



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Étude comparative de l'effet de l'hypoxie sur les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales dans un modèle in vitro

De Leener, Frédéric

Award date:
1992

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.

**Etude comparative de l'effet de l'hypoxie sur les
cellules musculaires lisses et les cellules
endothéliales dans un modèle *in vitro*.**

DE LEENER Frédéric

Résumé

Lors de pathologies veineuses telles que les varices, la paroi vasculaire subit un réarrangement global. Si l'endothélium reste intact, les cellules musculaires lisses passent d'un état contractile à un état synthétique leur permettant de proliférer, ceci constitue l'altération la plus importante observée dans ces pathologies.

Nous avons étudié les effets de l'hypoxie sur les cellules musculaires lisses (CML) en comparaison à ceux décrits pour les cellules endothéliales (CE). Nous avons montré que les CML sont plus résistantes que les CE du point de vue de leur viabilité. Nous avons également remarqué que la concentration en calcium libre dans le cytosol augmente chez les CML ayant subi une hypoxie. Par contre, ni la phospholipase A₂ ni la synthèse des prostaglandines ne sont spécifiquement activées par l'hypoxie chez les CML comme elles le sont chez les CE.

Nous avons également observé que les prostaglandines, et surtout la PGF₂ α , synthétisées par les CE activées par l'hypoxie étaient responsables d'une augmentation de la prolifération des CML. Cet effet pourrait expliquer la prolifération des CML apparaissant dans les parois vasculaires lors de varices comme étant une conséquence de l'activation des CE par l'hypoxie.

Il est évident que ce travail possède des implications physiologiques très importantes puisque l'on a montré que l'ischémie pouvait, via une activation des CE, induire la prolifération des CML.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques (Zoologiques)

Décembre 1992

Promoteur : Professeur J. Remacle

Pour mon premier grand rôle, je tiens à remercier tous ceux et celles qui m'ont aidé tout au long de cette année.

Mes premiers remerciements vont au Professeur J. Remacle, qui a bien voulu m'ouvrir les portes de son théâtre, à l'homme de métier qu'il est et à ses pertinents conseils lors des répétitions.

Je remercie ensuite Madame C. Bille-Michiels qui a été mon metteur en scène. Elle a accompli un travail prodigieux. Je la remercie plus particulièrement pour ses connaissances et son aide de tout moment. Sa disponibilité, sa compétence et sa volonté au travail m'ont grandi.

Merci également à Madame M. Raes, notre souffleuse. Elle a toujours su donner la meilleure interprétation des choses.

Un grand coup de chapeau à la technique. J'entends par là Madame A. Houbion, Monsieur E. Delaive et Marc Dieu. Ils m'ont fait profiter de toutes leurs expériences grâce à des conseils enrichissants.

Grand merci à Thierry Arnould dont j'ai suivi les traces. Son savoir et sa complicité furent un précieux atout lors de mon travail de scène. Merci à toi.

Je pense également à toutes les personnes qui ont contribué à la bonne humeur permanente sur le plateau. Je commencerai tout d'abord par les aînés qui n'ont jamais hésité à venir à mon secours : merci à Dédé, Bobo, Olivier, Isabelle A. et K., Nathalie, Maggy, Pierre, Benoît, Sylvianne et Dominique.

Merci aux filles, qui comme moi, étaient novices dans le métier cette année. Je pense à Frédérique, Véronique, et plus particulièrement à mes voisines de loges, Barbara, Patsy, Marie etMumu qui ont dû, parfois, supporter mes sauts d'humeur.

Enfin, je voudrais spécialement remercier Madame L. Godin et Madame M-T. Godin, ma grand-mère et ma mère, sans qui je n'aurais jamais pu vivre cette passion.

Les trois coups résonnent,..... le spectacle commence.

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION

1.1. LES VAISSEAUX SANGUINS.....	2
1.1.1. L'APPAREIL VASCULAIRE	2
1.1.2. LES DIFFERENTES PROPRIETES DE LA PAROI VASCULAIRE	3
1.1.2.1. LES PHENOMENES D'ECHANGES	
1.1.2.2. LES PHENOMENES MECANQUES	
1.1.3. LA MORPHOLOGIE DE LA PAROI VEINEUSE	6
1.1.4. LA CELLULE ENDOTHELIAL	9
1.1.4.1. LES CARACTERISTIQUES CYTOLOGIQUES	
1.1.4.2. L'ENDOTHELIUM EN TANT QUE MACHINE DE SYNTHESE	
1.1.5. LA CELLULE MUSCULAIRE LISSE	20
1.1.5.1. LES CARACTERISTIQUES CYTOLOGIQUES	
1.1.5.1.1. Le phénotype des cellules musculaires lisses <i>in vivo</i> .	
1.1.5.1.2. Le phénotype des cellules musculaires lisses <i>in vitro</i> .	
1.1.5.2. LA MODULATION PHENOTYPIQUE	
1.2. LES PATHOLOGIES VEINEUSES.....	27
1.2.1. L'ISCHEMIE	27
1.2.1.1. LES ALTERATIONS DU METABOLISME ENERGETIQUE	
1.2.1.2. LES ALTERATIONS MEMBRANAIRES	
1.2.1.3. LES CONSEQUENCES DES RADICAUX LIBRES DERIVES DE L'OXYGENE	
1.2.1.5. LE POINT DE NON-RETOUR	
1.2.2. LES VARICES	32
1.2.2.1. LES DIFFERENTES CARACTERISTIQUES DE LA PAROI VARIQUEUSE	
1.3. BUT DU MEMOIRE.....	36

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. LES CELLULES ENDOTHELIALES.....	38
2.1.1. MISE EN CULTURE DE CELLULES ENDOTHELIALES DE LA VEINE OMBILICALE HUMAINE	38
2.1.2. REPIQUAGE DES CELLULES ENDOTHELIALES	39
2.2. LES CELLULES MUSCULAIRES LISSES.....	40
2.2.1. REPIQUAGE DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES	40
2.3. MODELE IN VITRO D'HYPOXIE-REOXYGENATION.....	41
2.3.1. MODELE OPERATOIRE	41
2.3.2. ESTIMATION DE LA VIABILITE CELLULAIRE	42
2.4. DOSAGE DU CALCIUM LIBRE PAR LA SONDE FURA-2.....	43
2.4.1. CHARGEMENT DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES AVEC LE FURA-2 AM	44
2.4.1.1. PRINCIPE	
2.4.1.2. CONSERVATION DU FURA-2	
2.4.1.3. CHARGEMENT DES CML AVEC LE FURA-2 AM	
2.4.1.4. HYPOXIE DES CML CHARGEES	
2.4.2. MESURE SPECTROFLUORIMETRIQUE DE LA CONCENTRATION EN CALCIUM INTRACELLULAIRE	46
2.4.2.1. PRINCIPE	
2.4.2.2. METHODE DE CALCUL DE LA CONCENTRATION EN CALCIUM	
2.5. MESURE DE LA LIBERATION D'ACIDE ARACHIDONIQUE ([³H]-AA) ET D'ACIDE STEARIQUE ([¹⁴C]-AS) RADIOACTIF.....	48
2.5.1. PRINCIPE	48
2.5.3. MATERIEL	48
2.5.4. METHODE	48

2.6. DOSAGE DES PROSTAGLANDINES EN GC-MS.....	49
2.6.1. SOLUTIONS	49
2.6.2. METHODE	50
2.6.2.1. EXTRACTION DES PROSTAGLANDINES	
2.6.2.1. DERIVATISATION DES PROSTAGLANDINES	
2.6.2.3. DETECTION ET LA QUANTIFICATION DES PROSTAGLANDINES PAR CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE COUPLEE A UN SPECTROMETRE DE MASSE (GC-MS)	
2.7. IMMUNOFLUORESCENCE.....	53
2.7.1. REPIQUAGE	53
2.7.2. MODE OPERATOIRE	53
2.8. MESURE DE L'EFFET DES SURNAGEANTS DE CELLULES ENDOTHELIALES SUR LA PROLIFERATION DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES.....	54
2.8.1. MATERIEL	55
2.8.2. METHODE	55
2.9. ANALYSE STATISTIQUE.....	56

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. EFFET DE L'HYPOXIE SUR LES CELLULES MUSCULAIRES LISSES.....	57
3.1.1. ESTIMATION DE LA VIABILITE DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES APRES DIFFERENTS TEMPS D'HYPOXIE	58
3.1.2. EFFET DE LA REOXYGENATION SUR LA PROLIFERATION DES CELLULES MUSCULAIRES	60
3.1.3. DOSAGE DE LA CONCENTRATION EN CALCIUM INTRACELLULAIRE	61
3.1.4. MESURE DE L'ACTIVITE DE LA PHOSPHOLIPASE A ₂ ET DE LA SYNTHESE DES PROSTAGLANDINES	65
3.1.5. EFFET DE L'HYPOXIE SUR LE CYTOSQUELETTE DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES	69
3.1.6. DISCUSSION	71
3.2. EFFET DES SURNAGEANTS DE CELLULES ENDOTHELIALES SUR LES CELLULES MUSCULAIRES LISSES.....	73
3.2.1. EFFET PRO-PROLIFERATIF DES SURNAGEANTS DE CELLULES ENDOTHELIALES	74
3.2.2. EFFET D'INHIBITEURS SUR LA PROLIFERATION DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES	75
3.2.3. EFFET DES PROSTAGLANDINES SUR LA PROLIFERATION DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES	77
3.2.4. DISCUSSION	78

4. CONCLUSION

5. BIBLIOGRAPHIE

Liste des abréviations

AA :	Acide arachidonique
[³ H]-AA :	Acide arachidonique marqué au tritium
AS :	Acide stéarique
[¹⁴ C]-AS :	Acide stéarique marqué au carbone 14
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ATP :	Adénosine triphosphate
Ca ²⁺ :	Ion calcium
[Ca ²⁺] _i :	Concentration en calcium libre intracytoplasmique
CE :	Cellule endothéliale
CML :	Cellule musculaire lisse
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
Dulbecco :	Dulbecco's modified eagle medium
EDGF :	Endothelial-derived growth factor
EDRF :	Endothelial-derived relaxing growth
EDTA :	Acide éthylènedinitrilotétraacétique
EGF :	Epidermal growth factor
ET-1 :	Endothéline
FGF :	Fibroblast growth factor
GC-MS :	Chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse
HBMF :	Heparin-binding growth factor-1
HBSS :	Hank's balanced salt solution
HETE :	Acide hydroxyéicosatétraénoïque
HLA :	Hydrolysate de lactalbumine
IGF-1 :	Insulin like growth factor-1
IL-1 :	Interleukine 1
IL-6 :	Interleukine 6
LT :	Leukotriène
O ₂ :	Molécule d'oxygène
PAF :	Platelet-activating factor
PBS :	Phosphate buffer saline

PDGF :	Platelet-derived growth factor
PG :	Prostaglandine
PGD ₂ :	Prostaglandine D ₂
PGE ₁ :	Prostaglandine E ₁
PGE ₂ :	Prostaglandine E ₂
PGF ₂ α :	Prostaglandine F ₂ α
PGI ₂ :	Prostaglandine I ₂
6-céto-PGF ₁ α :	6-céto prostaglandine F ₁ α
PKC :	Protéine kinase C
PLA ₂ :	Phospholipase A ₂
PO ₂ :	Pression partielle en oxygène
S :	10% de sérum de veau foetal
TXA ₂ :	Thromboxane A ₂

1. INTRODUCTION

De nombreuses pathologies veineuses constituent une cause importante de mortalité et de morbidité dans nos pays industrialisés. L'ischémie résultant d'une occlusion, d'un traumatisme ou d'un simple rétrécissement de la lumière d'un vaisseau et les processus qui en découlent interfèrent avec les fonctions des différents types cellulaires au niveau des vaisseaux sanguins. La paroi vasculaire n'est pas simplement un décor, un squelette cellulaire, mais aussi une machinerie biochimique où chaque constituant a son rôle propre. Les cellules endothéliales à l'interface sang-tissu sont en contact direct avec les éléments du sang et elles sont en interaction continue avec les cellules musculaires lisses. Ces cellules endothéliales constituent une barrière à perméabilité sélective indispensable à l'intégrité des tissus. Si un phénomène comme l'ischémie se déroule dans une veine, un arrêt ou une diminution de la circulation sanguine provoque le déclenchement de modifications structurelles et fonctionnelles indésirables au niveau de la paroi vasculaire et du tissu affecté. On comprend mieux pourquoi une étude plus approfondie de ces modifications cellulaires et moléculaires, grâce à un modèle *in vitro*, devient nécessaire pour une meilleure compréhension des maladies veineuses telles que le varices.

L'introduction de ce mémoire se compose de deux parties :

- Dans un premier temps, on se familiarisera avec les vaisseaux sanguins en tant qu'unités structurelles et fonctionnelles. Nous étudierons le rôle de la cellule endothéliale, acteur principal. Nous nous focaliserons ensuite sur une analyse approfondie des cellules musculaires lisses et de leurs interactions avec les cellules endothéliales.

- Après cette étude du fonctionnement normal de la paroi vasculaire, nous caractériserons les pathologies veineuses, en particulier les varices. On définira également les problèmes cellulaires liés à une ischémie *in vivo*. Un modèle *in vitro* sera aussi développé en mettant en évidence les modifications cellulaires suite à une hypoxie. Pour terminer, nous citerons les principales substances activatrices ou inhibitrices de la migration et de la prolifération des cellules musculaires lisses à la suite d'interactions cellulaires lors de phénomènes pathologiques.

