



ELSEVIER

ARTICLE ORIGINAL

Effet de la fluvastatine sur l'expression du CMH de classe I par les cellules endothéliales humaines

Fluvastatin affects HLA class I expression on endothelial cells

Guillaume Belliard, Stéphanie Coupel, Béatrice Charreau *

Institut national de la santé et de la recherche médicale, UMR 643 « Immunointervention en allo et xénotransplantation » et institut de transplantation et de recherche en transplantation (ITERT), CHU Hôtel-Dieu, 30, boulevard Jean-Monnet, 44093 Nantes cedex 01, France

Reçu le 16 février 2005 ; accepté le 6 juin 2005

MOTS CLÉS

Cellules
endothéliales ;
Statines ;
CMH ;
Immunomodulation ;
Inflammation

KEYWORDS

Endothelial cells;
Statins;
MHC;
Immunomodulation;
Inflammation

Résumé Au-delà de leur effet hypolipémiant, les inhibiteurs de la HMG coenzyme A réductase ou statines contrôlent de multiples mécanismes cellulaires. Les statines exercent en particulier un effet anti-inflammatoire et immunomodulateur sur les cellules endothéliales (CE). Nous avons étudié l'effet de la fluvastatine sur l'expression constitutive des molécules du CMH et sur la régulation du CMH de classe I et de classe II induite par un traitement à l'IFN γ . Nos observations confirment l'effet inhibiteur des statines sur l'induction de l'expression endothéliale des molécules du CMH de classe II. Notre étude indique que la fluvastatine affecte également l'expression des molécules du CMH de classe I (HLA-A, -B, -C) dont elle augmente l'expression constitutive. L'effet d'une forte concentration de fluvastatine (1 μ M) a le même effet que le traitement par l'IFN γ (augmentation d'un facteur 2 de l'expression des molécules de classe I à la surface des CE). La fluvastatine potentialise à forte dose (1 μ M) la régulation induite par l'IFN γ . L'effet global de la fluvastatine sur l'expression endothéliale du CMH est dose-dépendant, il apparaît dès 0,01 μ M pour l'inhibition du CMH de classe II et dès 0,1 μ M pour le CMH de classe I. En conclusion, nous démontrons que la fluvastatine affecte différemment les molécules du CMH de classe I et de classe II. Les conséquences fonctionnelles de cette modulation devront être évaluées in vitro et in vivo.

© 2005 Elsevier SAS et Association Société de Néphrologie. Tous droits réservés.

Abstract Originally designed to target elevated lipids, the "traditional" cause of atherosclerosis, statins might also confer vascular benefit by directly or indirectly modulating both the inflammatory and immune responses. Statins have been shown to downregulate MHC class II and CD40 expression on activated endothelial cells (EC). In this study, we investigate the potential effect of statins on MHC class I expression and regulation in response to IFN γ . Primary cultures of human ECs have been treated with increasing doses

Abréviations : CE, cellules endothéliales ; CMH, complexe majeur d'histocompatibilité ; IFN γ , interféron-gamma ; HLA, *human leucocyte antigens* ; HUVEC, *human umbilical vein endothelial cell* ; MFI, moyenne d'intensité de fluorescence.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : Beatrice.Charreau@univ-nantes.fr (B. Charreau).

of fluvastatin (0.01; 0.1 and 1 μ M) with or without IFN γ for 48 hours. Surface expression of MHC class I and class II has been analyzed by flow cytometry. Our data indicate that fluvastatin increases MHC class I expression on quiescent ECs by a dose-dependent effect. Furthermore, fluvastatin potentiates the MHC class I upregulation but prevents MHC class II induction triggered by IFN γ . These effects are reversed by mevalonate. In conclusion, our results suggest that while decreasing MHC class II expression, fluvastatin (at 0.1 and 1 μ M) upregulates MHC class I expression on ECs. Functional consequences of statin-mediated modulation of MHC on ECs have still to be elucidated in vitro and in vivo.

