Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Contribution à l'étude de l'athérogenèse: études morphologiques du phénomène de blebbing observé au niveau de cellules endothéliales en culture soumises àun stress oxydant

Sanderson, Françoise

Award date:
1989

Awarding institution:
Universite de Namur

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Download date: 02. May. 2026

150689

Unité de Cytologie

Promoteur : M-F. Ronveaux-Dupal

Contribution à l'étude de l'athérogenèse : études morphologiques du phénomène de "blebbing" observé au niveau de cellules endothéliales en culture soumises à un stress oxydant

Françoise
Sanderson

Année 1988-1989

Au terme de ce mémoire, je tiens à remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont collaboré à la réalisation de ce travail. Plus particulièrement mes remerciements s'adressent à:

Madame M.F. Ronveaux-Dupal, promoteur de ce mémoire, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour m'avoir guidée et encouragée tout au long de cette année;

Madame R. Thibaut -Vercruyssen, sans qui le travail n'aurait pas eu lieu, pour sa compétence et sa symphathie;

Monsieur Yves Poumay pour sa disponibilité, ses nombreuses propositions, ses conseils judicieux et pour son amitié;

Mesdames M. Martin-Van Steenbrugge, N. Paulus-Ninane, Madame Henin et Christine et Isabelle pour leur collaboration toujours appréciée, ainsi que leurs encouragements et leur amitié;

Madame M. Raes pour sa disponibilité, ses conseils précieux et son avis critique sur ce travail;

Monsieur Collet pour l'important travail photographique de ce mémoire.

Merci à toutes les personnes que j'ai eu l'occasion de cotoyer au département d'Histologie de la Faculté de Médecine et plus spécialement à Francine Zune pour sa complicité dans ce travail ainsi que pour ses encouragements et son amitié.

Je tiens à remercier et à féliciter Manoëlle, Isabelle et Cécile qui m'ont aidée, encouragée et soutenue durant de longues heures, années,...

Je me tourne vers ma famille, tout particulièrement mes parents, pour m'avoir donné la possibilité d'entamer ces études, et pour la confiance qu'ils ont toujours manifestée à mon égard.

Table des matières

INTRODUCTION

1. Cellule endothéliale et athérogenèse
   1.1. Athérosclérose
      1.1.1. Définition
      1.1.2. Description des lésions
   1.2. Athérogenèse
      1.2.1. Hypothèses de la lésion de l'endothélium
      1.2.2. Hypothèse monoclonale
      1.2.3. Hypothèse lysosomale
      1.2.4. Hypothèses de l'infiltration lipidique
      1.2.5. Hypothèse du stress oxydant
   1.3.Cellule endothéliale
      1.3.1. Description
      1.3.2. Propriétés (Jaffé, 1985)
         1.3.2.1. Propriété de perméabilité
         1.3.2.2. Thromborésistance des cellules endothéliales
         1.3.2.3. Régulation de la croissance des cellules musculaires lisses de la média
         1.3.2.4. Régulation du tonus vasculaire

2. Stress oxydant et altérations morphologiques des cellules endothéliales
   2.1. Stress oxydant
      2.1.1. Les dérivés actifs de l'oxygène
      2.1.2. Production d'un stress oxydant.
   2. Stress oxydant et cellules endothéliales.
      2.2.1. Modèles in vivo et in vitro.
      2.2.2. Altérations morphologiques des cellules endothéliales.

3. Etude particulière d'une altération morphologique:les BLEBS

4. Le cytosquelette
   4.1. Les microfilaments
   4.2. Les microtubules (Blose, 1984)
   4.3. Les filaments intermédiaires (Blose, 1984)
   4.4. L'organisation du cytosquelette

BUT DU TRAVAIL.

MATERIEL ET METHODES.

1. Culture des cellules endothéliales, à partir de la veine ombilicale humaine.
    1.1. Origine et mise en culture de cellules endothéliales.
    1.2. Changement de milieu.
    1.3. Repiquage.
    1.4. Examen des cellules en culture.
2. Traitement des cellules endothéliales en culture par le système xanthine-xanthine oxydase.
3. Techniques morphologiques utilisées sur des cellules endothéliales en culture.
    3.1. Microscopie optique.
        3.1.1. Contraste de phase et fond noir.
        3.1.2. Immunofluorescence.
    3.2. Microscopie électronique
        3.2.1. Microscopie électonique à balayage.
        3.2.2. Microscopie électronique à transmission.
        3.2.3. Essai de mise au point d'un marquage en microscopie électronique à transmission, au moyen d'un anticorps couplé à l'or.

RESULTATS et COMMENTAIRES.

1. Identification des cellules endothéliales en culture
2. Observation des cultures de cellules endothéliales traitées et non traitées en microscopie photonique.
    2.1 Microscopie à contraste de phase inversé.
    2.2 Immunofluorescence
        2.2.1 Immunofluorescence directe
        2.2.2 Immunofluorescence indirecte
3. Observation des cellules endotheliales traitées ou non au microscope électronique à balayage.
    Résultats
    Commentaires
4. Observation des cultures de cellules endothéliales traitées et non traitées en microscopie électronique à transmission.
    4.1 Choix d'une méthode de fixation
        4.1.1. Résultats.(cfr. tableau II).
        4.1.2. Commentaires.
    4.2 Visualisation du cytosquelette par le biais de la microscopie à transmission

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION.
BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION.

1. Cellule endothéliale et athérogenèse:

1.1. Athérosclérose:

1.1.1. Définition:

L'athérosclérose est une maladie des artères qui touche particulièrement l'intima des gros vaisseaux. Elle consiste en une accumulation locale de lipides, de glucides complexes, de dérivés sanguins, de tissu fibreux et de dépôts calcaires. Le tout pouvant être accompagné de modifications de la média (Capron, 1983).

1.1.2. Description des lésions:

L'évolution de ces lésions peut être découpée en trois stades successifs.

A certains endroits du système artériel, on peut observer dès le plus jeune âge des infiltrations jaunâtres, appelées **stries lipidiques**. Ces dernières sont essentiellement formées de cellules endothéliales et sous-endothéliales contenant des inclusions lipidiques. L'intima est épaissie par l'accumulation dans la couche sous-endothéliale de lipophages (cellules riches en dépôts lipidiques), de cellules musculaires lisses et d'une matrice riche en protéoglycans.

Cette strie va évoluer en **athérome**, plaque formant un relief sur la paroi et contenant une "bouillie athéromateuse" riche en débris cellulaires et inclusions lipidiques.Un manchon de cellules musculaires lisses et de fibroblastes peut se former autour de cette bouillie.

Il y a ensuite une calcification préférentielle à la base de l'implantation de la plaque athéroscléreuse qui donne lieu à **une plaque calcaire**. La lésion peut engendrer une obstruction de l'artère ou une hémorragie localisée à la base d'implantation de la plaque avec libération dans la lumière du vaisseau du contenu de la bouillie.

1.2. Athérogenèse

1.2.1. Hypothèses de la lésion de l'endothélium:

-Selon von Rokitansky (1856), l'athérosclérose résulte d'un dépôt de substances du sang sur l'intima, en particulier de la fibrine.

La superposition de protéines plasmatiques suivie de leur dégradation aboutirait à la formation de la plaque athéromateuse.

-Virchow (1856), un pathologiste allemand émet l'avis que le dépôt de cholestérol résulte de l'infiltration de lipides sanguins dans la paroi artérielle: cette dernière, étant irritée par les dépôts, réagit par une inflammation et une prolifération des cellules qui précèdent les modifications dégénératives de la paroi artérielle.

-Ross et Glomset (1976) ont démontré le rôle que jouent l'altération de l'endothélium ainsi que la libération de facteurs mitogènes plaquettaires provoquée par l'adhésion des thrombocytes aux structures sous-endothéliales.

1.2.2. Hypothèse monoclonale:

-Benditt et Benditt (1973) suggèrent que l'établissement d'une tumeur bénigne dérivant d'une seule cellule musculaire lisse provenant de la média, est à l'origine de la plaque. Une mutation serait à la base de la migration de cette cellule musculaire.

1.2.3. Hypothèse lysosomale:

-de Duve et ses collaborateurs (1974) ont proposé l'hypothèse d'un manque d'activité des estérases lysosomales qui conduirait à une dégradation insuffisante des LDL (Low Density Lipoprotein) au niveau des plaques athéroscléreuses.

1.2.4. Hypothèses de l'infiltration lipidique:

-Anitschkov (1913) introduisit la théorie de l'infiltration lipidique, en provoquant des lésions athéroscléreuses chez des lapins par le biais d'un régime alimentaire enrichi en graisses et cholestérol.

Cette observation établissait le premier lien selon lequel l'athérosclérose évolue à partir d'infiltrations lipidiques.

-Goldstein et Brown (1977) ont mis l'accent sur l'importance de l'interaction des LDL avec leurs récepteurs situés en surface des cellules de la paroi artérielle. Ils ont démontré qu'une déficience ou une absence de récepteur rendaient ces cellules incapables de dégrader complètement les molécules lipidiques.

1.2.5. Hypothèse du stress oxydant:

-Steinberg et ses collaborateurs (1987) supposent que les dérivés actifs de l'oxygène sont responsables de la modification des lipoprotéines, ce qui entraîne leur reconnaissance par les récepteurs des macrophages du tissu sous-endothélial et la formation des lipophages dans l'intima.

1.3.Cellule endothéliale:

1.3.1. Description:

Les cellules endothéliales *in vivo* forment une monocouche de cellules pavimenteuses situées sur la membrane basale qui ancre la cellule à la paroi du vaisseau sanguin. Cette membrane est constituée de plusieurs types de collagènes, d'élastine, de microfibrilles, de laminine, de glycosaminoglycans, ainsi que de fibronectine et de thrombospondine. Elle forme un second filtre très sélectif permettant le passage de molécules de faible poids moléculaire.

L'épaisseur d'une cellule endothéliale typique varie, du centre à la périphérie de la cellule, de 3 µm à 1 µm, dans l'aorte; par contre, dans les capillaires et les veines, elle est de 0,1 µm. Cette cellule est allongée (25 à 50 µm) dans le sens du flux sanguin et sa largeur oscille entre 10 et 15 µm (Thorgeirsson, 1983).

Les cellules endothéliales occupent une surface de plus de 1000 m^2. Comme la surface d'une cellule est de l'ordre de 20x50 μm^2, le corps contient approximativement 10^{12} cellules endothéliales,d'un poids total de 100 grammes environ .

Leur localisation et leur contact avec le flux sanguin circulant leur permettent de moduler les différents systèmes biologiques du sang en particulier le système de la coagulation (Jaffe, 1985).

- Les cellules endothéliales *in vitro* prolifèrent en une monocouche de cellules polygonales étroitement accolées. La microscopie électronique révèle la présence dans une telle cellule d'un noyau ellipsoïde entouré d'un cytoplasme dense, riche en organites, mitochondries: RER, appareil de Golgi, lysosomes et vésicules de pinocytose (Haudenschild, 1984 et Pittilo, 1988). Cependant, une structure supplémentaire semble être unique aux cellules endothéliales, un organite intracellulaire formé d'un faisceau de fins tubules, le corps de Weibel-Palade (Weibel & Palade, 1964).

- Le cytosquelette des cellules endothéliales se compose de 3 systèmes de filaments protéiques: les microfilaments, les filaments intermédiaires et les microtubules (Blose,1984), qui seront détaillés au chapitre 4.

- Les cellules endothéliales humaines peuvent être identifiées par détection de la protéine F VIII :R ag par immunofluorescence (Jaffe, 1984) et par la recherche, en microscopie électronique à transmission, des corps de Weibel-Palade.

1.3.2. Propriétés (Jaffe, 1985):

1.3.2.1. Propriété de perméabilité:

Les cellules endothéliales constituent une barrière dont la perméabilité est sélective. Cette perméabilité sélective, nécessaire à la pénétration des composants sanguins indispensables à la nutrition des tissus sous-endothéliaux, est modulée par la production de prostaglandines, d'histamine, et la transformation d'angiotensine I en angiotensine II active par la cellule endothéliale (Capron, 1983).

1.3.2.2. Thromborésistance des cellules endothéliales:

La prostacycline (PGI_2) est un vasodilatateur puissant et un inhibiteur de l'adhésion des plaquettes (Moncada & Vane, 1979). Cette molécule, synthétisée par les cellules endothéliales, inhibe l'adhésion des plaquettes stimulées aux cellules endothéliales. Cette "non thrombogénicité" des cellules endothéliales *in vivo* fut démontrée en 1985 par Jaffe.

Habituellement, l'espace sous-endothélial est recouvert par les cellules endothéliales. Toutefois, le retrait ou la contraction de ces cellules expose l'espace sous-endothélial aux plaquettes qui y adhèrent et s'y dégranulent provoquant la libération de thromboxane (TXA_2). Cette adhésion dépend du facteur VIII de Von Willebrand, synthétisé sous forme d'un précurseur au niveau des corps de Weibel-Palade.

La cellule endothéliale réagit avec la thrombine de manière diverse (de Groot *et al*, 1985). Toutefois, elle peut empêcher cette molécule de participer au processus de coagulation, en formant un complexe covalent thrombine-antithrombine qui sera éliminé par le foie.

1.3.2.3. Régulation de la croissance des cellules musculaires lisses de la média:

Les cellules endothéliales jouent un rôle important dans la régulation de la croissance des cellules musculaires lisses sous-jacentes en élaborant un **"platelet-derived growth factor like protein"** (Fox & Di Corletto, 1984). Elles sécrètent aussi un inhibiteur **"héparine-like"** de la croissance des cellules musculaires lisses (Castellot *et al*,1984).

1.3.2.4. Régulation du tonus vasculaire:

La cellule endothéliale produit un **"endothelium-derived relaxing factor"** (EDRF) qui entraîne le relâchement des cellules lisses sous-jacentes. Ce facteur a récemment été identifié et serait apparenté à l'oxyde nitrique (Furchgott, 1984).

Elle élabore aussi un petit peptide **"l'endothéline"** qui peut induire une vasoconstriction très importante (Yanagisawa *et al*, 1988).

PRODUCTION OF SUPEROXIDE RADICAL, HYDROGEN PEROXIDE AND HYDROXYL RADICAL

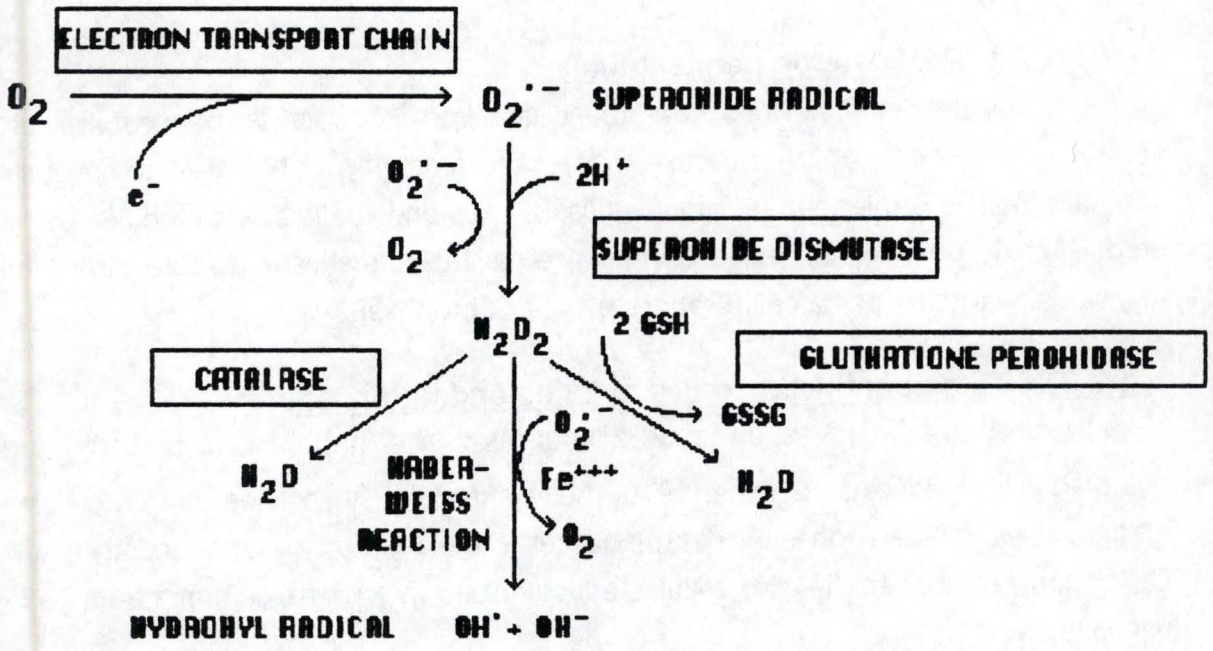


Figure 2-1: Formation des principaux intermédiaires de l'o_2

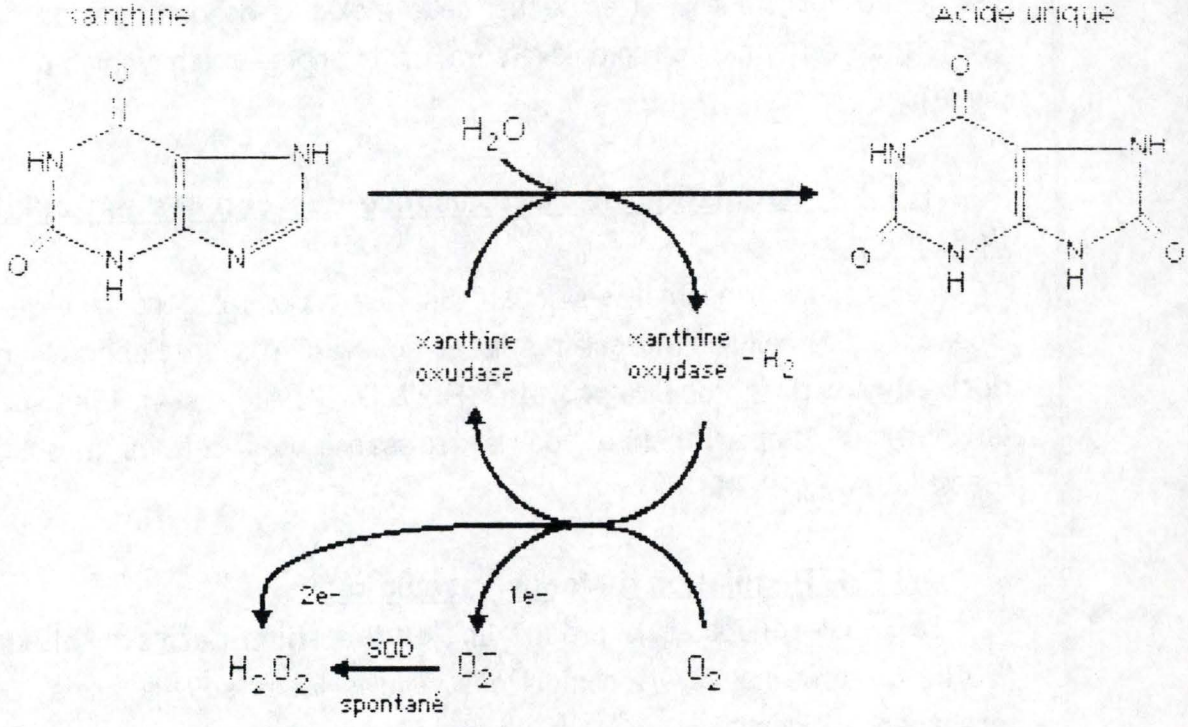


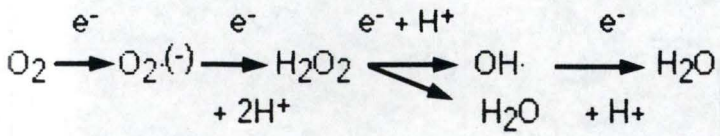
Figure 2-2: Oxydation de la xanthine en acide urique par la xanthine oxydase

2. Stress oxydant et altérations morphologiques des cellules endothéliales:

2.1. Stress oxydant:

2.1.1. Les dérivés actifs de l'oxygène:

L'oxygène moléculaire peut engendrer dans certaines conditions des dérivés très réactionnels, toxiques pour la cellule (Hennig *et al*, 1988). Ces molécules sont l'anion superoxyde ($O_2^{(-)}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et le radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$) (fig. 2-1).



Réduction monovalente de l'O_2

L'anion superoxyde est fréquemment formé dans tout organisme vivant (Halliwell, 1987), soit comme intermédiaire dans les complexes enzymes-substrats (cytochrome P450) (Massey *et al*, 1969 et Bartoli *et al*, 1971) ou au niveau des chaînes de transfert d'électrons (au niveau du cytochrome C) (Boveris, 1977), soit comme produit de la réaction. Par exemple, la xanthine oxydase qui catalyse l'oxydation de la xanthine en acide urique produit un anion superoxyde en même temps qu'un peroxyde d'hydrogène (Fried, 1980) (fig. 2-2).

Le peroxyde d'hydrogène, produit entre autres par la superoxyde dismutase, peut être converti en H_2O par la catalase et la glutathion peroxydase.

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} 2H_2O + O_2$$

$$2GSH + ROOH \xrightarrow[\text{GSH peroxydase}]{} GSSG + ROH + H_2O$$

Le radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$) peut être produit selon la réaction d'Haber-Weiss, et en présence de métaux de transition dans la réaction de Fenton.

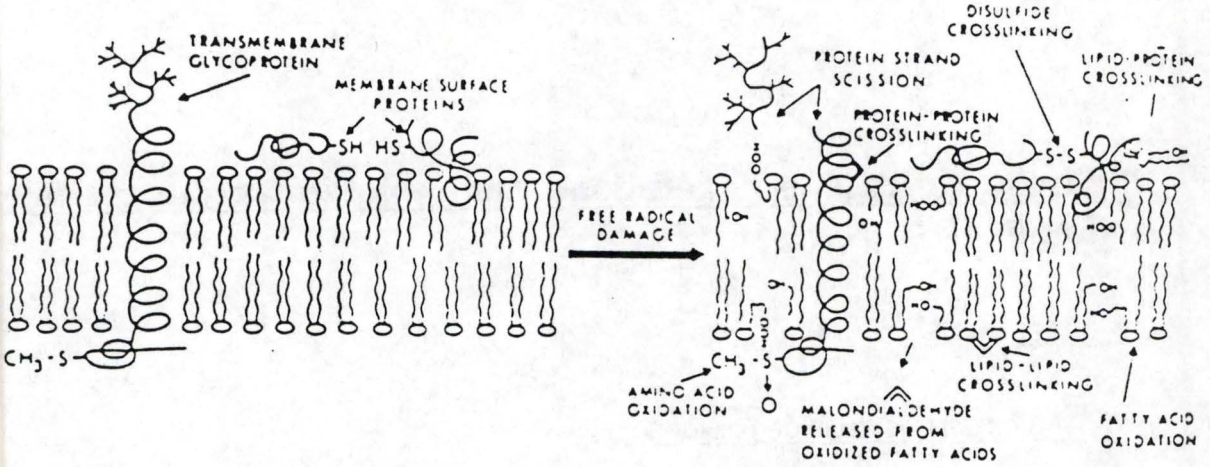


Figure 2-3:Dommages engendrés par les radicaux libres au sein d'une membrane (Freeman & Capron, 1982).

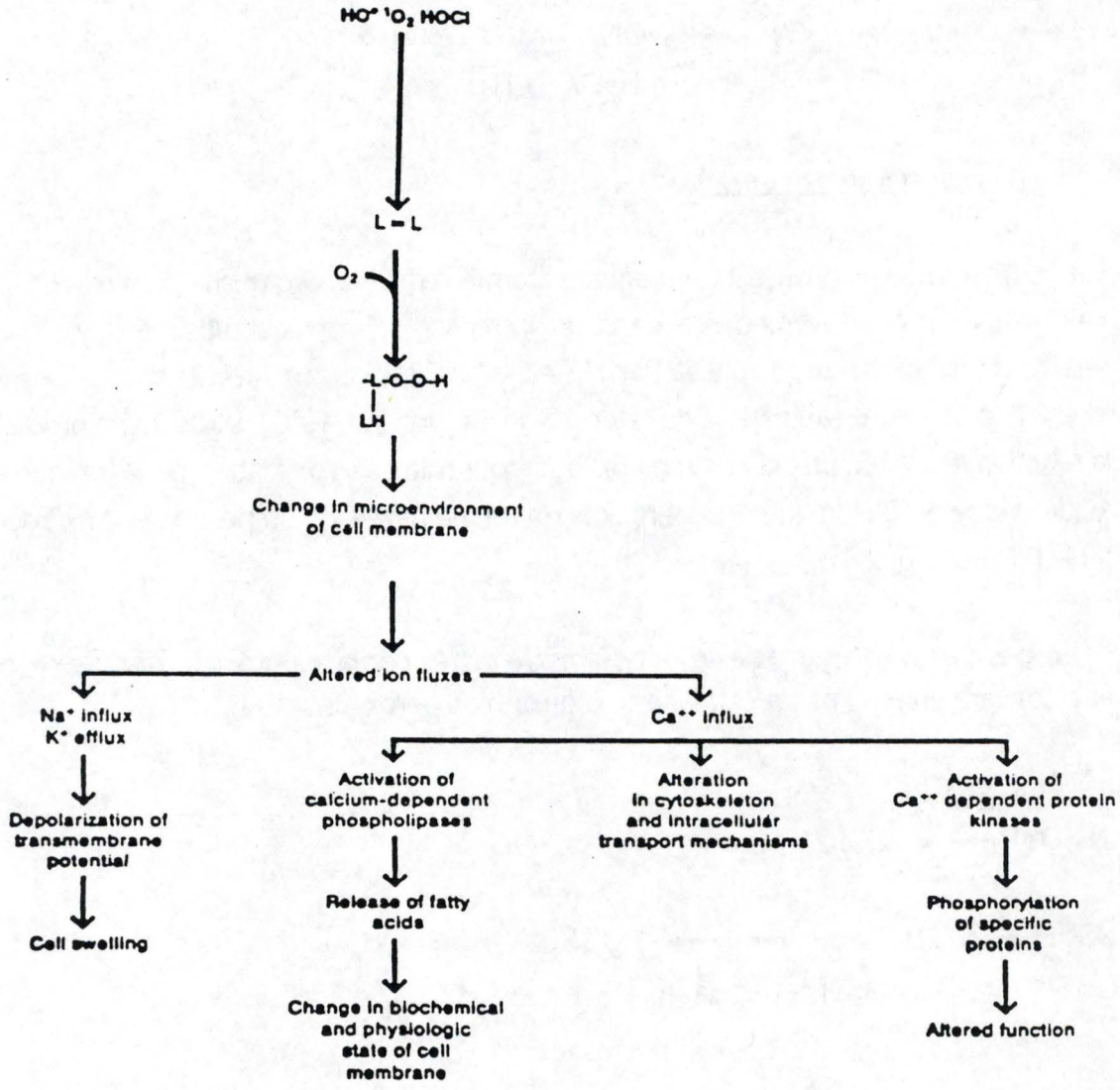


Figure 2-4: Conséquences de la peroxydation lipidique sur les membranes cellulaire et leurs fonctions (Fantone et Ward, 1985).

$- O_2^{\cdot -} + H_2O_2 \longrightarrow OH^{\cdot} + OH^- + O_2$ Haber-Weiss

$- O_2^{\cdot -} + Fe^{+++} \longrightarrow O_2 + Fe^{++}$ Fenton

$Fe^{++} + H_2O_2 \longrightarrow OH^- + OH^{\cdot} + Fe^{+++}$

$O_2^{\cdot -} + H_2O_2 \longrightarrow OH^{\cdot} + OH^- + O_2$

Le peroxyde d'hydrogène et le superoxyde sont extrêmement toxiques. Ils attaquent les acides gras insaturés, constituants des lipides membranaires, entraînant une altération au niveau de la structure de la membrane (Hennig *et al*, 1988) (fig. 2-3 et 2-4). Ils altèrent les protéines et engendrent des cassures au sein du DNA.

Pour se protéger contre toutes les attaques radicalaires, les organismes aérobies utilisent des systèmes enzymatiques, tels la superoxyde dismutase (SOD) (Halliwell, 1987) qui transforme le radical superoxyde en peroxyde d'hydrogène, la catalase, la glutathion peroxydase (GPX), laquelle réduit, en plus de H_2O_2, les peroxydes et les hydroperoxydes lipidiques (Suttorp *et al*, 1986), fournissant une protection supplémentaire par rapport à la catalase, et des systèmes non enzymatiques, tels la vitamine E ou α-tocophérol, la vitamine C ou l'acide ascorbique et le glutathion capables de capter les radicaux libres.

$$2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \xrightarrow{\text{Superoxyde dismutase}} H_2O_2 + O_2$$

2.1.2. Production d'un stress oxydant.

In vivo, les radicaux libres de l'oxygène sont produits de différentes façons: par des cellules (leucocytes, macrophages), par des organites intracellulaires (mitochondries, réticulum endoplasmique), par oxydation des catécholamines ou sous l'action de la cyclooxygénase et de la xanthine-oxydase dans le cytoplasme.

Ce dernier enzyme catalyse l'oxydation: hypoxanthine►xanthine►acide urique. Il agit donc comme une déshygrogénase, par transfert d'électrons dérivant de l'oxydation du substrat NAD^+ (Bindoli *et al*, 1988).

In vitro, Stirpe et ses collaborateurs (1969), ont montré que dans certaines conditions expérimentales telles une protéolyse, une incubation à 37°C, un stockage à -20°C, un traitement aux solvants organiques, ou par le biais de réactifs présentant des groupements SH, certains enzymes (xanthine déshydrogénase) se transforment en oxydase capable de libérer directement les électrons de l'oxygène moléculaire formant à la fois un superoxyde et un peroxyde d'hydrogène (Bindoli *et al*, 1988).

2.2. Stress oxydant et cellules endothéliales.

2.2.1. Modèles *in vivo* et *in vitro*

De par leur situation entre le sang et les tissus, les CE sont idéalement placées non seulement pour recevoir des signaux des uns et des autres, mais pour y réagir très rapidement (Ryan, 1988). Nous savons en effet que les CE sont extraordinairement actives du point de vue métabolique.

Divers stress oxydants peuvent atteindre les cellules endothéliales *in vivo* :

a) Cellules endothéliales et réactions inflammatoires.

Lors d'une inflammation, les leucocytes (PMN, monocytes) principalement du sang circulant, adhèrent à l'endothélium avant de le traverser (diapédèse). Cette adhésion s'accompagne d'une activation de ces cellules qui se traduit par une perméabilité vasculaire accrue et une libération de radicaux libres (relargage de lactate déshydrogénase, relargage de ^{51}Cr (Andreoli *et al*, 1985).

b) Cellules endothéliales lors d'une ischémie et de la reperfusion

L'interruption de la circulation dans un organe produit une ischémie : l'oxygène, les substances nutritives et hormonales ne sont plus fournis et les métabolites ne sont plus éliminés. Le manque d'oxygène entraîne rapidement une accumulation d'AMP car la cellule ne peut plus régénérer l'ATP. Cet AMP est métabolisé en hypoxanthine (McCord, 1985).

Parallèlement à cette augmentation d'hypoxanthine, la xanthine déshydrogénase cellulaire (XD) est clivée par une protéase, probablement la calpaïne, elle même activée par des ions Ca^{++} qui entrent dans la cellule suite à une diminution de l'activité des pompes ioniques dépendantes de l'ATP; la XD acquiert ainsi une activité d'oxydase (McCord, 1987). Elle métabolise l'hypoxanthine en xanthine puis en acide urique par la réduction de l'oxygène moléculaire en anion superoxyde et peroxyde d'hydrogène. Bien que des anions superoxydes soient aussi formés pendant l'ischémie (Hamer, 1987) c'est probablement surtout au moment de la reperfusion que les radicaux libres seront produits par la xanthine oxydase. De plus à ce moment là, il y a un afflux très important de polymorphonucléaires neutrophiles (Bulkley *et al*, 1987), ce qui augmente la production de dérivés actifs de l'oxygène .

In vitro, de nombreux modèles ont été établis permettant d'étudier les cellules endothéliales en condition d'hyperoxie ou d'hypoxie. Housset et Junod (1982) ont comparé la mortalité des cellules endothéliales en normoxie et en hypoxie prolongée en présence et en absence d'antioxydants.

Ces modèles de cellules endothéliales en culture rendent possible l'étude de l'influence de molécules ou drogues toxiques ou protectrices sur les cellules

endothéliales dans ces conditions (Mustafa *et al*, 1978; Ody et Junod, 1985 ; Poumay, 1988 et Toussaint, 1988).

Les interactions des CE avec les neutrophiles et les macrophages du sang circulant ou du tissu sous endothélial peuvent donc être à la base d'un stress oxydant pour les CE (Ager *et al*, 1984 ; Lewis *et al*, 1986 et Dobrina *et al*, 1988). Par ailleurs, ces CE possèdent des mécanismes protecteurs vis-à-vis de ces stress oxydants. Ainsi, on a calculé qu'une seule cellule endothéliale pouvait dégrader l'H_2O_2 produit par trois neutrophiles (Dobrina *et al*, 1988) grâce à la catalase et la glutathion peroxydase qu'elle contient. La cellule endothéliale peut augmenter sa production de glutathion en réaction aux stimuli (Tsan *et al*, 1985 et Denecke *et al*, 1987). Elle possède une activité glutathion réductase importante (Denecke *et al*, 1987).

Ainsi, l'endothélium est une surface dynamique capable de maintenir l'homéostasie en réponse à des lésions cellulaires.

Cependant, ces cellules peuvent elles-mêmes répondre aux stimuli en relargant des produits actifs y compris des dérivés actifs de l'oxygène (Rosen *et al*, 1984 ; Gorog *et al*, 1988 et Zweier *et al*, 1988). Pour Zweier *et al* (1988), la plupart des dérivés actifs de l'O_2 produits par les CE lors d'une anoxie suivie de réoxygénation, sont dus à l'activité de l'enzyme xanthine oxydase. On sait que les cellules endothéliales contiennent des concentrations élevées de xanthine oxydase (Jarash *et al*, 1986) et qu'en présence d'un inhibiteur de cet enzyme comme l'oxypurinol, 80 à 90 % des dérivés de l'oxygène produits lors de la réoxygénation des cellules endothéliales après anoxie, sont éliminés (Zweier *et al*, 1988).

2.2.2. Altérations morphologiques des cellules endothéliales.

Les cellules endothéliales soumises à un stress oxydant montrent progressivement des modifications de leur contour cellulaire, des altérations des organites ainsi que des variations dans le processus d'endocytose des LDL médié par les récepteurs, révélées par une incubation des cellules endothéliales avec des LDL conjugués à l'or colloïdal (Poumay, 1988).

Les premiers changements morphologiques concernent en général la périphérie des cellules oxydées qui apparaît beaucoup plus tourmentée et couverte de Blebs (boursouflures). De plus, ce phénomène s'amplifie après 120 minutes d'oxydation, et s'accompagne de modifications du réticulum et de dictyosomes de l'appareil de Golgi qui apparaissent gonflés, d'une dilatation des crêtes mitochondriales ainsi que d'une condensation de leur matrice. (Thibaut-Vercruyssen *et al*, 1988).

3. Etude particulière d'une altération morphologique : LES BLEBS:

-Le blebbing est une modification de la surface cellulaire induisant la formation de boursouflures ou blebs.
Parmi les nombreux termes utilisés pour décrire ce processus (Meek, 1976) nous retiendrons les plus courants: blebbing et zeiose.

-Une grande variété de toxiques chimiques (Jewell *et al.*, 1982), l'hypoxie (Lemasters *et al.*, 1987), l'anoxie (Herman *et al.*, 1988 et Nicotera *et al.*, 1989), induisent le blebbing qui apparait donc comme une réponse générale au stress.

-Le blebbing a été décrit dans des cellules en culture (Boyde *et al.*, 1972 et Porter *et al.*, 1973), dans des cellules en division (Robbins & Gonatas, 1964). Ce phénomène est nettement accentué dans les cellules tumorales, dans les cellules transformées (virus, agents chimiques, rayons) (Porter *et al.*, 1973; Everhart & Rubin, 1974 et Miranda *et al.*,1974) où l'altération de la membrane plasmique est accompagnée de microvillosités et de replis, et dans les stades précédant la mort cellulaire (Jewell *et al.*, 1982 et Lemasters *et al.*, 1987). Herman *et al.*, (1988) rapporte que la fusion de blebs peut conduire à leur rupture et aboutir ainsi à la mort cellulaire par augmentation soudaine de la perméabilité membranaire.

-Différentes techniques ont permis la visualisation du blebbing: la microscopie photonique à contraste de phase (Dalen & Todd ,1971 et Nicotera *et al.*, 1989), la cinématographie (Krishan, 1972), le DIC (Oppenheim *et al.*, 1973), la microscopie électronique à transmission (Price, 1967 et Borman *et al.*, 1975), la vidéo microscopie (Lemasters *et al.*, 1987 et Herman *et al.*, 1988) et de manière plus démonstrative encore, le microscope électronique à balayage (Dalen & Todd, 1971; Porter *et al.*, 1973 et Everhart & Rubin 1974).

-On distingue trois types de blebs. Le plus fréquent consiste en un renflement de la membrane cellulaire, rempli de ribosomes et pouvant contenir du réticulum endoplasmique.
D'autres, observés au niveau des épithéliums sécrétoires apparaissent comme des herniations apicales, dépourvues d'organites cellulaires. Plus communément, on les retrouve dans les cellules en culture : elles sont alors remplies de vésicules ou sacs membraneux.
Le troisième type, qui peut être considéré comme induit par modification de l'environnement ou par modification chimique, contient des ribosomes, du RER, des mitochondries et d'autres organites (Burgess & Grey, 1974).