1.1. LES VAISSEAUX SANGUINS

Les vaisseaux sanguins constituent le système vasculaire qui a pour origine embryologique le mésoblaste intra-embryonnaire. C'est un vaste réseau de tubes, disposé en circuit fermé, à l'intérieur duquel circule le sang, essence de la vie. Chaque vaisseau est constitué d'une paroi vasculaire comprenant différents types cellulaires organisés en plusieurs couches. Cette paroi n'est pas seulement un décor, c'est également un lieu d'échanges indispensables pour la vie. Chaque cellule vasculaire a son propre rôle avec ses propriétés intrinsèques. Outre leur rôle de soutien, ces cellules élaborent et sécrètent des constituants macro-moléculaires qui sont nécessaires pour conférer à la paroi les propriétés physiques et chimiques qui lui sont propres. Nous montrerons comment ces substances interagissent avec les cellules des vaisseaux sanguins après les avoir décrites.

1.1.1. L'APPAREIL VASCULAIRE

L'appareil vasculaire comporte différents éléments : le cœur et les vaisseaux sanguins c'est-à-dire les artères, les capillaires et les veines. C'est au niveau des capillaires que se font la majorité des échanges entre le sang et les tissus. Les artères et les veines sont avant tout des voies de transport rapide. Les artères conduisent le sang du cœur au capillaires qui irriguent les tissus. Les veines, elles, ramènent le sang au cœur qui joue le rôle de pompe-moteur. Notons que les transitions entre les artères-capillaires-veines sont rarement nettes au point de vue histologique et fonctionnel. De plus ces différents territoires vasculaires bien qu'ayant chacun des aspects spécifiques, présentent des caractéristiques morphologiques, biochimiques et même fonctionnelles communes.

Nous devons distinguer du point de vue fonctionnel deux types de circulations. La circulation pulmonaire permet les échanges entre l'air et le sang afin qu'il s'enrichisse en oxygène et qu'il élimine le gaz carbonique. La circulation systémique permet en premier lieu de distribuer le sang riche en oxygène à l'ensemble des tissus et en second lieu, par l'intermédiaire du système veineux, de ramener au

coeur du sang désaturé en oxygène et riche en CO₂ et autres déchets (Maillet and Chiarasini, 1985). C'est sur cette circulation que nos études se portent.

Le réseau sanguin est donc organisé de façon à apporter aux constituants des différents organes les aliments qui leur sont nécessaires et d'assurer l'élimination des déchets. Ces opérations sont rendues possibles grâce à la perméabilité de l'endothélium vasculaire et à la diffusion aisée au niveau de la membrane basale et de la matrice extra-cellulaire. Chaque type de vaisseau, suivant sa localisation, doit permettre la diffusion de substances depuis le sang vers les tissus et vice versa, et avoir une élasticité suffisante pour répondre aux déformations qui lui sont imposées par le flux sanguin. Pour comprendre mieux ces rôles des vaisseaux sanguins, nous analyserons leurs fonctions et leur morphologie.

Nous ne rentrerons pas dans une description poussée de tous les vaisseaux sanguins. Nous nous arrêterons spécialement sur le système veineux. La veine étant l'endroit de la pathologie étudiée, elle sera décrite plus en détail.

1.1.2. LES DIFFERENTES PROPRIETES DE LA PAROI VASCULAIRE

L'arbre vasculaire présente une unité parfaite dans la composition des cellules que l'on y trouve : les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. C'est la présence de ces cellules tout au long du système cardiovasculaire qui semble gouverner les caractéristiques chimiques des constituants macromoléculaires de la paroi. Ce sont précisément ces constituants qui sont responsables des propriétés mécaniques et physiques de celles-ci.

Nous développerons les caractéristiques générales de la paroi vasculaire, en rapport avec ses propriétés dans les échanges entre le sang et les tissus et dans l'écoulement sanguin. Les fonctions spécifiques des deux types cellulaires seront présentées lorsque nous décrirons ceux-ci.

1.1.2.1. LES PHENOMENES D'ECHANGES :

La raison d'être du système vasculaire est de permettre des échanges continus de molécules entre le sang et les organes. Ces phénomènes se déroulent d'un bout à l'autre de l'arbre vasculaire et plus particulièrement dans les capillaires, zones où le flux est ralenti.

Cette fonction est assurée par *l'endothélium* et *la membrane basale* (Caen, 1987). De part sa localisation, l'endothélium joue le rôle de barrière sélective qui régule les transferts de substances de poids moléculaire varié, tandis que la lame basale constitue un tamis moléculaire.

L'endothélium est constitué de cellules endothéliales qui sont en contiguïté les unes avec les autres grâce à des liens : tight junction et gap junction. Notons que ces jonctions sont beaucoup plus lâches dans les veines. Pour les substances dont la taille moléculaire ne dépasse pas 2 nm, des échanges trans-endothéliaux permettent la diffusion de l'eau, des gaz et autres petites molécules. En outre un système de pores, qui résultent de la fusion de vésicules d'endocytose entre elles, permet le passage de substances plus grosses, comme certains peptides et protéines plasmatiques. Cependant leur passage est relativement lent. Les molécules dépassant un diamètre de 70 nm ne passent pas, sauf en cas de déendothélialisation (Caen, 1987).

La membrane basale a deux fonctions essentielles : une fonction de tamis permettant une filtration sélective et un rôle d'encrage des éléments cellulaires à la charpente fibrillaire de la matrice extracellulaire sous-endothéliale. La lame basale contrôle donc l'accès de substances dans les cellules des couches sous-jacentes. Elle filtre les molécules d'après leur taille et d'après leur charge. Ceci est dû à la fois à sa structure et à sa composition. Cette membrane se présente en réseau tridimensionnelle de nature poreuse tout à fait caractéristique. Cette structure particulière est largement due à la présence de collagène de type IV et à l'existence de sites anioniques. Ces charges sont portées d'une part par les protéoglycanes riches en héparan sulfate et d'autre part par des glycoprotéines riches en acide sialique (Caen, 1987).

1.1.2.2. LES PHENOMENES MECANQUES :

Les propriétés mécaniques de la paroi vasculaire concernent l'élasticité et la contractilité nécessaires à l'écoulement sanguin.

L'ELASTICITE

L'élasticité est assurée par l'élastine, composant majeur des lames et des fibres élastiques, et par les fibres de collagène. Leur proportion relative varie d'un bout à l'autre du système vasculaire. Plus on s'éloigne du coeur, plus la quantité de collagène augmente. Ces deux macromolécules sont présentes dans tous les types de vaisseaux hormis les capillaires. Les différents types de collagène et leur localisation dans la paroi seront vus plus tard quand nous étudierons la matrice extracellulaire.

Pour expliquer les propriétés mécaniques de l'élastine et du collagène, plusieurs facteurs sont à considérer (Caen 1987):

1) Glissements des molécules dans les fibrilles, des fibrilles dans les fibres, des fibres dans les tissus. Ces glissements sont limités du fait des associations que forment ces deux types moléculaires avec les autres constituants de la matrice extracellulaire.

2) Structure semi-rigide due aux liaisons intermoléculaires et aux forces de friction s'établissant lors des étirements des fibres.

3) Propriété des protéines contractiles des cellules musculaires lisses, dont le mécanisme est résumé ci-dessous.

LA CONTRACTILITE

C'est la couche composée des cellules musculaires, la média, qui assure à la paroi sa contractilité. Ces cellules sont capables de se contracter et de se relâcher suivant un mécanisme identique à celui qui caractérise les muscles squelettiques. Ce mécanisme parfaitement régulé est dû au glissement des filaments minces (actine et tropmyosine) et épais (myosine) les uns sur les autres. La régulation est assurée par des phénomènes de phosphorylation intervenant au niveau de chaîne légère de la myosine sous l'effet d'une enzyme phosphorylante (Alberts *et al*, 1983). Cette enzyme

est activée par des ions calcium et par la calmoduline servant à lier le calcium. Une augmentation de la perméabilité de la membrane cellulaire pour le calcium entraîne une augmentation du calcium intracellulaire déclenchant une contraction de celle-ci. Et inversement, le relâchement de la cellule est dû à une sortie de calcium vers le milieu extracellulaire. Il faut également savoir que le calcium peut être séquestré dans les cellules musculaires lisses, au niveau d'organes de stockage et qu'il est un messager secondaire intracellulaire essentiel (Caen, 1987). Il participe en effet à beaucoup de réactions enzymatiques et de nombreuses voies métaboliques qui seront énumérées au point 1.1.4. et 1.1.5.

Les propriétés mécaniques de la paroi vasculaire sont donc la résultante de son élasticité et de sa contractilité. Ces facteurs sont directement liés à l'organisation des cellules et des macromolécules qui constituent la structure de la paroi que nous allons décrire dans le paragraphe suivant.

1.1.3. LA MORPHOLOGIE DE LA PAROI VEINEUSE

Dans le système veineux, la paroi vasculaire est organisée de telle sorte qu'elle permet le retour du sang vers le coeur. Le flux sanguin est alors à pression réduite. La paroi doit donc effectuer des phénomènes de contraction-dilatation pour assurer de façon contrôlée le retour du sang. Les valvules présentes à l'intérieur des veines y sont pour quelque chose. Pour certains cependant, elles sont considérées comme les restes en régression d'un système chez l'embryon. Les valvules sont propres aux veines. Elles sont constituées par les replis endothéliaux de l'intima et sont disposées en paires, avec la concavité dirigée vers le coeur. La remontée de la colonne sanguine est réalisée par les contractions des fibres musculaires lisses de la paroi veineuse.

Les veines et les veinules comportent, comme les artères et les artérioles, trois tuniques classiques (Maillet and Chiarasini, 1985) : nous trouvons, de la lumière vers la périphérie, l'intima, la média et l'adventice, souvent mal individualisées dans les veines par rapport aux artères et artérioles. Elles diffèrent des artères d'une part par leur calibre plus large, et d'autre part par le fait que leurs constituants élastiques et musculaires sont beaucoup moins développés. Leur paroi est donc plus mince, moins rigide -dotée d'une plasticité plus grande- et puisqu'on y trouve un tissu musculo-élastique peu développé, le tissu conjonctif est plus abondant.

Cette structure est fonction de la pression plus faible qui y règne. Il existe bien sûr une grande variabilité dépendante des conditions circulatoires locales.

Décrivons les trois tuniques de la paroi veineuse (Caen, 1987).

-L'*intima* est composée de la membrane basale et d'une mince couche unicellulaire, les cellules endothéliales décrites plus en détail au point 2.4., dont les replis forment des valvules. Les valvules forment une structure qui, en s'opposant au reflux sanguin, facilite le retour du sang. Vu leur localisation à l'interface entre le sang d'une part, la paroi vasculaire et les tissus interstitiels voisins d'autre part, les cellules endothéliales jouent un rôle essentiel dans le bon fonctionnement des vaisseaux sanguins. L'épaisseur de l'intima est généralement faible.

-La *média* est constituée de cellules musculaires lisses (point 1.1.5.), disposées de façon concentrique, et de la matrice extra-cellulaire constituée de fibres d'élastine incluses dans une substance riche en protéoglycanes et en glycoprotéines, séparées par des fibres de collagène. Cette couche du vaisseau est impliquée dans les phénomènes de contraction et de dilatation vasculaires. Les cellules musculaires lisses sont importantes à double titre : en premier lieu, du fait même de leur implication dans les propriétés mécaniques de la paroi, ensuite pour leur activité de synthèse. Les cellules musculaires lisses commencent surtout à apparaître lorsque le diamètre veineux augmente en taille. Elles forment alors une couche concentrique continue autour de la zone intimale et synthétisent des fibres de la matrice.

-L'*adventice*, la couche la plus éloignée du sang, comprend d'épaisses fibres de collagène ordonnées longitudinalement. Le tissu conjonctif a une capacité de soutien qui lui permet de résister à la pression hydrostatique. Il est lâche pour adapter en permanence le calibre du vaisseau aux variations du débit cardiaque. Le principal type de cellules qu'on y rencontre est le fibroblaste, cellule capable de synthétiser tous les éléments constitutifs du tissu conjonctif. Son rôle est double : d'une part attacher le vaisseau aux tissus voisins, et d'autre part, limiter les possibilités d'extension de l'ensemble de la paroi. Cette tunique est dans l'ensemble la couche la plus épaisse. Elle augmente au fur et à mesure que la veine s'élargit. L'*adventice* est, vu sa localisation, difficile à différencier des tissus environnants avec lesquels elle fusionne progressivement.

On classe habituellement les veines en quatre catégories (Maillet and Chiarasini, 1985).

-Les premiers types de veines qui apparaissent après le système capillaire sont des veines de petite taille, souvent appelées *veinules post-capillaires*. L'organisation en trois couches n'est pas observée immédiatement à la sortie du lit capillaire. En effet, les premières veinules qui résultent de la jonction de plusieurs capillaires ont dans l'ensemble une structure identique à celle des capillaires. Au fur et à mesure que la taille et le diamètre des veinules augmentent pour donner de petites veines, la structure des trois tuniques s'individualise. Elles sont pourvues d'un endothélium entouré par une mince couche conjonctivo-élastique sous-endothéliale et de cellules musculaires lisses circulaires dans les veinules à calibre plus grand.