© 2005 Elsevier SAS et Association Société de Néphrologie. Tous droits réservés.

Introduction

Les inhibiteurs de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase (HMG-CoA réductase) ou statines sont devenus le traitement de référence de la plupart des formes d'hypercholestérolémie [1]. Le mécanisme d'action principal des statines est d'inhiber la biosynthèse du cholestérol par inhibition compétitive de l'HMG-CoA réductase. Cette inhibition compétitive est due à l'analogie structurale des statines avec l'HMG-CoA, le substrat naturel de l'enzyme [2].

Au-delà de leur effet hypolipémiant, les inhibiteurs de la HMG-CoA réductase ou statines contrôlent de multiples mécanismes cellulaires, et de nombreuses études montrent que les statines exercent un effet sur le système immunitaire [1]. Parmi les effets documentés des statines in vitro et in vivo sur l'endothélium, il convient de citer la stimulation de la production de monoxyde d'azote (NO), la modulation de la prolifération [3], la modulation de l'expression de molécules d'adhésion et de cytokines, l'apoptose, l'augmentation de l'activité fibrinolytique et la régulation de facteurs de transcription et récepteurs nucléaires [4-6]. L'inhibition de l'isoprénnylation, modification post-traductionnelle des protéines, est le mécanisme central du mode d'action des statines [7]. C'est par ce mécanisme que les statines exercent leur effet inhibiteur sur les protéines G hétérotrimériques et petites protéines G telles que Ras, Rac et Rho. Les petites protéines G forment une superfamille de protéines essentielles à la transduction du signal, à l'organisation du cytosquelette et au transport cellulaire. Ainsi, les statines inhibent la prolifération cellulaire en contrôlant l'activité de la GTPase RhoA [3,8].

La démonstration d'un effet immunomodulateur a tout d'abord été apportée par Kwak et al. dont les travaux ont montré une action inhibitrice des statines sur l'expression des molécules du CMH de classe II [9]. Cet effet inhibiteur s'exerce sur l'induction des molécules CMH de classe II (cellules endothéliales et monocytes-macrophages) par l'IFN γ et non sur l'expression constitutive des molécules CMH de

classe II. En effet, alors que l'expression constitutive du CMH de classe II est restreinte à un petit nombre de cellules spécialisées, l'expression du CMH de classe II peut être induite par l'IFN γ dans de nombreux types cellulaires. Cette régulation complexe est sous le contrôle du facteur transactivateur CIITA (« *class II transactivator* ») dont l'expression est très finement régulée par une série de promoteurs permettant la transcription de CIITA dans des conditions physiologiques distinctes. L'induction des molécules du CMH de classe II par l'IFN γ et l'effet inhibiteur des statines sur ce mécanisme impliquent le promoteur IV du facteur transactivateur CIITA [9]. L'inhibition de l'expression induite du CMH de classe II par les cellules endothéliales a pour conséquence de diminuer la capacité de ces cellules à activer des lymphocytes T allogéniques [9]. Depuis, d'autres études ont montré un effet des statines sur des molécules de costimulation telles que CD40 [10], et étendu l'effet des statines à d'autres types cellulaires impliqués dans la réponse immune tels que les cellules dendritiques. L'ensemble de ces observations suggère l'utilisation des statines comme molécules immunomodulatrices. Dans un contexte de greffe d'organes, une étude portant sur 1574 receveurs d'une transplantation rénale a indiqué un net bénéfice (24 % d'augmentation) du traitement par les statines sur la survie des patients [11].

Dans cette étude, nous avons analysé in vitro l'effet des statines, et plus particulièrement de la fluvastatine, sur l'expression basale et la régulation par l'IFN γ des molécules du CMH de classe I et de classe II. Cette étude, réalisée avec des cultures primaires de cellules endothéliales issues de veines de cordons ombilicaux, compare trois concentrations de fluvastatine (0,01 ; 0,1 et 1 μ M).