La taille de ces trois types de blebs varie entre1 à 10µm et peut atteindre celle de la cellule entière.

-Différentes théories ont été avancées pour expliquer la formation des blebs. Il a été noté par exemple, que le blebbing augmente après une pression mécanique, osmotique ou hydrostatique. Cette dernière induirait une transformation en sol du gel cytoplasmique se traduisant par une modification de la forme cellulaire : arrondissement et blebbing (Landau, 1960 et Landau & Peabody, 1963). Cette même hypothèse pourrait être en relation avec la formation des blebs au moment de la division cellulaire, à l'anaphase (Robbins & Gonatas, 1964).

Des études *in vivo* et *in vitro* ont également lié ce phénomène aux variations du taux intracellulaire en Ca^{++} et en ATP (Malorni *et al*, 1988).

Selon Nicotera *et al* (1986) l'augmentation du Ca^{++} cytosolique provoquerait l'apparition de blebs au niveau d'hépatocytes isolés, par l'activation du système protéolitique non lysosomial.

On sait que les ions calcium jouent un rôle important dans la régulation structurale et fonctionnelle du cytosquelette. Ainsi, l'hypothèse d'une altération du cytosquelette a-t-elle été souvent proposée (Lemasters *et al*, 1982)comme pouvant être à l'origine des blebs. En effet, les Ca^{++} peuvent contrôler l'assemblage des protéines les plus typiques du cytosquelette, à savoir l'actine et la tubuline, en modifiant l'activation des protéines de liaison (Ca^{++} binding protéines) du Ca^{++}. Par ailleurs, l'activation de certaines enzymes cataboliques comme les Ca^{++} protéases peut entraîner des modifications de la structure du cytosquelette.

->Pour certains, de manière plus précise, le blebbing serait directement en relation avec une modification de la concentration en calcium extramitochondrial (Jewell *et al*, 1982).

->Les microfilaments présentent un intérêt particulier dans l'étude de la physiopathologie de la membrane (Marx, 1974). En effet, l'utilisation des cytochalasines (principalement B et D) inhibiteurs de la polymérisation des microfilaments ainsi que la colchicine, inhibiteur de la polymérisation des microtubules stimulent le blebbing (Miranda *et al*, 1974 et Everhart & Rubin, 1974).

-Le 2 déoxyglucose (DOG) (10^{-2}M), le dinitrophénol (DNP) ($5x10^{-3}$M), l'antimycine A (AMA) (10^{-4}M), le carbonylcyanide de n-chlorophenyl hydrazone (CCCP) ($2x10^{-5}$M), tous inhibiteurs spécifiques agissant en certains points de la chaîne respiratoire ont été utilisés comme moyens de prévention du blebbing (Godman *et al*, 1975).

Wysolmerski *et al*, (1988), suggéra qu'une diminution d'ATP, entraînerait une inhibition de la rétraction cellulaire, et préviendrait le blebbing.

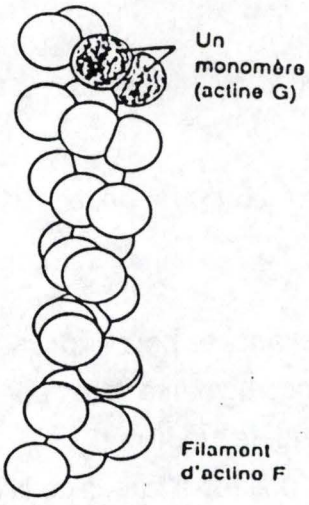


Figure 4-1 Shéma d'un filament d'actine, montrant l'arrangement hélicoïdal des molécules globulaires d'actine (extrait de Darnell, 1988).

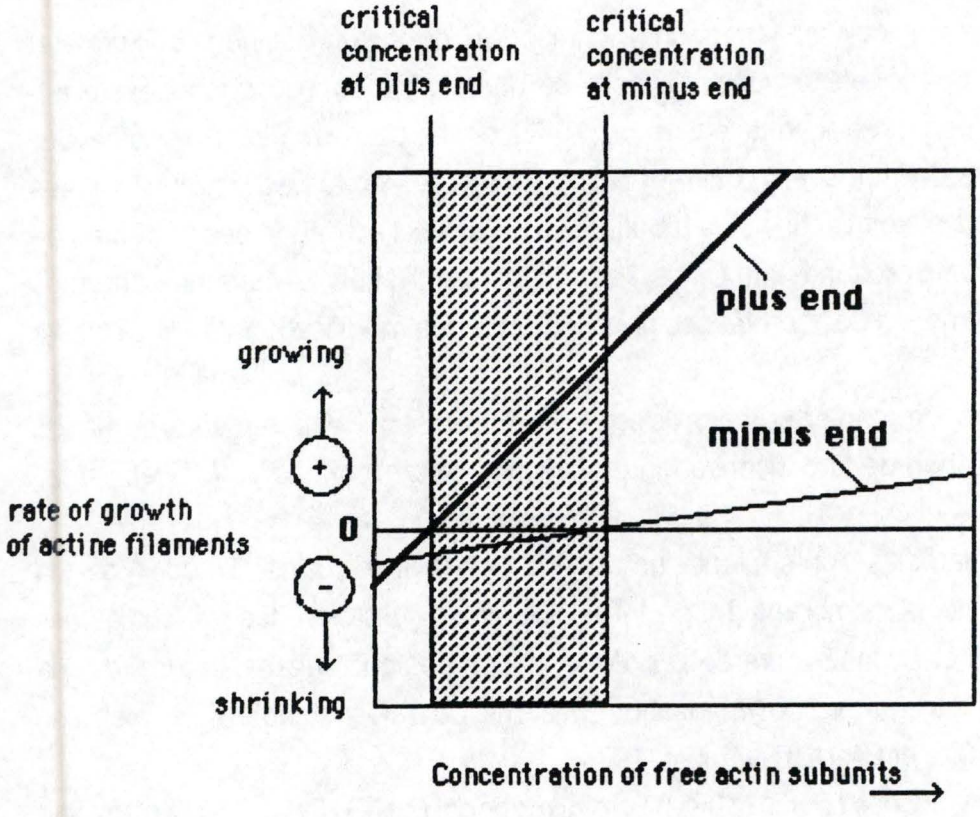


Figure 4-2 : Taux de croissance observé aux extrémités d'un filament d'actine pour différentes concentrations de molécules d'actine libre :
Ce graphe montre que les deux extrémités du filament possèdent des concentrations critiques et des vitesses de croissance différentes. Quand l'actine libre est en équilibre avec les filaments d'actine *in vitro*, aucune croissance nette n'a lieu ; cependant, les molécules d'actine se déplacent d'une extrémité à l'autre du polymère, processus dénommé "treadmilling" (extrait de Alberts *et al*, 1989).

4. Le cytosquelette:

La forme de la cellule, son organisation interne et son mouvement dépendent des réseaux complexes de filaments protéiques situés dans le cytoplasme; ceux-ci forment *la charpente et le muscle* de la cellule d'eucaryote, le cytosquelette cellulaire.

Les deux types de filaments les plus importants du cytosquelette sont les **microfilaments** , parfois appelés filaments d'actine et les **microtubules**. Tous deux sont constitués de sous-unités protéiques globulaires qui peuvent s'assembler et se désunir rapidement dans la cellule.

On trouve, dans la plupart des cellules animales, un troisième type de filaments protéiques, d'un diamètre intermédiaire entre celui des microfilaments et celui des microtubules et appelés pour cette raison **filaments intermédiaires.**

Ces derniers sont constitués de sous-unités protéiques fibreuses et sont plus stables que la plupart des microfilaments et des microtubules.

De plus, le cytosquelette contient de nombreuses protéines accessoires différentes qui, soit relient les filaments entre eux ou à d'autres composants cellulaires comme la membrane plasmique, soit influent sur la vitesse et l'ampleur de la polymérisation des filaments.

Les mouvements, produits par des séries particulières de protéines accessoires interragissant avec les filaments protéiques, sont liés à l'hydrolyse de l'ATP ou du GPT et au glissement d'un filament sur un autre.

4.1. Les microfilaments:

Les microfilaments examinés au microscope électronique à transmission apparaissent comme des structures filamenteuses dont le diamètre est de l'ordre de 5 à 7 nm. Ils sont composés de sous-unités protéiques globulaires d'actine, enchaînés en deux brins enroulés en hélice (fig.4-1). Dans les cellules en culture, ils sont organisés en faisceaux "stress fibers" ou câbles. Les microfilaments se situent dans le cytoplasme, à proximité de la surface inférieure de la cellule, et adjacents à la surface de la boîte de culture. Ces câbles peuvent être séparés des autres composants de la cellule et se contractent en présence d'ATP.

Certaines substances pharmaceutiques particulières modifient le degré de polymérisation de l'actine et influencent ainsi le comportement de la cellule.

- Les **cytochalasines**, une famille de métabolites excrétés par diverses espèces de moisissures, paralysent de nombreux types de mouvement cellulaire chez les vertébrés. Ces composés agissent en se fixant spécifiquement à une extrémité des filaments d'actine empêchant ainsi l'addition de molécules d'actine à cette extrémité (Cooper,1987).

- La **phalloïdine** est un alcaloïde extrêmement toxique, produit par le champignon vénéneux, *Amanita phalloïdes* (Coluccio & Tilney 1984 et Cooper,1987).

Contrairement aux cytochalasines, la phalloïdine stabilise les filaments d'actine et inhibe leur dépolymérisation. Le poison ne traverse pas facilement la membrane et il doit être injecté à l'intérieur d'une cellule pour être efficace. Du fait que la phalloïdine stabilise les filaments d'actine en se fixant de manière très spécifique sur toute leur longueur, des dérivés fluorescents de ce poison ont été utilisés pour marquer les filaments d'actine à l'intérieur des cellules (Wulf *et al*, 1979).

Pour être efficace, la polymérisation de l'actine se fait avec de l'ATP.

Ce nucléotide est lié à la molécule d'actine non polymérisée et est hydrolysé à chaque fois qu'une molécule d'actine est ajoutée au polymère. Les microfilaments sont particulièrement bien révélés par immunofluorescence.

Certaines de ces protéines, dont la myosine, sont réparties à intervalles réguliers d'un bout à l'autre du câble d'actine, mais leur organisation précise, comme celle de tous les assemblages contractiles non musculaires, est inconnue.

L'assemblage de la myosine dans les cellules non musculaires dépend des ions calcium. Comme pour la myosine du muscle lisse, la phosphorylation est catalysée par une myosine kinase stimulée par le Ca^{++}, de sorte que le degré d'agrégation de la myosine non musculaire et sa capacité à interagir avec les filaments d'actine sont tous deux modifiés par de légères variations de la concentration en Ca^{++} libre dans le cytosol. Ces variations de Ca^{++} intracellulaire interviennent généralement en réponse à des signaux extracellulaires.

Les filaments d'actine sont ancrés au niveau des membranes cellulaires.

En effet, dans certains cas, on peut voir distinctement de minces brins protéiques reliant une extrémité des filaments d'actine à la membrane plasmique. Par ailleurs, il existe des preuves indirectes de la participation d'une protéine particulière à ces ponts, la vinculine, identifiée grâce à des anticorps fluorescents. Toutefois, la vinculine n'est pas une protéine membranaire, elle sert donc vraisemblablement de lien entre l'actine et un composant intrinsèque de la membrane.

Les microfilaments labiles peuvent rapidement s'assembler à partir d'un pool de sous-unités solubles ou se désassembler quand ils ne sont plus nécessaires (fig.4-2).

Selon l'*hypothèse* du "treadmilling" ou du "tapis roulant", les microfilaments présentent un équilibre dynamique d'assemblage et de désassemblage de leurs sous-unités. Ces filaments sont polarisés, c'est à dire qu'ils se polymérisent et s'allongent généralement à l'une des extrémités (extrémité +) et se dépolymérisent à l'autre extrémité (extrémité -), cela provoque un flux stationnaire de sous-unités le long de la chaîne protéique lorsque celle-ci est en équilibre avec les sous-unités non polymérisées (Bonder *et al*, 1983 ; Alberts *et al*, 1988).

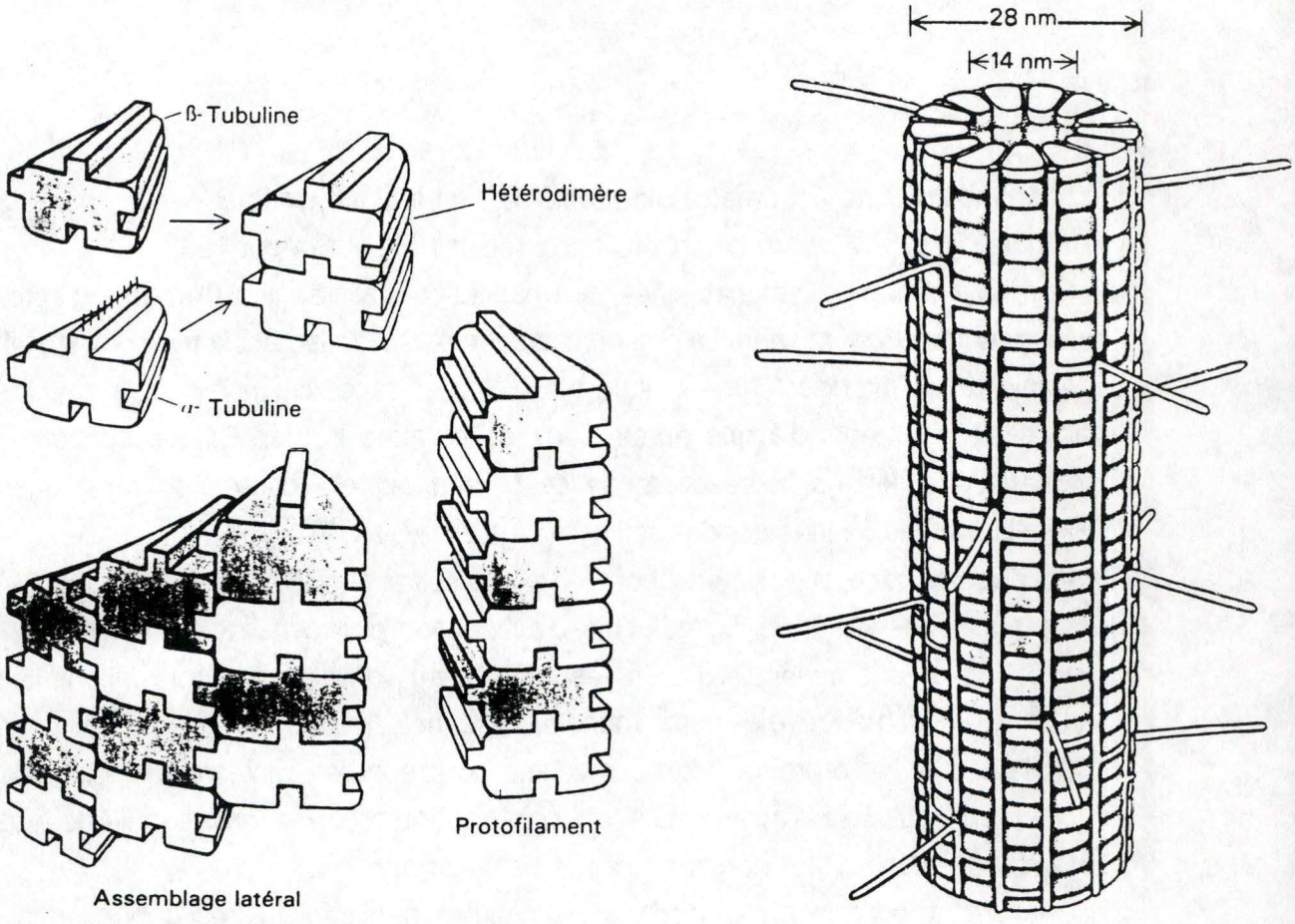


Figure 4-3: Représentation shématique de la manière dont l'α et la ß-tubulines s'assemblent préférentiellement pour donner des hétérodimères stables qui, eux mêmes s'assemblent longitudinalement en protofilaments.
Et à droite, un modèle de la structure tridimensionnelle d'un microtubules dont les protéines associées (MAPS) occupent les sillons (extrait de De Duve, 1984).

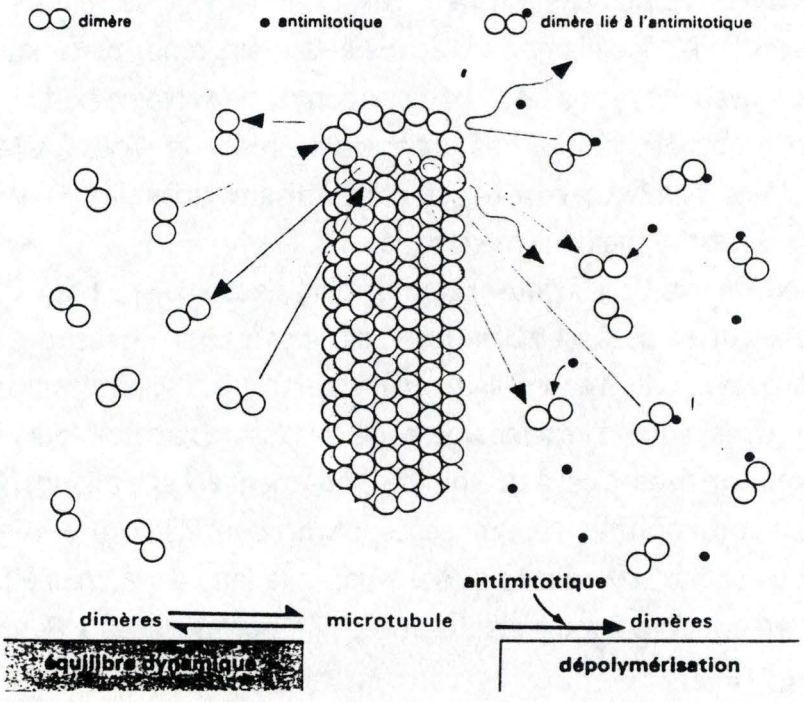


Figure 4-4 : Action d' un antimitotique sur un microtubule labile (extrait de Berkaloff, 1981)

4.2. Les microtubules (Blose, 1984):

Les microtubules sont constitués d'un complexe de 2 protéines, les tubulines α et ß, normalement associées au GTP qui sera hydrolysé en GDP au cours de la polymérisation. Elles sont disposées en hélice et forment 13 filaments verticaux ou protofilaments autour d'un centre creux, dont le diamètre externe est de 24 nm (fig. 4-3). Un grand nombre de leurs agencements dans la cellule sont labiles, et la fonction de certains repose sur cette labilité. Au cours de l'interphase, les microtubules rayonnent à partir du centrosome, constitué par les centrioles et le matériel péricentriolaire (satellites) situés au voisinage du noyau, vers la périphérie. Mais dès le début de la mitose, leur réseau se désunit pour faire place au fuseau mitotique. En fin de mitose le processus est inversé (Dustin, 1980). Cette labilité peut s'observer dans l'extrême sensibilité du fuseau mitotique à diverses substances pharmaceutiques qui se lient à la tubuline et empêchent sa polymérisation (Virtanen *et al*, 1980) (fig. 4-4).

- La **colchicine**, un alcaloïde extrait du safran des prés, se fixe étroitement à un dimère de tubuline et empêche ainsi sa polymérisation.

Son addition à une cellule en cours de division provoque la disparition du fuseau mitotique et bloque les cellules en mitose; ce composé est pour cette raison appelé agent antimitotique.

- La **vimblastine et la vincristine** inhibent aussi la formation des microtubules. Ils sont couramment utilisés dans le traitement du cancer puisqu'ils détruisent préférentiellement le fuseau, tuant de cette manière les cellules se divisant rapidement.

- Le **taxol** quant à lui favorise la polymérisation de la tubuline. Ajouté *in vitro* aux cellules, il provoque l'assemblage d'une grande proportion de la tubuline libre en microtubule (Schiff *et al*, 1979).

- De même, **l'eau lourde (D_2O)** provoque la polymérisation de la tubuline et augmente ainsi le nombre de microtubules dans un fuseau mitotique. De façon surprenante, la stabilisation supplémentaire que le taxol ou D_2O apporte aux microtubules de la cellule a un effet aussi nuisible sur la fonction des microtubules que leur dépolymérisation, car il semble que, pour fonctionner certains des microtubules doivent être en état de s'assembler et de se désassembler de façon dynamique. La concentration des ions Ca^{++} règle aussi l'assemblage des microtubules intracellulaires.

Les microtubules peuvent être mis en évidence dans le cytoplasme d'une cellule interphasique en culture par le marquage des cellules fixées avec des anticorps anti-tubuline fluorescents.

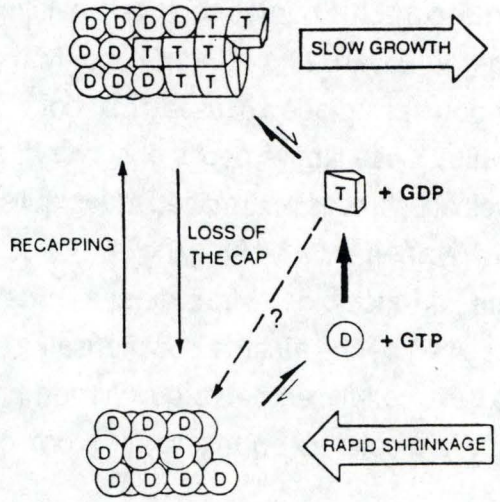


Figure 4-5: Modèle de l'instabillité dynamique (extrait de Kirschner & Mithison, 1986).

Croissance des microtubules :

Les deux extrémités d'un microtubule croissent à différentes vitesses (Farrell *et al*, 1987). L'extrémité à croissance rapide est appelée (+), l'autre (-). Les extrémités des microtubules les plus éloignés du centre de la cellule sont toujours les extrémités(+). Elles s'allongent toujours à partir de la région qui organise les microtubules, le centrosome ou les pôles du fuseau.

L'assemblage de tubuline en microtubule ressemble à la polymérisation de l'actine d'une certaine façon : elle se réalise spontanément *in vitro* et s'accompagne de l'hydrolyse retardée d'une molécule de GTP liée à la tubuline (dans le cas de l'actine, ce sera l'ATP). L'énergie fournie par l'hydrolyse du GTP n'est pas requise pour la polymérisation : elle abaisse cependant le seuil critique de sous-unités libres requis par la polymérisation à l'extrémité (+). Donc, l'extrémité (+) liera plus étroitement les molécules de tubuline.

Bien que le treadmilling puisse en principe se produire également dans les microtubules, un phénomène différent, appelé l'instabilité dynamique semble actuellement prédominer (Mitchison *et al*, 1984 et Horio *et al*, 1986).

En effet, d'après cette théorie un grand nombre de microtubules se polymérisent pendant qu'un petit nombre se dépolymérisent. Les monomères nécessaires à la croissance des filaments seraient fournis par les microtubules qui se dépolymérisent (fig.4-5). Expliquons brièvement ce qui se passe. Les extrémités (-) des microtubules dans les cellules sont fermement attachées au MOC qui contrôle l'assemblage et le désassemblage des sous-unités à cette extrémités. La plupart des microtubules des cellules animales croissent à partir d'un centrosome qui agit comme un MOC (Karsenti *et al*, 1986). Les extrémités (+) des microtubules *in vitro* passent spontanément d'un état de croissance lente (slowly growing) à un état de décroissance rapide (Rapidly shrinking), chaque état ne durant que quelques secondes. A tout instant, la population totale de microtubules comporte deux types de polymères qui s'échangent lentement.

Ce comportement, peut se comprendre si l'on tient compte des effets de l'hydrolyse retardée du GTP sur la polymérisation (Mitchison *et al*, 1984). Lorsqu'un microtubule croît rapidement, les molécules de tubuline s'ajoutent à l'extrémité du polymère plus vite que ne se réalise l'hydrolyse du GTP qu'elles transportent. On a donc un "GTP cap" (fig.4-3) à l'extrémité du microtubule ; et parce que les molécules de tubuline qui portent du GTP se lient avec plus grande affinité les unes aux autres qu'aux molécules de tubuline porteuses de GDP, la présence d'un "GTP cap" va favoriser la croissance du microtubule. Inversément, lorsqu'un microtubule perd son GTP cap (par ex. si la vitesse de polymérisation se ralentit), il va se contracter et aura tendance à accentuer cette décroissance. L'instabilité dynamique peut être observée directement en vidéomicroscopie optique à fond noir. (Horio *et al*, 1986 et Sammak *et al*, 1988).

4.3. Les filaments intermédiaires (Blose, 1984):

Les filaments intermédiaires sont des fibres protéiques résistantes. En effet, ces filaments subsistent après extraction par des solutions de force ionique élevée ou faible, ou par des détergents non ioniques, alors que la grande partie du cytosol et des autres filaments protéiques sont détruits. Ils sont stables, disposés de manière rectiligne, ou légèrement incurvés. Leur diamètre est de 8 à 10 nm, c'est à dire intermédiaire entre celui des filaments d'actine et celui des microtubules. Ils sont constitués de polymères de polypeptides fibreux de taille très variable. Plusieurs formes de filaments intermédiaires sont connues; ils sont spécifiques de chaque tissu et diffèrent par le type de polypeptide qu'ils contiennent: les filaments de kératine des cellules épithéliales ou d'origine épithéliale, les neurofilaments des cellules nerveuses, les filaments de vimentine des cellules endothéliales (Franke *et al*, 1979), des fibroblastes et de la plupart des cellules mésenchymateuses, les filaments gliaux, spécifiques des cellules gliales, et les filaments de desmine, localisés principalement dans les cellules des muscles striés, lisses et cardiaques.

L'assemblage des filaments intermédiaires est probablement irréversible. Il n'existe aucune preuve de l'existence d'une réserve de filaments intermédiaires, non polymérisés dans la cellule, ni de celle d'un équilibre dynamique entre leurs formes solubles et polymérisées, comme pour l'actine et la tubuline.

Cette stabilité soulève d'importantes questions quant au contrôle. La réponse à ces diverses questions a été apportée, en partie, par la découverte d'enzymes protéolytiques capables de dégrader spécifiquement une forme ou une autre forme de filaments intermédiaires. La plupart de ces enzymes sont activés *in vitro* par des ions Ca^{++}. Néanmoins, il est maintenant possible d'injecter à des cellules en culture des anticorps monoclonaux qui réagissent avec les filaments intermediaires.

On sait peu de choses sur le rôle joué par les filaments intermédiaires contenant de la vimentine. Certains auteurs ont impliqué leur rôle dans la distribution et le transport d'organites (Blose, 1979).

4.4. L'organisation du cytosquelette:

Jusqu'ici les différentes parties du cytosquelette étaient traitées comme constituants indépendants de la cellule. Mais, il est évident que le fonctionnement des microtubules, microfilaments et filaments intermédiaires est coordonné et que c'est par leur association, qu'ils interviennent dans les changements de forme de la cellule et engendrent divers types de mouvements cellulaires (Weber & Osborn, 1985).

Des organites et des protéines peuvent être associés au cytosquelette.

Citons les MAPS associées aux microtubules : certaines sont des protéines de haut poids moléculaire (PM 200000 à 300000), ce sont les HMW protéines, d'autres, les tau

protéines, de poids moléculaire plus faible (40000 à 60000). De nombreuses autres protéines qui se lient sélectivement aux microtubules ont été isolées. On ne connaît pas encore leur fonction (Olmsted, 1986).

Citons les lysosomes qui ont été associés aux microtubules et non aux filaments intermédiaires (Collot *et al*, 1984).

Ces liens ont été suggérés par des études sur le transport des composants protéiques dans l'axone de la cellule nerveuse (Lasek, 1981)ou par des études de cellules en culture.

Les microtubules provenants du centre cellulaire déterminent la distribution des filaments intermédiaires et semblent être responsables de l'établissement et du maintien de la polarité de la cellule. On sait malheureusement très peu de choses sur les interactions qui ont lieu entre les trois principaux systèmes de filaments du cytosquelette, et encore moins sur les mécanismes moléculaires qui coordonnent les nombreux changements auquels ces systèmes sont soumis Enfin, disons un mot du cytosol qui semble contenir un réseau complexe tridimensionnel de filaments protéiques (Bridgman, 1987 ; Luby-Phelps *et al*., 1986 et Wolosenick *et al*, 1979).

BUT DU TRAVAIL.

Dans le cadre d'un travail réalisé au laboratoire, la présence de blebs à la surface des cellules endothéliales soumises à un stress oxydant avait été observée (Thibaut-Vercruyssen *et al*, 1988).

Suite à ces constatations, nous nous sommes demandés si le cytosquelette subissait des altérations concomitantes et si ces altérations pouvaient être responsables du phénomène de blebbing.

Ce travail comprendra

-la mise en culture de cellules endothéliales à partir de la veine ombilicale humaine.

-une étude morphologique des cellules endothéliales en culture traitées et non traitées après différents temps de stress oxydant

-une étude particulière du cytosquelette des cellules endothéliales traitées et non traitées en microscopie photonique à contraste de phase,
photonique à fond noir,
électronique à balayage,
en immunofluorescence.
électronique à transmission,

Ce mémoire pourrait représenter une contribution à l'étude du rôle joué par le cytosquelette dans le phénomène de blebbing des cellules endothéliales, et de manière plus générale, sa contribution dans l'étude des altérations morphologiques des cellules soumises à un stress.

MATERIEL ET METHODES.

1. Culture des cellules endothéliales, à partir de la veine ombilicale humaine.

1.1. Origine et mise en culture de cellules endothéliales.

Immédiatement après l'accouchement, le cordon ombilical est prélevé stérilement et placé dans un tampon physiologique appelé **Cord Buffer** (140 mM NaCl - 4 mM KCl - tampon phosphate 1 mM PH 7,4 - 11 mM de D-glucose) à 4°C. La date, l'heure de la naissance, le sexe de l'enfant ainsi que la consommation de cigarettes par la mère durant la grossesse nous sont communiqués à la remise des cordons.

La mise en culture se fait stérilement et a lieu au minimum quatre heures après la naissance. La veine ombilicale est canulée à une extrémité avec un trocard, et le vaisseau est perfusé avec 20 ml de **Cord Buffer**, afin d'être lavé du sang qu'il pourrait contenir. L'autre extrémité est alors fermée et la veine remplie de collagénase 0,1% (Type CLS, Worthington ou Cooper Biomedicals) dans du PBS de Dulbecco. Après incubation dans du **Cord Buffer** à 37°C durant 20 minutes, le contenu de la veine ainsi que les 20 ml de **Cord Buffer** qui ont servi à perfuser le vaisseau sont récoltés dans un tube cônique et centrifugés pendant 5 minutes à 1000 T/minute.

Le culot est ensuite resuspendu dans 4 ml de milieu M199 (Flow Laboratories) contenant de la L-glutamine (Sigma) 2 mM, de l'Hepes 15 mM, des antibiotiques (Pénicilline 100 U/ml, Streptomycine 100 µg/ml, Nystatin 25 U/ml) ainsi que 20% de sérum de veau nouveau-né (Flow Laboratories).

Les cellules provenant d'un cordon sont déposées dans une boîte de pétri en plastic de 60 mm de diamètre (Nunc), qui a été au préalable recouverte d'une fine pellicule d'eau gélatineuse (0,2% de gélatine (Sigma) dans 100 ml d'eau distillée). Elles sont incubées à 37°C en atmosphère humide composée de 95% d'air et de 5% de CO_2.

1.2. Changement de milieu.

Il s'effectue le soir de la mise en culture. Puis, après ce changement initial, le milieu est renouvelé tous les deux jours.

1.3. Repiquage.

A la confluence, c'est-à-dire 4 à 5 jours après l'ensemencement, les boîtes sont lavées avec 2 ml de tampon "Hepes" (137 mM NaCl - 4 mM KCl - 12 mM glucose - 10 mM Hepes PH 7,5) à température ambiante, et incubées à 37°C dans une solution

contenant 2ml de collagénase (type CLS, Worthington ou Cooper Biomedicals) 0,2% dans le tampon Hepes et un volume identique de BSA/EDTA (0,5% et 0,02% respectivement) durant une période de 15 minutes, pour permettre le détachement des cellules.

Pour obtenir un pool de cellules endothéliales d'origines différentes, le contenu de plusieurs boîtes avec leur solution d'incubation ainsi que les quelques ml d'Hepes nécessaires au rinçage des boîtes sont recueillis dans un même tube cônique. Le culot obtenu après une centrifugation du contenu des deux boites de pétri durant 4 minutes à 1000 T/minute est resuspendu dans 27 ml de M199 contenant 20% de NBS. Cette suspension est distribuée dans 18 petites boîtes de pétri de 35 mm de diamètre (Nunc) préalablement recouvertes d'une fine pellicule d'eau gélatineuse, contenant éventuellement un couvre-objet en verre.

1.4. Examen des cellules en culture.

Les cellules sont examinées quotidiennement dans les boîtes de culture au moyen d'un microscope inversé Leitz Diavert, équipé d'objectifs de phase de grossissement 10X et 20X.

2. Traitement des cellules endothéliales en culture par le système xanthine-xanthine oxydase.

Nous dissolvons 3,8 mg de xanthine (Merck) dans 50 ml de milieu M199 (Flow-Laboratories), en y ajoutant la xanthine oxydase (Boehringer) (10 mU/ml) au moment de déposer le milieu dans les boîtes contenant les cellules endothéliales confluentes.

Les incubations de 0 à 120 minutes se déroulent à température ambiante.

3. Techniques morphologiques utilisées sur des cellules endothéliales en culture.

3.1. Microscopie optique.

3.1.1. Contraste de phase et fond noir.

Ces observations sont réalisées sur des cellules à confluence ayant poussé sur couvre-objet.

Ces derniers sont rincés avec du PBS et montés dans du PBS 10% dans du glycérol.

Les observations sont réalisées au moyen d'un microscope Biopan, équipé d'objectifs de phase de grossissement 10X, 40X et 100X.

3.1.2. Immunofluorescence.

3.1.2.1. Immunofluorescence indirecte appliquée à la visualisation des microtubules et des filaments intermédiaires.

Les manipulations se déroulent à température ambiante, sur des cellules à confluence ayant poussé sur couvre-objet.

1. **Fixation** : Après 3 lavages dans du PBS (1,9 mM NaH_2PO_4 H_2O - 11,8 mM Na_2HPO_4 anhydre - 0,15 M NaCl), nous réalisons la fixation des cellules par une incubation de 20 minutes dans une solution de paraformaldéhyde 3% dans du PBS (ou dans du méthanol à -20°C durant 10 minutes pour les filaments intermédiaires). Puis les cellules sont lavées 3 fois dans du PBS, et le fixateur est neutralisé par un quenching de 10 minutes dans du NH_4Cl (50 mM) dans du PBS. Cette étape est suivie de lavages rapides au PBS.

2. **Perméabilisation** :Les cellules sont perméabilisées par une incubation de 5 minutes en présence de Triton X-100 (0,1%) dans du PBS avant d'être à nouveau lavées dans du PBS.

3. **Marquage** : Après 2 lavages dans du PBS gélatine (Sigma) 0,2% destinés à éviter les absorptions non spécifiques des anticorps, et dans du PBS seul, les couvre-objets sont incubés pendant 20 minutes, à la température de la pièce et dans une atmosphère humide, sur une goutte de 25 µl du premier anticorps.

Les anticorps spécifiques utilisés pour la visualisation des microtubules, sont des anticorps de souris dirigés contre l'α-tubuline de cerveau de poulet (Amersham, Belgium), dilués 500 fois dans du PBS/Gélatine. Les anticorps destinés à la visualisation des filaments intermédiaires sont des anticorps de souris dirigés contre la vimentine du cristallin de l'oeil du porc (Prosan), dilués 500 fois dans du PBS/Gélatine.

Comme contrôles, nous omettons le premier anticorps, en le remplaçant par du PBS/gélatine, afin de vérifier l'absence de liaison non spécifique du deuxième anticorps, aux cellules endothéliales.

Après quoi les cellules sont à nouveau lavées dans du PBS contenant de la gélatine, puis dans du PBS seul. Enfin, elles sont incubées comme indiqué ci-dessus, avec une solution de l'anticorps de chèvre anti-immunoglobuline de souris couplé à de l'isothiocyanate de fluoresceine, dilué 50 fois dans du PBS/Gélatine (Sigma).

Cette seconde incubation, d'une durée de 20 minutes, se passe à l'obscurité et précède un dernier lavage avec du PBS/gélatine, puis avec du PBS seul. Nous effectuons le montage dans une goutte de PBS 10% dans du glycérol déposée sur une

lame porte objet, et nous observons ces préparations à l'aide d'un photomicroscope Leitz Dialux 22 à fluorescence épiaxiale.

3.1.2.2 Autre technique de marquage par immunofluorescence indirecte appliquée à la visualisation des microtubules .

Avant d'entamer la révélation immunocytochimique, les cellules endothéliales cultivées sur lames couvre-objet sont fixées dans une solution de glutaraldéhyde à 1 % dans un tampon Pipes à PH 6 préchauffé à 37°C(double Hanks: 1g/l de D glucose, 0,4g/l Kcl, 8g/l Nacl, 0,06g/l KH_2PO_4, 0,0475 g/l Na_2HPO_4, 0,35 g/l $NaHCO_3$, 2,5mM Pipes-2 mM EGTA et 2 mM $Mgcl_2$) pendant 10 minutes, à température ambiante. Cette fixation est suivie de 3 rinçages de 10 minutes dans le tampon Pipes, également préchauffée, pendant 10 minutes à température ambiante.