-La seconde catégorie est représentée par *les veines musculaires*. Elles se situent plus spécialement dans les membres et les viscères. Ce type de veine est le plus souvent sujet aux pathologies variqueuses. On y reconnaît en général les trois tuniques. L'intima comporte un endothélium et une couche conjonctivo-élastique sous-endothéliale. La limitante élastique interne, présente dans les artères, est souvent inconstante et quand elle existe, elle apparaît formée par des renforcements irréguliers des éléments élastiques de la couche sous-endothéliale. La média pour sa part est caractérisée par une nette dominance du tissu conjonctif au sein du tissu conjonctivo-élastique. Enfin, l'adventice est généralement bien développée. On y observe la présence de vasa vasorum et de nervi vasorum.

-Les veines du cerveau et du cervelet sont caractérisées par du tissu fibreux, on les appelle *les veines fibreuses*. La division de la paroi en trois couches est illusoire et les éléments élastiques sont rares.

-Il existe également *les veines fibro-élastiques*. Le tissu conjonctif y est bien développé avec un très riche réseau de fibres élastiques. Par contre les cellules musculaires lisses y sont rares.

Dans la lumière des vaisseaux sanguins circule le sang. Il conduit dans tout l'organisme les éléments nutritifs et aussi les éléments pathogènes. Les différentes cellules sanguines sont perpétuellement en contact avec la paroi des vaisseaux et plus particulièrement avec les cellules endothéliales. De nombreux phénomènes vasculaires impliquent *les polymorphonucléaires neutrophiles*. Ce type cellulaire est souvent en interaction avec l'endothélium. Ces cellules constituent 60 à 70% des leucocytes. Ils se développent dans la moelle osseuse et sont libérés ensuite dans la circulation. Le

cytoplasme des neutrophiles est abondant et comporte des granules. Ces granules sont entourées d'une membrane et sont divisées en deux groupes : les granules azurophiles contenant des hydrolases acides ainsi que la myéloperoxydase et les granules spécifiques contenant de la lactoferrine, de la collagénase, de la phosphatase alcaline,... (Junquera and Carneiro,1987).

L'activation des polymorphonucléaires est réalisée grâce au contact, via des récepteurs, d'un agent particulaire ou d'un activateur soluble avec la membrane de la cellule. Cela stimule toute une série de fonctions cellulaires telles que la phagocytose, la dégranulation, l'hyperactivité respiratoire et la libération de médiateurs de l'inflammation.

La paroi vasculaire est, comme nous l'avons vu, un décor organisé et fonctionnel. Elle comporte et synthétise tout un ensemble de constituants qui, dépassant leurs fonctions de soutien et de squelette moléculaire, sont des interlocuteurs des facteurs sanguins souvent en cause dans les pathologies veineuses. Pour mieux comprendre ce décor organisé de façon cohérente, nous allons développer une étude plus approfondie de deux types cellulaires de la paroi vasculaire : les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses sur lesquelles nous avons travaillé cette année. Cette analyse moléculaire nous permettra aussi de mieux cibler les interactions entre ces cellules.

1.1.4. LA CELLULE ENDOTHELIALE

Les cellules endothéliales tapissent en une monocouche cellulaire l'intérieur de tous les vaisseaux. Cette monocouche aplatie et uniforme est une véritable mosaïque de cellules polygonales, allongées et orientées parallèlement à la direction du flux sanguin (Herman *et al*, 1987). Cette assise unicellulaire forme l'endothélium vasculaire qui est l'épithélium simple le plus répandu de tout l'organisme. Sa localisation à l'interface entre le sang circulant d'une part, la paroi vasculaire et les tissus interstitiels voisins d'autre part, implique des propriétés structurelles et fonctionnelles spécialisées.

La barrière endothéliale possède au moins deux fonctions vitales qui sont liées au fait que ces cellules sont en contact très étroit les unes avec les autres : la

perméabilité sélective aux macromolécules, déjà discutée au paragraphe 2.2., et la propriété de thromborésistance, c'est-à-dire sa non-réactivité à l'état normal avec les plaquettes, les leucocytes et le système de la coagulation (Thorgeirsson, 1983; Ross, 1981). Par ailleurs, l'endothélium est un tissu métaboliquement actif. Les substances synthétisées et secrétées par les cellules endothéliales peuvent avoir de nombreux effets locaux. Ces cellules élaborent, entre autres, les principaux constituants de la matrice extracellulaire et de la membrane basale.

Vu ses nombreux rôles, on comprend aisément que des modifications dans la structure ou dans les fonctions de la monocouche endothéliale contribuent à la genèse de processus pathologiques (Thorgeirsson, 1983).

Nous étudierons leurs caractéristiques morphologiques, les substances qu'elles synthétisent et surtout leurs interactions avec les cellules musculaires lisses.

1.1.4.1. LES CARACTERISTIQUES CYTOLOGIQUES :

Au niveau phénotypique, la cellule endothéliale montre une très grande diversité. Les dimensions et la forme des cellules sont assez variables suivant leur localisation dans le système vasculaire (Thorgeirsson, 1983). Cependant plusieurs caractéristiques communes peuvent être décrites.

La surface des cellules endothéliales est entourée d'une enveloppe qui constitue le *glycocalyx*, riche en carbohydrates présents sous forme de protéoglycanes (héparan-sulfate en particulier), d'où émergent de nombreuses micro-villosités. L'héparan-sulfate, porteur de charges électro-négatives, joue un rôle important dans la propriété de thromborésistance de l'endothélium. Ce protéoglycan de surface a les mêmes caractéristiques que l'héparine (Ross, 1981; Herman *et al*, 1987). Mais la thromborésistance de l'endothélium n'est pas seulement due à l'héparine, d'autres molécules interviennent également (1.1.4.2.).

De nombreuses invaginations se forment à partir de la membrane, témoignant d'une intense activité, pouvant mener à la formation de vésicules de pinocytose. Ces phénomènes conduisent à l'internalisation des substances d'échange entre le sang et les tissus. Certains de ces phénomènes se font par un mode passif. Pour la plupart cependant les échanges se réalisent grâce à des mécanismes actifs :

endocytose et pinocytose. Tous ces mécanismes définissent la propriété de perméabilité sélective de l'endothélium. Notons également l'importance des jonctions intercellulaires dans le contrôle des échanges transendothéliaux.

La grande caractéristique morphologique des cellules endothéliales est la présence de corps appelés *corps de Weibel-Palade*. Ces granules ovoïdes sont un véritable critère pour la reconnaissance de la cellule endothéliale. C'est une inclusion intra-cytoplasmique composée d'un faisceau de tubules parallèles à l'axe du corps. Le tout est entouré d'une matrice dense et d'une membrane. Le corps de Weibel-Palade est probablement formé à partir du complexe de Golgi (Herman *et al*, 1987). Malheureusement on ne connaît pas son rôle, mais on admet qu'il stocke le *facteur de Von Willebrand* qui est une macro-molécule glycoprotéique participant à l'adhésion des plaquettes.

Les cellules endothéliales possèdent également, à l'intérieur de leur cytoplasme, des micro-filaments appelés *filaments intermédiaires*, composés de la vimentine d'un poids moléculaire de 57000.

Grâce à ces différentes caractéristiques, on peut distinguer facilement les cellules endothéliales des autres types cellulaires, comme les cellules musculaires lisses (Thorgeirsson, 1983).

En culture :

Les cellules endothéliales en culture prennent un aspect polygonal. Elles sont aplaties et possèdent un noyau ovoïde avec deux ou trois nucléoles. Outre les organites cytoplasmiques habituels des cellules eucaryotes (appareil de Golgi important, nombreuses mitochondries, saccules de réticulum endoplasmique lisse et rugueux,...) témoignant d'une activité métabolique intense, elles possèdent des inclusions spécifiques : les corps de Weibel-Palade décrits ci-dessus. On les retrouve même après un nombre élevé de générations.

Leur mode de croissance *in vitro* se fait selon un modèle très régulier. Elles prolifèrent en une monocouche de cellules étroitement accolées (Ross, 1981). Lorsqu'elles arrivent à confluence, les cellules ne répondent plus aux facteurs de croissance du sérum. En effet, les cellules endothéliales ne se chevauchent pas. Elles ne se divisent donc plus quand les divers amas cellulaires se rencontrent recouvrant toute la surface de la boîte de culture. C'est ce qu'on appelle le phénomène d'*inhibition de contact*.

Les études faites sur les capacités de prolifération et le vieillissement des cellules endothéliales ont montré qu'elles avaient une durée de vie limitée. Un processus de dédifférenciation apparaît rapidement, faisant perdre une partie des caractéristiques propres à ces cellules.

1.1.4.2. L'ENDOTHELIUM EN TANT QUE MACHINE DE SYNTHÈSE :

Les capacités de synthèse des cellules endothéliales sont très grandes et très diversifiées. Ces cellules présentent une particularité très originale : elles sont polarisées à la fois au niveau morphologique et fonctionnel (Ross, 1981). Cette polarité entre leur surface apicale et basolatérale reflète leurs spécialisations dans les interactions avec les cellules du sang et celles de la paroi vasculaire (Stoll and Spector, 1989). Chaque pôle, le pôle luminal en contact avec le sang et le pôle sous-endothélial, fabrique des substances à fonctions spécifiques.

On peut classer ces molécules en quatre catégories :

- Les éléments de la matrice extracellulaire sous-endothéliale.

Les cellules endothéliales élaborent, entre autres, des glycoprotéines, des glycosaminoglycans, de la laminine, de l'élastine, plusieurs types de collagène (surtout le collagène de type IV) (Ross, 1981; Tan *et al*, 1989), qui constituent la membrane basale et la matrice extracellulaire du sous-endothélium. Cette membrane isole ces cellules du sous-endothélium. Les cellules endothéliales reposent en fait sur cette membrane .

- Les facteurs contrôlant la thromborésistance.

Ces facteurs produits par les cellules endothéliales sont libérés dans le sang à partir du pôle luminal.

Parmi ces nombreuses substances, il y a bien sûr le facteur de Von Willebrand. C'est une glycoprotéine dont la sous-unité de base a un poids moléculaire

de 225 000. Une fois libéré dans la circulation sanguine, le facteur de Von Willebrand s'associe rapidement au facteur VIII de la coagulation. Ce complexe joue un rôle important dans le phénomène d'interaction entre les plaquettes sanguines et les cellules endothéliales de la paroi vasculaire.

Le facteur VIII est également synthétisé par les cellules endothéliales. Ce facteur anti-hémophilique intervient dans la coagulation sanguine.

Ces cellules sont le siège d'un intense métabolisme des prostaglandines. Ces lipides acides ont pour précurseur l'acide arachidonique, transformable par la cyclo-oxygénase en métabolites intermédiaires, les endoperoxydes. Ces endoperoxydes donnent principalement naissance à la *prostacycline* (PGI₂) grâce à l'intervention d'une enzyme, la prostacycline synthétase. La PGI₂ libérée dans le milieu extracellulaire a une action d'agent vaso-dilatateur et d'inhibiteur très puissant des plaquettes ainsi que la PGE₁ (Sinzinger, 1990). Cette molécule s'oppose à la thrombose en tant qu'agent antithrombogénique. Son temps de demi-vie est très bref, d'une minute ou deux. Elle se dégrade alors en un composé stable, la 6-céto-PGF₁alpha. La synthèse de base continue de la prostacycline est très faible puisque le taux plasmatique de cette prostaglandine est très bas chez l'homme. Par contre, dans certaines conditions, la sécrétion de la PGI₂ peut être stimulée de façon efficace, en particulier *in vitro* en présence de thrombine (enzyme-clé de la coagulation) (Ross, 1981).

Les cellules endothéliales possèdent énormément de molécules sur la surface cellulaire. Par exemple, on remarque la présence d'inhibiteurs de protéases de la coagulation (antithrombine III), ainsi que de l'héparan-sulfate, cité ultérieurement, avec son activité anticoagulante. Ces cellules présentent également sur leur surface une activité pro-coagulante qu'elles peuvent aussi libérer dans le sang. Cette activité permet la formation de thrombine. La thrombomoduline, molécule de surface, fixe la thrombine et la neutralise. Pour cela elle joue un rôle majeur dans les mécanismes de défense vasculaire antithrombotique (Caen, 1987).

Elles synthétisent également des activateurs tissulaires du plasminogène (Ross, 1981).

- Les facteurs dilatateurs.

Les cellules endothéliales produisent des substances influençant directement la paroi vasculaire. Ces cellules contrôlent le tonus vasculaire en libérant des molécules aux activités antagonistes actives sur les cellules musculaires lisses. Elles relarguent dans le milieu extracellulaire des facteurs relaxants (endothelial-derived relaxing factor : EDRF, PGI₂) (Clarke *et al*, 1990) et aussi des

facteurs avec un effet permettant la contraction des vaisseaux (Endothéline) (Michel *et al*, 1990; Dominiczak and Bohr, 1989; Inoue *et al*, 1990). Ces molécules libérées entrent alors en contact avec les cellules de la paroi vasculaire, en particulier avec les cellules musculaires lisses, contrôlant la dilatation et la contraction de cette paroi.

D'un point de vue mécanique, les facteurs induisant une contraction sont ceux qui augmentent le calcium cytotologique, alors que ceux qui provoquent une relaxation diminuent la concentration de calcium dans le cytosol (Dominiczak and Bohr, 1989). Trois mécanismes sont alors activés. Tout d'abord, lors d'une dilatation, le calcium intracellulaire est séquestré dans le réticulum sarcoplasmique. Il peut être aussi expulsé de la cellule par des pompes-calcium, dépendantes d'une consommation d'énergie, et par des pores en échange d'une entrée de sodium.