Matériel et méthodes

Réactifs

La fluvastatine nous a été gracieusement fournie par le laboratoire Novartis (Novartis Pharma SA,

Rueil-Malmaison, France). Le mévalonate (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) a été utilisé à 200 μ M.

Culture cellulaire et activation des cellules endothéliales

Les cellules endothéliales (HUVEC) ont été isolées à partir de cordons ombilicaux selon le protocole décrit par Jaffe et al. [12]. Les HUVEC sont cultivées dans le milieu *endothelial cell growth medium* (ECGM) supplémenté avec 10 % de sérum fœtal de veau, 0,004 ml/ml ECGS/héparine, 0,1 ng/ml hEGF, 1 ng/ml hbFGF, 1 μ g/ml hydrocortisone, 50 μ g/ml gentamycine et 50 ng/ml amphotéricine B (C-22010, PromoCell, Heidelberg, Germany), à 37 °C. Avant traitement, le milieu de culture est remplacé par du milieu ECGM supplémenté avec 2 % de sérum fœtal de veau. Les cellules sont incubées 18 heures en présence de statines avant traitement par l'IFN γ . Les CE ont été activées par un traitement de 48 heures en présence d'IFN γ (Imukin®, Boehringer Ingelheim, France ; 100 U/ml) en présence ou non de statines.

Immunomarquage et analyse par cytométrie de flux

Après traitement, les CE sont décollées à l'aide d'une solution de trypsine/EDTA (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France), lavées trois fois avec un tampon BSA 1 %/NaN₃ 0,05 % dans du PBS à 4 °C puis réparties à raison de 1.10^5 cellules par puits. Les CE sont incubées 30 minutes à 4 °C avec l'anticorps primaire (10 μ g/ml) puis lavées trois fois dans le tampon PBS/BSA 1 %/NaN₃ 0,05 %. La révélation est effectuée à l'aide d'un anticorps secondaire (10 μ g/ml) dirigé contre les Ig de souris et couplé au FITC (Jackson Lab., West Grove, PA). Les anticorps primaires utilisés pour cette étude sont : anti-ICAM-1 (B7H-11), anti-CMH classe I monomorphe (anti-HLA-A, -B, -C) ; (W6/32), anti-HLA-DR (clone L243 : anti-HLA-DRB1 + DRB4 IgG2a, monomorphe).

L'acquisition a été réalisée au moyen d'un Facs-Calibur® (Becton Dickinson, Mountain View, CA) sur 10 000 événements et l'analyse a été faite à l'aide du logiciel CellQuest Pro® (Becton Dickinson). Toutes les expériences présentées sont représentatives d'au moins trois expériences réalisées sur au moins deux cultures primaires issues de donneurs différents.

Résultats

Effet de la fluvastatine sur l'expression des molécules du CMH de classe I

Les CE humaines utilisées pour cette étude (HUVEC) expriment de façon constitutive les molécules du CMH de classe I (HLA-A, -B, -C) ; cette expression augmente lorsque les CE sont traitées par l'IFN γ [3,13]. Nous avons étudié l'effet de la fluvastatine sur l'expression constitutive des molécules du CMH (HLA-A, -B, -C) et sur la régulation du CMH de classe I et de classe II induite par un traitement à l'IFN γ . La Fig. 1 montre une expérience représentative indiquant que la présence de fluvastatine à 0,01 μ M n'a pas d'effet sur l'expression du CMH de classe I (moyenne d'intensité de fluorescence 162 vs 154). Cependant, le traitement des CE avec de plus fortes doses (0,1 et 1 μ M) augmente de façon significative et dose-dépendante l'expression des molécules CMH de classe I à la surface des CE. Le niveau d'expression produit par 1 μ M de fluvastatine est comparable à celui produit par le traitement par l'IFN γ (MFI : 320 et 354 respectivement pour la fluvastatine et l'IFN γ vs 154 pour les CE témoins). De la même façon, lorsque les CE sont activées par l'IFN γ , la concentration de 1 μ M accroît l'induction des molécules de classe I (MFI 513 vs 354 pour l'IFN γ seul), la fluvastatine utilisée à 0,01 ou 0,1 μ M n'a pas d'effet significatif.