Les cellules sont alors perméabilisées avec de l'éthanol 50% dans le tampon Pipes, en présence de $NaBH_4$ (0,5mg/ml) durant 30 minutes. Ce dernier intervient dans la réduction de la glutaraldéhyde réactionnelle, éventuellement encore présente. Cette étape est suivie d'un rinçage dans un nouveau tampon: une solution saline de Nacl 0,154 M, tamponnée avec du Tris- Hcl 10 mM à PH 7,6 (TBS). Après le rinçage, les cellules sont mises en présence d'un antiserum de chèvre normal (NGS) dilué(1:25) dans le TBS, pendant 15 minutes, afin de bloquer les sites antigéniques non spécifiques. Aprés rinçages dans le TBS, l'anticorps de souris dirigé contre l' -tubuline de cerveau de poulet (Amersham, Belgium) dilué (1:500) dans le TBS et en présence de NGS à 1% ou de TBS/NGS pour le contrôle sont mis en présence des cellules et celle-ci sont incubées à température ambiante dans une enceinte fermée et humide pendant une nuit. Après rinçages dans le TBS pendant 30 minutes, les cellules sont mises pendant 60 minutes en présence d'une solution d'anticorps de chèvre anti-immunoglobuline de souris couplé à de l'isothiocyanate de fluoresceine, dilué 20 fois dans du TBS (Sigma). Après rincages dans le TBS les lames sont montées dans une solution de glycérol-PBS pour leur observation à l'aide d'un photomicroscope Leitz Dialux 22 à fluorescence épiaxiale.

3.1.2.3. Immunofluorescence directe appliquée à la visualisation des microfilaments.

Les cellules sont cultivées sur lame couvre-objet dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre (Nunc). A la confluence, les préparations cellulaires sont fixées à la paraformaldéhyde pendant 20 minutes comme décrit en 3.1.2.1. Après fixation, les

cellules sont rincées dans du PBS puis perméabilisées comme décrit précédemment, et lavées dans du PBS. Le procédé immunocytochimique est réduit à

une incubation de 20 minutes, en atmosphère humide à l'obscurité, en présence de N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) phallacidine (Molecular Probes), dérivé fluorescent d'une phallotoxine de *Amanita phalloides* (Cooper, 1987), présentant une haute affinité pour la F-actine (Hinshaw, 1986 et Wulf et al., 1979).

Après quoi, les lames couvre objet sont montées dans du PBS/Glycérol avant d'être observées. Des préparations identiques, en omettant la NBD-Phallacidine ont été utilisées comme contrôles.

3.1.2.4. Double immunofluorescence appliquée à la visualisation des microtubules et des microfilaments.

Avant d'entamer le marquage immunocytochimique, les cellules sont fixées et perméabilisées comme décrit précédement en 3.1.2.1. La première incubation de 20 minutes a lieu en présence d'une quantité équivalente de NBD-Phallacidine et de l'anticorps de souris contre l'α-tubuline de cerveau de poulet. Après des lavages similaires à ceux décrits en immunofluorescence indirecte (3.1.2.1), nous incubons les cellules en présence d'une solution d'anticorps de chèvre anti-immunoglobuline de souris couplé à l'isothiocyanate de tétraméthylrhodamine, dilué 50 fois dans du PBS/Gelatine (Sigma). Après 20 minutes d'incubation, les préparations sont lavées 2 fois pendant 5 minutes dans du PBS gélatine puis dans du PBS seul avant d'être montées et observées.

3.2. Microscopie électronique.

3.2.1. Microscopie électonique à balayage.

Pour la microscopie électronique à balayage, les cellules sont cultivées sur lamelles couvre-objet, dans des boîtes de Pétri de 35mm de diamètre.

3.2.1.1. Choix d'une méthode de fixation.

Méthode n°1:

-**fixation** dans de la glutaraldéhyde 2,5% dans du tampon cacodylate 0,1M à PH 7,4 pendant 1h30 à 4°C.

-rincages dans du tampon cacodylate 0,1M PH 7,4 à 4°C (3X1 minute).

-**Post-fixation** avec le tétroxyde d'osmium 0,5% dans du tampon cacodylate 0,1M à PH 7,4 durant 1 heure à 4°C.

-trois rincages d'une minute avec le tampon cacodylate à 4°C.

-**déshydratation** progressive dans de l'éthanol 70, 90% (3 bains de deux minutes), et dans de l'éthanol absolu (deux bains de 10 minutes) à 4°C.

Méthode n°2:

-**la fixation** à lieu dans de la glutaraldéhyde 1,5% dans du tampon cacodylate0,1M à pH 7,4 à 4°C pendant 1h30.

-rincages dans un tampon cacodylate 0,1M PH 7,4 à 4°C (trois bains de 15minutes).

déshydratation progressive dans de l'acétone 30, 50, 70 et 90% (un bain de 10 minutes et un bain de 5 minutes) , et dans de l'acétone 100% (deux bains de 10 minutes) à 4°C.

3.2.1.2. La substitution et la métallisation.

-technique du point critique où le solvant est substitué par le CO_2

-métallisation à l'or de l'échantillon sous argon

-examen des échantillons au microscope électronique à balayage Jeol S 35 (FNDP Namur) ou JSM-840 A (Université de Liège).

3.2.2. Microscopie électronique à transmission.

3.2.2.1. Fixation.

3.2.2.1.1. Choix d'une méthode de fixation:

Méthode n°1:

-**fixer** les cellules avec de la glutaraldéhyde 2,5% dans du tampon cacodylate 0.1M (502 mOsm.) à PH 7,4 pendant 1h30 à 4°C.

-rincer avec le tampon cacodylate 3x1 minute à 4°C.

-**post fixer** avec le tétroxyde d'osmium 0,5% dans du tampon cacodylate 0,1M (220 mOsm.) à PH 7,4 durant 1 heure à 4°C.

-réaliser trois rinçages d'une minute avec le tampon cacodylate à 4°C.

Méthode n°2 (3) (Yirtanen *et al*, 1980):

-**Fixer** les cellules avec de la glutaraldéhyde 2,5% dans du tampon cacodylate 0,1M à PH 7,4 pendant 30 minutes à température ambiante ou à 4°C.

-rincer avec le tampon cacodylate 3x1 minute à 4°C.

-**Post fixer** avec le tétroxyde d'osmium 0,5% dans du tampon cacodylate 0,1M à Ph 7,4 durant 1heure à 4°C

Méthode n°4 (Reaven *et al* 1973):

-rincer au tampon phosphate à 37°C et **fixer** immédiatement avec 1% de glutaraldéhyde dans un tampon phosphate 0,1M (363 mOsm.) à PH 7,2 pendant 3 heures à 22°C.

-post fixer avec le tétroxyde d'osmium 1% dans du tampon phosphate 0,1M (253 mOsm.) à PH 7,2 durant 1heure suivi par 0,5% d'acétate d'uranyle dans un tampon véronal à PH 5,8 durant 1h30 à température ambiante à l'abri de la lumière.

-réaliser trois rinçages d'une minute avec le tampon phosphate.

Méthode n°5:

La méthode suivie est identique à la méthode précédente hormis le remplacement du tampon phosphate par le tampon cacodylate 0,1M (Osmolarité de la glutaral-déhyde: 323 mOsm., et l'osmolarité du tétroxyde d'osmium dans de telle conditions: 240 mOsm.) à PH 7,4.

3.2.2.1.2. Visualisation de l'origine des structures tubulaires voisinant les blebs par un marquage au Rouge de ruthénium.

-Les cellules sont fixées au moyen d'une solution de glutaraldéhyde 1,5% dans du tampon cacodylate 0,1 M PH 7,4 pendant 10 minutes à température ambiante.

-A la fin de l'incubation, elles sont lavées avec du tampon cacodylate 0,1M PH 7.4, et post fixées avec du tétroxyde d'osmium 1% dans du tampon cacodylate 0,1M à PH 7,4 contenant 1% de rouge de ruthénium pendant 30 minutes à 4°C.

-Trois rincages rapides au tampon cacodylate seront réalisés, avant la déshydratation.

3.2.2.2. Déshydratation et enrobage.

Quelque soit la méthode de fixation les cellules sont :

-déshydratées progressivement avec de l'éthanol 70° et 90°: 3x2 minutes à 4°C et enfin avec de l'éthanol 100°: 3x 10 minutes à la température ambiante.

-enrobées dans de l'épon dont la polymérisation durera 3 jours à 60°C.

Les coupes ultra-fines ont été obtenues avec un ultramicrotome (ultrotome III, LKB), puis contrastées pendant 30 minutes avec une solution aqueuse d'acétate d'uranyle 1%, suivie de citrate de plomb selon la technique de Reynolds (Lewis et Knight 1977) pendant 3 minutes. Les grilles sont examinées au microscope électronique Philips EM301 à 60 Kv.

3.2.3. Essai de mise au point d'un marquage en microscopie électronique à transmission, au moyen d'un anticorps couplé à l'or.

3.2.3.1. Méthode du pré-embedding appliquée à la visualisation des microtubules:

Les cellules endothéliales sont cultivées dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre, et utilisées à la confluence.

La technique immunocytochimique suivie est identique à celle rapportée au point 3.1.2.1. mises a part quelques variantes au niveau de la perméabilisation et du second anticorps utilisés:

Perméabilisation: Les cellules préalablement fixées sont perméabilisées au moyen de Triton X-100 (0,1%) dans du PBS, durant 5minutes ou dans du Triton X-100 (0,5%) dans du PBS, durant 30 minutes à température de la pièce.

Second anticorps: La seconde incubation est réalisée en présence d'une solution d'anticorps de chèvre anti-immunoglobuline de souris couplé à une particule d'or de 10 nm (Janssens) dilué 4 fois dans du PBS/Gélatine, durant 20 minutes ou 4 H

Après ce marquage, les cellules sont refixées dans une solution de glutaraldéhyde 1% dans du tampon cacodylate 0,1M PH 7,4 durant 60 minutes à la température de la pièce. En fin de fixation, elles sont lavées avec du tampon cacodylate, post fixées au moyen de tétroxyde d'osmium 0,5%dans le tampon cacodylate pendant 10 minutes à 0°C. Cette post-fixation est suivie d'une déshydratation et d'un enrobage classique.

3.2.3.2. Méthode du post-embedding appliquée à la visualisation des divers éléments du cytosquelette : microfilaments, microtubules et filaments intermédiaires.

Ce marquage se réalise ,sur des coupes ultra fines recueillies sur une grille de nickel, à température ambiante.

Chaque grille est déposée sur une goutte de métapériodate de sodium saturé, durant 60 ou 120 minutes. Après ce temps , chaque grille est rincée au moyen d'eau distillée puis avec du PBS/Gelatine avant d'être incubée avec l'anticorps dirigé contre l'actine,

l'α-tubuline ou la vimentine.

Après 1 à 2 heures d'incubation, chaque grille est rincée dans du PBS puis déposé dans une goutte d'une solution d'anticorps de chèvre anti-immunoglobuline de souris couplé à une particule d'or dilué 4 fois dans du PBS/Gélatine durant 30 minutes. Des lavages successifs au PBS et à l'eau distillée précèderont la coloration habituelle

des coupes: à l'acétate d'uranyle pendant 30 minutes à l'abri de la lumière, puis au citrate de plomb durant 3 minutes.

RESULTATS ET COMMENTAIRES.

1. Identification des cellules endothéliales en culture

Nous avons utilisé les cellules endothéliales en première sous-culture et à confluence. L'aspect de ces monocouches correspond tout à fait à ce qui a été décrit dans la littérature (Jaffé, 1984) et à ce qui a déjà été abondamment décrit dans notre laboratoire (Poumay, 1988). Nous en reparlerons dans le point 2.1.

L'identification des cellules endothéliales se base sur l'aspect de monocouches formant une sorte de "pavement" de cellules plus ou moins polyédriques, tassées les unes contre les autres mais ne se recouvrant jamais (ce qui les différencie des cellules musculaires lisses).

L'identification spécifique a été réalisée en premier lieu par la démonstration du facteur VIII en immunofluorescence. Les anticorps fluorescents mettent en évidence les corps de Webel-Palade sous forme de petits batonnets abondants dans le cytoplasme des cellules endothéliales. Ces corps de Webel-Palade stockent le facteur VIII dans leur matrice. D'autre part, par l'observation fréquente en ME à transmission de ces mêmes organites nous avons confirmé cette première identification. Il s'agit de corps oblongues de 0,1 µm de largeur à 2à3 µm de longueur tout à fait uniques aux cellules endothéliales et dont la matrice contient de fins tubules disposés parallèllement et dans le sens de la longueur de l'organite (Planche 1-b).

2. Observation des cultures de cellules endothéliales traitées et non traitées en microscopie photonique.

2.1 Microscopie à contraste de phase inversé.

Nous avons suivi systématiquement une culture de cellules endothéliales en première sous-culture, à confluence, toutes les 5 minutes durant deux heures d'incubation en présence du système xanthine-xanthine oxydase (fig. 2.1.1.)

Résultats :

Au temps 0, nous observons une monocouche dense de cellules polygonales, étroitement accolées, adhérant solidement au fond de la boite et dont le noyau central est bien visible. Cependant, signalons qu'avant même toute action des dérivés actifs

de l'oxygène, on peut observer la présence de quelques cellules " à blebs", petites protubérances sphériques paraissant homogènes .

Par la suite, et de manière progressive au cours du stress oxydant, nous observons une rétraction des cellules qui s'écartent ainsi les unes des autres, l'apparition de blebs en périphérie des cellules et un arrondissement de certaines d'entre-elles, qui s'entourent d'un halo clair, signe précurseur d'un détachement du substrat dans certains cas. Certains de ces signes seront déjà visibles dès les premières cinq minutes, tous iront en s'intensifiant avec la durée d'application du stress oxydant.

Après 15 minutes d'incubation, s'amorce la rétraction cellulaire mais le phénomène de blebbing est peu marqué.

Cette rétraction cellulaire s'accentue jusqu'à 60 minutes. A ce moment, cette altération perd rapidement de son ampleur au profit du blebbing qui s'intensifie au sein de la monocouche mais également au niveau de chaque cellule.

Après 120 minutes, les discontinuités entre les cellules sont extrêmement marquées bien que les réponses cellulaires au stress soient variables quantitativement et qualitativement.

En effet, si la plupart des cellules sont arrondies, couvertes de blebs, elles côtoient toutefois des cellules en cours de rétraction et quelques cellules dont l'aspect morphologique semble correspondre à celui des cellules non-oxydées.

En ce qui concerne les contrôles, les cellules endothéliales ont été incubées en présence de xanthine seule et elles ont été observées toutes les cinq minutes dans les mêmes conditions que les cellules soumises au stress oxydant. Dans ce cas, nous notons l'absence quasi totale de la rétraction cellulaire et du blebbing. (fig 2.1.2)

Commentaires.

Divers auteurs ont illustré leurs observations en microscopie optique des cellules endothéliales exposées aux dérivés actifs de l'oxygène : rétraction et parfois même détachement cellulaire sont classiquement rapportés (Hennig *et al*, 1987 ; Phillips *et al*, 1988 ; Thibaut-Vercruyssen *et al*, 1988).

Poumay et Thibaut-Vercruyssen (1988) ont observé ces discontinuités dans une monocouche de cellules endothéliales après un stress oxydant d'une durée maximale de 120 minutes. Là aussi le phénomène est réversible et la récupération semblait complète après 24 heures de réincubation des cellules endothéliales en milieu normal.

Dans ces même cellules, les mêmes altérations ont été produites sous l'influence de composés divers parfois très toxiques tels que les cytochalasines B et D, le sitostérol et l'histamine (Shasby *et al*, 1982 ; Wysolinersky, 1988 et Boberg, 1989).

Ainsi, Shasby (1982) observe une rétraction des cellules endothéliales d'artère pulmonaire de porc mises en culture sur filtre millipore, en présence de cytochalasines B et D. La diminution de l'adhésion cellulaire explique l'augmentation de la perméabilité de la monocouche à l'albumine. Le phénomène est cependant réversible endéans les 4 heures, en absence des éléments inhibiteurs et après récupération dans le milieu habituel M199.

Wysolnerski (1988) a également noté cette rétraction des cellules endothéliales soumises à l'influence de la cytochalasine B, de l'histamine et de l'ethchorvynol. Il a montré qu'une réduction du taux d'ATP intracellulaire, par incubation des cellules endothéliales dans un milieu contenant du glucose libre, de l'antimycine A et du 2-déoxyglucose, pouvait inhiber la rétraction.

De telles modifications ne sont pas l'apanage des cellules endothéliales : Welsh (1985) a décrit des phénomènes similaires sur diverses lignées cellulaires (MDCK, Vero, Hep2 MDBK). Suite à des études ultrastructurales, il suggère que le processus de rétraction pourrait être produit par la dissociation des jonctions intercellulaires.

Miranda (1984) avait déjà constaté l'association rétraction-blebbing chez des cellules Hela exposées à la cytochalasine D.

Lemasters (1983) a parfaitement décrit les modifications de surface survenant suite à l'hypoxie dans le foie de rat perfusé. Il a de plus examiné les effets de la réoxygénation.

Nicotera (1989) a induit chez des cellules 1c1c7 d'hépatome murin une anoxie chimique. Après 15 minutes d'incubation en présence de KCN et d'iodoacétate, de nombreux petits blebs sont apparus en surface des cellules. A 60 minutes, la plupart d'entre elles (75 à 80 % de la population) sont recouvertes de grosses protrusions bien qu'elles excluent encore les colorants vitaux.

Bond (1989) a montré chez des myocytes isolés de rats nouveaux-nés une hypercontraction des cellules non réversibles lors de la réoxygénation. Cependant, ces cellules sont toujours à même d'exclure les colorants vitaux tels que le bleu de trypan. Il en conclut qu'il faut souligner les différences entre état contracté et lésion irréversible des cellules. Après 12 minutes d'anoxie, on peut remarquer des blebs en

surface des cellules rétractées et la récupération est obtenue en 32 minutes. Après 100 minutes d'anoxie, il n'y a plus de récupération possible.

Souvent, des auteurs invoquent des modifications du cytosquelette et plus précisément des modifications au sein des microfilaments comme par exemple la perte de la bande dense périphérique et une réorganisation de ces éléments (Wong, 1984).

Pour certains, l'augmentation de la perméabilité de la monocouche résulterait de cette contraction-rétraction des cellules ; dans le cas de stress oxydant, on invoque la peroxydation des chaines lipidiques des phospholipides membranaires (Hennig, 1987 ; Phillips *et al*, 1988) c'est-à-dire une cytotocoxicité directement induite par les radicaux libres.

Les lésions des cellules endothéliales en culture sont identiques, qu'elles soient produites par le système xanthine-xanthine oxydase ou par des PMN activés.

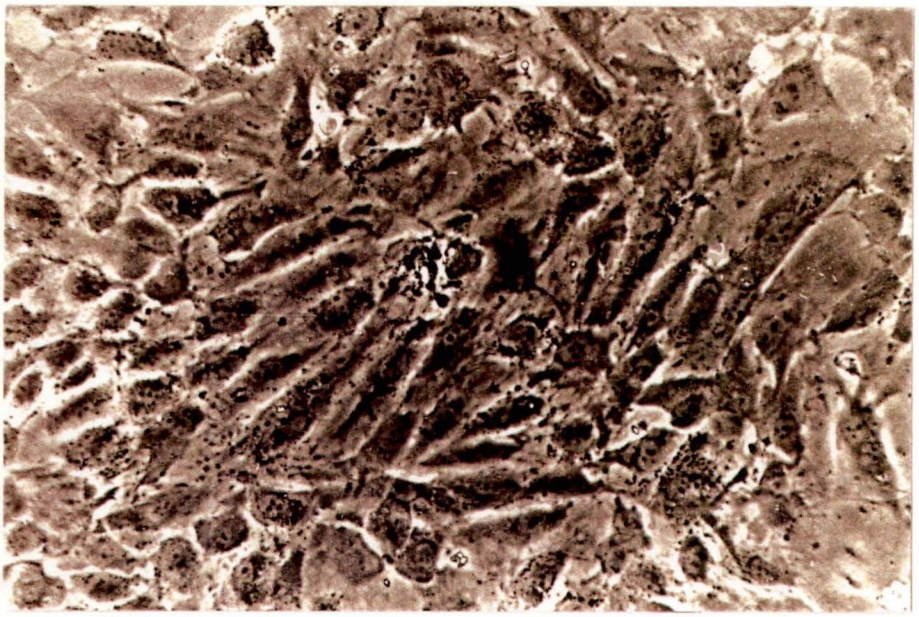
Dans ce dernier cas cependant, on ne peut éliminer le rôle possible des différentes protéases, par exemple l'élastase, dans le détachement des cellules de leur substrat (Harlan, 1981).

Cependant, les cellules endothéliales contiennent des systèmes de défense antioxydants endogènes (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase, vitamine E) qui peuvent prévenir ou enrayer la production de radicaux libres.

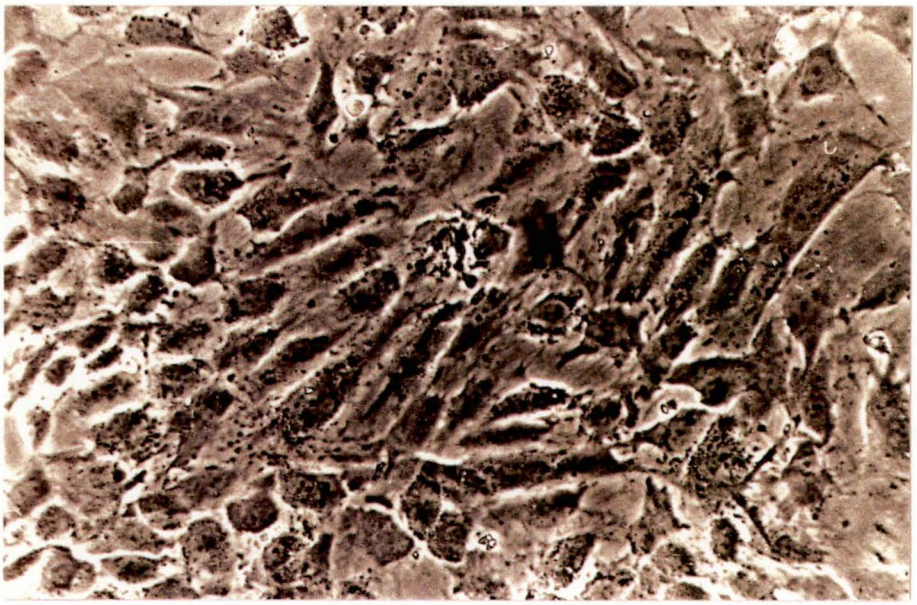
Si ces défenses sont diminuées, la cellule endothéliale devient incapable d'éliminer les radicaux toxiques, il en résulte une peroxydation lipidique des membranes ou une altération des protéines membranaires capitales pour le maintien de l'homéostasie intracellulaire (par exemple des ATPases). La monocouche perd son intégrité, ce qui peut mener au passage accru et anormal de certains ions ou molécules (albumine, sucre par exemple) (Schasby *et al*, 1982 ; Hennig, 1988).

Figure 2.1.1 : Microscopies prises au microscope inversé à contraste de phase d'un même champ de cellules endothéliales après 0,5,30,60,90,120 minutes incubées en présence de dérivés actifs de l'oxygène (respectivement les figures 1,2,3,4,5,6).

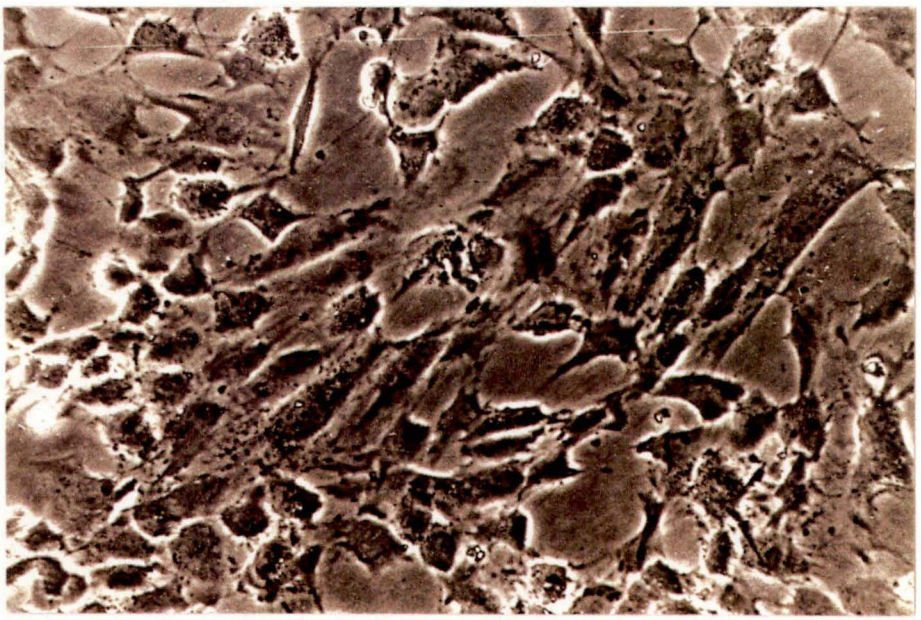
1



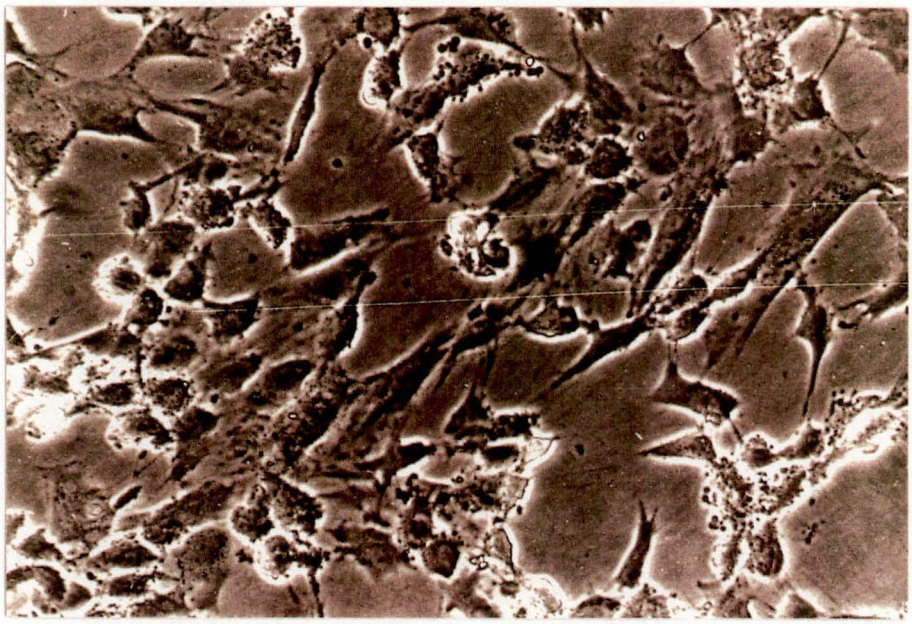
2



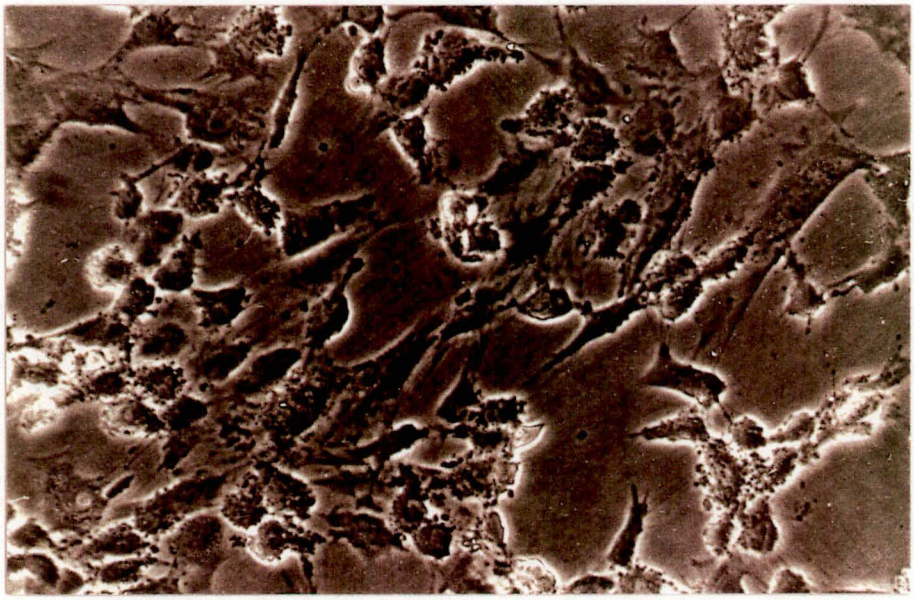
3



4



5



6

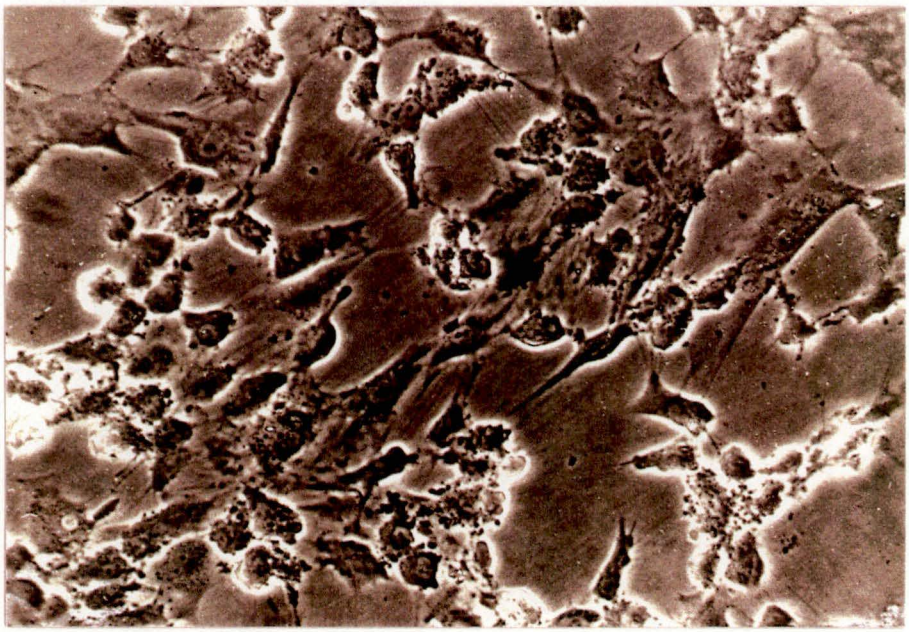
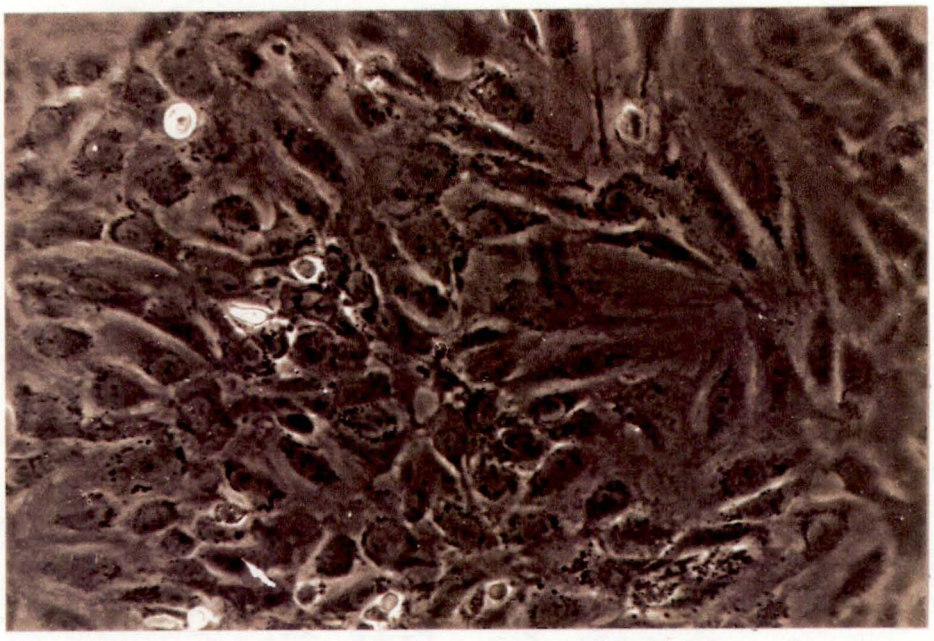
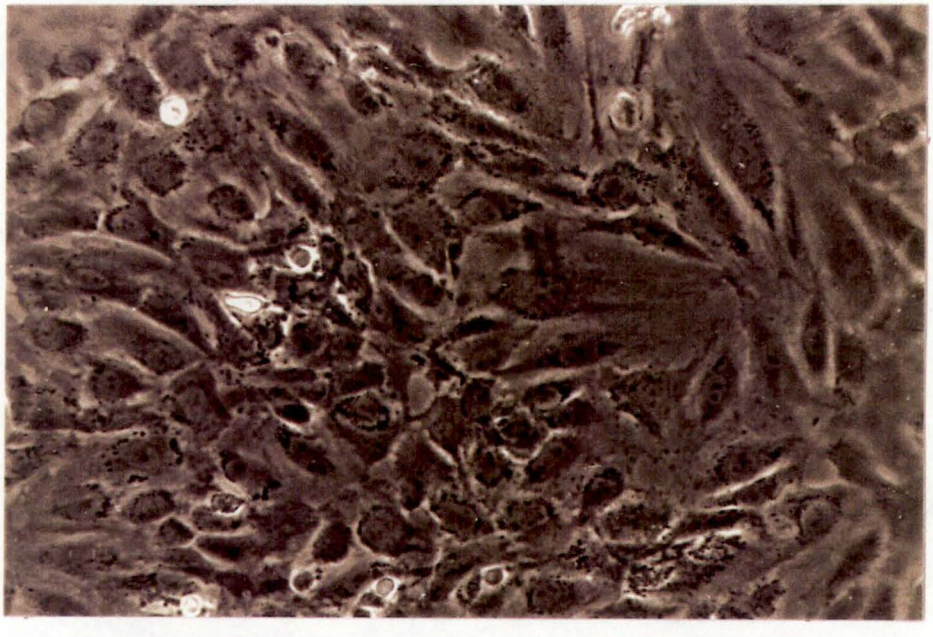


Figure 2.1.2 : Microscopies prises au microscope inversé à contraste de phase d'un même champ de cellules endothéliales après 0,60,120 minutes incubées en présence de xanthine seule (respectivement les figures 1,2,3).

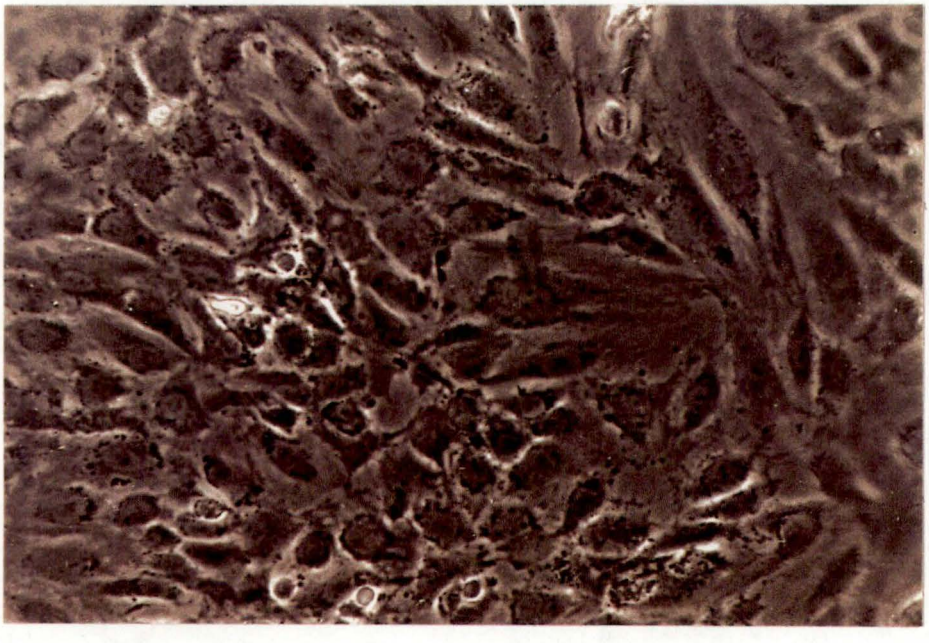
1



2



3



2.2 Immunofluorescence:

Grâce aux techniques de marquage par immunofluorescence, nous allons pouvoir visualiser la configuration des microfilaments, des microtubules et des filaments intermédiaires dans la cellule endothéliale en culture. Parmi les techniques immunocytochimiques, nous envisagerons successivement l'immunofluorescence directe, pour révéler la localisation de la F-actine des microfilaments, l'immunofluorescence indirecte pour révéler la localisation de l' α-tubuline des microtubules, et de la vimentine des filaments intermédiaires. Nous avons également réalisé des expériences de double immunofluorescence de façon à pouvoir observer simultanément les microfilaments et les microtubules. Rappelons que dans cette double immunofluorescence, les anticorps anti α–tubuline sont révélés par la TRITC et les F-actine par la NBD-Phallacidine.

2.2.1 Immunofluorescence directe appliquée à la visualisation des microfilaments:

Si l'on observe la distribution de la NBD-Phallacidine, dans les cellules endothéliales humaines en culture non exposées aux dérivés actifs de l'oxygène, on constate une prédominance de faisceaux parallèles de filaments d'actine, disposés en faisceaux ou câbles " stress fibers " (planche 1-a). Les microfilaments peuvent également former une couche corticale située sous la membrane plasmique, appelée "cortical network" (planche 1-b).