-L'*EDRF* est caractérisé comme un oxyde nitrique ayant comme précurseur la L-Arginine. Cette molécule a un potentiel vasodilatateur et est un inhibiteur de l'agrégation et de l'adhésion plaquettaire. L'hémoglobine et des antioxydants peuvent inhiber l'effet de l'*EDRF* (Clarke *et al*, 1990).

-La *prostacycline*, déjà vue précédemment, inhibe également l'agrégation des plaquettes et dilate les vaisseaux sanguins. L'aspirine, drogue inhibant la cyclo-oxygénase, diminue la production vasculaire de PGI_2 .

-L'*endothéline* (ET-1), peptide de 21 acides aminés, est, avant tout, un agent vasoconstricteur. Elle dépend de la présence de calcium extracellulaire et entraîne une augmentation de cet ion à l'intérieur de la cellule. Ce peptide active indirectement les canaux calciques (Inoue *et al*, 1990). L'ET-1 stimule la phospholipase A_2 (PLA $_2$), via l'activation de la phospholipase C et l'augmentation du calcium intracellulaire indispensable à l'activité de la PLA $_2$ (Resink *et al*, 1989). Cette phospholipase conduit à la synthèse des diverses prostaglandines. Rappelons que le métabolisme de l'acide arachidonique apparaît être un processus-clé dans la réponse vasculaire à plusieurs stimuli. L'endothéline augmente en outre le pH de la cellule. Cette alcalinisation est due à l'activité de la protéine kinase C qui stimule les échanges entre le sodium et les ions H^+ . Il a également été démontré que les cellules musculaires des vaisseaux peuvent se lier et internaliser l'ET-1 rapidement (Resink *et al*, 1990). Ce peptide, via ces différents mécanismes, stimule la contraction des cellules musculaires lisses (Danthuluri and Brock, 1990; Inoue *et al*, 1990), la synthèse de l'ADN dans ces mêmes cellules et augmentent l'effet du PDGF (platelet-derived growth factor) à basses concentrations (Nakaki *et al*, 1989).

- Les facteurs de croissance.

Les différents facteurs de croissance que la cellule endothéliale relargue sont des activateurs cellulaires. Mais tous ne stimulent pas la prolifération, certains activent uniquement les cellules en augmentant par exemple leur synthèse de protéoglycanes (Berrou *et al*, 1991).

L'étude du rôle de l'endothélium sur le contrôle de la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires a été souvent réalisée. Les cellules de l'endothélium sécrètent à la fois des facteurs d'inhibition et de stimulation de la croissance de ces cellules (Xu *et al*, 1991). De nombreuses expériences ont montré que les cellules musculaires se divisent rarement spontanément (Brinkman *et al*, 1990). La multiplication et le développement des cellules musculaires lisses dépendent de la présence de facteurs de croissance, et la plupart de ces facteurs proviennent des cellules endothéliales (Vender *et al*, 1987).

La cellule endothéliale libère donc plusieurs substances polypeptidiques stimulant la croissance des cellules musculaires lisses. Elles incluent un facteur ressemblant au facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), un facteur de croissance dérivé de la cellule endothéliale elle-même (EDGF), un facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF-1-like), un facteur de croissance ressemblant à celui qui est sécrété par les fibroblastes (FGF), l'endothéline (ET-1) (Michel *et al*, 1990), certaines prostaglandines (Brinkman *et al*, 1990) et l'interleukine 1 (IL-1) (Vender *et al*, 1987). Les autres prostaglandines et les substances analogues à l'héparine inhibent par contre la croissance des cellules musculaires lisses (Desmoulière *et al*, 1991).

Les prostaglandines :

Il a été observé que la croissance des cellules musculaires lisses peut être arrêtée par des inhibiteurs de la PLA₂. Cela suggérerait que le métabolisme de l'acide arachidonique peut être intégré dans le mécanisme de contrôle de la prolifération de ces cellules.

Pour identifier les eicosanoïdes impliqués dans ce processus, Brinkman *et al* (1990) ont étudié l'effet de certains métabolites de l'acide arachidonique sur la croissance des cellules musculaires lisses. Il a été montré que, le plus souvent, les prostaglandines seules (PGE₂) ou en mélange (PGI₂ et PGE₁) (Sinzinger *et al*, 1990) inhibent la prolifération cellulaire. Cependant, la PGI₂, la PGE₂ et la PGF₂ alpha induiraient la réplication de l'ADN chez les cellules musculaires lisses (Palmeberg *et*

al, 1991) et la PGE1 et la PGE2, ajoutés à du milieu avec sérum, stimuleraient la prolifération de ces cellules dans les artères pulmonaires (Pasricha *et al*, 1992).

Vu leur grande diversité, les différentes prostaglandines auraient des rôles opposés, tantôt agonistes des facteurs de croissance, tantôt antagonistes.

Le PDGF :

Ross *et al*, en 1974, avaient déjà mis en évidence une activité mitogénique provenant des plaquettes sur les cellules musculaires lisses. Plus tard, on montrera que le facteur de croissance d'origine plaquettaire est capable aussi de stimuler d'autres types cellulaires et d'être produit par d'autres cellules (Golden *et al*, 1991) comme les cellules endothéliales. Il s'agit d'une glycoprotéine cationique (Banskota *et al*, 1989) de PM 28-33 000 Da, détruite par la trypsine mais stable à la chaleur. Cette dernière propriété est d'ailleurs utilisée pour sa purification. Le PDGF est constitué de deux chaînes polypeptidiques homologues, A et B, reliées par des ponts disulfures. Les deux chaînes peuvent être combinées en trois isomères dimériques différents : AA, AB et BB.

Ce facteur stimule la synthèse de l'ADN. L'EGF - facteur stimulant la croissance cellulaire d'origine épidermique également produit par les cellules musculaires lisses (Rossi *et al*, 1992)- et l'insuline sont nécessaires à la poursuite du cycle cellulaire. Ce qui implique donc une synergie entre les différents facteurs de croissance ; le PDGF déclenche les premiers événements de la réponse mitogénique, en sensibilisant la cellule à d'autres facteurs qui interviennent à un stade plus tardif.

Outre son activité mitogène, le PDGF est un agent vasoconstricteur (Sachinidis *et al*, 1990, a).

Le PDGF n'est actif que sur les cellules qui portent, sur leur membrane, son récepteur spécifique (alpha et bêta) (Sachinidis *et al*, 1990, b); pour les cellules musculaires lisses il s'agit le plus souvent du récepteur bêta (Rossi *et al*, 1992) correspondant au PDGF-BB (Sachinidis *et al*, 1990, b). La liaison du PDGF à son récepteur est suivie d'une augmentation de ce peptide dans la région concernée de la membrane, puis de l'internalisation du complexe au sein de vésicules. Celles-ci fusionnent avec les lysosomes, où le PDGF est dégradé. De nombreux événements biologiques suivent la liaison de la molécule et du récepteur : activation d'une tyrosine kinase, régulation de récepteurs de l'EGF, la stimulation d'une phospholipase A₂ et du cycle de l'inositol, l'augmentation du calcium intracellulaire provoquant une réponse contractile des cellules musculaires lisses et l'acidification du cytoplasme cellulaire (Sachinidis *et al*, 1990 a).

L'IGF-1:

Le facteur 1 de croissance ressemblant à l'insuline est un polypeptide de 7500 daltons. Comme l'insuline, il stimule la mitose dans les cellules musculaires lisses *in vitro*.

En interaction avec le PDGF, l'IGF-1 régule la croissance cellulaire. D'une façon synergique, ils augmentent la prolifération en induisant le protooncogène *c-myc* (Banskota *et al*, 1989).

L'héparine :

L'héparine et ses analogues, glycosaminoglycans chargés négativement comme l'héparan sulfate, inhibent la prolifération des cellules musculaires lisses (Herbert and Maffrand, 1989; Herman and Castellot, 1987) et induisent un changement dans l'activité cellulaire (Williams and Mason, 1991).

L'héparine empêche la progression du cycle cellulaire chez les cellules musculaires lisses. Elle bloque la passage entre la phase G₁ et la phase de synthèse de l'ADN. L'héparan sulfate, de structure analogue à l'héparine, permet grâce à cet effet anti-prolifératif de maintenir à un taux constant le nombre de cellules musculaires lisses (Reilly *et al*, 1989).

Ils stimulent aussi l'expression des filaments d'actine alpha des muscles lisses, marqueurs de la différenciation de ces cellules, en relation avec les conditions du milieu de culture. L'héparine agit au niveau transcriptionnel et au niveau post-transcriptionnel. Il n'a pas seulement un impact sur la prolifération cellulaire mais aussi sur la différenciation des cellules musculaires lisses (Desmoulière *et al*, 1991).

Nous verrons au paragraphe suivant, quand on étudiera les cellules musculaires lisses, qu'elles possèdent deux états cellulaires, un état où elle prolifèrent et un autre où elle sont différenciées et sont capables alors de se contracter. Cet inhibiteur bloque en fait le passage du phénotype contractile au phénotype synthétique.

L'héparan sulfate à la surface des cellules endothéliales, ayant les mêmes propriétés que l'héparine, possède donc une activité anti-proliférative. Une analyse structurale indique qu'un pentasaccharide représente la structure moléculaire minimale nécessaire pour garder l'activité inhibitrice (Herbert and Maffrand, 1988).

En présence d'héparine et du facteur de croissance d'origine endothéliale (ECGF), la production de collagène chez les cellules musculaires lisses est inhibée. Par contre la production de protéoglycans est augmentée en leur présence. Le mélange

de l'héparine et de l'*ECGF* provoque donc une modulation de la production de la matrice extracellulaire dans ces cellules (Tan *et al*, 1989). Il y va de même pour l'héparine seule (Williams and Mason, 1991).

Elle module donc la synthèse de protéines spécifiques chez les cellules musculaires lisses *in vitro*. Les mécanismes exacts par lesquels l'héparine agit ne sont pas encore connus mais ils impliquent son internalisation par des récepteurs à grande affinité (Reilly *et al*, 1989), une action intracellulaire et une réduction du nombre de récepteurs du facteur de croissance d'origine épidermique (EGF) (Williams and Mason, 1991).

L'interleukine 1:

Cette interleukine est un médiateur-clé dans le réseau des cytokines. Il régule les fonctions de la paroi vasculaire par des mécanismes autocrines et paracrines (Gay and Winkles, 1991). Les cellules des vaisseaux sanguins, comme les cellules endothéliales et musculaires lisses, peuvent transcrire les gènes IL-1 (Loppnow and Libby, 1992).

L'IL-1 joue un rôle important dans la modulation de la croissance et dans d'autres activités biochimiques des cellules musculaires lisses. Elle augmente leur prolifération si elles sont déjà en phase S. La complémentarité d'autres facteurs de croissance est par conséquent indispensable pour déclencher le cycle cellulaire jusqu'à la mitose. Le PDGF, par exemple, permet à la cellule de passer de la phase G à la phase de réplication de l'ADN (Bonin *et al*, 1989). Une interaction entre ces deux molécules permet aux cellules de se multiplier.

En outre, l'interleukine 1 induit la libération, chez les cellules musculaires lisses, de prostanoïdes inhibiteurs de leur croissance (Libby *et al*, 1988).

De plus, elle régule l'expression du gène du facteur 2 de croissance se liant à l'héparine (HBGF₂) dans les cellules musculaires. Ce facteur est un agent chimotactique et mitogène pour ces cellules. De nouveau ici, plusieurs substances agissent ensemble, d'une façon autocrine pour le HBGF₂ et paracrine pour l'IL-1, pour stimuler la croissance des cellules musculaires lisses (Gay and Winkles, 1991).

Cette cytokine, en agissant sur la prolifération des cellules musculaires lisses, stimule également la production de l'interleukine 6 (Loppnow and Libby, 1990) qui induit la synthèse de PDGF, agent prolifératif de ces cellules. L'IL-6, libérée par les cellules d'une manière autocrine, déclencherait alors la croissance cellulaire via l'activation de la production de PDGF endogène (Ikeda *et al*, 1991).

