

50376
1989
73

50376
1989
73

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE FLANDRES-ARTOIS

N° d'ordre 346

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE OPTION BIOCHIMIE

présentée par
Françoise MARTIN-NIZARD

**HOMEOSTASIE DES LIPIDES CEREBRAUX :
ROLE DES LIPOPROTEINES DE HAUTE DENSITE (HDL)**



Soutenu et présentée le 5 Mai 1989

Jury :

Pr Jean MONTREUIL
Pr Jean-Charles FRUCHART
Pr André NOUVELOT
Pr Christiane DELBART
Pr Jean MALECHA

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

*A JEAN LOUIS ET A PIERRICK
A MES PARENTS
A TOUS CEUX QUE J'AIME*

Je tiens à remercier plus particulièrement les membres du jury

Le Professeur Jean Montreuil qui m'a fait l'honneur de présider cette thèse et ce malgré ses multiples charges.

Le Professeur Jean Charles Fruchart qui m'a accueillie au SERLIA et m'a toujours témoigné sa confiance.

Le Professeur André Nouvelot qui m'a procuré l'opportunité de travailler dans le domaine des lipides en initiant ce travail

Le Professeur Jean Malecha qui a eu l'amabilité d'accepter de juger ce travail.

Le Professeur Christiane Delbart qui m'a aidée à réaliser ce travail et dont les compétences scientifiques et humaines ne m'ont jamais fait défaut tout au long de ces quatre années. Je tiens à lui signifier ma plus sincère gratitude.

**L'aboutissement de ce travail me donne l'occasion de témoigner ma
profonde reconnaissance à tous ceux qui m'ont aidée au cours de ces années**

**L'équipe du Serlia et du laboratoire de Toxicologie qui prouvent
quotidiennement que la recherche se fait aussi avec enthousiasme et bonne
humeur**

**Stéphane, Geneviève, Jacques et Didier pour leur aide scientifique et
technique**

Michèle et Sophie pour la réalisation de ce document

PUBLICATIONS, COMMUNICATIONS ORALES ET AFFICHEES

1-Analysis of phospholipids transfer during HDL binding to platelets using a fluorescent analog of phosphatidyl choline.

F.MARTIN-NIZARD, B.RICHARD, G.Torpier, J.C. FRUCHARD, P.DUTHILLEUL, C.DELBART
Thrombosis Research, 1987, 47, 811-825

2-Apport d'acides gras polyinsaturés au cerveau pendant la période de myélinisation.
C.DELBART, F.MARTIN-NIZARD

Communication orale, CEA, 22 septembre 1986

3-Analyse de transfert de phospholipides entre HDL et plaquettes.

F.MARTIN-NIZARD

Rapport d'activité, communication orale pour le groupe lipides nutrition.

Paris, 20 novembre 1986

4-Internalisation intra-plaquettaire de lipoprotéines de haute densité (HDL) et transfert de phospholipides.

F.MARTIN-NIZARD, B.RICHARD, P.DUTHILLEUL, C.DELBART

Communication au groupe d'études sur l'hémostase et la thrombose,

Paris, 3-4 avril 1987

5-Fixation, internalisation et relargage sous forme modifiées de lipoprotéines de basse densité (LDL) par les plaquettes.

B.RICHARD, F.MARTIN-NIZARD, C.DELBART, P.DUTHILLEUL

Communication orale et résumé faits dans le cadre du groupe d'études sur l'hémostase et la thrombose, Paris, avril 1987

6-Lower capacity of cerebrotendinous xanthomatosis patient LDL to be metabolized by cultured cells.

F.MARTIN-NIZARD, G.AGNANI, V.CLAVEY, C.DELBART.

Communication au symposium international: cholesterol control and cardiovascular diseases, prevention and therapy. Milan, july 7-9, 1987

7-Interactions of HDL with endothelial cells of brain capillaries.

F.MARTIN-NIZARD, S.MERESSE, J.C.FRUCHART, C.DELBART

Fondation de recherche sur l'athérosclérose, Bruxelles 17-18-19 mars 1988

9-Interactions of HDL3 with brain capillary endothelium.

F.MARTIN-NIZARD, S.MERESSE, J.C.FRUCHART, C.DELBART.

Communication à European Society for Neurochemistry Göteborg 12-17 june 1988.

10-Interaction between apo E free High Density Lipoprotein and brain capillary endothelial cells.

F. MARTIN-NIZARD, S.MERESSE, R. CECHELLI, J.C.FRUCHART, C.DELBART.

soumis à publication BBA

11-High Density Lipoprotein(HDL) and phosphatidyl-choline hydrolysis in platelets

D.DEVRED, F.MARTIN-NIZARD, J.C.FRUCHART, C.DELBART.

soumis à publication BBA

ABREVIATIONS

AA : Acide aminé
ABAE : Cellules endothéliales d'aorte de boeuf
AC : Acide cholique
ACDC : Acide chenodésoxycholique
ACE : Enzyme de conversion de l'angiotensine
AG : Acide gras
AGPI : Acide gras polyinsaturé
Apo : Apolipoprotéine=Apoprotéine
BBCE : cellules endothéliales de capillaires cérébraux de boeuf
BHE : Barrière hémato-encéphalique
CE : Cholesterol esterifié
CL : Cholesterol libre = Cholesterol non esterifié
CML : Cellules musculaires lisses
DAG : Diacyl glycérol
ELISA : dosage immunoenzymatique (Enzyme linked immunoassay)
bFGF : Fibroblast growth factor basique
flu : fluorescent
gamma-GT : gamma-glutamyl transpeptidase
HDL : Lipoprotéine de haute densité (High Density Lipoprotein)
HMG-CoA réductase : 3-hydroxy-3 méthylglutamyl- Coa réductase
IDL : Lipoprotéine de densité intermédiaire (Intermediary Density Lipoprotein)
IGF : Insuline like growth factor
¹²⁵I-LP : Lipoprotéine marquée à l'iode 125
Ka : Constante d'association
Kd : Constante de dissociation
LCR : Liquide céphalo rachidien
LDL : Lipoprotéine de basse densité (Low Density Lipoprotein)
LH : Hormone lutéotrope (Luteinizing Hormone)
LPDS : Sérum sans lipoprotéines (Lipoprotein Deficient Serum)
Lp : particule lipoprotéinique
MAO : Mono amine oxydase
ME : Mobilité électrophorétique
MEC : Matrice extracellulaire
MM : Masse moléculaire
NBD : 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3 diazol
PBS-CMF : Tampon phosphate (Phosphate buffer saline Ca, Mg Free)
PC : Phosphatidyl choline
PE : Phosphatidyl ethanolamine
PI : Phosphatidyl inositol
PL : Phospholipide
PLA₂ : Phospholipase A₂
PLC : Phospholipase C
PM : Poids moléculaire
PPP : Plasma pauvre en plaquette
PS : Phosphatidyl sérine
SAB : Sérum albumine bovine
SV : Sérum de veau
SVF : Sérum de veau foetal
SNC : Système nerveux central
TG : Triglycéride
VHDL : Lipoprotéine de très haute densité
VLDL : Lipoprotéine de très basse densité (Very Low Density Lipoprotéin)
XCT : Xanthomatose cérébro-tendineuse

T A B L E D E S M A T I E R E S

| | |
|--|-----|
| . INTRODUCTION..... | 1 |
| . CHAPITRE I : LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE..... | 4 |
| . CHAPITRE II : LIPIDES ET BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE..... | 28 |
| . CHAPITRE III : LES ECHANGES LIPIDIQUES..... | 58 |
| . TRAVAUX PERSONNELS - RESULTATS ET DISCUSSION | |
| . CHAPITRE I : MISE AU POINT D'UN MODELE DE VECTEUR LIPIDIQUE..... | 77 |
| . CHAPITRE II : ETUDE <u>IN VIVO</u> DES ECHANGES LIPIDIQUES ENTRE HDL ₃ ET B.H.E..... | 95 |
| . CHAPITRE III : ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE LIPOPROTEINES DE HAUTE DENSITE ET LES CELLULES ENDOTHE- LIALES DE LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE... | 105 |
| . CHAPITRE IV : DYSFONCTIONNEMENT DES HDL ₃ ET XANTHOMATOSE CEREBRO-TENDINEUSE..... | 125 |
| . CONCLUSION ET PERSPECTIVES..... | 147 |
| . FICHES TECHNIQUES..... | 151 |
| . BIBLIOGRAPHIE..... | 191 |

Un plan détaillé figurera en début de chaque chapitre

I N T R O D U C T I O N

INTRODUCTION

Une des caractéristiques du système nerveux central est son extraordinaire richesse en lipides qui le distingue, à l'instar du tissu adipeux, des autres tissus de Mammifères. En effet les lipides représentent plus de la moitié du poids sec du cerveau et sont essentiellement des lipides structuraux non énergétiques qui participent à l'élaboration des membranes neuronales, des gaines de myéline et sont donc indispensables au bon fonctionnement cérébral.

Ces lipides cérébraux sont constitués de deux grands types d'acides gras :

- d'une part d'acides gras saturés et monoinsaturés pour la synthèse desquels le système nerveux possède tous les systèmes enzymatiques. Cependant certaines études ont montré que pour ces acides gras un apport exogène, variable suivant l'étape du développement cérébral était nécessaire.

- d'autre part d'acides gras polyinsaturés ou AGPI qui peuvent être synthétisés à partir des acides gras essentiels puisque le système nerveux à l'instar du foie, possède les enzymes d'élongation et de désaturation nécessaires à leur synthèse.

Toutefois les enzymes clefs de la synthèse des acides gras polyinsaturés sont très actifs dès les premiers mois du développement cérébral ; puis leur activité ne fait que décroître pour être insignifiante à l'âge adulte. Par contre les mêmes enzymes hépatiques ont une évolution inverse. Après la période de myélinisation, les AGPI sont synthétisés pratiquement exclusivement au niveau du foie. Une captation d'AGPI hépatiques déversés dans la circulation semble être la source majeure d'AGPI pour le cerveau.

Nous nous sommes intéressés au transport des acides gras vers le système nerveux central car si de nombreuses études ont permis d'élucider le mécanisme de passage des sucres et des acides aminés vers le cerveau, les mécanismes mis en jeu pour la captation des acides gras sont encore inconnus. En effet les modalités de cet apport lipidique à travers la barrière hémato-encéphalique seront très différentes de celles qui caractérisent un endothélium artériel, puisque le système capillaire cérébral est défini par la présence de jonctions serrées entre les cellules et par la rareté des vésicules d'endocytose.

Plusieurs problèmes se posaient à nous et en premier lieu le choix du transporteur sérique. Diverses macromolécules telles que les lipoprotéines ou la sérum albumine peuvent se charger en acides gras et les véhiculer jusqu'au cerveau.

Les travaux de NOUVELOT et coll. reliant régime et répartition des acides gras polyinsaturés dans les lipoprotéines de rat ont orienté notre choix vers l'étude du rôle des HDL dans le transport des acides gras vers le cerveau. De plus ces lipoprotéines ont la particularité d'être riches en phospholipides très insaturés.

Afin de mettre en évidence les modalités des transferts lipidiques entre le sang et le cerveau nous avons choisi d'utiliser des lipoprotéines dont l'acide gras des phospholipides porte une sonde fluorescente, le 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3 diazole ou NBD. Dans un premier temps nous avons validé ce modèle de vecteur lipidique sur des membranes plaquettaires, afin de l'utiliser in vivo. Des études in vivo chez le rat en période de myélinisation ont permis de définir les phénomènes de captation et d'échanges lipidiques au niveau du tissu cérébral après injection intraveineuse de lipoprotéines chargées en phospholipides porteurs de la sonde fluorescente.

Si les HDL₃ servent de vecteurs lipidiques pour le cerveau et assurent un certain approvisionnement en AGPI, elles se trouvent confrontées à la sélectivité de la B.H.E. qui régule les échanges entre le sang et le cerveau

A une étude sur la sélectivité des transferts d'acides gras, nous avons préféré une étude des mécanismes qui conditionnent les échanges lipidiques entre les lipoprotéines et le cerveau. Les questions générales qui se posaient étaient les suivantes :

- existe-t-il des interactions spécifiques entre les lipoprotéines et les cellules endothéliales de capillaires cérébraux comparables à celles décrites pour d'autres endothéliums et impliquant des récepteurs spécifiques ?

- quelles sont les modalités de transfert des lipides des lipoprotéines vers la cellule endothéliale dont les mécanismes d'endocytose et de transcytose sont presque inexistantes ?

Ces mêmes questions seront posées dans le cadre d'une perturbation des échanges lipidiques entre le sang et la barrière hémato-encéphalique qui caractérise la xanthomatose cérébro-tendineuse.

Ces études ont été réalisées sur des cellules endothéliales de capillaires cérébraux en culture. Nous avons recherché l'existence d'un récepteur spécifique pour les HDL₃ et défini les événements intracellulaires (internalisation et dégradation) qui peuvent être impliqués dans l'approvisionnement cérébral en acides gras.

C H A P I T R E I

LA BARRIÈRE HEMATO-ENCEPHALIQUE

CHAPITRE I : LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE

| | |
|---|----|
| I - <u>ANATOMIE DE LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE (B.H.E.)</u> | 4 |
| I.1. B.H.E. : Evolution d'un concept..... | 4 |
| I.2. B.H.E. : Son anatomie..... | 7 |
| I.2.1. Le capillaire cérébral : sa structure | 7 |
| I.2.1.1. Les cellules endothéliales de capillaires cérébraux..... | 8 |
| a) Richesse en mitochondries | 8 |
| b) Vésicules endothéliales | |
| c) Canaux transendothéliaux | 9 |
| d) Jonctions intercellulaires | 9 |
| e) Facteurs VIII/Von Willebrand et corps de Weibel Palade | 9 |
| f) Non trombogénicité et prostacycline..... | 10 |
| g) Autres caractères biochimiques..... | 10 |
| I.2.1.2. Environnement péri-endothélial..... | 11 |
| a) Lamelle basale ou membrane basale..... | 11 |
| b) Péricytes..... | 11 |
| c) Astrocytes | 11 |
| I.2.2. B.H.E. : Une spécialisation cellulaire | 11 |
| a) Cellules endothéliales : base réelle de la B.H.E. | 12 |
| b) Rôle de l'environnement péri-endothélial | 12 |
| c) Rôle des astrocytes | 13 |
| I.2.3. B.H.E. : Un caractère inductible..... | 13 |
| a) Ontologie de la B.H.E..... | 13 |
| b) B.H.E. : une propriété instable..... | 13 |
| c) Hypothèse d'une induction..... | 15 |
| II - <u>FONCTIONNEMENT DE LA B.H.E.</u> | 16 |
| II.1. Les contraintes | 18 |
| II.2. Transport des petites molécules et polarité de la B.H.E..... | 18 |

| | |
|--|----|
| II.2.1. Une répartition différentielle des transporteurs | 18 |
| II.2.2. Quelques exemples de fonctionnement de la B.H.E. | 20 |
| a) Transport ne nécessitant pas d'apport d'énergie | 20 |
| b) Transport nécessitant un apport d'énergie | 22 |
| c) Transports couplés à une modification métabolique | 22 |
| II.2.3. Polarité : un caractère inductible et labile | 22 |
| a) Rôle des cellules gliales dans la polarité de la B.H.E. | 22 |
| b) Modification de la polarité | 23 |
| II.3. Transport des macromolécules | 23 |
| II.3.1. La présence de récepteurs spécifiques | 23 |
| II.3.2. B.H.E. et transport des macromolécules | 25 |
| a) Transport de l'insuline | 25 |
| b) Transport de la transferrine | 25 |
| c) Transport de l'insuline - Like Growth Factors (IGF) ... | 26 |
| d) Transport de l'albumine cationisée | 26 |
| II.4. Conclusion | 27 |

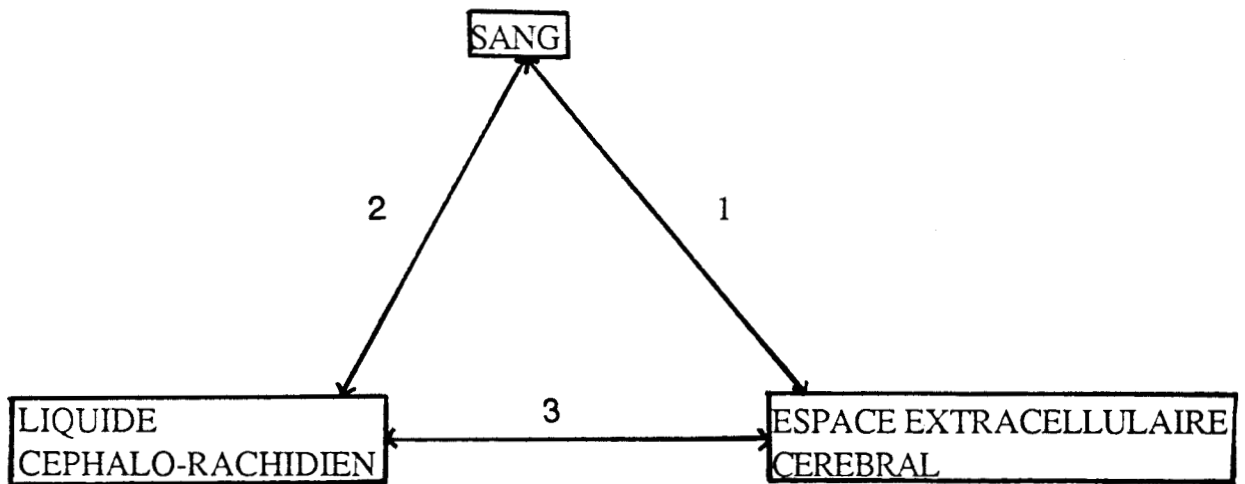
I - ANATOMIE DE LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE (B.H.E.)

I.1 B.H.E. : EVOLUTION D'UN CONCEPT

Les informations actuelles sur la barrière hémato-encéphalique (B.H.E.) résultent de recherches déjà anciennes. En effet dès 1885, ERLICH observait qu'après injection intraveineuse à de petits animaux, certains colorants atteignaient tous les organes sauf le cerveau, et il concluait que le cerveau présentait une affinité pour les colorants inférieure à celle d'autres tissus. Cette explication était pourtant erronée car l'injection directe de Bleu Trypan dans le liquide céphalo-rachidien (L.C.R.) de lapins et de chiens colorait la totalité du cerveau sans passer dans le sang, de sorte que les autres tissus n'étaient pas atteints (GOLDMAN, 1909). Il était ainsi démontré que le système nerveux central (S.N.C.) était isolé du sang par une sorte de barrière. Cette notion d'obstacle permettait aux physiologistes d'expliquer certains résultats intéressants mais troublants obtenus plusieurs années auparavant, tels que les pertes de conscience et les comas observés lors d'injections intracrâniennes d'acides biliaires ou de ferrocyanure de sodium, pourtant non neurotoxiques lorsqu'ils sont véhiculés par le sang, et pour lesquels le concept d'une perméabilité particulière des petits vaisseaux cérébraux avait été avancé (BIELD et KRAUS, 1898, LEWANDOWSKY, 1900).

La vision que l'on peut avoir actuellement de la B.H.E. est différente. En effet si l'on peut conserver le terme de barrière, il convient de le comprendre non comme un obstacle purement mécanique mais comme une interface réglant les échanges entre le sang et le S.N.C. (HAW et LEFAUCONNIER, 1983). Cette régulation comporte la restriction ou la facilitation du passage de différentes substances dans un sens ou dans l'autre. De plus, ce terme de barrière doit également tenir compte de toutes les interfaces comprises entre le sang, le liquide céphalo-rachidien (L.C.R.) et le cerveau (figure 1). Trois interfaces sont ainsi définies :

FIGURE 1 : BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE AU SENS LARGE DU TERME.

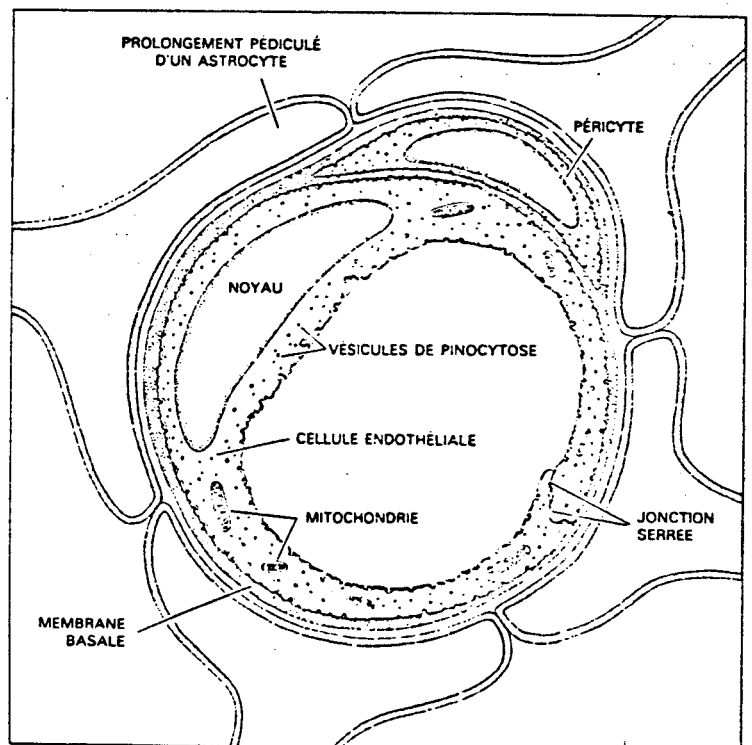
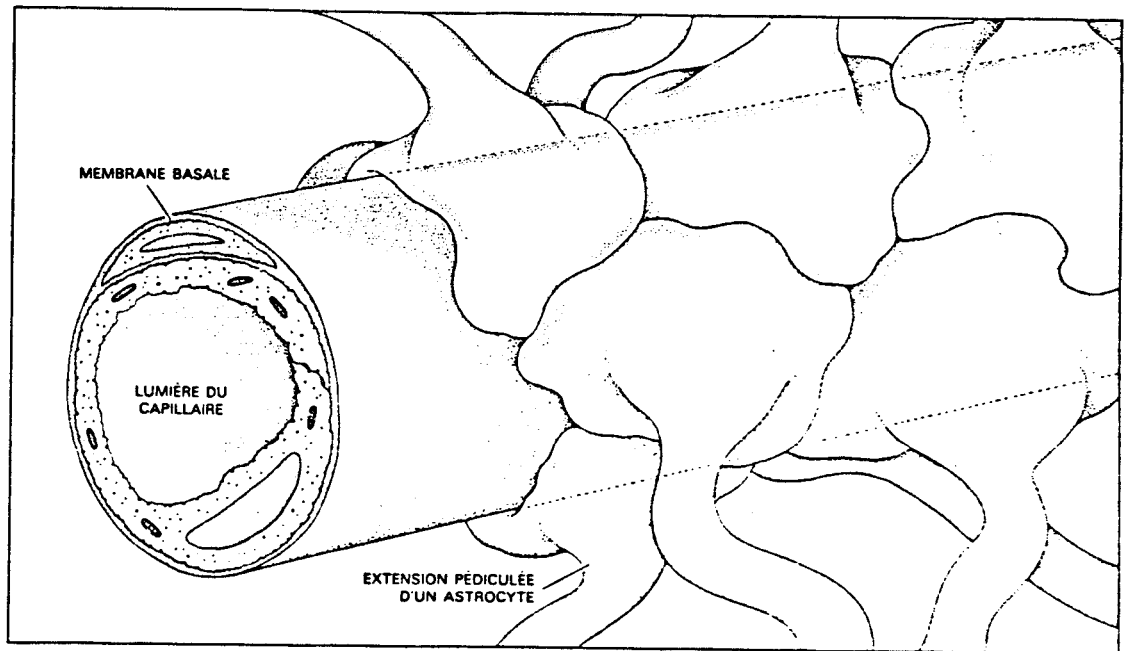


1 : BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE

2 : BARRIERE HEMATO-MENINGEE

3 : BARRIERE EPENDYMAIRE ET PIO-GLIALE

FIGURE 2 : ULTRASTRUCTURE D'UN CAPILLAIRE CEREBRAL.
(d'après Goldstein et Betz, 1986)



- la première entre le sang et le cerveau correspond à la barrière hémato-encéphalique localisée au niveau des capillaires cérébraux,

- la seconde entre le sang et le L.C.R. correspond à la barrière hémato-méningée située au niveau des plexus choroïdes et des villosités arachnoïdiennes,

- et enfin, celle entre le parenchyme et le L.C.R. définit la barrière épendymaire et piogliale.

Pour chaque interface ces systèmes d'échanges sont spécifiques.

Ces interfaces sont interdépendantes et toute modification d'un des milieux entraîne des répercussions sur les autres milieux.

I.2 B.H.E. : SON ANATOMIE

Le premier obstacle entre le sang et le cerveau est le capillaire cérébral.

Ces capillaires cérébraux fournissent le support anatomique de la B.H.E. Toutefois la complexité morphologique de cette structure rend délicate la définition anatomique de cette barrière sang-cerveau.

I.2.1 Le capillaire cérébral : sa structure

Très tôt GOLDMAN (1909) avait supposé que les capillaires cérébraux constituaient l'élément anatomique de la B.H.E., mais cette hypothèse ne fut confirmée qu'avec l'apparition de la microscopie électronique en 1950.

Les capillaires sont constitués (figure 2) d'une monocouche de cellules endothéliales reposant sur une lame basale doublée parfois d'une seconde couche plus externe de péricytes, bordés eux-aussi par une lame basale en continuité avec celle des cellules endothéliales (HADJISKY, 1980). La lame basale est délimitée du côté parenchyme cérébral par une couche ininterrompue d'astrocytes.

I.2.1.1 Les cellules endothéliales de capillaires cérébraux

Ces cellules d'aspect fusiforme, se caractérisent morphologiquement par (HAW et LEFAUCONNIER, 1983) :

- a : leur richesse en mitochondries
- b : la rareté de leurs vésicules
- c : l'absence de canaux transendothéliaux dans des conditions physiologiques normales
- d : et la présence de jonctions serrées intercellulaires

A ces quatre critères anatomiques qui font l'originalité de la B.H.E. s'ajoutent des caractères biochimiques.

a) Richesse en mitochondries

Les mitochondries sont plus abondantes dans les capillaires cérébraux que dans les capillaires du muscle squelettique. Souvent situées dans la région périnucléaire, elles pourraient témoigner d'une activité métabolique particulièrement intense (OLDENDORF et coll., 1977).

b) Vésicules endothéliales

Ces vésicules ont pour origine les phénomènes de pinocytose et d'endocytose par récepteurs.

A l'inverse des autres capillaires de l'organisme où les vésicules endothéliales sont très nombreuses et jouent un rôle important dans la perméabilité, elles sont très rares dans le S.N.C.. Leur nombre est particulièrement faible dans la région voisine de la lumière vasculaire du capillaire cérébral (REESE et KARNOVSKY, 1967). Quelques vésicules recouvertes ont été décrites par HEMMINGS en 1980 mais leur existence et leur rôle restent à démontrer.

c) Canaux transendothélieux

Dans certains capillaires extracérébraux, les vésicules n'apparaissent libres dans le cytoplasme qu'en raison d'incidences de coupes. Elles font en réalité partie d'un système complexe d'invaginations ramifiées en relation avec les deux surfaces des capillaires correspondant aux canaux transendothélieux. Dans les capillaires du S.N.C., la présence d'authentiques canaux transendothélieux n'a jamais été démontrée, toutefois ils pourraient exister dans certaines conditions pathologiques provoquant l'ouverture de la B.H.E. (BEGGS et WAGGENER, 1976). Ces images doivent cependant être interprétées avec précaution en fonction de possibles artéfacts induits lors de l'injection des traceurs et lors de la fixation des tissus.

d) Jonctions intercellulaires

Dans les capillaires cérébraux adultes les jonctions intercellulaires correspondent toujours à des "zonulae occludentes" appelées également jonctions serrées ou tight junctions reliant de façon continue chacune des cellules endothéliales à ses voisines (BRIGHTMAN et REESE, 1969, DERMIETZEL, 1975, STAEHELIN et HULL, 1978).

En cryodécapage, les feuilletts externes de la membrane plasmique de chacune des cellules adjacentes paraissent fusionner et l'espace extracellulaire disparaît (BOWMAN et coll., 1981, 1984).

e) Facteur VIII/Von Willebrand et corps de Weibel Palade

Comme toutes cellules endothéliales, les cellules de capillaires cérébraux se caractérisent par la présence de marqueurs biochimiques bien définis dont le facteur VIII. C'est une glycoprotéine intervenant dans l'adhérence plaquettaire. Il est synthétisé par les cellules endothéliales et les mégacaryocytes avant d'être sécrété dans le plasma (DREYFUS, 1988). Ce marqueur type des cellules endothéliales a été retrouvé dans les cellules endothéliales de capillaires cérébraux isolés de rat et de vache (PHILLIPS et coll., 1979), mais également dans les cultures primaires de cellules endothéliales de capillaires cérébraux de rat (BOWMAN et coll., 1981). Les corps de Weibel Palade probablement impliqués dans le stockage du facteur VIII sont très abondants dans les cellules endothéliales de gros vaisseaux et des capillaires immatures

(KUMAR et coll., 1980). Ils sont pratiquement absents des cellules endothéliales de capillaires cérébraux humains et inexistantes chez le boeuf (HERRLINGER et coll., 1974, HIRANO, 1974).

f) Non trombogénicité et prostacycline

Deux autres caractères spécifiques des cellules endothéliales correspondent à la non-trombogénicité de leurs surfaces (BOOYSE et coll., 1975) et à la production de prostacycline ou PGI₂ prévenant l'agrégation plaquettaire et facilitant le flux sanguin (MACLOUF et BELLUCI, 1986). Ces deux caractères ont été retrouvés au niveau des cellules endothéliales de capillaires cérébraux (BOWMAN et coll., 1981, MAURER et coll., 1980).

g) Autres caractères biochimiques

L'angiotensin converting enzyme ou A.C.E. qui convertit l'angiotensine I en angiotensine II est un puissant agent vasoconstricteur présent dans les cellules endothéliales y compris celles du cerveau (GIMBRONE et coll., 1979).

Plusieurs protéines spécifiques ont été identifiées dans les cellules endothéliales de capillaires cérébraux telles que :

- la monoamine oxydase ou M.A.O. (BERTLER et coll., 1966),
- la gammaglutamyltranspeptidase ou gamma G T (GHANDOUR et coll., 1980, BETZ et coll., 1980),
- la phosphatase alcaline (RENKAWEK et coll., 1976),
- une protéine de 46 KD spécifique des cellules endothéliales de la B.H.E. Elle est absente des neurones, des cellules gliales et des capillaires d'autres tissus (PARDRIDGE et coll., 1986)
- une série d'autres protéines de 14-18 KD et de 50-55 KD (PARDRIDGE et coll., 1985, 1986).

I.2.1.2 Environnement péri-endothélial

a) Lame basale ou membrane basale

La lame basale d'environ 5 nm d'épaisseur entoure les cellules endothéliales et les péricytes des capillaires. Elle comporte des glycoprotéines de structure, du collagène et des protéoglycannes. Des activités enzymatiques telles que la nucléoside phosphatase ou la phosphatase alcaline y ont été trouvées et pourraient être d'origine endothéliale ou péricytaire (LEE, 1982).

b) Péricytes

Les péricytes sont des cellules dont les contours présentent de nombreux prolongements. Ils sont localisés dans l'espace péri-endothélial et entourés par la lame basale dédoublée. Ils comportent très fréquemment des corps denses d'origine lysosomiale témoins d'une activité phagocytaire élevée (KRISTENSSON et OLSSON, 1973).

c) Astrocytes

Les astrocytes ont une forme caractéristique en étoile en relation avec l'existence de longs prolongements pédiculés. Ils forment une couche cellulaire relativement continue autour de la membrane basale. Les jonctions interastrocytaires sont exclusivement de types "gap". Ce sont des jonctions focales, non serrées et non étanches fermant incomplètement l'espace extracellulaire (PETERS et coll., 1976, LEE, 1982).

I.2.2 B.H.E. : une spécialisation cellulaire

La complexité structurale des capillaires cérébraux rend délicate l'identification précise du support anatomique. Seul le développement de la microscopie électronique apportera une réponse.

a) Cellules endothéliales : base réelle de la B.H.E.

Comme les capillaires cérébraux sont en contact très étroit avec les pieds d'astrocytes qui représentent plus de 90% de la composition du capillaire cérébral, SCHALTENBRAND et BAILEY en 1928 émirent l'hypothèse que les astrocytes représentaient le support physique de la B.H.E.

La mise au point de molécules traceuses détectables en microscopie électronique permit de corrélérer cellules endothéliales de capillaires cérébraux et siège anatomique de la B.H.E. Ainsi la micropéroxydase de Raifort (MM : 1800) après injection intraveineuse ne se retrouve que dans la lumière du capillaire. A l'inverse lorsqu'elle est injectée directement dans le L.C.R., elle diffuse lentement entre les astrocytes jusqu'aux jonctions interendothéliales sans être arrêtées par la lame basale et sans subir de transfert vésiculaire vers la lumière sanguine (DELORME et coll., 1975, VAN DEURS, 1980). Sa diffusion est alors bloquée au niveau des jonctions serrées des cellules endothéliales de capillaires cérébraux, démontrant ainsi sans ambiguïté le rôle des cellules endothéliales dans l'expression de la B.H.E.

b) Rôle de l'environnement péri-endothélial

D'une manière générale, la lame basale ne semble pas intervenir dans les phénomènes de différenciation de la B.H.E. De plus son rôle en tant qu'élément de la barrière est controversé. En effet cette lame basale ne paraît pas être un obstacle au transfert de la micropéroxydase (DELORME et coll., 1975, VAN DEURS, 1980) alors qu'elle s'oppose au passage de la ferritine injectée dans le L.C.R. La membrane basale du capillaire cérébral pourrait donc jouer le rôle de filtre pour les substances de poids moléculaire très élevé dans le sens tissus nerveux-sang, alors que de telles molécules sont arrêtées par les jonctions interendothéliales lorsqu'elles sont dans la lumière vasculaire (BRIGHTMAN, 1965).

Le rôle des péricytes est actuellement encore très mal connu. Ces cellules sont capables d'internaliser la plupart des traceurs quelle que soit la voie d'injection (VAN DEURS, 1980). Grâce à cette importante activité, les péricytes pourraient servir de barrière de défense en cas de rupture locale de la B.H.E. (BROADWELL, 1981).

c) Rôle des astrocytes

Si de nombreuses observations soulignent le rôle capital des astrocytes dans le développement d'une B.H.E. opérationnelle au niveau des cellules endothéliales de capillaires cérébraux, il semble actuellement bien établi qu'ils ne constituent pas au sens strict le support anatomique de la B.H.E. (BRADBURY, 1979).

I.2.3 B.H.E. : un caractère inductible

a) Ontologie de la B.H.E.

Pendant la gestation les capillaires sanguins foetaux forment progressivement dans le S.N.C. un plexus vasculaire (BRADBURY, 1979).

Chez les Mammifères, les capillaires cérébraux possèdent dans les premiers stades de développement, les mêmes caractéristiques que les capillaires non cérébraux et permettent le libre échange entre le sang et le S.N.C. de molécules dont la taille n'excède pas celle de l'albumine.

Puis le système de barrière avec toutes ses particularités apparaît progressivement. Dans diverses espèces, l'acquisition des propriétés restrictives de la B.H.E. est souvent liée à la naissance. Ainsi chez l'homme, elles apparaissent pendant la vie foetale et pour le rat peu après la naissance.

La maturation de la B.H.E. chez les Mammifères coïncide avec la phase critique du développement cérébral marquée par l'augmentation de diverses activités enzymatiques ou la ramification des dendrites par exemple (BRADBURY, 1979).

b) B.H.E. : une propriété instable

Plusieurs mécanismes peuvent entraîner l'ouverture transitoire de la B.H.E..

. Ouverture des jonctions interendothéliales

La destabilisation de ces jonctions a été démontrée à la suite de :

- fortes radiations (OLSSON et coll., 1975)
- hyperosmolarité (HICKS et coll., 1976)
- hypertension (RAPOPORT, 1976)

RAPOPORT en 1976 a suggéré que le mécanisme responsable de la rupture des jonctions serrées était le rétrécissement des cellules endothéliales après injection d'urée 3 M + arabinose 1 M et formation de pores permettant ainsi un mouvement des grosses molécules.

Si beaucoup d'auteurs sont convaincus de l'ouverture des jonctions serrées dans certaines conditions, ces résultats demeurent toutefois controversés (WESTERGAARD, 1980).

. Augmentation de transfert vésiculaire

L'augmentation de transfert vésiculaire peut être induite par :

- l'hyperosmolarité (BRIGHTMAN et coll., 1973)
- l'AMP cyclique (JOO, 1972)
- la sérotonine (WESTERGAARD, 1977)
- et de nombreux processus pathologiques (VAN DEURS, 1980)

En effet l'injection intracarotidienne d'une solution d'urée 3 M chez le lapin entraîne une augmentation des vésicules de pinocytose (BRIGHTMAN et REESE, 1973), témoignant ainsi de l'ouverture de la B.H.E.

. Apparition de canaux transendothéliaux

L'apparition de canaux transendothéliaux a été observée dans :

- l'hypertension sévère (HANSSON et coll., 1975)
- les blessures cérébrales (POVLISHOCK et coll., 1981)
- les oedèmes secondaires aux radiations ultraviolettes (SASAK et coll., 1977)
- les préparations en cryodécapage de cerveaux de lézard hyperglycémiques (SHIVERS, 1978)

Ces phénomènes sont issus d'une augmentation des phénomènes d'endocytose accompagnés d'une fusion vésiculaire donnant ainsi naissance à des canaux transendothéliaux qui perturbent le fonctionnement de la B.H.E.

Ces faits indiquent donc clairement que la physiologie de la B.H.E. qui repose sur la présence de jonctions serrées et l'absence de pinocytose est un caractère inductible.

Cette induction a lieu au cours du développement cérébral, et le caractère induit est modifiable. Il semble actuellement que les pieds des astrocytes soient en majeure partie responsables de ce phénomène d'induction.

c) Hypothèse d'une induction

Déjà en 1967 DAVSON spéculait sur le rôle des pieds d'astrocytes dans l'induction des propriétés de la B.H.E. Plusieurs faits sont en faveur de cette hypothèse :

- la maturation physiologique de la B.H.E. chez le rat coïncide avec la maturation des cellules gliales et des membranes basales,
- la désintégration de la membrane basale dans les cellules de cortex en culture quand le corset de cellules gliales est interrompu (WOLFF et coll., 1974)
- la différenciation des capillaires cérébraux lors des phénomènes de transplantation. En effet, lors de la transplantation d'un iris embryonnaire dans un cerveau embryonnaire de rat, les capillaires qui se développent perdent leur propriété de barrière au 6-hydroxy-dopamine fluorescent (SVENDGAARD et coll., 1975).

Les propriétés particulières des capillaires cérébraux semblent donc induites par des facteurs sécrétés par le tissu cérébral. Ces facteurs trophiques de nature peptidique séquestrés dans les capillaires cérébraux orchestrent probablement l'expression dans l'endothélium de capillaires cérébraux de gènes responsables de la B.H.E. (STEWART et WILEY, 1981) :

- l'augmentation de perméabilité des capillaires cérébraux dans le cas de tumeurs cérébrales en relation avec l'apparition de fenestration (HIRANO, 1974),
- l'expression de gamma-GT dans les capillaires cérébraux isolés en présence d'astrocytes dans le milieu (DEBAULT et CANCELLA, 1980).

Il semble donc de plus en plus probable que les astrocytes soient nécessaires au développement et à la différenciation des cellules endothéliales de capillaires cérébraux, et à l'expression des propriétés de la B.H.E.

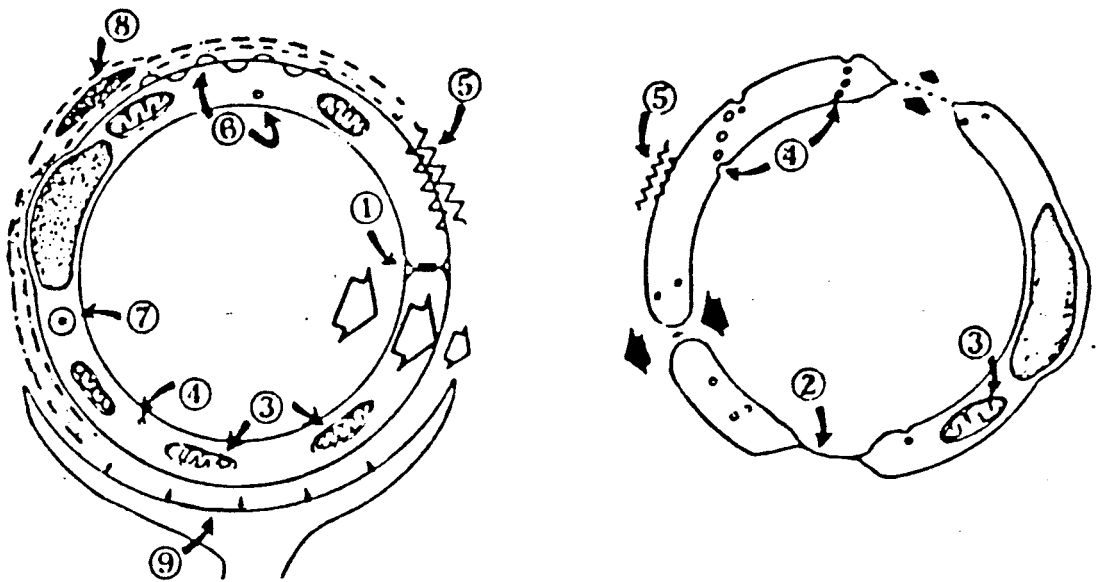
II - FONCTIONNEMENT DE LA B.H.E.

Le concept d'une B.H.E. purement restrictive isolant le cerveau du reste de l'organisme priverait le cerveau des aliments qui lui sont essentiels. Des systèmes de transport au niveau des cellules endothéliales vont permettre le passage d'un certain nombre de métabolites à travers la paroi du capillaire vers le S.N.C.

Dans ce chapitre nous envisagerons le fonctionnement de la B.H.E. et tenterons de répondre aux questions suivantes :

- quel est le rôle de cette B.H.E. ?
- a-t-elle une valeur sélective ?
- est-elle essentielle ?

FIGURE 3 : DIFFERENCES PHYSICOCHIMIQUES ENTRE UN CAPILLAIRE CEREBRAL ET UN CAPILLAIRE NORMAL (d'après Cornford, 1984).



passage transcellulaire

passage intercellulaire

CAPILLAIRE CEREBRAL

CAPILLAIRE GENERAL

- 1 : jonctions serrées
- 2 : fénestrations
- 3 : mitochondries
- 4 : vesicules de pinocytose
- 5 : résistance électrique
- 6 : différences structurales et fonctionnelles des membranes lumineales et antilumineales.
- 7 : enzymes spécifiques des capillaires cérébraux
- 8 : péricytes
- 9 : astrocytes

II.1 LES CONTRAINTES

Pour aborder le transport des différents substrats à travers la B.H.E. il est important de rappeler les différences morphologiques existant entre les capillaires cérébraux et les autres capillaires (CORNFORD, 1985).

La figure 3 illustre ces différences, à savoir pour le capillaire cérébral.

- 1) la présence de jonctions serrées
- 2) l'absence de fenestration
- 3) la quasi absence de vésicules de pinocytose
- 4) la distinction entre les faces lumineales et antilumineales, sur laquelle repose la polarité de la B.H.E.

Le transport d'une substance à travers la B.H.E. qui nécessite 3 étapes :

- le mouvement à travers la membrane lumineale,
- la diffusion à travers le cytoplasme endothélial,
- le transport à travers la membrane antilumineale,

sera fortement marqué par ces 4 caractères de la B.H.E. En effet ne seront compatibles avec le fonctionnement authentique de la B.H.E. que les transports transmembranaires (c'est-à-dire la diffusion simple, la diffusion facilitée, et le transport actif). Par définition les transports vésiculaires seront limités.

II.2 TRANSPORT DES PETITES MOLECULES ET POLARITE DE LA B.H.E.

II.2.1 Une répartition différentielle des transporteurs

Des études histochimiques ont souligné les différences entre les membranes lumineales et antilumineales.

Lorsque des produits marqués sont injectés directement dans les carotides, leur fixation différentielle indique que la membrane lumineale est différente de la membrane antilumineale d'où le concept de polarité de la B.H.E. (LADINSKY et DREWES, 1983).

TABLEAU I : REPARTITION DES DIFFERENTS TRANSPORTEURS SUR LES MEMBRANES LUMINALES ET ANTILUMINALES.

(voir pour revue Comford,1985)

| Transporteurs | face antiluminale | | face luminale | | caractéristiques |
|--|-------------------|-------------------|---------------|------------------|---|
| | présence | apport d' énergie | présence | apport d'énergie | |
| système L | + | + | + | - | syst. d' échange |
| système A | + | + | - | - | syst. d' échange |
| système ASC | + | - | + | - | ? |
| acides aminés acides | + | + | - | - | ? |
| acides valproïque et gammaaminobutyrique | + | + | - | - | syst. actif de sortie d'anions |
| système Na ⁺ /K ⁺ | + | + | - | - | syst. actif assymétrique |
| système Na ⁺ /Cl ⁻ | - | - | + | - | cotransporteur inhibé par la furosamide |
| système Na ⁺ | - | - | + | - | inhibé par l'amiloride diurétique |
| glucose | + | + | + | - | diffusion facilité symétrique, stéréospécifique |
| acide lactique | + | - | + | - | transport bidirectionnel |
| phenylalanine | + | - | + | - | transport bidirectionnel |
| arginine | + | - | + | - | transport bidirectionnel |
| choline | + | - | + | - | transport bidirectionnel |
| adénosine | + | - | + | - | transport bidirectionnel |
| adénine | + | - | + | - | transport bidirectionnel |

système L:transporteur de gros acides aminés neutres

système A: transporteur de petits acides aminés neutres

système ASC:transporteur d'alanine, serine et cystéine

Le tableau 1 illustre la répartition des différents transporteurs sur les membranes lumineales et antilumineales.

Les sept transporteurs majeurs (glucose, acide lactique, phénylalanine, arginine, choline, adénosine et adénine) se trouvent simultanément sur les membranes endothéliales. Il en est de même pour le système L transporteur des gros acides aminés neutres tels que la phénylalanine, le tryptophane, la méthionine et préférentiellement la leucine, ainsi que le transporteur de l'acide glutamique. Par contre le système A transportant les petits acides aminés neutres tels que la glycine, la sérine, la proline et préférentiellement l'alanine, ainsi que les transporteurs de l'acide valproïque, de l'acide gamma-amino-butérique et l'ATPase K^+Na^+ dépendante se situent sur la membrane antilumineale tandis que les transporteurs d'ions Na^+ sont localisés spécifiquement sur la membrane lumineale (voir pour revue CORNFORD, 1985).

La répartition des transporteurs est en étroite relation avec les besoins du cerveau. Ces systèmes de transport nécessitent ou non de l'énergie comme nous le verrons à l'aide de 2 exemples : le transport du glucose et celui des ions Na^+ et K^+ . Par ailleurs certains transports sont associés à une modification chimique des substances échangées.

II.2.2 Quelques exemples de fonctionnement de la B.H.E.

a) Transport ne nécessitant pas d'apport d'énergie

L'exemple type de ce mode de transport est celui du glucose. (figure 4).

L'activité métabolique très élevée du cerveau dépend étroitement de l'apport de glucose qui est aussi nécessaire à la synthèse d'un grand nombre de molécules.

Le transport du glucose se fait par diffusion facilitée (CRONE et coll., 1965, BETZ et coll., 1979). Il est symétrique et stéréospécifique. En effet le D-glucose, D-galactose, D-mannose sont transportés alors que le L-glucose et le D-fructose ne le sont pas. Cette diffusion facilitée implique (GJEDDE et CRONE, 1981) l'existence de 2 transporteurs de glucose dans la membrane de capillaires cérébraux :

- l'un à haute affinité et faible capacité,
- l'autre à faible affinité et haute capacité.

FIGURE 4 : SYSTEME COMPLEXE DE TRANSPORTEURS.
(d'après Goldstein et Betz, 1986)

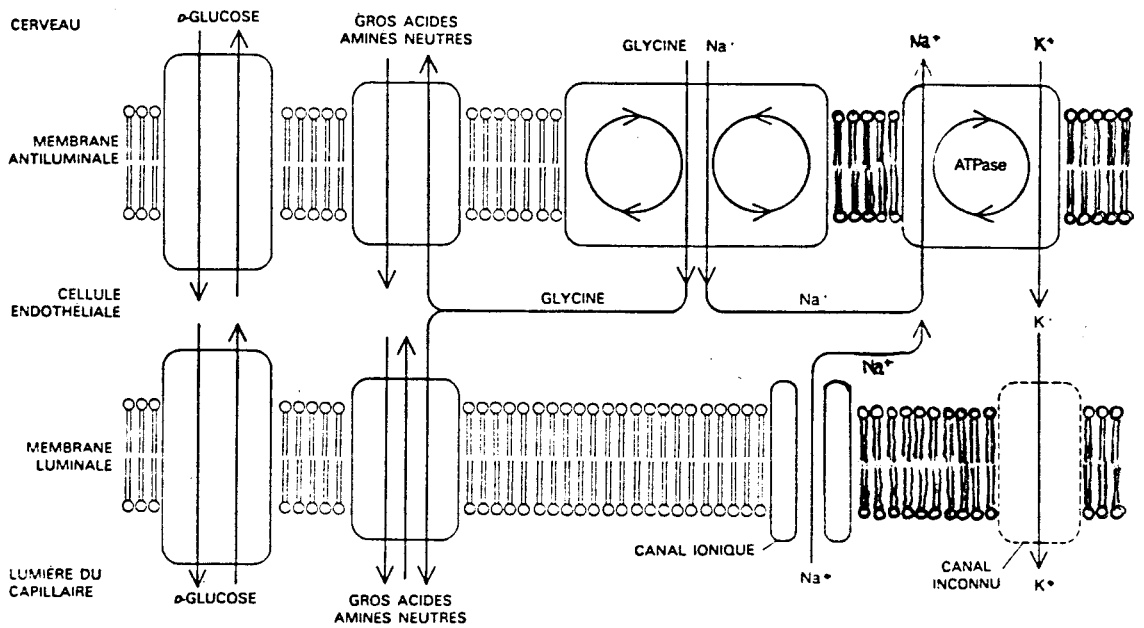
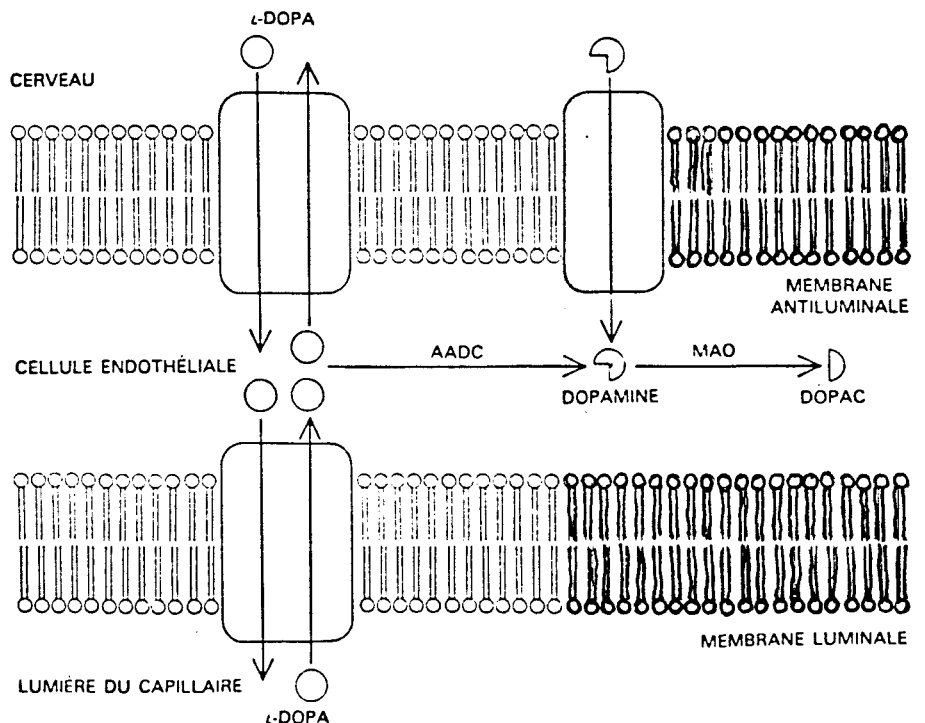


FIGURE 5 : LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE METABOLIQUE.
(d'après Goldstein et Betz, 1986)



b) Transport nécessitant un apport d'énergie

Les ions potassium exercent une action importante sur la transmission des influx nerveux. Leur concentration est maintenue à un faible niveau dans le milieu qui entoure les cellules nerveuses, grâce au fonctionnement d'une pompe Na^+K^+ , la clef du système est la répartition asymétrique de cette pompe entre les deux faces de la cellule endothéliale (BETZ et coll., 1980).

L'efflux du potassium du liquide extracellulaire vers le plasma associé à un transport de sodium en sens inverse est un transport actif assuré par une ATPase présente sur la membrane antiluminale. Les ions K^+ accumulés dans la cellule ressortent par les pores de la membrane luminale. Le transport K^+Na^+ est donc un système de transport actif asymétrique qui permet le maintien de faibles concentrations en ions K^+ dans le cerveau (figure 4).

c) Transports couplés à une modification métabolique

Les neuromédiateurs pénètrent en général dans le S.N.C. par simple diffusion. Cependant la L-DOPA (acide aminé précurseur de deux neuromédiateurs : la dopamine et la noradrénaline) pénètre rapidement l'endothélium en utilisant le système de transport des grands acides aminés neutres (PARDRIDGE et coll., 1977). Une fois dans la cellule, la L-DOPA est transformée en DOPAMINE puis en DOPAC. La DOPAMINE ressort du cerveau grâce à un transporteur spécifique. Il est à noter que ni la DOPAMINE, ni le DOPAC ne peuvent traverser la membrane antiluminale pour pénétrer dans le cerveau, illustrant ainsi la notion de barrière métabolique (HARDEBO et coll., 1979) qui se surajoute à la notion de B.H.E. (figure 5).

II.2.3 Polarité : un caractère inductible et labile

a) Rôle des cellules gliales dans la polarité de la B.H.E.

Dans les cultures de tissus, la présence de cellules gliales modifie les propriétés fonctionnelles des cellules endothéliales de capillaires cérébraux. Ainsi, l'activité gamma-GT n'existe pas dans les cellules endothéliales de capillaires isolés. Elle est induite lors du contact avec les cellules gliales (DEBAULT et CANCELLA, 1980). De même, la captation d'acides aminés par les cellules endothéliales cérébrales est fortement augmentée quand ces cellules sont cultivées en milieu conditionné par des cellules gliales (CANCELLA et DEBAULT, 1983).

Il semble donc que ces cellules gliales influencent la polarisation des cellules endothéliales de capillaires cérébraux et plus particulièrement le transport des acides aminés (BECK et coll., 1984). Ce caractère de polarité est typique des cellules endothéliales, mais son expression est sous la dépendance et le contrôle de l'environnement péri-endothélial.

b) Modification de la polarité

A l'instar des propriétés de la B.H.E., des modifications de polarité peuvent intervenir dans certaines conditions pathologiques. Ainsi la majorité de la phosphatase localisée normalement sur la face luminale, aura une répartition strictement antiluminale chez les souris infectées par certains virus (VORBRODT et coll., 1981).

II.3 TRANSPORT DES MACROMOLECULES

Les macromolécules ne peuvent emprunter les mêmes systèmes de transporteurs que les petites molécules.

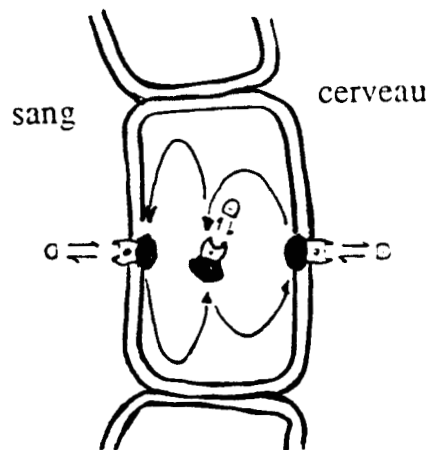
Le transport des grosses molécules fait intervenir les phénomènes d'endocytose. Or ces phénomènes d'internalisation (pinocytose et endocytose par récepteurs) sont normalement très limités dans les cellules endothéliales de capillaires cérébraux si on en juge par la rareté des endosomes.

De plus le concept de B.H.E. est en partie fondé sur cette limitation imposée aux phénomènes d'endocytose.

II.3.1 La présence de récepteurs spécifiques

L'expression de récepteurs spécifiques de certaines macromolécules au niveau des cellules endothéliales de capillaires cérébraux ne correspond donc pas à une propriété usuelle de la B.H.E. Toutefois certains récepteurs pour l'insuline (VAN HOUTEN et POSNER, 1979), l'insuline like growth factors IGF (FRANK et coll., 1986), la transferrine (JEFFERIES et coll., 1984) par exemple ont été mises en évidence au niveau de la B.H.E. et des cellules endothéliales et témoignent d'un certain trafic de peptides entre le sang et le cerveau.

FIGURE 6 : TRANSCYTOSE DE L'INSULINE A TRAVERS LA B.H.E.



La transcytose nécessite 3 étapes :

- l'endocytose au niveau de la face luminale
- la diffusion intracytoplasmique
- l'exocytose au niveau de la face antiluminale

II.3.2 B.H.E. et transport des macromolécules

L'expression de récepteurs spécifiques au niveau de la B.H.E. correspond-elle à une propriété fonctionnelle de cette barrière ?

a) Transport de l'insuline

Il existe des récepteurs à l'insuline sur la face luminale des capillaires cérébraux (FRANK et PARDRIDGE, 1981). Ces récepteurs ont été isolés. Ils correspondent à une protéine de 127 KD différente de leurs homologues des neurones, des cellules gliales et des synapses (ZAHNISER et coll., 1984). Ces récepteurs permettent l'internalisation de l'insuline par un transport analogue à la transcytose décrite pour les capillaires non cérébraux (PARDRIDGE et coll., 1985, BAR et coll., 1983, DUFFY et coll., 1986). Le transport de l'insuline à travers la B.H.E. implique trois étapes illustrées figure 6 :

- l'endocytose au niveau de la membrane luminale de la B.H.E.,
- la diffusion à travers le cytoplasme endothélial certainement par l'intermédiaire de vésicules lisses,
- l'exocytose au niveau de la membrane antiluminale de la B.H.E.

Cette endocytose par récepteur de l'insuline a un rôle physiologique extrêmement important car elle permet de constituer un stock d'insuline intracérébrale (HAVRANKOVA et ROTH, 1979). En effet l'absence de m-RNA spécifique dans le S.N.C. indique qu'il n'y a pas de synthèse "de novo" d'insuline et que sa seule origine est sérique (KOLATA, 1982). Il est intéressant de noter que dans le cas de diabète insulino-dépendant le niveau d'insuline intracérébral et l'activité des récepteurs sont faibles (FRANK et coll., 1986).

b) Transport de la transferrine

Autre récepteur identifié au niveau des capillaires cérébraux : celui de la transferrine.

Cette glycoprotéine de 80 KD capable de transporter le fer (SELIGMAN, 1983) joue, à cause de l'absence de pores de la B.H.E., un rôle capital dans l'approvisionnement du cerveau en fer.

Ce récepteur permet par endocytose l'entrée de la transferrine dans les cellules de la B.H.E. Toutefois des différences notables sont enregistrées par rapport au processus se déroulant dans les autres endothéliums (PARDRIDGE et coll., 1985).

Il semble qu'il n'y ait pas de dissociation de la transferrine qui sera en fait dirigée directement vers la membrane antiluminale.

c) Transport de l'insuline - Like Growth Factors (IGF)

En plus du récepteur à l'insuline, FRANK en 1986 a identifié les récepteurs à l'IGF_I et IGF_{II} sur capillaires isolés. La présence de ces récepteurs au niveau de la B.H.E. n'est pas surprenante puisque l'IGF_{II} en particulier est un facteur de croissance important dans le système nerveux central en cours de développement. Sa concentration intracérébrale est 10 fois supérieure dans les cas de mégaloencéphalie (HASELBACHER et coll., 1985).