Effet de la fluvastatine sur la régulation des molécules du CMH de classe II par l'IFN γ

Les CE humaines utilisées pour cette étude (HUVEC) n'expriment pas de façon constitutive les molécules du CMH de classe II. L'IFN γ induit l'expression des molécules CMH de classe II (HLA-DR, -DP, -DQ) [13]. La Fig. 2 montre une expérience représentative indiquant que le traitement par la fluvastatine, quelle que soit la concentration, n'induit pas l'expression du HLA-DR par les CE quiescentes. Lorsque les CE sont traitées par la fluvastatine en présence d'IFN γ , on observe un fort effet inhibiteur de la statine sur l'induction de l'expression du CMH de classe II (HLA-DR). Cet effet antagoniste est significatif dès 0,01 μ M (moyenne d'intensité de fluorescence 163 vs 235 sans statine). L'effet inhibiteur de la fluvastatine sur l'expression de HLA-DR est dose-dépendant avec un effet maximal observé à 1 μ M (moyenne d'intensité de fluorescence 43 vs 235 sans statine).

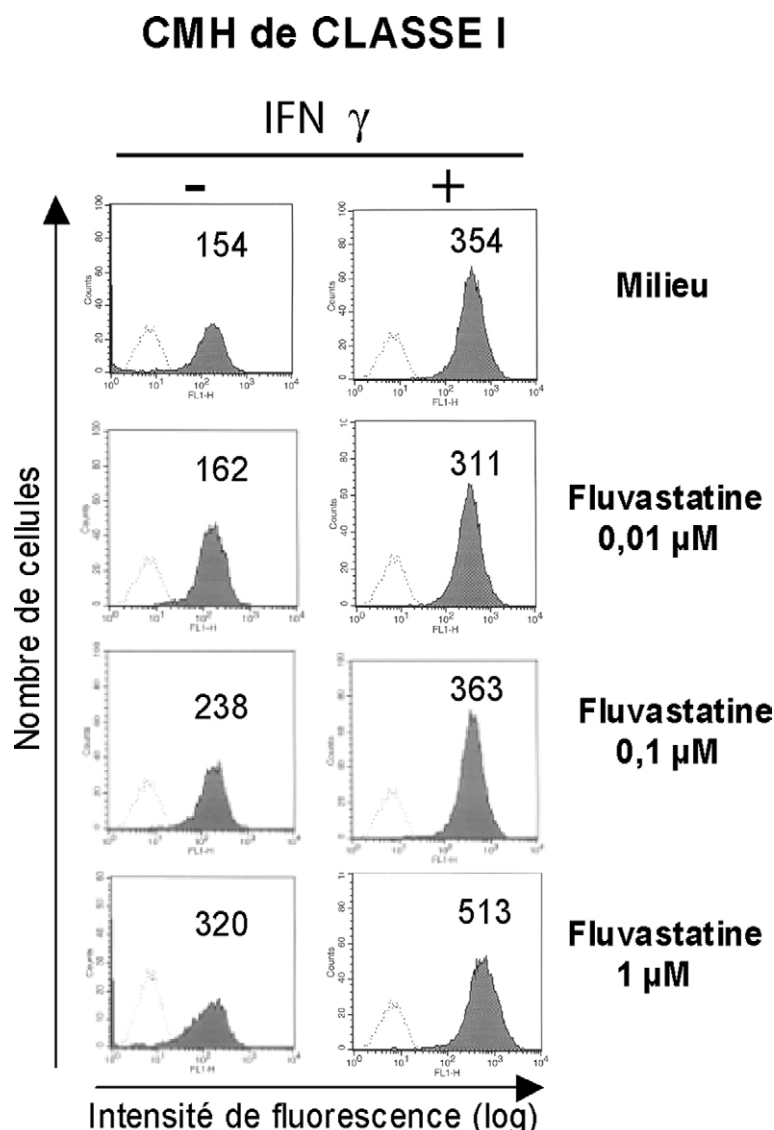


Figure 1 Effet de la fluvastatine sur l'expression des molécules du CMH de classe I.

Les cellules (HUVEC) ont été préincubées 18 heures avec de la fluvastatine (0,01 ; 0,1 ou 1 μ M) puis incubées pendant 48 heures en présence ou non d'IFN γ (100 U/ml). Après traitement, les cellules sont incubées avec un anticorps anti-HLA-A, -B, -C (histogramme noir) ou un anticorps irrelevant (histogramme blanc) 30 minutes à 4 °C. Après trois lavages, les cellules sont incubées avec un anticorps secondaire couplé au FITC 30 minutes à 4 °C. Les moyennes d'intensité de fluorescence (MFI) sont indiquées.