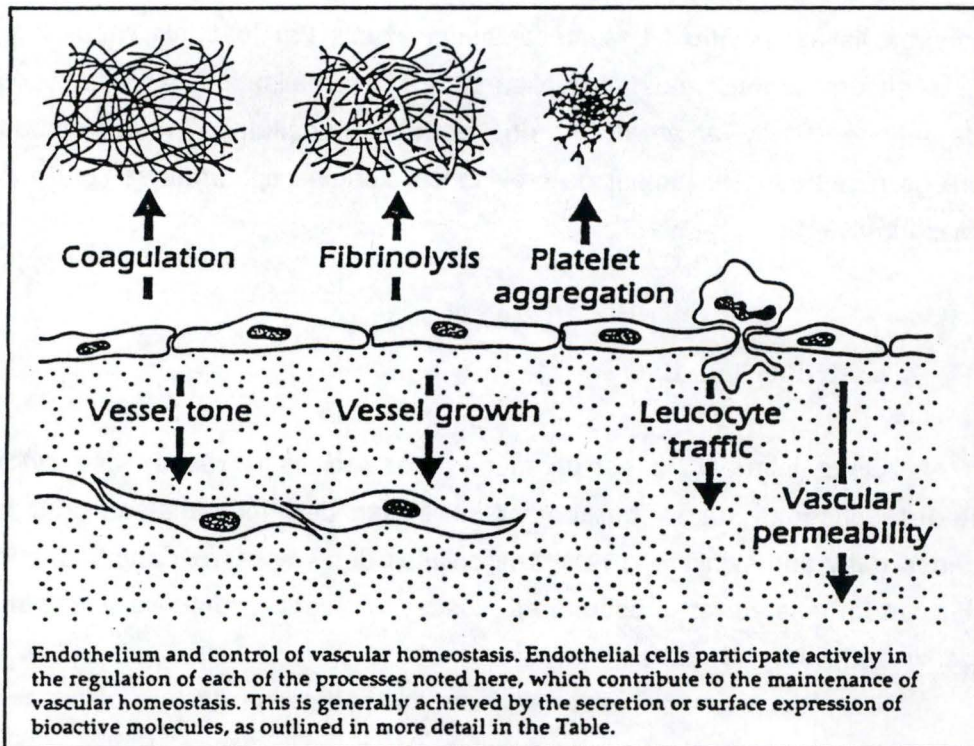


Illustration 1 :

Représentation des fonctions de l'endothélium dans le contrôle de l'homéostasie vasculaire (Pearson, 1991).

Comme on vient de le voir, de nombreux facteurs stimulant ou inhibant la croissance des cellules musculaires lisses sont synthétisés par les cellules endothéliales. La présence de récepteurs sur la membrane des cellules musculaires lisses est indispensable à l'effet stimulateur ou inhibiteur de ces facteurs de croissance (Schwartz *et al*, 1990). Ils interagissent tout le temps entre eux au niveau de la paroi vasculaire. Pour les cellules musculaires lisses, la synergie de ces substances de croissance est évidemment nécessaire à leur prolifération.

En outre, la cellule endothéliale, en réponse à différents stimuli, a la capacité également de synthétiser du *PAF* (1-O-alkyl-2-acétyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine). Cet agent pro-inflammatoire, en opposition avec les propriétés des prostaglandines, est une molécule à action vasculaire. En restant associée à la surface de la cellule endothéliale, elle permet l'agrégation des plaquettes. Mais si le *PAF* est libéré dans l'intima, il interagit avec les cellules musculaires lisses, en stimulant probablement la prolifération de celles-ci (Stoll and Spector, 1989). Le *PAF* augmenterait l'effet du *PDGF* sur ces cellules.

En conclusion, au vu de l'ensemble des caractéristiques décrites ci-dessus, les cellules endothéliales sont indispensables au bon fonctionnement du système vasculaire (illustrations 1 et 2). Ces cellules, à l'interface sang-tissu, agissent sur toute l'écologie vasculaire. Elles sont multifonctionnelles. L'endothélium est en interaction permanente avec les cellules circulant dans le sang d'une part, et d'autre part avec celles de la paroi du vaisseau sanguin, en particulier avec les cellules musculaires lisses (Dominiczak and Bohr, 1989). Celles-ci sont en effet sensibles à différents facteurs sécrétés par les cellules endothéliales qui agissent sur leur croissance, leur migration et leur état contractile, influençant ainsi la vasomotricité. L'étude de ces interactions sont d'une grande importance pour une meilleure compréhension de la physiologie et de la physiopathologie des systèmes veineux.

TABLE 1.—ENDOTHELIAL-DERIVED FACTORS AND VASCULAR RESPONSES

Anticoagulation	Prostacyclin Tissue plasminogen activator Glycosaminoglycans Thrombomodulin Proteins S and C EDRF (NO)
Procoagulation	Tissue factor Plasminogen activator inhibitor Factor V Platelet activating factor Factors V and XII activators von Willebrand factor Fibronectin Factor IXa binding protein
Immune function	ICAM-1 and ICAM-2 ELAM-1 IL-1 IL-8 Class I and II MHC antigens Colony stimulating factors
Vasorelaxation	Nitric oxide (NO) Other EDRFs
Vasoconstriction	Endothelins

EDRF, Endothelium-derived relaxation factor; NO, nitric oxide; ICAM, intercellular adhesion molecule; ELAM, endothelial leukocyte adhesion molecule; IL, interleukin, and MHC, major histocompatibility complex.

Illustration 2 :

Tableau représentant les différents facteurs dérivés des cellules endothéliales et les réponses vasculaires correspondantes (Palombo *et al*, 1991).

1.1.5. LA CELLULE MUSCULAIRE LISSE

Les cellules musculaires lisses, comme nous l'avons vu précédemment au point 1.1.3., constituent le type cellulaire le plus abondant dans la média des parois vasculaires (Loppnow and Libby, 1992). Les veines en comptent beaucoup plus que les artères. Grâce à leurs contractions, elles permettent au sang de remonter jusqu'au coeur.

Ces cellules sont nécessaires à l'organisation cohérente des parois. En plus de leur rôle mécanique, elles synthétisent les éléments de la matrice extracellulaire. Ce réseau tridimensionnel représente en réalité la charpente des vaisseaux sanguins.

Lors de pathologies veineuses, les cellules musculaires lisses sont la cause du remaniement des tuniques. Elles passent d'un état contractile à un état de synthèse et de prolifération leur permettant de migrer vers l'intima. Cette modulation est caractéristique de ce type cellulaire. Les altérations des fonctions des cellules musculaires lisses dans ces maladies sont la prolifération et la synthèse des composants extracellulaires. C'est pour ces raisons que l'étude de ces cellules est importante pour une meilleure analyse de ces phénomènes pathologiques. Les événements se produisant dans ces pathologies seront décrits en détail au point suivant.

Après une analyse des caractéristiques cellulaires *in vivo* et en culture, nous développerons le phénomène de "dédifférenciation" des cellules musculaires lisses.

1.1.5.1. LES CARACTERISTIQUES CYTOLOGIQUES.

1.1.5.1.1. Le phénotype des cellules musculaires lisses *in vivo*.

Les cellules musculaires lisses vasculaires sont d'origine mésenchymateuse et ressemblent aux fibroblastes au début de leur développement. Ces cellules ont une forme fibrillaire. Elles contiennent de nombreuses mitochondries leur apportant l'énergie nécessaire à leur contraction.

LA PROLIFERATION

En règle générale, avant une mitose, les cellules musculaires lisses modifient leur morphologie et leurs fonctions. Elles passent à un état cellulaire qui a perdu la capacité de se contracter. Elles sont alors capables de se diviser. Et inversement, lorsqu'elles sont différenciées, elles sont incapables de se multiplier. Un changement du phénotype est donc prérequis pour la prolifération des cellules musculaires lisses (Chamley-Campbell *et al*, 1979). On appelle cela le phénomène de modulation phénotypique, qu'on décrira au point 1.1.5.2.

Il existe au moins trois mécanismes proposés pour expliquer le contrôle de la croissance des cellules musculaires lisses (Schwartz *et al*, 1990) :

1) La croissance de ces cellules peut être contrôlée par des facteurs de croissance libérés par les cellules sanguines et notamment les plaquettes.

2) Elle peut être également modulée par des facteurs, inhibiteurs ou activateurs de la prolifération cellulaire, synthétisés par les cellules de la paroi vasculaire, comme par exemple les cellules endothéliales. Ces cellules endothéliales jouent un rôle majeur dans le contrôle de la croissance des cellules musculaires de la paroi vasculaire, comme nous l'avons déjà indiqué précédemment.

3) La croissance cellulaire peut enfin être stoppée par le phénomène d'inhibition de contact, décrit au point 1.1.4. A haute densité, les cellules musculaires lisses arrêtent de croître.

En plus, lorsque la machinerie de la croissance cellulaire est activée, l'expression des récepteurs au PDGF augmente (Hedin *et al*, 1990).

LA CONTRACTION

La fonction majeure des cellules musculaires lisses est la contraction. Elle est due à la présence des filaments musculaires. Ces filaments peuvent être divisés en trois groupes sur base de leur taille, de leur forme, de leur localisation et de leur composition (Chamley-Campbell *et al*, 1979).

a) Les filaments d'*actine* et de *tropomyosine* ont un diamètre de 50-80 Å. Ce sont les plus fins. Des filaments similaires sont observés dans une grande variété de cellules non-musculaires.

b) Le second type de filaments, constitués de *myosine*, est habituellement de 120-180 Å de diamètre. Ces filaments épais sont parallèles à l'axe de la cellule et sont entourés des fins filaments. Il existe deux isoformes différents du filament de myosine. La différence apparaît au niveau des chaînes lourdes (Zanellato *et al*, 1990).

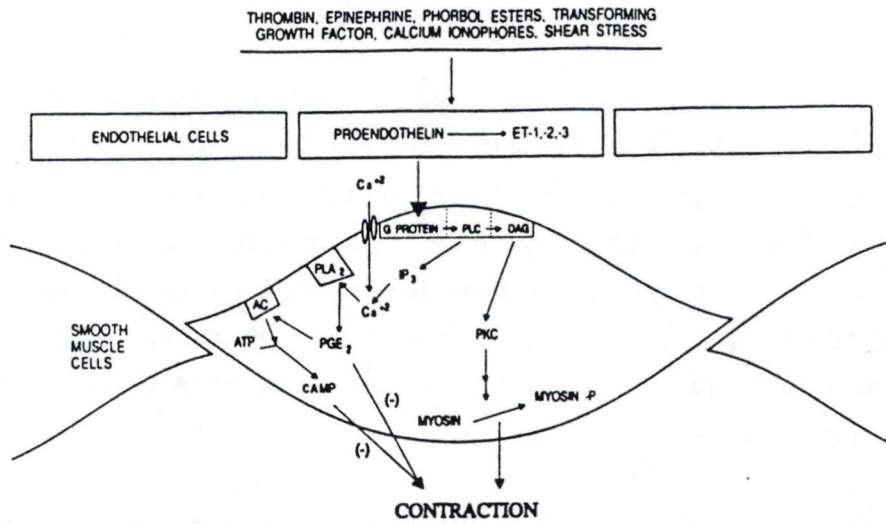
c) Souvent associés à des corps denses, les filaments intermédiaires ont un diamètre de 10 nm. Ils sont aussi appelés β -filaments ou filaments cytoplasmiques. Ce sont eux qui constituent, avec les corps denses, la structure du cytosquelette de l'appareil contractile.

L'*actine* est une protéine de 42 kdaltons existant dans pratiquement toutes les cellules. Il existe au moins six isotypes d'actine différents chez les mammifères (Gordon and Schwartz, 1987). Les trois classes d'isotypes sont l'alpha, la bêta et la gamma actine. Ces deux dernières sont aussi appelées isoformes cytoplasmiques. L'actine alpha des muscles lisses ne se trouvent que dans les cellules musculaires lisses, pas dans les autres types cellulaires, comme les cellules endothéliales par exemple (Andre *et al*, 1991), son taux est inversement proportionnel avec l'état prolifératif de la cellule. L'actine alpha est présente quand la cellule est dans son état contractile (Dartsch *et al*, 1990). Cet isotype est un bon marqueur de la différenciation des cellules musculaires lisses (Owens *et al*, 1987; Kocher and Madri, 1989). Il en va de même *in vitro*.

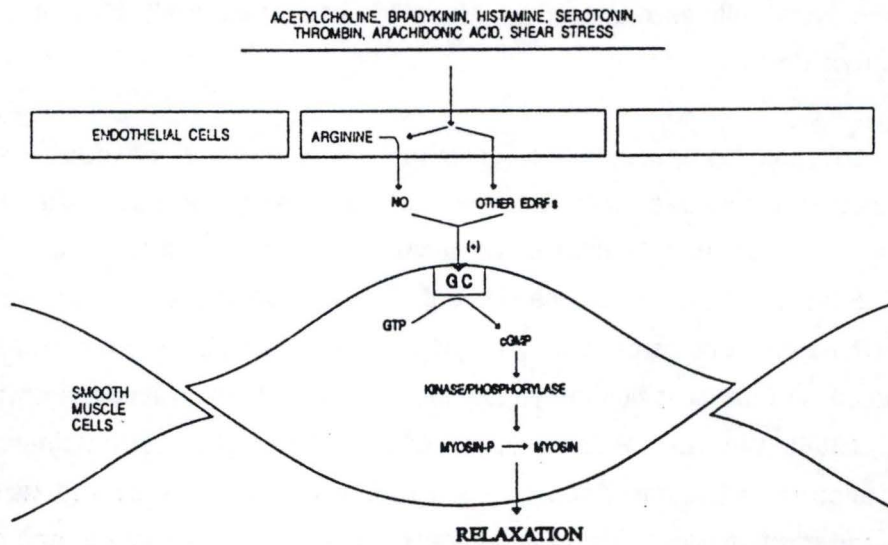
Les cellules musculaires lisses portent à leur surface des vésicules de micropinocytoses impliquées dans l'accumulation du calcium intracellulaire. Elles sont intimement associées au réticulum sarcoplasmique qui constitue le système tubulaire localisé à la périphérie de la cellule. Le calcium, indispensable à la contraction, est alors conduit via ces tubules dans tout le cytoplasme ou jusqu'au lieu de stockage. C'est l'augmentation du taux du calcium cytotologique qui active la contraction (Twort and Van Breemen, 1988; Wu and Bohr, 1991). C'est le réticulum sarcoplasmique, en continuité avec le réticulum endoplasmique rugueux, qui est la source de stockage principale du calcium dans les cellules musculaires lisses (Somlyo and Himpens, 1989).