Tout comme l'insuline, l'IGF_I et l'IGF_{II} sont internalisés (FRANK et coll., 1986). Leur transport à travers la B.H.E. fait également appel à la transcytose.

d) Transport de l'albumine cationisée

Aucun récepteur pour l'albumine n'a été mis en évidence au niveau de la B.H.E. (PARDRIDGE et coll., 1985), alors que l'albumine bovine cationisée par l'hexaméthylène diamine se fixe de façon saturable sur les capillaires isolés bovins (PARDRIDGE et coll., 1985).

La cationisation convertit l'albumine (point isoélectrique acide pI = 3,9) en une protéine de point isoélectrique basique (pI = 8,5) et augmente de façon notable son entrée dans les cellules de la B.H.E. par l'intermédiaire de transporteurs couplés aux mécanismes de transcytose (GRIFFIN et GIFFELS, 1982).

II.4 CONCLUSION

Comme les exemples que nous avons donnés le font penser, le fonctionnement de la B.H.E. est en grande partie fondé sur la régulation des transports à travers l'endothélium.

Si le passage d'acides aminés et de glucides à travers la B.H.E. a fait l'objet de nombreuses études, la littérature est par contre très pauvre en ce qui concerne la captation des lipides par le cerveau. Il est actuellement bien admis que le cerveau n'est pas autonome quant à l'élaboration de ses structures lipidiques et qu'un apport sérique d'acides gras est indispensable.

Dans le chapitre suivant nous examineront successivement les besoins en lipides du cerveau puis les modes de transport de ces lipides qui malgré leur nature, ne peuvent atteindre le cerveau sans emprunter un système de transport.

C H A P I T R E I I

LIPIDES ET BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE

CHAPITRE II : LIPIDES ET BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE

| | |
|---|----|
| I - <u>LE CERVEAU : UN ORGANE QUI A BESOIN DES AUTRES</u> | 28 |
| I.1. Acides gras cérébraux : leurs caractéristiques | 28 |
| I.2. Acides gras cérébraux : leur origine..... | 31 |
| I.2.1. Synthèse "de novo" | 33 |
| a) Synthèse cytoplasmique | 33 |
| b) Synthèse microsomale..... | 33 |
| c) Synthèse mitochondriale..... | 35 |
| I.2.2. Synthèse d'acides gras polyinsaturés ou AGPI..... | 35 |
| a) Synthèse des AGPI..... | 35 |
| b) Origine des AGPI cérébraux..... | 37 |
| II - <u>B.H.E. ET CAPTATION D'ACIDES GRAS</u> | 37 |
| II.1. Etudes "in vitro" | 38 |
| II.1.1. Utilisation des précurseurs d'acides gras..... | 38 |
| II.1.2. Utilisation des acides gras | 38 |
| II.2. Etudes diététiques | 40 |
| II.2.1. Carences nutritionnelles | 40 |
| II.2.2. Le cerveau : un organe protégé | 42 |
| II.2.3. Le cerveau : un organe qui récupère..... | 44 |
| II.3. Etudes "in vitro" | 45 |
| III - <u>LES TRANSPORTEURS LIPIDIQUES</u> | 47 |
| III.1. La sérum albumine | 47 |
| III.2. L'alpha-foetoprotéine (AFP) | 47 |
| III.3. Les lipoprotéines..... | 51 |
| III.3.1. Leur définition | 51 |
| III.3.2. Leur métabolisme | 53 |
| III.3.3. HDL et nutrition | 55 |
| III.4. Conclusion..... | 57 |

Le système nerveux central est après les masses adipeuses l'organe le plus riche en lipides qui représentent plus de la moitié du poids sec du cerveau. Ces lipides sont tous structuraux et non énergétiques. Ils participent directement à l'architecture et donc au fonctionnement du cerveau. Ils sont intégrés aux membranes et servent de support à un grand nombre d'activités physiologiques spécifiques comme la transmission nerveuse et les interactions cellulaires.

Une telle richesse en lipides suppose des systèmes de synthèse très actifs. Deux questions se posent : le cerveau peut-il synthétiser tous les lipides ? ou bien dépend-il d'un apport extérieur ?

Dans ce cas quels sont les mécanismes qui permettent cet approvisionnement.

I - LE CERVEAU : UN ORGANE QUI A BESOIN DES AUTRES

Pour élaborer ses lipides complexes, le cerveau a besoin d'acides gras. Or la composition en acides gras du S.N.C. est très spécifique, et va conditionner les importations lipidiques.

I.1 ACIDES GRAS CEREBRAUX : LEURS CARACTERISTIQUES

En plus des acides gras à 16 et 18 atomes de carbone, le cerveau contient des acides gras à très longue chaîne soit : 20, 22, 24, 26, 28 et même au-delà de 34 atomes de carbone (PAKKALA et coll., 1966). Ces acides gras sont essentiellement trouvés dans les sphingolipides myéliniques (BOURRE, 1980).

Dans la myéline un acide gras sur 5 a un nombre de carbone supérieur à 18 contre un sur 100 dans la substance blanche, qui contient par contre plus d'acides gras polyinsaturés (AGPI) : (1/5 contre 1/17 dans la myéline). Ces AGPI sont essentiellement localisés dans les phospholipides (phosphatidyl-éthanolamine (PE), phosphatidylsérine (PS), phosphatidylinositol (PI) (BOURRE, 1980).

NOMENCLATURE DES PRINCIPAUX ACIDES GRAS

| Nom commun | Nomenclature systématique | Abréviation |
|---------------------------|--|-------------|
| Ac. laurique | Ac. dodécanoïque | 12 : 0 |
| Ac. myristique | Ac. tétradécanoïque | 14 : 0 |
| Ac. palmitique | Ac. hexadécanoïque | 16 : 0 |
| Ac. palmitoléique | Ac. Δ^9 hexadécénoïque | 16 : 1 n-7 |
| Ac. stéarique | Ac. octadécanoïque | 18 : 0 |
| Ac. oléique | Ac. Δ^9 octadécénoïque | 18 : 1 n-9 |
| Ac. linoléique | Ac. Δ^9 -12 octadécadiénoïque | 18 : 2 n-6 |
| Ac. α linoléinique | Ac. Δ^9 -12-15 octadécatriénoïque | 18 : 3 n-3 |
| Ac. γ linoléinique | Ac. Δ 6-9-12 octadécatriénoïque | 18 : 3 n-6 |
| Ac. arachidique | Ac. eïcosanoïque | 20 : 0 |
| Ac. eicosénoïque | Ac. Δ 11 eïcosénoïque | 20 : 1 n-9 |
| Ac. écosatriénoïque | Ac. Δ 5-8-11 eïcosatriénoïque | 20 : 3 n-9 |
| Ac. di-homolinoléinique | Ac. Δ 8-11-14 éïcosatriénoïque | 20 : 3 n-6 |
| Ac. arachidonique | Ac. Δ 5-8-11-14 éïcosatétraénoïque | 20 : 4 n-6 |
| Ac. éïcosapentaénoïque | Ac. Δ 5-8-11-14-17 éïcosapentaénoïque | 20 : 5 n-3 |
| Ac. béhénique | Ac. docosanoïque | 22 : 0 |
| Ac. érucique | Ac. Δ 13 docosénoïque | 22 : 1 n-9 |
| Ac. docosatétraénoïque | Ac. Δ 7-10-13-16 docosatétraénoïque | 22 : 4 n-6 |
| Ac. docosapentaénoïque | Ac. Δ 4-7-10-13-16 docosapentaénoïque | 22 : 5 n-6 |
| | Ac. Δ 7-10-13-16-19 docosapentaénoïque | 22 : 5 n-3 |
| Ac. docosahexaénoïque | Ac. Δ 4-7-10-13-16-19 docosahexaénoïque | 22 : 6 n-3 |
| Ac. lignocérique | Ac. tétraconanoïque | 24 : 0 |
| Ac. nervonique | Ac. Δ 15 tétracosénoïque | 24 : 1 n-9 |

TABLEAU II : CARACTERISTIQUES DE LA COMPOSITION EN ACIDES GRAS DU CERVEAU

| | | groupe métabolique | |
|--|--------|--------------------|----|
| | | I | II |
| ACIDES GRAS CLASSIQUES-----> | | + | |
| acide palmitique | C16:0 | | |
| acide stéarique | C18:0 | | |
| acide oléique | C 18:1 | | |
| PARTICULARITES CEREBRALES | | | |
| chaines aliphatiques très longues : 19-26 atomes de carbones | | | |
| a) Acides gras saturés et monoinsaturés-----> | | + | |
| b) Acides gras hydroxylés-----> | | + | |
| c) Acides gras polyinsaturés-----> | | + | |
| famille des n-9-----> | | + | |
| famille des n-6-----> | | | + |
| famille des n-3-----> | | | + |

Ainsi chez l'homme les acides arachidoniques 20:4 n-6 et docosahexaénoïques 22:6 n-3 constituent plus de 30% des acides gras totaux des phospholipides (BOURRE, 1980).

Ces acides sur lesquels reposent les propriétés biologiques et physico-chimiques des membranes cérébrales, se répartissent en deux grands groupes métaboliques illustrés tableau II.

Le groupe métabolique n° 1 réunit tous les acides gras saturés et mono-insaturés, les acides gras hydroxylés et les acides gras polyinsaturés de la série n°-9, par opposition au groupe métabolique n° 2 qui comprend exclusivement les acides gras polyinsaturés (AGPI) de la série (n-6) et (n-3) qui dérivent chez les animaux des acides gras essentiels, acides linoléique et linoléique.

I.2 ACIDES GRAS CEREBRAUX : LEUR ORIGINE

L'origine des acides gras cérébraux a été analysée principalement chez la souris car : (voir pour revue BOURRE, 1980)

- la multiplication neuronale est prénatale.
- la multiplication gliale, la myélinisation et la synaptogénèse sont post-natales.

Il est donc aisé de relier le métabolisme lipidique aux principaux événements du développement cérébral. De plus chez la souris, il existe plusieurs mutants neurologiques : par exemple les souris jimpy accusant une absence de myélinisation et les souris quaking dont la myélinisation est perturbée.

Deux origines sont possibles pour les acides gras constitutifs des lipides cérébraux :

- la synthèse "in situ" qui concerne les acides gras du groupe métabolique 1,
- les apports extracérébraux qui concernent les acides gras essentiels dont l'origine est exclusivement alimentaire chez les Mammifères et les AGPI synthétisés dans le foie ; ces acides gras constituant le groupe métabolique 2.

TABLEAU III : PRINCIPALES ETAPES DE LA SYNTHÈSE DES ACIDES GRAS

| ETAPES | REACTION | ENZYME |
|--------|--|-------------------------------------|
| 1 | $\text{Acétyl CoA} + \text{HCO}_3^- + \text{ATP} \rightarrow \text{malonyl CoA} + \text{ADP} + \text{Pi} + \text{H}^+$ | Acétyl CoA carboxylase |
| 2 | $\text{Acétyl CoA} + \text{ACP} \rightleftharpoons \text{acétyl-ACP} + \text{CoA}$ | Acétyl transacylase |
| 3 | $\text{Malonyl CoA} + \text{ACP} \rightleftharpoons \text{malonyl-ACP} + \text{CoA}$ | Malonyl transacylase |
| 4 | $\text{Acétyl-ACP} + \text{malonyl-ACP} \rightarrow \text{acétoacétyl-ACP} + \text{ACP} + \text{CO}_2$ | Acyl-malonyl-ACP enzyme condensante |
| 5 | $\text{Acétoacétyl-ACP} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{D-3-hydroxybutyryl-ACP} + \text{NADP}^+$ | β -cétol-ACP-réductase |
| 6 | $\text{D-3-Hydroxybutyryl-ACP} \rightleftharpoons \text{crotonyl-ACP} + \text{H}_2\text{O}$ | 3-Hydroxyacyl-ACP-déshydratase |
| 7 | $\text{Crotonyl-ACP} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{butyryl-ACP} + \text{NADP}^+$ | β -Déshydroacyl-ACP-réductase |

I.2.1 Synthèse "de novo"

Le cerveau est capable de synthétiser "de novo" tous les acides gras (saturés ou monoinsaturés) appartenant au groupe 1. Le tableau III illustre les principales étapes de cette biosynthèse d'acides gras. Elle est commune aux cellules eucaryotes et fait intervenir l'acide gras synthétase qui n'est autre qu'un complexe multienzymatique. Elle s'effectue dans trois compartiments cellulaires :

- le cytosol dans lequel se fera plus particulièrement la production d'acides gras à chaîne moyenne (POLLET et coll., 1969),

- la mitochondrie pour la synthèse d'acides gras de toutes longueurs de chaîne (PATURNEAU-JOVAS et coll., 1976),

- les microsomes où s'effectuera la production d'acides gras typiques de la myéline (POLLET et coll., 1973).

a) Synthèse cytoplasmique

Cette synthèse ne se distingue en rien de celle des autres tissus, et produit principalement de l'acide palmitique qui pourra être modifié au niveau des mitochondries ou des microsomes cérébraux (POLLET et coll., 1969).

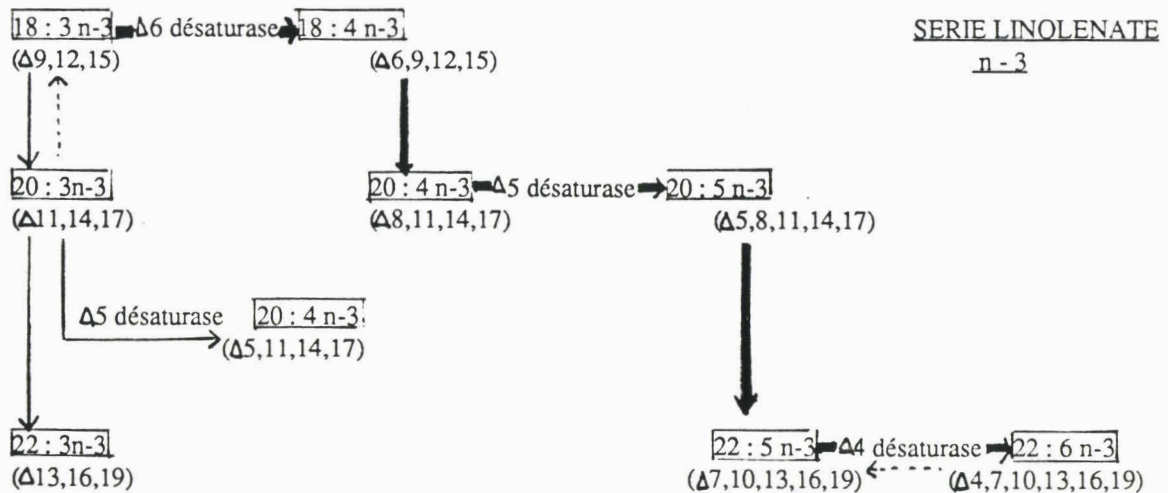
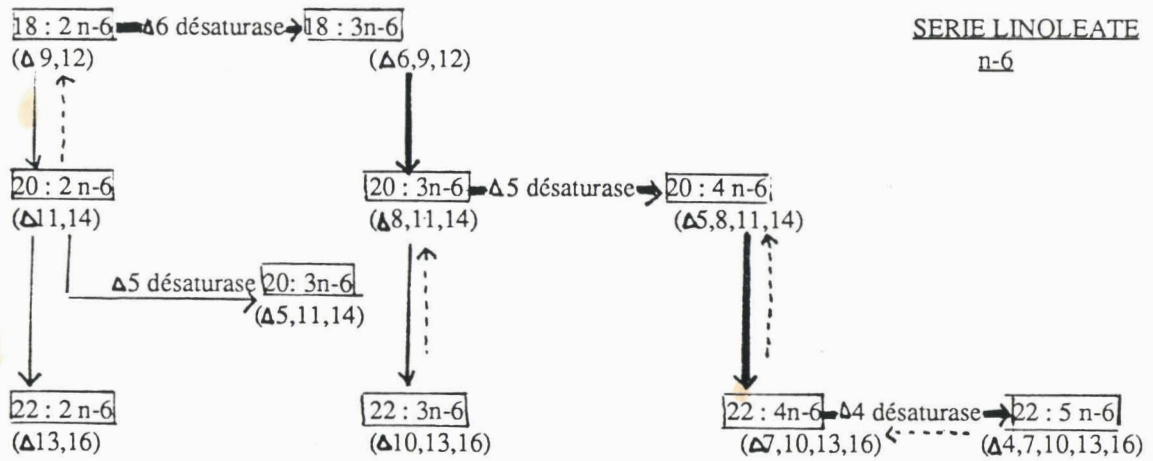
b) Synthèse microsomale

Le malonyl-CoA est le donneur principal de carbone pour la synthèse des acides gras. Elle se distingue également de la précédente par la présence de deux systèmes d'élongation (BOURRE et coll., 1970) :

- la C₁₆ élongase qui utilise le palmitoyl-CoA pour donner naissance à l'acide stéarique,

- et la C₁₈ élongase dont le substrat est le stéaroyl-CoA et qui donne naissance aux acides gras à très longues chaînes (de 24 à 26 atomes de carbone).

TABLEAU IV : BIOSYNTHESE DES ACIDES GRAS POLYINSATURES



Légende : $\xrightarrow{\text{voie principale}}$ Voie métabolique principale
 $\xrightarrow{\text{voie secondaire}}$ Voie métabolique secondaire
 $\xleftarrow{\text{dotted}}$ Rétroconversion

$\xrightarrow{\text{désaturation}}$ désaturation
 \downarrow élongation

Ac. gras

Acides gras présents dans les extraits lipidiques des tissus

Par ailleurs la synthèse d'acides gras monoinsaturés se fait par élongation de l'oleyl-CoA dans les microsomes cérébraux (BOURRE, 1976).

c) Synthèse mitochondriale

La mitochondrie contient une très faible quantité d'acides gras à longues chaînes (BOURRE et coll., 1976), d'autre part elle ne synthétise que ses propres acides gras et n'intervient pas dans la synthèse d'acides gras myéliniques (BOURRE, 1973). Contrairement aux microsomes, l'acétyl-CoA dans les mitochondries est le donneur de carbone. De plus seule l'activité de la C₁₆ élongase est enregistrée.

Il semble donc que le cerveau soit autonome pour la synthèse des acides gras du groupe 1. Il n'en est pas de même pour ceux du groupe 2.

I.2.2 Synthèse d'acides gras polyinsaturés ou (AGPI)

Dans le règne animal, l'absence de $\Delta 12$ et $\Delta 15$ desaturase rend impossible la synthèse d'acide linoléique C 18:2 n-6 et d'acide alpha-linolénique C 18:3 n-3 précurseurs d'acides gras polyinsaturés à plus longue chaîne (AGPI) (MORHRHAUER et HOLMAN, 1963).

a) Synthèse des AGPI

Le tableau IV schématise les principales étapes de la biosynthèse des AGPI à partir des acides gras essentiels. Elle repose sur une alternance d'étapes de désaturation et d'élongation dont les enzymes clefs sont la $\Delta 6$ et la $\Delta 5$ desaturase (SINCLAIR et CRAWFORD, 1972), dont la localisation est principalement cérébrale et hépatique.

La présence d'acides gras polyinsaturés de toute longueur de chaîne est donc étroitement dépendante de l'apport alimentaire en acides gras essentiels. A ce titre, le cerveau n'est pas plus autonome que les autres organes.

TABLEAU V : ORIGINE DES ACIDES GRAS POLYINSATURES CHEZ LES
MAMMIFERES (Cook, 1978)

| STADE | APPORT EXOGENE | ACTIVITE $\Delta 6$ DESATURASE | |
|------------|----------------------------------|--------------------------------|--|
| | | FOIE | CERVEAU |
| Embryon | foie maternel par le placenta | modéré | augmenté au cours des derniers stades |
| Nouveau-né | lait | modérée | très élevée |
| Sevrage | alimentation | très élevée | faible |
| Adulte | alimentation | élevée | faible |

Le problème de son autonomie se complique encore par le fait que les enzymes clefs du métabolisme des AGPI ont une activité qui suit le développement cérébral.

b) Origine des AGPI cérébraux

L'activité spécifique de la $\Delta 5$ desaturase cérébrale atteint son maximum entre le 4ème et le 20ème jour après la naissance chez le rat, pour ensuite décroître. Il en est de même pour la $\Delta 6$ desaturase (COOK, 1978). Dans le tableau V est reportée l'évolution de cette enzyme au niveau du foie et du cerveau. Il est à noter que le profil évolutif est inversé. L'activité de la $\Delta 6$ desaturase cérébrale est très élevée au cours du développement embryonnaire, elle est insignifiante chez l'adulte.

Il semble donc que dès le sevrage, le cerveau des Mammifères soit tributaire d'un apport en AGPI synthétisés au niveau du foie et déversés dans la circulation sanguine.

Ainsi l'autonomie du cerveau en matière de synthèse d'acides gras se limiterait chez l'adulte à la production des acides gras du groupe 1, il dépendrait d'un apport alimentaire pour les acides gras essentiels et d'un apport sérique pour les AGPI.

II - B.H.E. ET CAPTATION D'ACIDES GRAS

Les questions qui se posent sont les suivantes : la B.H.E. est-elle permissive en matière de captation d'acides gras, ou bien exerce-t-elle un pouvoir sélectif ?

Des éléments de réponse proviennent soit des études réalisées après injection de précurseurs d'acides gras ou d'acides gras eux-mêmes, soit des études diététiques.

II.1 ETUDES "IN VIVO"

II.1.1 Utilisation des précurseurs d'acides gras

L'injection d'acétate marquée au C_{14} dans la carotide de rat adulte suivie de la décapitation 15 secondes plus tard de l'animal, met en évidence (DHOPESHWARKAR et MEAD, 1971) :

- la synthèse de cholestérol marqué en quantité importante,
- la synthèse de lipides "de novo" dont celle des acides gras,
- le marquage des lipides polaires majeurs et l'incorporation de la radioactivité dans les complexes lipidiques.

La B.H.E. permet donc le passage des précurseurs radioactifs du sang vers le cerveau. Toutefois la voie d'injection semble être déterminante. En effet, lorsque l'acétate est injectée par voie intrapéritonéale et que l'animal est sacrifié 24 heures plus tard, la phosphatidylcholine cérébrale sera marquée préférentiellement. Par contre, si l'injection est intracarotidienne, suivie 15 secondes plus tard du sacrifice de l'animal, c'est la phosphatidylsérine qui sera massivement marquée (DHOPESHWARKAR et coll., 1973). Il apparaît donc que le chemin emprunté et le temps entre l'injection et le sacrifice soient déterminants. Toutefois le chemin emprunté n'est important que lors d'injections de précurseurs d'acides gras. En effet, lorsque l'acide palmitique marqué au C_{14} est injecté par voie intraveineuse ou intracarotidienne, c'est la phosphatidylcholine qui sera dans les deux cas la plus radioactive.

II.1.2 Utilisation des acides gras

L'acide palmitique marqué au C_{14} et injecté par voie intracarotidienne se fixe dans les phospholipides cérébraux dans les mêmes proportions que l'acétate marqué (DHOPESHWARKAR et coll., 1973). Ces études ont montré que le cerveau était capable de capter et d'assimiler les acides gras sériques.

TABLEAU VI : SYMPTOMES DE CARENCE EN ACIDES GRAS ESSENTIELS.

CROISSANCE (Burr et Burr, 1929)

*retard de croissance chez le rat : 20-30% chez la femelle
et 30-50% chez le mâle

MANIFESTATIONS CUTANÉES (Burr et Burr, 1929, 1930, Jokgensen et
Holmer, 1969)

*perte de poils
*nécrose de la queue
*diminution de la pigmentation de la peau

REPRODUCTION (Lackenbush et coll., 1942, Deuel et coll., 1954)

*augmentation du temps de gestation
*hémorragie lors de la parturition
*nombreux ratons mort nés
*atteinte difficile de l'âge du sevrage

AUTRES EFFETS (Panos et coll., 1956, Salli et coll., 1975)

*augmentation du métabolisme de base de 30 à 50 %
*augmentation de la perméabilité cutanée
*déséquilibre de la balance hydrique
*modification de l'électrocardiogramme
*diminution de la capacité d'apprentissage

Lorsque l'acide stéarique marqué au C₁₄ est injecté par voie sous-cutanée, la radioactivité est retrouvée au niveau des phospholipides du cerveau, et plus particulièrement ceux des synaptosomes (BOURRE et coll., 1977).

Toutefois l'acide stéarique subit des phénomènes d'élongation ou de dégradation ou encore donne naissance à de l'acétate puisque la radioactivité est retrouvée au niveau d'acides gras supérieurs en C20, C22, C26 ainsi qu'au niveau de l'acide palmitique et du cholestérol (GOZLAN-DEVILLIERRE et coll., 1976).

La captation des acides gras injectés et leur incorporation dans les lipides complexes cérébraux varie notamment avec le type cellulaire et le stade de développement. Ainsi la radioactivité captée au niveau des neurones et moins importante que celle enregistrée au niveau des astrocytes (respectivement 800 et 2200 cpm/mg de protéines 20 heures après l'injection) (MORAND et coll., 1979). Elle varie avec la classe lipidique : 80% de la radioactivité est retrouvé au niveau des phospholipides astrocytaires contre 65% au niveau neuronal (MORAND et coll., 1979).

L'apport exogène d'acides gras varie en fonction du développement cérébral. Ainsi l'acide stéarique est capté de façon croissante durant la période de myélinisation pour ensuite décroître (BOURRE et coll., 1978).

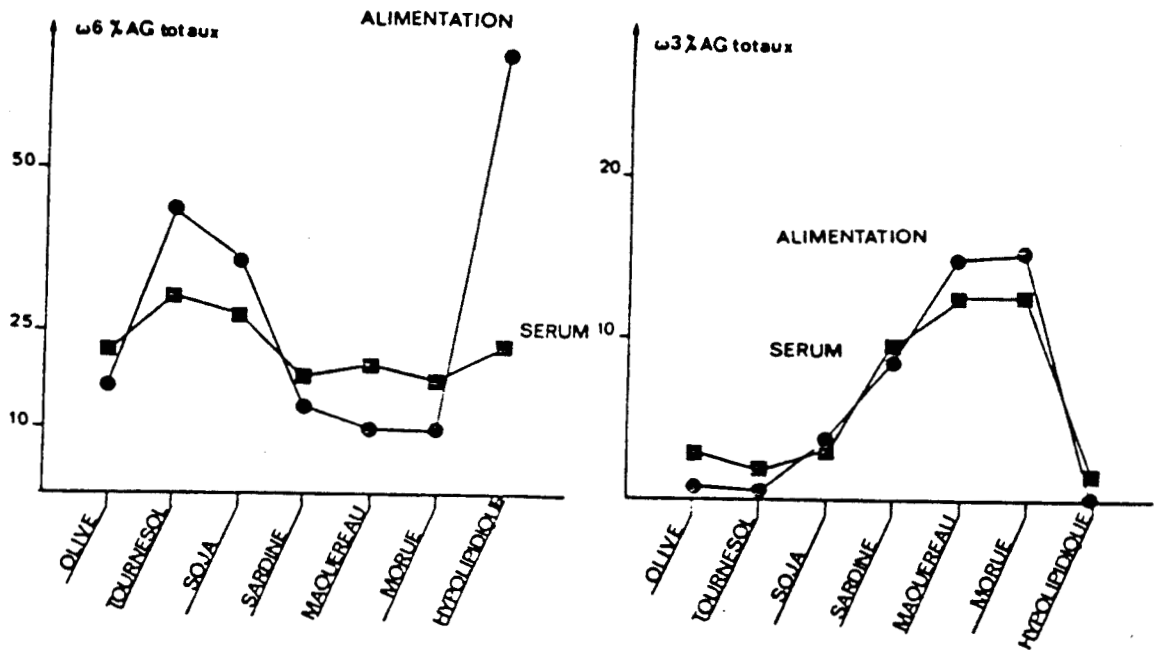
II.2 ETUDES DIETETIQUES

Si les études "in vitro" ont montré l'existence d'une captation cérébrale d'acides gras, les résultats restent imprécis quant à la définition des besoins cérébraux. Des études diététiques par le biais des carences nutritionnelles et des régimes lipidoprives ont permis de préciser les besoins fondamentaux en acides gras du S.N.C.

II.2.1 Carences nutritionnelles

Les carences nutritionnelles totales en acides gras essentiels s'accompagnent de syndromes typiques résumés tableau VI et parmi lesquels on notera plus particulièrement les problèmes de croissance, les manifestations cutanées et les problèmes liés à la reproduction.

FIGURE 7 : CORRELATION ENTRE LE C18 : 2 ET le C18 : 3 ALIMENTAIRE ET LES AGPI SERIQUES (Durand et coll., 1985).



Les rats sont soumis à un régime contenant 10% de lipides sous forme d'huile d'olive. A l'age adulte et pour deux mois, ils sont partagés en 7 lots:

- un lot continue de recevoir le régime "huile d'olive" et constitue le lot de référence.
- cinq lots reçoivent un régime ne différant du régime "huile d'olive" que par la nature de l'apport lipidique, la moitié de l'huile d'olive, soit 5% du régime, étant remplacée par : de l'huile de tournesol ou de l'huile de soja ou de l'huile extraite de boîte de sardines à l'huile d'olive ou de l'huile extraite des maquereaux entiers ou de l'huile de foie de morue. Le septième lot reçoit un régime dit hypolipidique, ne renfermant que 1% de lipides sous forme d'huile de tournesol.

Les teneurs en AG saturés des diverses matières grasses utilisées se situent entre 15%(tournesol) et 22,5%(maquereau).

Les teneurs en AG monoinsaturés vont de 66%(olive) à 41%(tournesol).

Les teneurs en AG polyinsaturés ω6 vont de 43%(tournesol) à 10 %(foie de morue).

Les teneurs en AG polyinsaturés ω3 vont de 0,5% (tournesol) à 15 % (foie de morue).

LEVIN et KLEEMAN en 1970 ont mis en évidence une captation sélective du C 18:3 n-3 par rapport au C 18:2 n-6 en dosant leurs homologues polyinsaturés (C 20:4 n-6 et C 22:6 n-3) dont ils sont les précurseurs.

Bien que le cerveau soit considéré comme étant l'organe le plus protégé de l'organisme face à une carence en acide linoléique, les membranes des cellules et organites cérébrales n'échappent pas à la règle et sont perturbées par les carences alimentaires (BOURRE et coll., 1984).

II.2.2 Le cerveau : un organe protégé

L'application de régime lipido-prive sélectif a permis de mettre en évidence un phénomène qui protège le cerveau contre les modifications de l'apport lipidique alimentaire.

L'étroite relation existant entre l'apport alimentaire et la composition sérique en acides gras a été étudiée en soumettant des animaux à des régimes contenant des quantités variables d'acides linoléique et linoléique (DURAND et coll., 1985).

Il a été mis en évidence une captation cérébrale très importante d'AGPI lorsque l'apport alimentaire est inférieur à 2-3% ; cette captation n'est plus proportionnelle à ce taux d'AGPI sériques quand l'apport exogène est excédentaire. Ainsi toutes les manipulations diététiques influencent la composition sérique et conditionnent les apports lipidiques aux tissus et en particulier au cerveau.

Un déficit alimentaire en acides gras essentiels des séries n-6 et n-3 appliqué à une rate 2 semaines avant le terme de sa gestation, provoque l'apparition d'acides gras de la série n-9 chez le raton nouveau-né. Ainsi l'acide eicosatriénoïque C 20:3 n-9 au niveau des phospholipides des microsomes myéliniques est particulièrement augmenté alors que le taux C 20:4 n-6 et C 22:4 n-6 est très faible. Cette augmentation des AGPI de la série n-9 contrebalance le déficit d'insaturation provoqué par le régime carencé en C 18 n-6 et C 18 n-3 qui bloque les voies de synthèse des AGPI des deux séries (SUN, 1972).

De même les lipides cérébraux des animaux soumis à des régimes lipido-privés pour les acides gras de la série n-3 uniquement (régime à l'huile de Tournesol) ont un degré d'insaturation analogue à celui des animaux non carencés (huile de Soja). Toutefois le taux d'AGPI de la série n-6 par rapport au taux d'AGPI de la série n-3 est particulièrement perturbé.

Chez les animaux soumis au régime Tournesol, le déficit très important en acide docosahexaénoïque (C 22:6 n-3) est compensé par un excès de C 22:5 n-6 (BOURRE et coll., 1984).

Il semble donc que le cerveau maintienne à tous prix constante sa concentration en acides gras polyinsaturés tout en accusant un déficit en acides gras à très longue chaîne qui auraient dû dériver de l'acide gras absent de l'alimentation. Il mettrait en oeuvre un système de protection vis-à-vis des manipulations diététiques en maintenant le taux constant d'insaturation des acides gras.

II.2.3 Le cerveau : un organe qui récupère

La carence nutritionnelle en acide linoléique provoque de graves anomalies dans la composition en acides gras des cellules et organites du cerveau. La vitesse de récupération après reprise d'un régime normal est extrêmement lente (YOUYOU et coll., 1986).

Il faut plusieurs mois pour qu'elles recouvrent une quantité normale en acide docosahexaénoïque (C 22:6 n-3) et perdent leur acide docosapentaénoïque (C 22:5 n-6) en excès. Cette lenteur illustrée figure 8 est la même quelle que soit la cellule ou l'organite.

On pourrait prévoir que la récupération serait effectivement peu rapide dans la myéline, membrane à renouvellement lent mais il est très unattendu d'observer que les terminaisons nerveuses aient elles aussi une récupération très lente, alors que le renouvellement des molécules constituant leurs membranes est supposé rapide. La régulation de la récupération se situe, soit au niveau de la production hépatique des fins de chaînes (acide docosahexaénoïque), soit au niveau du transport de la B.H.E, soit au

des activités enzymatiques de désaturation et d'élongation qui sont reconnus pour être affaiblies dans le cerveau après la naissance (COOK, 1978, STROUVE-VALLET et PASCAUD, 1971). Il est intéressant de constater que les microvaisseaux et les capillaires cérébraux ont aussi une vitesse de récupération très lente, bien qu'ils soient en contact avec les lipoprotéines plasmatiques normales (HOMAYOUN et coll., 1987). Ces résultats impliquent un rôle important de la B.H.E. dans les phénomènes de récupération.

II.3. ETUDES "IN VITRO"

Les études "in vitro" sur cultures cellulaires ont permis de définir quels étaient les acides gras réellement indispensables pour le cerveau (BOURRE et coll., 1983).

D'une part le cerveau ne contient pratiquement pas d'acide linoléique ni d'acide linoléique. D'autre part les cellules nerveuses en culture ne sont pas capables de synthétiser des quantités appréciables d'acide docosahexaénoïque C 22:6 n-3. Seule l'addition de C 20:4 n-6 et C 22:6 n-3 dans le milieu de culture de cellules nerveuses permet un meilleur fonctionnement des neurones mesuré par exemple par le relargage de neuromédiateurs (LOUDE et coll., 1983, BOURRE et coll., 1983), et la multiplication et la différenciation des oligodendrocytes par le biais d'une composition normale en acides gras de leurs membranes. Il semble donc que les acides polyinsaturés de fin de chaîne linoléique et linoléique, puis déversés dans la circulation sanguine soient les acides gras essentiels pour le cerveau. Pris en charge par divers transporteurs, ils se trouvent alors confrontés à la sélectivité de la B.H.E.

Nous étudierons donc tour à tour les différents transporteurs sériques d'acides gras pour trouver un modèle susceptible de s'adapter à la B.H.E.

TABLEAU VII : CONSTANTES D'ASSOCIATION DES ACIDES GRAS POUR LE PLASMA HUMAIN.(d'après Spector, 1975)

| Ka Résultats en M-1 | | | | | | | | | |
|---------------------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|----------|----------|-----------|
| Sites de fixation | Hexanoate | Octanoate | Décanoate | Laurate | Myristate | Palmitate | Stéarate | Oléate | Linoléate |
| 1 | 1.5 10.4 | 3.4 10.4 | 1.0 10.5 | 2.4 10.6 | 2.1 10.7 | 6.2 10.7 | 1.5 10.8 | 2.6 10.8 | 7.9 10.7 |
| 2 | 2.4 10.3 | 9.7 10.3 | 2.8 10.4 | 1.1 10.6 | 6.4 10.6 | 2.3 10.7 | 5.3 10.7 | 9.4 10.7 | 8.7 10.6 |
| 3 | 3.1 10.2 | 4.5 10.3 | 1.2 10.4 | 4.9 10.5 | 2.7 10.6 | 1.2 10.6 | 1.9 10.7 | 2.9 10.7 | 5.1 10.6 |
| 4 | 2.0 10.2 | 1.4 10.3 | 1.2 10.4 | 2.5 10.5 | 1.0 10.6 | 3.1 10.6 | 5.6 10.6 | 2.1 10.7 | 3.1 10.6 |
| 5 | 4.7 10.1 | 1.6 10.3 | 7.8 10.3 | 1.9 10.5 | 8.1 10.5 | 1.5 10.6 | 4.5 10.6 | 1.1 10.7 | 6.8 10.5 |

III - LES TRANSPORTEURS LIPIDIQUES

Les transporteurs potentiels des AG dans le sang sont au nombre de trois à savoir :

- la sérum albumine
- l'alpha foetoprotéine
- les lipoprotéines

III.1 LA SERUM ALBUMINE

La sérum albumine, chaîne polypeptidique de 569 à 613 résidus d'acides aminés est capable de transporter de nombreux AG libres et possède plusieurs sites de fixation en relation avec sa conformation (SPECTOR, 1975).

La chaîne polypeptidique comporte quatre régions globulaires, stabilisée par des ponts disulfures.

Les deux sites de liaison pour les anions organiques sont localisés dans des crevasses hydrophobes. A côté de ces deux sites possédant les constantes d'association les plus fortes et fixant les acides gras libres à longue chaîne, il existe plusieurs autres sites ayant une constante plus faible et liant la bilirubine ou d'autres composés organiques amphotères (FREDICKSON et GORDON, 1958).

La sérum albumine prend ainsi en charge les acides gras libres du plasma qui proviennent en partie de la dégradation des triglycérides, des adipocytes ou des lipoprotéines telles que les chylomicrons ou les VLDL.

Pour une concentration plasmatique de l'ordre de 0,18 à 1,65 mM. Les acides gras libres se fixeront sur les deux sites de haute affinité. Pour une concentration de 2 mM, les acides gras libres occuperont les autres sites de fixation (SPECTOR et coll., 1973).

Une certaine spécificité dans la liaison acide gras se dégage du tableau VII. La constante d'association croît en fonction du nombre d'atomes de carbone de la chaîne aliphatique. La sérum albumine s'avère être un transporteur efficace d'acides gras. Toutefois sa capacité à fixer les AGPI est relativement limitée.

De plus, les travaux de PARDRIDGE et coll. en 1985 ont montré que l'albumine ne se fixait pas de façon saturable sur les capillaires isolés de cerveau de boeuf.

Cette absence de récepteurs spécifiques au niveau de la B.H.E. associée à une capacité limitée dans le transport des AGPI font de la sérum albumine un vecteur peu probable dans l'alimentation lipidique cérébrale.

III.2 . L'ALPHA-FOETOPROTEINE (AFP)

L'AFP est une globuline synthétisée principalement par le foie et sécrétée dans le plasma au cours du développement foetal et post-natal (AUSSEL et MASSEYEF, 1983).

Bien que l'AFP soit antigénétiquement distincte de la sérum albumine, les deux protéines possèdent quelques propriétés physicochimiques et biochimiques analogues (YAVIN et coll., 1984). Toutefois, l'AFP fixe plus particulièrement des AGPI.

Selon AUSSEL et MASSEYEF, il existe une différence notable entre les différentes constantes d'association des acides gras saturés et monoinsaturés et les AGPI.

| | |
|-----------------------|----------------------------------|
| AGPI..... | $ka = 10^6 M^{-1}$ |
| Acides gras saturés.. | $ka = 10^4 \text{ } 10^5 M^{-1}$ |

Ainsi l'affinité de l'AFP pour les acides gras est d'autant plus grande que le nombre d'atomes de carbone et de doubles liaisons de leur chaîne aliphatique est grand.

Si l'AFP peut jouer un rôle de transport et amener les AGPI au cerveau, sa courte apparition dans le sérum restreinte aux premiers stades du développement, n'en fait pas un vecteur de choix dans les échanges lipidiques.

FIGURE 9 : STRUCTURE GENERALE D'UNE LIPOPROTEINE.

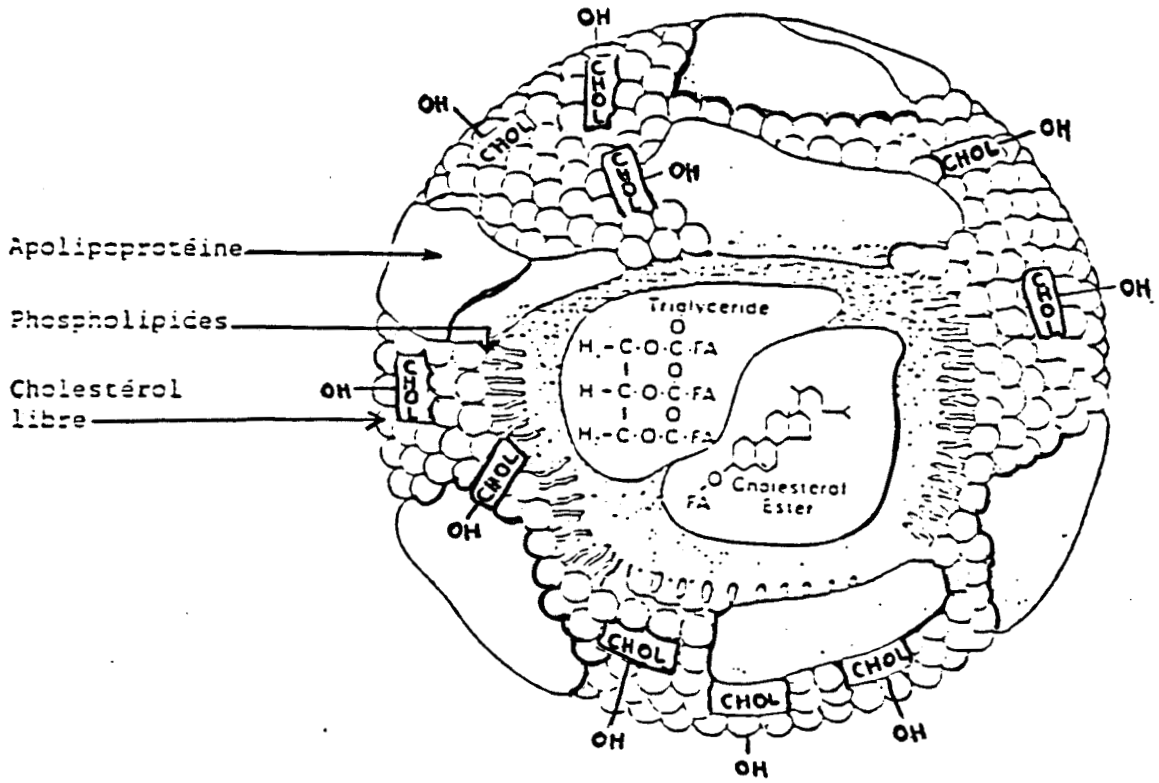


TABLEAU VIII : Les principales apoprotéines, localisation et fonctions.

| Apoprotéine | PM (kD) | Lieu de synthèse | Lipoprotéine | Rôle fonctionnel |
|-------------|-----------------|------------------------------|------------------------------|---|
| B100 | 540 | Foie Intestin | VLDL LDL | Transport des lipoprotéines hépatiques Interaction R. LDL Ligand des récepteurs B.E |
| B48 | 260 | Intestin | Chylomicrons VLDL | Transport des lipoprotéines intestinales |
| E | 33 | Foie Tissus périphériques | Remnants VLDL HDL 1-2 | Transport HDL naiss. Ligand des R. |
| A1 | 28 | Foie Intestin | Chylomicrons HDL | Transport Activ. LCAT |
| AII | 17 (8.5 X 2) | Foie Intestin | prot. struct. des HDL | Activ. Tryglycéride lipase hépatique |
| AIV | 45 | Intestin | Chylomicrons VLDL HDL3 | Activ. LCAT ligand des R |
| CII | 8,5 | Foie | VLDL HDL | Activ. Lipoprotéine lipase |
| CIII | 11-13 | Foie | VLDL HDL | Inhibe capt. Apo E Inhibe la LPL |
| CI | 6.5 | Foie | VLDL | Activ. LCAT |

TABLEAU IX : Caractéristiques physico-chimiques et composition des principales lipoprotéines

| | Chylomicrons | VLDL | IDL | LDL | HDL2 | HDL3 |
|-----------------------------|--------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|
| Flottation (Sf) | > 400 | 20-400 | 12-20 | 0-12 | 0 | 0 |
| Densité | < 0,94 | 0,94- 1,006 | 1,006- 1,019 | 1,019- 1,063 | 1,063- 1,125 | 1,125- 1,21 |
| Taille (nm) | 75-600 | 30-80 | 25-30 | 21-25 | 11 | 9 |
| Migration en électrophorèse | 0 | Pré- béta | béta large | béta | alpha | alpha |
| Composition (%) | | | | | | |
| Prot. | 2,5 | 9 | 13 | 21 | 44 | 54 |
| CL | 0,8 | 12 | 10 | 8 | 3 | 3 |
| CE | 2,9 | 6 | 27 | 37 | 15 | 18 |
| PL | 9 | 18 | 20 | 22 | 36 | 23 |
| TG | 85 | 53 | 30 | 11 | 2 | 2 |

III.3 LES LIPOPROTEINES

III.3.1 Leur définition

Les lipoprotéines assurent le transport des lipides dans le compartiment plasmatique. Elles permettent le transport et la distribution des graisses d'origine exogène ou endogène, ainsi que celui de diverses substances liposolubles (vitamines, carotènes, médicaments...).

Très schématiquement le noyau central des lipoprotéines illustré figure 9 est constitué de lipides hydrophobes comme le cholestérol estérifié (CE) et les triglycérides (TG) alors que les constituants de surface sont le cholestérol libre (CL), les phospholipides (PL) et les apolipoprotéines classées selon la nomenclature "A, B, C". Ces apolipoprotéines (tableau VIII) interviennent dans le transport des lipides, les interactions lipoprotéines-récepteurs, ainsi que dans la régulation de l'activité enzymatique impliquée dans le métabolisme des lipoprotéines (POLONOVSKI et BEUCLER, 1983). Cependant la structure des lipoprotéines est en perpétuel remaniement du fait de nombreux échanges intermoléculaires de tous genres.

Le tableau IX illustre la classification des lipoprotéines en fonction de leurs diverses propriétés physiques. Sur la base de leur densité hydratée, elles se subdivisent en ;

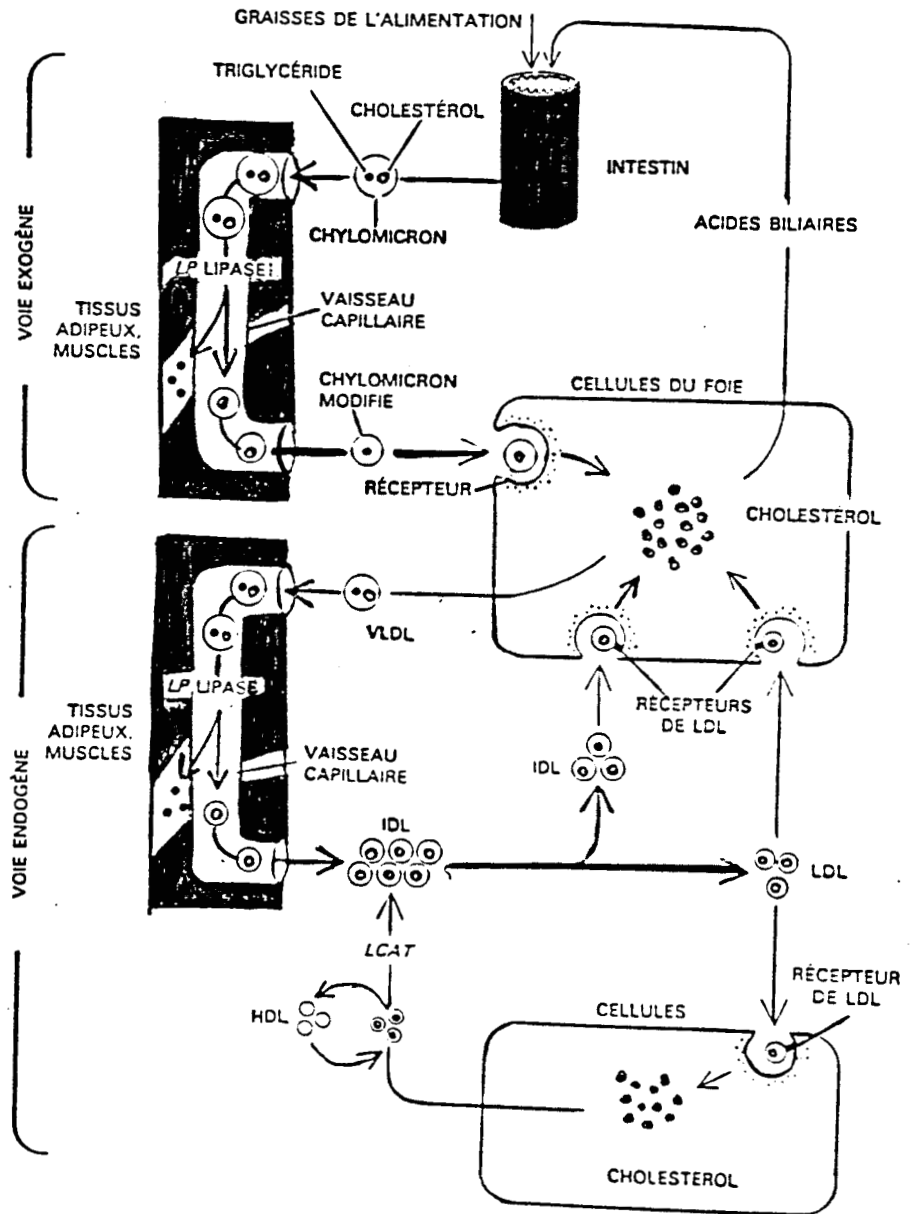
- chylomicrons
- lipoprotéines de très basse densité ou VLDL
- lipoprotéines de basse densité ou LDL
- lipoprotéines de haute densité ou HDL
- lipoprotéines intermédiaires ou IDL

et également deux classes quantitativement mineures :

- lipoprotéines de très haute densité ou VHDL
 $1,21 < d < 1,25$
- lipoprotéines (a) : Lp (a) chevauchant les LDL et les HDL
 $1,05 < d < 1,12$

FIGURE 10 : METABOLISME DES LIPOPROTEINES.

(d'après Brown et Goldstein, 1985)



Etant donné l'importance des apolipoprotéines en tant qu'élément structural et fonctionnel des lipoprotéines ALAUPOVIC et coll. en 1972 ont proposé un second mode de classification, non plus par référence à leurs propriétés physicochimiques, mais en fonction de leur composition en apolipoprotéines. Les lipoprotéines sont considérées comme un ensemble de particules où les lipides sont associés à une ou plusieurs apolipoprotéines. Ainsi, les lipoprotéines simples contiendront une seule apolipoprotéine (ex. : Lp AI, Lp B), tandis que les lipoprotéines complexes seront composées de deux ou plusieurs apolipoprotéines (ex. : Lp B-CIII, Lp AI-AII).

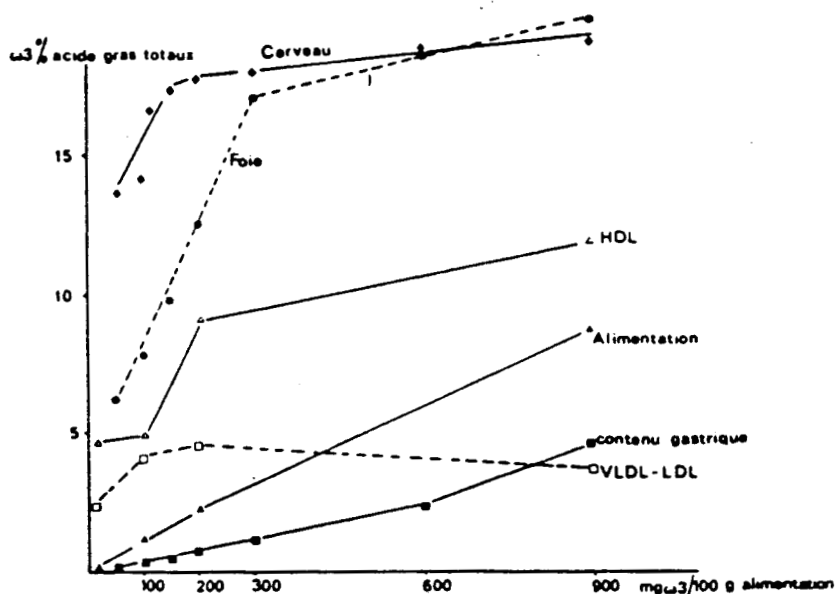
III.3.2 Leur métabolisme

Deux organes sont impliqués dans la biosynthèse et la sécrétion des lipoprotéines. : l'intestin et le foie (figure 10).

La muqueuse intestinale synthétise en période nutritionnelle des chylomicrons à partir des graisses ingérées et en toutes périodes des VLDL. Les chylomicrons sécrétés dans la lymphe et les VLDL rejoignent la circulation générale par l'intermédiaire du canal thoracique et sont chargés de triglycérides dont les acides gras sont essentiellement d'origine exogène. Le foie synthétise et sécrète dans le sang des HDL et des VLDL. Ces dernières transportent les triglycérides endogènes formés dans l'hépatocyte. Dans le sang, les chylomicrons et les VLDL pour être métabolisés, doivent recevoir des HDL un complément d'apolipoprotéines et en particulier d'apoprotéine CII activatrice de la lipoprotéine lipase (LPL). Les chylomicrons sont transformés en particules résiduelles appauvries en triglycérides et captées ensuite par le foie, leurs constituants de surface pouvant dans le même temps donner naissance aux HDL.

Le métabolisme intravasculaire des VLDL dépend au moins de deux enzymes : la lipoprotéine lipase (LPL) qui hydrolyse les triglycérides et la lécithine-cholestérol acyltransférase (LCAT) synthétisée dans le foie qui est responsable de l'estérification du cholestérol sérique.

FIGURE 11 : RELATION ENTRE LE CONTENU ALIMENTAIRE EN ACIDE LINOLENIQUE ET LES ACIDES GRAS DE LA SERIE $\omega 3$ ou n-3 DE DIVERS ORGANES ET FRACTIONS .
(d'après Nouvelot et coll. 1985)



Les animaux ont été soumis à un régime contenant 10% de lipides sous forme d'huile d'arachide ou de colza. Les valeurs intermédiaires en contenu d'acide linoléique ont été obtenues en ajoutant des quantités croissantes d'huile d'arachide à l'huile de colza.

Les particules résiduelles de chylomicrons sont captées directement par le foie, en revanche les particules résiduelles des VLDL d'origine hépatique ou lipoprotéines intermédiaires (IDL) sont captées directement par le foie ou transformées en LDL.

Les HDL quant à elles, sont synthétisées par le foie mais peuvent être également issues du catabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides. Les précurseurs des HDL sont des complexes discoïdaux constitués d'apolipoprotéines, de phospholipides et de cholestérol libre. Sous l'action de la LCAT, le cholestérol de surface est estérifié par un acide gras venant des phospholipides. La réaction est activée par l'apo AI puis par l'apo AIV. Le cholestérol estérifié ainsi synthétisé se déplace vers le noyau de la lipoprotéine libérant une place pour une nouvelle molécule de cholestérol. Les particules naissantes deviennent ainsi des HDL₃ qui après lipolyse donneront des HDL₂. Ainsi les HDL représentent une classe hétérogène de lipoprotéines. Leur richesse en AGPI localisés au niveau de leurs phospholipides est un fait à retenir. Ces AGPI ont été synthétisés au niveau du foie. Les HDL constituent les transporteurs par excellence des AGPI (voir pour revue : POLONOVSKI et BEUCLER, 1983).

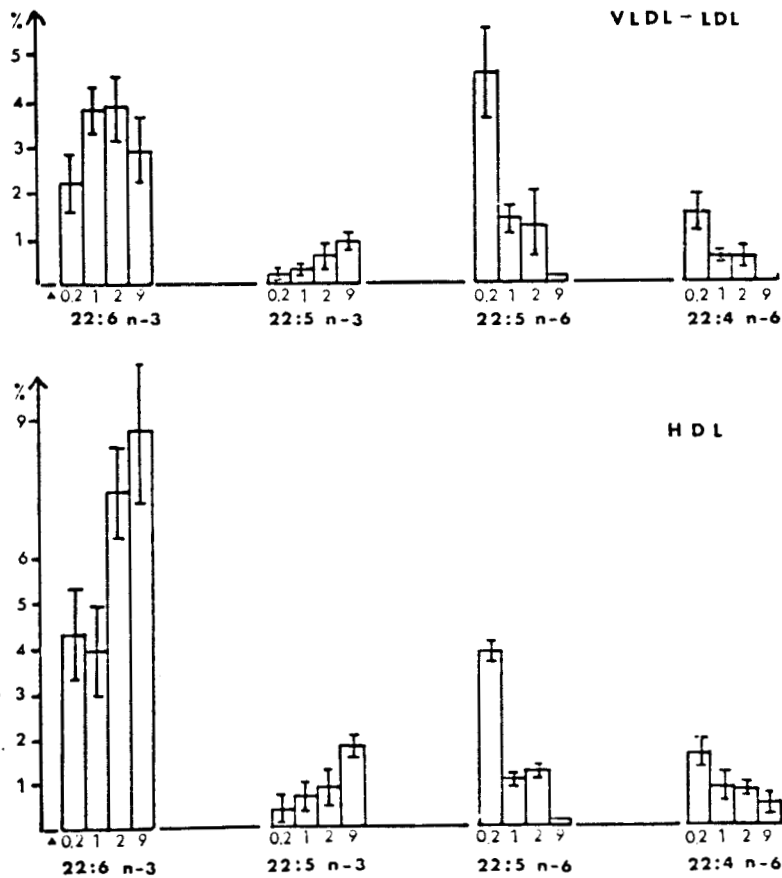
III.3.3 HDL et nutrition

Nous avons rappelé le métabolisme des lipoprotéines pour mettre en valeur l'incorporation progressive des graisses alimentaires au niveau des transporteurs sériques, et souligné l'importance des facteurs alimentaires sur leur constitution.

L'incidence du régime alimentaire sur la répartition des acides gras au sein des lipoprotéines sériques a été démontrée par des études nutritionnelles.

Ces études ont montré (figure 11) que le taux d'AGPI des HDL était étroitement corrélé aux variations de l'apport alimentaire. Une étude plus précise de l'évolution de ce même taux d'AGPI au niveau des phospholipides des lipoprotéines (figure 12) souligne la grande sensibilité des HDL aux manipulations diététiques (NOUVELOT et coll., 1985).

FIGURE 12 : EVOLUTION DU TAUX DES AGPI DE CHAQUE SERIE DANS LES LIPOPROTEINES EN FONCTION DE L'APPORT EN 18 : 3n-3 (d'après Nouvelot et coll., 1985).



L'apport en 18 : 3n-3 représente 0,2%, 1%, 2% et 9 % de l'alimentation

De toute évidence les HDL véhiculent de façon physiologique des AGPI synthétisés au niveau du foie et qui sont essentiels pour le fonctionnement cérébral.

III.4 CONCLUSION

L'étude des différents transporteurs sériques nous montre que la sérum albumine tout comme l'alpha foetoprotéine sont capables de fixer des acides gras et de les amener jusqu'au cerveau. Toutefois les HDL semblent plus adaptées à ce rôle de convoyeur d'AGPI jusqu'à la barrière hémato-encéphalique pour diverses raisons. En effet, contrairement à l'alpha foetoprotéine, leur existence sérique n'est pas limitée dans le temps. Comparativement à la sérum albumine, elles transportent d'importantes quantités d'acides gras polyinsaturés au niveau de leurs phospholipides.

Enfin leur rôle de facteurs nutritionnels dans l'apport d'acides gras au cerveau et dans la constitution des HDL sont en faveur d'un rôle important des HDL dans l'acheminement des acides gras synthétisés au niveau hépatique vers le S.N.C.

Si le choix des HDL comme transporteurs d'acides gras est judicieux, comment peut-on imaginer un transfert des acides gras des HDL vers le cerveau ?

Nous allons tenter dans le chapitre suivant de définir les mécanismes généraux qui régissent les transferts lipidiques.