Le mévalonate bloque l'effet de la fluvastatine sur l'expression du CMH de classe I et de classe II

L'HMG-CoA réductase est l'enzyme qui catalyse l'étape limitante de conversion de l'HMG-CoA en mévalonate, le précurseur du cholestérol. Le mévalonate restaure la voie de synthèse du cholestérol. Pour vérifier la spécificité d'action de la fluvastatine sur l'expression des molécules du CMH par les CE, les cellules ont été traitées avec la statine en présence ou non de mévalonate (200 μ M). La Fig. 3 montre une expérience représentative indiquant que le mévalonate empêche efficacement la surexpression du CMH de classe I induite par la fluvastatine (1 μ M) (MFI : 501 vs 719 sans la statine). De

plus, le mévalonate prévient également la diminution de l'expression du CMH de classe II (HLA-DR) par la fluvastatine (MFI : 276 en présence de mévalonate, d'IFN γ et de fluvastatine vs 35 en présence d'IFN γ et de fluvastatine vs 345 en présence d'IFN γ seul).

Discussion

Dans cette étude, nous avons montré que la fluvastatine affecte, in vitro, l'expression des molécules du CMH par les cellules endothéliales humaines. Nos observations confirment l'effet inhibiteur des statines sur l'induction de l'expression endothéliale des molécules du CMH de classe II déjà rap-