Les mitochondries sont localisées à la périphérie des cellules et autour du noyau. Ce sont elles qui apportent l'énergie nécessaire à la contraction. Elles sont également en relation avec les vésicules et le réticulum sarcoplasmique.

Les mécanismes contractiles chez les cellules musculaires lisses sont moins évolués que chez les muscles striés squelettiques. La contraction est déclenchée par une augmentation du niveau de calcium cytotologique. Chez les cellules musculaires lisses, ces ions n'agissent pas par l'intermédiaire d'un complexe troponine-tropomyosine. Ici la contraction est principalement amorcée par la phosphorylation de



Proposed mechanism for the contraction of smooth muscle mediated through the endothelial cell. Stimulation of endothelial cells by vasoconstrictants or shear stress induces genetic expression of pro-endothelin. Endothelin-1 (ET-1) is formed by the action of an endopeptidase and diffuses to the smooth muscle cell. Receptor-mediated activation of a G protein after the binding of ET-1 leads to formation of inositol-1,4,5 trisphosphate (IP_3) by phospholipase C (PLC) and release of intracellular calcium (Ca^{2+}). Concomitant formation of diacylglycerol (DAG) activates protein kinase C (PKC), resulting in the phosphorylation of myosin light chains (myosin-P) and initiation of the contractile response. Increases in intracellular calcium from endogenous and exogenous sources (through calcium channels) activates phospholipase A_2 (PLA_2), leading to formation of prostaglandin E_2 (PGE_2). PGE_2 can stimulate cyclic adenosine monophosphate (cAMP) formation by adenylate cyclase (AC). PGE_2 has vasorelaxant properties, while cAMP acts as a negative feedback signal on the contractile response.



Proposed mechanism for the relaxation of smooth muscle mediated through the endothelial cell. Activation of endothelial cells by receptor-mediated binding of a prorelaxant factor or by shear stress initiates the enzymatic conversion of arginine to citrulline with formation of nitric oxide (NO) and possibly other endothelium-derived relaxation factors (EDRF). NO diffuses through membranes to activate guanylate cyclase (GC) in smooth muscle cells and production of cyclic guanosine monophosphate (cGMP) from guanosine triphosphate (GTP). Subsequent initiation of a kinase/phosphorylase cascade by cGMP promotes dephosphorylation of myosin light chains (myosin-P) as a prelude to the relaxation response.

Illustration 3 :

Représentation des mécanismes de la contraction (a) et de la relaxation (b) chez les cellules musculaires lisses induits par l'activation des cellules endothéliales (Palombo et al, 1991).

l'une des deux chaînes légères de myosine, qui, à son tour, contrôle l'interaction de la myosine avec l'actine. Cette réaction de phosphorylation est catalysée par la kinase des chaînes légères de myosine (Wu and Bohr, 1991; Kargacin *et al*, 1990), dont l'activité nécessite la liaison d'un complexe calmoduline-calcium (Somlyo and Himpens, 1989). La phosphorylation se produit relativement lentement. Mais la contraction rapide n'est pas importante chez les cellules de muscles lisses, par opposition aux muscles squelettiques. Elle doit surtout être durable pour maintenir une tension prolongée dans les vaisseaux sanguins (Alberts *et al*, 1989; Owens *et al*, 1987). Notons également que les cellules endothéliales peuvent jouer un rôle dans la relaxation des cellules musculaires lisses en synthétisant de l'EDRF (point 1.1.4.) (Wu and Bohr, 1991). Ce qui montre encore qu'il existe, à tous les niveaux, des interactions entre ces deux types cellulaires (illustration 3).

Une hypertrophie du squelette musculaire peut apparaître, en réponse à une augmentation de la demande de travail.

LA SYNTHÈSE

Les cellules musculaires lisses ont la capacité de synthétiser les constituants de la matrice extracellulaire. Elles en sont le principal producteur (Ang *et al*, 1990). Elles sécrètent de l'élastine, du collagène et des glycoaminoglycans. Cette synthèse dépend de l'état de la cellule et implique une grande quantité de ribosomes libres, de réticulum endoplasmique rugueux et de complexes de Golgi.

Elles libèrent dans le milieu extracellulaire approximativement 30% de collagène de type I et 70% de type III à l'état adulte. Au stade synthétique, les cellules musculaires lisses produisent 25 à 30 fois plus de collagène qu'à l'état contractile (Ang *et al*, 1990). Les fibres élastiques du tissu conjonctif sont constituées de deux composants structuraux distincts : une glycoprotéine microfibrillaire et l'élastine, synthétisée par les cellules musculaires lisses, donnant un aspect amorphe à la matrice. Les glycoaminoglycans sont formés, pour leur part, par 60-80% de dermatan-sulfate, de 10-20% de chondroïtine-sulfate et de 0-5% d'acide hyaluronique (Chamley-Campbell *et al*, 1979; Berrou *et al*, 1991).

Cette matrice extracellulaire a comme fonction spéciale, outre celle de soutien, de réguler la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses (Herman and Castellot, 1987; Berrou *et al*, 1991).

1.1.5.1.2. Le phénotype des cellules musculaires lisses *in vitro*.

Les cellules musculaires lisses ont une forme effilée typique comme celle des aiguilles. Ce sont des cellules diploïdes avec un seul noyau. Elles ne possèdent pas de caractéristiques cytoplasmiques spécifiques outre leurs filaments musculaires et un système sarcoplasmique bien développé (Gordon and Schwartz, 1987). Comme toute cellule eucaryote, leur cytoplasme comporte l'endoplasme et ses organites habituels. Leur sarcoplasme contient des microfilaments orientés longitudinalement, des corps denses, des vésicules de micropinocytose en périphérie et de nombreux tubules de réticulum endoplasmique lisse (Krstic, 1988). La forme du système tubulaire du réticulum est en forme de T. Cet organite, souvent très abondant, est la réserve la plus importante du calcium intracellulaire (Twort and Van Breemen, 1988). Des investigations récentes ont montré que les vésicules de micropinocytose ont pour rôle de provoquer la contraction cellulaire en diminuant la résistance électrique de la membrane cellulaire. Les microfilaments intermédiaires de desmine et les corps denses constituent une charpente intracellulaire. Les différents microfilaments sont attachés à ces corps.

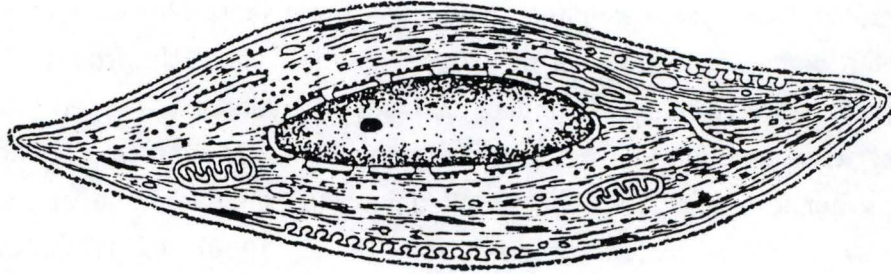
In vivo, les cellules musculaires lisses sont innervées. Ces innervations permettent, grâce à des ondes électriques, de provoquer des contractions. En culture, en l'absence de cellules nerveuses, ces cellules se contractent spontanément (Gordon and Schwartz, 1987). De plus, ces innervations ne sont pas requises pour l'établissement de l'état de différenciation.

Leur croissance est accompagnée d'un grand nombre de ribosomes accolés à un réticulum endoplasmique rugueux fort actif. Durant leur croissance normale, il y a une transition graduelle jusqu'au stade morphologique adulte caractérisé par les filaments d'actine et de myosine. Ces myofilaments apparaissent arrangés au hasard en opposition au pattern sarcoplasmique du squelette musculaire.

Les cellules musculaires lisses d'aorte ont la capacité de synthétiser et de sécréter des protéines extracellulaires prouvant que ces cellules *in vitro* sont également des cellules synthétisant les éléments du tissu conjonctif (Ross, 1971; Grimbrone and Cotran, 1975).

A7r5

Kimes et Brandt (1976) ont produit des clones de lignées cellulaires provenant d'aorte thoracique d'embryon de rat âgé de 14 à 17 jours (A7r5, A9 et A10). L'A7r5 est la souche de cellules musculaires lisses que nous avons utilisée. Ces cellules sont tétraploïdes ou hypertétraploïdes. Lorsqu'elles se divisent, elles sont



Contractility

Connective tissue synthesis

Lipid metabolism

LDL binding, internalization, degradation via high affinity receptors

Cholesterol synthesis

Phospholipid metabolism → prostaglandin synthesis

Proliferation

Dependent on state of modulation, contractile vs synthetic

Induced by:

PDGF, MDGF, ECDGF, LDL?, PGI₂, Ca⁺⁺ flux

Figure 11. Diagram of a smooth muscle cell, showing many of the phenotypic characteristics of normal smooth muscle, as well as factors that can induce smooth muscle proliferation.

Illustration 4 :

Représentation des différentes caractéristiques phénotypiques de la cellule musculaire lisse lorsqu'elle est dans son état contractile (Ross, 1981).

grosses, mais elles restent tout de même plus longues que larges, par comparaison à leur état contractile où elles sont effilées. Ces cellules évoluent alors parallèlement les unes aux autres. Elles produisent spontanément un potentiel d'action durant la phase stationnaire du cycle de croissance, dans une solution saline, à 23°C, contenant une concentration de calcium de 10 nM. De plus, ce type cellulaire conserve les caractéristiques spécifiques de l'ultrastructure des cellules musculaires lisses; les fins filaments sont orientés parallèlement à l'axe cellulaire, près de la surface membranaire, et les filaments intermédiaires sont dispersés au hasard sans localisation spécifique dans le cytoplasme (Chamley-Campbell *et al*, 1979; Kimes and Brandt, 1976).

A haute densité, ces cellules musculaires lisses ne forment pas plusieurs couches cellulaires. Elles ne se recouvrent pas. Nous ne sommes pas en présence du modèle "hills and valleys", dans lequel les cellules se chevauchent en formant des collines et des vallons, comme cela peut être le cas pour d'autres lignées de cellules musculaires lisses (Chamley-Campbell *et al*, 1979).

1.1.5.2. LA MODULATION PHENOTYPIQUE.

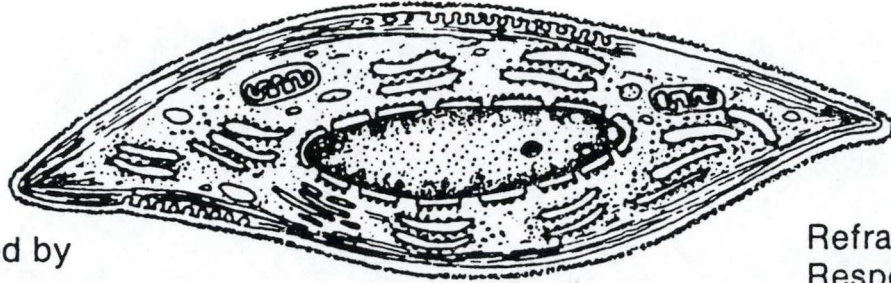
La différenciation de n'importe quel type de cellules peut être définie comme un changement de la morphologie et de la fonction de la cellule, qui apparaît durant le développement et qui implique une transition cellulaire d'un état initial multipotentiel à une forme spécialisée de l'état adulte (illustration 4).

Ce concept de différenciation cellulaire est complexe si on l'applique aux cellules musculaires lisses. Dans le passé le terme "dédifférenciation" était utilisé pour décrire une cellule musculaire adulte, ressemblant aux cellules musculaires lisses, impliquée dans la synthèse de la matrice extracellulaire ou dans la division cellulaire. Cette terminologie n'est pas strictement correcte, car il n'y a pas de preuves pour suggérer qu'elle retourne à un état initial multipotentiel.

On définit alors le changement dans le phénotype observé, quand les cellules musculaires lisses passent d'un état principalement contractile à un état synthétique et/ou mitotique par l'appellation de modulation phénotypique (Chamley-Campbell *et al*, 1979; Dartsch *et al*, 1990; Marks *et al*, 1990) (illustration 5).

Cette modulation conduit la cellule musculaire lisse à un état de synthèse et de prolifération. Elles perdent leur capacité de se contracter et commencent à produire les éléments de la matrice extracellulaire (Ross, 1981).

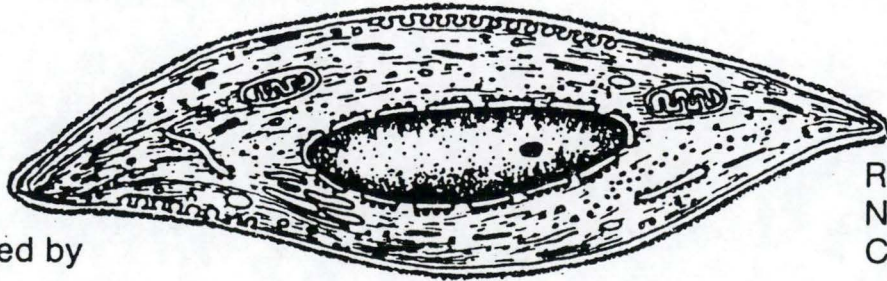
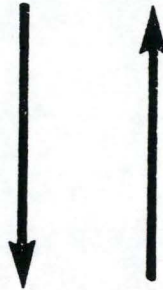
CONTRACTILE STATE



Maintained by
High Density
Endothelial derived
inhibitors

Refractile to PDGF
Responsive to angiotensin
No connective tissue synthesis

Modulation



Stimulated by
High Density

Responsive to PDGF
Noncontractile
Connective tissue synthesis

SYNTHETIC STATE

Figure 12. Diagram illustrating the state of modulation of smooth muscle cells in which the contractile vs the synthetic state are maintained by different sets of factors.