C H A P I T R E I I I

LES ECHANGES LIPIDIQUES

CHAPITRE III : LES ECHANGES LIPIDIQUES

| | |
|---|----|
| I - <u>L'ENDOCYTOSE PAR RECEPTEUR</u> | 58 |
| I.1. Endocytose par le récepteur B.E..... | 58 |
| I.1.1. Le mécanisme | 61 |
| I.1.2. Le récepteur B.E. | 61 |
| I.2. Un récepteur pour les HDL..... | 63 |
| I.2.1. Fixation tissulaire des HDL..... | 63 |
| a) Fixation hépatique | 63 |
| b) Fixation au niveau des tissus stéroïdiens | 64 |
| c) Fixation au niveau des tissus périphériques | 64 |
| I.2.2. Le site de fixation des HDL..... | 65 |
| I.3. Les HDL sont-elles internalisées | 66 |
| I.3.1. Au niveau du foie | 66 |
| I.3.2. Au niveau des tissus stéroïdiens | 68 |
| I.3.3. Au niveau des tissus périphériques | 68 |
| II - <u>ECHANGES LIPIDIQUES ENTRE BICOUCHES</u> | 69 |
| II.1. Echanges spontanés..... | 69 |
| II.1.1. Mécanismes physiques..... | 69 |
| a) Les échanges moléculaires | 69 |
| b) Les échanges micellaires | 69 |
| c) Les échanges par collision | 70 |
| d) Les échanges par fusion..... | 70 |
| II.1.2. Conditions requises..... | 70 |
| a) Echanges moléculaires et micellaires | 70 |
| b) Echanges par collision et fusion | 71 |
| II.1.3. Echanges lipidiques avec la membrane plasmique | 72 |
| II.2. Echanges non spontanés | 74 |
| III - <u>DESTIN DES LIPIDES ECHANGES AVEC LA MEMBRANE PLASMIQUE</u> | 75 |
| III.1. Destin des phospholipides | 75 |
| III.2. Destin du cholestérol | 76 |
| III.3. Conclusion | 76 |

Dans ce chapitre nous tenterons de définir les mécanismes qui assurent la distribution des lipides liés aux HDL tels que le cholestérol libre, le cholestérol estérifié, les phospholipides ou les AGPI aux différentes cellules.

Est-ce grâce à un phénomène d'endocytose similaire à celui observé pour les LDL ou est-ce grâce à un phénomène d'échange lipidique à la surface membranaire ?

Plusieurs approches ont été réalisées notamment en étudiant les interactions vésicules-membranes isolées ou les interactions cellules-vésicules lipidiques ou plus simplement les interactions vésicules lipidiques entre elles. Ces dernières, de composition connue représentent un modèle de base pour les systèmes beaucoup plus complexes.

I - L'ENDOCYTOSE PAR RECEPTEUR

Pour illustrer l'apport lipidique par endocytose nous prendrons comme exemple l'apport de cholestérol véhiculé par les LDL. Ce mécanisme bien connu de nos jours, a été caractérisé par GOLSTEIN et BROWN. Pour ces travaux ils obtinrent le prix Nobel de Médecine en 1985.

I.1 ENDOCYTOSE PAR LE RECEPTEUR BE

Les LDL issues du catabolisme des VLDL apportent le cholestérol aux cellules qui les captent par l'intermédiaire du récepteur BE mis en évidence par BROWN et GOLSTEIN, 1976. Il permet l'internalisation des LDL mais également d'autres lipoprotéines contenant de l'apolipoprotéine B ou E (apo B ou apo E). La captation des LDL se fait par un mécanisme d'endocytose du complexe ligand-récepteur illustré figure 13.

FIGURE 13 : ENDOCYTOSE PAR RECEPTEURS DES LDL.

(d'après Brown et Goldstein, 1985)

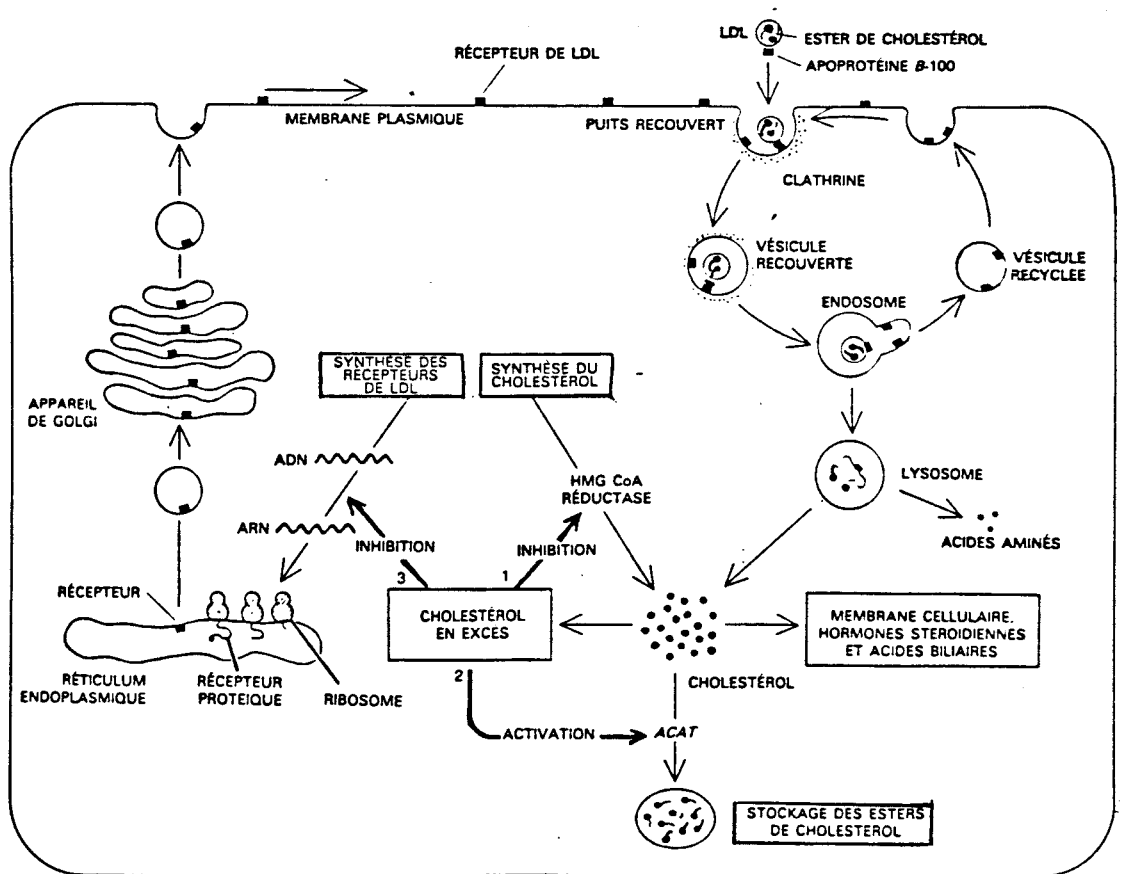
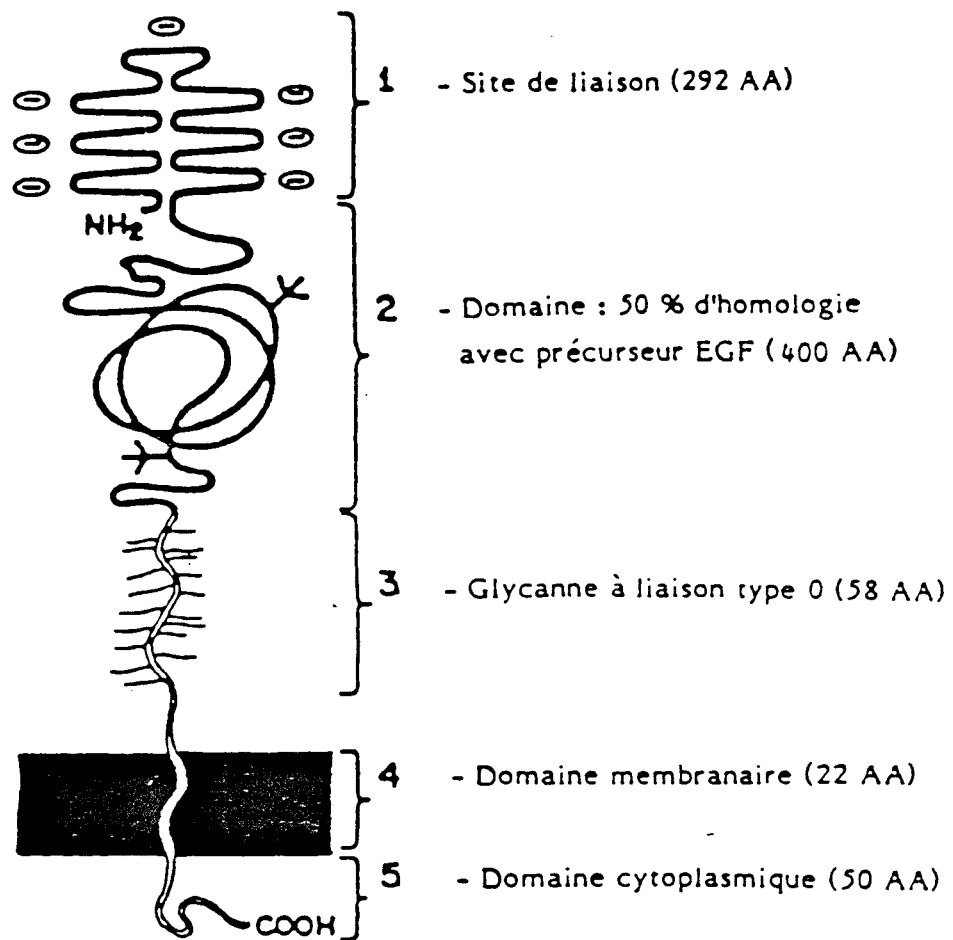


FIGURE 14 : RECEPTEUR LDL. (d'après Brown et Goldstein, 1985)



I.1.1 Le mécanisme

Les LDL se fixent sur des récepteurs de surface qui migrent et se regroupent dans des puits recouverts de la membrane plasmique. Ces puits recouverts d'une couche de clathrine (PEARSE, 1975) vont progressivement s'invaginer pour engendrer des vésicules recouvertes qui rassemblent les complexes récepteurs-LDL. Ces vésicules recouvertes perdent ensuite leur manteau de clathrine et fusionnent avec les endosomes. Le complexe récepteur-LDL est dissocié par acidification du milieu. Cette baisse de pH s'effectue grâce à la présence sur les membranes endosomiales, de pompes à protons ATP dépendantes (TYCKO et MAXFIELD, 1982). Les lipoprotéines sont transportées grâce aux endosomes tardifs vers les lysosomes pour y être dégradées alors que les récepteurs sélectionnés dans une vésicule sont recyclés à la surface des cellules. La libération de cholestérol consécutive à la dégradation intralysosomiale des lipoprotéines entraîne une série de rétrocontrôles qui assurent l'homéostasie du cholestérol intracellulaire (inhibition de HMG-CoA réductase, inhibition de la synthèse de nouveaux récepteurs et activation de l'ACAT).

I.1.2 Le récepteur BE

Le récepteur BE humain est une glycoprotéine de 839 acides aminés de masse moléculaire apparente de 164000 Daltons au sein de laquelle il est possible de distinguer cinq régions (figure 14) dont une région de 292 acides aminés en position NH_2 terminale se situant à l'extérieur de la cellule et comprenant le site de liaison des LDL (RUSSEL et coll., 1984).

La synthèse de ce récepteur est stimulée par les inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase impliquée dans la synthèse du cholestérol intracellulaire. Elle l'est également par l'ingestion de résines qui freinent la résorption intestinale des acides biliaires et augmentent l'élimination hépatique du cholestérol (THOMPSON, 1986).

Le récepteur BE est retrouvé à la surface de nombreuses cellules (fibroblastes, cellules musculaires lisses, leucocytes, surrénales, foies, etc..) et possède les caractéristiques suivantes (MAHLEY et INNERARITY, 1983) : la

TABLEAU X : SITES DE FIXATION DES RECEPTEURS HDL SUR DIFFERENTS TYPES CELLULAIRES.

| AUTEUR | TISSUS | "RECEPTEUR" | LIGAND | CARACTERISTIQUES |
|------------------------------|--|-------------|-------------------------------|---|
| BACHORIK 1982 | hépatocyte de porc | + | apo A-I | dégradation lysosomyale pour 1/3 des HDL fixées |
| DASHTIN 1985 | membrane hépatique humaine | + | apo C ou D | peu de spécificité |
| RIFICI 1984 | hépatocyte de rat | + | apo A-I | internalisation, dégradation |
| CHAKO 1985 | membrane hépatique de rat | + | tyrosine | |
| JOHNSON 1985 JOHNSON 1986 | hépatome humain | | | afflux de cholestérol dans la cellule en fonction du rapport C/PL |
| GLASS 1983 | | + | apo A-I | endocytose sans dégradation lysosomiale |
| HOEG 1985 | hépatocyte humain | + | apo A-I | |
| PITTMAN 1987 | hépatocyte humain | + | apo A-I | endocytose sans dégradation lysosomiale |
| GALLI 1980 | gonade de rat | + | apo A-I | |
| KOVANEN 1979 | tissus stéroïdien de souris | + | apo A-I | la captation du CE est supérieure à celle de l'apo A-I |
| GUYNNE 1982 | cellule surrénalienne de rat | | | la captation du CE est indépendante de la captation protéique |
| FIDGE 1985 | cellule corticosurrénalienne de rat | + | apo A-I apo A-II | internalisation sans dégradation |
| LEITERSDORF 1986 | cellule surrénalienne de rat ou de boeuf | + | | captation préférentielle du CE |
| FIDGE 1983 | fibroblaste humain | ? | | transport réverse du cholestérol grace aux lipides de surface |
| ORAM 1983 | " | ? | | " |
| TABAS 1984 | " | ? | | " |
| ORAM 1983 ORAM 1987 | cellule musculaire lisse, cellule endothéliale d'aorte bovine et fibroblaste | + | apo A-I apo A-I apo A-I | ni internalisation ni dégradation " " |
| HAVEKES 1984 | cellule endothéliale ? | | | pas de reconnaissance d'apo pour le site de fixation |
| PITTMAN 1987 | fibroblaste humain | + | apo A-I | captation préférentielle du CE par rapport à l'apo A-I |
| SLOTTE 1987 | fibroblaste humain et cellule endothéliale d'aorte bovine | + | apo A-I | retrait du cholestérol d'un pool intracellulaire |
| KARLIN 1987 | fibroblaste humain | - | | Transfert du cholestérol par diffusion aqueuse |
| STECK 1988 | globules rouges | - | | Transfert du cholestérol par collision |

CE : Cholestérol Estérifié

C/PL : Cholestérol/Phospholipides

fixation des LDL sur le récepteur BE et calcium dépendante. Elle est inhibée en présence d'EDTA par les polycations, la poly-L-lysine, la suramine et l'héparine. Par contre elle est résistante à la dénaturation thermique. Elle est abolie par la réduction des ponts disulfures et par la digestion enzymatique (pronase ou trypsine) du récepteur.

Ainsi comme son nom l'indique l'endocytose par récepteur nécessite à la fois la présence d'un récepteur actuellement bien caractérisé pour les LDL ainsi que des phénomènes d'endocytose impliquant un apport d'énergie et un ensemble de phénomènes de rétrocontrôles. Elle permet en fin de parcours la libération dans le cytoplasme des constituants véhiculés par la lipoprotéine. Elle constitue le principal mode d'apport du cholestérol aux cellules.

I.2 UN RECEPTEUR POUR LES HDL

Selon le système de classification d'ALAUPOVIC et coll. (1972), les HDL peuvent se subdiviser en fonction de leur composition en apolipoprotéines de type Apo AI, AII, AIV, CIII et E.

Les particules contenant l'apo E se retrouvent en majeure partie dans les HDL₂, alors que le taux d'apo E est insignifiant dans les HDL₃.

L'interaction des HDL₂ (présence d'apo E) avec le récepteur BE est donc possible. La question qui se pose concerne les HDL déficientes en apo E : interagissent-elles avec un récepteur spécifique de leur apolipoprotéine ?

I.2.1 Fixation tissulaire des HDL

Les HDL se fixent au niveau de trois types de tissus : hépatique, stéroïdien et périphérique. Les caractéristiques de ces fixations sont rassemblées tableau X.

a) Fixation hépatique

Le tissu hépatique est un gros consommateur de cholestérol qui lui est fourni par les HDL circulantes ou par une synthèse "de novo".

Une des grandes fonctions du foie est la dégradation du cholestérol et son excrétion dans la bile sous forme de stérols ou d'acides biliaires. Une partie du cholestérol hépatique est réexcrétée au niveau des lipoprotéines sériques. Ainsi l'excès de cholestérol des tissus périphériques est transporté dans le sang et la lymphe vers le foie pour être excrété (GLOMSET, 1968).

Les HDL amènent le cholestérol aux hépatocytes. A l'inverse des LDL, la liaison des HDL sur les hépatocytes de rat est indépendante de la présence de cations divalents et n'est pas inhibée par l'héparine ou lorsque les HDL sont modifiées par la 1,2-cyclohexanedione. Les apolipoprotéines AI sont responsables de cette fixation (CHAKO, 1984, 1985).

b) Fixation au niveau des tissus stéroïdiens

Le tissu stéroïdien est également un gros consommateur de cholestérol indispensable à la synthèse d'hormones stéroïdiennes. Les sites de liaison aux HDL situés au niveau des ovaires, des testicules et des glandes surrénales de rat sont soumis à une régulation hormonale par la LH/HCG (CHEN et coll., 1980), l'ACTH ou l'adrénotropine (FIDGE et coll., 1983).

L'apport de cholestérol au niveau des tissus stéroïdiens fait intervenir des récepteurs spécifiques des apolipoprotéines AI (FIDGE et NESTEL, 1985).

c) Fixation au niveau des tissus périphériques

Par rapport aux deux précédents tissus, les mouvements du cholestérol se font en sens inverse. Les tissus périphériques tendent à retrocéder leur cholestérol.

GLOMSET et NORUM ont proposé pour la première fois en 1973 le rôle des HDL dans le transport reverse du cholestérol à partir de cellules chargées en cholestérol. Les HDL se fixent par l'intermédiaire des apo AI et AII (ORAM et coll., 1983, BARBARAS et coll., 1987).

Des sites de liaison spécifiques des apolipoprotéines AI mais aussi AII et AIV semblent être impliqués dans la fixation des HDL. Ces sites de fixation favorisent l'efflux de cholestérol au niveau des tissus périphériques, aussi bien que l'influx de cholestérol au niveau des tissus consommateurs (hépatique et stéroïdien).

I.2.2 Le site de fixation des HDL

Les caractéristiques des sites de liaison des HDL sont les suivantes :

- ils reconnaissent les apolipoprotéines A (BARBARAS et coll., 1987), mais pas les apo B ou E.
- la fixation est indépendante de la présence de cations divalents. Elle n'est pas inhibée par la présence d'héparine.
- son expression à la surface cellulaire est fonction de la concentration intracellulaire en cholestérol. (ORAM et coll., 1983, HOEG et coll., 1985).

Les conséquences de la fixation des HDL sur ces sites de haute affinité sont la stimulation de l'activité de la 3-hydroxy-3-méthylglutamyl-CoA réductase ou HMG-CoA réductase, enzyme clé de la biosynthèse du cholestérol (DAERR et coll., 1980, CARR et SIMPSON, 1984) et de l'activité du récepteur LDL (BACHORICK et coll., 1982), ainsi qu'une inhibition de l'estérification du cholestérol (ORAM et coll., 1983) et de la réduction du cholestérol cellulaire (ORAM et coll., 1983, STEIN et coll., 1976).

De nombreux tissus semblent donc posséder des sites de liaison pour les HDL, mais le ou les "récepteurs" aux HDL ne paraissent pas avoir l'unicité du récepteur BE.

Jusqu'à nos jours quelques tentatives d'isolement de récepteurs ont été faites. Ainsi la membrane de nombreuses cellules posséderait une protéine cellulaire de surface de MM 110 KD capable de fixer des HDL₃ (ORAM et coll., 1983) aussi bien que des apo AI et AII (GRAHAM et ORAM, 1987, BARBARAS et coll., 1987). Une autre protéine de MM 78 KD a été caractérisée et purifiée partiellement dans le foie et le rein de rat ; elle est capable également de fixer les HDL₃, l'apo AI et l'apo AII (FIDGE et coll., 1985, 1986, BARBARAS et coll., 1987).

Il est possible que ces deux protéines capables de fixer à l'apo AI soient présentes à la surface des cellules adipeuses. La différence de masse moléculaire serait en fait le signe d'un degré différent de glycosylation (BARBARAS et coll., 1987).

Au problème d'isolement s'ajoute également le problème de spécificité du ligand vis-à-vis du récepteur.

Des HDL₃ se fixent avec une forte affinité sur les cellules endothéliales de cordon ombilical humain, mais les vésicules de phosphatidylcholine seules contenant de l'apo AI, de l'apo AII ou de l'apo E peuvent entrer en compétition de façon très efficace. La reconnaissance de l'apoprotéine pour le site de fixation n'est donc pas parfaitement spécifique (HAVEKES et coll., 1984).

I.3 LES HDL SONT-ELLES INTERNALISEES

Si on tend à accepter l'existence d'un récepteur HDL, se pose à nous le problème du devenir de ce récepteur après fixation de son ligand.

Une fois encore les données parues dans la littérature sont très controversées. Comme précédemment nous distinguerons les réponses en fonctions de trois grands types de tissus : le tissu hépatique, stéroïdien et périphérique.

I.3.1 Au niveau du foie

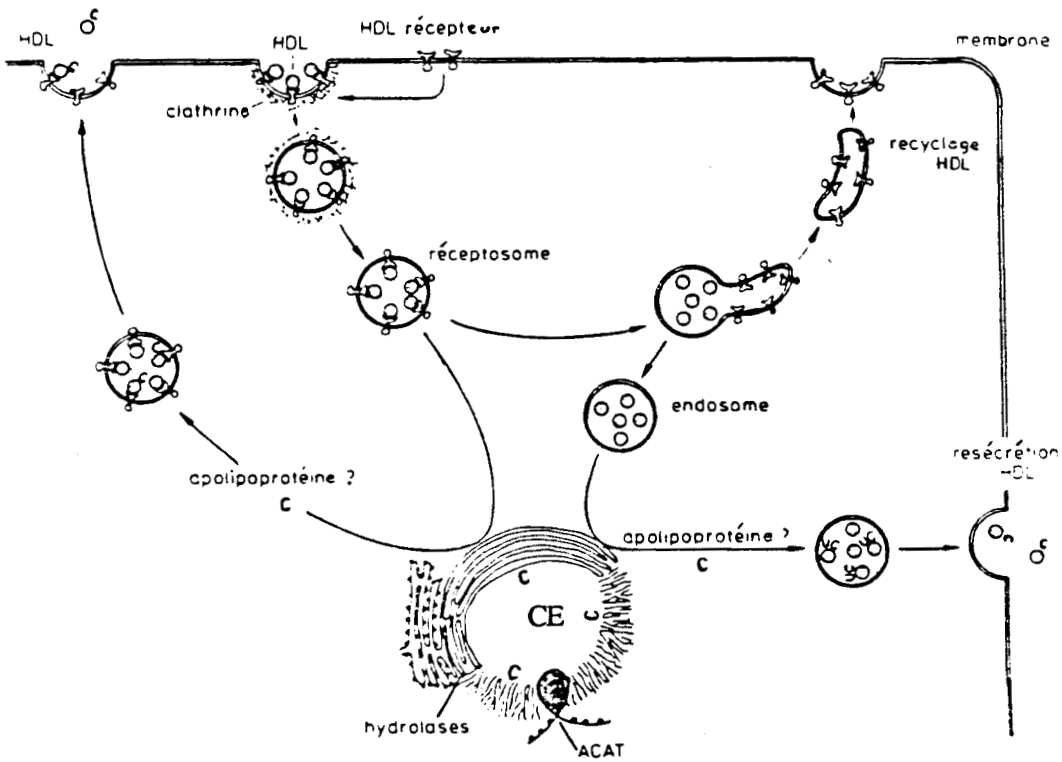
Il existe un récepteur spécifique des HDL sur les hépatocytes, par l'intermédiaire de l'Apo AI. Un tiers des HDL liées aux hépatocytes de porc subit une dégradation intralysosomiale, les 2/3 restants sont resécrétés avec l'apo AI partiellement dégradée (BACHORICK et coll., 1982). Toutefois la captation du cholestérol estérifié par le foie est plus rapide que la captation de l'apo AI.

L'influx du cholestérol des HDL vers les hépatocytes peut se concevoir dans le cadre d'un processus d'endocytose.

Le cholestérol estérifié des HDL serait dissocié de l'apo AI dans un site intracellulaire et l'apo AI retournerait ensuite à l'extérieur de la cellule (GLASS et coll., 1983). Toutefois l'internalisation des HDL n'est pas le seul mécanisme impliqué dans cet échange lipidique ; en témoigne la différence de vitesse de captation en cholestérol et l'apo AI.

Un mécanisme d'échange non couplé à l'endocytose des HDL permet l'influx de cholestérol (JOHNSON et coll., 1986, KARLIN et coll., 1987, PITTMAN et coll., 1987).

FIGURE 15 : LES RECEPTEURS HDL DANS LES MACROPHAGES.
(d'après Schmitz et coll., 1985)



C : CHOLESTEROL
CE : CHOLESTEROL ESTERIFIE

A titre d'exemple, JANSSEN et coll. en 1980 avaient proposé l'existence d'une enzyme similaire ou identique à la lipase hépatique qui jouerait un rôle dans le métabolisme des HDL à la surface cellulaire. En dégradant les phospholipides des HDL cette enzyme modifierait la molécule de HDL, en particulier son rapport en cholestérol/phospholipides, provoquant alors l'afflux de cholestérol dans la cellule.

Une telle lipolyse des HDL a été mise en évidence, mais d'autres mécanismes peuvent également intervenir (STEIN et coll., 1984).

I.3.2 Au niveau des tissus stéroïdiens

Il semble que l'utilisation du cholestérol estérifié des HDL humaines par les cellules stéroïdiennes ne nécessite pas parallèlement à la captation du cholestérol, une dégradation totale des apolipoprotéines des HDL.

Un mécanisme d'endocytose donne naissance à des endosomes contenant des HDL₃, toutefois ces endosomes ne semblent pas fusionner avec les lysosomes (FIDGE et coll., 1985). En conséquence les HDL₃ ne sont pas dégradées, et elles délivrent leur cholestérol par une voie non dégradative.

Un mécanisme de rétroendocytose analogue à celui décrit pour le macrophage (SCHMITZ et coll., 1985) peut être invoqué. Les HDL après interaction avec des récepteurs spécifiques et regroupement dans des puits tapissés seront internalisés et s'associeront avec des gouttelettes lipidiques où le cholestérol pourra être capté. Les HDL privées de cholestérol repartiront ensuite vers le milieu extérieur sans subir de dégradation lysosomale (figure 15).

I.3.3 Au niveau des tissus périphériques

Les HDL₃ induisent sur des fibroblastes et des cellules endothéliales d'aorte bovine un mouvement rapide du cholestérol à partir d'un compartiment cellulaire vers la membrane plasmique qui précède l'efflux de cholestérol. Dans ce cas l'efflux de cholestérol n'est pas lié à l'internalisation des lipoprotéines (STECK et coll., 1988, SLOTTE et coll., 1987, ORAM et coll., 1987).

Au terme de ces études il semble que si l'internalisation des HDL existe, elle ne se traduit pas obligatoirement par des phénomènes de dégradation classiquement observés pour les LDL. Les mouvements de cholestérol ou d'autres lipides supposent l'existence de mécanismes différents de l'endocytose que nous allons tenter d'étudier dans les paragraphes suivants.

II - ECHANGES LIPIDIQUES ENTRE BICOUCHES

Les mécanismes qui régissent les échanges de lipides au niveau des membranes ont été en majeure partie définis grâce à l'utilisation de liposomes ou de vésicules lipidiques.

Des mécanismes physicochimiques sont à la base de ces échanges spontanés. Parfois cependant des protéines de transfert plus ou moins spécifiques prennent le relais pour permettre ou augmenter l'efficacité.

II.1 ECHANGES SPONTANES

II.1.1 Mécanismes physiques

Un mélange de vésicules de phospholipides peuvent échanger leurs lipides par 4 moyens (DUCKWITZ -PETERLEIN et coll., 1977) :

a) Les échanges moléculaires

Les vésicules n'interagissent pas directement entre elles mais l'existence de molécules de phospholipides dissoutes dans le milieu occasionne des échanges moléculaires entre les vésicules à travers la phase aqueuse.

b) Les échanges micellaires

En plus des lipides dissous librement et des lipides sous forme vésiculaire, une dispersion contient toujours une petite fraction de lipides sous forme de micelles. L'équilibre association-dissociation entre les micelles et les vésicules produit un transfert de lipides entre les vésicules.

c) Les échanges par collision

Les phénomènes de collision provoquent des échanges de phospholipides entre les vésicules.

d) Les échanges par fusion

Après collision les vésicules peuvent fusionner donnant naissance à des vésicules recombinantes qui se séparent de nouveau par fission. Ces fusions-scissions engendrent des échanges lipidiques.

Aucun de ces échanges ne nécessitent d'apport énergétique (NICHOLS et PAGANO, 1981).

Comme toutes les espèces lipidiques sont toutes miscibles, les quatre mécanismes pourront donner naissance en fin de transfert à une population vésiculaire homogène. Actuellement il est impossible de définir lequel de ces mécanismes est prédominant dans les échanges lipidiques.

II.1.2 Conditions requises

Les mécanismes qui permettent les échanges lipidiques dépendent de nombreux facteurs tels que : la structure lipidique, la concentration critique micellaire et vésiculaire, la taille (elles doivent être assez larges pour ne pas avoir de tensions intralipidiques), la concentration des vésicules, le pH, la température, la force ionique, la charge et la fluidité. Ils dépendent également de la présence de composants non lipidiques.

Ces conditions varient selon le mode d'"échange impliqué".

a) Echanges moléculaires et micellaires

En ce qui concerne les transferts par échanges moléculaires et micellaires, la vitesse avec laquelle une molécule lipidique entre ou quitte une bicouche dépend de sa structure moléculaire du lipide à échanger d'une part, et des caractéristiques des bicouches (donneur et accepteur) (NICHOLS et PAGANO, 1981). Elle dépend également des rapports molaires, mais absolument pas de la concentration vésiculaire.

Ainsi, des vésicules de phospholipides contenant soit le trans- Δ - 9-octadécénoate, soit le trans- Δ -9-hexadécénoate comme composants majeurs des chaînes acylées donneront naissance à 45°C à une population unique de vésicules. Cependant le transfert est dans un premier temps asymétrique et les lipides contenant le trans- Δ -9-hexadécénoate s'échangent plus rapidement que les lipides possédant le trans- Δ -9-octadécénoate (DUCKWITZ-PETERLEIN et coll., 1977).

La nature des acides gras (leur degré d'insaturation, longueur de chaîne, etc..) est un facteur déterminant, il est à noter qu'elle conditionne la température de transition de phase autre élément décisif des échanges lipidiques (DUCKWITZ-PETERLEIN et coll., 1977).

b) Echanges par collision et fusion

La température et la concentration vésiculaire sont des facteurs déterminants dans les échanges par collision ou fusion (POSTE et PAPAHAJIOPOULOS, 1976).

L'état physique des phospholipides a une importance considérable dans la détermination du mode d'incorporation des lipides à la surface cellulaire. Les paramètres importants sont la présence ou l'absence de charges négatives et la fluidité des lipides vésiculaires (POSTE et PAPAHAJIOPOULOS, 1976).

Ainsi les vésicules neutres ou solides ne peuvent fusionner avec la surface cellulaire ou avec d'autres vésicules contrairement aux vésicules chargées négativement ou fluides qui fusionnent facilement avec les bicouches lipidiques.

La teneur en cholestérol est également un facteur clef (PAPAHAJIOPOULOS et coll., 1973).

Plus précisément, les vésicules chargées négativement (phosphatidylsérine ou phosphatidylsérine : 10% et phosphatidylcholine : 90%) ont une grande capacité à fusionner. L'incorporation de la lysophosphatidylcholine dans ces vésicules augmente légèrement le phénomène de fusion qui s'accompagne d'une certaine cytotoxicité et d'une cytolyse (PAPAHAJIOPOULOS et coll., 1973).

Les vésicules dont les lipides sont dans un état liquide à 37°C (phosphatidylglycérol : 10% et phosphatidylcholine : 90%) induisent mieux les phénomènes de fusion que les vésicules composées de lipides en phase solide à 37°C (distéaroylphosphatidylglycérol : 10% et distéaroylphosphatidylcholine : 90%) (PAPAHAJIOPOULOS et coll., 1973).

L'incorporation équimolaire de cholestérol dans les vésicules de dipalmitoylphosphatidylglycérol et de dipalmitoylphosphatidylcholine réduit significativement la capacité de ces vésicules à fusionner avec les cellules (PAPAHADJOPOULOS et coll., 1973).

II.1.3 Echanges lipidiques avec la membrane plasmique

Si les quatre mécanismes peuvent être impliqués dans les échanges lipidiques avec la membrane plasmique, les échanges par fusion sont de loin les plus intéressants.

Au cours des échanges lipidiques, les liposomes fluides peuvent extraire certaines protéines cellulaires (GREGORIADIS et ALLISON, 1980). Ils ne conservent pas leur intégrité après contact avec la surface cellulaire et introduisent leur contenu dans le cytoplasme par fuite, endocytose ou fusion liposomale (BLUMENTHAL et coll., 1982). Au contraire les liposomes en phase solide sont étroitement liés à des sites de membrane cellulaire, ils retiennent leur contenu après contact (PAGANO et TAKEICHI, 1977) et ne sont pas capables d'extraire les protéines cellulaires (COOK et coll., 1980).

Les sites de fixation pour les liposomes solides ont été en partie caractérisés (PAGANO et TAKEICHI, 1977). Sur fibroblastes, les sites responsables de la fixation et du transfert de phospholipides sont identiques ou localisés à proximité l'un de l'autre. Les liposomes liquides et solides peuvent se fixer sur de tels sites. Dans le cas des liposomes solides, cette fixation représente le stade final de l'interaction tandis que les liposomes liquides se désintègreront sur la surface cellulaire. Quelques liposomes liquides ou solides peuvent se désolidariser de la membrane en emportant avec eux des composants d'origine cellulaire et même probablement leurs propres sites de fixation (MARGOLIS et coll., 1984).

Il semble qu'un site unique soit responsable des activités de fixation, de transfert cellule-liposome et de transformation liposomales. Ces sites semblent spécifiques car les vésicules de phosphatidylsérine ne rentrent pas en compétition avec le site de fixation des vésicules de phosphatidylcholine (MARGOLIS et coll., 1984).

FIGURE 16 : CHANGEMENT CONFORMATIONNEL DE LA SERUM ALBUMINE APRES INTERACTION AVEC DES HEPATOCYTES.

(d'après Horie et coll., 1988)

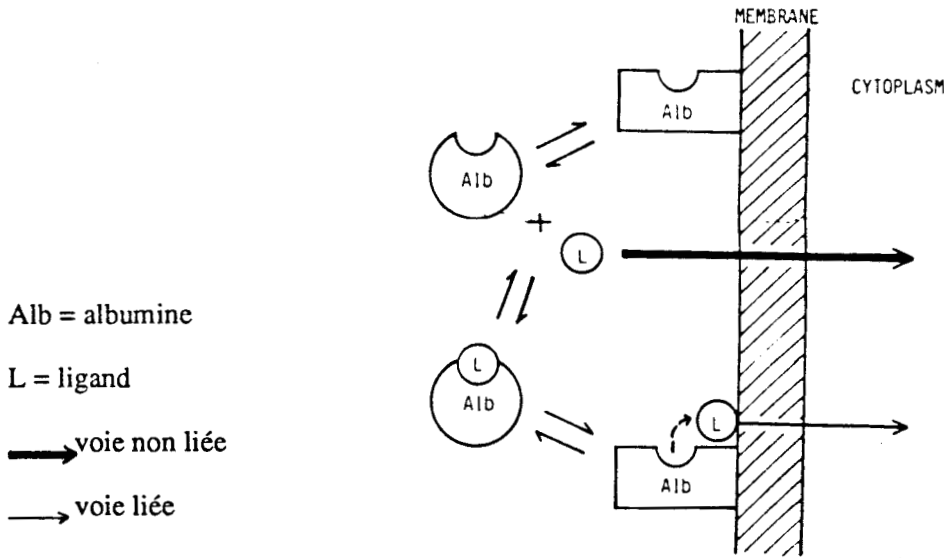
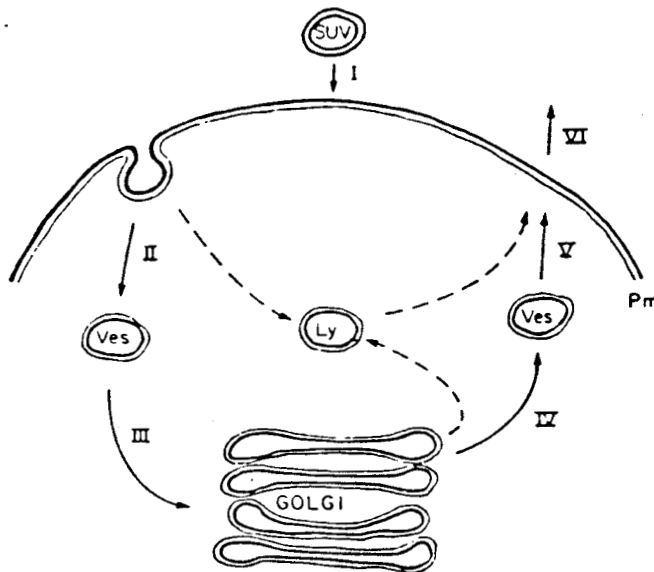


FIGURE 17 : MOUVEMENT DES LIPIDES APRES INTERACTIONS ENTRE CELLULES ET VESICULES DE PHOSPHOLIPIDES FLUORESCENTS.

(d'après Sleight et coll., 1984)



I : insertion spontanée de la PC dans le feuillet externe de la membrane plasmique.

II : internalisation de la PC par endocytose

III : fusion des vésicules avec l'appareil de Golgi

IV et V : la PC est recyclée de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique.

VI : dégradation de la PC dans la membrane plasmique

II.2 ECHANGES NON SPONTANES

Lorsque les conditions pour les échanges spontanés ne sont pas requises, les échanges lipidiques ne peuvent se faire que par l'intermédiaire de protéines de transfert (XU et coll., 1983, WIRTZ et coll., 1979).

Un nombre de plus en plus grand de protéines de transfert a été isolé et purifié à partir du plasma (SWEENEY et JONAS, 1985, MORTON, 1985, RICKERS et coll., 1985) et à partir du cytoplasme de diverses cellules (CRAIN et ZILVERSMIT, 1980, CHILD et coll., 1985, ABBEY et coll., 1984).

Les protéines de transfert peuvent être spécifiques du lipide à transporter (SWEENEY et JONAS, 1985) ou non.

Le mode d'action de ces protéines de transfert qui font la navette entre la structure qui cède le lipide et celle qui l'accepte est encore imprécise.

Un changement conformationnel est invoqué. Il a été proposé pour expliquer les activités de transfert de la sérum albumine (HORIE et coll., 1988).

En effet l'albumine plasmatique, protéine flexible et labile, peut subir des changements conformationnels en réponse à des stimuli extérieurs tels que la fixation d'un ligand ou les variations de pH et de température (BROWN et SCHOCKLEY, 1982).

Ces changements conformationnels de l'albumine peuvent constituer une explication au transport hépatique chez le rat, pour lequel deux voies seraient possibles : une voie ne nécessitant pas de liaison ligand-albumine et une seconde voie entraînant d'une part une liaison protéine ligand et d'autre part un changement conformationnel après fixation sur la membrane hépatique. Ce mode de transfert est illustré (figure 16).

Ainsi les protéines de transfert plasmatiques peuvent jouer un rôle capital dans les échanges lipidiques avec la membrane cellulaire.

III - DESTIN DES LIPIDES ECHANGES AVEC LA MEMBRANE PLASMIQUE

Une fois intégrés à la membrane plasmique, les lipides peuvent soit y rester, soit être convoyés vers un compartiment intracellulaire. Ce mouvement intracellulaire des lipides met en jeu les mécanismes d'endocytose ou les mécanismes de transfert non spontanés par l'intermédiaire des protéines de transfert cytoplasmique.

III:1 DESTIN DES PHOSPHOLIPIDES

Les mouvements des lipides après interactions entre cellules et vésicules ont été mis en évidence grâce à l'utilisation de lipides portant une sonde fluorescente. Ces travaux ont mis en évidence le transport de la phosphatidylcholine fluorescente de la membrane plasmique vers l'appareil de Golgi, dans les fibroblastes de hamster chinois. Ce transfert intracellulaire peut faire intervenir un phénomène d'endocytose particulier qui donne naissance à des vésicules dont les membranes sont hautement fluorescentes (SLEIGHT et PAGANO, 1984).

La plupart des vésicules formées par endocytose fusionnent avec l'appareil de Golgi où les lipides resteront piégés dans le feuillet (figure 17).

Les lipides seront ensuite excrétés de l'appareil de Golgi et retourneront en partie vers la membrane plasmique ou vers les lysosomes. Le nouveau cycle d'internalisation peut ainsi recommencer jusqu'à la dégradation totale de la phosphatidylcholine fluorescente dans les lysosomes.

Les protéines de transfert mises en évidence lors des transports intracellulaires entre le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique pourraient éventuellement être impliquées. Ce transport de phosphatidylcholine du réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique sur des cellules ovariennes de hamster chinois est très rapide ($t_{1/2}$ à 25°C = 2 min.). Il n'est pas affecté par les inhibiteurs du cytosquelette ni par les poisons énergétiques (KAPLAN et SIMONI, 1985) et se fait même à une température inférieure à 15°C.

Cependant aucune preuve n'indique que ces protéines participent aux mouvements des lipides après leur intégration dans la membrane plasmique.

III.2 DESTIN DU CHOLESTEROL

Plusieurs mécanismes de transport intracellulaire du cholestérol ont été décrits :

- un transport par l'intermédiaire d'une protéine de transport décrite au niveau de l'hépatocyte (FRIEDLANDER et coll., 1980, BELL, 1975).

- une diffusion passive des monomères de cholestérol à travers le cytoplasme en relation avec des différences de distribution du cholestérol et de phospholipides entre les diverses membranes (WATTENBERG et SILBERT, 1983),

- un transport vésiculaire.

Alors que le cholestérol semble être en équilibre entre les lipoprotéines plasmatiques et les membranes des cellules nucléées (DAWIDOWICZ, 1987), PHILLIPS et coll., 1987, OWEN, 1984), le mouvement du cholestérol dans le compartiment aqueux de ces cellules est restreint en dépit des protéines de transfert du cholestérol (DEMPSEY, 1984).

Il semble que les mouvements du cholestérol de la membrane plasmique vers les compartiments se fassent préférentiellement grâce au transport vésiculaire (KAPLAN et SIMONI, 1985).

III.3 CONCLUSION

Si les HDL sont les transporteurs d'AGPI pour le cerveau, la captation de ces acides gras par la cellule endothéliale pourra se faire par endocytose. Cette endocytose pourra faire intervenir des récepteurs de type BE ou de type AI-AII.

Toutefois la fixation des HDL₂ sur les récepteurs AI-AII n'est pas souvent couplée à un phénomène d'internalisation, mais plutôt à des échanges lipidiques.

Si les HDL apportent aux membranes lumineales de la B.H.E. des phospholipides par les récepteurs AI-AII, les échanges lipidiques entre HDL et cellules impliquent plutôt des mécanismes spontanés d'échange moléculaire, de r fusion ou feront appel aux protéines de transfert plasmatiques.

TRAVAUX PERSONNELS
RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE I : MISE AU POINT D'UN MODELE DE VECTEUR LIPIDIQUE

| | |
|--|----|
| I - <u>MISE AU POINT D'UN MODELE DE VECTEUR LIPIDIQUE</u> | 77 |
| I.1. Mise au point d'un protocole | 77 |
| I.2. Optimisation des paramètres de transfert | 82 |
| II - <u>EVALUATION DU MODELE</u> | 82 |
| II.1. Mise en évidence d'échanges lipidiques entre HDL ₃ et plaquettes | 82 |
| II.2. Insertion de la NBD-PC dans la membrane plaquettaire | 84 |
| II.3. Mise en évidence de deux pools lipidiques distincts | 86 |
| II.3.1. Rétrocession simple | 86 |
| II.3.2. Rétrocession en présence de colchicine | 87 |
| II.4. Dégradation de la NBD-PC dans un compartiment non lysosomal | 89 |
| II.4.1. Mise en évidence d'une dégradation de la NBD-PC | 89 |
| II.4.2. HDL ₃ et phospholipases C membranaires | 91 |
| III <u>CONCLUSION</u> | 92 |

Le but de notre travail étant de mettre en évidence le rôle des HDL dans le transport d'acides gras au niveau de la barrière hémato-encéphalique. Nous avons dans un premier temps mis au point un modèle de vecteur lipidique par incorporation de phospholipides fluorescents dans les HDL₃. L'utilisation de phosphatidylcholine (PC) ou phosphatidyléthanolamine (PE) dont l'acide gras en position SN 1 porte une sonde de 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD) semblait fournir un modèle adapté à notre étude. En effet la présence d'un acide laurique (C12:0) couplé au chlorure de NBD, ne modifie pas ou peu la structure générale du phospholipide.

Dans un premier temps, nous avons donc mis au point une technique d'incorporation des phospholipides fluorescentes dans les lipoprotéines, puis testé la validité du vecteur lipidique sur des membranes plasmiques de plaquettes, afin de vérifier la capacité de fixation des HDL₃ modifiées sur des récepteurs de surface et l'efficacité des transferts lipidiques des HDL vers la membrane plasmique.

I - MISE AU POINT D'UN MODELE DE VECTEUR LIPIDIQUE

De nombreux travaux ont mis en évidence l'existence de transfert de cholestérol et de phosphatidylcholine entre les HDL et LDL (LUND-KATZ et coll., 1982). L'emploi de liposomes comme vecteurs de lipides a permis de définir les conditions qui régissent le transfert des lipides entre un donneur et un accepteur (NICHOLS et PAGANO, 1981, POSTE et PAPAHAJOPOULOS, 1976, HELLINGS et coll., 1974, HELMKAMP, 1980, DUCKWITZ et coll., 1977, JAHNIG, 1984).

I.1 MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE

Nous nous sommes servis de ces réactions d'échanges liposomes-lipoprotéines pour incorporer dans les HDL des phospholipides porteurs d'une sonde fluorescente (figure 18). D'une manière générale des liposomes, des vésicules uni- ou multilamellaires (WIRTZ, 1974), des lamelles (THOMPSON et coll., 1984) ou des billes de verre (BROCKMAN et coll., 1973) recouvertes de phospholipides

FIGURE 18 : STRUCTURE DE LA PHOSPHATIDYL-CHOLINE FLUORESCENTE OU NBD-PC.

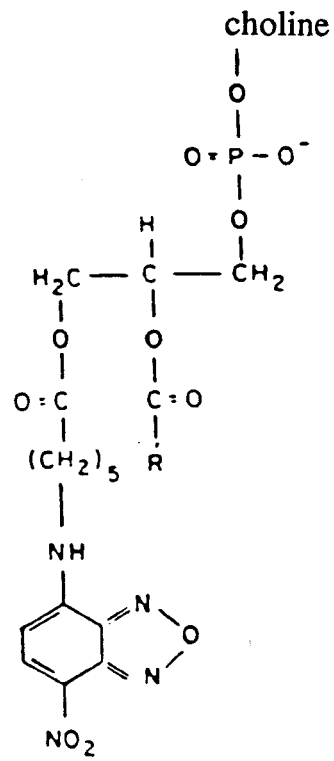
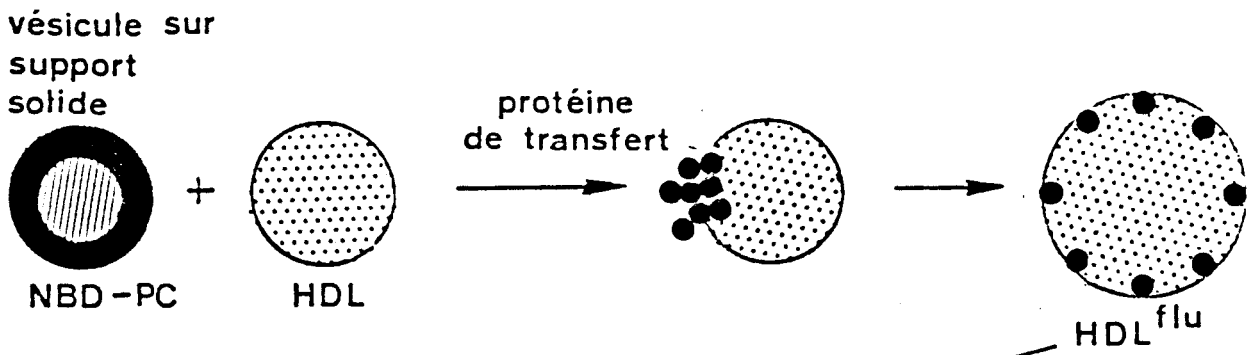
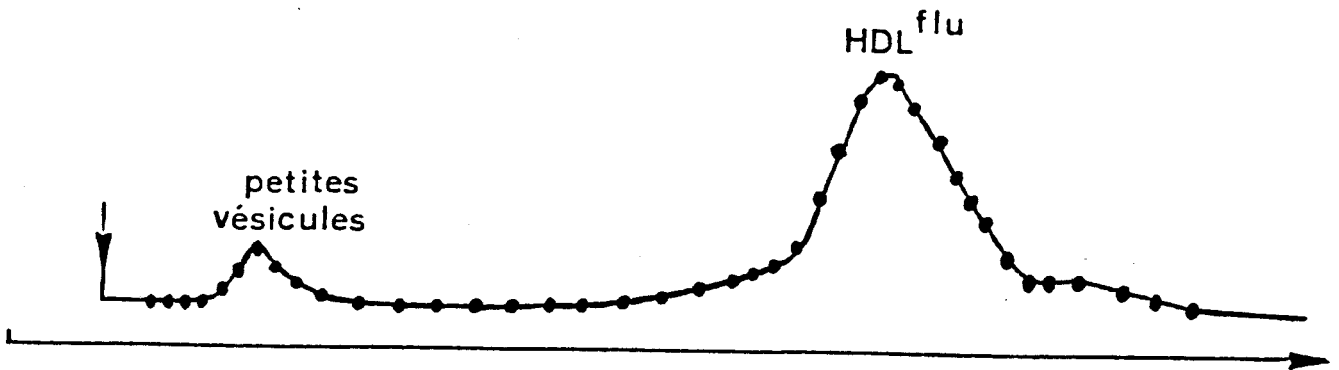


FIGURE 19 : PROTOCOLE DE PREPARATION DES HDL₃ FLUORESCENTES .



purification sur colonne de superose 6 B



peuvent être utilisés pour modifier la charge lipidique des lipoprotéines. Toutefois l'emploi de billes de verre recouvertes d'un fin film de phospholipides fluorescents avait l'avantage de permettre par simple centrifugation la récupération des lipoprotéines modifiées.

Le protocole de préparation de la sonde lipidique par incubation d'HDL en présence de liposomes, sur support solide est décrit fiche technique 11. Les HDL₃ réisolées par centrifugation sont fluorescentes et l'intensité du transfert est évaluée par dosage spectrofluorimétrique pour une longueur d'onde d'excitation $\lambda_{ex} = 470$ nm et d'émission $\lambda_{em} = 510$ nm.

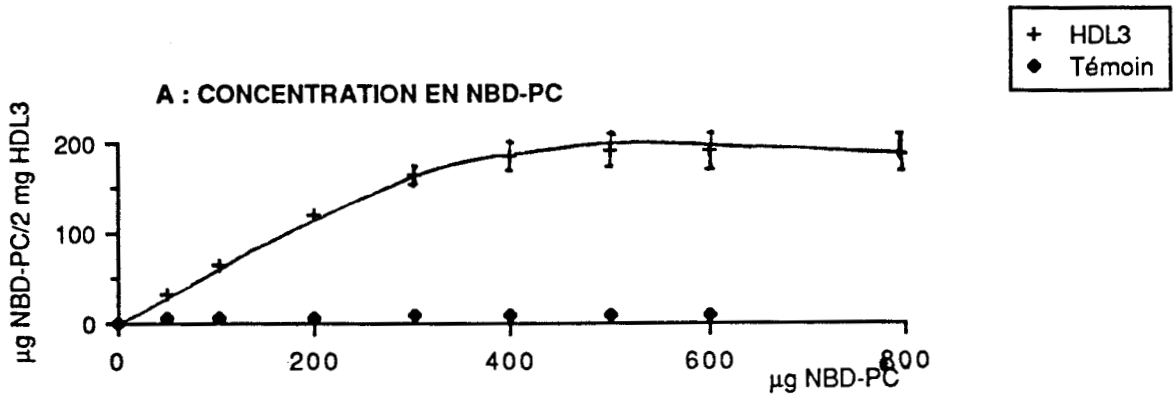
L'analyse en gel de polyacrylamide des HDL₃ fluorescents (HDL₃^{flu}) (fiche technique 5) met en évidence une légère dispersion des HDL^{flu} traduisant une certaine hétérogénéité de taille. De plus des vésicules de NBD-PL détachées des billes restent dans les puits de dépôt. L'analyse fluorimétrique des gels révèle également un maximum de fluorescence au niveau des HDL et plus légèrement au point de dépôt. La présence de vésicules phospholipidiques fluorescentes susceptibles d'interférer par la suite au niveau des échanges HDL-cellules a rendu indispensable une étape supplémentaire de purification des HDL₃^{flu} après la réaction de transfert (figure 19).

Nous avons préféré aux ultracentrifugations par flottaison ou en gradient de densité, une purification par chromatographie de gel filtration sur colonne de Superose 6 B en tampon NaCl 0,15 M, Na₂ EDTA 0,01%, NaN₃ 0,02%, pH : 7,2 (fiche technique 2).

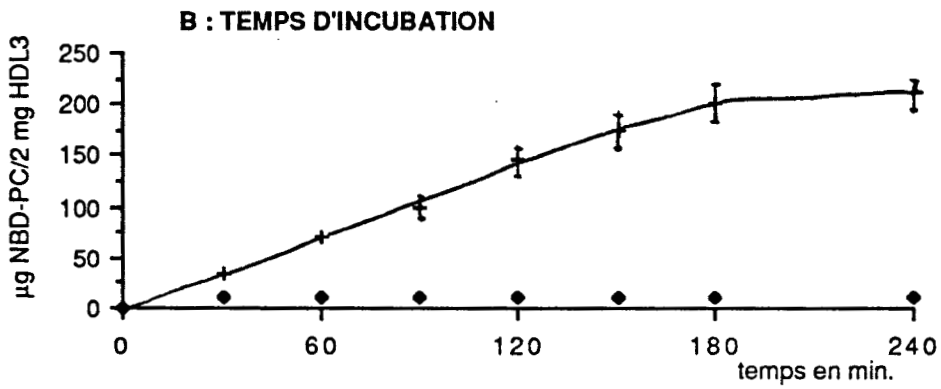
L'analyse en microscopie électronique des HDL₃^{flu} ainsi réisolées confirme les résultats obtenus après électrophorèse ou ultracentrifugation à savoir que l'incubation des lipoprotéines en présence de phospholipides modifie la forme des lipoprotéines. Elles subissent des remaniements structuraux qui se traduisent par l'apparition de particules de taille hétérogène ou de particules discoïdales.

Ces modifications ont été décrites pour les HDL (TALL et SMALL, 1977, TALL et coll., 1978, TALL et GREEN, 1981) et les LDL (CHAIT et coll., 1984, PARKS, 1985). Les HDL₃ deviennent discoïdales alors que les LDL modifiées de la même

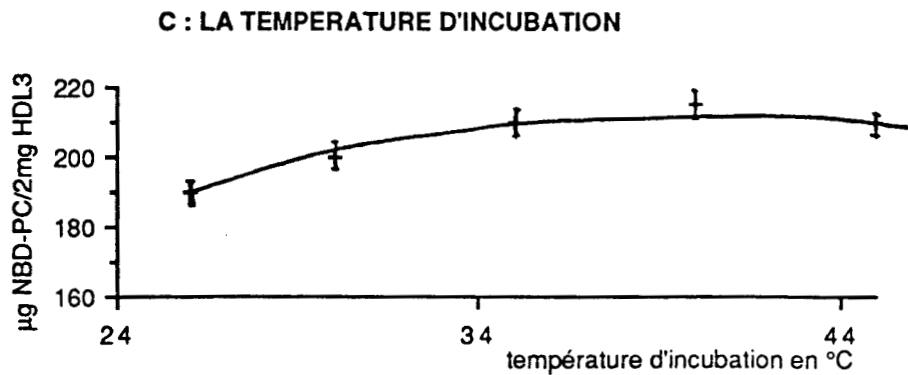
FIGURE 20 : OPTIMISATION DES PARAMETRES DE TRANSFERT DE LA NBD-PC DANS LES HDL₃.



400 mg de billes sont recouverts de 0 à 800 µg de NBD-PC. Le transfert s'effectue à température ambiante durant 3 h en présence de 1 ml de HDL₃ à 2 mg/ml.



400 mg de billes sont recouverts de 400 µg de NBD-PC. Le transfert s'effectue à température ambiante durant 0 à 240 minutes en présence de 1 ml de HDL₃ à 2 mg/ml.



400 mg de billes sont recouverts de 400 µg de NBD-PC. Le transfert s'effectue à des températures s'échelonnant de 25 à 45 °C pendant 3 h en présence de 1 ml de HDL₃ à 2 mg/ml.

manière restent plus ou moins sphériques avec un excès de matériel déformant la particule en un point particulier très visible en microscopie électronique (PARKS, 1985).

L'échange de phospholipides entre liposomes et lipoprotéines conduit à la production de particules lipoprotéiniques de taille hétérogène, de densité intermédiaire et au comportement électrophorétique modifié. En conséquence leurs propriétés biologiques pourraient être également légèrement perturbées.

I.2 OPTIMISATION DES PARAMETRES DE TRANSFERT

L'influence de divers paramètres tels que la charge en liposomes sur support solide, le temps d'incubation et la température sur l'intensité de l'incorporation de NBD-PC dans les HDL₃ a été étudiée de façon à optimiser les paramètres de la réaction de transfert. Ces résultats sont reportés figure 20 et ils ont conduit à la définition des conditions opératoires décrites fiche technique 11.

II - EVALUATION DU MODELE

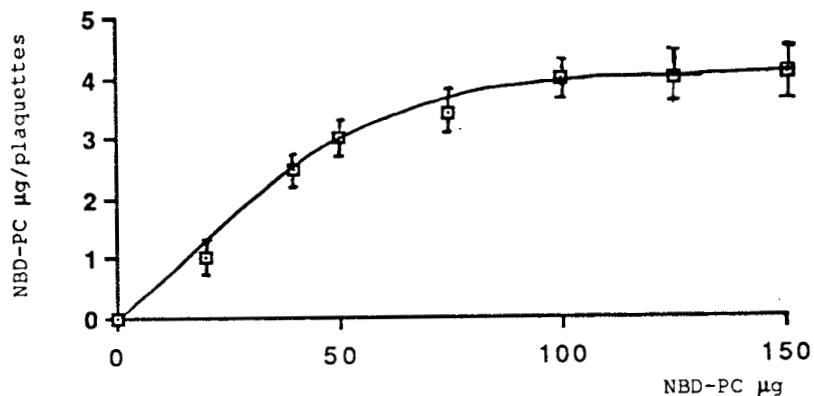
Les modifications de taille, de densité et de mobilité électrophorétique des HDL^{flu} après incorporation dans la molécule de NBD-PC rendent essentielle l'étape d'évaluation physiologique du vecteur. L'utilisation de plaquettes humaines qui possèdent des récepteurs spécifiques aux HDL (CURTISS et PLOW, 1984) nous a permis de comparer les propriétés des HDL₃^{flu} par rapport aux HDL₃ normales.

II.1 MISE EN EVIDENCE D'ECHANGES LIPIDIQUES ENTRE HDL^{FLU} ET PLAQUETTES

Après incubation des plaquettes pendant 2 heures à 37°C en présence de HDL₃^{flu} contenant de la NBD-PC et lavages à 4°C, des quantités importantes de NBD-PC sont transférées aux plaquettes. La présence de la sonde fluorescente dans la membrane plasmique plaquettaire est visualisée par une fluorescence périphérique intense quand les plaquettes sont observées au microscope à fluorescence. Cette fluorescence persiste plusieurs heures, lorsque les plaquettes sont maintenues à 4°C en tampon Tyrode.