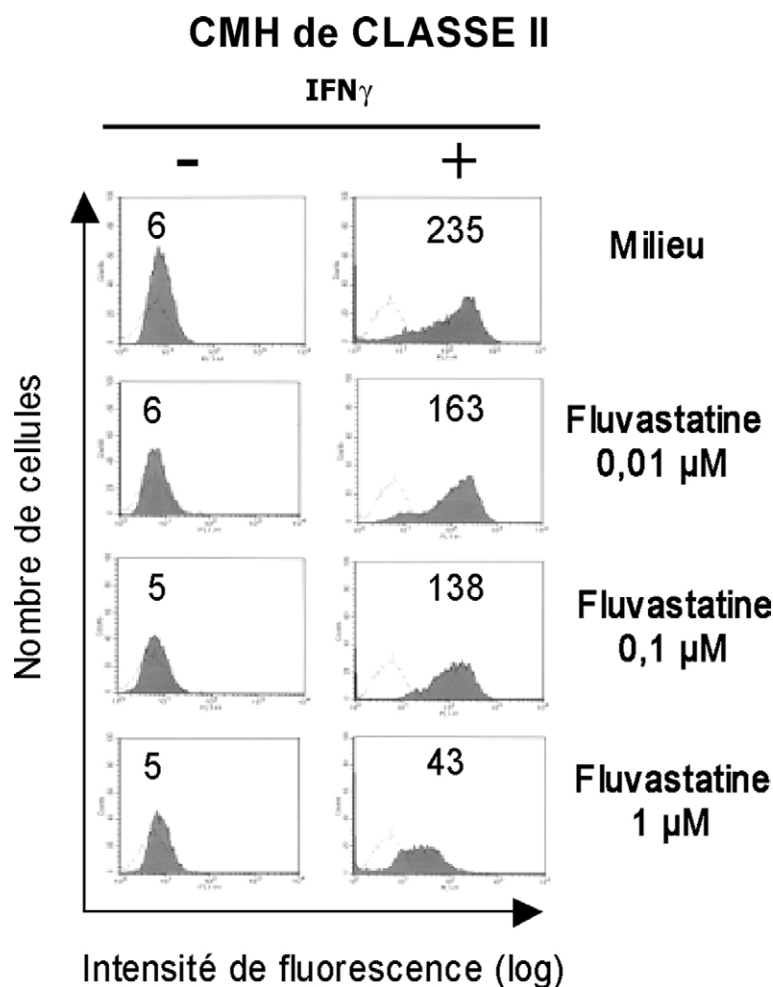


Figure 2 Effet de la fluvastatine sur la régulation des molécules du CMH de classe II par l'IFN γ .

Les cellules (HUVEC) ont été préincubées 18 heures avec de la fluvastatine (0,01 ; 0,1 ou 1 μ M) puis incubées pendant 48 heures en présence ou non d'IFN γ (100 U/ml). Après traitement, les cellules sont incubées avec un anticorps anti-HLA-DR (histogramme noir) ou un anticorps irrelevant (histogramme blanc) 30 minutes à 4 °C. Après trois lavages, les cellules sont incubées avec un anticorps secondaire couplé au FITC 30 minutes à 4 °C. Les moyennes d'intensité de fluorescence (MFI) sont indiquées.

porté par Kwak et al. [9]. Cependant, notre étude indique que la fluvastatine affecte également l'expression des molécules du CMH de classe I (HLA-A, -B, -C). Dans ce cas, la fluvastatine a pour effet d'augmenter l'expression constitutive des molécules du CMH de classe I. Nous n'avons pas observé cet effet avec d'autres statines testées dans les mêmes conditions (simvastatine, pravastatine, atorvastatine). Initialement, l'étude de Kwak et al., réalisée avec l'atorvastatine, ne montrait pas d'effet significatif de cette statine sur l'expression du MHC de classe I. L'effet d'une forte concentration de fluvastatine (1 μ M) est le même que celui du traitement par l'IFN γ (augmentation d'un facteur 2 de l'expression des molécules de classe I à la surface des CE). La fluvastatine exerce aussi un effet agoniste vis-à-vis de l'IFN γ et potentialise à forte dose (1 μ M) la régulation induite par cette cytokine. L'effet global de la fluvastatine sur l'expression endothéliale du CMH est dose-dépendant, il appa-

raît dès 0,01 μ M pour l'inhibition du CMH de classe II et dès 0,1 μ M pour le CMH de classe I.

L'ensemble de ces résultats confirme l'effet immunomodulateur des statines, déjà observé pour les molécules du CMH de classe II [9] et CD40 [10], et l'étend aux molécules du CMH de classe I pour de fortes doses de fluvastatine. Contrairement à l'effet inhibiteur décrit pour le CMH de classe II et CD40 dont l'effet immunomodulateur est clairement établi, les conséquences fonctionnelles de l'augmentation des molécules du CMH de classe I observée in vitro avec la fluvastatine dans notre étude restent à être évaluées.