Illustration 5:
Représentation de la modulation de l'état contractile et de l'état synthétique chez les
cellules musculaires lisses (Ross, 1981).

Ce changement phénotypique implique des modifications quantitatives et qualitatives dans l'expression des canaux calcium dépendant du voltage (Marks *et al*, 1990), ainsi que des variations au niveau des composants du cytosquelette (Kocher and Madri, 1989). Cette modulation montre une perte de microfilaments et un switch de l'expression de l'isoforme actine-a de muscle lisse en actine-b cytoplasmique (Desmoulière *et al*, 1991; Banskota *et al*, 1989). Cela suggère que l'expression de l'actine a de muscle lisse est dépendante du cycle cellulaire (Hedin *et al*, 1990).

A faible densité, les cellules musculaires lisses en culture prolifèrent. Elles sont alors dans leur état synthétique. Elles peuvent donc se diviser. Lorsqu'elles arrivent à confluence, ces cellules arrêtent de croître et se différencient. Il y a modulation phénotypique. Il est possible d'empêcher la modulation de l'état contractile en maintenant les cellules en culture à une haute densité (Ross, 1987).

Tout facteur synthétisé et libéré par les cellules endothéliales, ayant un effet sur la croissance des cellules musculaires lisses, provoque une modulation phénotypique chez ces cellules. Le surnageant de cellule endothéliale peut mener, entre autre, à la stimulation de la synthèse de protéoglycans chez les cellules musculaires lisses (Berrou *et al*, 1991).

Lors de pathologies vasculaires, la structure de la paroi se voit modifier. Plusieurs phénomènes apparaissent impliquant des changements au niveau des interactions cellulaires. Ces changements entraînent en outre la modulation phénotypique des cellules musculaires lisses qui commencent alors à proliférer et à migrer vers l'intima. Ce sont ces modifications de structure et de fonctions que nous allons étudier en détail dans le chapitre suivant, après un rappel du phénomène de l'ischémie.

1.2. PATHOLOGIES VEINEUSES

Souvent taxés d'une réputation de pathologie mineure, l'ischémie et les nombreux processus pathologiques qui en découlent sont la cause principale de mort dans nos pays industrialisés. La perte par le tissu veineux de ses capacités d'adaptation et de soutien est à l'origine d'une hyperpression et d'une stase veineuses qui, d'abord transitoires, deviennent progressivement définitives. Ces altérations tissulaires se retrouvent à tous les niveaux, jusqu'au niveau le plus intime de l'arbre vasculaire.

Comme une stase veineuse peut provoquer une ischémie, une diminution de la disponibilité de l'oxygène dans les tissus peut alors apparaître. A cause de sa localisation entre le sang et le tissu, l'endothélium est la première cible touchée. L'effet de privation de l'oxygène sur l'état fonctionnel des cellules endothéliales pourrait être le point de départ de la cascade d'événements conduisant à la désorganisation de la paroi vasculaire (Michiels *et al*, sous presse a). Cette désorganisation est surtout due à l'activation des cellules de l'endothélium et à leurs interactions avec les cellules musculaires lisses.

Toutes ces modifications cellulaires et tissulaires ont, bien sûr, des effets sur les fonctions de tout l'organisme, c'est-à-dire sur tout le corps humain.

Ce sont ces interactions entre ces deux types cellulaires, après hypoxie, que nous étudierons dans ce chapitre. Nous développerons premièrement les altérations cellulaires causées après l'ischémie et nous caractériserons ensuite les modifications morphologiques de la paroi des veines se déroulant lors des varices.

1.2.1. L'ISCHEMIE

L'ischémie se définit comme un arrêt temporaire et localisé de la circulation sanguine, qui peut être aigu et total ou chronique et incomplet.

Cette interruption de la circulation du sang dans les tissus provoque d'importants dommages cellulaires. Ils sont la conséquence d'un défaut d'apport d'éléments nutritifs ainsi qu'un manque d'oxygène, conduisant à une déplétion en ATP,

qui entraîne une mort tissulaire d'autant plus rapide que l'organe touché est plus hautement spécialisé et plus fragile.

Ces effets délétaires sont cependant amplifiés lors de la reprise du flux sanguin dans ce tissu. La reperfusion conduit elle aussi à des changements cellulaires néfastes dans un territoire préalablement ischémié (Fridovich, 1979). Ces altérations sont regroupées sous la dénomination de "reperfusion injury" (Flaherty and Weisfeld, 1988; Piper, 1989).

Examinons de plus près la séquence des événements intracellulaires qui ont lieu lors d'une ischémie (illustration 6).

1.2.1.1. LES ALTERATIONS DU METABOLISME ENERGETIQUE :

Il existe dans tous les tissus un équilibre finement régulé entre la production d'énergie et son utilisation. La première conséquence d'une ischémie est justement le déséquilibre de cette balance énergétique. Cela entraîne une diminution dramatique de la concentration en ATP intracellulaire (Kehrer *et al*, 1990; Piper, 1989).

En effet, l'arrêt de la circulation sanguine provoque une diminution de l'apport en oxygène. Cette molécule étant utilisée comme accepteur final des électrons dans les phosphorylations oxydatives mitochondriales, elle est indispensable au métabolisme cellulaire. Trente-six molécules d'ATP, molécule énergétique utilisée par les cellules, sont obtenues en oxydant le glucose. Sans oxygène, les mitochondries subissent une baisse de régime.

Les cellules tentent alors de compenser ce manque d'énergie en augmentant la glycolyse, seul mécanisme énergétique fonctionnant sans apport d'oxygène. Cependant, celle-ci ne peut fournir que deux molécules d'ATP par molécule de glucose. C'est un formidable gaspillage d'énergie. Dans de telles conditions, la cellule ne peut générer suffisamment d'ATP pour une survie à long terme.

De plus, l'accélération de la glycolyse mène à l'accumulation de produits terminaux, et notamment du lactate. Cette accumulation, concomitante à celle du phosphore inorganique et d'ions hydrogène, provoque une acidification du pH intra et extracellulaire (Hill and La Via, 1980).

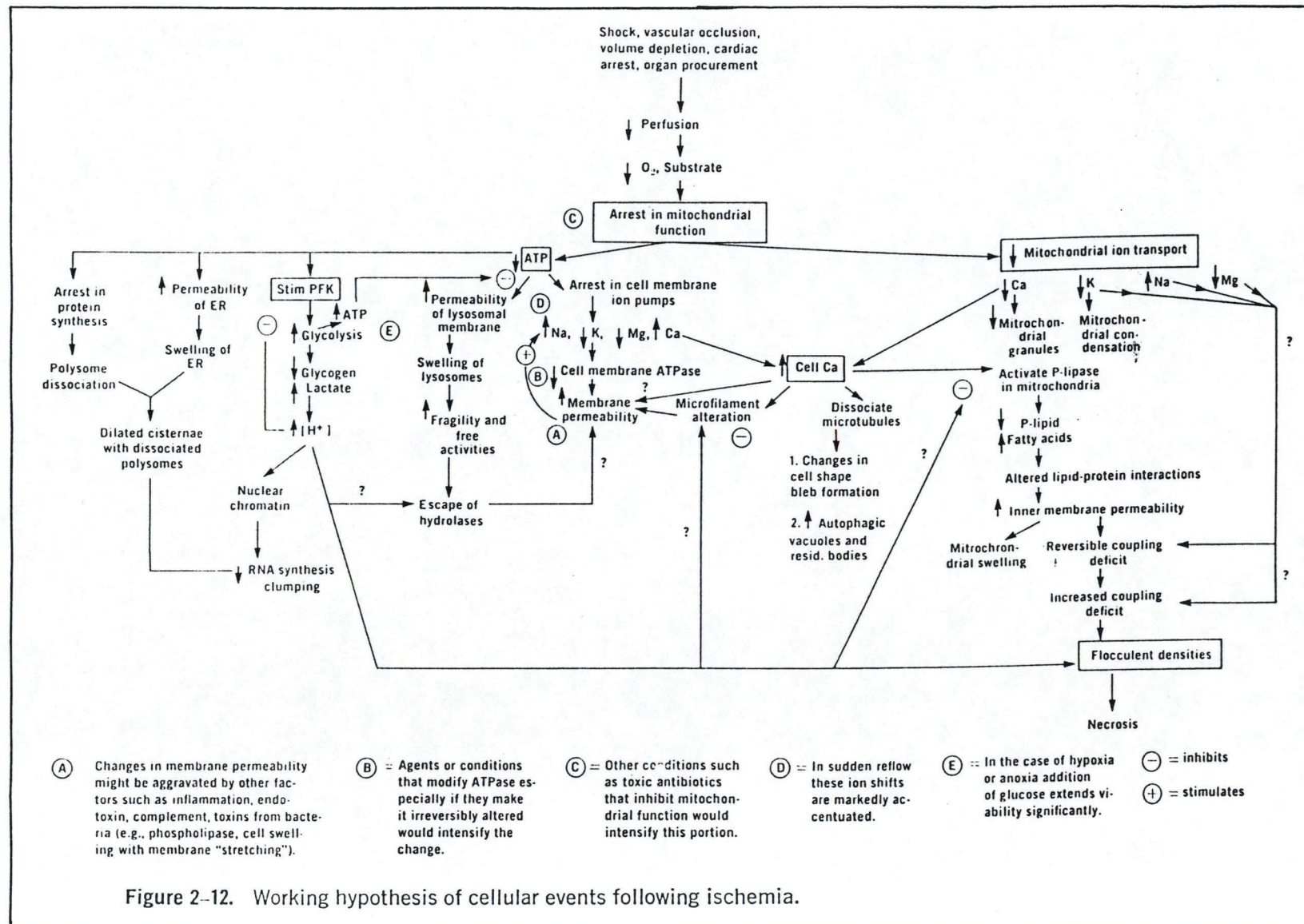


Figure 2-12. Working hypothesis of cellular events following ischemia.

Illustration 6 :
Représentation des différents événements se déroulant lors d'une ischémie (Hill and La Via, 1980).

Les mitochondries

Les mitochondries sont au centre du métabolisme énergétique. C'est grâce à leurs chaînes respiratoires que la cellule peut récupérer autant d'énergie à partir d'une molécule de glucose.

L'effet de l'ischémie sur les mitochondries provoque des modifications structurales. La matrice mitochondriale se gonfle (Hill and La via, 1980), probablement consécutivement à la perméabilisation de la membrane plasmique. Ces modifications sont réversibles au début de l'ischémie.

La pénurie en oxygène provoque simplement un arrêt des phosphorylations oxydatives (Hill and La Via, 1980). La mitochondrie reste fonctionnelle et elle n'est pas affectée de manière irréversible par cette interruption. Mais la cellule gaspille son énergie au cours de la glycolyse anaérobie. L'ATP se fait rare entraînant un grand nombre de modifications dans la cellule.

1.2.1.2. LES ALTERATIONS MEMBRANAIRES :

En conditions normales, la membrane plasmique est modérément perméable à divers ions, tels que le Na^+ , le K^+ , le Ca^{++} , le Mg^{++} , qui peuvent la traverser grâce à des canaux ioniques spécifiques. La cellule est capable, malgré ces flux constants, de maintenir une concentration intracellulaire en Na^+ et Ca^{++} inférieure à celle du milieu extérieur. Ceci est obtenu grâce à des pompes ATPasiques spécifiques à chaque ion (Piper, 1989; Hill and La Via, 1980).

En cas d'ischémie, l'ATP vient à manquer. Le fonctionnement de ces pompes est alors perturbé, ce qui a pour conséquence des modifications de la concentration de ces différents ions. L'accumulation des ions de sodium et de calcium à l'intérieur du cytoplasme entraîne une accumulation de Cl^- et de l'eau par osmose, conduisant à un gonflement des cellules (Hill and La Via, 1980). Ce phénomène leur donne un aspect de souffrance.

L'augmentation du calcium intracellulaire a d'autres conséquences.

LE CALCIUM

Le calcium est messenger secondaire important dans les cellules et plus encore dans les cellules musculaires lisses où il joue un rôle dans la contraction cellulaire (Twort and Van Breemen, 1988; Wu and Bohr, 1991). Ce rôle est expliqué au point 1.1.5.1.1. Il participe en effet à beaucoup de réactions enzymatiques de différentes voies métaboliques. C'est aussi un régulateur très important du métabolisme. Sa concentration extérieure est 10 000 fois plus élevée que celle à l'intérieur de la cellule (Rasmussen, 1989).

Il participe entre autre au maintien de la structure cellulaire en régulant l'association-dissociation de la tubuline en microtubules, ainsi que les interactions avec les autres structures subcellulaires telles que la membrane plasmique ou les microfilaments.

Le calcium peut également réguler la fluidité membranaire. Si sa concentration intracellulaire augmente, la fluidité au niveau de la membrane diminue.