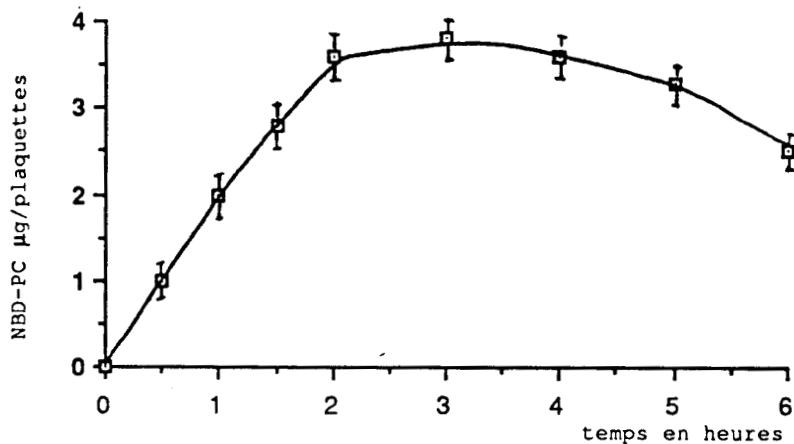
FIGURE 21 : ECHANGES DE LA NBD-PC DES HDL₃ VERS LES PLAQUETTES.

A : INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN NBD-PC



10⁸ plaquettes sont incubées de 2 h à 37°C en présence de quantités croissantes de HDL₃ fluorescentes (2 mg/ml). Après échanges, les lipides plaquettaire sont extraits, analysés et quantifiés (fiches techniques 11,13et14).

B : INFLUENCE DU TEMPS D'INCUBATION



10⁸ plaquettes sont incubées de 0 à 6 H. à 37°C en présence de HDL₃ fluorescentes (80 µg NBD-PC). Après échanges, les lipides plaquettaire sont extraits, analysés et quantifiés (fiches techniques 11,13 et 14).

Nous avons réalisé une série d'expériences de façon à optimiser les paramètres qui gouvernent l'insertion des lipides des HDL₃ dans la membrane plaquettaire. L'augmentation de la concentration en HDL₃^{flu} (figure 21 a) ou de la durée d'incubation à 37°C (figure 21 b) augmente de manière très significative le taux de NBD-PC transférée vers la plaquette. Toutefois pour des temps d'incubation supérieurs à 4 heures, on note une diminution de l'efficacité du transfert lipidique en relation avec un phénomène de dégradation plaquettaire due à des modifications de la perméabilité membranaire, ainsi qu'à l'altération de certaines propriétés fonctionnelles (THOMPSON et coll., 1984).

Ainsi les conditions standards choisies pour les expériences ultérieures seront une incubation de 10⁸ plaquettes pendant 2 heures en présence de HDL₃ correspondant à un apport de 72,5 µg de NBD-PC. Dans ces conditions, environ 4 µg de NBD-PC sont transférés des HDL aux plaquettes, ce qui représente environ 13% de la NBD-PC des HDL₃.

II.2 INSERTION DE LA NBD-PC DANS LA MEMBRANE PLAQUETTAIRE

Lors des incubations à 37°C, le taux de NBD-PC mesuré dans les plaquettes peut être dû :

- à la fixation des HDL₃^{flu} sur leur récepteur,
- au transfert des lipides marqués des HDL₃^{flu} dans la membrane des plaquettes,
- ou encore aux lipides internalisés dans la plaquette lors des phénomènes d'endocytose des HDL^{flu}.

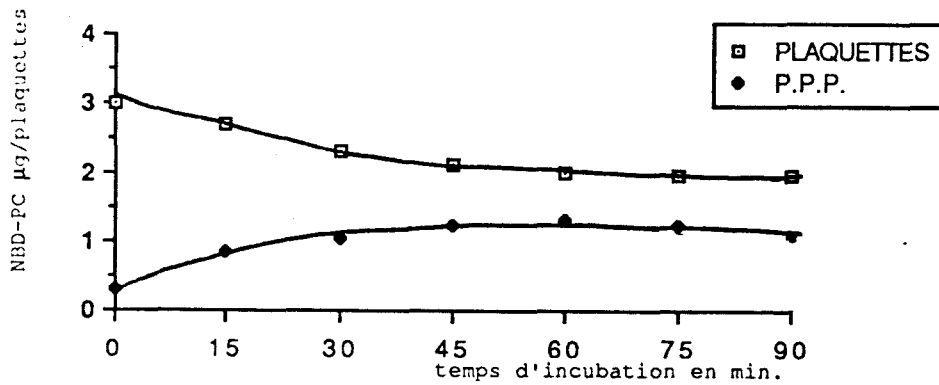
Afin de déterminer le taux de NBD-PC réellement insérée dans la membrane par rapport au taux de NBD-PC des HDL₃^{flu} fixées sur les récepteurs de surface, nous avons réalisé des expériences de transfert en incubant les plaquettes en présence ou non d'héparine qui permet la dissociation des complexes récepteurs-lipoprotéines (AVIRAM et BROOKS, 1983).

Ainsi 10⁸ plaquettes sont incubées 2 heures à 37°C en présence de HDL₃ fluorescentes (fiche technique 28) selon les conditions standards. Les cellules après lavage en tampon tyrode sont incubées 15 minutes à 37°C en présence ou

TABLEAU XI : INFLUENCE DE L'HEPARINE SUR LA FLUORESCENCE RESIDUELLE PLAQUETTAIRE.

| | $\mu\text{g NBD-PC}/10^8$ plaquettes avant incubation | $\mu\text{g NBD-PC}/10^8$ plaquettes après incubation |
|--------------|--|--|
| HEPARINE (-) | 3,27 + 0,06 | 2,29 + 0,05 |
| HEPARINE (+) | 3,45 + 0,04 | 1,16 + 0,07 |

FIGURE 22 : RETROCESSION DE LA FLUORESCENCE PLAQUETTAIRE A UN ACCEPTEUR LIPIDIQUE APRES FIXATION A 4°C .



10⁸ plaquettes sont incubées en présence de HDL₃ fluorescentes (80 μg de NBD-PC) pendant 2 H. à 4°C. Les cellules après lavage en tampon tyrode sont réincubées de 0 à 90 min. à 37°C avec 1 ml de plasma pauvre en plaquettes ou P.P.P. La fluorescence est déterminée dans chacune des fractions fiches techniques (11, 13, 14).

TABLEAU XII : RETROCESSION EN PRESENCE DE COLCHICINE.

| | $\mu\text{g NBD-PC}/10^8$ plaquettes |
|---|--------------------------------------|
| Plaquettes avant rétrocession | 3,40 + 0,04 |
| Plaquettes après rétrocession (COLCHICINE +) | 0,65 + 0,05 |
| Plaquettes après rétrocession (COLCHICINE -) | 1,01 + 0,05 |

en absence d'héparine (4 mg/ml). Après centrifugation 3 minutes à 4000 t/mn, les plaquettes sont récupérées et la quantité de NBD-PC est déterminée de façon classique, après extraction des lipides selon la technique de FOLCH (fiche technique 28), séparation chromatographique (fiche technique 14) et dosage spectrofluorimétrique. Les résultats sont reportés tableau XI.

Après traitement à l'héparine les cellules perdent environ 50% de leur fluorescence qui se retrouve dans le surnageant cellulaire lié au HDL₃. La fluorescence résiduelle correspond à l'insertion de la NBD-PC dans la membrane plasmique et/ou l'internalisation des lipoprotéines dans la plaquette. L'internalisation des HDL₃ étant très faible (CURTISS et PLOW, 1984), ces résultats suggèrent que la NBD-PC quitte les HDL pour être intégrée dans la membrane plasmique plaquettaire.

II.3 MISE EN EVIDENCE DE DEUX POOLS LIPIDIQUES DISTINCTS

II.3.1 Rétrocession simple

Nous avons procédé à des expériences de rétrocession ou "back exchange" afin de préciser le devenir métabolique des lipides échangés entre les HDL₃^{flu} et les plaquettes. Pour ces études de rétrocession, 10⁸ cellules sont incubées dans des conditions standards en présence de HDL₃ fluorescentes pendant 2 heures à 4°C. Après lavage en tampon tyrode elles sont ensuite incubées à 37°C en présence de 1 ml de plasma pauvre en plaquettes ou P.P.P. (plasma centrifugé à 11000 t/min. pendant 15 min.) de 0 à 90 minutes.

Les plaquettes et le P.P.P. sont séparés par centrifugation. Les phospholipides sont extraits et l'intensité de la fluorescence est appréciée. Les résultats sont exprimés figure 22. Lors de l'incubation à 4°C des plaquettes en présence de HDL^{flu} on note une fixation des HDL^{flu} inférieure à celle enregistrée à 37°C, ce qui se traduit par une intensité de fluorescence également plus faible. Toutefois cette fluorescence ne correspond qu'à la fixation des HDL^{flu} sur les récepteurs membranaires. La seconde incubation à 37°C en présence de P.P.P. permet de déclencher les processus d'endocytose et d'échanges lipidiques. Ces deux phénomènes vont soustraire progressivement la sonde lipidique de la

membrane plasmique soit en l'internalisant, soit en la rétrocédant à une molécule acceptrice présente dans le P.P.P. telles que les lipoprotéines circulantes. Nos résultats indiquent clairement qu'après 30 minutes d'incubation environ 1/3 de la fluorescence est transférée de la plaquette au P.P.P. ; les 2/3 restants non échangeables et résistants au phénomène de rétrocession ont donc probablement été soustraits de la membrane par internalisation.

II.3.2 Rétrocession en présence de colchicine

Pour préciser ce phénomène d'endocytose de la sonde fluorescente, nous avons réalisé de nouvelles expériences de rétrocession en présence d'agents inhibiteurs du cytosquelette (CURTISS et PLOW, 1984).

Dans un premier temps 10^8 plaquettes sont incubées 2 heures à 4°C en présence de HDL₃ fluorescentes dans les conditions standards. Après lavage en tampon tyrode les cellules sont incubées 30 minutes à 37°C avec 1 ml de P.P.P. en présence ou non de colchicine à 50 µg/ml. Après extraction des lipides, le pourcentage de fluorescence est évalué et les résultats sont reportés tableau XII.

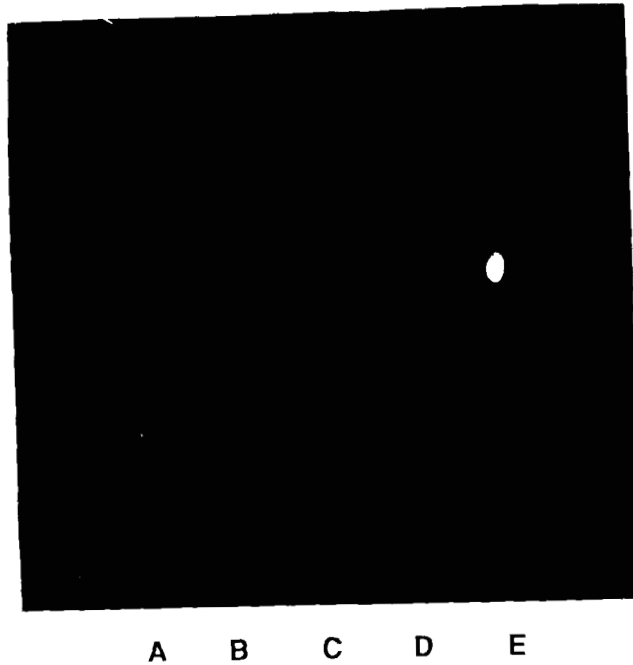
Dans les expériences de rétrocession en l'absence de colchicine, une fluorescence correspondant à 1,01µg de NBD-PC reste localisée au niveau des plaquettes et représente le taux de lipides non directement échangeables avec le plasma. En présence de colchicine la fluorescence résiduelle des plaquettes est plus faible et correspond à 0,65 µg de NBD-PC.

Ces 0,65 µg de lipides non échangeables ne peuvent pas correspondre aux lipides internalisés par endocytose par récepteur puisque la présence de colchicine inhibe les processus d'internalisation. Il existe donc dans les plaquettes après incubation avec des HDL₃^{flu} deux pools distincts de lipides :

- les lipides échangeables correspondant aux lipides portés par les HDL fixées aux récepteurs et aux lipides intégrés dans le feuillet externe de la membrane plasmique,
- les lipides non échangeables constitués en partie par les lipides internalisés mais également par des lipides qui ont migré dans la membrane plasmique de l'hémimembrane exoplasmique vers le feuillet protoplasmique.

FIGURE 23 : DEGRADATION DE LA NBD-PC DANS LA MEMBRANE
PLAQUETTAIRE

séparation des lipides fluorescents sur plaque de silice imprégnée de
borate dans le solvant : $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (90-54-5-5 v/v/v/v).



- A : extrait de lipides plaquettaires.
- B : NBD-phosphatidyl éthanolamine
- C : NBD-diacyl glycérol
- D : NBD-acide phosphatidique
- E : NBD-phosphatidyl choline

Cette migration des lipides par flip-flop soustrait au même titre que l'endocytose les lipides au phénomène de rétrocession.

Toutefois il est difficile de concevoir un mouvement de flip-flop de cette envergure pour la phosphatidylcholine qui est essentiellement localisée dans le feuillet le plus externe de la membrane plasmique. L'hypothèse d'une dégradation intramembranaire des lipides échangés a donc été avancée et nous avons donc cherché à mettre en évidence un phénomène de dégradation des lipides.

II.4 DEGRADATION DE LA NBD-PC DANS UN COMPARTIMENT NON LYSOSOMAL

II.4.1 Mise en évidence d'une dégradation de la NBD-PC

10^8 plaquettes sont incubées 2 heures à 37°C en présence de HDL₃ fluorescentes dans les conditions standards.

Les lipides sont extraits et séparés par chromatographie sur plaque de gel de silice imprégnée de borate (HOHENGASSER et coll., 1986) (fiche technique 14).

Après migration dans le système solvant chloroforme/méthanol/ammoniaque/eau 90/54/5/5 - v/v/v/v, les lipides fluorescents sont révélés par examen des plaques en lumière ultraviolette (figure 23). Deux spots fluorescents sont ainsi mis en évidence, l'un correspond à de la NBD-PC, l'autre à du diacyl-glycérol fluorescent (NBD-DAG) qui provient de la dégradation de la NBD-PC par une phospholipase C.

Nous avons donc pu mettre en évidence une dégradation très nette de la NBD-PC en NBD-DAG. Deux compartiments peuvent être le siège de cette dégradation :

- le compartiment lysosomal,
- la membrane plasmique riche en phospholipase.

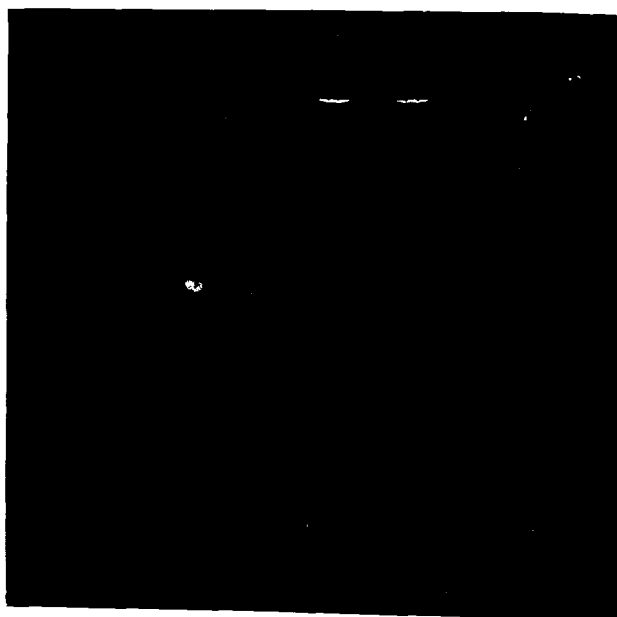
Afin de déterminer si ce sont les enzymes lysosomiales ou membranaires qui sont responsables de la conversion du NBD-PC en NBD-DAG, nous avons examiné la dégradation en présence ou en absence de NH₄Cl reliée à l'alcalinisation du compartiment lysosomal (STEINMAN et coll., 1983).

TABLEAU XIII : INFLUENCE DU NH₄Cl SUR LA DEGRADATION DE LA NBD-PC.

| | | µg PL/10 ⁸ plaquettes | NBD-DG en % |
|---------------------|----------|----------------------------------|-------------|
| NH ₄ Cl- | 30 min. | 2,26 + 0,03 | 2,15 + 0,17 |
| NH ₄ Cl+ | 30 min. | 2,23 + 0,02 | 2,05 + 0,20 |
| NH ₄ Cl- | 120 min. | 3,57 + 0,01 | 8,40 + 0,40 |
| NH ₄ Cl+ | 120 min. | 3,46 + 0,02 | 7,30 + 0,40 |

FIGURE 24 : SPECIFICITE DE LA DEGRADATION PLAQUETTAIRE DE LA NBD-PC

séparation des lipides fluorescents sur plaque de silice imprégnée de borate dans le solvant : CHCl₃/CH₃OH/NH₄OH/H₂O (90-54-5-5 v/v/v/v).



A B C D E

- A : vésicules de NBD-PC incubées en présence de plaquettes à 4°C
- B : vésicules de NBD-PC incubées en présence de plaquettes à 37°C
- C : HDL₃ (80µg de NBD-PC) incubées en présence de plaquettes à 4°C
- D : HDL₃ (80µg de NBD-PC) incubées en présence de plaquettes à 37°C
- E : HDL₃ (80µg de NBD-PC) incubées en présence de plaquettes à 37°C + NH₄Cl (20mM)

10^8 plaquettes sont incubées avec des HDL fluorescentes (conditions standards) à 37°C pendant 30 minutes ou 120 minutes en présence (+) ou en absence (-) de NH_4Cl (20 mM). Les lipides sont extraits et déposés sur plaque de gel de silice dans les mêmes conditions que précédemment. Les spots fluorescents correspondant au NBD-PC et NBD-DAG sont isolés et l'intensité de la fluorescence est enregistrée. Les résultats sont présentés tableau XIII et montrent que quelque soit le temps d'incubation, la production du NBD-DAG en présence ou en absence de NH_4Cl n'est pas significativement modifiée. Il est à noter que la libération de NBD-DAG par hydrolyse de la NBD-PC augmente en fonction du temps d'incubation à 37°C. Il semble donc que la dégradation intralysosomiale de la PC ne soit pas responsable de l'apparition de DAG fluorescent dans la plaquette. L'intervention de phospholipase (PL) de type PLC semble donc plus probable.

II.4.2 HDL₃ ET PHOSPHOLIPASES C MEMBRANAIRES

Si l'intervention de PLC membranaire dans la dégradation de la NBD-PC semble plausible, la question qui se pose concerne le mécanisme d'activation de cette enzyme et ses relations avec la fixation des HDL₃^{flu} sur la membrane plaquettaire.

Bien que cette étude ne soit pas notre objectif principal nous avons essayé de déterminer si la dégradation de la NBD-PC est due à une activation spécifique des lipases plaquettaires en réponse à la fixation des HDL₃. Pour cela nous avons incubé 10^8 plaquettes 2 heures à 37°C ou à 4°C en présence soit de vésicules de NBD-PC contenant 150 µg de NBD-PC soit de HDL₃ fluorescentes obtenues dans les conditions classiques.

Après lavage des cellules, les lipides sont extraits et chromatographiés sur couche mince dans un système solvant permettant la mise en évidence des métabolites de la PC. Les résultats illustrés figure 24 montrent que seule la fixation des HDL₃ à 37°C entraîne une dégradation de la NBD-PC en NBD-DAG. L'incubation des vésicules lipidiques à 4°C ou 37°C est incapable de promouvoir l'action phospholipasique et la libération de DAG fluorescent.

III - CONCLUSION

Les résultats nous indiquent qu'après leur incubation en présence des HDL₃ fluorescentes, les plaquettes deviennent fluorescentes à leur tour.

Cette fluorescence correspond à la fixation des HDL₃^{flu} sur les récepteurs membranaires à l'insertion de la bicouche lipidique de molécules de NBD-PC qui ont quittés les HDL₃.

Ces résultats sont en accord avec d'autres résultats indiquant que les plaquettes humaines incorporent la lécithine des lipoprotéines plasmatiques (BEREZIAT et coll., 1978, CHAMBAZ et coll., 1980, PLANTAVID et coll., 1982) et que la distribution des phospholipides dans la membrane plaquettaire est asymétrique et caractérisée par la prédominance de la choline dans le feuillet externe de la membrane (PLANTAVID et coll., 1982).

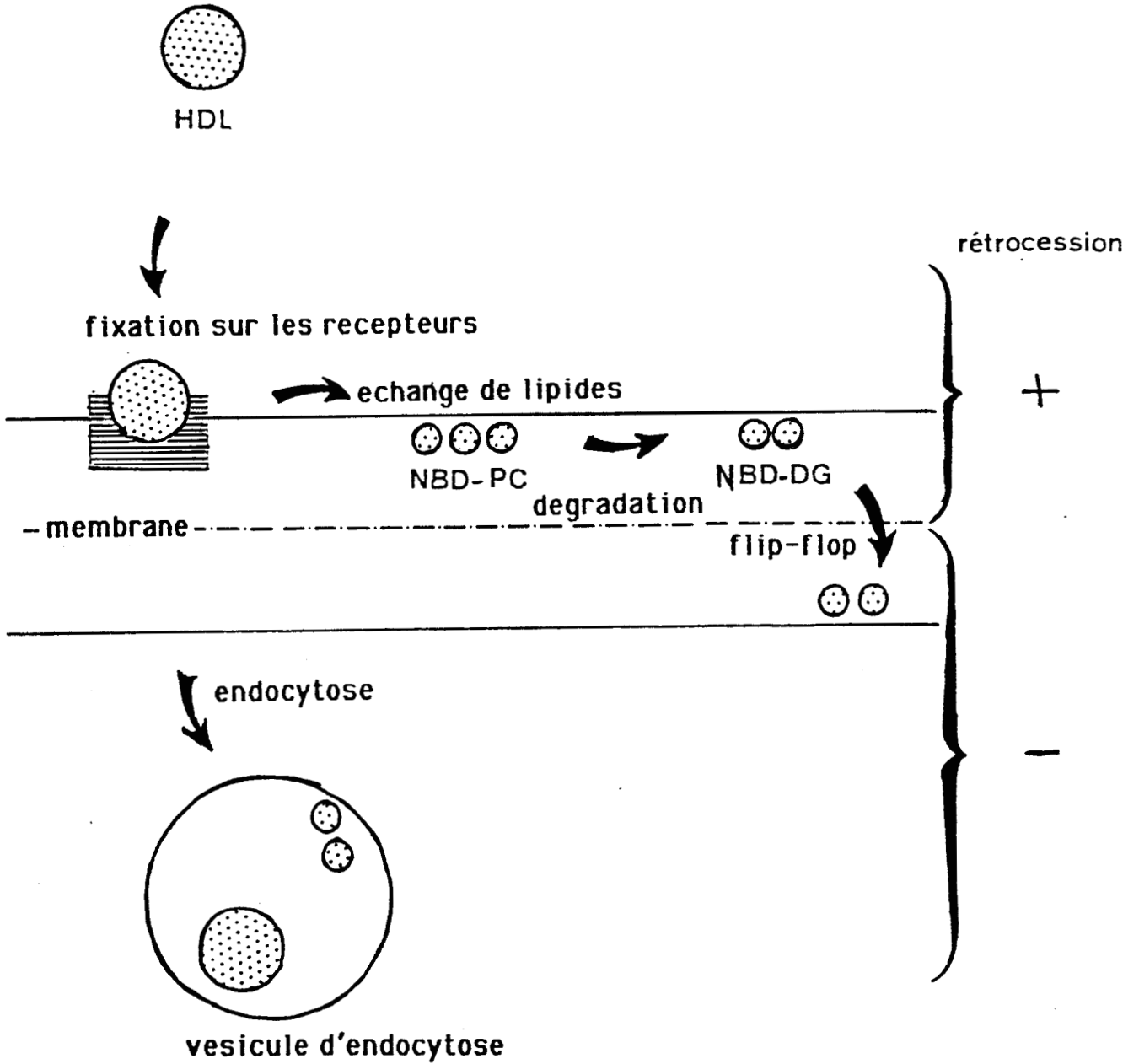
Nos résultats indiquent que :

- 50% de la fluorescence ne peut être déplacé par l'héparine et correspond à la fixation des HDL sur la membrane,
- 20 à 30% ne peuvent être rétrocedés et correspondent aux lipides internalisés et/ou fixés dans le feuillet interne de la membrane plasmique,
- 30 à 20% sont donc intégrés dans le feuillet externe.

La NBD-PC peut être dégradée dans la membrane plasmique en NBD-DAG. Il est à noter que la présence du fluorophore ne perturbe pas la phospholipase C (PAGANO et coll., 1981) et que ces phospholipases membranaires jouent un rôle dans la dégradation de la phosphatidylinositol durant la stimulation plaquettaire (ZUCKER et NACHMIAS, 1985). Il semble que la dégradation de la NBD-PC dans la membrane plasmique soit une conséquence de l'activation de la phospholipase C durant les phénomènes de fixation des HDL₃ sur les membranes plaquettaires.

En effet l'incubation des vésicules lipidiques à 4°C ou 37°C est incapable de promouvoir l'activité phospholipasique, de même que l'incubation des HDL à 4°C, bien qu'une fixation des lipoprotéines soit enregistrée à cette température. De plus l'incubation en présence de NH₄Cl 20 mM n'inhibe pas la dégradation de la NBD-PC.

FIGURE 25 : DEVENIR DE LA NBD-PC APRES FIXATION DES HDL₃ SUR LA MEMBRANE PLAQUETTAIRE.



Ainsi les plaquettes peuvent être potentiellement modifiées par l'acquisition de petites quantités de lipides des lipoprotéines circulantes. Si la fixation des HDL sur les plaquettes induit la libération des diglycérides par l'activation de la phospholipase C, cette fixation peut activer dans un second temps la phospholipase A₂ (DAWSON et coll., 1984, DAWSON et coll., 1985) conduisant à la génération de l'arachidonate qui sert de substrat à la prostaglandine et aux thromboxanes (BALLOU et CHEUNG, 1985). De plus l'activité de la phospholipase A₂ est régulée par le DAG et inhibée par les lipides contenant de la choline (DAWSON et coll., 1985).

La dégradation de la NBD-PC peut être interprétée de deux façons :

- soit comme étant le résultat d'une activation plaquettaire après fixation des HDL₃ sur des récepteurs de surface,
- soit comme une réaction de protection contre l'accumulation de la PC dans la membrane plasmique.

Nous avons schématisé figure 25 les évènements survenant dans la plaquette après fixation des HDL₃^{flu} sur leurs récepteurs spécifiques.

Les premiers phénomènes qui assurent les échanges lipidiques entre lipoprotéines et plaquettes sont les phénomènes d'internalisation des HDL₃ que nous avons mis en évidence grâce à l'utilisation des HDL₃ marquées à l'or-colloïdal (MARTIN-NIZARD et coll., 1987). Ces phénomènes d'endocytose sont responsables en partie de la pénétration de la sonde fluorescente dans le cytoplasme plaquettaire.

Un second phénomène consécutif à la fixation des HDL₃ donne lieu à des échanges lipidiques avec la membrane plasmique. La NBD-PC intégrée à la membrane peut être dégradée en NBD-DAG qui quitte le feuillet externe, donnant naissance à un pool de lipides non échangeables avec le milieu extracellulaire et que vient grossir les lipides internalisés par endocytose par récepteur.

En tout état de cause cette étude sur les interactions HDL₃^{flu} plaquettaires a permis de valider notre modèle de vecteur lipidique aux propriétés biologiques intactes. La présence de la sonde fluorescente ne perturbe pas la capacité de fixation des HDL₃ sur les récepteurs, ni les échanges lipidiques avec une membrane, ni les activités enzymatiques membranaires. Les HDL₃^{flu} bien que surchargées en phospholipides conservent toutes leurs propriétés et peuvent donc servir de vecteurs d'AGPI dans l'étude de la B.H.E. in vivo.

CHAPITRE II : ETUDE IN VIVO DES ECHANGES LIPIDIQUES ENTRE HDL₃ ET B.H.E.

| | |
|--|-----|
| I - <u>CAPTATION CEREBRALE DES SONDAS LIPIDIQUES</u> | 95 |
| I.1. Mise en évidence de la captation des sondes lipidiques | 95 |
| I.2. Influence du temps de persistance dans la circulation | 98 |
| I.3. Influence de la nature du transporteur | 98 |
| II - <u>EBAUCHE D'UN MECANISME D'ECHANGES</u> | 101 |
| III - <u>CONCLUSIONS</u> | 103 |

Notre sonde lipidique fluorescente mise au point, nous l'avons utilisée chez l'animal pour suivre les échanges lipidiques au niveau de la barrière hémato-encéphalique. Nous avons choisi le rat dont la période de myélinisation est post-natale. Cette myélinisation est corrélative avec la nécessité d'un apport extérieur important en lipides.

I - CAPTATION CEREBRALE DES SONDAS LIPIDIQUES

I.1 MISE EN EVIDENCE DE LA CAPTATION DES SONDAS LIPIDIQUES

Dans un premier temps nous avons injecté par voie intraveineuse à des rats d'âge variable (20, 23 et 30 jours) des HDL₃. Pour demeurer dans un système homologue nous avons utilisé des HDL₃ de rat préparées selon la méthode de HAVEL et coll., 1955 (fiche technique 1). Des HDL₃ ont été marquées à l'I¹²⁵ sur les apolipoprotéines (fiche technique 12) d'autres, sur les lipides par l'incorporation de sonde phospholipidique fluorescente (fiche technique 11). Ces I¹²⁵-HDL₃ et HDL₃^{flu} ont été injectées à des rats. Chaque expérience sur l'animal a été effectuée quatre fois et chaque point a été tripliqué. Après 18 heures les animaux sont sacrifiés et les cerveaux prélevés et homogénéisés. La radioactivité des protéines et la fluorescence des lipides ont été évaluées.

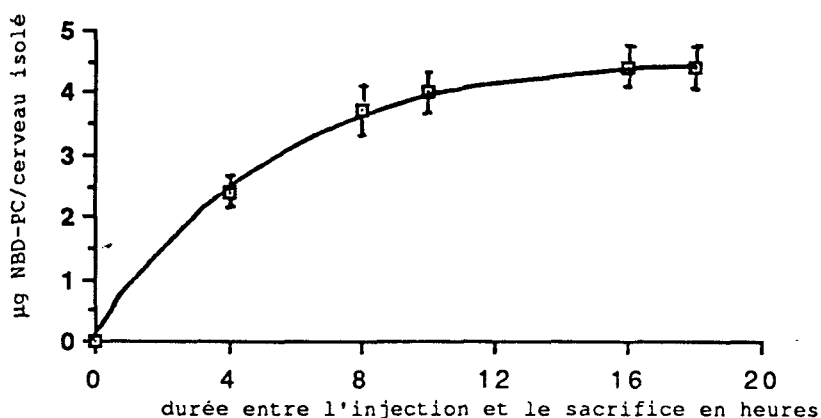
Les résultats sont reportés tableau XIV. 18 heures après l'injection, le pourcentage de radioactivité des protéines cérébrales est extrêmement faible, alors que l'index de fluorescence des lipides atteint 6,5%. Ces résultats indiquent clairement que 18 h après l'injection, seule la sonde fluorescente pénètre dans le cerveau. Il semble donc que la partie lipidique passe la B.H.E., tandis que la partie protéique des HDL₃ ne la franchit pas. De plus cette captation lipidique est plus importante vers 20 jours, c'est-à-dire au moment de la période de myélinisation chez le rat ; puis elle décroît à 23 et 30 jours. L'efficacité de la captation cérébrale varie en fonction de l'âge de l'animal, elle est accrue pendant la période de myélinisation.

TABLEAU XIV : MISE EN EVIDENCE DE LA CAPTATION CEREBRALE DE LA SONDE LIPIDIQUE

| AGE DES RATS EN J. au moment de l'injection | $^{125}\text{-I-HDL}_3$ en % | HDL ₃ marquée à la NBD-PC |
|--|---------------------------------|--------------------------------------|
| 20 | $0,02 \pm 0,002$ | $6,15 \pm 0,03$ |
| 23 | $0,04 \pm 0,0025$ | $1,00 \pm 0,025$ |
| 30 | $0,03 \pm 0,002$ | $0,75 \pm 0,03$ |

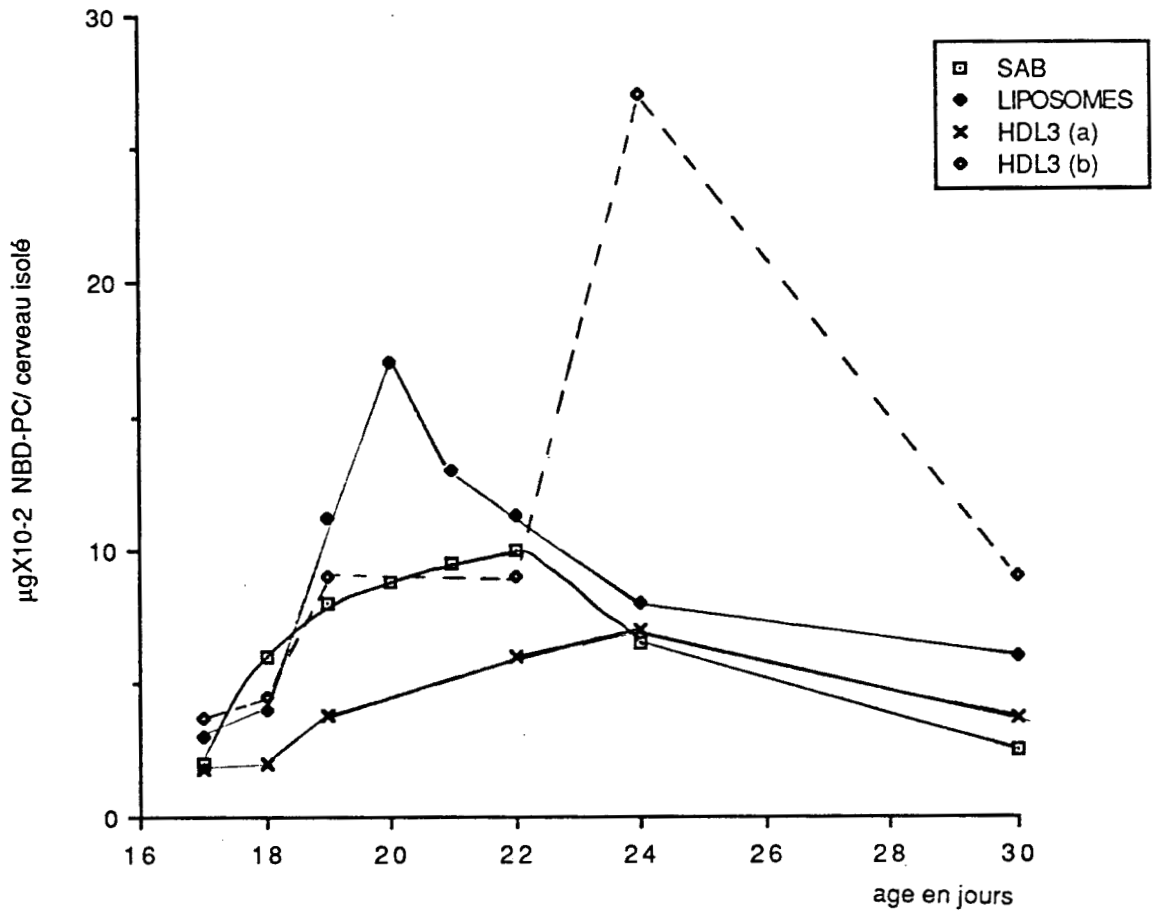
Les animaux d'âge variable reçoivent par voie intraveineuse soit 0,1 ml de HDL₃ radiomarquées (AS 180 cpm/ngde HDL₃), soit 0,1 ml de HDL₃ fluorescentes contenant 5,1 µg de NBD-PC. 18 H. après injection les animaux sont sacrifiés, la radioactivité ainsi que la fluorescence intracérébrale sont quantifiés.

FIGURE 26 : CAPTATION CEREBRALE DE LA NBD-PC CHEZ LE RAT DE 21 JOURS.



A intervalles de temps variables les animaux sont sacrifiés, les lipides du cerveau sont extraits et dosés selon les protocoles décrits dans les fiches techniques 13 et 14.

FIGURE 27 : INFLUENCE DE LA NATURE DU TRANSPORTEUR DE NBD-PC SUR LA CAPTATION CEREBRALE CHEZ LE RAT EN PERIODE DE MYELINISATION .



liposomes : 4,4 µg NBD-PC/0,1ml de solution injectée
SAB 9,1 µg NBD-PC/0,1ml de solution injectée
HDL₃(a) 18,1 µg NBD-PC/0,1ml de solution injectée
HDL₃(b) 3,1 µg NBD-PC/0,1ml de solution injectée

0,1 ml de chacune de ces solutions est injectée à des animaux d'ages variables.
Après 18 H. les animaux sont sacrifiés, les lipides du cerveau sont extraits et dosés selon les protocoles décrits dans les fiches techniques 13 et 14.

I.2 INFLUENCE DU TEMPS DE PERSISTANCE DANS LA CIRCULATION

Nous avons étudié l'influence de la durée de persistance de la sonde dans la circulation sanguine sur l'index de captation cérébrale.

Nous avons injecté par voie intraveineuse 0,1 ml de HDL₃^{flu} contenant 150 µg de NBD-PC/ml à de jeunes rats de 21 jours. Le temps entre l'injection et le sacrifice de l'animal varie de 0 à 18 heures. Chaque point a été effectué en 5 exemplaires. Les résultats présentés figure 26 indiquent que la captation cérébrale de la sonde fluorescente augmente en fonction du temps, de présence de la sonde dans la circulation sanguine pour atteindre un plateau vers 10 heures.

I.3 INFLUENCE DE LA NATURE DU TRANSPORTEUR

Nous avons cherché à mettre en évidence une certaine spécificité du vecteur lipidique dans la captation cérébrale des sondes fluorescentes. Nous avons donc injecté à des rats d'âge variable (17 à 30 jours) des liposomes de NBD-PC (4,4 µg NBD-PC/0,1 ml), de la sérum albumine chargée en NBD-PC (9,1 µg NBD-PC/0,1 ml) et des HDL₃^{flu} (18,1 µg NBD-PC/0,1 ml et 3,1 µg NBD-PC/0,1 ml). Après 18 heures les animaux sont sacrifiés et la fluorescence des lipides cérébraux est mesurée. Chaque point correspond à la moyenne de 5 expériences séparées. Les résultats sont reportés figure 27.

D'une manière générale les trois vecteurs de NBD-PC (liposome, sérum albumine et HDL₃) peuvent échanger leurs lipides au niveau de la B.H.E. Toutefois la sérum albumine s'avère être le vecteur le moins opérationnel au niveau de la B.H.E. Le maximum d'échange entre la sérum albumine et le cerveau se situe dans la période de myélinisation vers 20-21 jours.

Un profil analogue est obtenu pour les liposomes vecteurs lipidiques efficaces mais pas physiologiques.

Les résultats les plus surprenants ont été obtenus avec les HDL₃^{flu}. Lorsque la charge lipidique n'excède pas 3,1 µg/ml, les HDL₃^{flu} transfèrent très efficacement leur phosphatidylcholine aux tissus cérébraux. Ce transfert est

TABLEAU XV : MODIFICATION DES HDL₃ EN FONCTION DU TAUX DE NBD-PC
APPORTE PAR LES BILLES RECOUVERTES.



| FRACTIONS | PC:HDL ₃ /NBD-PC:VESICULE | NBD-PC µg/µg de HDL ₃ | DIAMETRE nm |
|-----------|--------------------------------------|-------------------------------------|----------------|
| A | 6:1 | 4,4 | 12,3 |
| B | 3:1 | 10,46 | 12,7 |
| C | 3:2 | 20,12 | 13,4 |
| D | 1:1 | 28,69 | 13,7 |
| E | 3:4 | 34,80 | 14,2 |
| F | 1:2 | 41,02 | 14,6 |

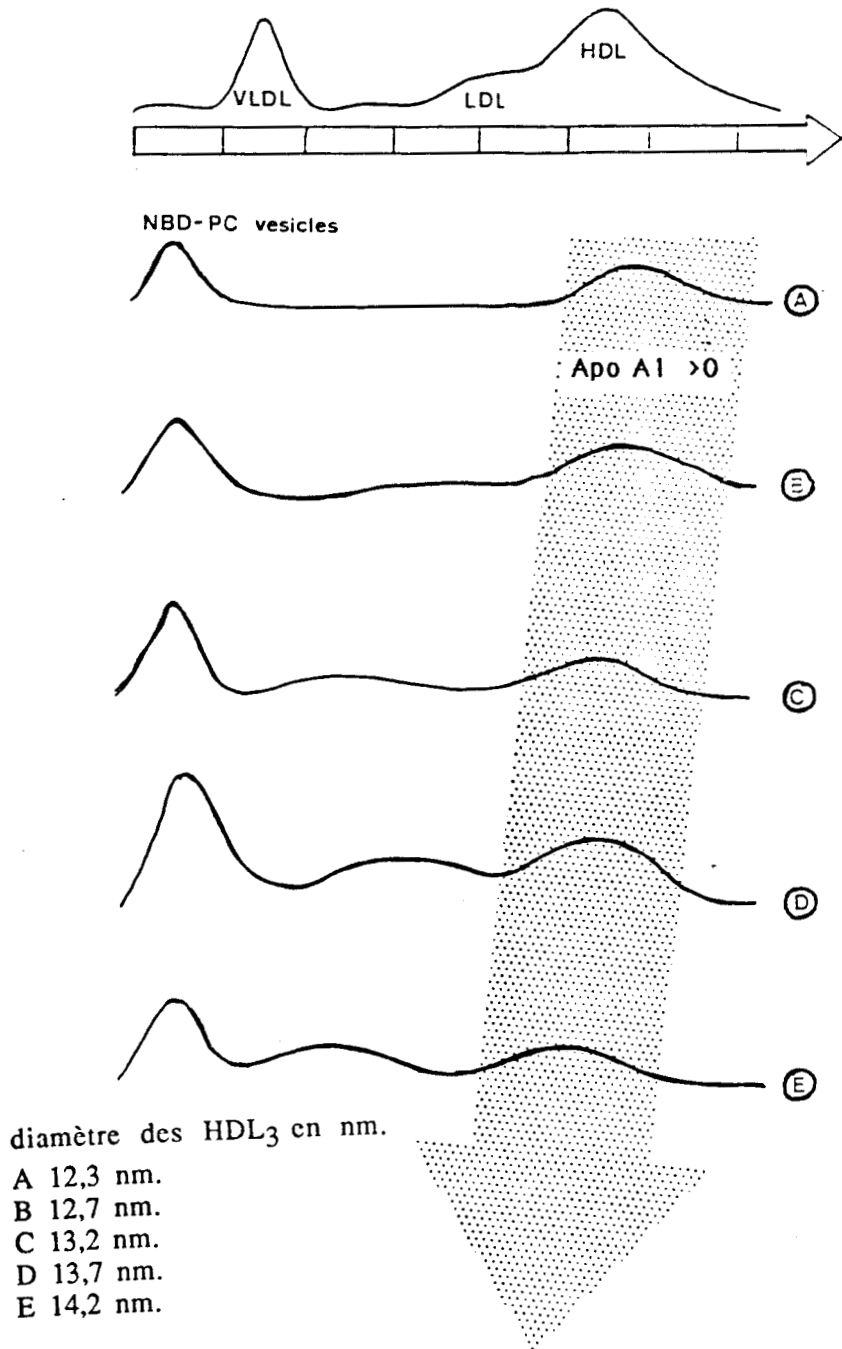
Le taux de NBD-PC contenu dans les HDL₃ varie en fonction de la quantité de NBD-PC transférée des billes de verre vers les lipoprotéines selon le protocole décrit fiche technique 11.

Les différentes fractions ainsi obtenues seront ensuite purifiées (figure 27) puis injectées à des animaux d'âge variable (figure 28).

FIGURE 28 : COMPORTEMENT CHROMATOGRAPHIQUE DES HDL₃ FLUORESCENTES.

FPLC - colonne de superose 6B

Tampon d'éluion : NaCl 0,15M; NaNO₃ 0,02%; EDTA 0,01% pH 7,2



intense en période de myélinisation, et analogue à celui de la sérum albumine. Le maximum est atteint vers le 24-25ème jours. Lorsque la charge en NBD-PC est 6 fois plus grande ($\approx 180 \mu\text{g/ml}$) les HDL₃^{flu} cèdent des quantités très faibles de lipides au cerveau.

Il semble donc que l'intensité des échanges lipidiques entre HDL₃ et cerveau ne soit pas proportionnelle à la quantité des lipides véhiculés par les lipoprotéines. Une certaine inhibition de la captation cérébrale des lipides pourrait être la conséquence de la surcharge en NBD-PC des HDL₃ qui masquerait les zones fonctionnelles de la particule lipoprotéinique, et en particulier celles des apolipoprotéines impliquées dans les interactions HDL-cellules.

II - EBAUCHE D'UN MECANISME D'ECHANGES

Nous avons donc essayé de mettre en évidence l'importance de la charge et donc de la taille des HDL₃ dans les phénomènes de captation chez le rat. Nous avons chargé différemment les HDL₃ en les incubants avec des quantités croissantes de liposomes sur support solide (fiche technique 11), de façon à respecter les rapports PC-HDL₃/NBD-PC liposomes indiqués tableau XV. Après incubation, les HDL₃^{flu} sont purifiées sur colonne de Superose 6 B (fiche technique 2). Le taux de NBD-PC incorporé dans chaque fraction de HDL₃^{flu} a été évalué (tableau XV), et il augmente en fonction de la concentration en liposomes sur support solide mise dans le milieu d'incubation.

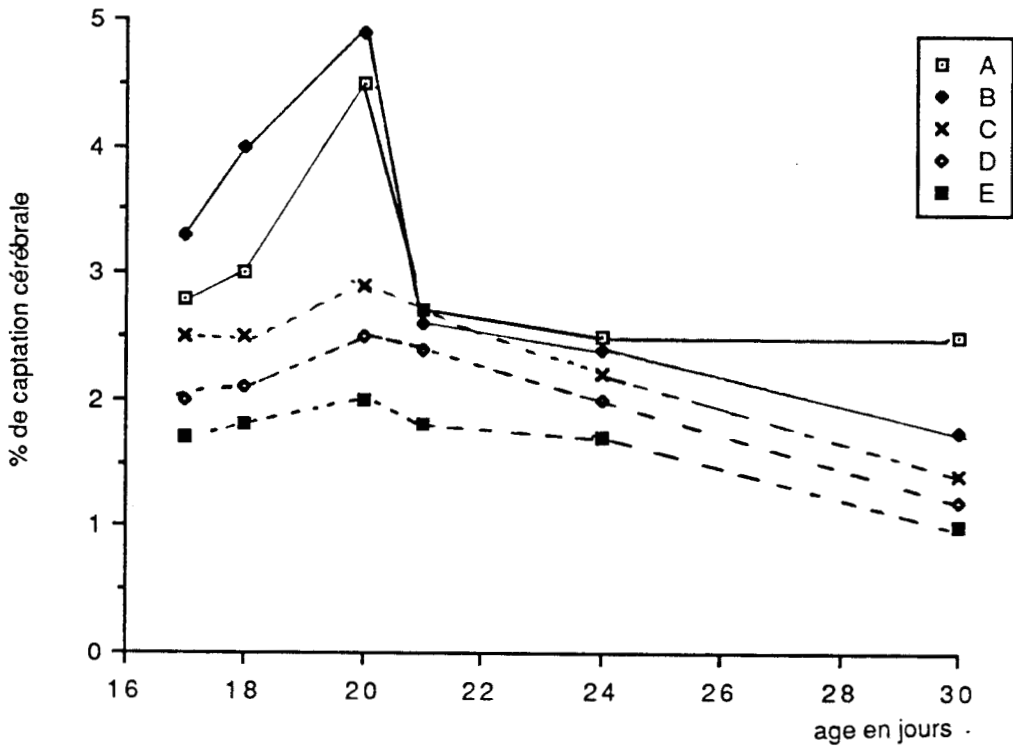
Lors de la purification des HDL₃^{flu} par gel filtration, une modification du profil d'élution est progressivement apparue (figure 28) traduisant une augmentation de la taille de ces HDL₃. Le diamètre des particules passe de 12,3 nm à 14,6 nm (FORTE et coll., 1985) comme l'indique l'évaluation en microscopie électronique (fiche technique 6).

Chacune des fractions est injectée à des rats d'âge variable, chaque expérience a été répétée 5 fois.

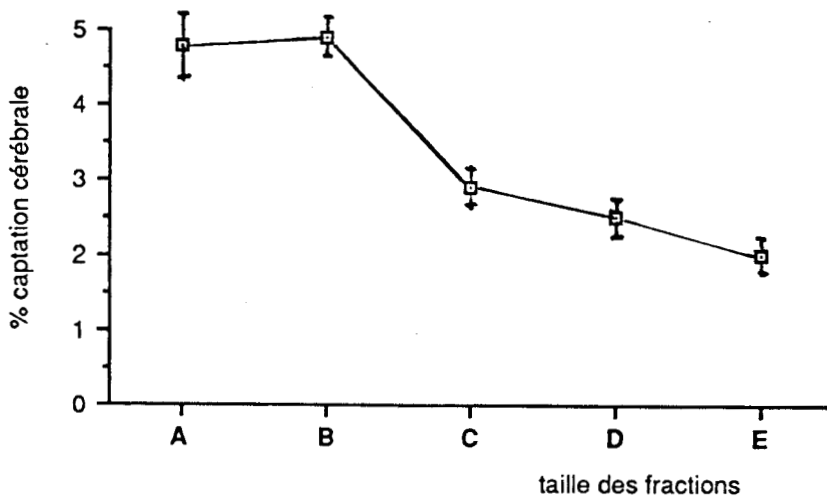
Les résultats présentés figure 29A indiquent que le pourcentage de captation cérébrale est d'autant plus grand que le diamètre des HDL₃ est petit, et donc que la charge en NBD-PC se rapproche de la charge normale.

FIGURE 29 : INFLUENCE DE LA TAILLE DES HDL₃ SUR LA CAPTATION CÉRÉBRALE CHEZ LE RAT EN PERIODE DE MYELINISATION.

A : VARIATION EN FONCTION DE L'AGE DE L'ANIMAL.



B : VARIATION EN FONCTION DE LA TAILLES DES HDL₃ CHEZ UN ANIMAL DE 20 J.



0,1ml de solution de HDL₃ dont les proportions sont définies tableau XV sont injectés à des rats d'ages variables. Après 18 H. les animaux sont sacrifiés, les lipides du cerveau sont extraits et dosés selon les protocoles décrits dans les fiches techniques 13 et 14.

Au maximum de myélinisation 19-20 jours, l'évolution du pourcentage de captation cérébrale de la sonde NBD-PC en fonction de la taille et de la charge des HDL₃ (figure 29B) indique clairement que les échanges lipidiques sont dans certaines limites conditionnés par le taux de phospholipides circulants, qu'ils sont saturables, et même inhibés pour des charges importantes en NBD-PC. Un simple phénomène de diffusion des lipides du sang vers la B.H.E. ne peut être invoqué.

Il apparaît en filigranne une ébauche de mécanisme. La conformation des HDL₃ est importante dans les processus d'échanges. La surcharge lipidique des HDL₃ modifie l'accessibilité des épitopes des apolipoprotéines responsables des interactions cellulaires et des phénomènes de fixation sur les récepteurs membranaires. Il semble donc qu'une interaction spécifique des HDL₃ avec les cellules de la B.H.E. soit indispensable dans les mécanismes d'échanges.

L'endocytose par récepteur des HDL₃ ne semble pas être le mécanisme qui amène les lipides aux cellules cérébrales, puisque aucune apolipoprotéine marquée à l'I¹²⁵ ne pénètre dans le cerveau. Ce qui semble compatible avec le fonctionnement de la B.H.E.

Si une certaine proportionnalité entre le taux de PC circulant et l'index de captation est mise en évidence, il ne semble pas que la diffusion simple des lipides au niveau de la B.H.E. soit le mécanisme qui amène les acides gras au cerveau.

III - CONCLUSIONS

L'utilisation de HDL₃ portant une sonde fluorescente de NBD-PC nous a permis de mettre en évidence le rôle des HDL₃ dans l'approvisionnement lipidique cérébral. La notion d'une interaction spécifique des HDL₃ avec les cellules de la barrière hémato-encéphalique semble se dégager.

Avant de continuer plus avant l'étude des mécanismes de captation des acides gras au niveau de la B.H.E., il nous a semblé primordial de rechercher l'existence de récepteurs spécifiques pour les HDL₃ sur les membranes de cellules endothéliales de capillaires cérébraux. En effet existe-t-il un récepteur spécifique des HDL₃ au niveau de la B.H.E. similaire à celui existant sur d'autres types cellulaires ?

La mise au point de cultures de cellules endothéliales de capillaires cérébraux de boeufs (MERESSE et coll., 1989) au Serlia, nous a permis l'étude des interactions HDL₃-cellules de la B.H.E.

CHAPITRE III : ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE LIPOPROTEINES DE HAUTE DENSITE
ET LES CELLULES ENDOTHELIALES DE LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE

| | |
|--|-----|
| I - <u>MISE EN EVIDENCE DE SITES DE FIXATION SPECIFIQUES AUX</u> <u>HDL₃ SUR LA B.H.E.</u> | 105 |
| I.1. Mise en évidence sur cerveaux isolés | 105 |
| I.2. Mise en évidence sur capillaires isolés | 107 |
| I.3. Etude sur membranes isolées | 109 |
| I.3.1. Mise en évidence de "récepteurs" sur les membranes endothéliales | 109 |
| I.3.2. Spécificité des "récepteurs" | 111 |
| I.4. Conclusion | 111 |
| II - <u>MISE EN EVIDENCE DE RECEPTEURS AI, AII SUR LES BBCE</u> | 112 |
| II.1. Mise en évidence de sites de fixation des HDL ₃ sur BBCE | 112 |
| II.1.1. Influence du nombre de générations cellulaires | 115 |
| II.1.2. Importance de l'origine des HDL ₃ : spécificité d'espèce | 115 |
| II.2. Présence d'un récepteur spécifique des Lp AI | 117 |
| II.3. Régulation de l'expression des récepteurs des Lp AI sur BBCE | 117 |
| III - <u>FONCTIONNEMENT DU RECEPTEUR HDL₃ DES BBCE</u> | 118 |
| III.1. Absence d'internalisation des HDL ₃ par les BBCE | 118 |
| III.2. Absence de dégradation des HDL ₃ par les BBCE | 123 |
| IV - <u>CONCLUSION</u> | 124 |

Avant d'aborder l'aspect cellulaire de la B.H.E. nous avons voulu vérifier la validité du concept d'une part sur un organe isolé et plus précisément sur capillaires et membranes de cellules endothéliales.

I - MISE EN EVIDENCE DE SITES DE FIXATION SPECIFIQUES AUX HDL₃ SUR LA B.H.E.

I.1 MISE EN EVIDENCE SUR CERVEAUX ISOLES

Les cerveaux de boeuf sont prélevés immédiatement après l'abattage et transportés à 4°C. L'artère cérébrale antérieure quittant le cercle de Willis est cathétérisée et l'arbre vasculaire cérébral est lavé par 2 fois 10 ml de DMEM, pH : 7,2, contenant 10 mM d'Hépès et 0,2% de BSA. Parallèlement les HDL₃ dépourvues d'apo E sont préparées à partir d'un pool de plasma bovin par une technique de centrifugation (fiches techniques 1 et 8) ; elles sont ensuite marquées à l'iode 125 (I¹²⁵-HDL₃) selon la méthode de BILHEMER et coll., 1972) (fiche technique 12).

Après injection de HDL₃ marquées à l'I¹²⁵ (100 µg/ml, 370 cpm/ng), incubation 1 heure à 4°C et lavages par 2 fois 10 ml de DMEM + 0,2% de BSA, les capillaires cérébraux sont isolés (fiche technique 18) et la radioactivité y est mesurée.

La fixation non spécifique est déterminée par injection de I¹²⁵-HDL₃ (100 µg/ml) en présence d'un excès de HDL₃ non marquées (2 mg/ml). Les résultats exprimés en ng de I¹²⁵-HDL₃ fixées par mg de protéines (figure 30) sont la moyenne de trois expériences séparées.

Après 1 heure d'incubation la fixation spécifique a atteint son maximum. Elle est de 1,15 ng de I¹²⁵-HDL₃/mg de protéines pour l'homogénat total, de 0,02 pour la fraction contenant principalement les artérioles et de 1,26 pour la fraction correspondant aux capillaires cérébraux purifiés. Les HDL₃ radioactives se fixent donc spécifiquement sur les capillaires cérébraux, probablement sur leur face luminale. La faible fixation sur les artérioles et veinules est

FIGURE 30 : FIXATION DES HDL₃ SUR CERVEAU ISOLE DE BOEUF.

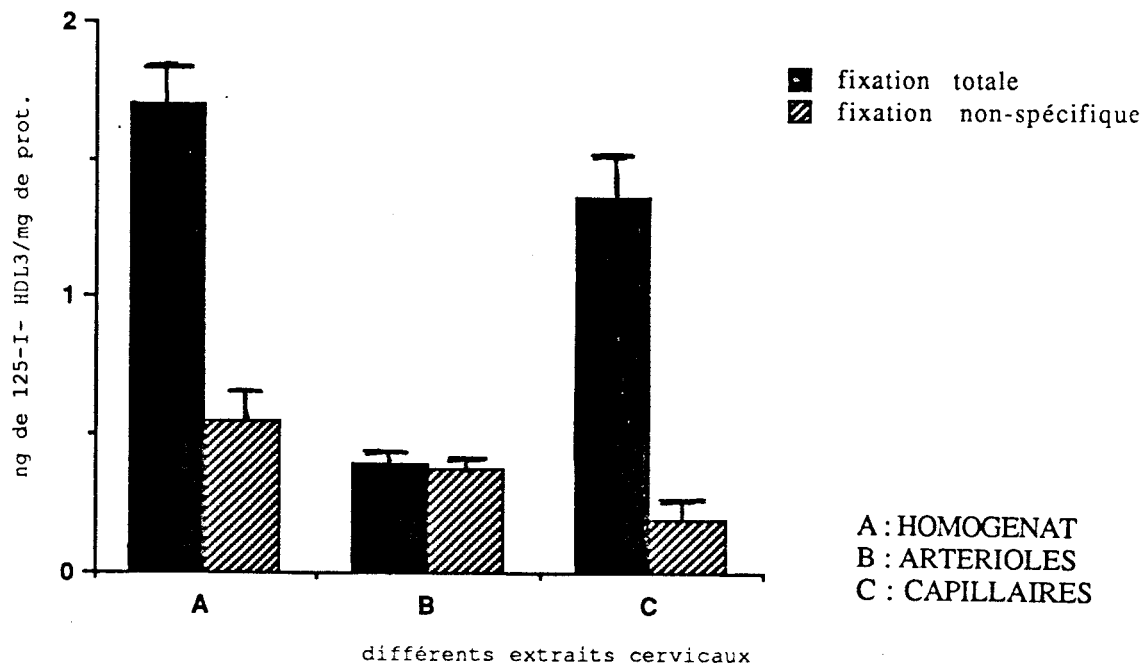
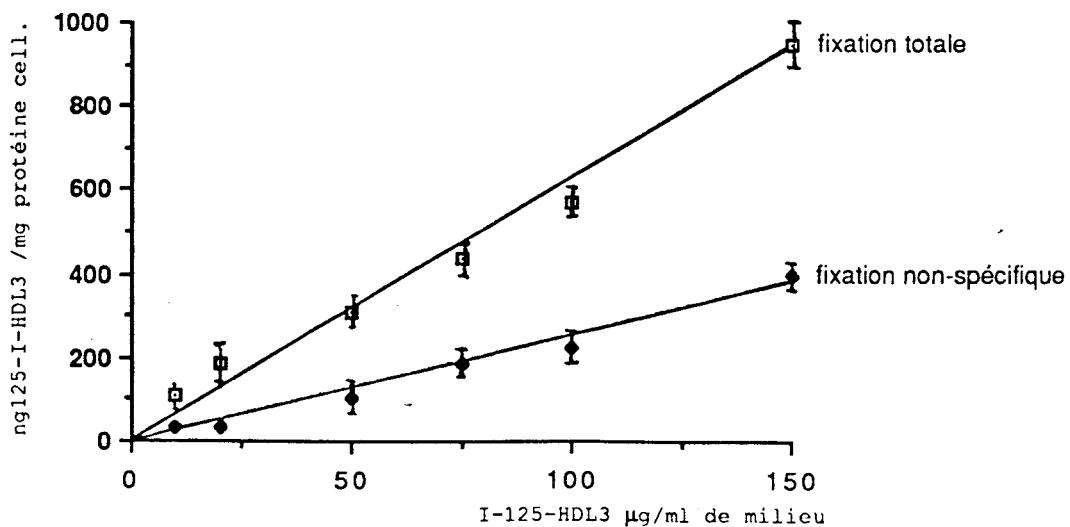


FIGURE 31 : FIXATION DES HDL₃ SUR CAPILLAIRES ISOLES.



certainement due à une contamination par du matériel non vasculaire. L'homogénéat quant à lui doit certainement sa forte affinité à la présence des méninges et des astrocytes (PITAS et coll., 1987).