En effet, dans un contexte de transplantation allogénique, l'expression des molécules du CMH de classe I du donneur par les cellules endothéliales du greffon participe à la réponse immune du receveur par la présentation directe des alloantigènes aux lymphocytes T CD8⁺ du receveur. L'expression accrue des molécules du CMH de classe I du donneur

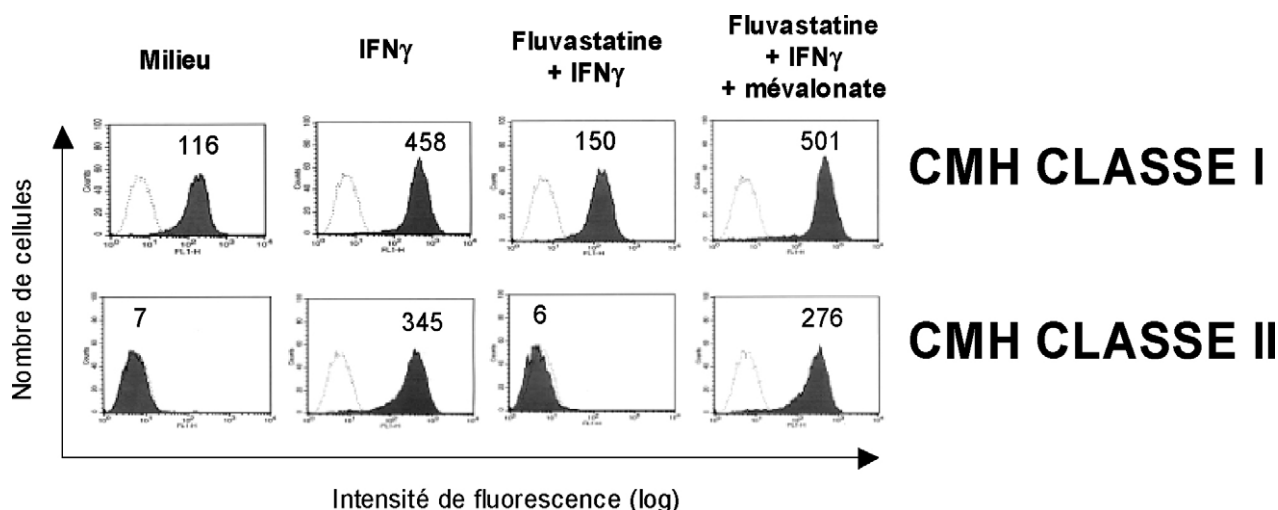


Figure 3 Le mévalonate bloque l'effet de la fluvastatine sur l'expression du CMH de classe I (A) et de classe II (B).

Les cellules (HUVEC) ont été préincubées 18 heures avec de la fluvastatine (1 μ M) en présence ou non de mévalonate (200 μ M) puis incubées pendant 48 heures en présence ou non d'IFN γ (100 U/ml). Après traitement, les cellules sont incubées avec un anticorps anti-HLA-A, -B, -C (histogramme noir), anti-HLA-DR (histogramme noir) ou un anticorps irrelevant (histogramme blanc) 30 minutes à 4 °C. Après trois lavages, les cellules sont incubées avec un anticorps secondaire couplé au FITC 30 minutes à 4 °C. Les moyennes d'intensité de fluorescence (MFI) sont indiquées.

pourrait également favoriser la réponse humorale et l'induction d'anticorps anti-donneur. Les molécules de classe I interviennent également dans le contrôle de l'activité des cellules NK par la reconnaissance des récepteurs exprimés par les cellules NK. Par conséquent, il serait également important de définir si l'effet régulateur de la statine sur l'expression du CMH de classe I modifie l'activité cytotoxique des cellules NK. Les cellules NK participent aussi à l'immunité naturelle par la cytolysse des cellules infectées ou tumorales. Il convient de noter qu'une étude récente n'a pas montré d'effet à dix ans de la symvastatine sur la mortalité ni sur l'incidence de cancer sur une cohorte de 2000 patients, traités ou non pendant cinq ans par la symvastatine puis traités librement [14]. À ce jour, les études cliniques ont démontré un effet bénéfique des statines sur la survie, la sévérité du rejet et l'artériopathie du greffon cardiaque. En revanche, le bénéfice des statines sur la survie des greffes de rein reste à démontrer. L'effet majeur rapporté est une réduction des maladies cardiaques qui sont la principale cause de décès, avec un greffon fonctionnel, chez les receveurs de transplantation rénale [15]. Ces résultats, en faveur d'un effet net des statines sur l'inflammation et l'athérogenèse lié à une diminution du cholestérol, montrent que leur effet immunosuppresseur demeure mal défini.