A 60 minutes d'oxydation, on observe une diminution de la quantité de stress fibers, une rétraction cellulaire soulignée par la présence de fibres d'actine appelées fibres de rétraction (Alberts *et al*, 1983), une disparition progressive du cortical network ainsi que l'apparition d'une zone périnucléaire fluorescente, et d'un marquage périphérique au sein du blebs (planche 1-c).

A 120 minutes d'oxydation, la distribution d'actine semble diffuse au sein des cellules rondes. Toutefois, un marquage intense souligne la zone périnucléaire et la région périphérique interne des nombreux blebs (planche 1-d).

2.2.2 Immunofluorescence indirecte appliquée à la visualisation des microtubules et des filaments intermédiaires:

Dans les cellules endothéliales humaines en culture, non exposées aux dérivés actifs de l'oxygène, les anticorps anti α-tubuline révélés par la TRITC ou la FITC, mettent en évidence un réseau de microtubules rayonnant à partir d'un point situé dans la région périnucléaire, connue sous le nom de centrosome. Toutefois, les cellules endothéliales non oxydées traitées selon la méthode utilisant le tampon PBS,

sembleraient présenter une dépolymérisation partielle du réseau, phénomène non observé avec la méthode utilisant le tampon Pipes (planche 2-a).

A 60 minutes d'oxydation, il semble que la majeure partie du réseau de microtubules soit dépolymérisé, tandis que quelques microtubules plus stables continuent de rayonner à partir des centrosomes. Le marquage est uniforme au sein des blebs présents (planche 2-b).

A 120 minutes d'oxydation, un marquage intense est concentré dans la région périnucléaire. Ce stade nous permet de confirmer le marquage uniforme dans tout le bleb (planche 2-c).

Si l'on observe la distribution des anticorps anti-vimentine révélés par la FITC dans les cellules endothéliales humaines en culture, fixées à la formaldéhyde, non exposées aux dérivés actifs de l'oxygène, on constate un réseau de filaments s'étendant à travers le cytoplasme. La plupart des filaments intermédiaires sont disposés en faisceaux relativement lâches; certains d'entre eux plus denses s'étendent radialement à partir de faisceaux encerclant partiellement ou totalement le noyau (planche 3-a). Cependant, ce réseau semble se maintenir au cours de l'oxydation des cellules. De plus, l'absence de marquage au niveau des blebs est à noter (planche 3-b.c) . Des expériences similaires ont été réalisées, après fixation au méthanol à -20°c afin d'augmenter la préservation des sites antigéniques, ou selon la méthode utilisant la saponine, mais sans succès. Les tests étaient aussi peu fluorescents que les contrôles et les structures étaient à la limite de la visibilité.

Commentaires:

- Les microfilaments, les microtubules et les filaments intermédiaires adoptent dans la cellule endothéliale en culture exposée à la xanthine seule des distributions qui sont comparables à celles de cellules endothéliales non traitées. Les microfilaments se rassemblent en fibres de stress parcourant la cellule (Kalnins & Subrahmanyan, 1981 et Wysolnerski *et al*, 1988); les microtubules rayonnent à partir de la région centriolaire (Kalnins & Subrahmanyan, 1981); quant aux filaments intermédiaires, ils présentent une grande variabilité de composition selon l'origine de la cellule endothéliale (Dodge *et al*, 1988). Ils sont souvent disposés en faisceaux relativement lâches (Franke *et al*, 1979).

- Cependant, une discontinuité est observée dans le marquage des microtubules de cellules endothéliales incubées en présence de xanthine seule, traitées suivant la méthode au tampon PBS. Cette discontinuité pourrait refléter une dépolymérisation partielle pouvant être produite par une composition ionique du tampon utilisé non conforme au maintien des microtubules très labiles. Par contre, la méthode au Pipes semble mieux répondre aux exigences ; toutefois, ce seul facteur ne peut être rendu

entièrement responsable de ce maintien du réseau, puisque l'entièreté de la méthode a été modifiée.

Des méthodes différentes ont également été testées pour la visualisation des filaments intermédiaires, afin d'accroître l'intensité du marquage. Seule la technique à la fixation à la formaldéhyde a pu révéler les filaments, bien que cette technique puisse engendrer la non résistance de certains sites antigéniques propres aux filaments intermédiaires (Sentein, 1975).

- L'organisation des microfilaments et des microtubules au sein de cellules endothéliales ayant subi un stress oxydant (système xanthine-xanthine oxydase), semble modifiée.

En effet, il semblerait que le cortical network soit déplacé vers la région périnucléaire, peut être à cause de la rétraction cellulaire. De telles modifications des microfilaments ne sont pas uniques aux cellules endothéliales. Hinshaw et al (1986) ont suivi un réarrangement des microfilaments au sein de la lignée cellulaire P388D1 soumise à un stress oxydant mais ils ont également, par la cytométrie de flux, démontré une augmentation substantielle de la F-actine. Wysolmerski (1988) a montré une rétraction de la bande dense périphérique d'actine ramenée dans la région sub-corticale dans des cellules exposées à l'histamine, et même la disparition des faisceaux d'actine dans les cellules traitées à la cytochalasine B.

Le réseau de microtubules semble être soumis à une dépolymérisation très accentuée à 120 minutes. Toutefois, la fluorescence intense à 120 minutes au sein de cellules rétractées rend difficile l'observation d'un maintien même partiel d'un réseau de microtubules. Yirtanen *et al*(1980) ont observé une destruction du réseau de microtubules au niveau de fibroblastes traités au froid ou suite à une exposition à la Colcemid.

D'autres auteurs ont également abondamment illustré les altérations au niveau des microtubules et des microfilaments après exposition de la cellule à divers agents. En effet, Shasby *et al* (1982) ont observé des destructions au sein des micro-filaments de cellules endothéliales exposées à la cytocholasine B et D. D'autre part, Wysolmerski *et al* en 1988, par le biais d'inhibiteurs du métabolisme, ont diminué le taux d'ATP, affectant les microfilaments et empêchant ainsi la rétraction des cellules incubées en présence de cytochalasine B tout en maintenant la perte du cortical network et la désorganisation des microfilaments. Cependant, Bershadsky *et al*, (1980) ont observé qu'une diminution du niveau d'ATP au sein de la cellule entraînait une modification des microfilaments sans engendrer une modification de la forme observée lors des traitements à la cytochalasine.

Seule l'organisation des filaments intermédiaires ne semble pas être affectée par le stress oxydant. On peut observer dans le bleb un marquage signant la présence d'actine et de tubuline. Des observations similaires ont été réalisées par Malorni *et al* (1988). Cependant quelques divergences existent avec nos résultats; en effet,

Kalmins & Subramanyan,(1981) soulignent la présence de tropomyosine, de myosine et de vimentine (très faible) dans les blebs de cellules endothéliales en culture de porc ainsi que l'absence de tubuline, tandis, que la vimentine est absente dans les blebs de cellules endothéliales humaines.

Planche 1 : Observation des microfilaments par immunofluorescence directe sur des cultures de cellules endothéliales traitées ou non traitées.

a/Organisation des filaments d'actine "stress fibres" au sein d'une cellule endothéliale non traitée.

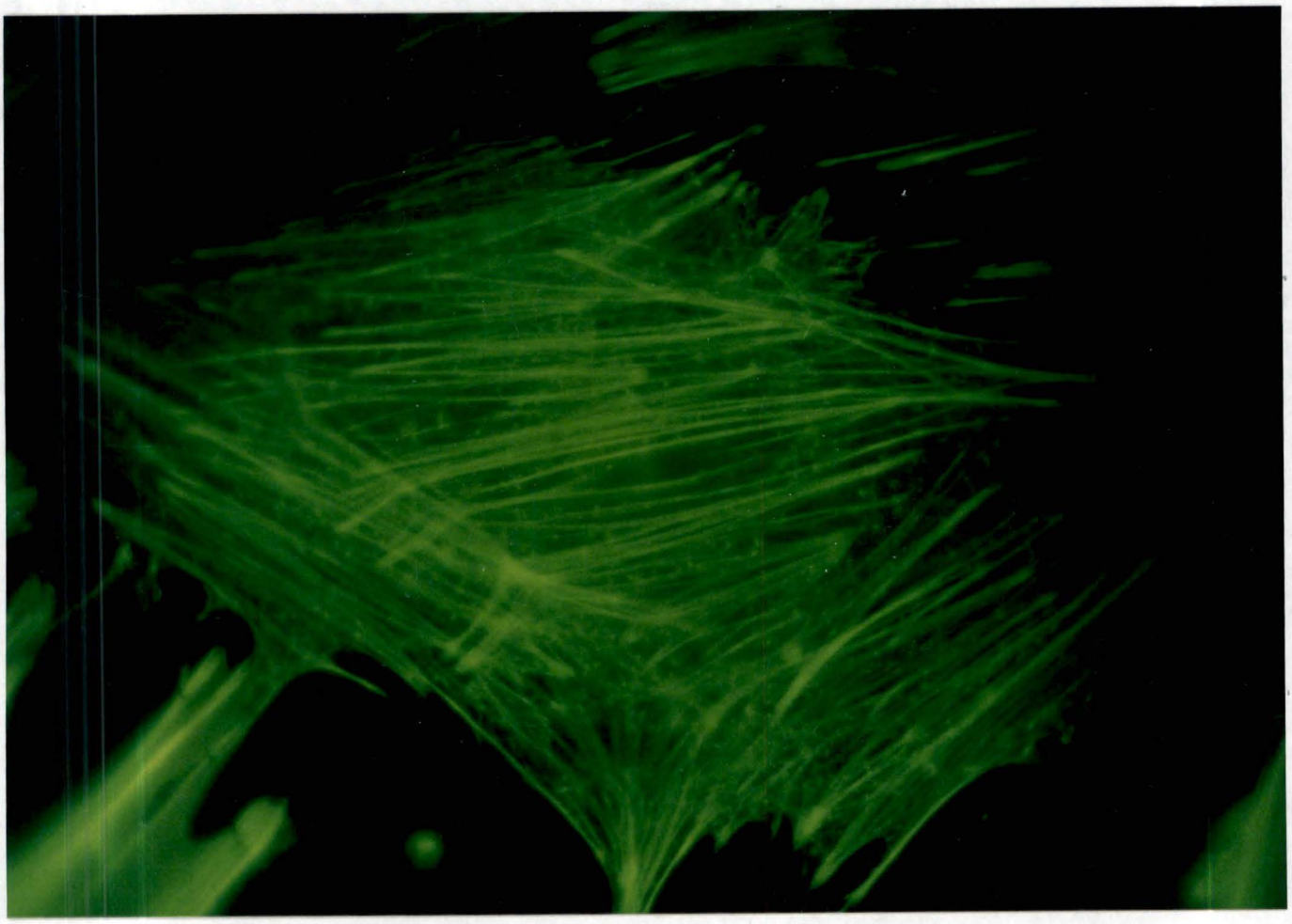
b/ Mise en évidence du cortical network en périphérie d'une cellule endothéliale non traitée.

c/Après 60 minutes d'incubation avec des dérivés actifs de l'oxygène. La cellule endothéliale se contracte. On peut également y observer une diminution des stress fibres.

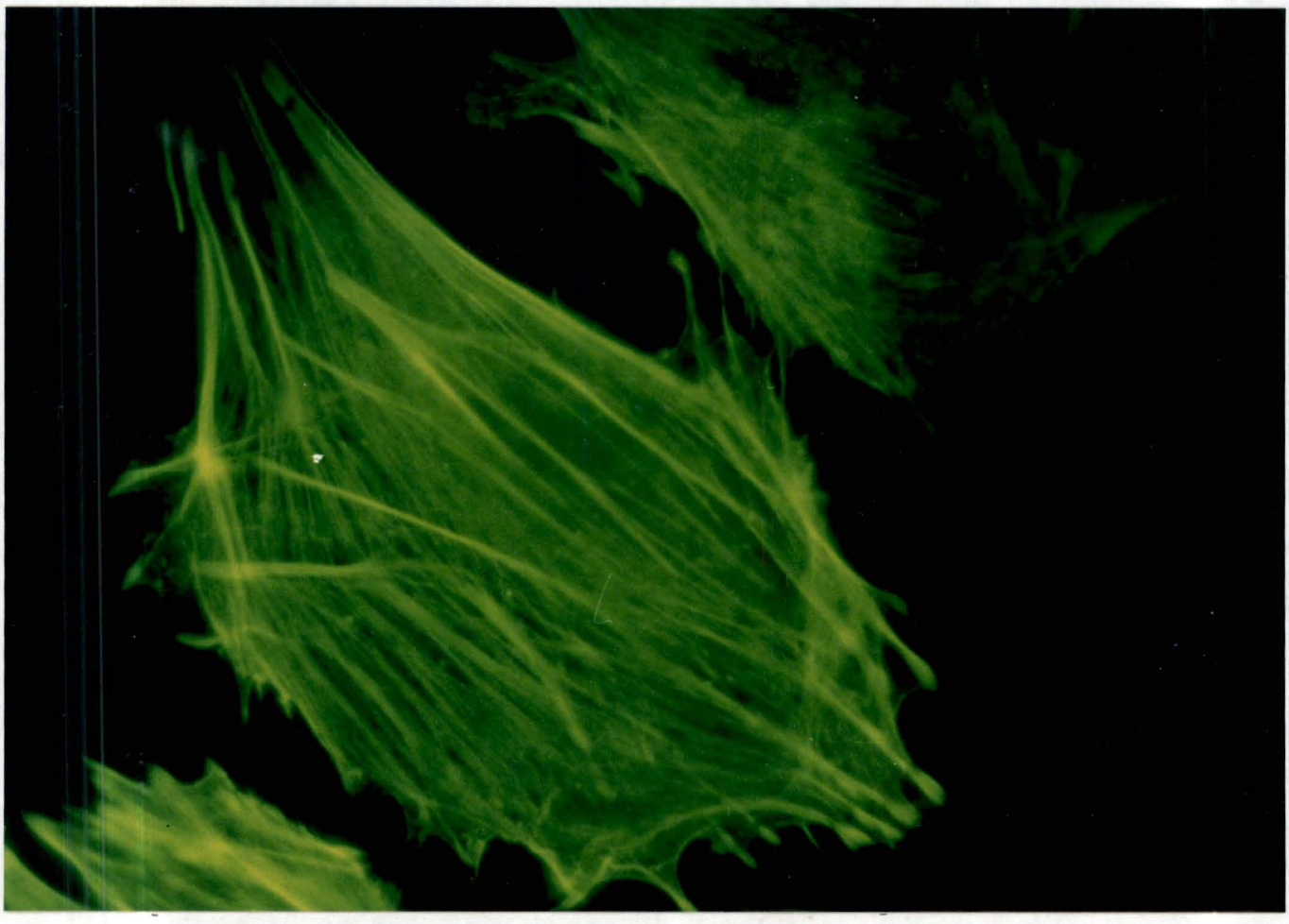
d/ Après 120 minutes d'incubation avec des dérivés actifs de l'oxygène. La cellule endothéliale est de plus en plus rétractée et arrondie. On peut mettre en évidence des blebs marqués sous la membrane plasmique et une région très fluorescente autour du noyau.

e/ Contrôle sans la NBD-Phallacidine.

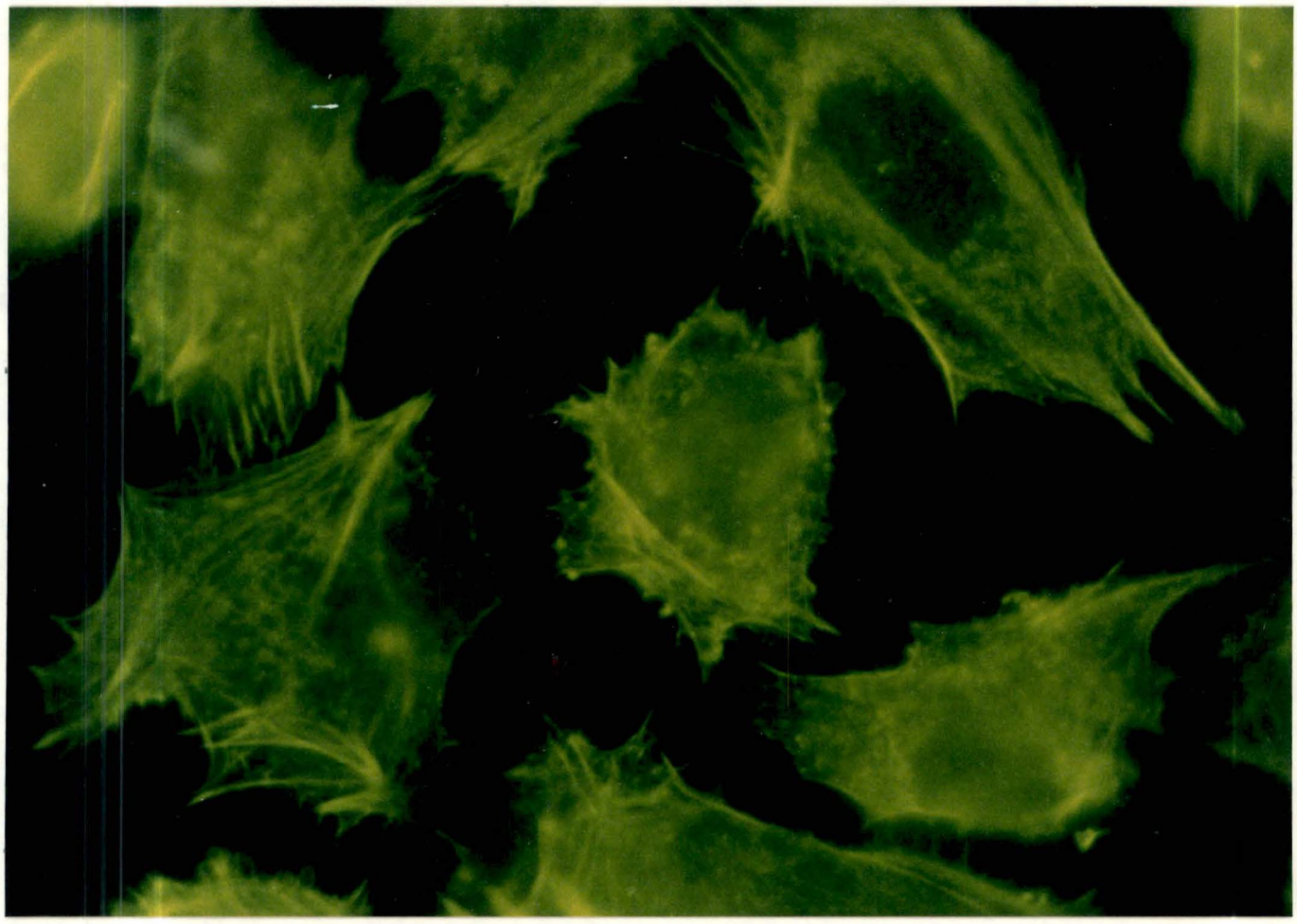
a



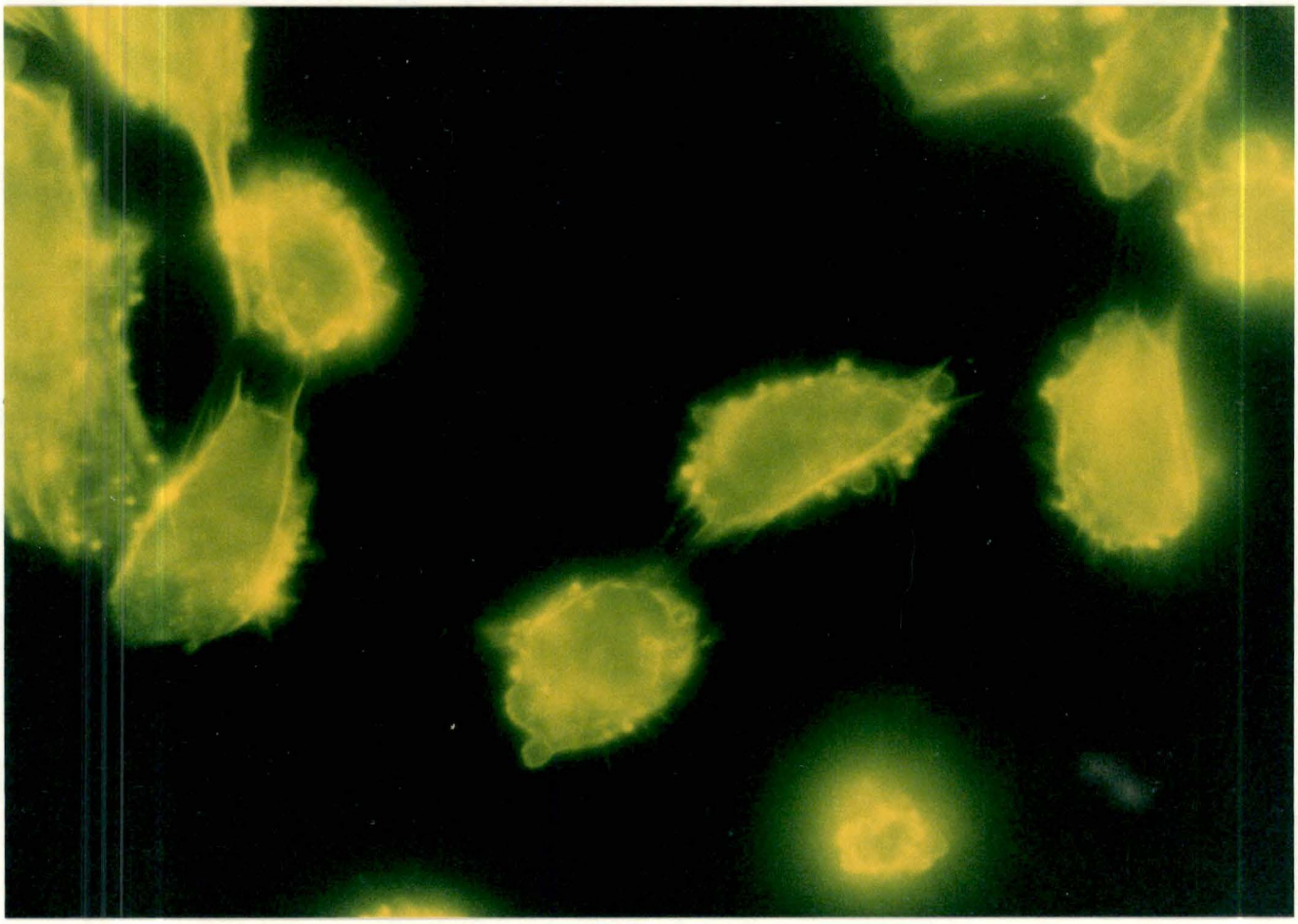
b



c



d



e



Planche 2 : Observation des microtubules par immunofluorescence indirecte sur des cultures de cellules endothéliales traitées ou non traitées.

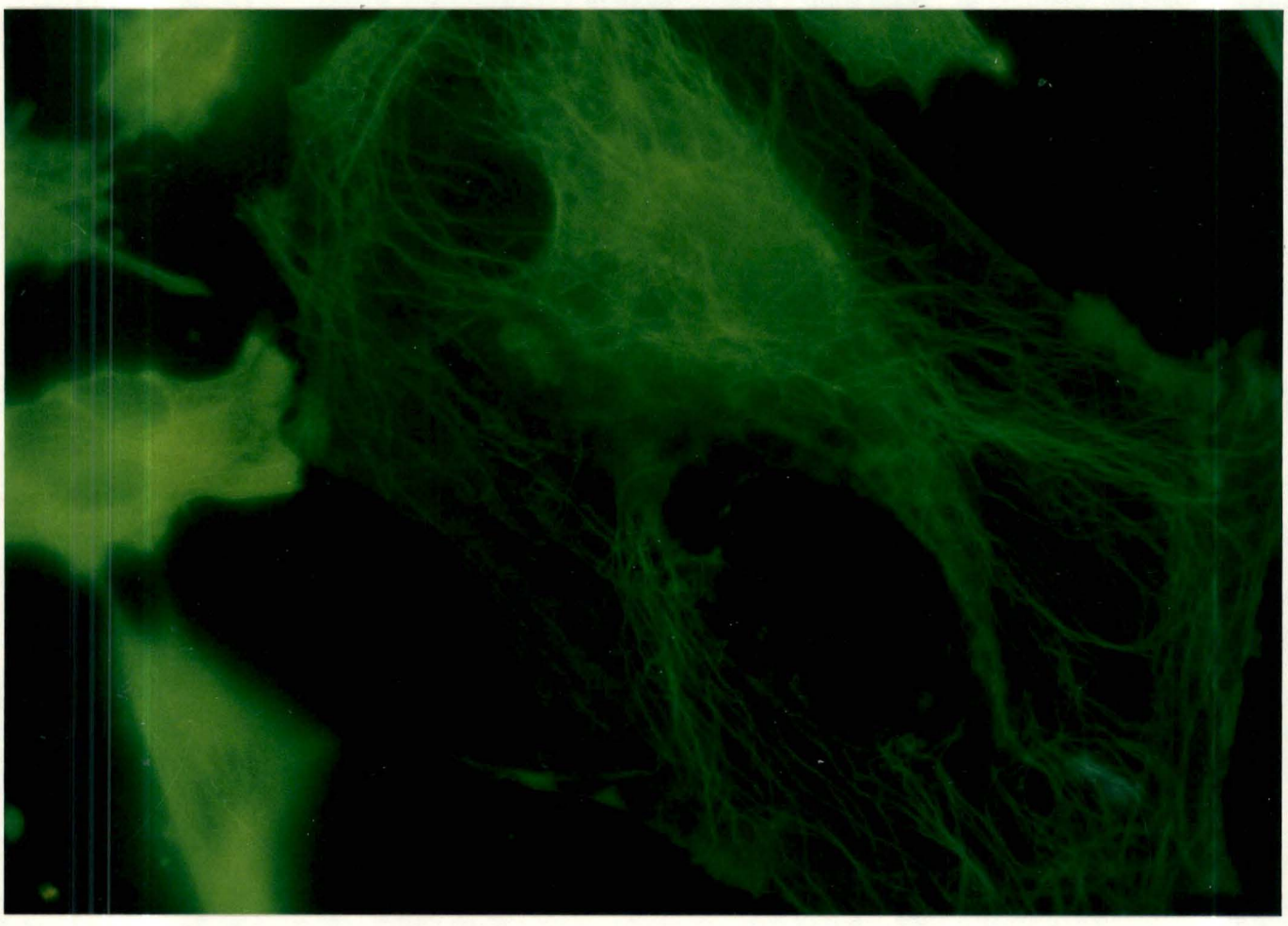
a/ Organisation des microtubules autour du noyau au sein d'une cellule non traitée.

b/ Contrôle sans l'anticorps anti α-tubuline.

c/Après 60 minutes d'incubation avec les dérivés actifs de l'oxygène. La cellule endothéliale se contracte. On peut mettre en évidence une dépolymérisation des microtubules, ainsi que la présence de blebs totalement marqués.

d/ Après 120 minutes d'incubation en présence de dérivés actifs de l'oxygène, il est très difficile d'observer le réseau vu la forte fluorescence. Toutefois la présence de blebs marqués est confirmée.

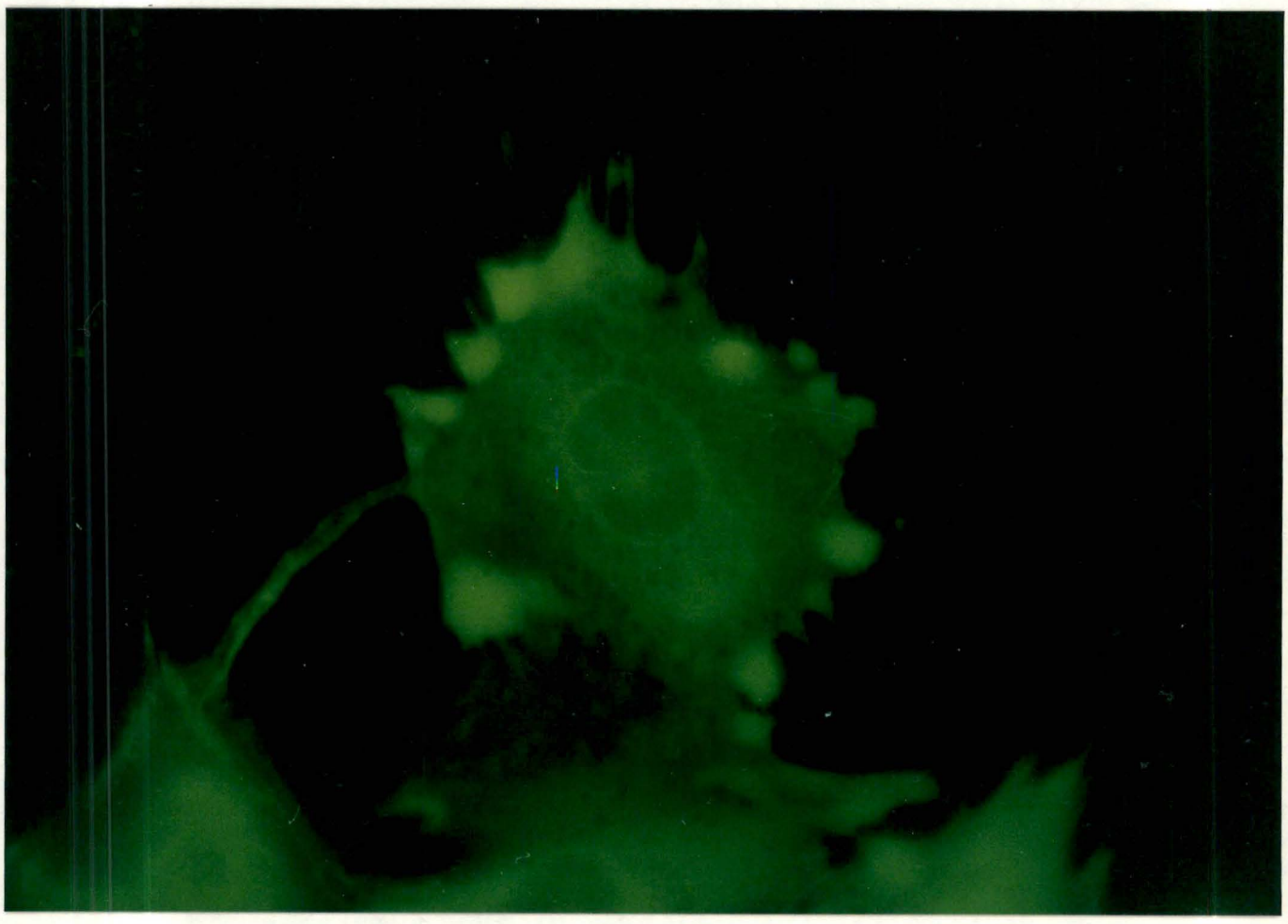
a



b



c



d

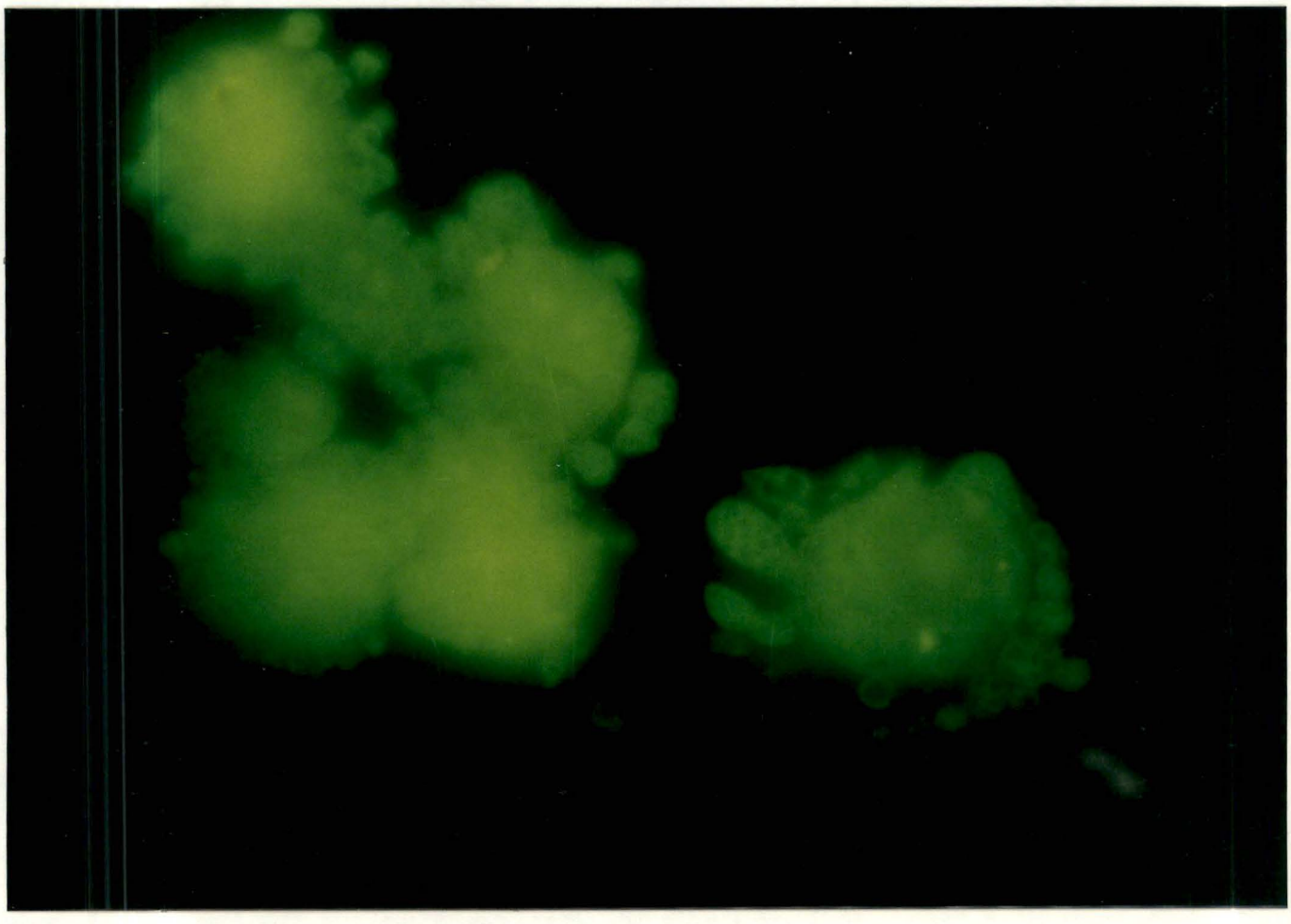


Planche 3 : Observation des filaments intermédiaires par immunofluorescence indirecte sur des cultures de cellules endothéliales traitées et non traitées.

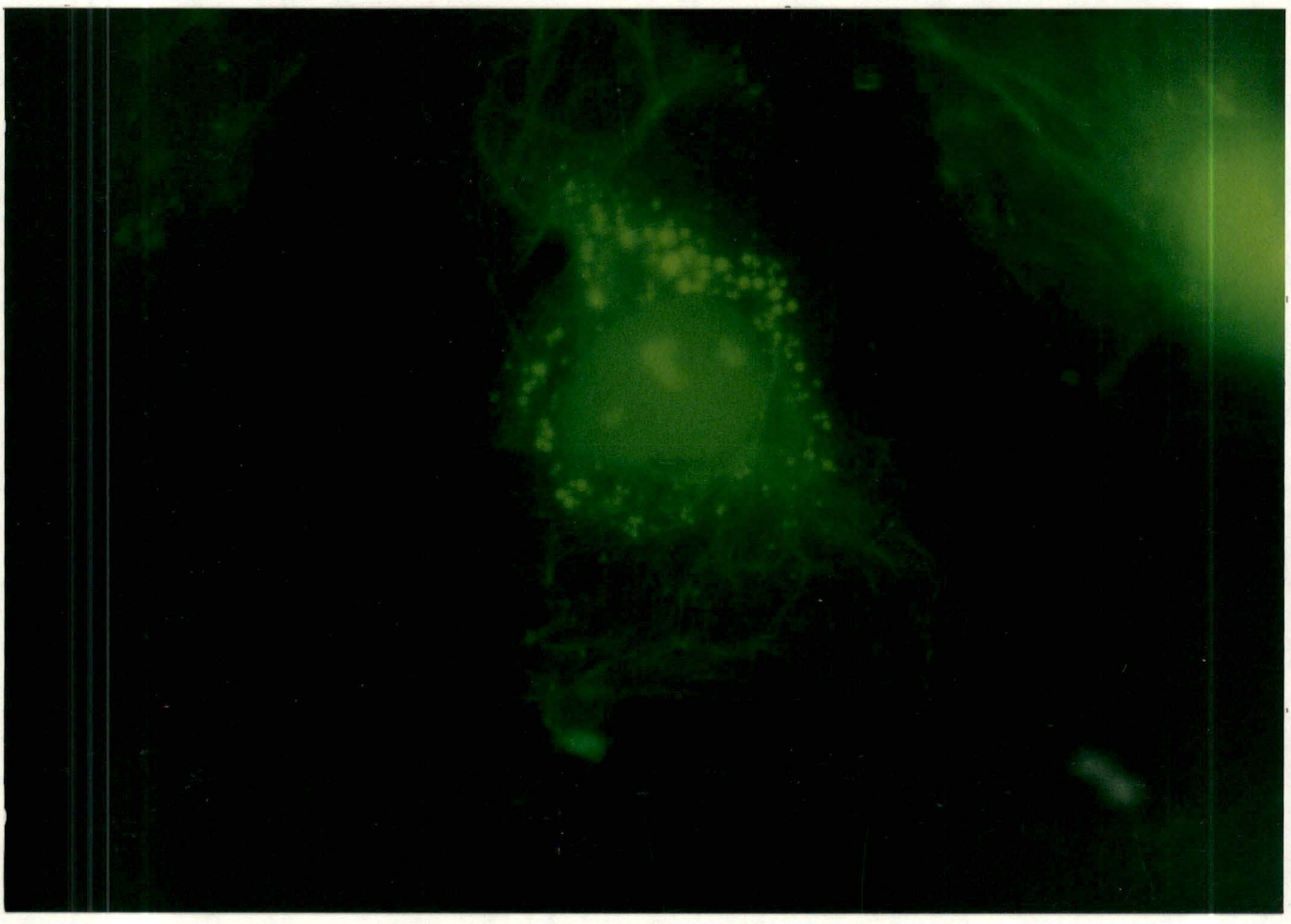
a/ Organisation de filaments intermédiaires au sein d'une cellule non traitée

b/ Contrôle sans l'anticorps anti vimentine.