I.2 MISE EN EVIDENCE SUR CAPILLAIRES ISOLES

Afin de vérifier l'existence d'une fixation spécifique des HDL₃ sur les capillaires cérébraux, nous avons recherché l'existence de sites de haute affinité sur des préparations de capillaires isolés.

Les capillaires cérébraux sont isolés par la méthode de BRENDEL et coll., 1974 modifiée. Le cortex cérébral est homogénéisé mécaniquement et filtré sur toile de bluter dont les mailles parfaitement calibrées permettent dans un premier temps d'éliminer artérioles et veinules (mailles de 180 micromètres) puis dans un second temps de collecter les capillaires (mailles de 60 micromètres).

Les capillaires sont incubés en présence de concentrations variables en I¹²⁵-HDL₃, additionnées (fixation non spécifique) ou non (fixation totale) d'un large excès de HDL₃ non radioactives.

Après incubation 2 heures à 4°C sous agitation, les capillaires sont lavés et la radioactivité résiduelle est mesurée. Chaque point est effectué en triple et l'expérience répétée trois fois. Les résultats sont reportés figure 31.

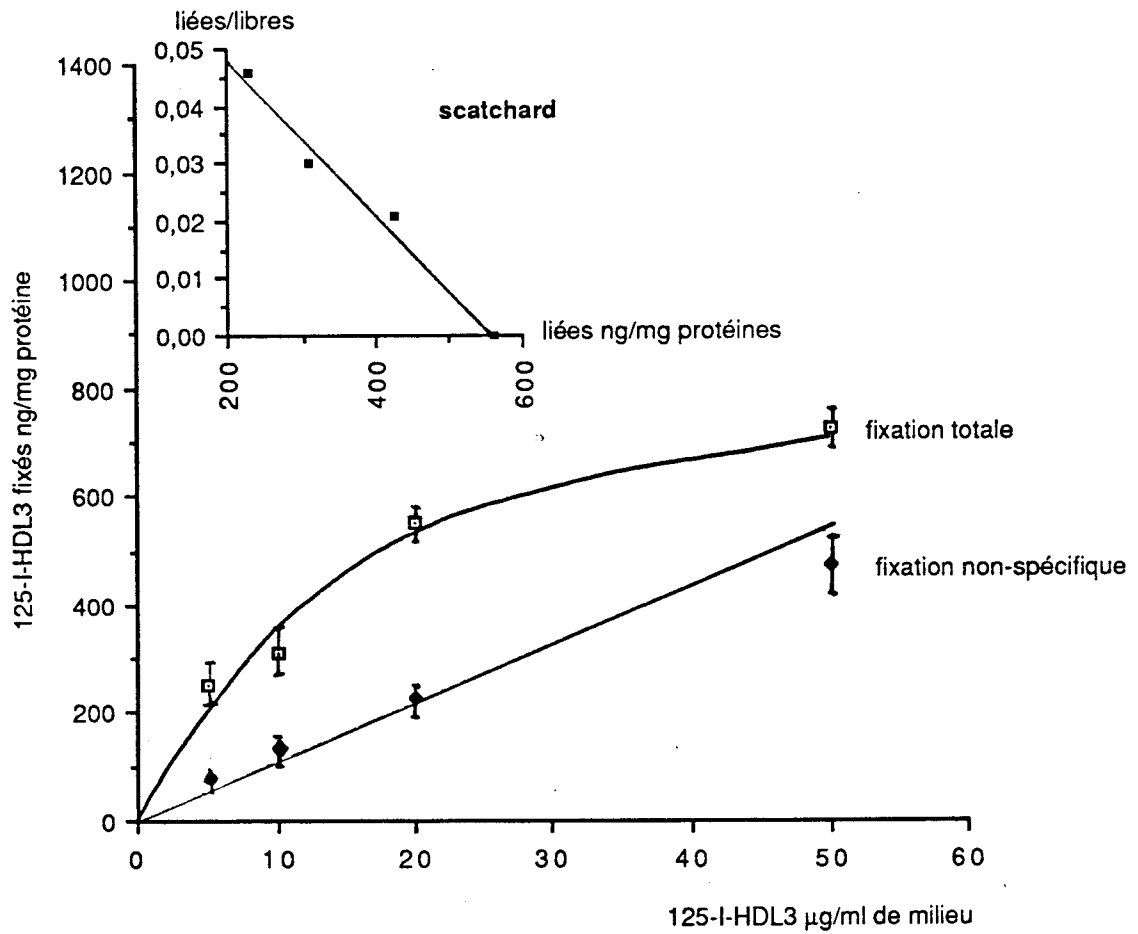
Les HDL₃ radiomarquées se fixent spécifiquement mais de façon non saturable sur les capillaires isolés.

Cette fixation n'est probablement pas le reflet de ce qui se passe sur la membrane luminale dont l'accessibilité reste très faible. En effet le diamètre des capillaires est très étroit et d'autre part la présence d'hématies et de collapsus bloquent l'accès aux membranes lumineales dans les expériences sur capillaires isolés.

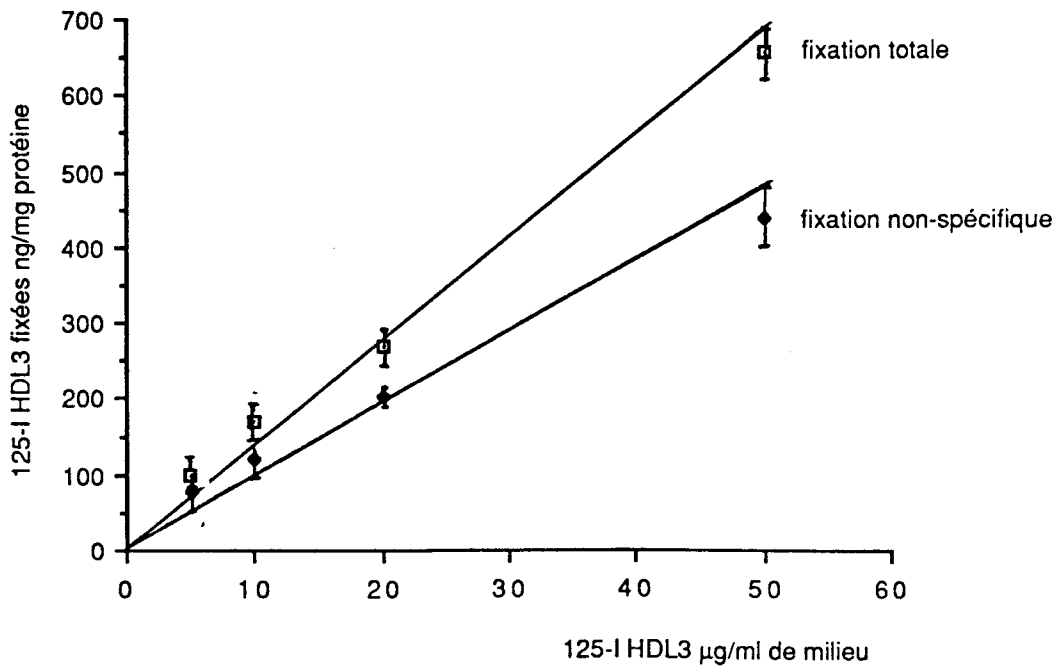
C'est donc principalement la face antiluminale comprenant la lame basale mais aussi les péricytes et les pieds d'astrocytes résiduels qui assureront la fixation des HDL₃ radioactives.

FIGURE 32 : FIXATION DES HDL₃ SUR MEMBRANES ENDOTHELIALES ET ANTILUMINALES.

A : MEMBRANES ENDOTHELIALES



B : MEMBRANES ANTILUMINALES



Cette expérience ne permet pas d'infirmer ou de confirmer l'existence d'une fixation spécifique et saturable sur la membrane luminale mise en évidence sur cerveaux isolés. Nous avons donc isolé les membranes endothéliales et basales et recherché sur ces deux fractions la présence éventuelle de sites récepteurs pour les HDL₃.

I.3 ETUDE SUR MEMBRANES ISOLEES

Les membranes endothéliales sont séparées de la membrane basale par la méthode de LIDINSKI et coll., 1983 (fiche technique 26). Les cellules endothéliales des capillaires isolés sont soumises à un choc hypotonique et soniquées, puis les membranes endothéliales et antiluminales sont séparées par centrifugation.

I.3.1 Mise en évidence de "récepteurs" sur les membranes endothéliales

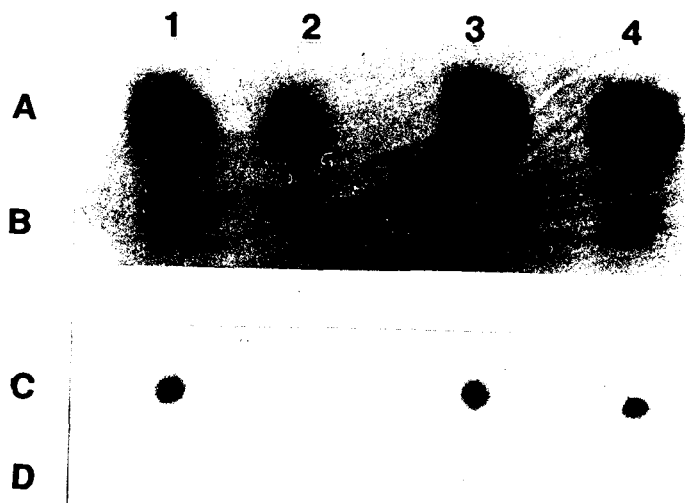
Les membranes endothéliales et basales sont incubées en présence de concentrations de I¹²⁵-HDL₃. La fixation non spécifique est déterminée par l'addition d'un large excès de HDL₃ non marquées (X 20). Après incubation 1 heure à 4°C les membranes sont lavées par filtration sur membrane de type GV (millipore) (fiche technique 31). La radioactivité est alors mesurée. Les résultats présentés figure 32 sont la moyenne de trois expériences et montrent une fixation spécifique et saturable sur des membranes endothéliales. La valeur du Kd varie de 5 à 10 µg/ml avec une valeur moyenne 7 µg/ml, à laquelle correspond un B max de 470 ng de HDL/mg de protéine cellulaire.

L'analyse selon SCATCHARD des courbes de fixation des HDL₃ sur les membranes endothéliales met en évidence l'existence d'une seule classe de sites pour les HDL₃.

Aucune liaison de type saturable n'est mise en évidence au niveau des fractions de membranes antiluminales.

Afin de déterminer si le site de fixation présent sur les membranes endothéliales est spécifique au HDL₃, nous avons effectué des expériences de compétitions par "Ligand Blotting" selon la méthode de GRAHAM et ORAM, 1987 (fiche technique 33).

FIGURE 33 : DETERMINATION DE LA SPECIFICITE DE FIXATION DES HDL₃ SUR LES MEMBRANES ENDOTHELIALES ET ANTILUMINALES PAR AUTORADIOGRAPHIE.



- 1 : 125-I- HDL₃ (30µg/ml)
- 2 : 125-I-HDL₃ (30µg/ml) + HDL₃ non marquées (600µg/ml)
- 3 : 125-I-HDL₃ (30µg/ml) +LDL non marquées (600µg/ml)
- 4 : 125-I-HDL₃ (30µg/ml) +LDL non marquées méthylées (600µg/ml)

- A : membranes endothéliales.
- B : membranes antiluminales ou basales.
- C : membranes endothéliales trypsinisées.
- D : membranes antiluminales ou basales trypsinisées.

30 µg d'extraits membranaires sont déposés sur nitrate de cellulose pour être ensuite incubés en présence des fractions 1,2,3 ou 4 et ensuite autoradiographiés selon le protocole décrit fiche technique 33.

I.3.2 Spécificité des récepteurs

Afin de démontrer la nature protéique des sites de fixation des HDL₃, nous avons préparé comme précédemment des membranes endothéliales ou basales, et une fraction aliquote est soumise à un traitement protéolytique par la trypsine.

La protéolyse des membranes endothéliales ou basales se déroule en présence de trypsine et d'EDTA (les concentrations finales respectives sont de 0,025% et 0,01% P/V) pendant 15 minutes à 37°C. La protéolyse est stoppée par addition de calcium (concentration finale 50 nM).

Des aliquots de préparations membranaires trypsinisées ou non correspondant à 30 µg de protéines sont déposées sur une feuille de nitrocellulose. Après saturation les bandes de nitrocellulose sont incubées en présence de : (1) I¹²⁵-HDL₃, (2) I¹²⁵-HDL₃ et HDL₃ non marquées en excès, (3) I¹²⁵-HDL₃ et LDL non marquées en excès, (4) I¹²⁵-HDL₃ et LDL méthylées en excès (fiche technique 7). Les résultats obtenus après autoradiographie sont représentés figure 33.

Ils confirment d'abord les résultats précédents dans le sens où les membranes antiluminales possèdent peu ou pas de sites de fixation pour les HDL₃.

De plus les membranes trypsinisées ont perdu leur capacité à fixer les lipoprotéines indiquant que les sites de fixation sont de nature protéique.

Ces sites sont spécifiques des HDL₃, puisque ni les LDL, ni les LDL méthylées entrent en compétition avec les HDL₃ pour l'occupation des sites de fixation des HDL₃.

I.4 CONCLUSION

Il existe donc bien au niveau de la B.H.E. des sites de liaison de haute affinité, saturables, spécifiques pour les HDL₃. Ces sites sont différents des récepteurs B.E. des LDL et des récepteurs de type "scavenger" des LDL modifiées. Ces sites sont localisés sur les membranes luminales des cellules endothéliales de capillaires cérébraux.

Quel est le rôle de ce "récepteur" au niveau de la barrière hémato-encéphalique ? et comment approvisionne-t-il les cellules endothéliales en lipides ?

Pour tenter de répondre à ces questions nous avons utilisé un modèle de cultures de cellules endothéliales de capillaires cérébraux bovins ou BBCE (Bovine Brain Capillary Endothelial Cells). Cette culture mise au point par MERESSE et coll. en 1989 est une culture à long terme sans contamination par les péricytes. Les cellules, même après un grand nombre de générations gardent toutes leurs caractéristiques de cellules endothéliales et de cellules de la B.H.E. (facteur VIII, enzyme de conversion de l'angiotensine, surface non thrombogénique et surtout présence de jonctions serrées).

Le protocole de mise en culture est présenté fiches techniques 18 à 25.

II - MISE EN EVIDENCE DE RECEPTEURS AI, AII SUR LES BBCE

Nous avons dans un premier temps vérifié que les BBCE en culture expriment un site de fixation pour les HDL₃ et que ses caractéristiques biochimiques sont identiques à celles des "récepteurs" que nous avons identifiées in vivo.

Nous avons comparé dans de nombreux cas notre modèle cellulaire à celui des cellules endothéliales d'aortes bovines ou ABAE plus largement étudié.

II.1 MISE EN EVIDENCE DE SITES DE FIXATION DES HDL₃ SUR BBCE

Le protocole d'étude de la fixation des HDL₃ sur des BBCE en culture est présenté fiche technique 30.

Ces études sont réalisées à partir de BBCE subconfluentes préincubées pendant 36 heures dans un milieu dans lequel le sérum de veau est remplacé par 0,2% de sérum albumine. Les cellules cultivées en boîtes de pétri de 35 mm sont incubées 2 heures à 4°C en présence de concentrations croissantes de lipoprotéines radiomarquées dans un milieu DMEM contenant 10 mM d'Hépès de pH 7,2. La fixation non spécifique est déterminée par l'addition d'un large excès de HDL₃ non radioactives. Les cellules sont ensuite lavées et la radioactivité résiduelle est mesurée. Chaque étude est réalisée trois fois, chaque point en triple exemplaire. Les résultats obtenus sur des cultures de BBCE après le 6ème passage sont reportés figure 34.

FIGURE 34 : FIXATION SPECIFIQUE DES HDL₃ SUR BBCE .

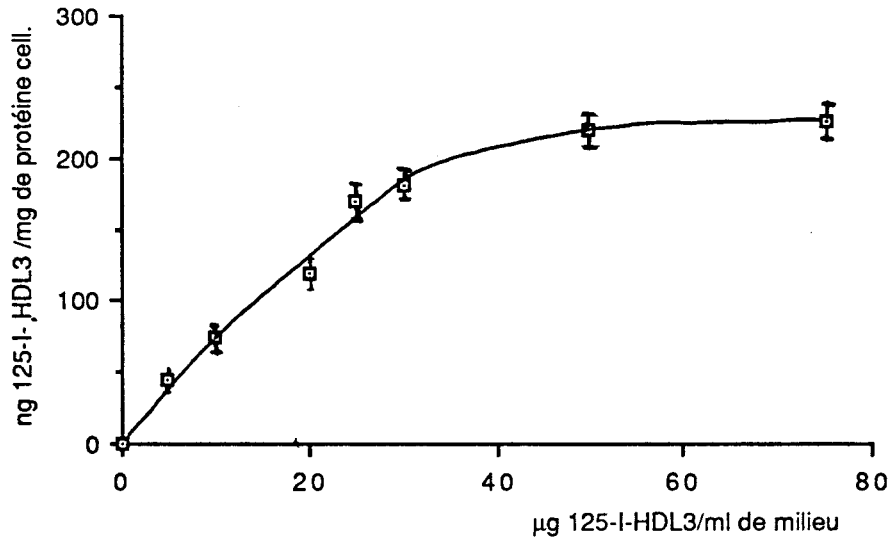
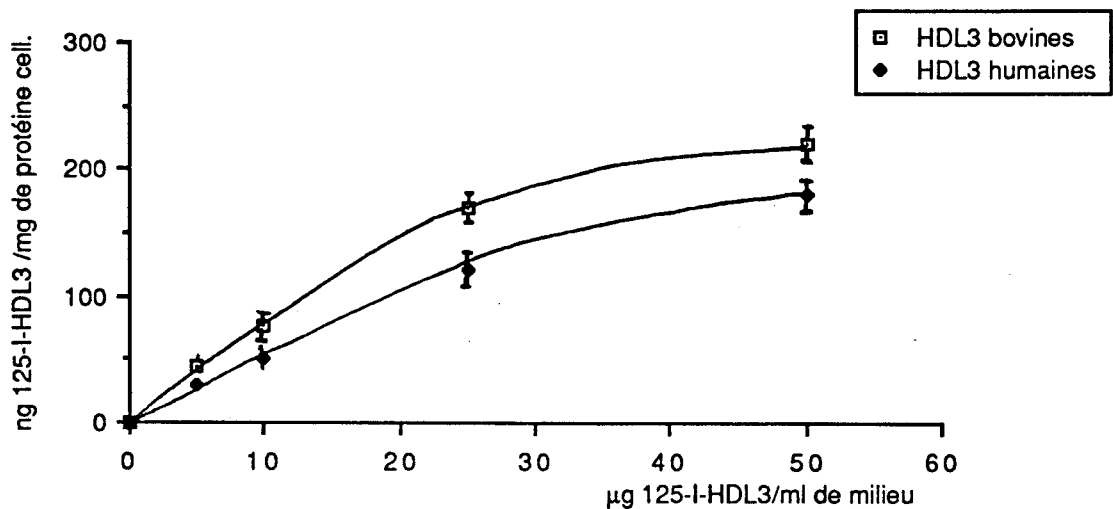


FIGURE 35 : INFLUENCE DE L'ORIGINE DES HDL₃.



Ces deux expériences ont été réalisées sur BBCE au 6^{ième} passage. La fixation spécifique représente la fixation totale des ¹²⁵-I-HDL₃ à laquelle a été enlevée la fixation non spécifique (¹²⁵-I-HDL₃ + 20 fois la concentration en HDL₃ non marquées).

TABLEAU XVI : CARACTERISTIQUES DE LA FIXATION DES HDL₃ A 4°C SUR BBCE EN FONCTION DU NOMBRE DE PASSAGE.

| PASSAGE | FIXATION SATURABLE | B max | Kd |
|---------|--------------------|-------|----|
| 1 | + | 200 | 14 |
| 5 | + | 205 | 14 |
| 6 | + | 200 | 14 |
| 7 | + | 670 | 38 |
| 8 | - | | |
| 9 | - | | |
| 10 | - | | |

Ce tableau représente la moyenne de 3 expériences dont les points ont tous été tripliqués, le coefficient de variation est inférieur à 10%.

Un phénomène de fixation, saturable est détecté sur les BBCE, les valeurs du Kd sont de 16 µg/ml et le B max de 240 ng de protéine HDL₃/ng de protéines cellulaires.

II.1.1 Influence du nombre de générations cellulaires

Les études de fixation à 4°C ont été réalisées sur des BBCE subconfluentes du 1er au 10ème passages (P1 à P10).

Nous avons reporté tableau XVI les caractéristiques de la fixation des HDL₃ sur les BBCE en fonction du nombre de passages.

De P1 à P6, les caractéristiques de la fixation des HDL₃ sur les BBCE ne sont pas différentes de celles enregistrées sur les membranes endothéliales de capillaires isolés.

A partir du 7ème passage, les B max et Kd augmentent de façon considérable traduisant une diminution de l'affinité des sites de liaison pour les HDL₃. Par la suite nous n'utiliserons donc que des cellules ayant subi moins de 7 passages.

II.1.2 Importance de l'origine des HDL₃ : spécificité d'espèce

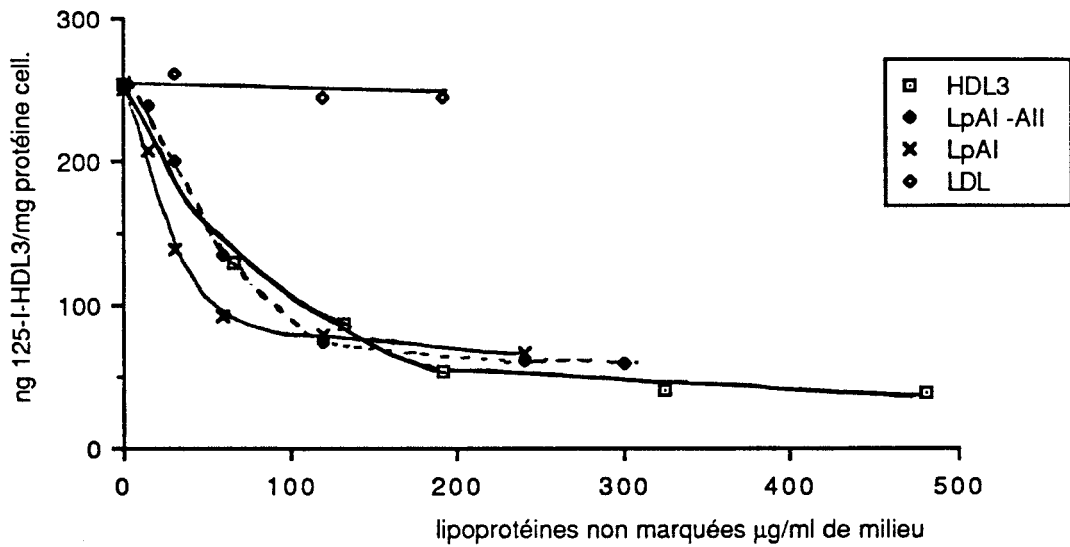
Nous avons isolé à la fois des HDL₃ humaines et bovines, dont les densités se situent entre 1,12 et 1,21 g/ml.

Les cellules subconfluentes au 6ème passage ou P6 sont incubées en présence de concentrations croissantes d'I¹²⁵-HDL₃ humaines ou bovines. La fixation non spécifique est déterminée par l'addition d'un large excès de HDL₃ non radioactives (20 fois plus).

Les résultats sont illustrés figure 35 et montrent que les HDL₃ humaines et bovines se fixent de façon spécifique et saturable sur les BBCE en culture, avec des Kd respectifs de 19 et de 16 µg HDL₃/ml.

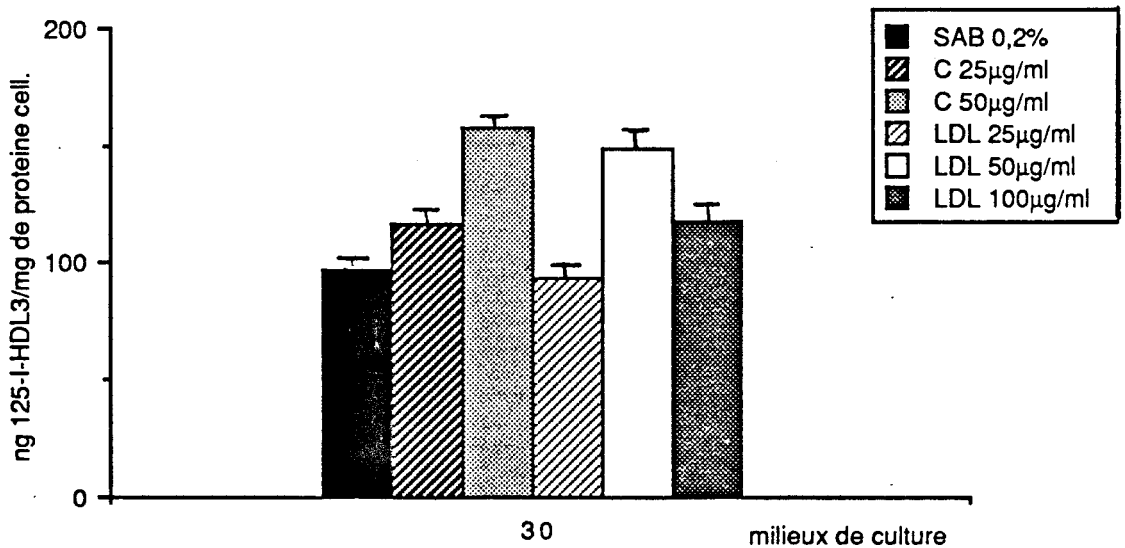
Les HDL₃ humaines et bovines ont donc des affinités analogues pour le site de liaison bovin ; avec toutefois une très légère baisse d'affinité pour les HDL₃ humaines.

FIGURE 36 : INHIBITION COMPETITIVE DE LA FIXATION DES HDL₃ SUR BBCE.



25 µg de ¹²⁵I-HDL₃ entrent en compétition avec des quantités croissantes de HDL₃, LpAI-AII, LPAI ou LDL non marquées pendant 2 H. à 4°C.

FIGURE 37 : INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN CHOLESTEROL DU MILIEU DE CULTURE SUR LA FIXATION SPECIFIQUE DES HDL₃ SUR BBCE.



Les BBCE subconfluentes sont préincubées en DMEM additionné de SAB 0,2%, SAB 0,2% + cholestérol (C 25 µg/ml), SAB 0,2% + cholestérol (C 50 µg/ml), LDL 25 µg/ml, LDL 50 µg/ml ou LDL 100 µg/ml pour être ensuite incubées en présence de 30 µg/ml de ¹²⁵I-HDL₃ ou de 30 µg/ml de ¹²⁵I-HDL₃ avec un large excès de HDL₃ non marquées (600 µg/ml).

Par la suite, nous ferons appel aux lipoprotéines de type Lp AI ou Lp AI, AII humaines plus facilement purifiables pour caractériser le site de fixation par des études d'inhibition compétitive. En effet les Lp AI-AII sont à l'état de traces dans le plasma bovin (CORDLE et coll., 1985).

II.2 PRESENCE D'UN "RECEPTEUR" SPECIFIQUE DES Lp AI

L'ambiguïté relevée dans la littérature concernant la caractérisation des récepteurs aux HDL nous a conduit à définir les sites de liaison pour les HDL des BBCE par des études d'inhibition compétitive. En effet les HDL₃ par leur très faible quantité d'apo E peuvent se fixer sur les récepteurs B.E. des LDL. La présence d'apo AI dans leur molécule leur permet d'être reconnues par des récepteurs AI, AII.

Les Lp AI et Lp AI, AII ont été isolées selon les méthodes de KOREN et coll., 1987 et de Mc CONATHY et coll., 1985 (fiche technique 10), à partir de plasma humain. Les LDL utilisées dans cette étude ont également une origine humaine.

Afin de déterminer précisément le composant impliqué dans la fixation des HDL₃, nous avons réalisé une expérience de compétition entre des HDL₃ radio-marquées (25 µg/ml) et des quantités croissantes de LDL, Lp AI, Lp AI, AII et HDL₃ non marquées (figure 36). Les LDL n'entrent pas en compétition avec les HDL₃ pour l'occupation du site de liaison, excluant ainsi la participation d'un récepteur B.E. dans le phénomène de fixation des HDL₃ au niveau de la B.H.E.

Par ailleurs 50% d'inhibition est obtenu pour 30 µg Lp AI/ml de milieu, 70 µg Lp AI, AII et 75 µg de HDL₃.

Ces résultats nous indiquent que l'apolipoprotéine AI possède une affinité particulière pour les sites de fixation des HDL₃ et que c'est probablement par son intermédiaire que les HDL₃ se lient aux récepteurs de surface des BBCE.

II.3 REGULATION DE L'EXPRESSION DES "RECEPTEURS" DES Lp AI SUR BBCE

L'objectif de cette étude est de déterminer la régulation de l'expression du site de fixation des HDL₃ par le taux intracellulaire en cholestérol.

Les BBCE subconfluentes sont préincubées en milieu DMEM additionné de :

- BSA 0,2%
- BSA 0,2% et cholestérol libre en éthanol 25 µg/ml
- BSA 0,2% et cholestérol libre en éthanol 50 µg/ml
- BSA 0,2% et LDL 25 µg/ml
- BSA 0,2% et LDL 50 µg/ml
- BSA 0,2% et LDL 75 µg/ml

Les BBCE sont ensuite incubées 2 heures à 4°C en présence de 30 µg/ml de HDL₃ bovines radiomarquées.

Les résultats illustrés figure 37 montrent un accroissement de la fixation des HDL₃ sur les BBCE en fonction de la concentration en LDL et cholestérol libre présent dans le milieu de préincubation.

Nos résultats concordent avec ceux d'autres études récentes (ORAM et coll., 1987, BRINTON et coll., 1985) qui indiquent que la fixation des HDL sur la surface des cellules de mammifères est régulée par la charge en cholestérol cellulaire.

III - FONCTIONNEMENT DU RECEPTEUR HDL₃ DES BBCE

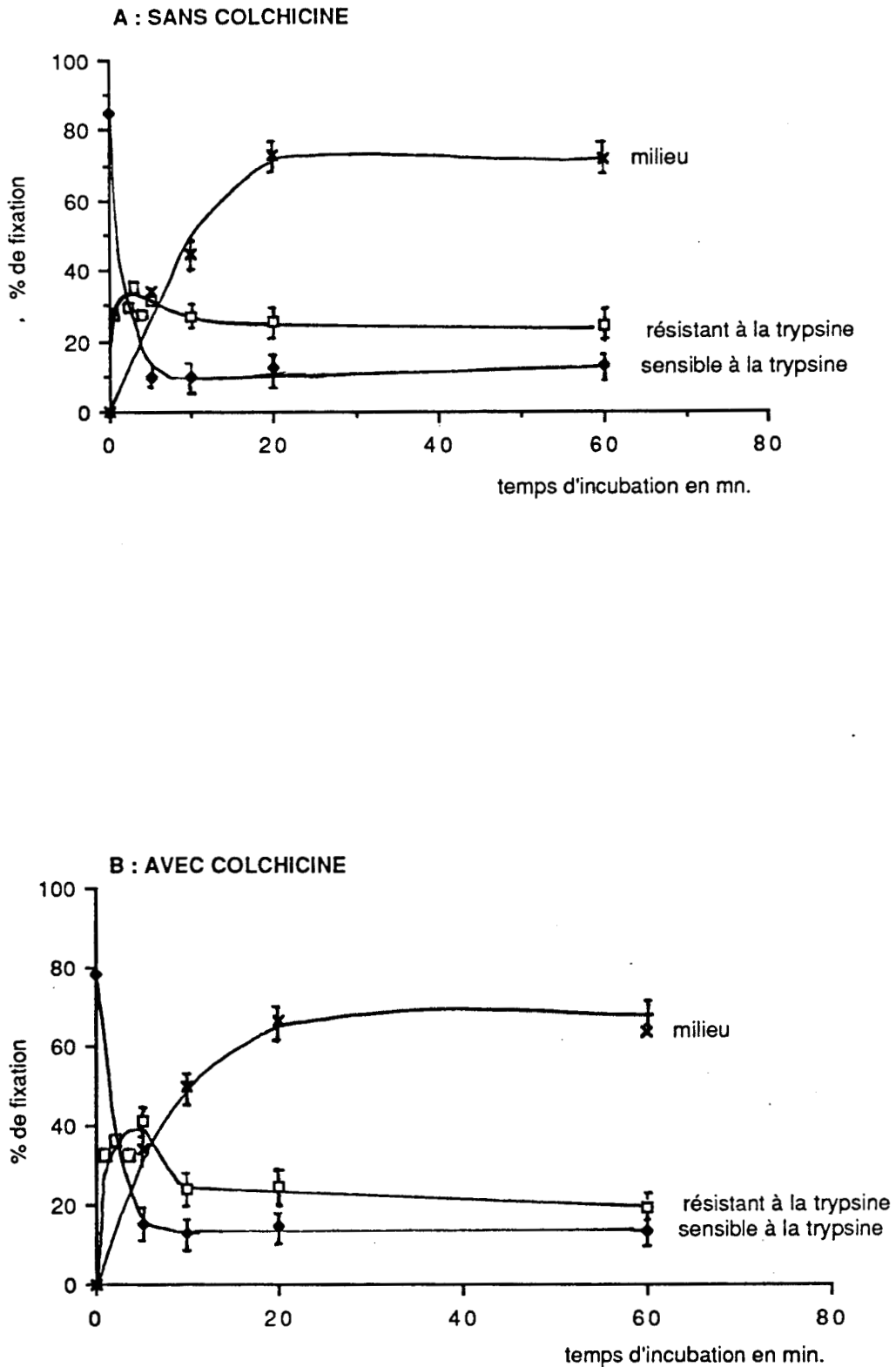
Nous avons pu mettre en évidence une fixation spécifique des HDL₃ sur les cellules de la B.H.E. in vivo et sur cellules endothéliales de capillaires cérébraux.

Les événements qui découlent de la fixation des HDL₃ sur leur site récepteur varient d'un type cellulaire à un autre, et il nous a semblé intéressant de les préciser au niveau de la B.H.E. par une étude des phénomènes d'internalisation et de dégradation.

III.1 ABSENCE D'INTERNALISATION DES HDL₃ PAR LES BBCE

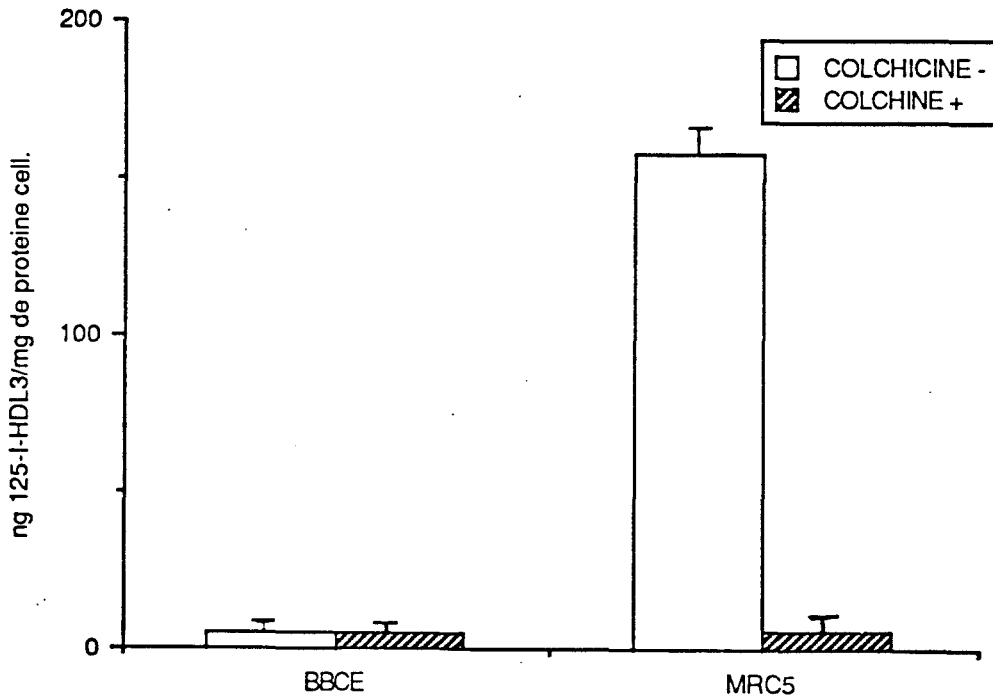
L'internalisation des I¹²⁵-HDL₃ bovines est mesurée sur cultures de BBCE subconfluentes, préincubées 36 heures en DMEM contenant 0,2% de BSA. Les cellules sont incubées deux heures à 4°C en présence de I¹²⁵-HDL₃ (30 µg/ml). Après lavage

FIGURE 38 : MISE EN EVIDENCE D'UNE LIAISON REVERSIBLE DES HDL₃ SUR BBCE.



Après incubation 2 H à 4°C soit en présence de ¹²⁵I-HDL₃ (30 µg/ml) soit en présence de ¹²⁵I-HDL₃ (30 µg/ml) + HDL₃ non marquées (600 µg/ml), les cellules sont lavées et réincubées à 37°C en présence ou non de colchicine à 15µM pendant des durées croissantes. La radioactivité est déterminée dans chacun des trois compartiments selon le protocole décrit fiche technique 30.

FIGURE 39 : INTERNALISATION SPECIFIQUE DES HDL₃ PAR
LES BBCE ET LES MRC5.



30 µg de ¹²⁵-I-HDL₃ en présence ou non de HDL₃ non marquées sont incubées 2 H. à 4°C, après lavage pour enlever l'excès de lipoprotéines non fixées, les cellules sont réincubées à 37°C en milieu (+ ou- colchicine 15 µM). Après trypsination des cellules la radioactivité résiduelle est déterminée et représente la quantité de ¹²⁵-I-HDL₃ internalisée.

les cellules sont replacées à 37°C en présence ou non de colchicine à 15 µM. A intervalle de temps régulier la radioactivité sera mesurée dans trois compartiments : dans le milieu de culture, dans les cellules après trypsination ou dans le surnageant de trypsination (fiche technique 30). La radioactivité du milieu fournit des indications sur les HDL₃ qui quittent leur récepteur et correspond à un index de réversibilité de la fixation. La radioactivité mesurée dans les cellules après traitement à la trypsine (index de trypsine résistance) est due aux HDL₃ internalisées dans la cellule, alors que la radioactivité mesurée dans le surnageant après trypsination des cellules correspond à la rupture du complexe HDL₃-récepteur de surface par protéolyse (index de trypsine sensibilité).

Ces résultats sont reportés figure 38 et représentent l'internalisation spécifique.

La présence ou non de colchicine inhibiteur de cytosquelette dans le milieu d'incubation ne modifie pas les résultats.

Dans les deux cas une grande partie de la radioactivité correspondant aux HDL₃ fixées à 4°C sur les BBCE, est très rapidement relarguée à 37°C dans le milieu de culture. En 20 minutes la majorité des HDL₃ se retrouve dans le milieu indiquant que les HDL₃ se fixent de manière réversible à la surface des BBCE (t 1/2 = 5 min.).

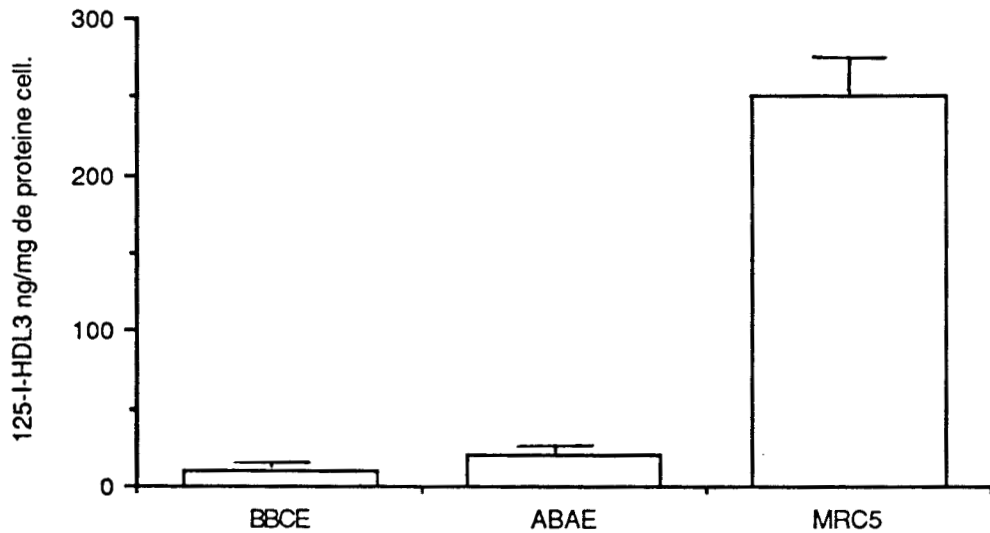
Ce relargage des HDL₃ dans le milieu est associé à une baisse rapide de la radioactivité "trypsine sensible" ; alors que l'index de résistance à la trypsine n'évolue pas.

Aucune internalisation significative des HDL₃ n'est enregistrée dans les BBCE, et la présence de colchicine ne perturbe donc en rien les événements qui se déroulent dans le cadre d'une liaison réversible des HDL₃ à la surface cellulaire.

En manière de preuve nous présentons également figure 39 une étude comparative des phénomènes d'internalisation des HDL₃ par les fibroblastes (endocytose active) et dans les BBCE.

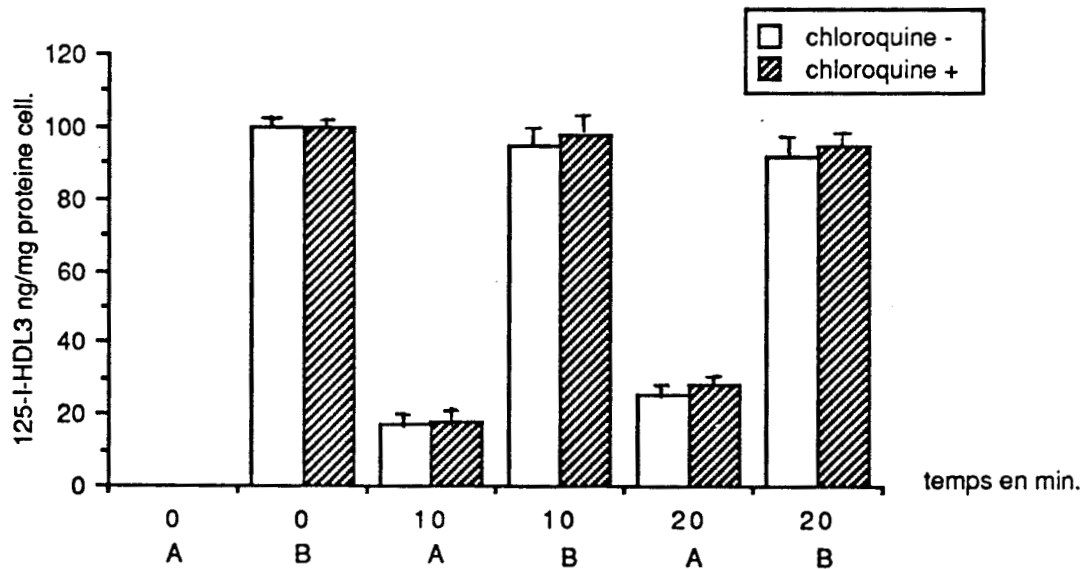
FIGURE 40 : DEGRADATION DES HDL₃ PAR LES BBCE, ABAE ET MRC5.

A : COMPARAISON DU TAUX DE DEGRADATION DES HDL₃ PAR DIFFERENTS TYPES CELLULAIRES.



30 µg de ¹²⁵-I-HDL₃ en présence ou non de HDL₃ non marquées sont incubées 90 mn. à 4°C sur différents types cellulaires, après lavage et incubation à 37°C pendant 90 min. le surnageant est prélevé, la dégradation est évaluée par mesure de la radioactivité non précipitable à l'acide trichloracétique.

B : ACTION DE LA CHLOROQUINE SUR LES PHENOMENES DE DEGRADATION.



30 µg de ¹²⁵-I-HDL₃ en présence ou non de HDL₃ non marquées sont incubées 90 mn à 4°C sur BBCE, après lavage et incubation à 37°C pendant 0, 10 ou 20 min. avec ou sans chloroquine (15 µM), les différentes fractions sont isolées et la radioactivité y est mesurée.

Les fractions A sont le reflet de la dégradation cellulaire des lipoprotéines (milieu non précipitable à l'acide trichloracétique).

Les fractions B sont le reflet de la radioactivité totale relarguée dans le milieu après action de la trypsine à 37°C.

Dans ce cas l'internalisation est mesurée selon la méthode de GOLSTEIN et BROWN, 1974 (fiche technique 30) qui consiste après préincubation des cellules en DMEM contenant 0,2% de BSA à les incuber directement deux heures à 37°C en présence de concentrations croissantes en I¹²⁵-HDL₃. Aucune internalisation spécifique n'est mise en évidence au niveau des BBCE. Ces résultats sont en accord avec le concept de BBCE support de la B.H.E. et siège d'une endocytose restreinte.

Il faut donc concevoir les HDL₃ comme des vecteurs lipidiques dont le mode d'action n'est pas lié à leur internalisation.

III.2 ABSENCE DE DEGRADATION DES HDL₃ PAR LES BBCE

L'absence d'internalisation des HDL₃ par les BBCE a pour corrolaire une absence de dégradation de ces lipoprotéines dans les compartiments lysosomiaux cellulaires.

Nous avons tenu toutefois à vérifier ce phénomène.

Les cultures de BBCE subconfluentes préincubées 36 heures en DMEM contenant 0,2% de BSA sont incubées 90 minutes à 4°C en présence de I¹²⁵-HDL₃ (30 µg/ml). Les cellules sont ensuite lavées six fois et incubées 90 minutes à 37°C. Le surnageant est alors prélevé et la dégradation des I¹²⁵-HDL₃ est évaluée par mesure de la radioactivité non précipitable à l'acide trichloroacétique (fiche technique 30).

Un témoin ABAE et fibroblastes a été utilisé, mais le taux de dégradation des HDL₃ par les BBCE après quatre expériences identiques et triplification des points était si faible (figure 40A) que nous avons modifié notre protocole en utilisant la chloroquine agent inhibiteur des dégradations dans le compartiment lysosomal.

Les BBCE subconfluentes préincubées 36 heures en DMEM contenant 0,2% de BSA sont incubées 90 minutes à 37°C en présence ou non de chloroquine (15 µM), puis en présence de 30 µg/ml/HDL₃ pendant 2 heures à 4°C.

Les cellules sont lavées et réincubées à 37°C en présence (C⁺) ou absence (C⁻) de chloroquine durant 0,10 ou 20 minutes. Les fractions sensibles et résistantes à trypsine ont été également isolées et comptées (figure 40 B). Le

taux de dégradation est une fois encore très faible et nous pouvons constater que la quantité de radioactivité dans la fraction TCA soluble n'est pas diminuée en présence de chloroquine indiquant l'absence de dégradation lysosomale des HDL₃ dans nos cultures de BBCE.

IV - CONCLUSION

Au terme de ce travail nous pouvons dire que pour transférer leurs lipides les HDL₃ se fixent donc spécifiquement et de façon saturable au niveau de la B.H.E.

Cette fixation des HDL₃ est réversible ($t_{1/2} = 5$ min.). Les phénomènes d'internalisation ou de dégradation s'ils existent semblent insignifiants. Ils ne peuvent être considérés comme le mode essentiel d'apport lipidique pour le cerveau. Ces échanges lipidiques entre HDL₃ et BBCE doivent donc se dérouler à la surface cellulaire. Ce mode d'échange est de plus en plus invoqué pour décrire le transfert réverse du cholestérol (BACKORICK et coll., 1987, PITTMAN et coll., 1987, KARLIN et coll., 1987, JOHNSON et coll., 1986, SLOTTE et coll., 1987).

Afin de préciser le rôle des HDL₃ dans les apports lipidiques cérébraux, nous avons étudié un cas particulier de dysfonctionnement des échanges lipidiques au cours de la xanthomatose cérébro-tendineuse.

CHAPITRE IV : DYSFONCTIONNEMENT DES HDL₃ ET XANTHOMATOSE CEREBRO-TENDINEUSE

| | |
|---|-----|
| I - <u>LA XANTHOMATOSE CEREBRO-TENDINEUSE</u> | 125 |
| I.1. Aspects cliniques | 125 |
| I.2. Aspects biochimiques | 127 |
| I.2.1. Les dépôts lipidiques..... | 127 |
| I.2.2. Anomalies plasmatiques | 127 |
| I.2.3. Anomalies biliaires | 127 |
| I.3. Aspects métaboliques | 130 |
| I.4. P.B. : un cas de X.C.T | 130 |
| II - <u>ANALYSE DES LIPOPROTEINES DE P.B.</u> | 132 |
| II.1. Bilan lipidique des lipoprotéines X.C.T | 132 |
| II.2. Bilan protéique des lipoprotéines X.C.T..... | 134 |
| III - <u>INTERACTIONS LDL DE SUJET X.C.T ET CELLULES</u> | 134 |
| III.1. Défaut de fixation à 4°C des LDL-X.C.T | 137 |
| III.2. Défaut d'internalisation et dégradation des LDL-X.C.T | 137 |
| III.3. Défaut d'affinité des LDL-X.C.T pour le récepteur B.E. | 139 |
| III.4. Conclusion | 141 |
| IV - <u>INTERACTIONS HDL₃ DE SUJET X.C.T ET CELLULES</u> | 141 |
| IV.1. Déficit en récepteurs HDL ₃ dans les cellules incubées en LDL-X.C.T | 141 |
| IV.2. Défaut d'affinité des HDL ₃ -X.C.T pour leur récepteur | 145 |
| IV.3. Défaut de transport réverse dans la X.C.T..... | 145 |
| V - <u>CONCLUSION</u> | 146 |

Les lipoprotéines de haute densité assurent le transport réverse du cholestérol des tissus non cérébraux par le biais de sites de fixation autres que le récepteur B.E.

Les arguments en faveur du rôle des lipoprotéines dans la captation cérébrale et la distribution des lipides aux tissus nerveux ne manquent pas.

Nous avons donc tenté d'étudier ces phénomènes in vivo et sur cellules endothéliales de capillaires cérébraux. D'autre part, il nous est apparu intéressant d'aborder ces mécanismes dans la xanthomatose cérébro-tendineuse (ou X.C.T), cas pathologique d'accumulation lipidique au niveau cérébral.

I - LA XANTHOMATOSE CEREBRO-TENDINEUSE

I.1 ASPECTS CLINIQUES

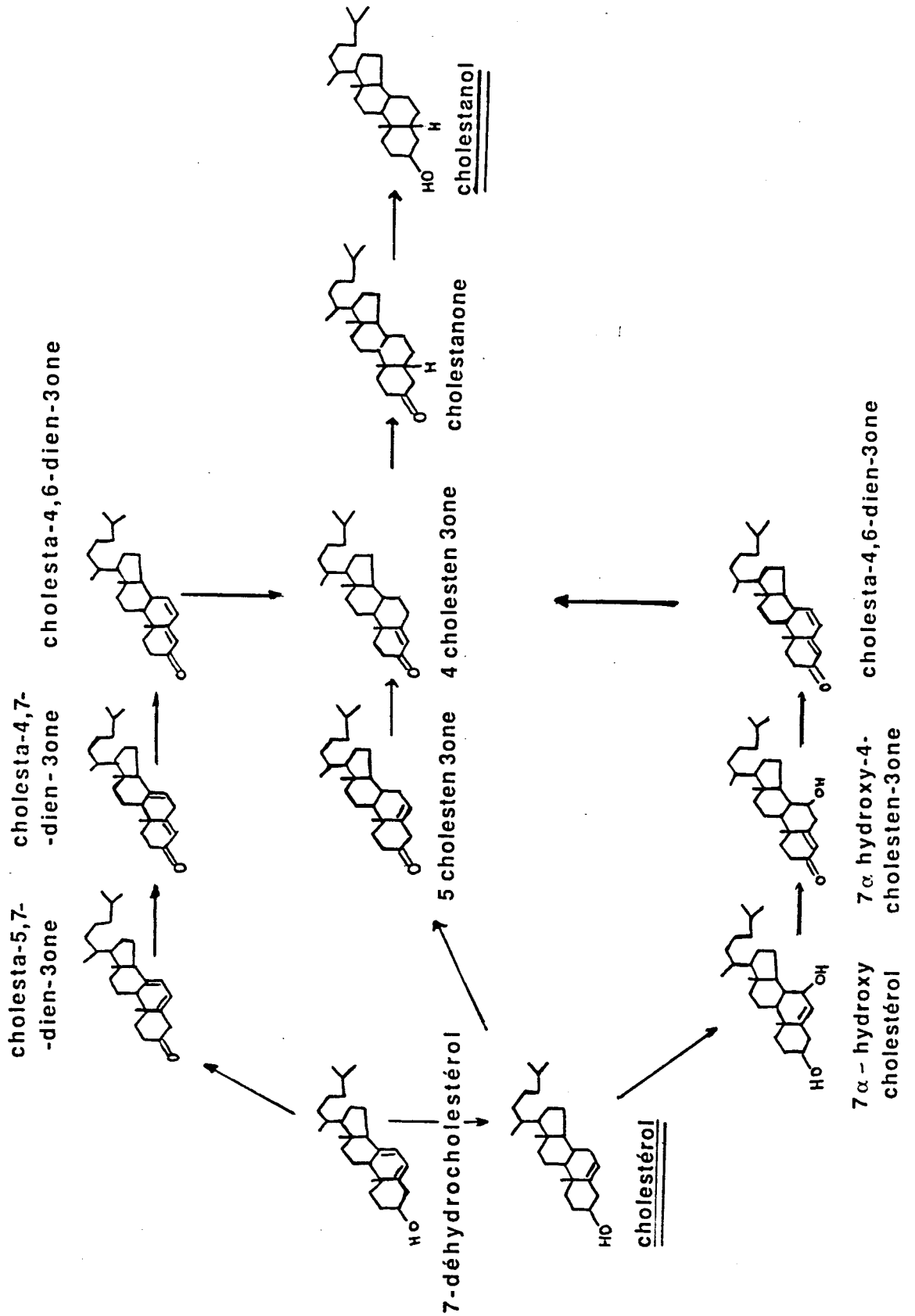
La xanthomatose cérébro-tendineuse (X.C.T) est connue depuis 1936, mais c'est à VAN BOGAERT (1969) que l'on doit la description clinique et neuropathologique de cette affection chez deux cousins germains.

Maladie rare autosomale récessive, elle est caractérisée par des troubles psychiques plus ou moins prononcés dès l'enfance ou l'adolescence, l'apparition d'une cataracte avant l'âge de 30 ans, de xanthes tendineux, d'une ataxie cérébelleuse et de troubles pyramidaux. L'évolution est lente avec détérioration mentale ; la mort est due à des paralysies bulbaires.

Les lésions du système nerveux central consistent en une démyélinisation du cervelet, du tronc cérébral, des faisceaux cortico-pontiques, des cordons postérieurs de la moelle et l'existence de dépôts lipidiques intracellulaires dans des cellules xanthomateuses et des dépôts lipidiques extracellulaires sous forme de cristaux en aiguilles réfringents au niveau principalement du cervelet, du tronc cérébral et du mésencéphale.

Ces dépôts lipidiques sont à l'origine des xanthes tendineux. Il s'en trouve également dans les os et les plèvres.

FIGURE 41 : SYNTHESE DU CHOLESTANOL.



I.2 ASPECTS BIOCHIMIQUES

I.2.1 Les dépôts lipidiques

Ces dépôts qui caractérisent la X.C.T sont constitués de stérols tels que le cholestérol et un de ses dérivés hydrogénés : le 5-alpha-cholestan-3-bêta-ol ou cholestanol (figure 41).

C'est en 1968 que SCHIMSCHOCK et coll. ont mis en évidence un excès de cholestanol dans le système nerveux central. Le cervelet des patients contient une grande quantité de cholestérol estérifié normalement à l'état de traces, du cholestanol libre représentant 20 à 30% des stérols (N = 1 à 3%) et du cholestanol estérifié, 2 à 56% (N = 1 à 10%). Ces mêmes caractéristiques sont retrouvées dans les substances blanches et grises du cerveau.

Les tendons sont également riches en cristaux de cholestérol et de cholestanol, pour ce dernier 50 à 90 fois plus que chez des sujets témoins, mais la plupart des tissus sont atteints (SALEN, 1971).

I.2.2 Anomalies plasmatiques

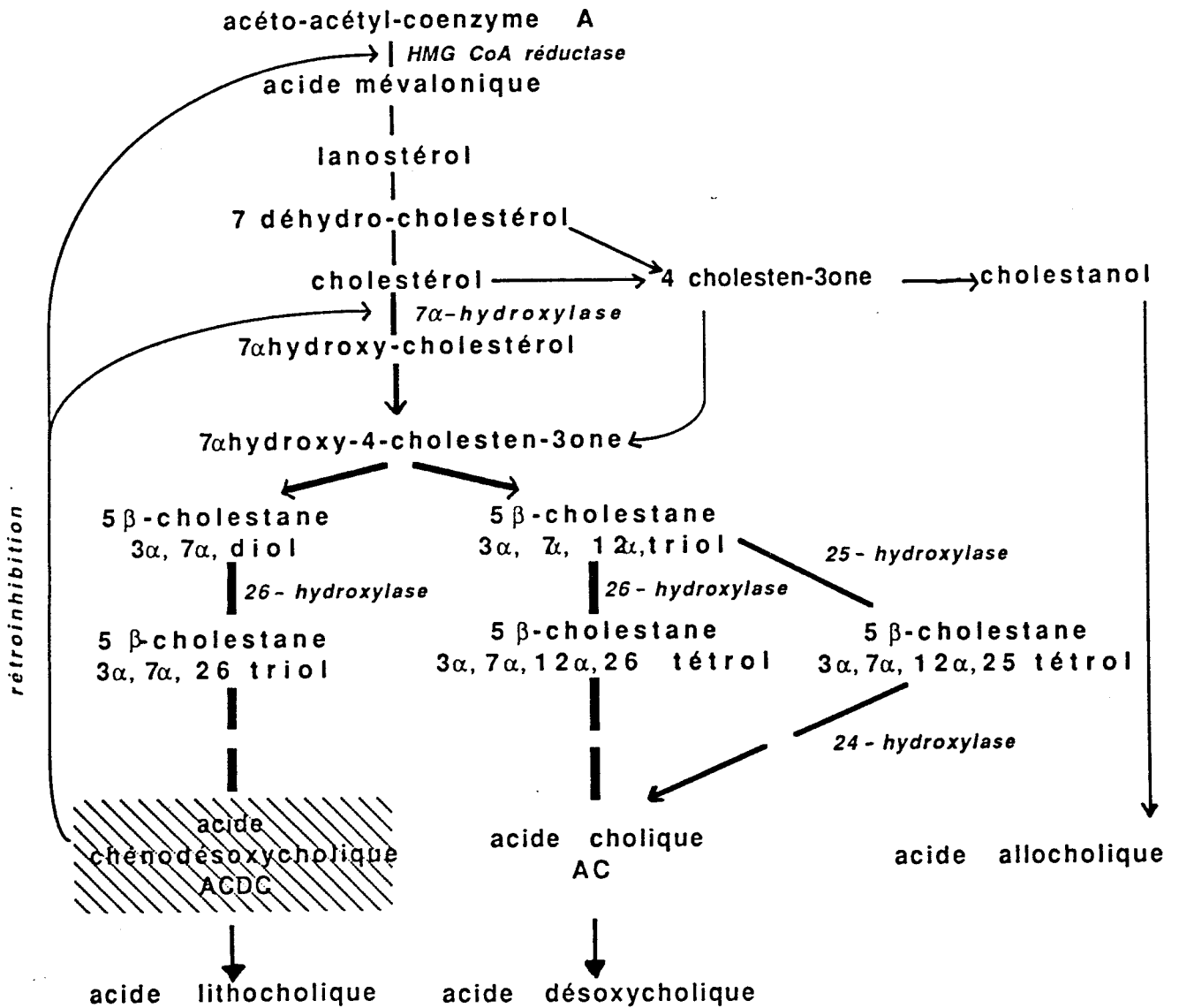
Les sujets atteints de X.C.T ne présentent pas en général d'hypercholestérolémie. Par contre le cholestanol plasmatique est augmenté et le rapport cholestanol/cholestérol plasmatiques peut atteindre plusieurs fois le chiffre normal (N = 1%).

