HAL
open science

Caractérisation des figures myéliniques associées à l'accumulation de lipides polaires induites par différents oxystérols cytotoxiques identifiés dans les lésions athéromateuses: étude des relations entre apoptose et métabolisme des lipides

Anne Vejux

To cite this version:

Anne Vejux. Caractérisation des figures myéliniques associées à l'accumulation de lipides polaires induites par différents oxystérols cytotoxiques identifiés dans les lésions athéromateuses: étude des relations entre apoptose et métabolisme des lipides. Biochimie [q-bio.BM]. Université de Bourgogne, 2006. Français. NNT : . tel-00168283

HAL Id: tel-00168283

https://theses.hal.science/tel-00168283

Submitted on 27 Aug 2007

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

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

UNIVERSITE DE BOURGOGNE

U.F.R de MEDECINE

Année 2006 N° attribué par la bibliothèque :

THESE

Présentée pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BOURGOGNE

Mention : Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

Présentée et soutenue publiquement le 1er décembre 2006

par

Anne VEJUX

Caractérisation des figures myéliniques associées à l'accumulation de lipides polaires induites par différents oxystérols cytotoxiques identifiés dans les lésions athéromateuses: étude des relations entre apoptose et métabolisme des lipides

Directeur de thèse : Gérard LIZARD

Membres du jury :

Pr Bernard Mignotte (Professeur et Directeur d'études EPHE, Versailles)	Rapporteur
Dr Xavier Ronot (Directeur d'études EPHE, La Tronche)	Rapporteur
Dr Pierre Bischoff (Chargé de recherche INSERM, Strasbourg)	Examinateur
Dr Edmond Kahn (Directeur de recherche INSERM, Paris)	Examinateur
Pr Eric Solary (Professeur des Universités/Praticien Hospitalier, Dijon)	Président du Jury
Dr Gérard Lizard (Chargé de recherche INSERM, Dijon)	Directeur de thèse

Qu'il me soit permis de remercier,

Monsieur le Professeur Eric Solary, qui me fait l'honneur de présider mon jury de thèse,

Messieurs le Professeur Bernard Mignotte et **le Docteur Xavier Ronot** qui ont accepté de bien vouloir relire et critiquer ce travail. Qu'ils soient assurés de ma reconnaissance et de ma profonde considération,

Monsieur le Docteur Pierre Bischoff d'avoir accepté d'examiner ce travail,

Monsieur le Docteur Edmond Kahn pour sa collaboration lors de mon travail de thèse, et pour avoir accepté d'examiner ce travail,

Monsieur le Professeur Philippe GAMBERT, de m'avoir accueillie au sein du laboratoire INSERM U498,

Monsieur le Docteur Gérard LIZARD, mon directeur de thèse, pour m'avoir fait découvrir les méandres de la Science,

J'aimerais également remercier toute **l'unité INSERM U498** :

Arnaud Berthier pour sa gentillesse, sa disponibilité et pour m'avoir tout de suite aidée lors de mon arrivée au labo

Thomas Montange, pour sa gentillesse, sa disponibilité, pour nos discussions variées, pour tout le reste, j'espère que tu pourras trouver le poste que tu souhaites après ton EPHE, si un jour tu as le cafard pense à Bouddha !!

Marie-Charlotte Royer, pour sa bonne humeur, nos fous rires, les pauses café, « The Eye of the Tiger », DTC, pour toutes ses petites expressions bien marrantes, pour être restée toi-même. Je te souhaite le meilleur.

Anne Athias, Ginette Bessède (merci pour m'avoir aidée lors de mon DEA), Aurélia Boualam, Laure Dumont, Thomas Gautier, Alexis Klein (médaille d'or des paris coupe du monde de football 2006, à moi l'argent !!), Stéphanie Lemaire-Ewing, Laure Malvitte (merci pour les gouttes contre l'allergie et l'uvéite), Franck Ménétrier (pour les petites pauses café, les restos chinois !), Serge Monier (comment tu vas faire maintenant pour télécharger les mises à jour de Baldur ?), Naig Le Guern, Dominique Néel, Nicolas Ogier, Jean-Paul Pais De Barros (Ah la tarte au citron !), Céline Prunet, Martina Schneider, Zoulika Zak…

Nathalie Decologne (pour les sorties cinés et restos, les pauses café et les DVDs) et mon petit stagiaire préféré Christophe Maiza,

L'équipe BT : Daniela Lakomy, Cédric Rébé, Magalie Raveneau (la championne de Zuma, merci pour les petites causettes autour de la bouilloire, les restos …) et Arnold.

Toute l'équipe du **LBMC** (nouvelle équipe BMN du CRI !!) : Norbert Latruffe, Patrick Dutartre, Mustapha Cherkaoui Malki, Brigitte Jannin, Valerie Nicolas, Stéphane Savary, Pierre Andreoletti, Dominique Delmas, Marie-Claude Clémencet, Catherine Gondcaille, David Oaxaca-Castillo, Alan Lançon (tout ce qui ne me d…), Didier Colin, Fabien Gueugnon, Sabrina Leclercq, Aurore Vluggens, Ségolène, Marco and Co …

Ainsi que toute l'équipe de **l'unité FLAVIC**, département Œil et Nutrition, INRA pour m'avoir accueillie : Corinne Joffre, Lionel Bretillon, Niazi Acar, Olivier Berdeaux, Bénédicte Buteau, Stéphanie Cabaret, Stéphane Grégoire, Pierre Juanéda, Laurent Leclere, Marie-Annick Maire, Chantal Vicente ainsi que les doctorantes : Agnès André, Véronique Fournier, Coralie Schnebelen, Sabrina Viau et Omega 21 : Valérie Lasseigne et Florent Joffre. Et surtout Lucy Martine pour m'avoir fait partager ses connaissances en chromatographie.

A mes parents,

Maman sans toi je n’en serais pas là,

A mes grands-parents,

A Marie-France et Daniel,

A Jean-Marie et Danièle,

A Maryline et Romain.

A Alex,

A Audrey,

A Marie,

SOMMAIRE

Liste des figures…….- 6 -

Liste des tableaux……...- 8 -

Liste des abréviations……- 9 -

CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

I. AVANT PROPOS.....- 14 -

II. L'ATHEROSCLEROSE .....- 16 -

1. Généralités ..... - 16 -
2. Structure de la paroi vasculaire..... - 17 -
3. Anatomopathologie de l'athérosclérose..... - 18 -
4. Athérogenèse ..... - 24 -
   a. Les différentes théories ..... - 24 -
   b. Evolution de la plaque d'athérosclérose ..... - 25 -
      ⌘ Le rôle des lipoprotéines de basse densité dans l'athérosclérose ..... - 26 -
      ⌘ Le recrutement des monocytes ..... - 28 -
      ⌘ Formation des cellules spumeuses et progression de l'athérosclérose ..... - 31 -
5. Facteurs de risque ..... - 33 -
6. Athérosclérose et mort cellulaire ..... - 35 -

III. LES OXYSTEROLS.....- 38 -

1. Origine alimentaire ..... - 39 -
2. Origine endogène..... - 40 -
   a. Synthèse enzymatique..... - 40 -
   b. Synthèse par auto-oxydation du cholestérol ..... - 43 -
3. Nature des oxystérols identifiés *in vivo* ..... - 44 -
4. Métabolisme des oxystérols..... - 46 -
   a. Elimination et transformation des oxystérols..... - 46 -
   b. Transport des oxystérols ..... - 46 -
   c. Estérification des oxystérols ..... - 47 -
5. Récepteurs intracellulaires aux oxystérols..... - 48 -
   a. Récepteurs cytosoliques..... - 48 -
      ⌘ Les OSBPs : ..... - 48 -
      ⌘ Les ORPs..... - 49 -
      ⌘ L' AEBS..... - 51 -
      ⌘ Les récepteurs arylhydrocarbones ..... - 51 -
   b. Récepteurs nucléaires..... - 51 -
      ⌘ Les SREBPs ..... - 51 -
      ⌘ Les LXRs..... - 51 -
      ⌘ Le SF-1..... - 52 -
      ⌘ Autres récepteurs nucléaires..... - 53 -
6. Effets biologiques des oxystérols ..... - 53 -
   a. Oxystérols et homéostasie du cholestérol ..... - 53 -
      ⌘ Le cholestérol ..... - 53 -
      ⌘ Oxystérols et synthèse du cholestérol..... - 57 -
      ⌘ Oxystérols et estérification du cholestérol..... - 58 -

⌘ Oxystérols et absorption digestive du cholestérol ..... - 59 -
⌘ Oxystérols et transport reverse du cholestérol ..... - 59 -
b. Oxystérols et récepteur aux LDLs ..... - 60 -
c. Oxystérols et métabolisme des acides gras ..... - 61 -
d. Oxystérols et membrane cellulaire ..... - 62 -
e. Oxystérols, prolifération et différenciation ..... - 63 -
f. Oxystérols et immunité ..... - 64 -
g. Oxystérols et inflammation ..... - 65 -
7. Toxicité des oxystérols ..... - 66 -
a. Mort cellulaire induite par les oxystérols sur les cellules de la paroi vasculaire ..... - 66 -
⌘ L'apoptose ..... - 66 -
• Voie mitochondriale ..... - 67 -
• Voie des récepteurs de mort ..... - 68 -
⌘ L'autophagie ..... - 69 -
⌘ Le stress du reticulum ..... - 69 -
b. Propriétés cytotoxiques et mutagènes des oxystérols sur d'autres types cellulaires ..... - 70 -
⌘ Propriétés cytotoxiques ..... - 70 -
⌘ Propriétés mutagènes ..... - 71 -
c. Résistance des cellules aux oxystérols ..... - 71 -
8. Mélanges d'oxystérols ..... - 71 -
a. Effets des mélanges d'oxystérols sur l'expression de cytokines ..... - 72 -
b. Mélanges d'oxystérols et mort cellulaire ..... - 72 -

IV. MORT CELLULAIRE ..... - 74 -
1. Oncose ..... - 75 -
2. Autophagie ..... - 76 -
3. Apoptose ..... - 77 -
a. Les aspects morphologiques de l'apoptose ..... - 77 -
b. Différentes voies apoptotiques ..... - 78 -
⌘ La voie des récepteurs à domaine de mort ..... - 78 -
⌘ La voie intrinsèque mitochondriale ..... - 80 -
⌘ La voie de la p53 ..... - 82 -
⌘ La voie du Granzyme B ..... - 83 -
c. Les enzymes exécutrices de la mort par apoptose : les caspases ..... - 84 -
⌘ Nomenclature des caspases: ..... - 84 -
⌘ Classification, structure et localisation des caspases: ..... - 84 -
⌘ Activation des caspases ..... - 86 -
⌘ Substrats des caspases ..... - 86 -
⌘ Régulation des caspases ..... - 88 -
⌘ La caspase-2 ..... - 92 -
d. Les protéines de la famille Bcl-2 ..... - 93 -
e. La lipoapoptose ..... - 95 -
4. Le stress du réticulum ..... - 98 -
a. La signalisation UPR médiée par IRE1 et ATF6 ..... - 100 -
b. La signalisation UPR médiée par PERK ..... - 101 -
c. Rôles adaptatifs et cytotoxiques du système UPR dans la fonction cellulaire et la survie cellulaire . - 102 -
⌘ Le Système ERAD ..... - 102 -
⌘ Homéostasie du calcium ..... - 102 -
⌘ Biosynthèse des lipides ..... - 103 -
⌘ Mort cellulaire programmée associée au stress du reticulum ..... - 103 -

V. LA VOIE DE SIGNALISATION PI3-K/c-Akt ..... - 105 -
1. Les PI3-kinases ..... - 105 -
a. PI3-K de classe I ..... - 106 -
⌘ PI3-K de classe IA ..... - 107 -
⌘ PI3-K de classe IB ..... - 107 -
⌘ Régulation négative de la signalisation PI3-K ..... - 109 -
⌘ Fonctions biologiques des PI3-K de classe I ..... - 110 -
⌘ Applications médicales et industrielles possibles ..... - 110 -
b. PI3-K de classe II ..... - 111 -
c. PI3-K de classe III ..... - 111 -
2. c-Akt ..... - 112 -
a. Structure ..... - 112 -
b. Activation ..... - 112 -
c. Substrats et fonctions ..... - 115 -
d. Régulation négative ..... - 116 -
3. PDK-1 ..... -117 -
a. Structure ..... - 117 -
b. Activation ..... - 117 -
c. Substrats ..... - 118 -
d. Régulation négative ..... - 118 -

TRAVAUX DE RECHERCHE

I. CARACTERISATION DES FIGURES MYELINIQUES ..... - 120 -
1. Figures myéliniques et céroïdes ..... - 120 -
2. Relations entre figures myéliniques et autophagie ..... - 120 -
a. Coloration à la monodansylcadavérine ..... - 120 -
b. Effets de différents inhibiteurs d'autophagie sur la formation des figures myéliniques ..... - 126 -
c. Expression de marqueurs d'autophagie : la protéine LC3 ..... - 128 -
d. Determination de la composition lipidique des figures myéliniques avec le Nile Red associé à la technique de FRET et par chromatographie en phase gazeuse associée à la spectrométrie de masse ..... - 129 -

II. RELATIONS ENTRE FIGURES MYELINIQUES, ACCUMULATION DE LIPIDES ET ACTIVATION DES CASPASES ..... - 136 -

III. EFFETS DE LA VITAMINE-E SUR LA PHOSPHOLIPIDOSE ET LA VOIE DE SIGNALISATION PI3-K/PDK-1/Akt AU COURS DE LA MORT CELLULAIRE INDUITE PAR LE 7-CETOCHOLESTEROL ..... - 141 -

DISCUSSION

I. Marqueurs ultrastructuraux de la cytotoxicité des oxystérols ..... - 145 -

II. Relations figures myéliniques - céroïdes ..... - 145 -

III. Relations figures myéliniques et autophagie ..... - 146 -

IV. Rôles possibles des figures myéliniques ..... - 147 -
1. Réponse adaptative à l'accumulation de cholestérol ..... - 147 -
2. Oxystérols et lipoapoptose ..... - 148 -
3. Oxystérols et phospholipidose ..... - 149 -

V. Origines possibles des figures myéliniques ..... - 150 -

VI. Relations entre la formation des figures myéliniques, l'accumulation de lipides polaires et l'activité caspase ..... - 151 -

VII. Effets de la vitamine-E sur la formation des figures myéliniques et la voie PI3-K/PDK-1/Akt ……- 153 -

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES……..- 155 -

BIBLIOGRAPHIE……- 158 -

Liste des publications et communications……...- 207 -

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Coupe d'Artère 17
Figure 2: Lésion de type II. Artère humaine avec strie lipidique 19
Figure 3: Lésion de type Va: Plaque fibro-lipidique précoce 21
Figure 4: Lésion de type Vb 21
Figure 5: Lésion de type Vb – plaque d'athérosclérose aortique avec une calcification étendue 22
Figure 6: Lésion de type VI - Plaque athérosclérotique aortique en rupture 22
Figure 7: Lésion de type VIb 23
Figure 8: Lésion de type VIc 23
Figure 9: Structure d'une LDL (*Low Density Lipoprotein*) 26
Figure 10: Schéma général de la peroxydation lipidique 27
Figure 11: Initiation du développement d'une lésion 31
Figure 12: Progression de la lésion 31
Figure 13: Rupture de plaque et Thrombose 32
Figure 14: Structures chimiques du cholestérol et de ses dérivés oxydés majoritairement identifiés *in vivo* 38
Figure 15: Synthèse enzymatique du 27-hydroxycholestérol 41
Figure 16: Synthèse enzymatique du 25-hydroxycholestérol 42
Figure 17: Synthèse enzymatique du 24(S)-hydroxycholestérol 42
Figure 18: Auto-oxydation du cholestérol 43
Figure 19: Présentation schématique de la structure de la protéine OSBP avec les membranes de l'appareil de Golgi 48
Figure 20: Les différentes protéines ORPs (*OSBP-Related Protein*) humaines 49
Figure 21: Clivage régulé par les stérols de SREBP 51
Figure 22 : Voie de signalisation LXR dans les macrophages: implication sur le métabolisme des lipides, l'efflux de cholestérol et l'inflammation 52
Figure 23 : Synthèse du cholestérol 57
Figure 24 : Transformation du cholestérol en acides biliaires 58
Figure 25 : Rôles des gènes cibles de LXR dans l'homéostasie du cholestérol 59
Figure 26 : Différentes voies menant à la mort cellulaire 74
Figure 27 : Modèle schématique de l'autophagie 76
Figure 28 : Différentes voies apoptotiques: la voie Fas et la voie mitochondriale 79

Figure 29: Deux modèles non-exclusifs de perméabilisation de la membrane externe mitochondriale 80
Figure 30 : Molécules relarguées par la mitochondrie au cours de la mort cellulaire par apoptose 81
Figure 31 : Formation de l'apoptosome 82
Figure 32 : Analyse phylogénétique de la famille des caspases 84
Figure 33: Organisation des procaspases 85
Figure 34: Schéma d'activation des caspases 86
Figure 35: Spécificité de substrats des caspases 87
Figure 36 : Les trois sous-familles des protéines de la famille Bcl-2 93
Figure 37 : La voie de la synthèse *de novo* des céramides connue pour être la route majeure de la lipoapoptose dans les îlots de rats ZDF 95
Figure 38: Les trois détecteurs UPR 99
Figure 39 : Signalisation UPR médiée par IRE1 et ATF6 100
Figure 40 : Signalisation UPR médiée par PERK 101
Figure 41: Structure chimique du phosphatidylinositol 105
Figure 42: Caractéristiques structurales des membres de la famille PI3 kinase 106
Figure 43: Recrutement et activation des PI3K de classe IA 108
Figure 44: Recrutement et Activation des PI3K de classe IB 109
Figure 45 : Liste des différents stimuli activant la protéine kinase B (PKB/Akt) 112
Figure 46: Modèle d'activation de c-Akt 113
Figure 47 : Formule chimique de la monodansylcadavérine 121
Figure 48 : Coloration par la monodansylcavérine (MDC) de cellules U937 traitées ou non par le 7-cétocholestérol 121
Figure 49 : Fractionnement sub-cellulaire sur gradient de sucrose (10%-60%). 121
Figure 50 : Caractérisation des lipides neutres (cholestérol, 7-cétocholestérol) et polaires (phosphatidylcholine, sphyngomyéline) dans les échantillons issus du fractionnement sub-cellulaire 122
Figure 51 : Principe de la microscopie confocale 123
Figure 52 : Modèle mathématique de la FAMIS 125
Figure 53 : Effets de différents inhibiteurs d'autophagie sur le pourcentage de cellules U937 traitées ou non par le 7-cétocholestérol et colorées par la monodansylcadavérine (MDC) 127
Figure 54 : Analyse de la présence la protéine LC3-II par immunofluorescence indirecte 128
Figure 55 : Caractéristiques chimique et spectrale du Nile Red 129
Figure 56 : Conditions requises pour le FRET 130

Figure 57 : Formule chimique de la Filipine 133
Figure 58 : Analyse du cholestérol cellulaire en chromatographie en phase gazeuse après extraction selon la méthode de Folch 133
Figure 59 : Séquence des changements morphologiques associés au traitement par le 7-cétocholestérol. 135
Figure 60 : Analyse de la caspase-2 140
Figure 61 : Voies de signalisation induites par le 7-cétocholestérol 157

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Principales causes estimées de décès dans le monde en 2002 16
Tableau 2: Définition des lésions d'athérosclérose aux différents stades selon la classification de l'*American Heart Association* 18
Tableau 3: Principaux facteurs de risque cardio-vasculaire 33
Tableau 4: Nomenclature de certains oxystérols 38
Tableau 5: Enzymes impliquées dans la formation d'oxystérols *in vivo* 40
Tableau 6: Famille gène/protéine en relation avec les OSBPs 49
Tableau 7: Les différentes classes de PI3K et leurs caractéristiques: sous-unités, régulation, substrats. 107
Tableau 8 : Liste des substrats connus d'Akt 114

LISTE DES ABREVIATIONS

ABC : *ATP Binding Cassette*
ACAT : *Acyl CoA:cholesterol AcylTransferase*
ADN : Acide DesoxyriboNucléique
AEBS : *AntiEstrogene Binding Site*
AhR : récepteur arylhydrocarbone
AIF : *Apoptosis Inducing Factor*
ANT : *Adenine Nucleotide Translocator*
AP-1 : *Activator Protein-1*
Apaf-1 : *Apoptotic Protease Activating Factor-1*
Arf1p : *Adenosinediphosphate Ribosylation Factor*
ASK1 : A*poptosis-Signaling Kinase 1*
ATF6 : *Activating Transcription Factor 6*
ATP : adenosine triphosphate
ATPase : *Adenosine TriPhosphate phosphatase*

Bad : *Bcl-2 Antagonist of cell Death*
BAR : *Bifunctional Apoptosis Regulator*
Bcl-2 : *B-Cell Leukemia/Lymphoma 2*
BH : *Bcl-2 Homology Domain*
BH : *Breakpoint-cluster-region Homology*
Bim : *Bcl-2 Interacting Mediator of cell death*
BIR : *Baculovirus IAP Repeat*

CaMKK : *Calcium/calmodulin dependent Kinase Kinase*
CARD : *Caspase Recrutment Domain*
Caspase : *Cystein Aspartic Acid Protease*
CD36 : *Cluster Differentiation* 36
CE : cholestérol estérase
CETP : *Cholesterol Ester Transfer Protein*
CHOP/GADD153 : *C/EBP Homologous Protein-10/Growth Arrest- and DNA Damage-inducible genes*
CLSM : *Confocal Laser Scanning Microscopy*
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CML : cellules musculaires lisses
CNBP : *Cellular Nucleic acid Binding Protein*
COX2 : cyclooxygenase 2
CPG/SM : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
CrmA : *Cytokine Response Modifier A*
CRP : protéine reactive C
CYP : cytochrome P450

DD : *Death Domain*
DED : *Death Effector Domain*
DISC : *Death-Inducing Signalling Complex*
DMLA : Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age
DR : *Death Receptor*

ENTH : *Epsin N-Terminal Homology*
ERAD : *ER-Associated protein Degradation*

ERK : *Extracellular signal-Regulated Kinase*
ERSE : *Endoplasmic Reticulum Stress Elements*

FABPpm : *plasma membrane Fatty Acid-Binding Protein*
FADD : *Fas-Associated Death Domain*
FAK : *Focal Adhesion Kinase*
FAMIS : analyse factorielle de séquences d'images
FLIM : *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*
FLIP : protéine inhibitrice de Flice
FRET : *Fluorescence Resonance Energy Transfer*

GLUT4 : *GLUcose Transporter* 4
GRO-α : *Growth Regulated Oncogene*
GSK-3 : *Glycogen Synthase Kinase 3*
GTP : Guanosine TriPhosphate

HDL : *High Density Lipoproteins*
HEK : *Human Epithelial Kidney*
Hg : mercure
HMG-CoA : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A
HMG-CoA reductase : β-hydroxy-β-méthyl-glutaryl-coenzyme A réductase
HSP : *Heat Shock Protein*
HtrA2 : *High-temperature-requirement protein A2*
H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène
$HO^{\bullet}$: radical hydroxyl

IAP : Protéines Inhibitrices de l'Apoptose
ICAD : *Inhibitor Caspase-Activated Deoxyribonuclease*
ICAM : *endothelialI InterCellular Adhesion Molecule 1*
IDL : *Intermediate Density Lipoproteins*
IFN-γ : interferon γ
IKK : *IKappaB Kinase*
IL-1β : *interleukin-1β*
ILK : *Integrin-Linked Kinase*
Ire1p/Ern 1p : *Inositol requiring 1/ER to nucleus signaling 1*
IRF-1 : *Interferon Regulatory Factor-1*
iSH2 : *inter-SH2*

JAK : *Janus Activated Kinase*
Jam : *Junctional adhesion molecule*
JIK : *Jun N-terminal Inhibitory Kinase*
JNK : *c-Jun N-terminal Kinase*

laser : *light amplification by stimulated emission of radiation*
LCAT : *Lecithin-Cholesterol AcylTransferase*
LC3 : *microtubule-associated protein 1 light chain 3*
LDL : *Low Density Lipoproteins*
LDLox : LDL oxydées
LDL-receptor : *Recepteur aux LDLs*
LXR : *Liver X Receptor*
LFA-1 : *Leucocyte Function Associated-1*
Lp(a) : lipoprotéine a

MAC : *Mitochondria Apoptosis-induced Channel*
MAP kinases : *Mitogen-Activated Protein*
MAPKAPK2 : *MAPK-Activated Protein Kinase 2*
MCP-1 : *Macrophage Chemotactic Protein 1*
M-CSF : *Monocyte-Colony Stimulating Factor*
MDC : monodansylcadavérine
Mdm-2 : *Mouse Double-Minute 2 homologue*
MEK-1 : *Mitogen-activated protein kinase Kinase*
MIP-1β : *Macrophage Inflammatory Protein 1 beta*
MMAC1 : *Mutated in Multiple Advanced Cancers*
MTP : *Microsomal Triglyceride Transfer Protein*

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucleotide
NAIP : *Neuronal apoptosis inhibitory protein*
NEK6 : *NIMA-related protein Kinase-6*
NF-κB : *Nuclear Factor-kappa* B
NGFR :*Nerve Growth Factor Receptor*
NO : monoxyde d'azote
Nox : *NADPH oxidase*
NK : *Natural Killer*
Nrf2 *: NF-E2-related factor-2*

O_3 : ozone
ORP : *OSBP-Related Protein*
OSBP : *OxySterol Binding Proteins*
OSBPL : *OxySterol Binding Like-Protein*

PAF-AH : *Platelet Activating Factor-Acetylhydrolase ou lipoprotein-associated phospholipase A2*
PARP : *Poly(ADP-ribose)polymerase*
PDGF : *Platelet-Derived Growth Factor*
PDK-1 : *3'Phosphoinositide-regulated Kinase*
PECAM-1 : *Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*
PERK : *double-strand RNA-activated Protein kinase-like ER Kinase*
PH : *Pleckstrin Homology*
PI(3)P : phosphatidylinositol-3-phosphate
PI(4)P : phosphatidylinositol-4-phosphate
PI(4,5)P_2 : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PI(3,4,5)P_3 : phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PIF : *PDK-1-Interacting Fragment*
PIK : *PI-Kinase region*
PKB : *Protein Kinase B*
PLA_2 :*Phospholipase A_2*
PLAD : *Pre Ligand Assembly Domain*
PLTP : protéine de transfert des phospholipides
PMT : photomultiplicateur
PP2A : *Protein Phosphatase 2A*
PP1c : protéine phosphatase 1c
PRK2 : *Protein kinase C-Related protein Kinase-2*
PSGL-1 : *P-Selectin Glycoprotein-1*
PTEN : *Phosphatase and TENsin homologue deleted from chromosome 10*
PTPC : *Permeability Transition Pore Complex*
PXR : *Pregnana X Receptor*

RAC-PKα : protéine α en relation avec les protéines kinases A et C
RAIDD : *RIP-associated ICH1/CED-3-homologous protein with death domain*
RANTES : *Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted*
RING : *Really Interesting New Gene*
RIP *: Receptor Interactig Protein*
RSK : *Ribosomal protein S6 Kinase*
RXR : *Retinoid X Receptor*

S1P/S2P : *Site-1/2 Protease*
SAM : *Sterile Alpha Motif*
SCAP : *SREBP Cleavage Activating Protein*
SDF-1α : *Stroma cell-Derived Factor 1*
SERCA : *Sarco-Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase*
SF-1 : *Steroidogenic Factor-1*
SH2 : *Src Homology 2*
SH3 : *Src Homology 3*
SHIP : *145-kDa SH2-containing Inositol (poly)phosphate 5-Phosphatase*
SIMP : *Soluble Intermembrane Mitochondrial Proteins*
Smac/DIABLO : *Second Mitochondria-derived Activator of Caspase / Direct IAP-Binding protein with Low pI*
SP1 : *Site Protease 1*
SR-B1 : *Scavenger Receptor class B1*
SRE : *Sterol Responsive Element*
SREBP : *Sterol Response Element Binding Protein*
SRA-A : récepteur scavenger de classe A
STAT : *Signal Transducer and Activator of Transcription*
SXR : *Steroid X Receptor*

TEP1 : *TGFβ-regulated and Epithelial cell-enriched Phosphatase*
TGF-β1 : *Transforming Growth Factor β1*
Th1/Th2 : T helper 1/2
TNF-α : *Tumor Necrosis Factor* α
Tor : *Target of rapamycine*
TRADD : *Tumor Necrosis Factor Receptor 1 Associated protein with Death Domain*).
TRAIL : *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*
TRAF2 : *Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor 2*

UPR : *Unfolded Protein Response*
UV : Ultra-Violet

VCAM : *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*
VDAC : *Voltage Dependent Anion Channel*
VE-Cadherin : *Vascular Endothelial Cadherin*
VLA-4 : *Very Late Antigen-4*
VLDL : *Very Low Density Lipoproteins*
Vps34p : *Vacuolar protein sorting mutant*

XBP1 : *X-box DNA-Binding Protein*
XIAP : *X-linked Inhibitor of Apoptosis*

Contexte Bibliographique

I. AVANT PROPOS

L'athérosclérose est un processus dégénératif multifactoriel lent qui fait intervenir des phénomènes inflammatoires, oxydatifs et cytotoxiques. Dans les pathologies associées à l'athérosclérose (infarctus du myocarde, accidents vasculaires cérébraux, artérites), l'intervention des dérivés oxydés du cholestérol (appelés aussi oxystérols), et en particulier du 7-cétocholestérol et du 7β-hydroxycholestérol, est fortement suspectée en raison de la présence de ces composés en quantités importantes dans le plasma et les plaques d'athérome de sujets athéromateux. Ceux-ci interviendraient également dans certaines pathologies comme la maladie d'Alzheimer[1] et la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA)[2] (Koldamova *et al.*, 2003 ; Malvitte *et al.*, 2006). En effet, de récentes études ont montré que certains oxystérols, via leurs actions sur LXR (*Liver X Receptor*), diminuent la secretion d'amyloïde β dans des cellules du cerveau, ceci pourrait ainsi constituer une nouvelles stratégie thérapeutique (Koldamova *et al.*, 2003).

Les processus cytotoxiques intervenant au cours de l'athérosclérose affectent essentiellement les cellules musculaires lisses et les cellules d'origine monocytaire (en particulier les cellules spumeuses[3]). Les dérivés oxydés du cholestérol en position 7 (7-cétocholestérol et 7β-hydroxycholestérol) entraînent *in vitro* la mort par apoptose de ces cellules (Lizard *et al*, 1997 ; Miguet *et al*, 2001), et dans certains cas la sécrétion d'interleukines (MCP-1, MIP-1β, IL-8, et TNF-α) et l'expression sur l'endothélium vasculaire de molécules d'adhérence (Lemaire *et al*, 1998 ; Prunet *et al.*, 2006).

Il a été démontré au laboratoire que ces deux oxystérols induisaient la mort des cellules promonocytaires U937 en empruntant la voie mitochondriale de l'apoptose, c'est-à-dire en entraînant une chute du potentiel transmembranaire mitochondrial, une fuite dans le cytosol du cytochrome *c*, d'*Apoptosis Inducing Factor* (AIF) et de l'endonucléase G. Il s'en suit l'activation des caspases-9 et -3, celle-ci entraînant à son tour l'activation des caspases-9, -7 et -8.

---

[1] Maladie d'Alzheimer : démence sénile, caractérisée par des dépots extracellulaires de peptides β amyloïdes.
[2] La DMLA est une maladie dégénérative rétinienne chronique, évolutive et invalidante, aboutissant à la cécité, qui débute après l'âge de 50 ans.
[3] Les cellules spumeuses sont des cellules présentant une accumulation de lipides dans leur cytoplasme.

Des structures myéliniques[4] ont été observées, localisées dans le cytoplasme de ces cellules (Kahn *et al.*, 2004 ; Vejux *et al.*, 2005). De telles structures sont induites par du cholestérol non estérifié ainsi que par des oxystérols inducteurs de mort cellulaire (7-cétocholestérol, 7β-hydroxycholestérol). Leur morphologie, leur constitution biochimique, leurs caractéristiques antigéniques et leurs rôles physiologiques (protecteurs ou non dans le processus de mort) ainsi que les voies métaboliques impliquées dans leur genèse sont actuellement pratiquement inconnus. Nous nous sommes donc interessés à la nature de ces structures, dans des cellules monocytaires, traitées par différents oxystérols (7-cétocholestérol, 7β-hydroxycholestérol, 25-hydroxycholestérol, 5,6α-époxycholestérol, 5,6β-époxycholestérol).

Ceci nous a aussi mené à étudier les changements potentiels dans la composition en lipides des cellules traitées par ces oxystérols. En effet, des macrophages traités par du cholestérol non estérifié présentent des modifications de leur contenu en lipides notamment à travers la régulation de l'enzyme CTP :phosphocholine cytidylyltransférase (Shiratori *et al.*, 1995). Compte-tenu du rôle des caspases dans de nombreux processus physiologiques, nous nous sommes interessés à l'implication possible de celles-ci dans les changements du contenu en lipides des cellules.

En fonction de ces différentes observations, le travail de recherche réalisé a consisté :

-à caractériser les structures myéliniques au cours de la mort cellulaire induite par le 7-cétocholestérol

-à évaluer les relations entre l'accumulation de lipides induite par le 7-cétocholestérol et l'activité caspase

-à étudier la voie PI3-kinase / c-Akt (PKB, *Protein Kinase B*) dont l'inhibition peut déclencher la mort par apoptose.

[4] Les structures myéliniques sont des structures multilamellaires présentes dans le cytoplasme de cellules traitées par les oxystérols.

Rang	Cause des décès	Nombre annuel de décès ($x10^3$)
1	Cardiopathies ischémiques	7 208
2	Maladies cérébrovasculaires	5 509
3	Infections des voies respiratoires inférieures	3 884
4	VIH/SIDA	2 777
5	Bronchopneumopathie obstructive chronique	2 748
6	Affections périnatales	2 462
7	Tuberculose	1 566
8	Paludisme	1 272
9	Cancers Trachée/Bronches/Poumons	1 243
10	Accidents de la route	1 192
11	Affections neuropsychiatriques	1 112
12	Diabète sucré	988
13	Traumatismes auto-infligés	873
14	Cirrhose du foie	786
15	Néphrite/Néphrose	677
16	Cancers colorectaux	622
17	Cancers du foie	618
18	Rougeole	611
19	Violence	559
20	Affections maternelles	493

Tableau 1: Principales causes estimées de décès dans le monde en 2002 (Rapport sur la santé dans le monde 2004, OMS)

II. L'ATHEROSCLEROSE

1. Généralités

En 1958, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) donne une définition, descriptive, mais toujours d'actualité: « L'athérosclérose est une association variable de remaniement de l'intima des artères de gros et moyen calibre. Elle consiste en une accumulation focale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissus fibreux et de dépôts calcaires. Le tout est accompagné de modifications de la média. ».

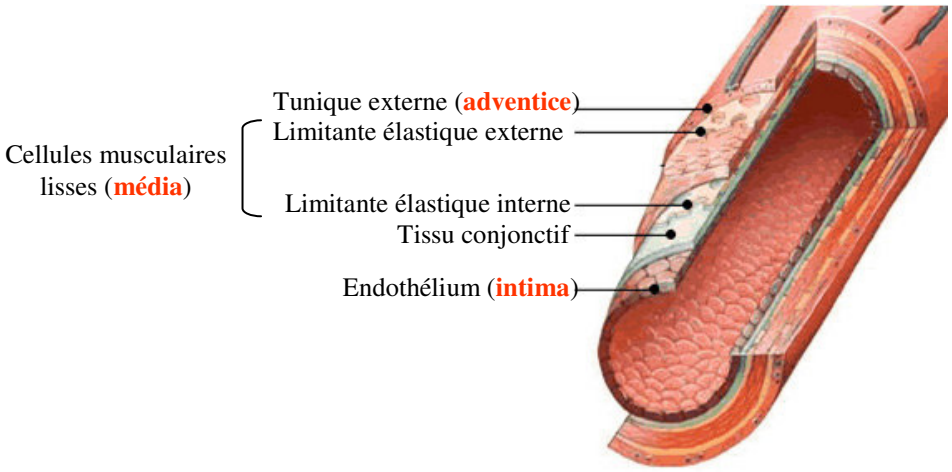
Le mot « athérosclérose », inventé par Félix Marchand en 1904, vient du grec *athéré* qui veut dire bouillie et de *skléros* qui veut dire dur.

L'athérosclérose n'est pas en elle-même une maladie, mais un processus focal qui est aussi et surtout le principal facteur de survenue des infarctus du myocarde, des accidents artériels cérébraux et de l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs.

En 2002, les complications de l'athérosclérose sont responsables des deux premières causes de mortalité dans le monde (Tableau 1). Les cardiopathies ischémiques sont responsables d'environ 7 millions de décès par an et les accidents vasculaires cérébraux de plus de 5 millions. La mortalité coronarienne est donc à la première place des causes de mortalité au niveau mondiale.

L'athérosclérose est une pathologie très complexe, elle fait intervenir aussi bien des facteurs métaboliques, environnementaux, vasculaires que génétiques. Les différents facteurs de risque de l'athérosclérose participent à la modulation de l'âge de survenue des lésions, la précocité des lésions et la rapidité de leur développement augmentent la fréquence de survenue d'une pathologie liée à l'athérosclérose.

A partir de différentes études anatomo-cliniques, d'imagerie vasculaire-clinique ainsi qu'épidémiologiques, la prévalence, l'extension et la distribution des lésions selon les territoires artériels, l'âge, le sexe et le type de lésion ont été déterminés. Celles-ci ont également démontré que la lésion d'athérosclérose est une lésion évolutive, passant par différents stades dont chacun est l'évolution du précédent. Ces lésions surviennent très tôt dans la vie, chez des jeunes enfants voir chez des nourrissons (Emmerich et Bruneval, 2000).



<u>Figure 1:</u> Coupe d'Artère

Les artères répondent toutes à un modèle commun d'organisation. Leur paroi est constituée de trois tuniques qui, de l'intérieur vers l'extérieur, sont: l'intima, la média et l'adventice. La tunique interne ou intima possède trois couches: 1°) l'endothélium reposant sur une lame basale mince, 2°) l'espace subendothelial contenant des fibres élastiques et de collagènes minces ainsi que des protéoglycanes, 3°) des cellules musculaires lisses orientées de manière longitudinale. La limitante élastique interne, relativement fine, possède une bande bien délimitée de fibres élastiques. La média est composée de cellules musculaires lisses. L'adventice est composée de tissu conjonctif contenant des quantités variable de fibres de collagène et élastiques.

2. Structure de la paroi vasculaire

La paroi artérielle est composée de trois couches cellulaires concentriques (Figure 1): l'intima, la média et l'adventice.

L'intima est la tunique la plus interne et la plus fine. C'est à son niveau que débute le développement de l'athérosclérose. Elle est constituée d'une couche unique de cellules endothéliales, imbriquées les unes dans les autres et formant une couverture étanche. Cet endothélium exerce différentes fonctions régulatrices telles que la synthèse de molécules vasoactives (NO (monoxyde d'azote), endothéline), la thromborésistance (synthèse de prostaglandine I2, antithrombine III, activateur tissulaire du plasminogène) ou la régulation des phénomènes immunitaires. Le sous-endothélium est formé de tissu conjonctif fibro-élastique. La couche sous-endothéliale est le site préférentiel de développement des lésions d'athérosclérose et sert de zone de stockage des lipoprotéines et des monocytes/macrophages provenant du sang. La limitante élastique interne (lame de fibres élastiques constituées d'élastine) sépare l'intima de la média.

La média est la tunique moyenne, le constituant principal de l'artère, elle est la plus épaisse. Elle est essentiellement constituée par des cellules musculaires lisses, empilées de façon concentrique en couches appelées unités lamellaires. Le nombre de ces couches varie suivant le type d'artère: d'une couche pour les artérioles, à plusieurs couches, pour les artères élastiques. Chaque unité lamellaire est composée de cellules musculaires lisses entourées d'une matrice extracellulaire constituée de protéines fibreuses et élastiques (collagène et élastine) et de mucopolysaccharides. Dans sa partie externe, la média reçoit l'irrigation des *vasa vasorum*[5] de l'adventice. La limitante élastique externe (lame d'élastine) sépare la média de l'adventice.

L'adventice est la tunique externe, elle se situe entre média et graisse péri-artérielle, elle est constituée par un tissu conjonctif peu organisé, riche en collagène et en fibres élastiques, et contenant des fibroblastes et des adipocytes. Elle assure l'ancrage de l'artère aux structures avoisinantes. Un réseau de nerfs vasomoteurs non myélinisés rejoint les fibres musculaires lisses de la media. Elle est irriguée par des *vasa vasorum* qui se prolongent dans la partie externe de la media.

---

[5] *Vasa vasorum* : capillaires dont la paroi n'est constituée que d'une seule cellule endothéliale.

Nomenclature	Principales caractéristiques
Type I, Lésion initiale	Dépôt de lipides dans un épaississement de l'intima Cellules spumeuses macrophagiques, esters de cholestérol
Type II, Strie Lipidique	Accumulation de cellules spumeuses dans l'intima Esters de cholestérol
Type III, Pré-athérome	Apparition de lipides extracellulaires Cellules spumeuses, lipides extracellulaires
Type IV, Athérome	Formation du cœur lipidique sans fibrose (cellules spumeuses, cristaux de cholestérol)
Type V, Fibro-athérome ou plaque simple -Va: cœur lipidique et chape fibreuse -Vb: en plus, calcifications -Vc: cœur lipidique minuscule ou absent	Individualisation de la chape fibreuse (collagène fibrillaire I et III, glycoprotéines, cellules musculaires lisses) Cœur lipidique (cellules musculaires lisses, lipides: esters de cholestérol, cholestérol libre, cholestérols oxydés, phospholipides)
Type VI, Fibro-athérome compliqué - VIa: ulcération - VIb: hématome ou hémorragie intraplaque - VIc: thrombose	Plaque instable par rupture, pouvant former un thrombus mural et/ou un hématome à l'intérieur de la plaque
Type VII, Lésion calcifiée	Plaque avancée, calcifiée
Type VIII, Lésion fibreuse	Plaque avancée, principalement formée de collagène

<u>Tableau 2</u>: Définition des lésions d'athérosclérose aux différents stades selon la classification de l'*American Heart Association*. (Stary, 2000)

3. Anatomopathologie de l'athérosclérose

Les lésions ont été classées en fonction du caractère évolutif dynamique de l'athérosclérose mis en évidence par des études anatomopathologiques et épidémiologiques.

La classification histogénétique proposée sous l'égide de l'*American Heart Association* (AHA) (Tableau 2) dans le cadre du *Committee on Vascular Lesions of the Council on Atherosclerosis* tient compte de ce caractère évolutif et reconnaît six principaux types lésionnels successifs (Stary, 2000).

Un épaississement fibro-musculaire de l'intima, présent dès la vie fœtale, se charge durant l'enfance et l'adolescence de cellules spumeuses (type I) pour devenir une strie lipidique[6] (type II). Les lésions de type I et II ne désorganisent pas la structure normale de l'intima, ne déforment pas l'artère et ne se manifestent pas cliniquement. Les lésions de type I et II sont incluses dans l'histoire naturelle de l'athérosclérose car la séquence des changements histologiques indique que, chez les individus symptomatiques, les lésions cliniques se développent à partir de ces changements au départ inoffensif. Chez le jeune adulte, la lésion de type III, lien histologique entre le type II et l'athérome (type IV), précède la plaque « simple » fibrolipidique (type IV et V). Ensuite les accidents de rupture avec thrombose et infiltration hémorragique surviennent (type VI). Aux âges avancés de la vie, on observe des plaques fortement calcifiées (type VII) ou exclusivement scléreuses (type VIII).

❖ Type I

Première lésion initiale, elle correspond à l'accumulation de cellules spumeuses, macrophages gorgés de lipides modifiés (cholestérol et ses dérivés oxydés appelés oxystérols), dans le sous-endothélium, plus précisément au niveau des coussinets intimaux. Ces coussinets sont formés naturellement par la paroi artérielle dans certains territoires, comme les zones d'écoulement turbulent, sous l'effet de forces de cisaillement. Il existe également à ce stade un début de prolifération de cellules musculaires lisses. Il n'y a aucune modification de la morphologie de la lumière vasculaire. Cette lésion ne se développera qu'à la suite d'une exposition à divers facteurs de risque, elle évoluera vers les stries lipidiques (Type II).

[6] Strie lipidique : cellules chargées de lipides organisées en petits amas dans la couche superficielle sous-endothéliale de l'intima et formant des lésions visibles macroscopiquement.

❖ Type II (Figure 2)

Il est caractérisé par l'accumulation d'un plus grand nombre de cellules spumeuses dans l'intima des artères. Ces cellules sont organisées en petits amas dans la couche sous-endothéliale de l'intima. Ces lésions sont l'évolution du type I. Elles peuvent soit régresser, soit évoluer vers des lésions plus avancées (type III).

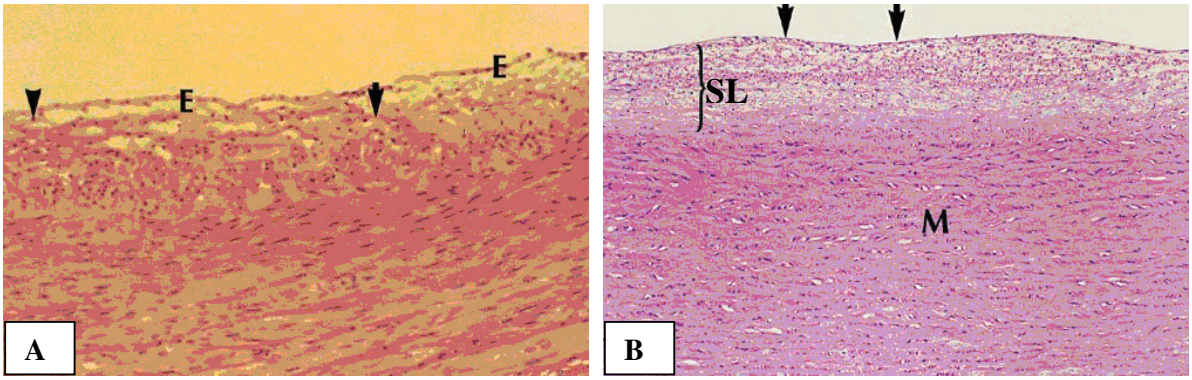


Figure 2: Lésion de type II. Artère humaine avec strie lipidique.

A: De nombreuses cellules sont présentes dans l'espace subendothélial: des macrophages spumeux (flèches) et des lymphocytes (têtes de flèches) sous un endothélium intact (E). (Hématoxyline Eosine, x 200)
B: Une strie lipidique (SL) développée sous un endothélium intact structurellement (flèches). Bien que la majorité des cellules dans l'espace subendothélial soit des macrophages spumeux, plusieurs lymphocytes sont aussi présents. La média (M) est intacte. (Hématoxyline Eosine, x 80).
(www.images.md)

❖ Type III

Ce type de lésion se caractérise par l'accumulation de lipides extracellulaires sous les cellules spumeuses.

❖ Type IV

Les lésions de type IV représentent les premières lésions avancées à cause d'une sévère désorganisation intimale, provoquée par le cœur lipidique (Stary *et al.*, 1995). Une accumulation dense de lipides extracellulaires occupe une région étendue mais bien définie de l'intima. Ce type d'accumulation de lipides extracellulaires est appelé « cœur lipidique » (Stary *et al.*, 1995). La lésion de type IV est aussi connue sous le nom d'athérome. Le cœur lipidique semble se développer à partir d'une augmentation de pools isolés de lipides extracellulaires qui caractérise la lésion de type III. Elles peuvent soit devenir des lésions compliquées thrombotiques (type VIc), soit évoluer en plaques fibreuses (type V).

❖ Type V

Ce type de lésion correspond à la définition de l'OMS citée précédemment. Les lésions de type V sont définies comme des lésions dans lesquelles un tissu conjonctif fibreux s'est formé (Stary *et al.*, 1995). Quand le nouveau tissu fait partie d'une lésion avec un cœur lipidique, cette lésion peut être référencée comme un fibroathérome ou une lésion de type Va (Figure 3). Une lésion de type V, avec un cœur lipidique ou d'autres parties de la lésion, calcifiés, peut être référencée comme une lésion de type Vb (Figures 4-5). Une lésion de type V avec un cœur lipidique absent et des lipides présents en quantités minimales peut être définie comme une lésion de type Vc (Stary *et al.*, 1995). Dans le cas de ces lésions, les artères ont une lumière rétrécie plus que dans le type IV. Comme avec le type IV, les lésions de type V peuvent développer des fissures, des hématomes et/ou une thrombose pour devenir une lésion de type VI (Stary *et al.*, 1995). Pour cette raison, ces lésions sont cliniquement importantes.

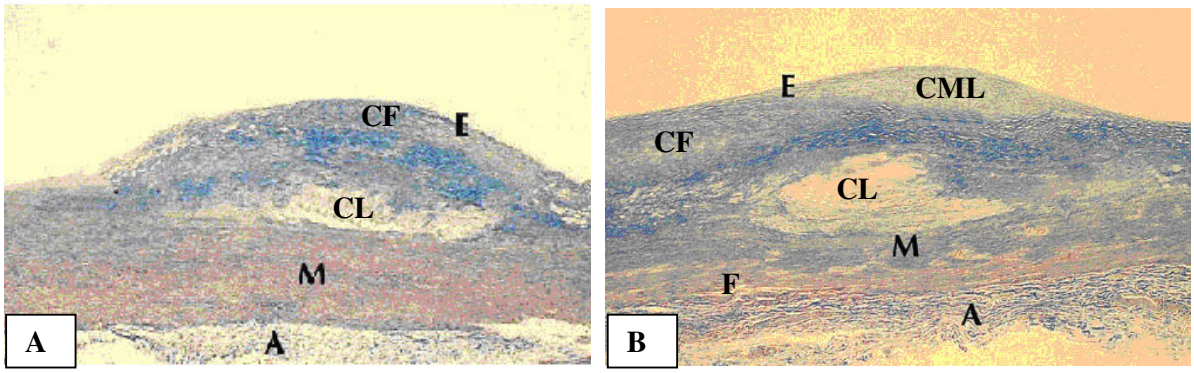
Le tissu conjonctif se forme dans et autour des régions de l'intima au niveau desquelles les accumulations importantes de lipides extracellulaires (cœur lipidique) désorganisent ou oblitèrent la structure normale de la cellule et de la matrice extracellulaire. Le nouveau tissu fibreux est composé de collagène et de cellules musculaires lisses riches en réticulum endoplasmique rugueux. Les capillaires, présents aux limites du cœur lipidique, peuvent être plus grands et plus nombreux que dans les lésions de type IV, ils peuvent être aussi présents dans le tissu nouvellement formé (Stary *et al.*, 1995).

Les lésions de type Va peuvent se présenter sous forme multicouches: plusieurs cœurs lipidiques, séparés par des couches épaisses de tissu fibreux conjonctif, sont empilés irrégulièrement les uns au dessus de autres (Stary *et al.*, 1995). Le terme « fibroathérome multicouches » peut être utilisé pour décrire cette morphologie.

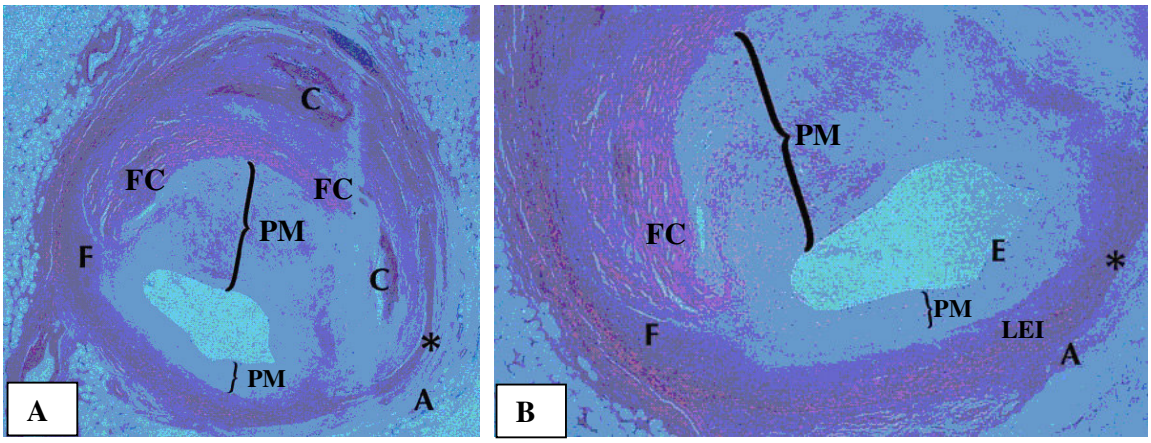
Les lésions, contenant une grande quantité de calcium, ont généralement aussi un tissu fibreux conjonctif plus important. Les lésions, dans lesquelles la minéralisation est la caractéristique dominante, sont appelées lésions de type Vb (calcifiées) (Figures 4-5) (Stary *et al.*, 1995). Les lésions calcifiées ont été dénommées lésions de type VII.

Dans les lésions de type Vc, souvent observées dans les artères des extrémités inférieures, l'intima normal est remplacée et épaissie avec du tissu fibreux conjonctif, alors que la composante lipidique est minimale voire absente (Stary *et al.*, 1995). Les lésions fibrotiques ont été dénommées lésions de type VIII.

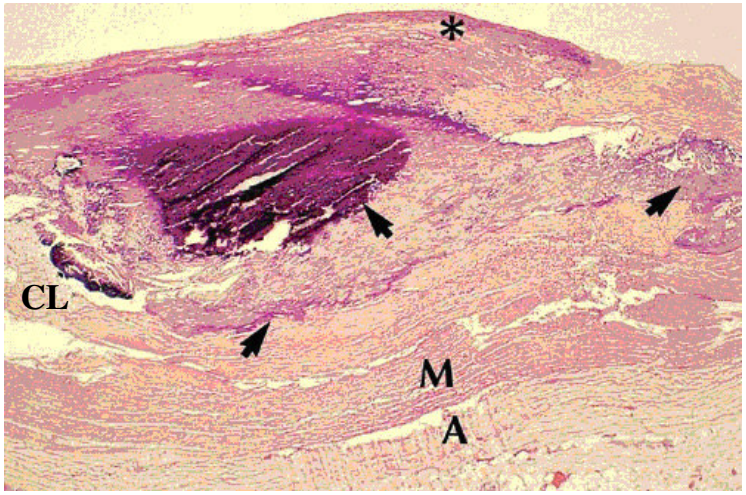
Les cellules musculaires lisses de la média adjacente, de l'intima transformée dans les lésions de type V, peuvent être désorganisées et leur quantité diminuée. La média et l'adventice adjacente peuvent contenir des accumulations de lymphocytes, macrophages et cellules macrophagiques spumeuses (Stary *et al.*, 1995).



<u>Figure 3:</u> Lésion de type Va: Plaque fibro-lipidique précoce.
A : La média sous le cœur lipidique (CL) apparaît fine avec une fibrose évidente (F). Les deux plaques présentent une chape fibreuse (CF) et un cœur lipidique d'importance modérée (CL). Lors de la progression des lésions intermédiaires, une chape fibreuse (CF) d'épaisseur variable se forme au-dessus de la lésion. **B** :La chape fibreuse est habituellement plus fine à l'endroit où s'accumulent les cellules spumeuses et les cellules musculaires lisses (CML). Le dépôt de tissu fibreux au niveau d'une plaque contribue significativement à la progression de la lésion qui apparaît être régulée par des facteurs de croissance agissant sur les fibroblastes et les cellules musculaires lisses. (Trichrome de Masson, x 80). A: adventice E: endothélium M: média.
(www.images.md)



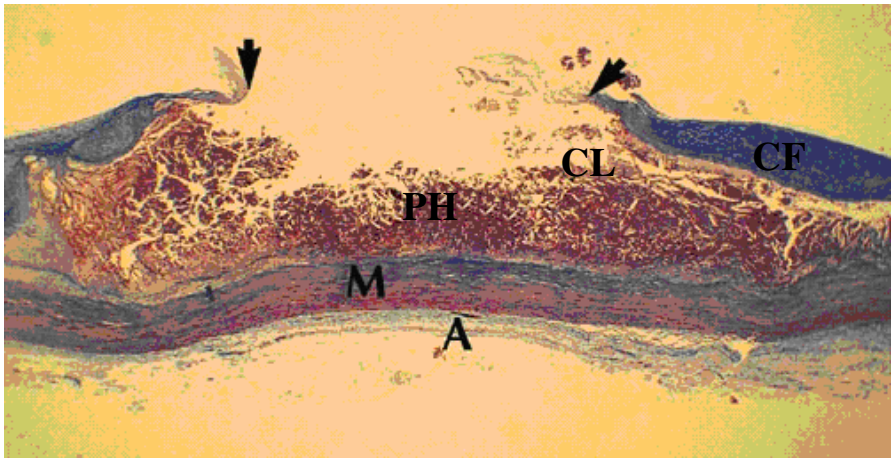
<u>Figure 4:</u> Lésion de type Vb.
La plaque fibro-lipidique calcifiée occupe les deux tiers de la lumière vasculaire. Un tissu fibro-musculaire s'étend entre la chape fibreuse (CF) de la plaque originale et la média (*) à travers une fissure (F) de la chape fibreuse au niveau de la région charnière. En plus d'être le site de croissance (recrutement de monocytes), les régions charnières de la plaque montrent une néovascularisation (angiogenèse). Des sites de calcification (C) sont présents à côté du site de prolifération myofibroblastique (PM). A: adventice ; E: endothélium ; LEI: limitante élastique interne (Hématoxyline Eosine, **A** x 40, **B** x 80)
(www.images.md)



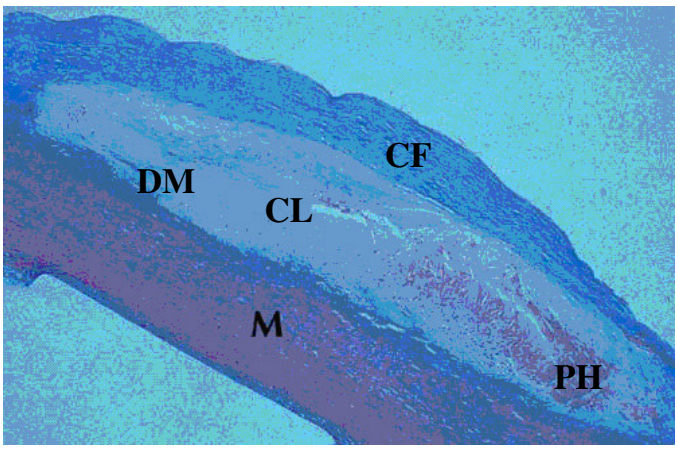
<u>Figure 5</u>: Lésion de type Vb – plaque d'athérosclérose aortique avec une calcification étendue. Bien que la plaque possède un coeur lipidique réduit (CL), la chape fibreuse entière (*) est calcifiée (flèches). (Hématoxyline Eosine, x 80). A: adventice ; M: média ; (www.images.md)

❖ Type VI

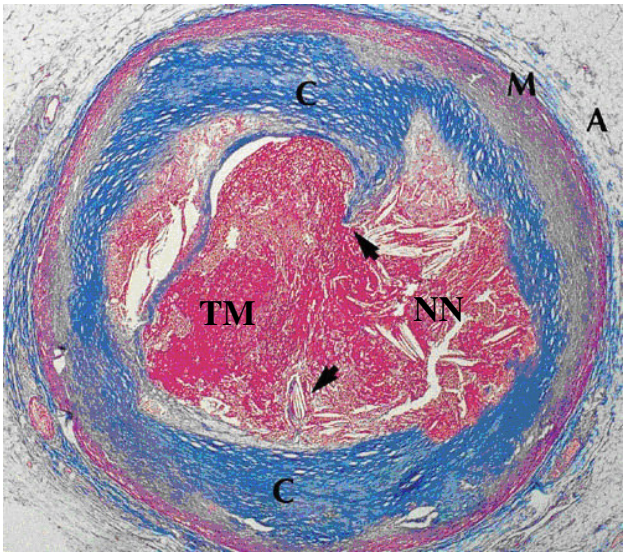
La morbidité et la mortalité de l'athérosclérose sont largement dues aux lésions de type IV et V dans lesquelles les ruptures de la surface de la lésion, les hématomes ou les hémorragies et les dépôts thrombotiques se sont développés (Stary *et al.*, 1995). Les lésions de type IV et V avec une ou plusieurs de ces caractéristiques additionnelles sont classifiées comme des lésions de types VI et appelées aussi lésions compliquées (Stary *et al.*, 1995). Ainsi, la rupture de la plaque est définie comme le type VIa (Figure 6), l'hématome ou l'hémorragie le type VIb (Figure 7) et la thrombose type VIc (Figure 8) (Stary *et al.*, 1995).



<u>Figure 6:</u> Lésion de type VI - Plaque athérosclérotique aortique en rupture.
Les extrémités rompues (flèches) de la chape fibreuse (CF) sont considérablement plus épaisses que le reste de l'intima riche en collagène. (Trichrome de Masson, x 380) A: adventice ; M: média ; PH: plaque hémorragique, CL: cœur lipidique. (www.images.md)



<u>Figure 7:</u> Lésion de type VIb.
La chape fibreuse (CF) s'amincit au niveau de la charnière droite de la plaque. Le cœur lipidique (CL) présente des centres hémorragiques (PH, plaques hemorragiques), bien qu'il n'y ait aucune communication apparente entre l'amas de lipides et la lumière vasculaire. La rupture des capillaires à côté du cœur lipidique peut être la source de ces hémorragies. Les couches inférieures de la média (M), à côté du cœur lipidique, sont focalement détruites. (Trichrome de Masson, x 20) DM: destruction de la média. (www.images.md)



<u>Figure 8</u>: Lésion de type VIc.
Il y a une rupture de la fine chape fibreuse (flèches), avec exposition du noyau nécrotique (NN) à la circulation générale et une thrombose murale (TM). (Trichrome de Masson, x 45) A: adventice ; M: média ; C: collagène. (www.images.md)

4. Athérogenèse

a. Les différentes théories

Différentes théories concernant l'athérogenèse ont été avancées.

La théorie d'incrustation, émise en 1852 par Karl Von ROKITANSKY, 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'athérogenèse.

La théorie inflammatoire: basée sur l'observation des modifications que subissait l'intima (prolifération de tissu conjonctif, calcification et dégénérescence graisseuse), cette théorie présentée par Rudolf VIRCHOW (1821-1902) dans les années 1860 avait été mise à l'écart pendant un peu plus d'un siècle.

La théorie de l'imbibition, dont dérive l'actuelle théorie lipidique, est née en 1908 à la suite d'expérimentations de IGNATOWSKI qui montra la relation, chez le lapin, entre un régime carné et la survenue de l'athérosclérose. IGNATOWSKI cherchait alors à prouver le lien entre régime alimentaire et apparition de la plaque. Et c'est en 1913 qu' ANITSCHOW et CHALATOW 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.

En 1973, ROSS et GLOMSET proposent l'hypothèse que l'athérosclérose est une « **réponse à l'effraction endothéliale** » (*response to injury*). Cette hypothèse a rapidement été révisée et modifiée. Elle peut être résumée ainsi. **1)** Beaucoup de facteurs (hyperlipidémie, diabète, hypertension, tabac, hyperhomocystéinémie …) peuvent endommager et activer l'endothélium. **2)** La dysfonction endothéliale mène à une augmentation de la perméabilité, les lipides et les cellules circulantes (particulièrement les lymphocytes et les monocytes qui deviennent des macrophages dans la paroi vasculaire) entrent dans l'espace sub-endothélial et forment la lésion initiale de l'athérosclérose: la strie lipidique. **3)** Comme le nombre de cellules augmente en même temps que l'accumulation de lipides, ceci peut augmenter la rupture de l'endothélium menant à des surfaces thrombogéniques au niveau desquelles les plaquettes peuvent adhérer. **4)** Les plaquettes, les macrophages, les cellules endothéliales et probablement les cellules musculaires lisses libèrent des facteurs de croissance provoquant la prolifération des cellules musculaires lisses et des fibroblastes. **5)** Ce processus mène à la formation de la plaque fibreuse et ultimement aux lésions avancées de l'athérosclérose (Schachter, 1997).

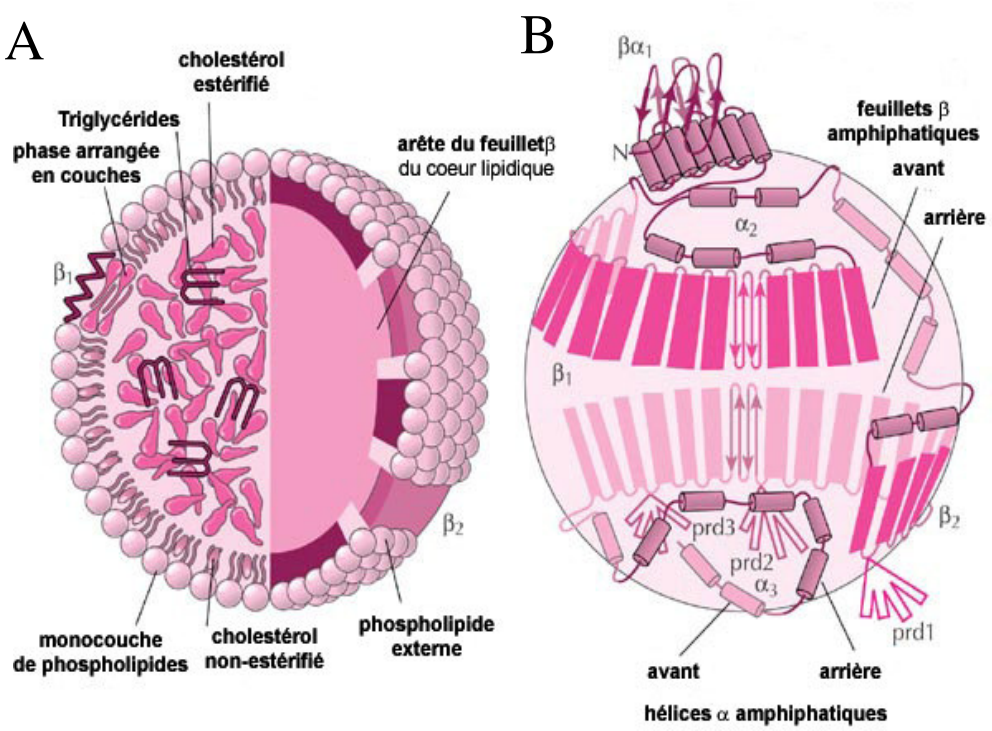
Cette hypothèse a été très controversée, car *in vivo* il n'a jamais été mis en évidence de rupture, de desquamation ou de dégénérescence des cellules endothéliales au niveau des plaques d'athérosclérose. L'endothélium conserve en effet son intégrité structurale.

Les études expérimentales les plus récentes, ainsi que les observations anatomo-pathologiques réalisées sur des plaques d'athérome humaines remettent en avant **la théorie inflammatoire**, avec la mise en évidence de la présence de cellules inflammatoires (macrophages et lymphocytes T) (Ross, 1999). Ceci démontre donc la survenue de processus inflammatoires dans les différentes lésions d'athérosclérose. Dès les premiers stades de l'athérosclérose, le processus inflammatoire intervient en réponse à une agression externe. Ensuite, la réaction inflammatoire mal contrôlée devient chronique et participerait alors à la progression de la lésion d'athérosclérose. Enfin, les complications thrombotiques associées à l'athérosclérose seraient aussi liées à l'état d'inflammation généralisée généré par la plaque d'athérosclérose (Tedgui & Mallat, 2001).

In fine, ces différentes théories sont proches dans certains domaines et très complémentaires. Initialement, la paroi vasculaire réagit à différents facteurs pathologiques, l'endothélium conservant son intégrité structurale. Ces différentes réactions conduisent au développement de l'athérosclérose. Ces facteurs peuvent être d'origine génétique, liés aux composants chimiques du sang ou aux influences environnementales.

b. Evolution de la plaque d'athérosclérose

Les lésions d'athérosclérose se développent dans certaines zones prédisposées des artères de gros et moyen calibre, au niveau des zones de bifurcations artérielles où les forces de cisaillements « shear stress », forces biomécaniques déterminées par le flux sanguin, la géométrie des vaisseaux et la viscosité du fluide, sont faibles. Il s'agit des bifurcations carotidiennes, des artères coronariennes, de l'aorte abdominale et des artères des membres inférieures. Dans ces zones, où il existe une stase des particules circulantes, l'exposition locale de l'endothélium et de la paroi artérielle aux agents athérogènes est accrue. Ceci explique le développement préférentiel des lésions d'athérosclérose à ces niveaux.



<u>Figure 9:</u> Structure d'une LDL (*Low Density Lipoprotein*) (Segrest *et al.*, 1994)
A: La LDL est la particule majeure du transport du cholestérol chez l'être humain et dans d'autres espèces, avec un cœur constitué principalement d'esters de cholestérol et d'une petite quantité de triglycérides et une surface composée de cholestérol non-estérifié et de phosphatidylcholine.
B: L'apolipoprotéine B-100, pratiquement l'unique apoprotéine au niveau de la surface, sert de ligand pour le récepteur aux LDL qui favorise la consommation des LDL par les cellules. Elle est constituée de 3 hélices α et de 2 feuillets β.

On peut ainsi diviser l'évolution de la plaque d'athérosclérose en différentes étapes:

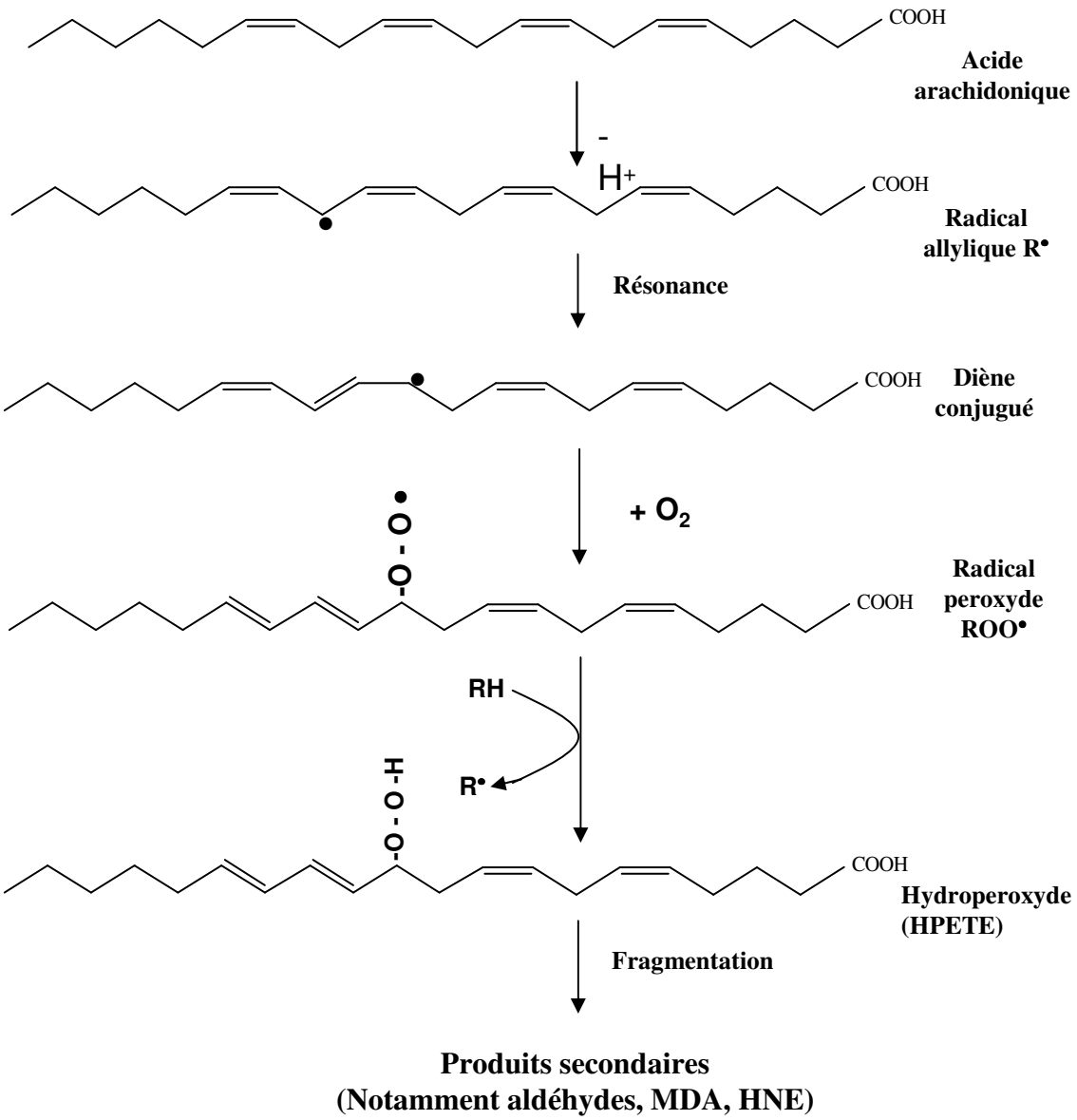
1. Pénétration des LDLs (*low density lipoprotein)* au niveau de l'intima.
2. Oxydation de ces LDLs.
3. Activation des cellules endothéliales ; adhésion des monocytes à l'endothélium et pénétration de ces monocytes au niveau de l'intima.
4. Formation des cellules spumeuses à partir des macrophages et des cellules musculaires lisses (CMLs).
5. Prolifération des cellules musculaires lisses (CMLs) et migration de ces CMLs de la media vers l'intima.
6. Sécrétion de collagène, de fibres élastiques et de protéoglycanes par les CMLs.
7. Accumulation de tissu conjonctif, de lipides, de CML et de cellules spumeuses.
8. Formation du noyau lipidique à partir des éléments lipidiques accumulés.
9. Ulcération de la paroi vasculaire et mise à nu du sous-endothélium.
10. Adhésion et activation plaquettaire provoquant une thrombose.

Ainsi les LDLs (Figure 9), les cellules endothéliales, les monocytes et les cellules musculaires lisses sont les différents acteurs de l'athérosclérose.

⌘ Le rôle des lipoprotéines de basse densité dans l'athérosclérose

Les lipoprotéines transportent la majeure partie des lipides dans l'organisme. Ces lipoprotéines sont constituées d'un cœur hydrophobe entouré par une couronne de phospholipides, cholestérol et protéines (Figure 9). Les protéines sont des apoprotéines. Elles solubilisent les lipides hydrophobes et jouent un rôle majeur dans le ciblage cellulaire et le métabolisme des lipoprotéines. On classe les lipoprotéines en fonction de leur densité. Des moins denses au plus denses, on distingue : les chylomicrons, les lipoprotéines de très basse densité (*Very Low Density Lipoproteins* : VLDL), les lipoprotéines de densité intermédiaire (*Intermediate Density Lipoproteins* : IDL), les lipoprotéines de basse densité (LDL), et les lipoprotéines de haute densité (*High Density Lipoproteins* : HDL). Des transferts de lipides ou d'apoprotéines sont possibles entre les différentes lipoprotéines.

Des études *in vitro* ont montrées les propriétés athérogènes des LDLs petites et denses. Ces dernières possèdent en effet une affinité plus faible pour le récepteur aux LDLs et une résistance plus faible au stress oxydant.



<u>Figure 10:</u> Schéma général de la peroxydation lipidique

En exemple, l'acide arachidonique, composant polyinsaturé des phospholipides et des esters de cholestérol des LDL, est transformé en hydroperoxyde lipidique, l'acide hydroperoxyeicosatétranoïque (HPETE), suite à la perte d'un atome d'hydrogène lors d'une attaque radicalaire et de l'addition de l'oxygène moléculaire. La fragmentation de cet hydroperoxyde peut ensuite donner lieu à la formation de produits secondaires tels que des aldéhydes à courte chaîne possédant des activités chimiques et biologiques élevées. Le radical R• peut subir un nouveau processus de peroxydation lipidique. HNE : HydroxyNonEnal ; MDA: MalonDiAldéhyde

La traversée de l'endothélium vasculaire par les LDLs initie le processus d'athérogenèse. La pénétration des LDLs dans l'espace sous-endothélial est inversement proportionnelle à leur taille, ce qui fait jouer un rôle prépondérant aux LDLs denses et de petites tailles dans l'athérosclérose.

L'oxydation des LDLs est une étape prépondérante dans l'athérogenèse. Elle se produit majoritairement *in situ*, dans la paroi (Steinberg, 1997). On ne retrouve en effet que de très faibles quantités de LDLs oxydées (LDLox) circulantes alors qu'elles sont présentes en abondance dans la plaque d'athérosclérose (Chisolm & Steinberg, 2000). L'oxydation des composants lipidiques ou peroxydation lipidique se déroule en plusieurs étapes (Figure 10). Il se produit tout d'abord une phase d'initiation où les radicaux oxygénés s'attaquent aux lipides des LDLs. Les lipides oxydés sont principalement ceux présentant une double liaison.

Dans une seconde phase, il y a une propagation, aux autres lipides, des modifications chimiques induites par l'oxydation des lipides insaturés. Cette deuxième phase dépend en partie de l'enzyme PAF-AH (*Platelet Activating Factor-Acetylhydrolase ou lipoprotein-associated phospholipase A2*) qui possède une activité phospholipase A2 (Navab *et al.*, 1996). Ceci conduit dans une troisième phase à la dégradation et à la libération de fragments lipidiques. Il y a alors formation de peroxydes et d'aldéhydes de lipides. Les aldéhydes formés peuvent alors se lier à l'apolipoprotéine ApoB100 (Figure 9), ligand clé du récepteur cellulaire des LDLs, via des résidus lysine ce qui modifie son activité physiologique. Il s'ensuit une modification covalente de l'apoB100 avec augmentation de sa charge négative, entraînant une perte de la reconnaissance par le récepteur des LDLs natives, mais lui conférant la capacité de se lier aux récepteurs « *scavenger* » (SRA-A et CD 36) (Berliner *et al.*, 1995).

Les forces de cisaillement influencent directement l'intégrité de l'endothélium et ainsi sa perméabilité, ceci est en partie du à la modulation des fonctions contractiles du cytosquelette. Des forces de faible intensité peuvent ainsi augmenter le temps de passage des LDLs et ainsi favoriser leur pénétration dans l'endothélium (VanderLaan *et al.*, 2004). Suite à leur pénétration et à leur rétention, les LDLox s'accumulent dans l'espace sous-endothélial, déclenchant le recrutement et l'infiltration de monocytes circulants dans l'intima, conduisant à la constitution de stries lipidiques à la surface luminale (Ross, 1999 ; Nordestgaard & Nielson, 1994 ; Boren *et al.*, 2000). Des forces de cisaillements faibles, comme il en existe au niveau des zones de prédisposition de l'athérosclérose, favorisent donc la consommation des LDLox par les macrophages (Niwa *et al.*, 2004).

⌘ Le recrutement des monocytes

En conditions normales, le recrutement de monocytes au sein de la paroi artérielle et leur différenciation en macrophages est un phénomène protecteur qui permet l'élimination des LDLox cytotoxiques et pro-inflammatoires ainsi que des cellules apoptotiques. Mais l'accumulation de macrophages chargés en LDLox peut induire la formation d'une lésion athérosclérotique. Le recrutement des monocytes aux sites de dysfonction endothéliale est régulé par des molécules d'ahésion exprimées à la surface de l'endothélium vasculaire. Les forces de cisaillement, faibles, influencent l'adhésion des leucocytes à l'endothélium activé, en favorisant l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion (Cunningham & Gotlieb, 2005). Ces molécules d'ahésion appartiennent à la famille des sélectines, aux ligands des sélectines, aux intégrines et aux immunoglobulines (Huo & Ley, 2001). Les LDLox sont également des stimuli majeurs pour l'expression de ces molécules d'adhésion. La régulation transcriptionnelle des molécules d'adhérence est sous la dépendance du facteur de transcription NF-κB (*Nuclear Factor-kappa* B), qui peut être activé par les LDLox (Berliner *et al.*, 1995) ou par les cytokines inflammatoires TNF-α (*Tumor Necrosis Factor* α) et IL-1β (*interleukin-1β*) (Tedgui & Mallat, 2001).

***Les sélectines : « le rolling »**

Les sélectines sont responsables du phénomène de « rolling » des leucocytes à la surface de l'endothélium (Giddings, 2005). Ce phénomène correspond à l'établissement puis à la rupture des liaisons établies entre les sélectines, exprimées par les cellules endothéliales, avec leurs ligands exprimés, à la surface des leucocytes, et se traduit par un ralentissement des leucocytes qui roulent à la surface de l'endothélium. La E-sélectine et la P-sélectine sont exprimées au niveau de l'endothélium activé, alors que la L-sélectine est constitutivement exprimée par l'endothélium.

Le principal ligand de ces sélectines est la *P-Selectin Glycoprotein-1* (PSGL-1). L'inhibition du phénomène de « rolling » se traduit par une forte diminution de l'adhésion des leucocytes au site inflammatoire. Ainsi, sur un modèle de carotide isolée et perfusée de souris athérosclérotiques ApoE$^{-/-}$, Ramos *et al.* ont observé une forte diminution du « rolling » et de l'attachement des leucocytes mononuclées en présence d'anticorps anti P-sélectine ou anti PSGL-1 (Ramos *et al.*, 1999). D'autre part, la taille des plaques d'athérome observées à 4 mois au niveau de l'aorte des souris obtenues par croisement de souris P-sélectine$^{-/-}$ et apoE$^{-/-}$ est 3,5 fois plus faible que celle de souris apoE$^{-/-}$ (Dong *et al.,* 2000).

Le rôle de la E-sélectine dans la formation de la plaque d'athérome est controversée. Ainsi O'Brian a observé en immunohistochimie sur des aortes humaines que la E-sélectine est exprimée dans 32% des plaques et est absente des aortes saines (O'Brian *et al.,* 1996). En revanche, Iiyama *et al.* n'ont pas détecté la présence de la protéine ou de son ARNm chez la souris et chez le lapin (Iiyama *et al.*, 1999).

***Les immunoglobulines et VCAM-1 : adhésion et transmigration**

L'adhésion des leucocytes à travers l'endothélium nécessite une interaction entre les immunoglobulines, molécules d'adhésion exprimées à la surface de l'endothélium vasculaire, et leurs ligands, des intégrines exprimées par les leucocytes. Cette liaison permet la transition entre la phase de « rolling » et une adhésion ferme des leucocytes à la surface de l'endothélium. Les molécules de la superfamille des immunoglobulines sont des protéines transmembranaires possédant une série de motifs extracellulaires communs à ceux des immunoglobulines G (IgG-like domains) et un court domaine cytoplasmique. Parmi les molécules d'adhésion appartenant à cette superfamille, on distingue les molécules d'adhésion intercellulaires 1, 2 et 3 (ICAM-1, 2, 3), la molécule d'adhésion endothéliale et plaquettaire 1 (PECAM-1 ou CD31) et la molécule des cellules vasculaires 1 (VCAM-1).

Leurs ligands, les intégrines, sont des hétérodimères composés d'une sous-unité β liée de manière non covalente à une sous-unité α. Les intégrines formées avec la sous-unité β_1 (CD29, *Cluster Differention*) sont aussi appelées antigènes très tardifs (VLA, *Very Late Antigen*) car elles sont exprimées tardivement par les lymphocytes à la suite de leur activation. L'une d'elles, VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$) est le principal ligand de VCAM-1. ICAM-1, 2 et 3 (*endothelial InterCellular Adhesion Molecule 1*) sont des ligands de l'intégrine LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$) (*Leucocyte Function Associated-1*), et ICAM-1 et 2 lient également Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$). PECAM-1 (*platelet/endothelial cell adhesion molecule-1*) est un ligand de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ mais réalise principalement des liaisons homotypiques avec des molécules PECAM-1 exprimées à la surface d'autres cellules. Les expressions de ICAM-1 et VCAM-1 sont augmentées ou induites lors d'une activation endothéliale. En effet, des molécules, présentes dans les LDLox comme la lysophosphatidylcholine, peuvent augmenter la transcription du gène VCAM-1 (Kume *et al.*, 1992). En revanche, PECAM-1 est constitutivement exprimée par l'endothélium.

Les trois principales molécules d'ahésion dont l'expression est induite au niveau de l'endothélium lors de la formation de la plaque d'athérome sont donc la P-sélectine, VCAM-1 et ICAM-1 (Huo & Ley, 2001).

La transmigration endothéliale ou diapédèse est un processus rapide durant lequel le leucocyte émet un pseudopode pour franchir la barrière endothéliale. Il nécessite le désassemblage du cytosquelette du leucocyte du côté apical de l'endothélium puis son réassemblage dans l'espace sous-endothélial. Deux interactions moléculaires homophiliques jouent un rôle majeur lors de la diapédèse : la liaison PECAM-1/PECAM-1 et la liaison CD99-CD99. Des études réalisées *in vitro* et *in vivo* indiquent que la suppression ou le blocage de l'une ou l'autre de ces molécules stoppe la diapédèse des leucocytes (Schenkel *et al.,* 2002 ; Bogen *et al.,* 1994). Cependant, lorsque PECAM-1 est bloquée, les leucocytes sont stoppés en surface de l'endothélium alors que lorsque CD99 est bloqué, ils sont stoppés à l'intérieur de la jonction endothéliale, ce qui indique que CD99 est impliqué lors d'une étape distale de celle impliquant PECAM-1. Les molécules d'adhésion Jam-A (*Junctional adhesion molecule*), B et C et la *Vascular Endothelial Cadherin* (VE-Cadherin) sont également impliquées dans ce processus.

Le signal de transmigration nécessite une augmentation transitoire de la concentration calcique à l'intérieur des cellules endothéliales adjacentes au site de transmigration (Huang *et al.,* 1993). Ce signal active la chaîne légère de la myosine et induit la rétractation des cellules endothéliales. Il est induit par des protéines cationiques solubles relarguées par les leucocytes activés ainsi que par la liaison des leucocytes aux sélectines et à VCAM-1.

***Les cytokines[7]**

L'IL-1β, le TNF-α, et l'IFN-γ favorisent le recrutement des monocytes, des lymphocytes T et *Natural Killer* au site inflammatoire en stimulant la libération des facteurs chimioattractifs : MCP-1 (*Macrophage Chemotactic Protein 1*), l'interleukine 8 (IL-8) (se lie aux récepteurs CXC 2 (CXCR-2)) (Glass & Witztum, 2001 ; Libby, 2002) et la fractalkine par les macrophages, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (Vanderlaan & Reardon, 2005). Le recrutement des monocytes est aussi amplifié par les plaquettes activées, *via* RANTES (*Regulated*

[7] Les cytokines, petites protéines ou glycoprotéines solubles, sont des molécules de signalisation intercellulaire qui sont sécrétées dans le milieu interstitiel par de nombreuses cellules activées en réponse à une agression. Elles régulent la prolifération, la migration, la différenciation ou l'apoptose des cellules.

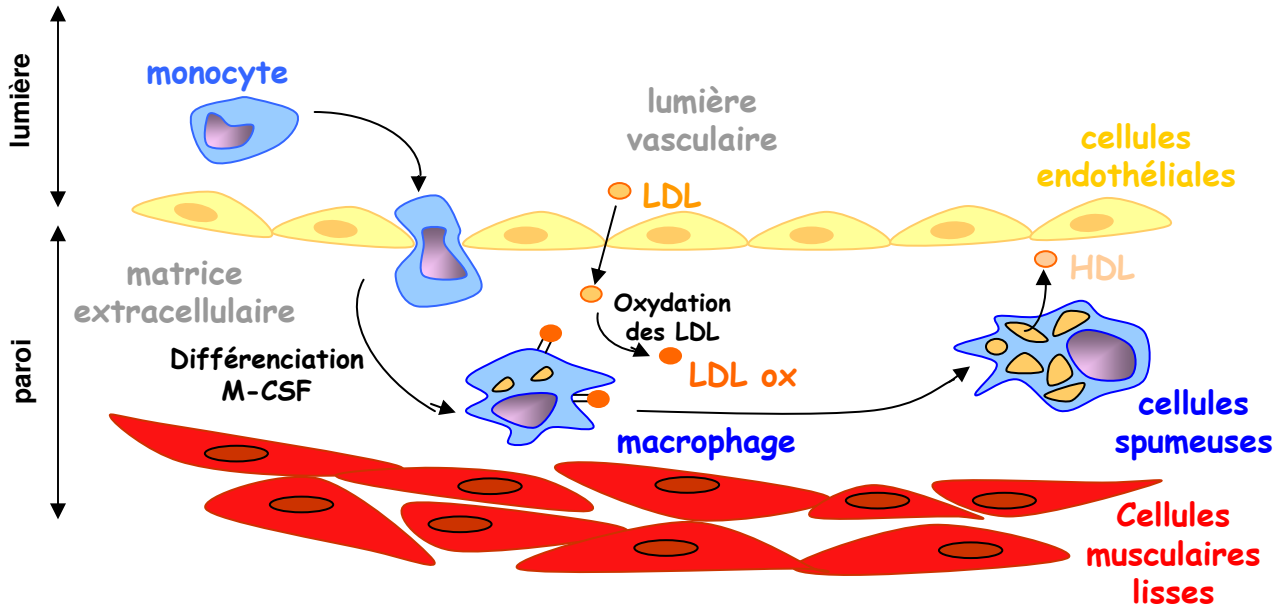


Figure 11: Initiation du développement d'une lésion (Glass & Witztum, 2001)
Les LDL sont sujets à des modifications oxydatives dans l'espace sous-endothélial. Les monocytes s'attachent aux cellules endothéliales qui ont été induites pour exprimer des molécules d'adhésion par les cytokines et les LDL modifiées de manière minime. Les monocytes adhérents migrent dans l'espace sous-endothélial et se différencient en macrophages. La consommation des LDL oxydées (LDLox) via les récepteurs scavengers mène à la formation de cellules spumeuses.

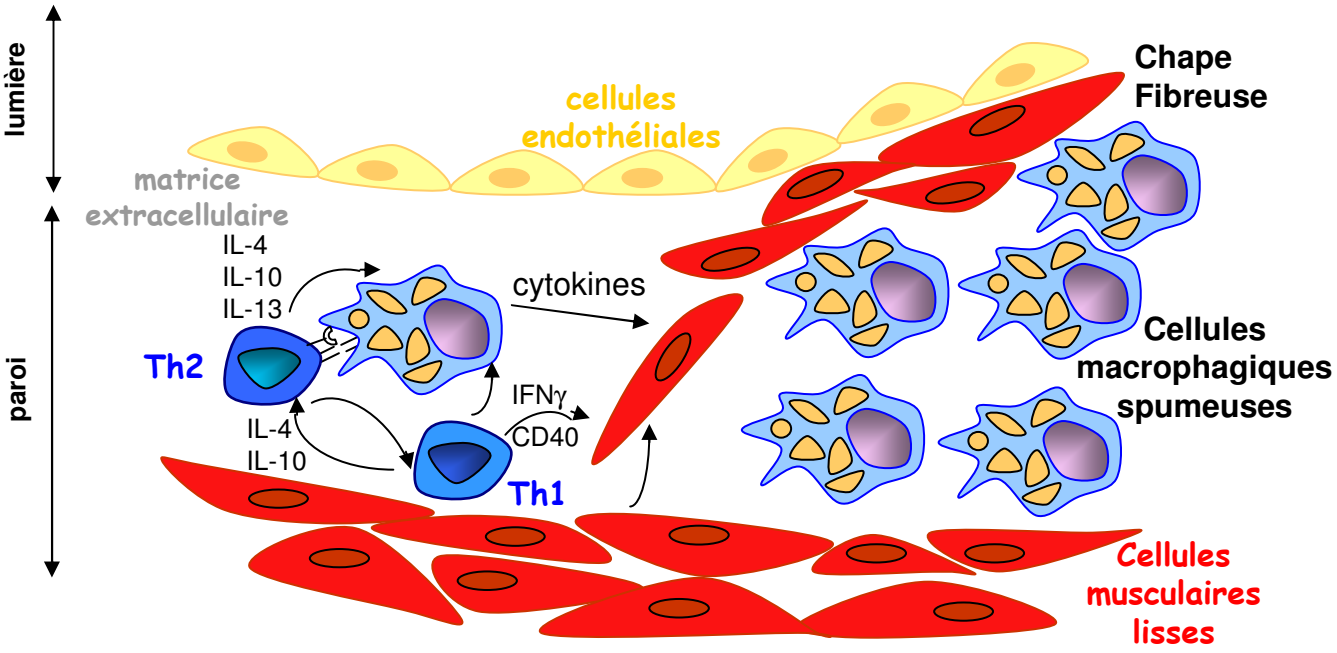


Figure 12: Progression de la lésion (Glass & Witztum, 2001)
Les interactions entre les cellules macrophagiques spumeuses et les cellules Th1 et Th2 établissent un processus inflammatoire chronique. Les cytokines, secrétées par les lymphocytes et les macrophages, exercent des effets pro- et anti-athérogèniques sur chaque élément du mur vasculaire. Les cellules musculaires lisses migrent de la portion médiane du mur artériel, prolifèrent et secrètent des protéines de matrice extracellulaire qui forment une plaque fibreuse

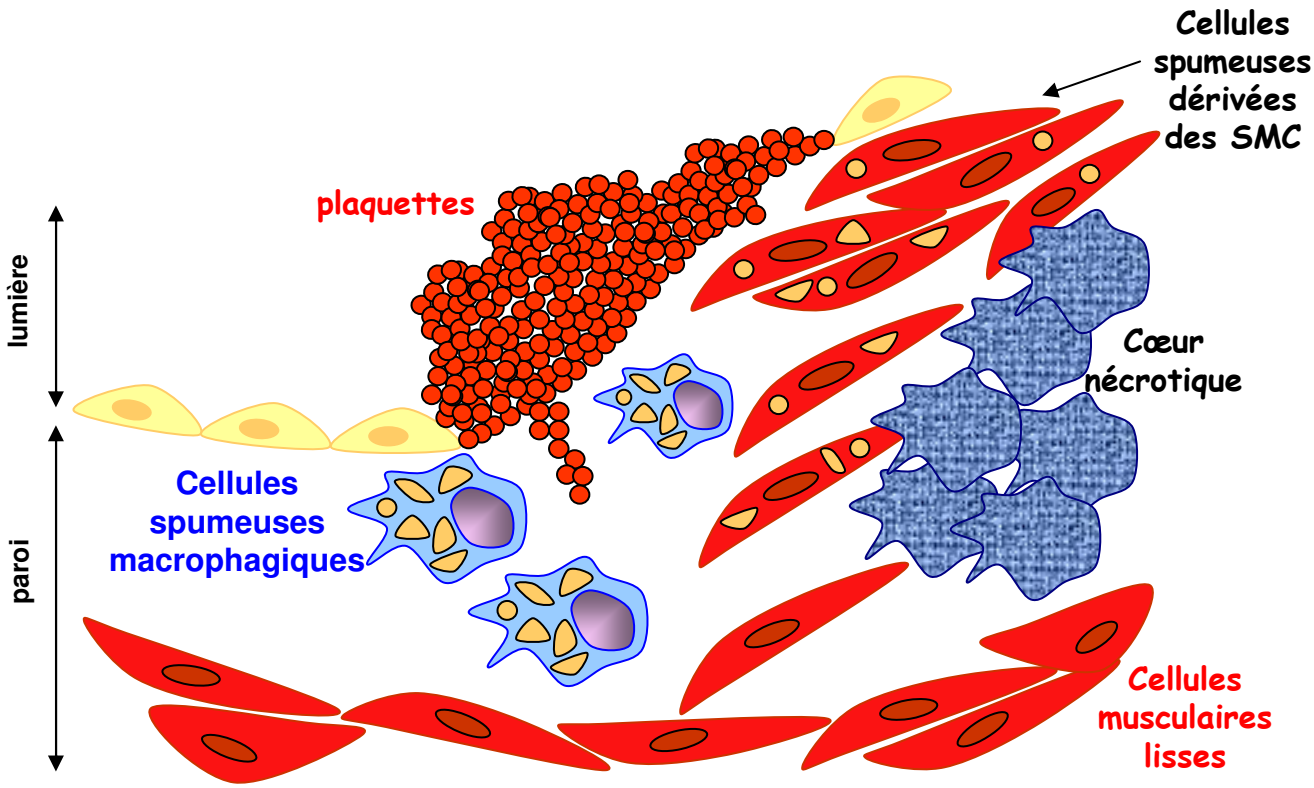
on Activation Normal T cell Expressed and Secreted) et le facteur plaquettaire 4 (CXCL4), ainsi que par la fraction active du complément C5a. D'autres chemokines seraient également impliquées telles que l'éotaxine, GRO-α (*Growth Regulated Oncogne*), Mig, IP10, I-TAC ou SDF-1α (*Stroma cell-Derived Factor 1*) (Raines & Ferri, 2005).

⌘ Formation des cellules spumeuses et progression de l'athérosclérose

Les monocytes adhérents pénètrent dans l'intima à travers les jonctions inter-endothéliales. Une fois que les monocytes circulant sont dans l'espace sous-endothélial, ils se différencient en macrophages sous l'influence du facteur hématopoïétique de différenciation et de prolifération des monocytes, le M-CSF (*Monocyte-Colony Stimulating Factor*) (Figure 11) (Tedgui & Mallat, 2001).

Les macrophages captent par leurs récepteurs « éboueurs » (*scavengers*) les LDLox. Cette internalisation des LDLs aboutit à la formation de cellules gorgées de lipides, les cellules spumeuses qui seront à l'origine de la strie lipidique, première étape de la lésion athéromateuse (Figure 11).

En réponse à la libération de chimiokines et de cytokines (PDGF: *Platelet-Derived Growth Factor)*, M-CSF, IL-1β), par les plaquettes, les cellules endothéliales et les macrophages de la plaque d'athérome (Ross, 1993), les cellules musculaires lisses présentes dans la média se multiplient et migrent de la média vers la zone endommagée (Figure 12). Certaines cellules musculaires lisses accumulent des lipides et deviennent des cellules spumeuses. Ceci définit le passage d'une strie lipidique simple à une lésion plus complexe. Ces cellules musculaires lisses synthétisent une matrice extracellulaire qui mène au développement de la chape fibreuse (Figure 12). Cette phase de développement lésionnel est influencée par les interactions entre les monocytes/macrophages et les lymphocytes T provoquant un large spectre de réponses cellulaires et humorales et l'acquisition des caractéristiques d'un état inflammatoire chronique (Glass & Witztum, 2001). Les différentes réponses immunologiques régulent la progression de la plaque. En effet, elles peuvent exercer des effets pro-athérogènes (IFNγ stimule la production par les macrophages de cytokines pro-inflammatoires et augmente l'expression de molécule de CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe 2) et anti-athérogènes (IFNγ réduit l'expression du récepteur scavenger à la surface des monocytes) (Glass & Witztum, 2001).



<u>Figure 13:</u> Rupture de plaque et Thrombose (Glass et Witztum, 2001)
La nécrose des cellules spumeuses dérivées des cellules musculaires lisses et des macrophages mène à la formation d'un cœur nécrotique et à l'accumulation de cholestérol extracellulaire. La sécrétion par les macrophages de métalloprotéinases de matrice et la néovascularisation contribuent à la rupture de plaque. La rupture de plaque expose les composants sanguins au facteur tissulaire, à l'initiation de la coagulation, au recrutement des plaquettes et à la formation d'un thrombus.

Les principaux lymphocytes T, présents au niveau de la plaque, sont les lymphocytes T auxiliaires ou *helper* et plus particulièrement des Th1 (T helper type 1). La différenciation des Th1 requièrt l'intervention des cellules dendritiques elles-même ainsi que différentes molécules comme l'interleukine-12, et l'interleukine-18. Ces dernières sont exprimées au niveau de la plaque et sont impliquées dans le maintient de l'inflammation au niveau de la plaque et de l'instabilité de celle-ci (Mallat *et al.*, 2005). Les réponses des Th1 seraient ainsi impliqées dans le développement et la progression de l'athérosclérose. Les Th2, moins présents au niveau de la plaque, peuvent avoir des effets anti-athérogènes (en antagonisant les effets des Th1 et en produisant des anticorps anti-LDLox) et pro-athérogènes selon les différentes étapes de développement de la plaque (Mallat *et al.*, 2005). Récemment, un nouveau sous-type de cellules T, appelé cellules T régulatrices, a été montré pour être un inhibiteur de l'athérosclérose et pourrait constituer une cible thérapeutique (Ait-Oufella, 2006).

La présence de fibres de collagène interstitiel au niveau du tissu conjonctif fibreux, formé par les cellules musculaires lisses, et les néo-capillaires qui vascularisent l'intima participent à la stabilisation de la plaque. La mort des cellules spumeuses dérivées des macrophages et des cellules musculaires lisses, provoquée entre autre par les stérols oxydés, participe à la formation d'un cœur nécrotique et à l'accumulation de cholestérol extracellulaire (Figure 13) (Glass & Witztum, 2001). Les métalloprotéinases, endopeptidases dirigées contre les différents constituants de la matrice extracellulaire, agissent sur la stabilité de la plaque en dégradant les protéines de la matrice extracellulaire. La mise à nu de l'endothélium, après la fissuration de la plaque, entraîne l'adhésion des plaquettes, puis leur agrégation, autour de la lésion (Figure 13). Les plaques à risque en vue de rupture, contiennent généralement un cœur lipidique acellulaire developpé, avec un contenu réduit en collagène, très peu de cellules musculaires lisses synthétisant du collagène, une chape fibreuse réduite, une inflammation au niveau de l'adventice et de l'intima, avec destruction des membranes élastiques internes et externes, une néovascularisation augmentée au niveau de la plaque et un remodelage du mur vasculaire (Shah, 2005).

5. Facteurs de risque

Les facteurs de risque sont des variables indépendantes, qui sont déterminées lors de grandes études de cohorte et répondent à un ensemble de propriétés: relation linéaire de type dose effet avec le risque vasculaire, cohérence avec des données de physiopathologie et expérimentales, indépendance entre les différents facteurs.

Les facteurs de risque de l'athérosclérose font intervenir des situations physiologiques (âge, sexe, hérédité), des habitudes de vie (alimentation, tabac) ou pathologiques (hypercholestérolémie, diabète, hypertension).

Facteurs de risque cardio-vasculaire	
non modifiables	**modifiables**
Sexe masculin	Tabac
Age	Hypertension artérielle
Ménopause	Dyslipidémies LDLc Triglycérides HDLc Lp(a)
Antécédents personnels	Insulino-résistance Obésité abdominale Diabète
Antécédents familiaux	Sédentarité

Tableau 3: Principaux facteurs de risque cardio-vasculaire.
Lp(a) : lipoprotéine a

- L'âge et le sexe: La prévalence de la maladie coronaire et de l'artériopathie des membres inférieurs augmente de façon nette à partir de 45 ans pour atteindre 6 à 7% à l'âge de 60 ans (Emmerich & Bruneval, 2000). Le sexe masculin est un facteur particulier car les femmes sont protégées jusqu'à l'âge de la ménopause du fait d'un meilleur profil lipidique secondaire à l'imprégnation oestroprogestative, à 45 ans le risque d'un accident coronaire est dix fois supérieur chez l'homme (Emmerich & Bruneval, 2000). Cette protection particulière des femmes n'est tout de fois pas prolongée par les traitements substitutifs hormonaux de la ménopause (Hulley *et al.*, 1998).

- Le tabac: Des études épidémiologiques supporte l'évidence que la consommation de cigarettes que cela soit chez les hommes ou chez les femmes augmente l'incidence de l'infarctus du myocarde et des maladies des artères coronaires (Ambrose & Barua, 2004). Les fumeurs passifs, avec une exposition à la cigarette d'un centième comparée à celle des fumeurs actifs, ont approximativement une augmentation de 30% du risque de maladies coronariennes, comparée avec une augmentation de 80% chez les fumeurs actifs (Glantz & Parmley, 1991). L'arrêt du tabac entraîne, en cinq ans, une diminution rapide du risque coronaire qui devient deux fois inférieur aux sujets qui continuent de fumer (Emmerich & Bruneval, 2000).

- L'hypercholestérolémie: le taux de cholestérol plasmatique est un facteur majeur de risque de maladies cardiovasculairse. Dès 1913, les travaux d'Anitschkow montrent que le lapin, soumis à un régime riche en lipides développe des lésions d'athérosclérose. Ultérieurement, l'étude Framingham montre chez l'homme une corrélation positive entre le taux de cholestérol plasmatique et l'incidence des maladies coronariennes (Kannel *et al.*, 1971 ; Castelli, 1988).

- Le diabète: les diabètes insulino et non insulino-dépendant constituent des facteurs de risque majeurs d'athérosclérose. Le rôle du diabète dans le développement des lésions athérosclérotiques est mal connu. Le diabète modifie le profil lipidique, en diminuant les HDL et en favorisant les modifications de LDLs qui deviennent plus denses et plus athérogènes (Emmerich & Bruneval, 2000). L'étude de Framingham indique que le risque relatif de mortalité coronarienne chez les diabétiques, comparé à celui des sujets non diabétiques, est de 1,7 chez les hommes et 3,3 chez les femmes, quelque soit le type de diabète (Kannel & McGee, 1979). Il existe de nombreux liens entre le diabète et l'athérosclérose. Ainsi, de nombreuses molécules pro-inflammatoires sont produites lors du diabète, tel que le INF-γ libéré par le tissu adipeux ou encore l'IL-6 et la CRP (*C reactive protein*). Le diabète est responsable d'un ensemble d'altérations de l'endothélium, des cellules musculaires lisses et des plaquettes, qui favorisent le développement de l'athérosclérose.

- L'hypertension artérielle: une relation entre la pression artérielle et l'athérosclérose est retrouvée dans toutes les enquêtes épidémiologiques. Par exemple, une étude parisienne montre que lorsque la pression artérielle systolique est à 170 mm de Hg, le risque de maladie coronaire est multiplié par quatre (Emmerich & Bruneval, 2000). Les effets de la pression artérielle sur la paroi vasculaire sont complexes. L'augmentation des forces de cisaillement favorise l'adhésion des monocytes à l'endothélium. Chez les patients présentant une hypertension, les taux plasmatiques d'angiotensine II, puissant vasoconstricteur, stimulent la prolifération des cellules musculaires lisses et favorisent la sécrétion de cytokines par les macrophages.

- L'homocystéinémie: l'homocystéine, acide aminé soufré dérivé du métabolisme de la méthionine, est retrouvée dans le plasma sous forme oxydée (homocystine et cystéine-homocystéine disulfite) et en partie fixée aux protéines plasmatiques. L'homocystéinémie est augmentée chez 15 à 40 % des patients présentant des pathologies artérielles coronaires, cérébrales ou périphériques (Malinow, 1994). *In vivo*, l'homocystéine est toxique pour l'endothélium (Van Den Berg *et al.*, 1995). L'homocystéine pourrait ainsi initier la lésion d'athérosclérose en altérant les fonctions de l'endothélium vasculaire.

- Les infections: différents agents infectieux bactériens et viraux sembleraient être impliqués dans l'athérosclérose et les infections multiples prédisposeraient plus à l'initiation et au développement du processus athéromateux. Parmi les bactéries et les virus identifiés au niveau des lésions d'athérosclérose Figurent: *Chlamydia pneumoniae* (Gram -), *Helicobacter pylori* (Gram -), *Streptococcus sanguis* (Gram +) *et Porphyromonas gingivalis* (Gram -), les virus herpès simplex de type 1 et 2, les coxsakievirus B et le virus de l'hépatite A. La migration et la prolifération des cellules musculaires lisses sont stimulées en présence de cytomégalovirus (Zhou *et al.*, 1999), qui pourrait comme *Chlamydia pneumoniae* s'opposer à l'induction de la mort cellulaire par apoptose (Tanaka *et al.*, 1999 ; Fan *et al.*, 1998) favorisant de ce fait l'épaississement sous-intimal et conduisant à une diminution de la lumière vasculaire. L'expression de molécules d'adhérence est plus élevée à la surface de fibroblastes et de cellules endothéliales infectées par du cytomégalovirus (Grundy *et al.*, 1993), ce qui favorise un recrutement plus important des cellules monocytaires et lymphocytaires.

6. Athérosclérose et mort cellulaire

Lors du développement de l'athérosclérose, il existe une forte implication de la prolifération des cellules monocytaires et des cellules musculaires lisses notamment. Il semble que non seulement la prolifération mais aussi la mort des cellules jouent un rôle important dans l'athérogenèse. La mort par apoptose des cellules musculaires lisses est relativement faible, elle affecte moins de 5% de ces cellules alors que dans certaines zones jusqu'à 50% des macrophages peuvent être engagés dans un processus de mort (Tedgui & Mallat, 1999).

Un certain nombre de facteurs est responsable de l'induction de l'apoptose des cellules endothéliales parmi lesquels les cytokines (TNF-α en particulier), le stress oxydatif, l'angiotensine II (Bombeli *et al.*, 1997, Mallat & Tedgui, 2000). L'apoptose des cellules endothéliales conduit à :

1) une augmentation du risque de thrombose. Durant le processus apoptotique, les cellules endothéliales perdent des composants membranaires anticoagulants et deviennent procoagulantes par une exposition augmentée des phosphatidylsérines à leur surface. En présence de facteurs de coagulation V et VII, la phosphatidylcholine peut promouvoir la production de thrombine (Bombeli *et al.*, 1997).

2) une progression de l'athérosclérose. Les vésicules membranaires des cellules endothéliales apoptotiques contiennent des phospholipides oxydés biologiquement actifs qui induisent l'adhésion des monocytes à l'endothélium (Huber *et al.*, 2002).

Les cellules musculaires lisses apoptotiques sont principalement localisées dans la portion fibrotique de l'athérome où elles synthétisent du collagène qui maintient la structure de la chape fibreuse. L'apoptose des cellules musculaires lisses est induite par les mêmes facteurs que ceux provoquant celle des cellules endothéliales (Lesauskaitè *et al.*, 2003). La voie médiée par Fas est très importante dans l'apoptose des cellules musculaires lisses. Par cette voie, les macrophages activés peuvent induire l'apoptose des cellules musculaires lisses et participer au remodelage des plaques athérosclérotiques (Imanishi *et al.*, 2002).

L'apoptose des cellules musculaires lisses mène à :

1) la disparition des cellules musculaires lisses de la chape fibreuse de la plaque athérosclérotique. Les cellules musculaires lisses sont les seules cellules qui peuvent synthétiser du collagène maintenant ainsi la structure et la résistance de la chape fibreuse. Ainsi une augmentation de l'apoptose de cellules musculaires lisses à l'intérieur de la région vulnérable de la plaque peut participer à l'affaiblissement voir à la rupture de cette région (Von der Thusen *et al.*, 2002 ; Kockx & Herman, 2000 ; Clarke *et al.*, 2006).

2) une augmentation du risque de thrombose. L'exposition de la phosphatidylsérine sur la membrane des cellules musculaires lisses apoptotiques peut mener à la production de thrombine (Flynn *et al.*, 1997).

3) une calcification de la plaque. Ce qu'il reste des cellules musculaires lisses apoptotiques peut souvent demeurer dans la plaque ce qui peut initier la calcification de la plaque (Kockx & Herman, 1998).

4) une protection des artères vis-à-vis de la resténose durant la formation néo-intimale après une agression artérielle (Matsuda *et al.*, 2002). L'apoptose des cellules musculaires lisses est d'une importance physiopathologique considérable dans la mesure où la rupture de plaque, associée à la thrombose, est la cause majeure d'angor instable, d'infarctus et de mort subite (Tedgui & Mallat, 1999).

Les macrophages apoptotiques sont regroupés principalement à l'intérieur du cœur lipidique de la lésion athérosclérotique (Geng & Libby, 1995). Le stress oxydatif et le chargement des cellules en cholestérol ont une grande importance dans l'induction de l'apoptose des macrophages (Salvayre *et al.*, 2002 ; Yao & Tabas, 2001). En effet, l'ensemble des évènements (accumulation de cholestérol dans le réticulum endoplasmique, altérations de la fonction des protéines intégrales de la membrane du réticulum, induction du stress du réticulum) induit par l'accumulation de cholestérol favorise la déstabilisation de la plaque dans les lésions athérosclérotiques avancées, qui est responsable de l'occlusion vasculaire athérothrombotique aigue et de l'infarctus tissulaire (Tabas, 2004). L'apoptose des macrophages induit des changements dans les plaques athérosclérotiques :

1) elle favorise la formation et l'agrandissement du cœur lipidique (Geng & Libby, 1995) dont la taille est en corrélation avec l'instabilité de la plaque (Libby *et al.*, 1996)

2) un nombre réduit de macrophages, à cause de leur mort par apoptose, peut conduire à une baisse de l'activité métalloprotéinase et à une stabilisation de la plaque à travers la diminution de la destruction du collagène (les macrophages étant responsables de cette destruction), (Kockx & Herman, 2000). Ceci permettrait une diminution du risque de rupture de plaque.

3) la diminution du nombre de macrophages conduit à un manque dans l'élimination des corps apoptotiques. Si les cellules musculaires lisses et les macrophages ne sont pas éliminés, un cœur nécrotique avec une thrombogénicité peut se former (Kockx & Herman, 2000). Dans le cas des macrophages survivants, une baisse de la phagocytose des autres cellules apoptotiques peut être observée. Plusieurs facteurs présents dans les plaques athérosclérotiques, comme l'accumulation de matériel non-digerable dans le cytoplasme des macrophages, le stress oxydatif et la présence de LDLox ou de cellules sanguines oxydées peuvent contribuer à cette inhibition de la phagocytose (Schrijvers *et al.*, 2005). Les macrophages, chargés de lipides, seraient défectueux en phagocytose à cause des changements induits par le cholestérol dans la fonction et la structure membranaire ou à cause de changements dans les voies de signalisation en relation avec la phagocytose (Tabas, 2004).

L'apoptose est à la fois un processus normal intervenant dans le remodelage de la paroi vasculaire au cours du développement et du vieillissement et pathologique participant à la formation des lésions athérosclérotiques. L'apoptose peut avoir des effets bénéfiques et néfastes suivant le stade de développement de l'athérosclérose. Dans les phases tardives, les effets dommageables prennent le pas sur les effets favorables, l'apoptose pourrait donc être une cible pharmacologique.

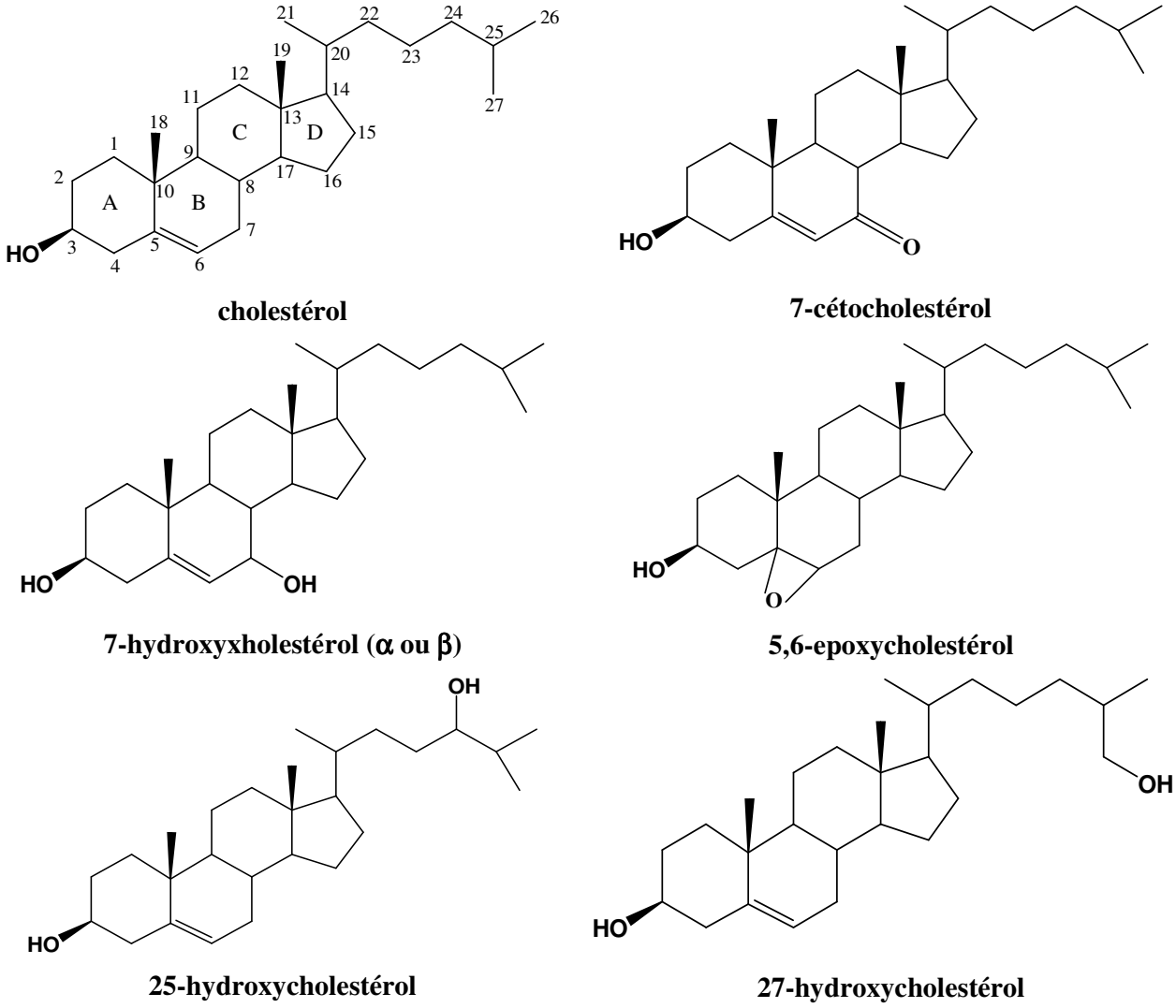
Les composants des LDLs oxydées connus pour provoquer l'apoptose *in vitro* incluent les produits de l'oxydation du cholestérol ou oxystérols.

Nom trivial	Nom Systématique
4α-hydroxycholestérol	Cholest-5-en-3β,4α-diol
4β-hydroxycholestérol	Cholest-5-en-3β,4β-diol
6β-hydroxycholestérol	Cholest-5-en-3β,6β-diol
7α-hydroperoxycholestérol	3β-hydroxycholest-5-en-7α-hydroperoxide
7β-hydroperoxycholestérol	3β-hydroxycholest-5-en-7β-hydroperoxide
7α-hydroxycholestérol	Cholest-5-en-3β,7α-diol
7β-hydroxycholestérol	Cholest-5-en-3β,7β-diol
7-cétocholestérol	3β-hydroxycholest-5-en-7-one
Cholestérol-5α,6α-epoxide	5,6α-Epoxy-5α-cholestan-3β-ol
Cholestérol-5β,6β-epoxide	5,6β-Epoxy-5β-cholestan-3β-ol
Cholestanetriol	5α-Cholestan-3β,5,6β-triol
20α-hydroxycholestérol	Cholest-5-en-3β,20α-diol
22-hydroxycholestérol	Cholest-5-en-3β,22ξ-diol
(24S)-hydroxycholestérol	(24S)-Cholest-5-en-3β,24-diol
Cholestérol-(24S),25-epoxide	(24S),25-Epoxy-5α-cholestan-3β-ol
25-hydroxycholestérol	Cholest-5-en-3β,25-diol
27-hydroxycholestérol	(25R)-Cholest-5-en-3β,26-diol
7α,27-dihydroxycholestérol	(25R)-Cholest-5-en-3β,7α,26-triol
7α,24-dihydroxycholestérol	(24S)-Cholest-5-en-3β,7α,24-triol

Tableau 4: Nomenclature de certains oxystérols
Les oxystérols, 7α-hydroxycholestérol, 7β-hydroxycholestérol, 7-cétocholestérol, cholestanetriol, 27-hydroxycholestérol, sont présents de façon prépondérante dans les plaques d'athérosclérose.

III. LES OXYSTEROLS

Les oxystérols sont des molécules à 27 atomes de carbones issues de l'oxydation du cholestérol (Figure 14). L'oxydation peut avoir lieu sur le noyau stérol, où la double liaison présente sur le cycle B est l'objet d'attaques radicalaires. Les positions 5, 6 et 7 sont sensibles à l'oxydation, c'est là où elle est la plus fréquente. Les oxydations peuvent également avoir lieu sur la chaîne latérale.



<u>Figure 14:</u> Structures chimiques du cholestérol et de ses dérivés oxydés majoritairement identifiés *in vivo*.

Dans la littérature, les oxystérols peuvent être désignés sous différents noms. Le Tableau 4 présente la nomenclature de certains oxystérols.

Les oxystérols, présents *in vivo*, peuvent être produits de manière endogène (synthèse par auto-oxydation ou par voie enzymatique) ou être apportés par l'alimentation.

1. Origine alimentaire

Les oxystérols proviennent de nourritures riches en cholestérol. Parmi les différents produits alimentaires, on trouve les œufs, la poudre d'œuf séchée souvent utilisée dans un grand nombre de produits commerciaux (Boselli *et al.*, 2001), la poudre de lait présente dans la composition de produits pour enfants (Przygonski *et al.*, 2000), le beurre clarifié (ou *ghee*), les fromages, les produits laitiers, la viande rouge (bœuf, porc, veau), le jambon, le foie, les reins, le poisson séché ou en boites (morue, anchois, harengs). Tous les produits contenant du cholestérol sont sujets à l'oxydation, spécialement ceux qui sont déshydratés, sujets à des radiations ou à des hautes températures et ceux qui sont cuisinés en présence d'oxygène (Leonarduzzi *et al.*, 2002 ; Yan, 1999). Sous ces conditions, les aliments sont exposés à des espèces réactives de l'oxygène tels que $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 (peroxyde d'hydrogène), $HO^{\bullet}$ (radical hydroxyl), O_3 (ozone). Le stockage sur de longues périodes, même sous vide, peut aussi favoriser la production d'oxystérols par les même effets décrits précédemment (Leonarduzzi *et al.*, 2002).

Les oxystérols, les plus communément détectés, sont oxydés en position 7 tels que les 7-cétocholestérol, 7α-hydroxycholestérol, 7β-hydroxycholestérol et ceux oxydés en positions 5,6 tels que les 5α,6α-epoxycholestérol, 5β,6β-epoxycholestérol, cholestan-3β,5α,6β-triol. On trouve également, en petite quantité, des oxystérols oxydés en position 25, 19 et 20α, ainsi que le 3β-hydroxy-5α-cholestan-6-one et le 3β,5α-dihydroxycholestan-6-one (Leonarduzzi *et al.*, 2002 ; Schroepfer, 2000).

Les oxystérols d'origine alimentaire sont principalement absorbés sous forme d'esters au niveau du tractus intestinal supérieur et transportés ensuite dans le plasma à l'intérieur de chylomicrons. Le 7-cétocholestérol est l'oxystérol le moins absorbé alors que le 7β-hydroxycholestérol est celui qui l'est le plus. Ensuite, ils sont transportés par des lipoprotéines dans le plasma. Tous les types de lipoprotéines peuvent les véhiculer que ce soit des VLDLs, LDLs ou HDLs. La majeure partie des oxystérols se trouve dans les LDLs, on en détecte un peu moins dans les LDLs et encore moins dans les VLDLs (Babiker et Diczfalusy, 1998). Différentes études ont démontré que les oxystérols non-estérifiés peuvent également être transportés, dans le plasma, liés à l'albumine (Babiker et Diczfalusy, 1998). Des études *in vivo* montrent également clairement que comparés avec le cholestérol, les oxystérols sont absorbés plus rapidement et plus complètement au

niveau de l'intestin et possèdent une clairance plasmatique plus rapide (Krut *et al.*, 1997). Ils sont ensuite rapidement captés par les tissus et les organes (Krut *et al.*, 1997).

2. Origine endogène

Les oxystérols peuvent être produits à l'intérieur des tissus en faisant intervenir des oxydations non-enzymatiques du cholestérol, de manière générale par des espèces réactives pro-oxydantes ou par catalyse enzymatique.

a. Synthèse enzymatique

La synthèse des oxystérols a été pour la première fois abordée par Frederickson et Ono en 1956. Ils incubèrent du cholestérol radiomarqué avec une fraction subcellulaire enrichie en mitochondries et montrèrent que le 25-hydrocholestérol et le 27-hydrocholestérol étaient formés. La synthèse enzymatique d'un troisième oxystérol, le 24-hydroxycholestérol, a été décrite beaucoup plus tard en 1974 par Lin et Smith.

Les 27-hydroxycholestérol, 25-hydroxycholestérol, 24-hydroxycholestérol, le 7α-hydroxycholestérol et le 4β-hydroxycholestérol sont synthétisés par voie enzymatique, respectivement par la 27-hydroxylase, la 25-hydroxylase, la 24-hydroxylase, la 7α-hydroxylase et la CYP3A4 (Tableau 5).

Enzyme	Expression tissulaire	Localisation subcellulaire	Produit formé
CYP27 ou 27-hydroxylase	Hépatocytes Macrophages Cellules endothéliales	Mitochondries	27-hydroxycholestérol Acide cholestanoïque
25-hydroxylase	Hépatocytes Autres tissus	Réticulum endoplasmique ou Golgi	25-hydroxycholestérol
CYP46 ou 24-hydroxylase	Neurones Hépatocytes	Réticulum endoplasmique	24-hydroxycholestérol 25-hydroxycholestérol
CYP7A ou 7α-hydroxylase	Hépatocytes	Microsomes	7α-hydroxycholestérol
CYP3A4	Hépatocytes	Microsomes	4β-hydroxycholestérol
7α-hydroxycholestérol déshydrogénase	Hépatocytes	Microsomes	7-cétocholestérol 7β-hydroxycholestérol

Tableau 5: Enzymes impliquées dans la formation d'oxystérols *in vivo*. (Russell, 2000)

L'enzyme qui catalyse l'hydroxylation en position 27 du cholestérol, la **27-hydroxylase**, appartient à la famille des enzymes à cytochrome P450, elle est aussi appelée cyp27. Elle est présente dans les tissus extrahépatiques (en particulier le poumon) (Björkhem et Diczfalusy, 2002). Cette enzyme catalyse l'addition d'un groupe hydroxyl sur plusieurs substrats stérols, incluant le cholestérol pour produire le 27-hydroxycholestérol (Figure 15) et des intermédiaires dans la voie de synthèse des acides biliaires comme le 5β-cholestane-3α,7α,12α-triol et le 5β-cholestane-3α,7α-diol pour produire leurs formes hydroxylées en position 27 (Russell, 2000). La 27-hydroxylase joue un rôle important dans la synthèse dite acide des acides biliaires. Elle catalyse les deux premières réactions en oxydant le cholestérol en 27-hydroxycholestérol. Ce dernier est ensuite transformé en acide 3β-hydroxy-5-cholesténoïque (Chiang, 1998). Le 27-hydroxycholestérol est aussi un puissant suppresseur de la biosynthèse du cholestérol (Russell, 2000).

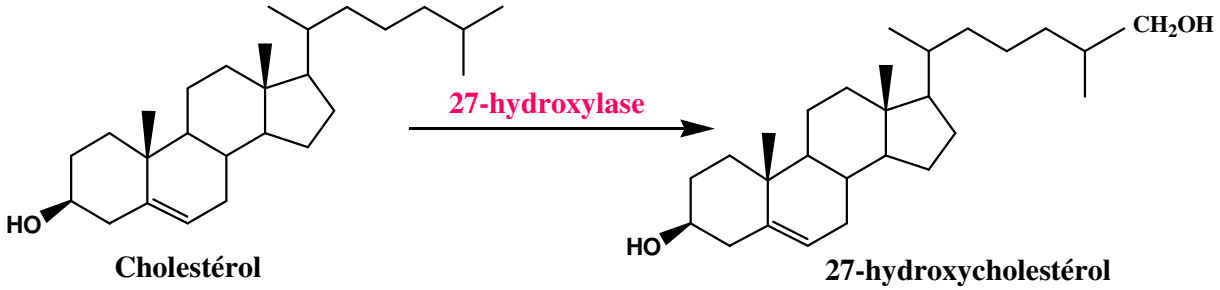


Figure 15: Synthèse enzymatique du 27-hydroxycholestérol. La 27-hydroxylase appartient à la famille des cytochromes P450, elle est présente dans la plupart des tissus.

L'enzyme responsable de la production du 25-hydroxycholestérol est la **25-hydroxylase** (Figure 16), petite enzyme hydrophobe (Lund *et al.*, 1998), qui appartient à la famille des protéines non hémiques contenant du fer (Russell, 2000). Elle est située au niveau du réticulum endoplasmique (Lund *et al.*, 1998). Elle est exprimée dans la plupart des tissus à des niveaux faibles (Lund *et al.*, 1998). Le 25-hydroxycholestérol est un puissant suppresseur de la synthèse des stérols dans les cellules en culture (Lund *et al.*, 1998). Chacun des gènes qui sont régulés possèdent une courte séquence d'ADN: un élément de réponse aux stérols (SRE, S*terol Responsive Element*) (Edwards *et al.*, 2000). Cette séquence est reconnue par la SREBP (S*terol Response Element Binding Protein*). La SREBP est synthétisée sous forme de précurseur et doit subir une série d'étapes protéolytiques afin d'être dirigée vers le noyau où elle va se lier aux séquences SRE (Edwards *et al.*, 2000). Le 25-hydroxycholestérol régule les étapes protéolytiques, lorsque ce stérol est en excès, la protéolyse ne se produit pas et la SREBP reste sous forme de précurseur. Cette régulation de la SREBP par les stérols est médiée par la protéine SCAP (*SREBP Cleavage*

Activating Protein) qui est un senseur du taux d'oxystérol. La SCAP possède un domaine qui est décrit pour lier un oxystérol permettant cette régulation de la SREBP par le 25-hydroxycholestérol.