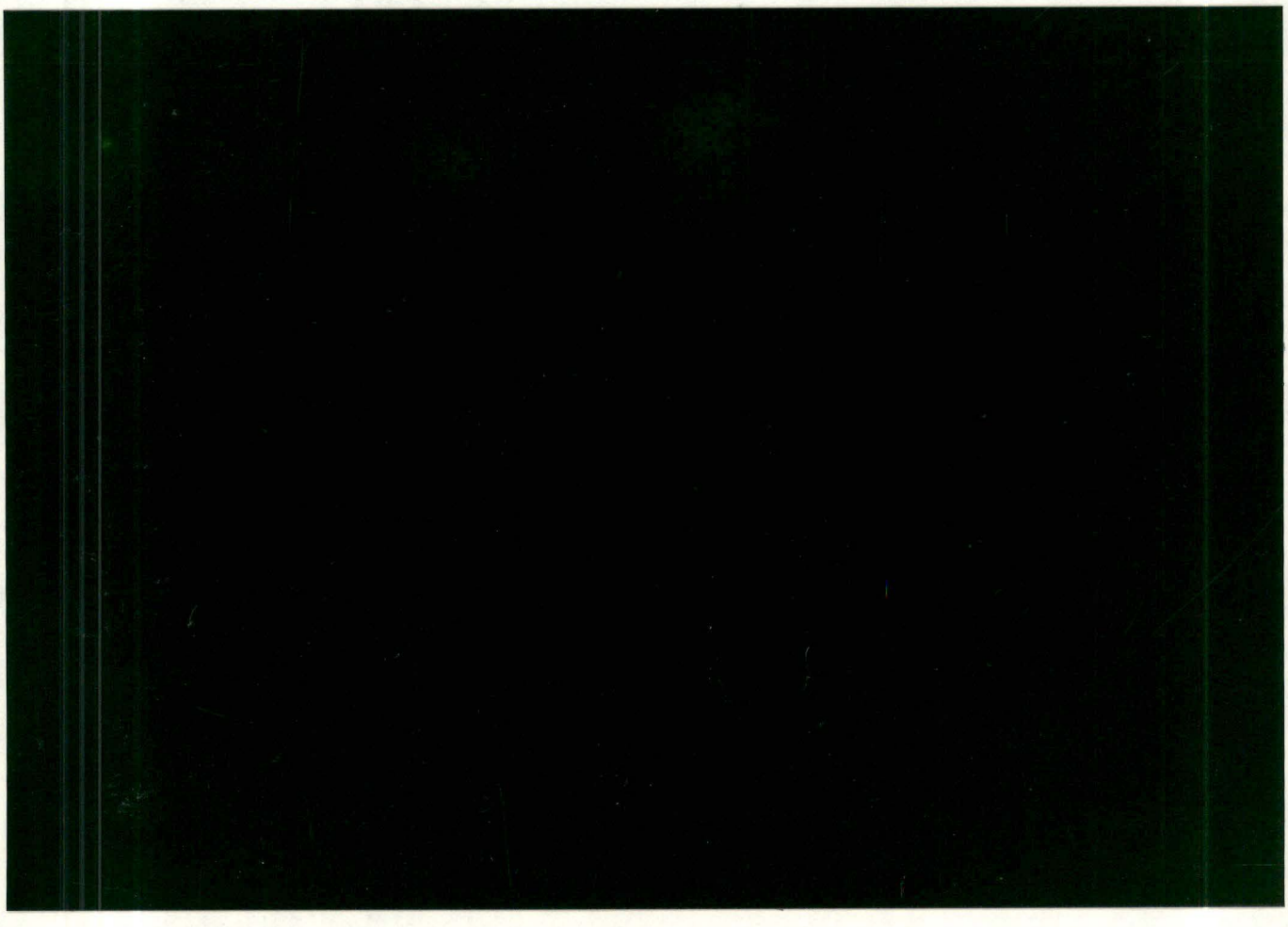
c/Après 60 minutes d'incubation avec les dérivés actifs de l'oxygène. Les cellules endothéliales se contractent. Toutefois le réseau semble préservé.

d/ Après 120 minutes d'incubation avec les dérivés actifs de l'oxygène, le réseau semble maintenu, et les blebs sont négatifs.

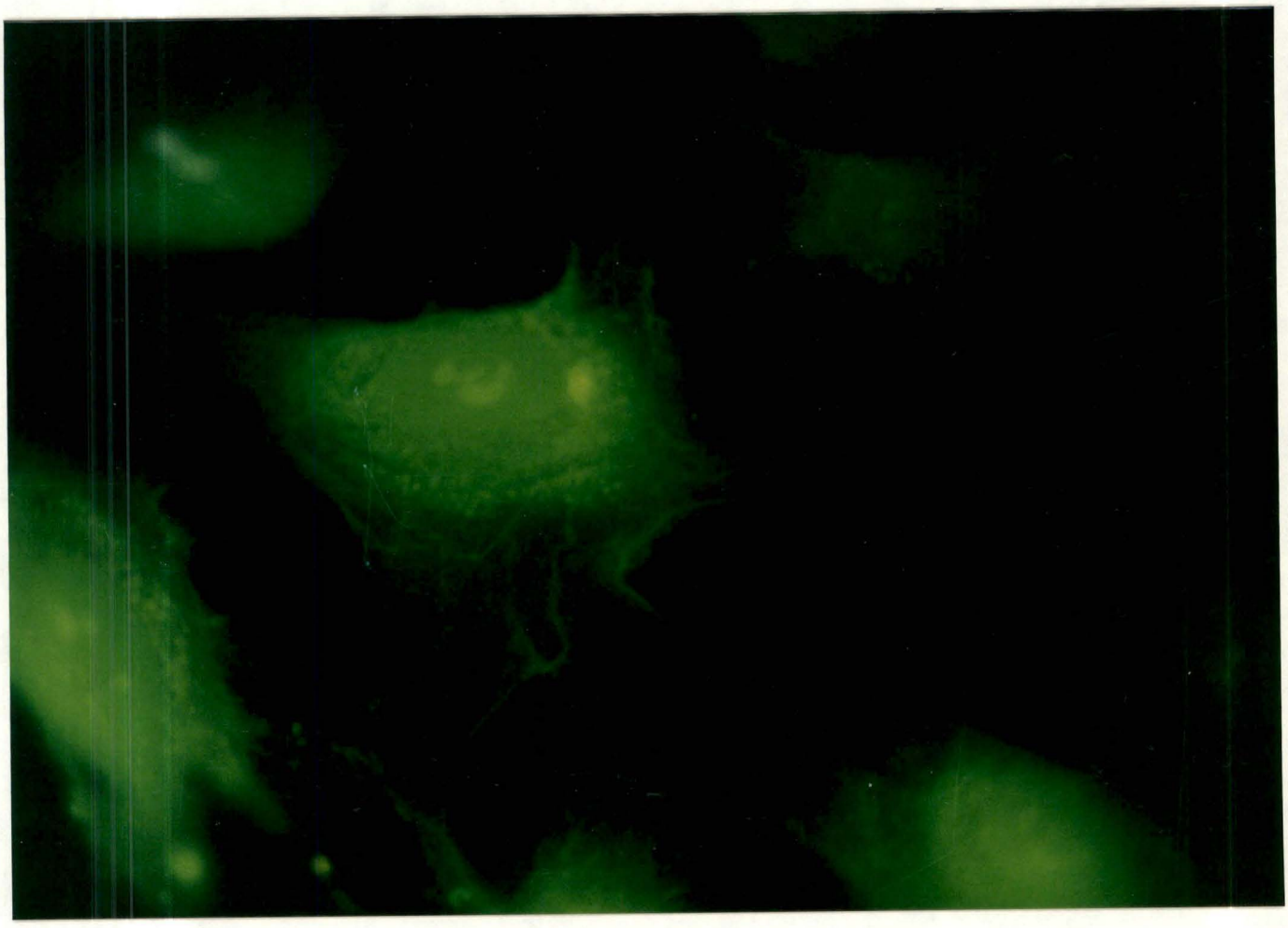
a



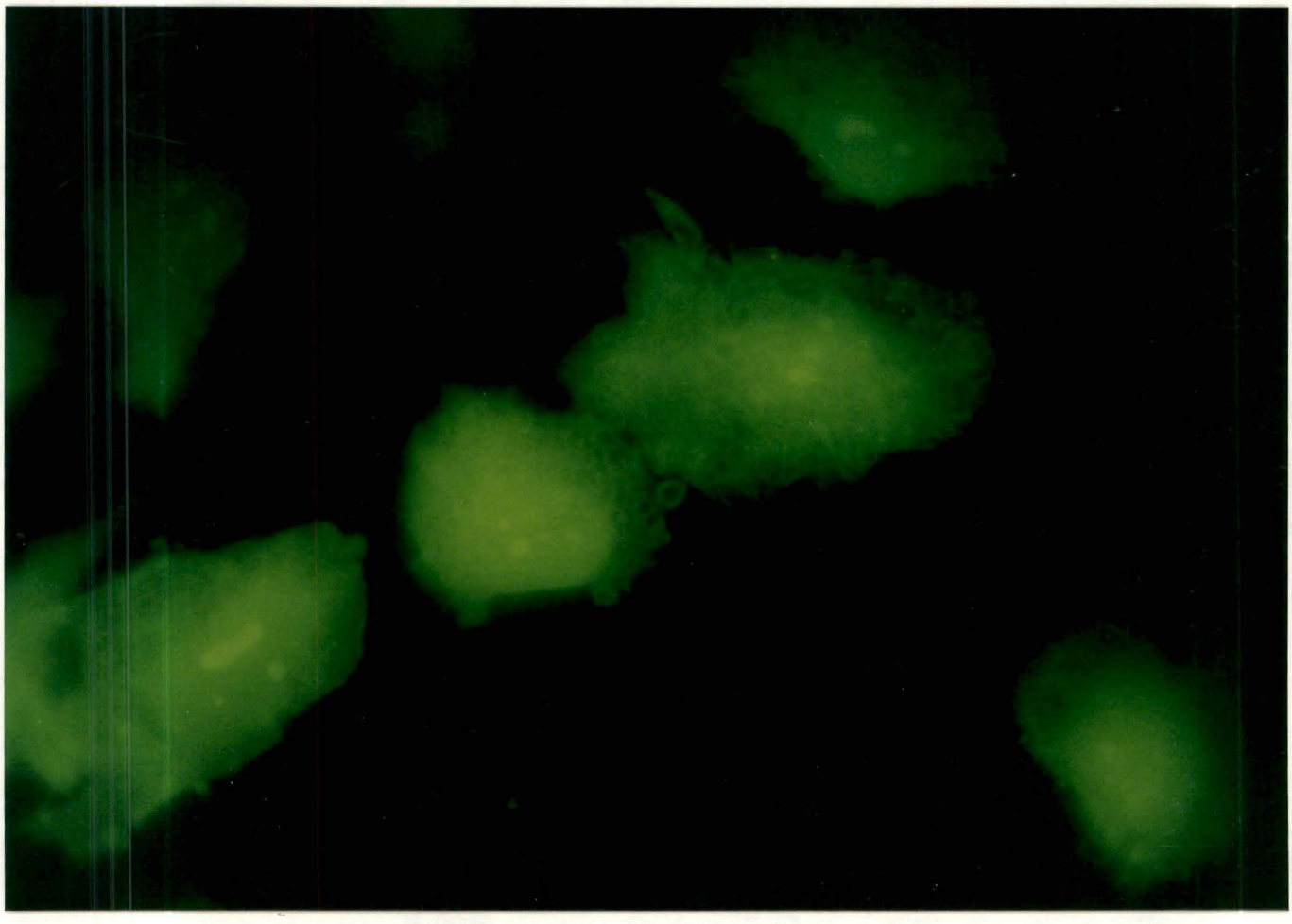
b



c



d



3 Observation des cellules endothéliales traitées ou non au microscope électronique à balayage.

-> Au début, cette technique fut utilisée comme un prolongement de la microscopie photonique qui permettait de révéler les plus fines structures de surfaces.

Ce type de microscopie présente plusieurs avantages : obtention d'une information tridimensionnelle, très grande profondeur de champ, ce qui permet l'observation des objets sous des directions et angles divers (Boyde, 1972).

-> Actuellement, les études parallèles en microscopie optique, en microscopie à balayage et en microscopie électronique à transmission permettent une observation plus complète de la morphologie cellulaire.

Résultats

Nous avons testé deux protocoles pour l'examen des cellules endothéliales mises en culture soumises à un stress oxydant : ils se distinguent l'un de l'autre non seulement par la concentration en glutaraldéhyde mais surtout par le type de solvant utilisé pour la déshydratation (éthanol ou acétone).

La déshydratation à l'alcool semble inadéquate pour les cellules endothéliales : on observe des blebs de formes très irrégulières, parfois concaves, une surface cellulaire présentant une sorte de réseau en nid d'abeille.

Des modifications semblables ne sont pas observées lors d'une déshydratation à l'acétone : dans ce cas, les blebs sont sphériques, même si parfois nous observerons de petites dépressions en surface (planche 1).

Commentaire

-> Nous avons pu, grâce à cet examen, confirmer et visualiser de manière tridimensionnelle "la souffrance" des cellules endothéliales en culture exposées au système xanthine-xanthine oxydase. La planche 2-a représente une monocouche de cellules endothéliales en culture non soumises au stress. Elles forment une monocouche de cellules polygonales de faible épaisseur, étroitement accolées, adhérant solidement au couvre-objet et présentant un noyau central contenant 2 ou 3 nucléoles. Toutefois, on peut percevoir quelques espaces intercellulaires élargis, probablement produits au moment de la déshydratation de l'échantillon (Porter, 1973). A 60 minutes, la souffrance est marquée d'une rétraction progressive de la cellule endothéliale qui se couvre peu à peu de blebs (Planche 3. b-c). Après une oxydation de 120 minutes, la confluence a disparu (Planche 3. d). La plupart des cellules se sont rétractées, présentant une forme plus sphérique dont l'épaisseur est plus importante. Elles sont couvertes de nombreux blebs de taille très variable, pouvant selon les cas

fusionner, ainsi que de longues fibres de rétraction. Il semblerait qu'au terme de ce processus la cellule puisse se détacher.

->Nous avons déjà mentionné l'étude de Lemasters (1983) sur le foie de rat perfusé isolé. En SEM, ils ont suivi les effets de l'hypoxie et de la réoxygénation. A 5 minutes d'hypoxie, ils ont observé de nombreuses petites protrusions à travers les fenestrations de l'endothélium des sinusoïdes ; de plus, les microvillosités des hépatocytes apparaissent gonflées. A 15 minutes, de grosses protrusions "blebs-like" se retrouvent dans les sinusoïdes. A noter que seule les surfaces sinusoïdales sont atteintes.

A 45 minutes, il faut constater la progression des lésions : toutes les surfaces cellulaires sont couvertes de blebs. S'y ajoutent d'autres lésions telles que fragmentation de l'endothélium et perte des détails de la surface.

Ces lésions sont réversibles en grande partie du moins en ce qui concerne les blebs et la rétraction des cellules.

-> Nous avons pu observer que les altérations engendrées par le stress oxydant évoluent et s'aggravent au cours du temps. Cependant, dans d'autres systèmes, on note des variations quant à l'apparition ou à la durée des lésions. Everhart (1974) observe déjà des modifications des cellules de hamster chinois endéans les deux minutes d'exposition à la cytochalasine B, ce qui suggère une interaction directe avec des composés membranaires. Par contre, Norouha-Dutra (1988) ne signale des altérations qu'après 60 minutes d'incubation en présence d'épinéphrine.

Planche 1 : Cellules endothéliales observées en microscopie électronique à balayage.

a/Aspect de la cellule après déshydratation à l'acétone.

gauche : 0 minute d'uncubation en présence de dérivés actifs de l'oxygène

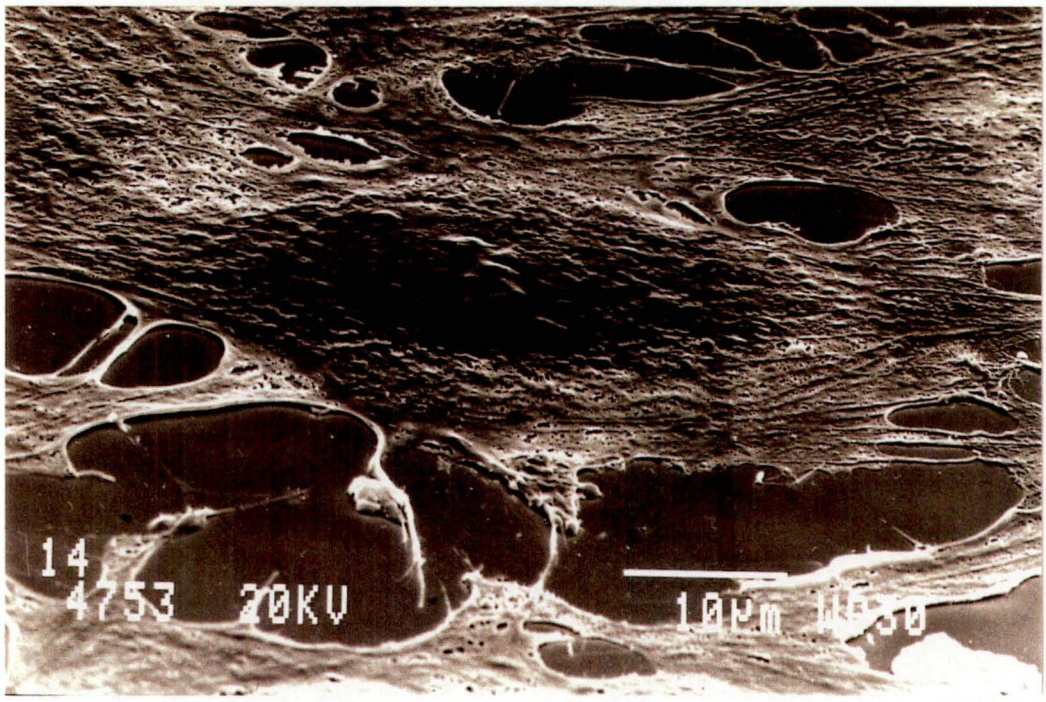
droite : 120 minutes d'incubation en présence des dérivés actifs de l'oxygène, les blebs sont sphériques.

b/Aspect de la cellule après déshydratation à l'éthanol

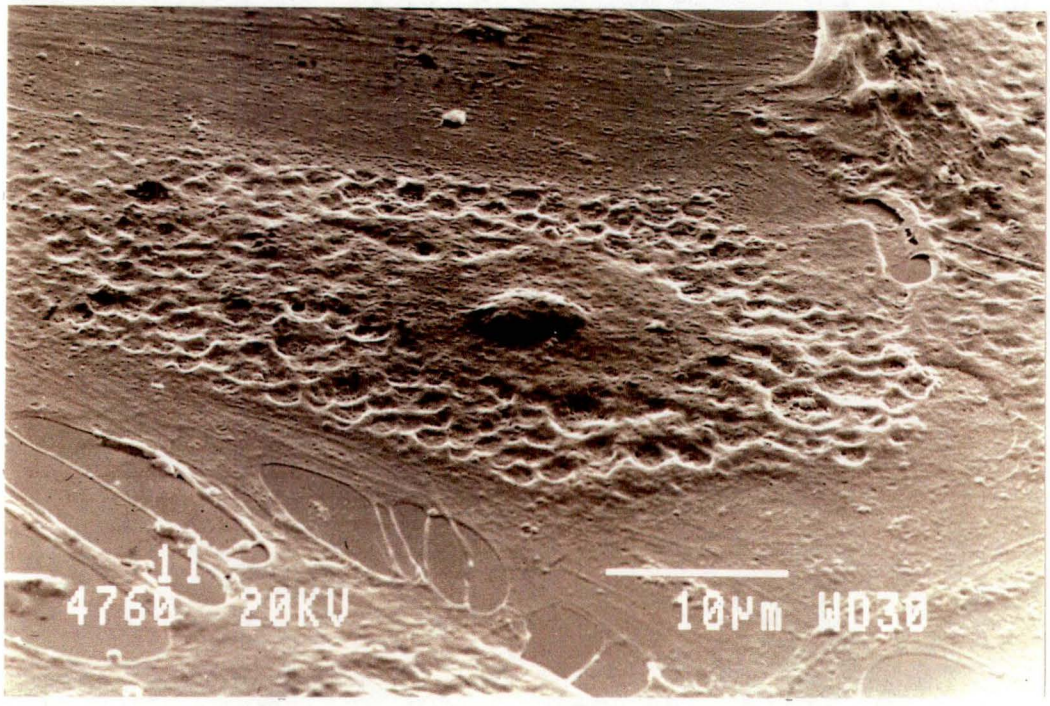
gauche : 0 minute d'uncubation en présence de dérivés actifs de l'oxygène

droite : 120 minutes d'incubation en présence des dérivés actifs de l'oxygène, les blebs sont concaves.

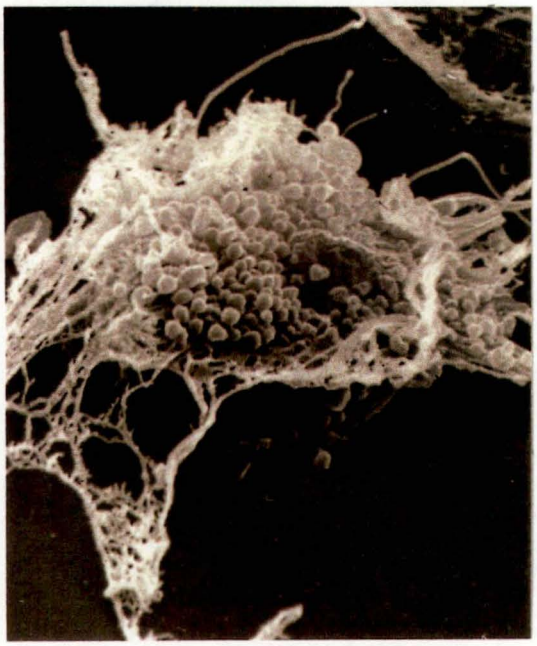
a.



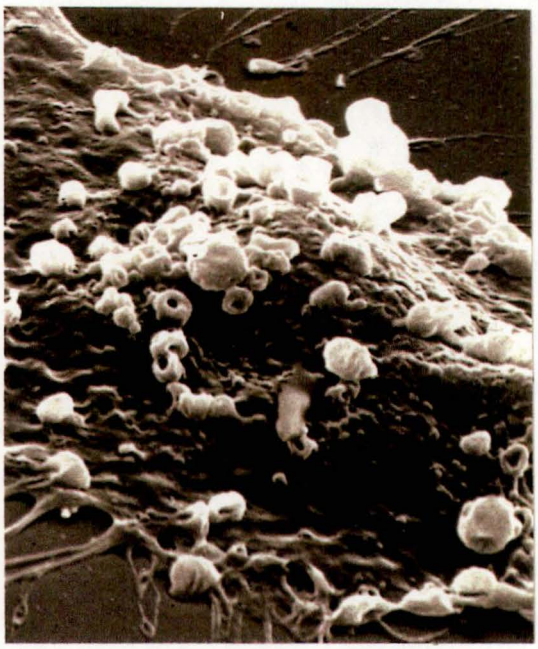
b.



a.



b.



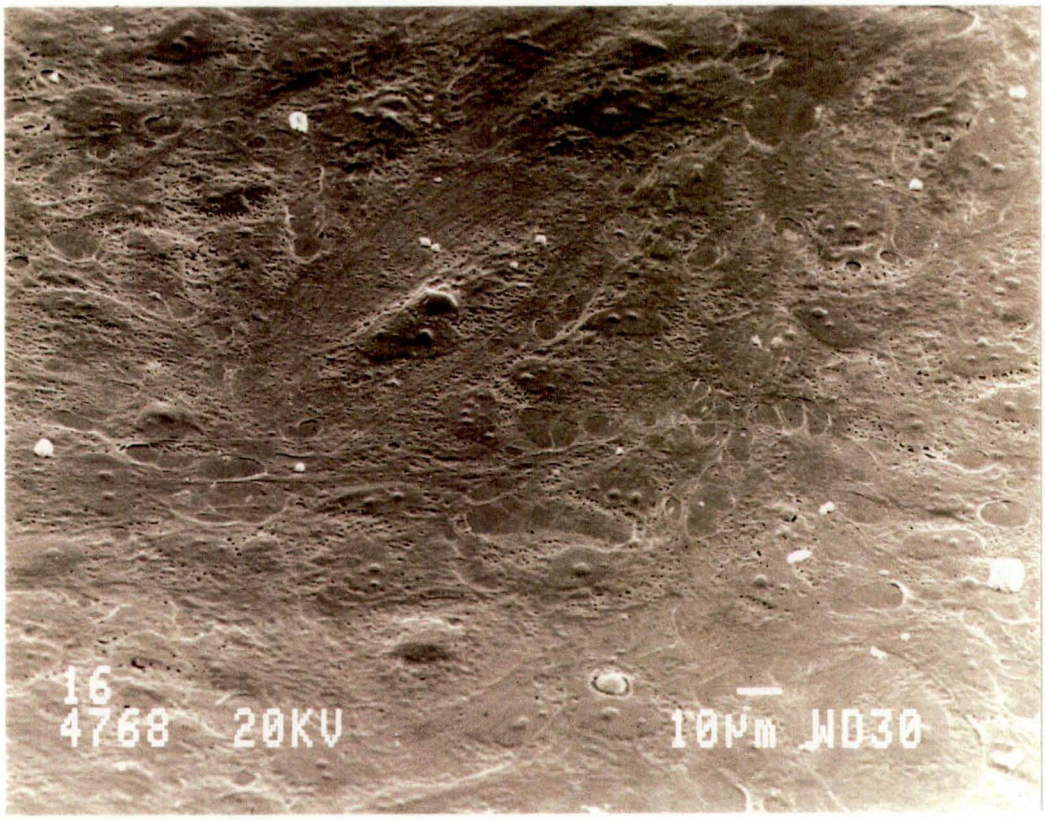
10 μm

Planche 2 : Monocouche de cellules endothéliales observées en microscopie électronique à balayage.

a/ Monocouche confluente après 0 minute d'incubation en présence de dérivés actifs de l'oxygène.

b/ Monocouche après 120 minutes d'incubation en présence de dérivés actifs de l'oxygène.

a.



b.

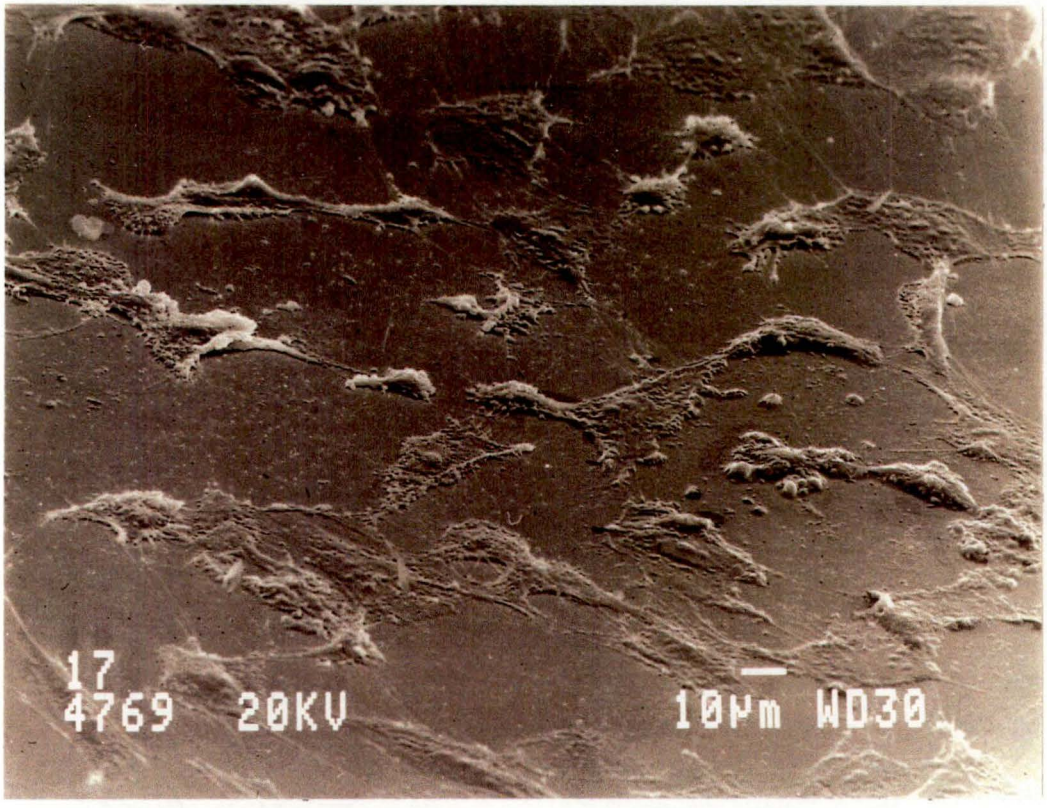
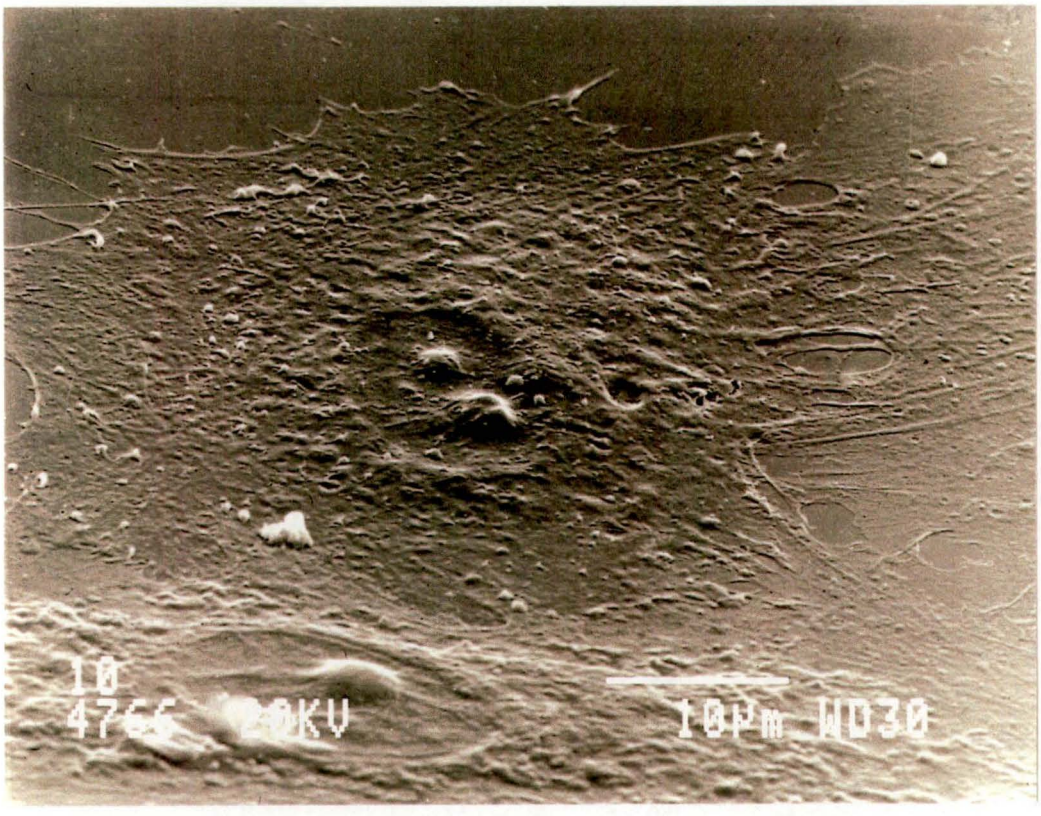
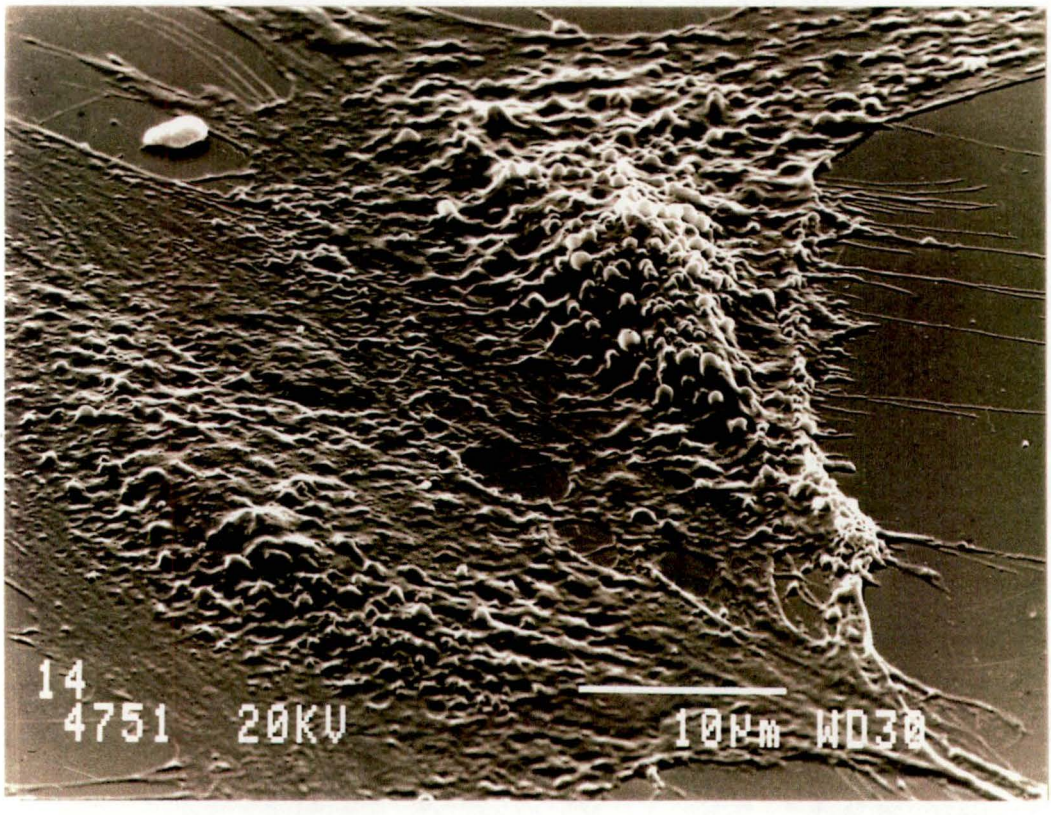


Planche 3 : Cellules endothéliales observées en microscopie électronique à balayage après 0, 60, 120 minutes d'oxydation (respectivement les figures a, b-c, d). Nous pouvons observer suite à l'oxydation, des fibres de rétractions ( ).

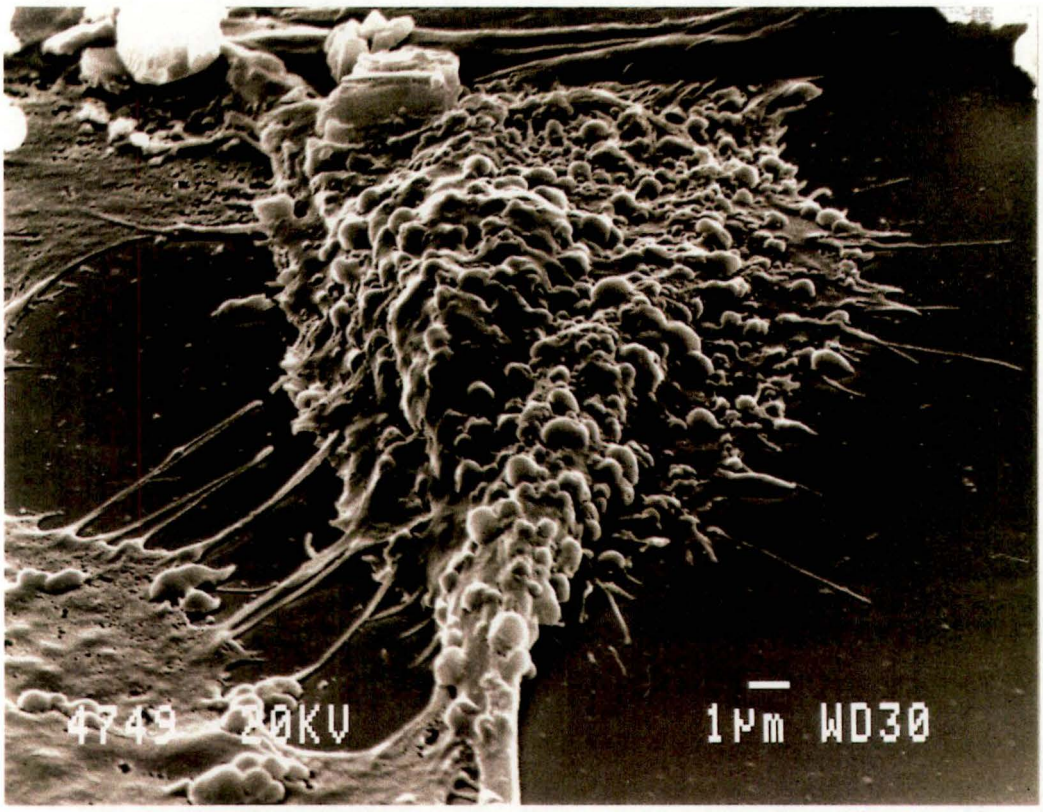
a.