I.2.3 Anomalies biliaires

Les différents travaux de SALEN et coll. en 1971, 1973, 1975 mettent en évidence des anomalies complexes dans la composition de la bile des malades atteints de X.C.T. Ils notent une augmentation relative du cholestanol par rapport au cholestérol de 10 à 40 fois plus qu'à l'état normal. Les précurseurs du cholestérol se trouvent en quantité importante, ils sont les témoins d'une augmentation de la synthèse hépatique du cholestérol. La quantité d'acides biliaires diminue avec très peu d'acide chenodésoxycholique ou A.C.D.C., 3 à 11% contre 77 à 88% d'acide cholique ou A.C.

On note également la présence d'acide allocholique qui est un dérivé du cholestanol ainsi que la présence de certains alcools biliaires tels que

FIGURE 42 : METABOLISME DU CHOLESTEROL.



les tétrols et pentols faiblement dégradés en acide cholique. En effet, les alcools marqués sont retrouvés en quantité anormale dans la bile et les fécès.

I.3 ASPECTS METABOLIQUES

La figure 42 illustre le métabolisme du cholestérol et nous permettra de mieux comprendre le phénomène de la X.C.T. Une fois synthétisés, les acides biliaires et en particulier l'A.C.D.C. exercent un contrôle négatif sur leur propre synthèse en régulant l'activité de deux enzymes clefs :

- l'HMG-CoA réductase.
- la 7-alpha-hydroxylase

Chez les sujets X.C.T (figure 43), il existe un déficit global dans la synthèse des acides biliaires et plus spécifiquement dans celle de l'A.C.D.C. Le rétrocontrôle de synthèse du cholestérol ne se fait plus, et l'accumulation est contrebalancée par une synthèse accrue de cholestanol.

L'A.C.D.C. administré par voie buccale corrige les anomalies biochimiques ainsi l'activité de l'hydroxyméthyl-glutaryl, coenzyme A réductase (HMG-CoA réductase), enzyme hépatique limitant la synthèse du cholestérol, a une activité 4 fois supérieure à la normale dans les cas de X.C.T, et sera diminuée de 50% après sept jours de traitement.

I.4 P.B. : UN CAS DE X.C.T

Nous avons eu l'opportunité d'obtenir un plasma d'un jeune homme né en 1963 (P.B.) atteint de cette maladie et présentant des xanthomes tendineux, et une cataracte bilatérale sans hyperlipidémie dès l'âge de 20 ans. Les lipoprotéines plasmatiques de ce sujet ont été analysées et testées sur différents types cellulaires tels que les cellules cancéreuses de type HeLa, les fibroblastes de type MRC 5 ou les cellules endothéliales de capillaires cérébraux (BBCE).

TABLEAU XVII : BILAN LIPOPROTEINIQUE.

| Protéines g/l | VLDL | IDL | LDL | HDL |
|------------------|-------------|------|-------------|-------------|
| P.B. | 1.07 | 0.56 | 1.72 | 3.05 |
| (1) CTX : hommes | 1.58 ± 0.73 | | 2.10 ± 0.32 | 1.87 ± 0.77 |
| femmes | 1.17 ± 0.36 | | 2.06 ± 0.39 | 2.72 ± 0.68 |
| (2) CTX : homme | 0.93 | 0.49 | 3.29 | >N |
| Normaux : hommes | 1.76 ± 0.65 | | 4.02 ± 0.85 | 2.66 ± 0.73 |
| femmes | 1.14 ± 1.1 | | 3.98 ± 1.00 | 4.08 ± 0.96 |

(1) Salen, 1971

(2) Ballantyne et coll., 1987

TABLEAU XVIII : BILAN LIPIDIQUE.

| | Triglycérides g/l | Cholestérol g/l | Cholestanol/ Cholestérol % | HDL-Cholestérol g/l | Cholestérol Total/ Cholestérol HDL |
|-----------------|----------------------|--------------------|----------------------------------|------------------------|---------------------------------------|
| P.B. | 1.16 | 1.38 | 3.74 | 0.275 | 5.02 |
| (1) CTX : 8 cas | 1.23 ± 0.64 | 1.65 ± 0.25 | 1.75 | 0.14 ± 0.03 | 11.40 |
| (2) CTX : 1 cas | 1.27 ± 0.15 | 1.25 ± 0.7 | 1.24 | 0.57 ± 0.05 | 3.95 |
| Normaux | 1.15 ± 0.33 | 2.30 ± 0.25 | 0.26 | 0.48 ± 0.09 | 4.80 |

(1) Salen, 1971

(2) Ballantyne et coll., 1987

TABLEAU XIX : REPARTITION DU CHOLESTEROL ENTRE LES LIPOPROTEINES.

| | VLDL g/l | LDL g/l | HDL g/l |
|---------|-------------|-------------|-------------|
| Normaux | 0.22 ± 0.01 | 1.42 ± 0.10 | 0.45 ± 0.04 |
| P.B. | 0.130 | 0.98 | 0.28 |
| (1) CTX | | | 0.15 ± 0.08 |
| (2) CTX | 0.20 ± 0.04 | 1.49 ± 0.06 | 0.57 ± 0.05 |

(1) Salen, 1971

(2) Ballantyne et coll., 1987

TABLEAU XX : REPARTITION DU CHOLESTANOL ENTRE LES LIPOPROTEINES

| | CHOLESTANOL/CHOLESTEROL EN % | | | |
|---------|------------------------------|--------|-------|-------|
| | VLDL | LDL | HDL2 | HDL3 |
| Normaux | < 0,2 | < 0,25 | < 0,3 | < 0,3 |
| P.B. | 2,26 | 3,16 | 8,17 | 6,16 |

II - ANALYSE DES LIPOPROTEINES PLASMATIQUES DE P.B.

Les lipoprotéines plasmatiques témoins ou du sujet X.C.T. sont isolées soit par ultracentrifugation séquentielle (fiche technique 1), soit par ultracentrifugation en gradient de densité (fiche technique 1 bis). Les apolipoprotéines sont dosées selon la méthode de type Sandwich : ELISA (fiche technique 4).

Par ailleurs, les taux de cholestérol et de cholestanol sont mesurés par chromatographie gaz-liquide selon la méthode de GAMBERT et coll., 1979 (fiche technique 17). De plus les triglycérides et les phospholipides sont déterminés à l'aide de coffrets réactifs (Boehringer, R.F.A., Biomérieux, France) sur un appareil automatique Hitachi 705.

II.1 BILAN LIPIDIQUE DES LIPOPROTEINES X.C.T

Nous avons exprimé les données concernant notre patient P.B. et nous les avons comparées d'une part à un témoin normal et d'autre part à quelques cas reportés dans la littérature par SALEN (1971) et BALLANTYNE et coll. (1987).

Les résultats sont présentés tableaux XVII, XVIII, XIX et XX.

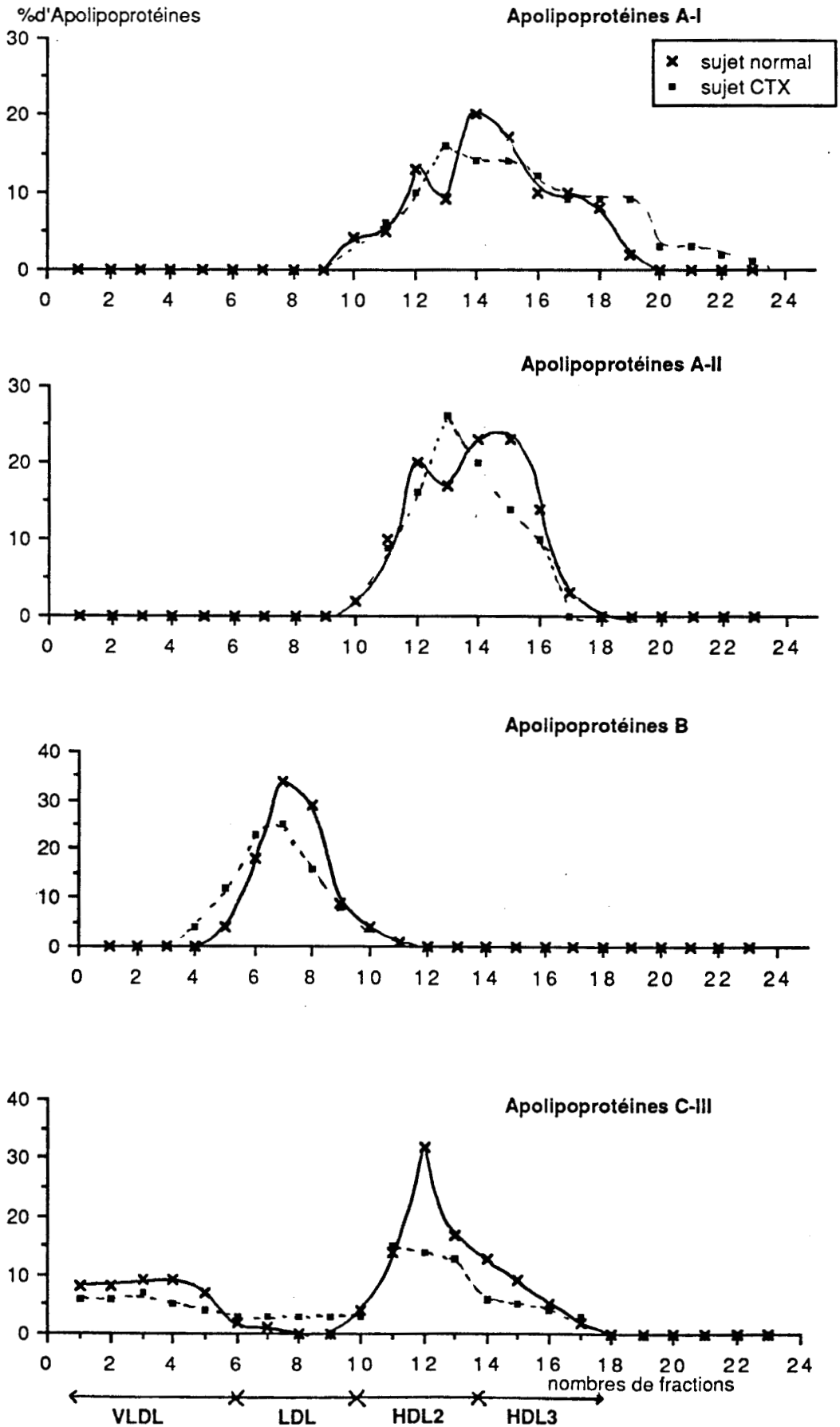
Les taux des lipoprotéines (tableau XVII) des sujets atteints sont sensiblement identiques à ceux des témoins, sauf en ce qui concerne les LDL qui sont toujours inférieures.

Le taux de LDL de P.B. est sensiblement inférieur à celui des cas X.C.T décrits dans la littérature et celui des HDL légèrement modifié.

En ce qui concerne la répartition des lipides circulants, la quantité de triglycérides et de phospholipides des sujets atteints est normale, tandis que la quantité de cholestérol total ou de cholestérol-HDL est nettement diminuée (tableau XVIII).

Le taux élevé de cholestanol/cholestérol ou de cholestérol total/cholestérol-HDL est considérablement élevé dans cette maladie. Le cas de P.B. ne fait pas exception à la règle.

FIGURE 44 : REPARTITION DES APOLIPOPROTEINES DANS LES DIFFERENTES FRACTIONS LIPOPROTEINIQUES.



Le taux de cholestérol dans le cas particulier de P.B. est anormalement bas quelque soit la classe lipoprotéinique considérée (tableau XIX) et constitue un des paradoxes de la X.C.T. Il est associé à un taux anormalement élevé de cholestanol exprimé en pourcentage de cholestanol/cholestérol dans chacune des fractions lipoprotéiniques (tableau XX).

II.2 BILAN PROTEIQUE DES LIPOPROTEINES X.C.T

L'isolement des différentes lipoprotéines est obtenu par ultracentrifugation en gradient de densité (fiche technique 1 bis).

Nous avons comparé notre sujet X.C.T (P.B.) à un sujet normal (figure 44). Les profils de répartitions AI, AII et E ne sont pas significativement modifiés tandis que l'apolipoprotéine B, tout en restant dans les normes de concentration est déplacée légèrement vers les faibles densités, l'apolipoprotéine C III n'est pas déplacée, mais sa concentration est nettement inférieure à la normale.

Les bilans en apolipoprotéines ne semblent donc pas très perturbés, on note toutefois une baisse du taux en apolipoprotéines AI et C III, et une légère augmentation du taux des apo AII. Ainsi, le rapport AI/AII passe de 2,5 à 3,7 dans la xanthomatose, ce qui laisse présager des modifications dans les phénomènes de fixation des HDL et dans les échanges lipidiques qui en découlent.

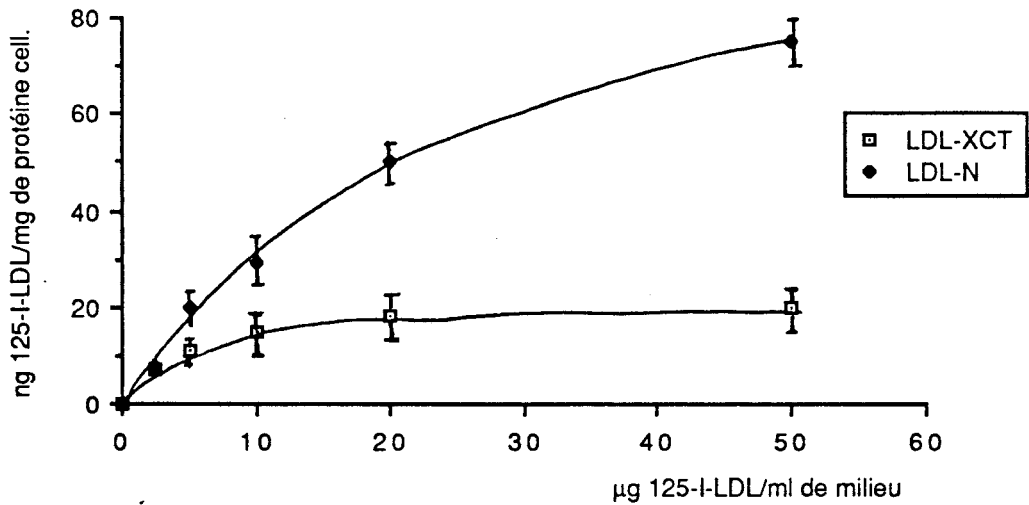
III - INTERACTIONS LDL DE SUJETS X.C.T ET CELLULES

La première hypothèse qui vient à l'esprit pour expliquer l'accumulation et le dépôt de stérols dans la X.C.T. est un dysfonctionnement des LDL qui amène normalement ces stérols aux cellules. Comme le taux des LDL chez les sujets X.C.T est généralement bas et ne peut être responsable de l'accumulation intracellulaire de cholestanol, nous avons analysé les interactions entre les LDL du sujet X.C.T et divers types cellulaires possédant des récepteurs B.E., soit des cellules HeLa, des cellules musculaires MRC 5 ou des cellules de B.H.E. (BBCE).

L'accumulation de stérols intracellulaires dans la X.C.T devait être corrélée à une fixation, une internalisation et une dégradation accrue des LDL véhiculant les stérols.

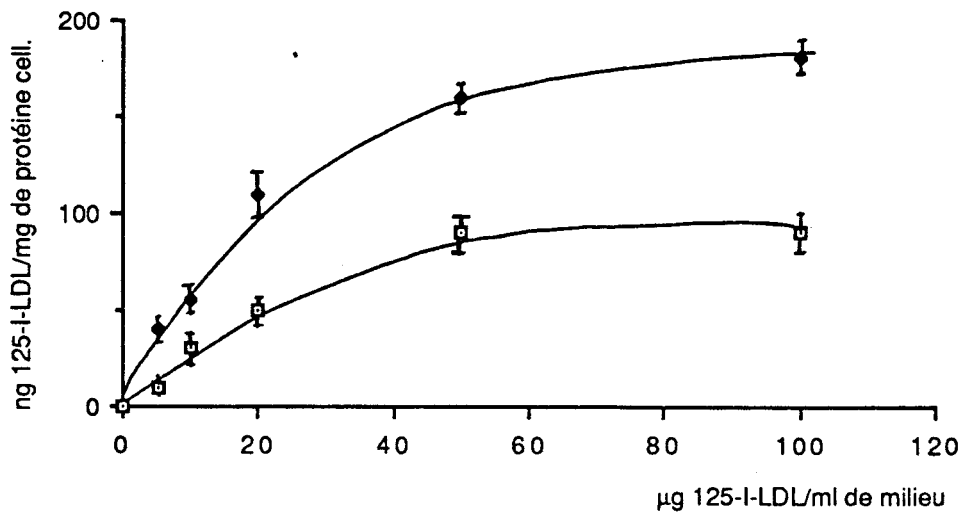
FIGURE 45 : FIXATION SPECIFIQUE DES LDL-N ET LDL-CTX A 4°C.

A : FIXATION SUR CELLULES HeLa.



B max LDL-N : 86 ng ¹²⁵-I- LDLfixées/mg de protéines cellulaires
Kd LDL-N : 20 µg ¹²⁵- I- LDL
B max LDL-XCT : 22 ng ¹²⁵- I LDLfixées/mg de protéines cellulaires
Kd LDL-XCT : 5 µg ¹²⁵-I- LDL

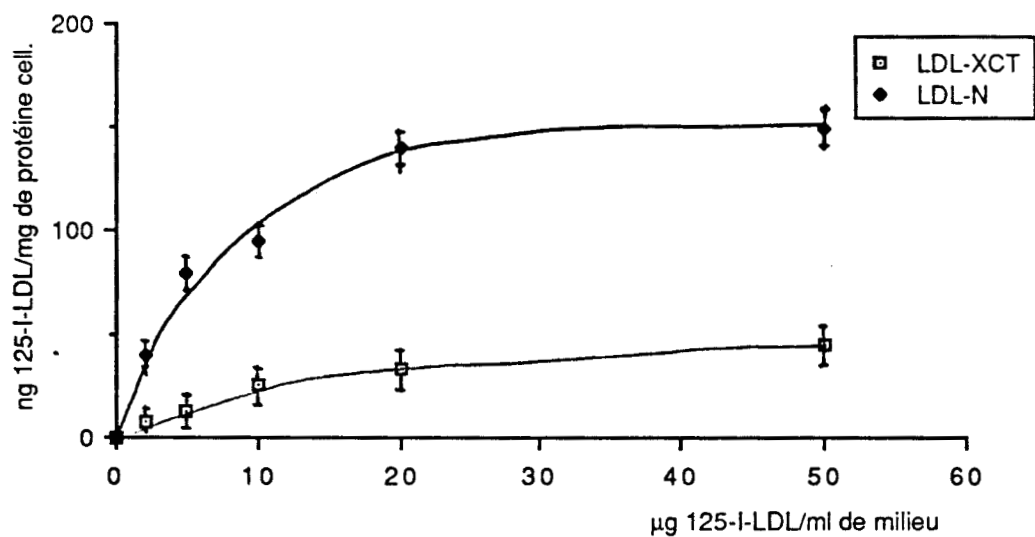
B : FIXATION SUR BBCE.



B max LDL-N : 190 ng ¹²⁵-I- LDL fixées/mg de protéines cellulaires
Kd LDL-N : 18 µg ¹²⁵-I-LDL
B max LDL-XCT : 90 ng ¹²⁵-I-LDL fixées/mg de protéines cellulaires
Kd LDL-XCT : 12 µg ¹²⁵-I-LDL

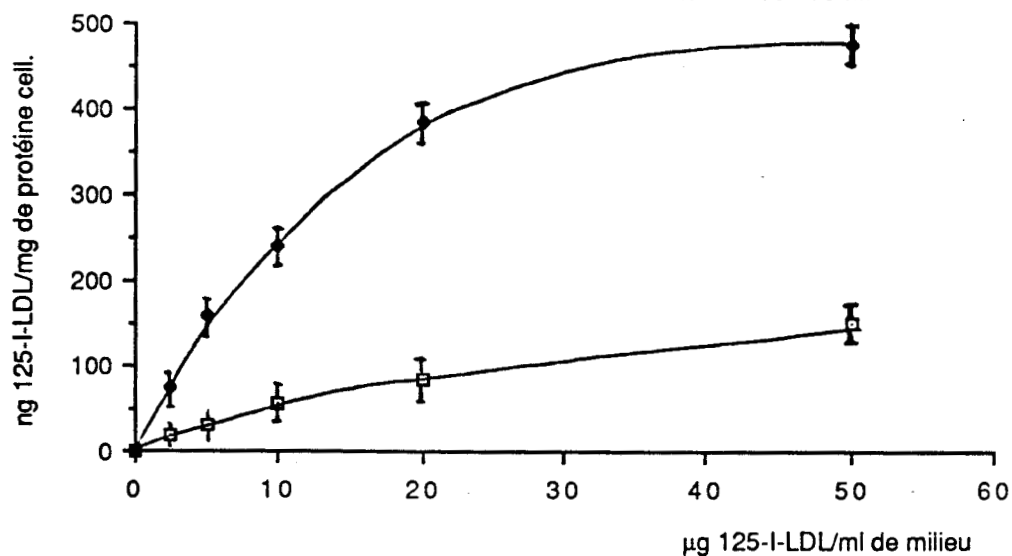
FIGURE 46 : FIXATION ET INTERNALISATION SPECIFIQUE DES LDL-N ET LDL-CTX A 37°C.

A : FIXATION ET INTERNALISATION SUR CELLULES HeLa.



B max LDL-N : 160 ng ¹²⁵-I-LDL fixées/mg de protéines cellulaires
Kd LDL-N : 7 µg ¹²⁵-I-LDL
B max LDL-XCT : 50 ng ¹²⁵-I-LDL fixées/mg de protéines cellulaires
Kd LDL-XCT : 12 µg ¹²⁵-I-LDL

B : FIXATION ET INTERNALISATION SUR CELLULES MRC5



B max LDL-N : 480 ng ¹²⁵-I-LDL fixées/mg de protéines cellulaires
Kd LDL-N : 10 µg ¹²⁵-I-LDL
B max LDL-XCT : 170 ng ¹²⁵-I-LDL fixées/mg de protéines cellulaires
Kd LDL-XCT : 15 µg ¹²⁵-I-LDL

Ces études d'interaction ont été réalisées sur BBCE subconfluentes entre leur 3ème et leur 6ème passage. Les cellules HeLa et les MRC 5 sont utilisées à confluence, car à ce stade elles expriment mieux leur récepteur.

Chaque étude a été réalisée deux fois et chaque point en triple. Toutes les manipulations n'ont pu être effectuées sur les trois types cellulaires, car nous n'avons disposé que d'une seule plasmaphérèse avant traitement. Chaque point représente la moyenne des résultats trouvés. Les écarts types ne sont pas représentés s'ils représentent moins de 5% d'erreur.

III.1 DEF AUT DE FIXATION A 4°C DES LDL X.C.T.

Après 48 heures en milieu DMEM contenant 5% de LPDS, les cellules sont incubées 3 h à 4°C pour les cellules HeLa et 2 h à 4°C pour les BBCE, en présence de concentrations croissantes de I^{125} -LDL ou de I^{125} -LDL-X.C.T. La fixation non spécifique est déterminée par l'addition d'un large excès de LDL non marquées (fiche technique 30).

Quelque soit le type cellulaire, les LDL-N ou LDL-X.C.T se fixent spécifiquement et de façon saturable (figure 45 A et B).

Toutefois la fixation des LDL-X.C.T. est nettement diminuée par rapport à celle des LDL de sujets normaux. Ceci se traduit par une diminution de l'affinité (Kd élevé) et de la valeur du B max sur BBCE ou sur cellules HeLa.

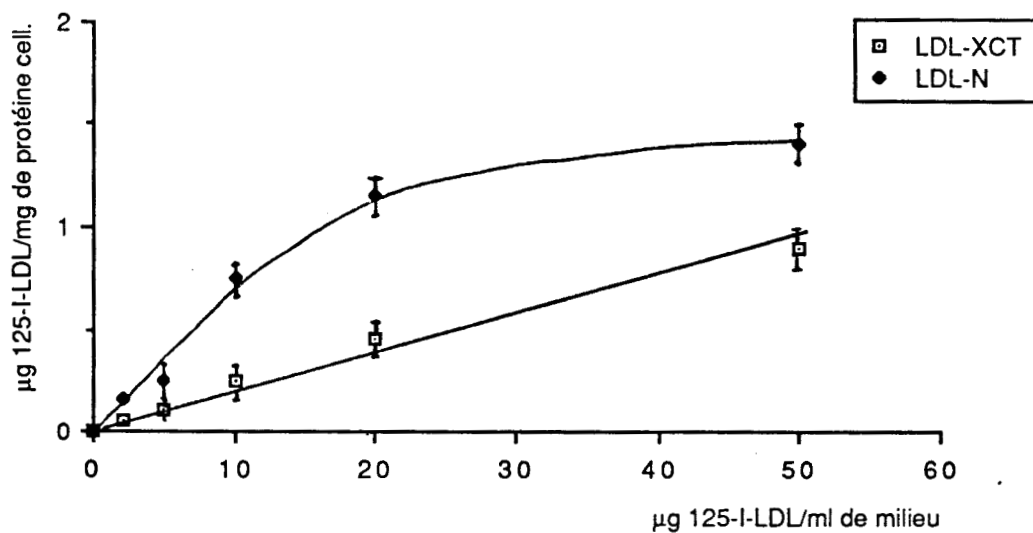
III.2 DEF AUT D'INTERNALISATION ET DEGRADATION DES LDL-X.C.T.

Après 48 heures en milieu DMEM contenant 5% de LPDS, les cellules sont incubées 3 h à 37°C en présence de concentrations croissantes de I^{125} -LDL ou de I^{125} -LDL-X.C.T. Après lavage la radioactivité mesurée sur les cellules intactes correspond aux LDL fixées et internalisées. Le surnageant après lavage est également prélevé et la dégradation des LDL est évaluée par mesure de la radioactivité non précipitable à l'acide trichloracétique (fiche technique 30).

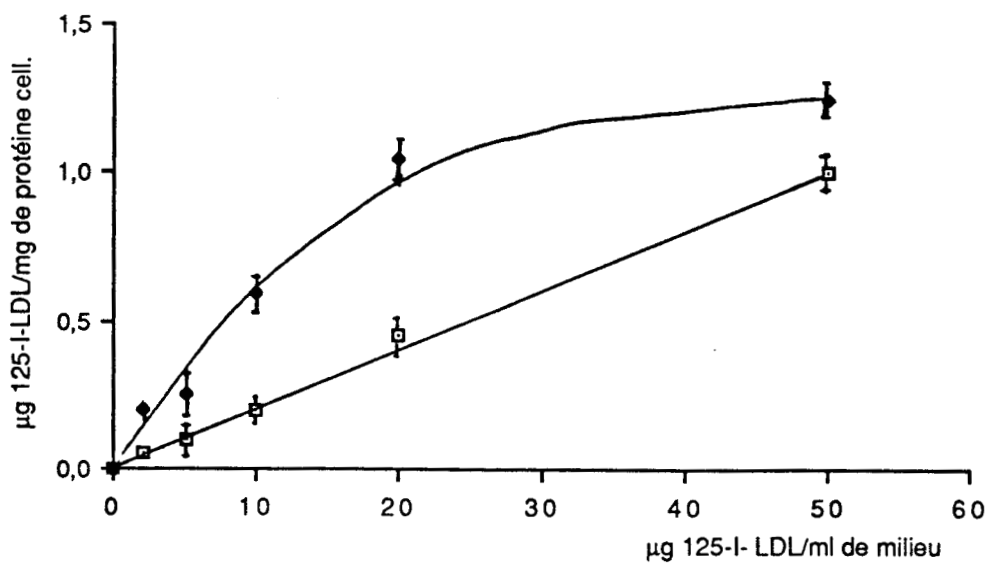
Tant pour les cellules HeLa que pour les MRC 5, les LDL-N ou LDL-X.C.T se fixent spécifiquement et de façon saturable à 37°C (figure 46 A et B).

FIGURE 47 : DEGRADATION SPECIFIQUE DES LDL-N ET LDL-XCT.

A : DEGRADATION SUR CELLULES HeLa.



B : DEGRADATION SUR LES CELLULES MRC5



| | B max | Kd |
|---------------------------|--|-----------------------------------|
| | ng LDL radiomarquées fixées et internalisées/mg protéine | ug LDL radiomarquées/ml de milieu |
| cellules HeLa | | |
| LDL-N | 160 | 7 |
| LDL-XCT | 50 | 12 |
| Cellules MRC ₅ | | |
| LDL-N | 480 | 10 |
| LDL-XCT | 170 | 15 |

Nous constatons que les LDL-X.C.T se fixent nettement moins sur les sites de liaisons cellulaire en relation avec une diminution du B max ou de l'affinité.

Les profils de dégradation des LDL sur cellules HeLa ou MRC 5 sont sensiblement identiques (figure 47 A et B). La dégradation des LDL-N par les cellules HeLa et MRC 5 est spécifique et saturable, leurs valeurs maximales sont respectivement de 1,45 et de 1,25 µg de LDL radioactives dégradées par mg de protéines cellulaires.

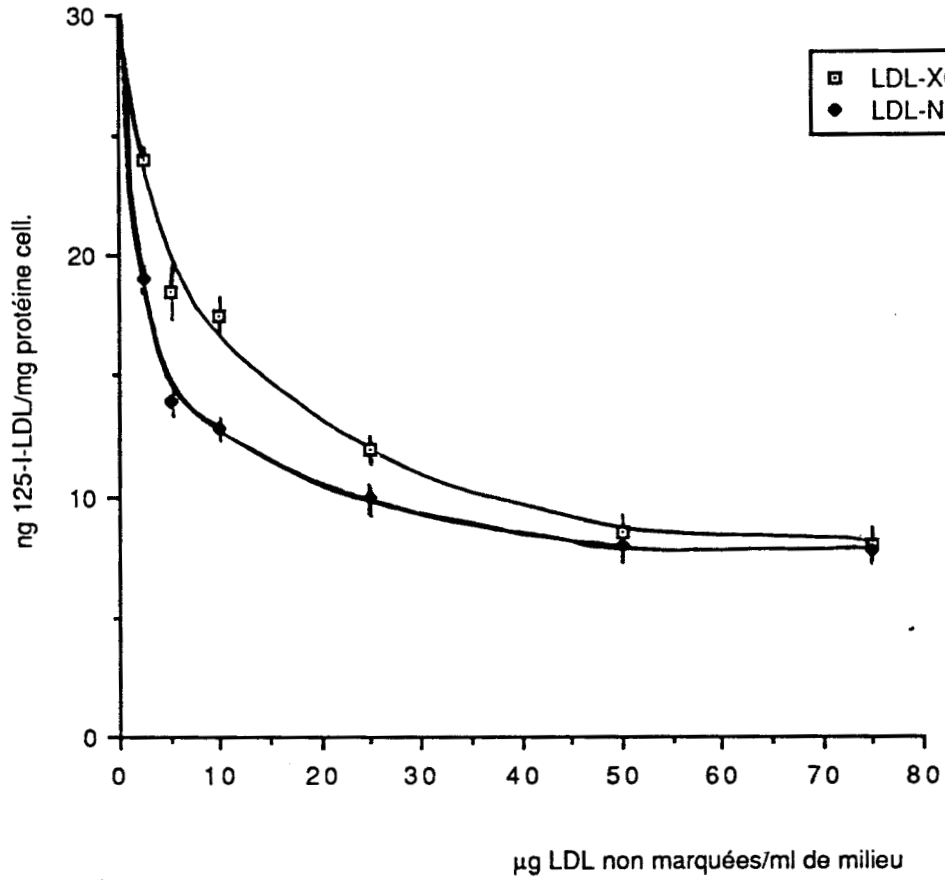
Par contre la dégradation des LDL-X.C.T est nettement inférieure et n'est pas saturable jusqu'à 50 µg LDL-X.C.T /ml de milieu.

III.3 DEFAUT D'AFFINITE DES LDL-X.C.T POUR LE RECEPTEUR B.E.

Afin d'expliquer les défauts de fixation, internalisation et dégradation des LDL-X.C.T au niveau cellulaire, nous avons réalisé des expériences d'inhibition compétitive de la fixation des LDL par les LDL-X.C.T. sur cellules HeLa.

Les cellules HeLa sont incubées 3 h à 4°C avec 10 µg/ml de LDL-N radiomarquées et en présence de concentrations croissantes en LDL ou de LDL-X.C.T non marquées (figure 48).

FIGURE 48 : INHIBITION COMPETITIVE DE LA FIXATION DES LDL-N PAR LES LDL-N ET LES LDL-XCT SUR CELLULES HeLa à 4°C.



Les cellules sont incubées 3 H. à 4°C en présence de 10 µg de ¹²⁵I-LDL-N ainsi qu'en présence de quantités croissantes de LDL-N ou LDL-XCT non marquées.

Nous observons une compétition entre les LDL radiomarquées ou non. La concentration en LDL-N non radioactives provoquant 50% d'inhibition de la fixation des I^{125} -LDL est de 3 μg des LDL-N/ml de milieu.

La même inhibition est obtenue avec 9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de LDL-X.C.T non marquées. Ces résultats indiquent donc clairement que les LDL de sujet X.C.T ont moins d'affinité pour le récepteur B.E. des LDL, et confirment la baisse du Kd enregistrée dans les études précédentes de fixation.

III.4 CONCLUSION

Le faible taux de LDL circulantes associé à une perte d'affinité de ces LDL-X.C.T pour le récepteur B.E. qui conditionne l'efficacité de leur fixation, de leur internalisation et de leur dégradation ne peut être responsable de l'accumulation intracellulaire des stérols dans la xanthomatose cérébro-tendineuse. Nous avons donc recherché un déficit dans le transport réverse des stérols.

IV - INTERACTIONS HDL₃ DE SUJETS X.C.T ET CELLULES

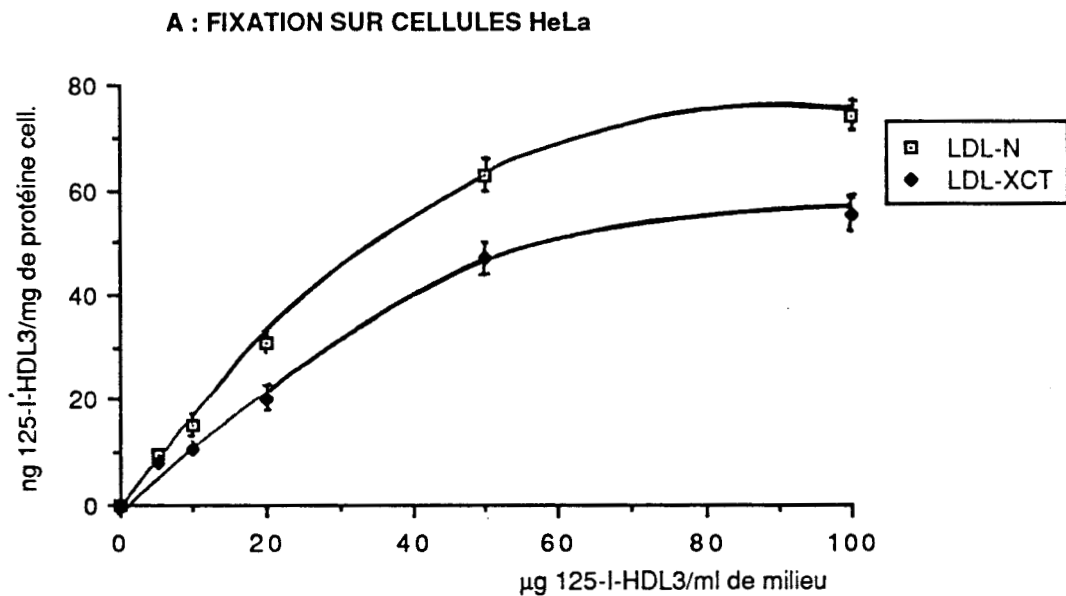
La seconde hypothèse permettant d'expliquer l'accumulation de stérols concerne un éventuel défaut dans le transport réverse du cholestérol qui assure l'élimination du cholestérol des tissus périphériques et son retour vers le foie, lieu de son catabolisme.

Si le taux des HDL₃ des sujets X.C.T est normal ou subnormal, la composition en apoprotéine et en particulier le rapport apoprotéine AI/AII perturbé laisse présager des perturbations d'une part dans la fixation des HDL₃ et dans les échanges lipidiques.

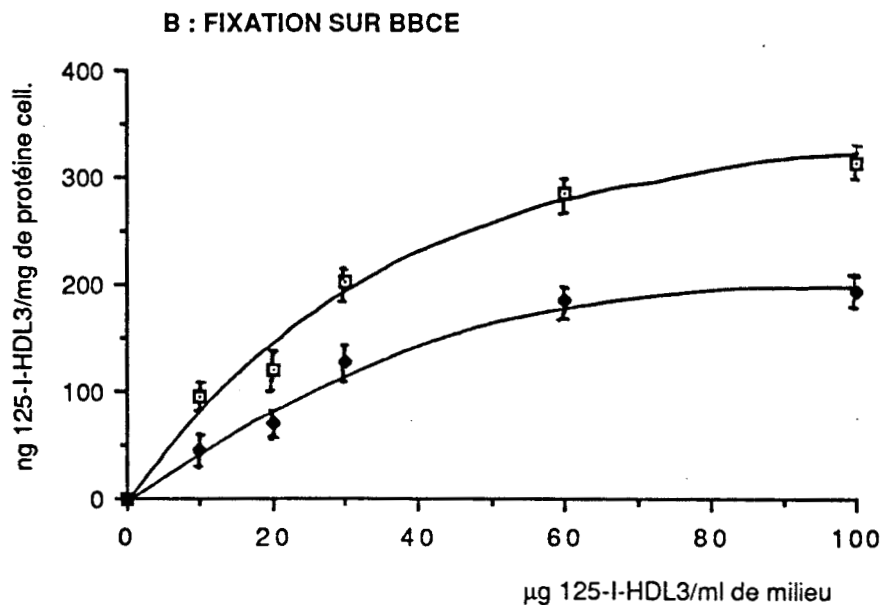
IV.1 DEFICIT EN RECEPTEURS HDL₃ DANS LES CELLULES INCUBEES EN LDL-X.C.T

Dans cette étude de fixation à 4°C, nous n'avons utilisé que des HDL ne contenant pas d'apolipoprotéine E afin d'éliminer toutes interactions avec le récepteur B.E. des LDL. Les HDL₃-N ou HDL₃-X.C.T sont purifiées par chromatographie d'affinité sur des colonnes contenant un anticorps anti-apo E permettant ainsi l'élimination de toute l'apolipoprotéine E normalement à l'état de traces dans les fractions de HDL₃ (fiche technique 8).

FIGURE 49 : FIXATION SPECIFIQUE A 4°C DES HDL₃-N SUR CELLULES PREINCUBEES SOIT EN PRESENCE DE LDL-N OU LDL-XCT.



Préincubation pendant 48 H. à 37°C en présence de DMEM+LDL-N (100 µg/ml de milieu) ou LDL-XCT (100 µg/ml de milieu).



Préincubation pendant 36 H. à 37°C en présence de DMEM+ LDL-N (50 µg /ml de milieu) ou LDL-XCT (50 µg /ml de milieu).

Après 48 h en milieu DMEM contenant 100 µg de LDL ou de LDL-X.C.T., les cellules HeLa sont incubées 3 h à 37°C en présence de concentrations croissantes de HDL₃ de sujets normaux. L'étude de la fixation est réalisée selon le protocole décrit fiche technique 30.

En ce qui concerne les BBCE, la pré-incubation se fait en DMEM et 50 µg de LDL-X.C.T, et l'incubation en présence d'HDL₃ ne dure que 2 heures.

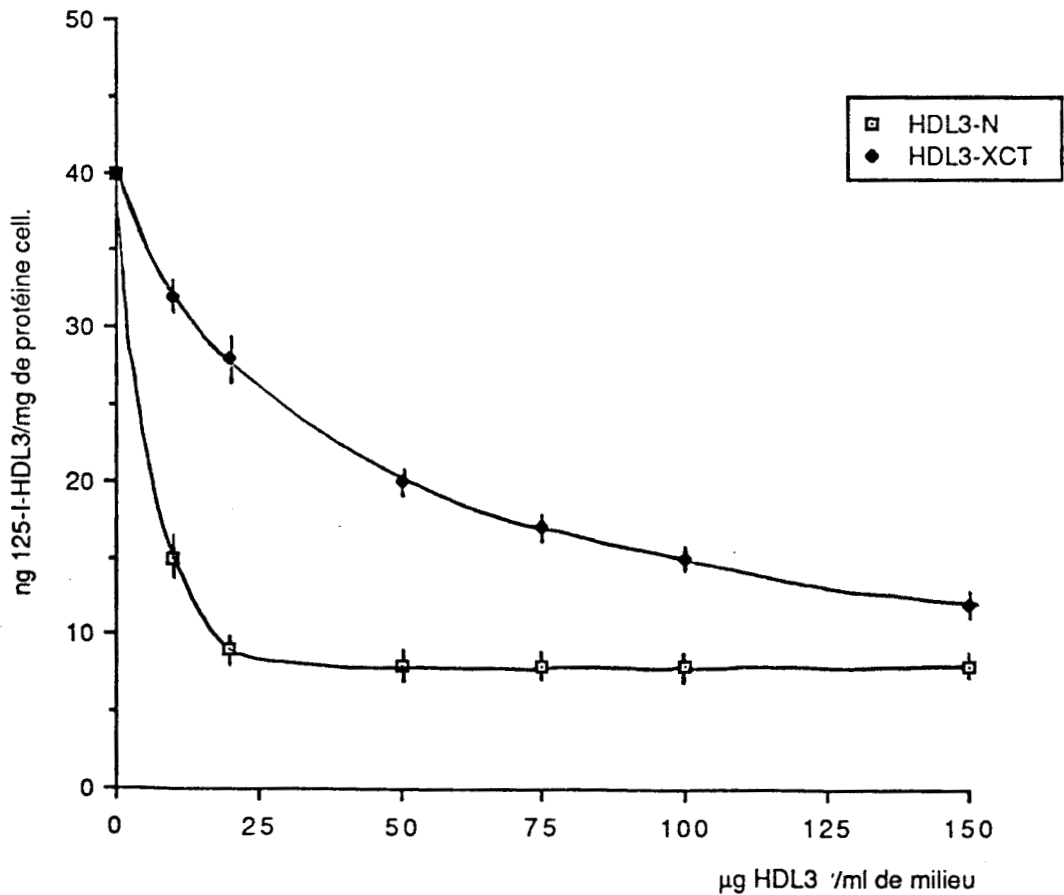
Les résultats sont présentés figure 49 A et B.

D'une manière générale, quelque soit le type cellulaire, la fixation des HDL₃ de sujet normal est supérieure lorsque la pré-incubation se fait en présence de LDL-N. Lorsqu'elle s'effectue en présence de LDL-X.C.T, la fixation des HDL₃ normales est diminuée, comme en témoignent les valeurs de B max et de Kd.

| | B max | Kd |
|---------------|---|---|
| | ng I ¹²⁵ /HDL ₃ /mg protéines cellulaires | ug I ¹²⁵ -HDL ₃ /ml |
| Cellules HeLa | | |
| LDL-N | 74 | 22-23 |
| LDL-X.C.T | 55 | 25-26 |
| BBCE | | |
| LDL-N | 310 | 20-22 |
| LDL-X.C.T | 200 | 24-25 |

Les résultats indiquent que l'expression du nombre de récepteurs pour les HDL₃ est diminuée par la pré-incubation des cellules avec les LDL-X.C.T. Les LDL-X.C.T régulent moins efficacement l'expression des récepteurs HDL ce qui entraîne des problèmes d'épuration du cholestérol et peut être une explication au stockage du cholestanol intracellulaire.

FIGURE 50 : INHIBITION COMPETITIVE DE LA FIXATION DES HDL₃-N RADIOMARQUEES PAR LES HDL₃-N ET LES HDL₃-XCT NON MARQUEES SUR CELLULES HeLa.



20 µg de ¹²⁵I-HDL₃ sont fixés 3 H. à 4°C sur cellules HeLa et entrent en compétition avec des quantités croissantes de HDL₃-N ou HDL₃-XCT non marquées.

IV.2 DEFAUT D'AFFINITE DES HDL₃-X.C.T POUR LEUR RECEPTEUR

Cette perte d'affinité des HDL₃-X.C.T a été mise en évidence par des études d'inhibition compétitive de la fixation des I¹²⁵-HDL₃ par des HDL₃ froides de sujets normaux ou atteints de X.C.T. Cette étude a été réalisée sur cellules HeLa (figure 50).

Les cellules HeLa sont incubées 3 h à 4°C en présence de 20 µg/ml de HDL₃-N radiomarquées et en présence de concentrations croissantes en HDL₃-N ou de HDL₃-X.C.T non marquées.

La concentration en HDL₃-N non marquées pour laquelle nous obtenons 50% d'inhibition est de 10 µg/ml tandis que la concentration en HDL₃-X.C.T pour laquelle nous obtenons le même taux d'inhibition est de 75 µg/ml soit 7 fois plus environ.

Ces résultats indiquent donc que les HDL₃ de sujets X.C.T ont moins d'affinité pour leur récepteur comparativement à leurs homologues de sujets sains, sans doute en raison des modifications du rapport entre les apolipoprotéines AI et AII.

IV.3 DEFAUT DE TRANSPORT REVERSE DANS LA X.C.T

Il semble donc que les cellules périphériques de sujet X.C.T soient mal adaptées au transport réverse du cholestérol et du cholestanol. En effet, elles expriment peu de récepteurs pour les HDL₃ et les HDL₃-X.C.T ont peu d'affinité pour le peu de récepteurs présents.

V - CONCLUSION

L'étude des interactions entre LDL-X.C.T et cellules des tissus périphériques a mis en évidence une nette diminution de la fixation de ces lipoprotéines sur leurs récepteurs membranaires en relation avec une perte d'affinité. La dégradation intracellulaire des LDL-X.C.T au niveau des lysosomes est également fortement diminuée. De plus les LDL-X.C.T contrôlent moins efficacement l'expression des récepteurs aux HDL responsables du transport réverse du cholestanol.

Ces résultats indiquent clairement que les dépôts intracellulaires de cholestanol des sujets X.C.T ne peuvent s'expliquer par une captation et dégradation accrues des LDL amenant les stérols aux cellules.

Il semble qu'une diminution de l'efflux de stérols en réponse aux anomalies structurales des HDL-X.C.T et à la dysrégulation du nombre de leurs récepteurs par les LDL-X.C.T soit à l'origine de ces accumulations.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'augmentation du nombre des arguments en faveur d'échanges lipidiques entre le sang et le cerveau a peu à peu modifié le concept d'autonomie du système nerveux central ainsi que celui de son isolement par la B.H.E. Cependant les modalités de ces échanges sont encore inconnues. L'objectif de ce travail était d'étudier le rôle des lipoprotéines lors des transferts lipidiques entre le sang et le cerveau.

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux lipoprotéines de haute densité (HDL) qui assurent d'une manière générale le transport réverse du cholestérol des tissus périphériques vers le foie. Les interactions entre ces HDL₃ et les divers types cellulaires impliquent des récepteurs qui reconnaissent leurs apolipoprotéines AI et AII. D'autre part ces HDL se distinguent des autres lipoprotéines par leur richesse en phospholipides très insaturés.

Dans un premier temps l'utilisation d'une sonde lipidique fluorescente nous a permis de mettre en évidence le rôle des HDL₃ dans l'approvisionnement lipidique cérébral.

L'index de captation cérébrale varie en fonction de l'âge de l'animal et augmente en période de myélinisation. L'intensité des échanges lipidiques entre HDL₃ et cerveau n'est pas proportionnelle à la quantité de lipides véhiculés par les lipoprotéines. Un phénomène de saturation semble indiquer qu'une interaction spécifique des HDL₃ avec les cellules de la B.H.E. soit indispensable dans les mécanismes d'échanges. De plus l'absence de phénomènes d'endocytose par récepteurs définit également ces échanges puisque la partie protéique de la lipoprotéine ne pénètre pas dans le cerveau.

Une notion d'interaction spécifique entre HDL₃ et cellules de la B.H.E. semblait donc se dégager. Elle s'est confirmée par une étude sur les cellules endothéliales de capillaires cérébraux en culture. Ces cellules fixent de façon spécifique et saturable les HDL₃ sur des sites reconnaissant l'apolipoprotéine AI ou AII. Elles ne sont capables ni d'internaliser ni de dégrader les HDL dans un compartiment lysosomal.

La réalité de ces interactions spécifiques entre HDL₃ et cellules cérébrales a également été prouvée par l'étude d'un cas de dysfonctionnement des échanges lipidiques entre sang et cerveau au cours de la xanthomatose cérébro-tendineuse (X.C.T).

Les anomalies de la composition des HDL₃ du sujet X.C.T tant au niveau des apolipoprotéines que des lipides, entraînent un défaut de fixation de ces lipoprotéines anormales sur les membranes de cellules de la B.H.E. Cette perte d'affinité des HDL₃ par leur récepteur, associée à un déficit en récepteurs perturbe le mouvement d'efflux des stéroïls du cerveau vers le sang. Les stéroïls s'accumulent peu à peu dans le parenchyme cérébral et provoquent l'apparition de dépôts lipidiques caractéristiques de cette maladie.

Ainsi les échanges lipidiques entre HDL et cellules ne reposent pas sur les phénomènes d'endocytose par récepteur et d'hétérophagie qui caractérisent le transfert du cholestérol des lipoprotéines de basse densité (LDL) aux cellules des tissus périphériques par l'intermédiaire du récepteur B.E. Le modèle le plus adapté suppose des échanges directs entre les HDL et les membranes plasmiques.

Lors de la validation de notre vecteur lipidique, nous avons pu mettre en évidence des échanges lipidiques entre les HDL₃ portant la sonde fluorescente et la membrane plasmique de plaquette. La majorité de la sonde fluorescente quittait la lipoprotéine pour s'insérer dans la bicouche membranaire, constituant un pool lipidique échangeable avec des accepteurs lipidiques du milieu extracellulaire. Au fur et à mesure que la phosphatidylcholine fluorescente (NBD-PC) était progressivement dégradée en diacyl-glycérol fluorescent (NBD-DAG), la sonde devenait de moins en moins rétrocédable au milieu extracellulaire, traduisant un phénomène de migration du NBD-DAG du feuillet membranaire le plus externe vers le feuillet le plus interne. Cette dégradation de la phosphatidylcholine semble impliquer l'activation de phospholipases C intramembranaires en réponse à la fixation des HDL₃ sur leurs sites récepteurs. Ces phospholipases C existent bel et bien dans la plaquette (BESTERMAN et coll., 1988, ZUCKER et NACHMIAS, 1985), et leur activation pourrait résulter du couplage avec un récepteur ou un canal ionique par l'intermédiaire des protéines G (MICHELL et KIRK, 1986). Le diacyl-glycérol produit pourrait alors jouer le rôle de second messager et activer diverses protéines kinases (NISHIZUKA, 1986).

Il a été démontré au laboratoire que la fixation des HDL₃ sur les plaquettes activait les phospholipases C et A₂ membranaires, suggérant ainsi que les HDL doivent être considérées autrement que comme de simples vecteurs de lipides.

Notre hypothèse de travail concernant les phénomènes impliqués dans la captation des acides gras polyinsaturés fait une large place aux phénomènes métaboliques déclenchés par l'occupation du récepteur HDL₃.

La source d'AGPI serait la phosphatidyléthanolamine (PE) qui représente au niveau des HDL₃ la classe la plus insaturée de phospholipides. Des études préliminaires nous ont montré que la PE des HDL₃ s'intégrait très facilement dans les membranes plasmiques, mais qu'elle n'était pas dégradée comme la PC en diacyl-glycérol.

La PE par méthylation séquentielle donne naissance à des dérivés mono, di et tri- méthylés de la PE, ce dernier étant la PC. Cette voie métabolique qui convertit la PE en PC est catalysée par la phosphatidyléthanolamine N-méthyltransférase (EC 2.1.1.17) dont la présence au niveau cérébral est largement prouvée (BLUSZTAIN et WURTMAN, 1981). La PC ainsi formée par méthylation séquentielle de la PE se caractérise par un taux très élevé d'AGPI : 43,4% contre 4,6% dans la PC synthétisée par condensation du diacyl-glycérol et de la CDP-choline ou par échange de base entre les divers phospholipides (TACCONI et WURTMAN, 1985). Cette PC très insaturée constitue probablement un pool distinct aux fonctions physiologiques particulières.

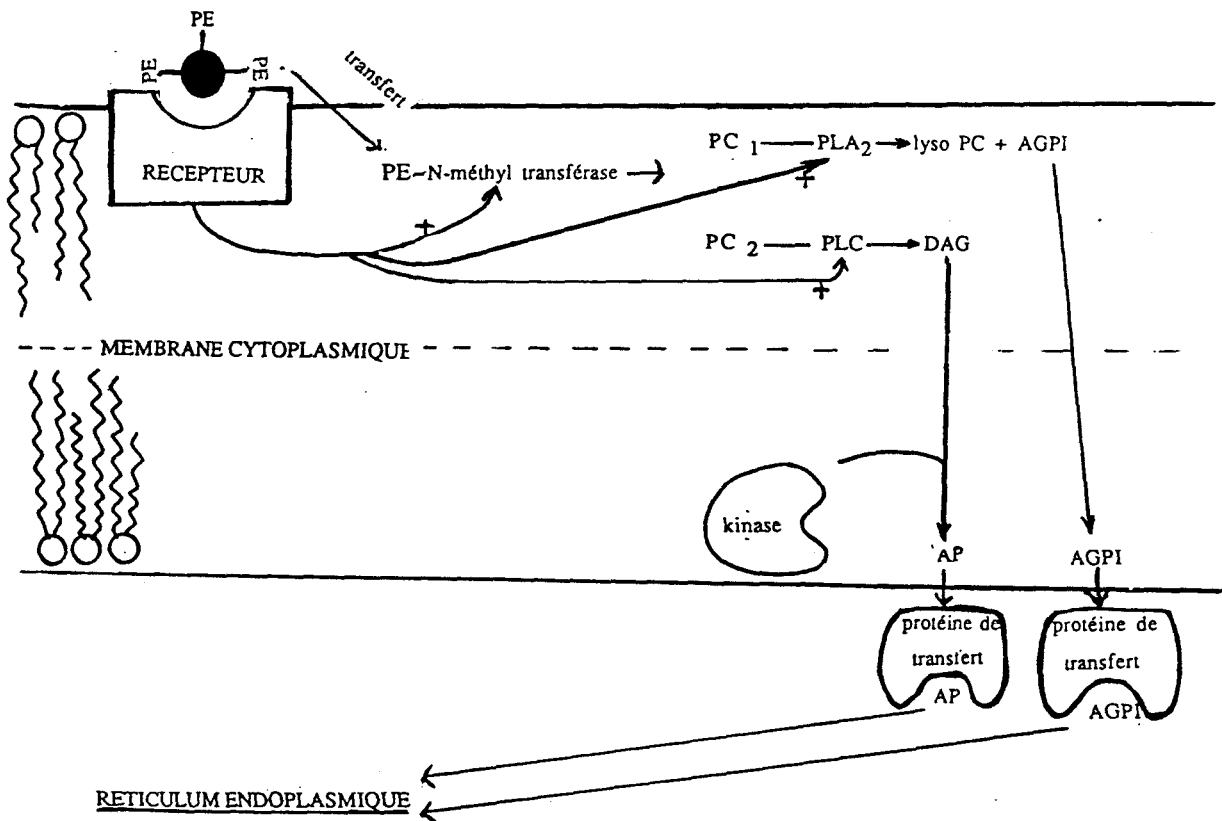
Des travaux déjà anciens (CREWS et coll., 1981) ont relié le procédé de méthylation de la PE et l'activation de la N-méthyltransférase à l'occupation d'un récepteur par un agoniste. La fixation d'IgE sur leurs récepteurs de surface augmentait le turnover des phospholipides méthylés et activait des phospholipases.

Notre hypothèse de travail est donc la suivante :

- la PE des HDL₃ s'intégrerait à la membrane plasmique des cellules endothéliales de la B.H.E. dès la fixation des HDL₃ sur leurs récepteurs cellulaires.

Cette fixation serait suivie d'une cascade d'activation enzymatique schématisée figure ci-dessous. Une activation récepteur-dépendante de la N-méthyltransférase convertirait la PE en PC très insaturée qui serait dégradée sous l'action de diverses phospholipases. Une activation des PLA₂ libérerait l'acide gras en position sn₂ alimentant ainsi directement le cerveau en AGPI. Par contre une activation des PLC dégraderait la PC en DAG qui, après migration vers le feuillet protoplasmique serait phosphorylé en acide phosphatidique et pris en charge par des protéines de transfert vers le réticulum endoplasmique (SLEIGHT et PAGANO, 1985, MARTIN et PAGANO, 1987).

Le but de notre travail sera de vérifier cette hypothèse, et rechercher les diverses activités enzymatiques qui assureraient l'apport des acides gras au cerveau.



PE : PHOSPHATIDYL ETHANOLAMINE
AP : ACIDE PHOSPHATIDIQUE
AGPI : ACIDE GRAS POLYINSATURE
PLA₂ : PHOSPHOLIPASE A₂

PC : PHOSPHATIDYL CHOLINE
DAG : DIGLYCERIDE
lyso PC : lyso PHOSPHATIDYL CHOLINE
PLC : PHOSPHOLIPASE C

FICHES TECHNIQUES

Fiche Technique 1

PREPARATION DES LDL, HDL₃ ET DU LPDS

Ref. HAVEL R.J., EDER H.S., BRADGON J.H. *The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum.*
J. Clin. Invest. (1955), 34, 1345-1353.

PRINCIPE

L'ultracentrifugation d'un plasma, ajusté à une densité saline bien définie, permet de faire flotter et de sédimenter les lipoprotéines.

MATERIEL ET METHODES

Les LDL et HDL sont préparées à partir d'un pool de plasmas normolipémiques. La densité saline est ajustée à l'aide de KBr solide. Les ultracentrifugations sont effectuées à 40 KRPM par une centrifugeuse Beckman modèle L5.50B, munie d'un rotor 50.2 Ti, à 4°C et pendant 24 heures.

LDL ($1,030 < d < 1,053$)

- centrifugation à 1,030.

- le surnageant ramené au volume initial est recentrifugé à 1,030.

- le surnageant est ajusté à 1,053 et centrifugé.

- le surnageant est ramené au volume initial et recentrifugé à 1,053.

- la fraction supérieure de cette 4^{ème} centrifugation est constituée de LDL.

Les HDL₃ sont préparées selon le même protocole entre la densité 1,12 et 1,21.

Le LPDS ($d > 1,25$) est constitué de la fraction inférieure de deux centrifugations successives à la densité de 1,25.

LDL, HDL₃ et LPDS sont dialysés extensivement contre un tampon Tris 0,01 M/NaCl 0,15 M/EDTA 0,02 %, pH 7,4.

Les lipoprotéines sont filtrées stérilement sur filtre Millipore de 0,22 µm et conservées à 4°C pendant 3 ou 4 semaines.

Le LPDS est ramené à son volume initial, passé sur filtre de 0,45 µm, décomplémenté 30 min. à 56°C et stocké à -20°C.

On notera que les lipoprotéines de rat ou de boeuf sont isolées aux mêmes densités.

Fiche Technique 1 bis

PREPARATION DES LIPOPROTEINES PAR ULTRACENTRIFUGATION EN GRADIENT DE DENSITE.

Réf. CHAPMAN J., GOLDSTEIN S., LAGRANGE D., LAPLAUD P.M. A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum. *J. Lipid. Research.*, (1981), 22, 339-358.

PRINCIPE

Les lipoprotéines sont séparées selon leur densité par ultracentrifugation sur un gradient de densité.

MATERIEL ET METHODES

Préparation de l'échantillon.

Le plasma normolipémique additionné de:

- azide 0,01% (p/v)
- EDTA 0,04% (p/v)
- mertiolate 0,001% (p/v)

est ajusté à la densité de 1,21 avec du KBR solide (0,325 g/ml).

Dépot du gradient.

Les solutions de densités différentes ajustées avec du KBR solide sont déposées dans l'ordre suivant dans des tubes "ultra-clear" (Beckman 14 X 89 mm).