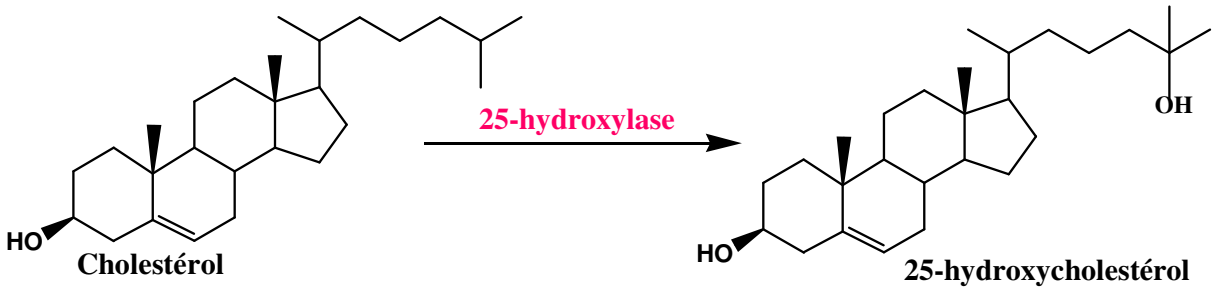


Figure 16: Synthèse enzymatique du 25-hydroxycholestérol. Elle appartient à la famille des protéines non hémiques contenant du fer, elle est située au niveau du réticulum endoplasmique et est exprimée dans la plupart des tissus à des niveaux faibles.

La **24-hydroxylase** catalyse la réaction permettant la synthèse du 24-hydroxycholestérol à partir du cholestérol (Figure 17). Elle appartient à la famille des cytochromes P450 (Lund *et al.*, 1999). Son nom officiel est CYP46. Elle est située dans le réticulum endoplasmique. Elle est principalement exprimée dans le cerveau, au niveau des neurones à partir de la naissance et tout au long de la vie (Björkhem et Diczfalusy, 2002, Russell, 2000, Lund *et al.*, 1999). La 24-hydroxylase serait impliquée dans le transport reverse du cholestérol (Russell, 2000). La 24-hydroxylase semble permettre aussi la synthèse de 25-hydroxycholestérol mais à des niveaux beaucoup plus faibles (Lund *et al.*, 1999). Le 24-hydroxycholestérol et la 24-hydroxylase jouent des rôles importants dans le métabolisme du cholestérol au niveau du cerveau. L'excès de cholestérol serait converti en 24-hydroxycholestérol par cette enzyme, ce dernier est plus rapidement secrété, à travers la barrière sang/cerveau, dans la circulation (Lund *et al.*, 1999).

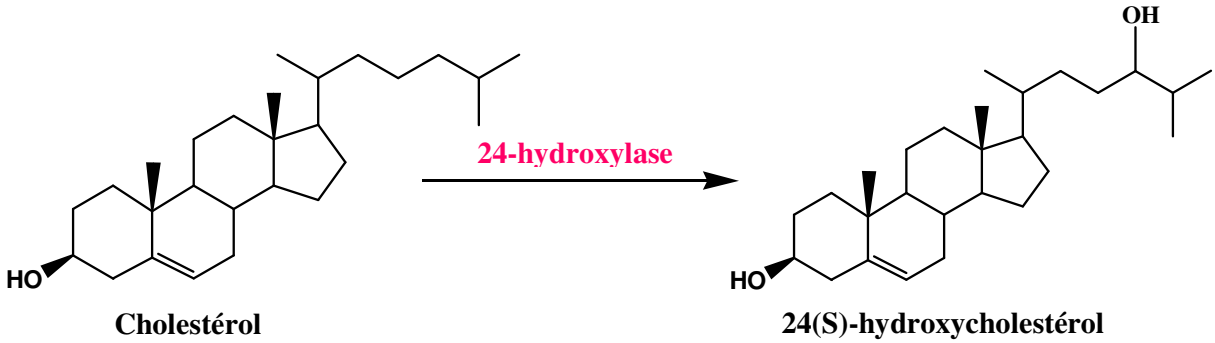


Figure 17: Synthèse enzymatique du 24(S)-hydroxycholestérol. La 24-hydroxylase appartient à la famille des cytochromes P450, elle est située dans le réticulum endoplasmique.

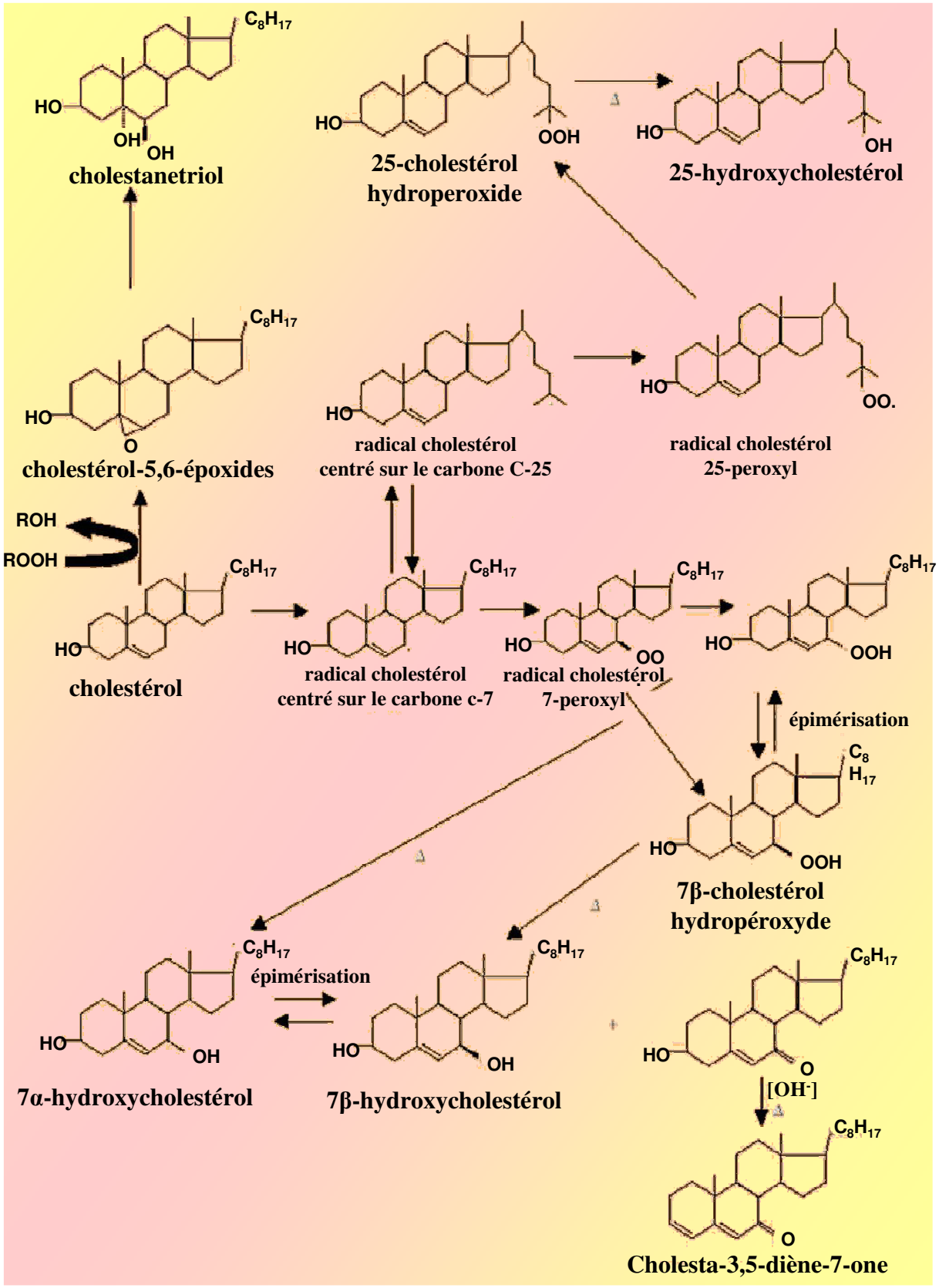


Figure 18: Auto-oxydation du cholestérol

Une enzyme de la famille des cytochromes P450, la **7α-hydroxylase** ou **CYP7A**, transforme le cholestérol en 7α-hydroxycholestérol lors de la synthèse classique des acides biliaires. Cette enzyme est l'enzyme limitante dans la conversion du cholestérol en acides biliaires (Li & Spencer, 2000). Elle est située dans les microsomes du foie (Ogishima *et al.*, 1987). Elle est régulée par le taux d'acides biliaires qui retournent au foie via la circulation entérohépatique (Ogishima *et al.*, 1987).

Il a également été démontré que le 4β-hydroxycholestérol est formé par l'action du **cytochrome P-450 3A4** (CYP3A4) sur le cholestérol (Björkhem et Diczfalusy, 2002).

Les oxystérols peuvent également être formés par auto-oxydation du cholestérol.

b. Synthèse par auto-oxydation du cholestérol

Les radicaux libres, sécrétés par les différents types cellulaires de la paroi artérielle (macrophages, cellules endothéliales lésées et cellules musculaires lisses) au niveau des plaques d'athérome, induisent l'oxydation des LDLs ainsi que celle du cholestérol qu'elles contiennent (Figure 18).

L'auto-oxydation du cholestérol a lieu préférentiellement sur le cycle B, formant les 7-hydroxycholestérols (α et β), le 7-cétocholestérol, les epoxydes 5,6 (5α,6α et 5β,6β) et le cholestanétriol (Patel *et al.*, 1996). Le 7-cétocholestérol est le principal oxystérol des LDLs oxydées et il semble être un bon marqueur de leur oxydation (Dyer *et al.*, 1997). L'oxydation *in vivo* est provoquée via des formes radicalaires actives par le contact entre les LDLs, certaines cellules vasculaires (monocytes/macrophages et cellules endothéliales) et des composants sanguins (myoglobine).

Ces réactions d'oxydation peuvent avoir lieu dans les différents tissus et notamment dans la paroi artérielle au cours du processus athéromateux.

3. Nature des oxystérols identifiés *in vivo*

La détermination de petites quantités d'oxystérols dans des échantillons biologiques contenant de grandes quantités de cholestérol est difficile. En effet, une oxydation mineure peut se produire durant l'échantillonnage, le transport, le stockage et l'analyse en elle-même et conduire à la génération d'oxystérols. Ce biais peut être contourné en utilisant du cholestérol marqué au deutérium ou au tritium qui sert alors de standard interne pour évaluer l'autooxydation (Diczfalusy, 2004). Dans les tissus, les oxystérols sont présents sous forme libre et sous forme estérifiée. Beaucoup de procédures analytiques incluent une étape hydrolytique pour transformer les formes estérifiées en formes libres. Ces procédures peuvent provoquer des artefacts si certaines précautions ne sont pas prises (Park *et al.*, 1996). Un autre problème peut être de trouver un standard interne aproprié. Ces différents facteurs peuvent expliquer les grandes différences observées dans les diverses études. Il est actuellement admis que les taux d'oxystérols ciculant chez des sujets sains sont 1000 fois plus faibles que ceux du cholestérol. Ces taux sont que 100 fois plus faibles chez des sujets athéromateux (Diczfalusy, 2004).

Quand le sang est analysé, le plasma est préféré au sérum, car lors de la préparation du sérum certains produits utilisés peuvent modifier la composition en oxystérols. Un des oxystérols, quantitativement prédominant dans le plasma humain est le (24S)-hydroxycholestérol qui est le produit de la cholestérol 24-hydroxylase. Ceci est du à un flux continu entre le cerveau et la circulation (Diczfalusy, 2004). Les concentrations de 7α-hydroxycholestérol varient avec une grande amplitude de 10-43 nmol/L à 286 nmol/L selon les analyses (Kudo *et al.*, 1989 ; Breuer & Björkhem, 1990), ceci parce qu'elles reflètent l'activité de la 7α-hydroxylase dans le foie. Le 7β-hydroxycholestérol et le cholestérol-5,6-epoxide, présents en petites quantités dans le plasma, ne sont pas sujets à de grandes variations. Les différences dans les concentrations plasmatiques des oxystérols peuvent être dues à l'âge, au sexe, ou à des maladies spécifiques comme la maladie d'Alzheimer, le syndrome Smith-Lemli-Opitz et leurs traitements associés (Diczfalusy, 2004 ; Bodin *et al.*, 2001). Les oxystérols, dans la ciculation, sont, en majorité, estérifiés avec des acides gras à longue chaîne (Diczfalusy, 2004). Le 4α-hydroxycholestérol, 4β-hydroxycholestérol, 7α-hydroxycholestérol, 7β-hydroxycholestérol, (24S)-hydroxycholestérol et le 27-hydroxycholestérol sont présents principalement sous forme estérifiée (> 70%) (Dzeletovic *et al.*, 1995a). Les oxystérols polaires, comme l'acide 3β-hydroxy-5-cholestenoïque, sont présents principalement dans la fraction libre de lipoprotéines, probablement associés à l'albumine.

Dans la fraction de lipoprotéines, les oxystérols présents en plus grande quantité sont le 7α-hydroxy-, 7β-hydroxy-, et le 7-céto-cholestérol ainsi que les 5,6-epoxycholestérols. Ces taux élevés d'oxystérols peuvent s'expliquer par le fait que lors de l'isolement des lipoprotéines une oxydation du cholestérol peut se produire et générer ces oxystérols (Babiker & Diczfalusy, 1998). Le 27-hydroxycholestérol, qui est formé seulement par voie enzymatique, est distribué principalement entre les LDLs et les HDLs. Le (24S)-hydroxycholestérol a également la même distribution (Babiker & Diczfalusy, 1998). Dans les lipoprotéines oxydées, le 7-cétocholestérol est l'oxystérol le plus abondant, viennent ensuite le 7α-hydroxycholestérol, le 7β-hydroxycholestérol, et le cholestérol-5β,6β-epoxide (Patel *et al.*, 1996 ; Brown *et al.*, 1996 ; Dzeletovic *et al.*, 1995b).

Lorsque l'on analyse les oxystérols au niveau tissulaire, leurs taux sont souvent rapportés au taux de cholestérol (nmol ou µg d'oxystérols/ mmol ou 100µg de cholestérol) ou au poids du tissu (pmol ou µg d'oxystérols/ mg de tissu). Au niveau des plaques d'athérosclérose, les produits non-enzymatiques de l'oxydation du cholestérol et le 27-hydroxycholestérol, un produit de l'enzyme 27-hydroxylase, sont présents. Le 27-hydroxycholestérol est l'oxystérol dominant dans les plaques avancées et sa concentration augmente avec l'aggravation de la sévérité de la lésion (Carpenter *et al.*, 1995 ; Fumagalli *et al.*, 1971 ; Garcia-Cruset *et al.*, 1999). Elle est plus élevée dans les lésions avancées riches en macrophages que dans les lésions fibreuses (Carpenter *et al.*, 1995). Le 27-hydroxycholestérol est plus abondant dans le cœur que dans la chape des lésions athérosclérotiques avancées (Garcia-Cruset *et al.*, 1999). La concentration de 27-hydroxycholestérol dans les plaques avancées est comprise entre 2,1 et 8,3 mg/g cholestérol (Brown & Jessup, 1999). Ces observations sont liées au rôle de la 27-hydroxylase dont l'activité est stimulée par les macrophages des lésions avancées en réponse à une accumulation de cholestérol, comme mécanisme de défense (Carpenter *et al.*, 1993a). En plus du 27-hydroxycholestérol, le 7-cétocholestérol, le 7β-hydroxycholestérol et le 7α-hydroxycholestérol sont également abondants dans les plaques avancées avec des concentrations comprises entre 20 et 50 µg/g de tissu (Crisby *et al.*, 1997 ; Björkhem *et al.*, 1994).

Le cerveau est l'organe le plus riche en cholestérol, il n'est donc pas surprenant qu'il contienne des oxystérols. Un oxystérol isolé de cerveau humain est le (24S)-hydroxycholestérol ou cerebrostérol. La concentration de (24S)-hydroxycholestérol, dans le cerveau humain, peut atteindre 15 µg/g de cerveau ce qui correspond à 2 mg/g de cholestérol (Lütjohann *et al.*, 1996). La conversion du cholestérol en (24S)-hydroxycholestérol est probablement une réaction importante pour maintenir l'homéostasie du cholestérol dans le cerveau (Björkhem *et al.*, 1998). Le 4α-hydroxycholestérol et le 4β-hydroxycholestérol sont présents dans le cerveau, à des concentrations de 88 et 165 µg/g de cholestérol, respectivement (Bodin *et al.*, 2001).

Quelques travaux rapportent la présence d'oxystérols dans le foie. Les produits d'oxydation primaires non-enzymatiques du cholestérol, les 7-hydroperoxycholestérols, ont été identifiés dans le foie humain (Adachi *et al.*, 2000). La concentration de 7α-hydroxycholestérol a été déterminée dans le foie humain et a été trouvée pour être de 4,1 µg/g de foie (Honda *et al.*, 1995). Le 4α-hydroxycholestérol et le 4β-hydroxycholestérol sont présents en faibles concentrations, 2 et 21 µg/g cholestérol, dans le foie humain. Le (24S)-hydroxycholestérol et le 27-hydroxycholestérol sont présents en plus grandes quantités 90 et 390 µg/g cholestérol, respectivement.

4. Métabolisme des oxystérols

a. Elimination et transformation des oxystérols

Il est généralement accepté que le catabolisme des oxystérols est similaire à celui du cholestérol. Les oxystérols seraient métabolisés en acides biliaires. La synthèse des acides biliaires se produit dans le foie à travers la 7α-hydroxylation du cholestérol. L'oxystérol, 7α-hydroxycholestérol, ainsi formé, peut être utilisé pour synthétiser l'acide cholique et l'acide chénodéoxycholique. Il n'est pas encore bien défini si les oxystérols et le cholestérol empruntent la même voie pour la synthèse des acides biliaires.

Les oxystérols, spécialement ceux avec un groupe hydroxyl sur la chaîne latérale, peuvent servir de substrats pour la synthèse des hormones stéroïdes dans les cellules stéroïdogéniques. Dans du syncytiotrophoblaste en culture, l'ajout de 25-hydroxycholestérol à un milieu sans sérum provoque une augmentation dans le contenu en progestérone cellulaire, suggérant son utilisation dans la synthèse de la progestérone (Tuckey *et al.*, 1994 ; Chaudhary *et al.*, 1992).

b. Transport des oxystérols

A cause de la similarité dans la structure entre les oxystérols et le cholestérol, il a été longtemps admis que leur transport devait être similaire dans le sérum. D'après des études réalisées chez des animaux, les oxystérols s'associent principalement avec les LDLs et les HDLs (Peng *et al.*, 1985 ; Javitt *et al.*, 1981). En revanche, dans des études *in vitro*, les oxystérols ne s'associent que partiellement avec les lipoprotéines, le reste des oxystérols se trouve dans la fraction de plus haute densité du sérum (Streuli *et al.*, 1981). De récentes études ont démontré que les oxystérols non-estérifiés s'associent rapidement avec l'albumine sérique (Lin & Morel, 1995). L'association avec l'albumine est de faible affinité mais de haute capacité. L'association des oxystérols avec l'albumine ou les lipoprotéines dépend de l'étendue de l'estérification des oxystérols (Lin & Morel,

1996). En effet, lorsque l'estérification est bloquée, les oxystérols se fixent principalement à l'albumine en revanche lorsque l'estérification des oxystérols se met en place, ces derniers se lient plus aux lipoprotéines.

Un autre élément régulateur de la distribution des oxystérols dans le sérum est la CETP (*Cholesterol Ester Transfer Protein*), qui permet le transfert des esters du 25-hydroxycholestérol associés aux HDLs vers les LDLs (Lin & Morel, 1996).

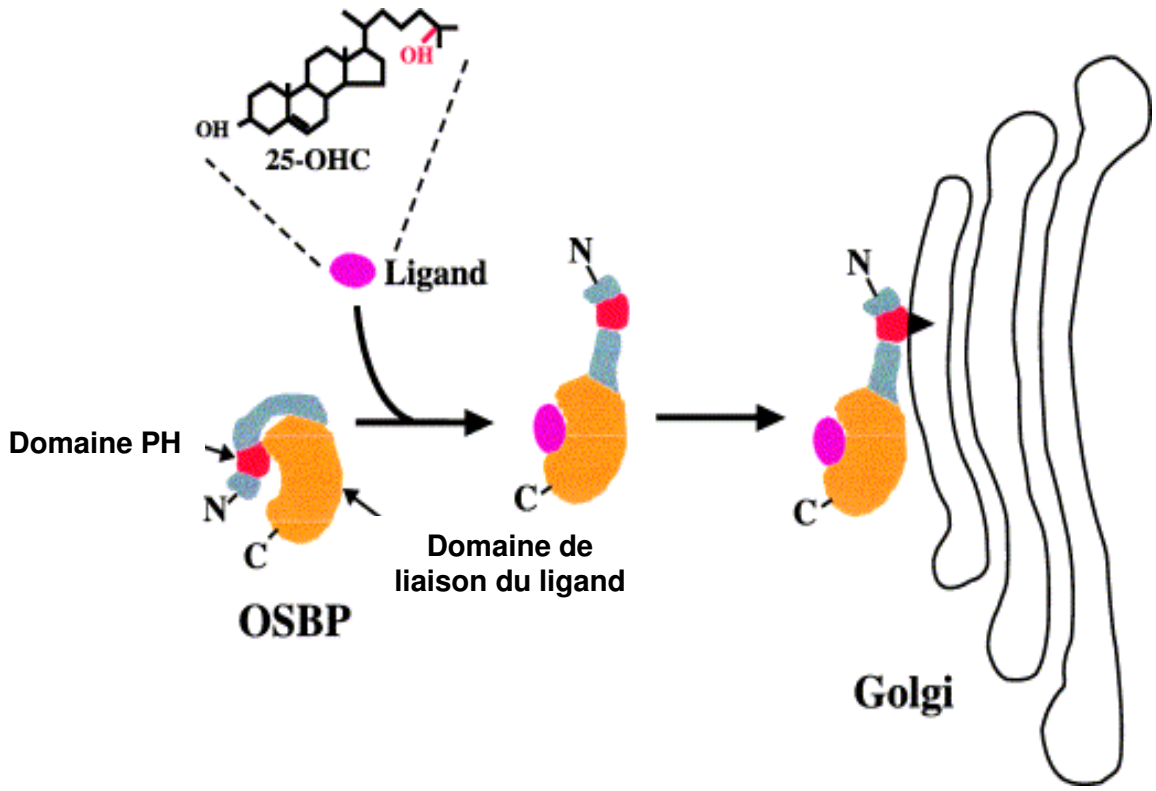
c. Estérification des oxystérols

Les oxystérols peuvent être estérifiés. Leur estérification peut être inhibée par des agents connus pour empêcher l'estérification du cholestérol tels que les inhibiteurs de la LCAT, de l'ACAT (Lin & Morel, 1996 ; Szedlacsek *et al.*, 1995).

Dans le plasma, la *Lecithin-Cholesterol Acyltransferase* (LCAT) catalyse le transfert d'un groupe acyl de la phosphatidylcholine en position sn-2 du cholestérol formant la lysophosphatidylcholine et d'un ester de cholestérol. Tous les oxystérols détectés dans le plasma humain sont estérifiés par la LCAT pour former des 3β-acyl esters (Szedlacsek *et al.*, 1995).

Dans les tissus, les oxystérols peuvent également être estérifiés par *l'Acyl CoA:Cholesterol AcylTransferase* (ACAT) (Lichtenstein & Brecher, 1983). Deux ACAT sont présentes chez les mammifères, ACAT-1 et ACAT-2. L'enzyme ACAT-1 est hautement exprimée chez les macrophages. Bien que les oxystérols aient une fonction oxygène additionnelle, qui peut être disponible pour l'estérification d'un acide gras, la formation d'un monoester en position 3β du noyau stérol apparaît pour être prédominante (Lin & Morel, 1996 ; Lichtenstein & Brecher, 1983).

Les formes estérifiées d'oxystérols, détectées *in vivo,* au niveau des plaques d'athérome constitueraient un processus protecteur empêchant l'accumulation en excès de cholestérol, qui est toxique (Vaya *et al.*, 2001 ; Tabas, 2002). De plus, il a été montré que les esters d'oxystérols, contrairement aux formes non estérifiées, ne sont pas pro-apoptotiques *in vitro* (Monier *et al.*, 2003). Ils peuvent aussi être métabolisés et transportés par les LDLs en vue d'une utilisation ou d'une excrétion, ce qui en revanche accroît la production de lipoprotéines athérogènes (Brown & Jessup, 1999). Les esters d'oxystérols peuvent donc avoir des effets pro- et anti-athérogènes suivant leur devenir.



<u>Figure 19:</u> Présentation schématique de la structure de la protéine OSBP avec les membranes de l'appareil de Golgi (Lehto & Olkkonen, 2003)

Après la liaison du 25-hydroxycholestérol au domaine de liaison de son ligand en position carboxy-terminale, un domaine PH, au niveau de la région amino-terminale se trouve exposé. Il peut donc interagir avec les phosphoinositides présents dans la membrane du golgi et cibler la protéine OSBP au golgi.

OSBP : *OxySterol Binding Protein ;* PH : *pleckstrin homology*.

5. Récepteurs intracellulaires aux oxystérols

Les oxystérols sont des molécules de signalisation importantes, capables de moduler l'activité de nombreux facteurs de transcription afin, entre autres, de limiter l'accumulation excessive de cholestérol. En effet, la présence d'un groupe oxygéné en plus du β hydroxyl sur le carbone en position 3, permet aux oxystérols de s'insérer parfaitement dans le double feuillet lipidique de la membrane plasmique, exerçant alors un effet similaire à celui du cholestérol (Guardiola *et al.*, 1996).

Deux catégories de récepteurs, cytosoliques et nucléaires, sont susceptibles de lier les oxystérols.

a. Récepteurs cytosoliques

⌘ Les OSBPs :

Les **O**xy**S**terol **B**inding **P**roteins (OSBPs) sont des protéines cytosoliques de masse moléculaire apparente de 95-101 kDa, dont la spécificité de liaison aux stérols est corrélée avec la capacité de ces composés à supprimer l'activité 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) qui conduit à la synthèse du mévalonate, précurseur du cholestérol (Taylor *et al.*, 1984). Elles existent sous deux formes, 1 et 2. La région de liaison aux oxystérols se situe dans la région carboxy-terminale de l'OSBP, la région responsable du ciblage à l'appareil de Golgi se situe elle dans la partie amino-terminale. Les OSBPs contiennent un domaine d'homologie à la pleckstrin (domaine PH) (Letho & Olkkonen, 2003). Un domaine de dimérisation peut en plus être localisé entre le domaine PH et le domaine de liaison du ligand (Ridgway *et al.*, 1992).

Les domaines PH contiennent des informations de ciblage suffisantes pour une localisation d'OSBP au niveau du Golgi (Figure 19). *In vitro*, le domaine PH des OSBPs a été trouvé pour lier le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate PI(4,5)P_2, le phosphatidylinositol-4-phosphate PI(4)P, et le phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate PI(3,4,5)P_3 (Levine & Munro, 1998 ; Rameh *et al.*, 1997). Ce ciblage, au niveau de l'appareil de Golgi, est dépendant d'une GTPase Arf1p (*Adenosinediphosphate Ribosylation Factor*), régulateur important des fonctions de transport des vésicules Golgiennes (Roth, 1999 ; Presley *et al.*, 2002 ; Levine & Munro, 2002).

Gènes humains	Anciens noms	Localisation chromosomique	OMIM[a]
OSBP		11q12–q13	167040
ORP1	OSBPL1A	18q11.1	606730
ORP2	OSBPL2, KIAA0772	20q13.3	606731
ORP3	OSBPL3, KIAA0704	7p15	606732
ORP4	OSBPL4, OSBPL1, OSBP2, KIAA1664, HLM	22q12.2	606729
ORP5	OSBPL5, KIAA1534	11p15.4	606733
ORP6	OSBPL6	2q31–q32.1	606734
ORP7	OSBPL7	17q21	606735
ORP8	OSBPL8, KIAA1451	12q14	606736
ORP9	OSBPL9	1p32.3	606737
ORP10	OSBPL10	3p22.3	606738
ORP11	OSBPL11	3q21	606739

Tableau 6: Famille gène/protéine en relation avec les OSBPs (*OxySterol Binding Protein*) (Lehto & Olkkonen, 2003).

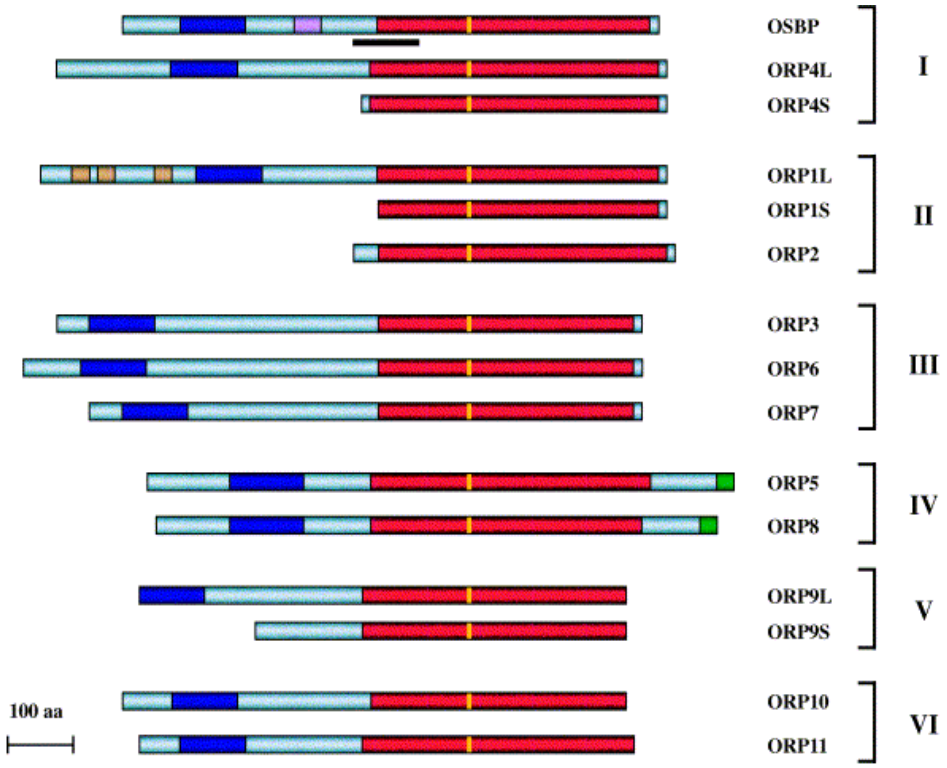


Figure 20: Les différentes protéines ORPs (*OSBP-Related Protein*) humaines (Lehto & Olkkonen, 2003).
Les protéines ont été organisées en six sous-familles (indiquées par des chiffres romains) en se basant sur la structure du gène et l'homologie de la séquence en acides aminés. Les séquences sont alignées en prenant comme séquence d'alignement la séquence « EQVSHHPP » (colorée en jaune). Le domaine PH est en bleu et le domaine de liaison au ligand en rouge. Les domaines transmembranaires possibles et les «ankyrin-like repeats» sont en vert et orange, respectivement Le domaine de dimérisation pour OSBP est en rose. La région responsable de l'interaction d'OSBP avec les protéines des vésicules de transport VAP-A est indiquée avec une barre noire. Les variants longs (L) et courts (S) ont été identifiés pour ORP4, ORP1 et ORP9.
OSBP : *OxySterol Binding Protein*; PH : *Pleckstrin Homology* ; VAP-A : *vesicle-associated membrane protein-associated protein A*.

Le 25-hydroxycholestérol est le composé présentant la plus haute affinité pour OSBP1 mais d'autres oxystérols comme le 20-hydroxycholestérol et le 7-cétocholestérol peuvent aussi s'y fixer.

Les OSBPs possèdent de nombreux effets régulateurs sur le métabolisme du cholestérol cellulaire et de la sphingomyéline. La surexpression d'OSBP dans des cellules d'ovaires de hamster, (CHO)-K1, montre une diminution de la biosynthèse des esters du cholestérol et de l'activité de l'ACAT (Lagace *et al.*, 1997), ainsi qu'une production accrue de sphingomyéline (Lehto & Olkkonen, 2003). Les OSBPs, en modulant les transports du réticulum endoplasmique aux membranes du Golgi, pourraient modifier le transport de SCAP et donc l'activation de la protéase SP1 (*Site Protease 1*). De plus, OSBPs pourraient contrôler la disponibilité des oxystérols pour les récepteurs en aval (SREBP et LXR (*Liver X Receptor*) qui sont plus directement impliqués dans le contrôle de l'homéostasie du cholestérol (Lehto & Olkkonen, 2003). Les OSBPs pourraient donc relayer les effets des oxystérols sur l'homéostasie du cholestérol.

Les OSBPs peuvent également participer à la régulation de voies de signalisation comme la voie de signalisation ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*). La depletion en cholestérol membranaire augmente les niveaux de ERK dans la cavéole et les fractions cytosoliques des cellules. Ceci passe par l'inactivation d'une phosphatase. Quand les niveaux de cholestérol cellulaire sont normaux, cette phosphatase travaille en tandem avec la ERK kinase MEK-1 (*Mitogen-activated protein kinase Kinase*) pour réguler le niveau d'ERK phosphorylée dans la cellule. Cette phosphatase est un hétéro-oligomère composé de deux phosphatases, une appartient à la famille de tyrosine phosphatases PTPPBS et l'autre est PP2A (*Protein Phosphatase 2A*) (Wang *et al.*, 2005). Le cholestérol se lie donc aux OSBPs qui subissent un changement conformationnel qui masque son domaine PH (Wang *et al.*, 2005). Dans cette configuration, OSBP est capable de se lier à ces deux phosphatases qui se retrouvent dans un environnement favorable pour ôter sélectivement les phosphates d'ERK1/2. L'activité phosphatase conférée par OSBPs est positivement régulée par le cholestérol et négativement régulée par les oxystérols (Wang *et al.*, 2005).

⌘ Les ORPs

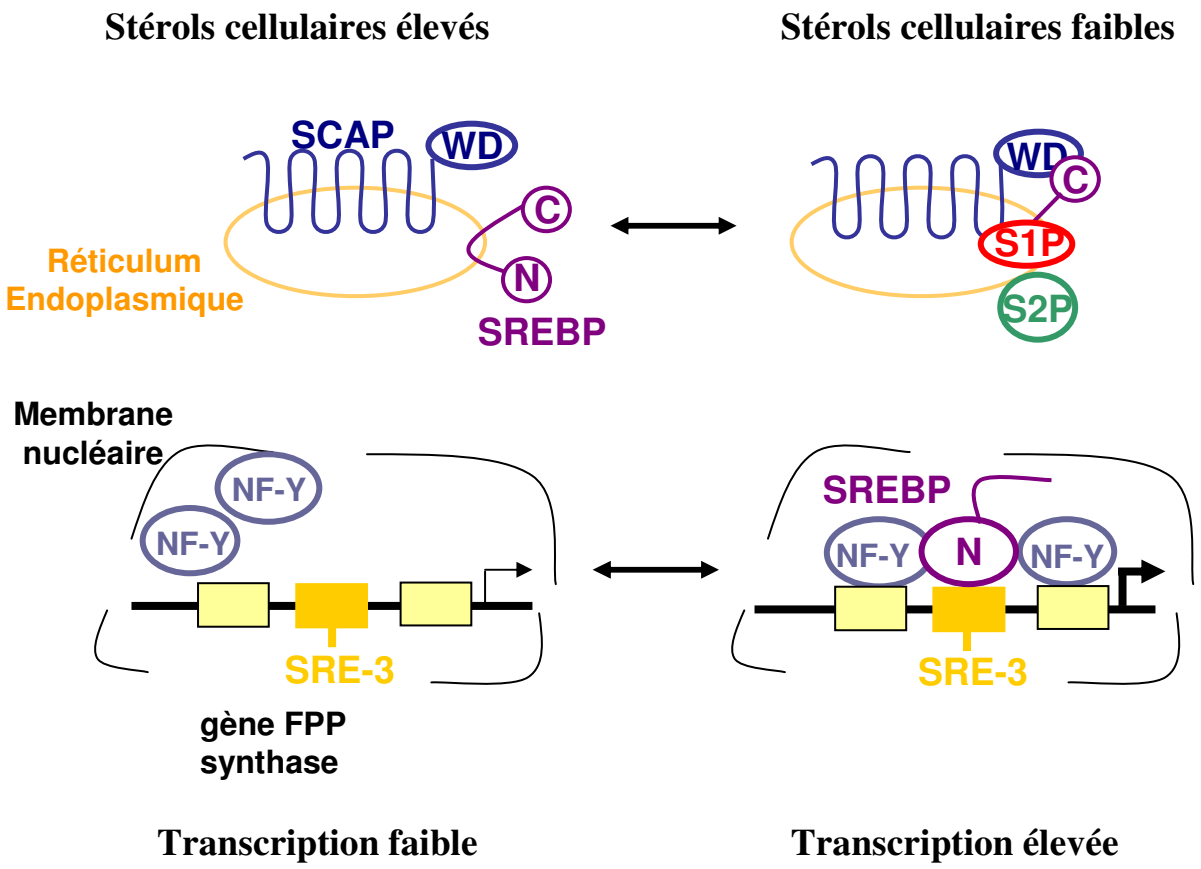
La famille ORP (*OSBP-Related Protein*) chez les humains est composée de 12 protéines subdivisées en 6 sous-familles selon l'organisation du gène et l'homologie en acides aminés (Tableau 6, Figure 20) (Lehto *et al.*, 2001). La plupart des protéines ORPs humaines possède deux caractéristiques structurales hautement homologues: le domaine PH à l'extrémité amino-terminale et le domaine LB à l'extrémité carboxy-terminale (Figure 20) (Lehto & Olkkonen, 2003). Il peut exister des variants longs (L) et des variants courts (S) composés seulement d'un domaine de liaison

du ligand (décrits pour ORP1 et ORP4). ORP4 et ORP8 possèdent des séquences de domaine transmembranaire au niveau de l'extrémité carboxy-terminale, indiquant que ces protéines peuvent entièrement s'ancrées dans les membranes.

ORP2, comme OSBP, apparaît pour se distribuer entre le cytosol et l'appareil de Golgi (Xu *et al.*, 2001 ; Laitinen *et al.*, 2002). ORP1 est présent sous forme d'un variants longs (ORP1L) et d'un court (ORP1S). Le variant long se localise à la surface des compartiments endosomaux tardifs, le variant court se distribue entre le cytosol et le noyau. Le variant court d'ORP4 se localise au niveau des filaments intermédiaires de vimentine. Ces filaments influencent le métabolisme et le trafic des stérols et sphingolipides cellulaires. Il semblerait qu'il y ait une possible implication de l'interaction entre ORP4S et les filaments de vimentine dans le transport du cholestérol dérivé des LDLs au compartiment d'estérification (Wang *et al.*, 2002).

Moreira *et al.* (2001) suggèrent qu'ORP4, le plus proche homologue d'OSBP, lie le 7-cétocholestérol et possède une plus faible affinité pour le 25-hydroxycholestérol. Alors que Wang *et al.* (2002) montrent qu'ORP4 et OSBP présentent une spécificité similaire pour les oxystérols. Tous les ORP ne lient pas les oxystérols, ORP1S et ORP2 ne lient pas le 25-hydroxycholestérol. Ces protéines montrent une affinité pour l'acide phosphatidique et lient faiblement la cardiolipine et le phosphatidylinositol-3-phosphate PI(3)P (Laitinen *et al.*, 2002).

Les ORPs semblent être impliquées dans divers processus cellulaires tels que le transport vésiculaire, le métabolisme du cholestérol. ORP1S et ORP2 pourraient intervenir au niveau du transport vésiculaire intracellulaire. ORP2 peut réguler le transport vésiculaire dans l'appareil de Golgi et entre le réticulum endoplasmique et le Golgi, ce qui peut conduire à des altérations dans le transport intracellulaire des lipides et des protéines et éventuellement provoquer des changements dans le métabolisme du cholestérol cellulaire (Lehto & Olkkonen, 2003). Le variant court d'ORP4, localisé au niveau des filaments intermédiaires de vimentine, peut provoquer des changements dans l'organisation de ces éléments du cytosquelette et ainsi modifier le métabolisme du cholestérol. Des cellules surexprimant cette protéine montrent une réduction de 40% dans l'estérification du cholestérol dérivé des LDLs. Des études récentes montrent que ORP1L affecte les fonctions de LXR et serait ainsi impliquée dans le contrôle du métabolisme des lipides cellulaires (Johansson *et al.*, 2003).



<u>Figure 21</u>: Clivage régulé par les stérols de SREBP (*Sterol Responsive Element Binding Protein*) (Edwards & Ericsson, 1998)

Le domaine WD de SCAP s'associe avec SREBP, en réponse à des niveaux en stérols cellulaires réduits il se produit un clivage de SREBP par S1P (*Site-1 protease*) et S2P (*Site-2 protease*). L'association de SCAP avec SREBP et le clivage de SREBP ne se produit pas dans les cellules chargées en stérols. Le promoteur du gène de farnésyl diphosphate synthase contient des sites de liaison pour SREBP (**SRE-3**) et NF-Y ▭ . Lorsque SREBP est clivée, la partie N-terminale vient se lier à SRE-3, et la transcription du gène de la farnésyl diphosphate synthase ou d'autres gènes présentant une séquence SRE est activée grâce à la présence de NF-Y sur ses sites de liaison.

SCAP : *SREBP cleavage activating protein ;* SRE : *Sterol Regulatory Element ;* WD : Tryptophane Aspartate

⌘ L' AEBS

Certains oxystérols peuvent se fixer sur une protéine intracellulaire liant les anti-oestrogènes, l'***A**nti **E**strogene **B**inding **S**ite* (AEBS) (Schroepfer, 2000). Les 6- et 7-cholestanols, ainsi que le 7β-hydroxycholestérol et le 7-cétocholestérol, possèdent la plus forte affinité pour ce récepteur.

⌘ Les récepteurs arylhydrocarbones

Le 7-cétocholestérol peut être un inhibiteur endogène de la transactivation du récepteur arylhydrocarbone (AhR) par liaison compétitive avec ses ligands non physiologiques, comme les xénobiotiques de type dioxine, benzopyrène et polychlorobiphényl (Savouret *et al.*, 2001). L'association du 7-cétocholestérol avec le récepteur AhR empêcherait la liaison de ce dernier avec l'ADN. En revanche, les 7α- et 7β-hydroxycholestérols, l'epoxycholestérol et le cholestanetriol ne se lient pas à ce récepteur (Savouret *et al.*, 2001).

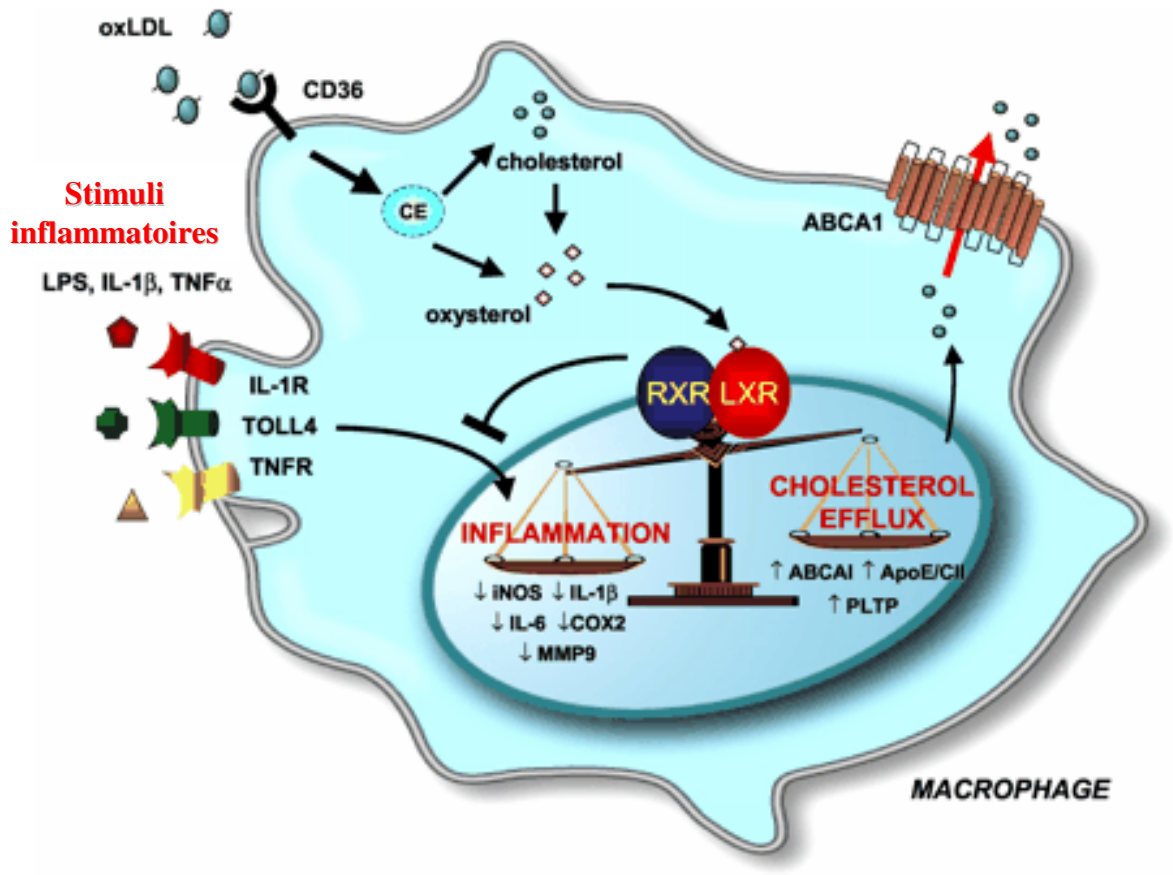
b. Récepteurs nucléaires

⌘ Les SREBPs

Les SREBPs sont une famille de trois facteurs de transcription, SREBP1a, SREBP1c et SREBP2. Les SREBPs contrôlent les niveaux d'enzymes impliqués dans la synthèse du cholestérol. SREBP est activée via clivage d'un précurseur en une forme active par une protéine du réticulum endoplasmique SCAP (Figure 21). Cette forme active est transloquée au noyau. Certains oxystérols se lient aux SREBPs, abaissant leur maturation protéique par la SCAP et donc leur translocation nucléaire (Schroepfer, 2000). *In vitro*, sur des cellules d'hépatomes, l'utilisation des 25-hydroxycholestérol et 20-hydroxycholestérol (à la concentration de 0,1 µg/ml) ainsi que du 7-cétocholestérol (à la concentration de 1 µg/ml) a également démontré cette inhibition de l'activité de la SREBP (Wang *et al.*, 1994).

⌘ Les LXRs

Les LXRs forment des hétérodimères fonctionnels avec RXR (*Retinoid X Receptor*) et activent la transcription en réponse à différents ligands. Ce complexe LXR/RXR est appelé un hétérodimère permissif car il peut être activé par les ligands de LXR ou de RXR. LXRα possède



<u>Figure 22 :</u> Voie de signalisation LXR dans les macrophages: implication sur le métabolisme des lipides, l'efflux de cholestérol et l'inflammation. (Tontonoz & Mangelsdorf, 2003)

Les LDLox, après internalisation via le récepteur CD36, peuvent subir des modifications aboutissant à la formation d'oxystérols. Certains oxystérols sont des récepteurs pour LXR.

LXR, en association avec RXR, agit comme un facteur de transcription qui permet l'augmentation de la transcription de gènes cibles dont ABCA1, celui de la PLTP et de l'ApoE/CII. La protéine ABCA1 est importante pour l'efflux du cholestérol cellulaire en excès. L'ApoE est le composant protéique principal des remnants, VLDLs et IDLs. La reconnaissance de l'ApoE par les récepteurs aux LDLs favorise l'internalisation au niveau du foie des remnants, VLDLs et IDLs. LXR favorise l'expression inductible par les lipides du gène de l'ApoE dans le tissu adipeux et les macrophages mais pas dans le foie. L'expression au niveau des macrophages de l'ApoE exerce des effets anti-athérogèniques. La PLTP a été identifiée comme étant un modulateur du métabolisme des HDLs et est impliquée dans le transport reverse du cholestérol. Les agonistes de LXR contrôlent l'expression de la PLTP dans les macrophages et cette enzyme est exprimée à des taux élevés au niveau des lésions athérosclérotiques.

Des agonistes de LXR inhibent l'expression de toute une batterie de gènes de l'inflammation dans les macrophages activés parmi lesquels les gènes de l'iNOS, IL-1β, IL-6, COX2, MMP9. Les médiateurs comme l'IL-1β et l' IL-6 favorisent le recrutement des monocytes et stimulent la prolifération des cellules musculaires lisses. Les métalloprotéinases comme MMP9 ont été impliquées dans le remodelage des lésions et la rupture de la plaque.

ABCA1 : *ATP Binding Cassette A1* ; ApoE : Apolipoprotéine E ; CE : cholestérol estérifié ; COX2 : cyclo-oxygénase 2 ; IDL : *Intermediate Density Lipoprotein* ; IL : interleukine ; iNOS : NO Synthase inductible ; LDL : *Low Density Lipoprotein* ; LXR : *Liver X Receptor* ; MMP9 : *Matrix MetalloProteinase-9* ; PLTP : Protéine de transfert des phospholipides ; RXR :récepteur de l'acide 9-cis-rétinoïque ; VLDL : *Very Low Density Lipoprotein*.

une expression limitée aux organes viscéraux, intestin, foie, reins, rate mais également dans les macrophages. Contrairement à LXRα, LXRβ est exprimé de manière constitutionnelle à des niveaux faibles dans tous les tissus. Les hétérodimères LXRα/RXRα et LXRβ/RXRα se lient à une séquence LXRE qui est un variant de la séquence idéale AGGTCA N_4 AGGTCA.

Les gènes cibles des LXRs codent des protéines qui ont des rôles critiques en régulant le catabolisme du cholestérol en acides biliaires (CYP7A1), la synthèse des acides gras à partir de précurseurs (SREBP1c, acides gras synthase), le métabolisme des lipoprotéines plasmatiques (CETP, lipoprotéine lipase), le transport transmembranaire des phospholipides et/ou des stérols (ABCA1, ABCG1, ABCG5, ABCG8 (*ATP Binding Cassette*), la protéine de transfert des phospholipides (PLTP)) et l'inflammation (NO Synthase inductible, IL-1β, IL-6, COX2 (cyclooxygénase 2), metalloprotéinase-9) (Edwards *et al.*, 2002, Ory, 2004, Tontonoz & Mangelsdorf, 2003) (Figure 22).

Les oxystérols se lient aux LXRs. Les ligands les plus efficaces de l'isoforme α sont ceux oxydés sur la chaîne latérale, tels que le 22(R)-hydroxycholestérol, le 20(S)-hydroxycholestérol, le 24(S),25-epoxycholestérol, le 24-hydroxycholestérol, le 25-hydroxycholestérol, ainsi que le 27-hydroxycholestérol (Janowski *et al.*, 1999, Ory, 2004). Le 7-cétocholestérol, le 7α-hydroxycholestérol et le 7β-hydroxycholestérol sont quant à eux des ligands moins efficaces des LXRs (Janowski *et al.*, 1999). Les différents oxystérols activent LXR à des concentrations physiologiques, similaires à celles rencontrées dans les tissus (Lehmann *et al.*, 1997).

⌘ Le SF-1

SF-1 (*Steroidogenic Factor-1*) est un membre de la famille des récepteurs nucléaires. SF-1 se lie comme monomère à un élément de l'ADN qui contient la séquence « AGGTCA » demi-site des récepteurs aux estrogènes. SF-1 régule les gènes impliqués dans la stéroïdogenèse et dans le développement des gonades. Dans les différentes expériences menées sur les fonctions de SF-1 décrites précédemment, SF-1 apparaît pour fonctionner indépendamment d'un ligand. Il a ensuite été suggéré que les oxystérols pouvaient être des ligands pour SF-1. Plusieurs mécanismes d'activation sont envisagés: les oxystérols peuvent se lier directement à SF-1 ; un métabolite des oxystérols ou un métabolite induit par les oxystérols peut servir de ligand ; les oxystérols peuvent se lier et recruter d'autres protéines qui peuvent interagir avec SF-1 et l'activer indirectement. Les oxystérols oxydés en position 25, 26 et 27 sont les activateurs les plus efficaces de SF-1 (Lala *et al.*, 1997). Dans un environnement riche en stérols, les oxystérols pourraient agir comme signaux pour

augmenter la biosynthèse des stéroïdes. Ceci pourrait passer par SF-1 qui peut augmenter l'expression d'enzymes impliquées dans le métabolisme des stéroïdes (Lala *et al.*, 1997).

⌘ Autres récepteurs nucléaires

Les oxystérols peuvent également constituer des ligands des récepteurs SXR (*Steroid X Receptor*) et de son orthologue chez la souris PXR (*Pregnana X Receptor*). Le SXR est un récepteur nucléaire orphelin qui joue un rôle clé dans la réponse aux xénobiotiques en contrôlant l'expression d'enzymes métabolisant ces drogues et impliquées dans leur clairance (Kawana *et al.*, 2003). Il est également un senseur biologique des dérivés secondaires des acides biliaires incluant l'acide lithocholique (Kawana *et al.*, 2003). SXR active l'expression de certaines protéines comme CYP3A4 et le transporteur ABCB1 impliqué dans l'efflux de drogues (glycoprotéine P), qui agit en réduisant la concentration de ces xénobiotiques et acides biliaires toxiques (Kawana *et al.*, 2003). PXR est exprimé principalement dans le foie et l'intestin, il est défini comme un récepteur aux xénobiotiques qui permet de défendre l'organisme contre des produits étrangers potentiellement toxiques (Sonoda *et al.*, 2005). Le (24S),25-epoxycholestérol a été décrit comme pouvant activer le PXR dans les hépatocytes de souris (Sonoda *et al.*, 2005).

6. Effets biologiques des oxystérols

a. Oxystérols et homéostasie du cholestérol

⌘ Le cholestérol

Le cholestérol, dérivé cyclopentanoperhydrophénantrènique, est présent dans les tissus et dans les lipoprotéines plasmatiques sous forme de cholestérol libre, ou combiné à un acide gras à longue chaîne sous la forme d'esters de cholestérol. Le métabolisme du cholestérol comprend sa synthèse à partir de l'acétyl-CoA, sa transformation en acides biliaires et les réactions d'estérification et d'hydrolyse des esters (les esters de cholestérol sont la forme de stockage et de transport du cholestérol).

Le cholestérol a un double rôle :

- *structural* : le cholestérol est au côté des phospholipides, l'un des constituants lipidiques (10% du poids sec) des membranes cellulaires chez les animaux, (et non chez les végétaux, où l'on trouve d'autres stérols, sigmastérol et β-sitostérol) et, dans une moindre mesure, de la membrane des organites. Sa molécule est amphiphile et s'intercale entre les molécules de phospholipides dans la bicouche lipidique. De part sa structure tétracyclique rigide, le cholestérol dans une biomembrane en réduit la fluidité.
- *métabolique* : le cholestérol est le précurseur[8] :

* de la synthèse des acides biliaires, dans le foie, indispensables à la digestion des lipides
* des hormones stéroïdes, dans les organes stéroïdogènes (corticosurrénales, gonades et placenta)
* de la vitamine D, dans la peau

Les besoins de l'organisme en cholestérol (1,2 g / 24h) sont couverts par l'alimentation (0,2 g) et surtout par la synthèse endogène (1 g) qui a lieu dans le foie (les 4/5), dans l'intestin (le 1/5) et un peu dans la peau.

Le métabolisme du cholestérol a lieu dans l'intestin, le foie, les tissus périphériques et les lipoprotéines.

- *dans l'intestin* : le cholestérol alimentaire libre ou liberé de ses esters est absorbé par les entérocytes. Ce cholestérol exogène se mèle au cholestérol endogène synthétisé à partir de l'acétyl-CoA et au cholestérol déversé par la bile dans l'intestin et repris dans un cycle entérohépatique. Après estérification avec des acides gras à longue chaîne, le cholestérol est incorporé dans les chylomicrons. Les remnants, issus du catabolisme plasmatique des chylomicrons, transportent les esters de cholestérol vers le foie.

Un grand nombre de protéines cellulaires distinctes peut influencer, de manière positive ou négative, l'absorption intestinale du cholestérol alimentaire comme FABPpm (*plasma membrane*

[8] Des intermédiaires de la synthèse du cholestérol sont les précurseurs de l'ubiquinone, du dolichol et des groupements géranyle et farnésyle qui ancrent les protéines dans les membranes.

Fatty Acid-Binding Protein), la Caveolin-1, SR-B1 (*Scavenger Receptor class B1*) (CLA-1), ABCA1, ABCG5, ABCG8, ou encore MTP (*Microsomal Triglyceride Transfer Protein*).

- *dans le foie*, le cholestérol a trois origines :

* le cholestérol libéré des esters de cholestérol des lipoprotéines issus du catabolisme plasmatique des chylomicrons (remnants) et des VLDLs (IDL, LDL).

*le cholestérol liberé des esters de cholestérol des HDLs d'origine instestinale et hépatique qui transportent le cholestérol des tissus périphériques vers le foie. La captation des esters de cholestérol des HDLs par le foie impliquerait le récepteur SR-B1 (Acton *et al.*, 1996). Le recepteur SR-B1 ouvre la principale voie par laquelle les esters de cholestérol des HDL sont délivrés au foie et aux tissus stéroïdogènes (Williams *et al.*, 1999). Après liaison directe des HDLs au récepteur SR-B1, il se produit la formation d'un canal hydrophobe le long duquel les molécules d'esters de cholestérol diffuseraient des HDLs vers la membrane plasmique le long d'un gradient de concentration (Williams *et al.*, 1999). Ceci se déroulerait au niveau des cavéoles.

* le cholestérol synthétisé à partir de l'acétyl-Co A provenant de la β-oxydation des acides gras.

Ce cholestérol a trois destinations :

* 25% sont éliminés tels quels par la bile dans l'intestin, où une partie (les 2/3) est réduite par une enzyme bactérienne en coprostanol éliminé dans les fécès (0,6 g / 24 h), et l'autre partie subit un cycle entérohépatique.

* 50 % sont catabolisés en acides biliaires éliminés par la bile dans l'intestin (0,6 g / 24 h).

* 25% sont incorporés dans les VLDLs au sein desquels il est estérifié. Les IDLs qui sont issues du catabolisme plasmatique des VLDLs retournent soit au foie, soit sont transformées en LDL dont 1/3 retourne au foie, 1/3 est capté par les macrophages, et 1/3 est internalisé par endocytose grâce aux récepteurs des LDLs des tissus périphériques.

- *dans les tissus préripheriques* : les esters de cholestérol des LDL internalisées sont hydrolysés. Le cholestérol libéré est soit incorporé dans les membranes cellulaires, soit utilisé comme précurseur dans les tissus stéroïdogènes, soit réestérifié pour stockage. Le cholestérol libéré par les cellules est capté par les HDL, qui l'emportent vers le foie.

L'efflux de cholestérol cellulaire, étape au cours de laquelle le cholestérol est transféré des cellules périphériques vers des HDLs, constitue la première phase de transport reverse du

cholestérol. Les mouvements de cholestérol peuvent se faire par une diffusion passive à travers la phase aqueuse, suivie d'une incorporation dans des particules acceptrices ou par l'intervention de protéines spécifiques. Par exemple, le récepteur SR-B1 pourrait contribuer à l'efflux du cholestérol cellulaire (Williams *et al.*, 1999 ; Rothblat *et al.*, 1999 ; Krieger, 2001). Il a aussi été démontré que la capacité des HDL à extraire le cholestérol des tissus périphériques est largement sous le contrôle de la protéine codée par le gène ABCA1 (Oram & Lawn, 2001). ABCA1 est une protéine intégrale de membrane, qui appartient à la famille des transporteurs ABC. ABCA1 transporte le cholestérol et les phospholipides cellulaires, principalement la phosphatidylcholine, aux apolipoprotéines liées à la surface des cellules (Oram & Lawn, 2001).

- *dans les lipoprotéines* :

  * les chylomicrons et les VLDLs échangent avec les HDLs grâce à la CETP, des triglycérides contre des esters de cholestérol, qui seront pris en charger par les remnants (IDLs et VLDLs) pour retourner au foie.

  * le cholestérol capté par les HDLs au niveau des tissus périphériques est estérifié au sein même de la lipoprotéine.

Ainsi la circulation du cholestérol entre le foie et les tissus périphériques est à double sens : les LDLs convoient le cholestérol du foie aux tissus périphériques tandis que les HDLs le transportent des tissus périphériques au foie.

Les enzymes responsables de l'estérification du cholestérol et de l'hydrolyse des esters de cholestérol sont au nombre de quatre :

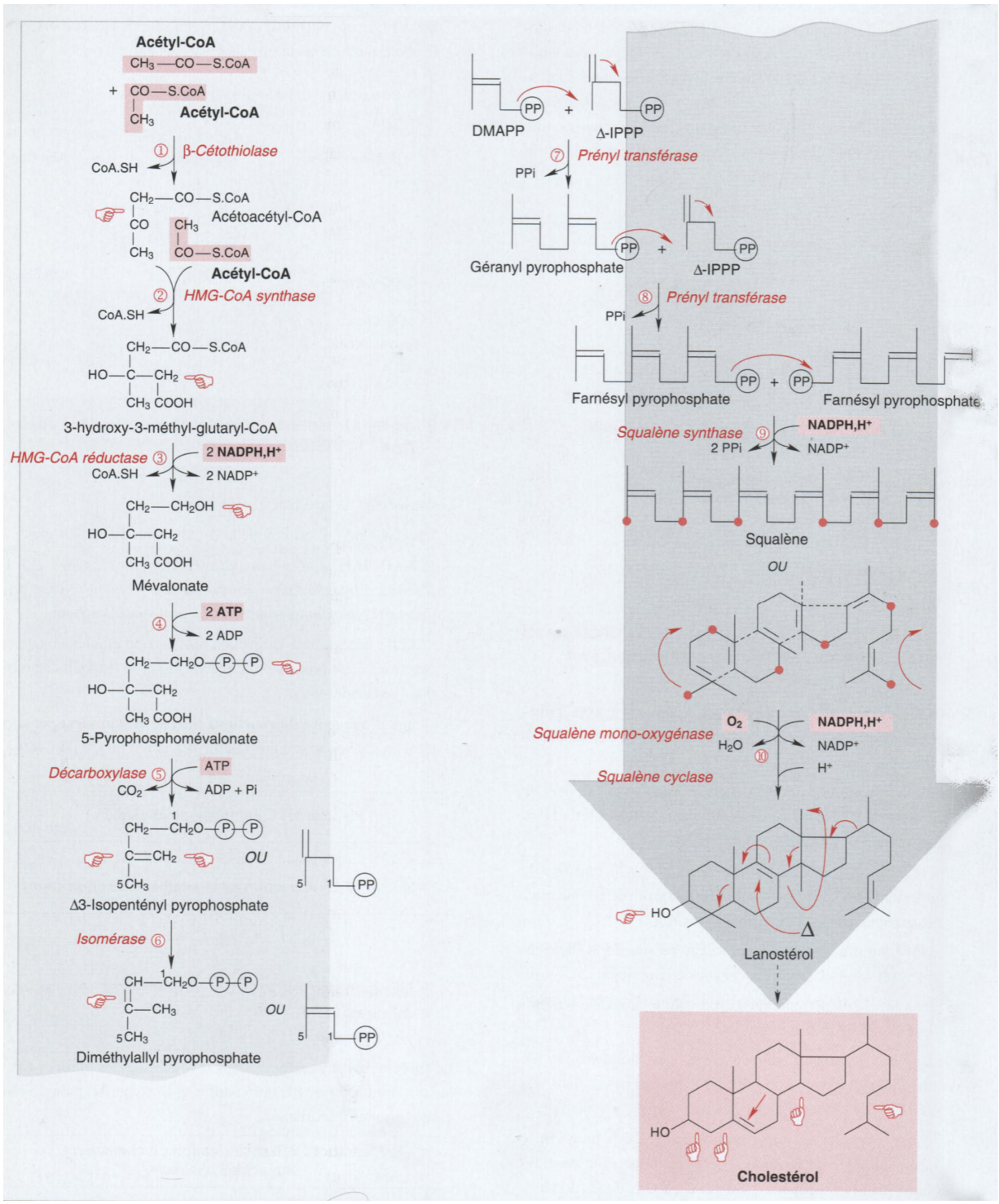
- **La lipase pancréatique non spécifique** hydrolyse dans la lumière intestinale les esters de cholestérol alimentaires en cholestérol et acides gras.

- La **cholestérol estérase** (CE) cellulaire hydrolyse les esters de cholestérol apporté au foie par les remnants, IDLs, LDLs, et HDLs et aux tissus extrahépatiques par les LDLs.

- **L'acyl-CoA cholestérol acyl transférase** (ACAT) transfère le groupement acyle de l'acyl-CoA, forme activée de l'acide gras, sur le groupement hydroxyle du cholestérol :

  * dans l'intestin, cet enzyme cellulaire réestérifie le cholestérol avant son incorporation dans les chylomicrons,

  * dans les tissus périphériques, il assure le stockage du cholestérol sous forme d'esters,



<u>Figure 23 :</u> Synthèse du cholestérol (Christian Moussard, Biochimie Structurale et Métabolique, Edition De Boeck, 2004)

* dans le foie, son activité est faible : le cholestérol est en majorité incorporé sous forme non estérifiée dans les VLDLs ; il y est ensuite estérifié par la LCAT plasmatique.

- **La lécithine cholestérol acyl transférase** (LCAT) transfère le groupement acyle en position 2 de la lécithine (phosphatidycholine) sur le groupement hydroxyle en C-3 du cholestérol. Cet enzyme est plasmatique, estérifiant le cholestérol au sein des VLDLs, et constitutif des HDLs, au sein desquels il estérifie le cholestérol capté au niveau des tissus périphériques.

La synthèse du cholestérol se fait à partir de l'acétyl-CoA. Les substrats de la synthèse sont **l'acétyl-CoA** qui est issu de la β-oxydation des acides gras ; le **NADPH,H$^+$**, nécessaire aux réactions de réduction et à la réaction d'hydroxylation (en présence d'oxygène), qui est produit principalement par la voie des pentoses phosphate ; l'**ATP**, nécessaire à la réaction d'activation du mévalonate en isoprène, qui est produit principalement par le catabolisme oxydatif des acides gras.

Au cours d'une suite de réactions longue et complexe, le cholestérol en C27 est constitué à partir des unités en C2 de l'acétyl-CoA (Figure 23).

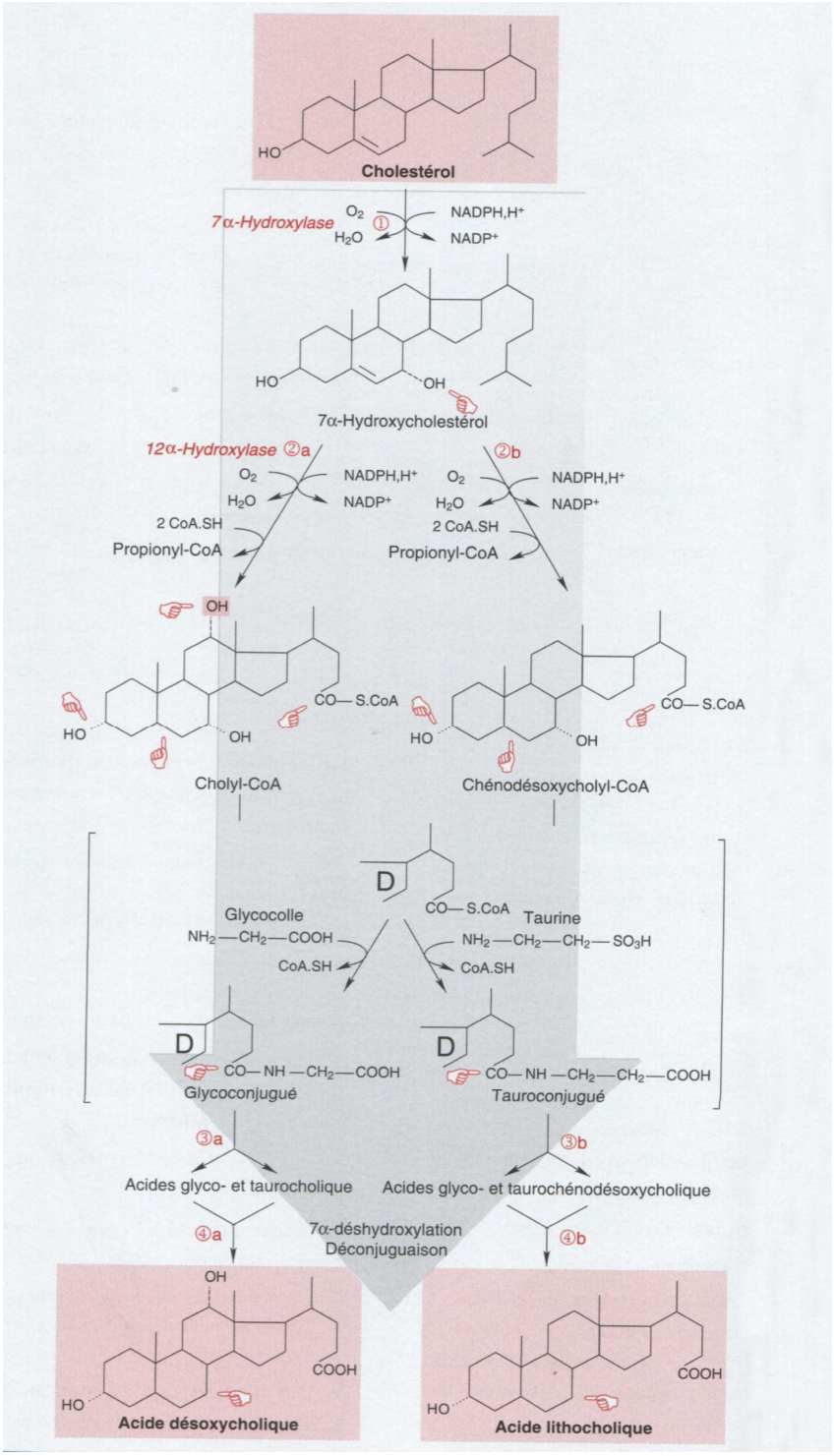
Le cholestérol est transformé dans le foie en acides biliaires qui sont, à la fois, sa forme d'élimination et ont des fonctions biologiques propres importantes (Figure 24).

90% des acides biliaires (primaires et secondaires) subissent un recyclage entéro-hépatique : ils retournent au foie par la circulation portale pour être à nouveau excrétés dans la bile vers l'intestin. Les 10% restant sont éliminés dans les selles, principalement sous la forme d'acide lithocholique. Les acides biliaires, formes d'élimination du cholestérol, participent à son homéostasie. Dans la bile, au côté des phospholipides, ils solubilisent le cholestérol.

⌘ Oxystérols et synthèse du cholestérol

La β-hydroxy-β-méthyl-glutaryl-coenzyme A reductase (*HMG-CoA reductase*), enzyme catalysant l'étape limitante dans la synthèse du cholestérol (Figure 23), est parmi les enzymes les plus hautement régulées dans la nature.

Beaucoup d'oxystérols sont de puissants inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase, et ceci à des concentrations inférieures à 100 nM (Morel & Lin, 1996). A des concentrations de 50 à 70 nM, les



<u>Figure 24 :</u> Transformation du cholestérol en acides biliaires (Christian Moussard, Biochimie Structurale et Métabolique, Editions De Boeck, 2004).
La transformation du cholestérol en 7a-hydroxycholestérol, catalysée par la 7a-hydroxylase, est l'étape de régulation du catabolisme du cholestérol.

oxystérols comme le 25-hydroxycholestérol ou le 24(S),25-epoxycholesterol diminuent l'activité réductase et la proportion de synthèse de stérol de 50% dans des cellules L de souris, proches de fibroblastes, en culture (Saucier *et al.*, 1985).

L'HMG-CoA réductase est régulée par les facteurs de transcription SREBPs. Les oxystérols agissent en diminuant l'expression des SREBPs, soit en inhibant leur activation protéolytique, soit en réprimant leurs gènes cibles *via* le LXRα ou les OSBPs/ORPs (Millatt *et al.*, 2003 ; Adams *et al.*, 2004). Il a été montré que le 25-hydroxycholestérol favoriserait la liaison de la SCAP avec Insigs, empêchant le mouvement du complexe SCAP/SREBP vers l'appareil de Golgi où SREBP est normalement transformée dans sa forme active (Adams *et al.*, 2004). Mais il ne provoquerait pas un changement conformationnel détectable. Le 25-hydroxycholestérol agirait aussi indirectement à travers une protéine qui pourrait appartenir à la famille OSBPs (Adams *et al.*, 2004). En effet, ce récepteur pourrait altérer le transport de la SCAP et ainsi empêcher l'activation des SREBPs (Letho & Olkkonen, 2003).

En plus de ces différents effets, il a été suggéré que les oxystérols favoriseraient aussi la dégradation de l'HMG-CoA réductase :

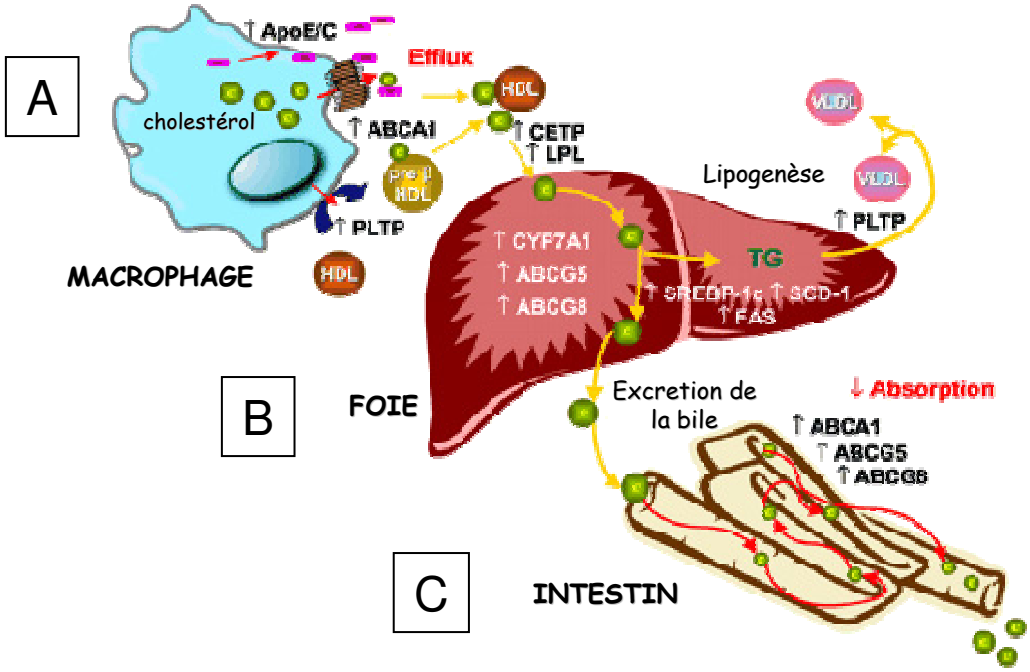
1) la demi-vie de cette enzyme est réduite en présence de 25-hydroxycholestérol ou de 7-cétocholestérol (Brown & Jessup, 1999),

2) les oxystérols modifieraient sa structure et donc son état de phosphorylation (Guardiola *et al.*, 1996),

3) la présence d'oxystérols dans la membrane du réticulum endoplasmique altérerait l'interaction physique entre la membrane et la réductase favorisant sa dégradation ou activerait d'autres enzymes liées à la membrane intervenant dans la dégradation de la réductase (Morel & Lin, 1996).

⌘ Oxystérols et estérification du cholestérol

Beaucoup d'oxystérols sont de puissants régulateurs de l'estérification du cholestérol intracellulaire. Brown et Goldstein rapportent que l'incubation de fibroblastes humains en culture avec des oxystérols, augmentant fortement le contenu cellulaire en esters de cholestérol, serait une conséquence d'une activité augmentée de l'ACAT (Morel & Lin, 1996 ; Brown *et al.*, 1975). Des effets similaires ont été observés avec des hépatocytes de rat, des cellules intestinales de lapin, des cellules musculaires lisses aortiques de lapin aussi bien qu'avec plusieurs types cellulaires intestinaux et macrophagiques transformés.



<u>Figure 25 :</u> Rôles des gènes cibles de LXR dans l'homéostasie du cholestérol (Tontonoz & Mangelsdorf, 2003)
A : L'ApoE intervient au niveau du retour au foie du cholestérol par l'intermédiaire des remnants, VLDL et IDL. La protéine ABCA1 est importante pour l'efflux du cholestérol cellulaire en excès. La PLTP est impliquée dans le transport reverse du cholestérol.
B : La LPL catalyse l'hydrolyse des triglycérides des lipoprotéines. Les agonistes de LXR induisent l'expression de la LPL dans les macrophages et le foie mais pas dans le tissu adipeux. La CETP, secrétée par le foie et circulant dans le plasma principalement liée aux HDL, favorise le transfert des esters de cholestérol des HDL aux particules à ApoB en échange de triglycérides.
CYP7A1, première cible identifiée de LXR, est l'enzyme qui catalyse l'étape limitante de la synthèse des acides biliaires. ABCG5 et ABCG8 forment un dimère qui réside dans la membrane apicale des hépatocytes et qui fonctionne comme une pompe qui transporte le cholestérol dans la bile.
Le mécanisme, par lequel les agonistes de LXR stimulent la lipogenèse, passe à travers l'activation directe du promoteur de SREBP-1c ainsi que sur certains gènes lipogeniques comme FAS et la PLTP.
C : ABCA1, ABCG5 et ABCG8 jouent un rôle dans l'inhibition par LXR de l'absorption du cholestérol au niveau de l'intestin.
ABCA1 : *ATP Binding Cassette A1 ;* ABCG5 et ABCG8 : *ATP Binding Cassette G5 et 8* ; ApoB : Apolipoprotéine B ; Apo E: Apolipoprotéine E ; CETP : protéines de transfert des esters de cholestérol ; CYP7A1 : *cytochrome P450, family 7, subfamily A, polypeptide 1 ;* FAS : *Fatty Acid Synthase* ; HDL : *High Density Lipoprotein* ; IDL : *Intermediate Density Lipoprotein* ; LPL : *LipoProtein Lipase* ; LXR : *Liver X Receptor* ; PLTP : protéine de transfert des phospholipides ; SREBP : *Sterol Regulatory Element Binding Protein* VLDL : *Very Low Density Lipoprotein.*

Plusieurs hypothèses existent concernant le mode de régulation de l'ACAT par les oxystérols. Il est possible que la liaison du 25-hydroxycholestérol à l'ACAT provoque un changement structural induit par le ligand au niveau de la protéine ACAT qui convertit l'enzyme d'une forme inactive en une forme active (Doolittle & Chane, 1982). Il peut y avoir également une modification covalente spécifique, induite par l'oxystérol, de la protéine qui peut en retour l'activer. Un rôle possible de la phosphorylation/déphosphorylation est également envisagé. L'utilisation d'inhibiteur de la synthèse des protéines n'annule pas l'effet stimulateur du 25-hydroxycholestérol sur l'activité ACAT suggérant que les oxystérols modulent l'activité ACAT de manière post-traductionnelle (Kushuhara *et al.*, 1992).

⌘ Oxystérols et absorption digestive du cholestérol

Dans l'entérocyte, l'accumulation d'oxystérols provoque l'activation des récepteurs nucléaires LXRα, qui induisent l'expression au niveau intestinal des transporteurs ABCA1, ABCG1, ABCG5, ABCG8 (Figure 25) (Costet *et al.*, 2000). ABCG5 et ABCG8 sont localisés au niveau de la membrane apicale des cellules de la muqueuse intestinale et de la membrane des canalicules du foie (Sudhop *et al.*, 2005). Ils représentent des pompes d'export de stérols qui participent à l'efflux actif de cholestérol et de phytostérols des entérocytes vers la lumière intestinale pour leur excretion. (Lammert & Wang, 2005 ; von Bergmann *et al.*, 2005). ABCG5 et ABCG8 sont régulés à travers LXRs par les oxystérols ainsi que par les stérols des plantes (Sudhop *et al.*, 2005).

⌘ Oxystérols et transport reverse du cholestérol

Les oxystérols, peuvent également jouer un rôle sur le transport reverse du cholestérol, et ceci également via les LXRs α et β. Ces derniers régulent positivement de nombreux gènes codant pour des protéines impliquées dans l'efflux du cholestérol comme les transporteurs ABCA1, ABCG1, et ABCG4 (Costet *et al.*, 2000 ; Rowe *et al.*, 2003 ; Engel *et al.*, 2001, Shachter, 2005, Sabol *et al.*, 2005), la CETP (Luo & Tall, 2000) et la PLTP (Laffitte *et al.*, 2003).

Des études *in vitro* avec des macrophages péritonéaux de souris knock-out pour ABCG1 montrent qu'ABCG1 est responsable de l'efflux de cholestérol induit par LXR aux HDLs (Shachter, 2005). ABCG1 est donc clairement un médiateur important de l'efflux de cholestérol total dans certains tissus, particulièrement sous des conditions d'excès de cholestérol (Shachter, 2005). ABCG1 et ABCG4 favorisent l'efflux de cholestérol des cellules aux HDLs. ABCG1 est hautement

exprimé dans les macrophages et participe propablemement l'efflux de cholestérol des macrophages spumeux aux HDLs, fournissant un mécanisme pour expliquer les relations entre les niveaux de HDLs et le risque d'athérosclérose (Wang *et al.*, 2004, Kennedy *et al.*, 2005).

Dans des cellules macrophagiques humaines et murines cultivées en présence de lipoprotéines athérogènes, une augmentation des taux de 24(S),25-epoxycholesterol, puissant ligand des LXRs, provoque une inhibition partielle de l'oxydosqualène:lanostérol cyclase, enzyme microsomale impliquée dans la voie de biosynthèse du cholestérol, ce qui réduit la formation des cellules spumeuses. L'inhibition de l'oxydosqualène:lanostérol cyclase régule positivement l'expression d'ABCG1 et ABCA1, ce qui mène à une augmentation de l'efflux de cholestérol des macrophages, ceci médié par les LXRs (Rowe *et al.*, 2003). Une augmentation de la synthèse des oxystérols endogènes, dans les macrophages, représente un nouveau mécanisme pour la régulation des gènes qui répondent à LXR et SREBP, ce qui participe à l'inhibition de la formation des cellules spumeuses (Rowe *et al.*, 2003).

Les LXRs, activés par les oxystérols, pourraient également moduler le métabolisme des lipoprotéines plasmatiques afin de favoriser le transport inverse du cholestérol. Dans des cellules adipocytaires, le 22(R)-hydroxycholestérol a été montré pour induire l'expression de la CETP, protéine de 74 kDa, contribue au transfert des esters de cholestérol des HDL aux lipoprotéines riches en triglycérides (Luo & Tall, 2000). De plus, le 22(R)-hydroxycholestérol et le 20(S)-hydroxycholestérol induisent également, *via* les LXRs, l'expression hépatique et macrophagique de la PLTP (Laffitte *et al.*, 2003).

b. Oxystérols et récepteur aux LDLs

L'expression du récepteur aux LDLs (*LDL-receptor*) est contrôlée par le besoin de la cellule en cholestérol, il se produit une augmentation de la transcription du gène quand le cholestérol est nécessaire pour la cellule, et une diminution de la synthèse de l'ARNm quand le cholestérol intracellulaire s'accumule.

Des études ont été réalisées afin de déterminer comment les oxystérols agissent sur l'expression du récepteur aux LDLs. Il a été découvert une séquence promotrice de 42 pb dans la région flanquante 5' du gène du récepteur, qui contrôle l'expression de la région codante pour celui-ci d'une manière dépendante des stérols (Sudhof *et al.*, 1987). A l'intérieur de cette séquence de 42 pb, deux séquences continues de 16 pb ont été identifiées et désignées « repeat-2 » et « repeat-3 ».

La « repeat-3 » favorise de manière constitutive la transcription du gène du récepteur sans tenir compte de la présence de stérols (Dawson *et al.*, 1988). En revanche, la « repeat-2 » supprime fortement l'action de la « repeat-3 » lorsque les stérols sont présents (Dawson *et al.*, 1988). Smith *et al.* (1989) ont découvert qu'une séquence de 10 pb à l'intérieur de la « repeat-2 » est essentiellement responsable de la suppression, médiée par les stérols, de l'expression du gène du récepteur aux LDLs. Cette séquence a été appelée élément régulateur des stérols 1 (SRE-1).

La SRE-1, dans la région promotrice du gène, contient une séquence consensus 5' CACC(C/G)CAC 3'. Cette séquence consensus se comporte comme un *enhancer* pour augmenter la transcription du gène des récepteurs aux LDLs en absence des oxystérols et est inactivée quand les oxystérols sont présents (Smith *et al.*, 1990). Le facteur de transcription SREBP-1 se fixe sur les séquences SRE-1. De forts taux intracellulaires de cholestérol et d'oxystérols inhibent donc la transcription en supprimant la production de la forme native de la SREBP (Wang *et al.*, 1994).

Il a été également proposé que les OBPs pouraient intervenir dans cette régulation par les oxystérols.

c. Oxystérols et métabolisme des acides gras

En 1990, Seillan rapporte que différents oxystérols produisent des effets différents sur la distribution des acides gras dans des cellules musculaires lisses aortiques bovines en culture. Les oxystérols inhibent également la synthèse des acides gras polyinsaturés à longue chaîne, à partir de leurs précurseurs, *in vivo* chez des lapins hypercholestérolémiques et *in vitro* dans des cellules THP-1 en culture (Rise *et al.*, 2004). Les oxystérols sont aussi montrés pour modifier le métabolisme cellulaire de l'acide arachidonique et de ses métabolites oxygénés, les eicosanoïdes (Lahoua *et al.*, 1988, 1991; Wohlfeil & Campbell, 1997). Les oxystérols peuvent activer la phospholipase A2 ou la protéine kinase C ou alternativement s'insérer dans la membrane plasmique et altérer l'activité de l'enzyme (Millanvoye-Van Brussel *et al.*, 2004 ; Antonio *et al.*, 2003). Des gènes intervenant dans la synthèse et la désaturation des acides gras: l'acide gras synthase, l'acétyl CoA carboxylase et la stéaryl CoA désaturase, sont régulés par les oxystérols tout comme certains intervenant dans la synthèse des triglycérides comme la glycérol-3-phosphate acyltransférase (Millatt *et al.*, 2003, Edwards *et al.*, 2000).

Cette action des oxystérols peut être médiée par les LXRs. L'administration d'agonistes de synthèse des LXRs à des souris induit l'expression des gènes de la biosynthèse des acides gras, comme ceux de l'acétyl CoA carboxylase, l'acide gras synthase, la stéaryl CoA désaturase-1 et provoque une augmentation des triglycérides dans le foie et le plasma, ainsi que des phospholipides (Makishima, 2005). Les LXRs régulent la SREBP-1c, qui augmente l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des acides gras.

d. Oxystérols et membrane cellulaire

Le cholestérol a un rôle primordial dans le maintien de la fluidité membranaire, la perméabilité et la stabilité des membranes. La fluidité membranaire dépend également du degré d'insaturation et de la longueur des chaînes des acides gras des phospholipides membranaires. Les oxystérols peuvent perturber l'interaction entre le cholestérol et les phospholipides, rendant l'action du cholestérol moins efficace. Les oxystérols sont capables de s'insérer dans la bicouche lipidique. Le 7-cétocholestérol s'oriente, dans un modèle de bicouche, d'une manière distincte de celle du cholestérol, perpendiculairement au plan de la bicouche, et peut former des domaines séparés dans des membranes synthétiques et cellulaires (Phillips *et al.*, 2001). Le 7-cétocholestérol n'organise pas les chaînes acyles des phospholipides de la même manière que le cholestérol, il ne condense donc pas les phospholipides membranaires aussi efficacement que le cholestérol (Phillips *et al.*, 2001, Massey & Pownall, 2005). Dans des cellules en culture, avec des concentrations de 7-cétocholestérol similaires à celles rencontrées dans des macrophages spumeux lésionnels, le 7-cétocholestérol libre se localise principalement au niveau de domaines membranaires résistants au détergent Triton X-100 (Berthier *et al.*, 2004, Myers & Stanley, 1999, Gaus *et al.*, 2004). Les domaines membranaires résistant aux détergents (radeaux lipidiques), isolés de ces macrophages chargés en cholestérol, contiennent environ 60% de sphingomyéline, et le 7-cétocholestérol représente 35% de la concentration totale en stérols (Gaus *et al.*, 2004). Cette quantité de stérol membranaire peut être requise pour les effets biologiques *in vitro* du 7-cétocholestérol. Les oxystérols peuvent donc altérer la composition en lipides et en protéines ainsi que les propriétés biophysiques des radeaux lipidiques qui peuvent être mécaniquement liés aux divers effets pathologiques des oxystérols (Berthier *et al.*, 2004, Gaus *et al.*, 2004). L'incorporation de 7-cétocholestérol, dans les radeaux lipidiques des membranes plasmiques, peut être considérée comme le mécanisme primaire par lequel cet oxystérol induit l'apoptose ou les voies de transduction du signal dans l'inflammation (Massey & Pownall, 2005). En revanche, le 25-hydroxycholestérol ne s'intercale pas dans les membranes. Ces différentes modifications membranaires peuvent donc perturber l'environnement des protéines transmembranaires.

Les oxystérols exercent de profonds effets régulateurs sur la structure et la fonction des membranes biologiques. Leurs effets se produisent : **1)** par insertion dans la bicouche de phospholipides modulant ainsi les interactions entre les lipides membranaires ainsi que la structure secondaire des protéines …. ; **2)** en éliminant le cholestérol membranaire.

Un grand nombre d'oxystérols modulent l'activité enzymatique de nombreuses protéines associées à la membrane comme la Na^+/K^+ ATPase (*Adenosine TriPhosphate Phosphatase*), et la Ca^{++}/Mg^{++} ATPase (Zhou *et al.*, 1991, Tabas, 2002). Les oxystérols stimulent la perméabilité des membranes au calcium. Une plus grande augmentation du calcium au niveau coronaire semble indiquer un risque substantiel pour les évènements cardiaques avancés (Ares *et al.*, 2000).

L'action des oxystérols sur les membranes cellulaires peut jouer un rôle dans le déroulement de l'athérosclérose. Le remodelage de la composition en lipides des membranes des cellules veineuses peut se produire durant le développement de l'athérosclérose, l'endothélium peut être impliqué dans ce processus (Kummerow *et al.*, 2000). En effet, lorsque des cellules endothéliales sont cultivées en présence de 27-hydroxycholestérol, il se produit une augmentation de la composition des membranes en sphingomyéline et en acide linoléique (Kummerow *et al.*, 2000). Les mêmes observations ont également été réalisées dans les artères coronaires de patients ayant subi une greffe au niveau de la déviation de l'artère coronaire. Ceci peut nous amener à suggerer que certains oxystérols peuvent être de puissants agents altérant l'architecture des vaisseaux (Kummerow *et al.*, 2000).

e. Oxystérols, prolifération et différenciation

Les oxystérols suppriment ou ralentissent la prolifération cellulaire, avec une activité anti-mitotique *in vivo*.

Le 25-hydroxycholestérol et le 7β-hydroxycholestérol inhibent la prolifération des cellules THP-1, par une accumulation des cellules dans la phase G2/M en régulant négativement la cycline B1 (Lim *et al.*, 2003).

La différenciation de l'épiderme est régulée par le récepteur LXRβ et les oxystérols, agissant par le LXRβ, peuvent induire la différenciation et inhiber la prolifération *in vivo* (Komuves *et al.*, 2002). Le traitement des kératinocytes humains en culture avec des oxystérols stimule leur différenciation. Ceci se produirait par l'augmentation de l'expression d'une protéine, l'involucrine,

suite à une élévation des taux de protéines constituant le complexe AP-1 (*Activator Protein-1*), induite par les oxystérols (Schmuth *et al.*, 2005).

Les cellules souches mésenchymateuses sont présentes dans une grande variété de tissus mais plus particulièrement dans le stroma de la moëlle osseuse. Elles peuvent se différencier en cellules spécifiques de lignées incluant les ostéoblastes, les chondrocytes, les myocytes, les adipocytes et les fibroblastes. Ces cellules pourraient être utilisées lors de maladies humaines comme l'ostéoporose qui apparaît avec l'âge ou après la ménaupose. Certains oxystérols pourraient réguler la différenciation spécifique de lignées des cellules souches mésenchymateuses en faveur d'une différenciation ostéoblastique par rapport à une différenciation adipogènique (Kha *et al.*, 2004). Cet effet des oxystérols passerait en partie par des mécanismes dépendants des voies ERK et COX/PLA_2 (*Phospholipase* A_2) (Kha *et al.*, 2004).

Le 7-cétocholestérol peut également induire la différenciation des monocytes en macrophages. Lorsque des cellules THP1 (lignée cellulaire monocytaire) sont traitées par du 7-cétocholestérol à de faibles concentrations, elles se différencient (Hayden *et al.*, 2002). Une adhérence aux boites de culture se met en place, des changements morphologiques et l'expression de marqueurs cellulaires caractéristiques de macrophages matures apparaissent (Hayden *et al.*, 2002). La voie utilisée par le 7-cétocholestérol pour cette action reste à élucider. Le 7-cétocholestérol peut également induire la différenciation et inhiber la prolifération des cellules épithéliales du cristallin (Girao *et al.*, 2003).

f. Oxystérols et immunité

Les oxystérols peuvent être de puissants immunosuppresseurs en affectant la production de lymphocytes cytotoxiques et leur fonction, en inhibant la prolifération et la transformation des lymphocytes, et l'activité des cellules NK (*Natural Killer*) (Smith & Johnson, 1989). Le 25-hydroxycholestérol supprime les transformations des lymphocytes humains induites par la concanavaline A, le mévalonate, la phytohémagglutinine (Yachnin, 1982) et inhibe la transformation des lymphocytes murins natifs en lymphocytes cytotoxiques différenciés (Heiniger & Marshall, 1982). Le 7β-hydroxycholestérol et le 7α-hydroxycholestérol administrés de manière intra-péritonéale à des rats ayant subi des greffes de peau semblent prolonger le temps de survie des greffes (Saito *et al.*, 1983). Ces actions suppressives auraient pour origine l'inhibition de la biosynthèse *de novo* des stérols. En effet le cholestérol est requis pour la prolifération et la cytotoxicité des lymphocytes (Heiniger & Marshall, 1982 ; Hemmi *et al.*, 1985 ; Cuthbert &

Lipsky, 1980). Plus tard, il a été démontré que la fonction lytique des cellules NK est sensible aux altérations physiques de sa membrane plasmique induites par les oxystérols (Kucuk *et al.*, 1992). L'inhibition de l'activité cytolytique des lymphocytes par les oxystérols serait également due à un remplacement du cholestérol membranaire par les oxystérols ce qui altérerait les fonctions physiques de la membrane (Kucuk *et al.*, 1994).

Les réponses cellulaires immunes à des protéines chemoattractives solubles appelées chemokines sont médiées par les récepteurs aux chemokines. La signalisation à travers ces récepteurs mène à l'activation de nombreuses voies de signalisation incluant la mobilisation du calcium intracellulaire, l'activation des MAP kinases (*Mitogen-Activated Protein*) et l'activation de la voie JAK/STAT (*Janus Activated Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription*). Le 22-hydroxycholestérol réduit significativement la liaison de SDF-1α et de MIP-1β (*Macrophage Inflammatory Protein 1 beta*), deux chémokines, aux cellules des lignées T humaines ainsi qu'aux cellules monocytaires isolées du sang périphérique (Nguyen & Taub, 2003). Cet oxystérol inhibe aussi la mobilisation du calcium intracellulaire et la migration des cellules en réponse à un traitement par le SDF-1α (Nguyen & Taub, 2003). Alors que la présence d'oxystérols dans la membrane cellulaire inhibe significativement la fonction du récepteur aux chémokines, l'effet inhibiteur n'implique pas d'altérations dans la conformation du récepteur, ni l'expression ou l'antagonisme direct de la liaison des chemokines (Nguyen & Taub, 2003).

Certaines fonctions inflammatoires des macrophages et des lymphocytes peuvent être modifiées par les oxystérols comme la production d'intermédiaires réactifs de l'oxygène et l'activité comme IL-1 (Dushkin *et al.*, 1998).

g. Oxystérols et inflammation

Les oxystérols peuvent moduler le métabolisme de l'acide arachidonique et induire le déséquilibre des niveaux de prostaglandines dans de nombreux tissus. Quand des oxystérols sont ajoutés au milieu de culture de cellules NRK 49F (rat, rein), le relargage de la prostaglandine E_2 et de la prostaglandine $F_{2\alpha}$, dans le milieu, est augmenté sans une modification apparente de l'activité cylcooxygenase, bien que ces observations n'aient pas été réalisées en absence de sérum de veau fœtal (Lahoua *et al.*, 1991). Les oxystérols, les plus actifs, seraient par ordre décroissant : 7α-hydroxycholestérol > 7β-hydroxycholestérol > 25-hydroxycholestérol (Lahoua *et al.*, 1988). Les oxystérols potentialisent le relargage d'acide arachidonique et la biosynthèse de protaglandines induits par le sérum. Le 25-hydroxycholestérol peut également stimuler la production d'écosanoïdes des cellules endothéliales d'artères coronaires bovines en culture, en augmentant la protaglandine

G/H synthase-2 (Wohlfeil & Campbell, 1997). Ainsi, les oxystérols peuvent induire de nombreux processus inflammatoires à travers la perturbation du métabolisme de l'acide arachidonique.

Les oxystérols peuvent également réguler la synthèse et l'expression d'un certain nombre de cytokines. Lorsque des cellules promonocytaires humaines U937 sont traitées par une mixture d'oxystérols, l'expression et la synthèse de MCP-1 sont augmentées et ceci est sous la dépendance d'une augmentation de la phosphoylation d'ERK 1/2 et de la liaison nucléaire de NF-κB (Leonarduzzi *et al.*, 2005). Certains oxystérols, le 25-hydroxycholestérol et ceux oxydés en position 7, peuvent induire la production d'interleukine-1β dans des macrophages humains et des cellules endothéliales de veines ombilicales humaines (Rosklint *et al.*, 2002 ; Lemaire *et al.*, 1998).

Le cholestérol est présent en grande quantité dans le cerveau, il peut être oxydé par différents processus. Dans des astrocytes de rat en culture, stimulés par des lipopolysaccharides, le 7-cétocholestérol et le 22(R)-hydroxycholestérol suppriment l'expression de la NO synthase inductible, le relargage du NO ainsi que l'inhibition de l'activité de molècules de signalisation présentes en amont incluant l'interféron-β (diminution des taux de transcripts), STAT 1/3 (diminution de la phosphorylation), IRF-1 (*Interferon Regulatory Factor-1*) (diminution de l'expression de la protéine) (Lee *et al.*, 2006). Cet effet serait médié par l'hétérodimère LXR/RXR (Figure 25) (Lee *et al.*, 2006).

7. Toxicité des oxystérols

La cytotoxicité des oxystérols sur différents types cellulaires est largement décrite.

a. Mort cellulaire induite par les oxystérols sur les cellules de la paroi vasculaire

⌘ L'apoptose

Les oxystérols induisent *in vitro* la mort par apoptose des différents types de cellules de la paroi vasculaire: les cellules endothéliales (Lizard *et al*, 1996 ; Lizard *et al.*, 1997 ; Lizard *et al.*, 1999), les cellules musculaires lisses (Ares *et a.l*, 1997 ; Lizard *et al.*, 1999 ; Ares *et al.*, 2000) et les monocytes/macrophages (Miguet *et al.*, 2001 ; Monier *et al.*, 2003 ; Rusiñol *et al.*, 2004). Le 7-cétocholestérol, le 7β-hydroxycholérol et le 27-hydroxycholestérol induisent l'apoptose des différents types cellulaires de la paroi vasculaire (Clare *et al.*, 1995 ; Ares *et al.*, 2000 ; Lizard *et al.*, 1997) alors que le 25-hydroxycholestérol présente une toxicité plus ou moins marquée en fonction

des cellules (Ares *et al.*, 1997 ; Lizard *et al.*, 1997 ; Rusiñol *et al.*, 2000). Les concentrations en oxystérols couramment rencontrées dans la littérature vont de 3 à 60 µg/ml, soit de 7,5 à 150 µM (Rusiñol *et al.*, 2000 ; Millanvoye-Van Brussel *et al.*, 2004), et les temps d'incubation vont de quelques minutes à 48 h (Ares *et al.*, 2000 ; Lemaire *et al.*, 1998). Ces concentrations d'oxystérols sont dans l'ordre de grandeur de celles mesurées dans le plasma humain (30 µM) après un repas riche en lipides (Emanuel *et al.*, 1991).

Voie mitochondriale

L'apoptose induite par les oxystérols présente les caractéristiques suivantes : externalisation de la phosphatidylsérine ; diminution du potentiel transmembranaire mitochondrial, sortie de l'espace transmembranaire mitochondrial vers le cytosol du cytochrome *c*, d'*Apoptosis Inducing Factor* (AIF), et d'endonucléase G, regulation négative de l'expression de Bcl-2 (*B-Cell Leukemia/Lymphoma 2*), clivage de Bid, activation des caspases-9, -3, -7, et -8, clivage d'ICAD (*Inhibitor Caspase-Activated Deoxyribonuclease*) et de la poly-ADP-Ribose polymérase, dégradation lysosomiale, fragmentation internucléosomale de l'ADN, condensation et/ou fragmentation nucléaire caractéristique de l'apoptose et gonflement cellulaire évoquant l'oncose (Nishio & Watanabe, 1996 ; Lizard *et al.*, 1997 ; Miguet *et al.*, 2001, Yang & Sinensky, 2000, Lim *et al.*, 2003, Seye *et al.*, 2004 ; Prunet *et al.*, 2005, Meynier *et al.*, 2005, Ryan *et al.*, 2005).

Les voies pré-mitochondriales, associées à la mort induite par les oxystérols, sont encore mal connues. Cependant, divers événements intervenant en amont de la mitochondrie ont été décrits dans différents types cellulaires, comme l'implication de la membrane plasmique, du calcium, de différentes voies de signalisation et des radicaux oxygenés (Berthier *et al.*, 2004 ; Leonarduzzi *et al.*, 2006, Lizard *et al*, 1999).

Le 22-hydroxycholestérol s'incorpore dans la membrane plasmique des cellules T humaines et il a été suggéré que cette incorporation pourrait être à l'origine de sa cytotoxicité (NGuyen & Taub, 2003).

Dans les cellules musculaires lisses d'aorte humaine, le 7β-hydroxycholestérol induit de courtes oscillations intracellulaires de calcium quelques minutes après son ajout dans le milieu de culture (Ares *et al*, 2000). Dans ces mêmes cellules, l'apoptose induite par le 25-hydroxycholesterol peut-être partiellement inhibée par la nifédipine ou le vérapamil, deux bloqueurs des canaux calciques de type-L (Ares *et al*, 1997). Par ailleurs, dans des fibroblastes et des cellules macrophagiques traités

par le 25-hydroxycholestérol, un influx de calcium est associé à l'activation de la phospholipase A2 cytosolique (cPLA2), et à la libération d'acide arachidonique. Cette activation serait en partie responsable du déclenchement de l'apoptose puisque dans des cellules cPLA2 (-/-), la mort cellulaire induite par le 25-hydroxycholestérol est partiellement inhibée (Panini *et al*, 2001 ; Rusiñol *et al*, 2004).

Les protéines Stat1 et $p21^{waf-1}$ sont également impliquées dans l'apoptose induite par le 7-cétocholestérol dans des fibroblastes murins et humains (Agrawal *et al.*, 2002).

Le 25-hydroxycholestérol entraîne l'inactivation de la voie Akt/PKB dans des macrophages murins (Rusiñol *et al.*, 2004). En revanche, dans les cellules musculaires lisses d'aorte humaine, le 7β-hydroxycholestérol active la voie des ERKs 1 et 2 (Ares e*t al*, 2000).

Une augmentation du stress oxydatif dans les promonocytes humaines U937 traités par le 7-cétocholestérol ou le 7β-hydroxycholestérol se traduit par une peroxydation lipidique et une chute du glutathion intracellulaire (Lizard *et al*, 1999; O'Callaghan *et al*, 2002). Ce stress oxydatif est accompagné d'une augmentation de l'activité de l'enzyme superoxyde dismutase (O'Callaghan *et al*, 2001 et 2002) et d'une inhibition de la production de NO endogène (Monier *et al*, 2003), dans des cellules promonocytaires U937, ainsi que d'une augmentation de l'activité NOX4 (NADPH oxydase) (Pedruzzi *et al.*, 2004).

Voie des récepteurs de mort

L'apoptose induite par certains oxystérols est également caractérisée par l'implication de la voie des récepteurs de mort dans certains types cellulaires. En effet, il a été demontré que l'utilisation du 25-hydroxycholestérol et du 7β-hydroxycholestérol, sur des cellules musculaires lisses, à une concentration de 25 µg/ml, tout comme le traitement par des LDLs oxydées, induit une augmentation des niveaux de Fas et de son ligand (FasL), ainsi qu'une augmentation de l'ARN messager de ce dernier (Panini & Sinensky, 2001). Les cellules musculaires lisses humaines sont résistantes à la mort médiée par Fas dans des conditions physiologiques. En présence de 7-cétocholestérol, les cellules musculaires lisses d'aorte humaine meurent par activation de la voie Fas (Rho *et al.*, 2005). Comme la mort de ces cellules est un élément clé dans la déstabilisation de la chape fibreuse, la présence de 7-cétocholestérol et du ligand de Fas peut contribuer à la vulnérabilité de la plaque et augmenter ainsi le risque de sa rupture (Rho *et al.*, 2005). Fas et son

ligand sont aussi impliqués dans l'apoptose induite par le 25-hydroxycholestérol et le 7β-hydroxycholestérol des cellules musculaires lisses (Lee et Chau, 2001).

Le 7-cétocholestérol et le TNF-α sont tous les deux présents dans les lésions athérosclérotiques. Le 7-cétocholestérol peut induire la mort cellulaire des cellules musculaires lisses d'aorte humaine en activant la voie des récepteurs de mort TNF (Lee *et al.*, 2005). Comme les cellules musculaires lisses vasculaires humaines sont des éléments clés dans la stabilisation de la chape fibreuse, la présence de 7-cétocholestérol peut contribuer à la destabilisation de la plaque en augmentant la mort des cellules musculaires lisses à travers la famille des récepteurs au TNF.

Tous les oxystérols ne présentent pourtant pas simultanément toutes ces caractéristiques. Même si la finalité est la mort par apoptose des cellules, les voies qui y conduisent ne sont pas systématiquement les mêmes. Le 7β-hydroxycholestérol et le cholestérol-5β,6β-epoxide induisent l'apoptose des cellules monocytaires U937 par des voies apoptotiques différentes. L'apoptose induite par le 7β-hydroxycholestérol serait similaire à celle induite par l'étoposide, via la voie mitochondriale (Ryan *et al.*, 2004). Toutes ces différentes observations suggèrent que différentes voies peuvent exister pour propager le signal apoptotique au sein d'une même cellule et que les mécanismes d'activation diffèrent selon le type cellulaire ou selon l'oxystérol considéré.

⌘ L'autophagie

Dans l'autophagie, la formation des autophagosomes implique la protéine de LC3 (*microtubule-associated protein 1 Light Chain 3*) (Kabeya *et al.*, 2000). Deux formes de LC3, appelées LC3-I et LC3-II, sont produites post-transcriptionnellement. LC3-I est cytosolique alors que LC3-II est liée à la membrane. Les vacuoles d'autophagie sont riches en LC3-II (Kabeya *et al.*, 2000). LC3-II peut être formée par conversion de la forme LC3-I. Dans des cellules musculaires lisses aortiques humaines, le 7-cétocholestérol induit un mode de mort cellulaire associé avec la conversion de LC3-I en LC3-II évoquant un processus autophagique (Martinet *et al.*, 2004).

⌘ Le stress du reticulum

La voie UPR (*Unfolded Protein Response*) est induite chez des cellules musculaires lisses aortiques humaines en culture traitées par le 7-cétocholestérol. Le 7-cétocholestérol génère des oscillations transitoires et précoces de calcium intracellulaire et active la voie IRE-1/JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*)/AP-1 (Pedruzzi *et al.*, 2004). Une augmentation de la quantité des protéines

GRP78/Bip et Bax, ainsi qu'une forte diminution des taux de la protéine Bcl-2 sont également observées, mettant bien en évidence l'activation d'un stress du réticulum dans des cellules musculaires lisses traitées par le 7-cétocholestérol (Pedruzzi *et al.*, 2004). Dans ce cas, la NADPH oxydase, non phagocytaire, Nox4 semble médier le stress du réticulum induit par le 7-cétocholestérol (Pedruzzi *et al.*, 2004). En effet, ces différentes observations sont inhibées par l'extinction génique de Nox4 par ARN interférence.

b. Propriétés cytotoxiques et mutagènes des oxystérols sur d'autres types cellulaires

⌘ Propriétés cytotoxiques

La mort cellulaire neuronale est accompagnée par une augmentation du relargage du cholestérol. La conversion du cholestérol en son métabolite polaire, le 24-hydroxycholestérol, apparaît comme être un mécanisme important dans le système nerveux central pour l'élimination du cholestérol dans le cerveau. Le 24-hydroxycholestérol est toxique sur les cellules de neuroblastome humain, SH-SY5Y, à une concentration de 20 µg/ml (50 µM) (Kölsch *et al.*, 1999). Dans les mêmes cellules, le 7α-hydroxyperoxycholestérol induit une nécrose, de manière dose dépendante (Kölsch *et al.*, 2000). Dans des cellules neuronales de rat en culture, différents oxystérols ont été testés pour leur toxicité : 7β-hydroxycholestérol, 7-cetocholestérol, 19-hydroxycholestérol, 22(R)-hydroxycholestérol, 22(S)-hydroxycholesterol et le 25-hydroxycholestérol (Chang & Liu, 1998). Le 7β-hydroxycholestérol et le 7-cétocholestérol sont plus toxiques dès la concentration de 20 µg/ml (50 µM). Différents agents pharmacologiques, comme l'acide aurintricarboxylique, la vitamine E et la méthyl-β-cyclodextrine, sont capables de prévenir la neurotoxicité induite par ces oxystérols (Chang & Liu, 1998). Le 25-hydroxycholestérol est également toxique sur des cellules microgliales, provoquant une condensation du noyau et une fragmentation de l'ADN (Chang *et al.*, 1998). Cette cytotoxicité peut être inhibée par la méthyl-β-cyclodextrine (Chang *et al.*, 1998).

Certains oxystérols, comme le 7-cétocholestérol et le 7β-hydroxycholestérol, peuvent induire également la nécrose des fibroblastes (Lizard *et al.*, 1999). Ces fibroblastes nécrotiques possèdent un noyau irrégulier et diffus après coloration par le hoechst 33342, aucune fragmentation de l'ADN n'est observée par la méthode TUNEL et par électrophorèse en gel d'agarose (Lizard *et al.*, 1999).

⌘ Propriétés mutagènes

Seuls les epoxydes semblent mutagènes, l'isomère β semblant être plus puissant que l'isomère α. (Sevanian & Peterson, 1986). De plus, dans un système lymphocytaire, le cholestérol-5β,6β-epoxyde est le seul composé parmi ceux testés à produire une augmentation dans l'échange des chromatides sœurs (Petrakis *et al.*, 1982). La mutagenèse induite par le cholestérol-5α,6α-epoxyde est seulement observée dans le cas où la conversion en cholestanetriol est faible, laissant supposer que la cytotoxicité de l'epoxyde est moins efficace que celle du triol pour permettre l'expression de la mutagenèse (Sevanian & Peterson, 1986). La cholestérol epoxyde hydrolase semble donc être un déterminant majeur dans la mutagenèse du cholestérol epoxyde, l'inhibition de cette enzyme peut ainsi diminuer la cytotoxicité de l'epoxyde mais augmenter son effet mutagène (Sevanian & Peterson, 1986). Dans le cas de cellules épithéliales d'ovaire de hamster chinois (cellules CHO), l'étude de la mutagénicité de certains oxystérols (cholestérol-3β,5α,6β-triol, 7-cétocholestérol, cholestérol-5α,6α-epoxide), met en évidence que seul le triol possède des propriétés mutagènes (Cheng *et al.*, 2005). Il semblerait que les espèces réactives de l'oxygène soient impliquées dans les effets génotoxiques du triol (Cheng *et al.*, 2005).

c. Résistance des cellules aux oxystérols

Des études sur la résistance de cellules HL-60 exposées de manière continue au 7β-hydroxycholestérol, 25-hydroxycholestérol, et 7-cétocholestérol, ne mettent pas en évidence de différence significative dans l'expression de plusieurs gènes précedemment impliqués dans la résistance aux oxystérols (HMG-CoA, ACAT, CNBP (C*ellular Nucleic Acid Binding Protein*), OSBPL3 ou ORP3 (O*xysterol Binding Like-Protein 3*), bcl-2, et c-myc) (Gregorio-King *et al.*, 2004). En revanche, ces cellules expriment le gène Bcl-2 à des niveaux significativement plus faibles que ceux observés dans les cellules contrôles (Gregorio-King *et al.*, 2004).

8. Mélanges d'oxystérols

Les proportions d'oxystérols dans les mélanges varient selon les auteurs (Leonarduzzi *et al.*, 2001 ; Yuan *et al.*, 2000) mais cela permet tout de même d'appréhender les effets globaux des oxystérols comme cela pourrait être le cas au niveau des plaques d'athérome où un certain nombre d'oxystérols est représenté. Les différents pourcentages représentent la quantité d'oxystérol mis au contact des cellules. Par exemple pour une utilisation d'une solution contenant 40 µg d'oxystérols, 5% de 7α-hydroxycholestérol correspond à une quantité de 2 µg mise au contact des cellules.

a. Effets des mélanges d'oxystérols sur l'expression de cytokines

Le mélange d'oxystérols suivant (7α-hydroxycholestérol 5%, 7β-hydroxycholestérol 10%, cholestérol-5α,6α-epoxyde 20%, cholestérol-5β,6β-epoxyde 20%, cholestan-3b,5a,6b-triol 9%, 7-cétocholestérol 35%, 25-hydroxycholestérol (1%)), utilisée à 30 µM, peut provoquer un fort stimulus profibrogénique (Leonarduzzi *et al.*, 2001). En effet, la consommation de ces oxystérols par des macrophages régule positivement l'expression et la synthèse de TGF-β1 (*Transforming Growth Factor β1*). Cette cytokine apparaît comme jouant un rôle dans la progression de la dégénération fibrotique du mur artériel, exercant des effets chémoattracteurs et différenciateurs sur les cellules musculaires lisses, induisant la synthèse de plusieurs protéines de la matrice extracellulaire, et régulant négativement la dégradation de cette matrice. La régulation positive de cette cytokine pleiotrope, dans les lésions précoces de l'athérosclérose, en absence d'un effet cytotoxique direct, suggère la présence d'un mécanisme spécifique par lequel la formation et l'élaboration de la chape fibreuse peut se produire (Leonarduzzi *et al.*, 2001). Cet effet, sur l'expression du gène de cette cytokine, en absence d'apoptose ou d'autre toxicité, est observé à des concentrations biologiquement compatibles d'oxystérols mais pas dans le cas d'un oxystérol purifié, le 7-cétocholestérol (Leonarduzzi *et al.*, 2001). Ainsi, l'apport des oxystérols par les LDLox au niveau des cellules de la paroi vasculaire peut contribuer à des étapes spécifiques dans l'élaboration des lésions athéroscléreuses.

b. Mélanges d'oxystérols et mort cellulaire

Cette mixture d'oxystérols (7α-hydroxycholestérol 5%, 7β-hydroxycholestérol 10%, cholestérol-5α,6α-epoxyde 20%, cholestérol-5β,6β-epoxyde 20%, cholestan-3β,5α,6β-triol 9%, 7-cétocholestérol 35%, 25-hydroxycholestérol (1%)), utilisée à 60 µM, peut prévenir les effets pro-apoptotiques du 7-cétocholestérol dans le cas des macrophages (Biasi *et al.*, 2004). Cette dernière contrequart la capacité du 7-cétocholestérol à fortement augmenter les taux des espèces réactives de l'oxygène dans les macrophages, aussi bien que la régulation positive du facteur pro-apototique p21 et l'activation de la voie apoptotique dépendante de la mitochondrie (Leonarduzzi *et al.*, 2004).

En revanche, une autre mixture d'oxystérols (7α-hydroxycholestérol (10,2%), 7β-hydroxycholestérol (6,7%), cholestan-52,62-epoxy-3β-ol (10,3%), cholestérol-5β,6β-epoxyde (24,3%), cholestan-3β,5α,6β-triol (10%), 7-cétocholestérol (31%), 25-hydroxycholestérol (7,3%)), utilisée à 56 µM, induit l'apoptose par rupture des lysosomes, activation de la caspase-3, et fragmentation de l'ADN (Yuan *et al.*, 2000). Une mixture équimolaire de 25-hydroxycholestérol, 7β-hydroxycholestérol, et cholestérol-5β,6β-epoxyde induit une augmentation significative de la mort cellulaire apoptotique des cellules promonocytaires humaines U937, mais induit une diminution de ce mode de mort cellulaire dans des cellules endothéliales aortiques bovines (O'sullivan *et al.*, 2005).

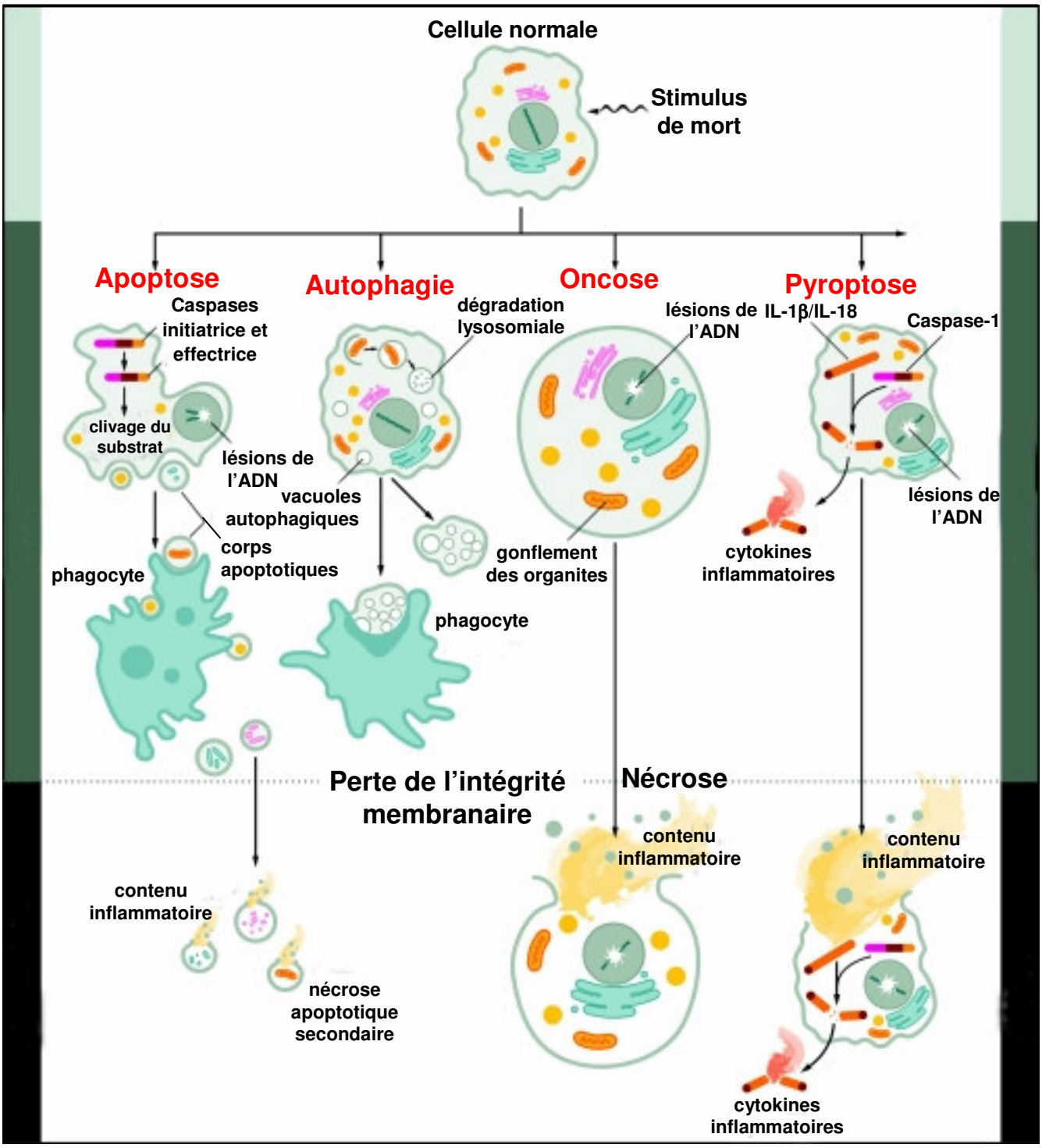


Figure 26 : Différentes voies menant à la mort cellulaire (Fink & Cookson, 2005)
Les cellules vivantes répondent à des stimuli en initiant une variété de voies moléculaires menant à la mort cellulaire. L'apoptose est une voie menant à la mort cellulaire avec pour caractéristiques l'activation de caspases initiatrices qui activent des caspases effectrices clivant un certain nombre de substrats.
L'autophagie se caractérise par une dégradation des composants cellulaires à l'intérieur de vacuoles autophagiques. L'oncose est associée à un gonflemment de la cellule et des organites, une rupture de la membrane plasmique.
La pyroptose implique l'activation de la caspase-1 qui active la maturation des cytokines inflammatoires IL-1β et IL-18.

IV. MORT CELLULAIRE

La mort cellulaire est un processus fondamental, elle participe au maintien de l'homéostasie cellulaire et tissulaire, au développement et à la différenciation cellulaire. Par ailleurs, la mort cellulaire intervient dans de nombreuses maladies, et plus particulièrement au cours de l'athérogenèse (Thompson, 1995 ; Geng & Libby, 1995). A partir de 1965, deux types de mort cellulaire distincts furent décrits (Kerr, 1965 ; Kerr *et al*, 1972) (Figure 26):

* La "mort cellulaire programmée" ou **apoptose**.

* L'**oncose**

La **nécrose** se réfère à des changements secondaires (état cellulaire) se produisant lors de la mort cellulaire.

Depuis cette première description de la mort cellulaire, plusieurs autres types de mort cellulaire ont été décrits (Figure 26) :

* l'**aponécrose** (Formigli *et al*, 2000),

* la mort cellulaire par **autophagie** (Searle *et al*, 1975; Bursch *et al*, 2000), la mort cellulaire ressemblant à la nécrose (Oppenheim *et al*, 2001; Assuncao Guimaraes & Linden, 2004)

* la **pyroptose** (Fink & Cookson, 2005),

* la **paraptose,** programme de mort cellulaire non-apoptotique qui peut être induit par le récepteur I des facteurs de croissance comme l'insuline (Sperandio *et al.*, 2004)

* **le stress du reticulum**

L'oncose, est une mort rapide entraînant *in vivo* une réaction inflammatoire. L'apoptose et l'autophagie sont des processus de mort importants dans le développement embryonnaire, qui sont impliqués également dans de nombreuses pathologies dégénératives ou qui sont induits par de nombreux agents biologiques, chimiques ou physiques. Ces deux types de mort font intervenir des voies métaboliques précises, mais différentes, qui conduisent *in fine* à la phagocytose de la cellule mourante par les macrophages environnants. Enfin, dans certains cas, une nécrose secondaire à l'apoptose ou à la l'autophagie peut avoir lieu (Kroemer *et al*, 1995 ; Bursch *et al*, 2000). L'oncose mène à la nécrose par destruction du noyau cellulaire, en contraste avec l'apoptose qui mène à une nécrose avec une fragmentation du noyau et un retrécissement de la cellule (Majno & Joris, 1995). Le stress du réticulum est un processus associé à la mort cellulaire qui se déclenche lorsque des protéines mal-repliées s'accumulent dans le réticulum endoplasmique.

1. Oncose

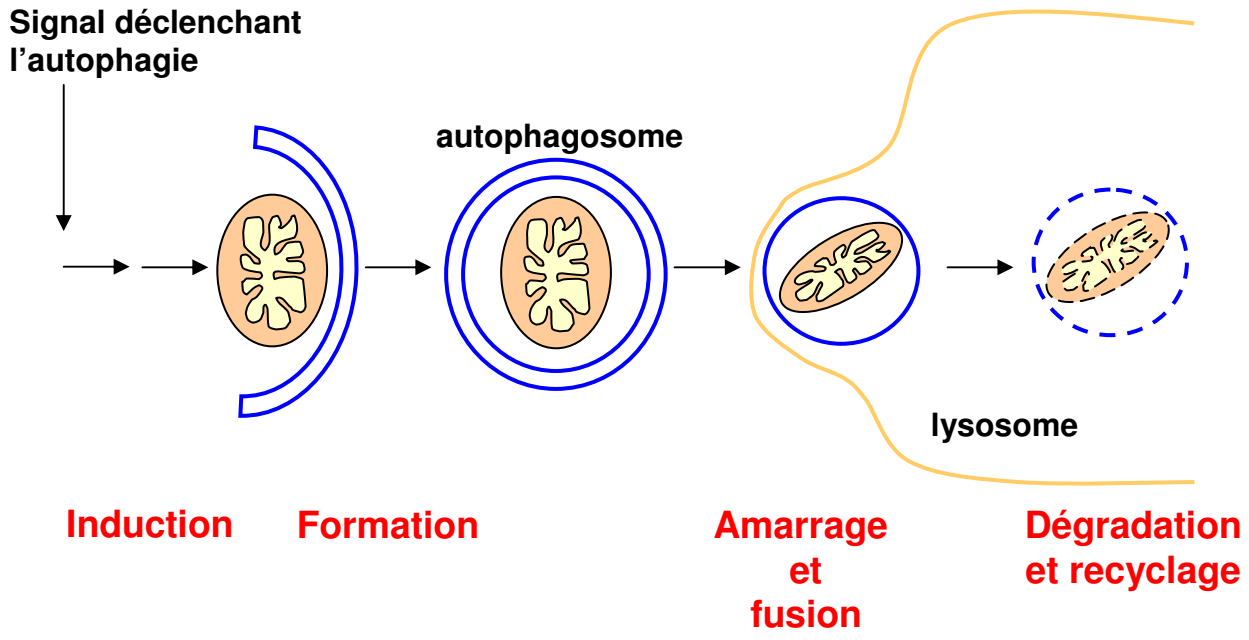
L'oncose, dérivée du mot « onkos » qui signifie "gonflement", est définie comme une voie pré-létale menant à la mort cellulaire accompagnée par un gonflement de la cellule, des organites, une augmentation de la perméabilité cellulaire et une réaction inflammatoire se développant couramment dans le tissu viable et adjacent en réponse à une libération de débris cellulaires (Fink & Cookson, 2005).

Le phénomène d'oncose conduit à une dépletion des réserves énergétiques de la cellule et à un arrêt des pompes ioniques dans la membrane plasmique. L'oncose peut résulter de l'action d'agents toxiques qui interfèrent avec la production d'ATP ou de processus qui provoquent une consommation non-controlée des énergies cellulaires (Majno & Joris, 1995).

L'oncose peut également être induite par des processus biochimiques catalysés par des enzymes. En effet, la poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), enzyme de réparation de l'ADN, lors d'une destruction massive de l'ADN, voit son activité augmentée, ce qui déplete son substrat le NAD (Walisser & Thies, 1999). Une nouvelle synthèse du NAD necessite de l'ATP, et la perte éventuelle des stocks d'énergie mène à une mort cellulaire oncotique. Durant l'apoptose, les caspases clivent et inactivent PARP, ce qui préserve les réserves en ATP malgré un dommage significatif de l'ADN.

Des taux altérés en calcium intracellulaire peuvent également réguler l'oncose. Des concentrations en calcium intracellulaire élevées peuvent activer des cystéine protéases de la famille des calpaines qui favorisent la rupture de la membrane plasmique à travers la protéolyse du cytosquelette et des protéines de la membrane plasmique (Liu & Schellmann, 2003 ; Liu *et al.*, 2004). Le calcium intracellulaire élevé initie aussi la translocation de la protéine phospholipase A2 cytosolique au niveau de la membrane cellulaire, où l'hydrolyse des phospholipides membranaires diminue l'intégrité membranaire (Cummings *et al.*, 2000).

Les infections par les pathogènes participent également à l'induction de l'oncose. L'infection par le rotavirus des cellules MA104 induit une mort cellulaire morphologiquement proche de l'oncose, et qui requièrt aussi une augmentation intracellulaire de calcium (Perez *et al.*, 1998). *Pseudomonas aeruginosa*, bactérie opportuniste multirésistante responsable d'infection chez les patients atteints de mucoviscidose (Hocquet *et al.*, 2003), induit l'oncose dans les macrophages et les neutrophiles infectés (Dacheux *et al.*, 2000).



<u>Figure 27</u> : Modèle schématique de l'autophagie (Klionsky & Emr, 2000)
Après induction de l'autophagie, une membrane séquestre du cytosol et/ou une organelle (mitochondrie comme ici) et forme une vésicule à double membrane appelé autophagosome. Celui-ci s'amarre à un lysosome et fusionne avec lui. Les enzymes lysosomiales dégradent la vacuole et un recyclage des différents composants (acides aminés, acides gras, sucres, nucléotides) se met en place.

2. Autophagie

L'autophagie est un processus catabolique intralysosomal majeur conservé au cours de l'évolution, pendant lequel les composants cytoplasmiques sont séquestrés de manière non sélective dans des structures formées d'une double membrane de 300-900 nm de diamètre. Elle intervient au cours du développement et sous certaines conditions de stress environnementaux (Punnonen *et al*, 1992 ; Klionsky et Erm, 2000). Chez les insectes, l'autophagie est un processus actif au cours de la mue (Klionsky et Erm, 2000). Chez l'homme, l'autophagie contribue à la regression des membranes interdigitales au cours de l'ontogenèse et elle est observée dans les cellules hépatiques (Klionsky et Erm, 2000). L'autophagie est induite dans des conditions de stress, de privation en acides aminés, par traitement à la rapamycine (antibiotique de la famille des macrolides) et par des hormones stéroïdiennes (Kim *et al.*, 2001 ; Munafo et Colombo, 2001). Elle joue un rôle dans le renouvellement des protéines, des ARNs, et d'autres macromolécules cytoplasmiques (Munafo et Colombo, 2001). On l'observe dans certaines pathologies : maladie de Parkinson, Alzheimer, certaines myopathies (Stefanis *et al.*, 2001). Dans certains cancers, l'autophagie constituerait une forme de résistance (Liang *et al.*, 1999). Deux types d'autophagie ont été décrits : la microautophagie, et la macroautophagie (Ohsumi, 2001). Au niveau biochimique, l'autophagie est surtout bien décrite chez la levure (Klionsky et Erm, 2000 ; Reggiori & Klionsky, 2002).