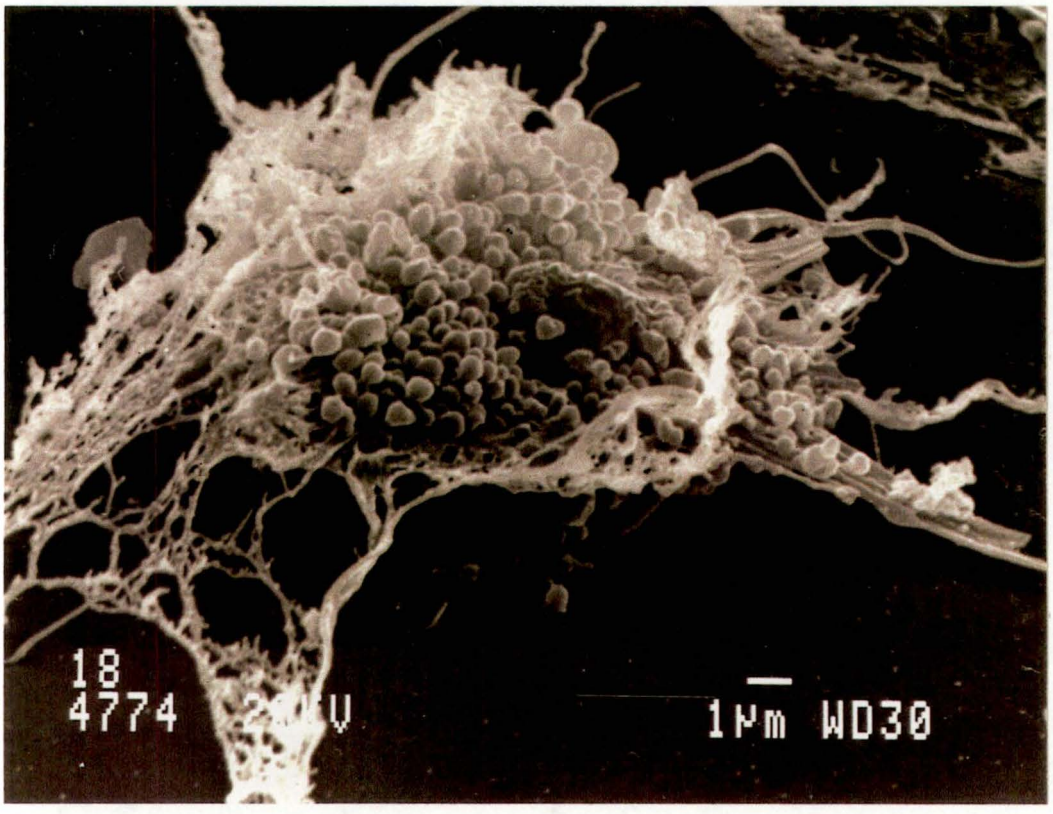
b.



c.



d.



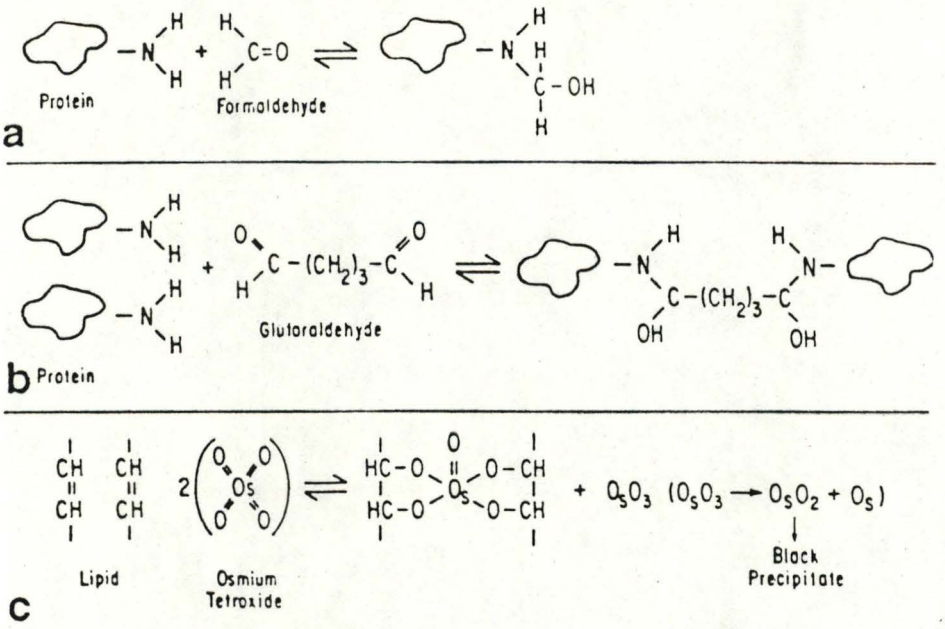


Figure 2.1 Description de l'action biochimique des divers fixateurs sur leurs substrats (protéines ou lipides insaturées) (extrait de Gosselin, 1986).

4. Observation des cultures de cellules endothéliales traitées et non traitées en microscopie électronique à transmission.

4.1 Choix d'une méthode de fixation:

Pour pouvoir conserver l'intégrité cellulaire permettant d'étudier la morphologie des tissus vivants, il faut les immobiliser dans un état aussi proche que possible de l'état vivant : c'est pourquoi on procède à leur fixation, qui en plus de préserver le tissu, lui permet de résister à diverses manipulations ultérieures (incubations, colorations, cytochimie...). Les principaux agents fixateurs utilisés en vue de l'observation au microscope électronique sont la glutaraldéhyde et le tétroxyde d'osmium.

La glutaraldéhyde est un dialdéhyde, qui fixe les proteines par ses deux fonctions CHO (fig.2.1-1B).

Le tétroxyde d'osmium ou acide osmique, fixe les proteines sans les précipiter. En effet, il réagit avec des groupes ou fonctions: sulphydryles (-SH),double liaison carbone-carbone (C=C), fonction amine terminal ($-NH^2$), disulfure (S-S), carbonyles dans de longues chaînes (-CHO), hydroxyle terminal (-OH) ou les hydroxyles adjacents dans des composés aromatiques.

Il est reconnu comme excellent fixateur des lipides non saturés au contact desquels il se transforme en bioxyde d'osmium ; celui-ci en précipitant, rend les structures membranaires opaques aux électrons ce qui augmente le contraste (fig. 2.1-1C).

Les caractéristiques de ces deux fixateurs sont reprises dans le tableau I.

Cependant, les méthodes classiques posent certains problèmes pour la visualisation du cytosquelette. Ainsi, Maupin-Szamier & Pollard (1978) ont observé que le tétroxyde d'osmium fragmentait les microfilaments. La vitesse de destruction des filaments d'actine par l' OsO_4 est influencée par de nombreux facteurs. Dans des conditions favorables, les filaments d'actine sont stables dans l'OsO_4, et sont bien préservés, même après l'enrobage et la coupe. En conditions défavorables, y compris celles qui sont utilisées habituellement pour fixer les cellules, les microfilaments forment un réseau durant la fixation. Hayat (1970) a constaté la disparition du réseau de microtubules suite à une fixation à 4°C dans de la glutaraldéhyde ou dans du tétroxyde d'osmium. Schultz & Case (1968) ont constaté que les microtubules de cellules neuronales étaient extrêmement sensibles au tampon utilisé. Ainsi, l'utilisation du tampon bicarbonate entraîne la disparition du réseau tandis que les tampons cacodylate, collidine ou phosphate le préservent.

Durant les dernières années, plusieurs auteurs ont essayé d'améliorer la visualisation de l'ultrastructure du cytosquelette Par exemple, après extraction des phospholipides et des protéines solubles au moyen d'un détergent non ionique (le Triton X 100) il ne persiste que les éléments insolubles du cytosquelette (French,

Tableau I: Caracteristiques de la glutaraldéhyde et du tetroxyde d'osmium (Gosselin, 1986).

	Glutaraldéhyde	Tétroxyde d'osmium
Concentration habituelle (seul ou mélange (%))	0,25-4	0,5-2
Penetration	satisfaisante	tres lente
Variation du volume tissulaire	aucune (parfois leger gonflement)	aucune
Effets sur . les proteines	agents non coagulant additifs	agent non coagulant additifs remarque: la fixation au tetroxyde d'osmium est accompagne d'une perte relativement importante des proteines
.acides nucléiques	légere extraction	legère extraction
.carbohydrates	aucun (?)	quelques oxydations (?)
.lipides	aucun	oxydation
.l'activité enzymatique	la plupart inhibe	inhibe
.les organelles (surtout les mitochondries)	bien preservées	bien preservees
Applications les plus communes	microscopie optique et microscopie électronique	microscopie électronique

1982). J.E. Heuser *et al.*(1980) ont réalisé des répliques de platine de cytosquelettes préparés par la technique du "Quick freeze-deep etch" après extraction, avec ce même Triton X-100, des protéines cytoplasmiques solubles et des protéines membranaires intégrales.Cette dernière technique nécessitant de l'hélium liquide ne nous est pas accessible.

Bien que ces travaux, dans certaines conditions d'extraction, laissent apparemment intact le cytosquelette (Bell, 1978), il nous a semblé préférable, pour conserver l'intégrité cellulaire, de porter principalement notre attention sur le choix de la fixation des cellules non extraites. Nous avons entrepris de tester plusieurs méthodes de fixation en faisant varier la concentration, le temps d'incubation et la température des divers fixateurs utilisés ainsi que le choix du tampon, ou en ajoutant une période de préfixation, afin de trouver les conditions optimales pour la visualisation du cytosquelette et de la cellule dans son ensemble.

4.1.1. Résultats.(cfr. tableau II).

Nous nous sommes basés sur une méthode de fixation classique habituellement utilisée dans le laboratoire, ainsi que sur les articles de French *et al.*(1982), Virtanen *et al.* (1980), Reaven & Axline (1973) qui ont amplement alimenté la littérature du cytosquelette

4.1.2. Commentaires.

a) sur les techniques utilisées.

La méthode n°1 utilisée habituellement dans notre laboratoire se base sur une fixation à la glutaraldéhyde 2,5 % dans du tampon cacodylate suivi d'une post-fixation à l'OsO_4 0,5 % toujours dans ce même tampon. Nous utilisons le tampon cacodylate étant donné que nous réalisons très souvent des mises en évidence de l'activité de la phosphatase acide et qu'il est préférable de ne pas utiliser de tampon phosphate dans ce cas. Cette fixation étant réalisée à 4°C, nous savions au départ que notre visualisation du cytosquelette serait inadéquate puisque les microtubules sont dépolymérisés à cette température. Nous souhaitions cependant avoir une bonne référence pour l'architecture générale de la cellule.

Nous souhaitions une bonne visualisation des filaments intermédiaires. Ces filaments sont difficiles à visualiser car ils sont souvent cachés par les autres organites du cytosol. Un procédé d'extraction qui débarrasse des organites et des protéines solubles du cytoplasme devrait renforcer la visualisation des éléments du cytosquelette. French *et al.*(1982) ont mis au point une technique où, après extraction par un détergent non ionique (le Triton X100), le rouge de Ruthenium (normalement arrêté par la membrane plasmique) entre dans le cytoplasme et colore les filaments. Ayant procédé de cette façon, French *et al.*(1982) ont observé qu'après extraction par

Tableau II : Fixation des cellules endothéliales humaines en première sous-culture, en vue de leur observation en microscopie électronique à transmission.

Méthodes de fixation	Membrane plasmique	Noyau et membrane nucléaire	Mitochondries	Liposomes
Méthode utilisée pour préserver au mieux le cytoplasme et les organites qu'il contient (méthode habituelle du laboratoire).				
Méthode n°1 :				
- Glutaraldéhyde 2,5% dans du tampon cacodylate 0,1 M 1H30 à 4°C. - OsO4 0,5% dans du tampon cacodylate 0,1 M 1 heure à 4°C.	-Nette -Régulière	- Parfois Irrégulier -Chromatine peu dense et hétérogène -Membrane nucléaire bien visible	-Matrice normale, parfois floconneuse. -Crêtes peu nombreuses mais normales.	-Réguliers -Aspect homogène.
Mise en évidence particulièrement des filaments intermédiaires (Virtanen *et al.* 1980)				
Méthode n°2 (3):				
- Glutaraldéhyde 2,5% dans du tampon cacodylate 0,1 M 30 minutes **à température ambiante** ou **à 4°C**. - OsO4 **0,5% (ou 1,5 %)** dans du tampon cacodylate 0,1 M pendant 1 heure à 4°C.	-Peu visible -Sinueuse.	-2 ou 3 nucléoles. -Régulier -Chromatine dense et homogène. -Membrane nucléaire bien visible.	-Matrice souvent inhomogène avec crêtes régulières.	-Réguliers -Aspect parfois hétérogène - Nombreux aux pôles de la cellule.

Cytosquelette	**Réticulum endoplasmique**	**Appareil de Golgi**	**Lysosomes**	**Vacuoles - Vésicules** (autres que golgiennes) **Remarques**
- Très minces faisceaux périphériques de MF. Très peu de MT et de FI -MT et FI peu visibles	-Normal à un peu dilaté	-Normal	- Présence de CMV	- Vacuoles claires à contenu indéterminé certaines d'origine mitochondriale (probable) - Quelques vacuoles autophagiques.
22°C : - Faisaceaux périphériques de MF présentant des "noeuds". MT bien visibles. FI nombreux et de disposition anarchique. **4°C :** MF et FI bien visibles. MT pas visibles.	- Légèrement dilaté -Nombreux polysomes	Légèrement dilaté	- Présence de CMV - Figures myéliniques	- Vacuoles claires à contenu indéterminé

Méthodes de fixation	Membrane plasmique	Noyau et membrane nucléaire	Mitochondries	Liposomes
<u>Mise en évidence particulièrement des microtubules et des microfilaments (Reaven et Axline, 1973)</u>				
<u>Méthode n° 4 :</u> (Reaven et Axline, 1973) - Glutaraldéhyde 1 % dans du tampon **phosphate** 0,1 M 3 heures **à température ambiante**. -OsO4 1 % dans du tampon phosphate 0,1 M 1 heure **à température ambiante** suivi par 0,5 % d'acétate d'uranyl dans un tampon véronal pH 5,8 - 1 heure à température ambiante, à l'abri de la lumière.	-Nette -Régulière	- 1 ou 2 nucléoles -Chromatine peu dense et homogène -Membrane nucléaire bien visible.	-Crêtes légèrement dilatées.	-Réguliers -Aspect homogène -Peu nombreux
<u>Méthode n°5 :</u> - Glutaraldéhyde 1 % dans du tampon **cacodylate** 0,1 M 3 heures **à température ambiante**. - OsO4 1 % dans du tampon cacodylate 0,1 M 1 heure **à température ambiante** suivi par 0,5 % d'acétate d'uranyl dans un tampon véronal pH 5,8 - 1 heure à température ambiante, à l'abri de la lumière.	- Parfois peu visible et sinueuse	- 1 ou 2 nucléoles -Chromatine peu dense et homogène, parfois hétérogène. -Membrane nucléaire bien visible.	- extraction des protéines de la matrice mitochondriale dans certains cas.	-Réguliers -Aspect parfois hétérogène -Peu nombreux.

Cytosquelette	**Réticulum endoplasmique**	**Appareil de Golgi**	**Lysosomes**	**Vacuoles - Vésicules** (autres que golgiennes) **Remarques**
- Faisceaux périphériques de MF. - MT et FI isolés dans le cytoplasme - MF, MT et FI bien visibles	- Souvent dilaté	- Peu étendu - Vésiculeux	- Présence de CMV	- Vacuoles claires à contenu indéterminé - Quelques vacuoles autophagiques - Léger précipité dans le cytoplasme
- <u>Faisceau épais de MF présentant "noeuds"</u> - MT et FI isolés dans le cytoplasme, parfois faisceaux de FI - MF et FI bien visibles.	- Dilaté	Légèrement dilaté - Vésiculeux	- Présence de CMV	- Quelques vacuoles claires à contenu indéterminé, certaines d'origine mitochondriale. - Quelques vacuoles autophagiques

le Triton X100 de préparations fixées à la glutaraldéhyde, les filaments intermédiaires n'étaient pas tellement bien visualisés ou formaient anormalement des faisceaux (cross-linkage des filaments par la glutaraldéhyde). Ils ont donc utilisé la fixation à l'OsO_4 2 % seul, en présence de rouge de Ruthenium selon la technique de Luft *et al* (1971).

Nous avons essayé cette technique à plusieurs reprises avec ou sans extraction, avec ou sans rouge de Ruthenium. Chaque fois, la fixation des autres éléments du cytoplasme était catastrophique et la vésiculisation des RER, SER, Golgi, était générale et typique d'une mauvaise fixation. Nous avons abandonné cette technique.

Nous nous sommes alors tournés vers la technique de Virtanen *et al* (1980). Celle-ci met bien en évidence les filaments intermédiaires en absence des microtubules qui ont été dépolymérisés au préalable par le froid. Cette rupture des microtubules par le froid ne fût pas accompagnée d'une réorganisation des filaments intermédiaires, ce qui laisse croire à l'indépendance des deux types de filaments. Cependant, Virtanen, après action de la Colcemid, a observé que la disparition des microtubules s'accompagnait d'une réorganisation importante des filaments intermédiaires en faisceaux périnucléaires. Nous avons utilisé cette technique avec succès.

Enfin, dans une dernière tentative pour visualiser tous les éléments du cytosquelette, spécialement les microtubules, en préservant au maximum l'architecture de la cellule, nous avons essayé la technique de Reaven et Axline (1973). Cette technique utilise en succession la glutaraldéhyde et l'acide osmique à une concentration normale de 1 % dans du tampon phosphate à température ambiante afin de préserver au maximum les microtubules. Dans le but de vérifier si les "noeuds" d'actine que nous avions observés dans les préparations réalisées avec la technique précédente ne pouvaient être causés par l'utilisation du tampon cacodylate, nous avons réalisé la même technique en présence de ce tampon. De plus, l'acétate d'uranyl dans le tampon véronal à température ambiante va, lui aussi, accentuer le contraste des éléments du cytosquelette. Nous avons utilisé cette technique avec succès.

b) Sur le tableau des résultats

La méthode utilisée pour préserver au mieux le cytoplasme et les organites qu'il contient, technique éprouvée depuis longtemps au laboratoire (technique numéro un), nous a toujours donné de bons résultats. Elle nous permet en effet d'observer des membranes plasmiques régulières, un noyau où l'espace périnucléaire n'est pas dilaté, où la chromatine périphérique est bien visible et homogène et où les éventuels nucléoles ne présentent pas de ségrégation de leurs constituants, des mitochondries à matrice homogène dont l'espace intermembranaire et les crêtes ne sont pas dilatés, et

enfin des citernes du réticulum endoplasmique non dilatées avec des ribosomes bien fixés sur les membranes. Il n'est pas rare d'observer cependant une dilatation du réticulum endoplasmique au sein de la cellule endothéliale. Son activité métabolique intense est probablement responsable de cette variation. Malheureusement, les microtubules et les filaments intermédiaires sont peu visibles. Il n'est pas rare d'observer des corps de Weibel-Palade, quelle que soit la technique utilisée. Ce qui confirme l'identification dont nous avons déjà parlé.

Nous avons donc, afin d'améliorer la visualisation des divers éléments du cytosquelette, utilisé la méthode particulière de mise en évidence des filaments intermédiaires selon Virtanen et al (1980).

Nous observons qu'à 4°C, si les MF et les FI sont bien visibles, les MT sont apparemment absents : c'est ce que nous attendions. A 37°C, ils sont visibles et d'aspect normal. Il est rare d'observer des mitochondries tout à fait intactes; le plus souvent, elles présentent une sorte "d'extraction" limitée de leur matrice, ce qui leur donne un aspect plus ou moins floconneux. Cet aspect se retrouve souvent quelle que soit la technique utilisée. Il est possible que les mitochondries de CE soient plus sensibles à la fixation chimique que celle d'hépatocytes par exemple.

Pour compléter la mise en évidence des différents éléments du cytosquelette, il nous restait à optimaliser la visualisation des microtubules et microfilaments. Cette technique nous a donné les meilleurs résultats compte tenu des critères que nous avions établis.

a) en présence de tampon phosphate: tant les différents organites que les divers éléments du cytosquelette MT, MF et FI sont bien préservés: les mitochondries semblent même mieux préservées que d'habitude.

Il nous semble y avoir cependant une certaine "extraction" des protéines du cytosol; c'est sans doute pour cette raison que tous les éléments du cytosquelette sont bien visibles et paraissent plus abondants q'avec les autres techniques.

b) en présence de tampon cacodylate: nous avons retrouvé les noeuds de filaments d'actine observés avec la technique de Virtanen. Il est donc possible que le tampon cacodylate soit responsable de cet artefact.

Notre choix s'est donc finalement porté sur la méthode n°2 pour la bonne préservation des microtubules (à 37°C) et des filaments intermédiaires, ainsi que sur la méthode n°5 qui donne une bonne visualisation des trois éléments du cytosquelette.

4.2 Visualisation du cytosquelette par le biais de la microscopie électronique à transmission:

Les observations en microscopie électronique à transmission constituent une part importante de cette étude, sur l'implication éventuelle de certains éléments du cytosquelette dans la genèse du blebbing. Nous avons suivi les modifications ultrastructurales des cellules endothéliales humaines en culture utilisées à la confluence, après 0, 60, et 120 minutes d'oxydation.

Au temps 0, la cellule endothéliale est aplatie, présentant un contour régulier (planche: 6-a), avec un noyau central ovoïde dont le grand axe est parallèle au grand axe de la cellule, entouré par une zone périnucléaire où sont localisés la majorité des organites cytoplasmiques, l'appareil de golgi, le réticulum endoplasmique rugueux, les mitochondries.

Sous la membrane plasmique, nous observons de nombreuses vésicules de pinocytose (planche: 1-a), ainsi qu'une bande plus ou moins épaisse de microfilaments (planche: 1-b). Il s'agit de la zone corticale de microfilaments. Suivant la fixation utilisée, on peut observer des noeuds au sein des microfilaments (planche: 1-b) correspondant probablement aux zones de contacts focaux (Birchmeier, 1984 ; Blose, 1984). Nous avons pu remarquer l'absence de microfilaments plus profondément dans la cellule. Ces indications nous laissent croire que la majeure partie de ces microfilaments sont à l'état de faisceaux dans la cellule endothéliale.

Les filaments intermédiaires isolés ou disposés en faisceaux lâches peu nombreux se situent dans la région comprise entre le noyau et le cortical network (planche 2). Ils entourent certains organites tels les mitochondries ou les liposomes (planche: 3), et semblent présenter une relation étroite vis à vis de certains d'entre eux (planche: 4-a,b). Il n'est pas rare d'observer un enchevêtrement de microfilaments et de filaments intermédiaires.

Enfin le cytoplasme renferme des microtubules isolés ou groupés par deux ou trois, généralement situés parallèlement au grand axe de la cellule. On en observe certains, rayonnant au travers du cytoplasme à partir du centrosome (planche: 5-a,b).

Après 60 minutes d'incubation en présence du système xanthine-xanthine oxydase, les cellules traitées s'arrondissent et présentent un contour tourmenté. Ce phénomène s'amplifie après 120 minutes de stress oxydant (planches: 6-a,b,c et 7). Après 60 minutes d'incubation avec les dérivés actifs de l'oxygène, les blebs, généralement peu proéminents, ne couvrent qu'une partie de la cellule (planche 6-b). De plus, le cytoplasme refoulé dans ces évaginations cellulaires paraît ne contenir que peu d'organelles: on y retrouve du RER, de nombreux ribosomes libres, parfois des vacuoles claires (planche 8-a).

Après 120 minutes d'incubation avec les dérivés de l'oxygène, les blebs beaucoup plus proéminents, couvrent une grande partie de la cellule. Les blebs les plus petits

présentent une forme arrondie ; d'autres en nette expansion bourgeonnent en d'autres blebs. Certains blebs apparaissent isolés, à proximité de la cellule. Ils ne possèdent plus de microfilaments corticaux. Parfois, nous avons rencontré l'un ou l'autre blebs où la présence de petits amas de microfilaments dans la membrane se distinguait nettement. Rarement, on remarque des expansions plus digitiformes avec à leur base des agrégats de microfilaments.

Nous avons réalisé plusieurs expériences avec le rouge de Ruthenium qui nous aurait permis, du moins nous l'espérions, de préciser l'origine des vacuoles ou tubes se trouvant à la base des blebs.

La surface membranaire est bien marquée, et certaines vésicules, tubules présents dans le cytoplasme cortical le sont aussi. Cependant, le plus souvent, les tubules ou vacuoles à la base des blebs ne le sont pas. Nous n'illustrons pas ce point, car nos contrôles - qui ne sont pas marqués - n'ont pu être photographiés en temps voulu.

Par ailleurs, on peut remarquer la présence aux temps 60 et 120, sous la membrane plasmique, de structures tubulaires claires et dont la lumière est parfois en relation avec l'extérieur de la cellule. Ces structures tubulaires voisinent les blebs formés en surface de cellules endothéliales (planche: 8-a,b). Sous la membrane plasmique du bleb, on discerne des microfilaments. On en trouve également à la base du bleb (planche: 8-c). On remarque dans le bleb l'absence de microtubules et de filaments intermédiaires. Cependant on peut trouver dans quelques cas des filaments intermédiaires dans la zone d'étranglement du bleb (planche 9)

Dans le cytoplasme des cellules incubées durant 60 ou 120 minutes en présence des dérivés actifs de l'oxygène, nous observons encore le cortical network ; cependant, nous ne retrouvons plus l'accumulation des microfilaments aux pôles cellulaires. Les filaments intermédiaires et les microtubules ne semblent pas modifiés par rapport aux cellules non traitées.

Nous observons en outre la dilatation du RER, un raccourcissement et la dilatation des dyctiosomes, un gonflement des mitochondries et une réduction du nombre de "coated vesicles".

Commentaires.

Nous avons analysé l'ultrastructure des cellules endothéliales soumises à un stress oxydant au microscope électronique à transmission. Ces observations nous ont d'abord révélé la présence de blebs au sein de la membrane plasmique des cellules endothéliales - comme déjà signalé par Niwa *et al.* (1982) - qui ont également incubé les cellules endothéliales avec les dérivés actifs de l'oxygène. Un phénomène identique avait déjà été observé par Godman *et al.* (1975) qui étudiaient l'action de la cytochalasine D sur diverses lignées cellulaires. Des études similaires sur des lignées Wish ont été réalisées par Meek (1976). Il attribua aux microfilaments un rôle

primordial dans la formation des blebs : pour lui, la constriction de la base des blebs serait engendrée par l'agrégation des microfilaments simultanément à la formation de vésicules de pinocytose. Nous avons plutôt observé des expansions tubulaires ou vésiculeuses situées à la base des blebs. Dans certains cas, nous notons aussi la présence d'amas denses de microfilaments agglutinés.

Nous pensons que les vacuoles pourraient représenter un mécanisme d'isolement du bleb qui, une fois formé, est destiné à être largué. Ce phénomène, accolement de vésicules ou tubules suivi de leur fusion, se rencontre dans plusieurs types cellulaires, comme par exemple chez le normoblaste lors de l'expulsion du noyau du futur érythrocyte ou encore, chez le mégacaryocyte qui pour larguer ses plaquettes, isole de petits territoires cytoplasmiques par un accolement suivi de fusion de vésicules du SER. Quant au mécanisme de formation des blebs, nous ne pourrons que l'imaginer dans la conclusion, car nos résultats ne sont pas suffisamment complets que pour être affirmatifs.

Hinshaw *et al.* (1986) ont noté sur les cellules P388D1 de souris, exposées à l'H_2O_2, la perte des microtubules. Nos résultats ne confirment pas cette perte ; cependant, la faible quantité de microtubules observée dans nos cellules traitées ou non traitées ne nous permet pas d'infirmer cette observation.

Par contre, nos résultats s'accordent sur l'observation d'un gonflement des mitochondries.

4.3. Essai de mise au point d'un marquage en microscopie électronique à transmission au moyen d'anticorps couplés à des particules d'or colloïdal favorisant la visualisation du cytosquelette.

Les techniques cytochimiques, en particulier l'immunocytochimie, ont permis de compléter les données de la microscopie optique et électronique.

L'immunoperoxydase, l'immunoferritine, le complexe Fer-polysaccharides, l'or colloïdal et plus récemment le marquage par le biais d'anticorps couplés à des particules d'or colloïdal, utilisent les réactions antigène-anticorps pour localiser des constituants transmembranaires ou cellulaires. Cette localisation est possible par un marquage direct ou indirect (Roth, 1986 et Gosselin, 1986). Il nous a semblé intéressant pour essayer de visualiser les variations éventuelles de l'organisation des constituants du cytosquelette suite à un stress oxydant, d'utiliser un marquage indirect où le second anticorps est couplé aux particules d'or de 10 nm.

Ces particules sont denses aux électrons. Pour l'établissement d'une technique appropriée au matériel utilisé, nous avons testé le pré et post embedding (Langanger et al, 1986 ; De Mey et al, 1986 et Langanger et al , 1984).

Méthode du pré embedding appliquée à la visualisation des microtubules.

Dans un premier temps, nous avons utilisé la technique du pré embedding pour visualiser les microtubules par l'anticorps de souris contre l' α-tubuline de cerveau de poulet. Le marquage du tissu se fait sur des cellules endothéliales en culture avant l'enrobage et la coupe pour la microscopie électronique. Afin de favoriser la pénétration du second anticorps couplé à l'or à travers la membrane plasmique, nous avons utilisé et testé deux concentrations en Triton (agent perméabilisant) se différenciant également par un temps d'incubation propre.

Or, il s'est avéré que les marquages obtenus suivant une perméabilisation au Triton X 100 (0,1 %) durant 5 minutes ou dans du Triton X 100 (0,5 %) durant 30 minutes donnait dans les deux cas un très faible marquage non spécifique au sein de la cellule. Cette cellule est elle-même très endommagée avec le Triton X 100 0,5 %. Au vu de ces résultats, nous avons opté pour le Triton X 100 (0,1 %) ainsi que pour une augmentation du second anticorps, espérant voir un marquage plus intense. Cependant, cette seconde tentative n'a pu que confirmer les résultats déjà obtenus. Ne disposant plus de suffisamment de temps que pour poursuivre les investigations dans cette voie (longue procédure de fixation, d'enrobage, de polymérisation et de réalisation des coupes pour la microscopie électronique). Nous nous sommes donc tournés vers la technique du post embedding, où le marquage se réalise directement sur des coupes ultra fines récoltées sur grille de Nickel. En outre, cette technique ne

nécessitant pas d'agent perméabilisant permet une meilleure préservation de l'ultrastructure.

Méthode du Post-embedding appliquée à la visualisation des divers éléments du cytosquelette : microfilaments, microtubules et filaments intermédiaires.

Le marquage par la technique du post embedding est très complexe. Il est en effet gêné par un camouflage des sites antigéniques par divers fixateurs.

Toutefois, le post embedding peut être amélioré en traitant les grilles au métapériodate de Sodium qui libère les sites antigéniques avant toute incubation avec le premier anticorps. Le marquage obtenu après 60 ou 120 minutes d'incubation avec le métapériodate de Sodium, que ce premier anticorps soit dirigé contre l'actine (IgM), l'α-tubuline (IgG) ou la vimentine (IgG), et après une incubation pendant 4 heures avec le second anticorps, a donné lieu à un marquage uniforme très intense sur l'entièreté de la coupe. Vu ces résultats, et afin d'éviter les effets néfastes à savoir une décoloration et une instabilité accrue aux électrons observées lors de l'utilisation du métapériodate de Sodium, nous avons choisi l'incubation à 60 minutes (Vandenbosgh et al, 1986) pour les expériences à venir. Elles n'ont pu avoir lieu dans les limites de ce mémoire. Plusieurs tentatives d'explication peuvent ici être avancées pour expliquer l'insuccès du post embedding :

- La première est que la glutaraldéhyde par ses liens bifonctionnels pourrait bloquer les sites antigéniques (Priestley, 1984 ; Newman et Jasani, 1984 et Vandenbosgh et al, 1986.
- La deuxième est que la section pourrait être endommagée par l'incubation au métapériodate de Sodium.
- La troisième, et la plus probable serait une mauvaise préservation des sites antigéniques lors de la fixation (Priestley, 1984 ; Newman et Jasani, 1984 et Vandenbosgh et al, 1986).

Planche 1 : Micrographies électroniques de coupes parallèles à la surface de la culture de cellules endothéliales non traitées.
a/Vésicules de pinocytose (▼) et réseau cortical de MF en périphérie.
b/Faisceau de microfilaments (MF) visibles en périphérie de la cellule (réseau cortical).

a.



b.

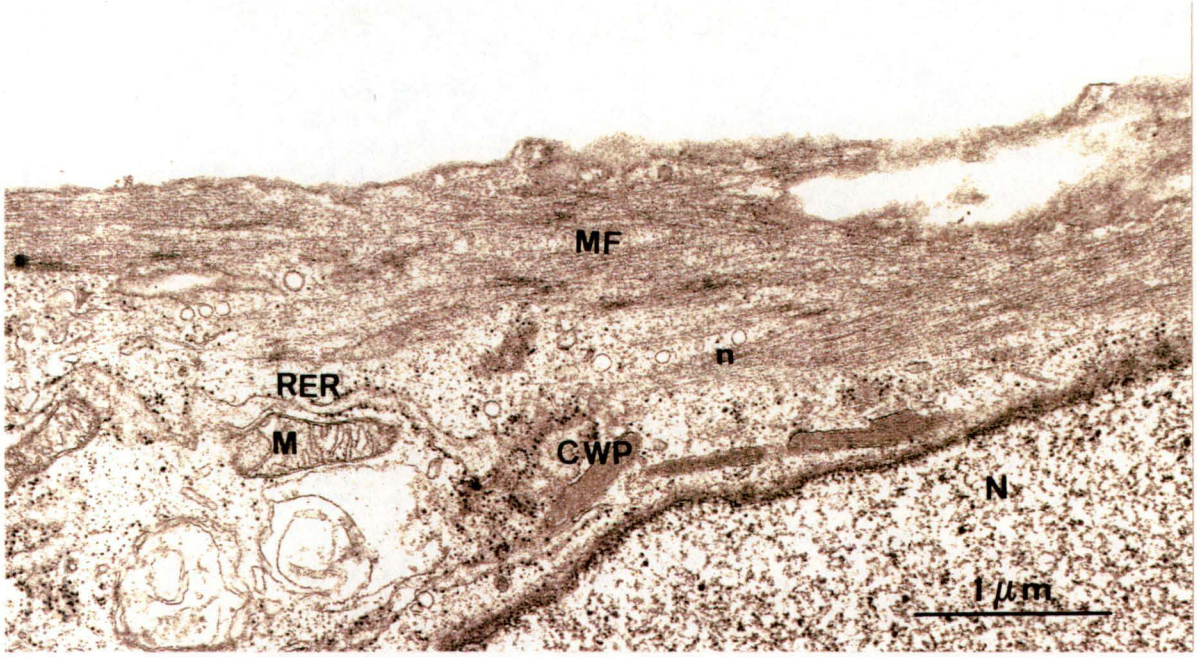


Planche 2 : Micrographie électronique de coupes parallèles à la surface de la culture de cellules endothéliales non traitées. Faisceaux lâches de filaments intermédiaires (FI) et filaments intermédiaires isolés dans le cytoplasme (↓).