- 2ml de solution de densité 1,24
- 3ml de serum ajusté à la densité de 1,21
- 2ml de solution de densité 1,063
- 2,5ml de solution de densité 1,019
- 2,5ml de solution de densité 1,006

Le gradient de densité se forme lors de la centrifugation à 40 000 tours/mn. durant 48 heures à 15°C dans un rotor SW 41 à godets mobiles.

Récupération des lipoprotéines.

Les lipoprotéines se répartissent dans l'ordre suivant de la densité la plus faible à la densité la plus forte nous trouverons:

- une crête de chylomicrons
- 0,7 ml de VLDL
- 1,8 ml de LDL
- 1,3 ml de HDL₂
- 1,6 ml de HDL₃

Ces différentes fractions apparaissent sous forme de bandes plus ou moins colorées. Leur récupération se fait en persant le fond du tube, leur dialyse et leur filtration se fait selon le protocole défini fiche technique 1.

Fiche Technique 2

SEPARATION DES LIPOPROTEINES PAR CHROMATOGRAPHIE DE GEL
FILTRATION SUR COLONNE DE SUPEROSE 6B.

*Réf. HA Y.C. et BARTER P.J. Rapid separation of plasma lipoproteins
by gel permeation chromatography on agarose gel Superose 6B
J.Chromatogr. (1985) , 341, 154-159*

PRINCIPE

La séparation des différentes lipoprotéines par FPLC est réalisée en fonction de leur taille.

MATERIEL ET METHODE

- FPLC (Pharmacia).
- Colonne 80 cm x 1,6 cm (Pharmacia).
- gel d'agarose Superose 6B (Pharmacia).
- tampon NaCl 0,15M ; Na₂EDTA 0,01% ; NaN₃ 0,02% pH7,2
filtré et dégazé au moment de l'emploi.

Les lipoprotéines totales sont obtenues par ultracentrifugation et sont amenées à une densité inférieure à 1,21 en KBr. La colonne de Superose 6B est prééquilibrée en tampon NaCl. 2ml d'échantillon filtrés et dégazés sont déposés sur la colonne pour un débit de 0,50 ml/min. et sont élués par le même tampon à un débit de 0,75 ml/min..

L'éluion des protéines est suivie par la mesure d'absorbance à 280 nm. Les 32 premiers ml élués sont éliminés puis les fractions de 2 ml sont récoltées.

Fiche Technique 3

DOSAGE DES PROTEINES : TECHNIQUE DE PETERSEN

Réf. PETERSEN G. A simplification of the protein assay method of Lowry which is more generally applicable. An. Biochem. (1977) , 83, 346-356

PRINCIPE

La méthode de Lowry est une méthode excellente pour le dosage des protéines en milieu aqueux mais mal adaptée pour le dosage des lipoprotéines. A cette dernière, on préférera la méthode de Petersen qui utilise du SDS comme détergent pour les molécules liposolubles.

MATERIEL ET METHODES

1) REACTIFS

- réactif 1 : carbonate à 20% (Na_2CO_3 anhydre : 50 g qsp 250 ml H_2O).
- réactif 2 : ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0,5 g + Tartrate de Na et K : 1g qsp 250 ml H_2O).
- réactif 3 : NaOH 0,8 N : 16 g qsp 500 ml H_2O .
- réactif 4 : H_2O
- réactif 5 : SDS à 10% : 50 g qsp 500 ml.

Le mélange réactionnel est préparé à partir des solutions précédentes.

0,5 vol. de 1 + 0,5 vol. de 2 + 1 vol. de 3 + 1 vol. de 4 + 1 vol. de 5.

- gamme étalon de sérum albumine de 0 à 1 mg/ml.

2) MODE OPERATOIRE

A 100 μl de solution à doser ajouter 1 ml du mélange réactionnel, agiter puis incuber 10 min. à température ambiante. Ajouter 0,5 ml de réactif de Folin dilué au 1/6 et incuber 30 min. à l'obscurité. La lecture de la D.O. se fait à 750 nm .

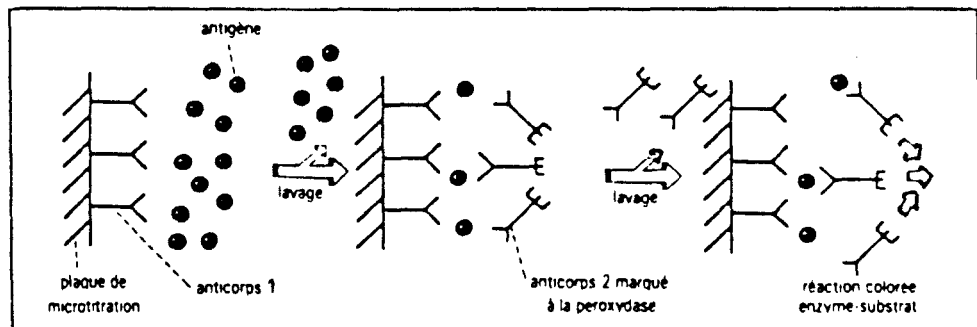
Fiche Technique 4

DOSAGE IMMUNOENZYMATIQUE DES APOPROTEINES
(méthode sandwich)

Ref. FIEVET C., DEMARQUILLY C., LUYEYE I.. Utilisation d'anticorps polyclonaux et monoclonaux pour le dépistage de l'athérosclérose. Intérêt de nouveaux marqueurs. Ann. Biol. Clin. (1985), 43, 493-499

PRINCIPE

Les apolipoprotéines A-I, A-II, B, C-III et E sont mesurées par une méthode immunoenzymatique non compétitive, de type "Sandwich" applicable avec des anticorps polyclonaux et monoclonaux. Le principe et les différentes étapes de ce dosage sont représentés par la figure ci-dessous.



REACTIFS

- Tampon PBS 0,1 M pH 7,4
 - * Phosphate disodique..... 27 g
($\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$, 12 H_2O)
 - * Phosphate monosodique..... 4 g
(PO_4NaH_2 , 2 H_2O)
 - * NaCl..... 9 g
 - * Eau distillée qsp..... 1 litre
- Tampon PBS-BSA
 - * BSA à 1% dans PBS..... 1 g pour 100 ml
- Tampon phosphate citrate pH 5,5
 - * Phosphate disodique 0,1 M..... 500 ml
($\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$, 12 H_2O)
 - * Citrate de sodium 0,1 M..... 200 ml
- Substrat
 - * Orthophénylènediamine (OPD)..... 37,5 g
 - * Tampon phosphate citrate..... 12,5 ml
 - * Eau oxygénée (H_2O_2)..... 8 μl

Fiche Technique 5

ANALYSE DES LIPOPROTEINES EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

Réf. Cette analyse est commercialisée par la firme SEBIA.

PRINCIPE

Les lipoprotéines sont soumises à une séparation électrophorétique en gel de polyacrylamide en gradient discontinu.

Le support commercialisé par la firme SEBIA est constitué de 2 gels de polyacrylamide de concentrations différentes : 2% dans la couche supérieure dans laquelle se trouvent les puits de dépôt et 3% dans la couche inférieure. La migration électrophorétique et la filtration moléculaire interviendront dans la séparation des diverses lipoprotéines.

Les chylomicrons qui sont de très grosses molécules resteront dans le puits de dépôt, tandis que les autres lipoprotéines migreront sous l'action d'un champ électrique. Le premier gel à 2% arrêtera les VLDL tandis que le gel à 3% assurera la séparation des LDL et HDL.

MATERIEL ET METHODES

1) REACTIFS

- Tampon lipofilm (dosages concentrés à diluer dans 1 litre).
- Lipofilms (coffret de 10 films hydratés avec support rigide, ponts de papier filtre et un flacon de colorant en solution).
Le lipofilm dans son emballage d'origine est parfaitement stable pendant au moins 18 mois, mais lorsqu'il est tamponné, il ne doit pas être conservé plus de 8 jours à 4°C.
- Colorant noir soudan.

2) MODE OPERATOIRE

a) Précoloration des échantillons :

Préparer le mélange colorant en ajoutant en premier un volume de colorant (50 µl) puis un volume de sérum (50 µl). Bien agiter et laisser en incubation 30 min. à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Pour les taux de lipides très élevés >20 g il est préférable de diluer le sérum en eau physiologique avant d'effectuer la précoloration, de façon à se trouver avec un taux de lipide normal ou <15 g.

b) Migration électrophorétique :

Déposer 5 µl de plasma précoloré dans les puits de dépôts, mettre sous tension : 250 V (8 mA par film). Le temps de migration est de 60 à 80 min. de façon à avoir une séparation entre les HDL et les LDL de 4 à 5 mm.

c) Lavage et conservation :

Après interprétation, immerger la plaque dans le bac de lavage contenant 5% d'acide acétique et 2% d'éthylène glycol (ou 0,5% de glycérol) en eau déminéralisée.

Placer le bac sur un agitateur magnétique. Agiter pendant une heure puis sortir le gel, le déshydrater à température ambiante ou sur une source de chaleur (étuve ventilée ou séchoir).

Fiche Technique 6

OBSERVATION DES LIPOPROTEINES EN
MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Réf. TALL A.R. , HOGAN V. , ASKINOZI L., SMALL D.M. *Interaction of plasma high density lipoproteins with dimyristoyl lecithin multilamellar liposomes.*
Biochemistry (1978) , 17, 322-326 .

PRINCIPE

Les différentes classes de lipoprotéines sont observées au microscope électronique après coloration négative.

MATERIEL ET METHODE

Une goutte de lipoprotéines (environ 80 à 100 µg) est déposée sur une grille (300 mesh) recouverte d'une membrane de parlodion légèrement carbonée pour éviter les échauffements locaux.

Les lipoprotéines sont ensuite contrastées négativement avec une solution de phosphotungstate de sodium à 2% de pH 6,8 pendant des temps s'échelonnant de 20 s. à 1 min. L'observation des préparations est réalisée avec un microscope électronique Philips EM 420.

METHYLATION DES LDL

*Réf. WEISGRABER K. H., INNERARITY T.L., MAHLEY R.W. Rôle of the lysine residues of plasma lipoproteins in high affinity binding to cell surface receptors on fibroblasts .
J. Biol. Chem. (1978), 253, 24 , 9053-9062.*

PRINCIPE

Les fonctions amines des résidus lysine des LDL sont méthylées par la formaldéhyde en milieu réducteur.

MATERIEL ET METHODE

- LDL : 2 à 10 mg/ml
- Tampon NaCl 0,15M/Tris 10 mM/EDTA 0,02%, pH 7,4
- Tampon borate 0,3 M, pH 9. Le pH est obtenu par mélange de solutions d'acide borique 0,3 M et de borate de sodium 0,3 M.
- Borohydrure de sodium : 1 mg
- Formaldéhyde aqueuse : 37%
- Colonne de Sephadex G50 (Farmacia)

Les LDL sont diluées 1,5 fois avec du tampon borate. La réduction s'effectue à 0°C sur glace et commence en additionnant 1 mg de borohydrure de sodium et 1 µl de formaldéhyde. 1 µl de formaldéhyde est ajouté successivement à 6, 12, 18, 24 puis 30 minutes d'incubation. La solution est chromatographiée sur colonne de Sephadex G50.

Le contrôle de la réduction se fait en Lipofilm et en microscopie électronique.

Fiche Technique 8

PREPARATION DE HDL DEPOURVUES D'APOLIPOPROTEINE E

Réf. GIBSON J.C., RUBINSTEIN A., NGAI N.. Immunoaffinity isolation of apolipoprotein E containing lipoproteins. Biochim. Biophys. Acta. (1985), 835,113-119.

PRINCIPE

La fraction de HDL dépourvues d'apolipoprotéine E, est obtenue par passage d'une solution de HDL₃ sur un immunoadsorbant anti-apo E polyclonal-Sépharose 4 B (BrCN). Le profil d'éluion est illustré ci-dessous.

MATERIEL ET METHODE

- Tampon d'équilibrage (A)
 - * PO₄Na₂H 0,1 M
 - * NaCl..... 0,05 M
 - * EDTA..... 0,01%
 - * NaN₃..... 0,01%
- Tampon NaCl 0,5 M (B)
- Tampon glyocolle HCl 0,25 M pH 2,5 (C)
- Tampon thiocyanate de potassium (KSCN) 3M (D)
- Tampon NaCl 0,15 M, Na₂ EDTA 0,02 % pH 7,2

Equilibrer la colonne d'affinité anti apo E-Sépharose 4B, (8 cm x 2 cm), débit 60 ml/heure avec le tampon A.

Déposer 4,5 ml d'une solution de HDL₃ (2,2 g/l) dialysée contre le tampon A, débit 30 ml/heure et incuber une nuit à température ambiante.

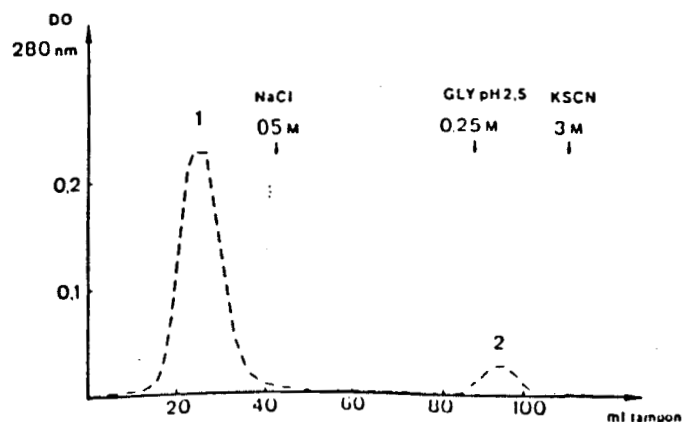
Eluer successivement avec :

- 20 ml de tampon A = fraction non retenue (HDL⁻).
- 20 ml de tampon B.
- 20 ml de tampon C = fraction 2 retenue.
- 20 ml de tampon D.

Dialyser immédiatement les fractions 1 et 2 contre le tampon NaCl 0,15 M pH 7,2.

Contrôle de la préparation

L'absence d'apolipoprotéine E dans la fraction éluee est vérifiée par dosage ELISA (Sandwich) illustré fiche technique 4.



Fiche Technique 9

CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR COLONNE DE SEPHAROSE 4B COUPLEE
A UN ANTICORPS ANTI-APO B.

*Réf. KOFFIGAN M., LARUE C., RIVAT C., TACQUET A., GUERAUD V., FRUCHART J.C.
Specific removal of apolipoproteins B containing lipoproteins by
immunoadsorption.
Annual Scientific meeting "European Society for clinical investigation",
1983, April, Travelmünde, West Germany.
AXEN R., PORATH J., ERNBACK S. Chemical coupling of peptides and
proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides.
Nature, (1967), 214, 1302-1304.*

PRINCIPE

Les lipoprotéines contenant des apolipoprotéines B (VLDL et LDL) sont retenues par chromatographie sur colonne de sépharose 4B sur laquelle sont couplées des anticorps anti apo B.

MATERIEL ET METHODES

- préparation de la sépharose-anti apo B.

La préparation de la sépharose 4B-anti apo B se fait en 2 étapes :
préparation de l'adsorbant et couplage de l'anticorps anti-apo B.

*préparation de l'adsorbant

- 8 gr de sépharose 4B activés sont mis à gonfler dans 30 à 40 ml d'HCl
 10^{-3} M, durant 15 minutes.

Ils sont déposés sur verre fritté : porosité 1 à 2 μ m (n°3) et sont lavés
avec 1,5 l d' HCl 10^{-3} M, puis 800 ml de NaHO₃ 0,1 M, NaCl 0,5M. Cette opération
s'effectue plusieurs fois.

*couplage des anticorps anti-apoB

- Mise en contact du gel avec 15 mg d'anticorps anti apo B par gramme de
gel sec et agiter doucement 2 H. à température ambiante ou un nuit à 4°C.

- Laver avec 100 ml de tampon NaHCO₃ 0,1M, NaCl 0,5 M.

- Bloquer les sites actifs encore libres par la glycine M pH 8 à raison de
20 ml/g de gel sec en agitant doucement 2 H. à température ambiante.

- Laver 3 fois alternativement avec 100 ml de tampon acétate de Na
(0,1M), NaCl (M) pH 4 et 100ml de tampon borate de Na (0,1M), NaCl (M) pH 8.

- terminer par un lavage avec une solution de NaCl 0,5 M.

-immuno épuration

Une colonne pharmacia de 200 mm de long et de 16 mm de diamètre est
remplie de sépharose anti apo B, puis équilibrée dans du tampon PBS 0,1 M

10 ml de plasma sont déposés à la surface du gel et sont adsorbés sur la
colonne. A raison d'un débit de 80 ml/H, nous obtenons l'éluion du premier
pic de plasma riche en HDL de 55 ml. Les lipoprotéines riches en apo B (VLDL
et LDL) sont éluées par 40 ml de tampon glycine-HCl 0,2 M pH 2,8 en réglant le
débit à 40 ml/H.

- concentration

La fraction plasmatique épurée de ses lipoprotéines riches en apo B doit
être concentrée pour éliminer l'effet de dilution amené par
l'immunoépuration.(cellule AMICON équipée d'une membrane PM 10)

- controle de la préparation

par électrophorèse en gel de polyacrylamide (fiche technique 5)

par dosage des apoprotéines AI (fiche technique 2)

par microscopie électronique (fiche technique 6)

Fiche Technique 10

CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR COLONNE DE SEPHAROSE 4B COUPLEE
A UN ANTICORPS ANTI-APO AII.

Réf. KOREN E., PUCHOIS P., ALAUPOVIC P., FESMIRE J., KANDOUSSI A., FRUCHART J.C. Quantification of two different types of apolipoprotein AI containing lipoprotein particles in plasma by enzyme-linked differential-antibody immunosorbent assay. CLIN. CHEM., (1987), 33(1), 38-43

PRINCIPE

Les lipoprotéines contenant de l'apo AII sont retenues par chromatographie sur colonne de sépharose 4B sur laquelle sont couplés des anticorps anti apo AII.

MATERIEL ET METHODES

La préparation de l'adsorbant et le couplage d'anticorps est identique à celui décrit fiche technique 9.

Une colonne PHARMACIA de 200 mm de long et de 16 mm de diamètre est remplie de sépharose anti Apo AII, puis équilibrée en tampon Na_2HPO_4 pH 6,5.

Une solution de HDL équivalente à 10 ml de plasma est déposée à la surface du gel et est adsorbée sur la colonne anti apo AII. Pour un débit de 80 ml/H, nous obtenons l'élution d'un premier pic riche en LpAI. Les LpAII ou LpAI-AII sont éluées par 40 ml de tampon glycine-HCl 0,2M pH 2,8 en réglant le débit à 40 ml/H. La fraction riche en LpAI peut être à son tour purifiée sur colonne de sépharose 4B couplée à un anticorps anti apo AI suivant le même protocole.

Les différentes fractions sont concentrées et contrôlées selon le protocole décrit fiche technique 9.

PREPARATION DES LIPOPROTEINES FLUORESCENTES

Réf. BROCKMAN H.L., LOW J.H., KEZDY F.J.. Catalysis by adsorbed enzymes.

J. BIOL. CHEM. (1973), 248,14, 4965-4970

PRINCIPE

La préparation des lipoprotéines contenant des phospholipides fluorescents se fait par simples réactions d'échanges entre des vésicules de phospholipides et des lipoprotéines.

Afin de séparer facilement les vésicules lipidiques des lipoprotéines, les phospholipides fluorescents seront fixés sur des billes de verre.

MATERIEL ET METHODES

- Billes de verre, 80 à 100 mesh (Interchim).
- 7 chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3 diazole-phosphatidyl choline ou NBD-PC en solution chloroformique (1 µg/ml), (Avanti, Birmingham, AL 3521, USA).

400 µg de billes de verre sont placés dans 400 µl de NBD-PC ou NBD-PE, le solvant est évaporé sous azote, les billes recouvertes de phospholipides sont mises en contact avec 1 ml de plasma ou par l'équivalent en lipoprotéines avec un mouvement rotatif de 22 retournements par min.. Le contact se fait soit 3 heures à température ambiante soit 24 heures à 4°C.

Les particules fluorescentes sont séparées des billes de verre par simple centrifugation (1000 t/mn.pendant 3 mn.).

MARQUAGE RADIOACTIF DES LIPOPROTEINES

Ref. BILHEIMER D.W., EISENBERG S., LEVY R.I. The metabolism of very low density lipoproteins. Biochim. Biophys. Acta, (1972), 260, 212-221.

PRINCIPE

Le marquage des protéines résulte de la fixation de la partie cationique de la molécule d'iode radioactive sur le noyau benzénique des résidus tyrosine. L'efficacité du marquage est améliorée par l'adjonction à l'iode radioactive, d'iode monochlorure convertie en hypoiodite.

REACTIFS

- lipoprotéines à la concentration en protéines de 2 mg/ml.
- tampon glycine 1M, NaCl 1M. pH 9,6.
- ^{125}I -Na (Amersham) 3,7 GBq/ml.
- tampon NaCl 0,15 M, Tris 10 mM, EDTA 0,02%. pH 7,4.
- solution d'ICI 0,033 M en NaCl 1M, HCl 1 M.
- acide trichloracétique 20% (P/V).

METHODE

1) MARQUAGE

Les mélanges suivants sont préparés extemporanément :

- | | |
|------------|--|
| solution A | - 1 ml de lipoprotéines |
| | - 0,2 ml de tampon glycine-NaCl |
| solution B | - 10 μl de ^{125}I -Na |
| | - 10 μl de ICl |
| | - 0,2 ml de tampon glycine-NaCl |

Le contenu de la solution B est transféré dans la solution A et l'ensemble est rapidement passé au vortex. La solution est déposée sur colonne de gel filtration PD-10 (Pharmacia/Séphadex G25) équilibrée en tampon Tris-NaCl. En sortie de colonne, l'éluat est recueilli par fractions de 15 gouttes. 1 μl de chaque tube est prélevé et compté. Les tubes contenant les ^{125}I -LDL sont rassemblés et la solution est stérilisée par filtration.

2) CONTROLE DE MARQUAGE

Le contrôle permet de déterminer les pourcentages de radioactivité liée d'une part à la fraction protéique et d'autre part à la fraction lipidique de la lipoprotéine.

a) Détermination de la radioactivité liée aux protéines.

Les protéines de 10 μ l de ^{125}I -LDL ou de ^{125}I -HDL₃ sont précipitées en présence de 100 μ l de sérum par 1 ml de TCA 20% pendant une nuit à 4°C. Après centrifugation, le culot protéique est lavé par le même volume de TCA 20%. La radioactivité est mesurée sur le culot obtenu après centrifugation.

b) Détermination de la radioactivité liée aux lipides.

La fraction lipidique est extraite selon la méthode de Folch et al. (1957) (Fiche technique 13). Un ml de solvant d'extraction chloroforme/méthanol (2/1) est ajouté à 10 μ l de ^{125}I -LDL. Après agitation, 200 μ l de solution de NaCl 0,15 M sont ajoutés. Le mélange est déphasé une nuit à 4°C. La phase inférieure lipidique est ensuite lavée 3 fois à l'aide du liquide de lavage (phase supérieure d'un mélange chloroforme/méthanol/eau - 8/4/3 - à laquelle est ajouté du NaCl à raison de 2,9 g/l). La radioactivité est finalement mesurée sur la phase inférieure lipidique.

EXTRACTION DES LIPIDES

Ref. FOLCH J. , LEES M. , SLANE-STANLEY G.H. ; a simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J.Biol.Chem. (1957), 226 , 497-509.

PRINCIPE

Les tissus sont broyés mécaniquement dans le mélange chloroforme-méthanol. Le méthanol dénature les protéines et le chloroforme favorise la mise en solution des lipides totaux . Après addition d'eau et déphasage , la phase hydro-alcoolique supérieure contient des substances hydrosolubles tandis que la phase inférieure chloroformique renferme les lipides totaux .

MATERIEL ET METHODE

1) REACTIFS :

- Solvant d'extraction chloroforme/méthanol (2/1 - v/v) .
- Solution de NaCl à 7,5 g/l
- Liquide de lavage :

| | |
|------------------|-----------|
| Chloroforme..... | 8 volumes |
| Méthanol..... | 4 volumes |
| Eau..... | 3 volumes |

Agiter en ampoule à décanter. Laisser reposer 1 H. et récupérer la phase supérieure. Mesurer le volume de la phase supérieure et additionner NaCl à raison de 2,9 g pour 1000 ml. Agiter jusqu'à dissolution complète.

2) EXTRACTION :

- 1g de tissu est homogénéisé dans 20 ml de solvant d'extraction à l'aide d'un homogénéisateur Ultr-Turrax. Laisser reposer 24 H. et filtrer sur filtre sans cendres en rinçant bien le haut du filtre avec le mélange d'extraction.

- Ajouter 4 ml de solution de NaCl à 7,5 g/l et agiter vigoureusement pendant 1 min.

- Abandonner une nuit à température ambiante pour permettre le déphasage. Siphonner la phase hydroalcoolique et laver trois fois la phase chloroformique avec le liquide de lavage.

- Après évaporation sous azote de la phase chloroformique, les extraits lipidiques sont conservés à -20° dans le chloroforme et sous azote .

Fiche Technique 14

SEPARATION DES PHOSPHOLIPIDES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR
COUCHE MINCE

Réf. ROUSER G., KRITCHEVSKY G., SIMON G., LLYAMAMOTO A. In " Lipid chromatographie analyses "
Edited Marinetti G.V. , London (1967) , vol.1 , 99

HOHENGASSER C.J.M., THORNBURG J.T., VAN PARIDOU P.A., VAN DER SCHAFT P., WIRTZ K.W.A. Phosphorylation and degradation of exogenous phosphatidyl inositol incorporated into Friend Erythroleukemic cells. *J.Biol.Chem.* (1986), 261, 6255-6259.

PRINCIPE

Séparation monodimensionnelle des phospholipides sur plaque de gel de silice G.

MATERIEL ET METHODES

Le système de migration le plus classique est le mélange :
Chloroforme/Methanol/eau (65/25/4, V/V/V)

Les phospholipides sont révélés, soit par vapeur d'iode qui se fixe sur les doubles liaisons des acides gras insaturés, soit, après pulvérisation des plaques avec une solution de Rhodamine 6G 50 mg/l diluée extemporanément par 1 volume de NaOH 4N, par examen sous lumière UV.

Cette methode très acceptable dans le cas du sérum, n'est pourtant pas tout à fait satisfaisante au niveau tissulaire, car certaines classes de phospholipides ont des vitesses de migration tellement voisines que leur séparation est impossible. Ainsi par exemple la phosphatidyl-éthanolamine (PE) est contaminée par la phosphatidyl-sérine (PS), la phosphatidyl-choline (PC) est contaminée par la phosphatidyl-inositol (PI). Par contre cette méthode présente l'avantage de bien individualiser le diphosphatidyl-glycérol qui migre presque au niveau du front de solvant .

Au système classique mentionné on peut ajouter le solvant de migration préconisé par Rouser : chloroforme/méthanol/ammoniaque 7N (115/45/7,5 V/V/V) qui a le mérite de bien individualiser la PE, la PC et la sphingomyéline. Pour une bonne séparation des diglycérides, on utilisera la methode de Hohengasser, les plaques de gel de silice seront imprégnées de borate avant migration dans le solvant : chloroforme / méthanol / ammoniaque/eau (90/54/5/5 V/V/V/V).

SEPARATION DES PHOSPHOLIPIDES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE EN GRADIENT D'HUMIDITE

*Ref. NOUVELOT A., SEZILLE G., DEWALLY P., FRUCHART J.C. Chromatographie monodimensionnelle des lipides polaires sur couche mince de gel de silice en gradient discontinu d'humidité .
REVUE FRANCAISE DES CORPS GRAS (1977), 2, 365-366.*

MATERIEL ET METHODES

- Plaques HPTLC 20 cm x 20 cm en gel de silice (MERCK).
- Chambre Vario KS de (Camag).

Avant l'emploi, 5 couloirs de migration de 28 mm de largeur sont délimités par grattage du gel sur des largeurs de 5 mm entre les couloirs et de 10 mm en bordure de plaque.

Les extraits lipidiques sont déposés en solution dans le mélange chloroforme/méthanol (2/1, V/V) et à raison de 0,5 à 0,7 mg au centre des bandes sur une distance de 15 mm de l'extrémité de la plaque. Un courant d'azote assure l'évaporation du solvant de dépôt .

La plaque (gel en dessous) est ensuite placée horizontalement au-dessus du plateau de conditionnement divisé en 5 compartiments perpendiculaires au sens de migration et contenant 20 ml de différents mélanges d'acide sulfurique (Merk Art. 731, 95-97 %) et d'eau : 24/56, 29/47, 32/42, 34/38, 38/30 (V/V) créant sur le gel un gradient discontinu d'humidité relative de 47%, 32%, 24%, 18%, 9% à partir du point de dépôt.

Après 90 min. de conditionnement, ce plateau est remplacé par un autre identique mais contenant dans les deux compartiments situés du côté des points de dépôt, 20 ml de solvant de saturation : tétrahydrofurane (Uvasol, Merk)/méthanol (2/1, V/V). L'imprégnation par les vapeurs de solvant est réalisée en 30 min. Une plaque métallique est alors glissée entre le gel et le plateau. La chromatographie est effectuée sur une distance de 18 cm par 20 ml de solvant de développement : chloroforme/méthanol/ammoniaque 4N, (70/50/7, V/V/V) déposés dans l'augette prévue à cet effet.

Fiche Technique 16

DOSAGE DES PHOSPHOLIPIDES

Réf. LOWRY R.R., TINSLEY I. ; A simple sensitive method for lipid phosphorus. Lipids (1974), 9, 491-492

PRINCIPE

Dosage du phosphore après minéralisation des phospholipides.

MATERIEL ET METHODES

1) REACTIFS

- Acide perchlorique à 70%
- Acide nitrique concentré
- Acétate de butyle
- Solution chromogène :
 - + Molybdate d'ammonium.....29,2g
 - + Acide chlorydrique concentré..... 100 mlAprès dissolution complète, ajouter 400 ml d'eau pour préparation injectable.
La solution est stockée à 4°C durant 3 mois.
- Etalon :
 - + phosphate monopotassique.....17,5 mg
 - + Eau pour préparation injectable.....10 ml(Etalon contenant 4 µg de phosphore minéral dans 10µl).

2) METHODE

Après fractionnement par chromatographie sur couche mince, les portions de gel correspondant aux phospholipides sont grattées et récupérées dans des tubes à minéraliser. Après addition d'1ml d'acide perchlorique à 70% et de deux gouttes d'acide nitrique concentré, les tubes munis de réfrigérants sont portés au thermobloc à 200°C pendant 45 min.. Laisser refroidir les tubes pendant 15 min. avant d'ajouter dans chacun d'eux 3,6 ml d'eau pour préparation injectable. Les tubes sont alors centrifugés 10 min. à 3000 tours/min. pour éliminer le gel de silice .

On reprend 3 ml du surnageant auquel on ajoute 7 ml d'eau et 1 ml de solution chromogène. On agite 20 secondes au Vortex avant d'ajouter 5 ml d'acétate de butyle. On agite de nouveau 30 secondes.

Une centrifugation à froid et à 3000 tours/min. pendant 5 min. permet de récupérer la phase supérieure dont la densité optique est lue à 310 nm.

N.B. : Il faut prendre la précaution d'utiliser de la vaisselle lavée au mélange sulfochromique et soigneusement rincée. Le tube "blanc" et le tube "étalon" doivent contenir la même quantité de gel de silice que les fractions de phospholipides .

Fiche Technique 17

DOSAGES DU CHOLESTEROL ET DU CHOLESTANOL EN CHROMATOGRAPHIE
GAZ-LIQUIDE.

Ref. GAMBERT P., LALLEMANT C., ARCHAMBOULT., Assessment of serum cholesterol by two methods : Gas-liquid chromatography on a capillary column and chemical ionization - mass fragmentography with isotopic dilution of (3,4-³C) cholesterol as internal standard. J. of Chromatography, (1979), 162, 1-6.

PRINCIPE

Les composés sont saponifiés puis silylés. La séparation s'opère sur colonne capillaire.

L'épicoprostanol est utilisé comme témoin interne.

MATERIEL

1) REACTIFS

- cholestérol (Sigma) 5 mM en éthanol absolu.
- 5 -cholestan-3 -ol (Sigma) 0,4mM.
- épicooprostanol (Sigma) 0,25 mM en éthanol absolu.
- N O-bis (trimethylsilyl) trifluoroacétamide (BSTFA) (Supelco).
- triméthylchlorosilane (TMCS).
- KOH 6 mM
- serum gardé à 4°C.

2) CHROMATOGRAPHE

Le chromatographe Vista 6000 (Varian) est équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne capillaire (Type 2101-203, 25 m x 0,22 mm I.D., 120000 plateaux théoriques, chrompack).

Les chromatogrammes sont enregistrés sur un appareil Varian type Vista 402.

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

1) SAPONIFICATION-EXTRACTION

Dans un tube vissé de 15 ml introduire :

- 1 ml d'épicooprostanol 0,25 mM (indication du rendement de saponification).
- 0,1 ml de KOH 6 mM.
- 50 µl de serum.

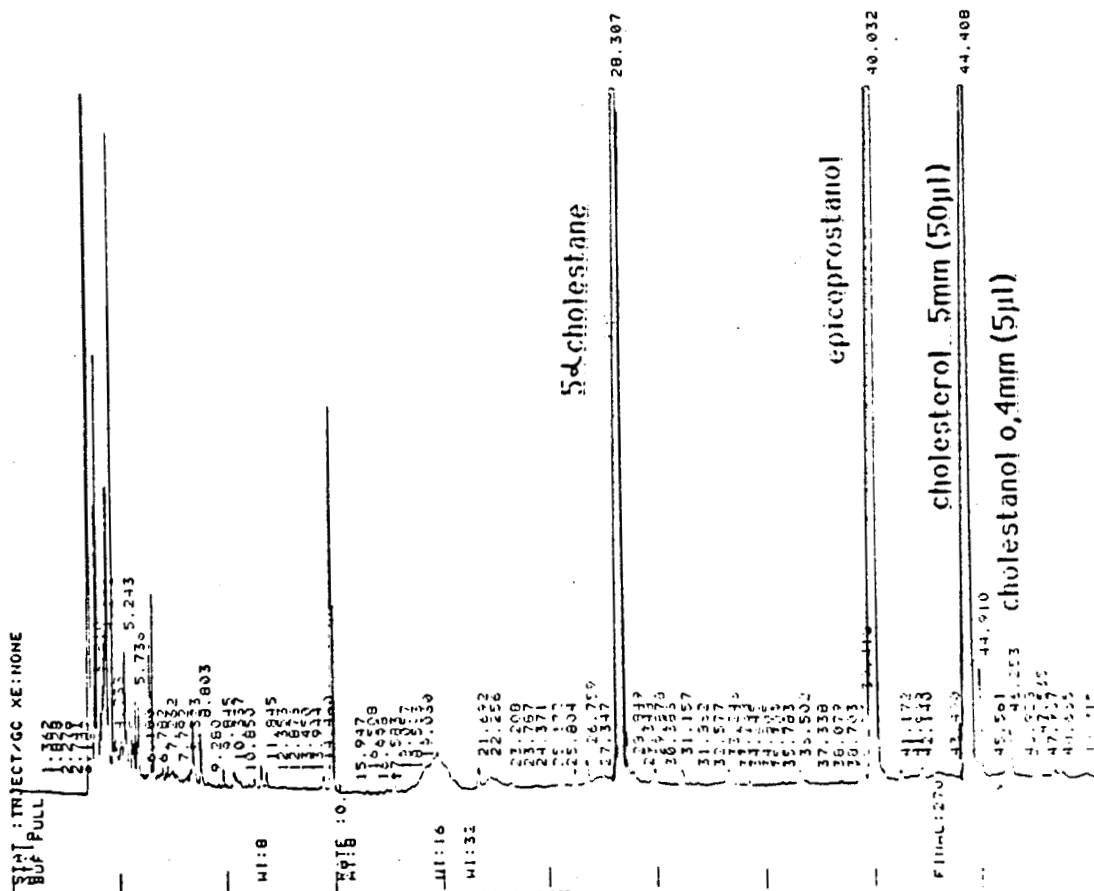
- incuber une heure à 60°C.
- refroidir.
- ajouter 10 ml de 5 cholestane-3 ol 0,025 mM.
- mélanger.
- ajouter 2 ml d'eau distillée.
- agiter une minute exactement au Vortex.
- prélever 2 ml de la phase hexane et transférer dans un tube en verre de 2 ml.
- évaporer à sec sous azote.

2) SILYLATION

- Au résidu sec ajouter 0,2 ml de mélange de silylation (BSTFA - TMCS, 4/1, V/V) préparé extemporanément.
- incuber une heure à 60°C.
- refroidir.
- ajouter 0,8 ml d'hexane.

3) CHROMATOGRAPHIE

- injection : 1 µl sur injecteur de Ross.
- La température de la colonne est programmée de 250°C à 285°C (1°C/min.).
- Le débit d'azote est de 3 ml/min..
- Les rapports de surfaces des pics sont calculés.



Fiche Technique 18

ISOLEMENT DES CAPILLAIRES CEREBRAUX DE BOEUF

Réf. BRENDEL K., MEEZAN E., CARLSON E.C.. Isolated brain microvessels : a purified metabolically active preparation from bovine cerebral cortex. SCIENCES (1974), 185, 953-955

PRINCIPE

L'isolement des capillaires cérébraux se fait par une technique d'homogénéisation mécanique et de filtration sur tamis .

MATERIEL ET METHODE

Le matériel et les réactifs sont entièrement stériles.

- Matériel de dissection.
- 2 béciers de 1 litre .
- Tamis de porosité de 180 nm. (toile à bluter-fabrique Zurichoise S.A.).
- Tamis de porosité de 60 nm. (toile à bluter-fabrique Zurichoise S.A.).
- homogénéiseur de Dounce 40 ml.
 - * piston large A de clearance de 75 μ M
 - * piston étroit B de clearance de 25 μ M
- PBS-CMF pH 7,4 NaCl 0,8% (P/V)/Na₂HPO₄, 12 H₂O 0,28% (P/V)/KH₂PO₄ 0,02% (P/V)/KCl 0,02% (P/V).
- cerveau de boeuf prélevé juste après l'abattage.

Les capillaires destinés à une étude biochimique sont isolés à 4°C. Lorsque l'isolement est effectué en vue d'une mise en culture, celui-ci est réalisé à température ambiante sous hotte à flux laminaire horizontal. Laver le cerveau par du tampon PBS-CMF, ôter les méninges, prélever environ 1/3 des circonvolutions et les laver par du tampon PBS-CMF. Homogénéiser le matériel au Dounce par 10 aller-retours avec le piston A, filtrer l'homogénat sur le tamis de 180 nm puis réhomogénéiser le filtrat au Dounce par 10 aller-retours avec le piston B, filtrer l'homogénat sur le tamis de 60 nm. La majorité des capillaires sont retenus sur ce deuxième tamis. Ils sont abondamment lavés au PBS, récupérés à l'aide d'un piston par un mouvement rotatif et mis en suspension dans un milieu adapté à leur utilisation.

La pureté des capillaires est contrôlée en microscopie optique.

Fiche Technique 19

PURIFICATION DU FIBROBLAST GROWTH FACTOR BASIQUE

Ref. GOSPODAROWICZ D, CHENG J., LUI GE M., ANDREW B., BOHLENT P. Isolation of brain fibroblast growth factor by heparine-sepharose affinity chromatography : identity with pituitary fibroblast growth factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1984), 81, 6963-6967.

PRINCIPE

Le FGF est extrait d'hypophyses de boeuf et purifié par précipitation au sulfate d'ammonium, chromatographié sur carboxy-methyl sephadex et héparine sépharose.

REACTIFS

- tampon Tris/NaCl 0,6 M : Tris 10 mM, NaCl 0,6 M, pH 7
- tampon Tris/NaCl 1,1 M : Tris 10 mM, NaCl 1,1 M, pH 7
- tampon Tris/NaCl 1,7 M : Tris 10 mM, NaCl 1,7 M, pH 7
- tampon P. : NaH₂PO₄ 0,1 M, pH 6.
- tampon P./NaCl 0,15 M : NaH₂PO₄ 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 6
- tampon P./NaCl 0,6 M : NaH₂PO₄ 0,1 M, NaCl 0,6 M, pH 6

PROTOCOLE

Les volumes sont prévus pour l'extraction du FGF à partir de 1,5 Kg d'hypophyses. La manipulation est réalisée à 4°C.

1) EXTRACTION ET PRECIPITATION DE FGF AU SULFATE D'AMMONIUM

Les hypophyses sont décongelées et broyées dans 6 litres de solution de (NH₄)₂ SO₄ à 20 g/l. Le pH est ajusté à 4,5 à l'aide de HCl 6 N. La solution est agitée pendant 1 heure puis centrifugée à 10000 RPM (rotor JA 10, centrifugeuse Beckman J 21). Le pH du surnageant est ajusté à 6,5 à l'aide de soude 1 M. Il est additionné de (NH₄)₂ SO₄ à raison de 200 g/l et agité 15 min.. Après centrifugation 15 min. à 10000 RPM, le surnageant est additionné de (NH₄)₂ SO₄ à raison de 250 g/l et agité 15 min.. La solution est recentrifugée 15 min. à 10000 RPM et le culot est dissous dans le minimum d'eau (environ 400 ml).

Cet extrait brut est dialysé extensivement contre de l'eau (membrane spectrapor n°1, cutoff de 6 à 8000). Après dialyse, les particules insolubles sont éliminées par centrifugation 10 min. à 10000 RPM.

2) CHROMATOGRAPHIE SUR CARBOXY-METHYL SEPHADEX (CMS)

Le gel de CMS est préalablement préparé de la façon suivante : 75 ml de gel sec sont hydratés dans 4 litres de NaOH 0,5 M. Après 30' min. de repos, le surnageant est aspiré. Le gel est lavé 12 fois par 4 litres d'eau. 200 ml de HCl 12 M sont ajoutés (sans enlever le surnageant) et le gel est à nouveau lavé 20 fois

par 3 litres d'eau. Le dernier lavage se fait avec le tampon P.. Le pH du gel est ajusté à 6. Il est relavé une fois par le tampon P.. Une colonne (diamètre 6 cm) est remplie de 500 ml de CMS. L'extrait brut de FGF est déposé (débit 250 ml/heure). Le gel, qui a pris une coloration rouge, est lavé par le tampon P., jusqu'à ce que la coloration rouge commence à être éluée. Il est ensuite lavé par le tampon P./NaCl 0,15 M jusqu'à ce que la densité optique de l'éluat soit de 0,3-0,4. Les protéines éluées par le tampon P./NaCl 0,6 M sont récoltées.

3) CHROMATOGRAPHIE SUR HEPARINE-SEPHAROSE

Une colonne (diamètre 1,6 cm) contenant 20 ml de gel est équilibrée par le tampon Tris/NaCl 0,6 M. Le pic récolté en sortie de CMS est fractionné à un débit de 30 ml/heure par le passage de tampon Tris/NaCl 0,6 M jusqu'à ce que la DO soit comprise entre 0,1 et 0,05, de tampon Tris/NaCl 1,1 M. Finalement le FGF est élué par un gradient linéaire de 40 ml de NaCl 1,1 -> 1,7 M.

Les fractions contenant le FGF sont conservées à -70°C. Elles sont dosées en protéines. Leur pureté est contrôlée en SDS-PAGE et leur activité mitogène est testée sur ABAE (courbe dose/réponse).

Cette technique permet d'obtenir entre 50 et 100 µg de FGF donnant une seule bande en électrophorèse et dont l'activité mitogène est optimale à la concentration de 1 ng/ml.

Fiche Technique 20

COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE

REACTIFS

- DMEM H-16 (Gibco) additionné de 2 g/l de bicarbonate de sodium. pH 6,8.
- Solution de gentamicine à 10 mg/ml (Seromed).
- Solution d'amphotéricine B à 250 microgrammes/ml (Seromed).
- Solution de glutamine 200 mM (Seromed).

Les serums de veau nouveau né et de veau foetal sont sélectionnés pour l'effet mitogène qu'ils exercent sur les cellules endothéliales d'aorte de boeuf. Pour cela, les cellules sont ensemencées à la densité de 2.10^3 cellules/cm² et cultivées pendant 5 jours dans leur milieu de culture composé du sérum à tester. Les cellules sont trypsinisées et comptées. Leur efficacité sur la prolifération cellulaire est comparée à celle d'un sérum de référence. En cas de test positif, la même manipulation est recommencée pendant 2 ou 3 passages.

Les serums sont décomplémentés par chauffage à 56°C pendant 30 min..

| ml composant | cellules | ABAE | cel.endo. de cornée | BBCE | cel. MRC5 | cel. HeLa |
|---------------|----------|------|------------------------|------|-----------|-----------|
| DMEM | | 87,5 | 87,5 | 87,5 | 87,5 | 87,5 |
| glutamine | | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| gentamicine | | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| amphotéricine | | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| SV | | 10 | 5 | 20 | - | - |
| SVF | | - | 5 | - | 10 | 10 |

Les milieux sont stérilisés par filtration (pores de 0,22 µm) et conservés à 4°C pendant 2 mois. La glutamine est renouvelée chaque semaine.

PREPARATION DES MATRICES EXTRACELLULAIRES

- Ref. GOSPODAROWICZ D., MESCHER A.L., BIRDWELL C.R. Stimulation of corneal endothelial cell proliferation "in vitro" by fibroblast and epidermal growth factor. Exp. Eye Res., (1977), 25, 75-89.*
GOSPODAROWICZ D. Permissive effect of extracellular matrix on cell proliferation "in vitro". Proc. Natl. Sci. USA, (1980), 77, 4094-4098.

PRINCIPE

Les cellules endothéliales de la cornée en culture produisent dans certaines conditions une matrice extracellulaire qui se dépose sur le fond de la boîte de Pétri. Les cellules de cornée sont éliminées par un choc hypotonique.

PROTOCOLE

L'ensemble des milieux et solutions sont stérilisés par filtration (0,22 µm). Les cultures de cellules endothéliales de cornée sont entretenues sur boîtes de Pétri recouverte de gélatine en DMEM additionné de 5% de SV et de 5% de SVF (Fiche technique 20) et de bFGF (1 ng/ml). L'ensemencement initial est de 4.10^3 cellules /cm². Les cellules sont cultivées en étuve humide (95% air, 5% CO₂).

Pour la production de matrice, les cellules sont cultivées sur plastique dans le milieu de culture précédent additionné de 5% (P/V) de Dextran T-40. Du bFGF est ajouté tous les 2 jours jusqu'à la confluence. 6 à 8 jours après que la confluence ait été atteinte, la couche cellulaire est éliminée. Le milieu de culture est aspiré et remplacé successivement par les solutions suivantes :

- eau pour préparations injectables, 2 min..
- ammoniaque 20 mM, 1 min..
- PBS, 4 rinçages.

Les matrices extracellulaires sont stockées, en PBS, à 4°C jusqu'à leur utilisation.

Fiche technique 22

ENSEMENCEMENT DES CAPILLAIRES CEREBRAUX

PRINCIPE

Ensemencement des capillaires cérébraux sur une matrice extracellulaire et migration des cellules endothéliales pour former des clones primaires.

MATERIEL ET METHODES

Les capillaires cérébraux sont isolés stérilement selon la méthode de BENDEL et coll.,1974, illustrée fiche technique 18 et sont déposés dans une boîte de Pétri de 60 mm de diamètre contenant 5 ml de DMEM+15% SV pour être ensuite homogénéisés à la pipette pasteur stérile.

Les boîtes de matrices sontensemencées par 3 à 6 gouttes dans 5 ml de DMEM+15 % SV.

Après 3 H. à l'étuve à 37°C les capillaires non fixés sont lavés par 5 ml de DMEM+15 % SV.

Le bFGF (1 ng/ml) est ajouté tous les deux jours dès l'apparition de quelques cellules.

CLONAGE DES CELLULES

PRINCIPE

Les cellules endothéliales d'aorte et de capillaire forment, en culture primaire, des colonies cellulaires issues d'une seule cellule mère. Ces cellules sont clonées par microtrypsinisation.

REACTIFS

- milieu de culture.
- PBS.
- solution de trypsine 0,05%/EDTA 0,02% en PBS.

PROTOCOLE

La colonie cellulaire est localisée sur la face extérieure du fond de la boîte de Pétri à l'aide d'un objectif marqueur. Le milieu de culture est aspiré et remplacé par le même volume de PBS. Cette solution est aspirée à l'aide d'une pipette Pasteur coudée sans sécher totalement la boîte de culture. Les cellules à cloner sont isolées du reste de la boîte par aspiration périphérique de la colonie à l'aide de la pipette Pasteur.

20 μ l de solution de trypsine sont déposés sur la colonie. La trypsinisation est suivie sous microscope. Lorsque les cellules sont individualisées et réfringentes, la trypsine est aspirée et refoulée plusieurs fois de façon à bien décoller les cellules. Elles sont ensemencées dans une boîte de Pétri de 35 mm et mises en culture.

Fiche Technique 24

REPIQUAGE DES CELLULES

PRINCIPE

Les cellules sont dissociées enzymatiquement et réensemencées sur une surface de culture plus importante.

REACTIFS

- milieu de culture.
- PBS
- solution de trypsine 0,05%/EDTA 0,02% en PBS

PROTOCOLE

Le milieu de culture est aspiré et remplacé par le même volume de PBS (respectivement 10, 5 et 2 ml pour les boîtes de 100, 60 et 35 mm). Le tampon est remplacé par un demi volume de solution de trypsine. Après 30 sec., la solution de trypsine est aspirée. La dissociation cellulaire est suivie sous microscope. Dès que les cellules sont individualisées et réfringentes, elles sont remises en suspension (aspiration et refoulement sur le fond de la boîte de culture) dans un volume de milieu de culture. Un aliquot est prélevé et les cellules sont comptées (Coulter Counter modèle ZBI). Elles sont ensemencées à la densité de 2000 cellules/cm² pour les ABAE, de 4000 cellules/cm² pour les BBCE et les cellules endothéliales de la cornée et de 13000 cellules/cm² pour les MRC₅ et les cellules HeLa.

CRYOCONSERVATION DES CELLULES

PRINCIPE

La congélation dans l'azote liquide permet de ralentir le métabolisme cellulaire et de conserver les cellules indéfiniment.

REACTIFS

- milieu de culture.
- PBS.
- milieu de cryoconservation pour les cellules endothéliales : DMEM tamponné à l'HEPES 10mM, SV 10% (V/V), diméthyl-sulfoxyde 10% (V/V), gentamicine 50 µg/ml, amphotéricine 2,5 µg/ml, glutamine 2mM, pH 7,2.
- milieu de cryoconservation pour les fibroblastes et les cellules HeLa : DMEM tamponné à l'HEPES 10mM, SVF 20% (V/V), diméthyl-sulfoxyde 10%, gentamicine 50 µg/ml, amphotéricine 2,5 µg/ml, glutamine 2mM, pH 7,2.

PROTOCOLE

Les cellules d'une boîte de Pétri de 60 mm sont trypsinisées, remises en suspension dans 5 ml de milieu de culture et centrifugées 10 min. à 500 g. Le culot cellulaire est repris par 1 ml de milieu de cryoconservation et placé dans une ampoule de plastique. La température est descendue par étapes successives : 1 heure à 4°C, 24 heures à -70°C dans une boîte de polystyrène (de façon à ce que la descente de température soit progressive) puis directement dans l'azote liquide jusqu'à utilisation.

Lors de la décongélation, l'ampoule est placée directement dans un bain-marie à 37°C. Les cellules sont ensemencées dans une boîte de Pétri de 100 mm. Dès que les cellules sont étalées, la boîte est lavée 2 fois au PBS et les cellules sont remises en culture.

PREPARATION DE MEMBRANES ENDOTHELIALES ET BASALES
DE CELLULES ENDOTHELIALES DE CAPILLAIRES CEREBRAUX

Réf. LIDINSKY W.A., DREWES L.R. Characterisation of blood brain barrier. Protein composition of the capillary endothelial cell membrane .
J. Neurochem. (1983) 4 N (5), 1341-1348

PRINCIPE

Après lyse cellulaire et sonication, les différentes membranes sont obtenues par ultracentrifugation.

MATERIEL

Tampon Tris, pH 7,4 (autoclavé 20min. à 120°C)

- Tris 1 mM.
- Phényl Méthyl Sulfonyl Fluoride (PMSF) 1 mM.
- O-phénantroline 1 mM.

METHODE

Les capillaires cérébraux sont isolés de façon classique à 4°C et sont remis en suspension dans 40 ml de tampon Tris et incubés sous agitation pendant 1 heure. Ils sont ensuite centrifugés 10 min. à 15 000 g (12 500 RPM dans un rotor Beckman 50.2 Ti), resuspendus dans 40 ml de tampon Tris et incubés une heure sous agitation. Après centrifugation dans les mêmes conditions que précédemment, les capillaires sont repris dans 5 ml de tampon et soniqués 2 fois une min. à la puissance de 5 W. Les membranes basales sont culottées par centrifugation à 25 000 g pendant 15 min. (16 500 RPM rotor 50.2 Ti). Les membranes endothéliales en suspension dans le surnageant sont précipitées par centrifugation 1 heure à 100 000 g (40 000 RPM) et mises en suspension dans le volume minimum de tampon Tris. Les membranes basales et endothéliales sont conservées pendant plusieurs semaines à -70°C.

ISOLEMENT DES PLAQUETTES
PAR GEL FILTRATION

réf. TANGEN O. , BERMAN H.J. , MAFEY P . *Gel filtration a new technique for separation blood from plasma.*
Thromb.Diath. Haemorrh. (1971) , 25 , 268-276 .

PRINCIPE

Les plaquettes sont isolées par gel filtration.

MATERIEL ET METHODES

1) Reactifs :

- Tampon Tyrode pH 7,2 (sans ions divalents).

| | |
|--|--------|
| * Phosphate monosodique (PO ₄ NaH ₂)..... | 0,05 g |
| * Phosphate monopotassique (PO ₄ KH ₂)..... | 0,1 g |
| * KCl..... | 0,2 g |
| * NaCl..... | 8 g |
| * D-glucose..... | 1 g |
| * Eau distillée qsp..... | 1 l |

- Tampon Tyrode BSA pH 7,2 (sans ions divalents).

* BSA à 2% (p/v) dans le tampon Tyrode

2) Methode :

Les plaquettes sont recueillies à partir de sang collecté sur citrate de sodium 3,8% (p/v) (un volume de citrate pour 9 volumes de sang).

Après une centrifugation de 10 min. à 1000 tours/min. et à température ambiante, le plasma riche en plaquettes (environ 200 000 à 400 000 plaquettes/ μ l) est soumis à une chromatographie de gel filtration sur colonne (2,8 X 9,6 cm) de Sepharose 2B (Pharmacia fine Chemicals) équilibrée en tampon Tyrode BSA pH 7,2. Le débit est de 60 ml/h.

Les plaquettes commencent à être éluées après le passage de 20 ml de tampon. L'apparition des plaquettes dans les tubes peut être facilement estimée visuellement par la turbidité de l'éluat ou par l'augmentation de la D.O. estimée à . L'état d'activation et de viabilité plaquettaire est contrôlé en microscopie électronique .

Fiche Technique 28

INTERACTIONS LIPOPROTEINES / PLAQUETTES

Réf. MARTIN-NIZARD F., RICHARD B., TORPIER G., FRUCHART J.C., DUTHILLEUL P., DELBART C.. Analysis of phosphatidylcholine transfert during HDL binding to platelets using a fluorescent analog of phosphatidylcholine. THROMBOSIS RESEARCH (1987) , 46 , 811-825

MATERIEL ET METHODES

Les plaquettes sont réparties dans des tubes à raison d'environ 10^8 plaquettes par tubes auxquelles sont ajoutés 700 μ l de plasma (HDL^{flu} + LDL^{flu}). Laisser en contact 3 heures à 4°C ou à 37°C. Laver le culot de plaquettes à 4°C par 700 μ l de tampon Tyrode ou par 700 μ l de plasma dépourvu de plaquettes (plasma centrifugé à 7000 tours/min. pendant 10 min.).

Centrifuger à 4000 tours/min. pendant 3 min..

Le culot et le surnageant sont récupérés en vue d'une extraction de phospholipides selon la technique de Folch et de leur analyse qualitative en chromatographie sur couches minces ou quantitative en fluorimétrie.

Fiche Technique 29

FIXATION POST MORTEM DES ^{125}I -HDL₃ DANS LES CAPILLAIRES
CEREBRAUX.

PRINCIPE

Les solutions de HDL₃ radioactives sont injectées dans le cercle de Willis pour permettre une irrigation des capillaires cérébraux qui seront ensuite isolés.

MATERIEL

- cerveau de boeuf venant d'être abattu
- 1 l de PBS-CMF (Phosphate Buffered Saline : Calcium-Magnesium Free)
- 500 ml DMEM tamponé en Hépès 10 mM 4°C
- 100 ml DMEM tamponé en Hépès 10 mM + 0,2% SAB 4°C
- solution de ^{125}I -HDL₃ à 100 µg/ml (200 à 400 cpm/ng)
- solution de ^{125}I -HDL₃ à 100 µg/ml additionnée d'un excès de HDL₃ froide à 2 mg/ml

METHODE

Le cerveau est conservé dans le tampon PBS-CMF à 4°C. Une première injection de 30 ml de PBS-CMF permet d'éliminer le sang contenu dans les vaisseaux et microvaisseaux du cerveau. Puis 2 ml de solution de HDL radioactives en présence ou non de HDL non marquées sont injectées par le cercle de Willis.

Après incubation 30 min à 4°C, les capillaires sont lavés par :

- 2 fois 5 ml de DMEM-Hépès,
- 1 fois 5 ml de DMEM-Hépès + 0,2% SAB,
- 1 fois 5 ml de DMEM-Hépès.

Les méninges sont retirées, les circonvolutions irriguées sont prélevées et placées en tampon PBS-CMF avant d'être homogénéisées dans un Pottere par 10 aller-retour avec le système de clearance A (76 µm) puis par 10 allers-retours avec le système de clearance B (25 µm) dans ce tampon.

Prélever 1 ml d'homogénat et filtrer le reste sur tamis de 180 nm puis sur le tamis de 60 nm.

Les capillaires retenus sur le tamis sont lavés dans le tampon PBS-CMF. Leur radioactivité est comptée. La quantité de protéines est dosée selon la méthode de Petersen (fiche technique 3).

Fiche Technique 30

ETUDE DE LA FIXATION, DE L'INTERNALISATION ET DE LA DEGRADATION
DES LIPOPROTEINES PAR LES CELLULES EN CULTURE

Ref. GOLDSTEIN et BROWN. Binding and degradation of low density lipoprotein by cultured human fibroblasts. J. Biol. Chem., (1974), 249, 5153-5162.

PROTOCOLE

Les cellules cultivées en boîtes de Pétri de 35 mm sont incubées 48 heures avant l'étude dans un milieu composé de DMEM, glutamine, gentamicine, amphotéricine et 5% de LPDS pour l'étude de la fixation des LDL ou 0,2% de BSA à la place du LPDS pour l'étude de la fixation des HDL₃.

1) ETUDE DE LA FIXATION

Les cellules sont refroidies à 4°C. Le milieu de culture est aspiré et remplacé par 0,7 ml de DMEM tamponné à l'HEPES 10 mM, pH 7,2, additionné de 5% de LPDS, ou 0,2% de BSA, et de lipoprotéines marquées et froides. L'incubation est réalisée dans la glace pendant 2 heures en présence ou non d'un excès de lipoprotéines froides.

- La radioactivité non fixée est éliminée de la façon suivante :
- 3 lavages par 2 ml de PBS.
 - 3 lavages par 2 ml de PBS + 0.2% de BSA.
 - 3 lavages par 2 ml de PBS.

Les cellules sont reprises par 0,5 ml de NaOH 0.1M. La radioactivité résiduelle est mesurée ainsi que la concentration en protéines de chaque boîte. Les résultats sont exprimés pour chaque concentration en ¹²⁵I-LDL ou ¹²⁵I-HDL₃ en ng de lipoprotéines fixés par mg de protéines cellulaires.

2) ETUDE DE L'INTERNALISATION

Le milieu est aspiré et remplacé par 0,7 ml de ce même milieu additionné des lipoprotéines marquées et/ou froides. Les cellules sont incubées 2 heures à 37°C. Le protocole de lavage est identique à celui utilisé pour l'étude de la fixation. Les cellules sont finalement incubées 15 min. à température ambiante en présence d'1 ml de solution de trypsine 0,05%/EDTA 0,02% en PBS.