Schématiquement, chez l'homme, la macroautophagie débute par la séquestration du matériel cytoplasmique pour former l'autophagosome (Klionsky et Erm, 2000). Ensuite, l'autophagosome, qui est composé d'une double membrane provenant d'un repliement du réticulum endoplasmique lisse, fusionne avec les lysosomes pour former une vacuole d'autophagie dans laquelle la dégradation finale du matériel séquestré intervient (Bursch, 2001) (Figure 27). Dans la microautophagie, la membrane lysosomiale s'invagine pour séquestrer, au sein des lysosomes, du cytoplasme ou des organites. Puis au contact des enzymes contenues dans le lysosome, ces produits invaginés sont dégradés (Ohsumi, 2001).

Au cours du processus de mort par autophagie, les protéines du cytosquelette restent intègres (Bursch, 2001). Le mécanisme de séquestration requiert les filaments intermédiaires et les autophagosomes migrent vers les lysosomes grâce aux microtubules (Bursch, 2001).

Chez les mammifères, le processus d'autophagie fait intervenir de nombreuses protéines cellulaires aussi bien lors de l'étape de séquestration (famille des GTPases (*Guanosine Triphosphate phosphatase)*, protéines de la famille Tor (*Target of rapamycin*), les p70S6 kinases, protéine phosphatase 2A…) que lors de la formation d'autophagosomes (famille des PI3-kinases). Cependant, la régulation de l'autophagie par ces protéines est un phénomène complexe qui reste encore mal compris (Ogier-Denis *et al.*, 1996 ; Codogno *et al.*, 1997 ; Petiot *et al.*, 2000). L'utilisation de différentes molécules, comme la 3-méthyladénine, la wortmannine, le LY294002, qui sont des inhibiteurs de PI3-K, les acides aminés qui répriment l'activité de la protéine Tor, l'acide ocadaïque qui inhibe la protéine phosphatase 2A (PP2A), la rapamycine qui active Tor permet d'étudier la participation des différentes protéines dans la voie autophagique (Kim et Klionsky, 2000 ; Codogno *et al.*, 1997).

La relation entre l'autophagie et la mort cellulaire a été prouvée par de nombreuses études qui ont démontré que la 3-méthyl-adénine inhibait à la fois la formation des autophagosomes et la mort cellulaire (Bursch, 2001).

3. Apoptose

Le terme « apoptose » d'origine grecque, désigne la chute des feuilles d'un arbre en automne. Il a été proposé par Kerr *et al.* en 1972 pour décrire la mort programmée dans l'organisme qui survient dans certains organes au cours de l'ontogenèse.

L'apoptose est un mécanisme de mort intervenant dans plusieurs processus physiologiques (embryogenèse, développement normal des organes, homéostasie cellulaire) et pathologiques. Ce mécanisme peut être activé (SIDA, maladie d'Alzheimer, infarctus du myocarde) ou inhibé (cancer, lupus érythémateux disséminé, certaines infections virales) (Meier *et al.* 2000). L'apoptose se caractérise par des aspects morphologiques spécifiques la distinguant des autres types de mort: nécrose, oncose, parapoptose et autophagie, et par une machinerie moléculaire particulière.

a. Les aspects morphologiques de l'apoptose

L'apoptose se définit morphologiquement par la diminution du volume cellulaire, le maintien de l'intégrité membranaire, et précocement par la condensation du cytoplasme et de la chromatine qui devient péri-nucléaire (Carson & Ribeiro, 1993 ; Arends *et al.*, 1994). Afin que la condensation de la chromatine se produise, le clivage des lamines A, B et C, protéines filamenteuses associées à la face interne de la membrane nucléaire, et qui permetttent l'attachement

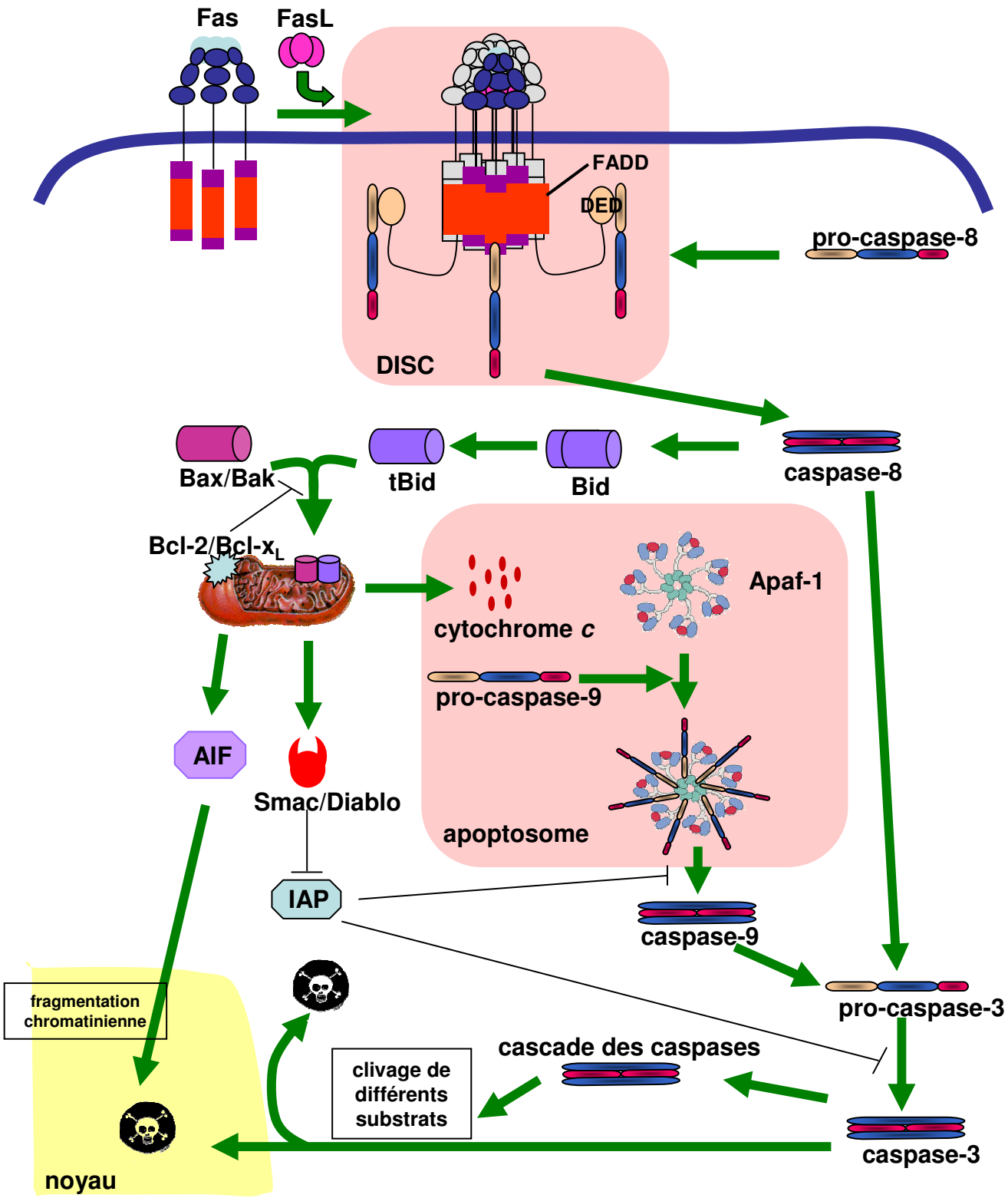
de la chromatine à l'enveloppe nucléaire par la caspase-6, est nécessaire (McConkey, 1996 ; Rao *et al.*, 1996). Le stade ultime consiste en une condensation nucléaire et/ou une dégradation spécifique de l'ADN en nucléotides de 50 à 300 kb, résultant de l'excision des boucles d'ADN et de leurs oligomères (Lagarkova *et al.*, 1995), suivie ou non d'une fragmentation internucléosomale en multiples de 180-200 pb, donnant un profil électrophorétique caractéristique « en échelle » dans un gel d'agarose (Wyllie *et al.*, 1980 ; Wyllie *et al.*, 1984). En fin d'apoptose, les cellules forment des corps apoptotiques qui sont éliminés par phagocytose via les macrophages et les cellules voisines. Le signal est donné par l'externalisation de la phosphatidylsérine (Fadok *et al.*, 1998). Les sucres de la surface de la cellule sont modifiés et reconnus par les lectines des phagocytes (Dini *et al.*, 1995). Lorsque les corps apoptotiques ne sont plus détruits, on assiste à la mise en place d'une nécrose secondaire des cellules et à l'accumulation de débris apoptotiques. La membrane plasmique garde cependant sa cohésion, ce qui prévient le déversement du contenu cytoplasmique dans le milieu extracellulaire et la réponse inflammatoire. C'est une mort implosive contrairement à la nécrose qui est une mort plus explosive, inflammatoire.

b. Différentes voies apoptotiques

Chez les mammifères, plusieurs voies conduisant à la mort cellulaire par apoptose ont été décrites. Il s'agit de la voie des récepteurs à domaines de mort appartenant à la superfamille du TNF et conduisant à l'activation directe des caspases, la voie initiée par un stress cellulaire et impliquant la mitochondrie, la voie résultant d'un stress du réticulum endoplasmique et activant, chez la souris, la caspase-12, la voie induite par la protéine p53 et enfin la voie du granzyme B.

⌘ La voie des récepteurs à domaine de mort

La voie des récepteurs à domaine de mort, ou voie extrinsèque, fait intervenir des récepteurs de la membrane plasmique qui, après fixation de leurs ligands spécifiques, déclenchent rapidement les mécanismes moléculaires conduisant à la mort par apoptose. Ces récepteurs, qui font partie de la superfamille des récepteurs au Facteur Nécrosant des Tumeurs (**TNF,** *Tumor Necrosis Factor*), ont la particularité de posséder dans leur portion intracellulaire, une région hautement conservée, appelée « domaine de mort » (**DD**, *Death Domain*). Ce domaine est un motif protéique de 80 amino-acides nécessaires à la transmission du signal de mort (Tartaglia *et al*, 1993; Smith *et al*, 1994; Gruss & Dower, 1995).



<u>Figure 28 :</u> Différentes voies apoptotiques: la voie Fas et la voie mitochondriale

L'activation de Fas par liaison de son ligand permet le recrutement de FADD qui *via* son DED lie la pro-caspase-8. Le complexe multiprotéique formé à la membrane par Fas, FADD et la pro-caspase-8 porte le nom de DISC. Une fois activée la caspase-8 induit la sortie de certaines molécules de la mitochondrie qui déclenche la cascade des caspases aboutissant à la mort cellulaire.

AIF : *Apoptosis Inducing Factor* ; Apaf1 : *Apoptotic Protease Activating Factor-1* ; Bcl-2 : *B-Cell Leukemia/Lymphoma 2* ; DED : *Death Effector Domain* ; DISC : *Death-Inducing Signalling Complex ;* FADD : Fas-Associated Death Domain ; IAP : protéines inhibitrices d'apoptose ; Smac/Diablo : *Second Mitochondria-derived Activator of Caspase /Direct IAP-Binding Protein with LOw pI ;* tBid : *truncated Bid*

Les sous-membres de cette famille, chez les mammifères, sont au nombre de 7 :

* **TNF-R1** (p55, CD120a/DR1)
* **Fas** (ou CD95/APO-1/DR2; DR, *Death Receptor*)
* **DR3** (APO-3/LARD/TRAMP/WSL1)
* **DR4** (TRAIL-R1/APO-2) (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand)*
* **DR5** (TRAIL-R2/KILLER/TRICK2).
* **DR6**
* **p75NGFR** (*Nerve Growth Factor Receptor*)

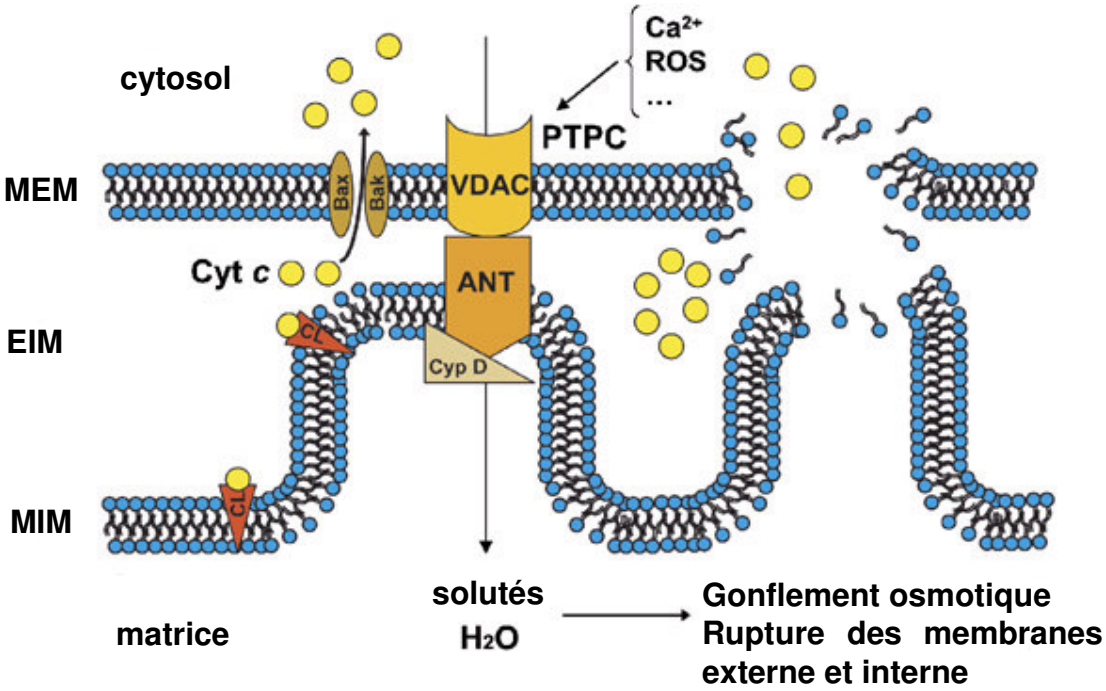
A l'exception du NGF, les ligands naturels de ces récepteurs appartiennent à la famille du TNF (Smith *et al*, 1994). Ainsi, FasL (ou CD95L) se lie à Fas, le TNF et la lymphotoxine α à TNFR1, Apo3-L/TWEAK à DR3 et Apo2-L/TRAIL à DR4 et DR5.

La capacité d'induction de mort cellulaire relayée par le récepteur Fas a été la première décrite et est donc la mieux connue. La recherche des molécules se liant au DD a tout d'abord conduit à la découverte de **FADD** (*Fas-Associated Death Domain*), une protéine cytoplasmique ubiquitaire qui contient dans sa partie carboxy-terminale, un domaine de mort.

L'activation de Fas permet le recrutement à la membrane de FADD grâce à l'interaction entre leurs domaines de mort. FADD possède également à son extrémité N-terminale, un autre domaine appelé domaine effecteur de mort (**DED**, *Death Effector Domain*), qui lie un motif analogue répété en tandem sur la pro-caspase-8, le motif **CARD** (*Caspase Recrutment Domain*) (Medema *et al*, 1997).

Le complexe multiprotéique formé à la membrane par Fas, FADD et la pro-caspase-8 porte le nom de **DISC** (*Death-Inducing Signalling Complex*) (Kischkel *et al.*, 1995) (Figure 28). Le rapprochement des formes zymogènes de la capase-8 dans le DISC permet leur clivage réciproque et la libération des formes actives de la caspase-8 dans le cytosol (Medema *et al*, 1997), qui vont à leur tour soit cliver un certains nombre de caspases effectrices telles que les caspases -3, -6 ou -7, soit cliver la protéine Bid, une protéine pro-apoptotique à domaine "BH3 uniquement" (Li *et al*, 1998). Bid clivée migre à la mitochondrie et active, en association avec Bax, la voie mitochondriale décrite au prochain paragraphe (Yin, 2000).

Jusqu'à présent, il avait été suggéré que FasL, qui est un homotrimère comme tous les ligands de la famille du TNF, engageait trois monomères de Fas pour conduire à l'activation du



<u>Figure 29:</u> Deux modèles non-exclusifs de perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (Garrido *et al.*, 2006)

Selon un modèle, les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 comme Bax et Bak, créent un pore sans affecter directement la membrane interne mitochondriale et/ou la matrice. La création de ces pores induit un potentiel de membrane et la libération, à partir de l'espace membranaire inter-membranaire, de protéines pro-apoptotiques comme AIF, l'endonucléase G et le cytochrome *c*. Pour un modèle alternatif (MPT), l'ouverture de complexes protéiques formés de pores de perméabilité (PTPC) permet à de petits solutés et à de l'eau d'entrer dans la matrice mitochondriale. Le gonflement osmotique éventuel provoque la rupture des membranes externe et interne et la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale.

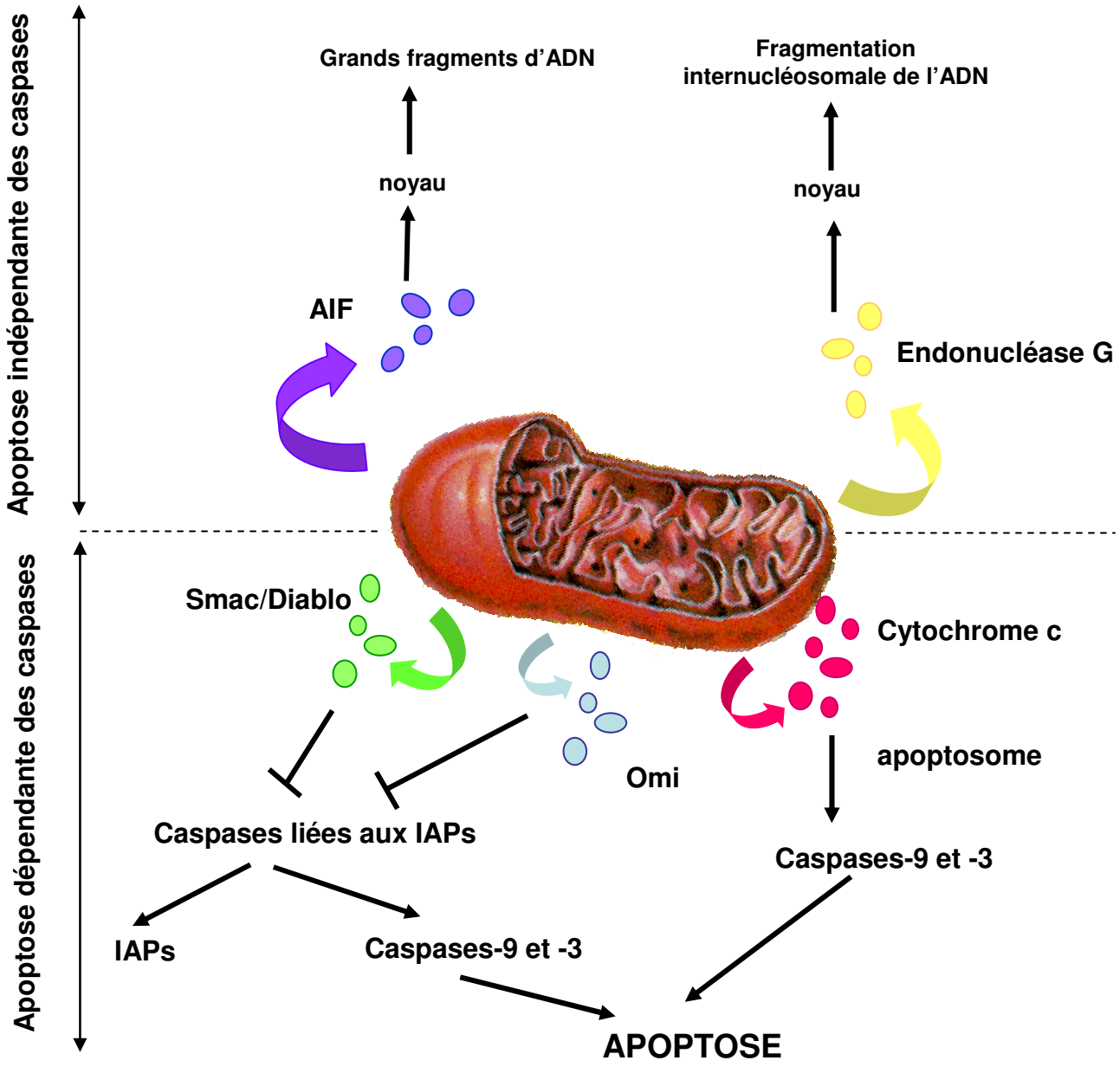
ANT, adenine nucleotide translocator ; CL, cardiolipin ; cypD, cyclophilin D ; Cyt c :cytochrome *c* ; EIM : espace inter-membranaire ; MEM : membrane externe mitochondriale ; MIM : membrane interne mitochondriale, MPT : mitochondrial permeability transition ; PTPC, permeability transition pore complex ; VDAC, voltage-dependent anion channel

récepteur et ainsi à l'agrégation des domaines de mort (Orlinick *et al.*, 1997 ; Ashkenazi & Dixit, 1998). Cependant, ce modèle d'assemblage a été récemment remis en cause (Papoff *et al*, 1999 ; Siegel *et al*, 2000). Ainsi, il a été démontré que non seulement Fas possédait la capacité de s'assembler en trimères indépendamment de l'engagement de son ligand, mais que ce pré-assemblage était même un pré-requis à la liaison de FasL, et donc à la transmission du signal de mort. La région nécessaire à cette trimérisation de Fas, PLAD (*Pre Ligand Assembly Domain*), est constituée des 49 premiers amino-acides de la région N-terminale de la portion extracellulaire de Fas, et est distincte du domaine de fixation de FasL. Ainsi, il semblerait qu'indépendamment de la présence d'un ligand, des trimères et des monomères de Fas co-existent au niveau de la membrane plasmique (Siegel *et al*, 2000).

⌘ La voie intrinsèque mitochondriale

La mitochondrie, depuis longtemps identifiée comme l'organite indispensable à la production d'ATP, a été plus récemment impliquée dans la régulation des mécanismes moléculaires de la mort cellulaire (Kroemer *et al.*, 1997). En effet, de nombreuses voies apoptotiques (telles que celles déclenchées par des drogues cytotoxiques, des chocs thermiques et/ou osmotiques ou encore par un sevrage en cytokines) convergent vers la mitochondrie et entraînent la perméabilité des membranes mitochondriales, qui est à l'origine de la libération de protéines pro-apoptotiques de l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytosol, et de la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\Psi m$) (Ferri & Kroemer, 2001). Le $\Delta\Psi m$ résulte d'une distribution asymétrique de protons et d'autres ions (comme le calcium) de part et d'autre de la membrane interne de la mitochondrie, donnant lieu à un gradient électrique nécessaire pour la respiration cellulaire et la synthèse d'ATP (Vayssière *et al.*, 1994). Si un agent apoptotique induit la perméabilité des membranes mitochondriales, le gradient ionique se dissipe et la mitochondrie se dépolarise (Kroemer *et al.*, 1997). Cependant, le mécanisme précis entraînant la perméabilité membranaire, reste encore très controversé, et plusieurs hypothèses sont proposées et pourraient coexister.

L'une des hypothèses propose l'ouverture d'une structure protéique complexe, le mégacanal mitochondrial, ou **PTPC** (*Permeability Transition Pore Complex*) (Figure 29). Ce canal serait composé en majorité de la porine de la membrane mitochondriale externe, aussi appelée **VDAC** (*Voltage Dependent Anion Channel*) ou du récepteur des benzodiazépines, et du "translocateur" de nucléotide à adénine (**ANT**, *Adenine Nucleotide Translocator*) de la membrane mitochondriale



<u>Figure 30</u> : Molécules relarguées par la mitochondrie au cours de la mort cellulaire par apoptose.
AIF: *Apoptosis Inducing Factor* ; IAP: *Inhibitors Apoptosis Proteins* ; Smac/Diablo : *Second Mitochondria-derived Activator of Caspase / Direct IAP-Binding protein with Low pI*

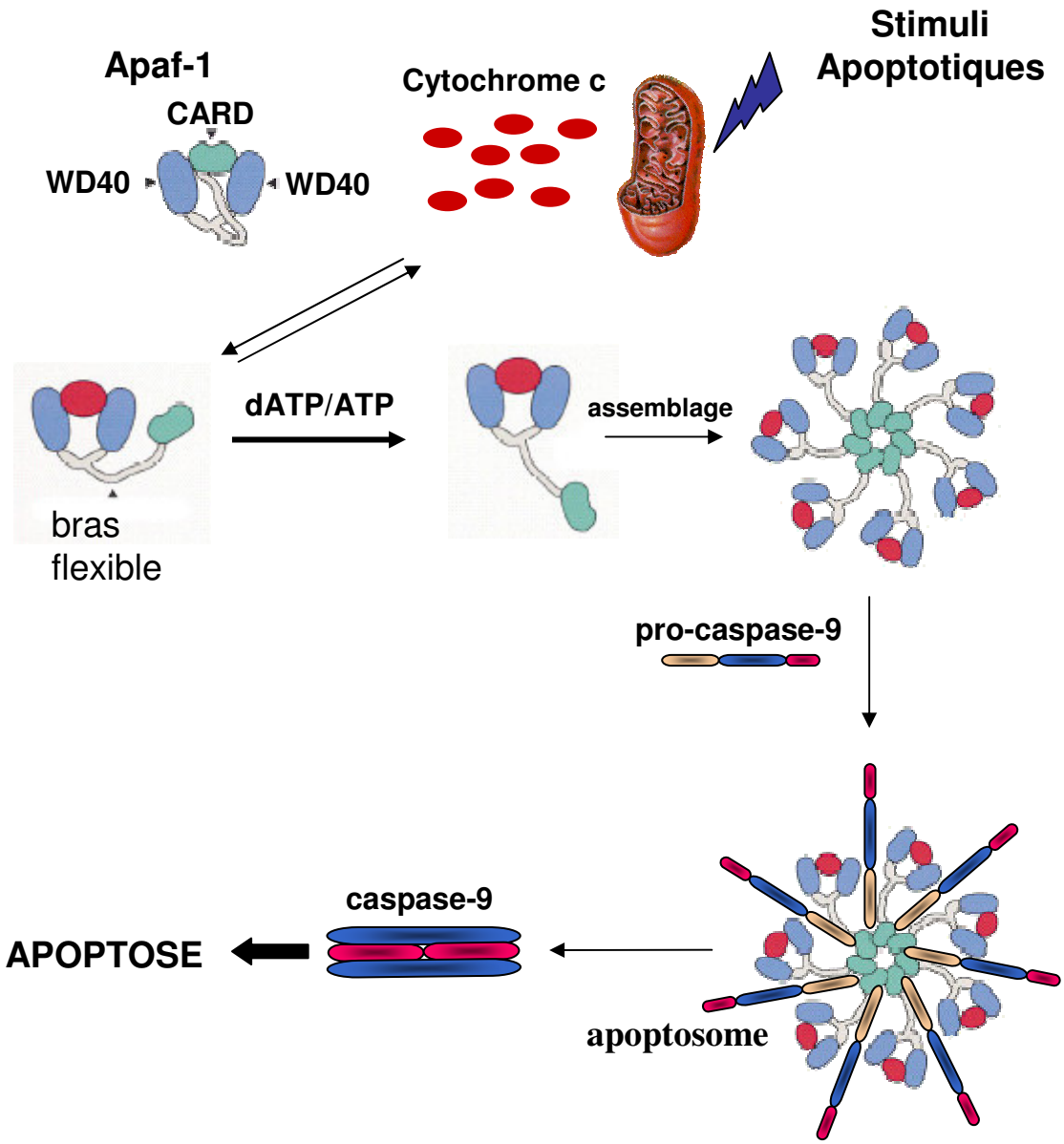
interne (Figure 29) (Kroemer *et al*, 1997 ; Green & Reed, 1998 ; Marzo *et al*, 1998 ; Decaudin *et al*, 2002, Garrido *et al.*, 2006).

Ces différentes structures formeraient alors un canal perméable aux ions et aux molécules dont le poids moléculaire est inférieur à 1,5 kDa. Dans ce modèle, les protéines pro-apoptotiques (comme Bax), en s'associant au PTP, faciliteraient son ouverture, provoquant alors un gonflement de la matrice mitochondriale (dû à une entrée d'eau et de solutés provoquée par une hyperosmolarité de la matrice), aboutissant à la rupture complète de la membrane externe mitochondriale (Green & Reed, 1998).

Un autre modèle suppose un dysfonctionnement au niveau de l'échange ATP/ADP mitochondrial lié à la fermeture de VDAC, provoquant alors une accumulation de protons dans l'espace intermembranaire, responsable à la fois du gonflement de la matrice et d'une production de radicaux oxygénés. Toutefois, ce modèle ne permet pas d'expliquer la libération des molécules apoptogéniques qui précède, dans certains cas, la chute du $\Delta\Psi m$ (Zamzami & Kroemer, 2001).

Enfin, un dernier modèle suggère plutôt la formation d'un pore dans la membrane mitochondriale externe permettant la libération de protéines dans le cytosol et la chute du $\Delta\Psi m$ sans altération physique des membranes mitochondriales. La formation de ce pore pourrait être réalisée par les protéines pro-apoptotiques de la **famille Bcl-2**, comme Bax ou Bak, qui interagiraient directement avec les lipides membranaires, soit en s'associant au VDAC, ou en s'oligomérisant entre elles (formation de super complexes Bax-Bax / Bax-Bak / Bak-Bak) (Chao & Korsmeyer, 1998 ; Pastorino *et al*, 1998 ; Martinou *et al*, 2000) (Figure 29). Récemment, en utilisant des méthodes éléctro-physiologiques, le groupe de Korsmeyer a mis en évidence celui formé par Bax/Bak (Dejean *et al.*, 2005). Leur canal **MAC** (*Mitochondria Apoptosis-induced Channel*) présente un diamètre de pore plus large que celui formé par Bax/Bak et permettrait alors de laisser passer des molécules dont le poids pourrait atteindre 100 kDa (Pavlov *et al*, 2001).

Quel que soit le modèle, l'induction de la perméabilité membranaire mitochondriale entraîne la libération dans le cytosol de molécules apoptogènes contenues dans l'espace intermembranaire mitochondrial (Figure 30). Il s'agit du **cytochrome *c*** (Liu *et al*, 1996), de l'**AIF** (Susin *et al*, 1999a), de **Smac/DIABLO** (*Second Mitochondria-derived Activator of Caspase / Direct IAP-Binding protein with Low pI*) (Chai *et al*, 2000), de **Omi/HtrA2** (Omi/*High-Temperature-Requirement protein A2*) (Faccio *et al*, 2000) ou de **l'endonucléase G** (Parrish *et al*, 2001). L'ensemble des protéines libérées est maintenant regroupé sous le nom de SIMP (*Soluble Intermembrane Mitochondrial Proteins*), et possède une activité pro-apoptotique.



<u>Figure 31 :</u> Formation de l'apoptosome (Acehan *et al.*, 2002)
Après le relargage du cytochrome *c* et en présence d'ATP, Apaf-1 s'oligomérise. La procaspase-9 est alors recrutée par une interaction CARD-CARD, pour former l'apoptosome. La pro-caspase-9 est alors activée en caspase-9 qui pourra à son tour activer la procaspase-3. Cette cascade d'activation conduit à la mort par apoptose de la cellule.
Apaf-1 : *Apoptotic Protease Activating Factor-1* ; CARD : *Caspase Recrutment Domain* ; WD40 : domaine tryptophane-aspartate

Le cytochrome *c* se lie à **Apaf-1** (*Apoptotic Protease Activating Factor-1*). Celui-ci lie faiblement le **dATP** ou l'**ATP**. La liaison du cytochrome *c* augmente l'affinité d'Apaf-1 pour le dATP ou l'ATP. Ces différents éléments s'oligolérisent pour former l'apoptosome (Zou *et al*, 1997) (Figure 31). Les domaines CARD d'Apaf-1 se retrouvent exposés dans l'apoptosome, ce qui permet le recrutement de multiples molécules de pro-caspase-9 et facilite son autoactivation.

Sous certaines conditions, une apoptose sans activation de caspases peut avoir lieu, et fait intervenir l'AIF, une flavoprotéine de 57 kDa, et/ou l'endonucléase G, une nucléase de 30 kDa. Ces deux protéines, une fois libérées de la mitochondrie, migrent dans le noyau où elles engendrent la condensation de la chromatine et une fragmentation de l'ADN en fragments d'environ 50 kb (Oberhammer *et al*, 1993 ; Susin *et al*, 1999b ; Parrish *et al*, 2001).

Enfin, il a également été observé qu'après l'induction de la perméabilité membranaire, les protéines Smac/DIABLO et Omi/HtrA2 peuvent être libérées dans le cytosol. Smac/DIABLO, une protéine de 29 kDa, s'oppose d'une part aux effets inhibiteurs des IAPs (protéines inhibitrices de l'apoptose) (Deveraux *et al*, 1998; Ekert *et al*, 2001), et d'autre part, facilite l'activation par protéolyse et l'activité enzymatique de la caspase-3 (Chai *et al*, 2000) (Figure 30). Un autre facteur mitochondrial qui partage une activité inhibitrice des IAPs avec Smac/DIABLO, est la protéine Omi/HtrA2. A côté de cette fonction inhibitrice, il a été montré que Omi/HtrA2, une sérine protéase de 37 kDa sous sa forme active, permettait également d'induire ou d'accélérer l'apoptose grâce à sa fonction catalytique, indépendamment d'une activité caspase (Faccio *et al*, 2000 ; Verhagen *et al*, 2002).

Pour conclure, la voie mitochondriale est une voie complexe, qui permet d'induire l'apoptose cellulaire de façon dépendante ou indépendante des caspases.

⌘ La voie de la p53

Le suppresseur de tumeur p53 est un facteur de transcription maintenu à un taux limité dans les cellules normales via son interaction avec la protéine Mdm-2 (*Mouse Double-Minute 2 homologue*) qui déclenche le processus de sa dégradation. Suite à différents stimuli apoptotiques tels que les agents cytotoxiques, les radiations, le stress oxydatif, l'hypoxie ou encore la déplétion en nucléotides, p53 et/ou Mdm-2 vont être phosphorylées, prévenant l'interaction entre ces deux molécules, ce qui va stabiliser et activer p53 (Haupt *et al*, 1997). La p53 va alors se lier, après tétramérisation, à sa séquence consensus et va activer ou inhiber la transcription de plusieurs gènes.

Ainsi, p53 provoque l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 en activant le gène de la p21, un inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines, mais induit aussi l'apoptose en activant la transcription de *Bax* et en inhibant la transcription de *Bcl-2* (Slee *et al*, 2004). p53 peut aussi augmenter l'expression de Fas et favoriser sa translocation du Golgi vers la surface cellulaire (Bennett *et al*, 1998).

Toutefois, il faut souligner que de récentes études ont montré que l'apoptose induite par la p53 peut être indépendante de son activité transcriptionnelle. Dans ce cas, la p53 agirait directement en inhibant les protéines anti-apoptotiques au niveau de la mitochondrie (Slee *et al*, 2004).

⌘ La voie du Granzyme B

Le granzyme B fait partie des protéases à sérine contenues dans les granules excrétés par les lymphocytes T cytotoxiques et "natural killer" lors de la réponse immunitaire à médiation cellulaire. Le granzyme B induit l'apoptose par un clivage direct de la pro-caspase-3 et présente *in vitro* une activité protéolytique sur les pro-caspases-6, -7, -8, -9 et -10 (Kam *et al*, 2000). Par ailleurs, l'activation de Bid, la dépolarisation des mitochondries et la libération du cytochrome c sont des événements impliqués au cours de l'apoptose induite par le granzyme B, mais pas obligatoirement nécessaires au processus apoptotique (Thomas *et al*, 2001).

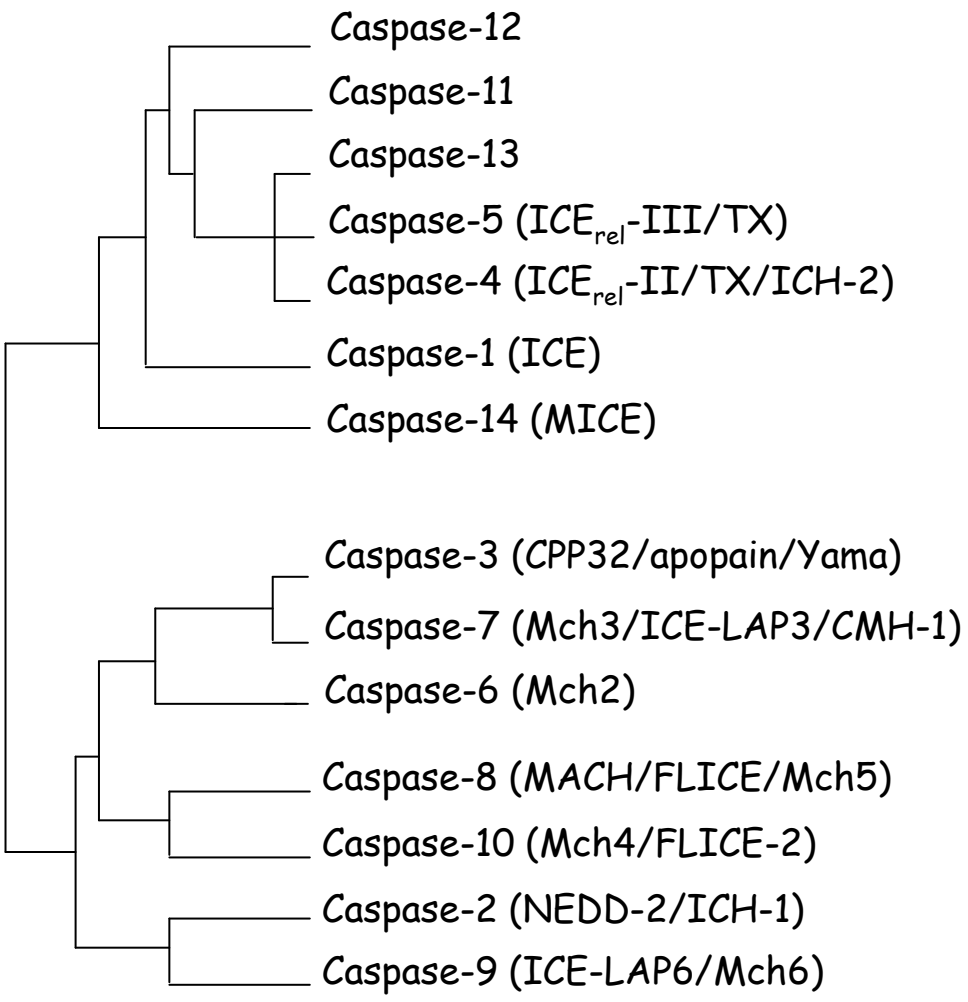


Figure 32 : Analyse phylogénétique de la famille des caspases (Alnemri *et al.*, 1996)
Toutes les caspases présentées dans cet arbre sont d'origine humaine à l'exception des caspases-11 et –12 d'origine murine et de la caspase-13 d'origine bovine.

c. Les enzymes exécutrices de la mort par apoptose : les caspases

⌘ Nomenclature des caspases:

Les protéases impliquées dans l'apoptose sont regroupées au sein d'une même famille. Ce sont des protéases à cystéine possédant une spécificité stricte de clivage de leurs substrats après un résidu d'aspartate (Asp). Elles sont donc regroupées sous le nom de CASPASE (*Cystein Aspartic Acid Protease*). Le C représente le résidu cystéine du centre enzymatique actif (QACXG), pentapeptide très conservé et Asp correspond à la spécificité stricte de clivage des substrats après un résidu aspartique.

⌘ Classification, structure et localisation des caspases:

Quatorze caspases sont actuellement connues chez les mammifères, dont 12 dans l'espèce humaine. Les caspases-11 et -12, identifiées chez la souris, ne possèdent pas d'homologues humains connus.

Des analyses phylogénétiques permettent de regrouper les caspases en trois groupes (Figure 32) (Nicholson, 1999) :

- les caspases du groupe I: les caspases-1, -4, -5, -11, -12, -13 et –14 sont impliquées dans la maturation de cytokines (pro-IL-1β, pro-IL-18) au cours de l'inflammation,
- les caspases du groupe II: les caspases-2, -3, -7 sont impliquées dans les phases effectrices de l'apoptose,
- les caspases du groupe III: les caspases-6, -8, -9, -10 sont impliquées dans les phases d'initiation de l'apoptose.

Toutes les caspases ont une structure très conservée (Figure 33). Elles sont synthétisées sous forme d'un propeptide inactif ou zymogène constitué par trois domaines de l'extrémité NH_2 à l'extrémité COOH: un pro-domaine de taille variable (long ou court, 3-24 kDa), un domaine correspondant à la grande sous-unité (17-21 kDa) et un domaine correspondant à la petite sous-unité (10-14 kDa).

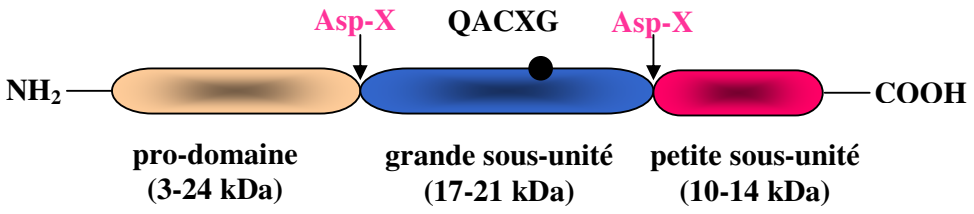
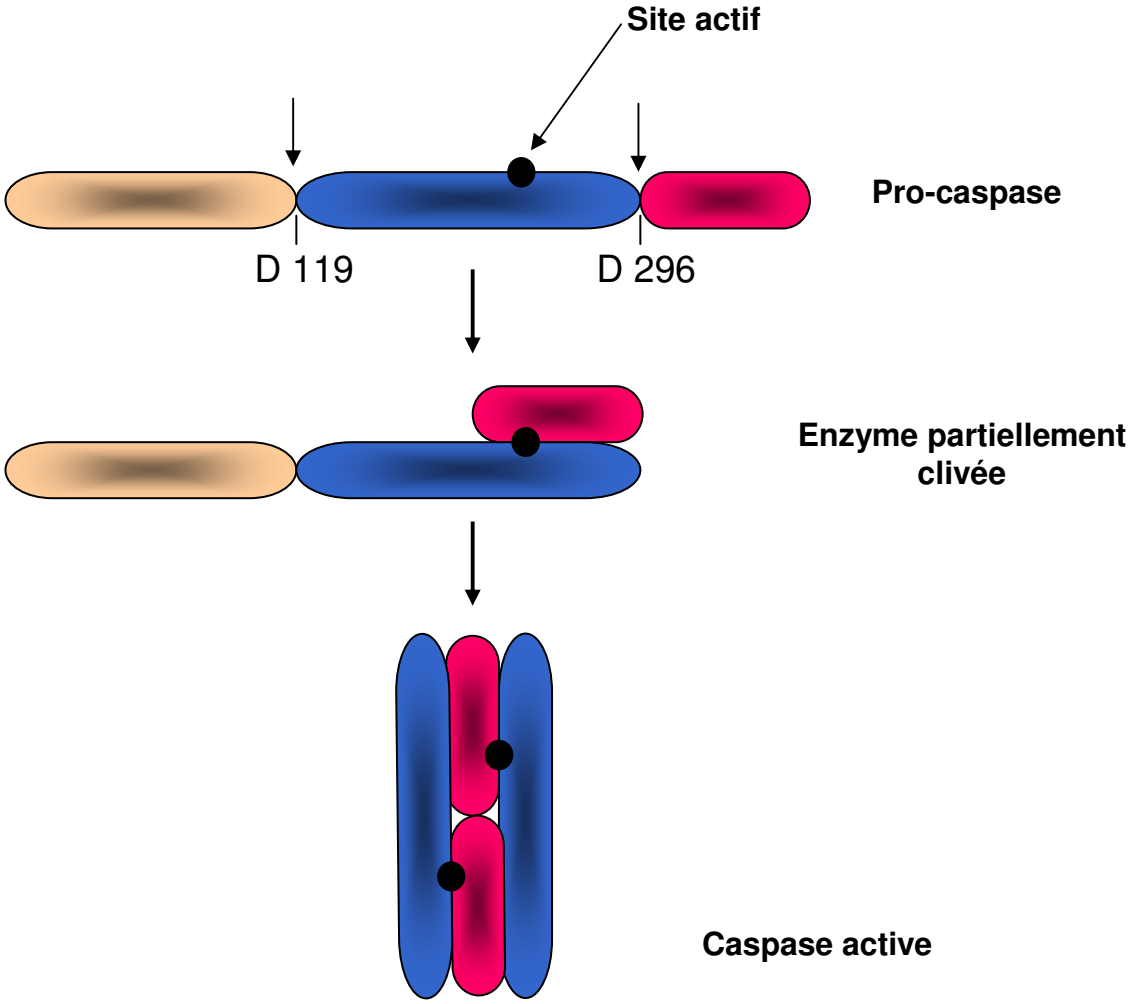


Figure 33: Organisation des pro-caspases.
Les pro-caspases sont constituées par un pro-domaine de 3-24 kDa à l'extrémité NH_2 suivi par la grande sous-unité de 17-21 kDa et la petite sous-unité de 10-14 kDa à l'extrémité COOH.

Les pro-domaines sont de différentes longueurs, de 23 acides aminés pour les caspases-6 et -7 jusqu'à 219 acides aminés pour la caspase-10 (Earnshaw *et al.*, 1999). Les caspases peuvent être classées en fonction de la longueur de leur pro-domaine. En simplifiant, les caspases à pro-domaine long (-1, -2, -4, -5, -8, -9, -10, -11, -12, -13) (caspases activatrices) activent les caspases à pro-domaine court (-3, -6, -7, -14), (caspases effectrices).

Les pro-domaines peuvent jouer des rôles importants dans les interactions protéine-protéine faisant le lien entre le stimulus apoptotique et l'activation des caspases. Bien que les pro-domaines présentent plus de divergences que les segments catalytiques, deux motifs ont été localisés dans cette région: des domaines effecteurs de mort **DED** ou des domaines de recrutement de caspase **CARD** (Earnshaw *et al.*, 1999). Les caspases à pro-domaine long qui possèdent dans leur pro-domaine des DEDs, les caspases-8 et -10 (Degterev *et al.*, 2003), peuvent être recrutées par les récepteurs de mort via une molécule adaptatrice, qui possède elle aussi un DED, telle que **FADD** ou **TRADD** (*Tumor Necrosis Factor Receptor 1 Associated protein with Death Domain*). Ainsi, l'activation du récepteur de mort CD95/APO-1/Fas permet le recrutement de la pro-caspase-8 par les protéines adaptatrices FADD/Mort-1 ou Flash. L'interaction FADD/pro-caspase-8, via les domaines DED présents chez les deux molécules, permet l'activation de la pro-caspase-8 et l'initiation de l'apoptose. Les caspases-1, -2, -4 et –9 possèdent un pro-domaine avec un domaine CARD (Degterev *et al.*, 2003). Ce domaine CARD permet les interactions entre Apaf-1 et la pro-caspase-9, menant à l'oligomérisation des protéases puis à leur activation. La caspase-2, par



<u>Figure 34:</u> Schéma d'activation des caspases
Les caspases inactives sont constituées d'un pro-domaine, d'une grande sous-unité et d'une petite sous-unité. Deux clivages libèrent tout d'abord la petite sous-unité puis la grande, et conduisent à la formation de la forme active de l'enzyme: deux hétérodimères composés chacun de l'association de deux sous-unités, et comprenant deux sites catalytiques.

⟶ Sites de clivage

l'intermédiaire d'interactions entre le domaine CARD et la molécule adaptatrice RAIDD/CRADD (*RIP-associated ICH1/CED-3-homologous protein with death domain,* RIP *: Receptor Interactig Protein*), pourrait s'associer avec les récepteurs de mort activés.

La grande sous-unité contient le site actif composé d'un résidu cystéine inclus dans une séquence peptidique de type QACXG (où X est R, Q ou G), ce qui leur confère une spécificité de reconnaissance et de clivage au niveau du résidu aspartate. Les résidus entourant l'aspartate dans les différents substrats des caspases déterminent la spécificité des différentes caspases.

Les caspases sont localisés principalement dans le cytosol des cellules mais certaines comme les pro-caspases-2, -9 et -3 peuvent être présentes, en association avec HSP60 et HSP10, au niveau des mitochondries (Samali *et al.*, 1999). Leur localisation peut changer suite à leur activation. Certaines caspases peuvent ainsi se retrouver transloquée dans la région nucléaire (Feng *et al.*, 2005).

⌘ Activation des caspases

L'activation des caspases nécessite un clivage protéolytique en aval d'un résidu aspartate. Un premier clivage, au niveau de l'aspartate 296 (convention de notation basée sur la caspase-1), libère tout d'abord la petite sous-unité du reste de la molécule (Figure 33). Il y a ensuite libération du pro-domaine par clivage au niveau de l'aspartate 119. La caspase active est un tétramère constitué de deux grandes sous-unités et de deux petites sous-unités, avec deux sites actifs par molécule (Reed, 2000) (Figure 34). Le clivage des pro-caspases peut être du à d'autres protéases à cystéine, à une auto-activation ou à d'autres caspases (modèle « en cascade »), ce qui aboutit à une activation protéolytique en cascade. Les pro-caspases possèdent une faible activité protéase (modèle de proximité) (Reed, 2000).

⌘ Substrats des caspases

Au cours de la mort cellulaire, l'activation des caspases conduit au clivage d'un grand nombre de protéines cellulaires aboutissant au démantèlement de la cellule et enfin à sa mort. Mais il ne se produit pas une digestion aléatoire des protéines cellulaires. Les caspases possèdent une spécificité de substrats qui repose sur la reconnaissance d'une séquence tétrapeptidique P4-P3-P2-P1 bien définie (Figure 35). L'acide aminé en position P1 est l'acide aspartique après lequel le clivage aura lieu. Les deux résidus P2 et P3 présents du côté amine de l'aspartate P1 ont un effet

limité sur le clivage du substrat (Sleath *et al.,* 1990 ; Thornberry *et al.*, 1992). En revanche, le résidu P4 est important pour les spécificités de substrats distinctes des caspases-1 et -3 (Earnshaw *et al.*, 1999).

Les sites de clivage ont une organisation variée, sous forme d'un seul site, de plusieurs sites groupés, d'une succession de sites ou de multiples sites distaux. L'étude des substrats des caspases a permis le développement de substrats fluorogènes et d'inhibiteurs. Les inhibiteurs sont des trétrapeptides sous forme d'aldéhydes, de nitriles ou de kétones avec un groupement pour les rendre perméants.

	NH_2	**P4**	**P3**	**P2**	**P1**	COOH
Caspase-1		W	E	H	**D**	
Caspase-4		(W/L)	E	H	**D**	
Caspase-5		(W/L)	E	H	**D**	
Caspase-6		V	E	H	**D**	
Caspase-8		L	E	T	**D**	
Caspase-9		L	E	H	**D**	
Caspase-11		(I/L/V/P)	E	H	**D**	
Caspase-2		D	E	H	**D**	
Caspase-3		D	E	V	**D**	
Caspase-7		D	E	V	**D**	

Figure 35: Spécificité de substrats des caspases (Degterev *et al.*, 2003).
Le premier groupe, qui inclut les caspase-1, -4 et -5, possède en position P4 un résidu volumineux et hydrophobique avec une séquence optimale WEHD. Le second groupe, constitué des capase-6, -8, -9 et -11, possède comme séquence récurrente (L/V)EXD. La séquence optimale pour le troisième groupe, constitué des caspases-2, -3, et -7, est DEXD où X peut être V, T ou H.

Une centaine de protéines a été identifiée comme étant clivée par les caspases. Ces cibles sont des protéines impliquées directement dans la régulation de l'apoptose, des protéines médiant ou régulant la transduction des signaux apoptotiques, des protéines structurales et à fonctions essentielles, des protéines intervenant dans la réparation cellulaire, des protéines régulant le cycle cellulaire et des protéines impliquées dans certaines pathologies humaines.

⌘ Régulation des caspases

Afin d'éviter une activation par inadvertance des caspases, ce qui pourrait avoir des conséquences dévastatrices, les caspases sont finemment régulées. Ansi, la production des caspases, leur activation et leurs activités sont contrôlées à plusieurs niveaux différents.

- Régulation transcriptionnelle

L'apoptose, dans la majorité des cellules, ne requiert pas la synthèse de nouvelles protéines, ni même d'ARNm (Kaufmann *et al.*, 1993 ; Weil *et al.*, 1996). Mais dans certaines circonstances, la régulation transcriptionnelle des caspases peut jouer un rôle très important (Degterev *et al.*, 2003). On peut rencontrer cette situation dans le cas de la caspase-11 ou de la caspase-5. Lors du traitement de cellules saines par des lipopolysaccharides ou d'autres stimuli pathologiques comme une ischémie *in vivo*, il se produit une régulation positive très importante de la transcription (Degterev *et al.*, 2003). La caspase-14 est aussi un autre exemple de caspase régulée de manière transcriptionnelle (Degterev *et al.*, 2003). Les niveaux d'ARNm de la pro-caspase-3 sont élevés dans les neurones de souris *in vitro* et dans le cerveau de souris *in vivo* après des dommages induisant l'apoptose (Ni *et al.*, 1997 ; Chen *et al.*, 1998). Un facteur qui influence l'expression du gène des pro-caspases est l'interféron γ. En effet, le traitement des cellules leucémiques humaines U937 avec de l'interféron γ peut augmenter l'expression des caspases (Tamura *et al.*, 1996). Au contraire, les cellules qui ne possèdent pas les facteurs de transcription répondant à l'interféron γ (le facteur de régulation de l'interféron-1 (IRF-1) ou l'activateur et le transducteur du signal de transcription-1 (STAT-1)) diminuent leur niveau basal d'ARNm des pro-caspases-1, -2 et -3 et diminuent également les réponses apoptotiques à certains signaux (Tamura *et al.*, 1995 ; Kumar *et al.*, 1997).

Un rôle du facteur de transcription oncogénique E2F a aussi été proposé dans l'expression des caspases (Nahle *et al.*, 2002). La dérégulation d'E2F provoque une accumulation des formes zymogènes de multiples caspases. Ceci favorise les signaux apoptotiques médiés par p53.

Certaines caspases dont les caspases-1, -8, -3 ou -2 possèdent plusieurs isoformes issues d'un épissage alternatif de leurs ARNsm. Par exemple, il existe deux isoformes de la caspase-2, une isoforme longue, la caspase-2L, dont la surexpression induit l'apoptose et une isoforme courte, la caspase-2S, qui inhibe l'apoptose induite par la privation de sérum (Wang *et al.*, 1994).

- Régulation de l'activation des caspases induite par les récepteurs de mort

L'activation des pro-caspases par les protéines associées aux récepteurs de mort peut être régulée par un polypeptide appelé FLIP (protéine inhibitrice de Flice)/I-FLICE/CASH/Flame-1/CLARP/MIRT/usurpin (Inohara *et al.*, 1997). FLIP, qui contient un DED, se lie aux pro-domaines des pro-caspases-8 et -10, inhibant ainsi leur recrutement par les complexes d'activation induits par CD95/Fas et TFNR1 (Irmler *et al.*, 1997 ; Srinivasula *et al.*, 1997)

- Régulation de la voie cytochrome-*c*/Apaf-1 par les membres de la famille Bcl-2

L'activation de la pro-caspase-9 par le complexe Apaf-1:cytochrome *c* apparaît comme étant régulée par les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Bcl-2 et Bcl-X_L peuvent inhiber la libération du cytochrome *c* (Kluck *et al.*, 1997). Bcl-2 et Bcl-X_L, par leur capacité à former des hétérodimères avec Bax, Bik, Bid et certains autres membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, peuvent empêcher l'activation de la libération du cytochrome *c* par ces derniers (Antonsson *et al.*, 1997 ; Schlesinger *et al.*, 1997). De plus, Bcl-X_L peut inhiber la formation d'Apaf-1:cytochrome *c* et donc l'activation des pro-caspases (Hu *et al.*, 1998).

- Régulation par des inhibiteurs naturels

  - p35 et CrmA

La protéine p35 est une protéine synthétisée par le baculovirus. Elle est capable d'inhiber de nombreuses caspases (caspase-1,-2,-3,-4,-6,-7,-8,-9 et -10), sans inhiber les sérines protéases et les autres cystéines protéases. CrmA (*Cytokine Response Modifier A*), est codée par un gène précoce du virus de la varicelle (cowpox virus) et s'apparente aux inhibiteurs des sérines protéases (serpines). Cependant, au sein des serpines, CrmA est la seule protéase capable d'inhiber les caspases (Ray *et al.*, 1992 ; Komiyama *et al.*, 1994). Elle exerce un effet inhibiteur sur l'inflammation en inhibant la caspase-1 et donc en bloquant la production des interleukines IL-1β et IL-18 matures. La surexpression de cette protéine permet d'inhiber l'apoptose induite par une privation de facteurs de croissance, Fas, TRAIL, ou le TNF-α (Marsters *et al.*, 1996). CrmA bloque l'activité protéolytique des caspases-1 et -8, et dans une moindre mesure la caspase-6 mais a très peu d'effet sur les caspases-3 et -7 (Zhou *et al.*, 1997). Ces deux protéines virales p35 et CrmA sont des inhibiteurs compétitifs. En effet, une fois clivées par une caspase, elles se lient aux caspases empêchant ainsi la dégradation de nouveaux substrats (Komiyama *et al.*, 1994 ; Bump *et al.*, 1995).

- Les IAPs

L'activation des caspases et leur activité peuvent être aussi régulées par des interactions avec des protéines inhibitrices d'apoptose (IAPs). Huit homologues chez les mammifères des protéines IAPs présentes chez les baculovirus ont été décrits (Rothe *et al.*, 1995 ; Roy *et al.*, 1995 ; Liston *et al.*, 1996 ; Hay *et al.*, 1995) :

* **XIAP** (*X-linked Inhibitor of Apoptosis*)/hILP/MIHA
* **cIAP1**/hIAP2/MIHB
* **cIAP2**/hIAP1/MIHC
* **NAIP** (*Neuronal apoptosis inhibitory protein*)
* **Apollon**
* **Survivine**
* **ML-IAP**/KIAP/Livine
* **ILP2**

Les protéines de la famille IAP sont caractérisées par la présence d'un domaine d'environ 70 acides aminés : le domaine BIR (*Baculovirus IAP Repeat*), situé dans leur partie amino-terminale. XIAP, cIAP-1 et cIAP-2, possèdent trois domaines BIR (Birnbaum *et al.*, 1994) alors que la survivine et ML-IAP ne possèdent qu'un seul domaine BIR. cIAP1 et cIAP2 possèdent aussi un domaine C-terminal en doigt de zinc (RING finger) (Lovering *et al.*, 1993) et un domaine CARD. La survivine et NAIP sont dépourvues de domaine RING et de domaine CARD. ML-IAP possède uniquement un domaine RING *(Really Interesting New Gene*, domaine d'interaction protéine/protéine liant le zinc). Les domaines RING et CARD sont impliqués dans les interactions protéine-protéine. Chacun de ces polypeptides peut inhiber l'apoptose induite par une variété de stimuli (Liston *et al.*, 1996 ; Duckett *et al.*, 1996 ; Ambrosini *et al.*, 1997). XIAP, cIAP-1 et cIAP-2 se lient et inhibent les caspases-3 et -7 actives (Deveraux *et al.*, 1997 ; Roy *et al.*, 1997). Ils se lient également à la pro-caspase-9 et préviennent son activation (Deveraux *et al.*, 1998). Elles n'ont pas d'action inhibitrice vis-à-vis des caspases-1, -6, et -8 (Deveraux *et al.*, 1998). Pour XIAP, un seul domaine BIR semble être responsable de ses effets (Takahashi *et al.*, 1998). La survivine est aussi capable de se lier aux caspases et de prévenir l'apoptose induite par Fas, ou des agents anticancéreux (Tamm *et al.*, 1998), tout comme ML-IAP (Kasof & Gomez, 2001). NAIP est incapable d'inhiber les caspases-1, -3, -6, -7 ou -8 (Roy *et al.*, 1997). cIAP-1 et cIAP-2 se lient aussi à TRAF-1 et TRAF-2 à travers des interactions impliquant des motifs BIR (Rothe *et al.*, 1995 ; Roy *et al.*, 1997).

Les IAPs peuvent aussi inhiber indirectement les caspases. En effet, XIAP, NAIP et ML-IAP sont capables d'activer une MAPK, la protéine JNK1, conduisant à l'inhibition de l'apoptose. L'activation de JNK1 par les IAPs implique une MAPKK, la TAK1 (Sanna *et al., 2002*).

- Les HSPs

Les protéines de stress ou de choc thermique (HSPs, *Heat Shock Proteins*) sont des protéines dont l'expression est induite en réponse à différents types de stress (Ritossa, 1962). Elles sont classées en quatre grandes sous-familles en fonction de leur masse moléculaire : HSP90 (HSP90α, HSP90β, GRP94), HSP70 (HSP70, HSC70, mHSP70, GRP78), HSP60 et les petites HSPs (HSP27, αA-cristalline, αB-cristalline).

HSP27 interagit spécifiquement avec le cytochrome *c* (pas avec AIF), et bloque la formation de l'apoptosome (Bruey *et al.*, 2000) en prevenant ainsi l'activation des pro-caspases-9 et -3 (Garrido *et al.*, 1999). Cette protéine est aussi capable d'inhiber l'activation de la pro-caspase-3 en se fixant directement sur cette pro-caspase (Pandey *et al.*, 2000).

HSP70 protège les cellules de l'apoptose induite par un stress, en prévenant l'activation des caspases, les dommages mitochondriaux et la fragmentation nucléaire (Buzzard *et al.*, 1998). HSP70 exerce son activité en aval du relargage du cytochrome *c* mais en amont de l'activation de la pro-caspase-3 (Li *et al.*, 2000), en se liant à Apaf-1.

HSP90 interagit directement avec Apaf-1, en bloquant son oligomérisation et le recrutement de la pro-caspase-9 (Pandey *et al.*, 2000). HSP90 peut également stabiliser la protéine Akt qui peut ainsi exercer sa fonction anti-apoptotique en phosphorylant plusieurs acteurs impliqués dans le contrôle de l'apoptose comme Bad et la caspase-9 (Sato *et al.*, 2000).

- <u>Modifications post-traductionnelles</u>

  - Nitrosylation et oxydation

La cystéine catalytique est sensible à des modifications. En effet, des agents modifiant les thiols comme le N-éthylmaleimide ou l'iodoacetamide et des donneurs du NO comme la S-nitrosoglutathione (GSNO), le BF_4NO, ou la spermine-NO, peuvent inhiber directement l'activité des caspases à travers la nitrosylation du site actif (Mohr *et al.*, 1997).

Une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène peut participer à l'inhibition des caspases.

- Phosphorylation

Les caspases peuvent être régulées par phosphorylation, phénomène régulateur fréquemment utilisé. Notamment, la caspase-9, qui peut être inhibée par la protéine Akt qui la phosphoryle au niveau du résidu sérine 196 (Cardone *et al.*, 1998).

⌘ La caspase-2

La caspase-2 est la seconde caspase identifiée chez les mammifères. Cette caspase est localisée dans le cytosol, dans le Golgi (Mancini *et al.*, 2000, O'Reilly *et al.*, 2002), dans la mitochondrie (Susin *et al.*, 1999) et principalement dans le noyau (Baliga *et al.*, 2003) où elle est la seule pro-caspase à être exprimée constitutivement.

Le gène de la caspase-2 code pour deux isoformes principales résultant de l'épissage alternatif de l'exon 9 dans la région 3' du gène. L'isoforme longue (caspase-2L) est une protéine de 48 kDa possèdant une grande sous-unité de 20 kDa, une petite sous-unité de 12 kDa et un long pro-domaine contenant un domaine CARD et deux séquences de localisation nucléaire (Baliga *et al.*, 2003). Dans la plupart des tissus, le messager de l'isoforme longue est 2 à 15 fois plus exprimé que celui de l'isoforme courte (34 kDa), à l'exception du cerveau, du muscle squelettique et du cœur (Wang *et al.*, 1994). L'isoforme courte (caspase-2S) est peu, voir pas du tout, exprimée dans la plupart des tissus.

Les sites de clivage de la caspase-2 semblent être communs avec ceux des caspases-3 et -7 c'est-à-dire les séquences DEXD (DEVD étant reconnaissable par les caspases-3 et -7 mais pas par la caspase-2) et surtout VDVAD, qui semble plus spécifique de la caspase-2 mais qui peut également être reconnue par les caspases-3 et -7.

Hormis la caspase-2, elle-même, la Golgine160 est un des rares substrats connus de la caspase-2. Cette protéine est localisée à la périphérie de la membrane golgienne et clivée dans certaines conditions apoptotiques telles que la mort induite par les UV (Ultra-Violet) ou la staurospaurine (Mancini *et al.*, 2000). Le clivage de la Golgine 160 précède le démantèlement du Golgi et suggère alors que cet évènement pourrait avoir un rôle dans la transmission du signal de mort. Plusieurs équipes ont démontré le clivage direct ou indirect de Bid par la caspase-2 (Paroni *et al.*, 2001 ; Wagner *et al.*, 2004, Guo *et al.*, 2002). Paroni *et al.* (Paroni *et al.*, 2002) ont montré que l'activation de la caspase-2 induit une relocalisation de Bid-GFP à la mitochondrie.

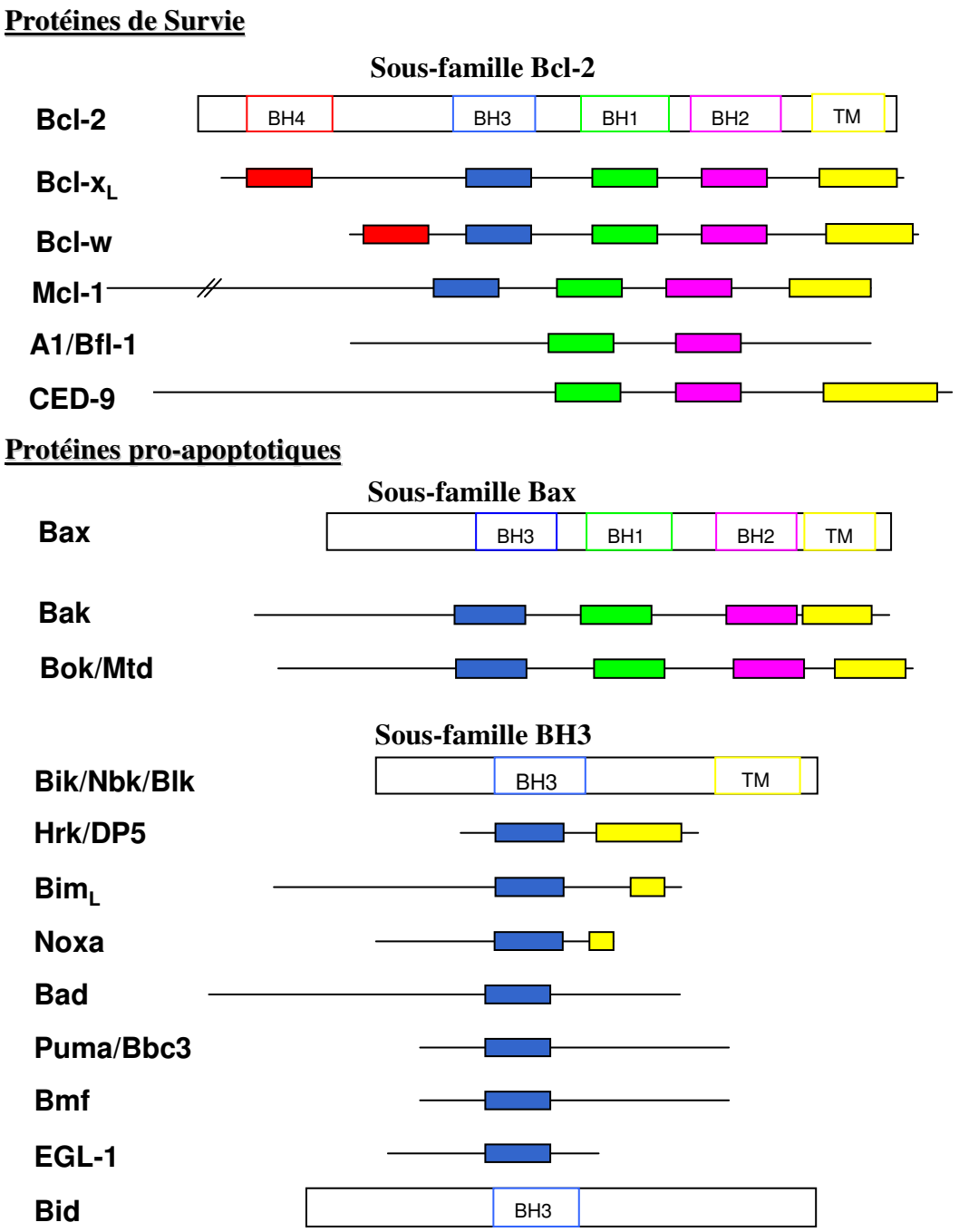


Figure 36 : **Les trois sous-familles des protéines de la famille Bcl-2** (Cory *et al.*, 2003)
BH1 à BH4 (*Bcl-2 homology regions 1-4*) sont des séquences ayant une haute homologie avec Bcl-2. La région BH1/2/3 de la sous-famille Bcl-2, et peut-être du groupe Bax, se comporte comme un récepteur pour le domaine BH3 de leurs ligands pro-apoptotiques. Certaines protéines ont un domaine carboxyterminal hydrophobe transmembranaire (TM) qui leur permet de s'ancrer aux membranes intracellulaires.

La caspase-2 semble jouer, au cours de l'apoptose, un rôle tant d'initiatrice (relargage du cytochrome *c*) que d'exécutrice (clivage de substrats spécifiques comme la Golgine 160). La caspase-2 a tout d'abord eu un rôle d'amplificateur du signal de mort en aval de la caspase-3. Cependant, la caspase-2 a également une fonction initiatrice en amont de la perméabilisation de la mitochondrie et de l'activation de l'apoptosome.

Le rôle de la caspase-2 semble dépendre du stimulus apoptotique, de la lignée cellulaire étudiée, mais également de l'abondance intracellulaire de pro-caspase-2.

d. Les protéines de la famille Bcl-2

Bcl-2 est le chef de famille de protéines composée actuellement d'une vingtaine de membres, dont certains préviennent l'apoptose (Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bcl-w, A1/Bfl-1, Boo/Diva, NR-13) alors que d'autres la facilitent (Bax, Bak, Bok/Mtd, Bcl-xs, Bid, Bad, Bim/Bod, Bmf, Noxa, Puma…).

Ces protéines sont caractérisées par la présence de domaines BH (*Bcl-2 Homology Domain*) (Adams & Cory, 1998 ; Kelekar & Thompson, 1998 ; Reed, 1998). Le nombre de domaines BH peut varier de un à quatre, selon la protéine. La nature des domaines BH semble déterminer la fonction des protéines de la famille Bcl-2.

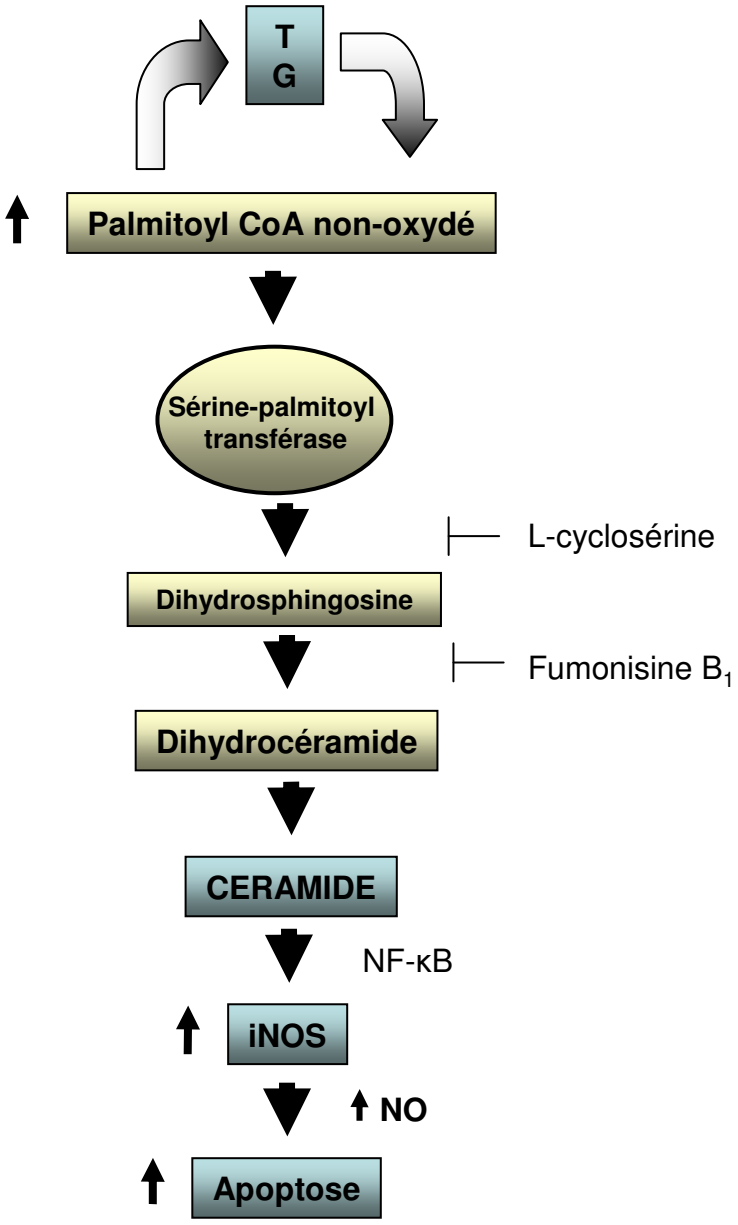
Les protéines de la famille Bcl-2 ont été regroupées en trois classes (Figure 36) :

* Les membres anti-apoptotiques (comme Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w ou Mcl-1) possédant jusqu'à quatre domaines BH. Le domaine BH4 semble être à l'origine de leur fonction anti-apoptotique.
* Les membres pro-apoptotiques (comme Bax, Bak, Bad et Bcl-x_S) ne possédant généralement pas de domaine BH4.
* Les membres pro-apoptotiques possédant un seul domaine BH, le domaine BH3 (« *BH3 only proteins* »).

Ces domaines, de BH1 à BH4, correspondent à des structures composées d'hélices α (Adams & Cory, 1998). Généralement, les membres anti-apoptotiques ont conservé les quatre domaines d'homologie alors que les membres pro-apoptotiques sont caractérisés par l'absence du premier segment en hélice α, le domaine BH4 (Burlacu, 2003). Le domaine BH3 est supposé être le domaine le plus important pour l'induction de la mort cellulaire chez les membres pro-apoptotiques. Cette hypothèse est confortée par l'existence des protéines pro-apoptotiques à domaine uniquement BH3 ne possèdant que le domaine d'homologie BH3 (Puthalakath & Strasser, 2002). Les membres de la famille Bcl-2 possèdent la capacité de former des homo- ou des hétérodimères. Ainsi une protéine de cette famille peut exercer une inhibition sur l'activité d'une autre. De ce fait, Bcl-2 peut former des hétérodimères avec Bax, une protéine pro-apoptotique qui partage 21% d'amino-acides identiques avec Bcl-2 (Adams & Cory, 1998). La plupart de ces protéines possède également un domaine hydrophobe carboxy-terminal, ou zone d'ancrage, permettant leur implantation dans la membrane mitochondriale, la membrane du reticulum endoplasmique ou la membrane nucléaire externe (Chao & Korsmeyer, 1998).

Un nouveau membre anti-apoptotique, BAR (*Bifunctional Apoptosis Regulator*), présente une structure originale. Il se compose de quatre domaines : un domaine RING, un domaine SAM (*Sterile Alpha Motif*), un domaine DED, suivi d'un domaine transmembranaire (Zhang *et al.*, 2000). Le domaine SAM est requis pour l'interaction avec Bcl-2 et Bcl-xL et pour l'inhibition de l'apoptose induite par Bax. Le DED lui permet d'interagir avec les pro-caspases et ainsi d'abolir l'apoptose induite par l'engagement des récepteurs de mort tel que Fas. BAR est donc capable de former un complexe comprenant la pro-caspase-8 et Bcl-2. Il a été suggéré que BAR, tout comme FLIP, entrait en compétition avec les protéines adaptatrices, telle que FADD, pour la liaison aux pro-caspases-8 et -10 (Tschopp *et al.*, 1998).

En l'absence de signaux apoptotiques, les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont inserées dans la membrane externe d'organites intracellulaires incluant la mitochondrie, le reticulum endoplasmique et le noyau (Hockenbery *et al.*, 1990, De Jong *et al.*, 1994, Zhu *et al.*, 1996), tandis que les protéines pro-apoptotiques de cette famille sont dans le cytosol ou au niveau du cytosquelette (Bim/LC8 dynein, Bad phosphorylé/14-3-3) (Hsu *et al.*, 1997, Gross *et al.*, 1998). En réponse à des singaux de mort cellulaire, ces dernières subissent des modifications qui permettent leur relocalisation, principalement dans la membrane externe des mitochondries où elles exercent leur fonction pro-apoptotique (Gross *et al.*, 1999), en interagissant et en neutralisant les protéines anti-apoptotiques.



<u>Figure 37 :</u> La voie de la synthèse *de novo* des céramides connue pour être la route majeure de la lipoapoptose dans les ilots de rats ZDF (Unger, 2003)
La synthèse des céramides induite par les acides gras se fait par condensation du palmitoyl CoA et de la sérine. La formation de céramides, la régulation positive de la NO synthase inductible (iNOS), et l'apoptose peuvent être réduits ou inhibés par la L-cyclosérine ou la fumonisine B_1.

e. La lipoapoptose

La dérégulation de l'homéostasie des acides gras à longue chaîne, qui se produit dans l'obésité et le vieillissement, peut être responsable d'une forme d'apoptose. Cette forme, non-famillière d'apoptose, la **lipoapoptose**, est le résultat d'une accumulation d'acides gras. L'induction de la lipoapoptose, dans les tissus non-adipeux (cellules de Langerhans du pancréas), peut être un facteur majeur dans les maladies associées à la sur-nutrition et à l'âge. L'accumulation d'acides gras à longue chaîne, dans le cœur, a été décrite comme pouvant jouer un rôle dans le développement des pathologies cardiaques et des cardiomyopathies diabétiques (Listenberger & Schaffer, 2002). Un lien a donc été suggéré entre l'accumulation de lipides, la mort cellulaire des cardiomyocytes et le développement des cardiomyopathies.

Les voies conduisant à la lipoapoptose peuvent varier d'une cellule à l'autre, et dans une même cellule en fonction du temps. La lipoapoptose a été décrite pour la première fois chez des rats ZDF (Zucker Diabetic Fatty), qui présentent une résistance congénitale à la leptine. Dans ce modèle, l'apoptose a été attribuée à une augmentation de la synthèse de céramides (Unger & Orci, 2002).

Les acides gras à longue chaîne induisent l'apoptose à travers un mécanisme impliquant la production d'intermédiaires réactifs. Cette production se produit de concert avec la synthèse *de novo* de céramides (Figure 37).

Les acides gras à longue chaîne comme le palmitate (C16:0) ou le stéarate (18:0) induisent un programme de mort cellulaire programmée dans une variété de types cellulaires. L'apoptose induite par le palmitate est caractérisée par une externalisation de la phosphatidylsérine, une activation de la caspase-3 et une fragmentation internucléosomale de l'ADN (Listenberger & Schaffer, 2002). Dans le cas du palmitate, la production de céramides n'est pas requise pour l'induction de l'apoptose, mais peut participer à l'amplification de la réponse apoptotique en agissant au niveau de l'activation des caspases et de la fragmentation de l'ADN (Listenberger & Schaffer, 2002). Cette réponse est différente, en fonction du type cellulaire, dans l'implication des céramides dans le processus apoptotique.

Dans des cellules β pancréatiques, de rats ZDF *fa/fa* non traités, de profondes altérations mitochondriales et l'apoptose sont observées. L'apoptose résulte d'une formation excessive de céramides couplée avec une sous-expression du facteur anti-apoptotique Bcl-2 (Unger, 2002).

La phosphorylation d'**Akt** par la PI-3-kinase peut promouvoir la survie cellulaire en phosphorylant et donc inhibant les composants de la machinerie de mort cellulaire, par exemple Bad, Bax, Bid et Bim. Parce que certaines parties lipidiques peuvent bloquer l'action de la PI-3-kinase, qui phosphoryle Akt, des taux élevés d'acides gras à longue chaîne et de céramides, en interférant avec la phosphorylation d'Akt, peuvent non seulement empêcher la consommation de glucose stimulée par l'insuline dans le muscle squelettique, mais aussi induire l'apoptose à long terme (Unger, 2003).

Les céramides peuvent aussi induire l'apoptose en régulant positivement la **NO synthase inductible** (Unger, 2003) (Figure 37). Cette augmentation de l'expression de la NO synthase inductible se produit à travers l'activation de NF-κB. (Unger & Orci, 2001) (Figure 37). Le NO participe à la formation d'oxydants puissants, comme le peroxynitrite, qui peuvent induire l'apoptose (Unger & Orci, 2001 ; Unger & Zhou, 2001).

La **leptine** a été dans un premier temps décrite comme une hormone anti-obésité en régulant la consommation de nourriture et la thermogenèse par des actions sur l'hypothalamus mais ceci n'a pas été confirmé. Mais une fonction physiologique de la leptine pourrait être de réguler dans les cellules non adipocytaires l'homéostasie intracellulaire des acides gras et des triglycérides (Unger *et al.*, 1999). La leptine protègerait les cellules non adipocytaires d'une accumulation excessive de triglycérides durant les périodes de sous-alimentation. La perte d'action de la leptine, dans les tissus non adipocytaires, provoque un chargement en graisse, qui empêche la fonction, et ultimement la viabilité des cellules β. En plus, des anormalités fonctionnelles, on peut également observer d'importants changements morphologiques, incluant la désorganisation de l'architecture de l'îlot, et un fort pourcentage d'anormalités mitochondriales (Unger *et al.*, 1999). L'action de la leptine sur les cellules β permet de maintenir un contenu en triglycérides normal et de fournir une protection contre la lipotoxicité (Unger *et al.*, 1999). En effet, la leptine bloque complètement la suppression de Bcl-2 induite par les acides gras dans les îlots normaux (Shimabukuro *et al.*, 1998). La leptine permettrait une protection contre la lipoapoptose des cellules β à travers le maintien de l'expression de Bcl-2 (Shimabukuro *et al.*, 1998).

Ces différentes études suggèrent d'importantes nouvelles stratégies pour prévenir l'apoptose en agissant à de multiples niveaux (Unger & Zhou, 2001) :

* en réduisant les taux d'acides gras,
* en bloquant la formation de céramides (en culture, l'apoptose induite par les acides gras, est inhibée par un puissant inhibiteur de la formation des céramides la fumonisin-B1),
* en inhibant la NO synthase inductible,
* en restaurant l'action de la leptine.

Des études précliniques sur des rats ZDF prédiabétiques ont démontré que des changements précoces, comme l'accumulation de triacylglycérol, la perte de fonction, et la perte des cellules β par lipoapoptose, peuvent être pévenus par traitement avec un thiazolidinedione, la troglitazone, qui est un agoniste de PPAR-γ, si ce traitement est pris à l'étape prédiabétique de la pathologie (Unger & Zhou, 2001). Malgré l'inaction de la leptine chez ces rats, le traitement par la troglitazone provoque une diminution de l'accumulation de lipides, ce qui diminue le contenu en céramides et inhibe l'apoptose. De plus, il prévient complètement les altérations sévères de la mitochondrie. Des résultats similaires peuvent être obtenus en traitant des rats ZDF prédiabétiques obèses avec les inhibiteurs de la NO synthase inductible : le nicotinamide ou aminoguanidine (Unger & Zhou, 2001).

L'effet proliférateur de forts taux d'acides gras à longue chaîne sur les cellules β suggère que l'exposition aux triglydérides a des effets mitogènes qui augmentent le risque de néoplasie dans les autres cellules. Un lien a été suggéré entre une nourriture riche en graisses et le cancer du colon (Unger *et al.*, 1999).

4. Le stress du réticulum

Le stress du réticulum est un processus associé à la mort cellulaire qui se déclenche lorsque des protéines mal repliées s'accumulent dans le réticulum endoplasmique. Un signal est alors envoyé de la membrane du réticulum endoplasmique au noyau et aux compartiments cytoplasmiques. Les protéines effectrices y répondent en régulant positivement la transcription d'un ensemble caractéristique de gènes et en ralentissant la traduction en général. Cette réponse adaptative est appelée UPR (*Unfolded Protein Response*). Cette voie est aussi impliquée dans certaines pathologies comme les maladies de Parkinson et d'Alzheimer. Des agents comme la tunicamycine, qui bloque la glycosylation des protéines, le dithiotreitol, qui empèche la formation des ponts disulfures, la thapsigargine, inhibiteur de la Ca-ATPase du reticulum et la brefeldin A, qui bloque le repliement et l'export des protéines, peuvent induire un stress du reticulum *in vitro*.

La protéine kinase transmembranaire/endoribonucléase Ire1p/Ern 1p (*Inositol requiring 1/ER to nucleus signaling 1*) est essentielle pour la survie cellulaire lors du stress du reticulum endoplasmique et a été identifiée comme un initiateur qui initie la voie de signalisation UPR (Morl *et al.*, 1993). Toutes les cellules eucaryotes ont conservé les propriétés uniques et essentielles de la signalisation UPR médiée par Ire1p identifiées chez la levure, mais possèdent également des initiateurs additionnels qui génèrent une diversité de réponses. Chez les mammifères, l'homologue d'Ire1p a deux isoformes **IRE1α** et **IRE1β**. IRE1α est exprimé dans la plupart des tissus alors qu'IRE1β s'exprime exclusivement dans les cellules épithéliales intestinales. IRE1 contient un domaine sensible au stress du reticulum en position N-terminale qui se situe dans la lumière du réticulum, un domaine transmembranaire, un domaine sérine/thréonine kinase et un domaine C-terminal endoribonucléase dans le cytosol (Shamu & Walter, 1996) (Figure 38). En plus d'IRE1, il existe deux initiateurs **PERK** (*double-strand RNA-activated Protein kinase-like ER Kinase*) et **ATF6** (*Activating Transcription Factor 6*) (Figure 38). PERK possède un grand domaine sensible au stress du reticulum qui est fonctionnellement interchangeable avec le domaine luminal d'IRE1 et un domaine cytosolique qui phosphoryle la sous-unité α du facteur 2 d'initiation de la traduction (eIF2α) (Shi *et al.*, 1998). ATF6 est un facteur de transcription avec un domaine leucine-zipper (b-ZIP), en N-terminal, dans le cytosol, et un domaine C-terminal situé dans la lumière du réticulum qui est sensible au stress (Haze *et al.*, 1999).

Ces différents initiateurs, IRE1, PERK et ATF6, sont activés par un stimulus commun : l'accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du réticulum. Une protéine chaperonne du reticulum, **BiP** (aussi connu sous le nom de GRP78) sert de régulateur principal de la voie UPR et joue un rôle essentiel en activant IRE1, PERK et ATF6 en réponse à un stress du reticulum (Shen *et al.*, 2002 ; Bertolotti *et al.*, 2000). BiP est une ATPase dépendante de peptide et membre de la famille des protéines de choc thermique HSP 70 qui se lient transitoirement aux protéines nouvellement synthétisées et transloquées dans le reticulum, et de manière plus permanente aux protéines non repliées et pas assez glycosylées.

Dans des conditions non-stressantes, BiP se lie aux domaines d'IRE1, PERK et ATF6, présents dans la lumière du reticulum pour les maintenir à l'intérieur du reticulum. Lors de l'accumulation de protéines mal repliées, BiP se détache d'IRE1 et de PERK pour permettre leur dimérisation/oligomérisation spontanée, puis leur autophosphorylation et activation (Bertolotti *et al.*, 2000). L'activation régulée par BiP fournit un mécanisme direct, pour les trois initiateurs, pour détecter le stress au niveau du reticulum.

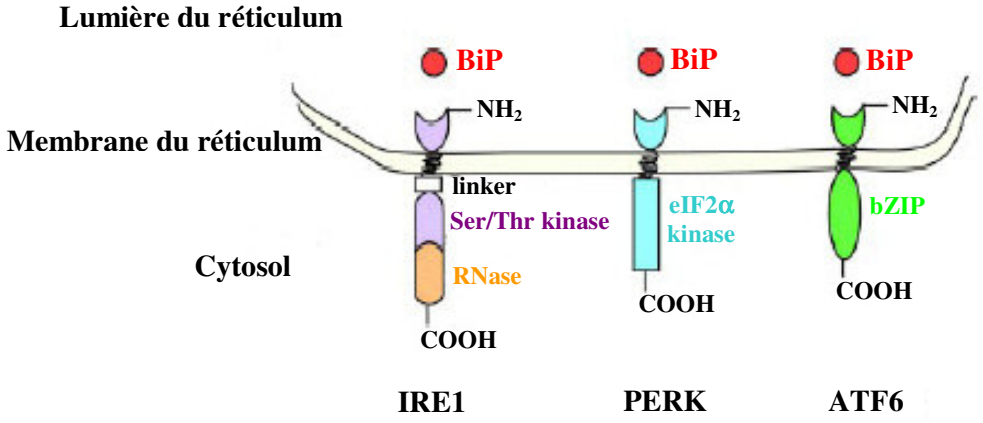
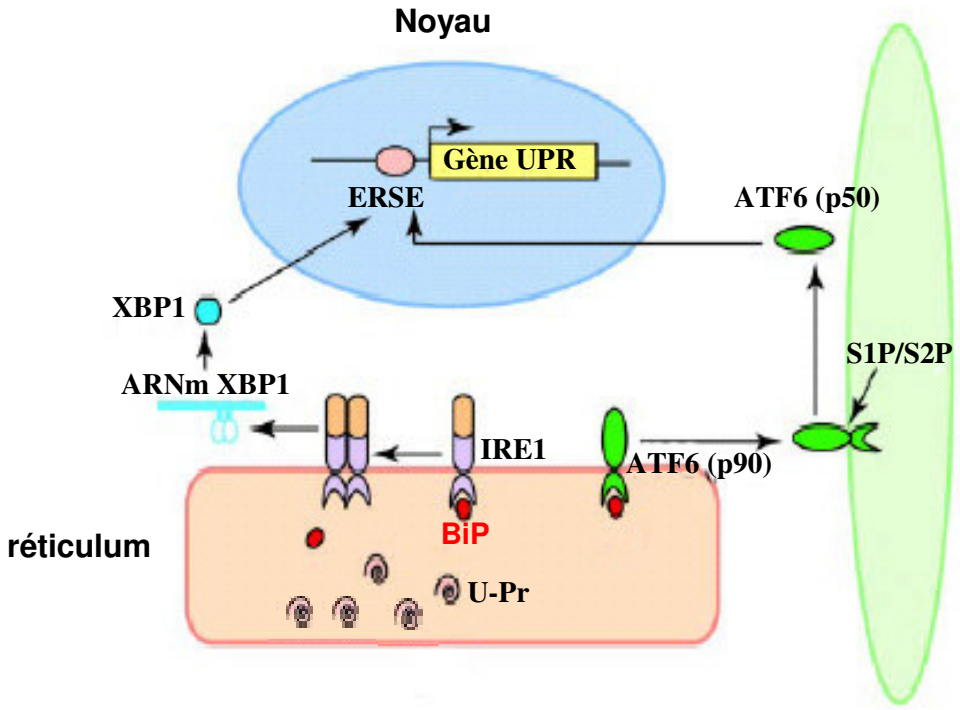


Figure 38: Les trois détecteurs UPR. (Zhang & Kaufman, 2004)
Les domaines structuraux d'IRE1, de PERK, d'ATF6 sont décrits ainsi que leurs associations avec BiP. IRE1 possède un domaine N-terminal sensible au stress présent dans la lumière du réticulum, un domaine transmembranaire, un domaine sérine/thréonine kinase et un domaine C-terminal à activité endoribonucléase localisé dans le cytosol. PERK possède un grand domaine sensible au stress qui est fonctionnellement interchangeable avec le domaine luminale d'IRE1 et un domaine cytosolique qui phosphoryle la sous-unité α du facteur 2 d'initiation de la traduction (eIF2α). ATF6 est un facteur de transcription avec un domaine N-terminal leucine zipper (b-ZIP) au niveau du cytosol et un domaine C-terminal sensible au stress présent dans la lumière du réticulum.



<u>Figure 39 :</u> Signalisation UPR médiée par IRE1 et ATF6 (Zhang & Kaufman, 2004)
Lors d'une accumulation de protéines mal-repliées (U-Pr) dans la lumière du réticulum, IRE1 se sépare de BiP, ce qui permet sa dimérisation et son activation. L'ARNm de XBP1 code pour un puissant facteur de transcription qui se lie à des séquences ERSE d'un certain nombre de gènes cibles UPR. ATF6 se libère de BiP, ce qui permet son transport dans le golgi où ATF6 (90 kDa) est clivé par les protéases S1P et S2P en un fragment cytosolique de 50 kDa qui migre dans le noyau pour activer la transcription de gènes de réponse UPR.
ATF6 : *Activating Transcription Factor 6* ; ERSE: *Endoplasmic Reticulum Stress response Elements* ; IRE1 : *Inositol requiring 1* ; S1P/S2P : *site-1 &-2 protease* ; U-Pr : protéines mal-repliées ; XBP1 : *X-box DNA-Binding Protein*

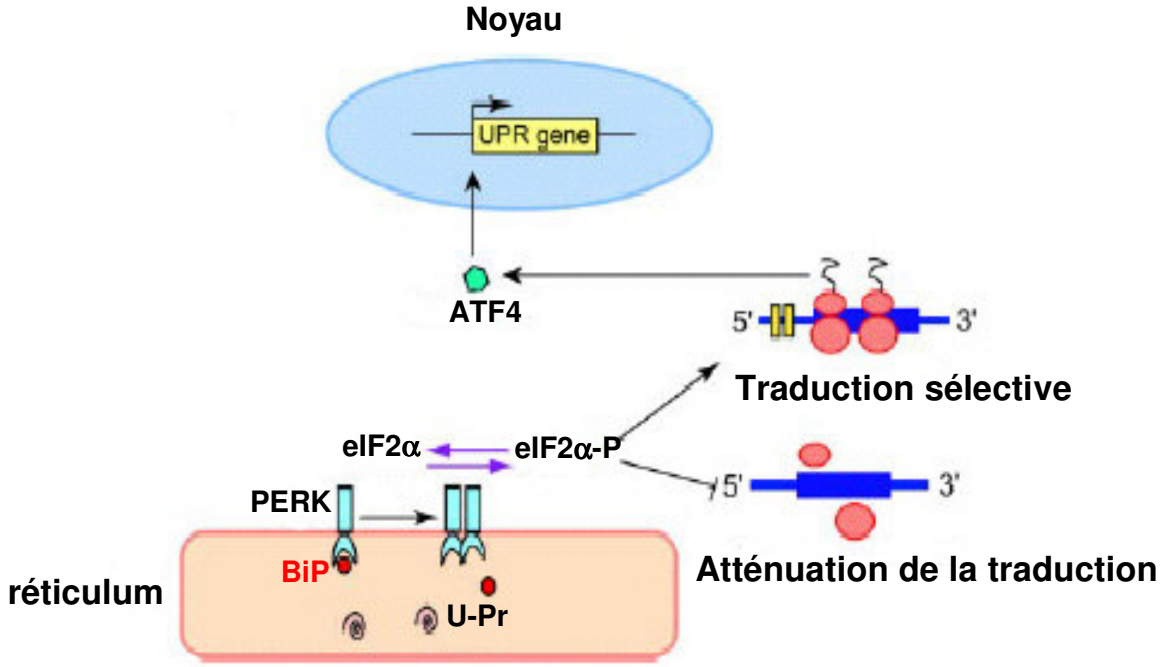
a. La signalisation UPR médiée par IRE1 et ATF6

Un élément de réponse au stress du réticulum a été identifié chez les mammifères, **ERSE** (*Endoplasmic Reticulum Stress response Elements*), avec comme motif minimum CCAAT(N_9)CCACG. Il est nécessaire et suffisant pour l'activation des gènes UPR. Deux facteurs de transcription b-ZIP, **XBP1** (*X-box DNA-Binding Protein*) et ATF6, ont été identifiés en utilisant ERSE comme sonde.

IRE1 code une endoribonucléase, protéine kinase transmembranaire de type I atypique, constituée d'un domaine de dimérisation luminal, de domaines kinases cytosoliques et endoribonucléases. Après dissociation de BiP du domaine luminal, IRE1 s'oligomérise et active son domaine RNAse par autophosphorylation. XBP1, homologue de Hac1p chez la levure, est un substrat pour l'activité RNase d'IRE1. Sous activation de l'UPR, IRE1 RNase clive l'ARNm de XBP1 pour éliminer un intron de 26 nucléotides (Calfon *et al.*, 2002 ; Lee *et al.*, 2002). L'ARNm de XBP1 épissé code une protéine avec une extrémité C-terminale nouvelle qui agit comme un puissant activateur de transcription pour un grand nombre de gènes cibles UPR notamment ceux de chaperonnes moléculaires résidentes dans le reticulum endoplasmique (Figure 39). De plus, XBP-1 est essentiel pour la différenciation terminale des cellules B (Reimold *et al.*, 2001).

ATF6 existe sous deux formes, ATF6α (90 kDa) et ATF6β (110 kDa, aussi connue sous le nom de CREB-RP/G13). Sous activation d'UPR, ATF6, après sa libération de la protéine BiP, est transporté au Golgi où il est clivé par S1P et S2P (*site-2 protease*) pour générer un fragment cytosolique de 50 kDa qui migre dans le noyau pour activer la transcription des gènes cibles d'UPR (Figure 39) (Shen *et al.*, 2002). En présence des facteurs liant CCAAT (CBF ou NF-Y), ATF6(p50) se lie au demi-site (CCACG) de ERSE pour activer la transcription. S1P et S2P sont également les enzymes qui clivent SREBP lors d'une déprivation en cholestérol.

ATF6 régule un groupe de gènes codant pour des chaperonnes moléculaires qui résident dans le reticulum et des enzymes participant au repliement des protéines alors que XBP1 régule un sous-ensemble de gènes codant des chaperonnes moléculaires qui résident dans le reticulum endoplasmique qui sont essentielles pour le repliement des protéines, leur maturation et leur dégradation dans le reticulum endoplasmique (Okada *et al.*, 2002 ; Lee *et al.*, 2003). Des complexes hétérodimériques entre ATF6α et ATF6β sont des répresseurs transcriptionnels du promoteur de BiP (Thuerauf *et al.*, 2004)



<u>Figure 40 :</u> Signalisation UPR médiée par PERK. (Zhang & Kaufman, 2004)
Lors d'une accumulation de protéines mal-repliées (U-Pr) dans la lumière du reticulum, PERK se sépare de BiP, ce qui permet sa dimérisation et son activation. PERK, une fois activé, phosphoryle eIF2α pour réduire la fréquence de l'initiation de la traduction de l'ARNm de manière générale. De manière sélective, comme c'est le cas avec ATF4, certains ARNm peuvent être préférentiellement traduit par eIF2α phosphorylé.
ATF4 : *Activating Transcription Factor* 4 ; eIF2 α : sous-unité α du facteur 2 d'initiation de la traduction ; PERK : *double-strand RNA-activated Protein kinase-like ER Kinase* ; U-Pr : protéine mal-repliée.

b. La signalisation UPR médiée par PERK

La réponse la plus immédiate à un stress du réticulum est l'atténuation transitoire de la traduction de l'ARNm par augmentation de la phosphorylation d'**eIF2α** (Figure 40). La forme liée au GTP d'eIF2 recrute l'initiateur $tRNA^{Met}$ au niveau de la petite sous-unité ribosomale. Durant l'initiation, le GTP est hydrolysé en GDP, qui doit être transformé en GTP pour renouveler l'activité eIF2. La phosphorylation sur la sérine 51 d'eIF2α bloque eIF2B, le facteur qui échange le GTP, interrompant le cycle d'eIF2 et inhibant ainsi l'initiation de la traduction. PERK est activée en réponse à un stress du reticulum pour phosphoryler eIF2α sur la sérine 51, atténuant ainsi la synthèse des protéines (Scheuner *et al.*, 2001 ; Harding *et al.*, 2000a).

Alors que la phosphorylation d'eIF2α par PERK conduit à l'atténuation globale de la traduction, eIF2α phosphorylé stimule sélectivement la traduction d'un ensemble d'ARNsm spécifiques en réponse au stress du reticulum (Figure 40). Ce peut être le cas avec l'ARNm d'**ATF4** qui active la transcription des gènes impliqués dans le transport et le métabolisme des acides aminés, dans les réactions d'oxydoréduction et dans l'apoptose induite par le stress du reticulum (Ron, 2002 ; Harding *et al.*, 2003). La surexpression d'ATF4 n'est pas suffisante pour activer l'expression des gènes du système UPR, suggérant qu'un autre facteur inductible par le stress agit en conjonction avec ATF4 (Harding *et al.*, 2000b).

En utilisant un système double-hybride, Diehl *et al.* ont isolé **Nrf2** (*NF-E2-related factor-2*), un facteur de transcription *Cap'n'Collar,* comme étant un nouveau substrat pour PERK (Cullinan & Diehl, 2004). Dans des cellules non stressées, Nrf2 est maintenu dans le cytoplasme via son association avec Keap1 (Itoh *et al.*, 1999). Sous des conditions de stress, la phosphorylation dépendante de PERK entraîne la dissociation du complexe Nrf2/Keap1, permettant l'import nucléaire de Nrf2. Nrf2, dans le noyau, favorise la transcription des gènes requis pour la survie en réponse à un stress oxydatif (Lee *et al.*, 2003). L'activation de Nrf2 apparaît indépendante et parallèle à la phosphorylation d'eIF2α, suggérant deux réponses divergentes en aval de la signalisation de PERK.

c. Rôles adaptatifs et cytotoxiques du système UPR dans la fonction cellulaire et la survie cellulaire

⌘ Le Système ERAD

Le système **ERAD** (*ER-Associated protein Degradation*) est un processus par lequel les protéines mal repliées sont détectées et arrêtées dans leur cheminement dans la voie sécrétrice, par des facteurs résidents dans le reticulum. Elles sont alors dirigées pour être retransloquées dans le cytosol, où elles subissent une dégradation dépendante du système ubiquitine/protéasome. Beaucoup de composants spécifiques du système ERAD sont induits par le système UPR (Travers *et al.*, 2000). La dégradation protéosomale des protéines mal repliées associées au reticulum est une protection contre l'activation du système UPR. L'inhibition du protéasome est suffisante pour activer la voie UPR qui peut en retour induire la transcription de gènes codant plusieurs composants de la voie ERAD. Le système UPR n'est pas requis pour l'expression basale des protéines du système ERAD impliquant l'existence d'un niveau basal qui est indépendant de la fonction UPR. L'activité ERAD basale est suffisante pour éliminer les protéines mal repliées dans des conditions normales. Quand le stress est déclenché, le système UPR est requis pour augmenter l'activité ERAD.

⌘ Homéostasie du calcium

La fonction normale du reticulum endoplasmique requiert de hautes concentrations de calcium libre à l'intérieur de la lumière de celui-ci. Ces niveaux de calcium, de 300-400 µM, favorisent une entière activation des chaperonnes dépendantes du calcium comme BiP et la calreticuline, et donc leurs interactions avec des protéines mal repliées et d'autres chaperonnes (High *et al.*, 2000). Lors d'une déplétion en calcium (niveaux de calcium dans la lumière du reticulum endoplasmique de 50-100 µM) ces interactions et les activités chaperonnes sont sévèremment empêchées. Un exemple direct montrant que de fortes altérations dans les niveaux de calcium dans la lumière du réticulum endoplasmique induisent le système UPR est l'inhibition irréversible de la pompe SERCA (*Sarco-Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase*), une pompe à calcium présente sur la membrane du réticulum, par la thapsigargine. La thapsigargine induit la déplètion du calcium du réticulum, produit une augmentation de 200 fois des ARNms *Grp 78, Grp94, Gadd34* et *CHOP,* et inhibe la traduction des protéines (Doutheil *et al.*, 1999 ; Mengesdorf *et al.*, 2001). De plus, SERCA est un gène répondant au système UPR. Son induction par l'UPR a pour but de restaurer l'homéostasie calcique perturbée, régulant positivement l'activité des chaperonnes dépendantes du calcium. L'UPR et les niveaux de calcium sont directement coordonnés pour maintenir l'homéostasie du réticulum assurant sa propre fonction.

⌘ Biosynthèse des lipides

Des voies communes existent entre l'UPR et la biosynthèse des lipides. Un exemple est l'activation d'ATF6 et de SREBP qui requièrent tous les deux une translocation régulée du réticulum au Golgi et un clivage par S1P et S2P. Bien qu'ils soient activés par des signaux distincts, l'hyperhomocystéinémie, une condition associée avec l'accumulation des protéines mal repliées dans le reticulum, est liée à l'activation d'ATF6 et de SREBP (Hampton, 2002 ; Werstuck *et al.*, 2001). Ainsi, le stress du reticulum, induit par l'homocystéine, provoque la dérégulation de la voie de réponse endogène aux stérols, menant à une augmentation de la biosynthèse et de la consommation de cholestérol et des triglycérides.

Une autre voie commune à UPR et à la synthèse des lipides est le système ERAD. Le système ERAD cible la dégradation des protéines régulatrices comme l'hydroxyméthylglutary-CoA réductase (HMGR), l'enzyme limitante dans la biosynthèse des stérols et des isoprénoïdes (Hampton, 2002). En présence de hautes concentrations de stérols, HMGR est sensible à la concentration de stérols à travers une transition structurale dans son domaine transmembranaire qui permet d'être reconnu par la machinerie ERAD (Gardner *et al.*, 2001).

⌘ Mort cellulaire programmée associée au stress du reticulum

L'activation prolongée du système UPR peut mener à une mort cellulaire programmée. Trois voies connues pro-apoptotiques émanant du reticulum sont médiées par IRE1, la caspase-12 et PERK/CHOP, bien que les mécanismes ne soient pas encore bien connus (Kaufman, 2002 ; Ron, 2002).

Sous un stress du reticulum, IRE1 activé recrute JIK (*Jun N-terminal Inhibitory Kinase*) et l'adaptateur cytosolique **TRAF2** (*Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor 2*), pour activer ASK1 (A*poptosis-Signaling Kinase 1*) qui en retour active JNK et les caspases dépendantes de la mitochondrie et d'Apaf-1. En effet, JNK est transloquée au niveau de la membrane mitochondriale et stimule la phosphorylation de Bim qui intervient dans le relargage du cytochrome *c* dépendant de Bax.

La **caspase-12** est un effecteur proximal, associé au réticulum, de la cascade d'activation des caspases, les cellules déficientes dans cette enzyme sont partiellement résistantes à l'apoptose induite par un stress du réticulum (Nakagawa *et al*., 2000). TRAF2 intervient dans l'activation de la caspase-12. La caspase-12 se situe du côté cytoplasmique du réticulum, son activation requiert son clivage de la membrane du réticulum par des protéases qui peuvent être présentes à la surface du réticulum ou qui sont transloquées du cytoplasme à la surface de celui-ci. L'élévation de calcium intracellulaire provoque l'activation et le déplacement des calpaines au réticulum où elles activent la caspase-12 en la clivant au niveau de sa région N-terminale (Nakagawa & Yuan, 2000). La caspase-7 cytosolique, transloquée à la surface du réticulum, peut également cliver la caspase-12 au niveau de son pro-domaine pour initier son activation (Rao *et al.*, 2001). La caspase-12, possède un domaine CARD à travers lequel la caspase-9 et Apaf-1 interagissent pour former l'apoptosome qui permet l'activation de la caspase-3, menant à l'apoptose (Nakagawa *et al*., 2000). La caspase-12, induit dans le cas du stress du réticulum une mort cellulaire indépendante du cytochrome *c*. La caspase-12 n'existant pas dans les cellules humaines, on peut alors suspecter la participation d'autres caspases comme la caspase-4 et la caspase-5. En effet, très récemment, la caspase-4 a été localisée au niveau du réticulum et activée par un stress du réticulum (Hitomi *et al.*, 2004).

CHOP/GADD153 (*C/EBP Homologous Protein-10/Growth Arrest- and DNA Damage-inducible genes*) est un facteur de transcription b-ZIP qui induit l'expression des gènes favorisant l'apoptose en réponse à un stress du réticulum (Ron, 2002). L'activation prolongée d'UPR mène à l'expression du facteur de transcription ATF4 à travers la voie PERK-eIF2α. ATF4 induit l'expression de CHOP, qui active la caspase-3 par des intermédiaires inconnus (Harding *et al.*, 2000b ; Ma *et al.*, 2002).

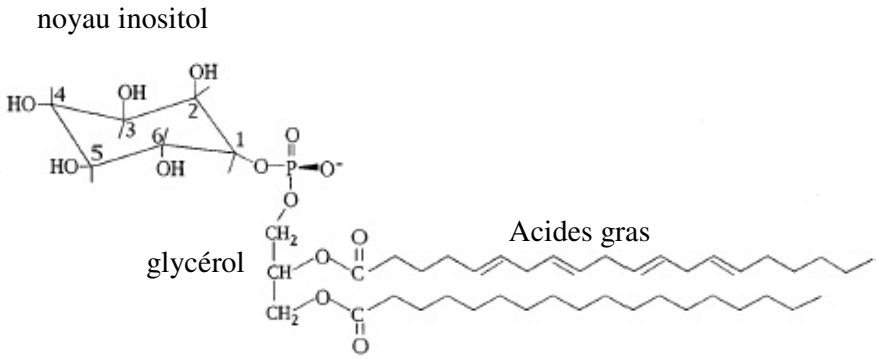
GADD34 fait partie d'une boucle de régulation négative qui peut jouer un rôle important en permettant à la traduction de se remettre en route. En effet, la protéine GADD34 se lie à la sous-unité catalytique de la protéine phosphatase 1 (PP1c) et la dirige vers eIF2α, favorisant la déphosphorylation d'eIF2α.

V. LA VOIE DE SIGNALISATION PI3-K/c-Akt

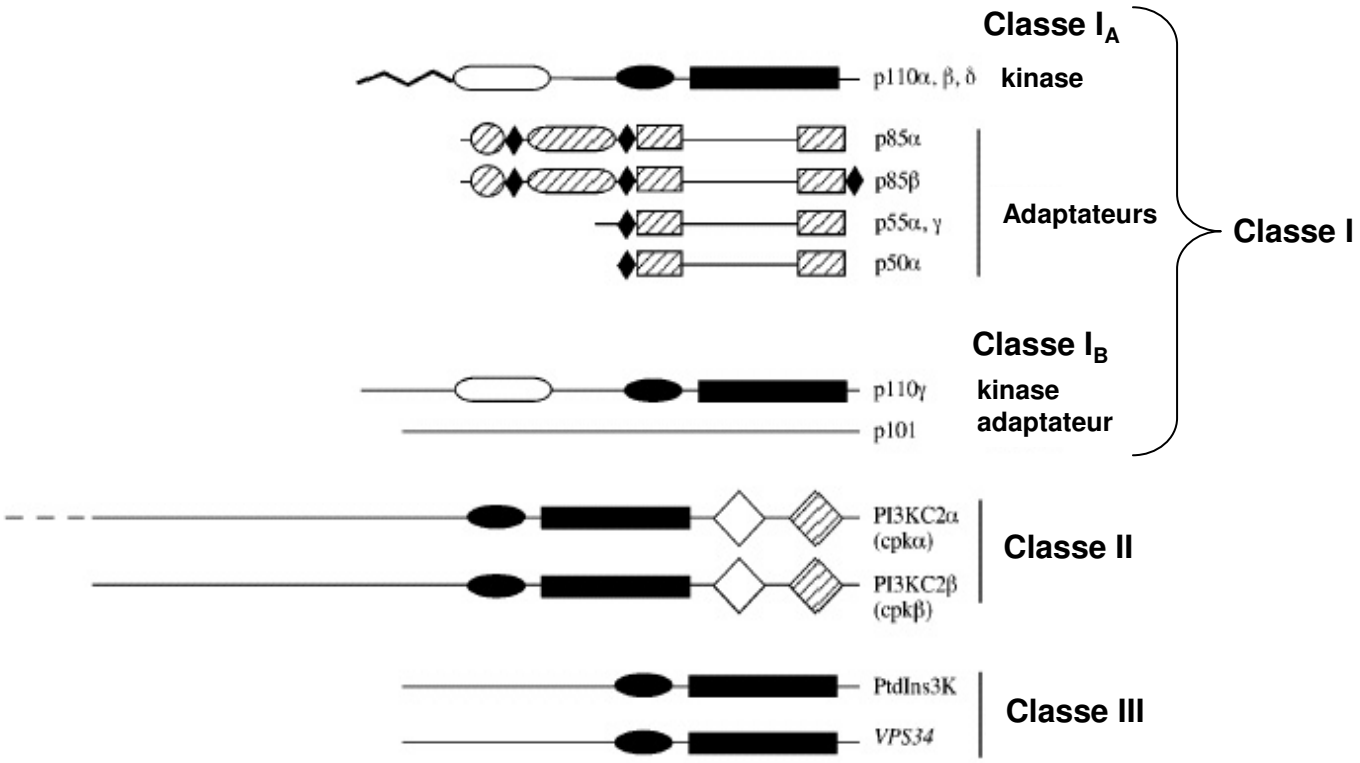
Durant l'ontogenèse, un grand nombre de cellules meurt par un processus apoptotique. L'induction de la mort cellulaire intervenant au cours de l'ontogenèse est un processus hautement régulé et qui peut être supprimé par une grande variété de stimuli extracellulaires. Les différentes études sur les facteurs favorisant la survie, ont mené à la découverte d'une voie importante: la voie PI3-K/c-Akt. En effet, plusieurs cibles de la voie de signalisation PI3-K/c-Akt soulignent la capacité de cette voie régulatrice à promouvoir la survie. Ces substrats incluent, entre autres, Bad et la capase-9, deux éléments importants de la cascade apoptotique, les facteurs de transcription de la famille Forkhead et une kinase IKK (*IKappaB Kinase*) qui régule le facteur de transcription NF-κB.

1. Les PI3-kinases

Les phosphatidylinositols (Figure 41) sont des précurseurs pour des seconds messagers dans les voies de transduction du signal couplées à des récepteurs membranaires. Une activité phosphatidylinositol kinase a été découverte pour phosphoryler le groupe hydroxy en position D3 de l'inositol des phosphatidylinositols. Cette kinase est la phosphoinositide-3-kinase (PI3-K). Les PI3-kinases sont une famille ubiquitaire d'enzymes présentes dans une grande varietés d'espèces.



<u>Figure 41:</u> Structure chimique du phosphatidylinositol.
Les hydroxyls en position 2 à 6 du noyau inositol sont libres. Ils peuvent donc être phosphorylés et générés différents phosphatidylinositols.



<u>Figure 42:</u> Caractéristiques structurales des membres de la famille PI3 kinase
Trois classes de PI3K ont été définies, la classe I qui est subdivisé en fonction de la sous-unité régulatrice associée, la classe II et la classe III.
Les domaines protéiques sont représentés de la manière suivante: le domaine catalytique (rectangle noir), domaine PIK (ovales noirs), le domaine de liaison à ras (ovales blancs), le domaine d'homologie rhoGAP (ovales hachurés), le domaine SH2 (rectangles hachurés), le domaine SH3 (cercles hachurés), les motifs riches en proline (losanges noirs), le domaine C2 (losanges hachurés), domaine PX (losanges blancs), et la région d'interaction avec p85 pour les enzymes de classe IA (pointillé).

Les PI3-K sont donc des enzymes qui catalysent le transfert d'un groupe γ-phosphate de l'ATP à la position D3 du noyau inositol d'un phosphatidylinositol. Chez les mammifères, huit PI3-kinases ont été identifiées.

En se basant sur leur spécificité de substrats *in vitro*, leur homologie de séquence et leur mode de régulation, les PI3-K peuvent être classées en trois classes: les PI3-K de classe I, les PI3-K de classe II et les PI3-K de classe III (Figure 42).

a. PI3-K de classe I

Les PI3-K de classe I sont des hétérodimères d'approximativement 200 kDa, composés d'une sous-unité catalytique de 110-120 kDa (p110α, p110β et p110δ) et d'une sous-unité adaptatrice de 50-100 kDa (Tableau 7). Elles sont capables de phosphoryler *in vitro*, le phosphatidylinositol, le phosphatidylinositol-4-monophosphate, le phosphatidylinositol-(4,5)-diphosphate. *In vivo*, le substrat privilégié des PI3-K de classe I semble être le phosphatidylinositol-(4,5)-diphosphate. Les isoformes p110α et β sont distribuées dans tous les tissus alors que l'isoforme p110δ possède une distribution plus restreinte et est principalement présente dans les leucocytes (Vanhaesebroeck *et al.*, 1997). L'activation des PI3-K de classe I est sous le contrôle d'une signalisation extracellulaire via des récepteurs avec une activité tyrosine kinase intrinsèque, des récepteurs couplés à une src-like tyrosine kinase ou des récepteurs couplés à une protéine G. Chacune des PI3-K de classe I est constituée par une région N-terminale qui interagit avec la sous-unité régulatrice, un domaine qui lie la petite protéine G ras, un « domaine PIK » (PIK: *PI-kinase region*) homologue à une région trouvée dans d'autres phosphoinositides kinases, et un domaine catalytique C-terminal (Anderson & Jackson, 2003). Les rôles cellulaires des PI3-K de classe I sont divers, avec une implication dans la régulation de la taille de la cellule, de sa motilité, dans la survie et la prolifération en réponse à de nombreux systèmes de signalisation dans des types cellulaires différents. Selon la protéine adaptatrice impliquée, les PI3-K de classe I peuvent être divisées en deux groupes: PI3-K de classe IA et PI3-K de classe IB.

Classe	Sous-Unités		Régulation	Substrats Lipidiques	
	Catalytiques	Adaptatrices		*in vitro*	*in vivo*
I					
A	p110α, β, δ	p85α p85β p55γ	Tyrosines kinases et ras Protéines G hétérotrimériques et ras	PI PIP PIP_2	PIP_2
B	p110γ	p101			
II	PI3K-C2α, β, δ	?	Tyrosine kinases ? Protéines G hétérotrimériques ? Pas ras	PI PIP PIP_2	?
III	Vps34p Analogues	p150	Constitutive ?	PI	PI

<u>Tableau 7:</u> Les différentes classes de PI3K et leurs caractéristiques: sous-unités, régulation, substrats
PI: phosphatidylinositol, PIP: phosphatidylinositol-(4)-monophosphate, PIP2: phosphatidylinositol-(4,5)-diphosphate.

⌘ PI3-K de classe IA

Les PI3-K de classe IA sont constitutivement associées avec une sous-unité régulatrice de 50-85 kDa dont p85 est le prototype. p85 est composé, de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale, d'un domaine SH3 (*Src Homology 3*), d'un domaine BH *(Breakpoint-cluster-region Homology*) flanqué par deux régions riches en proline et de deux domaines SH2 (*Src Homology 2*) espacés par une région iSH2 (*inter-SH2*) (Escobedo *et al.*, 1991). C'est ce domaine iSH2 qui participe à la liaison de p85 à la sous-unité catalytique. Il a tout d'abord été identifié deux gènes p85α (Escobedo *et al.*, 1991 ; Otsu *et al.*, 1991), et p85β (Otsu *et al.*, 1991), qui répondent à la structure précédemment décrite. Le gène p85α peut donner plusieurs variants par splicing, deux d'entre eux codent de plus petites protéines: p50α et p55α (Inukai *et al.*, 1997). Ces protéines possèdent une séquence N-terminale de 6 et 35 acides aminés respectivement et la séquence C-terminale de p85 incluant le second motif riche en proline, les domaines SH2, et le domaine iSH2. Un troisième gène, p55γ code une protéine qui possède une structure similaire à p55α (Pons *et al.*, 1995). p85α, p85β et p55γ ont été proposée pour moduler l'activité PI3-K associée au substrat du récepteur à l'insuline (IRS) (Pons *et al.*, 1995 ; Inukai *et al.*, 1997).

Grâce à ces multiples domaines d'interaction avec les protéines, p85 est capable d'interagir simultanément avec plusieurs molécules de signalisation et permet ainsi l'intégration de plusieurs voies de signalisation.

⌘ PI3-K de classe IB

Une protéine avec 36% d'identité avec p110α a été désignée comme la protéine p110γ. Elle possède un domaine PIK, un domaine kinase, et un domaine de liaison à ras mais diffère en son extrémité C-terminale avec les PI3-K de classe IA. Elle n'interagit pas avec les protéines p85. p101, une sous-unité régulatrice possible pour p110γ, ne possède pas d'homologie avec les autres protéines. Les régions d'interaction entre p101 et p110γ n'ont pas encore été localisées. La PI3-Kγ est hautement exprimée dans les cellules d'origine hématopoïétique et est présente à de faibles concentrations dans l'endothélium, les cellules musculaires lisses et les cardiomyocytes. PI3-Kγ est impliquée dans les processus inflammatoires (Hirsch *et al.*, 2000) et possède un rôle dans la fonction cardiovasculaire (Crackower *et al.*, 2002).

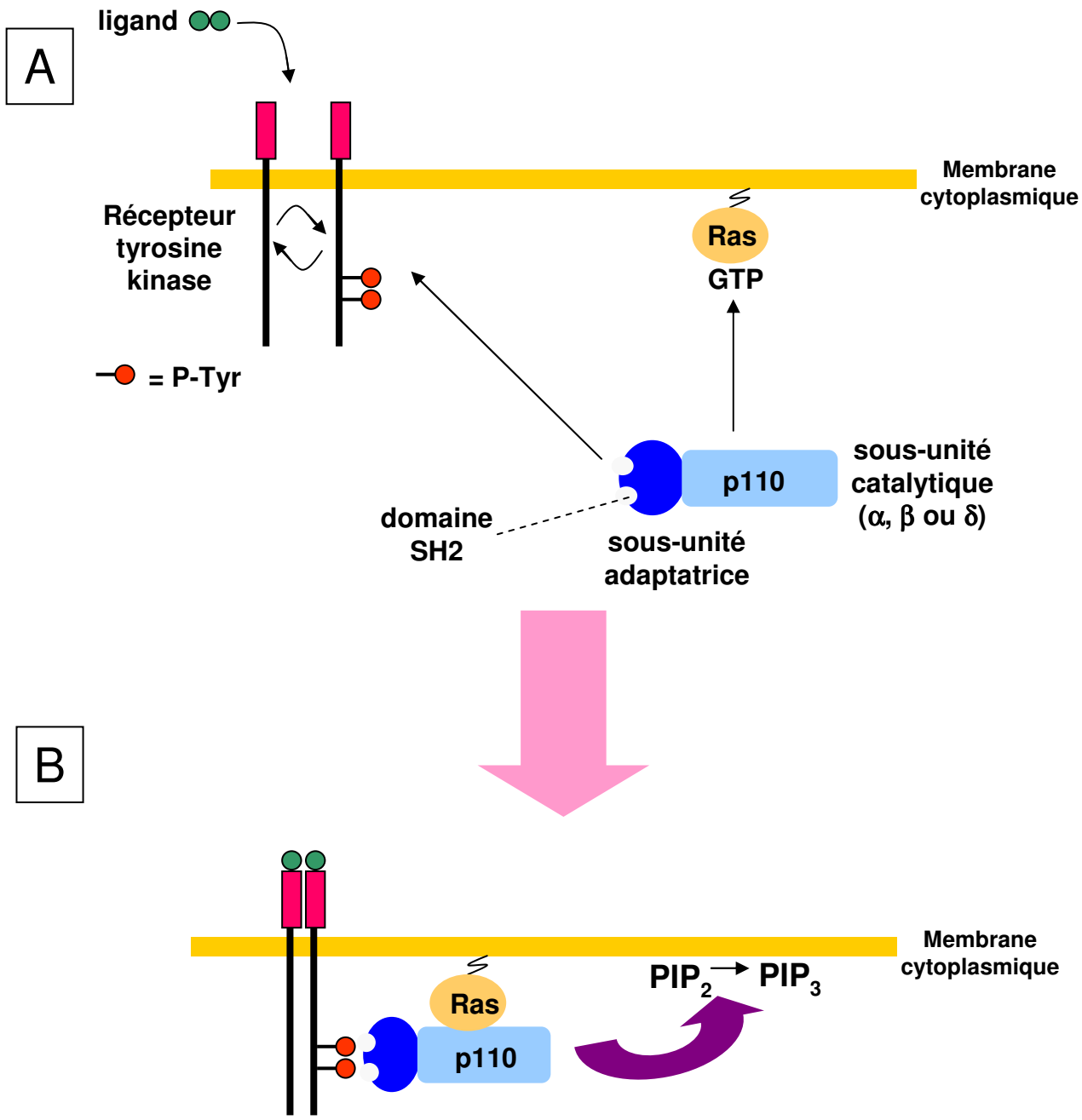


Figure 43: Recrutement et activation des PI3K de classe IA (Vanhaesebroeck & Waterfield, 1999)
A : Un récepteur avec une activité tyrosine kinase se dimérise par liaison à son ligand et se transphosphoryle, créant des sites de liaison/reconnaissance pour les domaines SH2 des PI3K de classe IA.
B : Les PI3K de classe IA sont ainsi activées et phosphorylent le phosphatidylinositol-(4,5)-diphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphate (PIP3).

⌘ **Activation et régulation des PI3-K de classe I** (Figure 43 et 44)

Toutes les sous-unités catalytiques des PI3-K de classe I possèdent une activité sérine kinase intrinsèque (p100α, p110γ, et p110δ). Les sous-unités régulatrices de PI3-K peuvent être phosphorylées par p110α sur une sérine correspondant à la sérine 608 sur la sous-unité p85α, ce qui réduit l'activité kinase des PI3-Kα. En revanche, p110δ ne phosphoryle pas les sous-unités régulatrices bien qu'il s'autophosphoryle, cette autophosphorylation régule aussi négativement l'activité enzymatique de la PI3-K (Vanhaesebroeck *et al.*, 1997). p110γ s'autophosphoryle également mais aucune modification de l'activité enzymatique n'a été mise en évidence de manière concluante (Stoyanova *et al.*, 1997).

Les PI3-K de classe IA sont régulées par interaction avec la petite protéine G ras. De nombreux signaux extracellulaires activent ras en agissant sur le ratio GTP/GDP. En retour, ras-GTP interagit avec de nombreux effecteurs. p110α a été montré comme étant un effecteur de ras: son activité est augmentée *in vitro* et *in vivo* par ras-GTP, (Rodriguez-Viciana *et al.*, 1994 ; Rodriguez-Viciana *et al.*, 1997 ; Khwaja *et al.*, 1997).