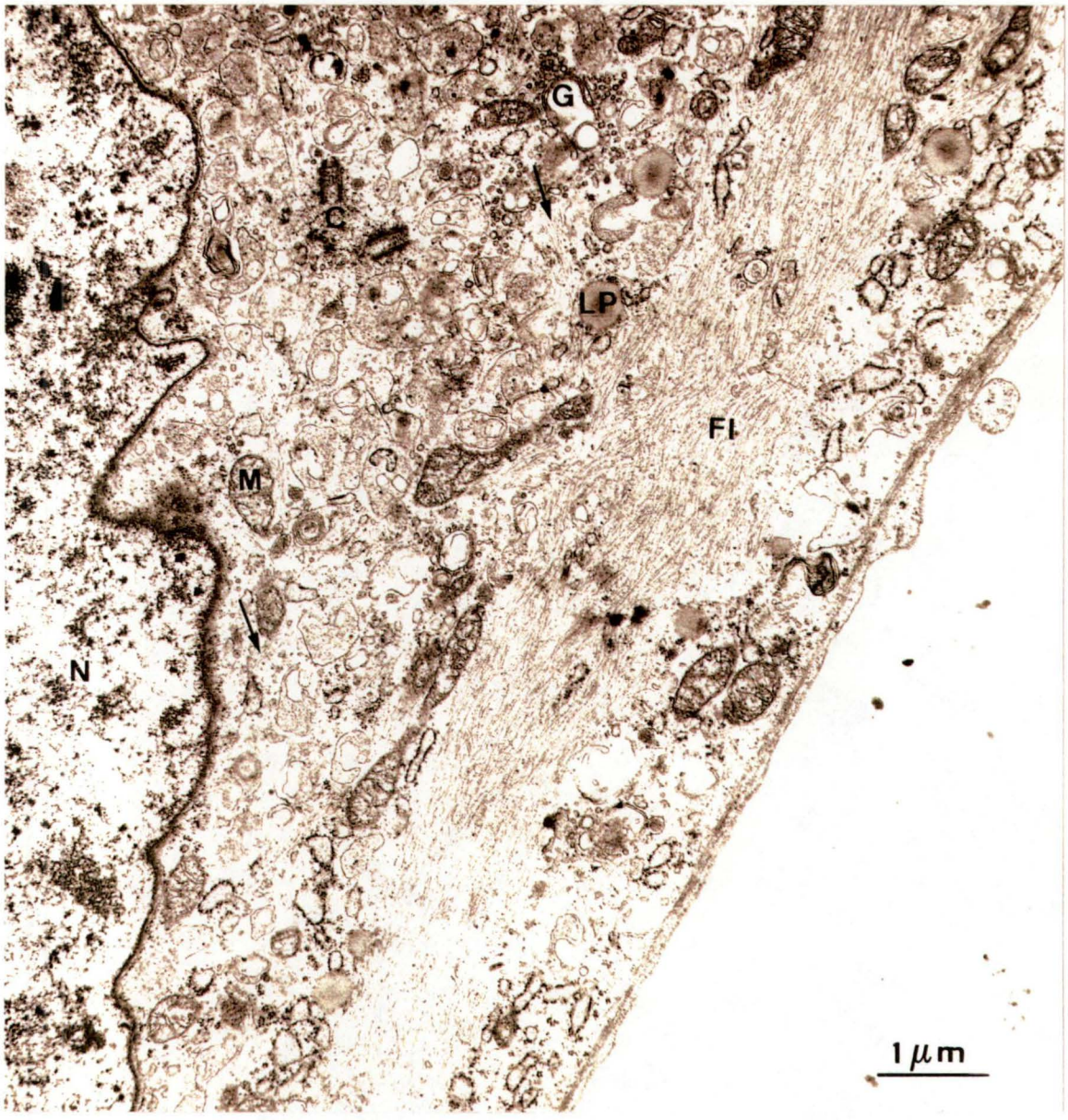

G
C
LP
Fl
M
N
1 μm

Planche 3 : Micrographie électronique de coupes parallèles à la surface de la culture de cellules endothéliales non traitées. Localisation de certains filaments intermédiaires autour de divers organites (LP : liposomes, M : mitochondries, MF : faisceau de microfilament

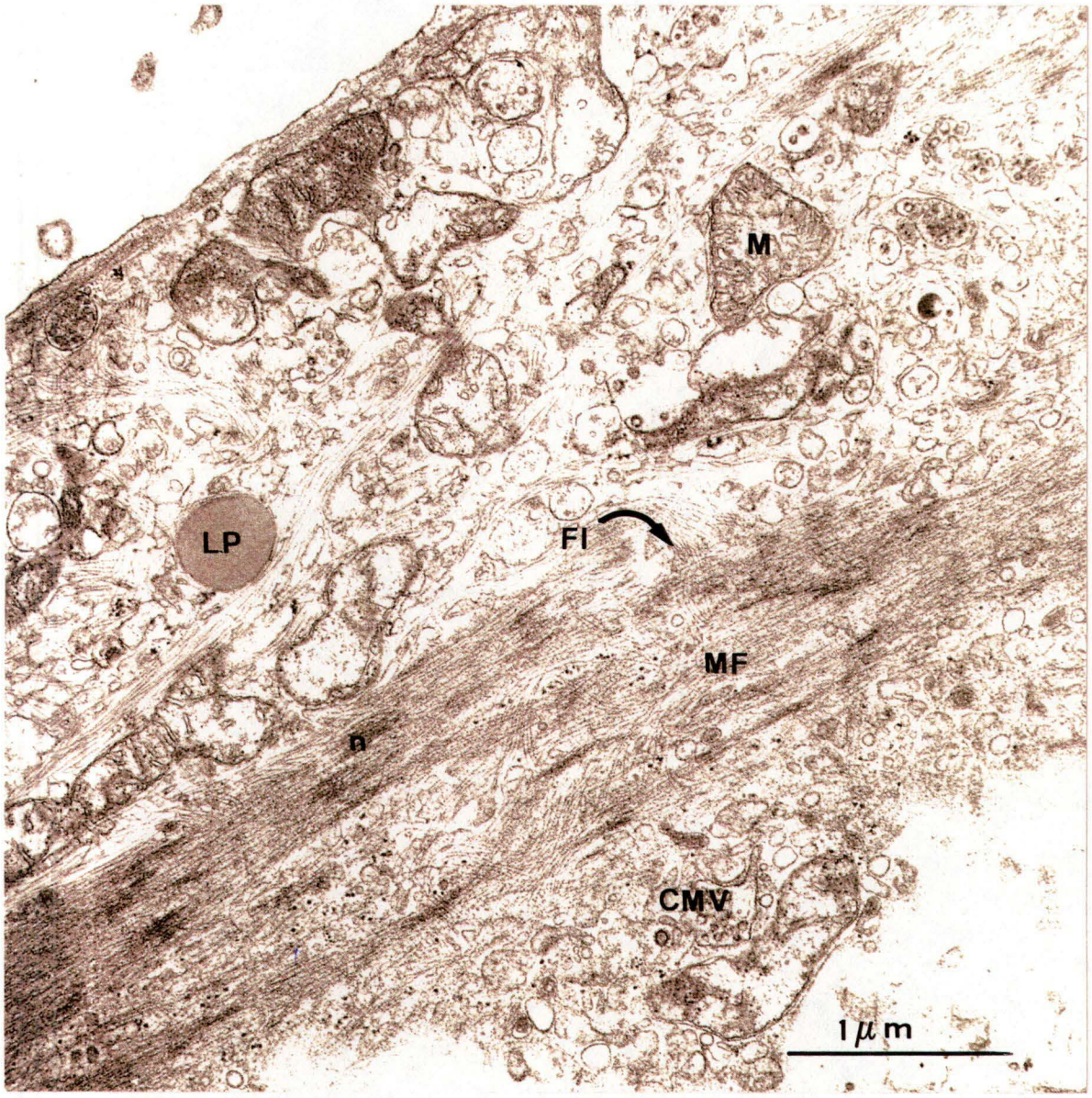
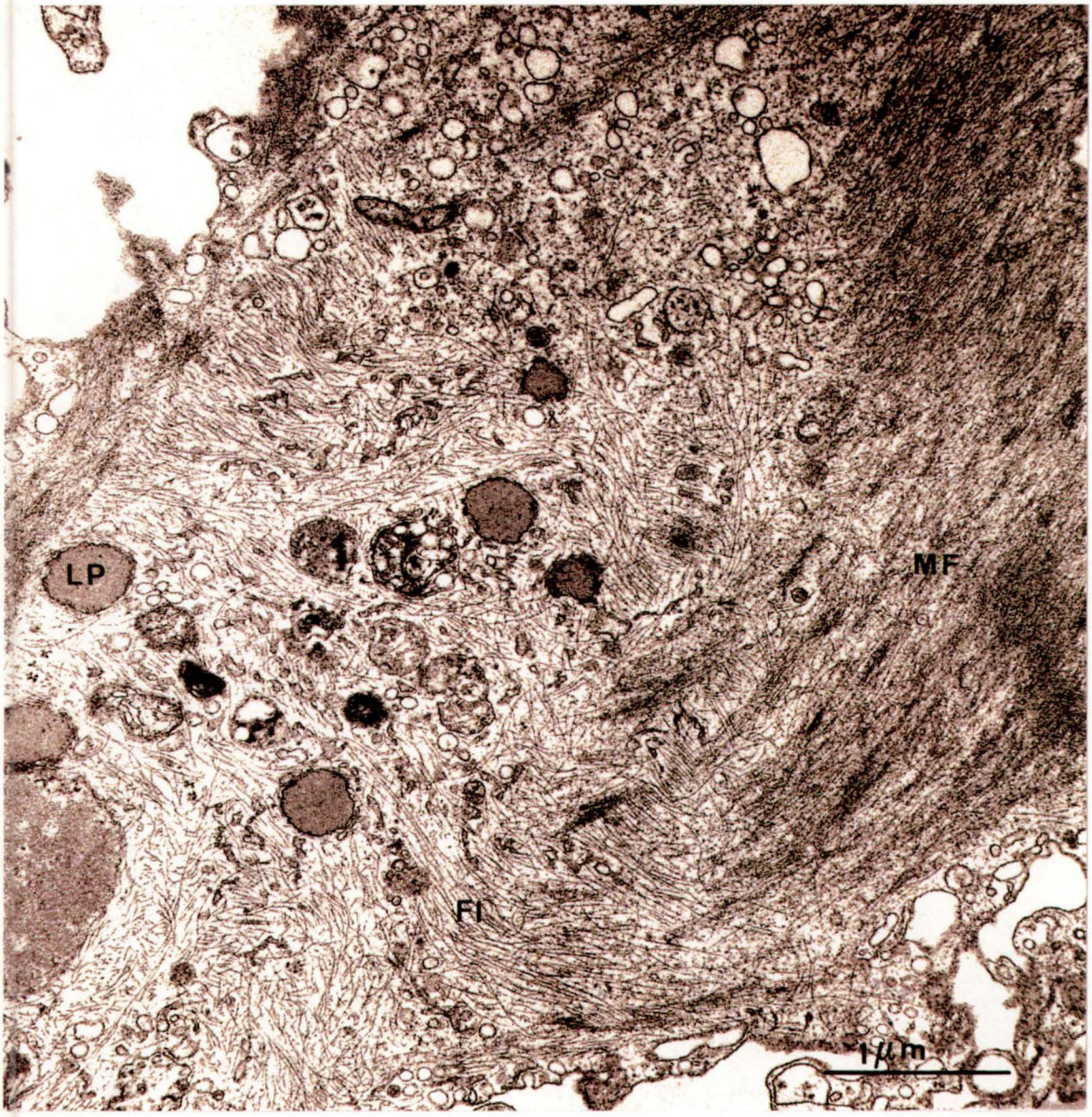

M
LP
Fl
MF
n
CMV
1 μm

Planche 4 : Micrographie électronique de coupes parallèles à la surface de la culture de cellules endothéliales.
Filaments intermédiaires (FI) qui semblent être en relation étroite avec certains organites (MF : faisceau de microfilaments)
On peut y distinguer le faisceau périphérique de microfilaments à la base du bleb.
Filaments intermédiaires (FI) qui semblent être en relation étroite avec certains organites (LP : liposomes, VM : vacuole d'origine mitochondriale).

a.



b.

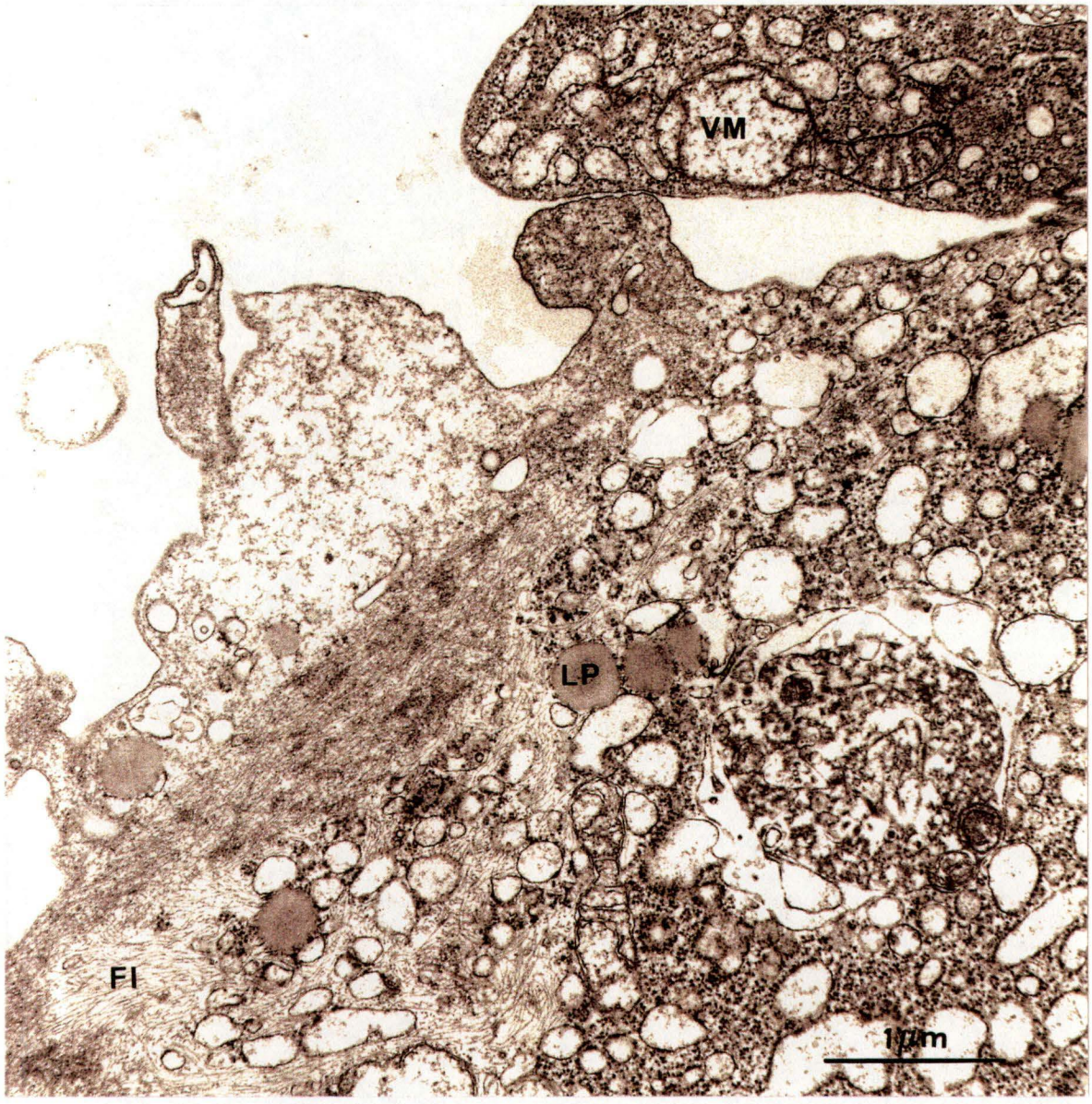


Planche 5 :Micrographies électroniques de coupes parallèles à la surface de la culture des cellules endothéliales non traitées. On peut y distinguer les microtubules (MT), le centrosome (C), des mitochondries (M), l'appareil de Golgi (G) et des liposomes (LP).

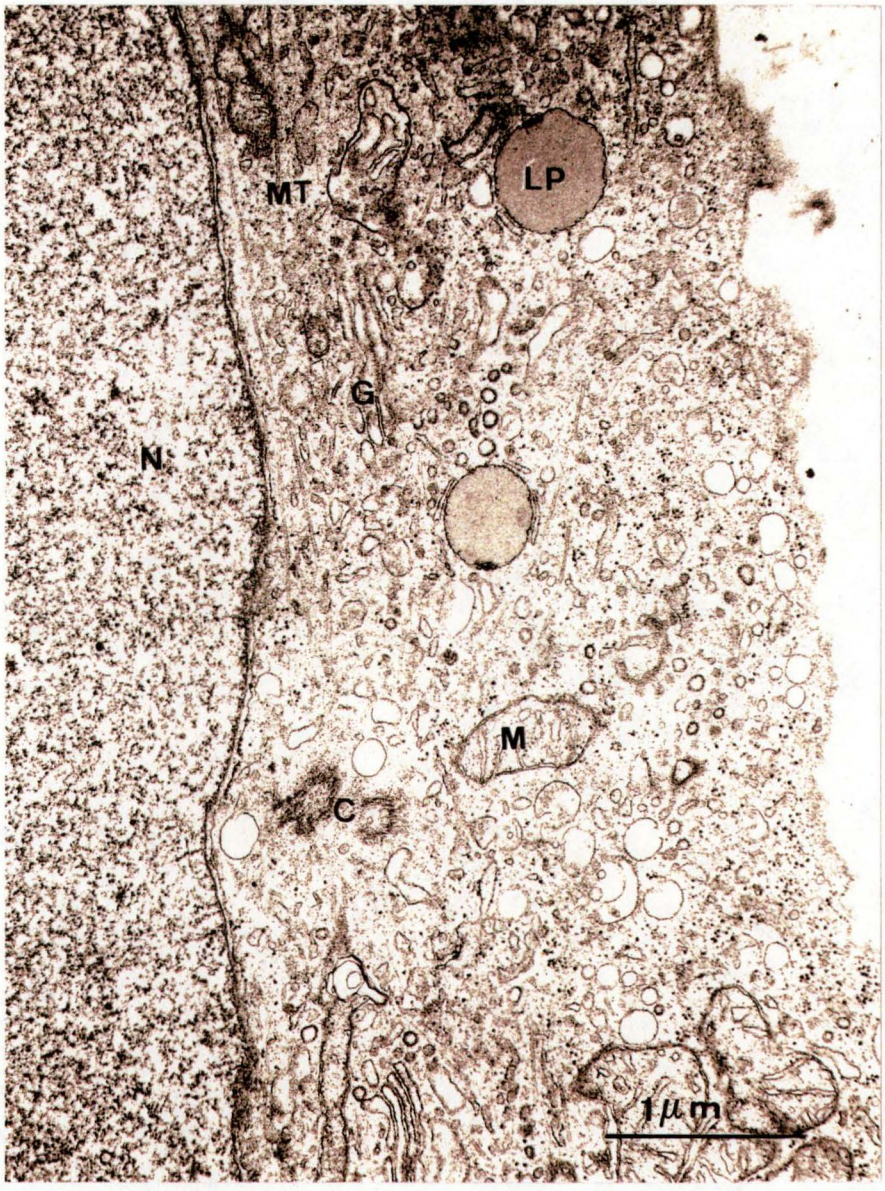
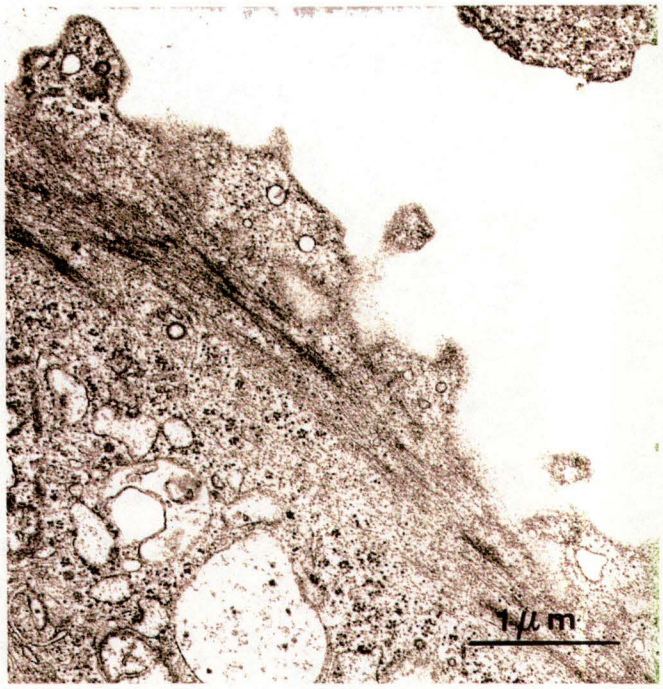

MT
LP
G
N
M
C
1μm

Planche 6 : Micrographies électroniques de coupes parallèles à la surface de la culture de cellules endothéliales non traitées et traitées.
a/Aspect d'une membrane plasmique d'une cellule endothéliale non traitée et dont on aperçoit le faisceau périphérique de microfilaments.
b/Cellules endothéliales incubées pendant 60 minutes avec des dérivés actifs de l'oxygène. La périphérie de la cellule paraît tourmentée.
c/Cellules endothéliales incubées pendant 120 minutes avec les dérivés actifs de l'oxygène. De nombreuses protrusions semblent se détacher du reste du cytoplasme. On peut y distinguer le faisceau périphérique de microfilaments à la base des blebs.

a.



b.



c.

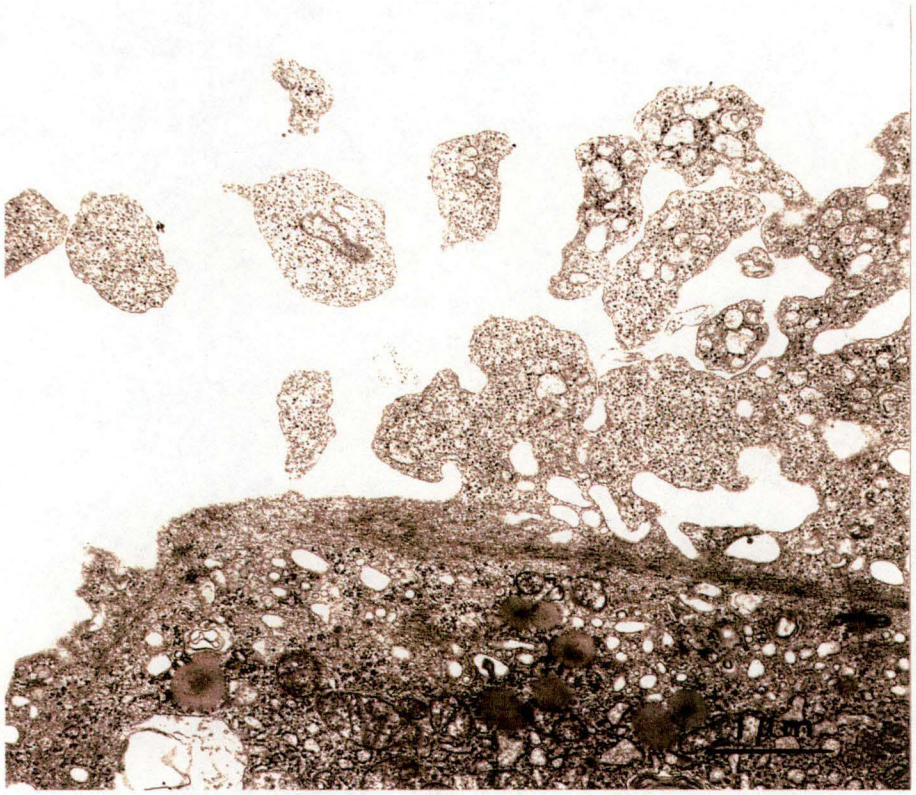


Planche 7 : Micrographie électronique de coupes parallèles à la surface de la culture de cellules endothéliales incubées 120 minutes avec les dérivés actifs de l'oxygène. De nombreuses boursouflures de la membrane plasmique déforment la cellule.

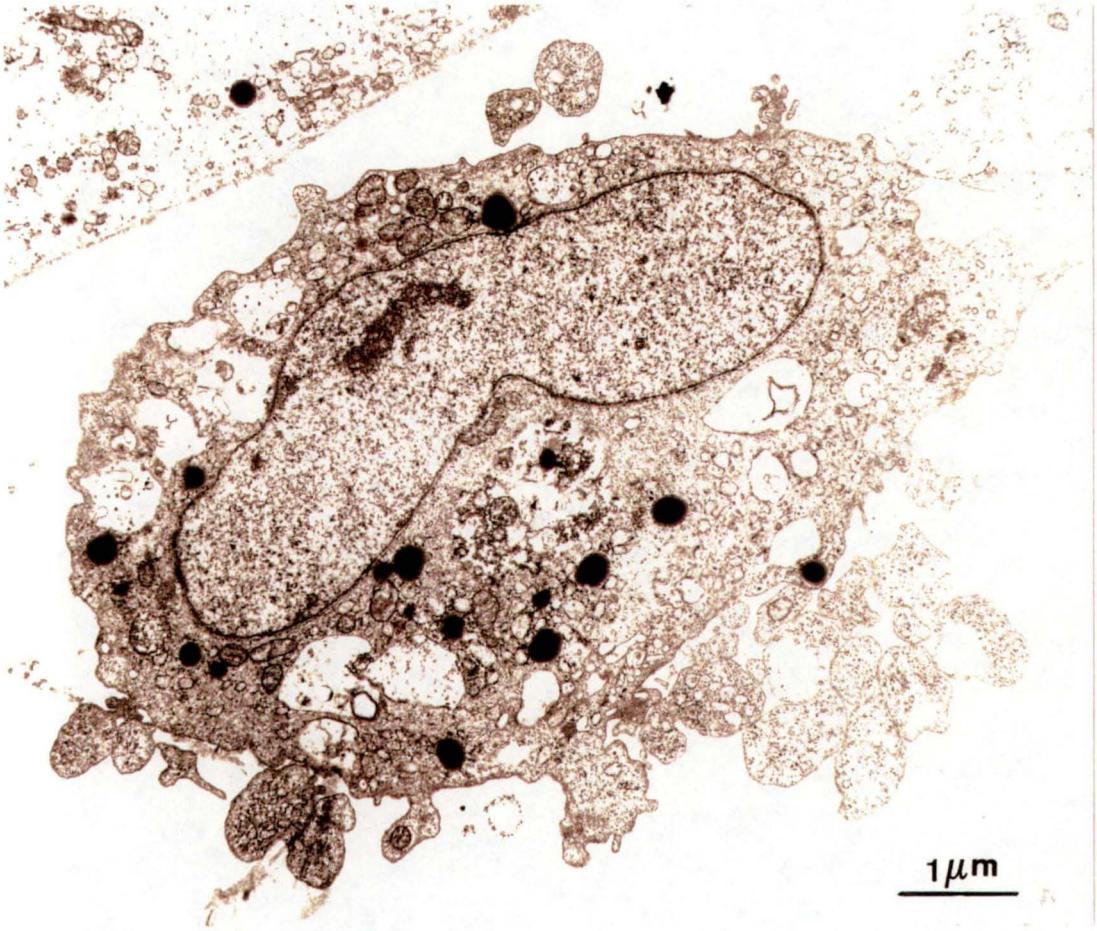

1μm

Planche 8 : Micrographies électroniques de coupes parallèles à la surface de la culture de cellules endothéliales traitées.

a/Cellules endothéliales incubées pendant 60 minutes avec les dérivés actifs de l'oxygène. Les blebs ne semblent contenir que des ribosomes isolés et de très fines et courtes fibrilles. A la base du bleb, on note des structures tubulaires (T), sous lesquelles on rencontre un faisceau de microfilaments (MF) ; filaments intermédiaires (FI).

b.c/Cellules endothéliales incubées pendant 120 minutes avec des dérivés actifs de l'oxygène. Sous la membrane plasmique et à la base du bleb, on rencontre des structures tubulaires (T). On peut également y observer la présence de microfilaments (MF) dans le bleb sous la membrane plasmique.

a.



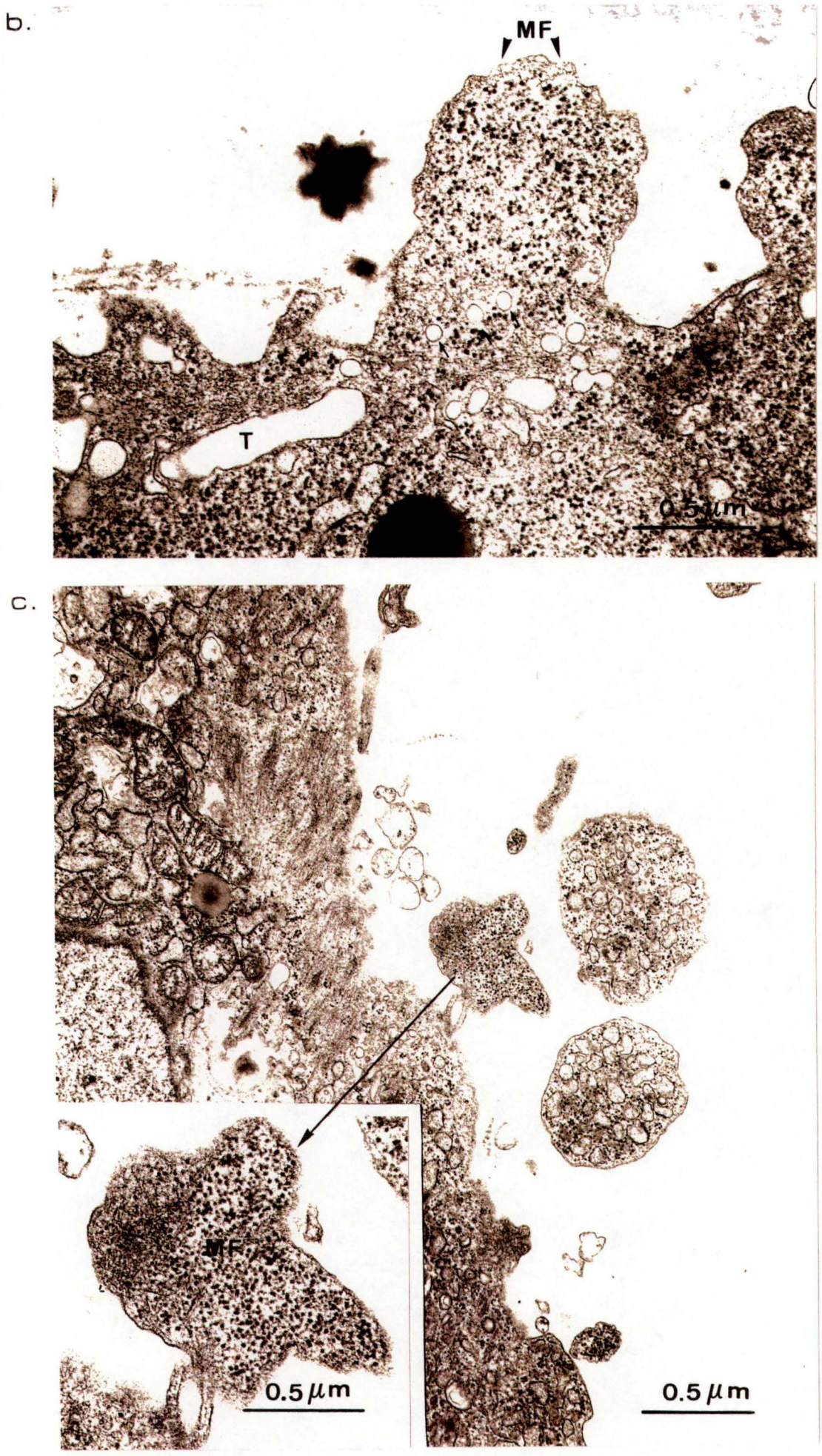
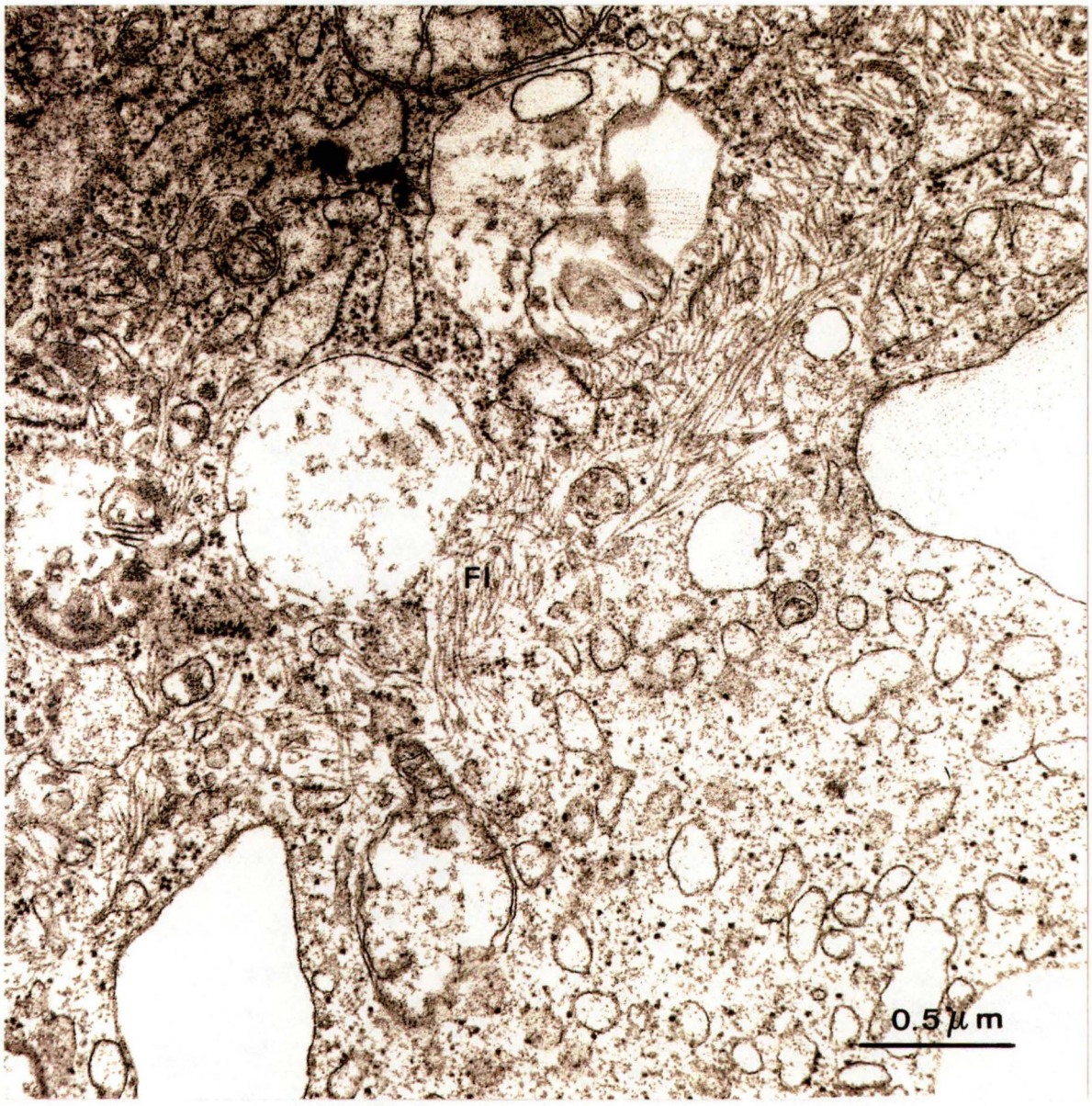

b.
MF
T
0.5 μm
c.
MF
0.5 μm
0.5 μm

Planche 9 : Micrographie électronique de coupes parallèles à la surface de la culture de cellules endothéliales incubées pendant 120 minutes avec les dérivés actifs de l'oxygène. On peut observer la présence de filaments intermédiaires (FI) à la base du bleb.


Fl
0.5 µm

Discussion générale.et conclusion

Le but de notre travail était d'examiner, avec diverses techniques morphologiques, une altération particulière appelée "bleb", qui se développait progressivement sous l'influence d'un stress oxydant de 60 à 120 minutes de durée. Ces boursouflures ont ceci d'intéressant qu'elles sont réversibles au retrait de l'agent traumatisant.

Les techniques de microscopie photonique, contraste de phase et immunofluorescence nous ont permis de suivre ce phénomène de l'extérieur comme de l'intérieur de la cellule. La technique de balayage nous a facilité la vision tridimensionnelle des blebs et la microscopie électronique a précisé la formation de ces boursouflures et leurs rapports de voisinage avec les autres organites ou constituants de la cellule.

Nous pouvons résumer ces observations en disant que la formation des blebs est progressive, relativement lente, et qu'elle s'accompagne de modifications très nettes du réseau de microfilaments intracytoplasmiques. Nos observations permettent d'imaginer un modèle pouvant correspondre à la formation de blebs (fig.1.). En absence d'agents lésants (ici en absence du milieu xanthine/xanthine oxydase, producteur de dérivés actifs de l'oxygène), la membrane plasmique apparaît lisse, légèrement ondulée, possédant un réseau de microfilaments sous cortical assez bien fourni, en relation avec des microtubules cheminant en direction parallèle ou légèrement oblique au grand axe de la cellule. Le cytoplasme, où l'on retrouve beaucoup de faisceaux de filaments intermédiaires plus indisciplinés, contient beaucoup de ribosomes libres.

A 60 minutes, en divers points de la surface (Cfr MO et ME), on observe des soulèvements, le plus souvent modérés, de la membrane plasmique qui possède alors toujours son réseau cortical de microfilaments. Ces protrusions sont cependant séparées du reste du cytoplasme par des faisceaux de microfilaments paraissant relativement normaux. Au-dessus des microfilaments, à la base de cette protubérance, on observe des vacuoles ou tubules dont nous n'avons pu préciser l'origine avec certitude, mais qui pourraient bien être des éléments du SER.

A 120 minutes, la boursouflure est soit nette, ovale ou arrondie, soit le plus souvent anarchique et irrégulière, mais elle est séparée du cytoplasme par un ensemble d'agrégats de filaments qui sont comme une corde de strangulation. Les tubules et vésicules sont toujours là. Nous ne voyons pas la fusion, mais cela pourrait être un phénomène très rapide, comme cela doit se passer pour le normoblaste et le mégacaryocyte.

Sur nos images d'immunofluorescence, se remarque très bien la rétraction progressive et massive de ces cellules, puisqu'à chaque temps de traitement, les photos sont prises au même grossissement. Le réseau de vimentine est le moins visible, mais il doit être plus difficile à mettre en évidence selon certains experts (Raes

M., communication personnelle). Sur certaines images, on aperçoit un réseau en nid d'abeille marqué (vimentine ou actine) dans tout le cytoplasme : il pourrait s'agir du réseau de réticulum endoplasmique.