Remerciements

Ces travaux ont été réalisés avec le soutien de la Société française de néphrologie. Les auteurs remercient le laboratoire Novartis pour la fluvastatine.

Références

- [1] Maron DJ, Fazio S, Linton MF. Current perspectives on statins. *Circulation* 2000;101:207-13.
- [2] Istvan ES, Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science* 2001;292:1160-4.
- [3] Coupel S, Leboeuf F, Boulday G, Soulillou JP, Charreau B. RhoA activation mediates phosphatidylinositol 3-kinase-dependent proliferation of human vascular endothelial cells: an alloimmune mechanism of chronic allograft nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:2429-39.
- [4] Vincent L, Soria C, Mirshahi F, Opolon P, Mishal Z, Vannier JP, et al. Cerivastatin, an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, inhibits endothelial cell proliferation induced by angiogenic factors in vitro and angiogenesis in in vivo models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:623-9.
- [5] Morikawa S, Takabe W, Mataka C, Kanke T, Itoh T, Wada Y, et al. The effect of statins on mRNA levels of genes related to inflammation, coagulation, and vascular constriction in HUVEC. Human umbilical vein endothelial cells. *J Atheroscler Thromb* 2002;9:178-83.
- [6] Dichtl W, Dulak J, Frick M, Alber HF, Schwarzbacher SP, Ares MP, et al. HMG-CoA reductase inhibitors regulate inflammatory transcription factors in human endothelial and vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:58-63.
- [7] Graaf MR, Richel DJ, van Noorden CJ, Guchelaar HJ. Effects of statins and farnesyltransferase inhibitors on the development and progression of cancer. *Cancer Treat Rev* 2004;30:609-41.
- [8] Li X, Liu L, Tupper JC, Bannerman DD, Winn RK, Sebti SM, et al. Inhibition of protein geranylgeranylation and RhoA/RhoA kinase pathway induces apoptosis in human endothelial cells. *J Biol Chem* 2002;277:15309-16.
- [9] Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, Mach F. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nat Med* 2000;6:1399-402.

- [10] Mulhaupt F, Matter CM, Kwak BR, Pelli G, Veillard NR, Burger F, et al. Statins (HMG-CoA reductase inhibitors) reduce CD40 expression in human vascular cells. *Cardio-vasc Res* 2003;59:755-66.
- [11] Cosio FG, Pesavento TE, Pelletier RP, Henry M, Ferguson RM, Kim S, et al. Patient survival after renal transplantation III: the effects of statins. *Am J Kidney Dis* 2002;40: 638-43.
- [12] Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973;52:2745-56.
- [13] Le Bas-Bernardet S, Coupel S, Chauveau A, Souillou JP, Charreau B. Vascular endothelial cells evade apoptosis triggered by HLA class II ligation. *Transplantation* 2004;78: 1729-39.
- [14] Strandberg TE, Pyorala K, Cook TJ, Wilhelmsen L, Faergeman O, Thorgeirsson G, et al. Mortality and incidence of cancer during 10-year follow-up of the Scandinavian simvastatin survival study (4S). *Lancet* 2004;364:771-7.
- [15] Kobashigawa JA. Statins in solid organ transplantation: is there an immunosuppressive effect? *Am J Transplant* 2004;4:1013-8.

Available online at www.sciencedirect.com