Les activités et les localisations subcellulaires des sous-unités catalytiques des PI3-K de classe IA peuvent aussi être régulées par les protéines p85. Les PI3-K de classe IA sont transloquées au niveau de la membrane par liaison des domaines SH2 de p85 aux motifs pYXXM (Y: tyrosine, M: méthionine) de tyrosine kinase de récepteur ou de leurs substrats. Cette translocation n'est pas suffisante pour activer les PI3-K. La liaison de phosphotyrosines, présentes au niveau de certaines protéines, aux domaines SH2 de p85 stimule l'activité lipide kinase des PI3-K (Carpenter *et al.*, 1993b). Les domaines SH3 sont connus pour interagir avec des séquences riches en proline possédant la séquence consensus φ-P-p-φ-P (P: proline ; p: proline faiblement conservée ; φ: acide aminé aliphatique) (Sparks *et al.*, 1996). Les motifs riches en proline de p85α réalisent la liaison avec les domaines SH3 des kinases de la famille src incluant src, lck, lyn, et fyn. Le domaine SH3 de la tyrosine kinase cytoplasmique abl s'associe aussi avec p85α. Les domaines riches en proline de p85β divergent considérablement en séquence par rapport à ces mêmes régions chez p85α. p85β peut ainsi sélectionner un ensemble différent de protéines ayant des domaines SH3 *in vivo.*

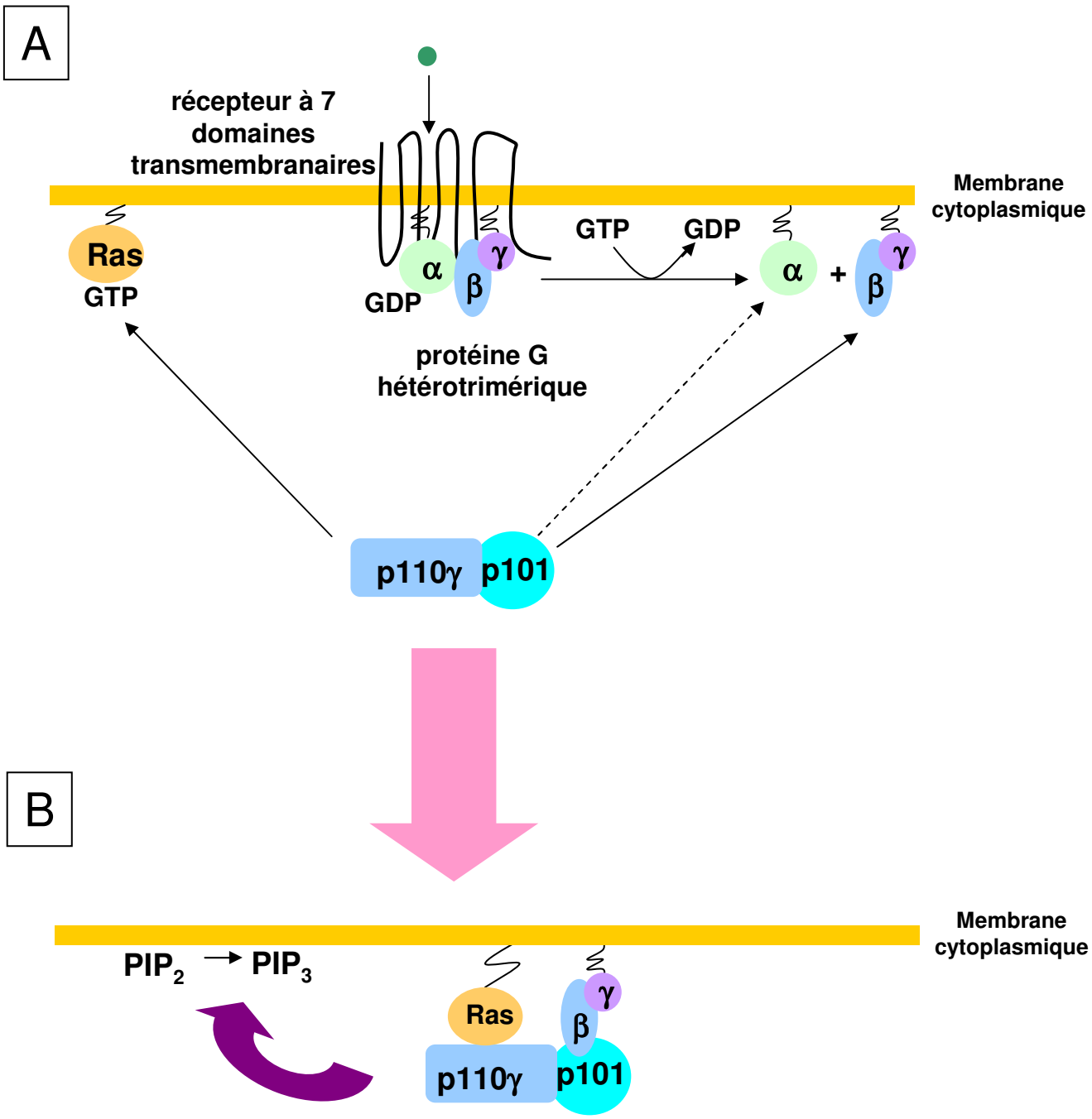


Figure 44: Recrutement et Activation des PI3K de classe IB (p110γ) (Vanhaesebroeck & Waterfield, 1999).
A : Les protéines G hétérotrimériques sont constituées de sous-unités α, β et γ, avec la sous-unité α liant soit le GDP, soit le GTP. Sous la forme liée au GDP, la sous-unité α interagit avec les deux autres sous-unités pour former un héterotrimère inactif qui se lie à des récepteurs à 7 domaines transmembranaires. La liaison du ligand au niveau de ces récepteurs induit un changement conformationnel qui résulte dans un échange entre GDP et le GTP sur la sous-unité α, induisant sa dissociation du récepteur et des sous-unités βγ.
B : Les sous-unités Gα et Gβγ peuvent interagir avec et moduler l'activité de leurs protéines cibles comme la p110γ.

Les PI3-K de classe IB (p110γ) sont activées directement par les sous-unités βγ des protéines G (Krugmann *et al.*, 1999 ; Stephens *et al.*, 1997). L'activation des protéines Gαβγ hétérotrimériques par échange du GDP lié à la sous-unité α par du GTP mène à la dissociation de la sous-unité Gα liée au GTP des sous-unités Gβγ. Les sous-unités libres Gβγ se lient et activent p110γ par un mécanisme qui est stimulé par une autre protéine régulatrice p101 (Krugmann *et al.*, 1999 ; Stephens *et al.*, 1997). p110γ peut également être activée par ras-GTP en synergie avec Gβγ.

⌘ Régulation négative de la signalisation PI3-K

Deux voies majeures de dégradation du produit de la PI3-K, le phosphatidylinositol(3,4,5)-triphosphate, ont été décrites: celle favorisant sa déphosphorylation par **PTEN** (*Phosphatase and TENsin homologue deleted from chromosome 10*) et celle favorisant sa déphosphorylation par **SHIP** (*145-kDa SH2-containing Inositol (poly)phosphate 5-Phosphatase*).

PTEN, également appelé MMAC1 (*Mutated in Multiple Advanced Cancers*) ou TEP1 (*TGFβ-regulated and Epithelial cell-enriched Phosphatase*), est un gène suppresseur de tumeur muté/délété dans une grande variété de tumeurs humaines. PTEN est normalement une protéine cytosolique, l'activation de PTEN implique nécessairement un recrutement au niveau de la membrane plasmique. PTEN est préférentiellement dirigé vers la membrane plasmique plutôt qu'au niveau de la membrane nucléaire à cause du contenu en lipides anioniques de la membrane plasmique (Das *et al.*, 2004). Les cellules sans PTEN ont des niveaux élevés de PI-(4,5)P_2 et de PI(3,4,5)P_3 et possèdent une activation constitutive des voies de signalisation de PI3-K médiée par les tyrosines kinases de la famille Tes (Shan *et al.*, 2000), la sérine/thréonine kinase Akt (Stambolic *et al.*, 1998), et Rac/Rho GTPase (Liliental *et al.*, 2000). PTEN contribue à la régulation du cycle cellulaire en bloquant l'entrée des cellules en phase S et par régulation positive de $p27^{Kip1}$ qui est recrutée par le complexe cycline E/cdk2. PTEN module aussi la migration cellulaire et la motilité en régulant la voie ERK-MAPK et en déphosphorylant la FAK (*Focal Adhesion Kinase*) (Hlobilková *et al.*, 2003).

SHIP est également un modulateur des taux de PI(3,4,5)P_3. SHIP a été montré comme étant un régulateur négatif de l'activation d'Akt/PKB médiée par un récepteur au facteur de croissance et de la survie des cellules myéloïdes. La perte de SHIP résulte en une réponse immune non-régulée et le dérèglement de l'homéostasie immunitaire résultant est très important dans le développement de l'autoimmunité (Helgason *et al.*, 1998).

Il a également été démontré qu'une protéine kinase spécifique de sérine/thréonine est physiquement associée avec PI3-K. Cette activité phosphoryle la sous-unité p85 et inhibe de manière réversible l'activité PI3-K. Le nom de phosphatidylinositol-3-kinase kinase (PIK kinase) a été suggéré pour cette activité (Carpenter *et al.,* 1993c).

⌘ Fonctions biologiques des PI3-K de classe I

A travers le developpement et l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques (comme la wortmannin et le LY294002), la PI3-kinase et ses produits ont été montrés comme jouant un rôle pivot dans divers processus cellulaires comme la croissance cellulaire, le traffic des vésicules, la réorganisation du cytosquelette, l'adhésion cellulaire, la production de superoxides et le transport du glucose (Katso *et al.,* 2001 ; Vanhaesebroeck *et al.,* 2001).

Les fonctions biologiques attribuées à la PI3-kinase sont assurées par ses produits lipidiques à travers des interactions spécifiques avec des protéines effectrices. En effet, la majorité des évenements connus dépendants de la PI3-kinase peut être expliquée, en partie, à travers l'identification et la caractérisation des protéines qui lient de manière spécifique les produits lipidiques de la PI3-kinase. Un grand nombre de ces protéines de liaison aux lipides possède des domaines spécifiques qui sont spécialisés dans la liaison aux phosphoinositides, incluant le domaine PH, les domaines FYVE, ENTH (*Epsin N-Terminal Homology*), et « *phox homology* » (Itoh & Takenawa, 2002). La stimulation des évènements en aval est initiée par le recrutement à la membrane des protéines se liant aux PIP(3,4,5)P_3. Deux protéines effectrices, bien caractérisées, sont la tyrosine kinase Bruton (tyrosine kinase non-récepteur de la famille Tec, exprimée dans la plupart des tissus hématopoïétiques) et la protéine kinase B, impliquées dans le développement des cellules B et la survie cellulaire respectivement.

Suivant la distribution, la régulation et la spécificité de substrat de chaque isoforme, il est probable que les PI3-kinases puissent jouer des rôles distincts lors de différents événements dépendants de la PI3-kinase.

⌘ Applications médicales et industrielles possibles

Des études ont montré l'implication de la PI3-kinase dans un grand nombre de conditions pathologiques incluant le cancer, l'inflammation, la restènose vasculaire et le diabète (Katso *et al.,* 2001). Par exemple, un grand nombre de gènes suppresseurs de tumeurs et d'oncogènes associés avec la tumorigènese sont des composants des réseaux de signalisation cellulaire qui utilisent la

PI3-kinase. Par exemple, le gène suppresseur de tumeur PTEN, qui déphosphoryle PIP(3,4,5)P_3 pour antagoniser la PI3-kinase, est présent dans un grand nombre de cancers.

Avec l'implication des PI3-kinases de classe I dans des rôles centraux de signalisation pour les réponses cellulaires, comme la migration, la croissance cellulaire et la survie, le développement des cellules T et B, et la signalisation de l'insuline, l'inhibition de ces voies peut fournir de nouveaux modes de traitement pour le cancer, les maladies prolifératives et l'inflammation.

Les différentes isoformes ayant des fonctions spécialisées, le but est, maintenant, de développer des inhibiteurs spécifiques des isoformes qui pourront cibler des systèmes de transduction du signal de manière précise, fournissant un bénéfice thérapeutique en minimisant les effets collatéraux.

b. PI3-K de classe II

Les PI3-K de classe II sont des protéines de 170-210 kDa ayant une spécificité restreinte aux phosphatidylinositol et phosphatidylinositol-4-monophosphate. Aucune sous-unité adaptatrice n'a été mise en évidence et leur mode d'activation reste indéterminé. Les PI3-K de classe II peuvent être subdivisées en trois groupes: PI3-K-IIα, β et γ. PI3-K-IIα et β sont présentes de manière ubiquitaire alors que PI3-K-IIγ est principalement présente dans le foie. Contrairement aux PI3-K de classe I qui sont principalement cytosoliques, les PI3-K de classe II sont associées de manière prédominante avec la fraction membranaire des cellules, membranes plasmiques, membranes intracellulaires et même avec le noyau (Arcaro *et al.*, 1998, Fry, 2001). Elles contiennent un domaine PIK et un domaine catalytique avec 40-50% de similarité par rapport au PI3-K de classe I. Les PI3-K de classe II ont aussi été appelées PI3-KC2 car elles possèdent un domaine C2 dans la région C-terminale. Ce domaine C2 peut lier *in vitro* les phospholipides d'une manière indépendante du calcium (Acaro *et al.*, 1998). PI3-KC2α et PI3-KC2β possèdent une séquence additionnelle appelée domaine PX. Cette classe de PI3-K ne s'associe pas avec la molécule adaptatrice p85.

c. PI3-K de classe III

Les PI3-K de classe III sont des homologues de Vps34p (*Vacuolar protein sorting mutant*) de *S. cerevisiae* (Herman & Emr, 1990 ; Schu *et al.*, 1993) et phosphorylent exclusivement le phosphatidylinositol. L'activité de Vps34p dépend de la Ser/Thr kinase Vps15p qui recrute la phosphatidylinositol kinase au niveau des compartiments golgiens (De Camilli**,** 1996). Dans toutes les espèces eucaryotes, une seule classe de sous-unité catalytique a été identifiée. Cette sous-unité catalytique existe sous forme de complexe avec p150, une Ser/Thr kinase (Panaretou *et al.*, 1997).

• Inhibiteurs de Phosphatases
Vanadate
Acide Okadaïque

• Tyrosine kinases
Angiopoiétine-1
Anticorps anti-CD28
Facteur de croissance épidermique
Facteur de croissance fibroblastique basique
Fibronectine
Gas6
Anticorps anti-intégrine
Interleukine -2,-3,-4,-5 et -8
Insuline
Facteur de croissance Insuline-like
Anticorps anti-killer cell inhibitory receptor
Facteur leukemia inhibitory
N-methyl-D-aspartate (NMDA)
Facteur de croissance dérivé des plaquettes
Facteur des cellules souches
Facteur de croissance endothélial vasculaire

• Stimuli régulant les récepteurs couplés aux protéines G
Bradykinine
C5a
Carbachol
Endothéline
GROalppha (*Growth-related oncogene alpha*)
fMet-Leu-Phe
(micro)Opioïdes
Facteurs activant les plaquettes
RANTES (*Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted*)

• Autres activateurs
Toxine Pertussis
Zinc
Sphingosine-1-phosphate
Hypoxie
Nitroprussiate de sodium
H_2O_2
Choc thermique
Force de cisaillement
TNFalpha (Tumor Necrosis Factor)
Cadmium

Figure 45 : Liste des différents stimuli activant la protéine kinase B (PKB/Akt)

Les PI3-K de classe III seraient impliquées dans des trafics intracellulaires divers incluant l'autophagie (Kihara *et al.* 2001), la formation du phagosome (Vieira *et al.*, 2001), la formation de vésicules à l'intérieur des endosomes multilamellaires (Futter *et al.*, 2001), et le transport à la membrane nucléaire (Roggo *et al.*, 2002).

2. c-Akt

c-Akt est l'homologue cellulaire de l'oncogène transformant du rétrovirus AKT8 (Staal *et al.*, 1987). Des analyses moléculaires révèlent que v-Akt résulterait d'une recombinaison entre les séquences virales *gag* et le gène cellulaire Akt, donnant naissance à une protéine de fusion gag-c-Akt. Au moment même de la mise en évidence de c-Akt, la protéine kinase Bα (PKBα) et la protéine α en relation avec les protéines kinases A et C (RAC-PKα), ont été clonées (Coffer & Woodgett, 1991). c-Akt1, PKBα et RAC-PKα sont codées par le même gène, qui sera nommé Akt. Deux membres supplémentaires de la famille Akt ont aussi été identifiés: c-Akt2/PKBβ/RAC-PKβ et c-Akt3/RAC-PKγ.

a. Structure

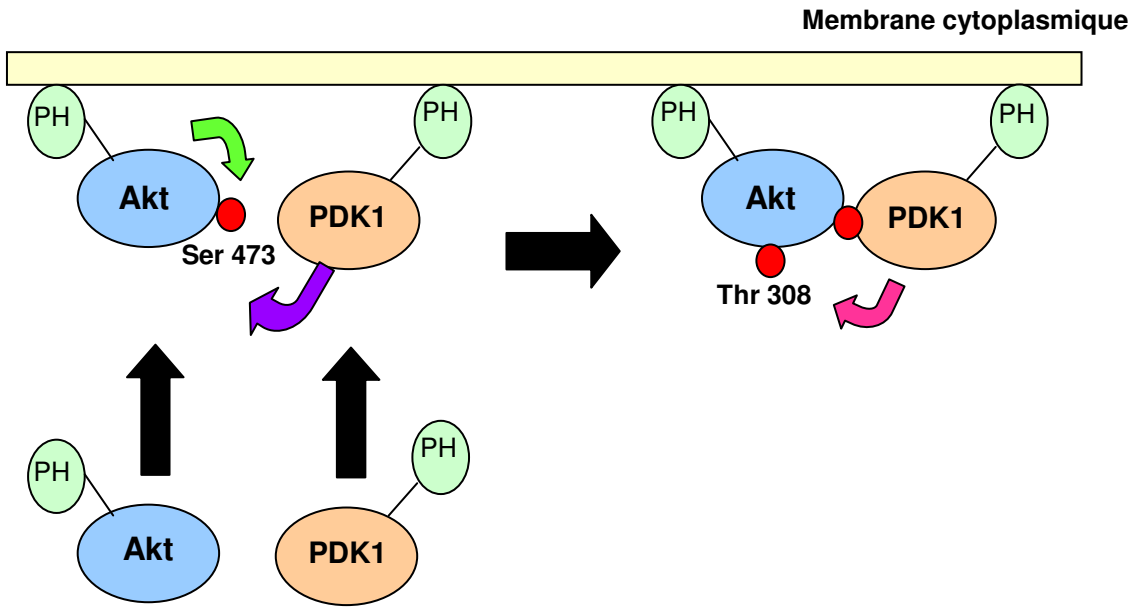
Les protéines de la famille Akt possèdent un domaine kinase central avec une spécificité pour les résidus sérine ou thréonine de leurs protéines substrats (Coffer & Woodgett, 1991). L'extrémité amino-terminale inclut un domaine d'homologie pleckstrine (PH), qui permet les interactions protéine/protéine et/ou protéine/lipide. L'extrémité carboxy-terminale est constituée par un domaine riche en proline et hydrophobe.

Quatre sites de phosphorylation ont été identifiés: la sérine 124, la thréonine 308, la thréonine 450 et la sérine 473. La thréonine 450 et la sérine 124 sont phosphorylées de manière constitutive tandis que la sérine 473 et la thréonine 308 sont phosphorylées de manière inductible.

La structure primaire de c-Akt est conservée au cours de l'évolution à l'exception de l'extrémité carboxy-terminale qui est présente dans certaines espèces et isoformes.

b. Activation

c-Akt est présente, dans le cytoplasme des cellules normales, sous une forme non phosphorylée et inactive. Un certain nombre de stimuli peut activer c-Akt (Figure 45). Lors de son activation, c-Akt est recrutée au niveau membranaire par l'intermédiaire des phosphatidylinositols (3,4)-diphosphate et (3,4,5)-triphosphate. Ce recrutement intervient grâce à l'affinité de ces



<u>Figure 46:</u> Modèle d'activation de c-Akt (Scheid *et al.*, 2002)
Les lipides générés par PI3-K recrutent c-Akt à la membrane plasmique où la phosphorylation de la sérine 473 se produit par autophosphorylation ou par intervention d'une kinase exogène tel que PDK1. Ceci permet la phosphorylation de la thréonine 308 par PDK1 ce qui active alors entièrement c-Akt.
PDK1 : *3'Phosphoinositide-regulated Kinase* ; PH : domaine d'homologie à la pleckstrine.

phosphatidylinositols pour le domaine PH de c-Akt. Cette liaison du domaine PH avec les phosphatidylinositols entraîne un changement de conformation de c-Akt, ce qui permet à certaines kinases de phosphoryler c-Akt (Stokoe *et al.*, 1997 ; James *et al.*, 1996). Cette translocation est importante pour l'activation de c-Akt. L'activité PI3-kinase est donc requise pour la translocation de c-Akt, à la membrane plasmique, où son activation se produit (Andjelkovic *et al.*, 1997). En effet, v-Akt, localisée de manière permanente au niveau de la membrane par la séquence gag virale, présente une activité kinase constitutive (Franke *et al.*, 1995). c-Akt est également constitutionnellement active quand elle est spécifiquement ciblée à la surface interne de la membrane plasmique (Kohn *et al.*, 1996).

Deux résidus de c-Akt sont rapidement phosphorylés: la thréonine 308 et la sérine 473. La thréonine 308 est phosphorylée par PDK-1 (*3'Phosphoinositide-regulated Kinase*). La phosphorylation de la sérine 473 reste mal comprise, en effet plusieurs kinases pourraient jouer un rôle dans sa phosphorylation. Ces kinases incluent PDK-1 lié à PRK-2, ILK (*Integrin-Linked Kinase*), MAPKAPK2 (*MAPK-Activated Protein Kinase 2)*, RSK *(Ribosomal protein S6 Kinase*) et NEK6 (*NIMA-related protein Kinase-6*). Il a également été décrit que la sérine 473 pourrait être autophosphorylée ou phosphorylée par une PKB Ser473 kinase, associée à des domaines membranaires particuliers les rafts (Hill *et al.*, 2002).

Plusieurs modèles d'activation de c-Akt ont été mis en évidence. Tous ont pour facteur initiateur le recrutement au niveau membranaire de c-Akt. Quelques divergences existent pour les étapes suivantes de l'activation. Scheid *et al.* (2002) ont établi pour l'activation de c-Akt, dans les cellules HEK (*Human Epithelial Kidney*), le modèle d'activation suivant (Figure 46): c-Akt est tout d'abord recrutée au niveau de la membrane plasmique par l'interaction entre le domaine PH et les phosphatidylinositols, précédemment cités, puis c-Akt s'autophosphoryle sur la sérine 473 où une kinase intervient pour phosphoryler ce site, ce qui permet l'interaction de PDK-1 avec c-Akt et donc la phosphorylation sur la thréonine 308.

Une fois activée, c-Akt se détache de la membrane et en retour phosphoryle ses substrats cytosoliques et nucléaires (Tableau 8).

Protéines	Espèces	Effets de la phosphorylation
BAD	Humain	Bloque l'apoptose induit par Bad
C-Raf	Humain	Inhibe l'activité de C-Raf
B-Raf	Humain	Inhibe l'activité de B-Raf
BRCA-1	Humain	Interfère avec la localisation nucléaire de BRCA-1 ?
CREB	Humain	Augmente l'association avec CBP et p130
eNOS	Humain	Active eNOS et conduit à la production de NO
FKHRL1	Humain	Inhibe l'activité transcriptionnelle de FKHRL1
GSK-3α	Humain	Inactive l'activité GSK-3
GSK-3β	Humain	Inactive l'activité GSK-3
I-κB kinase α	Humain	Active l'activité transcriptionnelle de NF-κB
IRS-1	Souris	Protège IRS-1 de l'action de PYPase
mTOR	Souris	Inhibe l'activité mTOR
PDE-3B	Souris	Inactive PDE-3B
PFK-2	Bovine	Active PFK-2
Rac1	Humain	Inhibe la liaison Rac1-GTP
hTERT	Humain	Augmente l'activité téléomérase
p21CIP1	Humain	Induit la localisation cytoplasmique de p21CIP1
Nur77	Humain	Inhibe l'activité transcriptionelle de Nur77

Tableau 8 : **Liste des substrats connus d'Akt** (Brazil & Hemmings, 2001)

Un autre site de phosphorylation pouvant intervenir dans la régulation de l'activation de c-Akt a été mis en évidence. En effet, la mutation de deux tyrosines à côté de la boucle d'activation de c-Akt inhibe complètement son activité kinase induite par des facteurs de croissance. Ces deux résidus tyrosyls sont conservés chez de nombreuses Ser/Thr kinases et la phosphorylation des résidus correspondants Tyr^{512} et Tyr^{523} de PKCδ a été montré comme pouvant être critique pour l'activation de PKCδ en réponse à H_2O_2 (Konishi *et al.*, 2001), suggérant que la phosphorylation de ces deux tyrosines peut être un mécanisme général par lequel ces kinases sont régulées. Les kinases de la famille Src peuvent être requises pour l'activation de c-Akt en réponse à des facteurs de croissance chez certaines cellules. Ceci met en évidence un nouveau mode d'activation dans le cas de facteurs de croissance : 1) translocation à la membrane plasmique par liaison aux phospholipides produits par la PI3-kinase, 2) phosphorylation de la thréonine 308 et de la sérine 473, 3) phosphorylation des tyrosines 315 et 326 (Chen *et al.*, 2001).

Un autre résidu tyrosyl, la tyrosine 474, a également été mis en évidence comme étant un site régulateur pour c-Akt. *In vivo*, dans des cellules COS, la mutation de la sérine 473 ou de la tyrosine 474 réduit la phosphorylation de la thréonine 308 et l'activation de la kinase (Marmy Conus *et al.*, 2002).

Une nouvelle protéine, la protéine Ft1, interagit directement avec c-Akt, augmentant la phosphorylation de deux de ces sites régulateurs en favorisant son interaction avec PDK-1 (Remy & Michnick, 2004).

Certains stimuli de survie activent c-Akt par des mécanismes qui ne font pas intervenir la PI3-K. Certains signaux cellulaires provoquent une augmentation en calcium, qui peut se lier à la calmoduline pour former un complexe calcium/calmoduline. Ce complexe active les CaMKK (*Calcium/calmodulin dependent Kinase Kinase*) qui activent c-Akt en phosphorylant directement c-Akt sur la thréonine 308 (Yano *et al.*, 1998). Un autre mécanisme indépendant de la PI3-K implique ILK1 qui phosphorylerait c-Akt sur la sérine 473 (Franke *et al.*, 2003).

Les HSPs peuvent jouer un rôle dans la protection de c-Akt en protégeant cette dernière de la dégradation médiée par le protéasome.

c. Substrats et fonctions

Différentes études ont permis de mettre en évidence un certain nombre de substrats pour la voie PI3-K/c-Akt (Tableau 8) et ses nombreux rôles dans divers processus physiologiques et pathophysiologiques. Le motif minimum pour la phosphorylation des substrats par c-Akt est Arg-Xaa-Arg-Yaa-Zaa-Ser/Thr-Hyd, Xaa est un acide aminé quelconque, Yaa et Zaa sont préférentiellement des petits résidus autre que la glycine, et Hyd est un résidu hydrophobe encombrant comme la leucine ou la phénylalanine (Alessi *et al.*, 1996).

Le premier substrat cellulaire de c-Akt qui a été décrit est GSK-3 (*Glycogen Synthase Kinase 3*), enzyme du métabolisme du glucose. Cette protéine kinase est constitutionnellement active dans les cellules non stimulées et phosphoryle de nombreuses protéines (glycogène synthase, c-Myc, et cylcine D) ce qui provoque leur inactivation ou favorise leur dégradation. La phosphorylation de GSK3 par c-Akt inhibe l'activité catalytique de cette enzyme ce qui résulte dans l'activation des voies qui sont normalement reprimées par GSK3. c-Akt peut également induire la consommation de glucose en induisant la translocation de GLUT4 (*GLUcose Transporter* 4) au niveau de la membrane plasmique et en augmentant les taux de GLUT1 (Kohn *et al.*, 1996).

Des expériences sur des neurones ont démontré que la privation en sérum ou en facteur de croissance comme IGF-1 induit une apoptose rapide des cellules. La voie de survie médiée par les facteurs de croissance requiért une activité PI3-K et implique c-Akt. c-Akt occuperait un rôle central dans la voie de survie neuronale médiée par IGF-1, ce qui suggère une implication d'Akt/PKB dans des pathologies cérébrales incluant des préjudices induits par hypoxie/ischémie et les désordres dégénératifs (Dudek *et al.*, 1997).

La fonction anti-apoptotique de la signalisation c-Akt/PKB passe par la protéine BAD, qui a été montré comme étant régulée par phosphorylation dans les cellules hématopoïétiques en réponse à un ligand comme l'interleukine-3, un événement qui inhibe sa fonction pro-apoptotique (del Peso *et al.*, 1997). BAD a été montré comme étant phosphorylée sur le résidu sérine 136 par c-Akt/PKB et cette phosphorylation, stimulée par des ligands comme IGF-1, prévient la mort cellulaire induite par BAD (del Peso *et al.*, 1997 ; Datta *et al.*, 1997).

c-Akt/PKB peut également phosphoryler et inactiver la famille de facteurs de transcription Forkhead (Brunet *et al.*, 1999). La phosphorylation médiée par c-Akt/PKB des protéines Forkhead apparaît comme régulant leur distribution cellulaire : les protéines Forkhead phosphorylées sont maintenues dans le cytosol, potentiellement liées aux protéines 14-3-3 et sont ainsi incapables de médier la transcription (Brunet *et al.*, 1999 ; Brownawell *et al.*, 2001).

La prolifération des cellules musculaires lisses joue un rôle critique dans la formation de la chape fibreuse et la stabilité de la plaque, où des évênements toxiques sont potentiellement impliqués dans la formation du cœur nécrotique et la rupture de la plaque. Les LDLox exercent des des effets biologiques variés potentiellement impliqués dans le développement de l'athérosclérose. La prolifération des cellules musculaires lisses induite par les LDLox implique l'activation de la voie céramide/sphingomyéline. Des études ont montré l'implication de la PI3-kinase dans la prolifération des macrophages induite par les LDLox (Martens *et al.*, 1998). Dans des cellules musculaires lisses de lapin, l'activation de la voie PI3-kinase/c-Akt par les LDLox se produit en coopération avec la voie céramide/sphingomyéline durant la prolifération des cellules musculaires lisses induite par les LDLox (Auge *et al.*, 2002). Dans des cellules musculaires lisses de rat, l'effet mitogénique des LDLox est en partie médiée par l'activation de la voie PI3-K/c-Akt/MEK/MAPK (Chien *et al.*, 2003).

La diversité des substrats et la vitesse à laquelle ils ont été découverts soulignent le rôle extrêmement important que la signalisation c-Akt joue dans les cellules. Cette diversité de protéines régulées montre que les substrats de c-Akt sont non seulement impliqués dans l'apoptose mais aussi dans le métabolisme, la régulation du cytosquelette et d'autres processus cellulaires variés.

d. Régulation négative

Le domaine PH de c-Akt peut agir comme un régulateur positif ou négatif de cette enzyme. Dans sa forme non-liée aux phosphatidylinositols, le domaine PH peut donner une conformation à c-Akt qui la rend inaccessible aux PDKs. Le domaine PH peut également interagir avec une protéine cellulaire qui régule négativement c-Akt et la liaison aux phosphatidylinositols nécessaire à son activation (Kandel & Hay, 1999).

La localisation subcellulaire de c-Akt peut être aussi régulée et peut fournir un mécanisme de régulation de l'activité cytoplasmique de c-Akt. La séquestration de c-Akt dans le noyau peut être un moyen de limiter l'exposition des substrats cytosoliques à la kinase et peut servir de mécanisme qui indirectement, régule négativement l'activité kinase (Kandel & Hay, 1999).

La phosphorylation de c-Akt est également régulée, et des inhibiteurs de phosphatases comme le vanadate et l'acide ocadaïque augmentent l'activité de c-Akt ce qui indique que l'enzyme est régulée négativement par déphosphorylation. Les phosphosérines et phosphotyrosines ont une demi-vie relativement courte, l'enzyme peut donc être régulée par déphosphorylation. La protéine phosphatase 2A participe principalement à la déphosphorylation de c-Akt (Kandel & Hay, 1999 ; Ugi *et al.*, 2004).

3. PDK-1

a. Structure

PDK-1 est une sérine/shréonine kinase de 63 kDa qui est exprimée ubiquitairement dans tous les tissus humains. PDK-1 est constituée d'un domaine N-terminal kinase et d'un domaine C-terminal PH. *In vitro*, son domaine PH se lie aux phosphatidylinositols (3,4)-diphosphate et (3,4,5)-triphosphate avec une plus haute affinité qu'aux autres phosphatidylinositols comme le phosphatidylinositol-(4,5)-diphosphate (Vanhaesebroeck & Alessi, 2000). Son affinité pour les phosphatidylinositols apparaît en général comme étant significativement plus élevée que celle de c-Akt (Vanhaesebroeck & Alessi, 2000).

b. Activation

Comme c-Akt, PDK-1 est également recruté à la membrane par le phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate, produit de la PI3-K. Ce recrutement est primordial pour permettre à PDK-1 de phosphoryler et d'activer c-Akt (Anderson *et al.*, 1998). Il intervient par interactions entre le domaine PH de PDK-1 et les phosphatidylinositols. Il est possible que les cellules normales contiennent des niveaux suffisants de phosphatidylinositols dans la membrane pour permettre un certain degré de ciblage à la membrane de PDK-1 (Anderson *et al.*, 1998). La spécificité de PDK-1 pour les deux sites de phosphorylation de c-Akt peut être modulée par l'interaction avec une ou plusieurs protéines accessoires. Quand PDK-1 interagit avec des molécules comme PIF (*PDK-1-Interacting Fragment*), qui correspond à une région carboxy-terminale de PRK2 (*Protein kinase C-*

Related protein Kinase-2), son activité devient directement stimulable par l'intéraction du domaine PH de PDK-1 avec le PIP(3,4,5)P_3 ou PIP(3,4)P_2 (Balendran *et al.*, 1999).

Un modèle d'activation a été proposé : PDK-1 est recrutée au niveau de la membrane plasmique puis subit une phosphorylation séquentielle sur les tyrosines 9 et 373. La phosphorylation sur la tyrosine 9 favorise la phosphorylation de la tyrosine 373 par un membre de la famille Src kinase (Park *et al.*, 2001). La phosphorylation de la sérine 241 au niveau de la boucle d'activation (équivalente à la thréonine 308 de c-Akt) est également nécessaire (Casamayor *et al.*, 1999). L'association de PDK-1 avec HSP90 régule sa stabilité (Fujita *et al.*, 2002).

c. Substrats

PDK-1 participe à la phosphorylation de nombreuses protéines, en plus de Akt/PKB, de manière dépendante de la PI3-K, parmi lesquelles p70S6K1/2, SGK, PKA, PKCξ et PAK1. p70S6 kinase favorise la croissance cellulaire.

PDK-1 phosphoryle aussi des kinases comme p90rsk, PKA et les PKC conventionnelles, malgré le fait que ces kinases ne soient pas dépendantes de la PI3-K pour leur activation.

La variété des kinases régulée par PDK-1 suggère qu'elle agit comme un master régulateur des kinases AGC dans les cellules.

Le nombre de protéines kinases régulé par PDK-1 souligne le rôle crucial de cette protéine dans le contrôle de voies de signalisation multiples et les réponses cellulaires.

d. Régulation négative

Certaines protéines 14-3-3 régulent négativement l'activité PDK-1 kinase en s'associant aux résidus entourant le site d'autophosphorylation : la sérine 241 (Sato *et al.*, 2002).

TRAVAUX DE RECHERCHE

I. CARACTERISATION DES FIGURES MYELINIQUES

1. Figures myéliniques et céroïdes

En raison de leurs caractéristiques ultrastructurales, les figures myéliniques ont également évoqué des céroïdes (Ball *et al.*, 1988 ; Armstrong, 1992). Le terme céroïde est donné à des complexes protéines/lipides oxydés, autofluorescents sous lumière ultraviolette et constituant un matériel insoluble dans plusieurs solvants organiques comme le xylène ou le mélange chloroforme/méthanol. Ces structures en spirale peuvent être mises en évidence par les techniques de coloration histologique de Ziehl-Neelsen et à l'Oil Red O qui révèlent respectivement des fonctions aldéhydes en relation avec le groupe des pigments de la lipofuscine et des lipides insolubles comme les triglycérides (lipides neutres) (Ball *et al.*, 1987).

En réalisant ces colorations et en observant nos préparations cellulaires sous lumière ultraviolette, nous n'avons pas détecté de fluorescence dans des cellules U937 traitées par le 7-cétocholestérol (20 µg/ml ; 24 h). Il en a été conclu que les structures multilamellaires en spirale observées dans le cytoplasme de cellules U937 traitées par le 7-cétocholestérol ne sont pas des céroïdes.

2. Relations entre figures myéliniques et autophagie

a. Coloration à la monodansylcadavérine

Sur des cellules épithéliales de poumon traitées par un inhibiteur de protéases lysosomiales, la leupeptine, les structures multilamellaires observées ont été décrites comme étant des figures d'autophagie (Hariri *et al.*, 2000). Ces structures cytoplasmiques ont été colorées par la monodansylcadavérine (5-dimethylaminonaphthalene-1-(*N*-(5-aminopentyl))sulfonamide, MDC) (Figure 47) qui est un agent lipophile cationique acidotrope décrit pour caractériser les vacuoles d'autophagie après que celles-ci aient fusionné avec les lysosomes (Biederbick *et al.*, 1995). En revanche, cette sonde ne s'accumule pas dans les lysosomes précoces et tardifs.

En fonction de ces observations, nous avons dans un premier temps coloré les cellules U937 par de la MDC pour évaluer si les figures myéliniques pouvaient être assimilées à des vacuoles d'autophagie (Figure 48). La coloration par la MDC de ces figures myéliniques souligne leur caractère acide.

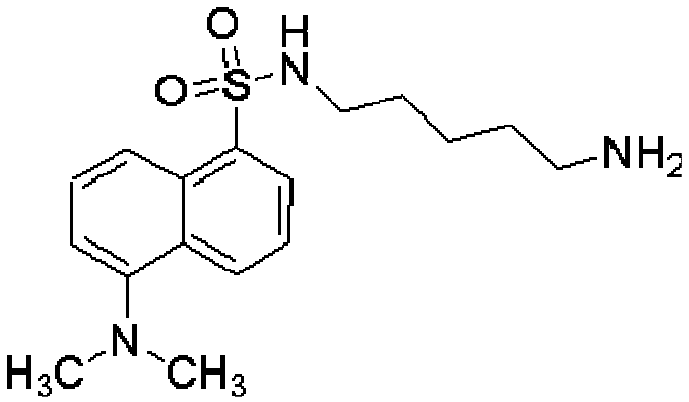
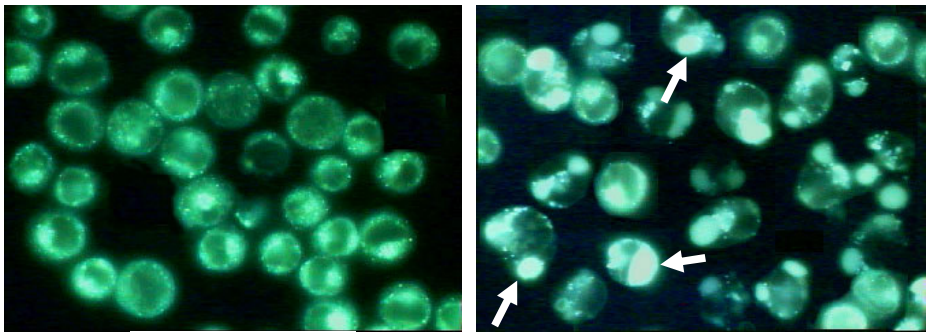


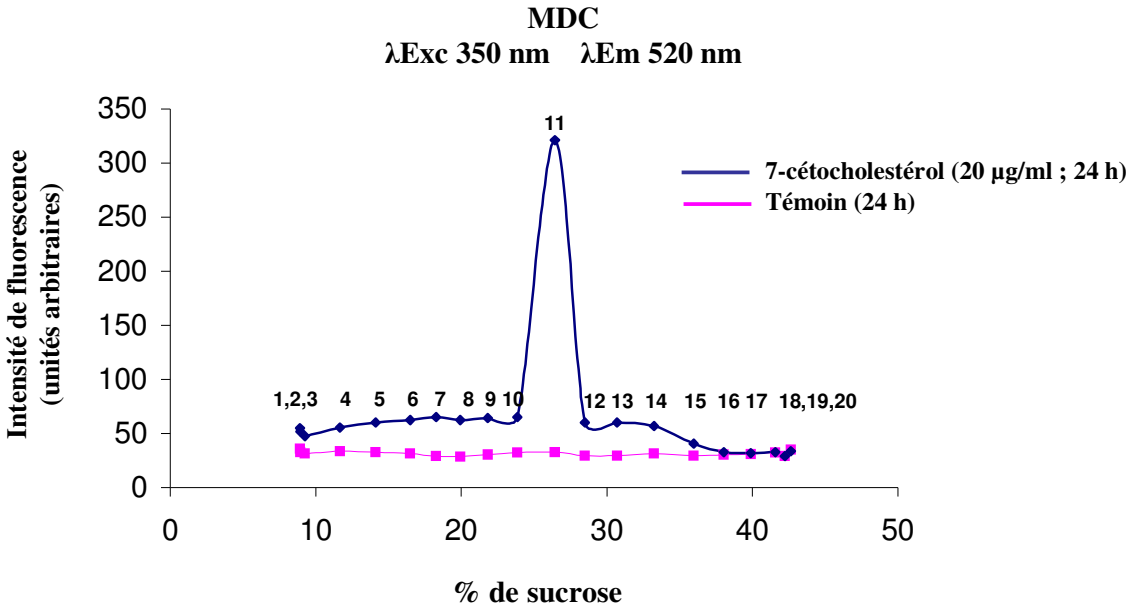
Figure 47 : **Formule chimique de la monodansycadaverine** (http://www.sigmaaldrich.com)



Témoin, 24 h 7-cétocholestérol (20 µg/ml, 24 h)

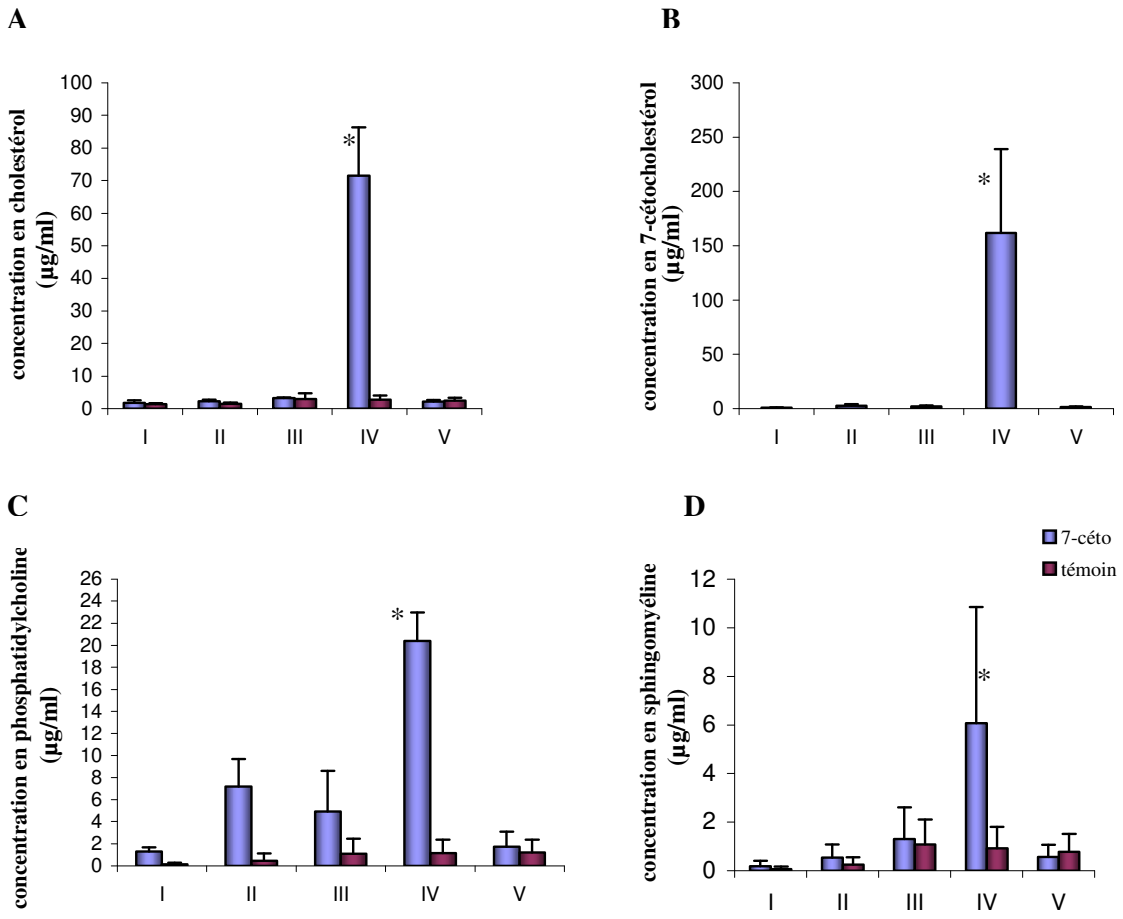
<u>Figure 48 :</u> Coloration par la monodansylcavérine (MDC) de cellules U937 traitées ou non par le 7-cétocholestérol.
Dans le cytoplasme de cellules U937 traitées par le 7-cétocholestérol, de larges structures cytoplasmiques (flèches) sont présentes dans les cellules traitées par le 7-cétocholestérol.

Par ailleurs, après coloration par la MDC, sur des cellules U937 traitées par le 7-cétocholestérol (20 µg/ml) pendant 24 h, un fractionnement subcellulaire a été réalisé en gradient de sucrose (10%-60%) d'après une méthode adaptée de Biederbick *et al.* (1995). Différentes fractions ont été collectées. Celles présentant la plus forte fluorescence au MDC correspondent à une densité en sucrose de 25% (Figure 49). Cette densité en sucrose est proche (mais néanmoins différente) de celle où sont localisées les vacuoles d'autophagie (22-23%) décrites par Biederbick *et al.*, (1995).



<u>Figure 49 :</u> Fractionnement subcellulaire sur gradient de sucrose (10%-60%). Les cellules U937 sont traitées ou non par le 7-cétocholestérol (20 µg/ml, 24 h) et colorées par la MDC (0,1 mM). Les homogénats cellulaires sont fractionnés par ultracentrifugation sur gradient de sucrose. Les graphiques correspondent aux intensités de fluorescence des différentes fractions collectées par pipetage; chaque fraction, indiquée par un symbole (losange bleu ou carré rose) et numérotée de 1 à 21 de la gauche vers la droite, correspond à une densité de sucrose exprimée en %.

Les différentes fractions ont également été caractérisées biochimiquement. A la suite de ce fractionnement, pour les cellules traitées par le 7-cétocholestérol, les fractions (1-2-3-4), (5-6-7-8), (9-10-12), 11, et (13-14-15-16-17-18-19-20-21) ont été rassemblées et nommées fractions I, II, III, IV et V. La fraction correspondant à la plus forte fluorescence au MDC (fraction IV) est riche en phospholipides (phosphatidylcholine et sphingomyéline) en cholestérol et en 7-cétocholestérol (Figure 50).



<u>Figure 50</u> : Caractérisation des lipides neutres (cholestérol, 7-cétocholestérol) et polaires (phosphatidylcholine, sphingomyéline) dans les échantillons issus du fractionnement sub-cellulaire. La composition en cholestérol (A), en 7-cétocholestérol (B), en phosphatidylcholine (C), et en sphingomyéline (C) a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Les * indiquent des différences significatives (analyse de variance ; $p < 0,05$) entre fractions de cellules traitées par le 7-cétocholestérol (20 µg/ml, 24 h) et de cellules non-traitées (témoin).

Ce travail a fait l'objet de l'article 1.

*** ARTICLE 1: Analysis of the fluorescence of monodansylcadaverine-positive cytoplasmic structures during 7-ketocholesterol-induced cell death.**

Kahn E, **Vejux A,** Lizard G, Bessède G, Frouin F, Prunet C, Bernengo JC, Brau F, Todd-Pokropek A, Gambert P.

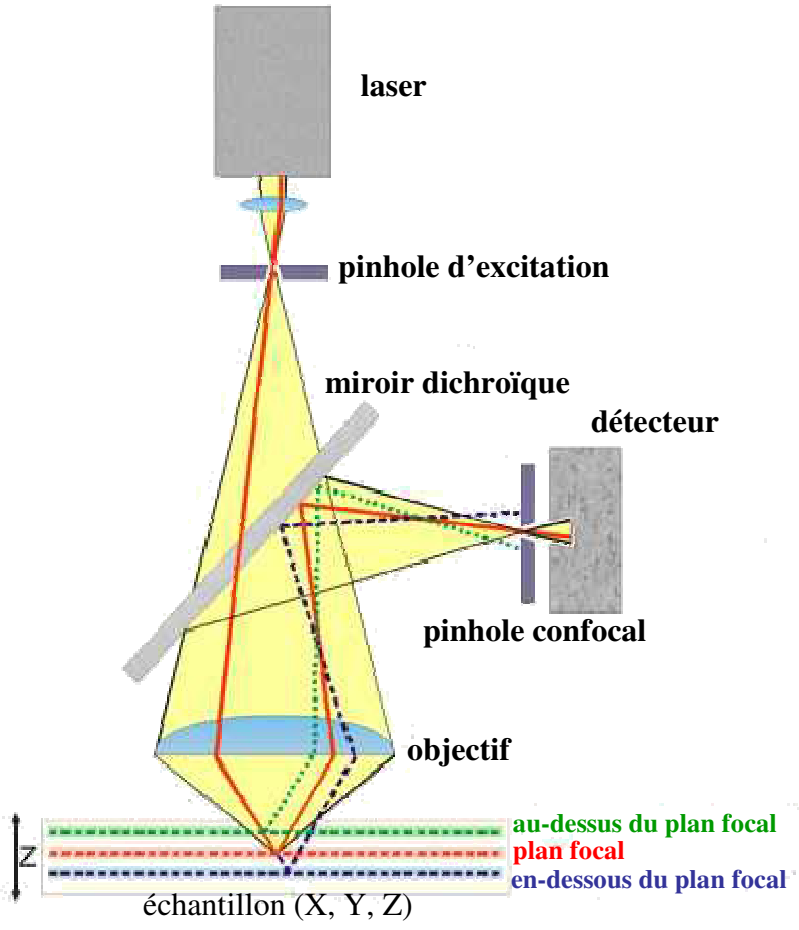
Anal Quant Cytol Histol 2004; **26**(1): 47-56.

Le but du travail de l'article 1 a été d'évaluer par microscopie confocale à balayage laser (CLSM : *Confocal Laser Scanning Microscopy*) associée à une méthode d'analyse factorielle (FAMIS : *Factor Analysis of bioMedical Image Sequences*), ainsi que par des méthodes biochimiques, d'une part la présence de structures cytoplasmiques colorées à la MDC et d'autre part leurs relations avec la localisation intracellulaire du 7-cétocholestérol.

Pour réaliser ce travail, des cellules promonocytaires leucémiques humaines U937 ont été cultivées pendant 6, 14, 18, 24, 30 et 40 h en absence ou en présence de 7-cétocholestérol (20 µg/ml).

Lors de cette étude, la mort cellulaire induite par le 7-cétocholestérol a été caractérisée par des critères morphologiques et fonctionnels : aspect morphologique des noyaux (condensés, fragmentés) après coloration au Hoechst 33342 (Darzynkiewicz *et al.,* 1992) (agent intercalant de l'ADN au niveau des bases adénine/thymine à l'extérieur de la double hélice et fluorescent en bleu sous excitation en lumière ultraviolette) ; variations du potentiel transmembranaire mitochondrial mesurées par une sonde cationique lipophile le DiOC6(3) (3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide) qui se concentre d'autant plus dans la matrice mitochondriale que la différence de potentiel transmembranaire est élevée (Chen, 1988). De plus, la présence de structures cytoplasmiques acides a été recherchée par coloration à la MDC (Biederbick *et al.*, 1995).

Afin d'étudier les interactions possibles entre le 7-cétocholestérol et les structures colorées à la MDC, nous avons utilisé la microscopie confocale à balayage laser combinée avec une analyse factorielle de séquences d'images (FAMIS). Le microscope confocale à balayage laser est un microscope optique qui permet de réaliser des images de très faible profondeur de champ (environ 600 nm) appelées « sections optiques » (Figure 51). Le processus de formation de l'image est basé sur l'utilisation d'une source de lumière à haute intensité qui est limitée en taille à un simple spot (Kahn, 2001).



<u>Figure 51</u> : Schéma de principe d'un microscope confocal

Pour cela, on éclaire la surface de l'échantillon par un rayon laser, concentré par une lentille, qui balaye la surface en positionnant le diaphragme devant le détecteur, dans un plan focal conjugué au plan focal de l'objectif (plans confocaux). De cette manière, seuls les photons provenant du plan focal passent le diaphragme et participent à la formation de l'image, d'ou le nom « confocal » (synonyme de monofocal). Le balayage par le laser se fait à l'aide de deux miroirs orthogonaux. Les détecteurs utilisés sont des tubes photo-multiplicateurs (PMT), l'intensité lumineuse est mesurée et numérisée en fonction de la position du laser dans l'échantillon : on obtient de cette façon des images numériques.

La technique FAMIS est une méthode d'analyse de séquences d'images spectrales (ou dynamiques), permettant de résumer le contenu de la séquence au moyen d'un petit nombre d'images et de courbes associées, en supposant un modèle de superposition linéaire des structures d'intérêt sous-jacentes. Elle permet en particulier de décomposer un processus dynamique complexe en une somme de processus plus simples, ou un signal spectral en différentes composantes. L'analyse factorielle des séquences d'images dynamiques est une méthode d'analyse qui résume le contenu d'une séquence d'images indexées ou non par le temps en un petit nombre d'images et de courbes associées. La courbe associée décrit l'aspect du signal qui évolue dans le compartiment. Le modèle utilisé pour réaliser la décomposition opérée par l'analyse factorielle est un modèle de superposition linéaire. Pour un pixel considéré, le poids associé à chaque fluorescence fondamentale correspond à une partie du signal de fluorescence totale. L'image de ces coefficients (ou poids) donne l'image des compartiments présentant la même fluorescence (images factorielles).

Dans ce modèle, les courbes de fluorescence ($\lambda_{(i)}$) dans chaque pixel i sont connues, et les inconnues à estimer sont les images des compartiments physiologiques a_k et les profils de fluorescence fondamentaux P_k. Le bruit epsilon i (εi) présent dans chaque pixel doit aussi être estimé. Pour estimer toutes ces inconnues, l'analyse peut utiliser 3 types de connaissances *a priori* : les propriétés du bruit, qui permettent d'estimer ε, des informations relatives aux allures des fonctions biologiques, et des informations relatives à la distribution spatiale des compartiments physiologiques. C'est en exploitant tout ou partie de ces *a priori* que l'analyse factorielle conduit à des facteurs et images factorielles estimant les fonctions fondamentales et les compartiments physiologiques associés.

Le principe de la technique FAMIS est présenté dans la Figure 52.

Cette figure illustre une séquence d'images réelles obtenues sous une excitation donnée (λ). Chaque image de la séquence correspond à une longueur d'onde d'émission différente. Les spectres d'émission de fluorescence de chaque pixel (ou voxel) ainsi obtenus sont ensuite analysés par la

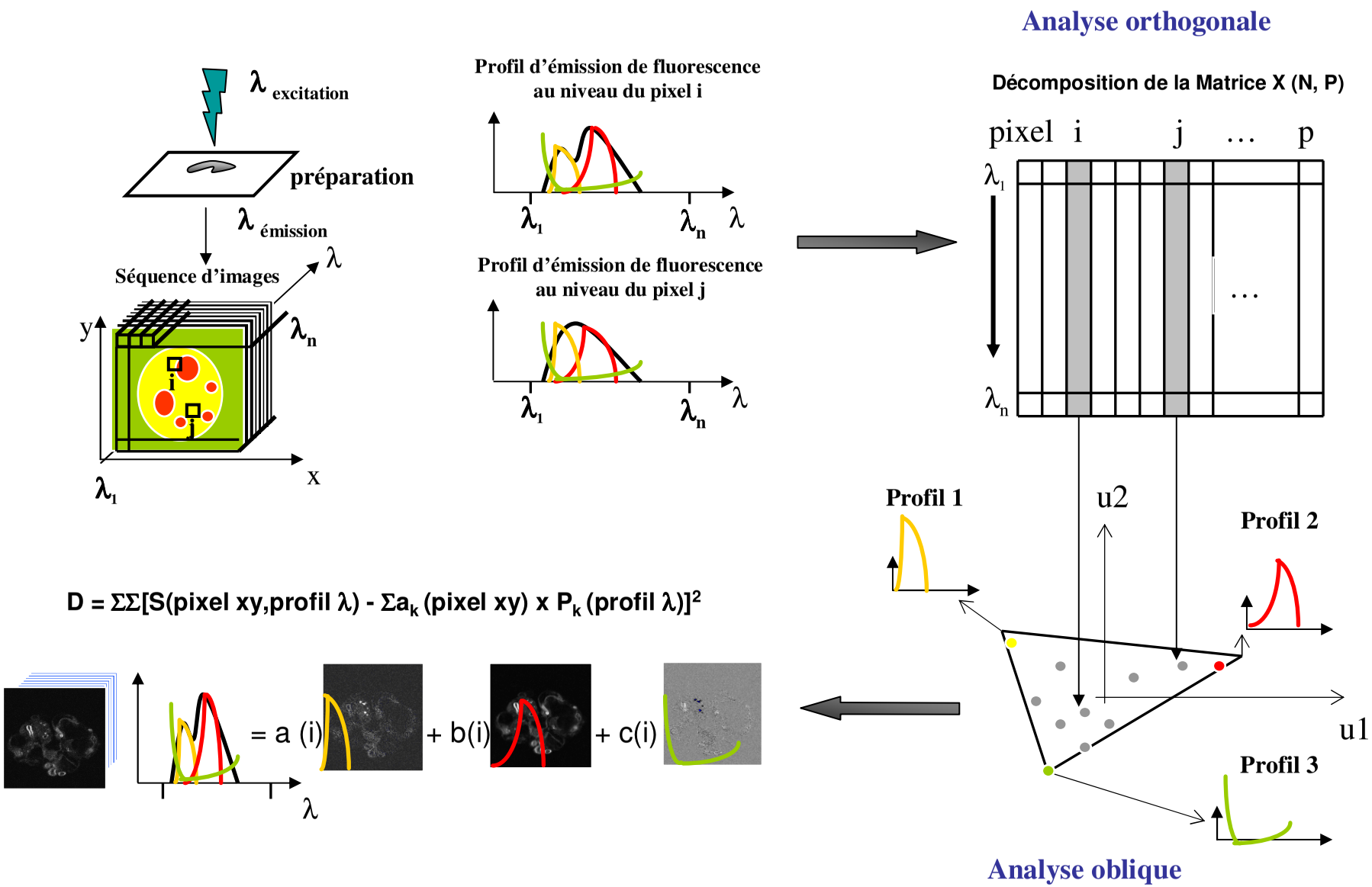


Figure 52 : Schéma de principe de l'analyse spectrale associée à l'analyse factorielle par la méthode FAMIS

méthode FAMIS incluant d'abord une analyse orthogonale puis une analyse oblique. L'analyse orthogonale en prenant en compte tous les pixels (ou voxels) visualise les composantes principales (identifie les spectres calculés (ou facteurs) principaux du plus important au moins important). Au pixel i est associé un spectre réel; on peut ainsi à la suite de l'analyse orthogonale lui associer un spectre théorique résultant de sa décomposition en spectre (ou facteur) calculé. Au pixel j est aussi associé un spectre réel; on peut de même à la suite de l'analyse orthogonale lui associer un spectre théorique résultant de sa décomposition en spectre (ou facteur) calculé. Et ainsi de suite … Après l'analyse orthogonale, une analyse oblique est réalisée. Cette analyse oblique affine la décomposition orthogonale en imposant des contraintes (a(i), b(i), c(i), ….) sur les spectres (ou facteurs). La formule utilisée permet d'évaluer la fiabilité des images factorielles obtenues par rapport aux images réelles. Cette méthode permet d'extraire des structures et de les visualiser même lorsque celles-ci ont des fluorescences proches. L'image d'origine peut être décomposée en images spectrales. Les spectres obtenus par analyse factorielle servent à calculer les images.

Les détails de la méthode FAMIS et les algorithmes de calculs utilisés sont décrits dans deux articles fondamentaux de E. Kahn *et al.* (Kahn *et al.,* 1997, Kahn *et al.,* 1999).

Dans cette partie du travail, nous rapportons que la formation des structures positives à la MDC se produit avant la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial et avant la condensation et la fragmentation nucléaire. La formation des structures MDC positives est par conséquent un évènement précoce précédant les signes de mort cellulaire.

En utilisant des techniques récentes, CLSM associée avec la technique FAMIS, nous montrons aussi que le 7-cétocholestérol co-localise avec les structures colorées par la MDC. Les problèmes techniques liés à la superposition des signaux d'émission de la MDC et du 7-cétocholestérol ont pu être résolus en utilisant l'analyse factorielle (FAMIS) qui a permis de co-localiser des signaux verts (MDC) et de la fluorescence bleue (7-cétocholestérol).

Des techniques biochimiques complémentaires ont permis de confirmer les données microscopiques, après isolement des structures positives à la MDC par fractionnement subcellulaire et analyses biochimiques par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Dans leur ensemble, ces résultats indiquent que les structures colorées par la MDC sont des vésicules acides, riches en phospholipides (phosphatidylcholine, sphingomyéline), et qu'elles accumulent du cholestérol et du 7-cétocholestérol.

Article 1 :

Analysis of the Fluorescence of Monodansylcadaverine-Positive Cytoplasmic Structures During 7-ketocholesterol –induced cell death

Kahn E, **Vejux A**, Lizard G, Bessède G, Frouin F, Prunet C, Bernengo JC, Brau F, Todd-Pokropek A, Gambert P.

Anal Quant Cytol Histol 2004; **26**(1): 47-56

Analysis of the Fluorescence of Monodansylcadaverine-Positive Cytoplasmic Structures During 7-Ketocholesterol–Induced Cell Death

Edmond Kahn, Ph.D., **Anne Vejux,** M.S., **Gérard Lizard,** Ph.D., **Ginette Bessède,** M.S., **Frédérique Frouin,** Ph.D., **Céline Prunet,** M.S., **Jean-Claude Bernengo,** Ph.D., **Frédéric Brau,** Ph.D., **Andrew Todd-Pokropek,** Ph.D., and **Philippe Gambert,** M.D., Ph.D.

OBJECTIVE: To analyze multilamellar cytoplasmic structures by confocal laser scanning microscopy (CLSM) combined with factor analysis of biomedical image sequences (FAMIS).
STUDY DESIGN: After treatment of U937 cells with 7-ketocholesterol (7-keto), cytoplasmic alterations were assessed with monodansylcadaverine (MDC). By ultraviolet excitation of a confocal laser scanning microscope (UV-CLSM), spectral sequences were performed to characterize 7-keto and MDC distribution inside cells. FAMIS was used to transform the image sequences in factor curves and images.
RESULTS: By UV-CLSM, 7-keto fluorescence was detected together with MDC, which revealed morphologic cytoplasmic changes in cells. The factor images obtained from confocal image sequences emphasized the view of these results. These data are in agreement with biochemical characterizations of MDC-positive structures.
CONCLUSION: The combined use of confocal microscopy and FAMIS allowed us to detect MDC-positive

From Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U494, Centre Hospitalier Universitaire Pitié Salpêtrière, and Institut Universitaire d'Hématologie, Paris; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U498, Centre Hospitalier Universitaire du Bocage, Dijon; and University of Lyon-1, Lyon, France.

Dr. Kahn is Director of Research, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U494.

Mss. Vejux and Prunet are Graduate Students, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U498.

Dr. Lizard is Head of Research, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U498.

Ms. Bessède is Technician, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U498.

Dr. Frouin is Head of Research, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U494.

Dr. Bernengo is Professor of Biophysics, University of Lyon-1.

Dr. Brau is Engineer of Research, Institut d'Hématologie.

Dr. Todd-Pokropek is Professor of Medical Physics and Director, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U494, Centre Hospitalier Universitaire Pitié-Salpêtrière.

Dr. Gambert is Professor of Medical Biochemistry and Director, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U498, Hôpital du Bocage.

Presented at the 1st International Cytomics Conference of the International Society for Analytical Cytology, Newport, Wales, U.K., May 6–9, 2003.

Address reprint requests to: Edmond Kahn, Ph.D., Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U494, Centre Hospitalier Universitaire Pitié-Salpêtrière, 75634 Paris Cedex 13, France (kahn@imed.jussieu.fr).

Financial Disclosure: The authors have no connection to any companies or products mentioned in this article.

Received for publication June 16, 2003.

Accepted for publication October 29, 2003.

0884-6812/04/2601-0047/$15.00/0 © The International Academy of Cytology

cytoplasmic structures in 7-keto–treated cells and to colocalize MDC and 7-keto distribution. This new method confirms the usefulness of MDC as a marker of oxysterol-induced cell death. (Analyt Quant Cytol Histol 2004;26:47–56)

Keywords: confocal microscopy, ketocholesterols, cell death, fluorescence.

Cholesterol oxide products (oxysterols) are supposed to play key roles in the initiation and progression of atherosclerosis. Indeed, some of them, such as 7-ketocholesterol, are frequently identified at increased levels in the plasma and vascular lesions of atherosclerotic patients,[7,34] can exert numerous biologic activities (induction of cell death, of radical oxygen species production and of cytokine secretion) and can possibly contribute to atherogenesis.[32] During 7-ketocholesterol–induced cell death, which is characterized by various cellular dysfunctions, large, cytoplasmic, multilamellar structures (myelin figures) are rapidly detected in dying cells by transmission electron microscopy.[25] As no myelin figures are observed when U937 cells are treated with other proapoptotic chemicals (vinblastine, cytosine-β-D-arabinofuranoside, cycloheximide, etoposide and staurosporine),[25] it is tempting to speculate that these structures can constitute reliable markers of oxysterol-induced cell death, and it is therefore important to characterize them.

These structures can be stained at 0.05 mM with monodansylcadaverine (MDC), which behaves as a lysosomotropic agent and as a solvent polarity probe and accumulates in acidic compartments. It is probably due to its amino group, which becomes protonated at low pH, leading to an ion-trapping mechanism.[28] MDC fluorescent dansyl moiety increases its quantum yield in a hydrophobic environment.[29] MDC is a fluorochrome that emits green fluorescence when excited by an ultraviolet line.[26] In the conditions of excitation of MDC, 7-ketocholesterol emits blue fluorescence.

We applied the MDC staining procedure to U937 promonocytic human leukemia cells, which were treated with 7-ketocholesterol (20 μg/mL) for different periods of time (6, 14, 24, 30 and 40 hours) in order to define (1) the kinetics of MDC positive structure formation comparatively with key events in 7-ketocholesterol–induced cell death (loss of transmembrane mitochondrial potentials as an intermediate event of apoptosis to determine the returnless point of cell death for the most part, measured by flow cytometry after staining with $DiOC_6(3)$)[36] and the condensation and/or fragmentation of nuclei as a late event in apoptosis, determined by fluorescence microscopy after staining with Hoechst 33342,[18] and (2) the relationships between the presence of MDC-positive structures and the repartition of 7-ketocholesterol inside the cells.

Since it is well understood that macrophages play important parts in the atherosclerotic process since increased concentrations of oxysterols in macrophage foam cells (resulting from the phagocytosis of oxidized low density lipoproteins) may lead to cell death and plaque rupture,[19] U937 cells were used because they constitute reference models in studies to investigate the cytotoxicity of oxysterols in humans[1,30] and because they are sensitive to oxysterols in the same range of concentration as those observed on endothelial and smooth muscle cells, which contribute also to atherogenesis.[23]

In agreement with our previous reports, our data confirm that the formation of MDC-positive structures occurs before the loss of transmembrane mitochondrial potentials and before condensation and/or fragmentation of the nuclei.[26] Moreover, in conventional conditions of fluorescence microscopy observation, large blue and green fluorescent structures can be observed in the cytoplasm of 7-ketocholesterol–treated cells, whereas small, green fluorescent spots can be observed only in untreated cells. More sophisticated conditions of observation, which include a CCD camera, confirm a mixture of blue and green fluorescence in treated cells. By confocal ultraviolet laser scanning microscopy, enhanced green and blue fluorescence intensity can be observed at the cytoplasmic level in 7-ketocholesterol–treated cells.

Our purpose was to obtain colocalized images of treated cells from the combined fluorescence of MDC and 7-ketocholesterol. They can be obtained via ultraviolet excitation from the same laser and factor analysis of biomedical image sequences (FAMIS) of the resulting confocal images.[15] FAMIS is an original method of image analysis that summarizes image sequences into a reduced number of images, or factor images, and curves, or factors. Emission spectra of both products as factors are extracted from the sequence of images, and summarized images of these products are restored from factors and the sequence of images. A confocal microscope that included the excitation possibilities of a UV laser (Spectra Physics 2018, Mountain Valley,

California, U.S.A.) and spectral acquisition facilities (Leica TCS SPL, Mannheim, Germany) were used to obtain the required sequences of images (excitation, 351 and 364 nm; emission, 400–700 nm). Under such experimental conditions, sequences of images were investigated by FAMIS according to the method developed by Di Paola et al[5] following general factor analysis techniques.[2,9]

In this study, a new version of FAMIS that makes it possible to process 4D sequences,[6] was used to characterize each fluorochrome in single-laser experiments. Single-laser studies were performed according to a method developed by Kahn et al[11] that clearly distinguishes each fluorochrome in groups of fluorochromes.[12,14,16] This method, which is based on FAMIS, uses physical properties of fluorochromes (spectra and decay rates)[11,16] to isolate MDC and 7-ketocholesterol and estimate corresponding images. Under these conditions, the distribution of MDC and 7-ketocholesterol in treated cells can be analyzed. In addition, CLSM, together with FAMIS, constitutes a new method of detecting cytoplasmic morphologic changes induced by 7-ketocholesterol (formation of MDC-positive structures) as well as localizing the cellular distribution of MDC-positive structures and of 7-ketocholesterol. The accumulation of 7-ketocholesterol in MDC-positive structures, as determined by CLSM together with FAMIS, is confirmed by subcellular fractionation combined with biochemical methods (gas chromatography coupled with mass spectrometry).

Materials and Methods

Cell Culture

Human promonocytic leukemia cells (U937) were grown in suspension in culture medium consisting of RPMI 1640 (Gibco, Eragny, France), 2 mM L-glutamine (Gibco) and antibiotics (100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin) supplemented with 10% (vol/vol) heat-inactivated fetal calf serum (Gibco). The cells were seeded in $10 \times 10{,}000$/mL of culture medium and passaged twice a week. They were cultured in a 5% CO_2/95% air, humidified atmosphere at 37°C.

Cell Treatment

7-Ketocholesterol ($\lambda Ex_{max} = 350$ nm, $\lambda Em_{max} = 420$ nm) was provided by Sigma (L'Isle d'Abeau Chesnes, France), and its purity was determined to be 100% by gas phase chromatography coupled with mass spectrometry. For all experiments, a stock solution of 7-ketocholesterol was prepared extemporaneously at a concentration of 800 µg/mL as previously described.[21] To obtain the initial solution, 800 µg of 7-ketocholesterol was dissolved in 50 µL of absolute ethanol, 950 µL of culture medium was added, and the solution was sonicated. To obtain a 20 µg/mL final concentration (corresponding to 50 µM) of 7-ketocholesterol, 25 µL of this initial solution was further added per milliliter of culture medium. In all experiments, 7-ketocholesterol was introduced in the culture medium at the beginning of the culture, and treatment with 7-ketocholesterol on U937 cells was carried out for 6, 14, 24, 30 and 40 hours.

Staining Conditions with MDC

Staining with MDC has been described as identifying cytoplasmic structures with autophagic vacuoles.[3] MDC ($\lambda Ex_{max} = 340$ nm, $\lambda Em_{max} = 530$ nm) (Sigma, St. Louis, Missouri, U.S.A.) was prepared at 0.1 M in DMSO and added to the culture medium at a final concentration of 0.05 mM. After 15 minutes of incubation at 37°C, cells were collected by centrifugation and resuspended in culture medium (2×10^6 cells/mL), and 50 µL of cell suspension was applied to glass slides by cytocentrifugation (5 minutes, 300 g) with a Cytospin 2 (Shandon, Cheshire, U.K.), mounted in Fluoprep (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France), coverslipped and stored in the dark at 4°C until microscopic examination.

Staining Conditions with Hoechst 33342

Nuclear morphology was analyzed by fluorescence microscopy after staining with Hoechst 33342 ($\lambda Ex_{max} = 350$ nm, $\lambda Em_{max} = 461$ nm) (Sigma). Apoptotic cells were characterized by nuclear condensation of chromatin and/or nuclear fragmentation.[20] Hoechst 33342 was prepared in distilled water at 1 mg/mL and added to the culture medium at a final concentration of 10 µg/mL. After 30 minutes of incubation at 37°C, cells were collected by centrifugation and resuspended at a concentration of 10^6 cells/mL in cold PBS containing 2% (wt/vol) paraformaldehyde. Cell deposits of 40,000 cells were applied to glass slides by cytocentrifugation (5 minutes, 15,000 rpm) with a Cytospin 2, mounted in Fluoprep, coverslipped and stored in the dark at 4°C until microscopic examinations.

Flow Cytometric Measurement of Mitochondrial Transmembrane Potentials with $DiOC_6(3)$

The mitochondrial transmembrane potentials

($\Delta\Psi m$) was measured by flow cytometry with 3,3′-dihexyloxacarbocyanine iodide ($DiOC_6(3)$ ($\lambda Ex_{max} = 484$ nm, $\lambda Em_{max} = 501$ nm) (Molecular Probes, Eugene, Oregon, U.S.A.) used at 40 nM final concentration.[25] Flow cytometric analyses were performed on a GALAXY flow cytometer (Partec, Münster, Germany). The green fluorescence of $DiOC_6(3)$ was collected through a 520/10 nm bandpass filter and measured on a logarithmic scale. For each sample, 10,000 cells were acquired. Data were analyzed with FlowMax software (Partec, Münster, Germany).

Conventional Fluorescence Microscopy

The morphology of cell nuclei as determined after staining with Hoechst 33342 was observed with an Axioskop direct microscope (Zeiss, Jena, Germany) by using UV light excitation, and 300 cells were examined for each sample.

Images of the fluorescence of MDC and 7-ketocholesterol were obtained by means of a fluorescence microscope (Leica DMRD) equipped with the usual CCD camera (Leica) and acquisition software (Leica Qwin). Images of the fluorescence emission when UV excitation is used together with phase contrast were obtained via an 1:63 immersion oil objective (NA 1.32) in 760×576-pixel matrices (pixel = 0.132 µm).

Confocal Microscopy and Image Acquisition

Images (63×) at pixel sizes ranging from 0.16 to 0.38 µm were obtained for each case in 512×512 matrices on the confocal microscope (Leica TCS-SPL). Excitation was obtained using $\lambda = 351$ and 364-nm laser lines of an argon-kryton laser (Spectra Physics 2018). Emission was observed using an 63× oil objective (HCX Plan APO, NA = 1.32). The investigation was performed by images obtained through blue and green bandpass filters (455/30, 522/35) and by spectral sequences of 16–30 images obtained by scanning the same area through bandpass filters in the range of 400–620 nm.

Image Analysis

Following general factor analysis techniques, FAMIS was developed to process biomedical image sequences. This development specifically required the use of constraints. It had to cope with mixtures of components characterized by their physical behavior. Linearity and component positivity basic hypotheses were considered. FAMIS synthesizes image sequences into factor images and factors. Factors estimate different individual behaviors in the sequence of images. Factor images correspond to spatial distributions of the different components.

Concerning the use of FAMIS, pixels in matrices were combined in 8×8 clusters. These clusters were all considered. Correspondence analysis, as explained by Benzecri,[2] was performed on the intensity evolution of each cluster. Then oblique analysis with positivity constraints was performed from the results of correspondence analysis, as explained by Di Paola et al,[5] asking for 2 positive factors and factor images. Factor images were recomputed in the original sampling by oblique projection on the factors.

As for analysis of spectral sequences of images, the characterized components are the intensity evolutions versus wavelengths of the different fluorochromes. The factors correspond to the evolution of the intensity of emission versus wavelengths. When fluorochromes have different behaviors versus wavelengths, factors provide factor images of each fluorochrome.

Subcellular Fractionation and Biochemical Characterization of MDC-Positive Cytoplasmic Structures

The methodology used derivatives of those described by Biederbick et al.[3] Briefly, after 24 hours of culture in the absence or presence of 7-ketocholesterol (20 µg/mL), U937 cells were incubated with MDC (0.05 mM, 15 minutes) at 37°C. Medium was removed, and cells were washed with cold PBS, resuspended in homogenization buffer (10 mM Tris HCl, pH 8; 0.25 M sucrose; 1 mM dithiothreitol; 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride; 3 mM $MgSO_4$; and 10 mM NaCl) and centrifuged at 700 g (10 minutes) at 4°C. The pellet was resuspended in 1 mL of Tris HCl (10 mM, pH 8) and separated on a continuous sucrose gradient (10–60%) at 112 500 g for 5 hours using a R70.1 rotor in a Beckman Optima™ L-90K centrifuge (Fullerton, California, U.S.A.). Fractions were collected from the bottom of the gradient. MDC-labelled compartments were detected with a LS50B Perkin Elmer spectrofluorometer (Wellesley, Massachusetts, U.S.A.) ($\lambda Ex = 350$ nm, $\lambda Em = 520$ nm), and the sucrose density of each fraction was simultaneously measured using a Codiam Scientific refractometer (Polylabo, Strasbourg, France). For each fraction, the lipid composition of cholesterol, 7-ketocholesterol, phosphatidylcholin and sphin-

gomyelin was determined. To this end, lipids were extracted and analyzed by capillary gas chromatography and mass spectrometry, as previously described.[21]

Results

Kinetic Analysis of the Formation of MDC-Positive Structures, Loss of Mitochondrial Transmembrane Potential and Morphologic Nuclear Changes

Kinetic analysis of the formation of MDC-positive structures, loss of mitochondrial transmembrane potentials and morphologic nuclear changes (presence of cells with condensed and/or fragmented nuclei) was performed at 6, 14, 24, 30 and 40 hours of culture in untreated and 7-ketocholesterol–treated cells. In untreated cells, the percentage of cells containing a MDC-positive structure (MDC-positive cells), depolarized mitochondria and condensed and/or fragmented nuclei did not exceed 5% (Figure 1A). In 7-ketocholesterol–treated cells, cells stained with MDC were detected very soon (6 hours) before cells containing depolarized mitochondria and condensed and/or fragmented nuclei (Figure 1B). Therefore, formation of MDC-positive structures is an early event in 7-ketocholesterol–induced cell death. Further investigations were performed at 24 hours. Maximal proportions of cells containing MDC-positive structures were detected. Among dead cells, none had started the secondary necrotic process, and that allowed us to study the localization of 7-ketocholesterol inside the cells when its presence depends on physiologic processes only.

Characterization of 7-Ketocholesterol–Treated Cells: Fluorescence Analysis of MDC-Stained Cells and Phase Contrast Microscopy

Images of 7-ketocholesterol–treated cells versus untreated cells (Figure 2) show the main differences at various cellular levels. In untreated cells stained with MDC, slight green fluorescence was located in the cytoplasm. In treated cells stained with MDC, large blue and green fluorescent structures were also located in the cytoplasm. Phase contrast microscopy showed that blue fluorescence of 7-ketocholesterol was located in both the cytoplasm and nucleus. Blue fluorescence was not observed in untreated cells.

Confocal Image Analysis

In the case of U937 cells, when MDC and 7-ketocholesterol emissions were recorded through blue and green bandpass filters, the results of conventional fluorescence analysis were confirmed. When they were recorded through bandpass filters from 400 to 600 nm, the 2 factor images resulting

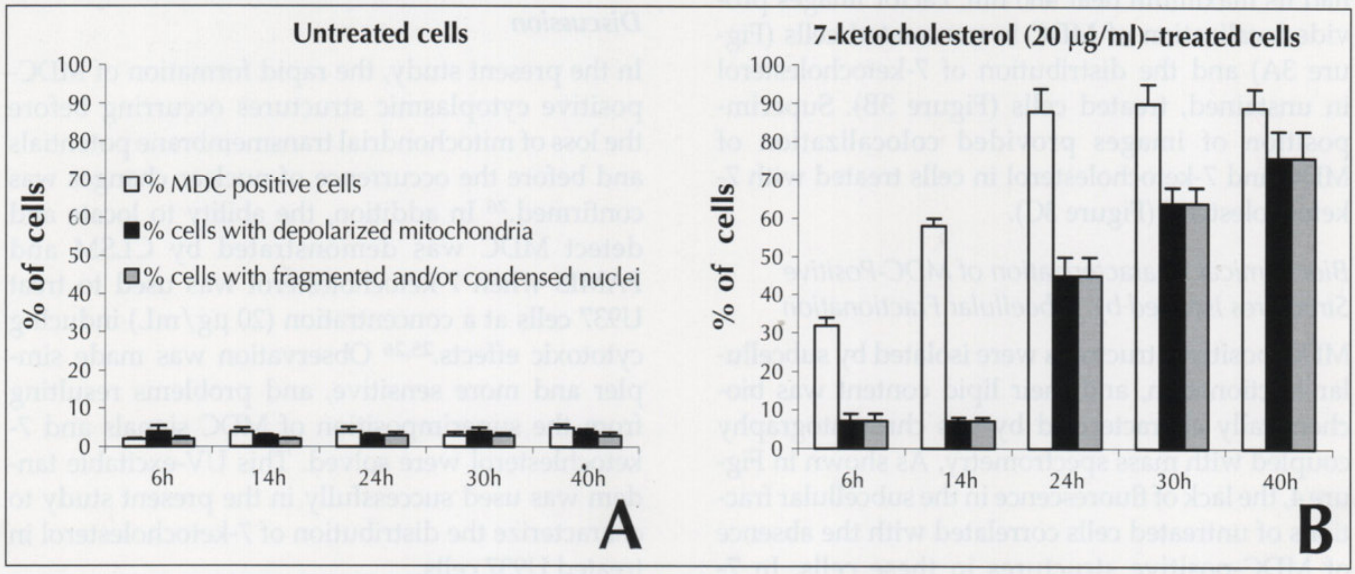


Figure 1 Time-dependent effect of 7-ketocholesterol on the formation of MDC-positive structures, mitochondrial transmembrane potential and morphologic nuclear changes. U937 cells were cultured in the (A) absence or (B) presence of 7-ketocholesterol. The effects of 7-ketocholesterol on MDC-positive structure formation and cell viability were evaluated by different methods: positive cytoplasmic structures were identified by staining with MDC, and the percentage of MDC-positive cells was determined by fluorescence microscopy; the loss of mitochondrial potential was measured by DiOC6(3), and the percentage of cells with depolarized mitochondria was defined by flow cytometry; morphologic nuclear changes were evaluated after staining with Hoechst 33342, and the percentage of cells with condensed and/or fragmented nuclei (characteristic of apoptotic cells) was established by fluorescence microscopy.

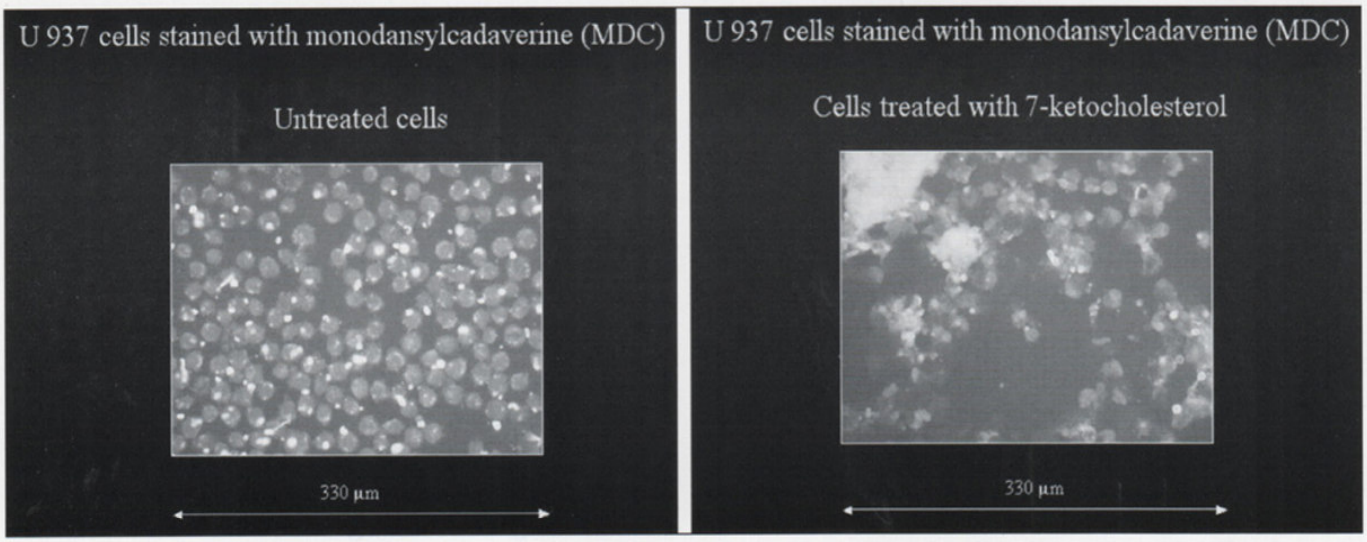


Figure 2 Conventional fluorescence microscopy. When human promonocytic U937 leukemia cells treated with 7-ketocholesterol were stained with MDC, it was possible to characterize changes of fluorescence. The images correspond to MDC and 7-ketocholesterol at 63× magnification. Cases of untreated U937 cells (control) and U937 cells treated with 7-ketocholesterol (20 µg/mL) are shown.

from FAMIS analysis of the corresponding spectral sequences of images permitted us to identify images corresponding to MDC and 7-ketocholesterol specifically (Figure 3). The factor corresponding to MDC had its maximum near 520 nm, while the factor curve corresponding to 7-ketocholesterol had its maximum near 460 nm. Factor images provide localization of MDC in nontreated cells (Figure 3A) and the distribution of 7-ketocholesterol in unstained, treated cells (Figure 3B). Superimposition of images provided colocalization of MDC and 7-ketocholesterol in cells treated with 7-ketocholesterol (Figure 3C).

Biochemical Characterization of MDC-Positive Structures Isolated by Subcellular Fractionation

MDC-positive structures were isolated by subcellular fractionation, and their lipid content was biochemically characterized by gas chromatography coupled with mass spectrometry. As shown in Figure 4, the lack of fluorescence in the subcellular fractions of untreated cells correlated with the absence of MDC-positive structures in these cells. In 7-ketocholesterol (20 µg/mL)–treated cells, the subcellular fraction corresponding to a sucrose density of 25% was strongly fluorescent (Figure 4). By gas chromatography coupled with mass spectrometry, the lipid composition of this MDC-positive subcellular fraction was determined. This subfraction contained high levels of neutral lipids (cholesterol, 7-ketocholesterol) and polar lipids (phosphatidylcholin, sphingomyelin). Thus, these data confirm those obtained by confocal image analysis and underline the accumulation of 7-ketocholesterol in MDC-positive structures.

Discussion

In the present study, the rapid formation of MDC-positive cytoplasmic structures occurring before the loss of mitochondrial transmembrane potentials and before the occurrence of nuclear changes was confirmed.[26] In addition, the ability to locate and detect MDC was demonstrated by CLSM and FAMIS when 7-ketocholesterol was used to treat U937 cells at a concentration (20 µg/mL) inducing cytotoxic effects.[25,26] Observation was made simpler and more sensitive, and problems resulting from the superimposition of MDC signals and 7-ketochlesterol were solved. This UV-excitable tandem was used successfully in the present study to characterize the distribution of 7-ketocholesterol in treated U937 cells.

7-Ketocholesterol–induced cell death is a complex phenomenon characterized by cytoplasmic and nuclear changes (induction of myelin figure formation, modification of microfilament organization, altered mitochondria, presence of cells with fragmented and/or condensed nuclei as well as

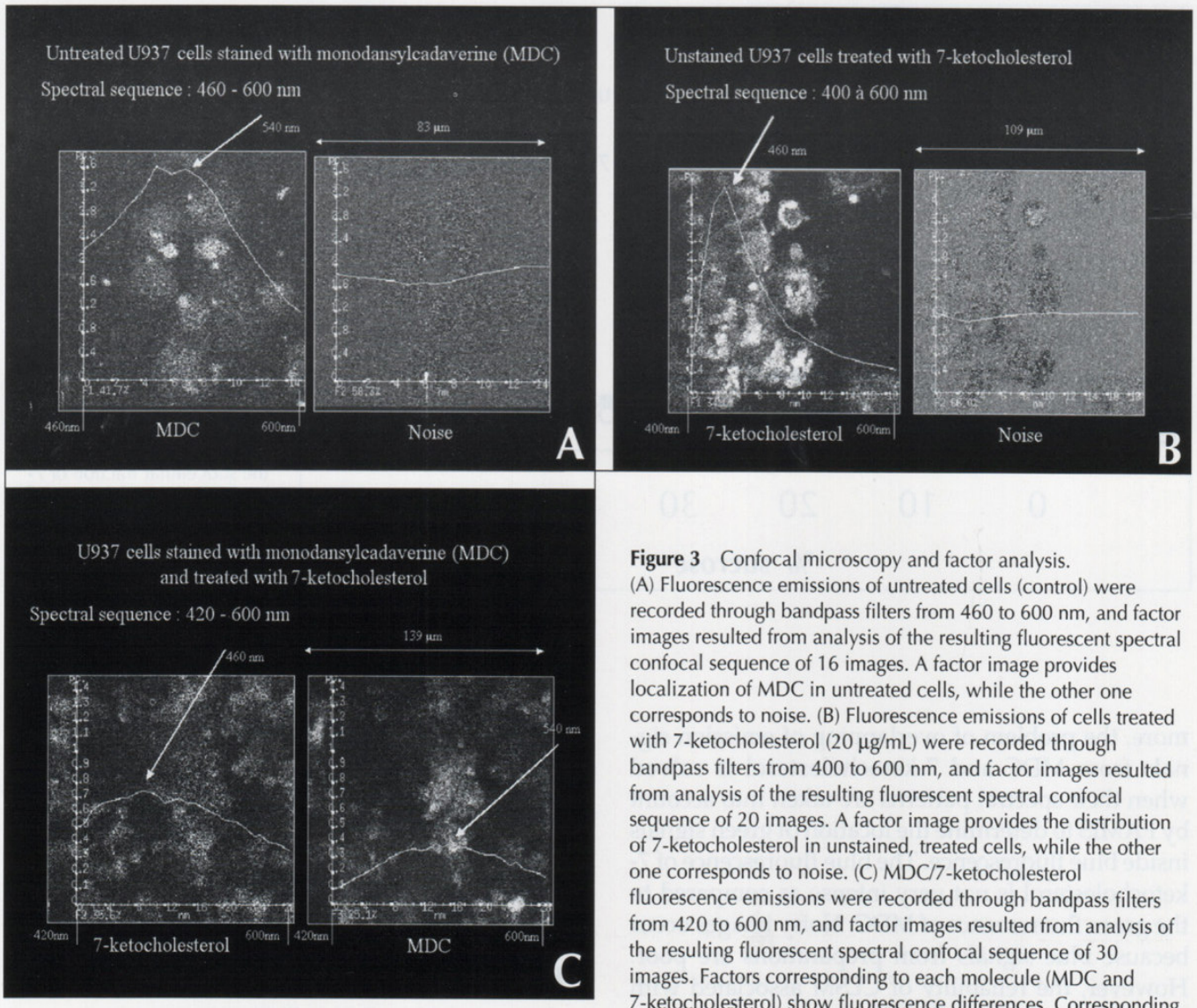


Figure 3 Confocal microscopy and factor analysis. (A) Fluorescence emissions of untreated cells (control) were recorded through bandpass filters from 460 to 600 nm, and factor images resulted from analysis of the resulting fluorescent spectral confocal sequence of 16 images. A factor image provides localization of MDC in untreated cells, while the other one corresponds to noise. (B) Fluorescence emissions of cells treated with 7-ketocholesterol (20 µg/mL) were recorded through bandpass filters from 400 to 600 nm, and factor images resulted from analysis of the resulting fluorescent spectral confocal sequence of 20 images. A factor image provides the distribution of 7-ketocholesterol in unstained, treated cells, while the other one corresponds to noise. (C) MDC/7-ketocholesterol fluorescence emissions were recorded through bandpass filters from 420 to 600 nm, and factor images resulted from analysis of the resulting fluorescent spectral confocal sequence of 30 images. Factors corresponding to each molecule (MDC and 7-ketocholesterol) show fluorescence differences. Corresponding factor images provide colocalization of MDC-positive structures and of 7-ketocholesterol. The factor corresponding to MDC has its maximum near 540 nm; that corresponding to 7-ketocholesterol has its maximum near 460 nm.

with swollen nuclei)[22,25,26,35] and various cellular dysfunctions: phosphatidylserine externalization, loss of mitochondrial transmembrane potential, cytosolic release of cytochrome c, activation of caspase-9 and −3 with subsequent degradation of poly(ADP-ribose)polymerase and increased accumulation of cellular C16:0 and C24:1 ceramide species.[13,24] These cell death characteristics evocate those observed when unesterified cholesterol is involved.[33] Whereas the accumulation of MDC in autophagic vacuoles has often been suggested both *in vitro*[4,27] and *in vivo*,[3] sequestration of this dye in other normal and abnormal cytoplasmic organelles cannot be excluded. It is therefore of interest to compare different methods (including various microscopic and biochemical methods) to more precisely characterize MDC-positive cytoplasmic structures corresponding to multillamellar cytoplasmic structures (myelin figures) detected by transmission electron microscopy.[22,25]

The present investigation, with the simultaneous use of MDC, 7-ketocholesterol, CLSM and FAMIS, constituted a new method that allowed us to detect MDC-positive cytoplasmic structures in 7-ketocholesterol–treated cells and to determine the simultaneous localization of MDC and 7-ketocholesterol distribution. Colocalization of MDC and 7-ketocholesterol underlines the role of multilamellar structures in lipid storage[8,17,31] and also emphasizes the hypothesis that these structures can protect the cells against 7-ketocholesterol–induced cytotoxicity.[33] Further-

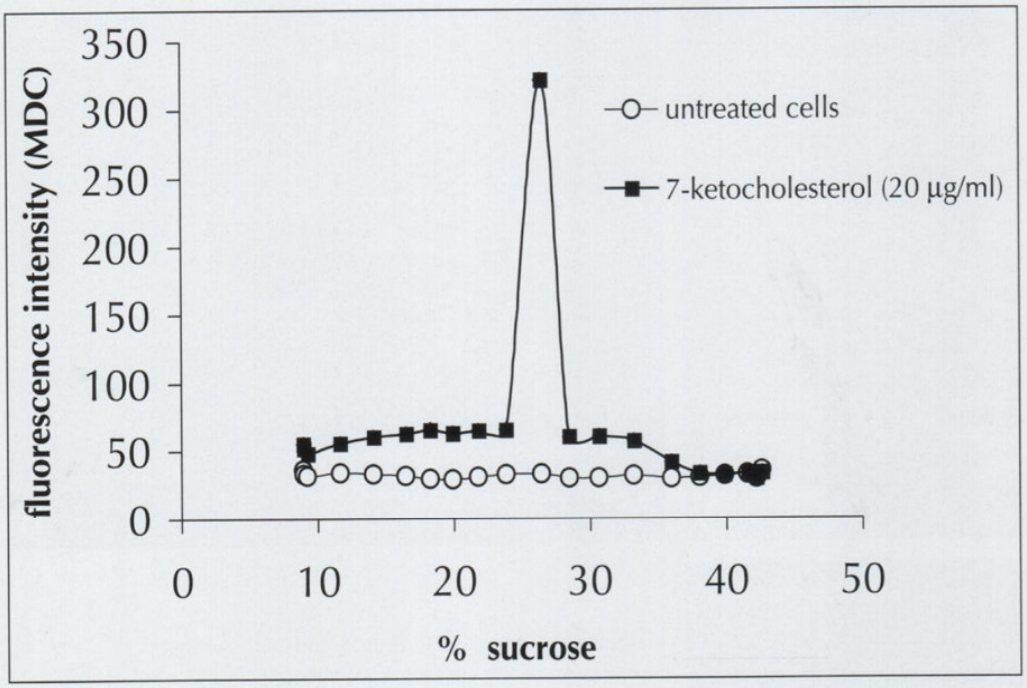


Figure 4 Subcellular fractionation of untreated and 7-ketocholesterol–treated cells on a continuous sucrose gradient (10–60%). U937 cells were cultured in the absence or presence of 7-ketocholesterol (20 µg/mL) for 24 hours, and MDC-positive structures were isolated by subcellular fractionation. Each symbol represents a subcellular fraction characterized by a given sucrose density. Whereas no fraction was fluorescent in untreated cells, the subcellular fraction of 7-ketocholesterol–treated cells corresponding to a sucrose density of 25% was strongly stained by MDC.

more, the problem of overlapping of emission signals from MDC and 7-ketocholesterol is solved when their spectral patterns are taken into account by FAMIS to determine the location of green signals inside blue fluorescence. The blue fluorescence of 7-ketocholesterol is not very intense as compared to the green fluorescence of MDC. Noisy images occur because blue signals from preparations are poor. However, the reliability of CLSM associated with FAMIS is underlined by biochemical studies. Indeed, when MDC-positive structures were isolated by subcellular fractionation and biochemically characterized by gas chromatography coupled with mass spectrometry, these methods confirmed the accumulation of 7-ketocholesterol in these structures. In the future we will use regularization methods[10] because they offer the possibility of restoring images with a better signal:noise ratio. Also, further characterization of possible green and/or blue autofluorescence will provide more specificity of MDC and 7-ketocholesterol signals. Furthermore, we will also process 4-dimensional spectral-temporal sequences of images by FAMIS to characterize possible autofluorescence and verify that green and blue fluorescence is carried by MDC and 7-ketocholesterol only. Moreover, photobleaching characterization improves spectral characterization[12] and can solve superimposition of signals but is limited by an increase in noise.

Therefore, the simultaneous use of CLSM and FAMIS constitutes a valuable method that is well adapted to study colocalization at the cellular level and opens new fields of investigation to characterize MDC-positive cytoplasmic structures and to determine their part in 7-ketocholesterol–induced cell death.

References

1. Aupeix K, Weltin D, Mejia JE, Christ M, Marchal J, Freyssinet JM, Bischoff P: Oxysterol-induced apoptosis in human monocytic cell lines. Immunobiology 1995;194:415–428
2. Benzecri JP: L'analyse des données, tome 2: L'analyse des correspondances. Paris, Dunod, 1973
3. Biederbick A, Kern HF, Elsässer HP: Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. Eur J Cell Biol 1995;66:3–14
4. Bursch W, Hochegger K, Török L, Marian B, Ellinger A, Hermann RS: Autophagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytosqueletal filaments. J Cell Science 2000;113:1189–1198
5. Di Paola R, Bazin JP, Aubry F, Aurengo A, Cavaillolès F, Herry JH, Kahn E: Handling of dynamic sequences in nuclear medecine. IEEE Trans Nucl Sci 1982;29:1310–1321
6. Frouin F, Cinotti L, Benali H, Buvat I, Bazin JP, Millet P, Di Paola R: Extraction of functional volumes from medical dynamic volumetric datasets. Comput Med Imaging Graph 1993;17:397–404
7. Garcia-Cruzet S, Carpenter KLH, Guardiola F, Stein BK, Mitchinson MJ: Oxysterol profiles of normal human arteries,

fatty streaks and advanced lesions. Free Rad Res 2001;35: 31–41

8. Hariri M, Millane G, Guimond MP, Guay G, Dennis IW, Nabi IR: Biogenesis of multilamellar bodies via autophagy. Mol Biol Cell 2000;11:255–268
9. Harman HH: Modern Factor Analysis. Chicago, University of Chicago Press, 1960
10. Kahn E, Coullin P, Frouin F, Todd-Pokropek A, Bernheim A: Improved confocal characterization of targets in nuclei of cytogenetic preparations. Analyt Quant Cytol Histol 2002;24: 178–184
11. Kahn E, Hotmar J, Frouin F, Di Paola M, Bazin JP, Di Paola R, Bernheim A: Spectral and dynamic confocal fluorescence characterization of cytogenetic preparations. Anal Cell Pathol 1996;12:45–56
12. Kahn E, Frouin F, Bruzzoni-Giovanelli H, Calvo F, Di Paola R, Linares-Cruz G: Confocal-multilabelling ultrasensitive TUNEL analysis of DNA breaks in individual cells. Analyt Quant Cytol Histol 1999;21:1–7
13. Kahn E, Lizard G, Frouin F, Bernengo JC, Souchier C, Bessède G, Clément O, Siitari H, Gambert P, Frija G, Todd-Pokropek A: Confocal analysis of phosphatidylserine externalization with the use of biotinylated annexin V revealed with streptavidin-FITC, -europium, -phycoerythrin or Texas red in oxysterol-treated apoptotic cells. Analyt Quant Cytol Histol 2001;23:47–55
14. Kahn E, Lizard G, Frouin F, Roignot P, Chardonnet Y, Di Paola R: Laser scanning confocal microscopy and factor analysis of biomedical image sequences (FAMIS) to detect and characterize HPV DNA sequences by FISH in HeLa cells. Cytometry 1997;28:269–279
15. Kahn E, Lizard G, Frouin F, Souchier C, Bernengo JC, Siitari H, Cuenod CA, Clément O, Frija G, Gambert P, Todd-Pokropek A: Confocal image characterization of human papillomavirus DNA sequences revealed with Eu in HeLa cell nuclei stained with Hoechst33342. Analyt Quant Cytol Histol 2001;23:101–108
16. Kahn E, Lizard G, Pélégrini M, Frouin F, Roignot P, Chardonnet Y, Di Paola R: Four-dimensional factor analysis of confocal images sequences (4D-FAMIS) to detect and characterize low numbers of human papillomavirus DNA by FISH in HeLa and SiHa cells. J Microsc 1999;193:227–243
17. Kielian MC, Steinman RM, Cohn ZA: Intralysosomal accumulation of polyanions: I. Fusion of pinocytic and phagocytic vacuoles with secondary lysosomes. J Cell Biol 1982;93: 866–874
18. Kroemer G, Zamzami N, Susin SA: Mitochondrial control of apoptosis. Immunol Today 1997;18:44–51
19. Littlewood TD, Bennett MR: Apoptotic cell death in atherosclerosis. Curr Opin Lipidol 2003;14:469–475
20. Lizard G, Fournel S, Genestier L, Dhedin N, Chaput C, Flacher M, Mutin M, Panaye G, Revillard JP: Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alterations in cells undergoing apoptosis. Cytometry 1995;21:275–283
21. Lizard G, Gueldry S, Sordet O, Monier S, Athias A, Miguet C, Bessède G, Lemaire S, Solary E, Gambert P: Glutathione is implied in the control of 7-ketocholesterol–induced apoptosis, which is associated with radical oxygen species production. FASEB J 1998;12:1651–1663
22. Lizard G, Moisant M, Cordelet C, Monier S, Gambert P, Lagrost L: Induction of similar features of apoptosis in human and bovine vascular endothelial cells treated by 7-ketocholesterol. J Pathol 1997;183:330–338
23. Lizard G, Monier S, Cordelet C, Gesquière L, Deckert V, Gueldry S, Lagrost L, Gambert P: Characterization and comparison of the mode of cell death, apoptosis versus necrosis, induced by 7β-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol in the cells of the vascular wall. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999;19:1190–1200
24. Miguet C, Monier S, Bettaieb A, Athias A, Bessède G, Laubriet A, Lemaire S, Néel D, Gambert P, Lizard G: Ceramide generation occurring during 7β-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol-induced apoptosis is caspase independent and is not required to trigger cell death. Cell Death Differ 2001;8:83–99
25. Miguet-Alfonsi C, Prunet C, Monier S, Bessède G, Lemaire-Ewing S, Berthier A, Ménétrier F, Néel, Gambert P, Lizard G: Analysis of oxidative processes and of myelin figures formation before and after the loss of mitochondrial transmembrane potential during 7β-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol-induced apoptosis: Comparison with various proapoptotic chemicals. Biochem Pharmacol 2002;64: 527–541
26. Monier S, Samadi M, Prunet C, Denance M, Laubriet A, Athias A, Berthier A, Steinmetz E, Jürgens G, Nègre-Salvayre A, Bessède G, Lemaire-Ewing S, Néel D, Gambert P, Lizard G: Impairment of the cytotoxic and oxidative activities of 7β-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol by esterification with oleate. Biochem Biophys Res Commun 2003;303:814–824
27. Munafo DB, Colombo MI: A novel assay to study autophagy: Regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation. J Cell Science 2001;114:3619–3629
28. Niemann A, Baltes J, Elsässer HP: Fluorescence properties and staining behavior of monodansyl pentane, a structural homologue of the lysosomotropic agent monodansylcadaverine. J Histochem Cytochem 2001;49:177–185
29. Niemann A, Takatsuki A, Elsässer HP: The lysosomotropic agent monodansylcadaverine also acts as a solvent polarity probe. J Histochem Cytochem 2000;48:251–258
30. O'Callaghan YC, Woods JA, O'Brien NM: Comparative study of the cytotoxicity and apoptosis-inducing potential of commonly occurring oxysterols. Cell Biol Toxicol 2001;17: 127–137
31. Schmitz G, Müller G: Structure and function of lamellar bodies, lipid-protein complexes involved in storage and secretion of cellular lipids. J Lipid Res 1991;32:1539–1570
32. Schroepfer GJ: Oxysterols: Modulators of cholesterol metabolism and other processes. Physiol Rev 2000;80:361–554
33. Tabas I: Consequences of cellular cholesterol accumulation: Basic concepts and physiological implications. J Clin Invest 2002;110:905–911
34. Vaya J, Aviram M, Mahmood S, Hayek T, Grenadir E, Hoffman A, Milo S: Selective distribution of oxysterols in atherosclerotic lesions and human plasma lipoproteins. Free Rad Res 2001;34:485–497

35. Zahm JM, Baconnais S, Monier S, Bonnet N, Bessède G, Gambert P, Puchelle E, Lizard G: Chronology of cellular alterations during 7-ketocholesterol-induced cell death on A7R5 rat smooth muscle cells: Analysis by time lapse-video microscopy and conventional fluorescence microscopy. Cytometry 2003;52A:57–69

36. Zamzami N, Kroemer G: Apoptosis: Mitochondrial membrane permeabilization: The (w)hole story? Curr Biol 2003; 13:R71–R73

b. Effets de différents inhibiteurs d'autophagie sur la formation des figures myéliniques

Différentes molécules capables d'inhiber le processus autophagique ont été utilisées : la wortmannine et la 3-méthyladénine qui sont des inhibiteurs de PI3-K, l'acide ocadaïque qui inhibe la protéine phosphatase 2A (Kim & Klionsky, 2000) ainsi qu'un mélange d'acides aminés qui répriment l'activité de la protéine Tor (Codogno *et al.*, 1997).

Des cellules U937 ont donc été mises en culture pendant 24 h en absence ou en présence de 7-cétocholestérol (20 µg/ml), associé ou non à de la wortmannine (W ; 10 nM), à de la 3-méthyladénine (3-MA ; 5 mM), à de l'acide ocadaïque (AO ; 7,5 nM) ou à un cocktail d'acides aminés (fourni par Pr P. Codogno), (AA ; 0,5 à 3 mM en fonction de l'acide aminé considéré) : Proline, Histidine, Méthionine, Tryptophane, Leucine, Cystéine, Acide Glutamique, Glycine, Isoleucine, Lysine, Sérine, Thréonine, Valine, Phénylalanine, Asparagine, Tyrosine, Alanine, Glutamine, Acide Aspartique, Arginine. Ces molécules ont été utilisées à des concentrations maximales non toxiques. La rapamycine (RAPA ; 20 µM) a été utilisée comme témoin positif d'induction d'autophagie (Noda *et al.*, 1998).

Dans ces conditions, dans les cellules non traitées (témoin), la proportion de cellules positives à la MDC est faible et n'excède pas 5%.

Avec le 7-cétocholestérol, la proportion de cellules positives à la MDC est de l'ordre de 90-95%.

Avec la wortmannine seule, la proportion de cellules positives à la MDC est similaire à celle du témoin. Lorsque la wortmannine est associée au 7-cétocholestérol, la proportion de cellules positives à la MDC est similaire à celle observée avec le 7-cétocholestérol.

Avec la 3-méthyladénine seule, la proportion de cellules positives à la MDC est similaire à celle du témoin. Lorsque la 3-méthyladénine est associée au 7-cétocholestérol, la proportion de cellules positives à la MDC est voisine de celle du 7-cétocholestérol seul.

Avec l'acide ocadaïque seul, la proportion de cellules positives à la MDC est similaire à celle du témoin. Lorsque l'acide ocadaïque est associé au 7-cétocholestérol, la proportion de cellules positives à la MDC est similaire à celle du 7-cétocholestérol seul.

Avec les acides aminés utilisés seuls à une concentration 4 fois supérieure à la concentration plasmatique périphérique mais proche de la concentration plasmatique au niveau de la veine porte, la proportion de cellules positives à la MDC est voisine de celle du témoin. Lorsque le 7-cétocholestérol est associé aux acides aminés, la proportion de cellules positives à la MDC est similaire à celle obtenue avec le 7-cétocholestérol (Figure 53).

Avec la rapamycine, 40% de cellules sont positives à la MDC mais les structures cytoplasmiques observées et colorées par ce fluorochrome ont de plus faibles diamètres que celles induites par le 7-cétocholestérol.

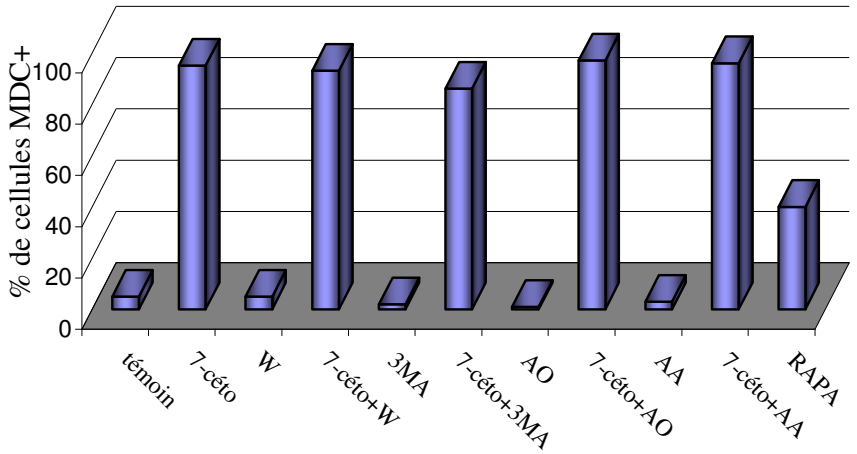


Figure 53: Effets de différents inhibiteurs d'autophagie sur le pourcentage de cellules U937 traitées ou non par le 7-cétocholestérol et colorées par la monodansylcadavérine (MDC). Les cellules U937 ont été cultivées en absence ou en présence de 7-cétocholestérol (7-céto : 20 µg/ml ; 24 h) associé ou non à différents inhibiteurs d'autophagie : wortmannine (W) à 10 nM ; 3-méthyladénine (3-MA) à 5 mM ; acide ocadaïque (AO) à 7,5 nM et cocktail d'acides aminés (AA) dont la concentration varie de 0,5 à 3 mM. MDC+ : cellules colorées par la MDC.

En raison des proportions identiques de cellules colorées par la MDC en présence de 7-cétocholestérol et en présence de 7-cétocholestérol associé à différents inhibiteurs d'autophagie, les résultats obtenus indiquent que les structures cytoplasmiques accumulant la MDC ne correspondent pas à des vacuoles d'autophagie.

c. Expression de marqueurs d'autophagie : la protéine LC3

La protéine LC3-II est considérée comme un marqueur de la membrane des vacuoles d'autophagie (Kabeya *et al.*, 2000). LC3-II, liée à la membrane, peut être formée par conversion de la forme LC3-I, cytosolique. Nous avons donc réalisé des immunomarquages de la protéine LC3 II dont la présence a été recherchée dans des cellules U937 cultivées en absence ou en présence de 7-cétocholestérol (20 µg/ml), associé ou non à de la wortmannine (10 nM) et à de la 3-méthyladénine (5 mM). La rapamycine (20 µM) a été utilisée comme témoin positif d'induction d'autophagie. L'immunomarquage a été réalisé avec l'anticorps anti-LC3-II (fourni par le Dr T Yoshimori, Japon) après 24 h de traitement (Figure 54).

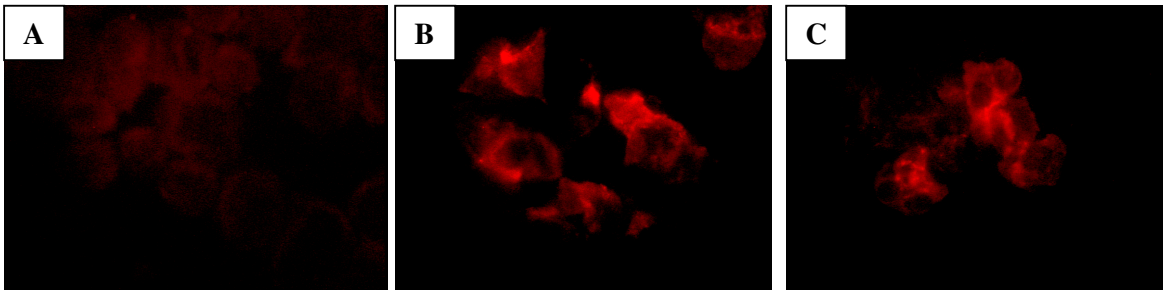


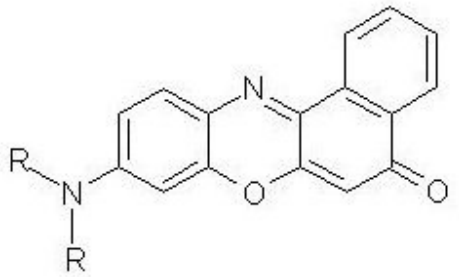
Figure 54 : Analyse de la présence de la protéine LC3-II par immunofluorescence indirecte. Des cellules U937 ont été cultivées pendant 24 h en absence (A) ou en présence de 7-cetocholestérol (20 µg/mL) (B) ou de rapamycine (20 µM) (C) ; (x 1200).

En absence de traitement (témoin), aucun marquage n'est observé. Avec le 7-cétocholestérol et la rapamycine, une fluorescence est détectée dans le cytoplasme des cellules U937. L'utilisation de wortmannine et de 3-méthyladénine (deux inhibiteurs d'autophagie) ne diminue pas le signal observé avec le 7-cétocholestérol et la rapamycine.

Ces résultats suggèrent que LC3-II ne serait pas uniquement un marqueur d'autophagie, mais pourrait avoir d'autres fonctions qui restent à identifier (Asanuma *et al.*, 2003). En effet, les différentes molécules utilisées, reconnues comme inhibant le processus autophagique, la wortmannine et la 3-méthyladénine, n'influencent en aucun cas l'intensité du marquage LC3-II.

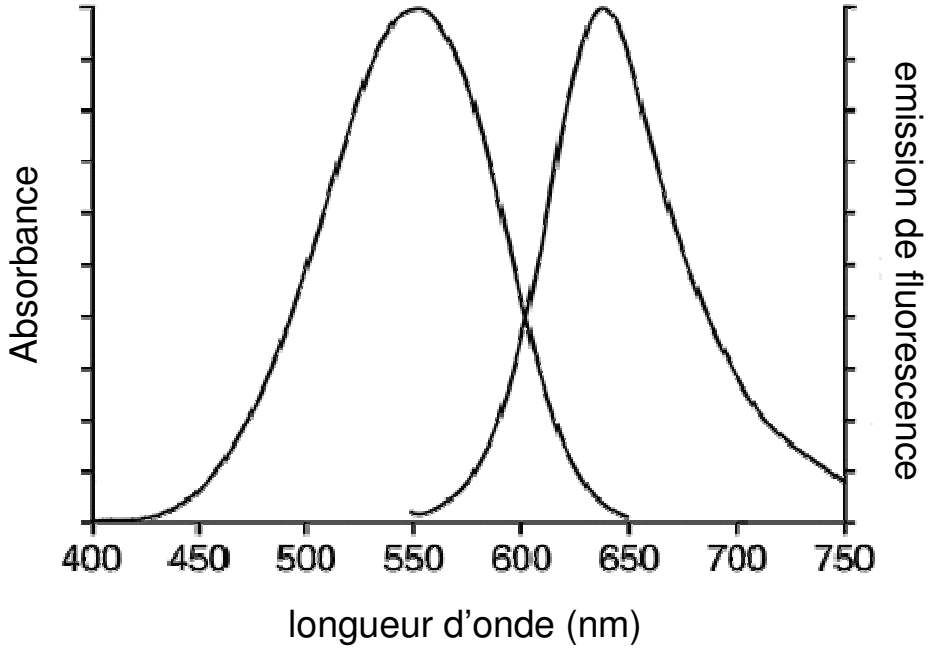
A

Nile Red



R=ethyl (C_2H_5)

B



<u>Figure 55</u> : Caractéristiques chimique et spectrales du Nile Red (http://probes.invitrogen.com)
A : Formule chimique du Nile Red
B : Spectre d'absorbance et d'émission du Nile Red lié à des phospholipides membranaires

d. Determination de la composition lipidique des figures myéliniques avec le Nile Red associé à la technique de FRET et par chromatographie en phase gazeuse associée à la spectrométrie de masse

Au cours des travaux faisant l'objet des articles 2 et 3, nous avons cherché à évaluer la composition en lipides des figures myéliniques ainsi que les relations pouvant exister entre la fluorescence du Nile Red et celle du 7-cétocholestérol dans des cellules cultivées en absence ou en présence de 7-cétocholestérol.

***ARTICLE 2: FRET multiphoton spectral imaging microscopy of 7-ketocholesterol and nile red in U937 monocytic cells loaded with 7-ketocholesterol**.

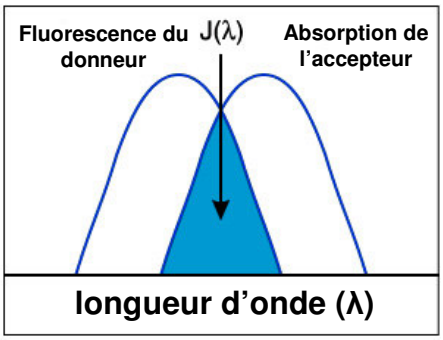
Kahn E, **Vejux A**, Dumas D, Montange T, Frouin F, Robert V, Riedinger JM, Stoltz JF, Gambert P, Todd-Pokropek A, Lizard G.

Anal Quant Cytol Histol 2004*;* **26**(6): 304-313.

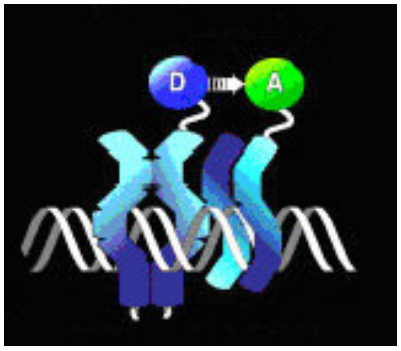
Dans l'article 2, le but du travail a été de mettre au point une technique permettant d'évaluer la composition lipidique des figures myéliniques ainsi que la localisation du 7-cétocholestérol dans les cellules. Pour réaliser cette étude, nous avons utilisé une sonde particulière ; le Nile Red, et la technique de FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) en microscopie confocale mono et biphotonique.

Le Nile Red est un colorant hydrophobe (Greenspan *et al.,* 1985) (Figure 55). Il permet de mettre en évidence les lipides neutres (esters de cholestérol, triglycérides) (λEmission 570-590 nm) et les lipides polaires (phospholipides, sphingomyéline) (λEmission 590-620 nm) lorsqu'il est excité à 488 nm. C'est une sonde intensément fluorescente en présence de lipides, relativement photostable et faiblement fluorescent en milieu aqueux (Greenspan & Fowler, 1985). Le Nile Red a été utilisé pour estimer le contenu en lipides intracellulaires lors d'études sur des oocytes de mammifères (Genicot *et al.*, 2005), dans des pathologies de la peau (Borgia *et al.*, 2005), sur des microorganismes (Kimura *et al.*, 2004) mais également dans des modèles cellulaires d'athérosclérose (Klinkner *et al.*, 1995 ; Klinkner *et al.*, 1997) pour révèler l'accumulation de lipides.

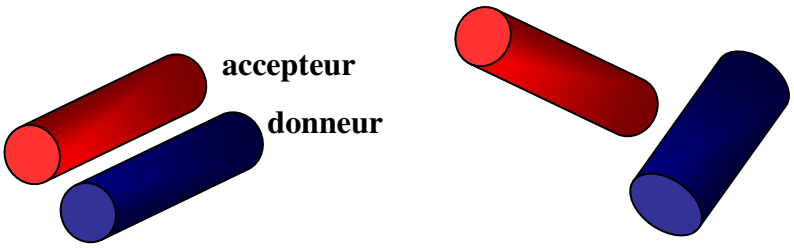
A



B



C



Dipôle Parallèle
Efficacité de FRET
plus importante

Dipôle Non Parallèle
Diminution de
l'efficacité de FRET

<u>Figure 56 :</u> Conditions requises pour le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)
(http://probes.invitrogen.com)
A : chevauchement des spectres d'émission du donneur et d'excitation de l'accepteur
B : donneur et accepteur spatialement proches
C : dipôle du donneur et de l'accepteur parallèle

Pour étudier la composition lipidique des figures myéliniques et la localisation du 7-cétocholestérol, nous avons utilisé la technique du FRET pour les raisons suivantes. Le spectre du 7-cétocholestérol (λEx_{max} = 350 nm, λEm_{max} = 420 nm) et celui du Nile Red (λEx = 488 nm ; lipides neutres : λEm = 570–590 nm ; lipides polaires : λEm = 590–620 nm) présentent des caractéristiques permettant le FRET, c'est-à-dire un chevauchement entre le spectre d'émission du 7-cétocholestérol et le spectre d'absorption du Nile Red.

Le FRET est une interaction dépendante de la distance entre l'état excité de deux fluorochromes dans laquelle l'excitation est transferée d'une molécule donneuse à une molécule acceptrice sans émission de photon. L'efficacité de FRET est dépendante de l'inverse à la puissance 6 de la distance intermoléculaire (Stryer & Haugland, 1967), ce qui rend cette approche utilisable pour l'analyse d'interactions moléculaires. Le FRET est donc une technique importante pour l'étude de nombreux phénomènes biologiques impliquant un changement de distance inter ou intra-moléculaire (Selvin, 1995 ; Berney & Danuser, 2003).

Certaines conditions sont donc requises pour qu'il y ait FRET (Figure 56):

* le spectre d'absorption de l'accepteur doit recouvrir le spectre d'émission du donneur (> 30%)

* le donneur et l'accepteur doivent être proches spatialement (typiquement entre 10-100 Å soit 1-10 nm)

* le dipôle du donneur et de l'accepteur doivent être approximativement parallèles

Les différentes mesures réalisées ont necessité des mises au point en microscopie afin d'obtenir la meilleure excitation pour que le Nile Red n'émette pas lorsque le 7-cétocholestérol est excité. En effet, si l'on excite le 7-cétocholestérol et que le Nile Red se retrouve également excité, nous ne pourrions pas établir de manière formelle qu'il y a bien FRET entre le 7-cétocholestérol et le Nile Red. Des conditions optimales de travail ont ainsi été obtenues avec une excitation biphotonique à 750 nm en microscopie confocale à balayage laser. Lorsque l'on excite les préparations avec cette longueur d'onde, aucune émission correspondante à celle du Nile Red n'est observée entre 530 et 620 nm. La microscopie biphotonique aussi appelée microscopie à fluorescence non linéaire repose sur un mécanisme très particulier d'interaction entre la lumière et les molécules chromophores. Au lieu d'apporter l'énergie par un photon unique, on l'apporte par deux photons d'énergie deux fois plus faibles émis concomitament par un laser pulsé (Ronot & Usson, 2001). Cette technique permet l'observation de cellules vivantes sans destruction et avec une pénétration dans la matière plus importante qu'en microscopie confocale monophotonique.

Dans nos conditions expérimentales, des images de FRET ont été obtenues dans les cellules U937 traitées au 7-cétocholestérol et colorées par le Nile Red essentiellement au niveau cytoplasmique. Ceci a conduit à démontrer que le 7-cétocholestérol co-localise avec le Nile Red et en particulier avec les lipides polaires (détection de fluorescence rouge).

Lors de la mise au point de cette technique, nous avons également observé que le 7-cétocholestérol était aussi localisé au niveau de la membrane cytoplasmique.

Par ailleurs, nous avons précisé que l'augmentation de la coloration au Nile Red précède la dépolarisation mitochondriale (mise en évidence par coloration au Mitotracker Rouge) ainsi que l'augmentation de la perméabilisation membranaire (révélée par l'iodure de propidium). Ceci souligne que l'accumulation de lipides polaires est un phénomène précoce survenant avant la mort cellulaire.

Article 2 :

FRET multiphoton spectral imaging microscopy of 7-ketocholesterol and nile red in U937 monocytic cells loaded with 7-ketocholesterol

Kahn E, **Vejux A**, Dumas D, Montange T, Frouin F, Robert V, Riedinger JM, Stoltz JF, Gambert P, Todd-Pokropek A, Lizard G.

Anal Quant Cytol Histol 2004*;* **26**(6): 304-313.

Analytical and Quantitative Cytology and Histology

Volume 26 **December 2004** **Number 6**

Pages 304-313

FRET Multiphoton Spectral Imaging Microscopy of 7-Ketocholesterol and Nile Red in U937 Monocytic Cells Loaded with 7-Ketocholesterol

Edmond Kahn, Ph.D., **Anne Vejux,** M.S., **Dominique Dumas,** Ph.D., **Thomas Montange,** B.S., **Frédérique Frouin,** Ph.D., **Vincent Robert,** B.S., **Jean-Marc Riedinger,** D.Pharm., **Jean-François Stoltz,** Ph.D., **Philippe Gambert,** M.D., Ph.D., **Andrew Todd-Pokropek,** Ph.D., and **Gérard Lizard,** Ph.D.

OBJECTIVE: To show the effect of 7-ketocholesterol (7KC) on cellular lipid content by means of flow cytometry and the interaction of 7KC with Nile Red (NR) via ultraviolet fluorescence resonance energy transfer (FRET) excitation of NR on U937 monocytic cells by means of 2-photon excitation confocal laser scanning microscopy (CLSM).

STUDY DESIGN: Untreated and 7KC-treated U937 cells were stained with NR and analyzed by flow cytometry and CLSM. 3D sequences of images were obtained by spectral analysis in a 2-photon excitation CLSM and analyzed by the factor analysis of medical image sequences (FAMIS) algorithm, which provides factor curves and images. Factor images are the result of the FAMIS image processing method, which handles emission spectra. In FRET analysis, preparations are screened at selected UV wavelengths to avoid emission of NR in the absence of 7KC.

RESULTS: During 7KC-induced cell death, flow cytometry and CLSM revealed a modification of the cellular lipid content. Factor images show FRET occurrence and subsequent colocalization of 7KC and NR.

CONCLUSION: This investigation established the utility of 2-photon excitation CLSM to assess colocalization of 7KC with NR by FRET and to identify and distinguish polar and neutral lipids stained by NR that accumulate from the effect of 7KC. (Analyt Quant Cytol Histol 2004;26:304–313)

Keywords: confocal laser scanning microscopy, ketocholesterols, U937 cells, computer-assisted image processing, Nile Red, mitotracker Red.

Cholesterol oxidation products (also termed oxysterols) are carbon 27 derivatives of cholesterol resulting from oxidation either on the sterol nucleus or on the side chain.[35] Among these oxysterols, 7-ketocholesterol (7KC) is able to trigger apoptosis in various cell types (including those of the vascular wall)[26,27] and to induce inflammatory and oxidative processes.[25,27,32] 7KC is frequently detected at high levels in atherosclerotic plaques,[1,6] and apoptotic cells, as well as inflammatory and oxidative reactions, are often observed in atherosclerotic lesions.[23,30,34] As a consequence, it is well accepted that 7KC probably plays important roles in the development of atherosclerosis, which can lead to myocardial infarction, cerebrovascular events and peripheral artery disease. Because the subcellular location of numerous chemicals is often related to their biologic activities,[7,28] it becomes important to define the cellular distribution of 7KC during 7KC-induced cell death. It can help to understand the structural-functional relationships of this molecule and to apply this knowledge to clinical practice. Competition between 7KC and cholesterol can modify some lipid structures and consequently alter some membrane functions)[5]; an increase in the cellular content of 7KC can disturb numerous metabolic pathways. It is also of interest to define the interactions of 7KC with cellular lipids.

To this end, human promonocytic U937 leukemia cells were cultured in the absence or presence of 7KC (20 µg/mL). The cytotoxic effects of 7KC were characterized by flow cytometry after staining with mitotracker Red[29] and propidium iodide (PI),[36] which permit measuring mitochondrial transmembrane potential and identifying dead cells, respectively. In addition, to determine the effects of 7KC on lipid content, U937 cells were stained with Nile Red (NR). NR emits yellow fluorescence in the presence of neutral lipids (cholesterol esters, triacylglycerols) and orange-red fluorescence in the presence of polar lipids (phospholipids, sphingomyelin) when it is excited by blue light.[8,22] To determine the effect of 7KC on lipid content and to obtain localization of this oxysterol inside dying cells and interaction with cellular lipids (colocalization of 7KC and NR), 3-dimensional (3-D) sequences of images were obtained by spectral analysis[37] of 7KC-treated U937 cells. They were analyzed by the factor analysis of medical image sequences (FAMIS) algorithm which provides factor curves and images.[12,13,15,18] Fluorescence resonance energy transfer (FRET) measurements were performed with a 2-photon excitation confocal laser scanning microscope (CLSM).[14,21,33] Noteworthy is that FRET provides a useful tool to assess colocalization of 7KC with NR and to separate polar and neutral lipids stained with NR, which accumulates from the effect of 7KC. Thus, the blue emission of ultraviolet (UV)–excited 7KC as donor is known, so excitation of NR occurs when colocalization exists. Therefore, a distinction can be made between emission of NR excited at 488 nm in untreated cells, and emission of NR excited by FRET resulting from the treatment of cells with 7KC.

To be sure that NR has no emission when conditions for excitation of 7KC are provided, an adjustment of UV excitation has to be made. Such tunable UV conditions are available in 2-photon excitation CLSM. Therefore, 2-photon excitation CLSM was used, and image analysis was performed on spectral sequences of images to obtain specific colocalized images of 7KC and NR. Sequences of images can be investigated by FAMIS to provide factor images corresponding to each fluorochrome. This method uses physical properties of fluorochromes (emission spectra and decay rates), according to Kahn et al,[11,13] who verified that dyes can be detected and identified through their spectral patterns[20] as well as their decay rates.[24] In addition, these dyes can be excited by UV light.[16] The present investigation assessed the utility of 2-photon excitation CLSM to identify and distinguish polar and neutral lipids stained by NR and that accumulate from the effect of 7KC and assessed colocalization of 7KC with these lipids during 7KC-induced cell death.

Materials and Methods

Cell Culture

Human promonocytic leukemia cells (U937) were grown in suspension in culture medium consisting of RPMI 1640 with Glutamax (Gibco, Eragny, France) and antibiotics (100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin) supplemented with 10% (vol/vol) heat-inactivated fetal calf serum (Gibco). The cells were seeded at 10 ×10,000/mL of culture medium and passaged twice a week. They were cultured under a 5% CO_2/95% air humidified atmosphere at 37°C.