Une chose nous semble curieuse : en immunofluorescence, le réseau de tubuline ne s'observe plus guère à 60 minutes, encore moins à 120 minutes. Or, sur nos micrographies électroniques, les microtubules se retrouvent avec la même densité à peu près à tous les temps.

Il se pourrait que les microtubules soient dépolymérisés à 60 et 120 minutes, car ces images ressemblent à celles obtenues par traitement des cellules au Nocodazole (il s'agissait de fibroblastes cependant) par Raes, M. (1983). Mais comment comprendre alors nos résultats en ME ? Il se pourrait aussi que le "racrapotage" (shrinkage) des cellules obscurcisse tout à fait le réseau de MT bien visible sur le contrôle.

Peut-être pourrions-nous pour terminer intégrer nos résultats avec ceux de la littérature et essayer de voir si nous pouvons faire rentrer cette forme particulière de réaction cellulaire dans le cadre plus général des réponses à "l'injury".

Les cellules soumises aux dérivés actifs de l'oxygène s'arrondissent et se soulèvent tout en restant attachées au substrat par des fibres de rétraction. Miranda (1974) rapporte que l'adhérence de diverses cellules traitées à la cytochalasine D n'est pas altérée par la rétraction cellulaire.

Au début de la formation des blebs, il est clair que les microfilaments s'agrègent et s'orientent vers la protrusion cytoplasmique. Au-dessus de cet agrégat de microfilaments, des tubes ou vésicules s'alignent. Godman (1975) a observé un phénomène similaire de condensation et de déplacement de microfilaments. Selon lui, la contraction de la cellule, induite par la cytochalasine D, entraînerait une pression responsable des perméations cytoplasmiques au niveau des zones les plus vulnérables de la cellule. Toutefois, il ne semble pas que la rétraction cellulaire soit responsable de la désorganisation des microfilaments puisque dans les cellules dépourvues d'ATP et traitées à la cytochalasine B, on note une désorganisation du cytosquelette sans observer de rétraction cellulaire (Wysolmerski, 1988).

Meek, (1976) a fréquemment observé à la base des blebs de cellules traitées à la cytochalasine, des vésicules qui joueraient un rôle dans le pincement de la portion basale des blebs. Nous avons déjà dit que nous divergions sur ce point d'avec son interprétation.

Des microtubules semblent associés à la membrane plasmique, mais ne lui semblent pas attachés comme les microfilaments semblent l'être. Les microtubules pourraient être attachés aux microfilaments qui seraient eux-mêmes attachés à la MP. C'est ce qui se produit certainement au niveau des plaques d'adhésion focale (Burridge, 1988) visibles sur les contrôles.

Comment comprendre l'altération des filaments d'actine intracellulaires sous l'influence d'un agent lésant extérieur ? Quelle est l'altération de la membrane plasmique ou de la cellule responsable de l'altération des microfilaments ? Quelle est l'intervention précise des dérivés actifs de l'oxygène dans tout cela ?

CE et dérivés actifs de l'oxygène.

En bref, il existe des liens certains entre la production des dérivés actifs de l'oxygène et la viabilité des CE ou l'altération de certaines de leurs structures ou fonctions. Harlan (1981), entre autres, avait observé la sensibilité particulière des CE aux dérivés actifs de l'oxygène.

Shasby (1985), déjà mentionné, avait observé une rétraction réversible des cellules, sous un stress identique suite à l'augmentation de la perméabilité de l'endothélium.

Enfin, Freeman (1986), dans des conditions similaires, a décrit des modifications dans l'organisation membranaire de ces cellules.

Altération du cytosquelette des CE et dérivés actifs de l'oxygène.

Shasby et al (1985) ont obtenu, par un système xanthine/xanthine oxydase, des effets sur le cytosquelette comparables à ceux dont nous venons de parler.

Niwa (1982) avait déjà signalé les mêmes boursouflures au niveau de la membrane plasmique des CE incubées avec les dérivés actifs de l'oxygène.

Mécanisme à la base de l'altération du cytosquelette.

La plupart des auteurs s'accordent pour penser qu'il s'agit d'une intervention directe des radicaux libres sur la membrane plasmique avec retentissement secondaire sur les microfilaments. Shasby (1985) attribuait un rôle à la perturbation de l'homéostasie calcique des CE produite sous un stress oxydant. Un effet similaire a été observé après incubation des cellules P 388 D1 avec l'H_2O_2 (Hyslop,1986). L'augmentation de Ca^{++} intracellulaire pourrait selon lui dériver d'une modification de la perméabilité de la membrane plasmique. L'augmentation de la perméabilité membranaire au calcium serait due à l'oxydation des acides gras lors de la peroxydation lipidique produite par les dérivés actifs de l'oxygène (Freeman, 1985).

Le calcium est un important constituant de la membrane qui peut se lier aux têtes polaires des lipides (Rasmussen et Bordier, 1974). Si ce Ca^{++} lié à la membrane s'en détache, il pourrait se produire des déformations dans la membrane et peut-être dans la couche corticale des microfilaments. L'activité de certains enzymes membranaires est sous la dépendance du Ca^{++}. Une augmentation du $[Ca^{++}]_i$ pourrait stimuler les phospholipases A2 membranaires ou d'autres enzymes Ca^{++} dépendantes.

Des changements dans les membranes elles-mêmes pourraient stimuler la formation de blebs. Par exemple, des réarrangements de lipides (les acides gras

désaturés sont une cible bien connue des radicaux libres) pourraient se produire et de tels réarrangements pourraient altérer les protéines de la membrane et même provoquer la rupture des microfilaments. Si les protéines altérées sont des ATPases, on peut imaginer les conséquences sur la perméabilité de la membrane et la perturbation ionique intracellulaire.

Blebbing et cell injury.

Le blebbing semble bien une réponse générale de la cellule à diverses aggressions. Les hypothèses sur les mécanismes qui la provoquent diffèrent.

Lemasters (1987), par exemple, n'attribue pas un rôle capital à la perturbation de l'homéostasie calcique.

Il a observé le blebbing sur des hépatocytes isolés en présence d'une hypoxie chimique réalisée à l'aide de KCN et d'iodo-acétate. Il a découvert que la mort cellulaire survenait de manière abrupte caractérisée par une augmentation soudaine, non spécifique de la perméabilité cellulaire produite par la rupture d'une boursouflure cellulaire.

Il a montré que l'acidose extracellulaire protège les hépatocytes en retardant la mort cellulaire. Cette protection est médiée par l'acidification de la cellule (Gores, 1988).

Perspectives.

Il nous semblerait intéressant, de pouvoir approfondir les éléments à l'origine des perturbations liées au stress oxydant dans les CE.

Par exemple, nous aimerions suivre - comme l'a montré Lemasters pour les hépatocytes - en même temps le blebbing et les variations du Ca^{++} intracellulaire en utilisant la vidéomicroscopie de fluorescence sur des CE intactes, vivantes (Di Giuseppi, 1985).

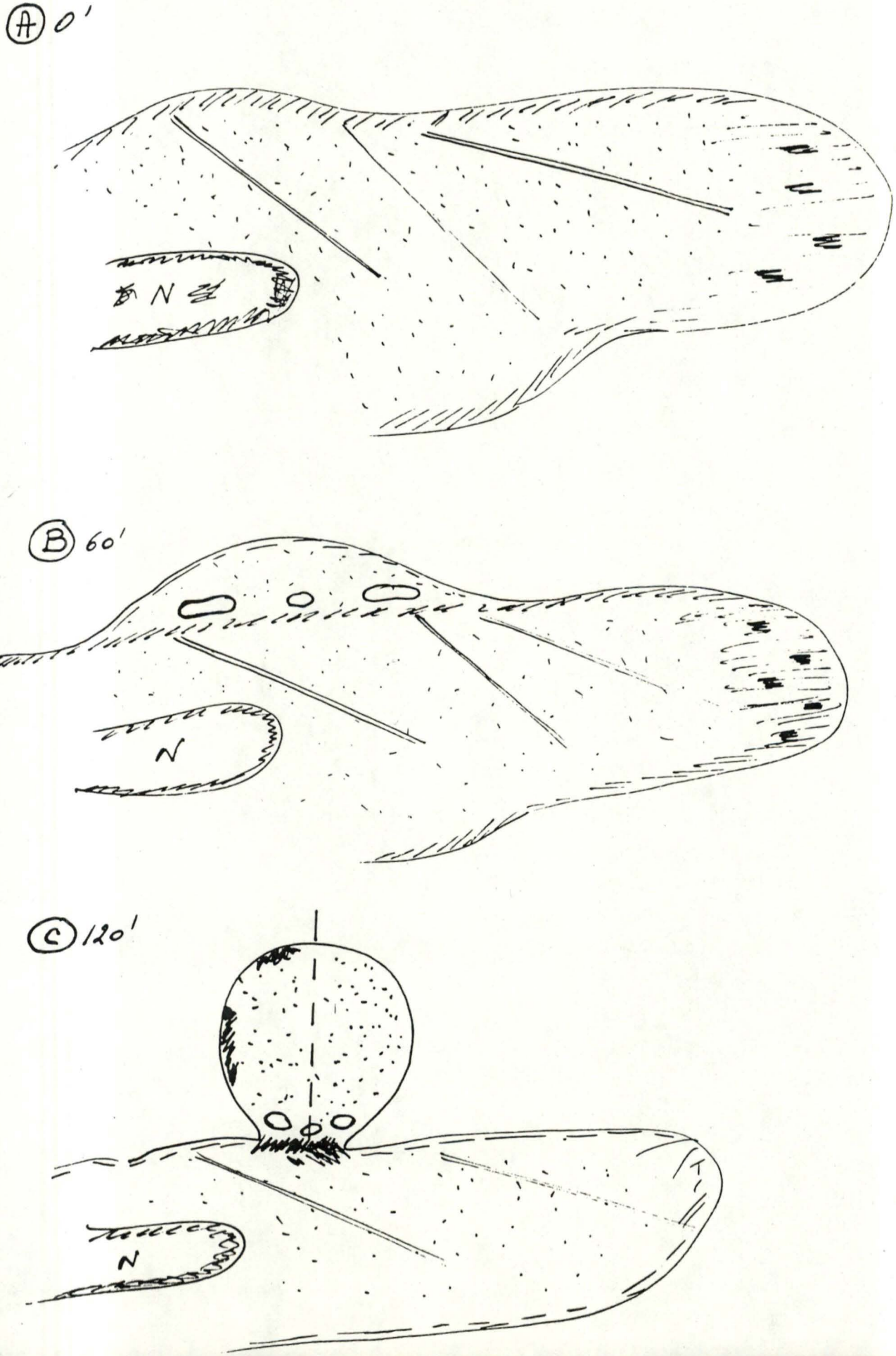
L'utilisation d'indicateurs fluorescents comme le Fura 2 par exemple (Malorni, 1987) ou le fluo 3 permet la mesure des concentrations cytosoliques de Ca^{++} dans des suspensions cellulaires ou mieux sur des cellules cultivées sur couvre-objet. Nous aimerions utiliser des inhibiteurs comme les cytochalasines B et D, la colchicine, des inhibiteurs du métabolisme pour essayer de mimer les altérations membrane / cytosquelette induites par un stress oxydant.

Figure 1 :

A/ On observe le réseau sous-cortical de microfilaments qui peut présenter un aspect plus étalé avec les plaques d'adhésion bien visibles, des microtubules en relation avec ce réseau cortical et les ribosomes dans le cytoplasme.

B/ Légère boursouflure isolée apparemment du cytoplasme par le réseau cortical de microfilaments. Présence de tubules ou vésicules à la base de bleb qui est rempli de ribosomes. On observe encore de légers faisceaux de microfilaments en périphérie du bleb.

C/ Boursouflure bien établi, arrondie ou ovale ayant à sa base des agrégats de microfilaments. Parfois ces agrégats se retrouvent en périphérie du bleb, parfois (fig 7a) il n'y en a plus et le bleb ne contient que des ribosomes. Rarement, on peut y retrouver des vacuoles claires d'origine mitochondriale, le RER. Le réseau cortical des microfilaments du reste de la cellule est beaucoup moins net, tandis que les microtubules paraissent inchangés de même que les filaments intermédiares (absents du schéma)


A 0'
N
B 60'
N
C 120'
N

Bibliographie

Ager, A. et Gordon, J.C. (1984).
Differencial effects of hydrogen peroxide on indices of endothelial cell function.
J. Exp. Med., 159, 592.

Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. et Watson, J.D. (1988).
The cytoskeleton.
In: Molecular Biology of the Cell. 2nd Ed. Ed. Garland Publ., New York.

Andreoli, S.P.; Bachner, P.L.et Bergstein, J.M.(1985).
In vitro detection of endothelial cell damage using 2-deoxy-D-^{3}H-glucose : comparison with ^{51}Cr, ^{3}H Leucine, ^{3}H Adenine and lactate dehydrogénase.
Lab. Clin. Med.,106, 253-261.

Anitschkov, N. (1983)
Uber die Veranderingen de Kaninche aorta bie seperimenteller chollsterinsteatase.
Beit. Path. Anat.,56, 379.

Bartoli, G.M.; Galeotti, T.; Tolombini, G.; Parisi, G. et Azzi, A. (1971)
Different contribution of rate liver microsomal pigments in the formation of superoxide anion and H_2O_2 during development
Arch. Biochem., 184, 276-281.

Bell,P.B., Nindroth, N. et Fredriksen, B-A. (1988)
Preparation of cytoskeleton of cells in culture for high resolution scanning and scanning transmission electron microscopy
Scanning Microscopy, 2 (3), 1647-1661

Benditt, E.P. et Benditt, J.M. (1973).
Evidence for a monoclonal origin of human atherosclerosis plaques.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 1753-1756.

Bindoli, A.; Cavallini, L.; Rigobello, M.P.; Coassin, M. et Di Lisa, F. (1988).
Modification of the xanthine-converting enzyme of perfused rat heart during ischemia and oxidative stress.
Free Rad. Biol. Med., 4, 163-167.

Birchmeier, W. (1984)
Cytoskeleton, structure and function
T.I.B.S., avril 84 , 192-199

Blose, S.H. (1979).
Ten nanometers filaments and mitosis : maintenance of structural continuity in dividing endothelial cells.
Proc. Ntl. Acad. Sci. USA., 76, 3372-3376.

Blose, S.H. (1984).
The endothelial cytoskeleton. In: Biology of endothelial cells (Jaffe, E.A., éd.),
pp.209-214, Martinus Nijhoff Publishers, Bosten, MA.

Bond, J.M., Dawson, J., Herman, B. et Lemasters, J.J. (1989).
Recovery of hypercontracted myocytes after chemical hypoxia.
Am. J. Physiol., 3A, 626-632.

Bonder, E.M.; Fiskkind, D.J. et Mooseker, M.S. (1983).
Direct measurement of critical concentrations and assembly rate constants at the two ends of an actin filament.
Cell., 34, 491-501.

Borman, L.S.; Dumont, J.N. et Hsie, A.W. (1975).
Relationship between cyclic AMP, microtubule organization, and mammalian cell shape. Studies on chinese Hamster ovary cells and their variants.
Exp. Cell Res., 91, 422-428.

Boveris, A. (1977).
Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide.
Adv. Exp. Med. Biol., 78, 67-82.

Boyde, A.; Weiss, R.A. et Vesely, P. (1972).
Scanning electron microscopy of cells in culture.
Exp. Cell Biol., 71, 313-324.

Bridgman, P. (1987).
Structure of cytoplasm as revealed by modern electron microscopy techniques.
Trends Neuro. Sci., 10, 321-325.

Bulkley, B.J.; Tanswell, A.K. et Freeman, B.A.(1987).
Liposomes mediated augmentation of catalase in alveolar type II cells protects against H_2O_2 injury.
J. Appl. Physiol., 63, (1), 359-360.

Burgess, D.R. et Grey, R.D. (1974).
Alterations in morphology of developing microvilli elicited by cytochalasin B.
J. Cell Biol., 62, 566-574.

Burridge ,K.,Fath K.,Kelly,Th., Nuckolls, G. and Turner C.(1988)
Focal adhesions:Transmembrane junctions between the Extracellular Matrix and the Cytoskeleton.
Ann. Rev. Cell Biol., 4, 487-525.

Capron, L. (1983).
Athérosclérose.
Rev. Neurol., 139, 167-176.

Castellot, J.J.; Rosenberg, R.D. et Karnovsky, M.J. (1984).
Endothelium, heparin, and the regulation of vascula`r smooth muscles cell growth.
In: Biology of endothelial cells.
Ed. Jaffe, E.A. Martinus Nijhoff Publishers, Boston, 118-128.

Collot, M., Louvard, D. and Singer, S.J. (1984).
Lysosomes are associated with microtubules and not with intermediate filaments in culture of fibroblasts.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81, 788-792.

Coluccio, L.M. et Tilney, L.G. (1984).
Phalloidin enhances actin assembly by preventing monomerdissociation.
J. Cell Biol., 99, 529-535.

Cooper, J.A. (1987).
Effects of cytochalasin and phalloidin on actin.
J. Cell Biol., 105, 1473-1478.

Dalen, H. et Todd, P. (1971).
Surface morphology of trypsinized human cells in vitro.
Exp. Cell Res., 66, 353-361.

de Duve C. (1974).
The participation of lysosomes in the transformation of smooth muscle cells to foamy cells in the aorta of cholesterol-fed rabbits.
Acta Cardiol. (Suppl.), 20, 9-25.

de Duve, C. (1984).
A guided tour of the guiding cell.
Vol 2. Scientific American Books, New York.

De Groot, P.G.; Brnkman, H.-J. M.; Gonsalves, M.D. et Van Mourik,J.A. (1985).
The role of thrombin in the regulation of the endothelial prostaglandin production.
Biochim. Biophys. Acta, 846, 342-349.

Denecke, S.M.; Steiger, V. et Fanburg, B.L. (1987)
Effect of hydroperoxide on glutathione levels and glutamic acid uptake in endothelial cells.
J. Applied Physiol., 63, 1966-1971.

Dobrina, J. (1988).
Neutrophil-endothelial cell interaction.
J. Clin. Invest., 78, 462-471.

Dodge, A.B., Patton, W.F.,Yoon, M.U., Hectman, H.F.et Shepro , D.
Intermediate filament (IF) patterns in cultured bovine, rat, and een microvascular endothelial cells (MVC).
Abstract.

Dustin, P. (1980)
Microtubules.
Sci. Am., 243, 58-68.

Everhart, L.P. et Rubin, R.W. (1974).
Cyclic changes in the cell surface.
II.The effect of cytochalasin B on the surface morphology of synchronized chinese hamster ovary cells.
J. Cell Biol., 60, 442-447.

Fantone, J.C. et Ward, P.A. (1982).
Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocytes-dependent in flammation reactions.
Am. J. Pathol., 107, 397-418.

Farrel, K.W.; Jordan, MA.; Miller, H.P. et Wilson, L. (1987).
Phase dynamics at microtubules ends: the coexistence of microtubule length changes and treadmilling.
J. Cell. Biol.,104, 1035-1046.

Fox, P.L. et Di Corletto, P.E. (1984).
Regulation of production of a platelet-derived growth factor-like protein by culturde bovine aortic endothelial cells.
J. Cell. Physiol., 121, 298-308.

Franke, W.W.; Schmid, E.; osborn, M. et Weber, K. (1979).
intermediate-sized filaments of human endothelial cells.
J. Cell Biol., 81, 570-580.

French, S.W.; Kondo, I.; Irie, T.; Ihrig, T.J.; Benson, N. et Munn, R. (1982).
Morphologic study of intermediate filaments in rat hepatocytes.
Hepatology, 2, 29-38.

Fried, R. (1980).
Metabolic role of xanthine oxidase as a source of superoxide dismutase radicals and hydrogen peroxide.
In "Chemical and Biochemical aspects of superoxide dismutase."
(Bannistrand J.V. and Hill H.A.).

Furchgott, R.F. (1984).
The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs.
Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 24, 175-197.

Godman, G.C.; Miranda, A.F.; Deitch, A.D. et Tanenbaum, S.W.(1975).
Action of cytochalasin D on cells of established lines.
III. Zeiosis and movements at the cell surface.
J. Cell Biol., 64, 644-667.

Goldstein, J.L. et Brown, M.S. (1977).
The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis.
Ann. Rev. Biochem., 46, 897-930.

Gorog, P.; Pearson, J.D. et Kakkar, V.V. (1988).
Generation of reactive oxygen metabolites by phagocytosing endothelial cells.
Atherosclerosis, 72, 19-27.

Halliwell, B. (1987).
Oxidants and human diseases : some new concepts.
FASEB J., 1, 358-364.

Hamer, I. (1987).
Activités enzymatiques impliquées dans le métabolisme des radicaux libres du foie de rat ischémié. Effet de l'hypothermie.
Mémoire de licence. FUNDP, Namur.

Harlan, J.M., Killen, P.D., Harker, L.A., Striker, G.E. et Wright, D.G. (1981).
Neutrophil-mediated endothelial injury in vitro. Mechanisms of cell detachment.
J. Clin. Invest., 68, 1394-1403.

Haudenschild, C.C. (1984).
Morphology of vascular endothelial cells in culture.
In: Biology of endothelial cells. Ed. Jaffe, E.A. pp 129-140.
Martinus Nijhoff, Publishers Boston M.A.

Hennig, B.; Enoch, C. et Chow, C.K. (1987).
Protection by Vitamin E against endothelial cells injury by linoleic acid hydroperoxides.
Nutr. Res., 7, 1253-1259.

Hennig, B. et Chow, C.K. (1988).
Lipid peroxidation and endothelial cell injury : implications in atherosclerosis.
Free Rad. Biol. Med., 4, 99-106.

Herman, B.; Nieminen, A.-L.; Gores, G.J. et Lemasters,J.J. (1988).
Irreversible injury in anoxic hepatocytes precipitated by an abrupt increase in plasma membrane permeability.
FASEB J., 2, 146-151.

Herman, B.; Nieminen, A.-L.; Gores, G.J. et Lemasters,J.J. (1988).
Blebbing, cytosolic free Calcium and mitochondrial membrane potential following toxic and anoxic injury in hepatocytes.
In: Integration of mitochondrial function.
Ed. Lemasters, J.J.,Hackenbrock, Ch.R., Thurmens, R.G. and Westerhoff, H.V. Plenum Publ. Corp., NY. pp 379-391.

Heuser, J.E. et Kirschner, M.N. (1980)
Filament organization revealed in platinum replicas of freeze dried cytoskeletons.
J. Cell. Biol., 86, 212-234.

Hinshaw, D.B., Sklar, L.A., Bohl, B., Schraufstatter, I.U., Hyslop, P.A., Rossi, M.W.,Spragg, R.G. et Cochrane, C.G. (1986)
Cytoskeletal and morphologic impact of cellular oxidant injury
Am.J.Pathol, 123, 454-464

Horio, H. et Hotani, H. (1986).
Visualization of the dynamic instability of individual microtubules by dark field microscopy.
Nature, 321, 605-607.

Housset, B. et Junod, A.F. (1982).
Effects of culture conditions and hyperoxia on antioxidant enzymes in pig pulmonary artery and aortic endothelium.
Biochim. Biophys. Acta. 716, 283-289.

Jaffe, E.A. (1984).
Culture and identification of large vessel endothelial cells.
In: Biology of endothelial cells (Jaffe, E.A., ed.), pp.1-2,
Martinus Nijhoff Publishers, Bosten, MA.

Jaffe,E.A. (1985).
Physiologic functions of normal endothelial cells.
Ann. N. Y. Acad. Sci. , 454, 279-291.

Jaffe, E.A. (1984).
Synthesis of factor VIII by endothelial cells. in Biology of endothelial cells (Jaffe, E.A., ed.),
pp.209-214, Martinus Nijhoff Publishers, Bosten, MA.

Jarash, E.D.; Bruder, G. et Heid, H.W. (1986)
Significance of xanthine oxidase in capillary endothelial cells.
Acta Physiol. Scand., Suppl. 548, 39-46.

Jewell, S.A.; Bellomo, G.; Thor, H.; Orrenius, S. et Smith, M.T.(1982).
Bleb formation in hepatocytes during drug metabolism is
caused by disturbances in thiol and calcium ion homeostasis.
Science, 217, 1257-1258.

Kalnins, V.I., Subrahmanyan, L. (1981)
Reorganisation of cytoskeletal fibre systems in spreading porcine endothelial cells in culture.
Eur.J. Cell.Biol., 24, 36-44

Karsenti, E. (1986).
Centrosomes and theoretical spatial distribution of microtubules in animal cells.
Trens Biochem. Sci.,11, 460-463.

Karsenti, E. et Maro, B. (1988).
Centrosomes and the spatial distribution of microtubules in animal cells.
Trends Biochem. Sci. 11, 460-463.

Kirschner, M. et Mitchison, T. (1986).
Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis.
Cell, 45, 329-342.

Kreis, T.E. et Birchmeier, W. (1980).
Stress fiber sarcomers of fibroblasts are contractile.
Cell, 22, 555-561.

Krishan, A. (1972).
Cytochalasin B. time-lapse cinematographic studies on its effects on cytokinesis.
J. Cell Biol., 54, 657-664.

Landau, J.V. (1960).
Sol-gel transformations in fibroblasts of embryonic chick heart tissue: a pressure-temperature study.
Exp. Cell Res., 21, 78-87.

Landau, J.V. et Peabody, R.A. (1963).
Endogenous adenosine triphosphate levels in human amnion cells during application of high hydrostatic pressure.
Exp. Cell Res., 29, 54-60.

Langanger, B.; Moeremans, M.; Daneels, G.; Sobieszek, A.; De Brabander, M. et Detry, J. (1986).
The molecular organization of myosis in stress fibers of cultured cells.
J. Cell. Biol., 102, 200-209.

Lasek, R.J. (1981).
The dynamic ordering of neuronal cytoskeletons.
In: Cytoskeletton and the nervous systems.
Neurosci. Res. Program. Bull., 19, 7-32.

Lazarides, E. et Weber, K. (1974).
Actin antibody : the specific visualization of actin filaments in non muscle cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 71, 2268-2272.

Lemasters, J.J.; Stemkowwski, C.J.; Sungchul, J.I. et Thurman, R.G. (1982).
Liver structure and function in hypoxia.
In: Protection of tissues against hypoxia, 15-30.

Lemasters, J.J.; DiGuiseppi, J.; Nieminen, A.-L. et Herman, B. (1987).
Blebbing, free ca2+ and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes.
Nature, 325, 78-81.

Lewis, R.E. et Granger, H.J. (1986).
Mediation of microvascular permeability.
Fed. Proc., 45, 109.

Luby-Phelps, K.; Taylor, D.L. et Lanny, F. (1986).
Probing the structure of the cytoplasm.
J. Cell. Biol., 102, 2015-2022.

Luft, J.H. (1971).
Ruthenium red and violet.
I. Chemistry purification methods of use for electron microscopy and mechanics of action.
II. Fine structural localization in animal tissues.
Anat. Rec., 171, 316-347.

Mac Cord, J.M. (1985).
Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury.
New Eng. J. Med.,310, (3), 159-163.

Mac Cord, J.M. (1987).
Oxygen derived radicals : a link between reperfusion injury and inflammation.
Fed. Proc.,46, 2402-2406.

Malorni, W., Iosi, F., Mirabelli, F. et Bellomo, G. (1988).
Oxidative stress and cytoskeletal alterations induced by menadione mechanisms of bleb formation in cultured cells.
Abstracts 4th Intern. Congress. Cell Biol., Montreal, pp. 427.

Marx, J.L. (1976).
Atherosclerosis : the cholesterol connection.
Science, 194, 711-755.

Massey, V.; Strickland, S.; Mayhew, S.G.; Howell, L.G., Engel P.G.; Matthews, R.G.; Schuman, M. et Sullivan, P.A. (1969).
The production of the superoxide anion radicals in the reaction of reduced flavine and flavoproteins with molecular oxygen.
Biochem. Biophys. Res. Comm.,36, 891-897.

Maupin-Szamier, P et Pollar, T.D. (1978)
Actine filament destruction by osmiun tetroxide
J.Cell.Biol., 77,837-851

Meek, W.D., (1976)
A scanning (SEM) and transmission electron microscopy study of the Wish cell lane.
Anat. Record, 184, 477 (abstract)

Miranda, A.F.; Godman, G.; Deitch,A.D. et Tanenbaum, S.W. (1974).
Action of cytochalasin D on cells of established lines.
J. cell Biol., 61, 481-500.

Mitchison, T. et Kirschner, M. (1984).
Dynamic instability of microtubules growth.
Nature, 312, 237-242.

Mustafa, M.G.et Tierney, D.F.(1978).
Biochemical and metabolic changes in the lung with oxygen ozone and nitrogen dioxide toxicity.
Am. Rev. Res. Dis., 118, 1061-1090.

Nicotera, P.; Hartzell, P.; Davis, G. et Orrenius, S. (1986).
The formation of plasma membrane blebs in hepatocytes exposed to agents that increase cytosolic Ca2+ is mediated by the activation of a non-lysosomal proteolytic system.
FEBS Lett., 209, 139-144.

Nicotera, P.L.; Thor, H. et Orrenius, S. (1989).
Cytosolic-free calcium and all killing in hepatoma 1c1c7 cells. exposed to chemical anoxia.
FASEB J., 3, 59-64.

Niwa, Y, Miyake, S., Sakane, T.,Shingu, M. et Yokoyama, M. (1982)
Auto-oxidative damage in behçet's disease-Endothelial cell damage following the elevated oxygen radicals generated by stimulated neutrophils
Clin.Exp.Immunol., 49, 247-255

Noronha-Dutra, A.A.; Steen-Dutra, E.M. et Woolf, N. (1988).
Epinephrine-Induced Cytotoxicity of rat plasma : its effects on isolated cardiac myocytes.
Lab. invest., 59, 817-823.

Ody, C. et Junod, A.F. (1985).
Direct toxic effects of paraquat and oxygen on cultured endothelial cells.
Lab.Invest., 52, (1), 77-84.

Olmsted, J.B. (1986).
Micotubule-associated proteins.
Ann. Rev. Cell Biol., 2, 421-457.

Oppenheim, D.S.; Hauschka, B.T. et McIntosh, J.R. (1973).
Anaphase motions in dilute colchicine. Evidence of two phases in chromosome segregation.
Exp. Cell Res., 79, 95-105.

Phillips, P.G.; Higgins, P.J.; Malik, A.B. et Tsan, M.-F. (1988).
Effect of hyperoxia on the cytoarchitecture of cultured endothelial cells.
Am. J. Pathol., 132, 59-72.

Poumay, Y. (1988).
Contribution à l'étude de l'athérogenèse. Effets des dérivés actifs de l'oxygène sur l'endocytose spécifique des lipoprotéines de faible densité par les cellulzes endothéliales humaines en culture.
Thèse de doctorat. FUNDP, Namur.

Porter, K.R.; Todaro, G.J. et Fonte, V. (1973).
A scanning electron microscope study of surface features of viral and spontaneous transformants of mouse BalB/3T3 cells.
J. Cell Biol., 59, 633-642.

Price, Z.H. (1967).
The micromorphology of zeiotic blebs in cultured human epithelial (HEp) cells.
Exp. Cell Res., 48, 82-92.

Raes, M. (1983)
Culture de fibroblastes de hamster doré comme nouveau modèle de vieillissement. Importance du cytosquelette dans ce modèle
Thèse de doctorat, F.N.D.P. Namur

Reaven, E.P. et Axline, S.G. (1973).
Subplasmalemmal microfilaments and microtubules in resting and phagocytizing cultivated macrophages.
J. Cell Biol., 59, 12-27.

Robbins, E. et Gonatas, N.K. (1964).
The ultastructure of a mammalian cell during the mitotic cycle.
J. Cell Biol., 21, 429-442.

Rokitansky, C.V. (1852).
Handb. Patholog. Anatomia.
Bd II : Hand. speciell Path. Anat. Teil I.
1. Auflage 1844 S534. Auflage 1856 S306.
Wien : Braumüller und Seidel.

Rosen, G.M. et Freeman, B.A. (1984).
Superoxide generated by endothelial cells.
Proc. Ntl. Acad. Sci. USA., 81, 726.

Ross, R. et Glomset, J.A. (1976).
The pathogenesis of atherosclerosis.
New Engl. J. Med., 295, 369-377 et 420-425.

Ryan, U.S. et Vann, J.M. (1988).
Endothelial cells: a source and target of oxidant damage.
In : Oxygen radical in biology and medecine. Basic life Sciences, vol. 49 (Simic, M.G. Taylort, K.A., Ward, J.F. et Von Sonntag, C.; eds); 963-968.

Sammak, P.J. et Borisy, G.G. (1988).
Direct observation of microtubules dynamics in living cells.
Nature, 332, 724-726.

Savion, N.; Vlodavsky, I.; Greenburg, G. et Gospodarowicz, D. (1982).
Synthesis and distribution of cytoskeletal elements in endothelial cells as a function of cell growth and organisation.
J. Cell. Physiol., 110, 129.

Schiff, P.B.; Fant, J. et Horwitz, S.B. (1979).
Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol.
Nature, 277, 665-667.

Shasby, D.M., Shasby, S.S., Sullivan, J.M. et Peach, M.J.(1982)
Role of endothelial cell cytosqueleton in contrôle of endothelial permeability
Circ.Res., 51, 657-661

Steinberg, D. (1987).
Lipoproteins and the pathogenesis of atherosclerosis.
Circulation, 76, 508-514.

Steinberg, D. (1987).
Lipoproteins and atherosclerosis : some unanswered questions.
Am. Heart J., 113, 626-632.

Stirpe, F.; Della Corte, E. (1969)
The regulation of rat xanthine oxidase. Conversion *in vitro* of the enzyme from deshydrogenase (type D) to oxidase (type O).
J. Chem. Biol., 244, 3855-3863.

Suttorp, N; Toepper, W. et Roka, L. (1986).
Antioxidant defense mechanism of endothelial cells : glutathione redox cycle versus catalase.
Am. J. Physiol., 251, C 671-C 680.

Thibaut-Vercruyssen, R.; Poumay, Y. et Ronveaux-Dupal, M.-F. (1988).
Ultrastructural study of the effects of incubation in an oxygen free radicals. Producing medium on the general morphology and on the endocytosis of low density lipoproteins by human endothelial cells in culture.
Abstract of the 8 th international symposium on atherosclerosis. Biology of arterial Wall., Siena, .

Thorgeirsson, G.(1983).
Structure and morphological fractures of vascular endothelium.
In: Biochemical Interactions at the Endothelium.
Ed. Cryer, A. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 5-39.

Tsan, M-F; Danis, E.H., Del Vecchio, P.J. et Rosana, C.L. (1985).
Enhancement of intracellular glutathion protects endothelial cells against oxidant damage.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 127, 270-276.

Toussaint, O. (1988).
Effet des agents enzymatiques antioxydants dans les cellules endothéliales.
Mémoire de licence. FUNDP, Namur.

Ullrich, V. et Diehl, H. (1971).
Uncoupling of monooxygenation and electron transport by fluorocarbons in liver microsomes.
Europ. J. Biochem., 20, 509-512.

Virchow, R. (1856).
Phlogose und thrombose im Gefaßsystem.
in: Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medicin. p 458, Meidinger Sohn & Co, Frankfurt.

Virtanen,I.; Lehto, V.-P. et Lehtonen, E. (1980).
Organization of intermediate filaments in cultured fibroblasts upon disruption of microtubules by cold treatement.
Eur. J. Cell Biol., 23, 80-84.

Weber, K. et Osborn, M. (1985).
Les molécules de la matrice cellulaire.
Pour la Science, 98, 80-92.

Wechezak, A.R.; Wight, T.N.; Viggers, R.F. et Sauvage, L.R. (1989).
Endothelial adherence under shear stress is dependent upon microfilament reorganisation.
J. Cellul. Physiol., 139, 136-146.

Weibel, E.R. et Palade, G.E. (1964).
New cytoplasmic components in arterial endothelia.
J. Cell Biol., 23, 101-112.

Weinberg, K.S.; Douglas, W.H.J.; MacNammee, D.R.; Lanzillo, J.J. et Fanburg, B.L. (1982).
In Vitro, 18, 400-406.

Welsh, M.J.; Shasby, M. et Husted, R.M. (1985).
Oxidants increase paracellular permeability in a cultured epithelial cell line.
J. Clin. Invest., 76, 1155-1168.

Wolosenick, J.J. et Porter, K.R. (1979).
Microtrabecular lattice of the cytoplasmic ground substance : artefect or reality.
J. Cell. Biol., 82, 114-139.

Wong, M.K. et Gotlieb. (1984).
Endothelial cell monolayer integrity.
Artero Sclerosis., 6, 212-219.

Wulf, E.; Deboben, A.; Bautz, F.A.; Faulstich, H. et Wieland, T. (1979).
Fluorescent phallotoxin, a tool for the visualization of cellular actin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4498-4502.

Wysolmerski, R.B. and Lagunoff, D. (1988).
Inhibition of endothelial cell retraction by ATP depletion.
Am. J. Pathol., 132, juin 88.

Yanagisawa, M.; Kurihara, H.; kimura, S.; Tomobe, Y.; kobayashi, M.; Mitsui, Y.; Yazaki, Y.; Gto, K. et Masaki, T. (1988).
A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells.
Nature, 332, 411-415.

Zweier, J.L., Kuppusamy, P. et Lutty, G.A. (1988)
Measurement of endothelial cell free radical generation : evidence for a central mechanism of free radical injury in post ischemic tissues.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 85, 4046-4050.