La protéolyse est stoppée par l'addition d'1 ml de serum de veau. Les cellules sont mises en suspension (aspiration-refoulement) et placées dans un tube. La radioactivité est mesurée. Elle représente la somme des deux phénomènes : la fixation et l'internalisation. Les tubes sont centrifugés 10 min. à 1000 g. Le surnageant est éliminé, le culot est lavé par 1 ml de PBS et centrifugé dans les mêmes conditions. Le culot final est repris par 0,5 ml de NaOH 0,1M. La radioactivité, qui représente les lipoprotéines internalisées, est mesurée. Les protéines sont dosées.

3) ETUDE DE LA DEGRADATION

Les cellules sont incubées 90 min. à 4°C selon le même protocole que celui utilisé pour la fixation. Elles sont lavées de la manière suivante :

- 2 lavages au PBS
- 2 lavages au PBS + 0,2% de BSA
- 2 lavages au PBS.

Les boîtes sont remplies par 1 ml de DMEM + 5% de LPDS et incubées entre 90 et 120 min. à 37°C. Le surnageant d'incubation est récupéré et additionné de 0,25 ml d'acide trichloracétique à 50% (P/V). Après incubation 1 heure à 4°C, le précipité est éliminé par centrifugation. 1 ml de surnageant est prélevé, stocké en tube de verre et additionné de 5 µl de solution à 40% de IK (P/V) et du même volume d'H₂O₂ 30%. Le surnageant est additionné d'1 ml de chloroforme, agité au Vortex et laissé au repos jusqu'à décantation totale. La radioactivité est mesurée sur 0,5 ml du surnageant. Les résultats sont exprimés en ng de lipoprotéines dégradées par mg de protéines cellulaires. Un témoin de dégradation spontanée des lipoprotéines en l'absence de cellules a été retiré de chacun des points.

Fiche Technique 31

ETUDE DE LA FIXATION DES HDL₃ SUR LES MEMBRANES
ENDOTHELIALES ET BASALES DES CAPILLAIRES CEREBRAUX
DOT BLOT

PRINCIPE

Les membranes sont incubées en présence des ¹²⁵I-HDL₃. La radioactivité non fixée est éliminée par filtration sur une membrane (pores de 0,2 µm).

REACTIF

Tampon d'incubation : DMEM tamponné à l'HEPES 10 mM, pH 7,4 et additionné de 0,2% de BSA. Le tampon est passé sur filtre de 0,22 µm avant chaque utilisation.

PROTOCOLE

Les membranes endothéliales ou basales (5 µg de protéines membranaires) sont incubées en présence de concentrations variables de ¹²⁵I-HDL₃ (de 2 à 50 µg/ml). La fixation non spécifique est déterminée par l'addition de HDL₃ froides à une concentration 20 fois supérieure. L'étude est réalisée dans le tampon d'incubation, en tube à essai avec un volume final de 120 µl. Chaque point est réalisé en triple exemplaire. Après incubation 1 heure à 4°C sous agitation, 100 µl de chaque tube sont déposés sur une plaque de filtration de 96 puits (Millipore - Millititer GV). Cette plaque est déposée sur un système de filtration sous vide (Millipore - Millititer vacuum holder - voir schéma). Les membranes retenues sur le filtre sont lavées par 5 fois 100 µl de tampon d'incubation. La dernière filtration est prolongée de manière à sécher le filtre. Chaque puits est ensuite découpé à l'aide d'un emporte-pièce et sa radioactivité est mesurée. Les résultats sont exprimés en ng de HDL₃ fixées par mg de protéines membranaires.

PREPARATION DE RECEPTEURS DES HDL

Réf. GRAHAM D. , ORAM J.F. ; Identification and caracterisation of a HDL binding protein in cell membranes by ligand blotting J.Biol.Chem. (1987) 262, N :16 : 7439-7442

MATERIEL ET METHODES

- TBS Tris HCl 10 mM pH 7,4 contenant :
 - NaCl 150 mM
 - Benzamidine 1 mM
 - EDTA 0,5 mM
 - Fluorure de phényl méthyl sulfonyl 1mM
dissous dans du diméthyl sulfoxide (DMSO)
- CHAPS 15 mM

Les cellules endothéliales d'aorte bovine (ABAE) sont lavées 3 fois en PBS-CMF 0,2% BSA à température ambiante puis refroidies à 4°C. Les cellules sont ensuite grattées en TBS, récupérées et centrifugées à 200 g pendant 5 min. à 4°C. Le culot est resuspendu en TBS puis centrifugé à 100 000 g pendant 60 min. à 4°C. Le culot est ensuite solubilisé en TBS contenant du CHAPS 15 mM et placé à 4°C pendant 15-20 min.. La concentration en CHAPS est ensuite ajustée en dessous de la concentration critique micellaire (< 9 mM). Le précipité formé est récupéré après centrifugation à 100 000 g pendant 60 min. à 4°C.

Le culot est stocké à -70°C.

LIGAND BLOTTING

Réf. GRAHAM D. L., ORAM J.F.. Identification and characterisation of a High Density Lipoprotein binding protein in cell membranes by ligand blotting. J. Biol. Chem. (1987), 262(16), 7439-7442.

PRINCIPE

Les protéines membranaires immobilisées sur nitrocellulose conservent leur capacité à fixer les HDL. Cette propriété est utilisée pour visualiser les sites de fixation par incubation de la nitrocellulose dans une solution de ^{125}I -HDL₃, lavages et autoradiographie.

MATERIEL ET METHODES

- Feuilles de nitrocellulose BA 85 0,45 μm .
- Film radiographique Kodak X-O mat S.
- Casette Philips munie d'écrans amplificateurs Cronex HI-plus (Dupont)
- Tampon de saturation TRIS HCl pH 7,4
 - * Tris 10 mM
 - * NaCl 10 mM
 - * SAB 1% (p/v)
 - * Lait en poudre sans matière grasse 1% (p/v)

Les extraits membranaires sont déposés sur une bandelette de nitrate de cellulose (entre 10 et 30 μg de protéines par dépôt). Les bandes de nitrate de cellulose sont préincubées 2 heures en tampon de saturation à 4°C puis soit en présence de ^{125}I -HDL₃ (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) soit en présence de ^{125}I -HDL₃ (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) + un excès de HDL₃ non marquées (600 $\mu\text{g}/\text{ml}$) pendant 2 heures à température ambiante. Les bandes sont ensuite lavées dans le tampon de saturation sous agitation pendant 1 min., 20 min., 20 min. et 1 min.. Laisser sécher les bandes de nitrate de cellulose, les sceller sous film plastic pour éviter la contamination. L'autoradiographie se fait pendant 1 nuit à -70°C.

B I B L I O G R A P H I E

BIBLIOGRAPHIE

- . ALAUPOVIC, P., LEE, D.M., Mc CONATY, W.I. - Studies of the composition and structure of plasma lipoproteins. Distribution of lipoproteins families in major density classes of normal human plasma lipoproteins. Biochim. Biophys. Acta, 1972, 260, 689-696.
- . ABBEY, M., SAVAGE, J.K., MACKINSLUN, A.M., BARTER, P.J., CALRERT, G.D. - Detection of lipid transfert protein activity in rabbit liver perfusate. Biochim. Biophys. Acta, 1984, 793, 481-484.
- . AUSSEL, C., MASSEYEF, F. - On rat alpha-fetoprotein as a fatty acid carrier influence of the structure of fatty acids. Biochim. Biophys. Acta, 1983, 752, 324-328.
- . AVIRAM, M., BROOKS, J.G. - Platelet interaction with high and low density lipoproteins. Atherosclerosis, 1983, 46, 259-264.
- . BACHORICK, P.S., FRANCKLIN, F.A., VIRGIL, D.G., KWITEROVICH, P.O. - High affinity uptake and degradation of apoprotein E free high density lipoprotein and low density lipoprotein in cultured porcine hepatocytes. Biochemistry, 1982, 21, 5675-5688.
- . BACHORICK, P.S., VIRGIL, D.G., KWITEROVICH, P.O. - Effect of apolipoprotein E free HDL on cholesterol metabolism in cultured Pig hepatocytes. J. Biol. Chem., 1987, 262, n° 28, 13636-13645.
- . BALLANTYNE, C.M., VEGA, G.L., EAST, C., RICHARDS, G., GRUNDY, S.M. - Low density lipoprotein metabolism in cerebrotendinous xanthomatosis. Metabolism, 1987, 36, n° 3, 270-280.
- . BALLOU, L.R., CHEUNG, N.Y. - Inhibition of human platelet phospholipase A₂ activity by unsaturate fatty acids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82, 371-375.
- . BAR, R.S., DE ROSE, A., SANDRA, A., PEACOCK, M.L., OWEN, W.G. - Insulin binding to microvascular endothelium of intact heart : a kinetic and morphometric analysis. Am. J. Physiol., 1983, 244, E 447-E 458.
- . BARBARAS, R., PUCHOIS, P., GRIMALDI, P., BARKIA, A., FRUCHART, J.C., AILHAUD, G. - Relationship in adipose cells between. The presence of receptor sites for high density lipoproteins and the promotion of reverse cholesterol transport. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1987, 149, n° 2, 545-554.

- . BECK, D.W., VINTERS, H.V., HART, M.N., CANCELLA, P.A. - Glial cells influence polarity of the blood brain barrier. J. of Neuropathology and Experimental Neurology, 1984, 43, n° 3, 219-224.
- . BEGGS, J.L., WAGGENER, J.D. - Transendothelial vesicles transport of protein following compression injury to the spinal cord. Lab. Invest., 1976, 34, 428-439.
- . BELL, F.P. - Cholesterol exchange between microsomal, mitochondrial and erythrocyte membranes and its enhancement by cytosol. Biochim. Biophys. Acta, 1975, 398, 18-27.
- . BEREZIAT, G., CHAMBAZ, J., TRUGMAN, G., PEPIN, D., POLONOVSKI, J. - Turn over of phospholipid linoleic and arachidonic acids in human platelets from plasma lecithins. J. Lipid Res., 1978, 19, 450-495.
- . BERTLER, A., FLAK, B., OWMAN, C. - The localization of monoaminergic blood brain barrier mechanisms. Pharmacol. Rev., 1966, 18, 369-385.
- . BESTERMAN, J.M., DURONIO, V., CUATRECASAS, P. Rapid formation of diacylglycerol from phosphatidylcholine. A pathway for generation of a second messenger. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, 83, 6785-6789.
- . BETZ, A.L., CSEJTEY, J., GOLDSTEIN, G.W. - Hexose transport and phosphorylation by capillaries isolated from rat brain. Am. J. Physiol., 1979, 236, C 96-C 102.
- . BETZ, A.L., FIRTH, J.A., GOLDSTEIN, G.W. - Polarity of the blood brain barrier distribution of enzymes between the luminal and antiluminal membranes of brain capillary endothelial cells. Brain Res., 1980, 192, 17-28.
- . BIELD, A., KRAUS, R. - Uber eine bisher unbekannte toxische Wirkung der Gallensäuren auf das Zentralnervensystem. Zentbl. Inn Med., 1898, 19, 1185-1200.
- . BLUMENTHAL, R., RALSTON, E., DRAGSTEN, P., LESERMAN, L.D., WEINSTEIN, J.N. - Lipid Vesicle cell interactions : analysis of a Model for transfer of transfer of contents from adsorbed vesicles to cells. Membrane Biochemistry, 1982, 4, n° 4, 283-303.
- . BLUSZTAJN, J.K., WURTMAN, R.J. - Choline biosynthesis by a preparation enriched in synaptosomes from rat brain. Nature (London), 1981, 290, 417-418.

- . BOOYSE, F.M., BELL, S., SEDLAK, B., RAFELSON, M.E. - Development of an in vitro vessel wall model for studying certain aspects of platelet vessel (endothelial) interactions. Artery, 1975, 1, 507-517.
- . BOURRE, J.M. - Origin of aliphatic chains in brain. INSERM Symposium, 14, 1980. Elsevier/North Holland/Biomedical Press. Nicole BAUMANN editor.
- . BOURRE, J.M., DAUDU, O., BAUMANN, N. - Ontogénèse de trois systèmes de biosynthèse des acides gras dans les microsomes cérébraux. Relation avec la myélinisation. Biochimie, 1976, 58, 1277-1279.
- . BOURRE, J.M., GOZLAN-DEVILLIERRE, N., DAUDU, O., BAUMANN, N.. - Is there a Blood Brain Barrier Relationship for saturated fatty acids during development. Biol.Neonate, 1978, 34, 182-186.
- . BOURRE, J.M., GOZLAN-DEVILLIERRE, N., POLLET, S., MAURIN, Y., BAUMMAN, N. - In vivo incorporation of exogenous stearic acid in synaptosomes : high occurrence of non esterified fatty acids. Neurosciences Letters, 1977, 4, 309-313.
- . BOURRE, J.M., PASCAL, G., DURAND, G., DUMONT, O., MASSON, O., PICIOTTI, M. - Alterations in the fatty acid composition of rat brain cells (neurons, astrocytes and oligodendrocytes) and of subcellar fractions(myelin and synaptosomes) induced by a diet devoid of n-3 fatty acids. J. Neurochem., 1984, 43, 342-348.
- . BOURRE, J.M., POLLET, S., CHAIX, G., DAUDU, O., BAUMANN, N. - Etude "in vitro" des acides gras synthétisés dans les microsomes de cerveaux de souris normales et "quacking". Biochimie, 1973, 55, 1473-1479.
- . BOURRE, J.M., POLLET, S., DUBOIS, G., BAUMANN, N. - Biosynthèse des acides gras à longue chaîne dans les microsomes de cerveau de souris. C.R. Acad. Sci., Paris, 1970, 271, 798-801.
- . BOWMAN, P.D., BETZ, A.L., GOLDSTEIN, G.W. - Culture of endothelial cells from neural capillaries. Biology of endothelial cells. Martinus-Nishoff Publishers. Boston, ISBN 0.89839.587.3, 1984, 3, 27-33.
- . BOWMAN, P.D., BETZ, A.L., AR, D., WOLINSKY, J.S., PENNEY, J.B., SHIVERS, R.R., GOLDSTEIN, G.W. - Primary culture of capillary endothelium from rat brain. In vitro, 1981, 17, 353-362.
- . BRADBURY, M.W.S.- Why a blood brain barrier. T.I.N.S., 1979, 2, 36-38.

- . BRIGHTMAN, M.W. - The distribution within the brain of ferritin injected into cerebrospinal fluid compartments. II. Parenchymal distribution. Amer. J. Anat., 1965, 117, 193-219.

- . BRIGHTMAN, M.W., HORI, M., RAPOPORT, S.I., REESE, T.S., WESTERGAARD, E. - Osmotic opening of tight junctions in cerebral endothelium. J. Comp. Neurol., 1973, 152, 317-326.

- . BRIGHTMAN, M.W., REESE, T.S. - Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. J. Cell Biol., 1969, 40, 648-677.

- . BRINTON, E.A., KENAGY, R.D., ORAM, J.F., BIERMAN, E.L. - Regulation of high density lipoprotein binding activity of aortic, endothelial cells by treatment with acetylated low density lipoprotein. Arteriosclerosis, 1985, 5, 329-335.

- . . BROADWELL, R.D., SALLMAN, M. - Expanding the definition of the blood brain barrier to protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, 78, 7820-7824.

- . BROCKMAN, R.L., LOW, J.H., KEZDY, E.J. - Catalysis by adsorbed enzymes. The J. Biol. Chem., 1973, 248, n° 14, 4965-4970.

- . BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.L. - Receptor mediated control of cholesterol metabolism. Science, 1976, 191, 150-154.

- . BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.L. - Les récepteurs des LDL, le cholestérol et l'athérosclérose. Pour la Science, janvier 1985, 62-74.

- . BROWN, J.R., SCHOCKLEY, P. - Serum albumin : structure and characterization of its ligand binding sites. In : Lipid Protein interaction, edited by P.C. JOST and O.H. GRIFFITH, New York : Wiley, 1982, 25-68.

- . BURR, G.O., BURR, M.M. - On the nature and role of the fatty acids essential in nutrition. J. Biol. Chem., 1930, 86, 587-621.

- . BURR, G.O., BURR, M.M. - A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. J. Biol. Chem., 1929, 82, 345-367.

- . CANCELLA, P.A., DE BAULT, L.E. - Neutral amino acid transport properties of cerebral endothelial cells in vitro. J. Neuropathology and Experimental Neurol., 1983, 42, 191-199.

- . CARR, B.R., SIMPSON, E.R. - Cholesterol synthesis by human fetal hepatocytes : effect of lipoproteins. Am. J. Obstet. Gynecol., 1984, 150, 551-557.

- . CHACKO, G.K. - Characterization of high density lipoprotein binding sites in rat liver and testis membranes. Biochim. Biophys. Acta, 1984, 795, 417-426.

- . CHAIT, A., ELSEMBERG, S., STEINMETZ, A., ALBERS, J.J., BIERMAN, E.L. - Low density lipoprotein modified by lipid transfer protein have altered biological activity. Biochim. Biophys. Acta, 1984, 795, n° 2, 314-325.
- . CHAMBAZ, J., WOLF, C., PEPIN, D., BEZIAT, G. - Phospholipid and fatty acid exchange between human platelets and plasma. Biol. Cell., 1980, 77, 223-230.
- . CHEN, Y.D.I., KRAEMER, F.B., REAVEN, G.M. - Identification of specific high density lipoprotein binding sites in rat testis and regulation of binding by human chorionic gonadotropin. J. Biol. Chem., 1980, 355, 9162-9170.
- . CHILD, P., MYHER, J.J., KUYPERS, F.A., OPDENKAMP, J.A.F., KUKSIS, A., VAN DEENEN, U.M. - Acyl selectivity in the transfer of molecular species of phosphatidylcholine from human erythrocytes. Biochim. Biophys. Acta, 1985, 812, 321-332.
- . COOK, H.W. - In vitro formation of polyunsaturated fatty acids by desaturation in rat brain : some properties of the enzyme in developing brain and comparison with liver. J. Neurochem., 1978, 30, 1327-1334.
- . COOK, S.L., BOUMA, S.R., HUESTIS, W.H. - Cell to vesicle Transfer of intrinsic Membrane Proteins : effect of Membrane fluidity. Biochemistry, 1980, 19, 4601-4607.
- . CORDLE, S.R., CLEGG, R.A., YEAMAN, S.J. - Purification and characterization of bovine lipoproteins using heparin Sepharose chromatography. J. Lipid Res., 1985, 26, 721-725.
- . CORNFORD, E.M. - The blood brain barrier : a dynamic regulatory interface. Molecular Physiology, 1985, 1, 219-259.
- . CRAIN, R.C., ZILVERSMIT, D.B. - Two non specific phospholipid exchange proteins from beef liver. I. Purification and characterization. Biochemistry, 1980, 19, 1433-1439.
- . CRAIN, R.C., ZILVERSMIT, D.B. - Two non specific phospholipid exchange proteins from beef liver. II. Use in studying the asymmetry and transbilayer movement of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and sphingomyelin in intact rat erythrocytes. Biochemistry, 1980, 19, 1440-1447.

- . CREWS, F.T., MORITA, Y., Mc GIVNEY, A., HIRATA, F., SIRAGANIAN, R.P., AXELROD, J. - Ig E-mediated Histamine Release in Rat Basophilic Leukemia Cells : receptor activation, phospholipid methylation, Ca²⁺ flux and release of Arachidonic Acid. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1981, 212, n° 2, 561-571.

- . CRONE, C. - Facilitated transfer of glucose from blood into brain tissue. J. Physiol., 1965, 181, 103-113.

- . CURTISS, L.K., PLOW, E.F. - Interaction of plasma lipoproteins with human platelets. Blood, 1984, 64, 365-372.

- . DAERR, W.H., GIANTURCO, S.H., PATSCH, J.R., SMITH, L.C., GOTT, A.M. - Stimulation and suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase in normal human fibroblasts by High Density lipoprotein subclasses Biochim. Biophys. Acta, 1980, 612, 287-301.

- . DASHTI, N., WOLFBAUER, G., ALAUPOVIC, P. - Binding and degradation of human High Density Lipoproteins by hepatosome cells line Hep G2. Biochim. Biophys. Acta, 1985, 833, 100-110.

- . DAVSON, H., OLDENDORF, W.H. - Transport in the central nervous system. Proc. R. Soc. Med., 1967, 60, 326-329.

- . DAWIDOWICZ, E.A. - Lipid Exchange : transmembrane movement, spontaneous movement and Protein. Mediated transfer of lipids spontaneous Movement and Protein. Mediated transfer of lipids and cholesterol. Curr. Top. Membr. Transp., 1987, 29, 175-202.

- . DAWSON, R.M.C., HEMINGTON, N., IRVINE, R.F. - The inhibition of diacyl-glycerol stimulated intracellular phospholipases by phospholipids with a phosphatidylcholine containing a polar group. Biochem. J., 1985, 230, 61-68.

- . DAWSON, R.M.C., IRVINE, F.R., BRAY, J., QUINN, P.S. - Long chain unsaturated diacyl-glycerol cause a perturbation in the structure of phospholipid bilayers rendering them susceptible to phospholipase attack. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1984, 125, 836-842.

- . DE BAULT, L.E., CANCELLA, P.A. - Gamma glutamyl transpeptidase in isolated brain endothelial cells : induction by glial cells in vitro. Science, 1980, 207, 653-655.

- . DELORME, P., GAYE, T.I., GRIGNON, G. - Diffusion of hoseradish peroxidase perfused through the lateral ventricle of the chick telencephalon. Cell Tissue Res., 1975, 157, 535-540.

- . DEMPSEY, M.E. - Regulation of lipid Metabolism by a lipid-Carrying Protein. Curr. Top. Cell. Reprl., 1984, 24, 63-86.
- . DERMETZEL, R. - Junctions in the central nervous system of the cat.
IV. Interendothelial junctions of cerebral blood vessels from selected areas of the brain. Cell. Tissue Res., 1975, 164, 45-62.
- . DEUEL, H.J., MARTIN, C.R., ALFIN-SLATER, R.B. - The effect of fat level of the diet on general nutrition. The requirement of essential fatty acids for pregnancy and lactation. J. Nutr., 1954, 54, 193-208.
- . DHOPEHWARKAR, G.A., MEAD, J.F. - Uptake and transport of fatty acids into the brain and the role of the blood brain barrier system. Adv. Lipid Res., 1973, 11, 109-142.
- . DHOPEHWARKAR, G.A., SUBRAMANIAN, C., MEAD, J.F. - Rapid uptake of (I ¹⁴C) acetate by the adult rat brain 15 seconds after carotid injection. Biochim. Biophys. Acta, 1971, 248, 41-52.
- . DREYFUS, J.C. - Actualité du facteur Willebrand. Medecine Sciences, 1988, 1, 50-51.
- . DUCKWITZ-PETERLEIN, G., EILENBERGER, G., OVERATH, P. - Phospholipid exchange between bilayer membranes. Biochim. Biophys. Acta, 1977, 469, 311-325.
- . DUFFY, K.R., CHOI, T.B., PARDRIGE, W.M. - In vivo evidence that brain insulin originates from blood. Clin. Res., 1986, 34, 57 A-65 A.
- . DURAND, G., PASCAL, G., LEGRAND, P., GOUNELLE DE PONTANET, H. - Effets comparés d'huiles végétales et d'huiles de poisson sur la cholestérolémie des rats. Relations entre la composition en acides gras des lipides de la ration, celle des lipides sériques et la cholestérolémie. Med. Nutr., 1985, 21, n° 6, 391-405.
- . EHRLICH, P. - Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus Eine Farbenanalytische Studie. Hirschwald, Berlin, 1885.
- . FIDGE, N.H. - Partial purification of a high density lipoprotein binding protein from rat liver and kidney membranes. FEBS Letters, 1986, 199, n° 2, 265-268.
- . FIDGE, N.H., KAGANI, A., O'CONNOR, M. - Identification of a high density lipoprotein binding protein from adrenocortical membranes. Biochim. Biophys. Res. Commun., 1985, 129, n° 3, 759-765.

- . FIDGE, N.H., LEONARD-KANESVSKY, M., NESTEL, P. - The hormonal stimulation of high density lipoprotein binding internalization and degradation by cultured rat adrenalcortical cells. Biochim. Biophys. Acta, 1983, 793, 180-186.
- . FIDGE, N.H., NESTEL, P.J. - Identification of apolipoproteins involved in the interaction of human high density lipoprotein with receptors on cultured cells. J. Biol. Chem., 1985, 260, 3570-3575.
- . FORTE, T.M., LUMINGREN, C., NORDHAUSEN, R.W., NICHOLS, A.V. - Formation of phospholipid rich HDL : a model for square packing lipoprotein particles found in interstitial fluid and in abetalipoproteinemic plasma. Biochim. Biophys. Acta, 1985, 834, 386-395.
- . FRANK, H.J.L., PARDRIDGE, W.M. - A direct in vitro demonstration of insulin binding to isolated brain microvessel. Diabetes, 1981, 30, 757-768.
- . FRANK, H.J.L., PARDRIDGE, W.M., MORRIS, W.L., ROSENFEL, R.G., CHOI, T.B.- Binding and internalization of insulin and insulin like growth factors by isolated brain microvessels. Diabetes, 1986, 35, 654-661.
- . FREDICKSON, D.S., GORDON, R.S. - The metabolism of albumin bound, C¹⁴-labelled unesterified fatty acids in normal human subjects. J. Clin. Invest., 1958, 37, 1504-1515.
- . FRIEDLANDER, E.J., CARAS, I.W., PEN, L., LIN, H., BLOCH, K. - Supernatant protein factor facilitates intermembrane transfer of squalene. J. Biol. Chem., 1980, 255, 8042-8045.
- . GHANDOUR, M.S., LANGLEY, O.K., VARGA, V. - Immunohistological localization of gamma glutamyl transpeptidases in cerebellum at light and electron microscope levels. Neuro. Sci. Lett., 1980, 20, 125-128.
- . GIMBRONE, M.A., MAJEAUG, R., ATKINSON, W.J., SADLER, W., CRUISE, S.A. - Angiotensin converting enzyme activity in isolated brain microvessels. Life Sci., 1979, 25, 1075-1084.
- . GJEDDE, A., CRONE, C. - Blood brain glucose transfer : repression in chronic hyperglycemia. Science, 1981, 214, 456-457.



- . GLASS, C., PITTMAN, R.C., WEINSTEIN, D.B., STEINBERG, D. - Dissociation of tissue uptake of cholesterol ester from that of apoprotein AI of rat plasma HDL : selective delivery of cholesterol ester to livers adrenal acid gonads. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, 80, 5434-5439.
- . GLOMSET, J.A. - The plasma lecithin : cholesterol acyltransferase reaction J. Lipid. Res., 1968, 9, 155-167.
- . GLOMSET, J.A., NORUM, K.R. - The metabolic role of lecithin cholesterol acyltransferase : perspectives from pathology. Adv. Lipid Res., 1973, 11, 1-65.
- . GOLDMANN, E.E. - Die äussere und innere Sekretion des gesunden und kranken. Organismus im Lichte der "vitalen Färbung". Beitr. Z. Klin. Chirurg., 1909, 64, 192-265.
- . GOLSTEIN, G.W., BETZ, A.L. - La barrière qui protège le cerveau. Pour la Science, novembre 1986, 84-94.
- . GOZLAN-DEVILLIERRE, N., BAUMANN, N., BOURRE, J.M. - Mouse brain uptake and metabolism of stearic acid. Biochimie, 1976, 58, 1129-1133.
- . GRAHAM, D.L., ORAM, J.F. - Identification and characterization of High Density Lipoprotein binding protein in cell membranes by ligand binding. J. Biol. Chem., 1987, 262, n° 16, 7439-7442.
- . GREGORIADIS, G., ALLISON, A.C. - Liposomes in Biological Systems. John Wiley et Sons, New York, 1980.
- . GRIFFIN, D.E., GIFFELS, J. - Study of protein characteristics that influence entry into the cerebrospinal fluid of normal mice and mice with encephalitis. J. Clin. Invest., 1982, 70, 289-298.
- . GUYNNE, J.T., STRAUSS, J.F. - III : the role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands. Endocrine Rev., 1982, 3, 299-310.
- . HADJISKY, P. - L'appareil cardiovasculaire. In : Précis d'Histologie humaine". R. COUJARD, J. POIRIER, J. RACADOT Eds, Masson, Paris, 1980, 361-382.
- . HANSSON, H.A., JOHANSSON, B.B., BLOMSTRAND, C. - Ultrastructural studies on cerebrovascular permeability in acute hypertension. Acta Neuropath. (Berl.), 1975, 32, 187-198.
- . HARDEBO, J.E., FALCK, B., OWMAN, C.H. - A comparative study on the uptake and subsequent decarboxylation of monoamine precursors in cerebral microvessels. Acta Physiol., Scand., 1979, 107, 161-167.

- . HASELBACHER, G.K., SCHWAB, M.E., PASI, A., HUMBEL, R.E. - Insulin like growth factor II (IGF II) in human brain : regional distribution of IGF II and of higher molecular mass forms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82, 2153-2163.
- . HAVEKES, L., SCHOUTEN, D., VAN HINSBERG, V., DEWITT, E. - Characterization of the binding of apo E free high density lipoprotein to cultured human endothelial cells. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1984, 122, n° 2, 785-790.
- . HAVRANKOVA, J., ROTH, J. - Concentrations of insulin and of insulin receptors in the brain are independent of peripheral insulin levels. J. Clin. Invest., 1979, 64, 636-645.
- . HAW, J.J., LEFAUCCONNIER, J.M. - La barrière hémato-encéphalique. Rev. Neurol., Paris, 1983, 139, n° 11, 611-624.
- . HELLINGS, J.A., KAMP, H.H., WIRTZ, K.W.A., VAN DEENEN, L.L.M. - Transfer of phosphatidylcholine between liposomes. Eur. J. Biochem., 1974, 47, 601-605.
- . HELMKAMP, G.M. - Effects of phospholipides fatty acid composition and membrane fluidity on the activity of bovine brain phospholipids exchange protein. Biochemistry, 1980, 19, n° 10, 2050-2056.
- . HEMMING, W.A. - Coated vesicles and protein transport. Medical Hypotheses, 1980, 6, 125-1216.
- . HERRLINGER, H., ANZIL, A.P., BLINGINGER, K., KRONSKI, D. - Endothelial microtubular bodies in human brain capillaries and venules. J. Anat., 1974, 118, 205-209.
- . HICKS, J.T., ALBRECHT, P., RAPOPORT, S.I. - Entry of neutralizing antibody to measles into brain and cerebrospinal fluid of immunized monkeys after osmotic opening of the blood brain barrier. Exp. Neurol., 1976, 53, 768-779.
- . HIRANO, A. - Fine structural alterations of small vessels in the nervous system. CERVOS-NAVARRO, J., ed., Pathology microcirculation, Berlin, De Gruyter Co, 1974, 203-223.

- . HIRANO, A., GHATAK, N.R., BECKER, N.H., ZIMMERMAN, H.M. - A comparison of the fine structure of small blood vessels in intracranial and retroperitoneal malignant lymphomas. Acta Neuropathol. (Berl.), 1974, 27, 93-103.
- . HOEG, J.M., DEMOSKY, S.J., EDGE, S.B., GREGG, R.F., OSBORNE, J.C., BREWER, M.B.- Characterization of a human hepatic receptor for high density lipoprotein. Arteriosclerosis, 1985, 5, 228-237.
- . HOHENGASSER, C.J.M., THORNBURG, J.T., VAN PARIDOU, P.A., VANDER SCHAFT, P., WIRTZ, K.W.A. - Phosphorylation and degradation of exogenous phosphatidylinositol incorporated into friend erythroleukemic cells. J. Biol. Chem., 1986, 261, 6255-6259.
- . HOMAYOUN, P., DURAND, G., PASCAL, G., BOURRE, J.M. - Alteration in fatty acid composition of adult rat brain capillaries and choroid plexus induced by a diet deficient in n-3 fatty acids. Slow recovery by substitution with a non deficient diet. J. Neurochem. (soumis à publication).
- . HORIE, T., MIZUMA, T., KASAI, S., AWAZU, S. - Conformational change in plasma albumin due to interaction with isolated rat hepatocyte. Am. J. Physiol., 1988, 254, G 465-G 470.
- . JAHNIG, F. - Lipid exchange between membranes. Biophys. Journal, 1984, 46, n° 6, 687-695.
- . JANSEN, H., HULSMANN, W.C. - Heparin releasable (liver) lipase (S) may play a role in the uptake of cholesterol by steroid secreting tissues. Trends Biochem. Sci., 1980, 5, 265-268.
- . JEFFERIES, W.A., BRANDOM, M.R., HUNT, S.V., WILLIAMS, A.F., GATTER, K.C., MASSON, D.Y. - Transferrin receptor on endothelium of brain capillaries. Nature, 1984, 312, 162-163.
- . JOHNSON, W.J., BAMBERGER, M., ROTHBLAT, G.H., PHILLIPS, M.C. - Phospholipase treatment of HDL reduces cellulase cholesterol efflux. Atherosclerosis, 1985, sept./oct., 5 (5), 540 a-547 a.
- . JOHNSON, W.J., BAMBERGER, M.J., LATTA, R.A., RAPP, P.E., PHILLIPS, M.C., ROTHBLAT, G.H. - The bidirectional flux of cholesterol between cells and lipoproteins. The J. Biol. Chem., 1986, 261, n° 13, 5766-5776.
- . . JOKGENSEN, A.E., HOLMER, R.G. - Essential fatty acid deficient rats : growth and testes development. Lipids, 1969, 4, 501-506.

- . JOO, F. - Effect of $N^{6}O^{2}$, dibuyryl cyclic 3',5', adenosine monophosphate on the pinocytosis of brain capillaries of mice. Experientia, 1972, 28, 1470-1471.
- . KAPLAN, M.R., SIMONI, R.D. - Transport of cholesterol from the plasma membrane. J. Cell. Biol., 1985, 101, 446-453.
- . KARLIN, J.B., JOHNSON, W.J., BENEDICT, C.R., CHACKO, G.K., PHILLIPS, M.C., ROTHBLAT, G. - Cholesterol flux between cells and high density lipoprotein. J. Biol. Chem., 1987, 262, n° 26, 12557-12564.
- . KOLATA, G. - Molecular biology of brain hormones. Science, 1982, 215, 1223-1229.
- . KRISTENSSON, K., OLSSON, Y. - Accumulation of protein tracers in pericytes of the central nervous systems following. Systemic injection in immature mice. Acta Neurol. Scand., 1973, 49, 189-194.
- . KUMAR, P., KUMAR, S., MARSDEN, H.B., LYNCH, P.G., FARNSHOAW, E. - Weibel Palade bodies in endothelial cells as a marker for angiogenesis in brain tumors. Cancer Res., 1980, 40, 2010-2019.
- . LACKENBUSH, F.W., KUMMEROW, F.A., STENEBOC, K. - The effectiveness of linoleic arachidonic and linolenic acids in reproduction and lactation. J. Nutr., 1942, 24, 213-217.
- . LADINSKY, W.A., DREWES, L.R. - Characterization of the blood brain barrier : protein composition of the capillary endothelial cell membrane. J. Neurochem., 1983, 41, 1341-1348.
- . LEE, J.C. - Anatomy of the blood brain barrier under normal and pathological conditions. In : "Histology and histopathology of the nervous systems". W. HAYMAKER et R.D. ADAMS eds. C.C. THOMAS, Springfield, 1982, 798-870.
- . LEITERSDORF, E., ISRAELI, A., STEIN, O., EISENBERG, S., STEIN, Y. - The role of apolipoproteins of HDL in the selective uptake of cholesteryl linoleyl ether by cultured rat and bovine adrenal cells. Biochim. Biophys. Acta, 1986, 878, 320-329.
- . LEVIN, E., KLEEMAN, C.R. - Significance of different routes of introduction on the transport of substances into the brain. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1970, 135, 685-689.
- . LEWANDOWSKY, M. - Zur lehre der Cerebrospinal flüssigkeit. Z. Klin. Med., 1900, 40, 480-494.
- . LOUDE, S.C., FAIVRE, A., BARRET, A., GROUSELLE, D., PUYMIRAT, J., TIXIER-VIDAL, M. - Release of immunoreactive TRH in serum free culture of mouse hypothalamic cells. Dev. Brain. Res., 1983, 9, 231-234.

- . LUND-KATZ, S., HAMMERSCHLAG, B., PHILLIPS, M.C. - Kinetics and mechanism of free cholesterol exchange between human serum. High and low density lipoproteins. Biochemistry, 1982, 21, 2964-2969.
- . MACLOUF, S., BELLUCCI, S. - Thromboxane A₂, prostacycline ou le duel plaquettes-vaisseaux. Médecine Sciences, 1986, 2, 552-557.
- . MAHLEY, R.W., INNERARITY, T.L. - Lipoprotein receptors and C homeostasis. Biochim. Biophys. Acta, 1983, 737, 197-222.
- . MAURER, P., MOSKOWITZ, M.A., LEVINE, L., MELAMED, E. - The synthesis of prostaglandins by bovine cerebral microvessels. Prostaglandins and Medicine, 1980, 4, 153-161.
- . MARGOLIS, L.B., BALBAKOV, B.A., NEYFAKH, A.A., VICTOROV, A.V., GALKINA, S.I., BERGELSON, L.D. - Liposome adsorption and cell to liposome lipid transfer are mediated by the same cell-surface sites. Biochim. Biophys. Acta, 1984, 804, 23-30
- . MARTIN, O.C., PAGANO, R.E. - Transbilayer Movement of fluorescent Analogs of Phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine at the plasma Membrane of cultured cells. J. Biol. Chem., 1987, 262, n° 12 , 5890-5898.
- . MARTIN-NIZARD, F., RICHARD, B., TORPIER, G., NOUVELOT, A., FRUCHART, J.C., DUTHILLEUL, P., DELBART, C. - Analysis of phospholipid transfer during HDL binding to platelets using a fluorescent analog of phosphatidylcholine. Thrombosis Res., 1987, 46, 811-825.
- . MERESSE, S., DEHOUCK, M.P., DELORME, P., BENSALD, M., TAUBER, J.P., DELBART, C., FRUCHART, J.C., CECCHELI, R. - Bovine brain endothelial cells express tight junctions and monoamine oxidase activity in long term culture. J. Neurochem. (soumis à publication).
- . MICHELL, B., KIRK, C. - G Protein control of inositol phosphate hydrolysis. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1986, 233, 305-312.
- . MORHRHAMER, H., HOLMAN, R. T. - Alteration of the fatty acid composition of brain lipids by varying levels of Dietary essential fatty acids. J. Neurochem., 1963, 10, 523-527.
- . MORAND, O., BAUMANN, N., BOURRE, J.M. - In vivo incorporation of exogenous (I-¹⁴C) stearic into neurons and astrocytes. Neuroscience Letters, 1979, 13, 177-181.
- . MORTON, R.E. - Binding of plasma derived lipid transfer protein to lipoprotein substrates. J. Biol. Chem., 1985, 260, 12593-12599.
- . NICHOLS, J.W., PAGANO, R.E. - Kinetics of soluble lipid monomer diffusion between vesicles. Biochemistry, 1981, 20, 2783-2789.

- . NISHIZUKA, Y. - Studies and perspectives of protein kinase C. Science, 1986, 233, 305-312.
- . NOUVELOT, A., DEDONDER, E., SEZILLE, G., BOURRE, J.M. - Incidence du taux des acides gras essentiels du régime sur la répartition des acides gras polyinsaturés des lipoprotéines chez le raton. Reprod. Nutr., Dévelop., 1985, 25, n° 1 B, 251-253.
- . OLDENDORF, W.H., CORNFORD, M.E., BROWN, W.J. - The large apparent work capability of the blood brain barrier a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. Ann. Neurol., 1977, 1, 409-417.
- . OLSSON, Y., KLATZ, O.I., CARSTEN, A. - The effect of acute radiation in jury on the permeability and ultrastructure of intracerebral capillaries. Neuropathol. Appl. Neurobiol., 1975, 1, 59-68.
- . ORAM, J.F., BRINTON, E.A., BIERMAN, E.L. - Regulation high density lipoprotein receptor activity in cultured human skin fibroblast and human arth smooth muscl cells. Clin. Invest., 1983, 72, 1611-1621.
- . ORAM, J.F., JOHNSON, C.J., AULINSKAS-BROWN, T. - Interaction high density lipoprotein with its receptor on cultured fibroblasts and macrophages. J. Biol. Chem., 1987, 262, n° 5, 2405-2410.
- . OWEN, J.S., Mc INTYRE, N., GILLETT, M.P.T. - Lipoproteins, cell membranes and cellular functions. Trends Biochem. Sci., 1984, 9, 238-242.
- . PAGANO, R.E., LONGMUIR, K.J., MARTIN, O.C., STRUCK, D.K. - Intracellular translocation and metabolism of a fluorescent labeled intermediate in lipid biosynthesis within cultured fibroblasts. J. Cell. Biol., 1981, 91, 872-877.
- . PAGANO, R.E., TAKEICHI, M. - Adhesion of phospholipid vesicles to chinese Hamster fibroblasts. J. Cell. Biol., 1977, 74, 531-546.
- . PAKKALA, S.G., FILLERUP, D.L., MEAD, J.F. - The very long chain fatty acids of human Brain sphingolipids. Lipids, 1966, 1, n° 6, 449-450.
- . PANOS, T.C., FINERTY, J.C., WALL, C.R. - Increased metabolism in fat deficiency relation to dietary fat. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1956, 93, 58i-587.
- . PAPAHAJJOPOULOS, D., POSTE, G., SCHAEFFER, B.E. - Fusion of mammalian cells by unilamellar lipid vesicles : influence of lipid surface charge, fluidity and cholesterol. Biochim. Biophys. Acta, 1973, 323, 23-42.

- . PARDRIDGE, W.M. - Kinetics of competitive inhibition of neutral amino-acid transport across the blood brain barrier. J. Neurochem., 1977, 28, 103-108.
- . PARDRIDGE, W.M., EISENBERG, J., CEFALU, W.T. - Absence of albumin receptor on brain capillaries in vivo or in vitro. Am. J. Physiol., 1985, 249, E 264-E 272.
- . PARDRIDGE, W.M., EISENBERG, J., YANG, J. - Human blood brain barrier insulin receptor. J. Neurochem., 1985, 44, 1771-1778.
- . PARDRIDGE, W.M., YANG, J., EISENBERG, J. - Blood brain barrier protein phosphorylation and dephosphorylation. J. Neurochem., 1985, 45, 1141-1142.
- . PARDRIDGE, W.M., YANG, J., EISENBERG, J., MIETUS, L.J. - Antidobies to blood brain barrier bind selectively to brain capillary endothelial lateral membranes and to a 46 K protein. J. Cereb. Blood Flow Metab., 1986, 6, 203-210.
- . PATURNEAU-JOVAS, M., BAUMANN, N., BOURRE, J.M. - Biosynthèse des acides gras dans les mitochondries de cerveau de souris en présence de malonyl-CoA ou d'acétyl-CoA. Biochimie, 1976, 58, 341-349.
- . PARKS, J.S., MARTIN, J.A., JOHNSON, F.L., RUDEL, L.L. - Fusion of LDL with cholesterol-PL microemulsion. Prevention of particle fusion by apolipoprotein AI. J. Biol. Chem., 1985, 260, n° 5, 3155-3164.
- . PEARSE, B.M.F. - Coated vesicles from pig brain : purification and biochemical characterization. J. Mol. Biol., 1975, 97, 93-98.
- . PETERS, A., PALAY, S., WEBSTER, H. - The fine structure of the nervous system : the neurons and supporting cells. W.B. Saunders, Philadelphia, 1976.
- . PHILLIPS, M.C., JOHNSON, W.J., ROTHBLAT, G.M. - Mechanisms and consequences of cellular cholesterol exchange and transfer. Biochim. Biophys. Acta, 1987, 906, 223-276.
- . PHILLIPS, P., KUMAR, P., KUMAR, S., WOGHE, M. - Isolation and characterization of endothelial cells from rat and cow white matter. J. Anat., 1979, 129, 261-272.
- . PITAS, R.E., BOYLES, J.K., LEE, S.H., HUI, D., WEISGRABER, K.H. - Lipoprotein and their receptors in the central nervous system. J. Biol. Chem., 1987, 262, 14352-14360.
- . PITTMAN, R.C., THOMAS, P., ROSENBAUM, M.S., TAYLOR, C.A. - A nonendocytotic mechanism for the selective uptake of high density lipoprotein associated cholesterol esters. J. Biol. Chem., 1987, 262, n° 6, 2443-2450.

- . PLANTAVID, M., PERRET, B.P., CHAP, H., SIMON, M.F., DOUSTE-BLAZY, L. -
Assymetry of arachidonic acid metabolism in the phospholipids of the
human platelet membrane as studie with purified phospholipases.
Biochim. Biophys. Acta, 1982, 693, 451-460.
- . POSTE, G., PAPAHAJDOPOULOS, D. - Lipid vesicles as carriers for introducing
materials into cultured cells : influence of vesicle lipid composition
on mechanisms (s) of vesicle incorporation into cells. Proc. Natl. Acad.
Sci. USA, 1976, 73, 1603-1607.
- . POLLET, S., BOURRE, J.M., BAUMANN, N.A. - Etude de la biosynthèse "de novo"
des acides gras dans le cerveau de souris normales "quaking" et hétéro-
zygotes pour le caractère "quaking". C.R. Acad. Sci., 1969, 268, 2146-2149.
- . POLLET, S., BOURRE, J.M., CHAIX, G., DAUDU, O., BAUMANN, N. - Biosynthèse
des acides gras dans les microsomes de cerveaux de souris. Biochimie,
1973, 55, 333-341.
- . POLONOVSKI, J., BEUCLER, I. - Structure et métabolisme des lipoprotéines
plasmatiques. Pathol. Biol., 1983, 31, 225-236.
- . POVLISHOCK, J.T., KONTOS, H.A., DEWITT, D.S., WEI, E.P. - Effects of mechanical
brain injury and acute hypertension upon the cerebral vasculature.
CERVOS-NAVARRO, J. and FRITSCHKA, E. eds., Raven Press, New York, 1981,
67-75.
- . RAPOPORT, S.I. - Opening of the blood brain barrier by acute hypertension.
Exp. Biol., 1976, 52, 467-479.
- . REESE, T.S., KARNOVSKY, M.J. - Fine structural localization of a blood brain
barrier to exogenous peroxidase. J. Cell Biol., 1967, 34, 207-217.
- . RENKAWEK, K., MURRAY, M.R., SPATZ, M., KLATZO, I. - Distinctive histochemical
characteristics of brain capillaries in organotypic culture. Exp. Neurol.,
1976, 50, 194-206.
- . RICKERS, J., SPENERS, F., KADER, J.C. - A phospholipid transfer protein that
binds long chain fatty acids. FEBS Letters, 1985, 180, n° 1, 29-32.
- . RIFICI, V.A., EDER, H.A. - A hepatocyte receptor for HDL specific for apo A_I.
J. Biol. Chem., 1984, 259, 13814-13818.
- . RUSSEL, D.W., SCHNEIDER, W.J., YAMAMOTO, T., BROWN, M.S., LUSKEY, K.L. -
Domain map of the LDL receptor : sequence homology with the epidermal
growth factor precursor. Cell, 1984, 37, 577-585.

- . SALEN, G., GRUNDY, S.M. - The metabolism of cholestanol/cholesterol and bile acids in cerebrotendinous xanthomatosis. J. Clin. Invest., 1973, 52, 2822-2835.
- . SALEN, G., MERIWITHER, T.W., NICOLAU, G. - Chenodesoxycholic acid inhibits increase cholesterol and cholestanol synthesis in patient in cerebrotendinous xanthomatosis. Biochem. Med., 1975, 14, 57-65.
- . SALEN, G. - Cholestanol deposition in cerebrotendinous xanthomatosis : a possible mechanism. Ann. Intern. Med., 1971, 75, 843-851.
- . SALLI, C., MESSERI, P., OLIVERIO, A., PAOLETTI, R. - Deficiency of essential fatty acids during pregnancy and avoidance learning in the progeny. Pharm. Res. Comm., 1975, 7, 71-80.
- . SASAK, I.S., FERSZT, R., CERVOS-NAVARRO, J. - Transendothelial vesicular transport of protein in brain edema induced by ultraviolet irradiation. Acta Neuropathol. (Berl.), 1977, 40, 207-212.
- . SCHALTENBRAND, G., BAILEY, P. - Die perivaskuläre Pia gliamenbran des Gehirns. J. Psychol., Neurol., 1928, 35, 199-208.
- . SCHIMSCHOCK, J.R., ALVORD, E.C., SWANSON, P.D. - Cerebrotendinous xanthomatosis clinical and pathological studies. Arch. Neurol. (Chic.), 1968, 18, 688-698.
- . SCHMITZ, G., ROBENEK, H., LOHMANN, U., ASSMANN, G. - Interaction of high density lipoprotein with cholesteryl ester laden macrophages biochemical and morphological. Characterization of cell surface receptor binding endocytosis and resecretion of high density lipoprotein by macrophages. EMBO Journ., 1985, 4, 613-622.
- . SELIGMAN, P.A. - Structure and function of the transferrin receptor. Prog. Hematol., 1983, 13, 131-147.
- . SHIVERS, R.R. - The effect of hyperglycemia on brain capillary permeability in a lizard, *Anolis carolinensis*. In : Proceedings VIIth Neuroscience meeting, 1978, 4, 335-341.
- . SINCLAIR, A.J., CRAWFORD, M.A. - The accumulation of arachidonate and docosahexaenoate in the developing rat brain. J. Neurochem., 1972, 19, 1753-1758.
- . SLEIGHT, R.G., PAGANO, R.E. - Transport of a fluorescent phosphatidylcholine analog from the plasma membrane to the golgi apparatus. J. Cell Biol., 1984, 99, n° 2, 742-752.
- . SLEIGHT, R.G., PAGANO, R.E. - Transbilayer movement of a fluorescent phosphatidylethanolamine analogue across the plasma membranes of cultured mammalian cells. J. Biol. Chem., 1985, 260, n° 2, 1146-1154.

- . SLOTTE, J.P., ORAM, J.F., BIERMAN, E.L. - Binding of High Density Lipoprotein to cell receptors promotes translocation of cholesterol from intracellular membranes to cell surface. J. Biol. Chem., 1987, 262, n° 27, 12904-12970.
- . SPECTOR, A.A. - Fatty acid binding to plasma albumin. - J. Lipid Res., 1975, 16, 165-179.
- . SPECTOR, A.A., SANTOS, E.C., ASHBROOK, J.D., FLETCHER, J.E. - Influence of free fatty acid concentration on drug binding to plasma albumin. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1973, 226, 247-258.
- . STAEHLIN, L.A., HULL, B.E. - Junctions between living cells. Scientific Americ., 1978, 238, 140-152.
- . STECK, T.L., KEZDY, F.J., LAWGE, Y. - An activation collision mechanism for cholesterol transfer between membranes. J. Biol. Chem., 1988, 263, n° 26, 13023-13031.
- . STEIN, Y., HALEPRIN, G., LEITERSDORF, E., DABACH, Y., HOLLANDER, G., STEIN, O.- Metabolism of Liposomes prepared from a labelled ether analog of 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine in the rat. Biochim. Biophys. Acta, 1984, 793, 354-364.
- . STEIN, O., VANDERHOEK, J., STEIN, Y. - Cholesterol content and sterol synthesis in human skin fibroblasts and rat aortic smooth muscle cells exposed to lipoprotein. Depleted serum and High Density Apolipoprotein/phospholipid Mixtures. Biochim. Biophys. Acta, 1976, 431, 347-358.
- . STEINMAN, R.M., MELLMAN, I.S., MULLER, W.A., COHN, Z.A. - Endocytosis and the recycling of plasma membrane. J. Cell Biol., 1983, 96, 1-27.
- . STEWART, P.A., WILEY, M.J. - Developing nervous tissue induces formation of blood brain barrier characteristics in invading endothelial cells : a study using quail-chick transplantation chimeras. Dev. Biol., 1981, 84, 183-192.
- . STROUVE-VALLET, J., PASCAUD, M., - Désaturation de l'acide linoléique par les microsomes du foie et du cerveau du rat en développement. Biochimie, 1971, 53, 699-703.
- . SUN, G.Y. - Effects of a fatty acid deficiency on lipids of whole brain microsomes and myelin in the rat. J. Lipid Res., 1972, 13, 56-62.
- . SVENDGAARD, N.A., BJORKLUND, A., HARDEBO, J.F., STENEVI, U. - Axonal degeneration associated with a defective blood brain barrier in cerebral implants. Nature, 1975, 255, 334-337.

- . SWENN, Y., JONAS, A. - Substrate specificity of human plasma phospholipid transfer protein. Biochim. Biophys. Acta, 1985, 835, 279-290.
- . TACCONI, M., WURTMAN, R.J. - Phosphatidylcholine produced in Rat synaptosomes by N-methylation is enriched in polyunsaturated fatty acids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82, 4828-483f.
- . TALL, A.R., GREEN, P.H.R. - Incorporation of PC into spherical and discoidal lipoproteins during incubation of eeg PC vesicles with isolated high density lipoprotein plasma. J. Biol. Chem., 1981, 256, 2035-2044.
- . TALL, A.R., HOGAN, V., ASKINAZI, L., SMALL, D.M. - Interaction of plasma high density lipoprotein with dimyristoyllecithin multilamellar liposomes. Biochemistry, 1978, 17, 322-326.
- . TALL, A.R., SMALL, D.M. - Solubilization of phospholipid membrane by human high density lipoprotein. Nature, 1977, 265, 163-164.
- . THOMPSON, G. - New hopes for the treatment of coronary heart disease. Nature, 1986, 324, 412-420.
- . THOMPSON, N.L., BRIAN, A.A., Mac CONNELL, H.M. - Covalent linkage of a synthetic peptide to a fluorescent PL and its incorporation into supported phospholipid monolayers. Biochim. Biophys. Acta, 1984, 772, 10-19.
- . TYCKO, P., MAXFIELD, F.R. - Rapid acidification of endocytic vesicles containing alpha-2-macroglobulin. Cell, 1982, 28, 643-651.
- . VAN BOGAERT, L. - Nouvelles recherches sur la xanthomatose cérébrotendineuse. Rev. Neurol., 1969, 121, 98-100
- . VANDEURS, B. - Structural aspects of brain barriers, with special reference to the permeability of the cerebral endothelium and choroidal epithelium. Internat. Rev. Cytology, 1980, 65, 117-192.
- . VAN HOUTEN, M., POSNER, B.I. - Insulin binds to blood brain vessels in vivo. Nature, 1979, 282, 623-631.
- . VORBRODT, A.W., LOSSINSKY, A.S., WISNEWSKI, H.M., MORETZ, R.C., IWANOSKI, L.- Ultrastructural cytochemical studies of cerebral microvasculature in scapie infected mice. Acta Neuropathol., 1981, 53, 203-211.
- . WATTENBERG, B.W., SILBERT, D.F. - Sterol partitioning among intracellular membranes. J. Biol. Chem., 1983, 258, 2284-2289.

- . WESTERGAARD, E. - The blood brain barrier to horseradish peroxidase under normal and experimental conditions. Acta Neuropathol. (Berl.), 1977, 39, 181-187.

- . WESTERGAARD, E. - Ultrastructural permeability properties of cerebral microvasculature under normal and experimental conditions after application of tracers. In : "Advances in Neurology". CERVOS-NAVARRO, J. and FERSZT, R. eds. Raven Press, New York, 1980, 28, 55-77.

- . WIRTZ, K.W.A. - Transfer of phospholipids between membranes. Biochim. Biophys. Acta, 1974, 344, 95-117.

- . WIRTZ, K.W.A., VRIEND, G., WESTERMAN, J. - Kinetic analysis of the interaction of the phosphatidylcholine exchange protein with unilamellar vesicles and multilamellar liposomes. Eur. J. Biochem., 1979, 94, 215-221.

- . WOLFF, J.R., RAJAN, K.T., NOACK, W. - The fate and fine structure of fragments of blood vessels in CNS Tissue cultures. Cell Tissue Res., 1974, 156, 89-102.

- . XU, Y.H., GIETZEN, K., GALLA, H.J., SACKMANN, E. - Protein mediated lipid transfer. Biochem. J., 1983, 213, 21-24.

- . YAVIN, E., RICHTER, C., DUKSIN, D., YAVIN, Z. - Tunicamycin blocks neuritogenesis and ducosamine labeling of gangliosides in developing cerebral neuron cultures. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, 81, 5638-5642;

- . YOUYOU, A., DURAND, G., PASCAL, G., PICIOTTI, M., DUMONT, O., BOURRE, J.M.- Recovery of altered fatty acid composition induced by a diet devoid n-3 fatty acids in myelin, synaptosomes, mitochondria and microsomes of developing rat brain. J. Neurochem., 1986, 46, 224-228.

- . ZAHNISER, N.R., GOENS, M.B., HANAWAY, P.J., VINYCH, J.V. - Characterization and regulation of insulin receptors in rat brain. J. Neurochem., 1984, 42, 1354-1363.

- . ZUCKER, M.B., NACHMIAS, V.T. - Platelet activation. Arteriosclerosis, 1985, 5, 2-18.



RESUME

Le transport des lipides au niveau du système nerveux central (SNC) met en jeu des mécanismes encore méconnus. Les difficultés d'approche du problème résident dans la nature même de la barrière hémato-encéphalique ou BHE car elle n'est le siège que d'une très faible endocytose et présente l'originalité de posséder des jonctions serrées entre les cellules endothéliales.

L'utilisation d'une sonde lipidique fluorescente "in vivo" chez le rat nous a permis de mettre en évidence le rôle des lipoprotéines de haute densité ou HDL₃ dans l'approvisionnement lipidique cérébral : il varie en fonction de l'âge de l'animal et de la concentration en lipides de ces HDL₃. Cet approvisionnement ne semble pas dépendre d'un phénomène de diffusion simple des lipides. Ces échanges sont saturables et laissent présager de l'existence d'interactions spécifiques au niveau de la BHE.

L'utilisation d'une culture de cellules endothéliales de capillaires cérébraux, support de la BHE, nous a permis de mettre en évidence une fixation spécifique et saturable des HDL₃ sur des sites "récepteurs" qui reconnaissent les apolipoprotéines AI et AII. Aucun phénomène d'internalisation ni de dégradation ne sont mis en évidence. Les échanges lipidiques entre les transporteurs sériques et la BHE se réalisent au niveau de la membrane des cellules de la BHE.

Une étude du rôle des HDL dans les échanges lipidiques entre le sang et le cerveau a été également entreprise dans le cadre d'un dysfonctionnement de la xanthomatose cérébro-tendineuse. Cette maladie se caractérise par une accumulation de stérols et de leurs dérivés au niveau cellulaire. Une diminution de l'efflux des stérols a été enregistrée en réponse aux anomalies structurales des HDL, à la diminution de la fixation de ces lipoprotéines sur les récepteurs membranaires en relation avec une perte d'affinité. De plus il semble qu'une dysrégulation du nombre de récepteurs des HDL par les LDL soit à l'origine de ces accumulations. Ainsi il existerait des interactions spécifiques entre HDL₃ et BHE et qui réguleraient les échanges lipidiques indispensables au fonctionnement cérébral.

MOTS CLES Barrière Hémato-Encéphalique ou BHE
Lipoprotéines de haute densité ou HDL
échanges lipidiques
Xanthomatose Cérébro- Tendineuse ou XCT

SUMMARY

Lipid transport through the Blood-Brain Barrier (BBB) is still badly known and is regulated by the unusual structure of the endothelium of brain capillaries (absence of endocytosis and presence of tight junctions between endothelial cells).

In "vivo" injection of fluorescent phosphatidylcholine-labelled HDL₃ in rat brains clearly shows that the HDL can actively transfer their lipids as assessed by the presence of the fluorescent probe in the brain without any internalisation of the protein core. These exchanges don't look like simple diffusions. They seem to be a saturable phenomenon that predicts the existence of specific receptors.

Using ¹²⁵I-HDL₃, the binding of HDL to bovine brain endothelial cells (BBEC) was shown to be mediated by a saturable specific process (apolipoprotein AI or AII are recognized). However the HDL₃ were not subsequently degraded or internalized by the BBEC indicating that lipid exchanges between HDL and BBB take place in the membrane.

We have also studied the role of HDL in a case of Cerebro-Tendinous Xanthomatosis (CTX), a rare inherited cholesterol storage disease. We have shown a decrease in the sterol efflux in relation to modifications of the CTX-HDL structure, to the decrease of lipoprotein fixation on membrane receptor in relation with a loss of affinity. A regulation of the number of HDL or LDL receptors seems to be the origine of this storage.

Thus, specific interactions exist between HDL and BHE that could regulate the lipid exchange necessary for the brain functioning.

Key words Blood-Brain Barrier or BBB
High Density Lipoprotein or HDL
lipid transfert
Cerebro-tendinous Xanthomatosis or CTX