Cell Treatment

7KC (lambdaEx$_{max}$ = 350 nm, lambdaEm$_{max}$ = 420 nm)[17,19] was provided by Sigma (L'Isle d'Abeau Chesnes, France), and its purity was determined to be 100% by gaseous phase chromatography coupled with mass spectrometry. For all experiments, stock solution of 7KC was prepared at a concentration of 800 µg/mL as previously described.[27] To obtain the initial solution, 800 µg of 7KC was dissolved in 50 µL of absolute ethanol, 950 µL of culture medium was added, and the solution was sonicated. To obtain a 20 µg/mL final concentration (corresponding to 50 µM) of 7KC, 25 µL of this initial solution was further added per milliliter of culture medium. In all experiments, 7KC was introduced into the culture medium at the beginning of the culture, and treatment with 7KC on U937 cells was carried out for different periods of time (0, 6, 14, 18, 24 and 30 hours).

Staining Conditions with Mitotracker Red

Mitochondrial transmembrane potential (delta psi m) was measured by flow cytometry with mitotracker Red (lambdaEx$_{max}$ = 578 nm, lambdaEm$_{max}$ = 599 nm) (Molecular Probes, Eugene, Oregon, U.S.A.).[29] Mitotracker Red was used at a 100 nM final concentration. After 15 minutes of incubation at 37°C, the cells were washed twice in RPMI 1640, resuspended in RPMI 1640 and immediately analyzed by flow cytometry.

Staining Conditions with Propidium Iodide

Cell viability was determined with propidium iodide (PI) (lambdaEx$_{max}$ = 540 nm, lambdaEm$_{max}$ = 625 nm) (Sigma), which stains only dead cells.[36] PI was used at a 1 µg/mL final concentration. After staining with PI (1 volume of PI at 2 µg/mL mixed with 1 volume of cell suspension), the cells were immediately analyzed by flow cytometry.

Staining Conditions with NR

NR is a phenoxazine dye that can be used on living cells to localize and quantify neutral and polar lipids.[8] This dye stains neutral lipids yellow (570–590 nm) and polar lipids orange-red (590–620 nm) when excited at 488 nm.[8,22] Moreover, the excitation and emission spectra of NR bound to phospholipid bilayer membranes, which are constituted mainly of polar lipids, are between 400 and 650 nm (lambdaEx$_{max}$ = 550 nm) and between 550 and 750 nm (Em$_{max}$ = 650 nm), respectively.[10] NR was prepared at 100 µg/mL in DMSO. After various times of treatment (0, 6, 14, 18, 24 and 30 hours) with 7KC (20 µg/mL), NR was added to the culture medium at a final concentration of 0.1 µg/mL in a cellular suspension adjusted at 10^6 cells/mL. After 15 minutes of incubation at 37°C, flow cytometric analyses were performed, or 30 µL of the cellular suspension was applied to glass slides, air dried at room temperature, mounted in mounting medium (Fluorescent Mounting Medium, Dako, Glostrup, Denmark), coverslipped and stored in the dark at 4°C until microscopy examinations. Observations by conventional fluorescence microscopy were performed with an Axioskop fluorescence microscope (Zeiss, Jena, Germany) with the following filters: (1) filter set 09 (Zeiss), excitation 450–490 nm (blue light), emission >515 nm; (2) filter set 15 (Zeiss), excitation 534–558 nm (green light), emission >590 nm. Under these

conditions, images were acquired using an AxioCam camera (Zeiss) and processed with AxioVision software (Zeiss).

Flow Cytometric Analyses

Flow cytometric analyses were performed on a CyFlow Green flow cytometer (Partec, Münster, Germany) equipped with a green laser emitting at 532 nm and working at 50 mW. Under these conditions, the fluorescence of PI was collected through a 590/10-nm band pass filter, whereas fluorescence of mitotracker Red and NR was collected through a 630-nm long pass filter. The mean fluorescence intensities of untreated and 7KC-treated U937 cells taken at various times of culture (0, 6, 14, 18, 24 and 30 hours) were measured on a logarithmic scale. For each sample, 10,000 cells were acquired, and data were analyzed with FlowMax software (Partec).

Fluorescence analysis by CLSM

Confocal observations of samples were carried out with a Leica TCS SP2 AOBS multiphoton CLSM (Leica, Wetzlar, Germany) equipped with a titanium:sapphire MIRA 900F Verdi 8-W laser (Coherent, Santa Clara, California, U.S.A.) on untreated and 7KC-treated U937 cells taken at 24 hours of culture. Images at 0.07–0.29 µm (x,y) pixel sizes were obtained for each case in 512×512 arrays depending on the required sizes of the nuclei at 63× magnification of the multiphoton CLSM. Two-photon excitation by the laser was obtained at 750 nm. This IR excitation line is equivalent to the UV excitation line, which would have been required if the 1-photon excitation CLSM mode (375 nm) had been used. The pinhole size was 60 µm. The regular acquisitions resulted in spectral sequences of 25–40 images in the 400–700-nm emission range. Nomarsky imaging, which provides a rapid means of accessing cell health and loading success and complementary four-dimensional acquisitions, which provide more information on samples than do 3-D acquisitions, were performed; in that case the z stepping was set to 0.28 µm.

Image Analysis

Following general factor analysis techniques, FAMIS[3,4] was developed to process biomedical image sequences. FAMIS assumes that each pixel is a mixture of different fluorescence patterns. The corresponding mathematical model assumes that each curve is a positively weighted sum of fundamental curves, called factor curves. Noise in these curves is assumed to be additive. Factor curves correspond to spectral emissions of the different fluorochromes on the slide. For each factor curve, the set of positive weights computed for each curve yields 1 image, or factor image. This development has to cope with mixtures of components characterized by their physical behaviors. Pixels of the images are combined into subarrays. Fluorescent image intensity curves are computed for each subarray and define the columns of an N×P rectangular array, denoted X, where N is the total number of images in the sequence and P the total number of subarrays. In the first step, called orthogonal analysis,[2,9] the array X is reconstituted using singular vectors associated with the 2 or 3 largest singular values. The second step, called oblique analysis,[3] aims to estimate factor curves representing the fundamental curves. After the orthogonal analysis, each curve is a linear combination of the 2 or 3 first singular vectors, but these vectors have no physical meaning. Due to orthogonal conditions, they have both positive and negative values and cannot be considered true spectral curves. Iterative algorithms have been proposed to find an appropriate solution—i.e., factors with physical meaning and positive weights of the curves on these factors. In the case of multispectral analysis, factor curves were selected by positivity constraints.

FAMIS synthesizes image sequences into a reduced number of images (factor images) and curves (factor curves). The latter estimate individual behaviors, such as spectral emissions in the sequence of images. Factor images correspond to spatial distribution components.

Concerning the use of FAMIS, pixels in arrays were combined according to 8×8 subarrays. These were all analyzed. Orthogonal analysis[2,9] was performed on intensity evolution of each subarray. Then oblique analysis with positivity constraints was performed on the results of orthogonal

analysis,[3] requiring positive factor curves and images. Factor images are recomputed in the original sampling by oblique projection on the factor curves, and the estimation is performed in the least-squares sense. Here, the factor curves correspond to the emission spectra of the fluorochromes. Factor images provide images of stained fluorescent structures.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed with the use of WinSTAT® software (Microsoft, Redmond, Washington, U.S.A.). The Mann-Whitney U-test was used to compare continuous variables from different groups, and data were considered statistically different at p value of 0.05.

Results

In agreement with our previous investigations performed on U937 cells,[26,31,32] 7KC exhibits strong cytotoxic activities, characterized on flow cytometry by loss of delta psi m and by increased permeability to PI. In the present study, 7KC induced a time-dependent increase in the percentage of cells with depolarized mitochondria (characterized by low values of delta psi m measured with mitotracker Red). It was associated with enhanced percentages of cells permeable to PI (Figure 1A and B) as well as with important modifications of cellular lipid content revealed both by conventional fluorescence microscopy (blue and green light excitation) and by flow cytometry (green light excitation) after staining with NR. This dye was chosen to investigate possible modifications of lipid content that occur during 7KC-induced cell death since it emits yellow or an orange-red fluorescence in the presence of neutral and polar lipids, respectively, when excited with blue light.[8,22] Thus, in untreated cells, on fluorescence microscopy (blue light excitation), punctuated yellow cytoplasmic structures were observed only, but some cellular areas emitting slight orange-red fluorescence were also found (Figure 2A).

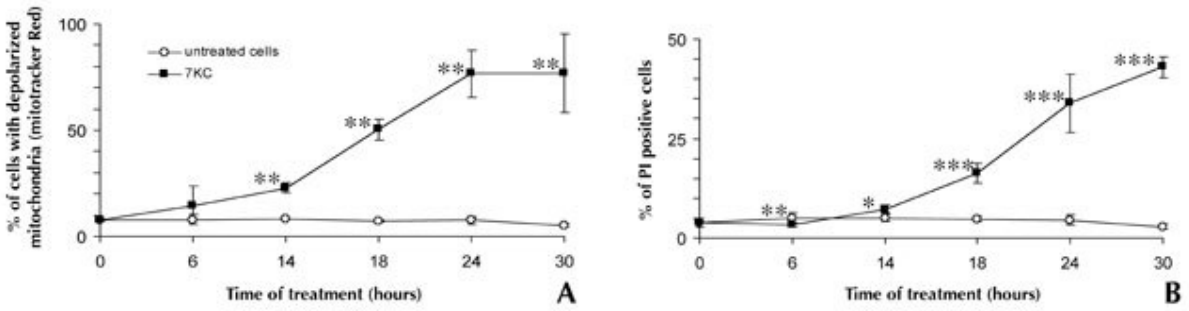


Figure 1 Time-dependent effect of 7KC on delta psi m and cellular permeability. U937 cells were cultured for various periods of time in the absence or presence of 7KC (20 µg/mL), and the effects of 7KC on cell viability were evaluated by flow cytometry with a laser emitting green light (532 nm). (A) Loss of delta psi m was measured with mitotracker Red (100 nM), and the percentages of cells with depolarized mitochondria were defined. (B) Cellular permeability was evaluated by staining with PI (1 µg/mL), and the percentages of PI-positive cells were quantified. Data are mean± SEM of 3 independent experiments performed in triplicate. *, ** And *** indicate statistically significant differences (p<0.05, 0.005 and 0.0005, respectively) between untreated and 7KC-treated cells.

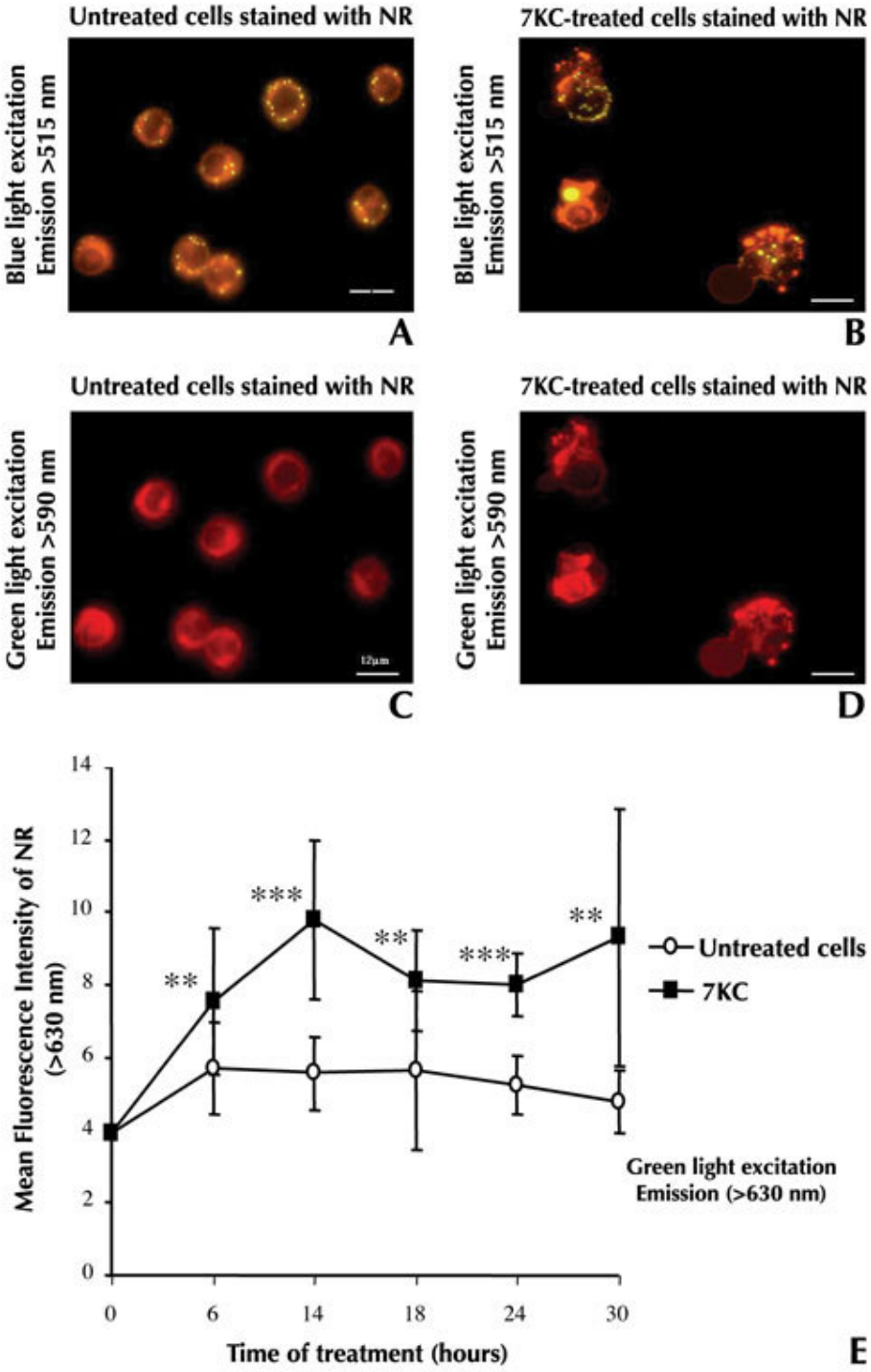


Figure 2 Effects of 7KC on cellular lipid content. U937 cells were cultured for various periods of time in the absence or presence of 7KC (20 µg/mL). The effect of 7KC on cellular lipid content was determined by fluorescence microscopy (excitation by blue or green light) and flow cytometry (excitation with a laser emitting green light [532 nm]) after staining with NR (0.1 µg/mL). NR emits yellow or orange-red fluorescence in the presence of neutral and polar lipids, respectively, when excited with blue light. On conventional fluorescence microscopy (blue light excitation), (A) some yellow cytoplasmic spots are observed in untreated cells, whereas (B) large orange-red cytoplasmic structures are present mainly in 7KC-treated cells. On conventional fluorescence microscopy (green light excitation), no yellow fluorescence is detected in either (C) untreated or (D) 7KC-treated cells, whereas large, red cytoplasmic structures are identified in 7KC-treated cells. (E) On flow cytometry, as compared to untreated cells, a rapid increase in red fluorescence (mean fluorescence intensity >630 nm) was observed in 7KC-treated cells as early as 6 hours. Data are mean ± SEM of 3 independent experiments performed in triplicate. ** And *** indicate statistically significant differences ($p<0.005$ and 0.0005, respectively) between untreated and 7KC-treated cells.

With reference to the presence of 7KC, cells with punctuated yellow cytoplasmic structures were rarely detected, whereas cells with large orange-red cytoplasmic structures (with or without containing yellow spots) were identified mainly (Figure 2B). Under excitation with green light, yellow fluorescent spots were not detected (since fluorescence emission was collected >590 nm). However, in 7KC-treated cells, large, red, cytoplasmic spots (not found in untreated cells) were present (Figure 2C and D). Therefore, under conditions used in conventional fluorescence microscopy, excitation with blue or green light permits identification of changes in neutral and polar lipid content in 7KC-treated cells. By flow cytometry, on NR-stained cells, as excitation with a green laser is not suitable for detecting and quantifying changes resulting from yellow fluorescence emission,[10] measurements were performed only on red fluorescence emission (>630 nm). Noteworthy, under these experimental conditions, is that flow cytometric analyses revealed higher red fluorescence intensity in 7KC-treated cells than in untreated cells as early as after 6 hours of culture (Figure 2E). Taken together, the present data obtained by conventional fluorescence microscopy and by flow cytometry show that 7KC modifies cellular content in neutral and polar lipids in dying cells.

By means of CLSM, in the case of regular observations in which emissions are interpreted through band pass filters only (Nomarsky and NR staining of untreated U937 cells), the excitation of NR at 488 nm, which was performed in the 1-photon excitation confocal mode, resulted in yellow-orange emission (586–605 nm), and numerous strongly fluorescent spots were visualized in the cytoplasm of cells (Figure 3). On 7KC alone (7KC-treated U937 cells), excitation at 750 nm, which was performed in the 2-photon excitation confocal mode, resulted in blue emission (412–476 nm) without green-red emission (530–620 nm) (Figure 4). This blue fluorescence emission confirmed that 7KC accumulates in 7KC-treated cells.[19] In untreated cells stained with NR, the absence of NR emission resulted from the adjustment of the excitation to 750 nm (Figure 4).

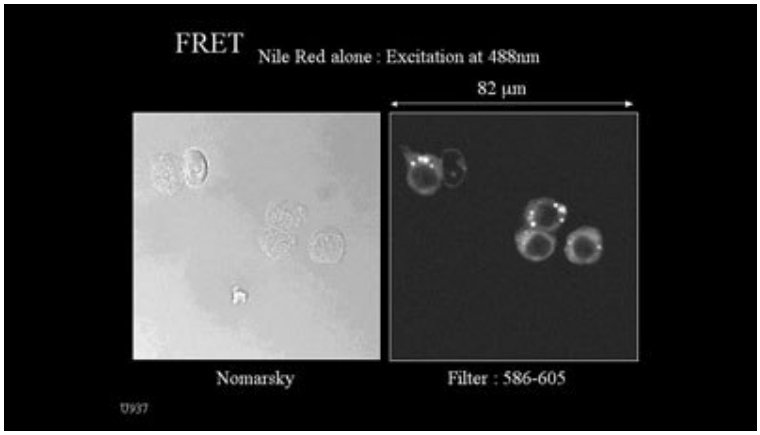


Figure 3 Untreated U937 cells cultured for 24 hours were stained with NR (0.1 µg/mL) and observed with a CLSM: Nomarsky (left) and excitation at 488 nm (right). Data shown were obtained with a CLSM working in the regular 1-photon excitation mode, and emission was collected with a yellow-orange filter (586–605 nm). Numerous strongly fluorescent spots are visualized in the cytoplasm of untreated U937 cells.

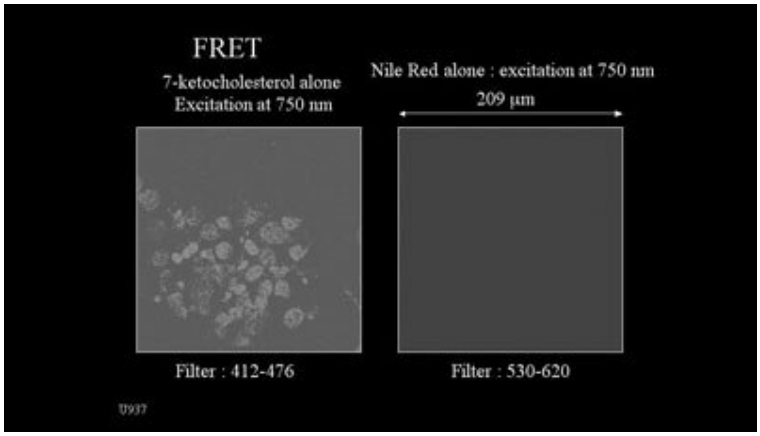


Figure 4 Adjustment of the excitation wavelength for FRET analysis. 7KC alone (left) and NR staining (0.1 µg/mL) alone (right) of U937 cells cultured in the presence or absence of 7KC (20 µg/mL) for 24 hours, respectively. Excitation at 750 nm was performed in the 2-photon excitation mode of a CLSM. 7KC emission was collected with a blue filter (412–476 nm) and NR emission with a green-red filter (530–620 nm). Adjustment of the excitation to 750 nm resulted in the absence of emission between 530 and 620 nm.

In the case of regular observation (Nomarsky and NR staining of 7KC-treated U937 cells), excitation at 750 nm of the 2-photon excitation CLSM resulted in strong green-red (530–620-nm) emission in the cytoplasm of 7KC-treated cells (Figure 5). This emission is the result of FRET between 7KC and NR.

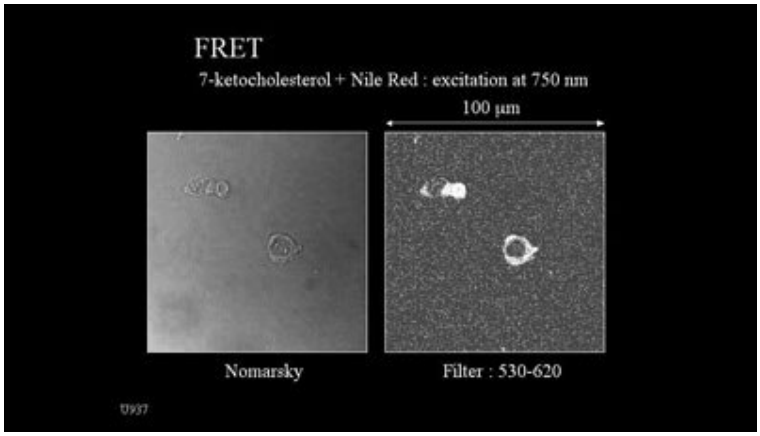


Figure 5 Occurrence of FRET between 7KC and NR. U937 cells were cultured for 24 hours in the presence of 7KC (20 µg/mL) and further stained with NR (0.1 µg/mL). Nomarsky (left) and NR staining of 7KC-treated U937 cells (right). Excitation at 750 nm was performed in the 2-photon excitation mode of a CLSM, and NR emission was collected with a green-red filter (530–620 nm). Strong fluorescence emission is visualized in the cytoplasm of 7KC-treated cells from FRET in 7KC and NR.

In the case of spectral observation in which emissions are collected through band pass filters and then processed before interpretation (NR staining of 7KC-treated U937 cells), excitation at 750 nm was performed in the 2-photon excitation confocal mode, and NR emission was collected in the spectral mode in 7-nm filters from red to blue (700—›410 nm) (Figure 6). The resulting spectral sequences were investigated by means of FAMIS. In 1 case (Figure 6A), orange-red emission (620 nm) was visualized in the cytoplasm of cells in the first factor image (on the left), and other factor images correspond to residuals. In another case (Figure 6B), orange-red emission (620 nm) was visualized throughout the cell in the first factor image (on the left), and 2 yellow (580-nm) spots were visualized in the second factor image (in the middle). The third factor image corresponds to residuals. In these 2 cases it was possible to establish a link between the factor curves and NR and to characterize the distribution of 7KC.

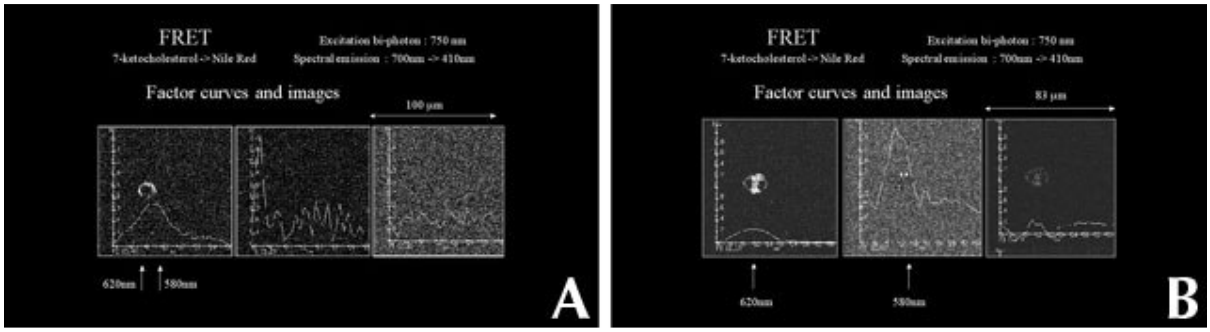


Figure 6 U937 cells were cultured for 24 hours in the presence of 7KC (20 µg/mL) and further stained with NR (0.1 µg/mL). Excitation at 750 nm was performed in the 2-photon excitation mode of a CLSM. NR emission was collected in the spectral mode in 7-nm filters from red to blue (700 —› 410 nm), and FAMIS analysis was processed. (A) Orange-red emission is visualized in the cytoplasm of cells in the first factor image (left). Other factor images correspond to residuals. (B) Orange-red emission is visualized throughout the cell in the first factor image (left), and 2 yellow spots are visualized in the second factor image (middle). The third factor image corresponds to residuals.

Visual observation validated the correspondence between factor curves and emission spectra and between factor images and stained objects.

Discussion

To determine the effect of 7KC on lipid content and to obtain its localization inside dying cells and interaction with cellular lipids, 3-D spectral sequences of images[37] of 7KC-treated U937 cells were analyzed by the FAMIS algorithm which provides factor curves and images.[12,13,15,18] Also, FRET measurements were performed with a 2-photon excitation CLSM,[19,21] taking advantage of the blue emission of UV-excited 7KC as donor to obtain excitation of NR when colocalization occurs. Therefore, a distinction can be made between emission of NR excited at 488 nm in untreated cells and emission of NR excited by FRET, resulting from the treatment of cells with 7KC. However, to be sure that NR has no emission when conditions for excitation of 7KC are given, an adjustment in UV excitation has to be made. Such tunable UV conditions are available in a 2-photon excitation CLSM, where excitation by the laser can be set to 750 nm. This IR excitation line is equivalent to a UV excitation line (375 nm), which would have been required if the 1-photon excitation CLSM mode had been used.

Investigations performed by flow cytometry with a green laser on untreated and 7KC-treated U937 cells stained with mitotracker Red and PI confirmed that the accumulation of 7KC inside cells has potent cytotoxic effects. They are associated with a rapid loss of mitochondrial transmembrane potential and with increased permeability to PI.[17,27,32] Moreover, important modifications of the cellular lipid content were revealed with NR, which emits yellow fluorescence in the presence of neutral lipids (cholesterol esters, triacylglycerols) and orange-red fluorescence in the presence of polar lipids (phospholipids, sphingomyelin) when it is excited by blue light.[8,22] Using flow cytometry and various methods of microscopy (conventional fluorescence microscopy, FRET 2-photon excitation CLSM) performed on NR-stained U937 cells loaded with 7KC, important modifications of lipid content were observed, especially a rapid increase in polar lipids quantified by flow cytometry. This increase in polar lipids in 7KC-treated cells is in agreement with an accumulation of phosphatidylcholin and sphingomyelin previously observed during 7KC-induced cell death.[19] In addition, by means of FRET performed in the 2-photon excitation mode of CLSM interactions between 7KC, neutral and polar lipids were shown.

Use of the FAMIS image processing technique leads to a differentiation of superimposed orange-red and yellow emissions. Though yellow spots are observed in a factor image of untreated cells, orange-red cytoplasmic structures are visible mainly in a factor image of 7KC-treated cells. However, as shown by this spectral analysis, structures can or cannot be associated with yellow spots. FAMIS performed on NR-stained U937 cells loaded with 7KC also indicates a change in lipid content: orange-red cytoplasmic structures (polar lipids) are more frequently detected in 7KC-treated cells than are yellow cytoplasmic structures (neutral lipids). In addition, colocalization of 7KC as donor and of NR-stained lipids as acceptor is demonstrated on the basis of FRET microscopy (simultaneous emission of yellow and orange-red fluorescence). Colocalization is specific and reliable since it is based on spectral 2-photon excitation CLSM and FAMIS image processing: a specific excitation wavelength can be determined to avoid any emission of NR alone at the same excitation wavelength (750 nm).

In conclusion, the present investigation established the utility of 2-photon excitation CLSM in assessing colocalization of 7KC with NR-stained lipids (including neutral and polar lipids) by FRET and identified and distinguished polar and neutral lipids stained by NR that accumulate from the effect of 7KC. Prospectively, the ability to precisely localize 7KC inside cells during 7KC-induced cell death by using spectral 2-photon excitation CLSM, FRET and FAMIS image processing will permit determination of the sequential accumulation of 7KC inside the cell at various stages of cell death and identification of the cellular compartments (and subsequently the metabolic pathways) that can contribute to the activation of cellular processes involved in the initiation and/or propagation of cell death signals triggered by 7KC.

Acknowledgments

We would like to thank Roberta S. Tish for her assistance in the editing of this paper.

References

1. Brown AJ, Jessup W: Oxysterols and atherosclerosis. Atherosclerosis 1999;142:1–28
2. Benzecri JP: L'analyse des données, Tome 2. L'analyse des correspondances. Paris, Dunod, 1973
3. Di Paola R, Bazin JP, Aubry F, Aurengo A, Cavaillolès F, Herry JH, Kahn E: Handling of dynamic sequences in nuclear medecine. IEEE Trans Nucl Sci 1982;29:1310–1321
4. Frouin F, Cinotti L, Benali H, Buvat I, Bazin JP, Millet P, Di Paola R: Extraction of functional volumes from medical dynamic volumetric datasets. Comp Med Imaging Graph 1993;17:397–404
5. Garcia-Cruset S, Carpenter KLH, Codony R, Gardiola F. Cholesterol oxidation products and atherosclerosis. *In* Cholesterol and Phytosterol Oxidation Products: Analysis, Occurrence, and Biological Effects. Edited by F Guardiola, PC Dutta, R Codony, GP Savage. Champaign, Illinois, American Oil Chemists' Society Press, 2002, pp 241–277
6. Garcia-Cruset S, Carpenter KLH, Guardiola F, Stein BK, Mitchinson MJ: Oxysterol profiles of normal human arteries, fatty streaks and advanced lesions. Free Rad Res 2001;35:31–41
7. Gigli M, Rasoanaivo TM, Millot JM, Jeannesson P, Rizzo V, Jardillier JC, Arcamone F, Manfait M: Correlation between growth inhibition and intranuclear doxorubicin and 4'-deoxy-4'-iododoxorubicin quantitated in living K562 cells by microspectrofluorometry. Cancer Res 1989;49:560–564
8. Greenspan P, Fowler SD. Spectrofluorometric studies of the lipid probe, nile red. J Lipid Res 1985;26:781–789
9. Harman HH: Modern Factor Analysis. Chicago, University of Chicago Press, 1960
10. Haugland RP: Handbook of Fluorescent Probes and Research Products: Molecular Probes. Ninth edition. Eugene, Oregon, U.S.A., Molecular Probes, 2002
11. Kahn E: Confocal microscopy: Characterization of fluorescent tracers by image processing of optical sections. Pathol Biol 2001;49:194–198
12. Kahn E, Frouin F, Souchier C, Bernengo JC, Bruzzoni-Giovanelli H, Clement O, Frija G, Di Paola R, Calvo F, Linares-Cruz G: Confocal multilaser focusing and single-laser characterization of UV excitable stains of cellular preparations. Cytometry 2000;40:42–49
13. Kahn E, Hotmar J, Frouin F, Di Paola M, Bazin JP, Di Paola R, Bernheim A: Spectral and dynamic confocal fluorescence characterization of cytogenetic preparations. Anal Cell Pathol 1996;12:45–56
14. Kahn E, Lizard G, Dumas D, Frouin F, Menetrier F, Stoltz J-F, Todd-Pokropek A: Analysis of fluorescent MRI contrast agent behavior in the liver and thoracic aorta of mice. Analyt Quant Cytol Histol (in press)
15. Kahn E, Lizard G, Frouin F, Roignot P, Chardonnet Y, Di Paola R: Laser scanning confocal microscopy and factor analysis of biomedical image sequences (FAMIS) to detect and characterize HPV DNA sequences by FISH in HeLa cells. Cytometry 1997;28:269–279
16. Kahn E, Lizard G, Frouin F, Souchier C, Bernengo JC, Siitari H, Cuenod CA, Clement O, Frija G, Gambert P, Todd-Pokropek A: Confocal image characterization of human papillomavirus DNA sequences revealed with Europium in Hela cell nuclei stained with Hoechst 33342. Analyt Quant Cytol Histol 2001;23:101–108
17. Kahn E, Lizard G, Monier S, Bessède G, Frouin F, Gambert P, Todd-Pokropek A: Flow cytometry and factor analysis evaluation of confocal image sequences of morphologic and functional changes occurring at the mitochondrial level during 7-ketocholesterol-induced cell death. Analyt Quant Cytol Histol 2002;24:355–362
18. Kahn E, Lizard G, Pélégrini M, Frouin F, Roignot P, Chardonnet Y, Di Paola R: Four-dimensional factor analysis of confocal images sequences (4D-FAMIS) to detect and characterize low numbers of human papillomavirus DNA by FISH in HeLa and SiHa cells. J Microscopy 1999;193:227–243
19. Kahn E, Vejux A, Lizard G, Bessède G, Frouin F, Prunet C, Bernengo JC, Brau F, Todd-Pokropek A, Gambert P: Analysis of the fluorescence of monodansylcadaverine-positive cytoplasmic structures during 7-ketocholesterol-induced cell death. Analyt Quant Cytol Histol 2004;26:47–56

20. Kawata S, Sasaki K, Minami S: Component analysis of spatial and spectral patterns in multispectral images: I. Basis. J Opt Soc A Opt Image Sci Vis 1987;4:2101–2106
21. Kenworthy AK: Imaging protein-protein interactions using fluorescence resonance energy transfer microscopy. Methods 2001;24:289–296
22. Klinkner AM, Bugelski PJ, Waites R, Louden C, Hart TK, Kerns WD: A novel technique for mapping the lipid composition of atherosclerotic fatty streaks by en face fluorescence microscopy. J Histochem Cytochem 1997;45:743–753
23. Kockx MM, Knaapen MWM: The role of apoptosis in vascular disease. J Pathol 2000;190:267–280
24. Lansing Taylor D, Waggoner AS, Murphy RF, Lanni F, Birge RR (editors): Applications of Fluorescence in the Biomedical Sciences. New York, Alan R Liss, 1986, pp 129–140
25. Lemaire S, Lizard G, Monier S, Miguet C, Gueldry S, Volot F, Gambert P, Néel D: Different patterns of IL-1beta secretion, adhesion molecule expression and apoptosis induction in human endothelial cells treated with 7alpha-, 7beta-hydroxycholesterol, or 7-ketocholesterol. FEBS Lett 1998;440:434–439
26. Lizard G, Monier S, Cordelet C, Gesquière L, Deckert V, Gueldry S, Lagrost L, Gambert P: Characterization and comparison of the mode of cell death, apoptosis versus necrosis, induced by 7beta-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol in the cells of the vascular wall. Arterisocler Thromb Vasc Biol 1999;19:1190–1200
27. Lizard G, Gueldry S, Sordet O, Monier S, Athias A, Miguet C, Bessède G, Lemaire S, Solary E, Gambert P: Glutathione is implied in the control of 7-ketocholesterol-induced apoptosis, which is associated with radical oxygen species production. FASEB J 1998;12:1651–1663
28. Lockyer PJ, Bottomley JR, Reynolds JS, McNulty TJ, Venkateswarlu K, Potter BV, Dempsey CE, Cullen PJ: Distinct subcellular localisations of the putative inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate receptors GAP1IP4BP and GAP1m result from the GAP1IP4BP PH domain directing plasma membrane targeting. Curr Biol 1997;7:1007–1010
29. Macho A, Decaudin D, Castedo M, Hirsch T, Susin SA, Zamzami N, Kroemer G: Chloromethyl-X-Rosamine is an aldehyde-fixable potential-sensitive fluorochrome for the detection of early apoptosis. Cytometry 1996;25:333–340
30. Mallat Z, Tedgui A: Apoptosis in the vasculature: Mechanisms and functional importance. Br J Pharmacol 2000;130:947–962
31. Miguet C, Monier S, Bettaieb A, Athias A, Bessède G, Laubriet A, Lemaire A, Néel D, Gambert P, Lizard G: Ceramide generation occuring during 7beta-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol-induced apoptosis is caspase independent and is not required to trigger cell death. Cell Death Differ 2001;8:83–99
32. Miguet-Alfonsi C, Prunet C, Monier S, Bessède G, Lemaire-Ewing S, Berthier A, Ménétrier F, Néel D, Gambert P, Lizard G. Analysis of oxidative processes and of myelin figures formation before and after the loss of mitochondrial transmembrane potential during 7beta-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol-induced apoptosis: Comparison with various pro-apoptotic chemicals. Biochem Pharmacol 2002;64:527–541
33. Pawley J (editor): Handbook of Biological Confocal Microscopy, Second edition. New York, Plenum Press, 1995
34. Rosenfeld ME: An overview of the evolution of the atherosclerotic plaque: From fatty streak to plaque rupture and thrombosis. Z Kardiol (suppl 7) 2000;89:VII/2–VII/6
35. Smith LL: Review of progress in sterol oxidations: 1987-1995. Lipids 1996;31:453–457
36. Yeh CG, His B, Faulk WP: Propidium iodide as a nuclear marker in immunofluorescence: II. Use with cellular identification and viability studies. J Immunol Methods 1981;43:269–275
37. Zimmermann T, Rietdorf J, Pepperkok R: Spectral imaging and its applications in live cell microscopy. FEBS Lett 2003;546:87–92

From Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U494, Centre Hospitalier Universitaire, Pitié-Salpêtrière, Paris; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U498, Institut Fédératif de Recherche 100, Hôpital du Bocage, and Centre Régional de Lutte contre le Cancer GF Leclerc, Laboratoire de Biologie Médicale, Dijon; and Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 7563, Laboratoire de Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, Institut Fédératif de Recherche 111, Faculté de Médecine de Nancy, Vandoeuvre les Nancy, France.

Dr. Kahn is Director of Research, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U494, Centre Hospitalier Universitaire, Pitié-Salpêtrière.

Ms. Vejux is Doctoral Candidate, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U498, Institut Fédératif de Recherche 100, Hôpital du Bocage.

Dr. Dumas is Research Engineer, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 7563, Laboratoire de Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, Institut Fédératif de Recherche 111, Faculté de Médecine de Nancy.

Mr. Montange is Assistant Engineer, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U498, Institut Fédératif de Recherche 100, Hôpital du Bocage.

Dr. Frouin is Head of Research, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U494, Centre Hospitalier Universitaire, Pitié-Salpêtrière.

Mr. Robert is Technician, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U498, Institut Fédératif de Recherche 100, Hôpital du Bocage.

Dr. Riedinger is Head, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U498, Institut Fédératif de Recherche 100, Hôpital du Bocage.

Dr. Stoltz is Professor of Hematology and Director, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 7563, Laboratoire de Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, Institut Fédératif de Recherche 111, Faculté de Médecine de Nancy.

Dr. Gambert is Professor of Medical Biochemistry and Director, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U498, Institut Fédératif de Recherche 100, Hôpital du Bocage.

Dr. Todd-Pokropek is Professor of Medical Physics and Director, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U494, Centre Hospitalier Universitaire, Pitié-Salpêtrière.

Dr. Lizard is Head of Research, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U498, Institut Fédératif de Recherche 100, Hôpital du Bocage.

Supported in part by grants from the Conseil Régional de Bourgogne and the Ligue Contre le Cancer de Côte d'or.

Address reprint requests to: Edmond Kahn, Ph.D., Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U494, Centre Hospitalier Universitaire, Pitié-Salpêtrière, 75634 Paris Cedex 13, France.

Financial Disclosure: The authors have no connection to any companies or products mentioned in this article

***ARTICLE 3 : 7-Ketocholesterol favors lipid accumulation and colocalizes with Nile Red positive cytoplasmic structures formed during 7-ketocholesterol-induced apoptosis: Analysis by flow cytometry, FRET biphoton spectral imaging microscopy, and subcellular fractionation.**

Vejux A, Kahn E, Dumas D, Bessède G, Menetrier F, Athias A, Riedinger JM, Frouin F, Stoltz JF, Ogier-Denis E, Todd-Pokropek A, Lizard G.

Cytometry 64A(2):87-100

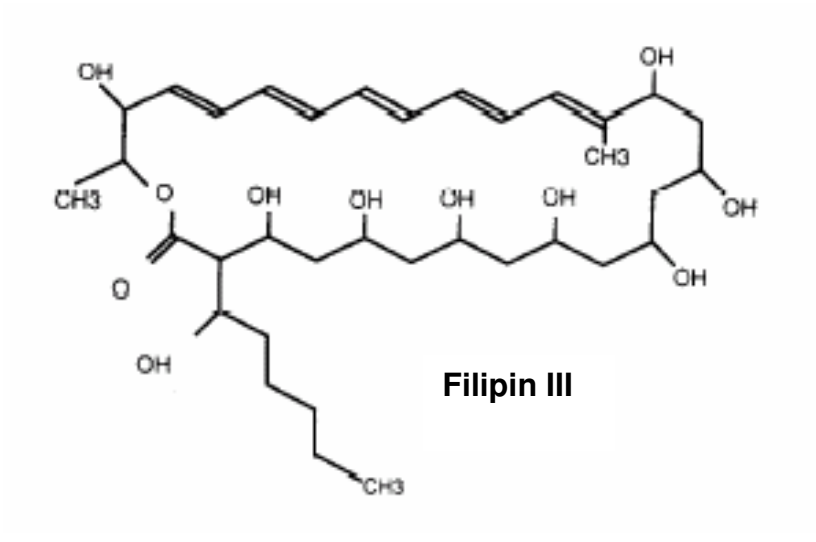
Dans l'article 3, compte-tenu des résultats de l'article 2 ayant permis la mise au point méthodologique du FRET en microscopie confocale, nous avons réalisé une étude plus fine d'une part de l'accumulation de lipides dans des cellules U937 traitées par le 7-cétocholestérol et d'autre part de la co-localisation du 7-cétocholestérol et du Nile Red. Cette étude a par ailleurs été associée à des analyses biochimiques des lipides contenus dans les figures myéliniques colorées au Nile Red par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM).

Nous avons par ailleurs utilisé un certain nombre de tests pour évaluer et caractériser la mort cellulaire. Nous avons utilisé le $DiOC_6(3)$ pour étudier les variations du potentiel de membrane mitochondrial, l'iodure de propidium pour évaluer la perméabilité membranaire, le Hoechst 33342 pour caractériser les cellules mortes (apoptotiques : cellules avec des noyaux condensés/fragmentés et oncotiques : cellules avec des noyaux gonflés). Ceci nous a permis de positionner précisément le processus d'accumulation de lipides par rapport à celui de la mort cellulaire.

L'effet du 7-cétocholestérol sur la composition en lipides intracellulaires a été évalué en utilisant deux sondes : le Nile Red et la filipine.

La filipine est un antibiotique macrolide polyène (Figure 57) issu de *Streptomyces lipinensis,* qui interagit spécifiquement avec le cholestérol (Hassall, 1992 ; Hassall & Graham, 1995). La Filipin III est le composant principal des 8 composants isomériques de la filipine. Ce fluorochrome est décrit pour révéler le cholestérol non estérifié (Hassall, 1992 ; Hassall & Graham, 1995).

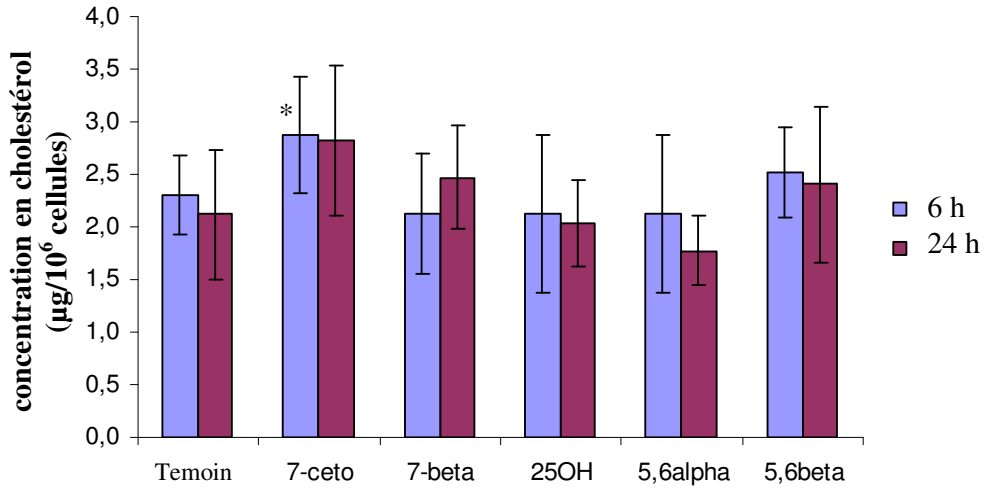
Il a été démontré par cytométrie en flux et/ou par microscopie confocale biphotonique associée à la technique de FRET que le 7-cétocholestérol induit une accumulation de cholestérol non-estérifié et de lipides polaires et co-localise avec les lipides cellulaires colorés par le Nile Red. Des analyses biochimiques complémentaires (CPG/SM) ont confirmé que ces structures colorées par le Nile Red sont riches en cholestérol (estérifié et non-estérifié), ainsi qu'en lipides polaires, du



<u>Figure 57 :</u> Formule chimique de la filipine utilisée pour identifier le cholestérol non-estérifié (http://www.sigmaaldrich.com).

type phospholipides, comme la sphingomyéline et la phosphatidylcholine. Le 7-cétocholestérol (7-ceto) a aussi été identifié en quantité importante dans ces structures.

Ces résultats ont conduit à préciser les effets d'autres oxystérols (7β-hydrocholestérol (7-beta), 25-hydroxycholestérol (25OH), 5,6α-epoxycholestérol (5,6alpha), 5,6β-epoxycholestérol (5,6beta)) sur l'accumulation de cholestérol intracellulaire en utilisant la chromatographie en phase gazeuse (Figure 58). En effet, le 7-cétocholestérol n'étant pas le seul oxystérol présent au niveau des plaques d'athérosclérose, il est important d'étudier également les effets des autres oxystérols identifiés.



<u>Figure 58 :</u> Analyse du cholestérol cellulaire en chromatographie en phase gazeuse après extraction selon la méthode de Folch (Folch *et al.,* 1957)**.** (* : $p < 0,05$, comparaison des essais par rapport au témoin (cellules non-traitées))

Parmi les oxystérols étudiés, le 7-cétocholestérol est celui qui induit la plus forte accumulation de cholestérol dans les cellules dès 6 h de traitement de manière significative ($p<0,05$; test de Mann & Whitney). Cette observation suggère que parmi les différents oxystérols présents au niveau de la plaque d'athérosclérose (Brown & Jessup, 1999), le 7-cétocholestérol participerait le plus activement à la formation de cellules spumeuses.

En conclusion, la mort cellulaire induite par le 7-cétocholestérol, aboutissant à la fois à la formation de cellules apoptotiques et oncotiques, est précédée par d'importants désordres lipidiques incluant l'accumulation de lipides polaires (phosphatidylcholine, sphingomyéline) dans des structures cytoplasmiques multilamellaires (appelées figures myéliniques) également riches en 7-cétocholestérol et en cholestérol.

Article 3 :

7-Ketocholesterol favors lipid accumulation and colocalizes with Nile Red positive cytoplasmic structures formed during 7-ketocholesterol-induced apoptosis: Analysis by flow cytometry, FRET biphoton spectral imaging microscopy, and subcellular fractionation.

Vejux A, Kahn E, Dumas D, Bessède G, Menetrier F, Athias A, Riedinger JM, Frouin F, Stoltz JF, Ogier-Denis E, Todd-Pokropek A, Lizard G

Cytometry 64A(2):87-100

© 2005 Wiley-Liss, Inc. Cytometry Part A 64A:87–100 (2005)

7-Ketocholesterol Favors Lipid Accumulation and Colocalizes With Nile Red Positive Cytoplasmic Structures Formed During 7-Ketocholesterol–Induced Apoptosis: Analysis by Flow Cytometry, FRET Biphoton Spectral Imaging Microscopy, and Subcellular Fractionation

Anne Vejux,[1] Edmond Kahn,[4] Dominique Dumas,[2] Ginette Bessède,[1] Franck Ménétrier,[1] Anne Athias,[1] Jean-Marc Riedinger,[3] Frédérique Frouin,[4] Jean-François Stoltz,[2] Eric Ogier-Denis,[5] Andrew Todd-Pokropek,[4] and Gérard Lizard[1]*

[1]INSERM U498, Hôpital du Bocage, Dijon, France
[2]CNRS UMR7563, Laboratoire de Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, Faculté de Médecine de Nancy, Vandoeuvre les Nancy, France
[3]Centre Anti-Cancer GF Leclerc, Laboratoire de Biologie Médicale, Dijon, France
[4]INSERM U494, CHU Pitié-Salpêtrière, Paris, France
[5]INSERM U479, Faculté de Médecine X Bichat, Paris, France

Received 1 June 2004; Revision Received 23 November 2004; Accepted 9 December 2004

Background: Oxidized low-density lipoproteins play key roles in atherosclerosis. Their toxicity is at least in part due to 7-ketocholesterol (7KC), which is a potent inducer of apoptosis. In this study on human promonocytic U937 cells, we determined the effects and the interactions of 7KC with cellular lipids during 7KC-induced apoptosis.
Methods: Morphologic and functional changes were investigated by microscopic and flow cytometric methods after staining with propidium iodide, 3,3′-dihexyloxacarbocyanine iodide, and Hoechst 33342. Cellular lipid content was identified by using filipin to quantify free cholesterol and Nile Red (NR), which emit a yellow or orange-red fluorescence in the presence of neutral and polar lipids, respectively. After staining with NR, interactions of 7KC with cellular lipids were identified by fluorescence resonance energy transfer biphoton spectral imaging confocal microscopy and by subcellular fractionation, gas chromatography, and mass spectrometry.
Results: During 7KC-induced apoptosis the fluorescence from filipin and the ratio of measured (orange-red vs. yellow) fluorescence of NR were enhanced. Spectral analysis of images obtained in biphoton mode and resulting factor images demonstrated the occurrence of fluorescence resonance energy transfer between 7KC and NR and the subsequent colocalization of 7KC and NR. These data were in agreement with biochemical characterization and demonstrated that 7KC and neutral and polar lipids accumulate in NR-stained cytoplasmic structures.
Conclusions: During 7KC-induced apoptosis, 7KC modifies the cellular content of neutral and polar lipids, favors free cholesterol accumulation, and colocalizes with neutral and polar lipids that are inside NR-stained cytoplasmic structures. © 2005 Wiley-Liss, Inc.

Key terms: 7-ketocholesterol; filipin; Nile Red; biphoton confocal microscopy; spectral analysis; subcellular fractionation

Frequent cardiovascular diseases including myocardial infarctions, cerebrovascular events, and peripheral artery diseases are direct consequences of atherosclerosis, which is a slow, multifactorial, degenerative pathology mainly caused by hypertension, cigarette smoking, diabetes, and/or hyperlipidemia (1,2). Histologically, atherosclerosis is characterized by a remodeling of the arterial wall, which leads to the formation of an atherosclerotic plaque. It results from the accumulation at the subendothelial level of oxidized low-density lipoproteins (Ox-LDL), some of their lipid components (oxysterols, oxidized fatty acids, aldehydes, lysophospholipids), fibrous elements, and inflammatory cells (3,4). Because Ox-LDL can induce an apoptotic mode of cell death in a variety of cells (5), it is currently acknowledged that they

Edmond Kahn and Gérard Lizard contributed equally to this report.

Contract grant sponsor: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale; Contract grant sponsor: Ligue Régionale Contre le Cancer de Côte d'Or; Contract grant sponsor: Conseil Régional de Bourgogne.

*Correspondence to: Dr. Gérard Lizard, CHU/Hôpital du Bocage, Laboratoire de Biochimie Médicale, INSERM U498, BP 77908, 21079 Dijon Cedex, France.
E-mail: gerard.lizard@chu-dijon.fr

Published online 28 February 2005 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).
DOI: 10.1002/cyto.a.20124

favor apoptosis in atherosclerotic plaques (6). In rabbit aortic endothelial cells, it was demonstrated that cellular injuries triggered by Ox-LDL were attributable to their oxysterol content, especially, 7-ketocholesterol (7KC), 7β-hydroxycholesterol, 7α-hydroxycholesterol, 5α-6α-epoxycholesterol, and 5β-6β-epoxycholesterol (7). Most of these oxysterols are frequently present at increased levels in atherosclerotic lesions. 7KC, which is the most prominent (8), mimics some aspects of the cytotoxicity of Ox-LDL on cells of the vascular wall (endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages), including the ability to induce apoptosis (9). Therefore, because apoptosis of smooth muscle cells and macrophages can promote coagulation and lead to plaque rupture, the involvement of 7KC in atherosclerosis is widely suspected (5). Because the subcellular localization of numerous chemicals often has been relied on for their biological activities (10,11), it is important to determine the cellular distribution of 7KC during 7KC-induced apoptosis. This is important to obtain an understanding of the structure–function relation of this molecule and to apply this knowledge to clinical practice. Moreover, because an increased cellular content of 7KC can disturb numerous metabolic pathways (competition between 7KC and cholesterol can modify some lipid structures and, hence, alter some membrane functions) (12), it is of interest to know the precise interactions of 7KC with cellular lipids. Therefore, we investigated the effects and interactions of 7KC with cellular lipids during 7KC-induced apoptosis.

Some approaches are currently available to localize chemicals at the cellular level. Among them, subcellular fractionation, frequently associated with complementary analytical methods, constitutes a powerful technique (13,14). However, various methods of investigation based mainly on microscopic approaches are currently available to characterize different types of molecules inside cells such as Raman spectroscopy (15), laser microspectrofluorometry, and confocal microscopy that allow identification and localization of fluorescent compounds (16,17). One main interest of fluorescent methods is the ability to colocalize stained structures in whole cells by using fluorescence resonance energy transfer (FRET) (18). FRET is a distance-dependent interaction between excited states of two fluorescent molecules. Excitation is transferred from a donor molecule to an acceptor molecule without emission of a photon, and its efficiency is dependent on the inverse sixth power of the intermolecular separation, so that donor and acceptor molecules must be in close proximity (typically 1.0–10.0 nm) (19,20).

Numerous multilamellar cytoplasmic structures (myelin figures) considered to be lipid storage organelles (21) were previously observed in apoptotically dying cells treated with 7KC (22–24) and in aortic cells from cholesterol-fed rabbits (25,26). In the present study the effects of 7KC on cellular lipid content were investigated by flow cytometry after staining with filipin and Nile Red (NR). Filipin permits quantification of free cholesterol (27,28) and NR emits a yellow or orange-red fluorescence in the presence of neutral lipids (esterified cholesterol) and polar lipids (phospholipids), respectively, when excited with blue light (29). Because intracellular accumulation of 7KC can disturb numerous metabolic pathways (12), interactions between 7KC and NR-stained cellular lipids were determined by FRET on spectral images obtained in the biphoton excitation mode of confocal microscopy (30). These images were analyzed by the Factor Analysis of Medical Image Sequences (FAMIS) algorithm, which provides factor curves and images (31,32). The ability to colocalize 7KC (emitting a blue fluorescence under ultraviolet [UV] light) (33) and cellular lipids stained with NR is possible because of the overlap of the emission spectra of 7KC with the excitation spectra of NR (33–35). In addition, subcellular fractionation associated with gas chromatography and mass spectrometry was used to characterize NR-positive cytoplasmic structures.

Under these conditions, when U937 cells are treated with 7KC (20 μg/ml) for different periods (06, 14, 18, 24, and 30 h) and stained with filipin or NR, several observations can be obtained. Fluorescence associated with filipin is higher in 7KC-treated cells than in untreated cells. In 7KC-treated cells large orange-red cytoplasmic structures (containing or not containing yellow spots) are identified, and an important increase of the ratio of fluorescence (orange-red/yellow; evaluating the ratio of polar lipids to neutral lipids per cell) is observed, as is the occurrence of FRET between 7KC and NR. This colocalization of 7KC with neutral and polar lipids in the cytoplasm of 7KC-treated U937 cells is in agreement with biochemical results. These latter results are obtained by subcellular fractionation, gas chromatography, and mass spectrometry and indicates that 7KC accumulates in NR-stained cytoplasmic structures that contain large amounts of cholesterol, sphingomyelin, and phosphatidylcholine (polar lipids).

Thus, during 7KC-induced apoptosis, 7KC modifies cellular lipid content, accumulates in NR-stained cytoplasmic structures, and colocalizes with their lipid components.

MATERIALS AND METHODS

Cells and Cell Treatment

Human promonocytic leukemia cells (U937) were grown in suspension in culture medium consisting of RPMI 1640 medium with GlutaMAX I (Gibco, Eragny, France), and antibiotics (100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum (Gibco). Cells were seeded at 100,000 per milliliter of culture medium and passaged twice a week. They were cultured in a 5%CO_2/95% air-humidified atmosphere at 37°C.

7KC ($\lambda Ex_{max\ (maximal\ excitation\ wavelength)}$ = 350 nm, $\lambda Em_{max\ (maximal\ emission\ wavelength)}$ = 420 nm) (33) was provided by Sigma (L'Isle d'Abeau Chesnes, France) and its purity was determined to be 100% by gaseous phase chromatography coupled with mass spectrometry. For all experiments, a stock solution of 7KC was prepared extemporaneously at a concentration of 800 μg/ml as previously described (36). To obtain the initial solution, 800 μg of 7KC was dissolved in 50 μl of absolute ethanol,

950 μl of culture medium were added, and the solution was sonicated. To obtain a 20-μg/ml final concentration (corresponding to 50 μM) of 7KC, 25 μl of this initial solution was further added per milliliter of culture medium. In all experiments, 7KC was introduced into the culture medium at the beginning of the culture, and treatments with 7KC on U937 cells were carried out for 06, 14, 18, 24, and/or 30 h.

Flow Cytometric Determination of Cell Viability With Propidium Iodide

Cell viability was determined with propidium iodide (PI; λEx_{max} = 540 nm, λEm_{max} = 625 nm; Sigma), which stains dead cells only (37). PI was used at 5 μg/ml in a cell suspension adjusted to 10^6 cells/ml. Flow cytometric analyses were performed on a Galaxy flow cytometer (Partec, Münster, Germany). Fluorescence of PI was acquired by using a 590/10-nm bandpass filter and measured on a logarithmic scale. Ten thousand cells were acquired for each sample. Data were analyzed with FlowMax software (Partec).

Flow Cytometric Measurement of Mitochondrial Transmembrane Potential With $DiOC_6(3)$

The mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi m$) was measured by flow cytometry with 3,3′-dihexyloxacarbocyanine iodide ($DiOC_6(3)$ λEx_{max} = 484 nm, λEm_{max} = 501 nm; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) used at a final concentration of 40 nM (23). Flow cytometric analyses were performed with a Galaxy flow cytometer (Partec). The green fluorescence of $DiOC_6(3)$ was acquired with a 520/10-nm bandpass filter and measured on a logarithmic scale. Data were analyzed with FlowMax software (Partec).

Nuclear Staining With Hoechst 33342

Nuclear morphology was analyzed by fluorescence microscopy after staining with Hoechst 33342 (λEx_{max} = 350 nm, λEm_{max} = 461 nm; Sigma). Apoptotic cells were characterized by nuclear condensation of chromatin and/or nuclear fragmentation (36). Hoechst 33342 was prepared in distilled water at 1 mg/ml and added to culture medium at a final concentration of 10 μg/ml. After 30 min of incubation at 37°C, cells were collected by centrifugation and resuspended at a concentration of 10^6 cells/ml in cold phosphate buffered saline (PBS) containing 2% (w/v) paraformaldehyde. Cell deposits of 40,000 cells were applied to glass slides by cytocentrifugation (5 min, 1,000 rpm) with a cytospin 4 (Shandon, Cheshire, UK), mounted in Fluoprep (Bio-Mérieux, Marcy l'Etoile, France), coverslipped, and stored in the dark at 4°C until microscopic examinations. Observations were made with an Axioskop fluorescent microscope (Zeiss, Jena, Germany) by using UV light excitation. For each sample, 300 cells were examined to determine the percentage of apoptotic cells on the basis of the morphologic aspect of nuclei.

Staining Conditions With Filipin

Quantification of free cholesterol (unesterified cholesterol) in whole cells was determined by flow cytometry after staining with filipin from *Streptomyces filipinensis* (λEx_{max} = 350 nm, λEm_{max} = 510 nm; Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany) that was prepared in dimethylsulfoxide (Sigma) at 100 mg/ml and stored frozen at −20°C until use. Briefly, after various culture times (0, 6, 14, 18, 24, and 30 h), untreated and 7KC-treated cells were collected by centrifugation and incubated in PBS containing 1% (w/v) paraformaldehyde for 20 min at room temperature (5–10 × 10^5 cells/ml of PBS containing 1% paraformaldehyde). After washing twice in PBS, cells were resuspended in PBS, stained with filipin (100 μg/ml final concentration) for 5 min, and analyzed by flow cytometry. Flow cytometry analyses were performed on a Galaxy flow cytometer (Partec) equipped with a UV lamp. The blue fluorescence of filipin was collected above 490 nm and measured on a logarithmic scale. Ten thousand cells were acquired for each sample, and data were analyzed with FlowMax software (Partec).

Staining Conditions With NR

NR is a phenoxazine dye that can be used on living cells to localize and quantify neutral and polar lipids. This dye stains neutral lipids yellow (570–590 nm) and polar lipids orange-red (≥590 nm) when excited at 488 nm (29,34). In the present investigation, NR was prepared at 100 μg/ml in dimethylsulfoxide. After various treatment times (0, 6, 14, 18, 24, and 30 h) with 7KC (20 μg/ml), NR was added to the culture medium at a final concentration of 0.1 μg/ml in a cellular suspension adjusted to 10^6 cells/ml. After 15 min of incubation at 37°C, flow cytometric analyses were immediately performed on a Galaxy flow cytometer (Partec). Yellow and orange-red fluorescences of NR were acquired with a 580/10-nm bandpass filter and a 630-nm longpass filter, respectively, and mean fluorescence intensities of untreated and 7KC-treated cells were measured on a logarithmic scale. In addition, for each sample, the ratio of fluorescence (orange-red/yellow) was determined. Ten thousand cells were acquired for each sample, and data were obtained with FlowMax software (Partec). For microscopic analyses, 30 μl of the cellular suspension was applied to glass slides, air dried at room temperature, mounted in Fluoprep (Bio-Mérieux), coverslipped, and stored in the dark at 4°C before microscopic examinations. Observations by conventional fluorescence microscopy were made with an Axioskop fluorescent microscope (Zeiss) by using blue light excitation. For each sample, 300 cells were examined to determine the percentages of yellow and orange-red fluorescent cells.

Fluorescence Analysis by Laser Scanning Confocal Microscopy

Confocal observations of samples were carried out with a Leica TCS 4D (Leica, Wetzlar, Germany) equipped for epifluorescence microscopy. Cells stained with NR were excited with an argon ion laser emitting at 488 nm, and

fluorescence emission was acquired with a 515-nm longpass filter. Each image was obtained in a 512 × 512 matrix at 40× magnification of the confocal microscope.

Biphoton laser confocal microscopy was performed with a Leica TCS SP2 AOBS biphoton laser scanning microscope (Leica) equipped with a Mira 900F Verdi 8W laser (Coherent, Santa Clara, CA, USA). Images at 0.07 to 0.29 μm (x,y) pixel sizes were obtained for each case in a 512 × 512 matrix at 63× magnification of the biphoton confocal microscope. Excitation by the laser at 750 nm was obtained. Pinhole size was equal to 60 μm. Regular acquisitions resulted in spectral sequences of 25 to 40 images in the 400- to 700-nm range. Nomarsky screening and complementary four-dimensional acquisitions were performed, in which case the z stepping was set to 0.28 μm.

Image Analysis

Along the lines of general factor analysis methods, FAMIS was specifically developed to process biomedical image sequences. This development specifically required the use of constraints and had to cope with mixtures of components characterized by their physical behaviors. Linearity and component positivity basic hypotheses were investigated. FAMIS decomposes image sequences into a smaller number of images, called factor images, and curves, called factor curves. Factor curves estimate individual temporal behavior in the sequence of images. Factor images correspond to spatial distribution components.

With FAMIS, pixels in images were recombined in 8 × 8 clusters. All such clusters were investigated. Correspondence analysis was performed on the intensity evolution of each cluster (38). Oblique analysis with positivity constraints was performed on the results of correspondence analysis (39) to obtain positive factor curves and images. Factor images are recomputed back to the original sampling by oblique projection on the factor curves. The estimation is performed in the least squares sense. Here, the factor curves correspond to the emission spectra of the fluorochromes. Factor images provide images of stained fluorescent structures.

Transmission Electron Microscopy

For transmission electron microscopy, 10×10^6 cells were fixed for 30 min at room temperature with a mixture of glutaraldehyde (1.5%) and paraformaldehyde (4%) prepared in a 0.1 M of phosphate buffer solution (pH 7.3), postfixed in osmium tetroxide, dehydrated with graded ethanol series, and embedded in Epon. Sections were further stained with uranyl acetate and lead citrate and examined with an electron microscope (H7500, Hitachi, Tokyo, Japan).

Subcellular Fractionation and Biochemical Characterization of NR-Positive Cytoplasmic Structures

The methodology used to isolate multilamellar cytoplasmic structures (also called myelin figures) (22,23) by subcellular fractionation has been described by Biederbick et al. (13). Briefly, after 24 h of culture in the absence or presence of 7KC (20 μg/ml), U937 cells were incubated at 37°C with NR (0.1 μg/ml, 15 min). NR stains neutral lipids yellow (570–590 nm) and polar lipids orange-red (≥590 nm) when excited at 488 nm (29,34). The medium was removed. Cells were washed with cold PBS and resuspended in a homogenization buffer (10 mM Tris HCl, pH 8, 0.25 M sucrose, 1 mM dithiothreitol, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 3 mM $MgSO_4$, and 10 mM NaCl), and then centrifuged at 700*g* (10 min) at 4°C. The pellet was resuspended in 1 ml of Tris HCl (10 mM, pH 8) and separated on a continuous sucrose gradient (10–60%) at 112,500*g* for 5 h by using a R70.1 rotor in a Beckman Optima L-90K centrifuge (Beckman, Fullerton, CA, USA). Fractions were collected from the bottom of the gradient. NR-labeled compartments were detected with a LS50B Perkin-Elmer spectrofluorometer (Perkin-Elmer, Oak Brook, IL, USA; λEx = 488 nm, λEm = 600 nm), and the sucrose density of each fraction was simultaneously measured with a Codiam Scientific refractometer (Polylabo, Strasbourg, France). For each fraction, lipid contents of cholesterol (esterified and unesterified), 7KC, phosphatidylcholine, and sphingomyelin were determined. To this end, lipids were extracted and analyzed by capillary gas chromatography and mass spectrometry as previously described (36).

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed with WinSTAT software (Microsoft, Redmond, WA, USA). The Mann-Whitney U test was used to compare continuous variables of different groups, and data were considered statistically different at $P \leq 0.05$.

RESULTS

Effects of 7KC on Mitochondrial Potential, Permeability to PI, and Morphologic Nuclear Changes

Toxicity of 7KC (20 μg/ml) was determined at 0, 6, 14, 24, and 30 h of treatment on human promonocytic U937 cells seeded at 100,000 cells/ml. Under these conditions, 7KC has strong cytotoxic activities characterized by a loss of ΔΨm measured after staining with DiOC6(3) and by an increased permeability to PI. Thus, at as soon as 14 h (Fig. 1A), 7KC induced a time-dependent increase of the percentage of cells with depolarized mitochondria (characterized by low values of ΔΨm) associated with enhanced percentages of cells permeable to PI (Fig. 1B). These cellular modifications were accompanied by morphologic nuclear changes demonstrated by enhanced proportions of cells with swollen, condensed, and/or fragmented nuclei determined after staining with Hoechst 33342 (Fig. 1C,D).

Effects of 7KC on Cellular Lipid Content During 7KC-Induced Cell Death

Multilamellar cytoplasmic structures (myelin figures) of various sizes and shapes were detected in the cytoplasm of 7KC-treated U937 cells but not in untreated U937 cells

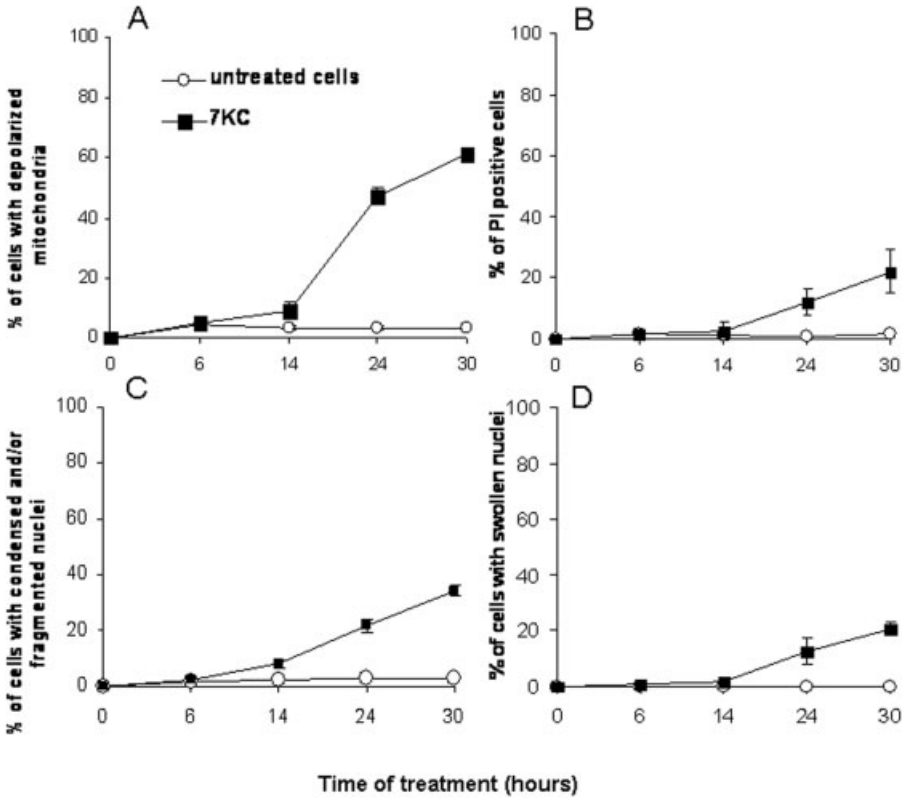


FIG. 1. Time-dependent effect of 7KC on mitochondrial transmembrane potential, cellular permeability, and morphologic nuclear changes. U937 cells were cultured for various periods in the absence or presence of 7KC (20 μg/ml), and the effects of 7KC on cell viability were evaluated by different methods. **A:** Loss of mitochondrial potential was measured with DiOC6(3) and percentages of cells with depolarized mitochondria were defined. **B:** Cellular permeability was evaluated by staining with PI and percentages of PI-positive cells were determined. **C, D:** Morphologic nuclear changes were evaluated by percentages of cells with condensed and/or fragmented nuclei (apoptotic cells) and by percentages of cells with swollen nuclei after staining with Hoechst 33342. Data are mean ± standard error of the mean of four independent experiments performed in triplicate.

(Fig. 2A–D). Interestingly, under treatment with 7KC, myelin figures were visualized in early apoptotic cells characterized by perinuclear localization of the chromatin (Fig. 2B) and in late apoptotic cells with condensed and/or fragmented nuclei (Fig. 2C,D). To determine whether the formation of myelin figures occurring during 7KC-induced cell death is associated with modifications of cellular lipid content, untreated and 7KC-treated U937 cells were stained at different times of culture (0, 6, 14, 18, 24, and 30 h) with filipin, which permits quantification of free cholesterol (unesterified cholesterol) (27,28), and with NR, which emits a yellow or orange-red fluorescence in the presence of neutral lipid or polar lipid, respectively, when excited with blue light (29). Under these conditions, incubation of U937 cells with 7KC induced a time-dependent cellular accumulation of free cholesterol. As shown by flow cytometry after staining with filipin, mean fluorescence intensities were always significantly higher in 7KC-treated cells than in untreated cells with only 6 h of culture (Fig. 3). In addition, the cellular content in neutral and polar lipids was modified as shown by analyses performed by fluorescence microscopy, confocal microscopy, and flow cytometry after staining with NR. Hence, in untreated cells, punctuated yellow cytoplasmic structures were observed only by fluorescence and confocal microscopies, but some cellular areas emitting a slight orange-red fluorescence were also detected (Fig. 4A). However, in the presence of 7KC, the percentages of cells with punctuated yellow cytoplasmic structures rapidly decreased, whereas the percentage of cells with large orange-red cytoplasmic structures (containing or not containing yellow spots) simultaneously increased (Fig. 4B–D). Complementary investigations performed by flow cytometry to quantify yellow and orange-red fluorescences (measured according to mean fluorescence intensity on FL2, 580 ± 10 nm, and FL3, >630 nm, respectively) in untreated and 7KC-treated cells were in agreement with microscopic data. The ratios of fluorescence (orange-red/yellow) were significantly higher in 7KC-treated cells than in untreated cells as soon as 6 h of culture (Fig. 4E). Taken together, the present data demonstrate that 7KC-induced cell death is associated with modifications of the cellular content in neutral and polar lipids and with an accumulation of free cholesterol.

Colocalization of 7KC in NR-Positive Cytoplasmic Structures by FRET Biphoton Spectral Imaging Microscopy

The ability to colocalize 7KC (emission of a blue fluorescence under UV light) (33) and cellular lipids stained with NR (emitting a yellow or orange-red fluorescence in the presence of neutral and polar lipids, respectively, when excited at 488 nm) (29,34) is possible depending on the overlap of the emission spectra of 7KC with the excitation spectra of NR. To define whether 7KC and NR colocalize by using FRET and the biphoton confocal mode of microscopy, it was first necessary to determine at which excitation wavelength 7KC has emission and that

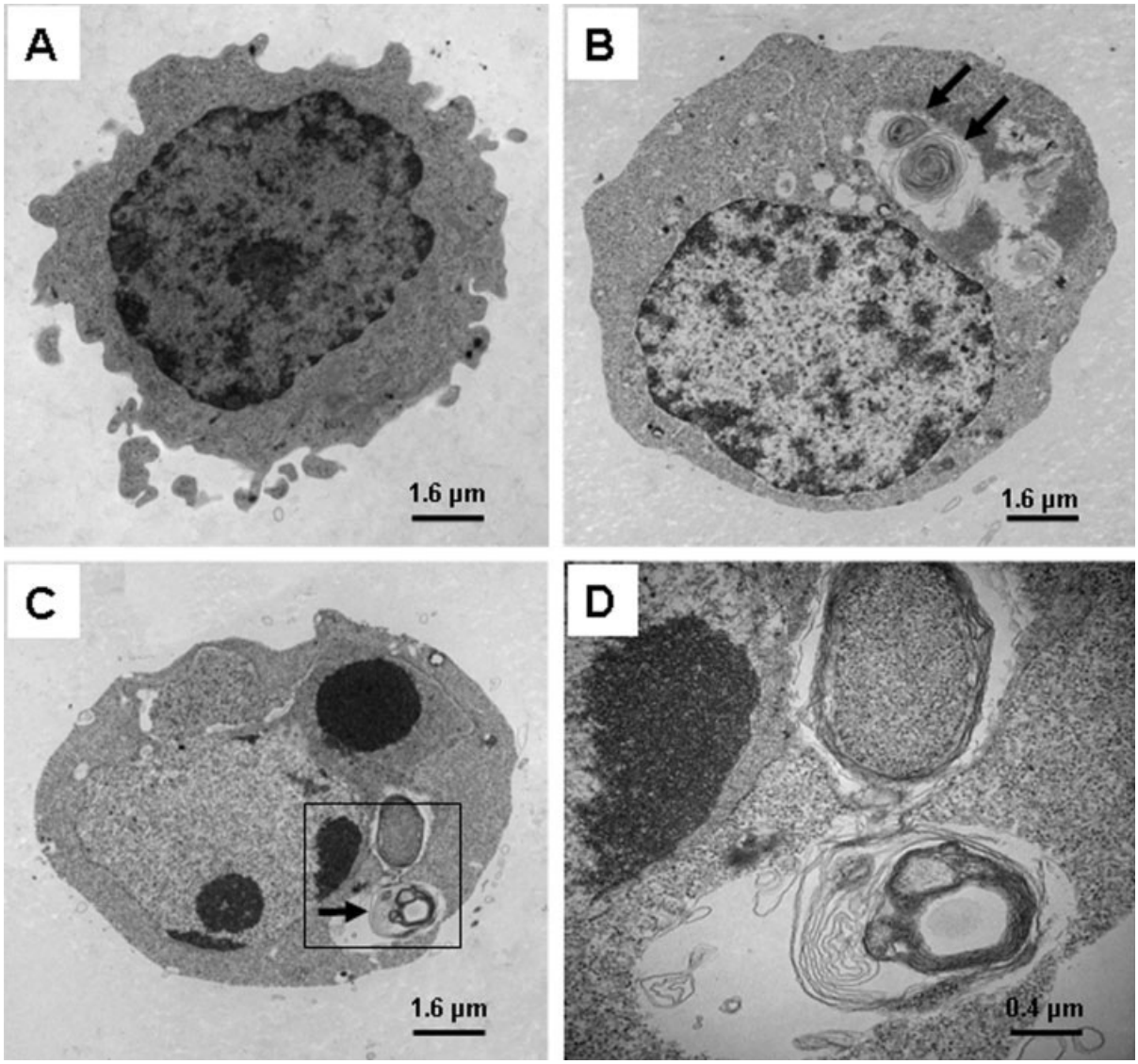


FIG. 2. Visualization of myelin figures by transmission electron microscopy. Transmission electron microscopy of U937 cells cultured in the absence (A) or presence of 7KC (20 µg/ml) for 30 h (B, C). Myelin figures (arrows) are multilamellar cytoplasmic structures of various sizes and shapes. **A:** They were never detected in untreated U937 cells. **B, C:** However, they were observed in U937 cells treated with 7KC, whatever the morphologic aspect of the nuclei. **D:** Enhanced magnification of the area delineated by a square in C.

NR has no emission. To this end, we established that this excitation wavelength was at 750 nm (Fig. 5). Thus, when untreated U937 cells are stained with NR (which emits a yellow fluorescence and a slight orange-red fluorescence when excited at 488 nm; Fig. 5A,B) and excited at 750 nm, no fluorescence emission is observed from 530 to 620 nm (Fig. 5C). A blue emission ranging from 412 to 476 nm is detected in 7KC-treated U937 cells that are not stained with NR (Fig. 5D). When 7KC is excited at 750 nm in the biphoton mode of confocal microscopy to induce a blue fluorescence emission, the occurrence of FRET between 7KC and NR is observed on 7KC-treated cells stained with NR (a strong fluorescence emission was observed at 530–620 nm; Fig. 5E,F), suggesting that 7KC and cytoplasmic lipids stained with NR colocalized in the cytoplasm of 7KC-treated cells. Moreover, when 7KC-treated U937 cells are excited at 750 nm in the biphoton mode of confocal microscopy, fluorescence emissions were detected with blue (398–505 nm; Fig. 6A), yellow (555–585 nm; Fig. 6B) and orange-red (602–672 nm; Fig. 6C) filters. These filters are indicated on the visible light spectrum (Fig. 6D). In addition, the curves superimposed on visible light spectrum correspond to the emission spectra of 7KC and NR obtained in the biphoton mode of confocal microscopy (excitation 750 nm), respectively (Fig. 6D). Depending on the overlap of these curves, it is difficult to obtain proper interpretations of yellow and orange-red images. Nevertheless, data presented in Figure 6 indicate that FRET

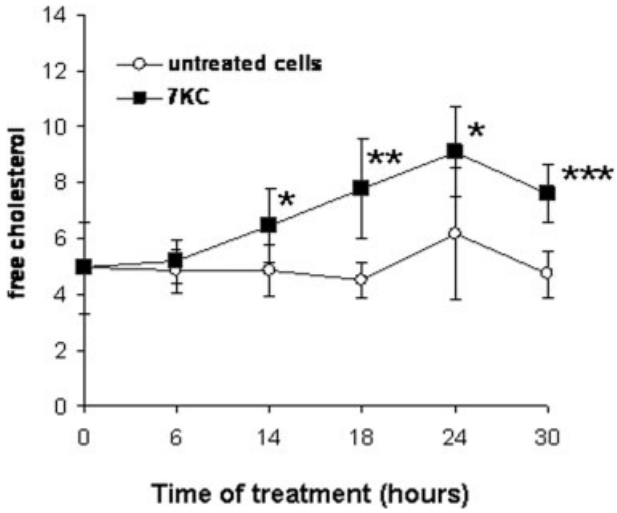


FIG. 3. Flow cytometric quantification of free cholesterol with filipin. U937 cells were cultured for 0, 6, 14, 18, 24, and 30 h in the absence or presence of 7KC (20 μg/ml), and the effect of 7KC on the cellular content in free cholesterol (unesterified cholesterol) was determined after staining with filipin (100 μg/ml final concentration; Free cholesterol content per cell is given in arbitrary fluorescence units [mean fluorescence intensity]). Data are mean ± standard error of the mean of three independent experiments performed in triplicate. There were statistically significant differences (*$P < 0.05$, **$P < 0.005$, ***$P < 0.0005$) between untreated and 7KC-treated cells.

occurs in large cytoplasmic structures and in the cytoplasmic membrane that emits yellow and orange-red fluorescences (Fig. 6B-C), and show that 7KC colocalizes with NR stained lipids in large cytoplasmic structures and in the cytoplasmic membrane.

Thus, spectral observations of 7KC-treated U937 cells stained with NR were also performed to distinguish yellow from orange-red fluorescence (Fig. 6E–G). To this end, excitation was processed at 750 nm in the biphoton confocal mode, and NR emission was collected in the spectral mode in 7-nm filters from red to blue (700 → 410 nm). As previously defined, factor analysis was performed on the resulting spectral sequences (32). Data shown illustrate an orange-red emission visualized throughout the cell in the first factor image (Fig. 6E) and two yellow spots visualized in the second factor image (Fig. 6F). The third factor image corresponds to residuals (Fig. 6G). Under these conditions, it was also possible to establish a link between the factor curves and to confirm the simultaneous presence of large orange-red cytoplasmic structures and of small yellow spots (often difficult to identify) in 7KC-treated U937 cells stained with NR. In some 7KC-treated cells stained with NR an orange-red emission was visualized throughout the cell in the first factor image, whereas no yellow emission was found in the second factor image (data not shown).

Biochemical Characterization of NR-Positive Cytoplasmic Structures Isolated by Subcellular Fractionation

Orange-red cytoplasmic structures identified after staining with NR were isolated by subcellular fractionation, and their lipid content was characterized by gas chromatography coupled with mass spectrometry. As shown in Figure 7, the lack of fluorescence in the subcellular fractions of untreated cells was in agreement with the absence of orange-red cytoplasmic structures in these cells. In 7KC-treated cells, the subcellular fraction corresponding to a sucrose density of 25% was strongly fluorescent (Fig. 7A). By gas chromatography coupled with mass spectrometry, the lipid composition of this orange-red positive subcellular fraction (fraction 11/IV) was determined. In agreement with flow cytometric and microscopic analyses, this subfraction contained high levels of cholesterol (esterified and unesterified), 7KC (Fig. 7B,C), and polar lipids (phosphatidylcholine, sphingomyelin; Fig. 7D,E), which were also slightly increased in subfractions (5, 6, 7, and 8)/II and/or (9, 10, and 12)/III. Thus, these biochemical data confirm and demonstrate that 7KC accumulates in NR-stained cytoplasmic structures containing high amounts of neutral and polar lipids.

DISCUSSION

Pathologic investigations have pointed out the part played by apoptosis in the development and evolution of atheroma and by the different compounds present in atherosclerotic lesions. It is now well accepted that 7KC can contribute to this mode of cell death (5,40,41). This oxysterol, frequently detected at enhanced levels in atherosclerotic plaques (8) and in the plasma of patients with high cardiovascular risks (42), is a potent inducer of apoptosis characterized by various cellular dysfunctions: phosphatidylserine externalization (43), loss of mitochondrial transmembrane potential, cytosolic release of cytochrome *c*, activation of caspase-9 and -3 with subsequent enhanced activity of caspase-3, degradation of poly(ADP-ribose) polymerase (36), morphologic nuclear changes (cells with swollen, condensed, and/or fragmented nuclei) (44), and formation of multilamellar cytoplasmic structures (22,23). Because multilamellar cytoplasmic structures (also termed myelin figures), considered as lipid storage organelles (21), were observed in aortic cells from cholesterol-fed rabbits (25,26), the effects of 7KC (20 μg/ml) on the cellular lipid content were studied on human promonocytic U937 cells after staining with filipin (27,28) and NR (29,34). Moreover, because an increased cellular content of 7KC can disturb numerous signaling pathways (12), the interaction between 7KC and cellular lipids was investigated by FRET. Under these conditions, when U937 cells are treated with 7KC at a concentration of 20 μg/ml, i.e., the level measured in plasma after a meal rich in fat (45) and in cholesterol-fed rich rabbits (46), we demonstrate that 7KC favors the intracellular accumulation of lipids (including free cholesterol) and colocalizes with myelin figures enriched in cholesterol, phospholipids, and sphingomyelin.

Under our experimental conditions, the ability of 7KC to induce accumulation of free cholesterol in U937 cells favors the hypothesis that this oxysterol can play key roles in the formation of foam cells (deriving from cholesterol-engorged macrophages or from smooth muscle cells),

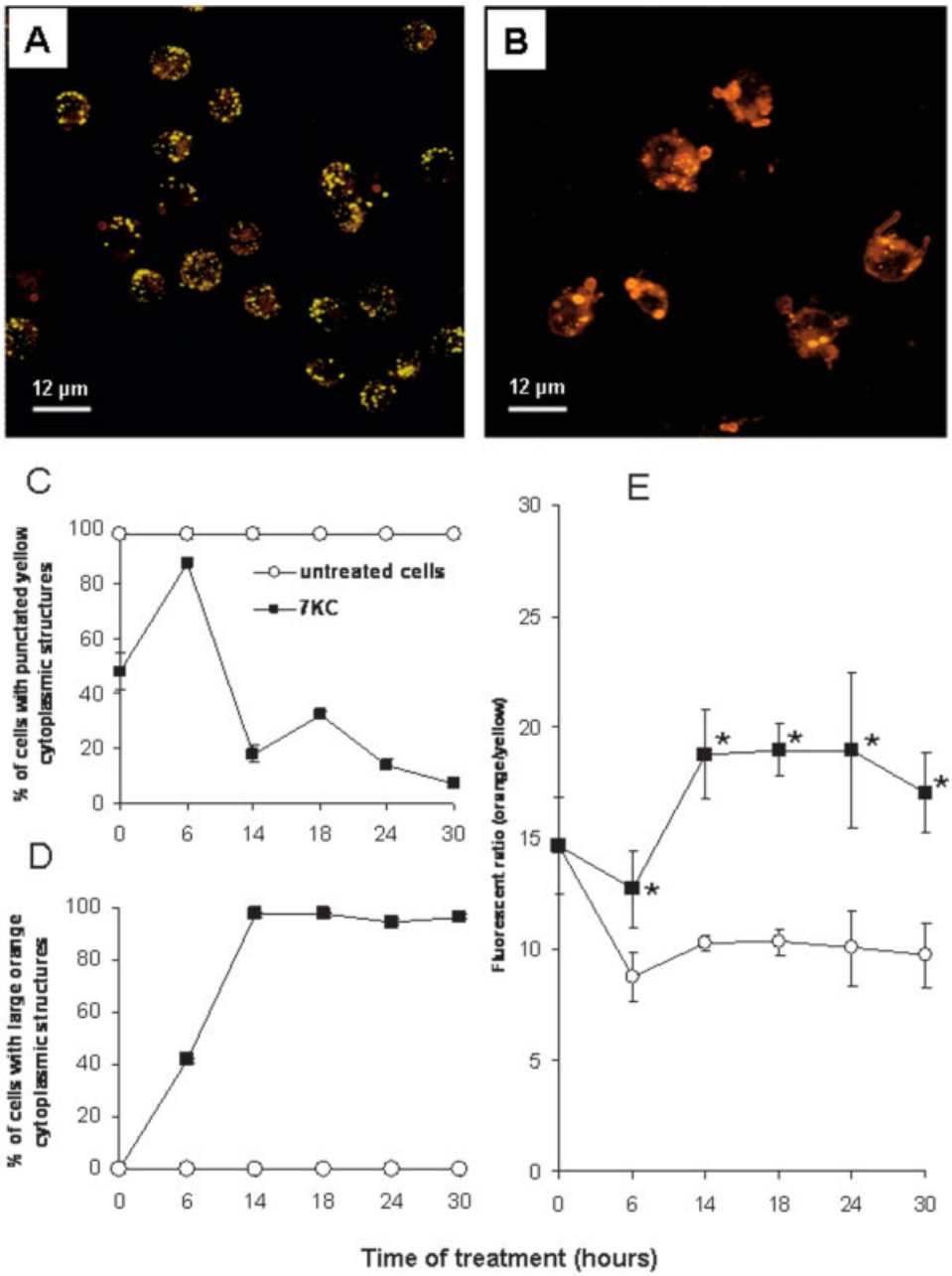


FIG. 4. Effects of 7KC on neutral and polar cellular lipids identified with NR: microscopic and flow cytometric analyses. U937 cells were cultured for 0, 6, 14, 18, 24, and 30 h in the absence or presence of 7KC (20 µg/ml), and the effect of this oxysterol on the cellular content in neutral and polar lipids was determined by various methods (fluorescence microscopy, confocal microscopy, and flow cytometry) after staining with NR (0.1 µg/ml), which emitted a yellow or orange-red fluorescence in the presence of neutral or polar lipids, respectively, when excited at 488 nm. Untreated (**A**) and 7KC-treated (**B**) cells observed by confocal microscopy after staining with NR. Various numbers of punctuated yellow cytoplasmic structures are observed in untreated cells (A), whereas large orange-red cytoplasmic are mainly present in 7KC-treated cells (B). **C, D:** Percentages of cells with punctuated yellow cytoplasmic structures and with large orange-red cytoplasmic structures determined by fluorescence microscopy in untreated and 7KC-treated cells. **E:** Ratio (polar lipids/neutral lipids) determined by flow cytometry. For each sample, the cellular content in polar lipids was determined by the mean fluorescence intensity measured in FL3 (>630 nm, orange-red fluorescence), and cellular content in neutral lipids was determined by mean fluorescence intensity measured in FL2 (580 ± 10 nm, yellow fluorescence). Data are mean ± standard error of four independent experiments performed in triplicate. $^*P < 0.005$, untreated versus 7KC-treated cells.

which are major precursors of atherosclerotic lesions (47). Consequently, it is tempting to speculate that 7KC contributes to regulating cholesterol uptake and/or release. Although little is known about the ability of 7KC to control cholesterol efflux and/or influx, the present data are in agreement with previous reports describing inhibition of cholesterol efflux from the arterial wall of rabbits receiving intravenous injection of 7KC (48) and in mouse

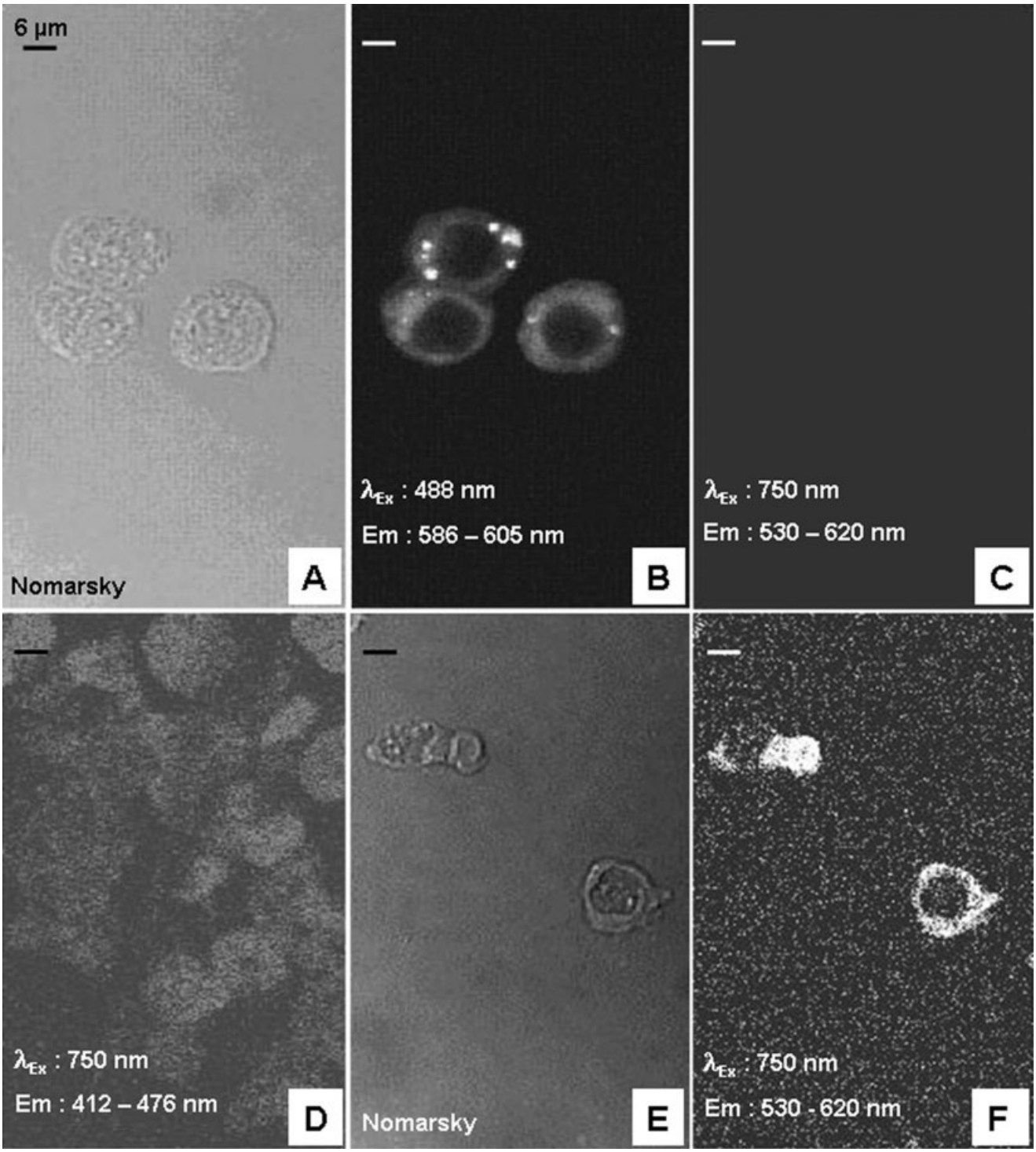


FIG. 5. The occurrence of FRET between 7KC and NR was investigated with a biphoton laser scanning confocal microscope. U937 cells cultured for 24 h in the absence (A–C) or presence (D–F) of 7KC (20 µg/ml) were analyzed under the following conditions. When untreated cells stained with NR (previously identified in Nomarsky) were excited at 488 nm in the monophoton confocal mode of microscopy (**A**), small yellow cytoplasmic spots were observed when fluorescence emission was collected at 586 to 605 nm (**B**). **C:** When these cells were excited at 750 nm in the biphoton confocal mode, no fluorescence emission was detected at 530 to 620 nm. **D:** In the presence 7KC alone (7KC-treated cells not stained with NR), when these cells were excited at 750 nm in the biphoton confocal mode, a blue fluorescence was collected at 412 to 476 nm. **E:** When 7KC-treated cells stained with NR (previously identified in Nomarsky) were excited at 750 nm in the biphoton confocal mode, an important emission of fluorescence was collected at 530 to 620 nm. Adjustment of excitation at 750 nm results from these types of experiments. Similar results were obtained in two independent experiments.

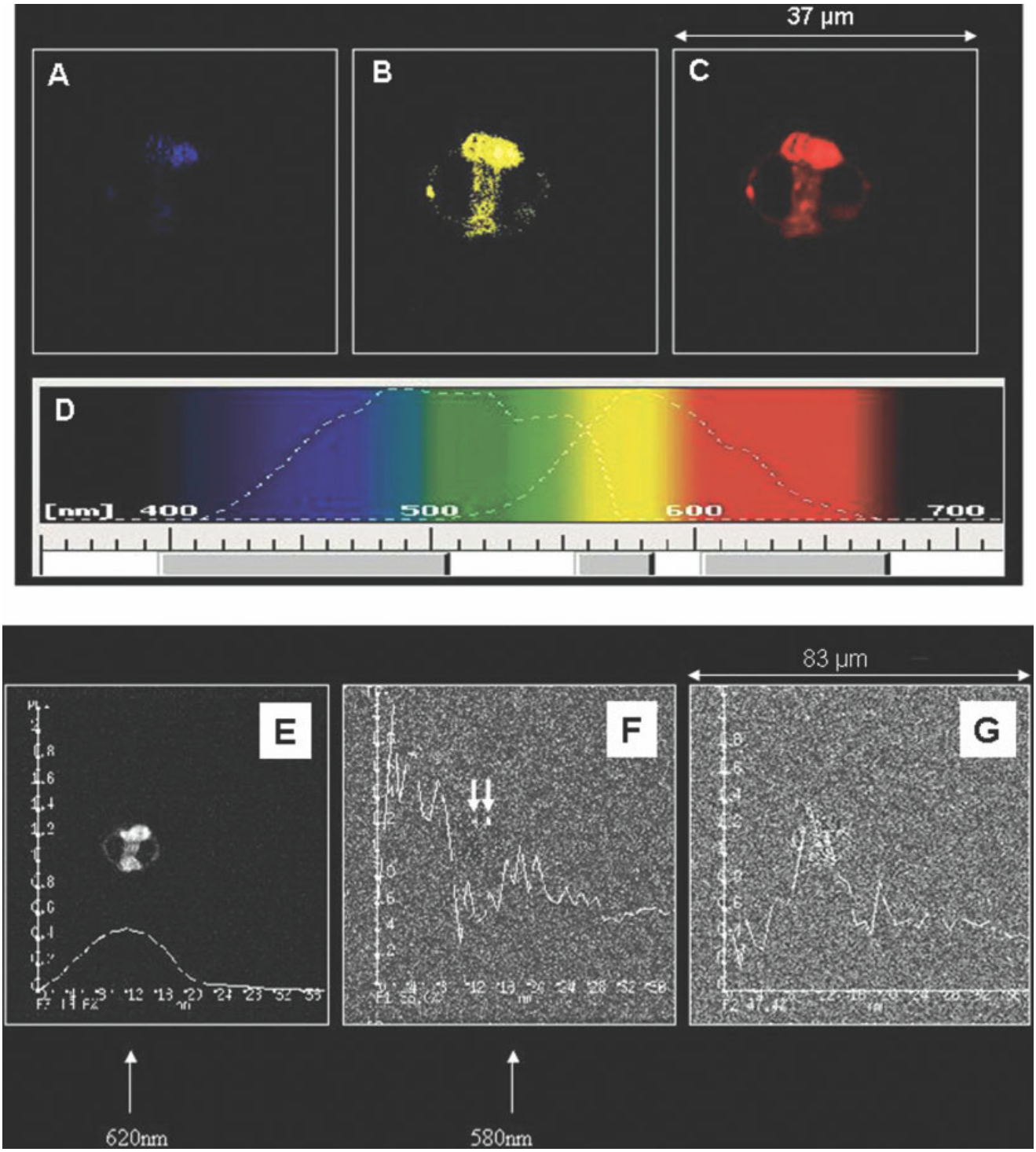


FIG. 6. Fluorescence emission and spectral and factor analyses from 7KC-treated cells obtained in the biphoton confocal mode. U937 cells treated with 7KC (20 µg/ml) for 24 h and stained with NR (0.1 µg/ml) were excited at 750 nm in the biphoton mode of confocal microscopy. Fluorescence emissions were detected with blue (398–505 nm; **A**), yellow (555–585 nm; **B**), and orange-red (602–672 nm; **C**) filters in the visible light spectrum (D). **D:** The curves superimposed on the visible light spectrum correspond to the emission spectra of 7KC and NR, respectively. Factor analysis was performed under the following conditions: excitation at 750 nm performed in biphoton confocal mode and NR emission collected in spectral mode in 7-nm filters from red to blue (700 → 410 nm). (**E**) An orange-red emission is visualized throughout the cell in the first factor image, and (**F**) two yellow spots (arrows) are visualized in the second factor image. **G:** The third factor image corresponds to residuals. Similar results were obtained in two independent experiments.

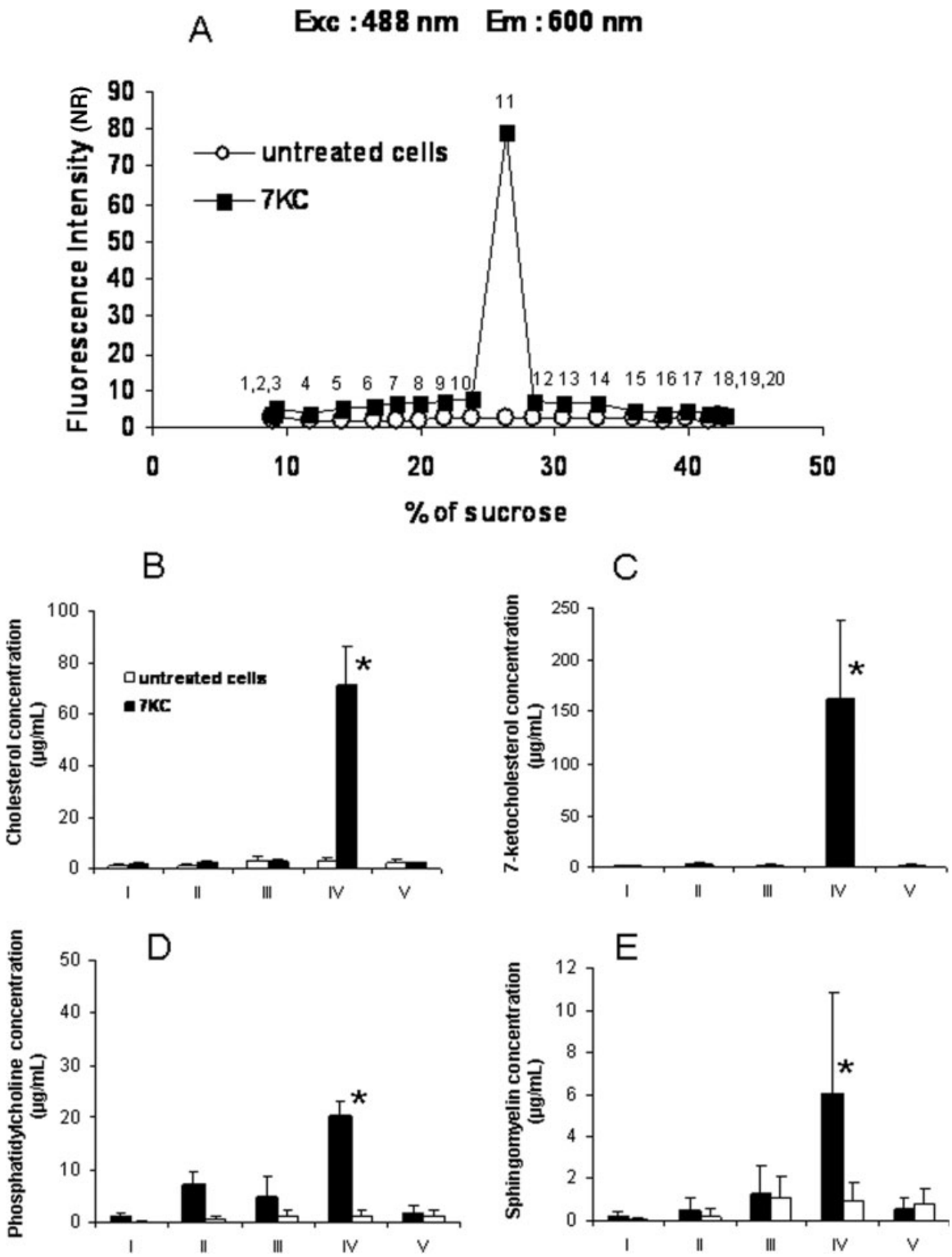


FIG. 7. Subcellular fractionation and biochemical characterization of untreated and 7KC-treated cells. U937 cells were cultured in the absence or presence of 7KC (20 µg/ml) for 24 h, and orange-red cytoplasmic structures resulting from staining with NR (0.1 µg/ml) were isolated by subcellular fractionation. **A:** Each symbol represent a subcellular fraction characterized by a given sucrose density. No fraction was fluorescent in untreated cells, whereas the subcellular fraction of 7KC-treated cells corresponding to a sucrose density of 25% was strongly fluorescent (fraction 11). To perform biochemical analyses by gas chromatography/mass spectrometry, some subcellular fractions were pooled. Fractions 1–4, 5–8, 9 and 10 and 12, 11, and 13–20 correspond to fractions I, II, III, IV, and V, respectively. For these different fractions, the lipid content in cholesterol (esterified and unesterified; **B**), 7KC (**C**), phosphatidylcholine (**D**), and sphingomyelin (**E**) was determined. Data are mean ± standard error of the mean of three independent experiments. $^{*}P < 0.05$, untreated versus 7KC-treated cells. Similar results were obtained in three independent experiments.

peritoneal macrophages incubated with 7KC-enriched acetylated low-density lipoproteins (49). Therefore, in accordance with these previous investigations, the present work underlines that 7KC favors cholesterol accumulation. Interestingly, in vivo high plasmatic levels of 7KC-3-sulfate (a potent antagonist of liver X receptors that transactivates ATP-binding cassette transporters such as ABCA1, which increases the overall rate of reverse cholesterol transport) are suspected of contributing to cholesterol accumulation (50–52), which in turn can decrease cholesterol efflux, endogenous cholesterol biosynthesis, and low-density lipoprotein receptor expression (53,54).

Moreover, the present study clearly shows that accumulation of neutral and polar lipids (including free cholesterol) precedes 7KC-induced cell death identified by early (loss of mitochondrial potential) and late (increased permeability to PI and morphologic nuclear changes) cytotoxic markers (55). These fast modifications in lipid content, especially in free cholesterol, can modify the structure and functions of some lipid-rich cellular compartments (endoplasmic reticulum, cytoplasmic membrane) and favor the relocation of molecules involved in the initiation of 7KC-induced cell death toward lipid rafts (cytoplasmic membrane microdomains rich in cholesterol and sphingolipids) involved in the initiation and transmission of various transduction signals, including cell death signals (56). Further, because free cholesterol activates apoptosis through the endoplasmic reticulum pathway (57), the intracellular accumulation of free cholesterol triggered by 7KC can stimulate some components of the endoplasmic reticulum, which in turn can induce 7KC-induced apoptosis. This hypothesis is supported by the expression of the cell death effector CHOP and GRP78/bip chaperone, which are hallmarks of the unfolded protein response (58), and by the synthesis of similar cytoplasmic structures occurring under treatment with 7KC and free cholesterol (22,23,57,59). At the cytoplasmic level, the presence of myelin figures observed during 7KC-induced apoptosis (22,23) evokes phospholipid whorls formed during cell death of murine macrophages induced by free cholesterol (54). We previously reported that these myelin figures, also induced by 7β-hydroxycholesterol (23), were not found with strong proapoptotic chemicals (antitumoral drugs, e.g., cytosine β-D-arabinofuranoside, vinblastine, cycloheximide, and etoposide, and staurosporine) (23) and supposed that they might constitute suitable markers of oxysterol (and of cholesterol) induced cytotoxicity, and that they can have important functions in the atherosclerotic process (54).

Therefore, during 7KC-induced apoptosis, these cytoplasmic structures, which were previously described to produce positive staining with monodansylcadaverine (a solvent polarity probe and a lysosomotropic agent that stains acidic compartments) (13,23,33,60,61), were characterized by flow cytometric and microscopic methods including FRET biphoton spectral imaging confocal microscopy and by subcellular fractionation, gas chromatography, and mass spectrometry after staining with NR. Thus, large orange-red cytoplasmic structures were identified only in 7KC-treated cells, whereas small punctuated yellow cytoplasmic structures were mainly detected in untreated cells. Because NR emits a yellow or orange-red fluorescence in the presence of neutral or polar lipids, respectively, when excited at 488 nm (29), our observations were consistent with an increased accumulation of polar lipids in the cytoplasm of 7KC-treated cells and were in agreement with data obtained by flow cytometry showing that the ratio of fluorescence (orange-red/yellow) after staining with NR was significantly higher in 7KC-treated cells than in untreated cells.

These important changes in lipid content are confirmed by subcellular fractionation, gas chromatography, and mass spectrometry. These biochemical methods revealed that NR-positive cytoplasmic structures isolated according to the method of Biederbick et al. (13) contained similar levels of cholesterol and polar lipids (phosphatidylcholine, sphingomyelin) than did monodansylcadaverine-positive structures (corresponding to myelin figures) previously obtained and characterized under the same conditions (33). Therefore, our biochemical analyses permit us to conclude that NR stains myelin figures. Additional experiments performed by FRET microscopy demonstrated that 7KC (which emits blue light when excited in UV) colocalized with neutral and polar lipids (emitting a yellow and orange-red fluorescence, respectively, when excited with a blue light). In these multilamellar cytoplasmic structures, sphingomyelin accumulation can be related to the inhibition of lysosomal sphingomyelinase by 7KC (62), whereas phosphatidylcholine accumulation could be one consequence of free cholesterol accumulation known to activate CTP:phosphocholine cytidyltransferase, the rate-limiting enzyme in phosphatidylcholine biosynthesis (63). In addition, increased accumulation of sphingomyelin can favor free cholesterol accumulation. Sphingomyelin regulates the capacity of membranes to absorb cholesterol and controls cholesterol efflux across the plasma membrane and toward the endoplasmic reticulum (64).

In conclusion, 7KC-induced cell death is preceded by important lipid disorders including cellular accumulation of neutral and polar lipids (free cholesterol, phosphatidylcholine, sphingomyelin) and formation of multilamellar cytoplasmic structures (myelin figures) accumulating 7KC which colocalizes with neutral and polar lipids. Although little is known about the roles of these structures observed during free cholesterol-induced cell death, it has been suggested that they help to protect against free cholesterol-induced cytotoxicity (54,63). This hypothesis considers that increasing phosphatidylcholine synthesis represents an adaptive response in preventing free cholesterol-mediated cytotoxicity by keeping the free cholesterol/phospholipid ratio in check. Therefore, better knowledge of these myelin figures, of their synthesis, and of their lipid content can bring new insights into our understanding of the development of atherosclerosis and opens new fields of investigations to distinguish stable from unstable atherosclerotic plaques.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Jeannine Lherminier (INRA, Service Commun de Microscopie Electronique, Dijon, France) for expert technical assistance in transmission electron microscopy (Service Commun de Microscopie Electronique INRA, Dijon, France) and Dr. Fabienne Vienney for measurement of refractive index (Laboratoire de Biophysique, Faculté de Pharmacie, Dijon, France).

LITERATURE CITED

1. Hackam DG, Anand SS. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review of the evidence. JAMA 2003;290: 932–940.
2. Poulter N. Global risk of cardiovascular disease. Heart 2003;89(suppl 2):2–5.
3. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. Circulation 1995;91:2488–2496.
4. Berliner JA, Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. Free Radic Biol Med 1996;20:707–727.
5. Colles SM, Maxson JM, Carlson SG, Chisolm GM. Oxidized LDL-induced injury and apoptosis in atherosclerosis. Potential roles for oxysterols. Trends Cardiovasc Med 2001;11:131–138.
6. Wahle KW. Atherosclerosis: cell biology and lipoproteins. Curr Opin Lipidol 2002;13:347–349.
7. Sevanian A, Hodis HN, Hwang J, McLeod LL, Peterson H. Characterization of endothelial cell injury by cholesterol oxidation products found in oxidized LDL. J Lipid Res 1995;36:1971–1986.
8. Brown AJ, Jessup W. Oxysterols and atherosclerosis. Atherosclerosis 1999;142:1–28.
9. Lizard G, Monier S, Cordelet C, Gesquière L, Deckert V, Gueldry S, Lagrost L, Gambert P. Characterization and comparison of the mode of cell death, apoptosis versus necrosis, induced by 7β-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol in the cells of the vascular wall. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999;19:1190–1200.
10. Gigli M, Rasoanaivo TM, Millot JM, Jeannesson P, Rizzo V, Jardillier JC, Arcamone F, Manfait M. Correlation between growth inhibition and intranuclear doxorubicin and 4′-deoxy-4′-iododoxorubicin quantitated in living K562 cells by microspectrofluorometry. Cancer Res 1989;49:560–564.
11. Lockyer PJ, Bottomley JR, Reynolds JS, McNulty TJ, Venkateswarlu K, Potter BV, Dempsey CE, Cullen PJ. Distinct subcellular localisations of the putative inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate receptors GAP1IP4BP and GAP1m result from the GAP1IP4BP PH domain directing plasma membrane targeting. Curr Biol 1997;7:1007–1010.
12. Garcia-Cruset S, Carpenter KLH, Codony R, Gardiola F. Cholesterol oxidation products and atherosclerosis. In: Guardiola F, Dutta PC, Codony R, Savage GP, editors. Cholesterol and phytosterol oxidation products—analysis, occurrence, and biological effects. Champaign, IL: AOCS Press; 2002. pp 241–277.
13. Biederbick A, Kern HF, Elsässer HP. Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. Eur J Cell Biol 1995;66:3–14.
14. Stromhaug PE, Berg TO, Fengsrud M, Seglen PO. Purification and characterization of autophagosomes from rat hepatocytes. Biochem J 1998;335:217–224.
15. Holtom GR, Thrall BD, Chin BY, Wiley S, Colson SD. Achieving molecular selectivity in imaging using bi-photon Raman spectroscopy techniques. Traffic 2001;2:781–788.
16. Seksek O, Bolard J. Nuclear pH gradient in mammalian cells revealed by laser microspectrofluorometry. J Cell Sci 1996;109:257–262.
17. Halbhuber KJ, Konig K. Modern laser scanning microscopy in biology, biotechnology and medicine. Ann Anat 2003;185:1–20.
18. Swift SR, Trinkle-Mulcahy L. Basic principles of FRAP, FLIM and FRET. Proc R Microsc Soc 2004;39:3–10.
19. Gordon GW, Liang GBXH, Levine B, Herman B. Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy. Biophys J 1998;74:2702–2713.
20. Haugland RP. Handbook of fluorescent probes and research products. 9th ed. Eugene, OR: Molecular Probes; 2002.
21. Schmitz G, Müller G. Structure and function of lamellar bodies, lipid–protein complexes involved in storage and secretion of cellular lipids. J Lipid Res 1991;32:1539–1570.
22. Lizard G, Moisant M, Cordelet C, Monier S, Gambert P, Lagrost L. Induction of similar features of apoptosis in human and bovine vascular endothelial cells treated by 7-ketocholesterol. J Pathol 1997; 183:330–338.
23. Miguet-Alfonsi C, Prunet C, Monier S, Bessède G, Lemaire-Ewing S, Berthier A, Ménétrier F, Néel D, Gambert P, Lizard G. Analysis of oxidative processes and of myelin figures formation before and after the loss of mitochondrial transmembrane potential during 7β-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol–induced apoptosis: comparison with various pro-apoptotic chemicals. Biochem Pharm 2002;64: 527–541.
24. Martinet W, De Bie M, Schrijvers DM, De Meyer GRY, Herman AG, Kockx MM. 7-ketocholesterol induces protein ubiquitination, myelin figure formation, and light chain 3 processing in vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004;24:1–7.
25. Shio H, Haley NJ, Fowler S. Characterization of lipid-loaded aortic cells from cholesterol-fed rabbits. III. Intracellular localization of cholesterol and cholesteryl ester. Lab Invest 1979;41:160–167.
26. Fowler S. Characterization of foam cells in experimental atherosclerosis. Acta Med Scand Suppl 1980;642:151–158.
27. Hassall DG. Three probe flow cytometry of a human-foam cell forming macrophage. Cytometry 1992;13:381–388.
28. Hassall DG, Graham A. Changes in free cholesterol content, measured by filipin fluorescence and flow cytometry correlate with changes in cholesterol biosynthesis in THP-1 macrophages. Cytometry 1995;21: 352–362.
29. Klinkner AM, Bugelski PJ, Waites R, Louden C, Hart TK, Kerns WD. A novel technique for mapping the lipid composition of atherosclerotic fatty streaks by en face fluorescence microscopy. J Histochem Cytochem 1997;45:743–753.
30. Pawley JB. Handbook of biological confocal microscopy. 2nd ed. New York: Plenum Press; 1995.
31. Harman HH. Modern factor analysis. Chicago: University of Chicago Press; 1960.
32. Kahn E, Lizard G, Pélégrini M, Frouin F, Roignot P, Chardonnet Y, Di Paola R. Four dimensional factor analysis of confocal images sequences (4D-FAMIS) to detect and characterize low numbers of human papillomavirus DNA by FISH in HeLa and SiHa cells. J Microsc 1999;193:227–243.
33. Kahn E, Vejux A, Lizard G, Bessède G, Frouin F, Prunet C, Bernengo JC, Brau F, Todd-Pokropek A, Gambert P. Analysis of the fluorescence of monodansylcadaverine positive cytoplasmic structures during 7-ketocholesterol–induced cell death. Anal Quant Cytol Histol 2004; 27:47–56.
34. Greenspan P, Fowler SD. Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile Red. J Lipid Res 1985;26:781–789.
35. Brown WJ, Sullivan TR, Greenspan P. Nile Red staining of lysosomal phospholipid inclusions. Histochemistry 1992;97:349–354.
36. Lizard G, Gueldry S, Sordet O, Monier S, Athias A, Miguet C, Bessède G, Lemaire S, Solary E, Gambert P. Glutathione is implied in the control of 7-ketocholesterol–induced apoptosis, which is associated with radical oxygen species production. FASEB J 1998; 12:1651–1663.
37. Yeh CG, Hsi B, Faulk WP. Propidium iodide as a nuclear marker in immunofluorescence. II. Use with cellular identification and viability studies. J Immunol Methods 1981;43:269–275.
38. Benzecri JP. L'analyse des données, Tome 2. L'analyse des correspondances. Paris: Dunod; 1973.
39. Di Paola R, Bazin JP, Aubry F, Aurengo A, Cavaillolès F, Herry JH, Kahn E. Handling of dynamic sequences in nuclear medecine. IEEE Trans Nucl Sci 1982;29:1310–1321.
40. Kockx MM, Herman AG. Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental? Cardiovasc Res 2000;45:736–746.
41. Schroepfer GJ. Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. Physiol Rev 2000;80:362–554.
42. Zhou Q, Wasowicz E, Handler B, Fleischer L, Kummerow FA. An excess concentration of oxysterols in the plasma is cytotoxic to cultured endothelial cells. Atherosclerosis 2000;149:191–197.
43. Kahn E, Lizard G, Frouin F, Bernengo JC, Souchier C, Bessède G, Clément O, Siitari H, Gambert P, Frija O, Todd-Pokropek A. Confocal analysis of phosphatidylserine externalization with the use of biotinylated Annexin V revealed with streptavidin FITC, -europium, -phycoerythrin or Texas Red in oxysterol-treated apoptotic cells. Anal Quant Cytol Histol 2001;23:47–55.
44. Monier S, Samadi M, Prunet C, Denance M, Laubriet A, Athias A, Berthier A, Steinmetz E, Jürgens G, Nègre-Salvayre A, Bessède G, Lemaire-Ewing S, Néel D, Gambert P, Lizard G. Impairment of the cytotoxic and oxidative activities of 7β-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol with oleate. Biochem Biophys Res Commun 2003;303: 814–824.
45. Emanuel HA, Hassel CA, Addis PB, Bergmann SD, Zavoral JH. Plasma

cholesterol oxidation products (oxysterols) in human subjects fed a meal rich in oxysterols. J Food Sci 1991;56:843–847.
46. Vine DF, Mamo JCL, Beilin LJ, Mori TA, Croft KD. Dietary oxysterols are incorporated in plasma triglyceride-rich lipoproteins, increase their susceptibility to oxidation and increase aortic cholesterol concentration of rabbits. J Lipid Res 1998;39:1995–2004.
47. Steinberg D, Pathasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztzum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. N Engl J Med 1989;320:915–924.
48. Santillan G, Sarma JS, Pawlik G, Rackl A, Grenier A, Bing RJ. Toxicity, pharmacokinetics, and cholesterol-inhibitory effects of cholesterol. Atherosclerosis 1980;35:1–10.
49. Gelissen IC, Brown AJ, Mander EL, Kritharides L, Dean RT, Jessup W. Sterol efflux is impaired from macrophage foam cells selectively enriched with 7-ketocholesterol. J Biol Chem 1996;271:17852–17860.
50. Tamasawa N, Tamasawa A, Takebe K. Higher levels of plasma cholesterol sulfate in patients with liver cirrhosis and hypercholesterolemia. Lipids 1993;28:833–836.
51. Song C, Hiipakka RA, Liao S. Auto-oxidized cholesterol sulfates are antagonistic ligands of liver X receptors: implications for the development and treatment of atherosclerosis. Steroids 2001;66:473–479.
52. Oram JF. Molecular basis of cholesterol homeostasis: lessons from Tangier disease and ABCA1. Trends Mol Med 2002;8:168–173.
53. Feng B, Tabas I. ABCA1-mediated cholesterol efflux is defective in free cholesterol-loaded macrophages. J Biol Chem 2002;277:43271–43280.
54. Tabas I. Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. J Clin Invest 2002;110:905–911.
55. Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssière JL, Mignotte B. The biochemistry of programmed cell death. FASEB J 1995;9:1277–1287.
56. Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. Nat Rev Mol Cell Biol 2000;1:31–41.
57. Feng B, Yao PM, Li Y, Devlin CM, Zhang D, Harding HP, Sweeney M, Rong JX, Kuriakose G, Fisher EA, Marks AR, Ron D, Tabas I. The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. Nat Cell Biol 2003;5:781–792.
58. Breckenridge DG, Germain M, Mathai JP, Nguyen M, Shore G. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. Oncogene 2003;22:8608–8618.
59. Pedruzzi E, Guichard C, Ollivier V, Driss F, Fay M, Prunet C, Marie JC, Pouzet C, Samadi M, Elbim C, O'Dowd Y, Bens M, Vandewalle A, Gougerot-Pocidalo MA, Lizard G, Ogier-Denis E. NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol–induced endoplasmic stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. Mol Cell Biol 2004;24:10703–10717.
60. Niemann A, Takatsuki A, Elsässer HP. The lysosomotropic agent monodansylcadaverine also acts as a solvent polarity probe. J Histochem Cytochem 2000;48:251–258.
61. Niemann A, Baltes J, Elsässer HP. Fluorescence properties and staining behavior of monodansylpentane, a structural homologue of the lysosomotropic agent monodansylcadaverine. J Histochem Cytochem 2001;49:177–185.
62. Maor I, Mandel H, Aviram M. Macrophage uptake of oxidized LDL inhibits lysosomal sphingomyelinase, thus causing the accumulation of unesterified-sphingomyelin-rich particles in the lysosomes. A possible role for 7-ketocholesterol. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995;15:1378–1387.
63. Shiratori Y, Okwu AK, Tabas I. Free cholesterol loading macrophages stimulates phosphatidylserine biosynthesis and upregulation of CTP: phosphocholine cytidyltransferase. J Biol Chem 1994;269:11337–11348.
64. Ridgway ND. Interactions between metabolism and intracellular distribution of cholesterol and sphingomyelin. Biochem Biophys Acta 2000;1484:129–141.

CONCLUSIONS
Articles 1, 2 et 3

La mort cellulaire induite par les oxystérols et en particulier par le 7-cétocholestérol est un processus présentant de nombreuses caractéristiques d'**apoptose** (externalisation de la phosphatidylsérine, chute du potentiel transmembranaire mitochondrial, fuite dans le cytosol du cytochrome c, d'AIF et de l'endonucléase G suivie par l'activation de la cascade des caspases (caspases-9, -3, -7, -8)). Ceci entraîne un clivage d'ICAD et de la PARP, une fragmentation internucléosomale de l'ADN, une condensation et /ou fragmentation nucléaire ainsi qu'un gonflement cellulaire (Miguet *et al.*, 2001 ; Miguet-Alfonsi *et al.*, 2002 ; Prunet *et al.*, 2005).

Au cours de ce processus, les travaux réalisés et présentés dans les articles 1, 2 et 3, ont permis de démontrer que la mort cellulaire, induite par le 7-cétocholestérol, était précédée par des modifications lipidiques importantes associées à la formation de structures multilamellaires.

Ces structures multilamellaires cytoplasmiques (appelées **figures myéliniques**) ont les caractéristiques suivantes :

- ce sont des structures localisées dans des compartiments acides (structures colorées à la MDC),
- ce sont des structures riches en lipides polaires (coloration rouge au Nile Red) qui accumulent des phospholipides identifiés par CPG/SM (phosphatidylcholine, sphingomyéline),
- ce sont des structures qui accumulent le 7-cétocholestérol et le cholestérol.

L'ensemble de ces caractéristiques indiquent que le 7-cétocholestérol est un puissant inducteur de **phospholipidose**.

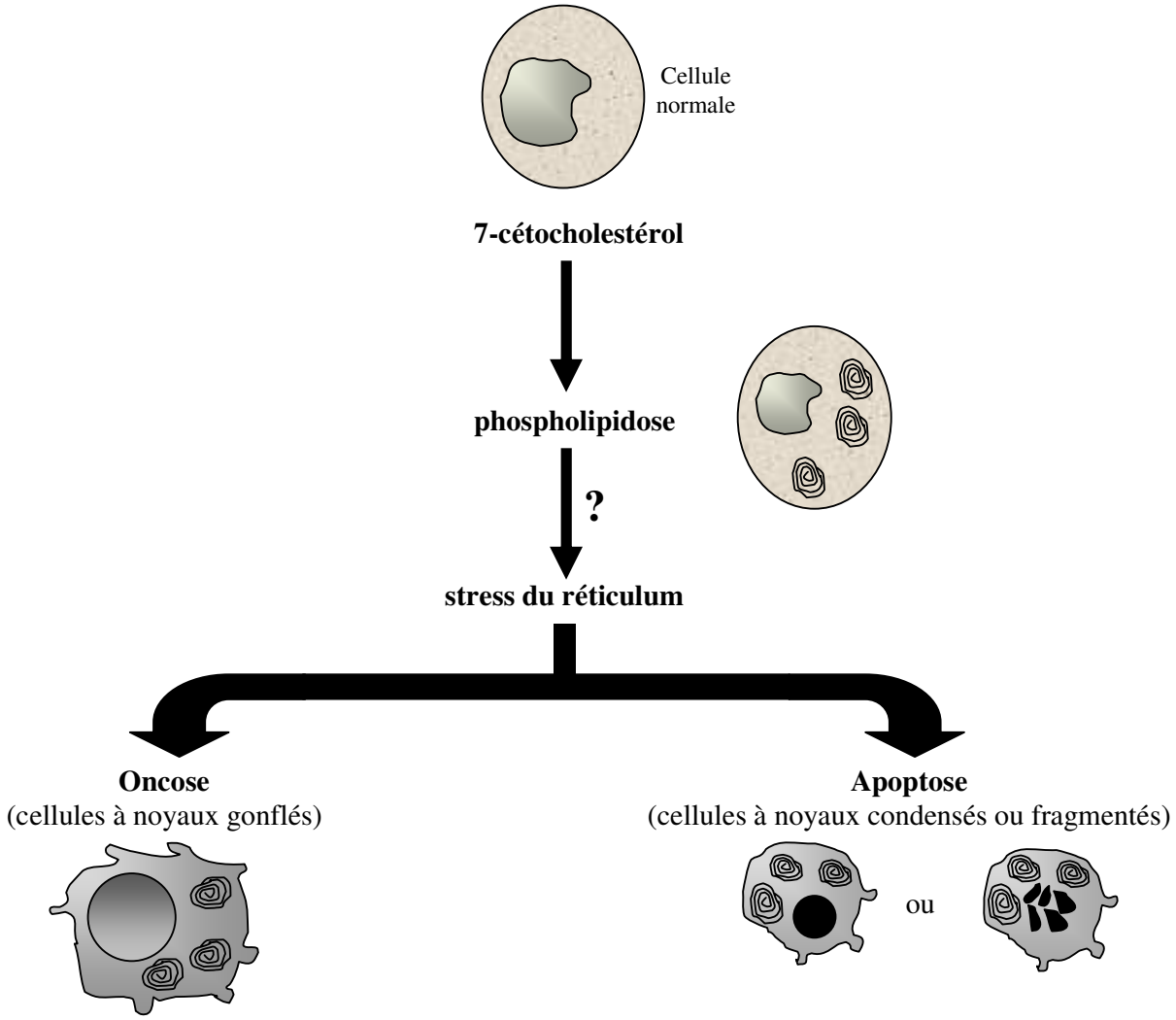
La **phospholipidose** est en effet définie par les critères suivants (Reasor & Kacew, 2001 ; Anderson & Borlak, 2006 ; Martin *et al.*, 1989) :

- présence de structures multilamellaires, identifiées par microscopie électronique, dans le cytoplasme,
- localisation de ces structures au niveau de compartiments acides,
- accumulation de phospholipides intracellulaires en particulier au niveau des structures multilamellaires,

- accumulation de l'agent inducteur de phospholipidose dans les structures multilamellaires.

Par ailleurs, la **phospholipidose** entraîne une réaction cellulaire inflammatoire (Anderson & Borlak, 2006). Or, les oxystérols induisent une surproduction de radicaux oxygénés ainsi qu'une synthèse de cytokines (MCP1, MIP1, IL8, TNFα) (Prunet *et al.*, 2006).

En fonction de ces résultats et de ceux obtenus précédemment au laboratoire, dans le cadre de la mort induite par le 7-cétocholestérol, nous proposons la séquence d'évènements suivante qui évoque d'ailleurs celle observée au cours de l'induction de la mort cellulaire par le cholestérol non-estérifié (Tabas, 2002) (Figure 59).



<u>Figure 59 :</u> Séquence des changements morphologiques associés au traitement par le 7-cétocholestérol.

Structures multilamellaires (figures myéliniques)

Comme des indices de phospholipidose ont été révélés dans des modèles d'athérosclérose expérimentaux (présence de structures multilamellaires) (Shio *et al.*, 1979 ; Fowler, 1980) et dans la mesure où la phospholipidose est un événement précoce associé à la toxicité du 7-cétocholestérol, l'identification des mécanismes associés à ce processus ainsi que les relations entre phospholipidose, inflammation et mort cellulaire pourrait conduire à de nouvelles approches d'étude de l'athérosclérose et à des stratégies thérapeutiques anti-athéromateuse.

II. RELATIONS ENTRE FIGURES MYELINIQUES, ACCUMULATION DE LIPIDES ET ACTIVATION DES CASPASES

La formation des structures multilamellaires est souvent associée à un processus de mort cellulaire. Ceci est le cas lors de la mort cellulaire induite par du cholestérol non-estérifié (Tabas, 2002), ou par l'amiodarone et l'imipramine, deux puissants inducteurs de phospholipidose (Piccotti *et al.*, 2005). Il a donc semblé important de préciser les relations entre l'activité des caspases, la formation des structures myéliniques et l'accumulation de phospholipides.

Actuellement, certaines relations entre les caspases et le métabolisme des lipides ont été mises en évidence. Quand l'apoptose est induite par la staurosporine (inhibiteur de protéine kinase), il a été démontré que la caspase-3 peut cliver SREBP-1 et SREBP-2 (Sterol-Regulatory Element Binding Proteins 1 and 2) libérant un fragment actif qui va agir au niveau transcriptionnel (Wang *et al.*, 1996). Ce fragment se lie au niveau du promoteur à des éléments de réponse fonctionnels pour SREBP.

Par ailleurs, le gène de la caspase-2 présente plusieurs éléments de réponse, au niveau de son promoteur, qui peuvent être reconnus par SREBPs. Ce type de sites est aussi rencontré dans la région promotrice de gènes impliqués dans l'homéostasie lipidique, codant pour des enzymes impliquées dans les voies de synthèse du cholestérol, de triacylglycérol, et de phospholipides, comme la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) réductase, la farnésyl diphosphate synthase (FPP synthase), l'acide gras synthase ou le récepteur aux LDLs (Logette *et al.*, 2005).

En fonction de ces considérations, l'objectif de l'article 4 a été de déterminer les relations éventuelles entre activité caspase, formation des structures myéliniques et accumulation de phospholipides.

ARTICLE 4 : Cytotoxic oxysterols indce caspase-independent myelin figure formation and caspase-dependent polar lipid accumulation.

Vejux A, Kahn E, Ménétrier F, Montange T, Lherminier J, Riedinger JM, Lizard G**.**

Histochemistry and Cell Biology (soumis)

Dans l'article 4, nous avons étudié différents oxystérols toxiques (7-cétocholestérol, 7β-hydroxycholestérol, 5,6β-epoxycholestérol) et non-toxiques (25-hydroxycholestérol, 5,6α-epoxycholesterol) afin de déterminer les relations entre toxicité, formation des structures myéliniques et accumulation de phospholipides. Nous avons aussi utilisé des inducteurs d'apoptose de référence comme le VP16 et la daunorubicine, un inducteur de stress du réticulum comme la tunicamycine, ainsi qu'un inducteur d'autophagie comme la rapamycine. L'utilisation de ces différents inducteurs avait pour objectif de définir si la formation des structures myéliniques et l'accumulation de phospholipides étaient spécifiques ou non d'oxystérols cytotoxiques.

Pour répondre à ces questions, nous avons utilisé des techniques de microscopie électronique, de cytométrie en flux et d'analyse de microscopie spectrale. Différentes lignées cellulaires ont été utilisées : cellules monocytaires humaines THP1 et U937, cellules musculaires lisses de rat A7R5, cellules humaines de carcinome du sein MCF-7.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet de différents oxystérols : 7-cétocholestérol, 7β-hydroxycholestérol, 25-hydroxycholestérol, 5,6α-epoxycholestérol, 5,6β-epoxycholestérol ainsi que de différents inducteurs de mort (VP16, daunorubicine, tunicamycine), et rapamycine, sur l'accumulation de lipides en utilisant le Nile Red comme sonde lipidique et sur la formation des figures myéliniques par microscopie électronique.

Seuls le 7-cétocholestérol, le 7β-hydroxycholestérol et le 5,6β-epoxycholestérol, qui sont des composés toxiques, induisent une accumulation de phospholipides et la formation de figures myéliniques. L'accumulation de phospholipides induite par le 7-cétocholestérol est la plus importante. Les différents inducteurs de mort (VP16, daunorubicine, tunicamycine, rapamycine) n'induisent ni la formation de figures myéliniques, ni l'accumulation de lipides polaires. Ces structures myéliniques seraient ainsi une caractéristique des oxystérols toxiques.

Par ailleurs, la formation des figures myéliniques n'a pas été empêchée par l'emploi d'un inhibiteur de caspases à large spectre z-VAD-fmk (Rodriguez *et al.*, 1996). Ces figures myéliniques sont également induites par le 7-cétocholestérol dans des cellules caspase-3 déficientes, les cellules MCF-7.

Nous avons aussi pu observer que l'utilisation de l'inhibiteur de caspases z-VAD-fmk, en association avec le 7-cétocholestérol induit une diminution de l'accumulation en lipides polaires mise en évidence par la mesure de fluorescence rouge en cytométrie en flux ainsi que par analyse spectrale après coloration des cellules par le Nile Red. Comme il a été récemment suggeré que la caspase-2 pouvait être impliquée dans le métabolisme des lipides (Logette *et al.*, 2005), son rôle dans l'accumulation de phospholipides sera étudié dans l'article 5.

Les travaux qui ont fait l'objet de l'article 4 montrent, quelles que soient les lignées cellulaires considérées, que la formation des figures myéliniques ainsi que l'accumulation de phospholipides ne sont induites que par les oxystérols toxiques (7-cétocholestérol ; 7β-hydroxycholestérol ; 5,6β-epoxycholestérol). Des inducteurs de mort (VP16, daunorubicine, tunicamycine, rapamycine) ne sont pas capables d'induire de telles structures.

En fonction des résultats obtenus avec l'utilisation de l'inhibiteur de caspases à large spectre z-VAD-fmk, la formation des figures myéliniques serait indépendante des caspases et la caspase-3 ne serait pas impliquée (présence de ces structures dans des cellules MCF-7, cellules déficientes en caspase-3). En revanche, l'accumulation de phospholipides semble dépendante des caspases.

Article 4 :

Cytotoxic oxysterols induce caspase-independent myelin figure formation and caspase-dependent polar lipid accumulation

Vejux A, Kahn E, Ménétrier F, Montange T, Lherminier J, Riedinger JM, Lizard G

Histochemistry and Cell Biology (soumis)

CYTOTOXIC OXYSTEROLS INDUCE CASPASE-INDEPENDENT MYELIN FIGURE FORMATION AND CASPASE-DEPENDENT POLAR LIPID ACCUMULATION

Anne Vejux[a], Edmond Kahn[b], Franck Ménétrier[c], Thomas Montange[a], Jeannine Lherminier[d], Jean-Marc Riedinger[e], Gérard Lizard[a]

a - INSERM U498/IFR100, CHU-Hôpital du Bocage, BP77908, 21079 Dijon Cedex and LBMC, Faculté des Sciences Gabriel, Université de Bourgogne, 6 Bd Gabriel, 21000 Dijon, France
b - INSERM U678/UMR-S UPMC, IFR 14, CHU Pitié-Salpêtrière, 75634 Paris Cedex 13, France,
c - IFR 100 INSERM, Centre de Microscopie Appliqué à la Biologie et à la Médecine, 7 Bd Jeanne d'Arc, 21033 Dijon Cedex, France
d - Service Commun de Microscopie Electronique, INRA, BP 86510, 21065 Dijon Cedex, France
e - Centre Anti-Cancer GF Leclerc, Laboratoire de Biologie Médicale, 1 bis rue du Pr Marion, 21000 Dijon, France

This work was supported by grants from the INSERM, the Ligue Contre Le Cancer (Comité de Côte d'Or) and the Conseil Régional de Bourgogne.

Correspondence to:

Dr Gérard Lizard, LBMC, Faculté des Sciences Gabriel, 6 Bd Gabriel, 21000 Dijon, France

Phone : 33 3 80 39 62 36 ; Fax : 33 3 80 39 62 50

E.mail : Gerard.Lizard@u-bourgogne.fr

ABSTRACT

Oxysterols, mainly those oxidized at the C7 position, induce a complex mode of cell death exhibiting some characteristics of apoptosis associated with a rapid induction of lipid rich multilamellar cytoplasmic structures (myelin figures) observed in various pathologies including atherosclerosis. The aim of this study was to determine the relationships between myelin figure formation, cell death, and lipid accumulation in various cell lines (U937, THP-1, MCF-7 (caspase-3 deficient), A7R5) treated either with oxysterols (7-ketocholesterol (7KC), 7β-hydroxycholesterol, cholesterol-5α,6α-epoxide, cholesterol-5β,6β-epoxide, 25-hydroxycholesterol) or cytotoxic drugs (etoposide, daunorubicin, tunicamycin, rapamycin). Cell death was assessed by the measurement of cellular permeability with propidium iodide, characterization of the morphological aspect of the nuclei with Hoechst 33342, and identification of myelin figures by transmission electron microscopy. Nile Red staining (distinguishing neutral and polar lipids) was used to identify lipid content by flow cytometry and spectral imaging microscopy. Whatever the cells considered, myelin figures were only observed with cytotoxic oxysterols (7KC, 7β-hydroxycholesterol, cholesterol-5β, 6β-epoxide), and their formation was not inhibited by the broad spectrum caspase inhibitor z-VAD-fmk. When U937 cells were treated with oxysterols or cytotoxic drugs, polar lipid accumulation was mainly observed with 7KC and 7β-hydroxycholesterol. The highest polar lipid accumulation, which was triggered by 7KC, was counteracted by z-VAD-fmk. These findings demonstrate that myelin figure formation is a caspase-independent event closely linked with the cytotoxicity of oxysterols, and they highlight a relationship between caspase activity and polar lipid accumulation.

Abbreviations : 7KC : 7-ketocholesterol; 7β-OH : 7β-hydroxycholesterol ; 25-OH : 25-hydroxycholesterol; CLSM : Confocale Laser Scanning Microscopy ; DNR : daunorubicin ; FAMIS : Factor Analysis of Medical Image Sequences ; NR : Nile Red ; PI : propidium iodide ; RAPA: rapamycin ; TUNICA : tunicamycin ; VP-16 : etoposide.

Keywords: caspase activity, myelin figures, Nile Red, oxysterols, polar lipids, spectral imaging microscopy.

INTRODUCTION

Multilamellar structures detected by transmission electron microscopy have been observed under different circumstances [1]. The most intensively investigated multilamellar structures are produced by pneumocytic cells to provide the lung surfactant system [2, 3], and in type II pneumocytes, 22-(R) hydroxycholesterol has been shown to contribute to their synthesis and secretion [4]. These ultrastructural cytoplasmic features are also frequently observed *in vivo* and *in vitro* in various pathological conditions such as prion diseases [5], or as a result of toxic drug effects [6, 7]. In experimental atherosclerosis [8, 9], multilamellar structures have been observed in foam cells, which are lipid-loaded cells, deriving either from free or esterified cholesterol engorged macrophages or smooth muscle cells [10, 11]. Interestingly, i*n vitro* studies have shown that oxidized-low density lipoproteins (Ox-LDL) (containing lipid hydroperoxides, aldehydes, and oxysterols)[12] are potent inducers of the formation of foam cells, and it has been reported that multilamellar stuctures are specialized organelles involved in the storage and secretion of lipids [1]. Thus, one of the earliest responses of macrophages to free cholesterol loading is reflected in the appearance of phospholipid-containing whorl-like membrane structures, which have the typical aspect of multilamellar structures [13-15]. As cellular injuries triggered by Ox-LDL are in part attributable to their oxysterol content [16], we previously characterized the cytotoxic effects of 7-ketocholesterol (7KC) - one of the most prominent oxysterols present in Ox-LDL and in atheromatous plaques [17] - on various cell types of the vascular wall (endothelial cells, smooth muscle cells, and monocytic cells) [18-20]. We described that 7KC- and 7β-hydroxycholesterol-induced cytotoxicity is a complex phenomenon, associated with numerous biochemical and morphological changes characteristic of apoptosis: externalization of phosphatidylserine, loss of transmembrane mitochondrial potential (ΔΨ), mitochondrial release of cytochrome *c*, endonuclease G and apoptosis inducing factor (AIF), cleavage of Bid, activation of caspases-3, -7, -8 and -9, degradation of PARP and ICAD, lysosomal destabilization, internucleosomal DNA degradation, and condensation/fragmentation or swelling of the nuclei, which are associated with the formation of multilamellar stuctures called myelin figures [18-20]. These latter are polar lipids rich structures containing cholesterol, phosphatidylcholine, and sphingomyelin [21] which are capable of activating numerous metabolic pathways, especially those involved in apoptosis playing key roles in the initiation and the development of atherosclerosis [22]. Because free cholesterol activates an apoptotic mode of cell death through the endoplasmic reticulum pathway [23], and since 7KC can stimulate some components of the reticulum such as the cell death effectors CHOP and GRP78/bip chaperone [24], it is tempting to speculate

that 7KC-induced lipid modification, especially accumulation of free cholesterol, might contribute to the activation of apoptosis. Moreover, as endoplasmic reticulum stress may contribute to the activation of autophagic cell death [25], lipid accumulation may also stimulate the processing of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) (an autophagosomal marker) in 7KC-treated human smooth muscle cells [26], and to the induction of autophagic like vacuoles identified by staining with monodansyl cadaverin in 7KC-treated U937 cells [19]. Thus, as some oxysterols identified in atherosclerotic plaques (7KC, 7β-OH, 25-hydroxycholesterol (25-OH), cholesterol-5α, 6α-epoxide (5α, 6α-epoxide), cholesterol-5β, 6β-epoxide (5β, 6β-epoxide)) [17] are either cytotoxic or not, and have various cytotoxic characteristics [27], whereas all of them are potentially capable of modifying lipid synthesis and of favoring atherosclerosis [28], the aim of the present investigation was to examine the relationships between the cytotoxicity of these compounds, and their ability to induce myelin figure formation, and lipid accumulation in order to improve the understanding of their biological and pro-atherogenic activities. To this end, human monocytic U937 and THP1 cells, A7R5 rat smooth muscle cells, and human MCF-7 carcinoma cells (functionally deleted with the caspase-3 gene) [29] were cultured for various periods of time in the absence and in the presence of 7KC, 7β-OH, 25-OH, 5α, 6α-epoxide, or 5β, 6β-epoxide (50-100 μM). Moreover, as 7KC- and 7β-OH-induced cell death is a complex phenomenon, involving endoplasmic reticulum stress and some autophagic features [19, 24, 26], we wondered whether myelin figure formation and lipid accumulation also occurred with well characterized inducers of typical modes of cell death: apoptosis triggered by etoposide (VP-16) and daunorubicin (DNR) [30, 31]; apoptosis coupled with endoplasmic reticulum stress, and autophagy induced by tunicamycin (TUNICA) [32] and by rapamycin (RAPA) [33], respectively. As there is some evidence of links between apoptosis and lipid metabolism [34, 35], we also investigated the relationship between myelin figure formation, lipid content, and caspase activation in U937 cells treated with 7KC in the absence or in the presence of the broad spectrum caspase inhibitor z-VAD-fmk [36].

In these conditions, myelin figure formation was only observed with cytotoxic oxysterols (7KC, 7β-OH, 5β, 6β-epoxide), and the greatest accumulation of polar lipids was observed with 7-KC. Moreover, in 7KC-treated U937 cells, myelin figure formation was not inhibited by z-VAD-fmk, whereas polar lipid accumulation was sharply reduced. Therefore, the present study demonstrates that myelin figure formation is a caspase-independent event, and reveals a relationship between caspase activation and polar lipids content.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Human monocytic U937 and THP-1 cells, A7R5 aortic rat smooth muscle cells, and human MCF-7 breast carcinoma cells obtained from the American Tissue and Culture Collection (Manassas, VA, USA) were cultured as previously described [19, 20, 37-39]. These different cell lines were used to specify that the induction of myelin figures, which is mainly well documented on 7KC-treated U937 cells [21], does not depend on the cell line considered.

Cell treatments

Treatments with oxysterols were performed at the beginning of the culture on U937 and THP-1 cells seeded at 1-5 x 10^5 cells/ml, and on MCF-7 seeded at 8 x 10^4 cells/cm^2. On A7R5 cells, oxysterols were introduced in the culture medium of confluent cells obtained after 72 h of culture [37]. Initial solutions of oxysterols were prepared at 800 µg/ml [19]. 7β-hydroxycholesterol (7β-OH) (Steraloids Inc) was introduced into the medium at 20 µg/ml (50 µM). 7KC, 5α, 6α-epoxide, 5β, 6β-epoxide, and 25-hydroxycholesterol (25-OH) (Sigma) were used at 40 µg/ml (100 µM). 7β-OH was used at 20 µg/ml for the following reasons: higher concentrations rapidly destroy the cells; the percentages of dead cells with 7β-OH (20 µg/ml) were in the same range as those found using 7KC (40 µg/ml) [39]. Moreover, in normal human plasma, oxysterol concentrations are around 1 µM, whereas in hypercholesterolemia, concentrations may be elevated to as high as 30 µM or higher [40, 41]. When the cells were simultaneously treated with oxysterols and with the broad spectrum caspase inhibitor z-VAD-fmk (Bachem) (100-200 µM) [36], the inhibitor was introduced into the medium at the beginning of the culture and oxysterols were added 1 h later. Stock solutions (DNR (Sigma) (10 mM), TUNICA (Alexis Biochemicals) (1.2 mM), VP-16 (Sigma) (20 mM), RAPA (Sigma) (1 mM)) were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma). Further dilutions were carried out in culture medium to obtain the following final concentrations: 1 µM (DNR), 3 µM (TUNICA), 100 µM (VP-16), and 20 µM (RAPA).

Identification and quantification of cells with condensed, fragmented and swollen nuclei after nuclei staining with Hoescht 33342

After staining with Hoescht 33342, nuclear morphology was studied under UV light by fluorescence microscopy with an Axioskop microscope (Zeiss) [19]. Apoptotic cells were characterized by condensed and/or fragmented nuclei [42]. Oncotic cells were identified by swollen nuclei [20]. For each sample, 300 cells were examined.

Flow cytometric measurement of cell viability with propidium iodide

Cell viability was determined with propidium iodide (PI) (1 µg/ml) which stains dead cells [43]. The red fluorescence was quantified by flow cytometry in 10,000 cells on a logarithmic scale of fluorescence with a CyFlow Green flow cytometer (Partec) equipped with a green laser emitting at 532 nm. Data were acquired and analyzed using the FlowMax software (Partec).

Staining conditions with Nile Red and flow cytometric analysis of lipid content

Nile Red (NR) is a phenoxazine dye used to localize and quantify neutral lipids (esterified cholesterol, mono-, di and tri-glycerides) and polar lipids (phospholipids). NR stains neutral lipids yellow (570-590 nm) and polar lipids orange-red (590 nm and above) [44, 45]. NR was prepared at 100 µg/ml in DMSO. After various treatment times, NR was added to the culture medium at 0.1 µg/ml. After 15 min of incubation at 37°C, flow cytometry analyses were performed on a CyFlow Green flow cytometer [46]. The red fluorescence of NR was collected through a 630 nm long pass filter. The mean fluorescence intensities were measured on a logarithmic scale. For each sample, 10,000 cells were acquired and analyzed by means of the FlowMax software.

Transmission electron microscopy

For electron microscopy, 5-10 x 10^6 cells were fixed for 1h with 2% glutaraldehyde prepared in 0.1 mM cacodylate buffer (pH 7.4), postfixed in osmium tetroxide, dehydrated with graded ethanol series, and embedded in Epon. Sections were stained with uranyl acetate and lead citrate, and examined with an H600 electron microscope (Hitachi).

Laser scanning confocal microscopy, spectral imaging and image analysis

For microscopical analyses, 30 µl of a cellular suspension stained with NR and adjusted at 10^6 cells/ml were applied to glass slides, air dried, mounted in a fluorescent mounting medium (Dako), coverslipped, and stored in the dark at 4°C before examination with a confocal laser scanning microscope (CLSM) Leica TCS SPL equipped with a UV/visible laser (Spectra Physics 2018). Excitation was performed at 488 nm. Images at 0.1 µm (x,y) pixel sizes were obtained in 512 x 512 matrices depending on required sizes of the nuclei at x 63 magnification of the CLSM. Regular acquisitions resulted in images in the green (530-550 nm), orange (570-590 nm) and red (610-630 nm) emission ranges. Advanced acquisitions performed in the spectral analysis mode via the RT30/70 dichroic mirror of the CLSM resulted in spectral sequences of 30 images selected inside successive 10 nm filters in the 525-695 nm emission range. Sequences of images were further processed by the Factor Analysis of Medical Image Sequences (FAMIS) algorithm [47] available at Apteryx under the name of Pixies (www.apteryx.fr). FAMIS synthesizes image sequences into a reduced number of images called factor images and curves called factor curves corresponding to fluorescent stains [48].

Statistical analysis

Statistical analyses were performed on at least three independent experiments with SigmaStat 2.03 software (Systat Software Inc) with the Student t'test, and data were considered statistically different at a *P*-value of 0.05 or less.

RESULTS

Effects of different oxysterols and of various inducers of cell death (VP-16, DNR, TUNICA, RAPA) on cell viability and lipid accumulation

The cytotoxic activities of 7KC, 7β-OH, 25-OH, 5α, 6α-epoxide, and 5β, 6β-epoxide (20-40 µg/ml), on human monocytic U937 cells were characterized at different times by determing the cellular permeability to PI [43], and the nuclear morphology with Hoechst 33342 [42]. Only 7KC, 7β-OH, and 5β, 6β-epoxide were toxic (Fig. 1). In agreement with the complex mode of cell death previously described with 7KC and 7β-OH [21], this toxicity was characterized by an enhanced permeability to PI (Fig. 1A), and by the occurrence of cells with condensed/fragmented, or swollen nuclei as early as 6 and 14h of treatment (Fig. 1B-C). When the cells were stained with NR, which emits an orange-red fluorescence in the presence polar lipids [44, 45], the red fluorescence intensity (> 630 nm) in 7KC- and 7β-OH-treated cells was significantly higher (Student t'test: $P \leq 0.05$) than in untreated cells as soon as 6 and 14h of treatment, respectively (Fig. 2A-B). In 25-OH-, 5α, 6α-epoxide-, and 5β, 6β-epoxide-treated cells, the red fluorescence intensities were either slightly higher or in the range of those quantified in untreated cells (especially at early stages of culture), and they were always lower than those detected in 7KC- and 7β-OH-treated cells (Fig. 2A-B). The most important significant increase in red fluorescence intensity was observed with 7KC (Fig. 2A-B). To study the relationships between the mode of cell death and lipid accumulation, U937 cells were treated with either VP-16 (100 µM, 6h), a potent inducer of apoptosis [19, 30], with TUNICA (3 µM, 30h) triggering an apoptotic process preceded by an endoplasmic reticulum stress [49], or with RAPA (20 µM, 16h) used to induce an autophagic mode of cell death [33, 50]. As expected, VP-16- and TUNICA-induced apoptosis were characterized by a high percentage of cells with fragmented and/or condensed nuclei, and by a slight increase in PI permeable cells (Fig. 2C), and no increase in the red fluorescence intensity of NR was observed (Fig. 2C). In the presence of RAPA, a low percentage of PI positive cells was detected, only few cells with condensed/fragmented nuclei were identified (some cells with perinuclear condensed chromatin corresponding to early steps of apoptosis were however observed, data not shown), and no increase in the red fluorescence intensity of NR was detected (Fig. 2C). Due to the red auto-fluorescence of DNR, staining with PI and NR was not performed. So, unlike to oxysterol-induced cell death (especially 7KC), the cytotoxic effects

of VP16, TUNICA and RAPA are not associated with an accumulation of polar lipids revealed by an increase in the red fluorescence intensity of NR.

Effects of different oxysterols and of various inducers of cell death (VP-16, DNR, TUNICA, RAPA) on myelin figure formation

Since myelin figures were previously observed in treatments with 7β-OH and 7KC [18, 19], we determined the relationships between myelin figure formation and the cytotoxicity of various oxysterols (7KC, 7β-OH, 25-OH ,5α, 6α-epoxide, and 5β, 6β-epoxide) (20-40 µg/ml) in human monocytic U937 cells. We also examined whether these ultrastructural figures were induced by other well defined inducers of cell death: VP-16 (100 µM, 6h), DNR (1 µM, 6h), TUNICA (30 µM, 30h), and RAPA (20 µM, 16h). Interestingly, cytoplasmic multilamellar structures were only observed with cytotoxic oxysterols (7KC, 7β-OH, 5β, 6β-epoxide) (Fig. 3, and data not shown) [19]. In addition, myelin figures were observed on 7KC (20-40 µg/ml, 24-30h)-treated human monocytic THP-1 cells (data not shown), on 7KC (20-40 µg/ml, 24-30h)-treated A7R5 rat smooth muscle cells (data not shown), on 7KC (40 µg/ml, 24-48h)-treated-human MCF-7 breast carcinoma cells (functionally deleted with the caspase-3 gene) [29] as well as on 7KC (40 µg/ml, 29-48h)-treated U937 cells cultured in the presence of the broad spectrum caspase inhibitor z-VAD-fmk (100 µM) (Fig. 3). Taken together, our data underline that myelin figure formation 1) only occurs in the presence of cytotoxic oxysterols, 2) does not depend on the cell type considered, and 2) does not require caspase activation.

Relationships between caspase activation and lipid accumulation

In agreement with our previous investigations [21, 46], 7KC leads to a significant increase in red fluorescence intensity after staining with NR (Fig. 2A-B). As we previously showed that this increase in red fluorescence was associated with an accumulation of polar lipids [21], and as among the different oxysterols investigated 7KC is the major enhancer of red fluorescence, we determined the relationships between caspase activation and lipid accumulation in 7KC-treated U937 cells. In these conditions, when 7KC (40 µg/ml)-treated cells were cultured for 18h in the presence of the caspase inhibitor (z-VAD-fmk, 200 µM), the following observations were made. As expected, compared to 7KC-treated cells, the percentage of PI permeable cells was unchanged, whereas significantly lower percentages of cells with condensed, fragmented, and swollen nuclei were observed (Fig. 4A). Moreover, compared to 7KC-treated cells, the percentage of NR positive cells was sharply reduced (Fig. 4B).

Therefore, during 7KC-induced cell death, the ability of the broad spectrum caspase inhibitor z-VAD-fmk to simultaneously reduce the percentage of cells with condensed and/or fragmented nuclei characteristic of apoptotic cells, and the percentage of NR positive cells (emitting a red fluorescence characteristic of polar lipids) focus on the existence of relationships between caspase activation and polar lipid accumulation.

Analysis of Nile Red fluorescence by spectral imaging microscopy

Spectral imaging microscopy is a powerful microscopical method that uses measurement of optical spectra at every pixel of an image, and allows to appreciate differences in color that might not otherwise be apparent. Thus, when specific probes characterized by a unique fingerprint spectrum are applied to cells or tissues, spectral imaging can help disentangle multiple colors even when they overlap either spectrally, spatially, or both [51].

In the present investigation, U937 cells were cultured for 18h in the absence or in the presence of 7KC (40 µg/ml) associated or not with z-VAD-fmk (200 µM). Analysis of NR fluorescence was performed by regular and spectral analysis by means of confocal laser scanning microscopy (CLSM) and by FAMIS processing (a sophisticated algorithm use for extraction of information) [47] of 3D-image sequences.

By regular analysis, the excitation of NR results in images in which numerous yellow fluorescent structures are visible, especially in untreated cells (control) (Fig. 5 A) and z-VAD-fmk-treated cells (Fig. 5 G). In 7KC- and (7KC + z-VAD-fmk)-treated cells, yellow spots are hardly detectable whereas orange-red fluorescent cytoplasmic structures are observed (Fig. 5 D, J).

By spectral analysis, the spectral sequences of images investigated with FAMIS provides factor images (Fig. 5 B, E, H, K) resulting from factor analysis which makes the spectral emission pattern of the cells visible (Fig. 5 C, F, I, L). In untreated cells (Fig. 5 A, B, C), a yellow emission (576 nm), and an orange emission (588 nm) are visible in the cells in the first (yellow line) and in the second (red line) factor image, respectively, whereas in 7KC-treated cells (Fig. 5 D, E, F), an orange emission (588 nm), and an orange-red emission (605 nm) are visible in the cells in the first (yellow line) and in the second (red line) factor image, respectively. Thus, compared to the control, an important fluorescence switching in the orange-red spectrum is observed in 7KC-treated cells. In z-VAD-fmk-treated cells (Fig. 5 G, H, I), an orange emission (588 nm), and a yellow-orange emission (576-594 nm) are visible in the cells in the first (yellow line) and in the second (red line) factor image, respectively. Interestingly, in (7KC plus z-VAD-fmk)-treated cells (Fig. 5 J, K, L), a weak yellow emission is visible in the first factor

image (yellow line), and an orange emission (594 nm) is mainly visible in the cells in the second factor image (red line). Thus, whereas the position of the peak in the second factor image is higher that in control cells (594 nm instead of 588 nm), the aspect of the curve evokes those of the control, and contrary to 7KC-treated cells no important fluorescent signals are observed above 594 nm. In all cases, the green lines correspond to residuals.

Overall, the present spectral imaging microscopical analyses strengthen data obtained by flow cytometry, and the method, with the use of Nile Red, contributes to the *in situ* identification of neutral and polar lipids. Therefore, this technology might constitute a usefull method for the biologists and the pathologists in order to evaluate lipid composition before to use more sophisticated biochemical or physical techniques such as gas chromatography coupled with mass spectrometry, or NMR spectroscopy or imaging, respectively.

In addition, our data demonstrate that 7KC induces an increase in red fluorescence intensity after staining with NR, and that z-VAD-fmk counteracts the increase in red fluorescence intensity triggered by 7KC. Therefore, during 7KC-induced cell death, the present data also highlight on the existence of relationships between caspase activation and polar lipid accumulation.

DISCUSSION

Multilamellar cytoplasmic structures are observed in normal and pathological conditions, including atherosclerosis [1, 8]. However, the molecules and the mechanisms involved in the formation of these ultrastructural features are not yet elucidated. In atherosclerosis, the contribution of free-cholesterol is well documented [15], and we previously reported that some oxysterols, such as 7KC and 7β-OH, were capable of inducing the formation of these multilamellar structures called myelin figures [18-21]. We also demonstrated that myelin figure formation occurring during 7KC-induced cell death was associated with an important accumulation of polar lipids (cholesterol, phosphatidylcholine, and sphingomyelin) preceding the earliest signs of cell death [21, 46]. In addition, whereas little is known on the interactions between lipid metabolism and cell death, lipotoxicity is clearly established in certain diseases, and some lipids are potent inducers of apoptosis [52]. These considerations led us to suggest that some relationships may exist between cell death, myelin figure formation, and polar lipid accumulation. Therefore, in the present investigation, different oxysterols (7KC, 7β-OH, 25-OH, 5α, 6α-epoxide, 5β, 6β-epoxide) identified at enhanced levels in atherosclerotic plaques and in the plasma of atherosclerotic patients [17] were studied. We demonstrated that myelin

figure formation only occurred under treatment with cytotoxic oxysterols and did not depend on caspase activation. Moreover, our data highlight a relationship between caspase activation and polar lipids content.

Among the oxysterols considered (7KC, 7β-OH, 25-OH, 5β, 6β-epoxide, 5α, 6α-epoxide), and in agreement with previous investigations [27, 53], cytotoxic activities were only observed with 7-KC, 7β-OH, and 5β,6β-epoxide. Moreover, as myelin figures were only detected with these cytotoxic oxysterols, and as they were not found in treatments with the potent inducers of apoptosis or autophagy studied (VP-16, daunorubicin, tunicamycin, rapamycin), nor with cytosine β-D-arabinofuranoside, vinblastine, cycloheximide, or staurosporine [19], our observations reinforce the hypothesis that multilamellar structures might constitute suitable markers of oxysterol-induced cytotoxicity. Moreover, as myelin figures can be found in MCF-7 cells (functionally deleted with the caspase-3 gene) [29], we can conclude that the formation of myelin figures does not require caspase-3, and that their formation is a caspase-independent event since they are still observed in the presence of z-VAD-fmk, a wide spectrum caspase inhibitor. Consequently, we can suppose that well conserved metabolic pathways are involved in the development of myelin figures since they are detected in cells of various species (human monocytic U937 and THP-1 cells, A7R5 rat smooth muscle cells, human MCF-7 carcinoma cells, human and bovine endothelial cells) [18, 19], and that they may have important functions in cellular repair because their presence is linked to cytotoxic activities [54]. Indeed, it has been reported that these phosphatidylcholine rich structures might represent an adaptative response to prevent free-cholesterol accumulation triggered by various chemicals, including 7KC [21], by keeping the cholesterol/phospholipid ratio in check [13-15]. So, a better knowledge of the synthesis of myelin figures [8, 9], may bring new insights to our understanding of the development of the atherosclerotic plaque to distinguish stable from unstable atherosclerotic lesions. It was therefore also of interest to examine more closely the relationships between myelin figure formation and lipid accumulation.

In a previous investigation, we demonstrated with NR and biochemical methods that 7KC-induced-cell death favors a major increase in polar lipids in NR cytoplasmic structures [21]. NR was thus used in the present study to specify the relationships between myelin figure formation, cell death, and lipid accumulation. Interestingly, the most important increases in red fluorescence of NR were only observed with the different cytotoxic oxysterols (7-KC, 7β-OH, and 5β,6β-epoxide) triggering myelin figure formation. However, whatever the stage of culture, the highest increases in red fluorescence intensity were observed with 7KC, and to a

lesser extent with 7β-OH and 5β,6β-epoxide. These data provide further evidence that 7KC, 7β-OH, and 5β,6β-epoxide activate various metabolic pathways [55]. Moreover, the marked lipid accumulation occurring during 7KC-, 7β-OH-, and 5β,6β-epoxide -induced cell death lead us to suggest that these oxysterols may trigger a lipoapototic form of cell death [52]. Consequently, foam cell formation playing key roles in atherogenesis, and resulting from the accumulation of lipids in monocytes/macrophages present at the sub-endothelial level, might depend on the oxysterol profile of the atheromatous lesion [56, 57].

As 7KC and 7β-OH induced - lipid accumulation is associated with a complex mode of cell death including some characteristics of apoptosis [19, 20], we also detailed the relationships between lipid accumulation, and caspase activation. The analysis of these relationships was supported by different reports demonstrating connections between lipid metabolism and cell death. When apoptosis was induced by the protein kinase inhibitor staurosporine, it was demonstrated that caspase-3 (CPP32) can cleave SREBP-1 and SREBP-2 (Sterol-regulatory element binding proteins 1 and 2) liberating a transcriptionally active fragment [34]. Similarly, in sterol-deprived cells, SREBP-1 and SREBP-2 are cleaved and induce the release of an N-terminal fragment that enters the nucleus and activates transcription of numerous genes. These include genes for the low density lipoprotein receptor as well as genes implied in lipid homeostasis and those encoding enzymes involved in the cholesterol or triacylglycerol/phospholipid synthesis pathway, such as 3-hydro-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, farnesyl diphosphate synthase, and fatty acid synthase [58-60]. It has also been recently demonstrated that caspase-2 is a member of the SREBP-responsive gene battery in human cells, and that modulation of caspase-2 expression via SREBP-2 modulates the cellular lipid content [35]. These different data underline the interactions between lipid metabolism, caspase-3 activity, and caspase-2 synthesis and activity, and our investigation sheds new light on the links between caspase activity and polar lipid accumulation. Indeed, when U937 cells were treated with 7KC in the simultaneous presence of the caspase inhibitor z-VAD-fmk, the sharp decrease in the red fluorescence intensity of NR obtained by flow cytometry, and the loss of the orange-red fluorescent signal observed by spectral imaging microscopy establishes a clear relationship between caspase activation and polar lipid accumulation. However, apart from the roles of caspase in apoptosis, we can also suppose that these enzymes contribute to the control of the cellular lipid level, and that a tightly regulated equilibrium exists between lipid level and the induction of programmed cell death.

In conclusion, this investigation demonstrates that the main oxysterols identified at increased levels in pro-atherogenic oxidized low density lipoproteins, and in atheromatous plaques

induce a caspase-independent myelin figure formation and a caspase-dependent lipid accumulation associated with an apoptotic mode of cell death. These observations have important pharmacological and therapeutic consequences. Indeed, new generations of anti-atherosclerotic drugs inhibiting caspase activity and enhancing lipid catabolism would have some benefits at various stages of atherosclerosis. Consequently, the analysis of the relationships between caspase and lipid metabolism is a promising field of investigation which will contribute to a better understanding of atherosclerosis and aid in the development of new treatments.

Acknowledgements

We thank Pr Eric Solary (INSERM U 517 / IFR 100, Dijon, France) for his helpful comments. The authors are indebted to Mrs Mary Bouley for reviewing the English version of the manuscript.

REFERENCES

1 Schmitz G, Muller G (1991) Structure and function of lamellar bodies, lipid-protein complexes involved in storage and secretion of cellular lipids. J Lipid Res 32: 1539-1570.

2 Guttentag S, Robinson L, Zhang P, Bühling F, Beers M (2003) Cysteine protease activity is required for surfactant protein B processing and lamellar body biogenesis. Am J Respir Cell Mol Biol 28: 69-79.

3 Ridsdale R, Post M (2004) Surfactant lipid synthesis and lamellar body formation in glycogen-laden type II cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 287: L743-751.

4 Agassandian M, Mathur SN, Zhou J, Field FJ, Mallampalli RK (2004) Oxysterols trigger ABCA1-mediated basolateral surfactant efflux. Am J Respir Cell Mol Biol 31: 227-233.

5 Liberski PP, Gadjusek DC, Brown P (2002) How do neurons degenerate in prion diseases or transmissible spongiform encephalopathies (TSEs): neuronal autophagy revisited. Acta Neurobiol 62: 141-147.

6 Schulze-Osthoff K, Bakker AC, Vanhaesebroeck B, Beyaert R, Jacob WA, Fiers W. (1992) Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. J Biol Chem 267: 5317-5323.

7 Hariri M, Millane G, Guimond MP, Guay G, Dennis JW, Nabi IR (2000) Biogenesis of multilamellar bodies via autophagy. Mol Biol Cell 11: 255-268.

8 Shio H, Haley NJ, Fowler S (1979) Characterization of lipid-laden aortic cells from cholesterol-fed rabbits. III. Intracellular localization of cholesterol and cholesteryl ester. Lab Invest 41: 160-167.

9 Fowler S (1980) Characterization of foam cells in experimental atherosclerosis. Acta Med Scand Suppl 642: 151-158.

10 Argmann CA, Sawyez CG, Li S, Nong Z, Hegele RA, Pickering JG, Huff MW (2004) Human smooth muscle cell subpopulations differentially accumulate cholesteryl ester when exposed to native and oxidized lipoproteins. Arterioscler Thromb Vasc Biol 24: 1290-1296.

11 Bobryshev YV (2006) Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis. Micron 37:208-222

12 Esterbauer H, Ramos P. Chemistry and pathophysiology of oxidation of LDL (1995) Rev Physiol Biochem Pharmacol 127: 31-64

13 Shiratori Y, Okwu AK, Tabas I (1994) Free cholesterol loading of macrophages stimulates phosphatidylcholine biosynthesis and up-regulation of CTP: phosphocholine cytidylyltransferase. J Biol Chem 269: 11337-11348.

14 Tabas I, Marathe S, Keesler GA, Shiratori Y (1996) Evidence that the initial up-regulation of phosphatidylcholine biosynthesis in free cholesterol-loaded macrophages is an adaptative response that prevents cholesterol-induced cellular necrosis. Proposed role of an eventual failure of this response in foam cell necrosis in advanced atherosclerosis. J Biol Chem 271: 22773-22781.

15 Tabas I (2002) Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. J Clin Invest 110: 905-911.

16 Colles SM, Maxson JM, Carlson SG, Chisolm GM (2001) Oxidized LDL-induced injury and apoptosis in atherosclerosis. Potential roles for oxysterols. Trends Cardiovasc Med 11: 131-138.

17 Brown AJ, Jessup W (1999) Oxysterols and atherosclerosis. Atherosclerosis 142: 1-28

18 Lizard G, Moisant M, Cordelet C, Monier S, Gambert P, Lagrost L (1997) Induction of similar features of apoptosis in human and bovine vascular endothelial cells treated by 7-ketocholesterol. J Pathol 183: 330-338.

19 Miguet-Alfonsi C, Prunet C, Monier S, Bessède G, Lemaire-Ewing S, Berthier A, Ménétrier F, Néel D, Gambert P, Lizard G (2002) Analysis of oxidative processes and of myelin figure formation before and after the loss of mitochondrial transmembrane potential during 7β-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol-induced apoptosis: comparison with various pro-apoptotic chemicals. Biochem Pharmacol 64: 527-541.

20 Prunet C, Lemaire-Ewing S, Ménétrier F, Néel D, Lizard G (2005) Activation of caspase-3-dependent and –independent pathways during 7-ketocholesterol- and 7β-hydroxycholesterol-induced cell death : a morphological and biochemical study. J Biochem Mol Toxicol 19: 311-326.

21 Vejux A, Kahn E, Dumas D, Bessède G, Ménétrier F, Athias A, Riedinger JM, Frouin F, Stoltz JF, Ogier-Denis E, Todd-Pokropek A, Lizard G (2005) 7-ketocholesterol favors lipid accumulation and colocalizes with Nile Red positive structures formed during 7-ketocholesterol-induced apoptosis: analysis by flow cytometry, FRET biphoton spectral imaging microscopy, and subcellular fractionation. Cytometry 64A: 87-100.

22 Martinet W, Kockx MM (2001) Apoptosis in atherosclerosis: focus on oxidized lipids and inflammation. Curr Opin Lipidol 12: 535-541.

23 Feng B, Yao PM, Li Y, Devlin CM, Zhang D, Harding HP, Sweeney M, Rong JX, Kuriakose G, Fischer EA, Marks AR, Ron D, Tabas I (2003) The endoplasmic is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. Nat Cell Biol 9: 781-792.

24 Pedruzzi E, Guichard C, Ollivier V, Driss F, Fay M, Prunet C, Marie JC, Pouzet C, Samadi M, Elbim C, O'dowd Y, Bens M, Vandewalle A, Gougerot-Pocidalo MA, Lizard G, Ogier-Denis E (2004) NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. Mol Cell Biol 24: 10703-10717.

25 Momoi T (2006) Conformational diseases and ER stress-mediated cell death: apoptotic cell death and autophagic cell death. Curr Mol Med 6: 111-118.

26 Martinet W, De Bie M, Schrijvers DM, De Meyer GR, Herman AG, Kockx MM (2004) 7-ketocholesterol induces protein ubiquitination, myelin figure formation, and light chain 3 processing in vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 24: 2296-2301.

27 Lemaire-Ewing S, Prunet C, Montange T, Vejux A, Berthier A, Bessède G, Corcos L, Gambert P, Néel D, Lizard G (2005) Comparison of the cytotoxic, pro-oxidant and pro-inflammatory characteristics of different oxysterols. Cell Biol Toxicol 21: 97-114

28 Massey JB (2006) Membrane and protein interactions of oxysterols. Curr Opin Lipidol 17: 296-301.

29 Jänicke RU, Sprengart ML, Wati MR, Porter AG (1998) Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis J Biol Chem 273: 9357-9360.

30 Eymin B, Dubrez L, Allouche M, Solary E (1997) Increased gadd 153 messenger RNA level is associated with apoptosis in human leukemic cells treated with etoposide. Cancer Res 15: 686-695.

31 Terrisse AD, Bezombes C, Lerouge S, Laurent G, Jaffrézou JP (2002) Daunorubicin- and Ara-C-induced interphasic apoptosis of human Type II leukemia cells is caspase-8-independent. Biochim Biophys Acta 1584: 99-103.

32 Hu P, Han Z, Couvillon AD, Exton JH (2004) Critical role of endogenous Akt/IAPs and MEK1/ERK pathways in counteracting endoplasmic reticulum stress-induced cell death. J Biol Chem 279: 49420-49429.

33 Paglin S, Lee NY, Nakar C, Fitzgerald M, Plotkin J, Deuel B, Hackett N, McMahill M, Sphicas E, Lampen N, Yahalom J (2005) Rapamycin-sensitive pathway regulates mitochondrial membrane potential, autophagy, and survival in irradiated MCF-7 cells. Cancer Res 65: 11061-11070.

34 Wang X, Zelenski NG, Yang J, Sakai J, Brown MS, Goldstein JL (1996) Cleavage of sterol regulatory element binding protein (SREBPs) by CPP32 during apoptosis. EMBO J 15: 1012-1020.

35 Logette E, Le Jossic-Corcos C, Masson D, Solier S, Sequeira-Legrand A, Dugail I, Lemaire-Ewing S, Desoche L, Solary E, Corcos L (2005) Caspase-2, a novel lipid sensor under the control of sterol regulatory element binding protein 2. Mol Cell Biol 21: 9621-9631.

36 Rodriguez I, Matsuura K, Ody C, Nagata S, Vassalli P (1996) Systemic injection of a tripeptide inhibits the intracellular activation of CPP32-like proteases in vivo and fully protects mice against Fas-mediated fulminant liver destruction and death. J Exp Med 184: 2067-2072.

37 Zahm JM, Baconnais S, Monier S, Bonnet N, Bessède G, Gambert P, Puchelle E, Lizard G (2003) Chronology of cellular alterations during 7-ketocholesterol-induced cell death on A7R5 rat smooth muscle cells: analysis by time lapse-video microscopy and conventional fluorescence microscopy. Cytometry 52A: 57-69.

38 Prunet C, Montange T, Vejux A, Laubriet A, Rohmer JF, Riedinger JM, Athias A, Lemaire-Ewing S, Néel D, Petit JM, Steinmetz E, Brenot R,Gambert P, Lizard G (2006) Multiplexed Flow Cytometric Analyses of Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines in the Culture Media of Oxysterol-Treated Human Monocytic Cells and in the Sera of Atherosclerotic Patients. Cytometry 69: 359-373.

39 Miguet C, Monier S, Bettaieb A, Athias A, Bessède G, Laubriet A, Lemaire S, Néel D, Gambert P, Lizard G (2001) Ceramide generation occurring during 7β-hydroxycholesterol- and 7-ketocholesterol-induced apoptosis is caspase independent and is not required to trigger cell death. Cell Death Differ 8: 83-99.

40 Schroepfer GJ (2000) Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. Physiol Rev 80: 361-554.

41 Emanuel HA, Hassel CA, Addis PB, Bergmann SD, Zavoral JH (1991) Plasma cholesterol oxidation products in human subjects fed a meal rich in oxysterols. J Food Sci 56:843-847.

42 Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F (1992) Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. Cytometry 13: 795-808.

43 Yeh CG, Hsi B, Faulk WP (1981) Propidium iodide as a nuclear marker in immunofluorescence. II. Use with cellular identification and viability studies. J Immunol Methods 43: 269-275.

44 Klinkner AM, Bugelski PJ, Waites R, Louden C, Hart TK, Kerns WD. (1997) A novel technique for mapping the lipid composition of atherosclerotic fatty streaks by en face fluorescence microscopy. J Histochem Cytochem 45: 743-753.

45 Greenspan P, Fowler SD (1985) Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile Red. J Lipid Res 26: 781-789.

46 Kahn E, Vejux A, Dumas D, Montange T, Frouin F, Robert V, Riedinger JM, Stoltz JF, Gambert P, Todd-Pokropek A, Lizard G (2004) FRET multiphoton spectral imaging microscopy of 7-ketocholesterol and Nile Red in U937 monocytic cells loaded with 7-ketocholesterol. Anal Quant Cytol Histol 26: 304-313.

47 Frouin F, Cinotti L, Benali H, Buvat I, Bazin JP, Millet P, Di Paola R (1993) Extraction of functional volumes from medical dynamic volumetric datasets. Comp Med Imaging Graph 17: 397-404.

48 Kahn E, Lizard G, Pélégrini M, Frouin F, Roignot P, Chardonnet Y, Di Paola R (1999) Four-dimensional factor analysis of confocal images sequences (4D-FAMIS) to detect and characterize low numbers of human papillomavirus DNA by FISH in HeLa and SiHa cells. J Microsc 193: 227-243.

49 Devries-Seimon T, Li Y, Yao PM, Stone E, Wang Y, Davis RJ, Flawell R, Tabas I (2005) Cholesterol- induced macrophage apoptosis requires ER stress pathways and engagement of the type A scavenger receptor. J Cell Biol 171: 61-73

50 Klionsky DJ (2005) Autophagy. Curr Biol 15: R282-283

51 Zimmermann T (2005) Spectral imaging and linear unmixing in light microscopy. Multispectral imaging fluorescence microscopy for living cells. Adv Biochem Eng Biotechnol 95: 245-265.

52 Unger RH, Orci L (2002) Lipoapoptosis: its mechanism and its diseases. Biochim Biophys Acta 1585: 202-212.

53 Wielkoszynski T, Gawron K, Strzelcyk J, Bodzek P, Zalewska-Ziob M, Trapp G, Sreniak M, Wickowski A (2006) Cellular toxicity of oxycholesterols. BioEssays 28: 387-298.

54 Reasor MJ (1989) A review of the biology and toxicologic implications of the induction of lysosomal lamellar bodies by drugs. Toxicol Appl Pharmacol 97: 47-56.

55 Ryan L, O'Callaghan YC, O'Brien NM (2004) Generation of an oxidative stress precedes caspase activation during 7beta-hydroxycholesterol-induced apoptosis in U937 cells. J Biochem Mol Toxicol 18:50-59.

56 Carpenter KLH (2002) Good COP, bad COP: an unsolved murder. Are dietary cholesterol oxidation products guilty of atherogenicity? Br J Nutr 88: 335-338.

57 Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarpotto E, Poli G (2004) Trojan horse-like behavior of a biologically representative mixture of oxysterols. Mol Aspects Med 25: 155-167.

58 Magana MM, Osborne TF (1996) Two tandem binding sites for sterol regulatory element binding proteins are required for sterol regulation of fatty-acid synthase promoter. J Biol Chem 271: 32689-32694.

59 Ericsson J, Jackson SM, Lee BC, Edwards PA (1996) Sterol regulatory element binding protein binds to a cis element in the promoter of the farnesyl diphosphate synthase gene. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 945-950.

60 Wang X, Briggs MR, Hua X, Yokoyama C, Goldstein JL, Brown MS (1993) Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. II . Purification and characterization. J Biol Chem 268: 14497-14504.

LEGENDS OF FIGURES

Fig. 1: Time-dependent effects of some oxysterols on cell viability. 7-ketocholesterol (7KC), 7β-hydroxycholesterol (7β-OH), 25-hydroxycholesterol (25-OH), cholesterol-5α, 6α-epoxide (5α, 6α-epoxide), and cholesterol-5β, 6β-epoxide (5β, 6β-epoxide) were used at 20-40 µg/ml in U937 cells: (A) cellular permeability to propidium iodide (PI) measured by flow cytometry, (B-C) morphological aspect of nuclei evaluated by fluorescence microscopy with Hoechst 33342. Data shown are means ± standard error of at least three independent experiments.

Fig. 2: Flow cytometric quantification of polar lipids measured with Nile Red. **A**: U937 cells were cultured for various lengths of time in the absence and in the presence of 7-ketocholesterol (7KC), 7β-hydroxycholesterol (7β-OH), 25-hydroxycholesterol (25-OH), cholesterol-5α, 6α-epoxide (5α, 6α-epoxide), and cholesterol-5β, 6β-epoxide (5β, 6β-epoxide), used at 20-40 µg/ml, and the red fluorescence of Nile Red (NR) (above 630 nm) was measured by flow cytometry. **B**: data shown are characteristic of the red fluorescence intensity of NR in untreated U937 cells (control), 7KC (40 µg/ml, 6h)- and 7β-OH (20 µg/ml, 14h)-treated U937 cells **C**: characterization of cell death (propidium iodide (PI) staining measured by flow cytometry, nuclear morphology performed by fluorescence microscopy with Hoechst 33342), quantification of the red fluorescence of NR, and identification of myelin figure formation (transmission electron microscopy) in untreated (control), 7KC, VP-16, tunicamycin (TUNICA) and rapamycin (RAPA)-treated U937 cells. Data presented are means ± standard error of at least three independent experiments. There were statistically significant differences (* $P \leq 0.05$) between untreated (control) and treated cells.

Fig 3: **Visualization of myelin figures by transmission electron microscopy**. Transmission electron microscopy of U937 cells cultured: (**A**) in the absence or (**B**) in the presence of 7KC (40 µg/ml, 30h); (**C**): enhanced magnification of the area delineated by a square in B; (**D**) in the presence of the broad spectrum caspase inhibitor z-VAD-fmk alone (100 µM, 30h), or (**E**) in the presence of 7KC (40 µg/ml) plus z-VAD-fmk (100 µM) for 30h; (**F**): enhanced magnification of the area delineated by a rectangle in E. Transmission electron microscopy of MCF-7 cells cultured (**G**) in the absence or (**H**) in the presence of 7KC (40 µg/ml; 30h). (**I**): Enhanced magnification of the area delineated by a rectangle in H.

Fig. 4: Effects of the broad spectrum caspase inhibitor z-VAD-fmk on 7-ketocholesterol-induced cell death and on polar lipid accumulation measured with Nile Red. U937 cells were cultured for 18h in the absence or in the presence of 7KC (40 µg/ml) associated or not with z-VAD-fmk (200 µM). **A**: cellular permeability to propidium iodide (PI) was measured by flow cytometry, and the morphological aspect of nuclei was evaluated by fluorescence microscopy with Hoechst 33342; **B**: the red fluorescence of Nile Red (above 630 nm) was measured by flow cytometry. Data presented are means ± standard error of at least three independent experiments. There were statistically significant differences (* $P \leq 0.05$) between untreated (control) and 7KC-treated cells. Comparison between 7KC-treated cells and (7KC+z-VAD-fmk)-treated cells: (# $P<0.001$; † $P<0.005$).

Fig. 5: Analysis of Nile Red fluorescence by spectral analysis. U937 cells were cultured for 18h in the absence or in the presence of 7KC (40 µg/ml) without or with z-VAD-fmk (200 µM). Analysis of Nile Red (NR) staining pattern was performed by regular and spectral analysis by means of confocal laser scanning microscopy (CLSM) and by FAMIS processing of 3D-image sequences. Regular analysis: NR fluorescence of cells comprised within 570-630 nm, **A**: control (untreated cells); **D**: 7KC-treated cells; **G**: z-VAD-fmk-treated cells; **J**: (7KC + z-VAD-fmk)-treated cells. Spectral analysis: three factor images are extracted from a sequence of 30 images from 525 nm to 695 nm (superimposed factor images). For image **B** (control/untreated cells), the first factor corresponds to 576 nm yellow emission (yellow line in C), the second one to 588 nm orange emission (red line in C) and the other one to residuals (green line in C). For image **E** (7KC-treated cells), the first factor corresponds to 588 nm orange emission (yellow line in F), the second one to 605 nm orange-red emission (red line in F) and the other one to residuals (green line in F). For image **H** (z-VAD-fmk-treated cells), the first factor corresponds to 588 nm orange emission (yellow line in J), the second one to 576-594 nm yellow-orange emission (red line in F) and the other one to residuals (green line in F). For image **K** (7KC + z-VAD-fmk)-treated cells, the first factor corresponds to yellow emission (yellow line in L), the second one to 594 nm orange emission (red line in L) and the other one to residuals (in green). **C**, **F**, **I** and **L**: corresponding three factor curves associated to factors images B, E, H and K, respectively. Arrows point towards yellow fluorescent spots; head arrows point towards orange-red fluorescent structures.

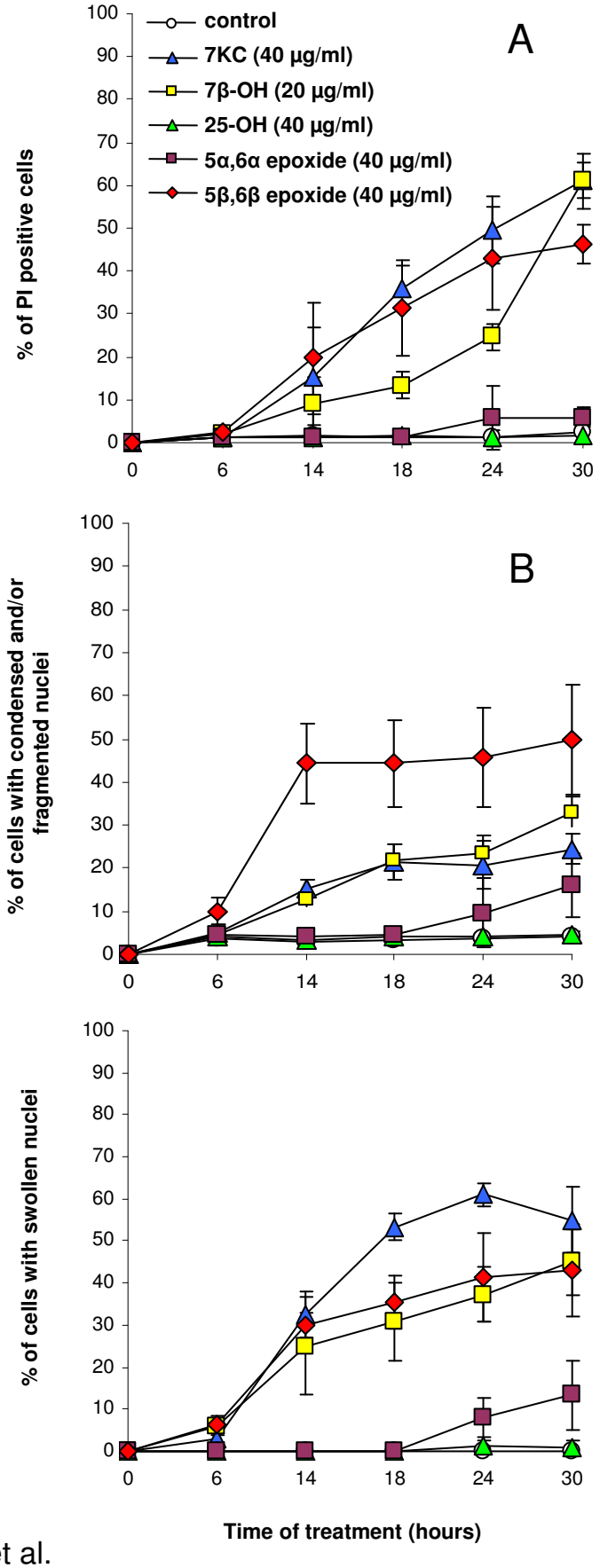
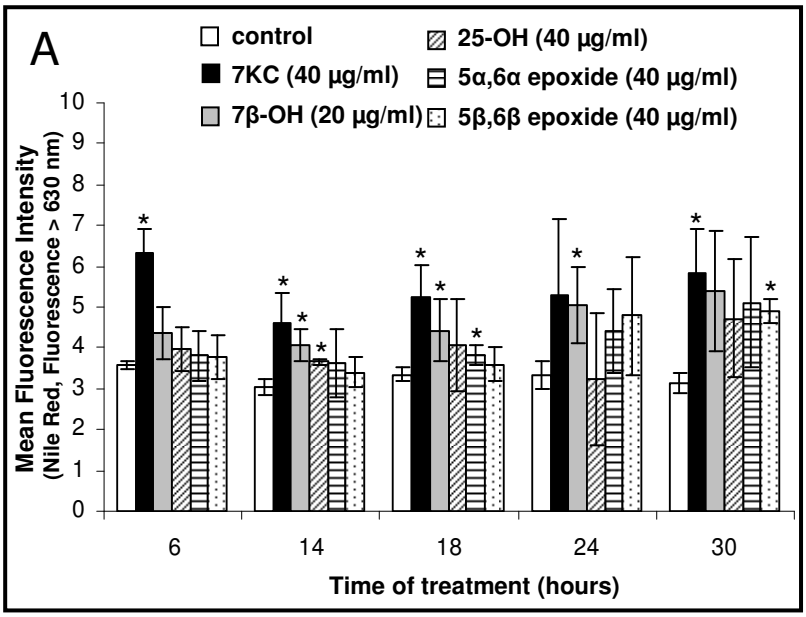
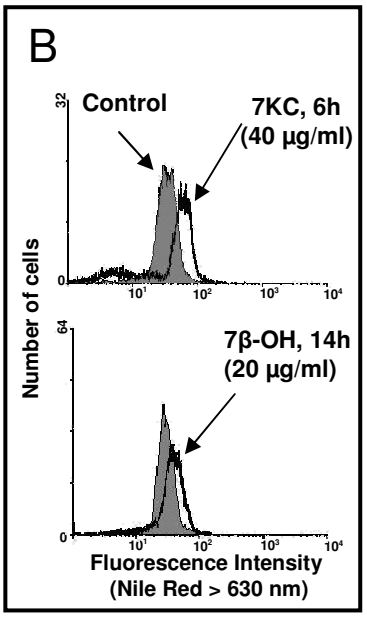


Fig. 1

Anne Vejux et al.





C

Drugs	% of PI positive cells	% of cells with condensed (C), fragmented (F) and/or swollen (S) nuclei	Mean fluorescence intensity (Nile Red, fluorescence > 630 nm)	Myelin Figures
Control	1 ± 0.5	**C/F** 4 ± 1 **S** 0	3.6 ± 0.1	-
7KC (40 µg/ml, 18h)	36 ± 5*	**C/F** 21 ± 4* **S** 53 ± 3*	5.3 ± 0.8*	+
VP16 (100 µM, 6h)	2.1 ± 0.4*	**C/F** 93 ± 3* **S** 22 ± 2*	3.2 ± 0.4	-
DNR (1 µM, 6h)	N/D	**C/F** 41 ± 2* **S** 0	N/D	-
TUNICA (3 µM, 30h)	15.7 ± 4.6*	**C/F** 96 ± 3* **S** 3 ± 2*	2.5 ± 0.5	-
RAPA (20 µM, 16h)	4.5 ± 0.3*	**C/F** 13 ± 1* **S** 0	3.2 ± 0.2	-

Fig. 2

Anne Vejux et al.

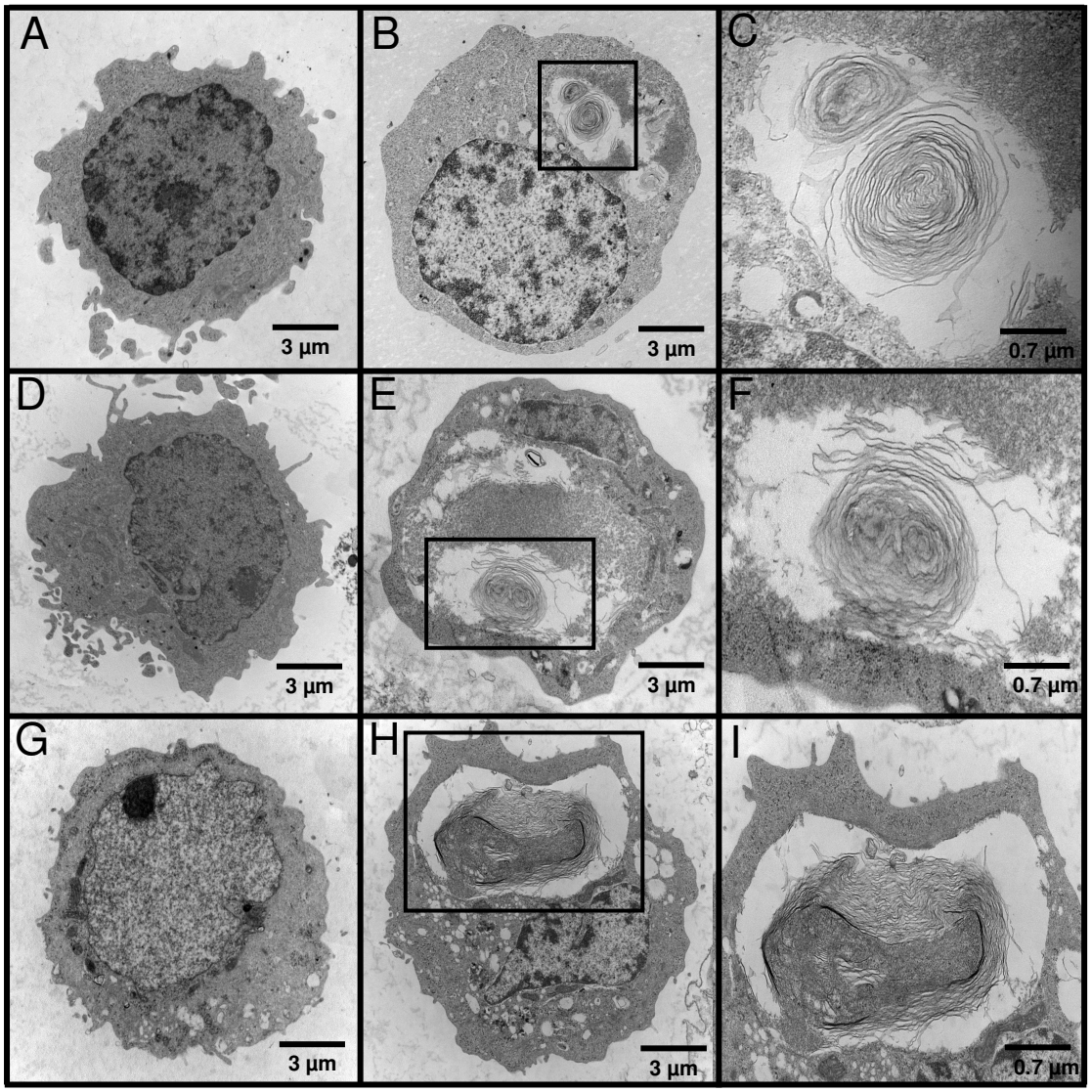


Fig. 3

Anne Vejux et al.

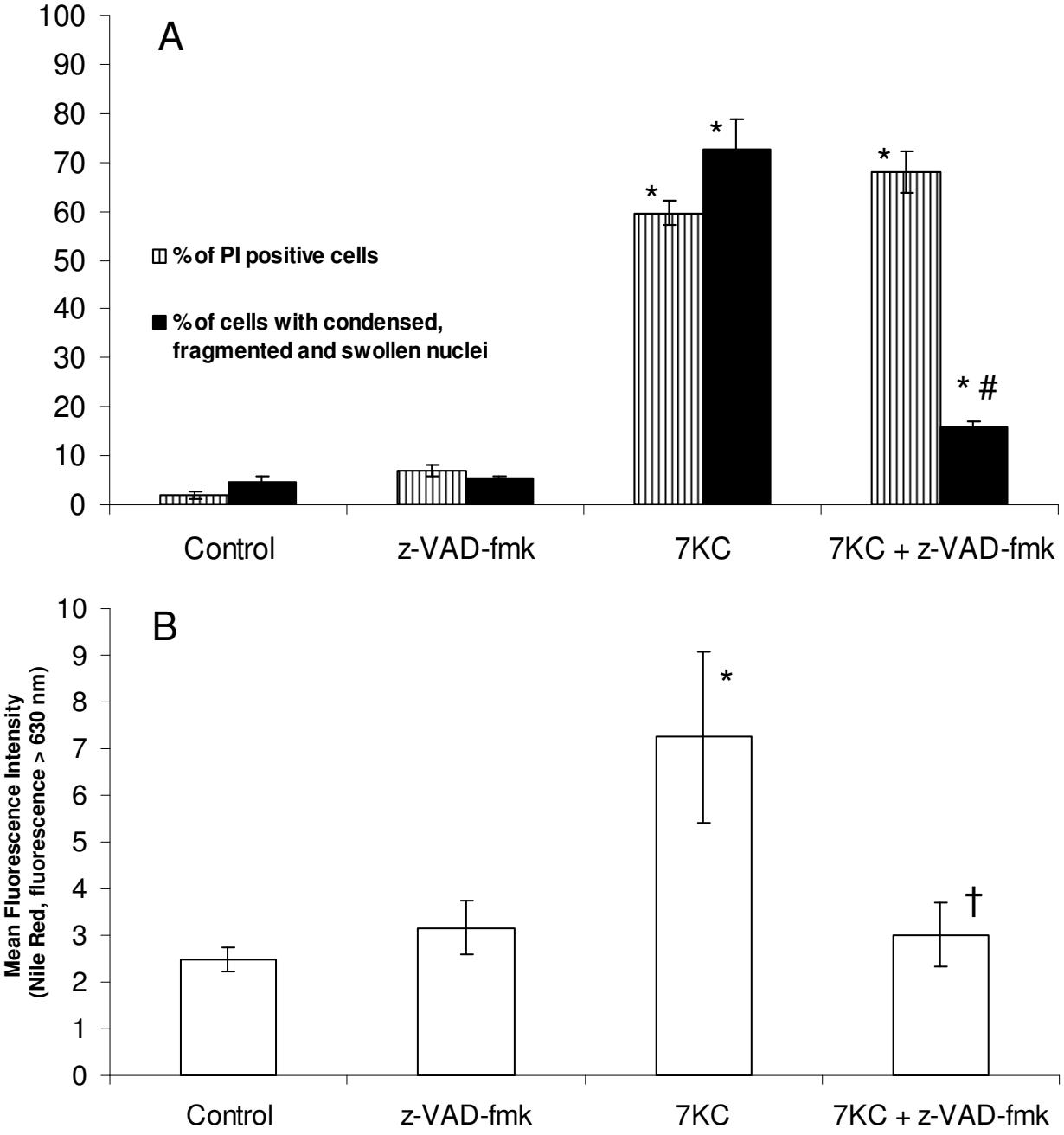


Fig. 4

Anne Vejux et al.

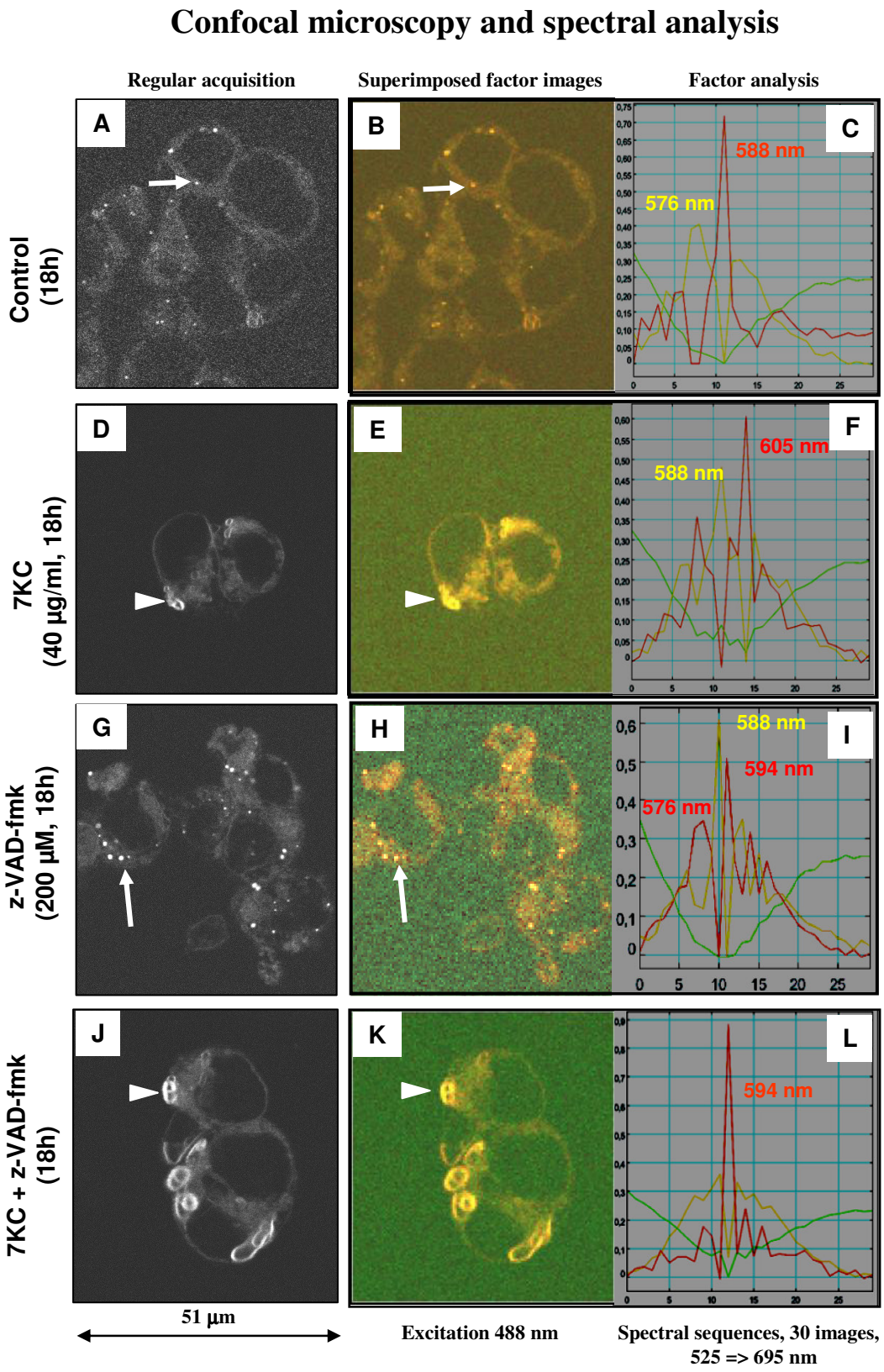


Fig. 5

Anne Vejux et al.

ARTICLE 5: Effects of caspase inhibitors (z-VAD-fmk, z-VDVAD-fmk) on Nile Red fluorescence pattern in 7-ketocholesterol-treated cells: investigation by flow cytometry and spectral imaging microscopy

Vejux A, Lizard G, Tourneur Y, Riedinger JM, Frouin F, Kahn E**.**

Cytometry (soumis)

Dans l'article 5, nous avons étudié la capacité d'inhibiteurs de caspases (z-VAD-fmk ; z-VDVAD-fmk) à s'opposer à l'accumulation des lipides polaires en mesurant la fluorescence rouge émise par le Nile Red.

Nous avons tout d'abord confirmé par cytométrie en flux et par microscopie à fluorescence l'intervention de caspases dans les cellules traitées par le 7-cétocholestérol (40 µg/ml ; 18 h) par l'intermédiaire de la technique FLICA (Fluorescent Labelled Inhibitors of CAspases). En utilisant la technique FLICA, nous avons également mis en évidence une activation de la caspase-2 (Solier *et al.*, 2004). La technique FLICA est basée sur l'utilisation d'inhibiteurs de caspases couplés à un fluorochrome (Bedner *et al.*, 2000; Grabarek *et al.*, 2002). Une fois dans les cellules, l'inhibiteur fluorescent se lie de manière covalente aux caspases actives. Le signal de fluorescence prend en compte l'inhibiteur marqué lié aux caspases actives. C'est une mesure directe *in situ* du nombre de caspases actives.

Nous montrons aussi que l'inhibiteur de caspases à large spectre, z-VAD-fmk (200 µM), possède un effet sur la morphologie nucléaire en réduisant les proportions de cellules avec des noyaux condensés, fragmentés et gonflés alors que l'inhibiteur de caspase-2 (z-VDVAD-fmk ; 100 µM) n'a aucun effet, suggérant ainsi que la caspase-2 a un rôle mineur sur les modifications de morphologie du noyau.

En revanche, ces deux inhibiteurs sont capables de réduire l'augmentation de la fluorescence rouge du Nile Red induite par le 7-cétocholestérol, indiquant une réduction de l'accumulation de lipides polaires. Cette observation, réalisée par cytométrie en flux, a été confirmée par analyse spectrale. En effet, lorsque ce type d'analyse est réalisé sur des cellules traitées par le 7-cétocholestérol associé à l'inhibiteur de caspases total (z-VAD-fmk) ou à l'inhibiteur de caspase-2 (z-VDVAD-fmk), nous constatons des caractéristiques spectrales qui évoquent alors celles obtenues avec les cellules non traitées.

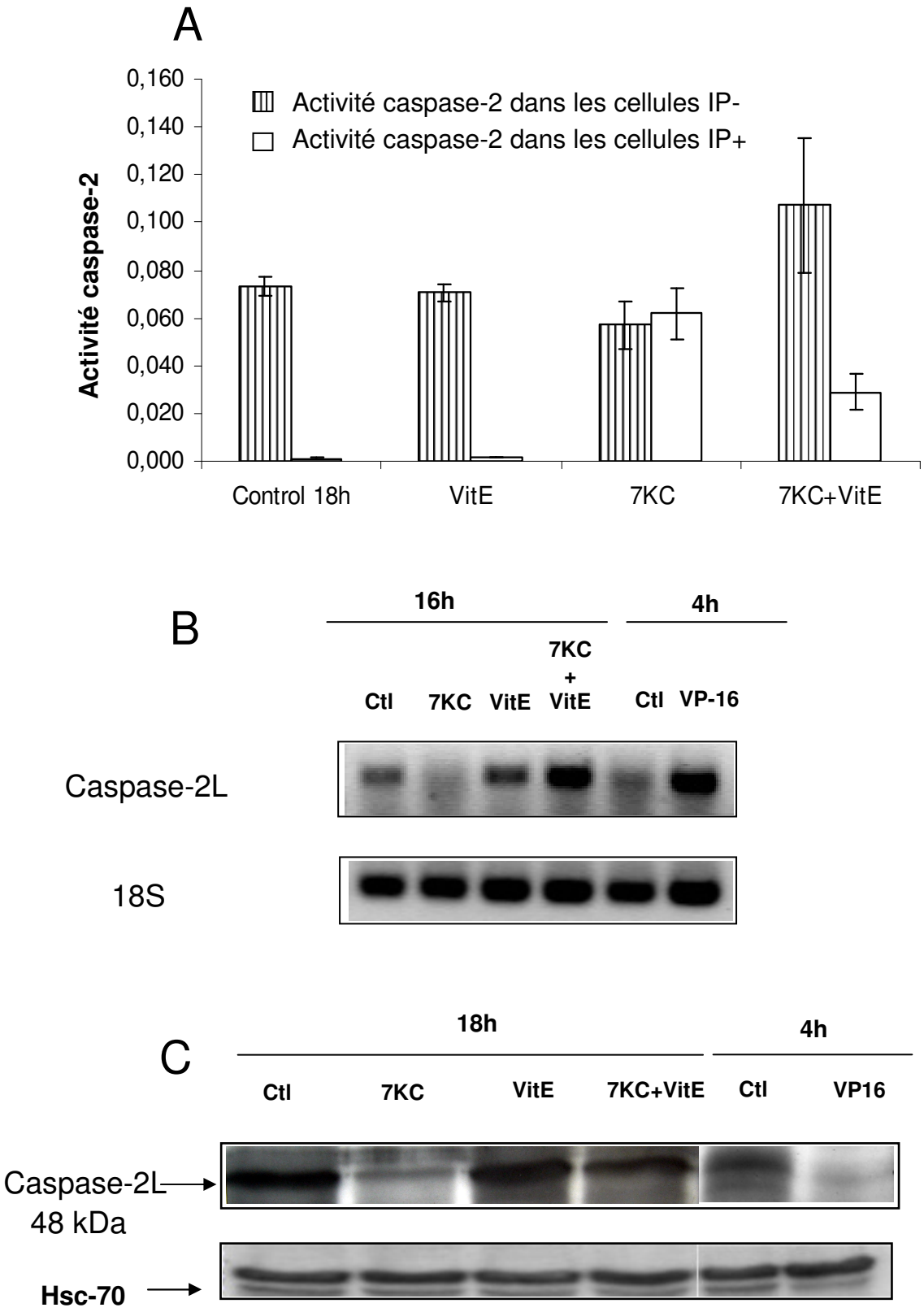


Figure 60 : Analyse de la caspase-2 au cours de la mort cellulaire induite par le 7-cétocholestérol. Des cellules U937 ont été cultivées en absence (control : Ctl) ou présence de 7-cétocholestérol (7KC) utilisé à 40 µg/ml associé ou non à de la Vitamine-E (VitE) à la concentration de 100µM pendant 4, 16 ou 18 h. **A** : Activité caspase-2 total déterminée dans les cellules non perméables (IP-) et perméable à l'iodure de propidium (IP+) avec le kit caspase-2 'colorimetric assay' (R&D Systems) au temps 18h. **B** : Analyse du taux d'ARNm de la caspase-2L par RT-PCR (primers caspase-2L : 5'-ATG-GCC-GCT-GAC-AGG-GGA-CGC-3' (sens) and 5'-GGC-AGC-AAG-TTG-AGG-AGT-TC-3' (anti-sens) ; primers 18S : 5'-CAG-CTT-CCG-GGA-AAC-CA-3' (forward) and 5'-G-GTT-TCC-CGT-GTT-GAG-T-3' (reverse)). **C** : Analyse de la pro-forme de la caspase-2L par Western Blot (Anti-caspase-2 ; BD Biosciences) et Hsc-70 (Santa Cruz).

Cette étude suggère une intervention des caspases et en particulier de la caspase-2 dans le processus d'accumulation des lipides polaires survenant au cours de la mort cellulaire induite par le 7-cétocholestérol.

En fonction des résultats obtenus, des études de biochimie et de biologie moléculaire complémentaires ont été entreprises sur l'activité caspase-2 et sur l'expression de son isoforme caspase-2L (isoforme pro-apoptotique) aux niveaux transcriptionnel et traductionnel (Figure 60). Les effets de la vitamine-E sur la caspase-2 et -2L ont aussi été étudiés (Figure 60).

Dans les cellules traitées par le 7-cétocholestérol (40 µg/ml ; 18 h), une activité caspase-2 (déterminée avec le kit caspase-2 'colorimetric assay' (R&D Systems)) a été identifiée aussi bien dans les cellules perméables (IP+) et non-perméables (IP-) à l'iodure de propidium (Figure 60A). Dans les deux cas, cette activité caspase-2 est de l'ordre de celle observée dans les cellules IP- non traitées ou traitées par la vitamine-E (100 µM). Le traitement par la vitamine-E induit aussi une augmentation des cellules IP- présentant une activité caspase-2 ainsi qu'une diminution des cellules IP+ présentant une activité caspase-2 (Figure 60A). Ceci suggère que la caspase-2 interviendrait peu ou pas dans le processus de mort induit par le 7-cétocholestérol.

L'analyse des taux d'ARNm de la caspase-2L, par RT-PCR semi-quantitative (5'-ATG-GCC-GCT-GAC-AGG-GGA-CGC-3' (sens) and 5'-GGC-AGC-AAG-TTG-AGG-AGT-TC-3' (anti-sens)) met en évidence que le 7-cétocholestérol (40 µg/ml, 16 h) diminue la transcription du gène de la caspase-2. Cette diminution est contre-balancée par la vitamine-E qui, seule, stimule la transcription de la caspase-2 (Figure 60B). Avec le VP-16 (100 µM, 4 h), une forte stimulation de l'activité transcriptionnelle de la caspase-2 a également été observée (Figure 60B).

L'analyse transcriptionnelle de la caspase-2L (Anti-caspase-2, BD Biosciences) montre une diminution de la pro-forme 48 kDa lorsque les cellules sont traitées par le 7-cétocholestérol (40 µg/ml ; 18 h). Le traitement des cellules par la vitamine-E restaure la pro-forme 48 kDa (Figure 60C). Le VP-16 qui a été utilisé comme témoin de l'activation de la caspase-2L induit aussi une forte diminution de la pro-forme (Figure 60C).

Dans leur ensemble, ces résultats montrent que le 7-cétocholestérol module l'activité de la caspase-2 ainsi que la transcription et la traduction de la caspase-2L, et que la vitamine-E s'oppose aux effets du 7-cétocholestérol.

Article 5 :

Effects of caspase inhibitors (z-VAD-fmk, z-VDVAD-fmk) on Nile Red fluorescence pattern in 7-ketocholesterol-treated cells: investigation by flow cytometry and spectral imaging microscopy

Vejux A, Lizard G, Tourneur Y, Riedinger JM, Frouin F, Kahn E

Cytometry (soumis)

EFFECTS OF CASPASE INHIBITORS (Z-VAD-FMK, Z-VDVAD-FMK) ON NILE RED FLUORESCENCE PATTERN IN 7-KETOCHOLESTEROL-TREATED CELLS: INVESTIGATION BY FLOW CYTOMETRY AND SPECTRAL IMAGING MICROSCOPY

Anne Vejux[1], Gérard Lizard[1*], Yves Tourneur[2], Jean-Marc Riedinger[3], Frédérique Frouin[4], Edmond Kahn[4*].

[1] INSERM U498, IFR 100, Hôpital du Bocage, BP 77908, 21079 Dijon Cedex, France ;

[2] Centre Commun de Quantimétrie, Université Lyon1, 8 Avenue Rockefeller, 69373 Lyon ;

[3] Centre de Lutte contre le Cancer GF Leclerc, Laboratoire de Biologie Médicale, 1 bis rue du Pr Marion, 21000 Dijon, France ;

[4] INSERM U678, CHU Pitié-Salpêtrière, 75634 Paris Cedex 13, France.

Corresponding author: Dr Edmond Kahn

E-mail: kahn@imed.jussieu.fr

*** Dr E Kahn and G Lizard have equally contributed to this work**

ABSTRACT

Background: 7-ketocholesterol (7KC) – induced cell death has some characteristics of apoptosis and is associated with polar lipid accumulation. So, we investigated the effects of the broad-spectrum caspase inhibitor z-VAD-fmk, and of the caspase-2 inhibitor z-VDVAD-fmk on lipid profile evaluated by staining with Nile Red (NR).

Methods: 7KC-treated human monocytic U937 cells were cultured in the absence or in the presence of the caspase inhibitors z-VAD-fmk, or z-VDVAD-fmk. After staining with NR, which colors neutral and polar lipids in yellow and orange/red, respectively, fluorescence was analyzed by flow cytometry (FCM), and by confocal laser scanning microscopy (CLSM) combined with subsequent image processing. 3D-image sequences were obtained by spectral analysis, and analyzed by the Factor Analysis of Medical Image Sequences (FAMIS) algorithm to differentiate emission spectra and get corresponding specific images.

Results: By FCM, comparatively to untreated cells, higher percentages of red fluorescent cells were identified in 7KC-treated cells. Factor curves and images only show orange/red fluorescence in 7KC-treated cells, whereas yellow, orange and red fluorescences are detected in 7KC-treated cells cultured in the presence of z-VAD-fmk or z-VDVAD-fmk.

Conclusions: Our data support that analysis by FCM, and by spectral analysis in CLSM associated with subsequent image processing provides useful tools to analyze the effect of caspase inhibitors on lipid content evaluated with NR. They also suggest some interactions between caspase activity, especially caspase-2, and polar lipid accumulation.

Key terms: 7-ketocholesterol, caspase-2, confocal microscopy, flow cytometry, Nile Red, spectral imaging.

INTRODUCTION

Cholesterol is the most abundant sterol in human and animal tissues and it can be oxidized to oxysterols either by specific enzymes or spontaneously when it is exposed to heat, air, light, and oxidizing agents (**1**). Oxysterols which are identified in animal and human tissues have different biological activities. It includes effects on cholesterol homeostasis, sphingolipid metabolism, radical oxygen species production, cytokines secretion, and cellular viability (**2, 3**), which are supposed to play key roles in slow degenerative diseases such as atherosclerosis (**4**). Among these oxysterols, 7-ketocholesterol (7KC) is one of the most prominent oxysterol which are present in atheromatous plaques (**5**). We previously reported that 7KC-induced cytotoxic effects include numerous features of apoptosis such as activation of caspases-3, -7, -8 and -9, which are associated to the formation of multilamellar stuctures named myelin figures (**6, 7**). These ultrastructural cytoplasmic structures, which can be stained with Nile Red (NR) (a metachromatic fluorescent probe which put yellow and orange/red colors on neutral and polar lipids, respectively) (**8-10**), are structures which are rich in 7KC accumulating polar lipids, and contain cholesterol, phosphatidylcholine, and sphingomyelin (**7**). This data provides experimental evidence that 7KC-induced cell death is associated with altered lipid metabolism. Therefore, the biological aim of the present investigation was to study the link between lipid accumulation, and caspase activity by using caspase inhibitors.

The analysis of this relationship was also supported by different reports which demonstrate some connections between lipid metabolism and cell death. When apoptosis is induced by the protein kinase inhibitor staurosporine, it was demonstrated that caspase-3 can cleave SREBP-1 and SREBP-2 (Sterol-Regulatory Element Binding Proteins 1 and 2) liberating a transcriptionally active fragment (**11**). Similarly, in sterol-deprived cells, SREBP-1 and SREBP-2 are cleaved and induce the release of a N-terminal fragment that enters the nucleus and activates transcription of numerous genes. This includes genes for the low density lipoprotein receptor as well as genes implied in lipid homeostasis such as those encoding enzymes involved in the cholesterol or triacylglycerol/phospholipid synthesis pathway, such as 3-hydro-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, farnesyl diphosphate synthase, and fatty acid synthase (**12-14**). It has also been recently demonstrated that caspase-2 is a member of the SREBP-responsive gene battery in human cells, and that modulation of caspase-2 expression via SREBP-2 modulates the cellular lipid content (**15**).

In order to analyze the relations between lipid accumulation and caspase activity, human monocytic U937 cells were cultured in the absence or in the presence of 7KC (40 µg/ml) associated or not with the broad-spectrum caspase inhibitor z-VAD-fmk (200 µM) (**16**), or

with the caspase-2 inhibitor z-VDVAD-fmk (100 μM) (**17**). The effects of these inhibitors on 7KC-induced lipid accumulation was measured after staining with NR which allows to distinguish neutral and polar lipids (**8, 9**) both by flow cytometry (FCM), and by spectral analysis (**18**) by means of confocal laser scanning microscopy (CLSM). 3D sequences of images obtained by spectral analysis of cells were analyzed by the Factor Analysis of Medical Image Sequences (FAMIS) algorithm, which summarizes image sequences into a reduced number of images called factor images and curves called factor curves (**19, 20**). Image analysis was performed on spectral sequences of images to get the specific color expressions of NR corresponding to neutral and polar lipids, which are yellow and orange/red. Sequences of images were investigated by FAMIS to provide factor images corresponding to each color expression.

The present investigation establishes the interest of the simultaneous analysis of NR-stained cells by FCM and by spectral analysis in CLSM associated with subsequent image processing with FAMIS algorithm, to provide useful tools to analyze the effects of caspase inhibitors on cellular lipid content. These complementary methods clearly show that the broad-caspase inhibitor z-VAD-fmk and the caspase-2 inhibitor z-VDVAD-fmk are capable to counteract the red fluorescence increase of NR triggered by 7KC. It is therefore tempting to speculate that caspase activity can be involved in polar lipid accumulation during 7KC-induced cell death.

MATERIALS AND METHODS

Cells and treatments

Human promonocytic U937 leukemia cells were grown in suspension in culture medium consisting of RPMI 1640 with GlutaMAX I (Gibco, Eragny, France), and antibiotics (100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum (Gibco). Cells were seeded at 500,000 per ml of culture medium, and passaged twice a week. They were cultured in a 5%CO_2/95% air-humidified atmosphere at 37°C.

7-ketocholesterol (7KC) was provided by Sigma (L'Isle d'Abeau Chesnes, France), and its purity was determined to be 100% by gaseous phase chromatography coupled with mass spectrometry. For all experiments, a stock solution of 7KC was prepared at a concentration of 800 µg/ml as previously described (**21**). To obtain the initial solution, 800 µg of 7KC was dissolved in 50 µl of absolute ethanol, 950 µl of culture medium were added, and the suspension was sonicated. To obtain a 40 µg/ml final concentration (corresponding to 100 µM), 50 µl of this initial solution was added per ml of culture medium. In all experiments, 7KC was introduced into the culture medium at the beginning of the culture, and treatments on U937 cells were carried out for 18 h. When cells are simultaneously treated with 7KC, and with the broad spectrum caspase inhibitor z-VAD-fmk (200 µM) (Bachem, Voisins le Bretonneux, France), or with the caspase-2 inhibitor z-VDVAD-fmk (100 µM) (R&D systems, Minneapolis, MN, USA), these caspase inhibitors were introduced in the medium at the beginning of the culture and oxysterols were added 1 h later.

In situ detection of activated caspases with fluorochrome-labeled inhibitors of caspase (FLICA)

Caspase total and caspase-2 activities were measured with fam-VAD-fmk (Trevigen Inc, Gaithersburg, MD, USA) and fam-VDVAD-fmk (Immunochemistry Technologies, Bloomington, MN, USA), respectively, using specifically dedicated kits according to manufactural procedures. FLICA reagents (fam-VAD-fmk; fam-VDVAD-fmk) are cell permeant and non-cytotoxic compounds, which are widely used in flow cytometry and microscopy to investigate caspase activities during apoptosis (**22, 23**). Briefly, fam-VAD-fmk is a carboxyfluorescein derivative of VAD-fmk, and fam-VDVAD-fmk is a carboxyfluorescein derivative of VDVAD-fmk. These FLICA reagents were dissolved in DMSO to obtain a 150X concentrated solution. Prior to use, 30X working solutions of fam-VAD-fmk or fam-VDVAD-fmk were prepared by diluting the stock solution 1:5 in phosphate

buffer saline (PBS). Cells were distributed into 300 µl aliquots containing 1 x 10^6 cells, and fam-VAD-fmk or fam-VDVAD-fmk working solutions were added to obtain a 1X final concentration. After 1h of incubation in the dark in a 5%CO_2/95% air-humidified atmosphere at 37°C, cells were washed twice in 1X wash buffer. The cell pellet was resuspended in 400µl of PBS, and Hoechst 33342 was added to obtain a 5 µM final concentration. After incubation for 30 min at 37°C, cells were immediately analyzed by flow cytometry. In addition, 30 µl of the cellular suspension adjusted at 10^6 cells/ml were applied to glass slides, air dried, mounted in a fluorescent mounting medium (Dako, Coppenhagen, Denmark), coverslipped, and stored in the dark at 4°C before microscopical examinations. Flow cytometric analyses were performed on GALAXY flow cytometer (Partec) equipment. The green emission of fam-VAD-fmk and fam-VDVAD-fmk were collected at 520 ± 10 nm, and measured on a logarithmic scale. 10,000 cells were acquired for each sample, and data were analyzed with the FlowMax software (Partec). Observations by conventional fluorescence microscopy were made with an Axioskop fluorescent microscope (Zeiss). For each sample, 300 cells were examined.

Staining conditions with Nile Red

Nile Red (NR) is a phenoxazine dye that can be used on living cells to localize and quantify neutral and polar lipids (Sigma). This dye stains neutral lipids in yellow (570-590 nm), and polar lipids in orange/red (590 nm and above) when it is excited at 488 nm (**8, 9**). When it is excited at 532 nm, NR can be used to identify polar lipids, which are colored in orange/red (**10**). In the present investigation, NR was prepared at 100 µg/ml in DMSO (Sigma). After 18 h of treatment with 7KC (40 µg/ml), NR was added to the culture medium at a final concentration of 0.1 µg/ml on a cellular suspension adjusted to 10^6 cells/ml. After 15 min of incubation at 37°C, flow cytometric analyses of NR stained cells were immediately performed on a CYFLOW green flow cytometer (Partec, Münster, Germany) as previously described (**10**). The orange/red fluorescence of NR was acquired with a 630 nm long pass filter, and the mean fluorescence intensities of untreated and 7KC-treated cells were measured on a logarithmic scale. 10,000 cells were acquired for each sample, and data were obtained with the FlowMax software (Partec).

Characterization of nuclear morphology by means of Hoechst 33342 staining

Nuclear morphology was studied by means of Hoechst 33342 staining, using fluorescence microscopy with an Axioskop microscope (Zeiss, Jena, Germany) and UV light excitation. Apoptotic cells were characterized by condensed and/or fragmented nuclei, and oncotic cells were identified by swollen nuclei (**24, 25**). For each sample, 300 cells were examined.

Laser scanning confocal microscopy, spectral imaging, and image analysis

For microscopical analyses, 30 µl of a cellular suspension stained with NR and adjusted at 10^6 cells/ml were applied to glass slides, air dried, mounted in a fluorescent mounting medium (Dako), coverslipped, and stored in the dark at 4°C before microscopical examinations with a confocal laser scanning microscope (CLSM) Leica TCS SPL equipped with a UV/visible laser (Spectra Physics 2018, Spectra Physics Inc, Montain View, CA, USA). Preliminary studies were performed to determine the most convenient excitation line (488 nm, 514 nm, 532 nm) and the excitation at 488 nm was selected. Images at 0.1 µm (x,y) pixel sizes were then obtained in 512 x 512 matrices depending on required sizes of the nuclei at x 63 magnification of the CLSM. Advanced acquisitions performed in the spectral analysis mode via the RT30/70 dichroic mirror of the CLSM (**26**) resulted in spectral sequences of 30 images selected inside successive 10 nm filters in the 525-695 nm emission range. Sequences of images were further processed by the Factor Analysis of Medical Image Sequences (FAMIS) algorithm (**19**) available at Apteryx under the name of Pixies (www.apteryx.fr). FAMIS synthesizes image sequences into a reduced number of images called factor images and curves called factor curves corresponding to fluorescent stains (**20, 27**). To improve interpretation of the results, factor images are superimposed. Each factor image is coded in a different color. Regular acquisitions were also performed in the orange/red range (570-620 nm) and joined to the results to facilitate the interpretation. When inhibitors are involved, four factors were required to cope with the number of possible color expressions and the presence of residuals. In other cases, three factors only were required.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with SigmaStat 2.03 software (Systat Software Inc, Richmond, CA, USA) with the Student t'test. Data were considered statistically different at a *P*-value of 0.05 or less.

RESULTS

Relationships between caspase total activity, caspase-2 activity, and polar lipid accumulation: analysis by conventional fluorescence microscopy and flow cytometry

In previous investigations, we demonstrated that the maximum proportions of U937 cells simultaneously characterized by a typical morphology of apoptosis (condensed and/or fragmented nuclei) and by an important accumulation of polar lipids measured by staining with NR, were identified at 18 h when they are cultured in the presence of 7KC used at 40 µg/ml (**7, 10**). Therefore in the present study, the relationships between polar lipid accumulation and caspase activity were analyzed in the same experimental conditions. The involvement of caspase activity occuring during 7KC-induced cell death was confirmed by the *in situ* detection of activated caspases with fluorochrome-labeled inhibitors of caspases (FLICA) (Fig. 1 A-C). Data obtained clearly show an absence of caspase activity in untreated cells whereas some caspase positive cells (84 $\pm$ 4 %) were detected under treatment with 7KC. They also reveal the presence of caspase-2 activity among a high percentage (77 $\pm$ 4 %) of 7KC-treated cells corresponding either to apoptotic cells (condensed and/or fragmented nuclei) or to oncotic cells (swollen nuclei) (**25**). Interestingly, whereas the broad spectrum caspase inhibitor (z-VAD-fmk) strongly reduces the proportions of cells with fragmented nuclei as well as the cells with swollen nuclei, the caspase-2 inhibitor (z-VDVAD-fmk) has no effect on nuclear morphology (Fig. 1 D). However, the important increase of the orange/red fluorescence of NR (corresponding to an accumulation of polar lipids) (**7**) observed in the presence of 7KC was strongly counteracted when the cells are simultaneously treated either with z-VAD-fmk or with z-VDVAD-fmk (Fig. 1 E). Interestingly, no caspase-6 activity was detected in 7KC-treated U937 cells (**25**), and no effects of the caspase-6 inhibitor (z-VEID-fmk, 100 µM) was found on the orange/red fluorescence of NR on untreated and 7KC-treated cells (Data not shown). Taken together, the present observations show that the caspase inhibitors z-VAD-fmk and z-VDVAD-fmk are capable to counteract the increase of the orange/red fluorescence of NR triggered by 7KC, and consequently that they can reduce polar lipid accumulation. So, these results hint a possible relationship between caspase activity and polar lipid accumulation, and they strengthen data obtained in previous studies evocating a potential role of caspase-2 in lipid metabolism (**15**).

Spectral imaging microscopy by confocal laser microscopy and subsequent image processing by Factor Analysis of Medical Image Sequences (FAMIS)

In the case of CLSM spectral observations of human untreated and 7KC-treated monocytic U937 cells cultured in the absence or in the presence of z-VAD-fmk or z-VDVAD-fmk, fluorescence emissions were collected through narrow band-pass filters then processed before interpretation. The excitation at 488 nm was performed and NR emission was collected in the spectral mode in 10 nm filters from red to blue to red (525 => 695 nm). The resulting spectral sequences were investigated by means of FAMIS. Regular acquisitions were also performed in the orange/red range (570-620 nm) and joined to the figures in which color superimposition of factor images is included as well as factor curves. Factor images corresponding to color expressions were coded in yellow, orange and red and the remaining one, which corresponds to residuals was coded in green.

In the case of untreated monocytic U937 cells stained with NR (Fig. 2A-C), when FAMIS is processed and three factors are required, an orange emission (594 nm) is visualized in the cells in the first factor image and a second factor image corresponds to a yellow emission (582 nm) (Fig. 2C). The third factor image corresponds to residuals.

In the case of 7KC-treated U937 cells stained with NR (Fig. 2D-F), when FAMIS is processed and three factors are required, a red emission (605 nm) is only visualized in a first factor image. The second and third factor images correspond to residuals (Fig. 2F).

In the case of U937 cells cultured with z-VAD-fmk and stained with NR (Fig. 3A-C), when FAMIS is processed and three factors are required, an orange emission (594 nm) is visualized in a first factor image,and a yellow emission (582 nm) is visualized in a second factor image while the third factor image corresponds to residuals (Fig. 3C).

In the case of U937 cells cultured with z-VDVAD-fmk and stained with NR (Fig. 3D-F), when FAMIS is processed and three factors are required, an orange emission (594 nm) is visualized in a first factor image, and a yellow emission (582 nm) is visualized in a second factor image while the third factor image corresponds to residuals (Fig. 3F).

In the case of 7KC-treated U937 cells cultured in the presence of z-VAD-fmk and stained with NR (Fig. 3G-I), when FAMIS is processed and three factors are required, a red emission (611 nm) combined with a yellow emission (582 nm) is visualized in a first factor image, and an orange emission (594 nm) is visualized in a second factor image while the third factor image corresponds to residuals (Fig. 3I). When four factors are required the yellow and red emissions are unmixed.

In the case of 7KC-treated U937 cells cultured in the presence of z-VDVAD-fmk and stained with NR (Fig. 3J-L), when FAMIS is processed and three factors are required, a red emission (611 nm) is visualized in a first factor image, and a yellow emission (576 nm) is visualized in a second factor image while the third factor image corresponds to an orange emission (594 nm) (Fig. 3L). When four factors are required, the extra factor corresponds to residuals.

In all the cases, the eye validated the correspondence between factor curves and emission spectra, and between factor images and stained objects.

Taken together, these data show that yellow, orange and red fluorescences are mainly observed in untreated cells, whereas in 7KC-treated cells orange/red fluorescence is only detected. These observations are in agreement with an accumulation of polar lipids in 7KC-treated cells (**7**). In z-VAD-fmk- or z-VDVAD-fmk-treated cells, yellow, orange and fluorescences are also simultaneously observed. Interestingly, in (7KC+z-VAD-fmk)- or (7KC+z-VDVAD-fmk)-treated cells, red fluorescence is not the principal component, and as in untreated cells, yellow and orange components are also detected. These data show that caspase inbitors, especially caspase-2 inbitor, are able to counteract 7KC-induced polar lipid accumulation. They support the hypothesis that caspases (especially caspase-2) are involved in polar lipid accumulation.

DISCUSSION

Among oxysterols, those resulting from a spontaneous oxidation of cholesterol at C7 such as 7-ketocholesterol (7KC) are present at enhanced concentrations in the plasma of atherosclerotic subjects and in atheromatous plaques (**1,4,5**). 7KC is one of the most prominent oxysterols found is atherosclerotic lesion, and it has been shown that is capable to favor polar lipid accumulation, and to induce a complex mode of cell death with some characteristics of apoptosis (**28**). As these biological activities contribute to the initiation and the development of atherosclerosis (**29**), it is important to precise the relationships between these different effects, and to identify molecules capable to counteract them in order to identify and develop new anti-atherosclerotic treatments. So in the present study, we investigated the relationships between caspase activity and polar lipid accumulation by using caspase inhibitors on human monocytic cells treated with 7KC and stained with NR, used to differentiate neutral and polar lipids (**8,9, 30**)**.** To this end we used FCM, and we developped an original spectral method of investigation by confocal laser scanning microscopy (CLSM) combined with subsequent image processing by the Factor Analysis of Medical Image Sequences (FAMIS) algorithm to differentiate emission spectra and get corresponding specific images.

Noteworthy, data obtained by flow cytometry with FLICA underline 1) that 7KC induces a caspase dependent mode of apoptosis (**25**) associated with an activation of caspase-2, and 2) that this oxysterol favors polar lipid accumulation identified by staining with NR. Consequently, these observations favor the hypothesis that some relationships can exist between cell death and polar lipid accumulation. Therefore, this led us to investigate the effects of the wide spectrum caspase inhibitor (z-VAD-fmk) and of the caspase-2 inhibitor (z-VDVAD-fmk) on polar lipid accumulation by analysis of NR fluorescence performed by regular and spectral analysis by CLSM and by FAMIS processing of 3D-image sequences.

Thus, spectral analysis and subsequent FAMIS analysis of 3D sequences of confocal images show the effect of the wide caspase inhibitor (z-VAD-fmk), and of the caspase-2 inhibitor (z-VDVAD-fmk) in the distribution of neutral and polar lipids on 7KC-treated cells. Multispectral analysis provides differentiated yellow, orange and red emissions of fluorescence of NR on corresponding images when cell deposits were screened in the blue (488 nm) excitation mode, which optimized the fluorescence expression of NR and permits to distinguish neutral and polar lipids which are stained in yellow and orange/red, respectively (**8, 9**). In agreement with data obtained by FCM, CLSM revealed the modifications in the fluorescence of NR (decreased orange/red fluorescence emission, and presence of a yellow

fluorescence emission) when 7KC-treated cells are simultaneously incubated with z-VAD-fmk and z-VDVAD-fmk, suggesting that caspases, such as caspase-2, may be involved in the regulation of polar lipids accumulation. As factor curves and images show the narrow yellow, orange and red emissions of NR, a reliable evaluation of the effect of z-VAD-fmk or z-VDVAD-fmk is obtained. Therefore, our data underline that NR is a useful and suitable marker to detect polar lipids (**30, 31**), and that spectral analysis and subsequent image processing might constitute a useful tool to analyze the effect of drugs on lipid content, especially to follow and to characterize the lipid changes associated with oxysterols present at important levels in the atherosclerotic plaque such as 7-ketocholesterol (**32**). As a consequence, our data highlight that spectral analysis provides a new tool to analyze the *in situ* content and evolution of lipids inside cells by means of fluorescence and image distribution. Therefore, this technology can constitute a useful method for the biologists and the pathologists in order to characterize the lipid content of isolated cells or tissue sections before to use more sophisticated biochemical or physical techniques such as gas chromatography coupled with mass spectrometry, NMR spectroscopy or imaging, or Raman microscopy (**33**), respectively.

In conclusion, data obtained by flow cytometry with FLICA underline 1) that 7KC induces a caspase dependent mode of apoptosis associated with an activation of caspase-2, and 2) that this oxysterol favors polar lipid accumulation identified by staining with NR. These observations led us to investigate the effects of caspase inhibitors on polar lipid accumulation by analysis of NR fluorescence performed by regular and spectral analysis by CLSM and by FAMIS processing of 3D-image sequences, and to show important differences in NR fluorescence emission spectra. In agreement with our previous investigations (**7, 10**), data obtained by spectral analysis reveal important differences in NR fluorescence between untreated and 7KC-treated cells, and show that these differences were reduced by caspase inhibitors (z-VAD-fmk and z-VDVAD-fmk). Thus, the analysis of lipids based on NR emission spectra obtained by CLSM and FAMIS processing of 3D-image sequences can constitute a new approach for the *in situ* characterization of lipids which might have numerous biological and pharmacological applications.

LITERATURE CITED

1 Schroepfer GJ Jr. Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. Physiol Rev. 2000 ; 80: 361-554.

2 Guardiola F, Codony R, Addis PB, Rafecas M, Boatella J. Biological effects of oxysterols: current status. Food Chem Toxicol. 1996 ; 34 : 193-211.

3 Massey JB. Membrane and protein interactions of oxysterols. Curr Opin Lipidol. 2006 ; 17 : 296-301.

4 Colles SM, Maxson JM, Carlson SG, Chisolm GM. Oxidized LDL-induced injury and apoptosis in atherosclerosis. Potential roles for oxysterols. Trends Cardiovasc Med. 2001 ;11 : 131-138

5 Brown AJ, Jessup W. Oxysterols and atherosclerosis. Atherosclerosis 1999; 142: 1-28

6 Miguet-Alfonsi C, Prunet C, Monier S, Bessède G, Lemaire-Ewing S, Berthier A, Ménétrier F, Néel D, Gambert P, Lizard G. Analysis of oxidative processes and of myelin figure formation before and after the loss of mitochondrial transmembrane potential during 7β-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol-induced apoptosis: comparison with various pro-apoptotic chemicals. Biochem Pharmacol 2002; 64:527-41.

7 Vejux A, Kahn E, Dumas D, Bessède G, Ménétrier F, Athias A, Riedinger JM, Frouin F, Stoltz JF, Ogier-Denis E, Todd-Pokropek A, Lizard G. 7-ketocholesterol favors lipid accumulation and colocalizes with Nile Red positive structures formed during 7-ketocholesterol-induced apoptosis: analysis by flow cytometry, FRET biphoton spectral imaging microscopy, and subcellular fractionation. Cytometry 2005; 64A: 87-100.

8 Greenspan P, Mayer EP, Fowler SD. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. J Cell Biol. 1985 ; 100: 965-973.

9 Klinkner AM, Bugelski PJ, Waites CR, Louden C, Hart TK, Kerns WD. A novel technique for mapping the lipid composition of atherosclerotic fatty streaks by en face fluorescence microscopy. J Histochem Cytochem. 1997 ; 45: 743-753.

10 Kahn E, Vejux A, Dumas D, Montange T, Frouin F, Robert V, Riedinger JM, Stoltz JF, Gambert P, Todd-Pokropek A, Lizard G. FRET multiphoton spectral imaging microscopy of 7-ketocholesterol and Nile Red in U937 monocytic cells loaded with 7-ketocholesterol. Anal Quant Cytol Histol. 2004 ; 26 : 304-313.

11 Wang X, Zelenski NG, Yang J, Sakai J, Brown MS, Goldstein JL. Cleavage of sterol regulatory element binding protein (SREBPs) by CPP32 during apoptosis. EMBO J 1996; 15: 1012-20.

12 Magana MM, Osborne TF. Two tandem binding sites for sterol regulatory element binding proteins are required for sterol regulation of fatty-acid synthase promoter. J Biol Chem 1996; 271: 32689-32694.

13 Ericsson J, Jackson SM, Lee BC, Edwards PA. Sterol regulatory element binding protein binds to a cis element in the promoter of the farnesyl diphosphate synthase gene. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93: 945-950.

14 Wang X, Briggs MR, Hua X, Yokoyama C, Goldstein JL, Brown MS. Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. II . Purification and characterization. J Biol Chem 1993; 268: 14497-14504.

15 Logette E, Le Jossic-Corcos C, Masson D, Solier S, Sequeira-Legrand A, Dugail I, Lemaire-Ewing S, Desoche L, Solary E, Corcos L. Caspase-2, a novel lipid sensor under the control of sterol regulatory element binding protein 2. Mol Cell Biol 2005; 25: 9621-9631.

16 Rodriguez I, Matsuura K, Ody C, Nagata S, Vassalli P. Systemic injection of a tripeptide inhibits the intracellular activation of CPP32-like proteases in vivo and fully protects mice against Fas-mediated fulminant liver destruction and death. J Exp Med 1996; 184: 2067-72.

17 Jangi SM, Diaz-Perez JL, Ochoa-Lizarralde B, Martin-Ruiz I, Asumendi A, Perez-Yarza G, Gardeazabal J, Diaz-Ramon JL, Boyano MD. H1 histamine receptor antagonists induce genotoxic and caspase-2-dependent apoptosis in human melanoma cells. Carcinogenesis. 2006 ; 27 : 1787-1796.

18 Garini Y, Young IT, McNamara G. Spectral imaging : principles and applications. Cytometry 2006; 69: 735-747.

19 Frouin F, Cinotti L, Benali H, Buvat I, Bazin JP, Millet P, Di Paola R. Extraction of functional volumes from medical dynamic volumetric datasets. Comp Med Imaging Graph 1993; 17: 397-404.

20 Kahn E, Lizard G, Pélégrini M, Frouin F, Roignot P, Chardonnet Y, Di Paola R. Four-dimensional factor analysis of confocal images sequences (4D-FAMIS) to detect and characterize low numbers of human papillomavirus DNA by FISH in HeLa and SiHa cells. J Micros 1999; 193: 227-43.

21 Lizard G, Gueldry S, Sordet O, Monier S, Athias A, Miguet C, Bessede G, Lemaire S, Solary E, Gambert P. Glutathione is implied in the control of 7-ketocholesterol-induced apoptosis, which is associated with radical oxygen species production. FASEB J. 1998 ; 12 : 1651-1663.

22 Bedner E, Smolewski P, Amstad P, Darzynkiewicz Z. Activation of caspases measured in situ by binding of fluorochrome-labeled inhibitors of caspases (FLICA): correlation with DNA fragmentation. Exp Cell Res. 2000 ; 259: 308-313.

23 Grabarek J, Amstad P, Darzynkiewicz Z. Use of fluorescently labeled caspase inhibitors as affinity labels to detect activated caspases. Hum Cell. 2002 ;15 :1-12

24 Lizard G, Fournel S, Genestier L, Dhedin N, Chaput C, Flacher M, Mutin M, Panaye G, Revillard JP. Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alterations in cells undergoing apoptosis. Cytometry 1995; 21: 275-283.

25 Prunet C, Lemaire-Ewing S, Ménétrier F, Néel D, Lizard G. Activation of caspase-3-dependent and –independent pathways during 7-ketocholesterol- and 7b-hydroxycholesterol-induced cell death : a morphological and biochemical study. J Biochem Mol Toxicol 2005; 19: 311-326.

26 Hiraoka Y, Shimi T, Haraguchi T. Multispectral imaging fluorescence microscopy for living cells. Cell Struct Funct 2002; 27: 367-374

27 Kahn E, Frouin F, Souchier C, Bernengo JC, Bruzzoni-Giovanelli H, Clement O, Frija G, Di Paola R, Calvo F, Linares-Cruz G. Confocal multilaser focusing and single-laser characterization of UV excitable stains of cellular preparations. Cytometry 2000; 40: 42-9.

28 Lyons MA, Brown AJ. 7-ketocholesterol. Int J Biochem Cell Biol 1999; 31: 369-375.

29 Gau GT, Wright RS. Pathophysiology, diagnosis, and management of dyslipidemia. Curr Probl Cardiol 2006; 31: 445-486.

30 Casartelli A, Bonato M, Cristofori P, Crivellente F, Dal Negro G, Masotto I, Mutinelli C, Valko K, Bonfante V. A cell based approach for the early assessment of the phospholipidogenic potential in pharmaceutical research and drug development. Cell Biol Toxicol 2003; 19: 161-176.

31 Halstead BW, Zwickl CM, Morgan RE, Monteith DK, Thomas CE, Kowers RK, Berridge BR. A clinical flow cytometric biomarker strategy: validation of peripheral leukocyte phospholipidosis using Nile Red. J Appl Toxicol. 2006 ; 26:169-77

32 Brown AJ, Jessup W. Oxysterols and atherosclerosis. Atherosclerosis. 1999 ; 142 : 1-28

33 Whitley A, Adar F. Confocal spectral imaging in tissue with contrast provided by Raman vibrational signatures. Cytometry 2006; 69: 880-887.

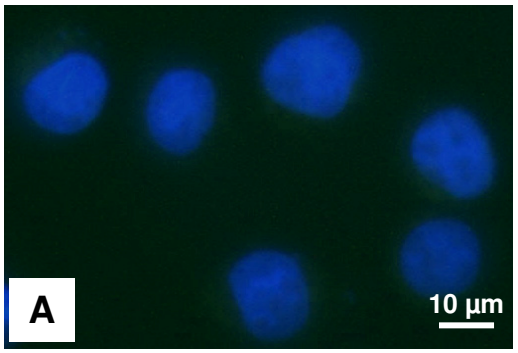
Figures legends

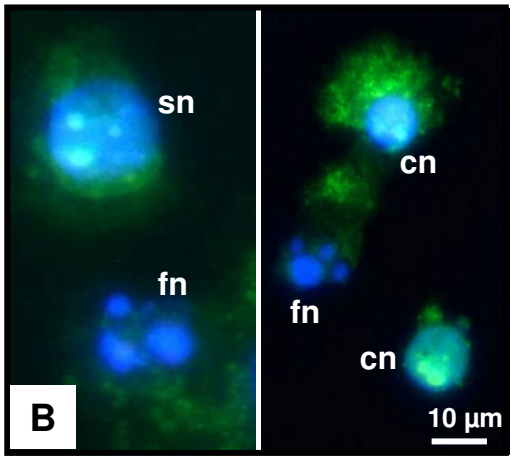
Figure 1: Analysis of caspase total activity, caspase-2 activity, and lipid content by conventional fluorescence microscopy and flow cytometry. U93 were cultured for 18h in the absence or in the presence of 7KC (40 µg/ml) associated or not with z-VAD-fmk (broad-spectrum caspase inhibitor), or with z-VDVAD-fmk (caspase-2 inhibitor).

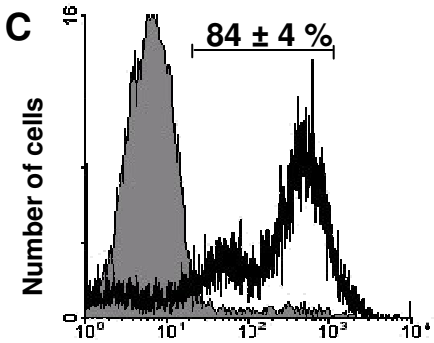
Detection and quantification of broad-spectrum caspase and caspase-2 activities with fluorochrome-labeled inhibitors of caspases (FLICA): **A**) fam-VDVAD-fmk - negative untreated cells counterstained with Hoechst 33342 (absence of caspase-2 activity); **B**) fam-VDVAD-fmk - positive 7KC-treated cells (presence of caspase-2 activity in cells with condensed, fragmented, and swollen nuclei); cn: condensed nuclei; fn: fragmented nuclei; sn: swollen nuclei; **C**) quantification of fam-VAD-fmk – positive cells (broad-spectrum caspase positive cells) and of fam-VDVAD-fmk – positive cells (caspase-2 positive cells) by flow cytometry; shaded histograms correspond to spontaneous fluorescence of the cells. **D**) Effects of z-VAD-fmk (200 µM) and z-VDVAD-fmk (100 µM) on the morphological aspect of the nuclei identified by staining with Hoechst 33342; **E**) Effects of z-VAD-fmk (200 µM) and z-VDVAD-fmk (100 µM) on polar lipid accumulation measured by flow cytometry with NR. (* $P < 0.05$).

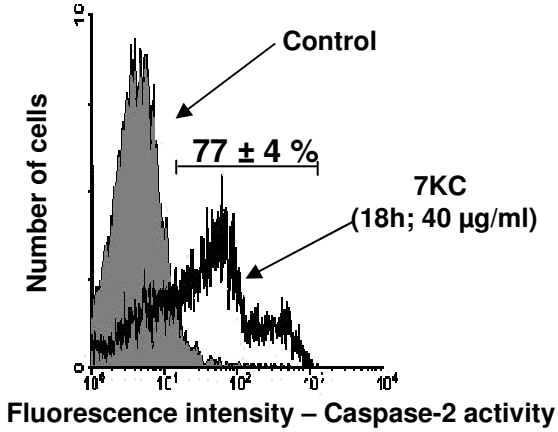
Figure 2: Multispectral analysis on untreated and 7-ketocholesterol-treated human monocytic U937 cells stained with Nile Red and observed by confocal laser scanning microscopy. U937 cells were cultured for 18h in the absence or in the presence of 7-ketocholesterol (7KC) used at 40 µg/ml. Cells were stained with NR used at 0.1 µg/ml. On untreated cells, small yellow cytoplasmic fluorescent spots are observed (**A-B**), and when FAMIS is processed and three factors are required, an orange emission (594 nm) is visualized in untreated cells in the first factor image, and a second factor image corresponds to a yellow emission (582 nm) (**C**). The third factor image corresponds to residuals. On 7KC-treated cells, only few or no yellow fluorescent spots were detected (**D-E**), and when FAMIS is processed and three factors are required, a red emission (605 nm) is visualized in a first factor image and the second and third factor images correspond to residuals (**F**). **C**, and **F**: corresponding three factor curves associated to factors images B, and E, respectively.

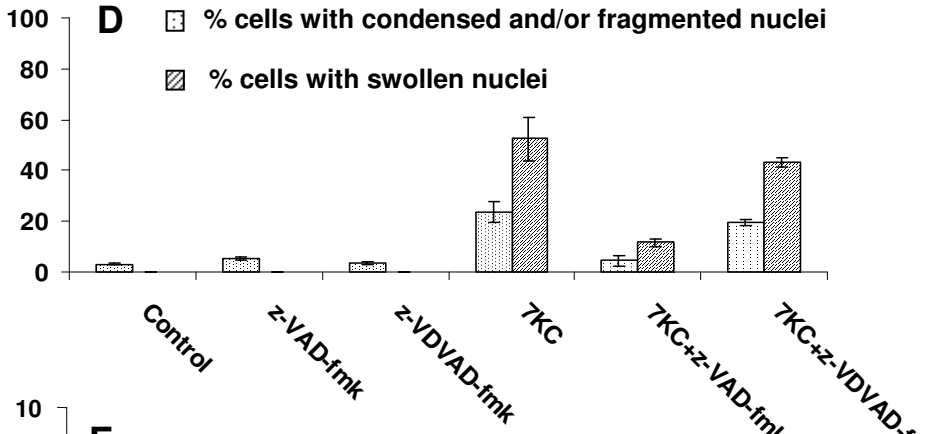
<u>Figure 3:</u> Multispectral analysis on 7-ketocholesterol-treated human monocytic U937 cells cultured with z-VAD-fmk or z-VDVAD-fmk, stained with Nile Red, and observed by confocal laser scanning microscopy. U937 cells were cultured for 18 h in the presence of of z-VAD-fmk (100 µM) or z-VDVAD-fmk (200 µM), and in the presence of 7-ketocholesterol (7KC) used at 40 µg/ml associated with z-VAD-fmk or z-VDVAD-fmk. Cells were stained with NR used at 0.1 µg/ml . On the cells cultured with z-VAD-fmk, by regular and spectral analysis by means of confocal laser scanning microscopy (CLSM) some yellow fluorescent spots are present in the cytoplasm (**A-B**), and when FAMIS is processed and three factors are required, an orange emission (594 nm) is visualized in a first factor image and a yellow emission (582 nm) is visualized in a second factor image while the third factor image corresponds to residuals (**C**). On the cells cultured with z-VDVAD-fmk, by regular and spectral analysis with CLSM, some yellow cytoplasmic structures are detected (**D-E**), and when FAMIS is processed and three factors are required, a red emission (611 nm) combined with a yellow emission (582 nm) is visualized in a first factor image, and an orange emission (594 nm) is visualized in a second factor image, while the third factor image corresponds to residuals (**F**). On 7KC-treated cells cultured with z-VAD-fmk (**G-H**) or z-VDVAD-fmk (**J-K**). When FAMIS is processed on 7KC-treated cells cultured with z-VAD-fmk and three factors are required, a red emission (611 nm) combined with a yellow emission (582 nm) is visualized in a first factor image and an orange emission (594 nm) is visualized in a second factor image while the third factor image corresponds to residuals (**I**). When FAMIS is processed on 7KC-treated cells cultured with z-VDVAD-fmk, and three factors are required, a red emission (611 nm) is visualized in a first factor image and a yellow emission (576 nm) is visualized in a second factor image while the third factor image corresponds to an orange emission (594 nm), while the third factor image corresponds to residuals (**L**).


A
10 µm


sn
fn
cn
fn
cn
B
10 µm


C
84 ± 4 %
Number of cells
Fluorescence intensity – Caspase activity


Control
77 ± 4 %
7KC
(18h; 40 µg/ml)
Number of cells
Fluorescence intensity – Caspase-2 activity


D
% cells with condensed and/or fragmented nuclei
% cells with swollen nuclei
100
80
60
40
20
0
Control
z-VAD-fmk
z-VDVAD-fmk
7KC
7KC+z-VAD-fmk
7KC+z-VDVAD-fmk

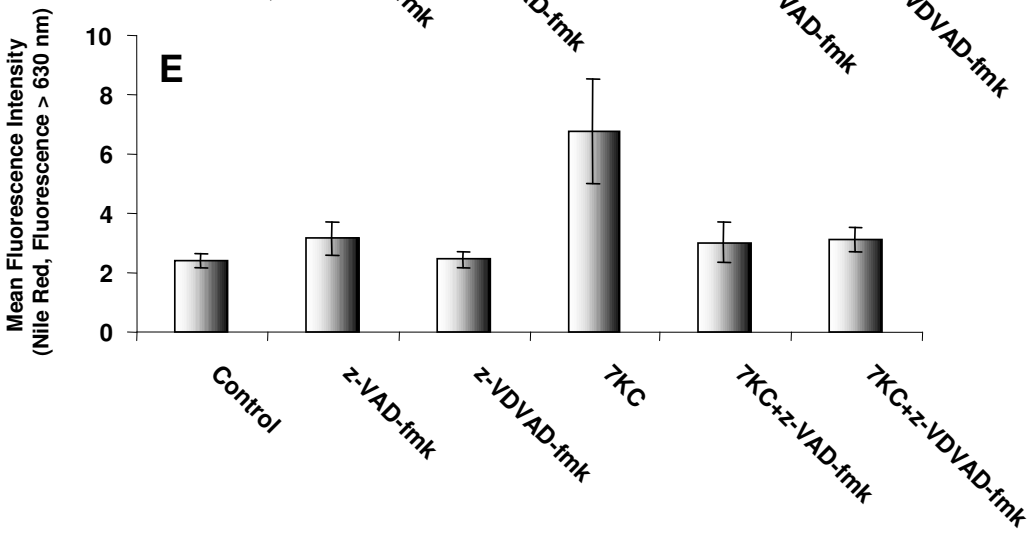

E
Mean Fluorescence Intensity
(Nile Red, Fluorescence > 630 nm)
10
8
6
4
2
0
Control
z-VAD-fmk
z-VDVAD-fmk
7KC
7KC+z-VAD-fmk
7KC+z-VDVAD-fmk

Fig 1

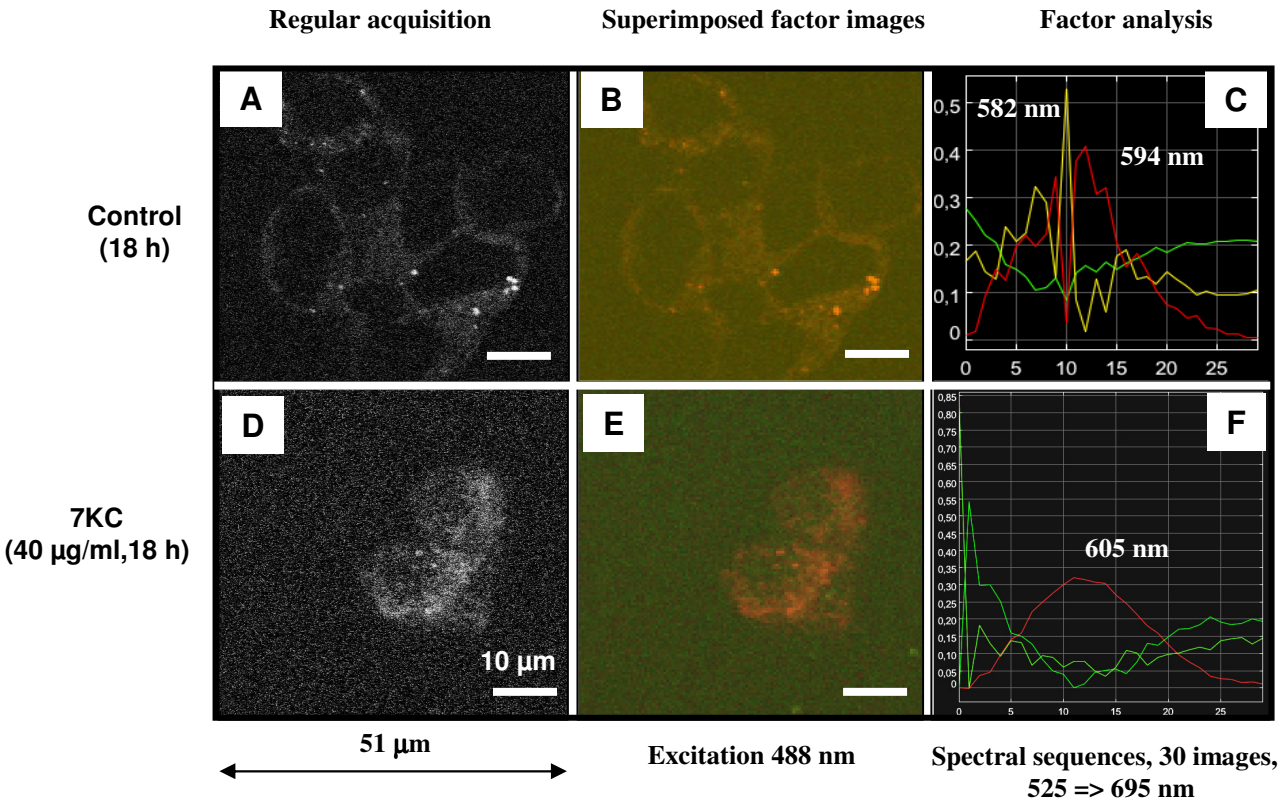

Regular acquisition
Superimposed factor images
Factor analysis
A
B
C
582 nm
594 nm
Control
(18 h)
D
E
F
605 nm
7KC
(40 µg/ml,18 h)
10 µm
51 µm
Excitation 488 nm
Spectral sequences, 30 images,
525 => 695 nm

Fig 2

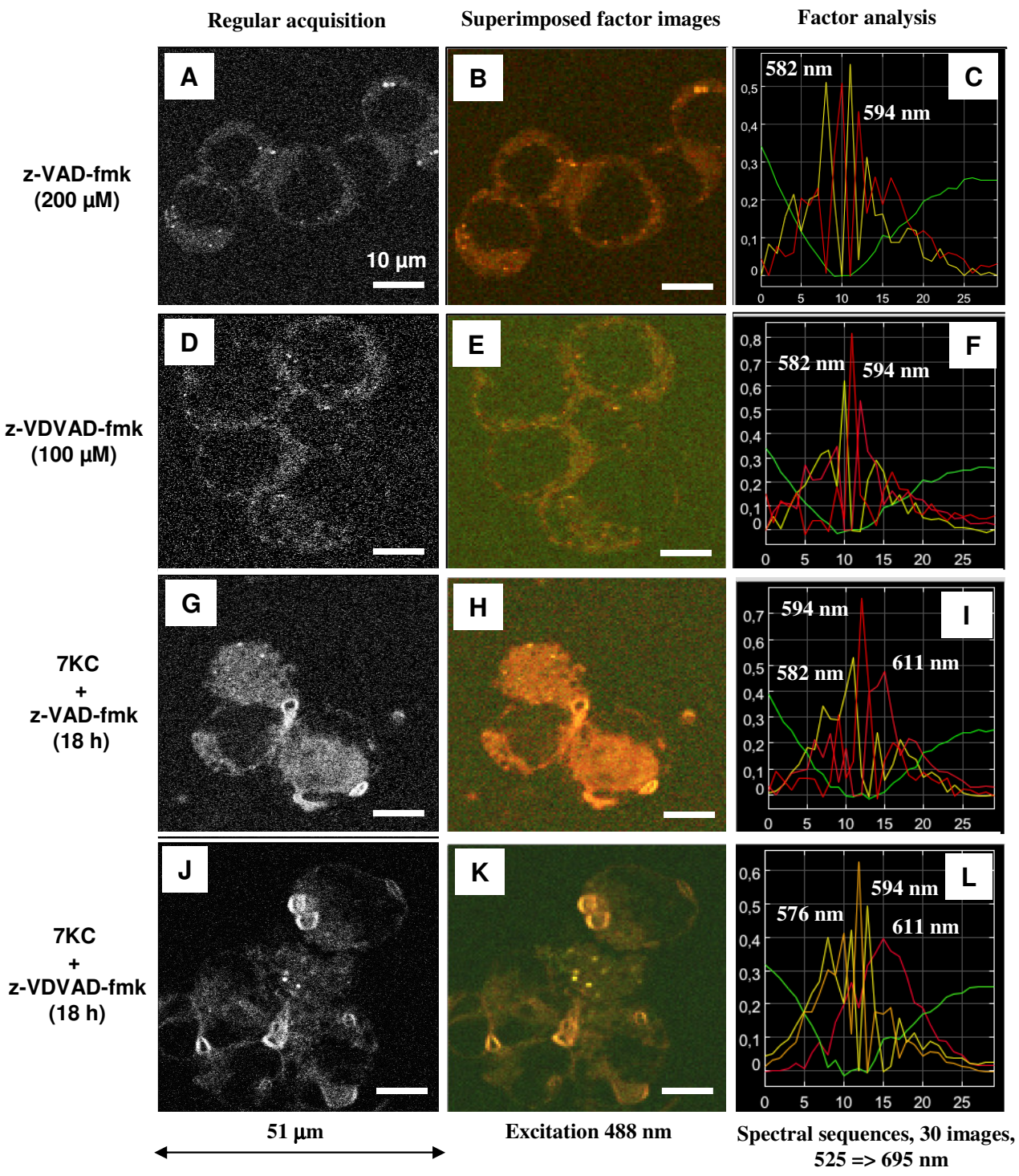

Regular acquisition
Superimposed factor images
Factor analysis
z-VAD-fmk
(200 µM)
z-VDVAD-fmk
(100 µM)
7KC
+
z-VAD-fmk
(18 h)
7KC
+
z-VDVAD-fmk
(18 h)
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
10 µm
582 nm
594 nm
611 nm
576 nm
51 µm
Excitation 488 nm
Spectral sequences, 30 images,
525 => 695 nm

Fig 3

III. EFFETS DE LA VITAMINE-E SUR LA PHOSPHOLIPIDOSE ET LA VOIE DE SIGNALISATION PI3-K/PDK-1/Akt AU COURS DE LA MORT CELLULAIRE INDUITE PAR LE 7-CETOCHOLESTEROL

ARTICLE 6 : Vitamin E impairs phospholipidosis and counteracts the inactivation of the PI3-K / PDK-1 / Akt signalling pathway associated with 7-ketocholesterol-induced apoptosis

Vejux A, Lizard G

Cell Death Differ (soumis)

Des structures multilamellaires cytoplasmiques colorées par la monodansylcadavérine (MDC) ont été décrites comme étant des vacuoles d'autophagie sur des cellules Mv1Lu transfectées par la transférase β1-6-*N*-acetylglucosaminyl V (Hariri *et al.*, 2000). Toutefois, des critères ultrastructuraux et de coloration par la MDC sont insuffisants pour affirmer que le 7-cétocholestérol induit de l'autophagie (Klionsky et Emr, 2000). Il était donc important de déterminer quel était le processus associé à la formation des structures multilamellaires colorées par la MDC sur des cellules U937 traitées par le 7-cétocholestérol. Une partie de ce travail a donc consisté à caractériser ces structures cytoplasmiques.

Par ailleurs, sachant qu'il existe des relations entre autophagie et apoptose (Bauvy *et al.*, 2001), et que la voie PI3-K/Akt est importante à la fois dans l'autophagie (Petiot *et al.*, 2000) et l'apoptose (Datta *et al.*, 1999; Neri *et al.*, 2002), il était important de déterminer la part prise par cette voie de signalisation au cours de la mort cellulaire induite par le 7-cétocholestérol. Une probable inactivation de la voie PI3-K/Akt est suggérée par des études antérieures réalisées au laboratoire démontrant une activation de la protéine pro-apoptotique BAD, présente sous sa forme déphosphorylée dans des cellules THP-1 traitées par du 7-cétocholestérol. En effet lorsque la voie PI3-K/PDK-1/Akt est active, Akt est phosphorylée par PDK-1 (Datta *et al.*, 1999). La kinase Akt peut alors phosphoryler BAD sur la sérine 99 (Datta *et al.*, 1997). BAD est alors fixée à la protéine 14-3-3, qui contribue à l'inactiver (Datta *et al.*, 1999).

Sachant que la vitamine-E s'oppose à la mort cellulaire induite par différents oxystérols (Lizard *et al.*, 2000 ; Miguet-Alfonsi *et al.*, 2002), les effets de cette vitamine sur la formation des figures myéliniques, l'accumulation de phospholipides et la voie PI3-K/PDK-1/Akt ont aussi été étudiés.

Dans l'article 6, nous démontrons que les figures myéliniques résultent d'une **phospholipidose** de part les caractéristiques qu'elles présentent : ce sont des structures multilamellaires présentes dans des vésicules acides, riches en phospholipides qui accumulent du 7-cétocholestérol. L'accumulation de phospholipides est réversible avant la dépolarisation mitochondriale.

Au cours de la mort cellulaire induite par le 7-cétocholestérol, la voie PI3-K/PDK-1/Akt est inhibée : la quantité de PI(3,4,5)P_3 est diminuée, PDK-1 et Akt sont déphosphorylées.

La vitamine-E est capable de s'opposer à la phospholipidose, en inhibant la formation des figures myéliniques, en diminuant fortement l'accumulation de lipides polaires mise en évidence par le Nile Red et en contrecarrant les changements lipidiques intervenant au niveau de la membrane cytoplasmique mis en évidence par l'utilisation de la mérocyanine 540.

La vitamine-E restaure aussi l'activité de la voie PI3-K/PDK-1/Akt : l'activité de la kinase PI3-K, la phosphorylation de PDK-1 sur les tyrosines 373/376 et celle d'Akt sur la thréonine 308 sont rétablies.

Ces travaux soulignent que le 7-cétocholestérol est un puissant inducteur de phospholipidose et que la vitamine-E inhibe ce processus. Par ailleurs, lors de la mort cellulaire induite par le 7-cétocholestérol, la voie PI3-K/PDK-1/Akt est inhibée et la vitamine-E est capable de restaurer la fonctionnalité de cette voie en activant la PI3-K, et en rétablissant la phosphorylation de PDK-1 et d'Akt.

Article 6 :

Vitamin E impairs phospholipidosis and counteracts the inactivation of the PI3-K / PDK-1 / Akt signalling pathway associated with 7-ketocholesterol-induced apoptosis

Vejux A, Lizard G

Cell Death Differ (soumis)

Vitamin-E impairs phospholipidosis and counteracts the inactivation of the PI3-K / PDK-1 / Akt signalling pathway associated with 7-ketocholesterol-induced apoptosis

A Vejux [1], G Lizard [1]*

1 - LBMC, Inserm U498, Inserm IFR100, Faculté des Sciences Gabriel, 6 Bd Gabriel, 21000 Dijon, France

* ***Correspondence to*** : Dr Gérard Lizard, LBMC / Inserm, Faculté des Sciences Gabriel, 6 Bd Gabriel, 21000 Dijon, France

Phone : 33 3 80 39 62 56 ; Fax : 33 3 80 39 62 50

E.mail : Gerard.Lizard@u-bourgogne.fr

ABSTRACT

In the present investigation, we characterized the multilamellar cytoplasmic structures, named myelin figures, on 7KC-treated human promonocytic U937 cells. We also precised the effects of 7KC on the PI3-K / PDK-1 / Akt signalling pathway, and we evaluated the effects of Vitamin-E (Vit-E; α-tocopherol) on the formation of myelin figures and on the on the PI3-K / PDK-1 / Akt signalling pathway. We report that 7KC-induced myelin figures formation are acidic phospholipid rich vesicules, also accumulating 7KC and cholesterol. This leads us to demonstrate that 7KC is a potent inducer of phospholipidosis preceding early signs of cell death (loss of transmembrane mitochondrial potential) and morphological nuclear changes. Noteworthy, 7KC-induced phospholipidosis was counteracted by Vit-E. In addition, 7KC-induced cell death is associated with a loss of PI3-K activity, and by a dephosphorylation of PDK-1 and Akt which were restored by Vit-E.

Keywords : 7-ketocholesterol, apoptosis, phospholipidosis, α-tocopherol, PI3-K, PDK-1, Akt, Vitamin-E.

Abbreviations : 7KC : 7-ketocholesterol ; AO : acridine orange ; FLICA : ; MC540 : merocyanine 540 ; PI3-K : phosphoinositide 3-kinase; PDK-1 : 3'Phosphoinositide-regulated Kinase-1; PI : propidium iodide ; PP2A : protein phosphatase 2A ; PTEN : phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten; Vit-E : Vitamin-E ; MDC : monodansylcadaverine; NR : Nile Red.

INTRODUCTION

Oxysterols are 27 carbon derivatives of cholesterol containing additional oxygen atoms on the steroids nucleus or on the side chain[1]. These cholesterol oxide derivatives are common components of oxidized-lipoproteins (Ox-LDL)[2], which play key roles at different stages of the atherosclerotic process[3], and they constitute a wide family of molecules resulting either from the auto-oxidation of cholesterol in air, or from the enzyme-catalyzed transformation of cholesterol in various cell species[4]. Until now, the roles of oxysterols in the development of atherosclerotic lesions are widely suspected for the following reasons: numerous studies determined increased oxysterol levels in the plasma of atherosclerotic patients and in atheromatous plaques (mainly 27-hydroxycholesterol, 7-ketocholesterol, and 7β-hydroxycholesterol)[5,6], and several investigations clearly established that some of these compounds (7β-hydroperoxycholesterol, 7β-hydroxycholesterol, and 7-ketocholesterol (7KC)) mimic the cytotoxic effects of Ox-LDL on the cells of the vascular wall in animal models as well as *ex vivo* and *in vitro*. Morover, some oxysterols, especially 7KC and 7β-hydroxycholesterol, have potent cytotoxic, pro-oxidative and/or pro-inflammatory properties [7-9], which are hallmarks of the pathophysiological mechanisms involved in the atherosclerotic process[10,11]. Among the different oxysterols capable to favor atherogenesis, 7KC is one of the most abundant in the plasma and in arterial lesions of atherosclerotic subjects[5], and one of the most studied. It has been clearly established, especially on the human promonocytic U937 cells, that this oxysterol induced a complex mode of cell death with some characteristics of apoptosis: externalization of phosphatidylserine, loss of transmembrane mitochondrial potential ($\Delta\Psi$), mitochondrial release of cytochrome *c*, endonuclease G and apoptosis inducing factor (AIF), cleavage of Bid, activation of caspases-3, -7, -8 and -9, degradation of PARP and ICAD, lysosomal destabilization, internucleosomal DNA degradation, and condensation/fragmentation or swelling of the nuclei, which are associated with the formation of multilamellar stuctures[8,9]. These structures, isolated by subcellular fractionation after staining with monodansyl cadaverine, were partially characterized: they accumulate 7KC and contain high amounts of phosphatidylcholine and sphingomyelin[12]. Noteworthy, ultrastructurally similar monodansylcadaverine positive multillamellar bodies, considered as autophagic vacuoles, were observed in Mv1Lu mink lung type II alveolar cells transfected with β1-6-*N*-acetylglucosaminyl transferase V[13]. Based on ultrastructural criteria, it was supposed that 7-ketocholesterol-induced cell death might be associated with an autophagic process[14,15]. Nevertheless, these arguments are not sufficient to affirm that myelin figures are

autophagic vacuoles, and to assert that 7KC-induced cell death is associated with an activation of autophagy[16]. Moreover, since a close link can exist between autophagy and apoptosis[17], and as the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) / Akt pathway is an important second messenger system involved both in autophagy[18], and in apoptosis[19,20], it was of importance to determine the part taken by the PI3K/Akt signalling pathway in 7KC-induced cell death. A probable inactivation of the PI3K/Akt signalling pathway in 7KC-induced cell death is suggested by a previous investigation demonstrating an activation of the pro-apoptotic protein BAD which is present under its dephosphorylated form in 7KC-treated cells[21]. Indeed, when Akt is activated and present under its phosphorylated form, via the PI3K kinase signalling pathway through the 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK-1), it maintains BAD under its inactive form by phosphorylation on serine 99[19].

Based on these different considerations, the aim of the present investigation consisted 1) to precisely characterize the multilamellar structures, named myelin figures, on 7KC-treated human promonocytic U937 cells which have been widely used to study the cytotoxic effects of some oxysterols[8,22,23], 2) to precise the effects of 7KC on the PI3-K / PDK-1 / Akt signalling pathway, and 3) to evaluate the effects of Vitamin-E (Vit-E; α-tocopherol) on the formation of myelin figures and on the on the PI3-K / PDK-1 / Akt signalling pathway. Indeed, we previously reported that 7KC-induced apoptosis was impaired by Vitamin-E[24].

We report that 7KC-induced myelin figures formation are acidic phospholipid rich vesicules, also accumulating 7KC and cholesterol. This leads us to demonstrate that 7KC is a potent inducer of phospholipidosis[25,26] preceding early signs of cell death (loss of transmembrane mitochondrial potential) and morphological nuclear changes. Noteworthy, 7KC-induced phospholipidosis was counteracted by Vit-E. In addition, 7KC-induced cell death is associated with a loss of PI3-K activity, and by a dephosphorylation of PDK-1 and Akt which were restored by Vit-E.

RESULTS

Induction of phospholipidosis on 7-ketocholesterol-treated U937 cells

In agreement with our previous investigation performed on U937 cells treated with 7-ketocholesterol (7KC, 20-40 µg/ml), we confirm that 7KC used at 20 or 40 µg/ml for 18, 24, or 30 h is a potent inducer of cytoplasmic multilammellar structures (myelin figures) (Figure 1 A-C), and favors an important accumulation of the lysosomotropic dye monodansylcadaverine (MDC) (Figure 1 D-E). As this accumulation of MDC was not counteracted by potent inhibitors of autophagy (mixture of aminoacids (0.5 – 3 mM); 3-

methyladenin (5 mM); okadaic acid (7.5 nM); wortmanin (10 nM)), it was concluded that MDC positive structures were not autophagic vesicules, whereas LC3-II (often considered as a marker of autophagy[16]) was detected by indirect immunofluorescence on 7KC-treated cells (Our data not shown). In addition, the absence of spontaneous orange-yellow fluorescence emission in 7KC-treated cells examined under UV light, and the lack of staining with the Ziehl-Neelsen solution (Our data not shown) do not support that 7KC-induced myelin figures are ceroid structures which also have a multilamellar aspect in transmission electron microscopy[27,28,29,30]. Moreover, when the cells were stained with Nile Red (NR), which colors neutral and polar lipids yellow and red, respectively[31,32], a large number of yellow fluorescent spots were revealed in the cytoplasm of untreated cells (Figure 1 F). However, only few yellow cytoplasmic fluorescent spots were observed in 7KC-treated cells, whereas mainly large orange-red cytoplasmic fluorescent structures were detected (Figure 1 G). In agreement, with data obtained with NR, untreated cells were slightly stained with Oil Red O allowing to identify neutral lipids, and no discoloration was found on 7KC-treated cells (Our data not shown). These different cytological characterizations were associated with biochemical studies. Untreated and 7KC-treated cells, stained either with MDC or NR, were fractionated by ultracentrifugation using the procedure described by Biderbick *et al*. to isolate multilamellar cytoplasmic structures[33]. The cell fractions corresponding to a sucrose density of 25 $\pm$ 3% were strongly stained with MDC and NR. These fractions were pooled and characterized by gas chromatography coupled with mass spectrometry. Noteworthy, MDC positive fractions and NR positive fractions have similar lipid profiles: they content high cholesterol and phospholipids (phosphatidylcholine, sphingomyelin) levels, and accumulate 7KC (Table 1). Interestingly, when 7KC-treated cells were cultured in the presence of 7KC for periods of time preceeding the loss of transmembrane mitochondrial potential which constitutes a point of non return[34], and re-introduce in 7KC-free medium, a reversion of the accumulation of polar lipids evaluated by staining with NR was observed (Figure 1 H). Thus, our data demonstrate that 7KC-induce myelin figures (multilamellar structures) formation is associated with the following cellular events: 1) accumulation of polar lipids shown by NR staining, and by biochemical analysis (high levels of phospholipids, mainly phosphatidylcholine and sphingomyelin in myelin figures isolated after staining with MDC or NR); 2) location of myelin figures in acidic compartments (staining with MDC); 3) accumulation of 7KC in myelin figures; 4) reversibility of polar lipid accumulation. Taken together, these different observations lead us to conclude that 7KC is a potent inducer of phospholipidosis[25,26] which is characterized by four principal features: excessive

accumulation of phospholipids in cells, ultrastructural appearance of membranous lamellar inclusions, predominantly lysosomal in origins, accumulation of the inducing drug with the increased phospholipids, and reversibility of alterations after discontinuance of drug treatment.

Impairement by Vitamin-E of 7-ketocholesterol induced phospholipidosis

Vitamin E (Vit-E) has been described to protect against atherosclerosis[35], and we previously reported that it was capable to reduce 7KC-induced cytosolic release of cytochrome c, overproduction of superoxide anions, and the percentages of MDC positive cells[14,24]. So, on U937 cells, we asked whether Vit-E (100 µM) was capable to impair caspase activation measured by the *in situ* detection of activated caspases with FLICA, myelin figure formation identified by transmission electron microscopy, destabilization of lysosomes and accumulation of polar lipids evaluated after staining with AO and NR, respectively. The effect of Vit-E on 7KC-induced cholesterol accumulation was also determined by gas chromatography, and we used merocyanine 540 (MC540) to investigate the effects of 7KC on the lipids of the cytoplasmic membrane. Noteworthy, when Vit-E was added to the culture medium 30 min before treatment with 7KC (40 µg/ml), the percentages of U937 cells with activated caspases, and with destabilized lysosomes were significantly reduced (Figure 2 A, C), and the formation of myelin figures was counteracted (Figure 2 B). The accumulation of polar lipids and cholesterol were also strongly reduced (Figure 2 D, E), as well as the percentages of cells with disorganized cytoplasmic membranes resulting from qualitative, quantitative, and/or altered packing of lipids evaluated with MC540 by the ratio [MC 540 bright cells]/[MC 540 dim cells]. (Figure 2 F). Taken together, these data demonstrate that Vit-E is a potent inhibitor of 7KC-induced phospholipidosis.

Impairement by Vitamin-E of the inactivation of the PI3-K / PDK-1 / Akt signalling pathway associated with 7-ketocholesterol-induced apoptosis

Lipid second messengers, particularly those derived from the polyphosphoinositide cycle, play pivotal roles in several cell signalling networks. As 7KC-induced cell death is associated with numerous lipid modifications, those occuring at the cytoplasmic membrane level identified by staining with MC540 may contribute to inactivate the PI3-K / PDK-1 / Akt signalling pathway which is located on the inner cytoplasmic membrane, and which controls downstream signal transduction cascades involved in the regulation of the equilibrium between life and death. Thus, the effects of 7KC on PI3-K activity, and on the

phosphorylation of PDK-1 and Akt were investigated. In addition, as Vit-E was capable to impair the lipid modifications occuring at the cytoplasmic membrane level, its effects on PI3-K activity, as well as on the phosphorylation state of PDK-1 and Akt were also studied. When U937 were cultured with 7KC (40 µg/ml) for 24 h an important decrease of PI3-K activity was observed. Indeed, comparatively to untreated cells, the quantity of PI(3,4,5)P_3 per 10^6 cells was strongly reduced in 7KC-treated cells. As PI(3,4,5)P_3 is the product resulting from the enzymatic kinase activity of PI3-K on the substrat PI(4,5)P_2 (Figure 3 A). Interestingly, significantly higher values of PI(3,4,5)P_3 were present when the cells were cultured in the presence of 7KC associated with Vit-E (Figure 3A). Similarly, comparatively to untreated cells, lower levels of the kinases PDK-1 and Akt, and of their enzymatically active phosphorylated forms were found in 7KC-treated cells (Figure 3B). Thus, Vit-E impairs the inactivation of the PI3-K / PDK-1 / Akt signalling pathway associated with 7KC-induced apoptosis.

DISCUSSION

Due to the important accumulation of oxysterols in atherosclerotic plaques, and of their ability to induce a complex mode of cell death with some characteristics of apoptosis[36] as well as cytokines secretion[9], and superoxide anions production[7], which are hallmarks of the atherosclerotic process, it is of importance to identify the cellular events and the metabolic pathways associated with the different biological effects triggered by these compounds. To this end, human U937 promonocytic leukemia cells were treated with 7-ketocholesterol (7KC) used in the range of levels measured in the plasma of subjects after a rich fat meal[37], and of cholesterol-rich fed rabbit[38]. U937 were choosen because they are sensitive to oxysterols in the same range of concentrations as those observed on the cells of the vascular wall (endothelial and smooth muscle cells)[39]. In addition, U937 cells are frequently used as macrophage-like reference models to investigate the cytotoxic activities of oxysterols, as it is well admitted that macrophages play an important role in atherosclerotic process[40].

Under those conditions, we underline that 7KC-induced apoptosis is associated with important cytoplasmic modifications including a reversible formation of multilamellar structures that we previously nammed myelin figures[41], which are polar lipid rich structures, containing high levels of phosphatidylcholine and sphingomyelin, and localized in acidic compartments. Interestingly, these different features are the pathologic-morphologic characteristics of phospholipidosis defined by the following criteria: ultrastructural appearance of membranous lamellar inclusions (also called lysosomal inclusion bodies, or

myeloid bodies) excessive accumulation of phospholipids in cells), predominantly lysosomal in origin, and reversibility of alterations after discontinuance of drug treatment[25,26]. Up to now, phospholipidosis has never been described under treatment with oxysterols, and the main *in vivo* and *in vitro* reports concern phospholipidosis induced by drugs with a cationic amphiphilic structures such as amiodarone, fluxetine, imipramine, chlorcyclizine, tamoxifen, and gentamicin[25]. As of today, drug induced phospholipidosis remains remains an unresolved issue due to unclear molecular causes, and its relationships with various cytotoxic effects, including the induction of cell death, are not well known. It has been suggested that phospholipidosis might be a part of a defense mechanism when the cell is confronted with an important accumulation of xenobiotics and of their metabolites for the following reasons: presence of multilamellar structures in acidic compartments might favors the inactivation of cytotoxic compounds[25,26]; lamellar bodies have been observed to undergo exocytosis, and have been located in the extracellular space[26]. However, amiodarone and imipramine, which are two major inducers of phospholipidosis, were also shown to inhibit cell proliferation and to activate caspase-mediated apoptosis in cell culture[42]. Moreover, in murine macrophages loaded with free cholesterol some phospholipids worhls, evocating myelin figures have been observed, and their presence is associated with important cytotoxic effects including a stress of the reticulum connected with the induction of a mode of cell death by apoptosis[43]. As 7KC favors the expression of the cell death effectors CHOP and GRP78/bip chaperone, which are hallmarks of the unfolded protein response[44], and as free cholesterol can activate apoptosis through the endoplasmic reticulum pathway, it is tempting to speculate that the intracellular accumulation of free cholesterol triggered by 7KC might stimulate some components of the endoplasmic reticulum, which in turn might stimulate 7KC-induced apoptosis. Moreover, it has also been suggested that the rupture of the acidic compartments containing multilamellar structures, might release some proteolytic enzymes in the cytoplasm[26], wich might subsequently contribute to activate some apoptotic pathways. This hypothesis is supported by the destabilization of lysosomes observed by staining with acridine orange, and by the ability to inhibit 7KC- and 7β-hydroxycholesterol-induced apoptosis with inhibtors of cathepsin B and L[45]. Therefore, these different observations rather that phospholipidosis play key roles in the induction of 7KC-induced cell death. By analogy with lipoapoptosis which is a mode of cell death resulting from the accumulation of long-chain fatty acids inside the cells[46], phospholipidosis might be a mode of cell death resulting from the cytoplasmic accumulation of phospholipids. In addition, during apoptosis, the roles of phospholipids are also established at the cytoplasmic membrane levels. Indeed, the spatial organization of membrane lipids is

crucial, and the externalization of phosphatidylserine on the outer leaflet of the cytoplasmic membrane is recognized as key and early events of the apoptotic process[47]. Since 7KC-induced cell death is also associated with a rapid externalization of phosphatidylserine[48], and as our data obtained with merocyanin 540 underline that 7KC contributes to desorganize the packaging of cytoplasmic membrane lipids, these observations led us to precise the effects of 7KC on the PI3-K / PDK-1 / Akt signalling pathway which is tightly associated with the cytoplasmic membrane, and which is involved in the control of some life and death signals[19].

Noteworthy, in agreement with data obtained on 7KC-treated murine macrophages P388D1[49], a degradation of Akt is observed, and this latter is associated with absence of phosphorylation on Threonine 308 which is required for Akt activity as revealed by mutagenesis studies[50]. Consequently, some signalling pathways involved in cell death are disturbed. One of them is the regulation of signalling via the nuclear factor-bB (NF-kB) transcription factor pathway. Normally, Nf-kB is held in the cytoplasm as an inactive complex via its inhibitor IkB, and when Akt is activated, it phosphorylates IkB which is degradated allowing thus the migration of Nf-kB into the nucleus to trans-activate numerous genes involved in cell proliferation such as $p27^{kip1}$ or GSK3[51]. It is also known that Akt under its active form sequester the pro-apototic form of the protein Bad into the cytoplasm, and diminish the activity of caspase-9[52] which are two important proteins complicated in 7KC-induced apoptosis[53,54]. Therefore, inhibition of Akt activity a major pre-mitochondrial event implicated in 7KC-induced cell death.

Given the diversity and complexicity of the mechanisms capable to contribute to the dephosphorylation of Akt, involving both kinases and phosphatases, we choose to precise the part taken by the PI3-K for the following reasons: this kinase lead to the synthesis $PI(3,4,5)P_3$; this inositol is necessary for the recruitement and the activity of PDK-1 which can in turn phosphorylate Akt on Threonine 308[20]. The lover level of $PI(3,4,5)P_3$ observed in 7KC-treated cells, and the degradation of PDK-1 associated with an absence of phosphorylation on Thyrosine 373 and 376, lead us to conclude that the loss of activity of PI3-K constitutes the initial event leading subsequently to the inactivation of PDK-1 and of Akt. However, an involvement of others enzymes can not be excluded. Thus, an activation of the phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN) reverting the formation of $PI(3,4,5)P_3$ into $PI(4,5)P_2$, and an activation of the protein phosphatase-2A (PP2A), which dephosphorylate PDK1 and Akt, might also contribute to decrease Akt activity[51].

As Vitamine E has been known to counteract 7KC-induced apoptosis[24], to reduce the accumulation of MDC[14] which is associated with 7KC-induced phospholipidosis, and to interact with phospholipids[55], it was of interest to precise its effects on phospholipidosis and

on the PI3-K / PDK-1 / Akt signalling pathway. Up to know, with known inducers of phospholipidosis (amiodarone, desethylamiodarone), Vitamine E has been shown to reduce the accumulation of these drugs and to counteract phospholipidosis biochemically evaluated by decreased cytoplasmic levels of phospholipids[56]. Our data, brings however additional information, and show that this decrease of accumulation of phospholipids is associated with an inhibition of myelin figures formation whereas large vacuole are still present. Therefore, the ability to dissociate the formation of multilamellar structures from those of vacuoles suggest different hypotheses: Vitamine E might inhibit the accumulation of phospholipids into the vacuoles, Vitamine E might favor the degradation or inhibit the synthesis of phospholipids inside the vacuoles, or Vitamine might restablish the traffic of phospholipids towards other cell compartments, such as the endoplasmic reticulum or the plasma membrane. Thus, the ability of Vitamine E to act on phospholipid content and distribution can explain its ability to restore the activity of the PI3-K / PDK-1 / Akt signalling pathway. Moreover, the ability of Vitamine to inhibit PP2A[57], might also contribute to restore this metabolic pathway. Therefore, our data underline that Vitamine E can counteract 7KC-induce cell death[14], and they show that this vitamin has either some direct or indirect effects at various cellular levels: at the mitochondrial level to inhibit mitochondrial depolarization and the cytosolic release of cytochrome c[24], but also at the pre-mitochondrial levels by contributing to restablish the activity of the PI3-K / PDK-1 / Akt signalling pathway.

In conclusion, 7KC-induced phospholipidosis brings new informations on the effects of this oxysterol. The identification of this process, which was previously only uncompletely described, suggest some relationships between cell death, the metabolism, the distribution, and the trafficking of phospholipids which are known to modulate numerous signalling pathways such as the PI3-K / PDK-1 / Akt signalling pathway. Moreover, the ability of Vitamine E to counteract phospholipidosis and to counteracts the inactivation of the PI3-K / PDK-1 / Akt signalling pathway associated with 7KC-induced apoptosis underline that this Vitamine has numerous cellular targets, and reinforce its interest to prevent atherosclerotic process.

MATERIALS AND METHODS

Cells and treatments

Human promonocytic U937 leukemia cells were grown in suspension in culture medium consisting of RPMI 1640 with GlutaMAX I (Gibco, Eragny, France), and antibiotics (100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum (Gibco). Cells were seeded at 500,000 per ml of culture medium, and passaged twice a week. They were cultured in a 5%CO_2/95% air-humidified atmosphere at 37°C.

7-ketocholesterol (7KC) was provided by Sigma (L'Isle d'Abeau Chesnes, France), and its purity was determined to be 100% by gaseous phase chromatography coupled with mass spectrometry. For all experiments, a stock solution of 7KC was prepared at a concentration of 800 µg/ml as previously described[7]. To obtain the initial solution, 800 µg of 7KC was dissolved in 50 µl of absolute ethanol, 950 µl of culture medium were added, and the suspension was sonicated. To obtain a 20 or 40 µg/ml final concentration (corresponding to 50 or 100 µM), 25 or 50 µl of this initial solution was added per ml of culture medium. In all experiments, 7KC was introduced into the culture medium at the beginning of the culture, and treatments on U937 cells were carried out for 6, 14, 18, 24, 30 h. When the cells were cultured in the presence of 7KC associated with α-tocopherol, or with different inhibitors of autophagy (mixture of aminoacids, wortmanin, 3-méthyladenin, or okadaic acid), these compounds were in introduced in the culture medium 30 min before 7KC. Vitamin-E (Vit-E) corresponding to DL-α-tocopherol was provided by Sigma, and its purity was 95%. The solution of Vit-E was extemporaneously prepared at 30 mM in ethanol (1mg of α-tocopherol / 50 µl ethanol), and diluted in the culture medium to obtain a 100 µM final concentration. The mixture of aminoacids was a generous gift from Dr Codogno (Inserm U756, Chatenay Malabry, France). In this initial mixture, aminoacids (prolin, histidin, methionin, tryptophane, leucin, cystein, glutamic acid, glycin, isoleucin, lysin, serin, threonin, valin, phenylalanin, asparagin, tyrosin, alanine, glutamine, aspartic acid, arginin) were present at 37.5 or 500 mM. This mixture was introduced in the culture medium in order to obtain aminoacids at 3 and 40 mM final concentrations. A stock solution of wortmanin (Sigma) was prepared at 2.3 mM by dilution in DMSO, stored at 4°C, and used at 10 nM. 3-methyladenin (Sigma) was extemporaneously prepared in warm water at 100 mM, and used at 5 mM final concentration. Okadaic acid (Sigma) was prepared at 10 µM in DMSO, and used at 7.5 nM.

In situ detection of activated caspases with fluorochrome-labeled inhibitors of caspases (FLICA)

Caspase total activity was measured with fam-VAD-fmk (Trevigen Inc, Gaithersburg, MD, USA) using a specifically dedicated kit according to manufactural procedures. FLICA reagent (fam-VAD-fmk) is a cell permeant, and noncytotoxic compound which is widely used in flow cytometry and microscopy to investigate caspase activities during apoptosis[58,59]. Briefly, fam-VAD-fmk is a carboxyfluorescein derivative of VAD-fmk. This FLICA reagent was dissolved in DMSO to obtain a 150X concentrated solution. Prior to use, a 30X working solution of fam-VAD-fmk was prepared by diluting the stock solution 1:5 in phosphate buffer saline (PBS). Cells were distributed into 300 µl aliquots containing 1 x 10^6 cells, and fam-VAD-fmk working solutions was added to obtain a 1X final concentration. After 1h of incubation in the dark in a 5%CO_2/95% air-humidified atmosphere at 37°C, cells were washed twice in 1X wash buffer. The cell pellet was resuspended in 400µl of PBS, and Hoechst 33342 was added to obtain a 5 µM final concentration. After incubation for 30 min at 37°C, cells were immediately analyzed by flow cytometry. In addition, 30 µl of the cellular suspension adjusted at 10^6 cells/ml were applied to glass slides, air dried, mounted in a fluorescent mounting medium (Dako, Coppenhagen, Denmark), coverslipped, and stored in the dark at 4°C before microscopical examinations. Flow cytometric analyses were performed on a GALAXY flow cytometer (Partec) equipped. The green emission of fam-VAD-fmk was collected at 520 ± 10 nm, and measured on a logarithmic scale. 10,000 cells were acquired for each sample, and data were analyzed with the FlowMax software (Partec).

Staining conditions with monodansylcadaverin

Myelin figures can be stained with monodansylcadaverine (MDC), which behaves as a lysosomotropic agent and a solvent polarity probe and accumulates in acidic compartments. It is probably due to its amino group, which becomes protonated at low pH, leading to an ion trapping mechanism (Nieman et al, 2000; Nieman et al, 2001; Kahn et al, 2004). MDC (λEx_{max}=340 nm, λEm_{max}=530 nm) (Sigma) was prepared at 0.1M in DMSO and added to the culture medium at a final concentration of 0.05 mM. After 15 min of incubation at 37°C, cells were collected by centrifugation and resuspended in culture medium (2 x 10^6 cells/ml), and 50 µl of cell suspension was applied to glass slides by cytocentrifugation (5 minutes, 300g) with a Cytospin 2 (Shandon, Cheshire, U.K.), mounted in Fluoprep (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France), coverslipped and stored in the dark at 4°C until microscopical examination.

Staining conditions with Nile Red

Nile Red (NR), is a phenoxazine dye that can be used on living cells to localize and quantify neutral and polar lipids (Sigma). This dye stains neutral lipids yellow (570-590 nm), and polar lipids orange/red (590 nm and above) when excited at 488 nm[31,32]. When excited at 532 nm, NR allows to identify polar lipids which are colored in orange/red[12]. In the present investigation, NR was prepared at 100 µg/ml in DMSO (Sigma). After 18 h of treatment with 7KC (40 µg/ml), NR was added to the culture medium at a final concentration of 0.1 µg/ml on a cellular suspension adjusted to 10^6 cells/ml. After 15 min of incubation at 37°C, flow cytometric analyses of NR stained cells were immediately performed on a CYFLOW green flow cytometer (Partec, Münster, Germany) equipped with a green laser (Nd:YAG) emitting at 532 nm and working at 50 mW as previously described (Kahn et al, 2004). The orange/red fluorescence of NR were acquired with a 630 nm long pass filter, and the mean fluorescence intensities of untreated and 7KC-treated cells were measured on a logarithmic scale. 10,000 cells were acquired for each sample, and data were obtained with the FlowMax software (Partec).

Staining conditions with Merocyanine 540

Merocyanine 540 (MC540) (Aldrich) is a negatively charged chromophore that binds to the outer leaflet of the cell membrane[60]. The loss of asymmetry and altered packing of the membrane enhance MC540 fluorescence[61]. MC540 was prepared in absolute ethanol at 2 mg/ml, and added to the culture medium at a final concentration of 2.5 µg/ml. After 10 min of incubation at room temperature, cells were analyzed by flow cytometry. MC 540 bright cells and MC 540 dim cells were considered as apoptotic and normal cells, respectively[62]. Flow cytometric analyses were performed on a CYFLOW green flow cytometer (Partec) equipped with a green laser (Nd:YAG) emitting at 532 nm and working at 50 mW. The fluorescence of MC540 was collected through a 590 / 30 nm band pass filter, and measured on a logarithmic scale. 10,000 cells were acquired for each sample, and data were analyzed with the FlowMax software (Partec). Data were expressed by the ratio [MC 540 bright cells]/ [MC 540 dim cells].

Staining conditions with Oil Red O and Ziehl-Neelsen

The presence of neutral lipids was also investigated with Oil Red O. This coupound is a neutral colorant which is soluble in neutral lipids and remains dissolved in triglycerides after washing. To this end, cells were applied to glass slides by cytocentrifugation (5 min, 1,000

rpm) with a cytospin 4 (Shandon, Cheshire, UK). Cell deposits were then washed with distilled water, and incubated in isopropanol (60%) for 1 min. Cells were further stained with Oil Red O for 15 min, and incubated for 1 min in isopropanol (60%). After washing in distilled water, nuclear coloration was realized with hemalun (2-3 min). After washing in water, the preparation was mounted in Eukitt, and stored in the dark at room temperature until observations in brightfield microscopy with an Axioskop right microscope (Zeiss).

Ziehl Neelsen coloration, is an acid-fast stain test**,** which is used to evaluate the presence of céroïds[27]. These lamellar structures belong to the lipofuscin group of pigments, and originate of oxidation and peroxidation of phospholipids and unsaturated fatty acids[63]. To perform this coloration, cells were applied to glass slides by cytocentrifugation (5 min, 1,000 rpm) with a cytospin 4 (Shandon), fixed, and stained by fuchsin during 15 min. After washing with water, cell preparation were incubated in Gabett Solution (methylene blue, sulfuric acid 60°, absolute alcool, distilled water) for 5 min. After washing, cell preparations were air dried, mounted in Dako Mounting medium (Dako), and stored in the dark at room temperature until observations in brightfield microscopy with an Axioskop right microscope (Zeiss).

Staining conditions with Acridine Orange

Lysosomal destabilization was assayed by staining with Acridine Orange (AO) (Sigma)[64,65]. Acridine orange is a lysosomotropic weak base, which produces a red fluorescence when excited by a blue light[65]. During prolonged exposure to cytotoxic agents, the red fluorescence of AO decreases markedly[64]. The shift in AO fluorecence from granualr red to diffuse green reflects leakage and redistribution of AO from the lysosomes, indicating impairment of the lysosome membranes or the inability of the lysosomes to maintain low pH. AO was used at 5 µg/ml on cell suspensions adjusted to 10^6 cells /ml. After incubation (15 min, 37°C), cells were washed with culture medium, resuspended in culture medium, and analysed by flow cytometry. Flow cytometric analyses were performed on a GALAXY flow cytometer (Partec). The fluorescence of AO was acquired through a 630 long pass filter, and measured on a logarithmic scale. 10,000 cells were acquired for each sample, and data were analyzed with the FlowMax software (Partec).

Detection of LC3 II by indirect immunofluorescence

U937 cells cultured in the absence or in the presence of 7-ketocholesterol (20 µg/ml) were applied to glass slides by cytocentrifugation (5 min, 1,000 rpm) with a cytospin 4 (Shandon). Glass slides were treated at room temperature with 2% formol, and then washed with PBS.

The cells were further incubated (45 min, 37°C) with an rabbit polyclonal LC3 II antibody (Generous gift from Dr T Yoshimori, National Institute of Genetics, Mishima, Japan) diluted 1:10 in PBS containing 1% bovine serum albumin (PBS-1%BSA). After washing with PBS, cells were incubated (30 min, 37°C) with a biotinylated - Multilink antibody (Dako) diluted 1:100 in PBS-1%BSA. After washing with PBS, cells were incubated (30 min, 37°C) with streptavidin-Texas Red (Molecular Probes) diluted 1:100 in PBS-1%BSA. After washing with PBS, glass slides were mounted in Fluoprep (Bio-Mérieux, Marcy l'Etoile, France), coverslipped, and stored in the dark at 4°C until microscopical examinations. Observations were made with an Axioskop fluorescent microscope (Zeiss, Jena, Germany).

Transmission electron microscopy

For electron microscopy, 5-10 x 10^6 cells were fixed for 1h with 2% glutaraldehyde prepared in 0.1 mM cacodylate buffer (pH 7.4), postfixed in osmium tetroxide, dehydrated with graded ethanol series, and embedded in Epon. Sections were stained with uranyl acetate and lead citrate, and examined with an H600 electron microscope (Hitachi, Tokyo, Japan).

Subcellular fractionation and biochemical characterization of monodansylcadaverin and Nile Red positive cytoplasmic structures

The methodology which is used to isolate multilamellar cytoplasmic structures (also called myelin figures) by subcellular fractionation is described by Biederbick *et al*. Briefly, after 24 h of culture in the absence or in the presence of 7KC (20 µg/ml), U937 cells were incubated at 37°C with monodansylcadaverin (MDC) (0.05 mM, 15 min) or with NR (0.1 µg / ml, 15 min). The medium was removed. Cells were washed with cold PBS. and resuspended in an homogenization buffer (10 mM Tris HCl, PH 8, 0.25 M sucrose, 1 mM dithiothreitol, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 3 mM $MgSO_4$ and 10 mM NaCl), then centrifuged (700 g, 10 min, 4°C). The pellet was resuspended in 1 mL of Tris HCl (10 mM, pH 8) and separated on a continuous sucrose gradient (10-60%) at 112,500 g during 5 h using a R70.1 rotor in a Beckman Optima™ L-90K centrifuger. Fractions were collected from the bottom of the gradient. A LS50B Perkin Elmer spectrofluorometer was used to detect MDC labelled compartments (λExcitation = 340 nm, λEmission = 530 nm), and NR labelled compartments (λExcitation = 488 nm, λEmission = 600 nm). The sucrose density of each fraction was simultaneously measured using a Codiam Scientific refractometer. For each fraction, the lipid content of cholesterol (esterified and unesterified), 7KC, and phospholipids (phosphatidylcholin, sphingomyelin) was determined.

Characterization and quantification of cholesterol, 7-ketocholesterol, and phospholipids by capillary gas chromatography and mass spectrometry

After various time of culture, cellular suspension was centrifuged, cells and surnageant were separated. Cells were washed twice with phosphate buffer saline 1X. The entire cells and surnageant were used for further analyses. The lipids were extracted using Folch reagent containing 0,05% butylated hydroxytoluene as antioxidant. The lipids were saponified for night, in the dark, under argon, at room temperature using 1M-potassium hydroxide (10 ml). After adding 20 ml purified water, non-saponifiable matter was extracted two times by 20 ml dichloromethane. The two dichloromethanolic fractions ware gathered and washed several times with water until pH neutral was reached. 5α-cholesterol was used as external standard.

Before analysis, the samples were transformed in TMSE derivatives as follows: after evaporation of the solvent under nitrogen, the samples were redissolved in 100 µl of pyridine and 100 µl of BSTFA containing 1% of TMCS was added. The TMSE derivatives were obtained by heating 30 min at 60°C. The reagents were then evaporated under N_2 and the residue dissolved in hexane for gas chromatography analysis.

The analyses were effected using a 5890 Series II Hewlett-Packard gas chromatograph (Palo Alto, CA, USA), equipped with a needle-falling injector (temperature 290°C) and a flame ionization detector operated at 300°C. One column was used : a 0,25 µm film thickness, 30 m x 0,25 mm i.d. DB5-MS fused silica capillary column (J&W Scientific, Folsom, CA, USA). Helium was the carrier gas. After 1 min at 50°C, the oven temperature was raised from 50 to 275°C at 20°C/min, then 1°C/min until 290°C. The completion of the analyses was effected at 290°C. The chromatographic data processing was effected using Diamir software (JMBS Developments, Fontaine, France).

Protein extraction and Western blot analysis

Cells were resuspended in Ripa lysis buffer (0.1% (w/v) SDS, 1% (w/v) Igepal, 0.5% (w/v) Na-desoxycholate, 50 mM TrisHCl PH 8, 150 mM NaCl) containing a mixture of protease and phosphatase inhibitors (0.1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, 2.5 µg/l aprotinin, 10 µg/l pepstatin A, 2.5 µg/l trypsin inhibitor, 2.5 µg/l leupeptin, 0.1 mM orthovanadate, 40 mM β-glycerophosphate, 100 mM NaF). After a 30-min incubation à 4°C in the lysis buffer, the cell debris were eliminated by centrifugation for 20 min at 10,000 *g* and the supernatant was collected.

The protein concentrations were measured by using bicinchoninic acid reagent (Pierce, Rockford, IL, USA) according to the method of Smith *et al.*[66]. Eighty micrograms of protein

were incubated in loading buffer (125 mmol/l Tris/HCl, PH 6.8, 10% (w/v) mercaptoethanol, 4.6% (w/v) SDS, 20% (v/v) glycerol, 0.003% (w/v) Bromophenol blue), boiled for 3 min, seprarated by SDS-PAGE and electroblotted onto a polyvinylidine difluoride membrane (Bio-Rad, Ivry sur Seine, France). After blocking nonspecific binding sites for 2 h at room temperature in TPBS (NaCl/P_i, 0.1 % Tween-20), the membranes were incubated overnight at 4°C with various primary antibodies diluted in TPBS. The anti-Akt polyclonal antibody (dilution : 1/1000), the anti-Akt phospho Thr 308 polyclonal antibody (dilution : 1/1000) and the anti-PDK-1 phospho Tyr 373/376 polyclonal antibody (dilution : 1/1000) were purchased from Cell Signaling. The anti-PDK-1 monoclonal antibody (dilution : 1:100) and the anti-Hsc-70 polyclonal antibody (dilution : 1:1000) were purchased from Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnologies, USA). After three 10-min washes with TPBS, the membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody at a dilution of 1:2500 for 1 h at room temperature and washed three times in TPBS for 10 min. Autoradiography of the immunoblots was performed using an enhanced chemoluminescence detection kit (Amersham, Les Ulis, France).

Measurement of PI3-K activity

We determined PI3-K activity by measuring the amount of PI(3,4,5)P_3 extracted from cells by means of standard ELISA format. We used PIP_3 Mass ELISA kit™ (Echelon Biosciences, Inc., Salt Lake City, USA). The extraction of PI(3,4,5)P_3 was performed according to the following protocol. The cells (5 x 10^6 cells) were collected and centrifuged (525 g, 5 min, 4°C). The pellet was resuspended in a solution of 5% TCA / 1 mM EDTA and centrifuged (525 g, 5 min). This step was repeated one more time. Neutral lipids were extracted by adding a solution of MeOH:$CHCl_3$ (2:1), the suspension was vortexed 3 times over 10 min at room temperature, then centrifuged (525 g, 5 min). This step was repeated one more time. Acidic lipids were extracted by adding a solution of MEOH:$CHCl_3$: 12 M HCL (80:40:1), the suspension was vortexed 4 times over 15 min at room temperature, then centrifuged (525 g, 5 min). The supernatant was mixed with $CHCl_3$ and HCl (0.1 M), this suspension was centrifuged (525 g, 5 min) to separate organic and aqueous phases. Organic phase was collected and dried in a vacuum dryer. Lipids dried was resuspended in PIP_3 Buffer (50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 1.5 % Na Cholate, pH 7.4), sonicated in a water bath for 5 min, and leaved overnight at 4°C.

After this extraction, ELISA was realized according to manufacturer's procedure (Echelon Biosciences, Inc., Salt Lake City, USA).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the INSERM, the Ligue Contre Le Cancer (Comité de Côte d'Or) and the Conseil Régional de Bourgogne. We thank Dr Jean-Marc Riedinger (Centre Anti-Cancer GF Leclerc, Laboratoire de Biologie Médicale, Dijon, France) for his expert statistical analysis, as well as Mr Franck Ménétrier (Laboratoire de Microscopie Préparative Appliqué à la Biologie et à la Médecine, Faculté de Médecine, 7 Bd Jeanne d'Arc, 21033 Dijon, France) for his technical support in electron microscopy. We also acknowledge Ms Jeannine Lherminier (Service Commun de Microscopie Electronique, INRA, BP 86510, 21065 Dijon Cedex, France) for the observations by transmission electron microscopy, and Ms Anne Athias (Inserm U498 / Inserm IFR100) for the analyses by gas chromatography coupled with mass spectrometry.

REFERENCES

1 Smith L. Review of progress in sterol oxidations: 1987-1995. Lipids 1996; 31: 453-457.

2 Berliner JA, Heinecke JW. The roles of oxidized lipoproteins in atherogenesis. Free Radic Biol Med. 1996; 20: 707-727.

3 Colles SM, Maxson JM, Carlson SG, Chilsolm GM. Oxidized LDL-induced injury and apoptosis in atherosclerosis. Trends Cardiovasc Med 2001; 11: 131-138.

4 Schroepfer GJ. Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. Physiol Rev 2000; 80: 361-554.

5 Brown AJ, Jessup WJ. Oxysterols and atherosclerosis. Atherosclerosis 1999; 142: 1-28.

6 Diczfalusy U. Analysis of cholesterol oxidation products in biological samples. J AOAC Int 2004; 87: 467-473.

7 Lizard G, Gueldry S, Sordet O, Monier S, Athias A, Miguet C, et al. Glutathione is implied in the control of 7-ketocholesterol-induced apoptosis, which is associated with radical oxygen species production. FASEB J 1998; 12: 1651-1663

8 Lemaire-Ewing S, Prunet C, Montange T, Vejux A, Berthier A, Bessède G, et al. Comparison of the cytotoxic, pro-oxydant and pro-inflammatory characteristics of different oxysterols. Cell Biol Toxicol 2005; 21: 97-114.

9 Prunet C, Montange T, Véjux A, Laubriet A, Rohmer JF, Riedinger JM, et al. Multiplexed flow cytometric analyses of pro- and anti-inflammatory cytokines in the culture media of oxysterol-treated human monocytic cells and in the sera of atherosclerotic patients. Cytometry 2006; 69: 359-373.

10 Kockx M, Knaapen MW. The role of apoptosis in vascular disease. J Pathol 2000 ; 190: 267-280.

11 Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. Physiol Rev 2006; 86: 515-581.

12 Kahn E, Vejux A, Lizard G, Bessède G, Frouin F, Prunet C, et al. Analysis of the fluorescence of monodansylcadaverine-positive cytoplasmic structures during 7-ketocholesterol-induced cell death. Analyt Quant Cytol Histol 2004 ; 26 : 47-56.

13 Hariri M, Millane G, Guimond MP, Guay G, Dennis JW, Nabi IR. Biogenesis of multilamellar boodies via autophagy. Mol Biol Cell 2000; 11: 255-268.

14 Miguet-Alfonsi C, Prunet C, Monier S, Bessède G, Lemaire-Ewing S, Berthier A, et al. Analysis of oxidative processes and of myelin figure formation before and after the loss of mitochondrial transmembrane potential during 7β-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol-induced apoptosis: comparison with various pro-apoptotic chemicals. Biochem Pharmacol 2002 ; 64:527-41.

15 Monier S, Samadi M, Prunet C, Denance M, Laubriet A, Athias A, et al. Impairment of the cytotoxic and oxidative activities of 7β-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol by esterification with oleate. Biochem Biophys Res Commun 2003 ; 303: 814-824.

16 Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. Science 2000 ; 290: 1717-1721.

17 Bauvy C, Gane P, Arico S, Codogno P, Ogier-Denis E. Autophagy delays sulindac sulfide-induced apoptosis in the human intestinal colon cancer cell line HT-29. Exp Cell Res 2001 ; 268: 139-149.

18 Petiot A, Ogier-Denis E, Blommaart EF, Meijer AJ, Codogno P. Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macro-autophagy in HT-29 cells. J Biol Chem 2000; 275: 992-998.

19 Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. Gene Dev 1999 ; 13: 2905-2927.

20 Neri LM, Borgatti P, Capitani S, Martelli AM. The nuclear phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway: a new second messenger system. Biochim Biophys Acta 2002; 1584: 73-80.

21 Berthier A, Lemaire-Ewing S, Prunet C, Monier S, Athias A, Bessède G, et al. Involvement of a calcium-dependent dephosphorylation of BAD associated with the localization of Trpc-1 within lipid rafts in 7-ketocholesterol-induced THP-1 cell apoptosis. Cell Death Differ 2004; 11: 897-905.

22 Aupeix C, Weltin D, Meija JE, Christ M, Marchal J, Freyssinet JM, et al. Oxysterol-induced apoptosis in human monocytic cell lines. Immunology 1995; 194: 415-428.

23 Ryan L, O'Callaghan YC, O'Brien NM. Generation of an oxidative stress precedes caspase activation during 7β-hydroxycholesterol-induced apoptosis in U937 cells. J Biochem Mol Toxicol 2004; 18: 50-59.

24 Lizard G, Miguet C, Bessède G, Monier S, Gueldry S, Néel D, et al. Impairment with various antioxidants of the loss of mitochondrial transmembrane potential and of the cytosolic release of cytochrome c occuring during 7-ketocholesterol-induced apoptosis. Free Radic Biol Med 2000 ; 28: 743-753.

25 Reasor MJ, Kacew S. Drug-induced phospholipidosis: are there functional consequences? Exp Biol Med 2001; 226: 825-830.

26 Anderson N, Borlak J. Drug-induced phospholipidosis. FEBS Lett 2006 ;580 : 5533-5540

27 Mitchinson MJ, Hothersall DC, Brooks PN, De Burbuke C. The distribution of ceroid in human atherosclerosis. J Pathol 1985 ; 145: 177-183.

28 Ball RY, Carpenter KLH, Mitchinson MJ. Ceroid accumulation by murine peritoneal macrophages exposed to artificial lipoproteins: ultrastructural observations. Br J Exp Path 1988 ; 69: 43-56.

29 Harman D. Lipofuscin and ceroid formation: the cellular recycling system. In: Lipofuscin and Ceroid Pigments. (Edited by Porta EA, Plenum Press, New York), 1990 pp3-15.

30 Hunt JV, Skamarauskas J, Carter NP, Mitchinson MJ. Measurement of ceroid accumulation in macrophages by flow cytometry. Cytometry 1994 ; 15: 377-382.

31 Greenspan P, Fowler SD. Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile Red. J Lipid Res 1985 ; 26: 781-789.

32 Klinkner AM, Bugelski PJ, Waites R, Louden C, Hart TK, Kerns WD. A novel technique for mapping the lipid composition of atherosclerotic fatty streaks by en face fluorescence microscopy. J Histochem Cytochem 1997 ; 45: 743-753.

33 Biederbick A, Kern HF, Elsässer HP. Monodansylcadaverine (MDC) is a specificic in vivo marker for autophagic vacuoles. Eur J Cell Biol 1995 ; 66: 3-14.

34 Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssière JL, Mignotte B. The biochemistry of programmed cell death. FASEB J 1995 ; 9: 1277-1287.

35 Bron D, Amis R. Vitamin E and the prevention of atherosclerosis. Int J Vitam Nutr Res 2001 ; 71: 18-24.

36 Prunet C, Lemaire-Ewing S, Ménétrier F, Néel D, Lizard G. Activation of caspase-3 dependent and independent pathways during 7-ketocholesterol- and 7β-hydroxycholesterol-induced cell death : a morphological and biochemical study. J Biochem Mol Toxicol 2005 ; 19: 311-326.

37 Emanuel HA, Hassel CA, Addis PB, Bergmann SD, Zavoral JH. Plasma cholesterol oxidation products (oxysterols) in human subjects fed a meal rich in oxysterols. J Food Sci 1991 ; 56: 843-847.

38 Vine F, Mamo JCL, Beilin LJ, Mori TA, Croft KD. Dietary oxysterols are involved in plasma triglyceride rich liporoteins, increase their susceptibility to oxidation and increase aortic cholesterol concentration in rabbits. J Lipid Res 1998 ; 39: 1995-2004.

39 Lizard G, Monier S, Cordelet C, Gesquière L, Deckert V, Gueldry S, et al. Characterization and comparison of the mode of cell death, apoptosis versus necrosis, induced by 7β-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol in the cells of the vascular wall. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999 ; 19: 1190-1200.

40 Stoll G, Bendszus M. Inflammation and atherosclerosis: novel insight into plaque formation and destabilization. Stroke 2006 ; 37: 1923-1932.

41 Lizard G, Moisant M, Cordelet C, Monier S, Gambert P, Lagrost L. Induction of similar features of apoptosis in human and bovine vascular endothelial cells treated by 7-ketocholesterol. J Pathol 1997 ; 183: 330-338.

42 Piccotti JR, LaGattuta MS, Knight SA, Gonzales AJ, Bleavins MR. Induction of apoptosis by cationic amphiphilic drugs amiodarone and imipramine. Drug Chem Toxicol 2005 ; 28: 117-133.

43 Feng B, Yao PM, Li Y, Devlin CM, Zhang D, Harding HP, et al. The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. Nat Cell Biol 2003 ; 5: 781-792.

44 Pedruzzi E, Guichard C, Ollivier V, Fay M, Prunet C, Marie JC, et al. NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholestero-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. Mol Cell Biol 2004 ; 24: 10703-10717.

45 Li W, Dalen H, Eaton JW, Yuan XM. Apoptotic death of inflammatory cells in human atheroma. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001 ; 21: 1124-1130.

46 Unger RH, Orci L. Lipoapoptosis : its mechanism and its diseases. Biochim Biophys Acta 2002 ; 15: 202-212.

47 Koopman G, Reutelingsperger CPM, Kuijten GAM, Keehnen RMJ, Pals ST, van Oers MHJ. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. Blood 1994 ; 84: 1415-1420.

48 Kahn E, Lizard G, Frouin F, Bernengo JC, Souchier C, Bessede G, et al. Confocal analysis of phosphatidylserine externalization with the use of biotinylated annexin V revealed with streptavidin FITC, -europium, -phycoerythrin or -Texas Red in oxysterol-treated apoptotic cells. Anal Quant Cytol Histol 2001 ; 23: 47-55.

49 Rusinol AE, Thewke D, Liu J, Freeman N, Panini SR, Sinensky MS. AKT/protein kinase B regulation of BCL family members during oxysterol-induced apoptosis. J Biol Chem 2004 ; 279: 1392-1399.

50 Alessi DR, Caudwell FBN, Andjelkovic M, Hemmings BA, Cohen P. Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAP kinase-1 and p70 S6 kinase. FEBS Lett 1996 ; 399: 333-338.

51 Hill MM, Hemmings BA. Inhibition of protein kinase B / Akt: implication for cancer therapy. Pharmacology & Therapeutics 2002 ; 93: 243-251.

52 Khwaja A. Akt is more than just a Bad kinase. Nature 1999 ; 401: 33-34.

53 Miguet C, Monier S, Bettaieb A, Athias A, Bessede G, Laubriet A, et al. Ceramide generation occuring during 7b-hydroxycholesterol - and 7-ketocholesterol-induced apoptosis is caspase independent and is not required to trigger cell death. Cell Death Differ 2001 ; 8: 83-99.

54 Berthier A, Lemaire-Ewing S, Prunet C, Monier S, Athias A, Bessede G, et al. Involvement of a calcium-dependent dephosphorylation of BAD associated with the localization of Trpc-1 within lipid rafts in 7-ketocholesterol-induced THP-1 cell apoptosis. Cell Death Differ 2004 ; 11: 897-905.

55 Lucy, JA. Structural interactions between vitamin E and polyunsaturated lipids. World Rev Nutr Diet. 1978 ; 31:184-189.

56 Honegger UE, Scuntaro I, Wiesman UN. Vitamin E reduces accumulation of amiodarone and desethylamiodarone and inhibits phospholipidosis in cultured human cells. Biochem Pharmacol 1995 ; 49: 1741-1745.

57 Yin KJ, Hsu CY, Hu XY, Chen H, Chen SW, Xu J, et al.. Protein phosphatase 2A regulates bim expression via the Akt/FKHRL1 signaling pathway in amyloid-beta peptide-induced cerebrovascular endothelial cell death. J Neurosci 2006 ; 26 : 2290-2299.

58 Bedner E, Smolewski P, Amstad P, Darzynkiewicz Z. Activation of caspases measured in situ by binding of fluorochrome-labeled inhibitors of caspases (FLICA): correlation with DNA fragmentation. Exp Cell Res 2000 ; 259: 308-313.

59 Grabarek J, Amstad P, Darzynkiewicz Z. Use of fluorescently labeled caspase inhibitors as affinity labels to detect activated caspases. Hum Cell 2002 ; 15: 1-12.

60 Schlegel RA, Phelps BM, Waggoner A, Terada L, Williamson P. Binding of merocyanin 540 to normal and leukemic erythroid cells. Cell 1980 ; 20; 321-328.

61 Schlegel RA, Stevens M, Lumley-Sapanski K, Williamson P. Altered lipid packing identifies apoptotic cells. Immunol Lett 1993 ; 36: 283-288.

62 Laakko T, King L, Fraker P. Versatility of merocyanine 540 for the flow cytometric detection of apoptosis in human and murine cells. J Immunol Methods 2002 ; 61: 129-139.

63 Cromheeke KM, Kockx MM, De Meyer GR, Bosmans JM, Bult H, Beelaerts WJ, et al. Inducible nitric oxide synthase colocalizes with signs of lipid oxidation/peroxidation in human atherosclerotic plaques. Cardiovasc Res. 1999 ; 43 : 744-54.

64 Yuan XM, Li W, Brunk UT, Dalen H, Chang YH, Sevanian A. Lysosomal destabilisation during macrophage damage induced by cholesterol oxidation products. Free Radic Biol Med 2000 ; 28: 208-218.

65 Olsson GM, Rungby J, Rundquist I, Brunk UT. Evaluation of lysosomal stability in living culture macrophages by cytofluorometry. Effect of silver lactate and hypotonic solutions. Virchows Arch B Cell Pathol 1989 ; 56: 263-269.

66 Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem 1985 ; 150: 76-85.

LEGENDS OF FIGURES

Figure 1: Ultrastructural, and cytological characterization of 7-ketocholesterol induced phopholipidosis. Identification of multilamellar cytoplasmic structures (myelin figures) by transmission electron microscopy. Transmission electron microscopy of U937 cells cultured in the absence (**A**) or presence (**B-D**) of 7KC (20 µg/ml) for 30 h. Myelin figures (arrows), were only observed in 7KC treated cells. They may have various sizes and shapes. Staining with monodansylcadaverine (MDC), a solvent polarity probe accumulating in acidic compartments. Observation by fluorescence microscopy of U937 cells cultured in the absence (**E**) or presence (**F**) of 7KC (40 µg/ml) for 24 h. Cellular structures stained by MDC are indicated by arrows. Staining with Nile Red (NR) emitting a yellow or orange-red fluorescence in the presence of neutral or polar lipids (including phospolipids), respectively, when excited by a blue light. After 24 h of culture, various numbers of punctuated yellow cytoplasmic spots are observed in untreated U937 cells (**G**), whereas large orange-red cytoplasmic structures, indicated by arrows, are mainly present in the cells treated by 7KC (40 µg/ml) (**H**).

Figure 2: Reversibility of 7-ketocholesterol induced polar lipid accumulation. U937 were cultured in the absence or in the presence of 7KC (40 µg/ml) for 8 h, washed, and resupended in culture medium only for 14 h. At 8, and 22 h, the percentages of cells with depolarized mitochondria (**A**), and with large red cytoplasmic structures (above 630 nm) (**B**) were determined by staining with with DiOC6(3) and Nile Red (0.1 µg/ml), respectively. Data presented are means ± standard error of at least three independent experiments. * $P < 0.05$, untreated versus 7KC-treated cells; # $P < 0.05$, 7KC-treated cells resuspended in culture medium versus 7KC-treated cells.

Figure 3: Effects of Vitamin-E on phospholipidosis associated with 7-ketocholesterol-induced apoptosis. U937 cells were cultured in the absence or presence of 7-ketocholesterol (7KC; 40 µg/ml) for various periods of time (6, 14, 18, 24, and 30 h) and the effects of Vitamin-E (Vit-E, 100 µM) on apoptosis, and on the cellular events associated with phospholipidosis were investigated. (**A**): *in situ* detection of activated caspases with fluorochrome-labeled inhibitors of caspases (FLICA) in untreated or 7KC-treated cells

cultured for 18 h in the absence or in the presence of Vit-E. (**B**): effects of Vit-E on myelin figure formation; **a**: untreated cells; **b**: Vit-E treated cells; **c**: 7KC-treated cells; **d**: (7KC+Vit-E)-treated cells. (**C**): effects of Vit-E on lysosomal destabilization evaluated by flow cytometry after staining with acridine orange (AO). (**D**): effects of Vit-E on polar lipid accumulation determined by flow cytometry after staining with Nile Red (NR); (**E**): effects of Vit-E on cholesterol content measured on cellular extracts by gas chromatography; (**F**): Effects of Vit-E on the organization and lipid content of cytoplasmic membrane was determined by flow cytometry after staining with MC 540 by the ratio [MC 540 bright cells]/ [MC 540 dim cells]. Data presented are means ± standard error of at least three independent experiments. * $P < 0.05$, untreated versus 7KC-treated cells ; # $P < 0.05$, 7KC-treated versus (7KC+Vit-E)-treated cells.

Figure 4: Effects of Vitamin-E on PI3-K activity, and on the content and phosphorylation of PDK-1 and Akt during 7-ketocholesterol-induced apoptosis. U937 cells were cultured in the absence or presence of 7-ketocholesterol (7KC; 40 µg/ml) for 24 h and the effects of Vitamin-E (Vit-E, 100 µM) on the different components of PI3-K / PDK-1 / Akt pathway were investigated. **(A) :** effects of Vitamin-E on PI3-K activity measured on cell extracts with the 'PIP$_3$ Mass ELISA' kit (Echelon Biosciences). Data presented are means ± standard error of at least three independent experiments. * $P < 0.05$, untreated versus 7KC-treated cells ; # $P < 0.05$, 7KC-treated versus (7KC+Vit-E)-treated cells. (**B**) : effects of Vitamin-E on PDK-1 and Akt content, and phosphorylation were investigated by Western blot. At the end of the incubation time, cell extracts were collected, subjected to SDS/PAGE, and immunoblotted with anti-Akt, anti-Akt phospho Thr 308, anti-PDK-1, anti-PDK-1 phospho Tyr 373/376 antibodies. An anti Hsc-70 monoclonal antibody was used to verify the regular expression of Hsc-70 used as internal standard. Data shown in (**B**) are representative of three independent experiments.

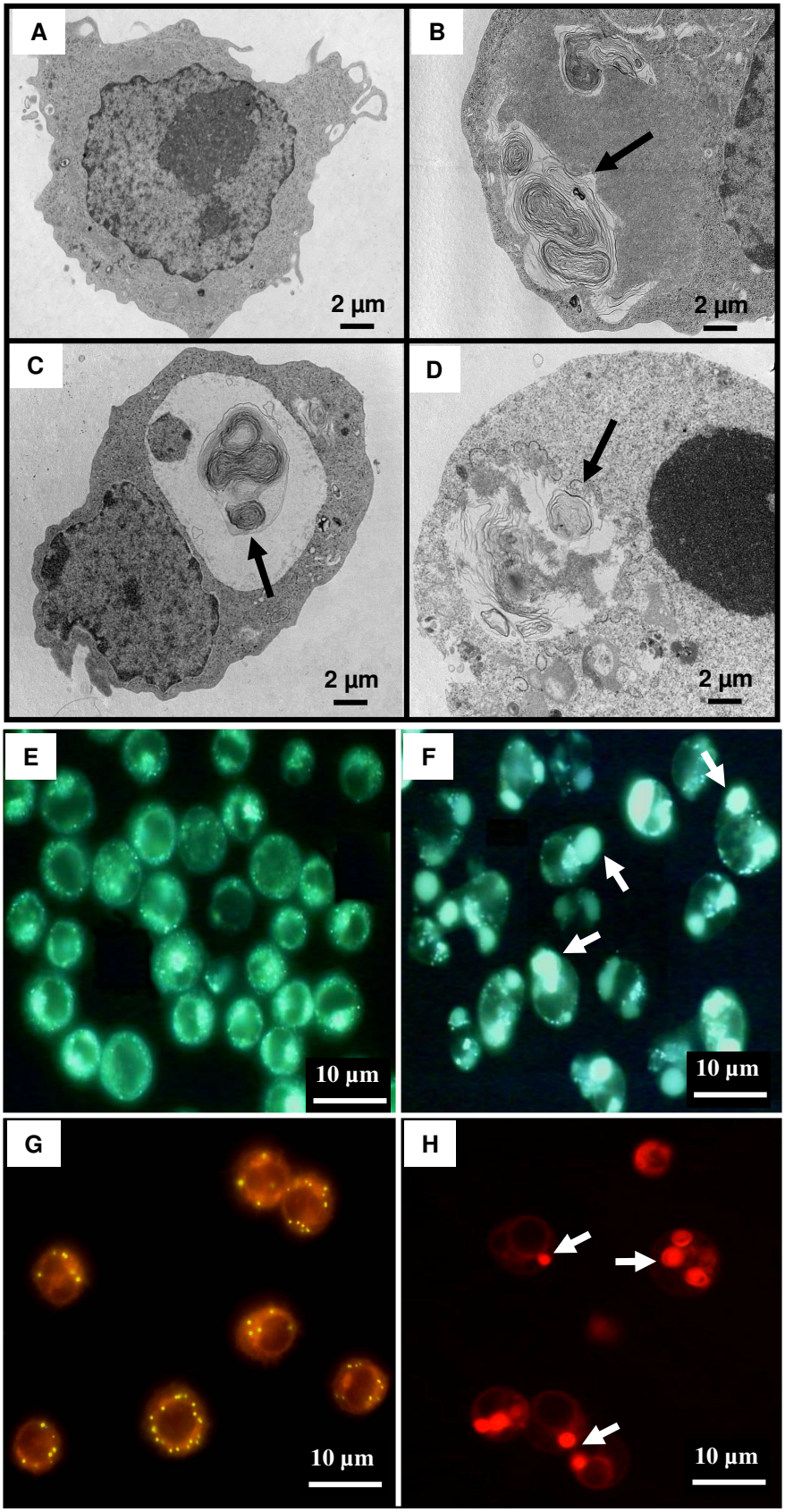
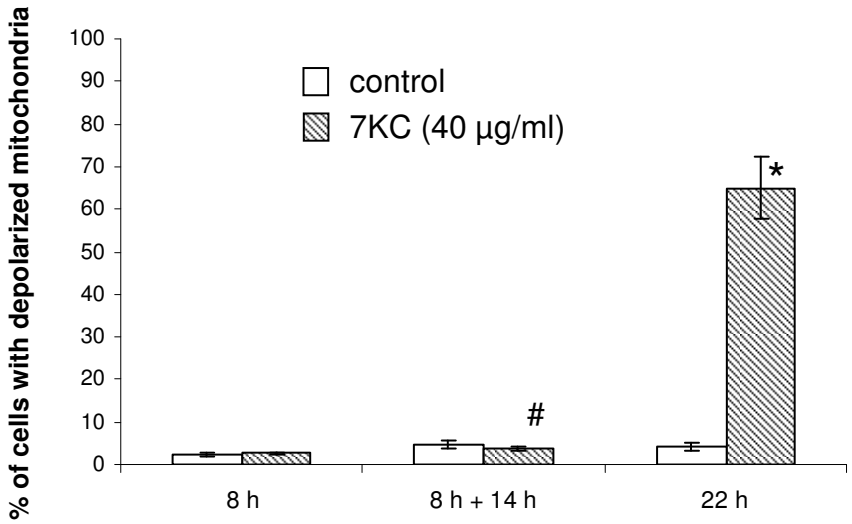


Fig 1

A


% of cells with depolarized mitochondria
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
control
7KC (40 µg/ml)
*
#
8 h
8 h + 14 h
22 h

B

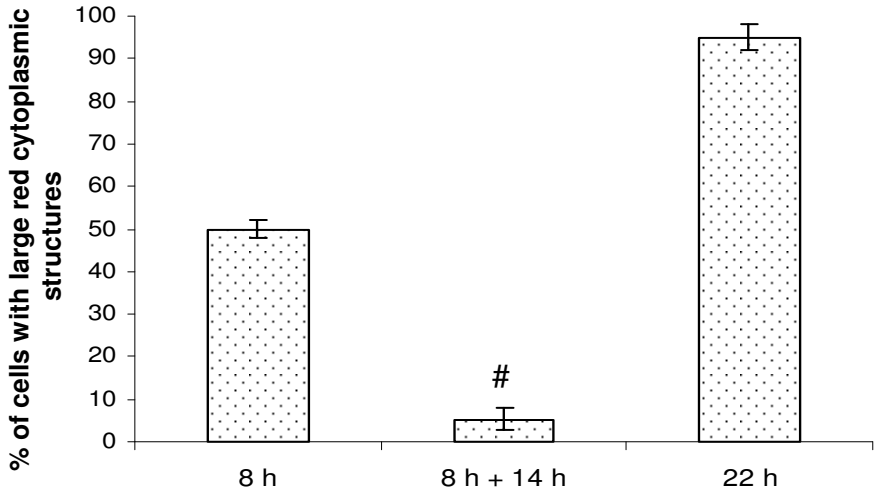

% of cells with large red cytoplasmic structures
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
#
8 h
8 h + 14 h
22 h

Fig 2

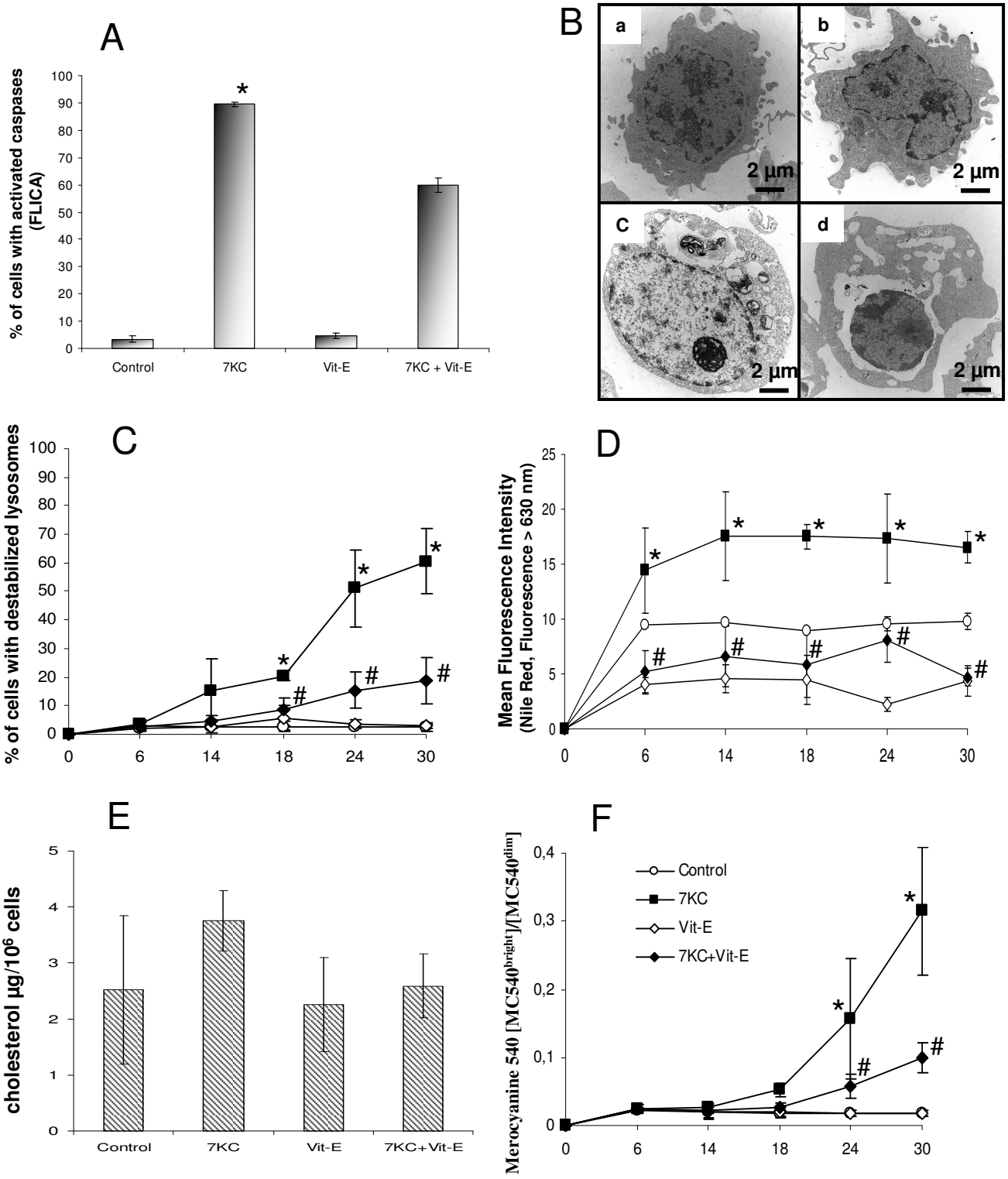
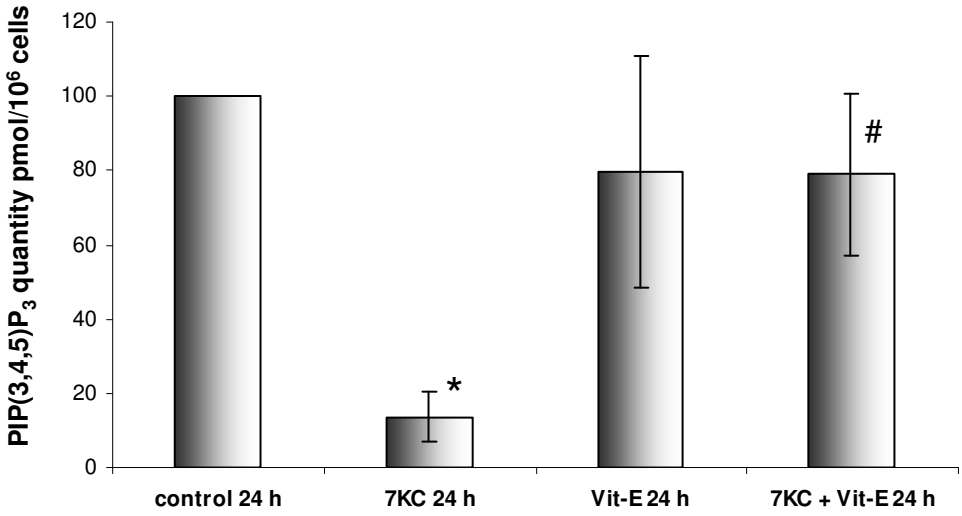

A
% of cells with activated caspases (FLICA)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
*
Control
7KC
Vit-E
7KC + Vit-E
B
a
b
c
d
2 µm
2 µm
2 µm
2 µm
C
% of cells with destabilized lysosomes
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
6
14
18
24
30
*
#
D
Mean Fluorescence Intensity (Nile Red, Fluorescence > 630 nm)
25
20
15
10
5
0
0
6
14
18
24
30
*
#
E
cholesterol µg/10^6 cells
5
4
3
2
1
0
Control
7KC
Vit-E
7KC+Vit-E
F
Merocyanine 540 [MC540^bright]/[MC540^dim]
0,4
0,3
0,2
0,1
0
0
6
14
18
24
30
Control
7KC
Vit-E
7KC+Vit-E
*
#

Fig 3

A


PIP(3,4,5)P3 quantity pmol/10^6 cells
120
100
80
60
40
20
0
*
#
control 24 h
7KC 24 h
Vit-E 24 h
7KC + Vit-E 24 h

B

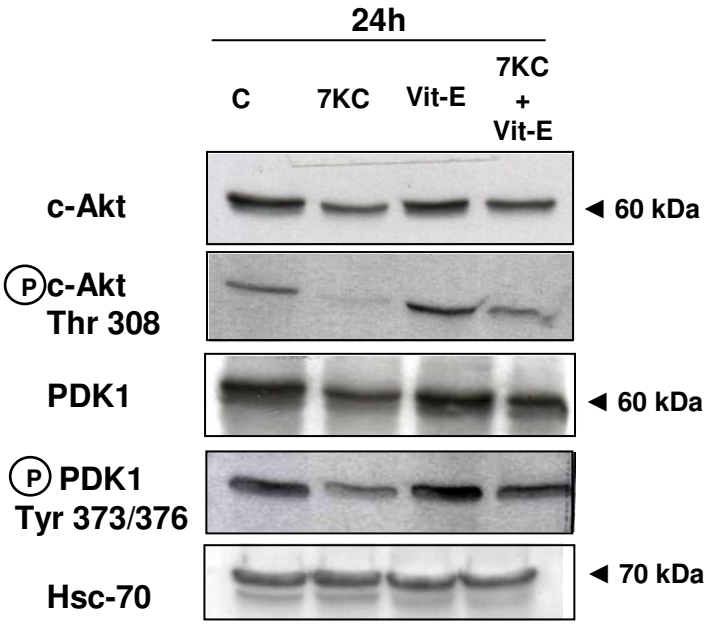

24h
C
7KC
Vit-E
7KC + Vit-E
c-Akt
60 kDa
Pc-Akt Thr 308
PDK1
60 kDa
P PDK1 Tyr 373/376
Hsc-70
70 kDa

Fig 4

	MDC or NR negative fractions Sucrose gradient: 10 - 21% and 29 - 42%	MDC or NR positive fractions Sucrose gradient: 22% - 28%
Staining with MDC		
° **Untreated cells**		
- sphingomyelin (µg/ml)	0.98 ± 0.08	1.68 ± 0.11
- phosphatidylcholin (µg/ml)	0.95 ± 0.5	1.46 ± 0.9
- cholesterol (µg/ml)	2.03 ± 0.96	2.82 ± 1.2
- 7KC (µg/ml)	0	
° **7KC-treated cells**		
- sphingomyelin (µg/ml)	1.1 ± 0.8	10.21 ± 0.4
- phosphatidylcholin (µg/ml)	5.02 ± 2.8	22.8 ± 0.6
- cholesterol (µg/ml)	2.5 ± 0.5	58.4 ± 0.2
- 7KC (µg/ml)	1.96 ± 0.7	74.4 ± 1.2
Staining with NR		
° **Untreated cells**		
- sphingomyelin (µg/ml)	0.09 ± 0.05	0.17 ± 0.01
- phosphatidylcholin (µg/ml)	0.6 ± 0.4	0. 83 ± 0.5
- cholesterol (µg/ml)	2.12 ± 0.6	2.68 ± 0.8
- 7KC (µg/ml)		
° **7KC-treated cells**		
- sphingomyelin (µg/ml)	0.9 ± 0.14	1.92 ± 0.2
- phosphatidylcholin (µg/ml)	2.97 ± 1.7	19.5 ± 0.96
- cholesterol (µg/ml)	2.2 ± 0.7	82.8 ± 10.1
- 7KC (µg/ml)	1.68 ± 1	204.9 ± 20.4

Table 1: Characterization by gas chromatography coupled with mass spectrometry of subcellar fractions obtained on a sucrose gradient by ultracentrifugation of cellular extracts of untreated and 7KC-treated U937 cells previously stained with monodansylcadaverine or Nile Red. Cells were cultured in the presence or in the absence of 7KC (20 µg/ml) for 24 h, and stained with monodansylcadaverine (MDC) or Nile Red (NR) used at 0.05 mM and 0.1 µg/ml, respectively. Data are mean ± standard error of three independent experiments. * $P < 0.05$, untreated versus 7KC-treated cells

DISCUSSION

Lors du traitement de cellules de la paroi vasculaire (cellules musculaires lisses aortiques, cellules endothéliales bovines ou humaines) et monocytaires (U937, THP1) par le 7-cétocholestérol ou le 7β-hydroxycholestérol, les modifications associées à la mort cellulaire, s'accompagnent de la formation de structures multilamellaires cytoplasmiques aussi appelées figures myéliniques (Lizard et *et al.*, 1996, 1997 ; Miguet-Alfonsi *et al.*, 2002 ; Martinet *et al.*, 2004). Ces structures, observées en microscopie électronique à transmission, ont des tailles et des formes variées, et le traitement des cellules U937 par des agents pro-apoptotiques (staurosporine, daunorubicine, vinblastine, cycloheximide, étoposide, cytosine-β-D-arabinofuranoside), par un inducteur de stress du reticulum (tunicamycine) ou par un inducteur d'autophagie (rapamycine) ne s'accompagne pas de la formation de ces structures myéliniques (Miguet-Alfonsi *et al.*, 2002 ; **article 4**). Par ailleurs, lorsque les cellules U937 sont traitées par des oxystérols non toxiques (7α-hydroxycholestérol, 25-hydroxycholestérol, 5,6α-epoxycholestérol), par du cholestérol libre, ou par du 7-cétocholestérol- et du 7β-hydroxycholestérol-oléate aucune structure myélinique n'est détectée (Monier *et al.*, 2003 ; Lemaire-Ewing *et al.*, 2005 ; **article 4**). Les structures myéliniques pourraient donc constituer des bio-marqueurs ultrastructuraux des oxystérols cytotoxiques.

Toutefois, ces corps multilamellaires ne sont pas spécifiques des oxystérols cytotoxiques. En effet, ils ont été détectés dans des conditions normales, sous l'effet de traitements et dans certaines pathologies dans de nombreux types cellulaires.

Dans des conditions physiologiques, ces structures sont décrites comme des organites sécrétoires ou spécialisés dans le stockage de lipides (Schmitz & Müller, 1991). Elles ont été identifiées dans différents tissus et organes : poumons (les structures lamellaires sont des structures de stockage du surfactant pulmonaire), peau (les corps multilamellaires de la peau, aussi appelés corps d'Odland ou kératinosomes, sont des structures sécrétrices qui sont synthétisées dans la couche cornée de l'épiderme), estomac, cartilage et péritoine, ainsi que dans la bile où ils favorisent la solubilisation du cholestérol et permettent son transport (Schmitz & Müller, 1991). Ces corps multilamellaires contiennent des enzymes lysosomiales et des apolipoprotéines impliquées dans leur intégrité fonctionnelle et structurale. Dans un modèle d'athérosclérose expérimentale, des structures multilamellaires ont été observées au niveau de la strie lipidique dans des cellules spumeuses (cellules riches en lipides, dérivant de macrophages ou de cellules musculaires lisses engorgées de cholestérol libre ou estérifié) (Argmann *et al.*, 2004; Bobryshev, 2006).

Bien que ces structures multilamellaires soient actuellement bien caractérisées morphologiquement, il reste encore à déterminer leurs relations avec des voies métaboliques particulières. Par ailleurs, leur composition ainsi que leurs rôles sont d'une façon générale encore mal connus.

I. Marqueurs ultrastructuraux de la cytotoxicité des oxystérols

Les structures cytoplasmiques marquées par la monodansylcadavérine pourraient constituer un marqueur précoce et spécifique de la cytotoxicité induite par les oxystérols (Miguet-Alfonsi *et al.,* 2002). Certaines de nos observations confortent cette hypothèse. En effet, ces structures apparaissent avant la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial, non seulement en phase tardive d'apoptose (identifiée par une condensation et/ou une fragmentation nucléaire) mais aussi en phase précoce d'apoptose (caractérisée par la condensation périnucléaire de la chromatine) (Prunet *et al.*, 2005 ; Monier *et al.*, 2003 ; Lemaire-Ewing *et al.*, 2005 ; **articles 1, 3**). Par ailleurs, comme les figures myéliniques ainsi que l'accumulation de phospolipides qui leurs sont associées ne sont observées qu'avec des oxystérols toxiques comme le 7-cétocholestérol ou le 7β-hydroxycholestérol (**Article 4**) cela permet de suggérer que la formation de ces structures cytoplasmiques traduit le caractère cytotoxique général des oxystérols. La présence de structures multilamellaires au niveau des plaques d'athérosclérose pourrait donc être un indice de taux élevés d'oxystérols cytotoxiques.

II. Relations figures myéliniques - céroïdes

En raison de leur aspect morphologique, les structures cytoplasmiques multilamellaires auraient pu correspondre à des céroïdes. Les céroïdes sont des complexes protéines-lipides oxydés, constituant un matériel insoluble dans plusieurs solvants organiques comme le xylène ou le chloroforme méthanol. Ce matériel est fluorescent en jaune-orange sous lumière UV, acido-résistant (mis en évidence par la méthode de Ziehl-Neelsen) et possède la capacité à accumuler le colorant Noir-Soudan. Il peut également être mis en évidence par la coloration à l'Oil Red O. L'absence d'autofluorescence jaune sous excitation ultraviolette et de coloration cytoplasmique rouge avec l'Oil Red O nous a conduit à conclure que les structures myéliniques ne sont pas des céroïdes.

Cette hypothèse avait été envisagée car les céroïdes sont souvent présents en quantité variable à l'intérieur des plaques d'athérosclérose, aussi bien à l'intérieur des macrophages qu'au niveau du cœur nécrotique des plaques avancées (Mitchinson 1982 ; Mitchinson *et al.*, 1985). Ces céroïdes artériels seraient le résultat de l'activité de mécanismes microbicides des macrophages dépendants de l'oxygène (Mitchinson *et al.*, 1988).

III. Relations figures myéliniques et autophagie

Des structures myéliniques colorées par la monodansylcadavérine ont été considérées comme des vacuoles d'autophagie (Hariri *et al.*, 2000). En raison, de la présence de vacuoles accumulant la monodansylcadavérine dans le cytoplasme de cellules U937, THP1, A7R5 et MCF-7, traitées par des oxystérols toxiques, ceci nous a conduit à envisager l'intervention d'un processus autophagique précédant la mort cellulaire par apoptose induite par le 7-cétocholestérol. La formation précoce des vacuoles colorées par la monodansylcadavérine (**Articles 1, 2, 3**), laisse supposer que ces vacuoles pourraient participer au processus de mort déclenché par le 7-cétocholestérol. L'altération de l'intégrité des lysosomes observée avec le 7-cétocholestérol sur les cellules U937 (Lemaire-Ewing *et al.*, 2005) (impliquant probablement la libération subséquente d'enzymes protéolytiques lysosomiales), pourrait résulter de la fusion d'autophagosomes avec les lysosomes, comme cela est décrit dans l'autophagie (Klionsky, 2005). De plus, Martinet et collaborateurs (2004) ont mis en évidence la conversion de LC3-I en LC3-II (homologue chez les mammifères d'Aut7/Apg8 impliqué dans l'expansion de l'autophagosome (Kabeya *et al.*, 2000)) ainsi que la formation de vacuoles acides, en faveur d'une implication de l'autophagie dans la cytotoxicté du 7-cétocholestérol.

Cependant, nos travaux ont montré que les structures cytoplasmiques colorées par la monodansylcadavérine sont formées en présence de 7-cétocholestérol, en absence ou en présence d'inhibiteurs du processus autophagique tels que la wortmaninne, la 3-méthyladénine, un cocktail d'acides aminés (inhibiteur de mTor), ou de l'acide ocadaïque (inhibiteur de PP2A)) (Ogier-Denis & Codogno, 2003 ; Bursch, 2004). Ces observations vont donc à l'encontre de l'hypothèse selon laquelle l'autophagie serait impliquée dans la mort cellulaire induite par le 7-cétocholestérol.

Dans ce cas, il n'est pas à exclure que la présence de la protéine LC3-II, mise en évidence par Martinet et collaborateurs (2004) dans les cellules musculaires lisses cultivées en présence de 7-cétocholestérol, reflète son association à des structures différentes des vacuoles d'autophagie telles que les microtubules. L'interaction de LC3-II avec les microtubules, impliqués dans l'ancrage d'un certain nombre de protéines intervenant dans des processus physiologiques différents, pourrait constituer une explication à l'immunomarquage observé en immunofluorescence avec l'anticorps anti-LC3 sur les cellules U937 traitées par le 7-cétocholestérol. En effet, lorsque des cellules THP-1 sont traitées par le 7-cétocholestérol, il a été observé une désorganisation du réseau de microtubules, ainsi qu'un réarrangement et une dépolarisation progressive des microtubules qui pourrait permettre une accessibilité de la protéine LC3-II aux anticorps (Berthier *et al.*, 2005).

IV. Rôles possibles des figures myéliniques

Les figures myéliniques formées après traitement des cellules U937 par le 7-cétocholestérol ont été caractérisées biochimiquement. Ces structures sont composées de lipides neutres (7-cétocholestérol, cholestérol) et de lipides polaires (phosphatidylcholine, sphingomyéline) (**Articles 2, 3**).

1. Réponse adaptative à l'accumulation de cholestérol

La composition lipidique des figures myéliniques présente des similitudes, non seulement d'un point de vue ultrastructural, mais aussi biochimique, avec ce qui est décrit par Tabas quand du cholestérol libre (aussi appelé cholestérol non estérifié) s'accumule dans des macrophages (Tabas, 2002). En effet, dans des macrophages spumeux isolés de plaques d'athérome ou dans des macrophages murins J744 chargés de cholestérol non estérifié, les structures lipidiques en spirales observées sont riches en phospholipides (Tabas, 2002). Schmitz et ses collaborateurs avaient également observé la formation de corps multilamellaires riches en cholestérol et en phospholipides dans le cytoplasme de macrophages chargés en cholestérol (Robenek & Schmitz, 1988 ; Schmitz & Muller, 1991). Cette accumulation massive de phospholipides serait induite par le cholestérol libre afin de maintenir constant le rapport cholestérol libre / phospholipides, et de prévenir la diminution de la fluidité de domaines membranaires ainsi que l'activité de certaines enzymes (Tabas, 2000). En effet, lorsque le rapport cholestérol libre / phospholipides est normal, les membranes contiennent des domaines présentant des défauts d'assemblage des phospholipides fournissant des espaces pour les protéines de membrane afin qu'elles puissent subir des changements conformationnels. En présence d'un excès de cholestérol libre, ces domaines sont moins nombreux ce qui restreint la liberté conformationnelle des protéines de membrane et inhibe leurs fonctions (Yeagle, 1991). Avec le cholestérol libre, l'augmentation de la biosynthèse des phospholipides est surtout observable à travers l'augmentation de la biosynthèse de phosphatidylcholine, due à l'activation de l'enzyme CTP :phosphocholine cytidylyltransferase, et de la biosynthèse de la sphingomyéline (Shiratori *et al.*, 1995 ; Okwu *et al.*, 1994).

Dans des lésions athéromateuses avancées, il a également été observé une accumulation de cholestérol libre. Celle-ci serait due soit à une diminution de l'efflux de cholestérol libre, soit à une diminution de l'estérification du cholestérol médiée par l'ACAT et peut être à une augmentation de l'hydrolyse du cholestérol estérifié ainsi qu'à une augmentation de la biosynthèse de phospholipides

(Tabas, 1997a ; 1997b). Compte-tenu de ces différentes observations, l'hypothèse suivante a été émise : l'augmentation de la biosynthèse des phospholipides, en empêchant le ratio cholestérol libre / phospholipides d'atteindre des niveaux toxiques, serait une réponse initiale, transitoire adaptative à l'accumulation intracellulaire de cholestérol libre (Tabas, 2000).

Par analogie avec ce qui est décrit avec le cholestérol libre (Tabas, 2002), ces structures multilamellaires pourraient constituer une réponse adaptative protectrice vis-à-vis de certains évènements associés à la cytotoxicité du 7-cétocholestérol parmi lesquels figure une forte accumulation intracellulaire de cholestérol libre (**Article 3**). Cependant, lorsque du cholestérol libre est ajouté au milieu de culture, il n'est pas toxique et n'induit pas la formation de structures cytoplasmiques colorées par la monodansylcadavérine (Monier *et al.*, 2003 ; Lemaire-Ewing *et al.*, 2005).

2. Oxystérols et lipoapoptose

Il a été démontré que les acides gras sont capables d'induire une forme de mort cellulaire particulière : la lipoapoptose (Unger & Orci, 2001 ; Unger & Orci, 2002). Ce type de mort est caractérisé par une accumulation d'acides gras qui induisent l'apoptose par différentes voies de signalisation. Par analogie, nous pouvons supposer que l'accumulation de phospholipides, observée dans le cytoplasme des cellules U937 traitées par le 7-cétocholestérol, pourrait induire des effets analogues. En effet lors de la lipoapoptose, il se produit une surproduction de céramides, une activation de caspases, une régulation des membres de la famille Bcl-2 ainsi que l'inhibition de la voie de survie PI3-K/Akt. Or, tous ces évènements sont observés lorsque des cellules sont traitées par du 7-cétocholestérol : surproduction de céramides C16:0 et C24:0 (Miguet *et al.,* 2001), activation des caspases-9, -3, -7, -8, régulation négative de Bcl-2 et inhibition de la voie PI3-K/PDK-1/Akt. L'accumulation de phospholipides pourrait ainsi conduire à une forme de lipoapoptose par des mécanismes qui restent à préciser.

3. Oxystérols et phospholipidose

Les structures multilamellaires, mises en évidence, sont associées à un phénomène de phospholipidose le plus souvent décrit avec des drogues lipophiles cationiques. Cette phospholipidose est définie par 4 caractéristiques principales : accumulation excessive de phospholipides (qui peuvent être de natures différentes) dans les cellules ; présence d'inclusions cytoplasmiques multilamellaires dans des compartiments acides ; accumulation de la drogue inductrice en association avec les phospholipides dans les structures multilamellaires et réversibilité des altérations après l'arrêt du traitement par la drogue (Reasor & Kacew, 2001).

Les différentes drogues induisant la phospholipidose incluent une grande variété d'agents pharmacologiques comme des anti-bactériens, des anti-psychotiques, des anti-dépresseurs et des anti-arythmiques. La phospholipidose a également été observée dans un modèle d'athérosclérose lors de l'induction de macrophages spumeux chez le rat par un traitement de longue durée avec de la chloroquine (Nelson & Fitzhugh, 1948). La phospholipidose est considérée comme un effet secondaire important et pouvant être rédibitoire. Actuellement, la cytométrie en flux, associée au Nile Red, l'histopathologie et la microscopie électronique sont les méthodes de référence pour valider la présence de phospholipidose (Halstead *et al.*, 2006).

Dans le cas de certaines drogues, l'accumulation de phospholipides serait le résultat de l'inhibition de la dégradation des phospholipides par les phospholipases A1 et A2 lysosomiales (Martin *et al.*, 1989). Une étude ultrastructurale de macrophages alvéolaires et péritonéaux de souris déficientes en phospholipase A2 lysosomiale révèle l'apparition de cellules spumeuses avec des corps multilamellaires constituant un des critères de phospholipidose (Hiraoka *et al.*, 2006). Dans notre modèle cellulaire, les oxystérols, qui présentent une toxicité, induisent une déstabilisation lysosomiale (Lemaire-Ewing *et al.*, 2005) qui pourrait s'opposer à la dégradation des phospholipides au niveau des lysosomes (**Article 6**).

La phospholipidose également décrite *in vitro, in vivo* et en clinique, est un phénomène réversible (Dean *et al.*, 1987 ; McCloud *et al.*, 1995). Nous observons également cette réversion dans notre modèle cellulaire (**Article 6**) ce qui conforte que le phénomène d'accumulation de phospholipides détecté en présence de 7-cétocholestérol correspond à de la phospholipidose.

Concernant le rôle de la phospholipidose, la théorie qui prévaut actuellement est une réponse adaptative à l'exposition aux drogues plutôt qu'une réponse impliquée dans la toxicité. La cellule s'adapterait à l'exposition à la drogue en la séquestrant dans des corps multilamellaires, réduisant ainsi sa toxicité potentielle (Hostetler *et al.*, 1985). Les structures multilamellaires pourraient donc constituer une réponse adaptative qui permettrait d'emprisonner le 7-cétocholestérol diminuant ses effets cytotoxiques.

Cependant, lorsque des cellules sont traitées par des inducteurs de phospholipidose, tels que l'amiodarone et l'imipramine, la prolifération cellulaire est inhibée et une apoptose dépendante des caspases est observée. (Piccotti *et al.,* 2005). Le rôle protecteur de la phospholipidose est donc reconsidéré et les interactions entre phospholipidose et mort cellulaire sont actuellement évaluées et prises en compte. Etant donné que l'arrêt du traitement par le 7-cétocholestérol, et l'apport de Vitamine-E s'accompagnent à la fois d'une disparition des figures myéliniques et des signes de toxicité du 7-cétocholestérol, ces observations militent aussi en faveur de relations entre phospholipidose et mort cellulaire. De plus, lorsque le nombre de cellules présentant des structures multilamellaires augmente, la cytotoxicité apparaît (**Article 3**). D'un point de vue fonctionnel, il a été suggéré que la rupture des lysosomes dans lesquels se trouvent les structures multilamellaires pourrait conduire à la libération d'enzymes capables d'activer les caspases (Piccotti *et al.*, 2005).

V. Origines possibles des figures myéliniques

Les structures multilamellaires, de part leur composition en sphingomyéline et en cholestérol, évoquent des membranes cellulaires et en particulier des domaines membranaires appelés radeaux lipidiques. Ces derniers sont en effet constitués principalement de sphingomyéline et de cholestérol et ces portions de membrane pourraient s'accumuler dans des vacuoles et fusionner avec des lysosomes (Li *et al.*, 2005). Par ailleurs, des observations réalisées au laboraoire ont montré que le 7-cétocholestérol peut s'insérer dans les radeaux lipidiques (Phillips *et al.*, 2001 ; Berthier *et al.*, 2004). Il est possible qu'une accumulation importante de lipides issus des radeaux lipidiques dans les lysosomes puisse altérer les propriétés de ces derniers ce qui pourrait conduire à la formation de vacuoles évoquant les figures myéliniques (Neufeld, 1991).

Dans des conditions physiologiques, au niveau de la peau, les structures multilamellaires présentent aussi un caractère lysosomial et contiennent des enzymes comme l'acide phosphatase, la carboxypeptidase, la cathepsine B, la lipase acide, la sphingomyélinase et la phospholipase A2 (Schmitz & Muller, 1991).

Ces structures multilamellaires pourraient également avoir pour origine le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi. En effet, lors du traitement de rats par deux inhibiteurs de la synthèse protéique (la cycloheximide, l'émétine), des structures membranaires en spirales apparaissent dans le cytoplasme des cellules parenchymateuses du foie (Hwang *et al.*, 1974). Dans certains cas, ces structures sont présentes en position périnucléaire, d'autres apparaissent au niveau du réticulum endoplasmique granuleux (Hwang *et al.*, 1974). La plupart des structures en spirale sont libres de polyribosomes et entourent des organites comme les mitochondries, les peroxisomes, le réticulum endoplasmique lisse et des lipides (Hwang *et al.*, 1974). Les longues citernes périphériques contenant ces structures peuvent également se terminer par des ampoules dilatées ressemblant aux corps de Golgi (Hwang *et al.*, 1974). Dans ce cas, la formation des membranes de ces structures serait liée à une désynchronisation de la synthèse de protéines naissantes et des composants lipidiques des membranes ou à d'autres dérégulations biochimiques impliquant des interactions lipides-protéines (Hwang *et al.*, 1974). Landmann a également décrit les corps multilamellaires comme dérivant d'un bourgeonnement du Golgi (Landmann, 1986).

VI. Relations entre la formation des figures myéliniques, l'accumulation de lipides polaires et l'activité caspase

Le 7-cétocholestérol induisant un type de mort présentant des caractéristiques d'apoptose, l'hypothèse d'une relation possible entre les caspases, la formation des structures myéliniques et l'accumulation de lipides polaires a été envisagée.

L'utilisation de cellules déficientes en caspase-3 comme les MCF-7 et d'inhibiteurs des caspases a permis d'évaluer le rôle des caspases dans la formation des structures myéliniques (**Article 4**). Ceci a conduit à démontrer que les caspases et en particulier la caspase-3 n'interviennent pas dans la formation des figures myéliniques.

Différentes hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer cette accumulation de lipides. Des travaux antérieurs menés au laboratoire ont montré que le 7-cétocholestérol augmente de façon précoce le contenu cellulaire en céramides C16:0 et C24:0 (Miguet *et al.,* 2001). Ces derniers pourraient gagner l'appareil de Golgi, et en association à la phosphatidylcholine, généreraient de la sphingomyéline. Toutefois, la sphingomyéline pourrait aussi provenir de l'inhibition directe de la sphingomyélinase acide par le 7-cétocholestérol (Maor *et al.,* 1995 ; Tabas, 2002). Quant à l'accumulation cellulaire de phosphatidylcholine, elle pourrait être due à une néosynthèse

secondaire (par activation de la CTP :phosphocholine cytidyltransférase), suite à l'augmentation des taux intracellulaires de cholestérol libre (Tabas, 2002). L'accumulation de cholestérol libre induite par le 7-cétocholestérol, pourrait également provenir de l'inhibition de l'efflux du cholestérol (Gelissen *et al.,* 1996 ; Tabas, 2002), d'une compétition avec le cholestérol pour ACAT1 (Brown *et al.*, 2000), d'une rétention accrue du cholestérol (Norlin & Chiang, 2004), ou encore d'une perturbation du transport vésiculaire du cholestérol intracellulaire (par les protéines Nieman-Pick C ou la sphingomyéline) (Feng *et al.,* 2003).

Lorsque l'on utilise des inhibiteurs de caspases à large spectre, z-VAD-fmk, ou de caspase-2, z-VDVAD-fmk, nous observons une diminution de la fluorescence rouge du Nile Red, reflétant une diminution d'accumulation de lipides polaires (**Articles 4, 5**). L'accumulation de lipides polaires pourrait donc impliquer la caspase-2. Ceci est en accord avec les résultats obtenus sur cellules HCT116 dans lesquelles le gène de la caspase-2 a été éteint. Dans ces conditions, une diminution de 50% de lipides a été observée après marquage au Nile Red (Logette *et al.*, 2005).

Par ailleurs, nous avons démontré que le 7-cétocholestérol inhibait la transcription de la caspase-2. Il a été mis en évidence que le promoteur de la caspase-2 présentait des sites pour les facteurs de transcription SREBPs (Logette *et al.*, 2005). Or, le 7-cétocholestérol peut se lier à la protéine SCAP qui joue un rôle dans l'activation des facteurs de transcription SREBPs (Massey, 2006). En se liant à SCAP, le 7-cétocholestérol retiendrait cette protéine dans la membrane du reticulum endoplasmique. Les facteurs de transcription SREBPs ne pourraient alors pas être clivés et donc activés, ce qui réduirait la transcription des gènes qui présentent dans leur promoteur un site de liaison à ces facteurs.

Lors de la mort cellulaire induite par le 7-cétocholestérol, la caspase-2 semblerait peu impliquée dans le processus de mort. En effet, l'iodure de propidium permet de mettre en évidence les cellules mortes, et l'activité caspase-2 n'est trouvée que dans les cellules ne présentant pas de perméabilité à l'iodure de propidium. Par ailleurs, l'inhibition de cette caspase n'influe pas sur la proportion de cellules avec des noyaux condensés/fragmentés (**Article 4**).

VII. Effets de la vitamine-E sur la formation des figures myéliniques et la voie PI3-K/PDK-1/Akt

Dans le cadre de la phospholipidose, la vitamine-E est capable de réduire l'accumulation de drogue et de ses dérivés et ainsi d'inhiber la phospholipidose (Honegger *et al.*, 1995 ; Agoston *et al.*, 2003). Ceci pourrait être expliqué par une interférence de la vitamine E avec la formation des complexes drogues/phospholipides, responsable du stockage des lipides et de l'accumulation de la drogue, ou avec des complexes drogues/phospholipides pré-existants, accélérant leur dissociation et permettant aux phospholipides d'être substrats des phospholipases lysosomiales (Honegger *et al.*, 1995). Ceci pourrait expliquer le fait que la vitamine-E inhibe l'accumulation de lipides polaires et la formation des figures myéliniques lors de la mort cellulaire induite par le 7-cétocholestérol (**Article 6**).

La vitamine E a également un effet au niveau de la signalisation cellulaire. La vitamine-E peut agir sur la protéine kinase C (PKC), un effecteur clé pour les voies de signalisation des cytokines, des facteurs de croissance et des hormones. L'inhibition des PKC par la vitamine-E pourrait résulter soit de la prévention de l'autophosphorylation de l'enzyme, soit de la déphosphorylation de la PKC par une phosphatase protéique PP2A (protéine phosphatase 2A), qui est activée par la vitamine E (Clement *et al.,* 1996 ; Ricciarelli *et al.*, 1998). La vitamine-E a aussi été décrite comme pouvant moduler la voie PI3-K en intervenant probablement au niveau de la phosphatidylinositol-3-kinase, de PDK-1 ou d'une phosphatase déphosphorylant c-Akt (Mazière *et al.*, 2004 ; Kempna *et al.*, 2004).

Rusinol *et al.* ont montré que dans des cellules macrophagiques murines P388D1, le 25-hydroxycholestérol et le 7-cétocholestérol induisaient une dégradation de la protéine Akt (Rusinol *et al.*, 2004). Dans les cellules U937, la voie PI3-K/PDK-1/Akt est également inhibée lors de la mort cellulaire induite par le 7-cétocholestérol. En revanche, le 25-hydroxycholestérol n'est pas toxique sur les cellules promonocytaires humaines U937. La vitamine-E, comme cela a été suspecté (Mazière *et al.*, 2004 ; Kempna *et al.*, 2004), restaure cette voie PI3-K/PDK-1/Akt en augmentant l'activité PI3-K, et en permettant la phosphorylation des protéines PDK-1 et Akt (une fois phosphorylées ces protéines sont actives). L'étape inititale de l'activation de ces deux protéines étant leur recrutement au niveau de la membrane par l'intermédiaire du phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphate, nous pouvons supposer que la vitamine-E agit au niveau membranaire (la vitamine-E activant la PI3-K). Cette hypothèse est confortée par les observations suivantes. La vitamine-E, sous sa forme α-tocophérol, a été localisée en association étroite avec les

phospholipides poly-insaturés (Lucy, 1978). Elle se trouverait alors dans une position adéquate pour empêcher la peroxydation lipidique (Lucy, 1978 ; Packer *et al.*, 2001). Elle pourrait ainsi stabiliser les membranes biologiques contenant de hautes quantités de molécules de phospholipides poly-insaturés (Lucy, 1978). En stabilisant les membranes, la vitamine-E pourrait permettre à la PI3-K d'exercer son activité : produire du phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphate qui permet le recrutement de PDK-1 et d'Akt.

La vitamine-E pourrait également intervenir sur la voie PI3-K/PDK-1/Akt en modulant une phosphatase, la protéine phosphatase 2A (PP2A), étant donné que la vitamine-E agit surtout au niveau de la phosphorylation des protéines PDK-1 et Akt (Yin *et al.*, 2006).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans leur ensemble, les travaux réalisés ont permis une caractérisation structurale, fonctionnelle et biochimique précise des figures myéliniques qui ont permis de démontrer que leur formation s'inscrivait dans un processus appelé **phospholipidose**.

L'identification de ce processus est d'autant plus important que de telles figures sont identifiées *in vivo*, en particulier dans des plaques d'athérome, et ne sont détectées qu'avec des **oxystérols** cytotoxiques en particulier avec le **7-cétocholestérol** et le 7β-hydroxycholestérol identifiés en quantités importantes dans les lésions athéromateuses.

Comme la phospholipidose est un processus précoce précédant les signes de mort cellulaire, il reste à définir s'il s'agit d'un phénomène de détoxification ou associé à la mort cellulaire.
Cette dernière hypothèse a conduit à évaluer s'il pouvait exister des relations entre le métabolisme des lipides et celui de la mort cellulaire. Cette hypothèse est confortée par les résultats obtenus montrant que l'inhibiteur de **caspases** large spectre z-VAD-fmk inhibait non seulement la mort cellulaire mais aussi l'accumulation de lipides polaires, évaluée par coloration au **Nile Red** en utilisant la cytométrie en flux reconnue comme technique de référence pour mettre en évidence la phospholipidose, ainsi qu'une technique de microscopie prometteuse et performante : la **microscopie confocale spectrale**. Comme une inhibition de l'accumulation de lipides polaires a aussi été observée en présence de z-VDVAD-fmk (inhibiteur de caspase-2), une implication de la **caspase-2** dans le processus de phospholipidose est suspectée.

Au cours de ce travail de thèse, les modifications lipidiques également observées au niveau de la membrane cytoplasmique, ont aussi conduit à préciser dans quelles mesures ces dernières pouvaient influencer l'activité de voies métaboliques associées à la membrane et impliquées dans la régulation de la vie et de la mort cellulaire. Dans ce contexte, le rôle de **la voie PI3-K / PDK-1 / Akt** est largement décrit avec différents inducteurs de mort cellulaire. Le travail réalisé démontre que cette voie métabolique est inhibée par le 7-cétocholestérol aboutissant ainsi à une déphosphorylation d'Akt et par conséquent à son inactivation. Or, Akt intervient dans la phosphorylation de protéines impliquées dans le contrôle de la mort cellulaire, telle que BAD, qui intervient dans la dépolarisation mitochondriale. Une voie métabolique pré-mitochondriale impliquée dans la mort cellulaire complexe associée au 7-cétocholestérol a donc été identifiée.

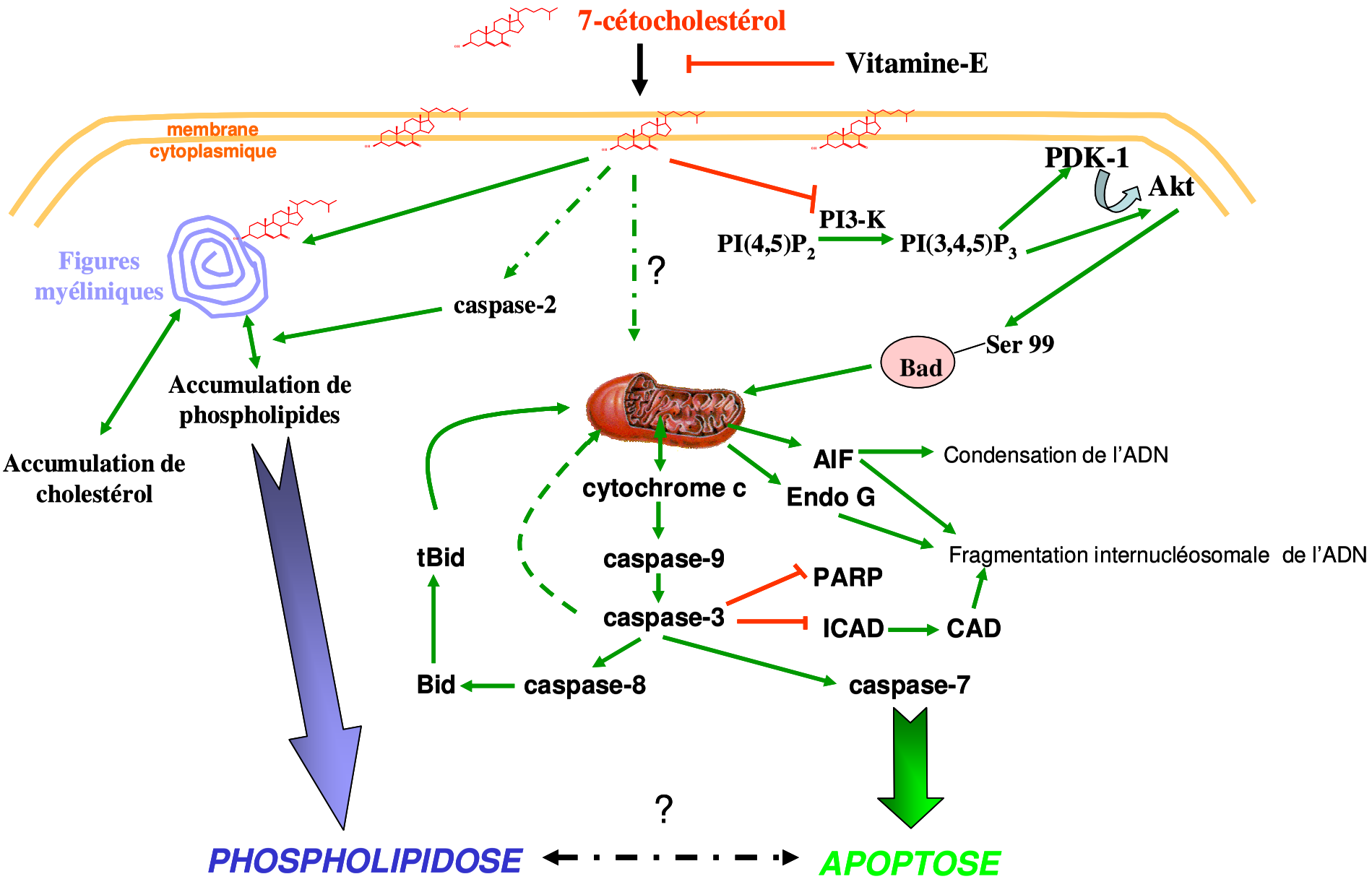


Figure 61 : Formation de figures myéliniques, accumulation de lipides et voies de signalisation induites par le 7-cétocholestérol

Sur des cellules traitées par du 7-cétocholestérol, des études ultérieures réalisées au laboratoire ayant montré que la **Vitamine-E** s'opposait à l'accumulation de vésicules acides contenant les structures myéliniques et inhibait l'apoptose, ceci nous a amené à préciser le rôle de la Vitamine-E sur la phospholipidose et sur la voie PI3-K / PDK-1 / Akt. Il a été démontré que la Vitamine-E s'oppose à la phospholipidose et préserve l'activité de la voie PI3-K / PDK-1 / Akt.

Les résultats obtenus résumés dans la Figure 61 ont permis de mieux caractériser la mort cellulaire induite par le 7-cétocholestérol et ouvrent de nombreuses perspectives de travail.

- Il semble ainsi important de préciser les relations entre phospholipidose et mort cellulaire, en particulier le rôle des caspases et celui de la caspase-2 dans l'accumulation de phospholipides associée à la toxicité du 7-cétocholestérol.

- Les sites d'accumulation du 7-cétocholestérol dans la cellule sont encore à préciser. L'accumulation de cet oxystérol dans des membranes d'oganites cellulaires (mitochondries, peroxysomes) n'est pas à exclure ce qui pourrait ainsi contribuer au dysfonctionnement mitochondrial et aux désordres lipidiques observés.

- La confirmation du rôle protecteur de la Vitamine-E (α-tocophérol) dans le processus de mort cellulaire ainsi que sur la phospholipidose conforte l'intérêt accordé à cette molécule, et à ses dérivés, pour s'opposer au développement de pathologies dégénératives lentes qui constituent de véritables problèmes de santé publique et dans lesquelles pourraient intervenir les oxystérols, telles que l'athérosclérose, la dégénérescence maculaire liée à l'âge et la maladie d'Alzheimer.

BIBLIOGRAPHIE

A

• **Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW.** (2002) Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, pro-caspase-9 binding, and activation**.** Mol Cell 9: 423-432.

• **Acton S**, **Rigotti A**, **Landschulz KT**, **Xu S**, **Hobbs HH**, **Krieger M**. (1996) Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. Science 271: 518-520.

• **Adams JM, Cory S.** (1998) The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. Science 281: 1322-1326.

• **Adams Cm, Reitz J, De Brabander JK, Feramisco JD, Li L, Brown MS, Goldstein JL.** (2004) Cholesterol and 25-hydroxycholesterol inhibit activation of SREGPs by different mechanisms, both involving SCAP and Insigs. J Biol Chem 279: 52772-52780.

• **Adachi J, Asano M, Ueno Y, Naito T.** (2000) Identification of 7-hydroperoxycholesterol in human liver by liquid chromatography-mass spectrometry. Alcohol Clin Exp Res 24: 21S-25S.

• **Agoston M, Orsi F, Fehér E, hagymasi K, Orosz Z, Blazovics A, Fehér J, Vereckei A.** (2003) Silymarin and vitamin E reduce amiodarone-induced lysosomal phospholipidosis in rats. Toxicology 190 : 231-241.

• **Agrawal, S., M. L. Agarwal, M. Chatterjee-Kishore, G. R. Stark, and G. M. Chisolm.** (2002) Stat1-dependent, p53-independent expression of p21(waf1) modulates oxysterol-induced apoptosis. Mol Cell Biol 22:1981-1992.

• **Ait-Oufella H, Salomon BL, Potteaux S, Robertson AK, Gourdy P, Zoll J, Merval R, Esposito B, Cohen JL, Fisson S, Flavell RA, Hansson GK, Klatzmann D, Tedgui A, Mallat Z**. (2006) Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. Nat Med 12: 178-180.

• **Alessi DR, Caudwell FB, Andjelkovié M, Hemmings BA, Cohen P.** (1996) Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B: comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. FEBS Lett 399: 333-338.

• **Ambrose JA, Barua RS.** (2004) The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease An update. J Am Coll Cardiol 43: 1731-1737.

• **Ambrosini G, Adida C, Altieri DC.** (1997) A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. Nat Med 3 : 917-921.

• **Anderson KE, Coadwell J, Stephens LR, Hawkins PT**. (1998) Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B. Cur Biol 8: 684-691.

• **Anderson KE, Jackson SP.** (2003) Class I phosphoinositide 3-kinases. Int J Biochem Cell Biol 35 : 1028-1033.

• **Anderson N, Borlak J**. (2006) Drug-induced phospholipidosis. FEBS Lett Sous presse.

• **Andjelkovic M, Alessi DR, Meier R, Fernandez A, Lamb NJ, Frech M, Cron P, Cohen P, Lucocq JM, Hemmings BA**. (1997) Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. J Biol Chem 272 : 31515-31524.

• **Antonio V, Janvier B, Brouillet A, Andreani M, Raymondjean M.** (2003) Oxysterol and 9-cis-retinoic acid stimulate the group IIA secretory phospholipase A2 gene in rat smooth-muscle cells. Biochem J 376: 351-360.

• **Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, Montessuit S, Lewis S, Martinou I, Bernasconi L, Bernard A, Mermod JJ, Mazzei G, Maundrell K, Gambale F, Sadoul R, Martinou JC.** (1997) Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. Science 277 : 370-372.

• **Arcaro A, Volinia S, Zvelebil MJ, Stein R, Watton SJ, Layton MJ, Gout I, Ahmadi K, Downward J, Waterfield MD.** (1998) Human phosphoinositide 3-kinase C2beta, the role of calcium and the C2 domain in enzyme activity. J Biol Chem 273: 33082-33090.

• **Arends MJ, McGregor AH, Wyllie AH.** (1994) Apoptosis is inversely related to necrosis and determines net growth in tumors bearing constitutively expressed myc, ras, and HPV oncogenes. Am J Pathol 144 : 1045-1057.

• **Ares MP, Porn-Ares MI, Thyberg J, Juntti-Berggren L, Berggren PO, Diczfalusy U, Kallin B, Bjorkhem I, Orrenius S, Nilsson J.** (1997) Ca2+ channel blockers verapamil and nifedipine inhibit apoptosis induced by 25-hydroxycholesterol in human aortic smooth muscle cells. J Lipid Res 38: 2049-2061.

• **Ares MP, Porn-Ares MI, Moses S, Thyberg J, Juntti-Berggren L, Berggren P, Hultgardh-Nilsson A, Kallin B, Nilsson J.** (2000) 7beta-hydroxycholesterol induces Ca(2+) oscillations, MAP kinase activation and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. Atherosclerosis 153: 23-35.

• **Argmann CA, Sawyez CG, Li S, Nong Z, Hegele RA, Pickering JG, Huff MW**. (2004) Human smooth muscle cell subpopulations differentially accumulate cholesteryl ester when exposed to native and oxidized lipoproteins. Arterioscler Thromb Vasc Biol 24: 1290-1296.

• **Armstrong DA**. (1992) Oxidized LDL ceroid, and prostaglandin metabolism in human atherosclerosis. Med Hypotheses 38 : 244-248.

• **Ashkenazi A, Dixit VM.** (1998) Death receptors: signaling and modulation**.** Science 1998 Aug 28;281(5381):1305-8

• **Asanuma K**, **Tanida I**, **Shirato I**, **Ueno T**, **Takahara H**, **Nishitani T**, **Kominami E**, **Tomino Y**. (2003) MAP-LC3, a promising autophagosomal marker, is processed during the differentiation and recovery of podocytes from PAN nephrosis**.** FASEB J 17 : 1165-1167.

• **Assuncao Guimaraes C, Linden R.** (2004). Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. Eur J Biochem 271:1638-1650.

• **Auge N, Garcia V, Maupas-Schwalm F, Levade T, Salvayre R, Negre-Salvayre A**. (2002) Oxidized LDL-induced smooth muscle cell proliferation involves the EGF receptor/PI-3 kinase/Akt and the sphingolipid signaling pathways. Arterioscler Thromb Vasc Biol 22 : 1990-1995.

B

• **Babiker A, Diczfalusy U.** (1998) Transport of side-chain oxidized oxysterols in the human circulation. Biochim Biophys Acta 1392: 333-339.

• **Balendran A, Casamayor A, Deak M, Paterson A, Gaffney P, Currie R, Downes CP, Alessi DR.** (1999) PDK1 acquires PDK2 activity in the presence of a synthetic peptide derived from the carboxyl terminus of PRK2. Curr Biol 9 : 393-404.

• **Baliga BC**, **Colussi PA**, **Read SH**, **Dias MM**, **Jans DA**, **Kumar S**. (2003) Role of prodomain in importin-mediated nuclear localization and activation of caspase-2. J Biol Chem 14: 4899-4905.

• **Ball RY, Carpenter KLH, Mitchinson MJ.** (1987) What is the significance of ceroid in human atherosclerosis ? Arch Pathol Lab Med 111: 1134-1140.

• **Ball RY**, **Carpenter KL**, **Mitchinson MJ**. (1988) Ceroid accumulation by murine peritoneal macrophages exposed to artificial lipoproteins: ultrastructural observations. Br J Exp Pathol. 69 : 43-56.

• **Bauvy C**, **Gane P**, **Arico S**, **Codogno P**, **Ogier-Denis E**. (2001) Autophagy delays sulindac sulfide-induced apoptosis in the human intestinal colon cancer cell line HT-29. Exp Cell Res 268 : 139-149.

• **Bedner E**, **Smolewski P**, **Amstad P**, **Darzynkiewicz Z**. (2000) Activation of caspases measured in situ by binding of fluorochrome-labeled inhibitors of caspases (FLICA): correlation with DNA fragmentation. Exp Cell Res 259 : 308-313.

• **Bennett M, Macdonald K, Chan SW, Luzio JP, Simari R, Weissberg P.** (1998) Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. Science 282: 290-293.

• **Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ.** (1995) Atherosclerosis: Basic Mechanisms. Oxidation, inflammation and genetics. Circulation 91: 2488-2496.

• **Berney C, Danuser G.** (2003) FRET or No FRET: A quantitative comparison. Biophys J 84: 3992-4010.

• **Berthier A**, **Lemaire-Ewing S**, **Prunet C**, **Monier S**, **Athias A**, **Bessede G**, **Pais de Barros JP**, **Laubriet A**, **Gambert P**, **Lizard G**, **Neel D**. (2004) Involvement of a calcium-dependent dephosphorylation of BAD associated with the localization of Trpc-1 within lipid rafts in 7-ketocholesterol-induced THP-1 cell apoptosis. Cell Death Differ 11: 897-905.

• **Berthier A**, **Lemaire-Ewing S**, **Prunet C**, **Montange T**, **Vejux A**, **Pais de Barros JP**, **Monier S**, **Gambert P**, **Lizard G**, **Neel D**. (2005) 7-Ketocholesterol-induced apoptosis. Involvement of several pro-apoptotic but also anti-apoptotic calcium-dependent transduction pathways. FEBS J 272: 3093-3104

• **Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D**. (2000) Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. Nat Cell Biol 2: 326-332.

• **Biasi F**, **Leonarduzzi G**, **Vizio B**, **Zanetti D**, **Sevanian A**, **Sottero B**, **Verde V**, **Zingaro B**, **Chiarpotto E**, **Poli G**. (2004) Oxysterol mixtures prevent proapoptotic effects of 7-ketocholesterol in macrophages: implications for proatherogenic gene modulation. FASEB J 18: 693-695.

• **Biederbick A, Kern HF, Elsasser HP**. (1995) Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. Eur J Cell Biol 66 : 3-14.

• **Birnbaum MJ, Clem RJ, Miller LK**. (1994) An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. J Virol 68 : 2521-2528.

• **Björkhem I, Andersson O, Diczfalusy U, Sevastik B, Xiu RJ, Duan C, Lund E.** (1994) Atherosclerosis and sterol 27-hydroxylase: evidence for a role of this enzyme in elimination of cholesterol from human macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A 91: 8592-8596.

• **Bjorkhem I, Lutjohann D, Diczfalusy U, Stahle L, Ahlborg G, Wahren J.** (1998) Cholesterol homeostasis in human brain: turnover of 24S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation. J Lipid Res 39: 1594-1600.

• **Björkhem I, Diczfaluzsy U.** (2002) Oxysterols. Friends, foes, or just fellow passengers ? Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol 22: 734-742.

• **Bobryshev YV**. (2006) Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis. Micron 37 : 208-222.

• **Bodin K, Bretillon L, Aden Y, Bertilsson L, Broome U, Einarsson C, Diczfalusy U.** (2001) Antiepileptic drugs increase plasma levels of 4beta-hydroxycholesterol in humans: evidence for involvement of cytochrome p450 3A4. J Biol Chem 276: 38685-38689.

• **Bogen S**, **Pak J, Garifallou M, Deng X, Muller WA.** (1994) Monoclonal antibody to murine PECAM-1 (CD31) blocks acute inflammation *in vivo.* J Exp Med 179: 1059-1064.

• **Bombeli T, Karsan A, Tait JF, Harlan JM.** (1997) Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. Blood 89: 2429-2442.

• **Boren J, Gustafsson M, Skalen K, Flood C, Innerarity TL.** (2000) Role of extracellular retention of low density lipoproteins in atherosclerosis. Curr Opin Lipidol 11: 451-456.

• **Borgia SL, Regehly M, Sivaramakrishnan R, Mehnert W, Korting HC, Danker K, Roder B, Kramer KD, Schafer-Korting M**. (2005) Lipid nanoparticles for skin penetration enhancement-correlation to drug localization within the particle matrix as determined by fluorescence and parelectric spectroscopy. J Control Release 110 : 151-163.

• **Boselli E, Velazco V, Caboni MF, Lercker G.** (2001) Pressurized liquid extraction of lipids for the determination of oxystérols in egg-containing food. J Chromatogr A 917: 239-244.

• **Brazil DP, Hemmings BA.** (2001) Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. TRENDS in Biochemical Sciences 26: 657-664.

• **Breuer O, Björkhem I.** (1990) Simultaneous quantification of several cholesterol autoxidation and monohydroxylation products by isotope-dilution mass spectrometry. Steroids 55: 185-192.

• **Brown MS, Dana SE, Goldstein JL**. (1975) Cholesterol ester formation in cultured human fibroblasts. Stimulation by oxygenated sterols. J Biol Chem 250: 4025-4027.

• **Brown AJ, Dean RT, Jessup W.** (1996) Free and esterified oxysterol: formation during copper-oxidation of low density lipoprotein and uptake by macrophages. J Lipid Res 37: 320-335.

• **Brown AJ, Jessup W**. (1999) Oxysterols and atherosclerosis. Atherosclerosis 142: 1-28.

• **Brown AJ**, **Mander EL**, **Gelissen IC**, **Kritharides L**, **Dean RT**, **Jessup W**. (2000) Cholesterol and oxysterol metabolism and subcellular distribution in macrophage foam cells. Accumulation of oxidized esters in lysosomes. J Lipid Res 41 : 226-237.

• **Brownawell AM**, **Kops GJ**, **Macara IG**, **Burgering BM**. (2001) Inhibition of nuclear import by protein kinase B (Akt) regulates the subcellular distribution and activity of the forkhead transcription factor AFX. Mol Cell Biol 21 : 3534-3546.

• **Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Diaz-Latoud C, Gurbuxani S, Arrigo AP, Kroemer G, Solary E, Garrido C.** (2000) Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. Nat Cell Biol 2 : 645-652.

• **Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME**. (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. Cell 96:857-868.

• **Bump NJ**, **Hackett M**, **Hugunin M**, **Seshagiri S**, **Brady K**, **Chen P**, **Ferenz C**, **Franklin S**, **Ghayur T**, **Li P**, et al. (1995) Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. Science 269 : 1885-1888.

• **Burlacu A**. (2003) Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. J Cell Mol Med 7 : 249-257.

• **Bursch W, Ellinger A, Gerner C, Frohwein U, Schulte-Hermann R.** (2000). Programmed cell death (PCD). Apoptosis, autophagic PCD, or others? Ann N Y Acad Sci 926**:**1-12.

• **Bursch W.** (2001). The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. Cell Death Differ 8:569-581.

• **Bursch W**. (2004) Multiple cell death programs: Charon's lifts to Hades. FEMS Yeast Res 5 : 101-110.

• **Buzzard KA, Giaccia AJ, Killender M, Anderson RL.** (1998) Heat shock protein 72 modulates pathways of stress-induced apoptosis. J Biol Chem 273(27):17147-53.

C

• **Calfon M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG, Ron D**. (2002) IRE1 couples endoplasmic réticulum load to secretory capacity by processing the *XBP-1* mRNA. Nature 415: 92-96.

• **Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC.** (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. Science 282: 1318-1321.

• **Carpenter KL, Taylor SE, Ballantine JA, Fussell B, Halliwell B, Mitchinson MJ.** (1993a) Lipids and oxidised lipids in human atheroma and normal aorta. Biochim Biophys Acta 1167: 121-130.

• **Carpenter CL, Auger KR, Chanudhuri M, Yoakim M, Schaffhausen B, Shoelson S, Cantley LC**. (1993b) Phosphoinositide 3-kinase is activated by phosphopeptides that bind to the SH2 domains of the 85-kDa subunit. J Biol chem. 268; 9478-9483.

• **Carpenter CL, Auger KR, Duckworth BC, Hou WM, Schaffhausen B, Cantley LC.** (1993c) A tightly associated serine/threonine protein kinase regulates phosphoinositides 3-kinase activity. Mol Cell Biol 13; 1657-1665.

• **Carpenter KL, Taylor SE, van der Veen C, Williamson BK, Ballantine JA, Mitchinson MJ.** (1995) Lipids and oxidised lipids in human atherosclerotic lesions at different stages of development. Biochim Biophys Acta 1256: 141-150.

• **Carson DA, Ribeiro JM.** (1993) Apoptosis and disease. Lancet 341 : 1251-1254.

• **Casamayor A**, **Morrice NA**, **Alessi DR**. (1999) Phosphorylation of Ser-241 is essential for the activity of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1: identification of five sites of phosphorylation in vivo. Biochem J 342 : 287-292.

• **Castelli WP.** (1988) Cholesterol and lipids in the risk of coronary artery disease--the Framingham Heart Study. Can J Cardiol 4: 5A-10A

• **Chai J, Du C, Wu JW, Kyin S, Wang X, Shi Y.** (2000) Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. Nature 406:855-862.

• **Chao DT, Korsmeyer SJ.** (1998) BCL-2 family: regulators of cell death. Annu Rev Immunol 16: 395-419.

• **Chang JY, Chavis JA, Liu LZ, Drew PD.** (1998) Cholesterol oxides induce programmed cell death in microglial cells. Biochem Biophys Res Com 249: 817-821.

• **Chang JY, Liu LZ.** (1998) Neurotoxicity of cholesterol oxides on cultured cerebellar granule cells. Neurochem Int 32: 317-323.

• **Chaudhary J, Bhattacharyya S, Das C**. (1992) Regulation of progesterone secretion in human syncytiotrophoblasts in culture by human chorionic gonadotropin. J Steroid Biochem Mol Biol 42: 425-432.

• **Chen J, Nagayama T, Jin K, Stetler RA, Zhu RL**, **Graham SH, Roger PS**. (1998) Induction of Caspase-3-Like Protease May Mediate Delayed Neuronal Death in the Hippocampus after Transient Cerebral Ischemia. J Neurosci 18 : 4914-4928.

• **Chen LB.** (1988) Mitochondrial membrane potential in living cells. Annu Rev Cell Biol 4 : 155-181.

• **Chen R, Kim O, Yang J, Sato K, Eisenmann KM, McCarthy J, Chen H, Qiu Y.** (2001) Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation. J Biol Chem 276: 31858-31862.

• **Cheng YW, Kang JJ, Shih YL, Lo YL, Wang CF**. (2005) Cholesterol-3-beta,5-alpha,6-beta-triol induced genotoxicity through reactive oxygen species formation. Food Chem Toxicol 43: 617-622.

• **Chiang JYL**. (1998). Regulation of bile acid synthesis. Front. Biosci. 3: D176-D193.

• **Chien MW, Chien CS, Hsiao LD, Lin CH, Yang CM.** (2003) OxLDL induces mitogen-activated protein kinase activation mediated via PI3-kinase/akt in vascular smooth muscle cells. J Lipid Res 44; 1667-1675.

• **Chisolm GM, Steinberg D.** (2000) The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. Free Radic Biol Med 28: 1815-1826.

• **Clare K, Hardwick SJ, Carpenter KL, Weeratunge N, Mitchinson MJ.** (1995) Toxicity of oxysterols to human monocyte-macrophages. Atherosclerosis 118: 67-75.

• **Clarke MCH, Figg N, Maguire JJ, Davenport AP, Goddard M, Littlewood TD, Bennett MR.** (2006) Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis. Nat Med 12 : 1075-1080.

• **Clement S**, **Tasinato A**, **Boscoboinik D**, **Azzi A**. (1996) The effect of alpha-tocopherol on the synthesis, phosphorylation and activity of protein kinase C in smooth muscle cells after phorbol 12-myristate 13-acetate down-regulation. Eur J Biochem 246 : 745-749.

• **Codogno P, Ogier-Denis E, Houri JJ.** (1997). Signal transduction pathways in macroautophagy. Cell Signal 9:125-30.

• **Coffer PJ, Woodgett JR**. (1991) Molecular cloning and characterization of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. Eur J Biochem 201: 475-481.

• **Costet P, Luo Y, Wang N, Tall AR.** (2000) Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the Liver X Receptor/ Retinoid X Receptor. J Biol Chem 275: 28240-28245.

• **Crackower MA, Oudit GY, Kozieradzki I, Sarao R, Sun H, Sasaki T, Hirsch E, Suzuki A, Shioi T, Irie-Sasaki J, Sah R, Cheng HY, Rybin VO, Lembo G, Fratta L, Oliveira-dos-Santos AJ, Benovic JL, Kahn CR, Izumo S, Steinberg SF, Wymann MP, Backx PH, Penninger JM.** (2002) Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3-K-PTEN signaling pathways. Cell 110: 737-749.

• **Crisby M, Nilsson J, Kostulas V, Bjorkhem I, Diczfalusy U.** (1997) Localization of sterol 27-hydroxylase immuno-reactivity in human atherosclerotic plaques. Biochim Biophys Acta 1344: 278-285.

• **Cullinan SB, Diehl JA.** (2004) PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following ER stress. J Biol Chem 279: 20108-20117.

• **Cummings BS, McHowat J, Schnellmann RG**. (2000) Phospholipase A(2)s in cell injury and death. J Pharmacol Exp Ther 294: 793-799.

• **Cunningham KS**, **Gotlieb AI**. (2005) The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. Lab Invest 85(1):9-23.

• **Cuthbert JA, Lipsky PE.** (1980) Sterol metabolism and lymphocyte function: inhibition of endogenous sterol biosynthesis does not prevent mitogen-induced human T lymphocyte activation. J Immuno 124: 2240-2246.

D

• **Dacheux D**, **Toussaint B**, **Richard M**, **Brochier G**, **Croize J**, **Attree I**. (2000) Pseudomonas aeruginosa cystic fibrosis isolates induce rapid, type III secretion-dependent, but ExoU-independent, oncosis of macrophages and polymorphonuclear neutrophils. Infect Immun 68:2916-2924.

• **Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F**. (1992) Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. Cytometry 13: 795-808.

• **Das S, Dixon JE, Cho W.** (2004) Membrane-binding and activation mechanism of PTEN. Proc natl Acad Sci USA 100: 7491-7496.

• **Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME**. (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. Cell 91:231-241.

• **Datta SR**, **Brunet A**, **Greenberg ME**. (1999) Cellular survival: a play in three Akts. Genes Dev. 13 : 2905-2927.

• **Dawson PA, Hofmann SL, Van der Westhuysen DR, Sudhof TC, Brown MS, Goldstein JL.** (1988) Sterol-dependent repression of low density lipoprotein receptor promoter mediated by 16-base pair sequence adjacent to binding site for transcription factor Sp1. J Biol Chem 263: 3372-3379.

• **Dean PJ, Groshart KD, Porterfield JG, Iansmith DH, Golden EB Jr**. (1987) Amiodarone-associated pulmonary toxicity. A clinical and pathologic study of eleven cases. Am J Clin Pathol 87 : 7-13.

• **De Camilli P, Emr SD, McPherson PS, Novick P.** (1996) Phosphoinositides as Regulators in Membrane Traffic. Science 271: 1533-1539.

• **Decaudin D, Castedo M, Nemati F, Beurdeley-Thomas A, De Pinieux G, Caron A, Pouillart P, Wijdenes J, Rouillard D, Kroemer G, Poupon MF.** (2002) Peripheral benzodiazepine receptor ligands reverse apoptosis resistance of cancer cells in vitro and in vivo. Cancer Res 62: 1388-1393.

• **Degterev A**, **Boyce M**, **Yuan J**. (2003) A decade of caspases. Oncogene 22 : 8543-8567.

• **Dejean LM, Martinez-Caballero S, Guo L, Hughes C, Teijido O, Ducret T, Ichas F, Korsmeyer SJ, Antonsson B, Jonas EA, Kinnally KW**. (2005) Oligomeric Bax is a component of the putative cytochrome c release channel MAC, mitochondrial apoptosis-induced channel. Mol Biol Cell 16 : 2424-2432.

• **de Jong D, Prins FA, Mason DY, Reed JC, van Ommen GB, Kluin PM.** (1994) Subcellular localization of the bcl-2 protein in malignant and normal lymphoid cells. Cancer Res 54: 256-260.

• **del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G.** (1997) Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. Science 278 : 687-689.

• **Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC**. (1997) X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. Nature 388 : 300-304.

• **Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen GS, Reed JC.** (1998) IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. Embo J 17: 2215-2223.

• **Diczfalusy U.** (2004) Analysis of cholesterol oxidation products in biological samples. J AOAC Int 87: 467-473.

• **Dini L, Lentini A, Diez GD, Rocha M, Falasca L, Serafino L, Vidal-Vanaclocha F.** (1995) Phagocytosis of apoptotic bodies by liver endothelial cells. J Cell Sci 108 : 967-973.

• **Doolittle GM, Chane TY.** (1982) Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase in Chinese hamster ovary cells. Enzyme activity determined after reconstitution in phospholipids/cholesterol liposomes. Biochim Biophys Acta 713: 529-537.

• **Dong ZM, Brown AA, Wagner DD**. (2000) Prominent role of P-selectin in the development of advanced atherosclerosis in ApoE-deficient mice. Circulation 101: 2290 - 2295

• **Doutheil J, Treiman M, Oschlies U, Paschen W**. (1999) Recovery of neuronal protein synthesis after irreversible inhibition of the endoplasmic réticulum calcium pump. Cell Calcium 25: 419-428.

• **Duckett CS, Nava VE, Gedrich RW, Clem RJ, Van Dongen JL, Gilfillan MC, Shiels H, Hardwick JM, Thompson CB.** (1996) A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. EMBO J 15 : 2685-2694.

• **Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, Segal RA, Kaplan DR, Greenberg ME**. (1997) Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. Science 275 : 661-665.

• **Dushkin M, Schwartz Y, Volsky N, Musatov M, Vereschagin E, Ragino J, Perminova O, Kozlov V.** (1998) Effects of oxysterols upon macrophage and lymphocyte functions in vitro. Prostaglandins Other Lipid Mediat 55: 219-236.

• **Dyer RG, Stewart MW, Mitcheson J, George K, Alberti MM, Laker MF**. (1997) 7-ketocholesterol, a specific indicator of lipoprotein oxidation, and malondialdehyde in noninsulin dependent diabetes and peripheral vascular disease. Clin. Chim. Acta 260: 1-13.

• **Dzeletovic S, Babiker A, Lund E, Diczfalusy U.** (1995a) Time course of oxysterol formation during in vitro oxidation of Low Density Lipoprotein. Chem Phys Lipids 78: 119-128.

• **Dzeletovic S, Breuer O, Lund E, Diczfalusy U.** (1995b) Determination of cholesterol oxidation products in human plasma by isotope dilution-mass spectrometry. Anal Biochem 225: 73-80.

E

• **Earnshaw WC**, **Martins LM**, **Kaufmann SH**. (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. Annu Rev Biochem 68 : 383-424.

• **Edwards PA, Tabor D, Kast HR, Venkateswaran A.** (2000) Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. Biochim Biophys Acta 1529: 103-113.

• **Edwards PA, Kennedy MA, Mak PA**. (2002) LXRs; oxystérols-activated nuclear receptors that regulate genes controlling lipid homeostasis. Vascul Pharmacol 38: 249-256.

• **Ekert PG, Silke J, Hawkins CJ, Verhagen AM, Vaux DL.** (2001) DIABLO promotes apoptosis by removing MIHA/XIAP from processed caspase 9. J Cell Biol 152: 483-490

• **Emanuel HA, Hassel CA, Addis PB, Bergmann SD, Zavoral JH.** (1991) Plasma cholesterol oxidation products (Oxysterols) in human subjects fed a meal rich in oxysterols. J Food Science 56: 843-847.

• **Emmerich J, Bruneval P.** (2000) L'athérosclérose. Editions John Libbey Eurotext.

• **Engel T**, **Lorkowski S**, **Lueken A**, **Rust S**, **Schluter B**, **Berger G**, **Cullen P**, **Assmann G**. (2001) The human ABCG4 gene is regulated by oxysterols and retinoids in monocyte-derived macrophages. Biochem Biophys Res Commun 288: 483-488.

• **Escobedo JA, Navankasattusas S, Kavanaugh WM, Milfay D, Fried VA, Williams LT.** (1991) cDNA cloning of a novel 85 kd protein that has SH2 domains and regulates binding of PI3-kinase to the PDGF beta-receptor. Cell 65: 75-82.

F

• **Faccio L, Fusco C, Chen A, Martinotti S, Bonventre JV, Zervos AS.** (2000) Characterization of a novel human serine protease that has extensive homology to bacterial heat shock endoprotease HtrA and is regulated by kidney ischemia. J Biol Chem 275: 2581-2588.

• **Fadok VA, Bratton DL, Frasch SC, Warner ML, Henson PM.** (1998) The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. Cell Death Differ 5 : 551-562.

• **Fan T, Lu H, Hu H, Shi L, McClarty GA, Nance DM, Greenberg AH, Zhong G.** (1998) Inhibition of apoptosis in Chlamydia-infected cells: blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. J Exp Med 187: 487-496.

• **Feng B, Yao PM, Li Y, Devlin CM, Zhang D, Harding HP, Sweeney M, Rong JX, Kuriakose G, Fisher A, Marks AR, Ron D, Tabas I.** (2003) The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. Nat Cell Biol 5: 781-792.

• **Feng Y, Hu J, Xie D, Qin J, Zhong Y, Li X, Xiao W, Wu J, Tao D, Zhang M, Zhu Y, Song Y, Reed E, Li QQ, Gong J**. (2005) Subcellular localization of caspase-3 activation correlates with changes in apoptotic morphology in MOLT-4 leukemia cells exposed to X-ray irradiation. Int J Oncol 27: 699-704.

• **Ferri KF, Kroemer G**. (2001) Mitochondria--the suicide organelles. Bioessays 23:111-115.

• **Fink SL**, **Cookson BT**. (2005) Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. Infect Immun 73: 1907-1916.

• **Flynn PD, Byrne CD, Baglin TP, Weissberg PL, Bennett MR.** (1997) Thrombin generation by apoptotic vascular SMCs. Blood 89: 4378-4384.

• **Folch J, Lees M, Stanley GHS.** (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animals tissues. J Biol chem. 226 : 497-509.

• **Formigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini GE, Capaccioli S, Orlandini SZ.** (2000). Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. J Cell Physiol 182:41-49.

• **Fowler S.** (1980) Characterization of foam cells in experimental atherosclerosis. Acta Med Scand Suppl 642 : 151-158.

• **Franke TF, Yang SI, Chan TO, Datta K, Kazlauskas A, Morrison DK, Kaplan DR, Tsichlis PN.** (1995) The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. Cell 81: 727-736.

• **Franke TF, Hornik CP, Segev L, Shostak GA, Sugimoto C**. (2003) PI3K/Akt and apoptosis: size matters. Oncogene 22 : 8983-8998

• **Fry MJ.** (2001) Phosphoinositide 3-kinase signalling in breast cancer: how big a role might it play? Breast Cancer Res 3: 304-312.

• **Fujita N, Sato S, Ishida A, Tsuruo T.** (2002) Involvement oh Hsp90 in signaling and stability of 3-phosphoinositide-dependent kinase-1. J Biol Chem 277; 10346-10353.

• **Fumagalli R, Galli G, Urna G.** (1971) Cholestanol and 26-hydroxycholesterol in normal and atherosclerotic human aorta. Life Sci II 10: 25-33.

• **Futter CE, Collinson LM, Backer JM, Hopkins CR.** (2001) Human VPS34 is required for internal vesicle formation within multivesicular endosomes. J Cell Biol 155: 1251-1264.

G

• **Garcia-Cruset S, Carpenter KL, Guardiola F, Mitchinson MJ.** (1999) Oxysterols in cap and core of human advanced atherosclerotic lesions. Free Radic Res 30: 341-350.

• **Gardner RG, Shearer AG, Hampton RY.** (2001) In vivo action of the HRD ubiquitin ligase complex: mechanisms of endoplasmic réticulum quality control and sterol regulation. Mol Cell Biol 21: 4276-4291.

• **Garrido C, Bruey JM, Fromentin A, Hammann A, Arrigo AP, Solary E.** (1999) HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of pro-caspase-9. FASEB J 13 : 2061-2070.

• **Garrido C**, **Galluzzi L**, **Brunet M**, **Puig PE**, **Didelot C**, **Kroemer G**. (2006) Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. Cell Death Differ 13 : 1423-1433.

• **Gaus K**, **Kritharides L**, **Schmitz G**, **Boettcher A**, **Drobnik W**, **Langmann T**, **Quinn CM**, **Death A**, **Dean RT**, **Jessup W**. (2004) Apolipoprotein A-1 interaction with plasma membrane lipid rafts controls cholesterol export from macrophages. FASEB J 18: 574-576.

• **Gelissen IC, Brown AJ, Mander EL, Kritharides L, Dean RT, Jessup W**. (1996) Sterol efflux is impaired from macrophage foam cells selectively enriched with 7-ketocholesterol. J Biol Chem 271 : 17852-17860.

• **Geng YJ, Libby P.** (1995) Evidence for apoptosis in advanced human atheroma. Colocalization with interleukin-1 beta-converting enzyme. Am J Pathol 147: 251-256.

• **Genicot G, Leroy JL, Soom AV, Donnay I** (2005) The use of a fluorescent dye, Nile red, to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes. Theriogenology 63 : 1181-1194.

• **Giddings JC.** (2005) Soluble adhesion molecules in inflammatory and vascular diseases. Biochem Soc Trans 33: 406-408.

• **Girao H, Shang F, Pereira P.** (2003) 7-ketocholesterol stimulates differentiation of lens epithelial cells. Mol Vis 9: 497-501.

• **Glantz SA, Parmley WW.** (1991) Passive smoking and heart disease: epidemiology, physiology and biochemistry. Circulation 83: 1-12.

• **Glass CK, Witztum JL.** (2001) Atherosclerosis: the road ahead. Cell 104: 503-516.

• **Grabarek J**, **Amstad P**, **Darzynkiewicz Z**. (2002) Use of fluorescently labeled caspase inhibitors as affinity labels to detect activated caspases. Hum Cell 15 : 1-12.

• **Green DR, Reed JC.** (1998) Mitochondria and apoptosis. Science 281: 1309-1312.

• **Greenspan P, Fowler SD.** (1985) Spectrofluorometric studies of the lipid probe, nile red. J Lipid Res 26: 781-789.

• **Greenspan P**, **Mayer EP**, **Fowler SD**. (1985) Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. J Cell Biol 100 : 965-973.

• **Gregorio-King CC, Gough T, Van Der Meer GJ, Hosking JB, Waugh CM, McLeod JL, Collier FM, Kirkland MA.** (2004) Mechanisms of resistance to the cytotoxic effects of oxysterols in human leukemic cells. J Steroid Biochem Mol Biol 88: 311-320.

• **Gross A, Jockel J, Wei MC, Korsmeyer SJ.** (1998) Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. EMBO J 17: 3878-3885.

• **Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ.** (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. Genes Dev 13 : 1899-1911.

• **Grundy JE, Downes KL.** (1993) Up-regulation of LFA-3 and ICAM-I on the surfaceof fibroblasts infected with cytomegalovirus. Immunology 78: 405-412.

• **Gruss, H J, Dower SK**. (1995) The TNF ligand superfamily and its relevance for human diseases. Cytokines Mol Ther 1: 75-105.

• **Guardiola F, Codony R, Addis PB, Rafecas M, Boatella J.** (1996) Biological effects of oxysterols: current status. Food Chem Toxicol 34: 193-211.

• **Guo Y, Srinivasula SM, Druilhe A, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES.** (2002) Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. J Biol Chem 277: 13430-13437.

H

• **Halstead BW, Zwickl CM, Morgan RE, Monteith DK, Thomas CE, Bowers RK, Berridge BR.** (2006) A clinical flow cytometric biomarker strategy: validation of peripheral leukocyte phospholipidosis using Nile red. J Appl Toxicol 26 : 169-177.

• **Hampton RY.** (2002) Proteolysis and sterol regulation. Annu Rev Cell Dev Biol 18: 345-378.

• **Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D.** (2000a) Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. Mol Cell 5:897-904.

• **Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D.** (2000b) Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. Mol Cell 6: 1099-1108.

• **Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calfon M, Sadri N, Yun C, Popko B, Paules R, Stojdl DF, Bell JC, Hettmann T, Leiden JM, Ron D.** (2003) An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. Mol Cell 11:619-633.

• **Hariri M, Millane G, Guimond MP, Guay G, Dennis JW, Nabi IR**. (2000) Biogenesis of multilamellar bodies via autophagy. Mol Biol Cell 11 : 255-268.

• **Hassall DG.** (1992) Three probe .ow cytometry of a human-foam cell forming macrophage. Cytometry 13 : 381-388.

• **Hassall DG, Graham A**. (1995) Changes in free cholesterol content, measured by filipin fuorescence and fow cytometry correlate with changes in cholesterol biosynthesis in THP-1 macrophages. Cytometry 21 : 352-362.

• **Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M.** (1997) Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. Nature 387: 296-299.

• **Hay BA, Wassarman DA, Rubin GM**. (1995) Drosophila homologs of baculovirus inhibitor of apoptosis proteins function to block cell death. Cell 83 : 1253-1262

• **Hayden JM, Brachova L, Higgins K, Obermiller L, Sevanian A, Khandrika S, Reaven PD.** (2002) Induction of monocyte differentiation and foam cell formation in vitro by 7-ketocholesterol. J Lipid Res 43: 26-35.

• **Haze K**, **Yoshida H**, **Yanagi H**, **Yura T**, **Mori K**. (1999) Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic réticulum stress. Mol Biol Cell 10: 3787-3799

• **Heiniger HJ, Marshall JD.** (1982) Cholesterol synthesis in polyclonally activated cytotoxic lymphocytes and its requirement for differentiation and proliferation. Proc Natl Acad Sci U S A 79: 3823-3827.

• **Helgason CD, Damen JE, Rosten P, Grewal R, Sorensen P, Chappel SM, Borowski A, Jirik F, Krystal G, Humphries RK.** (1998) Targeted disruption of SHIP leads to hemopoietic perturbations, lung pathology, and a shortened life span. Genes Dev 12: 1610-1620.

• **Hemmi H, Kitame F, Ishida N.** (1985) Inhibition of sterol and DNA syntheses in phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes by 7 alpha-hydroxycholesterol. Tohoku J Exp Med 145: 105-113.

• **Herman PK, Emr SD.** (1990) Characterization of VPS34, a gene required for vacuolar protein sorting and vacuole segregation in Saccharomyces cerevisiae. Mol Cell Biol 10: 6742-6754.

• **High S, Lecomte FJ, Russell SJ, Abell BM, Oliver JD**. (2000) Glycoprotein folding in the endoplasmic réticulum: a tale of three chaperones ? FEBS Lett 476: 38-41.

• **Hill MM, Feng J, Hemmings BA.** (2002) Identification of a plasma membrane raft-associated PKB Ser473 kinase activity that is distinct from ILK and PDK1. Curr Biol 12; 1251-1255.

• **Hiraoka M, Abe A, Lu Y, Yang K, Han X, Gross RW, Shayman JA**. (2006) Lysosomal Phospholipase A2 and Phospholipidosis. Mol Cell Bio 26: 6139-6148.

• **Hirsch E, Katanaev VL, Garlanda C, Azzolino O, Pirola L, Silengo L, Sozzani S, Mantovani A, Altruda F, Wymann MP.** (2000) Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. Science 287: 1049-1053.

• **Hitomi J, Katayama T, Eguchi Y, Kudo t, Taniguchi M, Koyama Y, Manabe T, Yamagishi S, Bando Y, Imaizumi K, Tsujimoto Y, Tohyama M.** (2004) Involvement of caspase-4 in endoplasmic réticulum stress-induced apoptosis and A{beta}-induced cell death. J Cell Biol 165: 347-356.

• **Hlobilková A, Knillová J, Bártek J, Lukás J, Kolái Z.** (2003) The mechanism of action of the tumor suppressor gene PTEN. Biomed Papers 147: 19-25.

• **Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ.** (1990) Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. Nature 348: 334-336.

• **Hocquet D**, **Vogne C**, **El Garch F**, **Vejux A**, **Gotoh N**, **Lee A**, **Lomovskaya O**, **Plesiat P**. (2003) MexXY-OprM efflux pump is necessary for a adaptive resistance of Pseudomonas aeruginosa to aminoglycosides. Antimicrob Agents Chemother 47: 1371-1375.

• **Honda A, Yoshida T, Tanaka N, Matsuzaki Y, He B, Shoda J, Osuga T.** (1995) Accumulation of 7 alpha-hydroxycholesterol in liver tissue of patients with cholesterol gallstones. J Gastroenterol 30: 651-656.

• **Honegger UE, Scuntaro I, Wiesmann UN.** (1995) Vitamin E reduces accumulation of amiodarone and desethylamiodarone and inhibits phospholipidosis in cultured human cells. Biochem Pharmacol 49 : 1741-1745.

• **Hostetler KY**, **Reasor M**, **Yazaki PJ**. (1985) Chloroquine-induced phospholipid fatty liver. Measurement of drug and lipid concentrations in rat liver lysosomes. J Biol Chem. 260 : 215-219

• **Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ.** (1997) Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. Proc Natl Acad Sci 94: 3668-3672.

• **Hu Y, Benedict MA, Wu D, Inohara N, Nunez G.** (1998) Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 4386-4391.

• **Huang AJ, Manning JE, Bandak TM, Ratau MC, Hanser KR, Silverstein SC**. (1993) Endothelial cell cytosolic free calcium regulates neutrophil migration across monolayers of endothelial cells. J Cell Biol 120: 1371-1380.

• **Huber J, Vales A, Mitulovic G, Blumer M, Schmid R, Witztum JL, Binder BR, Leitinger N.** (2002) Oxidized membrane vesicles and blebs from apoptotic cells contain biologically active oxidized phospholipids that induce monocyte-endothelial interactions. Arterioscler Thromb Vasc Biol 22: 101-107.

• **Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E.** (1998) Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. JAMA 280: 605-613.

• **Huo Y, Ley K**. (2001) Adhesion molecules and atherogenesis. Acta Physiol Scand 173: 35-43.

• **Hwang KM, Yang LC, Carrico CK, Schulz RA, Schenkman JB, Sartorelli AC**. (1974) Production of membrane whorls in rat liver by some inhibitors of protein synthesis. J Cell Biol. 62 : 20-31.

I

• **Iiyama K, Hajra L, Liyama M, Li H, DiChiara M, Medoff BD, Cybulsky MI**. (1999) Pattern of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. Circ Res 85: 199-207.

• **Imanishi T, Han DK, Hofstra L, Hano T, Nishio I, Liles WC, Gown AM, Schwartz SM, Han DK, Gorden AM.** (2002) Apoptosis of vascular smooth muscle cells is induced by Fas ligand derived from monocytes/macrophages. Atherosclerosis 161: 143-151.

• **Inohara N, Koseki T, Hu Y, Chen S, Nunez G.** (1997) CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A 94 : 10717-22.

• **Inukai K, Funaki M, Ogihara T, Katagiri H, Kanda A, Anai M, Fukushima Y, Hosaka T, Suzuki M, Shin BC, Takata K, Yazaki Y, Kikuchi M, Oka Y, Asano T.** (1997) p85alpha gene generates three isoforms of regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-Kinase), p50alpha, p55alpha, and p85alpha, with different PI 3-kinase activity elevating responses to insulin. J Biol Chem 272: 7873-7882.

• **Irmler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J.** (1997) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. Nature 388 : 190-195.

• **Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, Yamamoto M.** (1999) Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2through binding to the amino-terminal Nch2 domain. Genes Dev 13: 76-86.

• **Itoh T, Takenawa T**. (2002) Phosphoinositide-binding domains: Functional units for temporal and spatial regulation of intracellular signalling. Cell Signal 14: 733-743.

J

• **James SR, Downes CP, Gigg R, Grove SJA, Holmes AB, Alessi DR.** (1996) Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate without subsequent activation. Biochem J 315; 709-713.

•**Janowski BA, Grogan MJ, Jones SA, Wisely GB, Kliewer SA, Corey EJ, Mangelsdorf DJ.** (1999) Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 266-271.

• **Javitt NB, Kok E, Burstein S, Cohen B, Kutscher J.** (1981) 26-hydroxycholesterol. Identification and quantification in human serum. J Biol Chem 256: 12644-12646.

• **Johansson M, Bocher V, Lehto M, Chinetti G, Kuismanen E, Ehnholm C, Staels B, Olkkonen VM.** (2003) The Two variants of oxysterol binding protein-related protein-1 display different tissue expression patterns, have different intracellular localization, and are functionally distinct. Mol Biol Cell 14: 903-915.

• **Jonas A.** (2000) Lecithin cholesterol acyltransferase. Biochim Bioph Acta 1529: 245-256.

K

• **Kabeya Y**, **Mizushima N**, **Ueno T**, **Yamamoto A**, **Kirisako T**, **Noda T**, **Kominami E**, **Ohsumi Y**, **Yoshimori T**. (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. EMBO J 19:5720-5728.

• **Kahn E, Lizard G, Frouin F, Roignot P, Chardonnet Y, Di Paola R**. (1997) Laser scanning confocal microscopy and factor analysis of biomedical image sequences (FAMIS) to detect and characterise HPV DNA sequences by FISH in HeLa cells. Cytometry 28:269-279.

• **Kahn E, Lizard G, Pelegrini M, Frouin F, Roignot P, Chardonnet Y, Di Paola R**. (1999) Four-dimensional factor analysis of confocal image sequences (4D-FAMIS) to detect and characterize low copy numbers of human papillomavirus DNA by FISH in HeLa and SiHa cells. J Microsc. 193:227-243.

• **Kahn E.** (2001) Confocal microscopy : characterization of fluorescent tracers by image processing of optical sections. Pathol Biol 49 : 194-198.

• **Kahn E**, **Vejux A**, **Dumas D**, **Montange T**, **Frouin F**, **Robert V**, **Riedinger JM**, **Stoltz JF**, **Gambert P**, **Todd-Pokropek A**, **Lizard G**. (2004) FRET multiphoton spectral imaging microscopy of 7-ketocholesterol and Nile Red in U937 monocytic cells loaded with 7-ketocholesterol. Anal Quant Cytol Histol 26:304-313.

• **Kam CM, Hudig D, Powers JC.** (2000) Granzymes (lymphocyte serine proteases): characterization with natural and synthetic substrates and inhibitors. Biochim Biophys Acta 1477: 307-323.

• **Kandel ES, Hay N.** (1999) The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. Exp Cell Res 253; 210-229.

• **Kannel WB, Castelli WP, Gordon T, McNamara PM.** (1971) Serum cholesterol, lipoproteins, and the risk of coronary heart disease. The Framingham study. Ann Intern Med 74: 1-12.

• **Kannel WB, McGee DL**. (1979) Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. JAMA 241: 2035-2038.

• **Kasof GM**, **Gomes BC**. (2001) Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. J Biol Chem 276 : 3238-3246

• **Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J, Waterfield MD.** (2001) Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. Annu Rev Cell Dev Biol 17:615-675.

• **Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG.** (1993) Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. Cancer Res 53 : 3976-3985.

• **Kaufmann M, Bozic D, Briand C, Bodmer JL, Zerbe O, Kohl A, Tschopp J, Grutter MG**. (2002) Identification of a basic surface area of the FADD death effector domain critical for apoptotic signaling. FEBS Lett 527 : 250-254.

• **Kawana K, Ikuta T, Kobayashi Y, Gotoh O, Takeda K, Kawajiri K.** (2003) Molecular mechanism of nuclear translocation of an orphan nuclear receptor, SXR. Mol Pharmacol 63: 524-531.

• **Kelekar A, Thompson CB**. (1998) Bcl-2 family proteins: the role of BH3 domain in apoptosis. Trends Cell Biol 8: 324-330.

• **Kempna P, Reiter E, Arock M, Azzi A, Zingg JM**. (2004) Inhibition of HMC-1 mast cell proliferation by vitamin E: involvement of the protein kinase B pathway. J Biol Chem. 279 : 50700-50709.

• **Kennedy MA, Barrera GC, Nakamura K, Baldan A, Tarr P, Fishbein MC, Frank J, Francone OL, Edwards PA.** (2005) ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. Cell Metab 1: 121-131.

• **Kerr, J. F.** 1965. A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. J Pathol Bacteriol 90: 419-435.

• **Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR.** (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenom with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 26: 239-257.

• **Kha HT, Basseri B, Shouhed D, Richardson J, Tetradis S, Hahn TJ, Parhami F.** (2004) Oxysterols regulate differentiation of mesenchymal stem cells: pro-bone and anti-fat. J Bone Miner Res 19: 830-840.

• **Khwaja A, Rodriguez-Viciana P, Wennstrom S, Warne PH, Downward J.** (1997) Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. EMBO J 16: 2783-2793.

• **Kihara A, Noda T, Ishihara N, Ohsumi Y.** (2001) Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. J Cell Biol 152: 519-530.

• **Kim J**, **Huang WP**, **Klionsky DJ**. (2001) Membrane recruitment of Aut7p in the autophagy and cytoplasm to vacuole targeting pathways requires Aut1p, Aut2p, and the autophagy conjugation complex. J Cell Biol 152 : 51-64.

• **Kim J**, **Klionsky DJ**. (2000) Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. Annu Rev Biochem 69: 303-342.

• **Kimura K**, **Yamaoka M**, **Kamisaka Y**. (2004) Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile red fluorescence. J Microbiol Methods 56 : 331-338.

• **Kischkel FC**, **Hellbardt S**, **Behrmann I**, **Germer M**, **Pawlita M**, **Krammer PH**, **Peter ME**. (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. EMBO J 14 : 5579-5588.

• **Klinkner AM**, **Waites CR**, **Kerns WD**, **Bugelski PJ**. (1995) Evidence of foam cell and cholesterol crystal formation in macrophages incubated with oxidized LDL by fluorescence and electron microscopy. J Histochem Cytochem 43: 1071-1078

• **Klinkner AM, Bugelski PJ, Waites CR, Louden C, Hart TK, Kerns WD**. (1997) A novel technique for mapping the lipid composition of atherosclerotic fatty streaks by en face fluorescence microscopy. J Histochem Cytochem 45: 743-753.

• **Klionsky DJ, Emr SD.** (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. Science 290:1717-1721

• **Klionsky DJ.** (2005) The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. J Cell Sci 118: 7-18.

• **Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD.** (1997) The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. Science 275:1132-1136.

• **Kockx MM, Herman AG.** (1998) Apoptosis in atherogenesis: implications for plaque destabilization. Eur Heart J 19: G23-G28.

• **Kockx MM, Herman AG.** (2000) Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental ? Cardiovasc Research 45: 736-746.

• **Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth RA.** (1996) Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. J Biol Chem 271: 31372-31378.

• **Koldamova RP**, **Lefterov IM**, **Ikonomovic MD**, **Skoko J**, **Lefterov PI**, **Isanski BA**, **DeKosky ST**, **Lazo JS**. (2003) 22R-hydroxycholesterol and 9-cis-retinoic acid induce ATP-binding cassette transporter A1 expression and cholesterol efflux in brain cells and decrease amyloid beta secretion. J Biol Chem 278 : 13244-13256

• **Kölsch H, Lütjohann D, Tulke A, Björkhem I, Rao ML.** (1999) The neurotoxicic effect of 24-hydroxycholesterol on SH-SY5Y human neuroblastoma cells. Brain res 818: 171-175.

• **Kölsch H, Ludwig M, Lütjohann D, Prange W, Rao ML.** (2000) 7α-hydroperoxycholesterol causes CNS neuronal cell death. Neurochem Int 36: 507-512.

• **Komiyama T, Ray CA, Pickup DJ, Howard AD, Thornberry NA, Peterson EP, Salvesen G.** (1994) Inhibition of interleukin-1 beta converting enzyme by the cowpox virus serpin CrmA. An example of cross-class inhibition. J Biol Chem 269 : 19331-19337.

• **Komuves LG, Schmuth M, Fowler AJ, Elias PM, Hanley K, Man MQ, Moser AH, Lobaccaro JM, Williams ML, Mangelsdorf DJ, Feingold KR.** (2002) Oxysterol stimulation of epidermal differentiation is mediated by liver X receptor-beta in murine epidermis. J Invest Dermatol 118: 25-34.

• **Konishi H, Yamauchi E, Taniguchi H, Yamamoto T, Matsuzaki H, Takemura Y, Ohmae K, Kikkawa U, Nishizuka Y.** (2001) Phosphorylation sites of protein kinase C delta in H2O2-treated cells and its activation by tyrosine kinase in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A. 98 : 6587-6592.

• **Krieger M.** (2001) Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. J Clin Invest 108: 793-797.

• **Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssiere JL, Mignotte B.** (1995) The biochemistry of programmed cell death. Faseb J 9: 1277-1287.

• **Kroemer G, Zamzami N, Susin SA**. (1997) Mitochondrial control of apoptosis. Immunol Today 18: 44-51.

• **Krugmann S, Hawkins PT, Pryer N, Braselmann S**. (1999) Characterizing the interactions between the two subunits of the p101/p110gamma phosphoinositide 3-kinase and their role in the activation of this enzyme by G beta gamma subunits. J Biol Chem 274 : 17152-17158.

• **Krut LH, Yang JW, Schonfeld G, Ostlund RE.** (1997) The effect of oxidizing cholesterol on gastrointestinal absorption, plasma clearance, tissue distribution, and processing by endothelial cells. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 17: 778-785.

• **Kucuk O, Stoner-Picking J, Yachnin S, Gordon LI, Williams RM, Lis LJ, Westerman MP.** (1992) Inhibition of NK cell-mediated cytotoxicity by oxysterols. Cell Immunol 139: 541-549.

• **Kucuk O, Stoner-Picking J, Yachnin S, Gordon LI, Williams RM, Lis LJ, Westerman MP.** (1994) Inhibition of cytolytic T lymphocyte activity by oxysterols. Lipids 29: 657-660.

• **Kudo K, Emmons GT, Casserly EW, Via DP, Smith LC, St Pyrek J, Schroepfer GJ Jr.** (1989) Inhibitors of sterol synthesis. Chromatography of acetate derivatives of oxygenated sterols. J Lipid Res 30: 1097-1111.

• **Kumar A, Commane M, Flickinger TW, Horvath CM, Stark GR.** (1997) Defective TNF-α-Induced Apoptosis in STAT1-Null Cells Due to Low Constitutive Levels of Caspases. Science 278: 1630-1632.

• **Kume N**, **Cybulsky MI**, **Gimbrone MA Jr**. (1992) Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. J Clin Invest 90 : 1138-1144.

• **Kummerow FA, Mahfouz MM, Zhou Q, Cook LS**. (2006) 27-hydroxycholesterol causes remodeling in endothelial cell membrane lipid composition comparable to remodeling in the failed vein grafts of CABG patients. Life Sci 78: 958-963.

• **Kushuhara H, Shimada O, Inui J.** (1992) Effect of 25-hydroxycholesterol on cholesterol ester formation in Caco-2 cells. Lipids 27: 478-480.

L

• **Laffitte BA, Joseph SB, Chen M, Castrillo A, Repa J, Wilpitz D, Mangelsdorf D, Tontonoz P.** (2003) The phospholipid transfer protein gene is a liver X receptor target expressed by macrophages in atherosclerotic lesions. Mol Cel Biol 23: 2182-2191.

• **Lagace TA, Byers DM, Cook HW, Ridgway ND.** (1997) Altered regulation of cholesterol and cholesteryl ester synthesis in Chinese-hamster ovary cells overexpressing the oxysterol-binding protein is dependent on the pleckstrin homology domain. Biochem J 326: 205-213.

• **Lagarkova MA, Iarovaia OV, Razin SV.** (1995) Large-scale fragmentation of mammalian DNA in the course of apoptosis proceeds via excision of chromosomal DNA loops and their oligomers. J Biol Chem 270 : 20239-20241.

• **Lahoua Z, Astruc ME, Crastes de Paulet A.** (1988) Serum-induced arachidonic acid release and prostaglandin biosynthesis are potentiated by oxygenated sterols in NRK 49F cells. Biochim Biophys Acta 958: 396-404.

• **Lahoua Z, Vial H, Michel F, Crastes de Paulet A, Astruc ME.** (1991) Oxysterol activation of arachidonic acid release and prostaglandin E2 biosynthesis in NRK 49F cells is partially dependent on protein kinase C activity. Cell Signal 3: 559-567.

• **Laitinen S, Lehto M, Lehtonen S, Hyvärinen K, Heino S, Lehtonen E, Ehnholm C, Ikonen E, Olkkonen VM.** (2002) ORP2, a homolog oxysterol binding protein, regulates cellular cholesterol metabolism. J Lipid Res 43: 245-255.

• **Lala DS, Syka PM, Lazarchik SB, Mangelsdorf DJ, Parker KL, Heyman RA.** (1997) Activation of the orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1 by oxysterols. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 4895-4900.

• **Lammert F, Wang DQH.** (2005) New insights into the gentic regulation of intestinal cholesterol absorption. Gastroenterology, 129: 718-734.

• **Landmann L**. (1986) Epidermal permeability barrier: transformation of lamellar granule-disks into intercellular sheets by a membrane-fusion process, a freeze-fracture study. J Invest Dermatol 87 : 202-209.

• **Lee TS, Chau LY.** (2001) Fas/Fas ligand-mediated death pathway is involved in oxLDL-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells. Am J Physiol Cell Physiol 280: C709-C718.

• **Lee K, Tirasophon W, Shen X, Michalak M, Prywes R, Okada T, Yoshida H, Mori K, Kaufman RJ.** (2002) IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. Genes Dev 16:452-466.

• **Lee JM, Calkins MJ, Chan K, Kan YW, Johnson JA.** (2003) Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. J Biol Chem 278: 12029-12038.

• **Lee HS**, **Chang JS**, **Baek JA**, **Chung MY**, **Lee HC**, **Rhim BY**, **Sok DE**, **Rho MC**, **Kim YK**, **Kim K**. (2005) TNF-alpha activates death pathway in human aorta smooth muscle cell in the presence of 7-ketocholesterol. Biochem Biophys Res Commun 333: 1093-1099.

• **Lee CS**, **Joe EH**, **Jou I**. (2006) Oxysterols suppress inducible nitric oxide synthase expression in lipopolysaccharide-stimulated astrocytes through liver X receptor. Neuroreport 17: 183-187.

• **Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, Smith-Oliver TA, Oliver BB, Su JL, Sundseth SS, Winegar DA, Blanchard DE, Spencer TA, Willson TM.** (1997). Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. J Biol Chem 272: 3137-3140

• **Lehto M**, **Laitinen S**, **Chinetti G**, **Johansson M**, **Ehnholm C**, **Staels B**, **Ikonen E**, **Olkkonen VM**. (2001) The OSBP-related protein family in humans. J Lipid Res 42 : 1203-1213.

• **Lehto M, Olkkonen VM.** (2003) The OSBP-related proteins: novel protein family involved in vesicle transport, cellular lipid metabolism, and cell signaling. Biochim Biophys Acta 1631: 1-11.

• **Lemaire S, Lizard G, Monier S, Miguet C, Gueldry S, Volot F, Gambert P, Neel D.** (1998). Different patterns of IL-1beta secretion, adhesion molecule expression and apoptosis induction in human endothelial cells treated with 7alpha- , 7beta-hydroxycholesterol, or 7-ketocholesterol. FEBS Lett 440: 434-439.

• **Lemaire-Ewing S, Prunet C, Montange T, Vejux A, Berthier A, Bessède G, Corcos L, Gambert P, Néel D, Lizard G.** (2005) Comparison of the cytotoxic, pro-oxydant and pro-inflammatory characteristics of different oxysterols. Cell Biol Toxicol 21 : 97-114.

• **Leonarduzzi G**, **Sevanian A**, **Sottero B**, **Arkan MC**, **Biasi F**, **Chiarpotto E**, **Basaga H**, **Poli G**. (2001) Up-regulation of the fibrogenic cytokine TGF-beta1 by oxysterols: a mechanistic link between cholesterol and atherosclerosis. FASEB J 15: 1619-1621.

• **Leonarduzzi G, Sottero B, Poli G.** (2002) Oxidized products of cholesterol: dietary and metabolic origin, and proatherosclerotic effects. J. Nutr. Biochem. 13: 700-710.

• **Leonarduzzi G**, **Biasi F**, **Chiarpotto E**, **Poli G**. (2004) Trojan horse-like behavior of a biologically representative mixture of oxysterols. Mol Aspects Med 25: 155-167.

• **Leonarduzzi G, Gamba P, Sottero B, Kadl A, Robbesyn F, Calogero RA, Biasi F, Chiarpotto E, Leitinger N, Sevanian A, Poli G.** (2005) Oxysterol-induced up-regulation of MCP-1 expression and synthesis in macrophage cells. Free Radic Biol Med 39: 1152-1161.

• **Leonarduzzi G, Vizio B, Sottero B, Verde V, Gamba P, Mascia C, Chiarpotto E, Poli G, Biasi F.** (2006) Early involvement of ROS overproduction in apoptosis induced by 7-ketocholesterol. Antioxid Redox Signal 8 : 375-380.

• **Lesauskaitė V, Ivanovienė L, Valančiūtė A.** (2003) Programmed cellular death and atherogenesis: from molecular mechanisms to clinical aspects. Medicina 39: e353-e358.

• **Levine TP, Munro S.** (1998) The pleckstrin homology domain of oxysterol-binding protein recognises a determinant specific to Golgi membranes. Curr Biol 8: 729-739.

• **Levine TP, Munro S.** (2002) Targeting of Golgi-specific pleckstrin homology domains involves both PtdIns 4-kinase-dependent and –independent components. Curr Biol 12: 695-704.

• **Li H, Zhu H, Xu C, Yuan J**. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in th Fas pathway of apoptosis. Cell 94: 491-501.

• **Li D, Spencer TA.** (2000). Synthesis of 7α-hydroxy derivatives of regulatory oxysterols. Steroids 65: 529-535.

• **Li CY, Lee JS, Ko YG, Kim JI, Seo JS.** (2000) Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. J Biol Chem 275 : 25665-25671.

• **Li XA, Everson WV, Smart EJ.** (2005) Caveolae, lipid rafts, and vascular disease. Trends Cardiovasc Med. 15 : 92-96.

• **Liang XH**, **Jackson S**, **Seaman M**, **Brown K**, **Kempkes B**, **Hibshoosh H**, **Levine B**. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. Nature 402: 672-676.

• **Libby P, Geng YJ, Aikawa M, Schoenbeck U, Mach F, Clinton SK, Sukhova GK, Lee RT.** (1996) Macrophage and atherosclerotic plaque stability. Curr Opin Lipidol 7: 330-335.

• **Libby P**. (2002) Inflammation in atherosclerosis. Nature 420: 868-874.

• **Lichtenstein AH, Brecher P**. (1983) Esterification of cholesterol and 25-hydroxycholesterol by rat liver microsomes. Biochim Biophys Acta 751: 340-348.

• **Liliental J, Moon SY, Lesche R, Mamillapalli R, Li D, Zheng Y, Sun H, Wu H.** (2000) Genetic deletion of the Pten tumor suppressor gene promotes cell motility by activation of Rac1 and Cdc42 GTPases. Curr Biol 10: 401-404.

• **Lim HK, Kang HK, Yoo ES, Kim NJ, Kim YW, Cho M, Lee JH, Lee YS, Chung MH, Hyun JW.** (2003) Oxysterols induce apoptosis and accumulation of cell cycle at G_2/M phase in the human monocytic THP-1 cell line. Life Sci 72: 1389-1399.

• **Lin CY, Morel DW**. (1995). Distribution of oxysterols in human serum characterization of 25-hydroxycholesterol association with serum albumin. J Nutr Biochem 6: 618-625.

• **Lin CY, Morel DW.** (1996) Esterification of oxysterols in human serum: effects on distribution and cellular uptake. J Lipid Res 37: 168-178.

• **Listenberger LL, Schaffer JE.** (2002) Mechanisms of lipoapotosis: implications for human heart disease. Trends Cardiovasc Med 12: 134-138.

• **Liston P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton-Horvat G, Farahani R, McLean M, lkeda JE, Mackenzie A, Korneluk RG.** (1996) Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. Nature 379 : 349-353.

• **Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X.** (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. Cell 86:147-157.

• **Liu X**, **Schnellmann RG**. (2003) Calpain mediates progressive plasma membrane permeability and proteolysis of cytoskeleton-associated paxillin, talin, and vinculin during renal cell death. J Pharmacol Exp Ther 304: 63-70.

• **Liu X**, **Van Vleet T**, **Schnellmann RG**. (2004) The role of calpain in oncotic cell death. Annu Rev Pharmacol Toxicol 44: 349-370.

• **Lizard G., Deckert V, Dubrez L, Moisant M, Gambert P, Lagrost L.** (1996) Induction of apoptosis in endothelial cells treated with cholesterol oxides. Am J Pathol 148:1625-1638.

• **Lizard G, Moisant M, Cordelet C, Monier S, Gambert P, Lagrost L.** (1997) Induction of similar features of apoptosis in human and bovine vascular endothelial cells treated by 7-ketocholesterol. J Pathol 183**:**330-338.

• **Lizard G, Monier S, Cordelet C, Gesquiere L, Deckert V, Gueldry S, Lagrost L, Gambert P.** (1999) Characterization and comparison of the mode of cell death, apoptosis versus necrosis, induced by 7beta-hydroxycholesterol and 7- ketocholesterol in the cells of the vascular wall. Arterioscler Thromb Vasc Biol 19**:**1190-1200.

• **Logette E, Le Jossic-Corcos C, Masson D, Solier S, Sequeira-Legrand A, Dugail I, Lemaire-Ewing S, Desoche L, Solary E, Corcos L.** (2005) Caspase-2, a novel lipid sensor under the control of sterol regulatory element binding protein 2. Mol Cell Biol 21: 9621-9631.

• **Lovering R, Hanson IM, Borden KL, Martin S, O'Reilly NJ, Evan GI, Rahman D, Pappin DJ, Trowsdale J, Freemont PS.** (1993) Identification and preliminary characterization of a protein motif related to the zinc finger. Proc Natl Acad Sci USA 90 : 2112-2116.

• **Lucy, JA**. (1978) Structural interactions between vitamin E and polyunsaturated lipids. World Rev Nutr Diet. 31:184-189.

• **Lund EG, Kerr TA, Sakai J, Li W-P, Russell DW.** (1998). cDNA cloning of mouse and human cholesterol 25-hydroxylases, polytopic membrane proteins that synthesize a potent oxystérol regulator of lipid metabolism. J. Biol. Chem. 273: 34316-34327.

• **Lund EG, Guileyrardo JM, Russell DW**. (1999). cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 7238-7243.

• **Luo Y, Tall AR**. (2000) Sterol upregulation of human CETP expression in vitro and in transgenic mice by an LXr element. J Clin Invest 105: 513-520.

• **Lutjohann D, Breuer O, Ahlborg G, Nennesmo I, Siden A, Diczfalusy U, Bjorkhem I.** (1996) Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 9799-9804.

M

• **Ma Y, Brewer JW, Diehl JA, Hendershot LM.** (2002) Two Distinct Stress Signaling Pathways Converge Upon the CHOP Promoter During the Mammalian Unfolded Protein Response. J Mol Biol 318:1351-1365.

• **Majno G, Joris I.** (1995) Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. Am J Pathol 146: 3-15.

• **Makishima M.** (2005) Nuclear receptors as targets for drug development: regulation of cholesterol and bile acid metabolism by nuclear receptors. J Pharmacol Sci 97: 177-183.

• **Malinow MR.** (1994) Homocyst(e)ine and arterial occlusive diseases. J Intern Med 236: 603-617.

• **Mallat Z, Tedgui A.** (2000) Apoptosis in the vasculature: mechanisms and functional importance. Br J Pharmacol 130: 947-962.

• **Mallat Z, Ait-Oufella H, Tedgui A**. (2005) Regulatory T cell responses: potential role in the control of atherosclerosis. Curr Opin Lipidol 16: 518-524.

• **Malvitte L, Montange T, Joffre C, Vejux A, Maïza C, Bron A, Creuzot-Garcher C, Lizard G.** (2006) Analogies entre processus athéromateux et dégénérescence maculaire liée à l'âge : rôles présumés des oxystérols. J Fr Ophtalmol 29 : 570-578.

• **Mancini M**, **Machamer CE**, **Roy S**, **Nicholson DW**, **Thornberry NA**, **Casciola-Rosen LA**, **Rosen A**. (2000) Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves Golgin-160 during apoptosis. J Cell Biol 149: 603-612.

• **Maor I, Mandel H, Aviram M.** (1995) Macrophage uptake of oxidized LDL inhibits lysosomal sphingomyelinase, thus causing the accumulation of unesterified cholesterol-sphingomyelin-rich particles in the lysosomes. A possible role for 7-Ketocholesterol. Arterioscler Thromb Vasc Biol 15 : 1378-1387.

• **Marmy Conus N, Hannan KM, Cristiano BE, Hemmings BA, Pearson RB.** (2002) Direct identification of tyrosine 474 as a regulatory phosphorylation site for the Akt protein kinase. J Biol Chem 277; 38021-38028.

• **Marsters SA, Pitti RM, Donahue CJ, Ruppert S, Bauer KD, Ashkenazi A.** (1996) Activation of apoptosis by Apo-2 ligand is independent of FADD but blocked by CrmA. Curr Biol 6: 750-752.

• **Martin WJ 2d, Kachel DL, Vilen T, Natarajan V.** (1989) Mechanism of phospholipidosis in amiodarone pulmonary toxicity. J. Pharmacol Exp Ther 251: 272-278.

• **Martens JS, Reiner NE, Herrera-Velit P, Steinbrecher UP.** (1998) Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in the induction of macrophage growth by oxidized low density lipoprotein. J Biol Chem 273: 4915-4920.

• **Martinet W, De Bie M, Schrijvers DM, De Meyer GR, Herman AG, Kockx MM.** (2004) 7-ketocholesterol induces protein ubiquitination, myelin Figure formation, and light chain 3 processing in vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 24: 2296-2301.

• **Martinou JC, Desagher S, Antonsson B.** (2000) Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing. Nat Cell Biol 2: E41-E43.

• **Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jurgensmeier JM, Susin SA, Vieira HL, Prevost MC, Xie Z, Matsuyama S, Reed JC, Kroemer G.** (1998) Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. Science 281: 2027-2031.

• **Massey JB.** (2006) Membrane and protein interactions of oxysterols. Curr Opin Lipidol. 17 : 296-301.

• **Massey JB, Pownall HJ**. (2005) The polar nature of 7-ketocholesterol determines its location within membrane domains and the kinetics of membrane microsolubilization by apolipoprotein A-I. Biochemistry 44: 10423-10433.

• **Matsuda A, Suzuki Y, Kondo K, Ikeda Y, Umemura K.** (2002) Hypercholesterolemia induces regression in neointimal thickening due to apoptosis of vascular smooth muscle cells in the hamster endothelial injury. Cardiovasc Res 53: 512-523.

• **Maziere C, Morliere P, Santus R, Marcheux V, Louandre C, Conte MA, Maziere JC**. (2004) Inhibition of insulin signaling by oxidized low density lipoprotein. Protective effect of the antioxidant Vitamin E. Atherosclerosis. 175 : 23-30.

• **McCloud CM**, **Beard TL**, **Kacew S**, **Reasor MJ**. (1995) In vivo and in vitro reversibility of chlorphentermine-induced phospholipidosis in rat alveolar macrophages. Exp Mol Pathol 62 : 12-21.

• **McConkey DJ**. (1996) Calcium-dependent, Interleukin 1β-converting Enzyme Inhibitor-insensitive Degradation of Lamin B_1 and DNA Fragmentation in Isolated Thymocyte Nuclei J Biol Chem 271 : 22398-22406.

• **Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, Peter ME**. (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). Embo J 16: 2794-2804.

• **Meier P, Finch A, Evan G.** (2000) Apoptosis in development. Nature 407: 796-801.

• **Mengesdorf T, Althausen S, Obendorfer I, Paschen W.** (2001) Response of neurons to an irreversible inhibition of endoplasmic réticulum Ca^{2+}-ATPase: relationship between global protein synthesis and expression and translation of individual genes. Biochem J 356: 805-812.

• **Meynier A, Andre A, Lherminier J, Grandgirard A, Demaison L.** (2005) Dietary oxysterols induce *in vivo* toxicity of coronary endothelial and smooth muscle cells. Eur J Nutr 44 : 393-405.

• **Miguet C, Monier S, Bettaieb A, Athias A, Bessede G, Laubriet A, Lemaire S, Neel D, Gambert P, Lizard G.** (2001) Ceramide generation occurring during 7beta-hydroxycholesterol- and 7- ketocholesterol-induced apoptosis is caspase independent and is not required to trigger cell death. Cell Death Differ 8: 83-99.

• **Miguet-Alfonsi C, Prunet C, Monier S, Bessède G, Lemaire-Ewing S, Berthier A, Ménétier F, Néel D, Gambert P, Lizard G.** (2002) Analysis of oxidative processes and of myelin Figures formation before and after the loss of mitochondrial transmembrane potential during 7beta-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol-induced apoptosis: comparison with various pro-apoptotic chemicals. Biochem Pharmacol 64: 527-541.

• **Millanvoye-Van Brussel E, Topal G, Brunet A, Do Pham T, Deckert V, Rendu F, David-Dufilho M.** (2004) Lysophosphatidylcholine and 7-oxocholesterol modulate Ca2+ signals and inhibit the phosphorylation of endothelial NO synthase and cytosolic phospholipase A2. Biochem J 380: 533-539.

• **Millatt LJ, Bocher V, Fruchart JC, Staels B.** (2003) Liver X receptors and the control of cholesterol homeostasis: potential therapeutic targets for the treatment of atherosclerosis. Biochim Biophys Acta 1631: 107-118.

• **Mitchinson MJ.** (1982) Insoluble lipids in human atherosclerotic plaques. Atherosclerosis 45 : 11-15.

• **Mitchinson MJ, Hothersall DC, Brooks PN, De Burbure CY.** (1985) The distribution of ceroid in human atherosclerosis. J Pathol 145: 177-183.

• **Mitchinson MJ, Ball RY, Carpenter KLH, Parums DV.** (1988) Macrophages and ceroid in atherosclerosis. Dans *Hyperlidaemia and atherosclerosis*. Eds KE Suckling & PHE Groot, London: Academic Press. Pp 117-134.

• **Mohr S, Zech B, Lapetina EG, Brune B.** (1997) Inhibition of caspase-3 by S-nitrosation and oxidation caused by nitric oxide. Biochem Biophys Res Commun 238 : 387-391.

• **Monier S, Samadi M, Prunet C, Denance M, Laubriet A, Athias A, Berthier A, Steinmetz E, Jurgens G, Negre-Salvayre A, Bessede G, Lemaire-Ewing S, Neel D, Gambert P, Lizard G.** (2003) Impairment of the cytotoxic and oxidative activities of 7 beta-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol by esterification with oleate. Biochem Biophys Res Commun 303: 814-824.

• **Moreira EF, Jaworski C, Li A, Rodriguez IR.** (2001) Molecular and biochemical characterization of a novel oxysterol-binding protein (OSBP2) highly expressed in retina. J Biol Chem 276: 18570-18578.

• **Morel DW, Lin CY**. (1996) Cellular biochemistry of oxysterols derived from the diet or oxidation in vivo. J Nutr Biochem 7: 495-506.

• **Morl K, Ma W, Gething MJ, Sambrook J.** (1993) A transmembrane protein with a cdc2^{+}/CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus. Cell 74: 743-756.

• **Moussard C**. (2004) Biochimie Structurale et Métabolique, Edition De Boeck.

• **Munafo DB**, **Colombo MI**. (2001) A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation. J Cell Sci 114 : 3619-3629.

• **Myers SJ, Stanley KK**. (1999) Src family kinase activation in glycosphingolipid-rich membrane domains of endothelial cells treated with oxidised low density lipoprotein. Atherosclerosis 143: 389-397.

N

• **Nahle Z, Polakoff J, Davuluri RV, McCurrach ME, Jacobson MD, Narita M, Zhang MQ, Lazebnik Y, Bar-Sagi D, Lowe SW.** (2002) Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F. Nat Cell Biol 4: 859-864

• **Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yanker BA, Yuan J.** (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-réticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. Nature 403:98-103.

• **Nakagawa T, Yuan J.** (2000) Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. J Cell Biol 150: 887-894.

• **Navab M, Berliner JA, Watson AD, Hama SY, Territo MC, Lusis AJ, Shih DM, Van Lenten BJ, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Fogelman AM**. (1996) The Yin and Yang of Oxidation in the Development of the Fatty Streak A Review Based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol 16: 831-842.

• **Nelson AA, Fitzbugh OG**. (1948) Chloroquine: pathological changes observed in rats which for two years had been fed various proportions. Arch Pathol 45: 454-462.

• **Neri LM, Borgatti P, Capitani S, Martelli AM**. (2002) The nuclear phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway: a new second messenger system. Biochim Biophys Acta 1584 : 73-80.

• **Neufeld EF.** (1991) Lysosomal storage diseases. Annu Rev Biochem 60 : 257-280.

• **Nguyen DH, Taub DD.** (2003) Membrane incorporation of 22-hydroxycholesterol inhibits chemokine receptor activity. Exp Cell Res 285: 268-277.

• **Ni BH, Wu X, Du YS, Su Y, Hamilton-Byrd E, Rockey PK, Rosteck Jr. P, Poirier GG, Steven MP.** (1997) Cloning and Expression of a Rat Brain Interleukin-1β-Converting Enzyme (ICE)-Related Protease (IRP) and Its Possible Role in Apoptosis of Cultured Cerebellar Granule Neurons**.** J Neurosci 17 : 1561-1569.

• **Nicholson DW.** (1999) Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. Cell Death Differ 6: 1028-1042.

• **Nishio E, Watanabe Y.** (1996) Oxysterols induced apoptosis in cultured smooth muscle cells through CPP32 protease activation and bcl-2 protein downregulation. Biochem Biophys Res Commun 226: 928-934.

• **Niwa K, Kado T, Sakai J, Karino T**. (2004) The effects of a shear flow on the uptake of LDL and acetylated LDL by an EC monoculture and an EC-SMC coculture. Ann Biomed Eng 32: 537-543.

• **Noda T**, **Ohsumi Y**. (1998) Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. J Biol Chem 273 : 3963-3966.

• **Nordestgaard BG, Nielson LB.** (1994) Atherosclerosis and arterial influx of lipoprotein. Curr Opin Lipidol 5: 252-257.

• **Norlin M, Chiang JY.** (2004) Transcriptional regulation of human oxysterol 7alpha-hydroxylase by sterol response element binding protein. Biochem Biophys Res Commun. 316 : 158-164.

O

• **Oberhammer F, Wilson JW, Dive C, Morris ID, Hickman JA, Wakeling AE, Walker PR, Sikorska M.** (1993) Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. Embo J 12: 3679-3684.

• **O'Brien KD, McDonald TO, Chait A, Allen MD, Alpers CE**. (1996) Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 and vascular adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leucocyte content. Circulation 93: 672-682.

• **O'Callaghan YC, Woods JA, O'Brien NM.** (2001) Comparative study of the cytotoxicity and apoptosis-inducing potential of commonly occurring oxysterols. Cell Biol Toxicol 17: 127-137.

• **O'Callaghan YC, Woods JA, O'Brien NM.** (2002). Characteristics of 7β-hydroxycholesterol-induced cell death in a human monocytic blood cell line, U937, and a human hepatoma cell line, HepG2. Toxicol In Vitro 16: 245-251.

• **Ogier-Denis E, Houri JJ, Bauvy C, Codogno P.** (1996). Guanine nucleotide exchange on heterotrimeric Gi3 protein controls autophagic sequestration in HT-29 cells. J Biol Chem 271: 28593-28600.

• **Ogier-Denis E, Codogno P.** (2003) Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer. Biochim Biophys Acta 1603: 113-128.

• **Ogishima T, Deguchi S, Okuda K.** (1987) Purification and characterization of cholesterol 7α-hydroxylase from rat liver microsomes. J. Biol. Chem. 262: 7646-7650.

• **Ohsumi Y.** (2001). Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. Nat Rev Mol Cell Biol 2:211-216

• **Okada T, Yoshida H, Akazawa R, Negishi M, Mori K.** (2002) Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic réticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. Biochem J 366: 585-594.

• **Okwu AK, Xu X, Shiratori Y, Tabas I**. (1994) Regulation of the threshold for lipoprotein-induced acyl-CoA :cholesterol *O*-acyltransferase stimulation in macrophages by cellular sphingomyéline content. J Lipid Res 35: 644-655.

• **Olsson GM, Brunmark A, Brunk UT**. (1989) Acridine orange-mediated photodamage of microsomal- and lysosomal fractions. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 56: 247-257.

• **Oppenheim, R. W., R. A. Flavell, S. Vinsant, D. Prevette, C. Y. Kuan, and P. Rakic.** 2001. Programmed cell death of developing mammalian neurons after genetic deletion of caspases. J Neurosci 21: 4752-4760

• **Oram JF, Lawn RM**. (2001) ABCA1: the gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol. J Lipid Res 42: 1173-1179.

• **Orlinick JR**, **Elkon KB**, **Chao MV**. (1997) Separate domains of the human fas ligand dictate self-association and receptor binding. J Biol Chem 272 : 32221-32229.

• **Ory DS**. (2004) Nuclear receptor signaling in the control of cholesterol homeostasis. Have the orphans found a home ? Circ Res 95: 660-670.

• **O'Reilly LA**, **Ekert P**, **Harvey N**, **Marsden V**, **Cullen L**, **Vaux DL**, **Hacker G**, **Magnusson C**, **Pakusch M**, **Cecconi F**, **Kuida K**, **Strasser A**, **Huang DC**, **Kumar S**. (2002) Caspase-2 is not required for thymocyte or neuronal apoptosis even though cleavage of caspase-2 is dependent on both Apaf-1 and caspase-9. Cell Death Differ 9: 832-841.

• **O'sullivan AJ, O'callaghan YC, O'brien NM.** (2005) Differential effects of mixtures of cholesterol oxidation products on bovine aortic endothelial cells and human monocytic U937 cells. Int J Toxicol 24: 173-179.

• **Otsu M, Hiles I, Gout I, Fry MJ, Ruiz-Larrea F, Panayotou G, Thompson A, Dhand R, Hsuan J, Totty N, et al.** (1991) Characterization of two 85 kd proteins that associate with receptor tyrosine kinases, middle-T/pp60c-src complexes, and PI3-kinase. Cell 65: 91-104.

P

• **Packer L, Weber SU, Rimbach G.** (2001) Molecular aspects of alpha-tocotrienol antioxidant action and cell signalling. J Nutr. 131 : 369S-373S.

• **Panaretou C, Domin J, Cockcroft S, Waterfield MD**. (1997) Characterization of p150, an adaptor protein for the human phosphatidylinositol (PtdIns) 3-kinase. Substrate presentation by phosphatidylinositol transfer protein to the p150.Ptdins 3-kinase complex. J Biol Chem 272 : 2477-2485.

• **Panaretou C, Domin J, Cockcroft S, Waterfield MD.** (1998) Characterization of p150, an adaptor protein for the human phosphatidylinositol (PtdIns) 3-kinase. Substrate presentation by phosphatidylinositol transfer protein to the p150.Ptdins 3-kinase complex. J Biol Chem 272: 2477-2485.

• **Pandey P, Farber R, Nakazawa A, Kumar S, Bharti A, Nalin C, Weichselbaum R, Kufe D, Kharbanda S**. (2000) Hsp27 functions as a negative regulator of cytochrome c-dependent activation of pro-caspase-3. Oncogene 19 : 1975-1981

• **Panini SR, Yang L, Rusinol AE, Sinensky MS, Bonventre JV, Leslie CC.** (2001) Arachidonate metabolism and the signaling pathway of induction of apoptosis by oxidized LDL/oxysterol. J Lipid Res 42:1678-1686.

• **Panini SR, Sinensky MS.** (2001) Mechanisms of oxysterol-induced apoptosis. Curr Opin Lipidol 12:529-533.

• **Papoff G**, **Hausler P**, **Eramo A**, **Pagano MG**, **Di Leve G**, **Signore A**, **Ruberti G**. (1999) Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor. J Biol Chem 274 : 38241-38250.

• **Paroni G, Henderson C, Schneider C, Brancolini C**. (2001) Caspase-2-induced apoptosis is dependent on caspase-9, but its processing during UV- or tumor necrosis factor-dependent cell death requires caspase-3. J Biol Chem 276 : 21907-21915.

• **Paroni G, Henderson C, Schneider C, Brancolini C**. (2002) Caspase-2 can trigger cytochrome c release and apoptosis from the nucleus. J Biol Chem 277 : 15147-15161.

• **Park J, Hill MM, Hess D, Brazil DP, hofsteenge, Hemmings BA.** (2001) Identification of tyrosine phosphorylation sites on 3-phosphoinostide-dependent protein kinase-1 and their role in regulating kinase activity. J Biol Chem 276: 37459-37471.

• **Park PW, Guardiola F, Park SH, Addis PB.** (1996) Kinetic evaluation of 3β-hydroxycholest-5-en-7-one (7-ketocholesterol) stability during saponification. J Am Oil Chem Soc 73: 623-629.

• **Parrish J, Li L, Klotz K, Ledwich D, Wang X, Xue D.** (2001) Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in C. elegans. Nature 412**:** 90-94.

• **Pastorino JG, Chen ST, Tafani M, Snyder JW, Farber JL.** (1998) The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. J Biol Chem 273: 7770-7775.

• **Patel RP, Diczfalusy U, Dzeletovic S, Wilson MT, Darley-Usmar VM.** (1996) Formation of oxysterols during oxidation of low density lipoprotein by peroxynitrite, myoglobin, and copper. J. Lipid Res 37: 2361-2371.

• **Pavlov EV, Priault M, Pietkiewicz D, Cheng EH, Antonsson B, Manon S, Korsmeyer SJ, Mannella CA, Kinnally KW.** (2001) A novel, high conductance channel of mitochondria linked to apoptosis in mammalian cells and Bax expression in yeast. J Cell Biol 155: 725-731.

• **Pedruzzi E, Guichard C, Ollivier V, Driss F, Fay M, Prunet C, Marie JC, Pouzet C, Samadi M, Elbim C, O'dowd Y, Bens M, Vandewalle A, Gougerot-Pocidalo MA, Lizard G, Ogier-Denis E.** (2004) NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic réticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. Mol Cell Biol 24: 10703-10717.

• **Peng SK, Taylor CB, Hill JC, Morin RJ**. (1985) Cholesterol oxidation derivatives and arterial endothelial damage. Atherosclerosis 41: 395-402.

• **Perez JF, Chemello ME, Liprandi F, Ruiz MC, Michelangeli F**. (1998) Oncosis in MA104 cells is induced by rotavirus infection through an increase in intracellular Ca2+ concentration. Virology 252 : 17-27.

• **Petiot A, Ogier-Denis E, Blommaart EF, Meijer AJ, Codogno P.** (2000). Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. J Biol Chem 275:992-998.

• **Petrakis NL, Dupuy ME, Lee RE, Lyon M, Mauk CA, Gruenke LD, Craig JC.** (1982) Mutagens in nipple aspirates of breast fluids. Indicators of Genotoxic Exposure. Branbury report 13 p67 Cold Spring Harbor Laboratory New York.

• **Phillips JE, Geng YJ, Mason RP.** (2001) 7-ketocholesterol forms crystalline domains in model membranes and murine aortic smooth muscle cells. Atherosclerosis 159: 125-135.

• **Piccotti JR, LaGattuta MS, Knight SA, Gonzales AJ, Bleavins MR**. (2005) Induction of apoptosis by cationic amphiphilic drugs amiodarone and imipramine. Drug Chem Toxicol 28 : 117-133.

• **Pons S, Asano T, Glasheen E, Miralpeix M, Zhang Y, Fisher TL, Myers MG Jr, Sun XJ, White MF.** (1995) The structure and function of p55PIK reveal a new regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase. Mol Cell Biol 15: 4453-4465.

• **Presley JF, Ward TH, Pfeifer AC, Siggia ED, Phair RD, Lippincott-Schwartz J.** (2002) Dissection of COPI and Arf1 dynamics in vivo and role in Golgi membrane transport. Nature 417: 187-193.

• **Prunet C, Lemaire-Ewing S, Menetrier F, Neel D, Lizard G.** (2005) Activation of caspase-3-dependent and -independent pathways during 7-ketocholesterol- and 7beta-hydroxycholesterol-induced cell death: a morphological and biochemical study. J Biochem Mol Toxicol. 19: 311-326.

• **Prunet C**, **Montange T**, **Vejux A**, **Laubriet A**, **Rohmer JF**, **Riedinger JM**, **Athias A**, **Lemaire-Ewing S**, **Neel D**, **Petit JM**, **Steinmetz E**, **Brenot R**, **Gambert P**, **Lizard G**. (2006) Multiplexed flow cytometric analyses of pro- and anti-inflammatory cytokines in the culture media of oxysterol-treated human monocytic cells and in the sera of atherosclerotic patients. Cytometry A 69 : 359-373.

• **Przygonski K, Jelen H, Wasowicz E.** (2000) Determination of cholesterol oxidation products in milk powder and infant formulas by gas chromatography and mass spectrometry. Nahrung 44: 122-125.

• **Punnonen EL, Autio S, Marjomaki VS, Reunanen H.** (1992). Autophagy, cathepsin L transport, and acidification in cultured rat fibroblasts. J Histochem Cytochem 40:1579-1587.

• **Puthalakath H, Strasser A.** (2002) Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. Cell Death Differ 9 : 505-512.

R

• **Raines EW, Ferri N.** (2005) Cytokines affecting endothelial and smooth muscle cells in vascular disease. J Lipid Res 46: 1081-1092.

• **Rameh LE, Arvidsson A, Carraway KL 3rd, Couvillon AD, Rathbun G, Crompton A, VanRenterghem B, Czech MP, Ravichandran KS, Burakoff SJ, Wang DS, Chen CS, Cantley LC.** (1997) A comparative analysis of the phosphoinositide binding specificity of pleckstrin homology domains. J Biol Chem 272: 22059-22066.

• **Ramos LC, Huo Y, Jung U, Ghosh S, Manka DR, Sarembock IJ, Ley K**. (1999) Direct demonstration of P-selectin-and VCAM-1-dependent mononuclear cell rolling in early atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice. Circ Res 84: 1237-1244.

• **Rao L, Perez D, White E.** (1996) Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. J Cell Biol 135 : 1441-1455.

• **Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, del Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE.** (2001) Coupling endoplasmic réticulum stress to the cell death program. Mecanism of caspase activation. J Biol Chem 276: 33869-33874.

• **Ray CA**, **Black RA**, **Kronheim SR**, **Greenstreet TA**, **Sleath PR**, **Salvesen GS**, **Pickup DJ**. (1992) Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. Cell 69 : 597-604.

• **Reasor MJ, Kacew S**. (2001) Drug-induced phospholiposis: are there functional consequences? Exp Biol Med 226: 825-830.

• **Reed JC**. (1998) Bcl-2 family proteins. Oncogene 17: 3225-3236.

• **Reed JC**. (2000) Mechanisms of apoptosis. Am J Pathol 157: 1415-1430.

• **Reggiori F**, **Klionsky DJ**. (2002) Autophagy in the eukaryotic cell. Eukaryot Cell 1 : 11-21.

• **Reimold AM, Iwakoshi NN, Manis J, Vallabhajosyula P, Szomolanyi-Tsuda E, Gravallese EM, Friend D, Grusby MJ, Alt F, Glimcher LH**. (2001) Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. Nature 412: 300-307.

• **Remy I, Michnick SW.** (2004) Regulation of apoptosis by the Ft1 protein, a new modulator of protein kinase B/Akt. Mol Cell Biol 24: 1493-1504.

• **Rho MC**, **Kim YK**, **Chang JS**, **Lee HS**, **Baek JA**, **Chung MY**, **Lee HC**, **Lee HW**, **Rhim BY**, **Reidy MA**, **Kim K**. (2005) 7-Ketocholesterol predisposes human aorta smooth muscle cells to Fas-mediated death. J Mol Cell Cardiol 39: 823-832.

• **Ricciarelli R, Tasinato A, Clement S, Ozer NK, Boscoboinik D, Azzi A**. (1998) alpha-Tocopherol specifically inactivates cellular protein kinase C alpha by changing its phosphorylation state. Biochem J 334 : 243-249.

• **Ridgway ND, Dawson PA, Ho YK, Brown MS, Goldstein JL.** (1992) Translocation of oxysterol binding protein to Golgi apparatus triggered by ligand binding. J Cell Biol 116: 307-319.

• **Rise P, Camera M, Caruso D, Ghezzi S, Visiolo F, Galli C.** (2004) Synthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids is inhibited in vivo in hypercholesterolemic rabbits and in vitro by oxysterols. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 71: 79-86.

• **Ritossa FM** (1962) A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila.* Experientia 18 **:** 571-573.

• **Robenek H**, **Schmitz G**. (1988) Ca^{++} antagonists and ACAT inhibitors promote cholesterol efflux from macrophages by different mechanisms. II. Characterization of intracellular morphologic changes. Arteriosclerosis 8 : 57-67.

• **Rodriguez I, Matsuura K, Ody C, Nagata S, Vassalli P**. (1996) Systemic injection of a tripeptide inhibits the intracellular activation of CPP32-like proteases in vivo and fully protects mice against Fas-mediated fulminant liver destruction and death. J Exp Med 184: 2067-72.

• **Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, Waterfield MD, Downward J.** (1994) Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. Nature 370: 527-532.

• **Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Khwaja A, Marte BM, Pappin D, Das P, Waterfield MD, Ridley A, Downward J.** (1997) Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. Cell 89: 457-467.

• **Roggo L, Bernard V, Kovacs AL, Rose AM, Savoy F, Zetka M, Wymann MP, Muller F.** (2002) Membrane transport in Caenorhabditis elegans: an essential role for VPS34 at the nuclear membrane. EMBO J 21: 1673-1683.

• **Ron D.** (2002) Translational control in the endoplasmic réticulum stress response. J Clin Invest 110:1383-1388.

• **Ronot X, Usson Y**. (2001) Methods in visualization series. Imaging of nucleic acids and quantitation in photonic microscopy. CRC Press.

• **Rosklint T, Ohlsson BG, Wiklund O, Norén K, Hultén LM.** (2002) Oxysterols induce interleukin-1β production in human macrophage. Eur J Clin Invest 32: 35-42.

• **Ross R.** (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. Nature 362: 801-809.

• **Ross R.** (1999) Atherosclerosis-an inflammatory disease. N Engl J Med 340: 115-126.

• **Roth MG.** (1999) Inheriting the Golgi. Cell 99: 559-562.

• **Rothblat GH, de la Llera-Moya M, Atger V, Kellner-Weibel G, Williams DL, Phillips MC.** (1999) Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. J Lipid Res 40: 781-796.

• **Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM, Goeddel DV**. (1995) The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. Cell 83 : 1243-1252.

• **Roy N, Mahadevan MS, McLean M, Shutler G, Yaraghi Z, Farahani R, Baird S, Besner-Johnston A, Lefebvre C, Kang X, Salih M, Aubry H, Tamai K, Guan X, Ioannou P, Crawford TO, de Jong PJ, Surh L, Ikeda JE, Korneluk RG, MacKenzie A.** (1995) The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. Cell 80 : 167-178.

• **Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC**. (1997) The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. EMBO J 16 : 6914-6925.

• **Rowe AH**, **Argmann CA**, **Edwards JY**, **Sawyez CG**, **Morand OH**, **Hegele RA**, **Huff MW**. (2003) Enhanced synthesis of the oxysterol 24(S),25-epoxycholesterol in macrophages by inhibitors of 2,3-oxidosqualene:lanosterol cyclase: a novel mechanism for the attenuation of foam cell formation. Circ Res 93: 717-725.

• **Rusinol AE, Yang L, Thewke D, Panini SR, Kramer MF, Sinensky MS.** (2000) Isolation of a somatic cell mutant resistant to the induction of apoptosis by oxidized low density lipoprotein. J Biol Chem 275: 7296-7303.

• **Rusinol AE, Thewke D, Liu J, Freeman N, Panini SR, Sinensky MS.** (2004) AKT/protein kinase B regulation of BCL family members during oxysterol-induced apoptosis. J Biol Chem 279: 1392-1399.

• **Russell DW.** (2000) Oxysterol biosynthetic enzymes. Biochim. Biophys. Acta 1529: 126-135.

• **Ryan L**, **O'Callaghan YC**, **O'Brien NM**. (2004) Comparaison of the apoptotic processes induced by the oxysterols 7β-hydroxycholesterol and cholesterol-5β,6β-epoxide. Cell Biol Toxicol 20: 313-323.

• **Ryan L**, **O'Callaghan YC**, **O'Brien NM**. (2005) The role of the mitochondria in apoptosis induced by 7β-hydroxycholesterol and cholesterol-5β,6β-epoxide. Br J Nutr 94: 519-525.

S

• **Sabol SL, Brewer HB, Santamarina-Fojo S.** (2005) The human ABCG1 gene: identification of LXR response elements that modulate expression in macrophages and liver. J Lipid Res 46: 2151-2167.

• **Saito H, Kitame F, Uemura Y, Ishida N.** (1983) The regulating effect of cholesterol derivatives isolated from human sera on lymphocyte response to phytohemagglutinin. Tohoku J Exp Med 140: 245-258.

• **Salvayre R, Auge N, Benoist H, Nègre-Salvayre A.** (2002) Oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis. Biochem Biophys Acta 1585: 213-221.

• **Samali A, Cai J, Zhivotovsky B, Jones DP, Orrenius S.** (1999) Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. EMBO J 18: 2040-2048.

• **Sanna MG**, **da Silva Correia J**, **Ducrey O**, **Lee J**, **Nomoto K**, **Schrantz N**, **Deveraux QL**, **Ulevitch RJ**. (2002) IAP suppression of apoptosis involves distinct mechanisms: the TAK1/JNK1 signaling cascade and caspase inhibition. Mol Cell Biol 22 : 1754-1766.

• **Saucier SE, Kandutscht AA, Taylor FR, Spencers TA, Phirwag S, Gayens AK.** (1985) Identification of regulatory oxysterols, 24(S),25-epoxycholesterol and 25-hydroxycholesterol, in cultured fibroblasts. J Biol Chem 260: 14571-14579.

• **Sato S, Fujita N, Tsuruo T.** (2000) Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. Proc Natl Acad Sci U S A 97 : 10832-10837.

• **Sato S, Fujita N, Tsuruo T.** (2002) Regulation of kinase activity of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 by binding to 14-3-3. J Biol Chem 277: 39360-39367.

• **Savouret JF, Antenos M, Quesne M, Xu J, Milgrom E, Casper RF.** (2001) 7-ketocholesterol is an endogenous modulator for the arylhydrocarbon receptor. J Biol Chem 276: 3054-3059.

• **Schachter, M.** (1997). The pathogenesis of atherosclerosis. Int. J. Cardiol. 62: S3-S7.

• **Scheid MP, Marignani PA, Woodgett JR.** (2002) Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B. Mol Cell Biol 22: 6247-6260.

• **Schenkel AR, Mamdouh Z, Chen X, Liebman RM, Muller WA**. (2002) CD99 plays a major role in the migration of monocyte through endothelial junctions. Nat Immunol 3: 143-150.

• **Scheuner D, Song B, McEwen E, Lui C, Laybutt R, Gillespie P, Saunders T, Bonner-Weir S, Kaufman RJ.** (2001) Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. Mol Cell 7 :1165-1176.

• **Schlesinger PH, Gross A, Yin XM, Yamamoto K, Saito M, Waksman G, Korsmeyer SJ.** (1997) Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. Proc Natl Acad Sci U S A 94 : 11357-11362.

• **Schmitz G, Müller G.** (1991) Structure and function of lamellar bodies, lipid-protein complexes involved in storage and secretion of cellular lipids. J Lipid Res 32: 1539-1570.

• **Schmuth M, Bikle DD, Willson TM, Mangelsdorf DJ, Elias PM, Feingold KR.** (2005) Pro-differentiating effects of oxysterols in keratinocytes. Exp Dermatol 14: 154-155.

• **Schrijvers DM, De Meyer GR, Kockx MM, Herman AG, Martinet W.** (2005) Phagocytosis of Apoptotic Cells by Macrophages Is Impaired in Atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 25: 1-6

• **Schroepfer GJ.** (2000) Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. Physiological Reviews 80: 361-554.

• **Schu PV, Takegawa K, Fry MJ, Stack JH, Waterfield MD, Emr SD.** (1993) Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. Science 260: 88-91.

• **Searle, J., T. A. Lawson, P. J. Abbott, B. Harmon, and J. F. Kerr.** 1975. An electron-microscope study of the mode of cell death induced by cancer-chemotherapeutic agents in populations of proliferating normal and neoplastic cells. J Pathol 116: 129-138.

• **Segrest JP, Garber DW, Brouillette CG**. (1994) The amphipathic à helix: a multifunctional structural motif in plasma lipoproteins**.** Adv Protein Chem 45: 303-369.

• **Seillan C.** (1990) Oxysterol mediated changes in fatty acid distribution and lipid synthesis in cultured bovine aortic smooth muscle cells. Lipids 25: 172-176.

• **Selvin PR.** (1995) Fluorescence resonance energy transfer. Methods Enzymol 246: 300-334.

• **Sevanian A, Peterson AR.** (1986) The cytotoxic and mutagenic properties of cholesterol oxidation products. Food Chem Toxicol 24: 1103-1110.

• **Seye CI**, **Knaapen MW**, **Daret D**, **Desgranges C**, **Herman AG**, **Kockx MM**, **Bult H**. (2004) 7-Ketocholesterol induces reversible cytochrome c release in smooth muscle cells in absence of mitochondrial swelling.Cardiovasc Res 64: 144-153.

• **Shachter NS.** (2005) ABCG1: how critical for cholesterol transport ? Cell Metab 1: 87-88.

• **Shah PK.** (2005) Insights into the molecular mechanisms of plaque rupture and thrombosis. Indian Heart J. 57: 21-30.

• **Shamu CE**, **Walter P**. (1996) Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic réticulum to the nucleus. EMBO J 15: 3028-3039.

• **Shan X, Czar MJ, Bunnell SC, Liu P, Liu Y, Schwartzberg PL, Wange RL.** (2000) Deficiency of PTEN in Jurkat T cells causes constitutive localization of Itk to the plasma membrane and hyperresponsiveness to CD3 stimulation. Mol Cell Biol 20: 6945-6957.

• **Shen J**, **Chen X**, **Hendershot L**, **Prywes R**. (2002) ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. Dev Cell. 3: 99-111.

• **Shi Y**, **Vattem KM**, **Sood R**, **An J**, **Liang J**, **Stramm L**, **Wek RC**. (1998) Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control. Mol Cell Biol 18: 7499-7509.

• **Shimabukuro M, Wang MY, Zhou YT, Newgard CB, Unger RH.** (1998) Protection against lipoapoptosis of β cells through leptin-dependent maintenance of Bcl-2 expression. Proc Natl Acad Sci USA 95: 9558-9561.

• **Shio H, Haley NJ, Fowler S.** (1979) Characterization of lipid-loaded aortic cells from cholesterol-fed rabbits. III. Intracellular localization of cholesterol and cholesteryl ester. Lab Invest 41 : 160-167.

• **Shiratori Y, Houweling M, Zha X, Tabas I.** (1995) Stimulation of CTP:phosphocholine cytidylyltransferase by free cholesterol loading of macrophages involves signaling through protein dephosphorylation. J Biol Chem 270: 29894-29903.

• **Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, Chan FK, Johnson M, Lynch D, Tsien RY, Lenardo MJ**. (2000) Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. Science 288: 2354-2357.

• **Sleath PR, Hendrickson RC, Kronheim SR, March CJ, Black RA**. (1990). Substrate specificity of the protease that processes human interleukin-1β. J Biol Chem 265: 14526-14528.

• **Slee EA, O'Connor DJ, Lu X.** (2004) To die or not to die: how does p53 decide? Oncogene 23: 2809-2818

• **Smith LL, Johnson BH.** (1989) Biological activities of oxysterols. Free Radic Biol Med 7: 285-332.

• **Smith TJ**, **Hautamaa D**, **Maeda N**. (1990) Sequence of the putative LDL receptor binding regions of apolipoprotein B in mouse and hamster. Gene 95 : 307-308.

• **Smith CA, Farrah T, Goodwin RG**. (1994) The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. Cell 76: 959-962.

• **Solier S**, **Lansiaux A**, **Logette E**, **Wu J**, **Soret J**, **Tazi J**, **Bailly C**, **Desoche L**, **Solary E**, **Corcos L**. (2004) Topoisomerase I and II inhibitors control caspase-2 pre-messenger RNA splicing in human cells. Mol Cancer Res 2 : 53-61.

• **Sonoda J, Chong LW, Downes M, Barish GD, Coulter S, Liddle C, Lee CH, Evans RM.** (2005) Pregnane X receptor prevents hepatorenal toxicity from cholesterol metabolites. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 2198-2203.

• **Sperandio S**, **Poksay K**, **de Belle I**, **Lafuente MJ**, **Liu B**, **Nasir J**, **Bredesen DE**. (2004) Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix. Cell Death Differ 11 : 1066-1075

• **Srinivasula SM, Ahmad M, Ottilie S, Bullrich F, Banks S, Wang Y, Fernandes-Alnemri T, Croce CM, Litwack G, Tomaselli KJ, Armstrong RC, Alnemri ES.** (1997) FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis. J Biol Chem 272 :18542-18545.

• **Staal SP**. (1987). Molecular cloning of the *akt* oncogene and its human homologues *AKT1* and *AKT2*: amplification of *AKT1* in a primary human gastric adenocarcinoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 5034-5037.

• **Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW.** (1998) Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. Cell 95: 29-39.

• **Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW.** (1995) A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol 15: 1512-1531.

• **Stary HC**. (2000) Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions. An Update. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 20: 1177-1178.

• **Stefanis L**, **Larsen KE**, **Rideout HJ**, **Sulzer D**, **Greene LA**. (2001) Expression of A53T mutant but not wild-type alpha-synuclein in PC12 cells induces alterations of the ubiquitin-dependent degradation system, loss of dopamine release, and autophagic cell death. J Neurosci 21: 9549-9560.

• **Steinberg, D.** (1997) Oxidative modification of LDL and atherogenesis. Circulation 95: 1062-1071.

• **Stephens LR, Eguinoa A, Erdjument-Bromage H, Lui M, Cooke F, Coadwell J, Smrcka AS, Thelen M, Cadwallader K, Tempst P, Hawkins PT.** (1997) The G beta gamma sensitivity of a PI3-K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. Cell 89: 105-114.

• **Stokoe D, Stephens LR, Copeland T, Gaffney PR, Reese CB, Painter GF, Holmes AB, McCormick F, Hawkins PT.** (1997) Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. Science 277: 567-570.

• **Stoyanova S, Bulgarelli-Leva G, Kirsch C, Hanck T, Klinger R, Wetzker R, Wymann MP.** (1997) Lipid kinase and protein kinase activities of G-protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma: structure-activity analysis and interactions with wortmannin. Biochem J 324: 489-495.

• **Streuli RA, Chung JA, Scanu AM, Yachnim S**. (1981) Serum lipoproteins modulate oxygenated sterol insertion into human red cell membranes. Science 212: 1294-1296.

• **Stryer L, Haugland RP.** (1967) Energy transfer:a spectroscopic ruler. Proc Natl Acad Sci U S A 58, 719-726.

• **Sudhof TC, Russel DW, Brown MS, Goldstein JL.** (1987) A 42bp element from LDL receptor gene confers endproduct repression by sterols when inserted into viral TK promoter. Cell 48: 1061-1069.

• **Sudhop T, Lütjohann D, von Bergmann K.** (2005) Sterol transporters: targets of natural sterols and new lipid lowering drugs. Pharmacol Ther 105: 333-341.

• **Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G.** (1999a) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. Nature 397: 441-446.

• **Susin SA**, **Lorenzo HK**, **Zamzami N**, **Marzo I**, **Brenner C**, **Larochette N**, **Prevost MC**, **Alzari PM**, **Kroemer G**. (1999b) Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. J Exp Med 189: 381-394.

• **Szedlacsek SE, Wasowicz E, Hulea SA, Nishida HI, Kummerow FA, Nishida T**. (1995) Esterification of oxystérols by human plasma lecithin-cholesterol acyltransferase. J Biol Chem 270; 11812-11819.

T

• **Tabas I.** (1997a) Free cholesterol-induced cytotoxicity. A possible contributing factor to macrophage foam cell necrosis in advanced atherosclerotic lesions. Trends Cardiovasc Med. 7: 256-263.

• **Tabas I** (1997b) Phospholipid metabolism in cholesterol-loaded macrophages. Curr Opin Lipidol 8: 263-267.

• **Tabas I**. (2000) Cholesterol and phospholipid metabolism in macrophages. Biochim Biophys Acta 1529 : 164-174.

• **Tabas I.** (2002) Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. J Clin Invest 110: 905-911

• **Tabas I.** (2004) Apoptosis and plaque destabilization in atherosclerosis: the role of macrophage apoptosis induced by cholesterol. Cell Death Differ 11: S12-S16.

• **Takahashi R, Deveraux Q, Tamm I, Welsh K, Assa-Munt N, Salvesen GS, Reed JC.** (1998) A Single BIR Domain of XIAP Sufficient for Inhibiting Caspases. J Biol Chem 273 : 7787-7790.

• **Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, Reed JC.** (1998) IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. Cancer Res 58 : 5315-5320.

• **Tamura T, Ueda S, Yoshida M, Lamphier MS, Tanaka N, Oishi I, Aizawa S, Matsuyama T, Mak TW, Taki S, Taniguchi T.** (1995) An IRF-1-dependent pathway of DNA damage-induced apoptosis in mitogen-activated T lymphocytes. Nature 376: 596-599.

• **Tamura T, Ueda S, Yoshida M, Matsuzaki M, Mohri H, Okubo T.** (1996) Interferon-gamma induces Ice gene expression and enhances cellular susceptibility to apoptosis in the U937 leukemia cell line. Biochem Biophys Res Commun 229 : 21-26.

• **Tanaka K, Zou JP, Takeda K, Ferrans VJ, Sandford GR**, **Johnson TM, Finkel T, Epstein SE**. (1999) Effects of human cytomegalovirus immediate-early proteins on apoptosis in coronary artery smooth muscle cells. Ciculation 99: 1656-1659.

• **Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV**. (1993) A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. Cell 74: 845-853.

• **Taylor FR, Saucier SE, Shown EP, Parish EJ, Kandutsch AA.** (1984) Correlation between oxysterol binding to a cytosolic binding protein and potency in the repression of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase. J Biol Chem 259: 12382-12387.

• **Tedgui A, Mallat Z.** (1999) Apoptose et remodelage vasculaire. Thérapie 54: 167-170.

• **Tedgui A, Mallat Z.** (2001) Athérosclérose et inflammation. Médecine/Sciences 17: 162-169.

• **Thomas DA, Scorrano L, Putcha GV, Korsmeyer SJ, Ley TJ.** (2001) Granzyme B can cause mitochondrial depolarization and cell death in the absence of BID, BAX, and BAK. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 14985-14990.

• **Thompson CB.** (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science 267:1456-1462.

• **Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J, Elliston KO, Ayala JM, Casano FJ, Chin J, Ding GJF, Egger LA, Gaffney EP, Limjuco G, Palyha OC, Raju SM, Rolando AM, Salley JP, Yamin TT, Lee TD, Shively JE, Maccross M, Mumford RA, Schmidt JA, Tocci MJ**. (1992) A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1β processing in monocytes. Nature 356: 768-774.

• **Thuerauf DJ, Morrison L, Glembotski CC**. (2004) Opposing roles for ATF6α and ATF6β in ER stress response gene induction J Biol Chem 279: 21078-21084.

• **Tontonoz P, Mangelsdorf DJ.** (2003) Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. Mol Endocrinol 17: 985-993.

• **Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS, Walter P.** (2000) Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. Cell 101: 249-258.

• **Tschopp J, Irmler M, Thome M.** (1998) Inhibition of fas death signals by FLIPs. Curr Opin Immunol 10 : 552-558.

• **Tuckey RC, KostadinovicZ, Cameron KJ**. (1994) Cytochrome P-450scc activity and substrate supply in human placental trophoblasts. Mol Cell Endocr 105: 103-109.

U

• **Ugi S, Imamura T, Maegawa H, Egawa K, Yoshizaki T, Shi K, Obata T, Ebina Y, Kashiwagi A, Olefsky JM**. (2004) Protein phosphatase 2A negatively regulates insulin's metabolic signaling pathway by inhibiting Akt (protein kinase B) activity in 3T3-L1 adipocytes. Mol Cell Biol 24:8778-8789.

• **Unger RH**. (2002) Lipotoxic Diseases. Annu Rev Med 53: 319-336.

• **Unger RH**. (2003) The physiology of cellular liporegulation. Annu Rev Physiol 65: 333-347.

• **Unger RH, Orci L**. (2001) Diseases of liporegulation: new perspective on obesity and related disorders. Faseb J 15: 312-321.

• **Unger RH, Orci L**. (2002) Lipoapoptosis : its mechanism and its diseases. Biochim Biophys Acta 15: 202-212.

• **Unger RH, Zhou YT**. (2001) Lipotoxicity of β-cells in obesity and in other causes of fatty acid spillover. Diabetes 50:S118-S121.

• **Unger RH, Zhou YT, Orci L.** (1999) Regulation of fatty acid homeostasis in cells: novel role of leptin. Proc Natl Acad Sci USA 96: 2327-2332.

V

• **Van den Berg M, Boers GH, Franken DG, Blom HJ, Van Kamp GJ, Jakobs C, Rauwerda JA, Kluft C, Stehouwert CD.** (1995) Hyperhomocysteinaemia and endothelial dysfunction in young patients with peripheral arterial occlusive disease. Eur J Clin Invest 25: 176-181.

• **VanderLaan PA, Reardon CA, Getz GS.** (2004) Site specificity of atherosclerosis: site-selective responses to atherosclerotic modulators. Arterioscler Thromb Vasc Biol 24: 12-22.

• **VanderLaan PA, Reardon CA.** (2005) The unusual suspects: an overview of the minor leukocyte populations in atherosclerosis. J Lipid Res 46: 829-838.

• **Vanhaesebroeck B, Welham MJ, Kotani K, Stein R, Warne PH, Zvelebil MJ, Higashi K, Volinia S, Downward J, Waterfield MD.** (1997) P110delta, a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 94: 4330-4335.

• **Vanhaesebroeck B, Waterfield MD.** (1999) Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. Exp Cell Res 253: 239-254.

• **Vanhaesebroeck B, Alessi DR.** (2000) The PI3K-PDK1 connection : more than just a road to PKB. Biochem J 346: 561-576.

• **Vanhaesebroeck B, Leevers SJ, Ahmadi K, Timms J, Katso R, Driscoll PC, Woscholski R, Parker PJ, Waterfield MD.** (2001) Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. Annu Rev Biochem 70:535-602.

• **Vaya J, Aviram M, Mahmood S, Hayek T, Grenadir E, Hoffman A, Milo S.** (2001) Selective distribution of oxysterols in atherosclerotic lesions and human plasma lipoproteins. Free Radic Res 34: 485-497.

• **Vayssiere JL, Petit PX, Risler Y, Mignotte B.** (1994) Commitment to apoptosis is associated with changes in mitochondrial biogenesis and activity in cell lines conditionally immortalized with simian virus 40. Proc Natl Acad Sci U S A. 91:11752-11756.

• **Vejux A**, **Kahn E**, **Dumas D**, **Bessede G**, **Menetrier F**, **Athias A**, **Riedinger JM**, **Frouin F**, **Stoltz JF**, **Ogier-Denis E**, **Todd-Pokropek A**, **Lizard G**. (2005) 7-Ketocholesterol favors lipid accumulation and colocalizes with Nile Red positive cytoplasmic structures formed during 7-ketocholesterol-induced apoptosis: analysis by flow cytometry, FRET biphoton spectral imaging microscopy, and subcellular fractionation. Cytometry A. 2005 64 : 87-100.

• **Verhagen AM, Silke J, Ekert PG, Pakusch M, Kaufmann H, Connolly LM, Day CL, Tikoo A, Burke R, Wrobel C, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL.** (2002). HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. J Biol Chem 277: 445-454

• **Vieira OV, Botelho RJ, Rameh L, Brachmann SM, Matsuo T, Davidson HW, Schreiber A, Backer JM, Cantley LC, Grinstein S.** (2001) Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation. J Cell Biol 155: 19-25.

• **Von Bergmann K, Sudhop T, Lütjohann D.** (2005) Cholesterol and plant sterol absorption: recent insights. Am J Cardiol 96: 10D-14D.

• **Von der Thusen JH, Van Vlijmen BJ, Hoeben RC, Kockx MM, Havekes LM, Van Berkel TJ, Biessen EA.** (2002) Induction of atherosclerotic plaque rupture in apolipoprotéine E -/- mice after adenovirus-mediated transfer of p53. Circulation 105: 2064-2070.

W

- **Wagner KW, Engels IH, Deveraux QL.** (2004) Caspase-2 can function upstream of bid cleavage in the TRAIL apoptosis pathway. J Biol Chem 279 : 35047-35052.
- **Walisser JA**, **Thies RL**. (1999) Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition in oxidant-stressed endothelial cells prevents oncosis and permits caspase activation and apoptosis. Exp Cell Res 251: 401-413.
- **Wang C, Jebailey L, Ridgway ND.** (2002) Oxysterol-binding-protein (OSBP)-related protein 4 binds 25-hydroxycholesterol and interacts with vimentine intermediate filaments. Biochem J 361: 461-472.
- **Wang L, Miura M, Bergeron L, Zhu H, Yuan J.** (1994) Ich-1, an Ice/ced-3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. Cell 78 : 739-750.
- **Wang N, Lan D, Chen W, Matsuura F, Tall AR.** (2004) ATP-binding cassette transporters G1 et G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. PNAS 101: 9774-9779.
- **Wang PY, Weng J, Anderson RGW.** (2005) OSBP is a cholesterol-rgulated scaffolding protein in control of ERK1/2 activation. Science 307: 1472-1476.
- **Wang X, Sato R, Brown MS, Hua X, Goldstein JL.** (1994) SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. Cell 77: 53-62.
- **Wang X, Zelenski NG, Yang J, Sakai J, Brown MS, Goldstein JL.** (1996) Cleavage of sterol regulatory element binding protein (SREBPs) by CPP32 during apoptosis. EMBO J 15: 1012-1020.
- **Weil M., Jacobson MD, Coles HSR, Davies TJ, Gardener RL, Raff KD, Raft MC**. (1996) Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. J. Cell Biol. 133 : 1053-1059.
- **Werstuck GH, Lentz SR, Dayal S, Hossain GS, Sood SK, Shi YY, Zhou J, Maeda N, Krisans SK, Malinow MR, Austin RC.** (2001) Homocysteine-induced endoplasmic réticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. J Clin Invest 107: 1263-1273.
- **Williams DL, Connelly MA, Temel RE, Swarnakar S, Phillips MC, de la Llera-Moya M, Rothblat GH.** (1999) Scavenger receptor BI and cholesterol trafficking. Curr Opin Lipidol 10: 329-339.
- **Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR.** (1980) Cell death: the significance of apoptosis. Int Rev Cytol 68 : 251-306.
- **Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D.** (1984) Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. J Pathol 142 : 67-77.

• **Wohlfeil ER, Campbell WB.** (1997) 25-Hydroxycholesterol enhances eicosanoid production in cultured bovine coronary artery endothelial cells by increasing prostaglandin G/H synthase-2. Biochim Biophys Acta 1345: 109-120.

X

• **Xu Y, Liu Y, Ridgway ND, McMaster CR.** (2001) Novel members of the human oxysterol-binding protein family bind phospholipids and regulate vesicle transport. J Biol Chem 276: 18407-18414.

Y

• **Yachnin S.** (1982) Mevalonic acid as an initiator of cell growth. Studies using human lymphocytes and inhibitors of endogenous mevalonate biosynthesis. Oncodev Biol Med 3: 111-123.

• **Yan PS.** (1999). Cholesterol Oxidation Products. Their occurrence and detection in our foodstuffs. Impact of Processing on Food Safety.

• **Yang L, Sinensky MS.** (2000) 25-hydroxycholesterol activates a cytochrome c release-mediated caspase cascade. Biochem Biophys Res Commun 278: 557-563.

• **Yano S, Tokumitsu H, Soderling TR.** (1998). Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. Nature 396: 584-587.

• **Yao PM, Tabas I.** (2001) Free cholesterol loading macrophage is associated with widespread mitochondrial dysfunction and activation of the mitochondrial apoptosis pathway. J Biol Chem 276: 42468-42476.

• **Yeagle PL**. (1991) Modulation of membrane function by cholesterol. Biochimie 73: 1303-1310.

• **Yin XM**. (2000) Signal transduction mediated by Bid, a pro-death Bcl-2 family proteins, connects the death receptor and mitochondria apoptosis pathways. Cell Res 10:161-167.

• **Yin KJ**, **Hsu CY**, **Hu XY**, **Chen H**, **Chen SW**, **Xu J**, **Lee JM**. (2006) Protein phosphatase 2A regulates bim expression via the Akt/FKHRL1 signaling pathway in amyloid-beta peptide-induced cerebrovascular endothelial cell death. J Neurosci 26 : 2290-2299.

• **Yuan XM, Li W, Brunk UT, Dalen H, Chang YH, Sevanian A.** (2000) Lysosomal destabilization during macrophage damage induced by cholesterol oxidation products. Free Radic Biol Med 28: 208-218.

Z

- **Zamzami N, Kroemer G.** (2001) The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. Nat Rev Mol Cell Biol 2: 67-71.
- **Zhang H, Xu Q, Krajewski S, Krajewska M, Xie Z, Fuess S, Kitada S, Pawlowski K, Godzik A, Reed JC.** (2000) BAR: An apoptosis regulator at the intersection of caspases and Bcl-2 family proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 97 : 2597-2602.
- **Zhang K, Kaufman RJ.** (2004) Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic réticulum. J Biol Chem 279: 25935-25938.
- **Zhou Q, Jimi S, Smith TL, Kummerow FA.** (1991) The effect of 25-hydroxycholesterol on accumulation of intracellular calcium. Cell Calcium 12: 467-476.
- **Zhou Q, Snipas S, Orth K, Muzio M, Dixit VM, Salvesen GS**. (1997) Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases. J Biol Chem 272 : 7797-7800.
- **Zhou YF, Yu ZX, Wanishawad C, Shou M, Epstein SE.** (1999) The immediate early gene products of human cytomegalovirus increase vascular smooth muscle cell migration, proliferation and expression of PDGFβ-receptor. Biochem Biophys Res Commun 256: 608-613.
- **Zhu W, Cowie A, Wasfy GW, Penn LZ, Leber B, Andrews DW**. (1996) Bcl-2 mutants with restricted subcellular location reveal spatially distinct pathways for apoptosis in different cell types. EMBO J 15: 4130-4141.
- **Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X.** (1997) Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. Cell 90: 405-413.

Liste de publications et communications

Publications dans des revues internationales à comité de lecture

2004

04.1 - Kahn E, **Vejux A,** Lizard G, Bessède G, Frouin F, Prunet C, Bernengo JC, Brau F, Todd-Pokropek A, Gambert P. (2004) Analysis of the fluorescence of monodansylcadavérine-positive cytoplasmic structures during 7-ketocholesterol-induced cell death. ***Anal Quant Cytol Histol*** **26**(1): 47-56.

04.2 - Kahn E, **Vejux A**, Dumas D, Montange T, Frouin F, Robert V, Riedinger JM, Stoltz JF, Gambert P, Todd-Pokropek A, Lizard G. (2004) FRET multiphoton spectral imaging microscopy of 7-ketocholesterol and nile red in U937 monocytic cells loaded with 7-ketocholesterol. ***Anal Quant Cytol Histol*** **26**(6): 304-313.

2005

05.1 - Vejux A, Kahn E, Dumas D, Bessède G, Menetrier F, Athias A, Riedinger JM, Frouin F, Stoltz JF, Ogier-Denis E, Todd-Pokropek A, Lizard G. (2005) 7-Ketocholesterol favors lipid accumulation and colocalizes with Nile Red positive cytoplasmic structures formed during 7-ketocholesterol-induced apoptosis: Analysis by flow cytometry, FRET biphoton spectral imaging microscopy, and subcellular fractionation. ***Cytometry*** 64A(2):87-100.

05.2 - Berthier A, Lemaire-Ewing S, Prunet C, Montange T, **Vejux A**, Pais De Barros JP, Monier S, Gambert P, Lizard G, Néel D. (2005) 7-ketocholesterol induced apoptosis: involvement of several pro-apoptotic but also anti-apoptotic calcium-dependent transduction pathways. ***FEBS J*** 272: 3093-3104.

05.3 - Lemaire-Ewing S, Prunet C, Monier S, Montange T, **Vejux A**, Berthier A, Bessède G, Corcos L, Gambert P, Néel D, Lizard G. (2005) Comparison of cytotoxic, pro-oxidant and pro-inflammatory characteristics of different oxysterols. ***Cell Biol Toxicol*** 21: 97-114.

2006

06.1 - Kahn E, **Vejux A**, Menetrier F, Maiza C, Hammann A, Sequeira-Legrand A, Frouin F, Tourneur Y, Brau F, Riedinger JM, Steinmetz E, Todd-Pokropek A, Lizard G. (2006) Analysis of CD36 expression on human monocytic cells and atherosclerotic tissue sections with quantum dots. Investigation by flow cytometry and spectral imaging microscopy. ***Anal Quant Cytol Histol*** 28(1):14-26.

06.2 - Prunet C, Montange T, **Vejux A,** Laubriet A, Rohmer JF, Riedinger JM, Athias A, Lemaire-Ewing S, Néel D, Petit JM, Steinmetz E, Brenot R,Gambert P, Lizard G. (2006) Multiplexed Flow Cytometric Analyses of Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines in the Culture Media of Oxysterol-Treated Human Monocytic Cells and in the Sera of Atherosclerotic Patients. ***Cytometry*** 69(5):359-373.

06.3 - Malvitte L, Montange T, Joffre C, **Vejux A**, Maiza C, Bron A, Creuzot-Garcher C, Lizard G. (2006) Analogies between atherosclerosis and age-related maculopathy: expected roles of oxysterols. ***J Fr Ophtalmol*** 29(5):570-578.

06.4 - Malvitte L, Montange T, **Vejux A**, Baudouin C, Bron AM, Creuzot-Garcher C, Lizard G. (2006) Measurement of inflammatory cytokines by multicytokine assay in tears of glaucoma patients topically treated with chronic medications**.** ***Br J Ophthalmol*** (sous presse)

06.5 - Kahn E, Menetrier F, **Vejux A**, Montange T, Dumas D, Riedinger JM, Frouin F, Tourneur Y, Brau F, Stoltz JF, Lizard G. (2006) Spectral imaging multiphoton microscopy analysis of CD36 expression with quantum dots 605 of untreated- and 7-ketocholesterol-treated human monocytic cells. ***Anal Quant Cytol Histol*** (sous presse)

06.6 - **Vejux A,** Kahn E, Ménétrier F, Montange T, Lherminier J, Riedinger JM, Lizard G**.** (2006) Cytotoxic oxysterols indce caspase-independent myelin figure formation and caspase-dependent polar lipid accumulation. ***Histochemistry and Cell Biology*** (soumis) page 137.

06.7 - **Vejux A,** Lizard G, Tourneur Y, Riedinger JM, Frouin F, Kahn E**.** (2006) Effects of caspase inhibitors (z-VAD-fmk, z-VDVAD-fmk) on Nile Red fluorescence pattern in 7-ketocholesterol-treated cells: investigation by flow cytometry and spectral imaging microscopy. ***Cytometry*** (soumis) page 139

06.8 - **Vejux A**, Lizard G. (2006) Vitamin E impairs phospholipidosis and counteracts the inactivation of the PI3-K / PDK-1 / Akt signalling pathway associated with 7-ketocholesterol-induced apoptosis. ***Cell Death Differ*** (soumis) page 141

Revue Générale

2005

- Montange T, **Vejux A**, Labenne M, Poncelet P, Gouyon JB, Lizard G. (2005) Cytométrie en flux, microbilles et analyses biomoléculaires multiplexes. ***Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*** 20 : 2-10.

Communications Affichées

2004

-Analyse par microscopie confocale spectrale de la fluorescence des structures cytoplasmiques positives à la monodansylcadavérine lors de la mort cellulaire induite par le 7-cétocholestérol.
Anne Vejux, Edmond Kahn, Ginette Bessède, Philippe Gambert, Gérard Lizard
1er Congrès de la Nouvelle Société Française d'Athérosclérose (10-12 juin 2004, Biarritz)

2005

-Accumulation intracellulaire de lipides neutres et polaires au cours de la mort cellulaire induite par le 7-cétocholestérol : analyse par cytométrie en flux, microscopie confocale et fractionnement cellulaire.
Anne Vejux, Edmond Kahn, Philippe Gambert, Gérard Lizard
XIème Forum des Jeunes Chercheurs (9-10 juin 2005, Dijon).

-In situ characterization of lipids interaction and localization with Nile Red : analysis by FRET multi-photo spectral imaging microscopy.
Edmond Kahn, **Anne Vejux**, Dominique Dumas, Frédérique Frouin, Gérard Lizard
10ème Congrès Annuel de l'Association Française de Cytométrie en Flux (5-7 octobre 2005, Grenoble).

-Investigation of lipid interaction and localization with nile red by fret multiphoton confocal spectral imaging.

Edmond Kahn, **Anne Vejux**, Dominique Dumas, Frédérique Frouin, Gérard Lizard

Lipid functions in membrane dynamics (Congrès de la SBCF; 7-8 novembre 2005, Paris)

-7-ketocholesterol- and 7β-hydroxycholesterol-induced cell death is preceded and associated with various cytoplasmic and membranous lipid modifications.

Anne Vejux, Edmond Kahn, Gérard Lizard

Lipid functions in membrane dynamics (Congrès de la SBCF; 7-8 novembre 2005, Paris)

-Evaluation of the cytotoxic and pro-inflammatory properties of sitostanetriol: comparative analysis with 7-ketocholesterol.

Anne Vejux, Lucy Martine, Thomas Montange, Catherine Cordelet, Philippe Gambert, André Grandgirard, Gérard Lizard

1ère Journée scientifique commune NSFA/DGAF/AGLA (1-2 décembre 2005, Dijon)

2006

-Assessment of the toxicity of cholesterol oxides on retinal pigment epithelial cultured cells.

Laure Malvitte, Thomas Montange, Corinne Joffre, **Anne Vejux**, Gérard Lizard, Alain Bron, Catherine Creuzot-Garcher

Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Annual Meeting, (30 avril-4 mai 2006), Fort Lauderdale, Floride, USA

-Fluorochrome-labeled inhibitors of caspases (FLICA) stains cells with fragmented, condensed and swollen nuclei during 7-ketocholesterol-induced cell death.

Anne Vejux, Thomas Montange, Edmond Kahn, Gérard Lizard

ISAC XXIII International Congress (20-24 mai 2006), Quebec City, Canada

-Spectral imaging multiphoton microscopy analysis of CD36 expression with quantum dots 605 of 7-ketocholesterol-treated human monocytic cells and human atherosclerotic tissue sections.

Edmond Kahn, **Anne Vejux**, Dominique Dumas, Frédérique Frouin, Gérard Lizard

ISAC XXIII International Congress (20-24 mai 2006), Quebec City, Canada

-Relation entre la formation des structures myéliniques, l'accumulation de lipides polaires et l'activation des caspases durant la mort cellulaire par apoptose induite par les oxystérols.
Anne Vejux, Edmond Kahn, Franck Menetrier, Gérard Lizard
XIIème Forum des Jeunes Chercheurs (8-9 juin 2006, Besançon).

-Imagerie spectrale et par cytométrie en flux de l'expression de CD36 à l'aide de quantum dots 605 : étude sur des monocytes humains traités au 7-cétocholestérol et sur des coupes d'artères humaines athéromateuses.
Edmond Kahn, **Anne Vejux**, Dominique Dumas, Yves Tourneur, Frédérique Frouin, Gérard Lizard
11ème congrès annuel de l'Association Française de Cytométrie (18-20 octobre 2006, Bruges, Belgique)

-Analyses biologiques réalisables sur un cytomètre en flux équipé d'un laser vert.
Thomas Montange, **Anne Vejux**, Edmond Kahn, Gérard Lizard
11ème congrès annuel de l'Association Française de Cytométrie (18-20 octobre 2006, Bruges, Belgique)

Communication orale

2006

-Lipid interaction and localization with Nile Red by FRET multiphoton confocale spectral imaging.
Edmond Kahn, **Anne Vejux**, Dominique Dumas, Frédérique Frouin, Gérard Lizard
ISAC XXIII International Congress (20-24 mai 2006), Quebec City, Canada

Publication Internet

2005

-**Anne Vejux** , Edmond Kahn, Gérard Lizard. Lipid accumulation during 7-ketocholesterol-induced apoptosis: investigation by flow cytometry, FRET bi-photon spectral imaging microscopy and subcellular fractionation. **International Society of Atherosclerosis Web Site**, Commentaries, June 2005. www.athero.org

ABSTRACT

Atherosclerosis is a complex and chronic arterial process which is characterized by a remodeling of the vascular wall, associated with inflammatory reactions, cellular proliferation and cell death, and with accumulation of oxidized lipids among which oxysterols (cholesterol oxidation products) might play key roles in the initiation and development of atheromatous lesions.

This work was performed on U937 and THP1 promonocytic human cells, rat aorta embryonic A7R5 cells, and human breast carcinoma MCF7 cells (caspase-3 deficient). Different oxysterols, present in large amount in atheromatous lesions, were used: 7-ketocholesterol (7KC), 7β-hydroxycholesterol, 25-hydroxycholesterol, cholesterol-5α, 6α-epoxide, cholesterol-5β, 6β-epoxide.

The first part of the work shown that 7KC-induced cell death was a complex phenomenon with some apoptotic characteristics accompanied by a synthesis of cytoplasmic multilamellar structures called myelin figures revealed by transmission electron microscopy. The synthesis of these structures is an early phenomenon preceding the cytotoxic effects : loss of mitochondrial membrane potential, increase permeability of propidium iodide, and modifications of nuclear morphology (condensation, fragmentation, swelling of the nuclei). The isolation of these structures by subcellular fractionation after staining with monodansylcadaverine or Nile Red (emitting a yellow and a red fluorescence in the presence of neutral and polar lipids, respectively) allowed to determine that they are rich in polar lipids (sphingomyelin, phosphatidylcholine), and in cholesterol, and that they are accumulation sites of 7KC. Within these myelin structures, a co-localization of 7KC with polar lipids was shown by FRET carried out by mono and bi-photon confocal microscopy. The morphological and biochemical characteristics of myelin figures allowed to establish that 7KC is a powerful inducer of phospholipidosis.

By taking into account the quantitative and qualitative lipid modifications induced by 7KC and revealed by Nile Red, the second part of the work specified the relationships between cell death, synthesis of myelin figures, accumulation of polar lipids, and caspase activity. With the different oxysterols studied, myelin figures were only observed with cytotoxic oxysterols (7KC, 7β-hydroxycholesterol, cholesterol-5β,6β-epoxide), and their synthesis was independent of caspase activity. On the other hand, polar lipid accumulation induced by 7KC was inhibited in the presence of z-VAD-fmk (caspase broad spectrum inhibitor) and of z-VDVAD-fmk (caspase-2 inhibitor). These results suggest that some caspases, including caspase-2, can contribute to polar lipid accumulation.

The third part of the work consisted to study the effects of Vitamin E (VitE) on 7KC-induced cell death. Interestingly, VitE counteracts 7KC-induced-cell death, and the related events : phospholipidosis, membrane lipid modifications, inactivation of the PI3-K/c-Akt signaling pathway, dephosphorylation of PDK-1 and c-Akt, and degradation of the pro-form of caspase-2L.

Altogether, this work reveals some relationships between oxysterol-induced cell death and lipid metabolism. It also demonstrates that VitE, which protects from 7KC-induced-cell death, acts on various cellular compartments, and can impair 7KC-induced lipid modifications.

KEYWORDS : Atherosclerosis – Oxysterols – Apoptosis – Cell Death – Caspase-2 – Lipids – Vitamin E – Phospholipidosis

RESUME

L'athérosclérose est une pathologie artérielle complexe à évolution lente définie par un remodelage de la paroi vasculaire, associée à des réactions inflammatoires, à des processus de prolifération, de mort cellulaire et à une accumulation de lipides oxydés tels que les oxystérols (dérivés oxydés du cholestérol) dont le rôle est fortement suspecté dans le développement de l'athérome.

Le travail réalisé a été effectué sur des cellules monocytaires humaines U937 et THP-1, aortiques de rat A7R5 et carcinomateuses humaines MCF-7 (déficientes en caspase-3). Différents oxystérols, présents en quantité importante dans les lésions athéromateuses, ont été utilisés (7-cétocholestérol (7KC), 7β-hydroxycholestérol, 25-hydroxycholestérol, cholestérol-5α, 6α-epoxide, cholestérol-5β, 6β-epoxide) ainsi que du cholestérol.

La première partie du travail a montré que la mort cellulaire induite par le 7KC est un phénomène complexe présentant des caractéristiques apoptotiques accompagnées d'une synthèse de structures multilamellaires cytoplasmiques appelées corps myéliniques visualisés par microscopie électronique à transmission. La synthèse rapide de ces structures précède les effets cytotoxiques : chute du potentiel membranaire mitochondrial, augmentation de la perméabilité à l'iodure de propidium et modifications de la morphologie nucléaire (condensation, fragmentation, gonflement des noyaux). L'isolement de ces structures par ultracentrifugation après coloration à la monodansylcadavérine (fluorochrome lysosomotropique acide) ou au Nile Red (fluorescence jaune en présence de lipides neutres et rouge en présence de lipides polaires) a permis de montrer qu'elles sont riches en lipides polaires (sphingomyéline, phosphatidylcholine) et en cholestérol et qu'elles accumulent le 7KC. Au sein de ces corps myéliniques, une co-localisation du 7KC avec les lipides polaires a été démontrée par la technique de FRET réalisée par microscopie confocale mono- et bi-photonique. Les caractéristiques morphologiques et biochimiques des figures myéliniques ont permis d'établir que le 7-cétocholestérol est un puissant inducteur de phospholipidose.

Compte tenu des modifications lipidiques spatiotemporelles, quantitatives et qualitatives, induites par le 7KC et révélé par le Nile Red, la seconde partie du travail a précisé les relations entre la mort cellulaire, la synthèse de corps myéliniques, l'accumulation de lipides polaires et l'activité caspase. Avec les différents oxystérols étudiés, les corps myéliniques ne sont observés qu'avec des composés cytotoxiques (7KC, 7β-hydroxycholestérol, cholestérol-5β, 6β-epoxide) et leur synthèse est indépendante d'activité caspase. En revanche, l'accumulation de lipides polaires induite par le 7KC est inhibée en présence de z-VAD-fmk (inhibiteurs de caspases large spectre) et de z-VDVAD-fmk (inhibiteur de caspase-2). Certaines caspases et en particulier la caspase-2 pourraient contribuer à l'accumulation de lipides polaires.

La troisième partie du travail a conduit à étudier les effets de la Vitamine-E (VitE) sur la mort cellulaire induite par le 7KC en raison de ses propriétés anti-apoptotiques et anti-oxydantes. La VitE protège de la mort cellulaire induite par le 7KC. Les effets protecteurs pourraient en partie être dus à la capacité de la VitE à maintenir fonctionnelle la voie PI3-K/c-Akt en s'opposant aux déphosphorylations de PDK-1 et de c-Akt, et en préservant l'activité PI3-K. Par ailleurs, la VitE s'oppose aux modifications lipidiques au niveau de la membrane cytoplasmique et à l'accumulation de lipides polaires. La VitE réduit aussi la dégradation de la pro-forme de la caspase-2L et augmente les taux d'ARNm correspondants.

Ces travaux montrent des relations entre la mort cellulaire induite par des oxystérols et le métabolisme des lipides. Ils révèlent aussi que la VitE protège de la mort induite par le 7KC en agissant au niveau de la voie PI3-K/c-Akt. Par ailleurs, la VitE s'oppose aux modifications lipidiques membranaires et cytoplasmiques associées à la mort cellulaire induite par le 7KC.

MOTS-CLES : Athérosclérose – Oxystérols – Apoptose – Mort cellulaire – Caspase-2 – Lipides – Vitamine-E – Phospholipidose

DISCIPLINE : Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

INSERM U498
Métabolisme des lipoprotéines humaines et interactions vasculaires
Hôpital du Bocage, BP 77 908
21 079 Dijon Cedex