Pour maintenir une faible concentration intracellulaire, les cellules utilisent deux systèmes au niveau de la membrane plasmique (Rasmussen, 1989) :

a) Une pompe à calcium qui nécessite de l'énergie, sous forme d'ATP, pour son fonctionnement.

b) Un échangeur d'ions conduit par le gradient électrochimique en sodium, existant dans la membrane plasmique.

Les cellules possèdent également deux autres systèmes de régulation : les mitochondries et les calciosomes. Chez les cellules musculaires lisses, il existe en plus le réseau tubulaire du réticulum sarcoplasmique. Ces organites sont capables de stocker le calcium et de le relâcher lors d'une activation cellulaire.

En tant que régulateur, toute augmentation de la concentration intracellulaire de calcium provoque l'activation de plusieurs systèmes enzymatiques. Comme nous l'avons mentionné précédemment, la diminution de la concentration en ATP cytoplasmique entraîne une rentrée de calcium dans la cellule, via une baisse de régime de l'activité des pompes ATPasiques (Arnould *et al*, 1992). Ce surplus de calcium peut notamment activer des phospholipases endogènes, comme la phospholipase A₂. Cette activation provoque dans les cellules endothéliales l'augmentation de la synthèse de molécules pro-inflammatoires. Parmi celles-ci,

citons les prostaglandines et le PAF (platelet-activating factor) (Michiels *et al*, sous presse b; Arnould *et al*, soumis pour publication).

1.2.1.3. LES CONSEQUENCES DES RADICAUX LIBRES DERIVES DE L'OXYGENE :

Alors qu'on pourrait s'attendre à ce que la réadmission de l'oxygène minimise les effets de l'hypoxie en permettant la récupération d'énergie dans la chaîne respiratoire, on constate que la réintroduction soudaine de l'O₂ s'accompagne de perturbations dans l'intégrité cellulaire. C'est ce qu'on appelle la "reperfusion-injury".

Ce phénomène apparaît complexe. Bien que plusieurs mécanismes possibles ont été suggérés pour en rendre compte, comme la déplétion en ATP (Jennings *et al*, 1978), une accumulation de calcium intracellulaire (Katz and Reuter, 1979; Nayler, 1981) ou l'activation de phospholipases (Weglicki *et al*, 1972), les *radicaux libres dérivés de l'oxygène* jouent vraisemblablement un rôle important dans les lésions tissulaires se produisant lors de la reperfusion suivant une ischémie (Rubanyi, 1988). Des évidences directes et indirectes concernant l'importance des radicaux libres dans la reperfusion-injury sont apportées par de nombreuses études (Flaherty and Weisfeld, 1988; Simpson and Lucchesi, 1987; Engler, 1989; McCord, 1985).

La reperfusion-injury est donc principalement le résultat de la génération excessive de radicaux libres cytotoxiques intra- et extracellulaire (Tamura *et al*, 1988).

1.2.1.4. LE POINT DE NON-RETOUR :

Beaucoup d'altérations cellulaires produites lors du phénomène de l'ischémie deviennent irréversibles après un certain point. C'est le point de non-retour. La mort cellulaire est inévitable. Son suicide est "programmé", menant à des lésions cellulaires. Au début de l'ischémie, les *lysosomes* apparaissent intacts, dilatés et lumineux. Ce sont ces vacuoles digestives et endosécrétrices qui sont le résultat de la mort de la cellule, et non la cause. Ces vésicules contiennent des hydrolases.

Au point de non-retour, les lysosomes libèrent ces enzymes. Elles sont actives à pH acide. A ce stade de l'ischémie, le pH intracellulaire est faible. Les hydrolases peuvent alors commencer à détruire la cellule. C'est le début de la nécrose cellulaire. La membrane cellulaire se fragmente. La cellule subit donc une dégradation par autolyse. (Hill and La Via, 1980).

Notons, pour conclure, que l'ischémie est présente dans la maladie veineuse (Cornwall *et al*, 1986). Lengyel et Acsady (1990) ont également proposé que l'ischémie peut être la cause du développement de la maladie. Les travaux du laboratoire ont pour la première fois établi une cascade d'évènements biochimiques expliquant le lien entre l'ischémie et le développement de la maladie (Michiels *et al*, sous presse a).

1.2.2. LES VARICES

Les varices sont caractérisées par une dilatation irrégulière et permanente d'une veine. Ces déformations veineuses sont les mieux connues. Elles sont souvent provoquées par une insuffisance des valvules veineuses entraînant un reflux du sang.

Les veines variqueuses sont anormalement dilatées, tordues et très fragiles. On songe généralement en premier lieu aux veines superficielles qui peuvent enlaidir les jambes si elles sont atteintes de varices. Cependant, les varices peuvent se développer dans d'autres parties du corps. Ainsi, les hémorroïdes ne sont rien d'autre que des vaisseaux sanguins dilatés de l'anus (Beunk, 1984).

Parmi les nombreuses causes des varices, citons la faiblesse du tissu conjonctif et du tissu musculaire et la perte de la capacité d'adaptation du tissu veineux. A mesure que l'on avance en âge, ce soutien conjonctif et musculaire a tendance à s'affaiblir. En même temps, les muscles de la jambe s'atrophient. Ils sont généralement moins utilisés. En raison de cette diminution du travail musculaire, la quantité de sang qui aurait dû être expulsée des jambes a tendance à y stagner. Nous sommes alors en présence d'hyperpression et de stases veineuses qui transitoires, deviennent progressivement définitives.

Les différents phénomènes se déroulant lors de pathologies, telles que les varices, impliquent des interactions cellulaires à tous les niveaux. Ce sont ces

modifications de la veine variqueuse, découlant du processus d'activation suite à une ischémie, que nous allons approfondir.

1.2.2.1. LES DIFFERENTES CARACTERISTIQUES DE LA PAROI VARIQUEUSE :

Lors de l'évolution de la maladie, les altérations tissulaires s'installent. Les propriétés initiales de chaque élément sont alors modifiées. Les veines se dilatent, les valvules perdent leur étanchéité. La pression veineuse s'accroît, majorant les contraintes pariétales, sur un tissu de soutien défectueux. Ainsi est atteint le stade des varices.

D'un point de vue tissulaire et cellulaire, tous les éléments de la paroi vasculaire subissent des modifications. Elles sont dues à une suite d'événements provenant d'interactions entre les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses.

Quatre principales modifications dans les vaisseaux variqueux peuvent être d'abord décrites (Niebes, 1977), avant d'en étudier les causes éventuelles :

Conservation de l'endothélium.

Dans les veines variqueuses, l'endothélium est encore présent même si d'autres cellules, comme essentiellement les cellules musculaires lisses, subissent de profonds changements. Les cellules endothéliales sont alors activées et relarguent différents médiateurs influençant les cellules musculaires lisses. Ceci provoquera un remaniement de la paroi vasculaire.

Modification du collagène et présence de radicaux libres.

Les molécules de collagènes et les protéoglycanes sont altérées lors des varices. Le nombre de collagène soluble augmente (Niebes, 1977). Les radicaux libres sont connus pour être capable de fragmenter le collagène et les protéoglycans (Greenwald *et al*, 1976). Les radicaux libres sont, comme diverses protéases, libérés

par les polymorphonucléaire activés et infiltrés dans la paroi vasculaire. Ces deux types de molécules peuvent agir de façon synergique et peuvent être responsable de l'hydrolyse du collagène dans les veines variqueuses.

Présence d'enzymes lysosomaux.

Une large quantité d'enzymes lysosomaux sont présentes dans les couches cellulaires sous-endothéliales de la paroi vasculaire. Ces molécules sont libérées par des polymorphonucléaires et les cellules endothéliales activés.

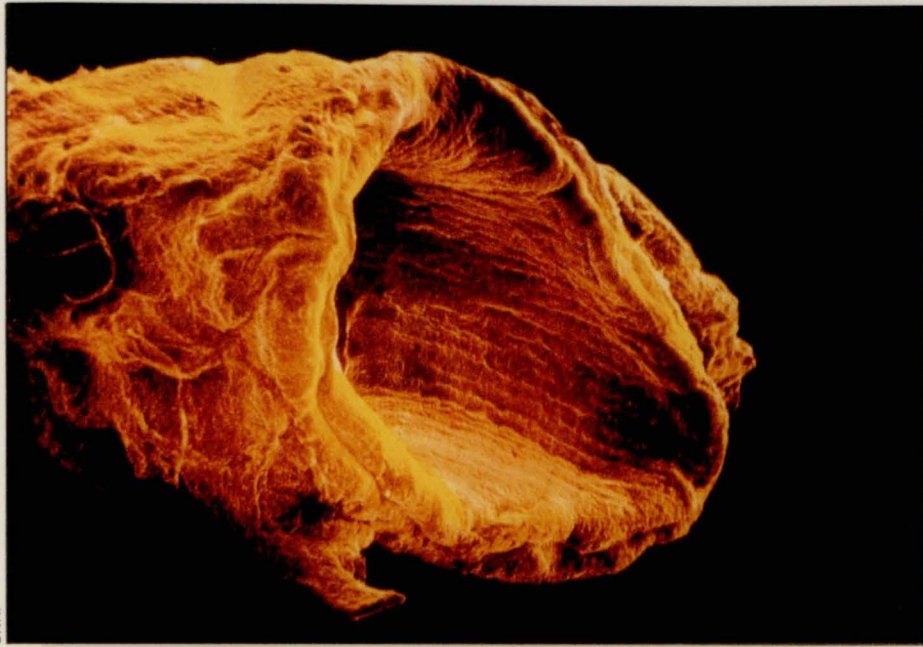
Désorganisation de la paroi vasculaire.

Lors des varices, la paroi veineuse subit un remaniement général. Cette désorganisation touche essentiellement le tissu conjonctif et musculaire.

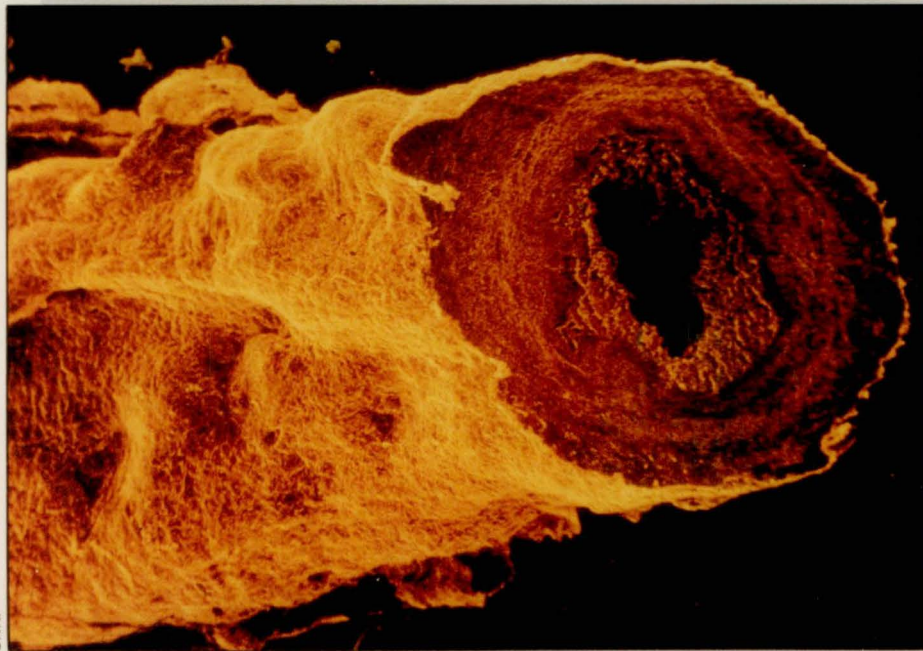
On observe un épaissement de l'intima. Ce phénomène est typique des veines variqueuses. Il est dû à la *prolifération des cellules musculaires lisses* et de leur migration de la média vers l'intima (Ross, 1981; Weissberg, 1991). Il a été montré qu'elles prolifèrent lors d'hypertension hypoxique *in vivo*, suite à une activation de la protéine kinase C (Dempsey *et al*, 1991). Ces cellules musculaires lisses deviennent alors le principal type cellulaire dans la tunique interne de la paroi.

Le processus de l'épaississement de l'intima peut être divisé en plusieurs étapes : initiation de la prolifération des cellules musculaires lisses, migration et enfin déposition de la matrice extracellulaire (Clowes *et al*, 1989).

La prolifération et la migration des cellules musculaires lisses peuvent être attribuées aux facteurs de croissance (Weissberg, 1991), libérés par des polymorphonucléaires (Ross, 1981; Fingerle *et al*, 1989), par les cellules endothéliales activées (Clowes *et al*, 1989) ainsi que par des cellules musculaires lisses déjà stimulées (Golden *et al*, 1987). Les différents facteurs, synthétisés par les cellules endothéliales, sont décrits au point 1.1.4.2. Rappelons que les cellules endothéliales activées peuvent également sécréter des facteurs inhibiteurs de la croissance cellulaire (héparine et héparan sulfate) (Clowes *et al*, 1989; Hassoun *et al*, 1989). Vender *et al* (1987) ont déjà montré que la réduction de la tension en oxygène induit la libération, par l'endothélium, de mitogènes pour les cellules musculaires lisses *in vivo*. Le PDGF est, de façon indirecte, responsable des



a



b

Illustration 7 :
Photographies en microscopie à balayage mettant en évidence les remaniements structurels de la paroi d'une veine pathologique (b) par rapport à la structure d'une veine saine (a).

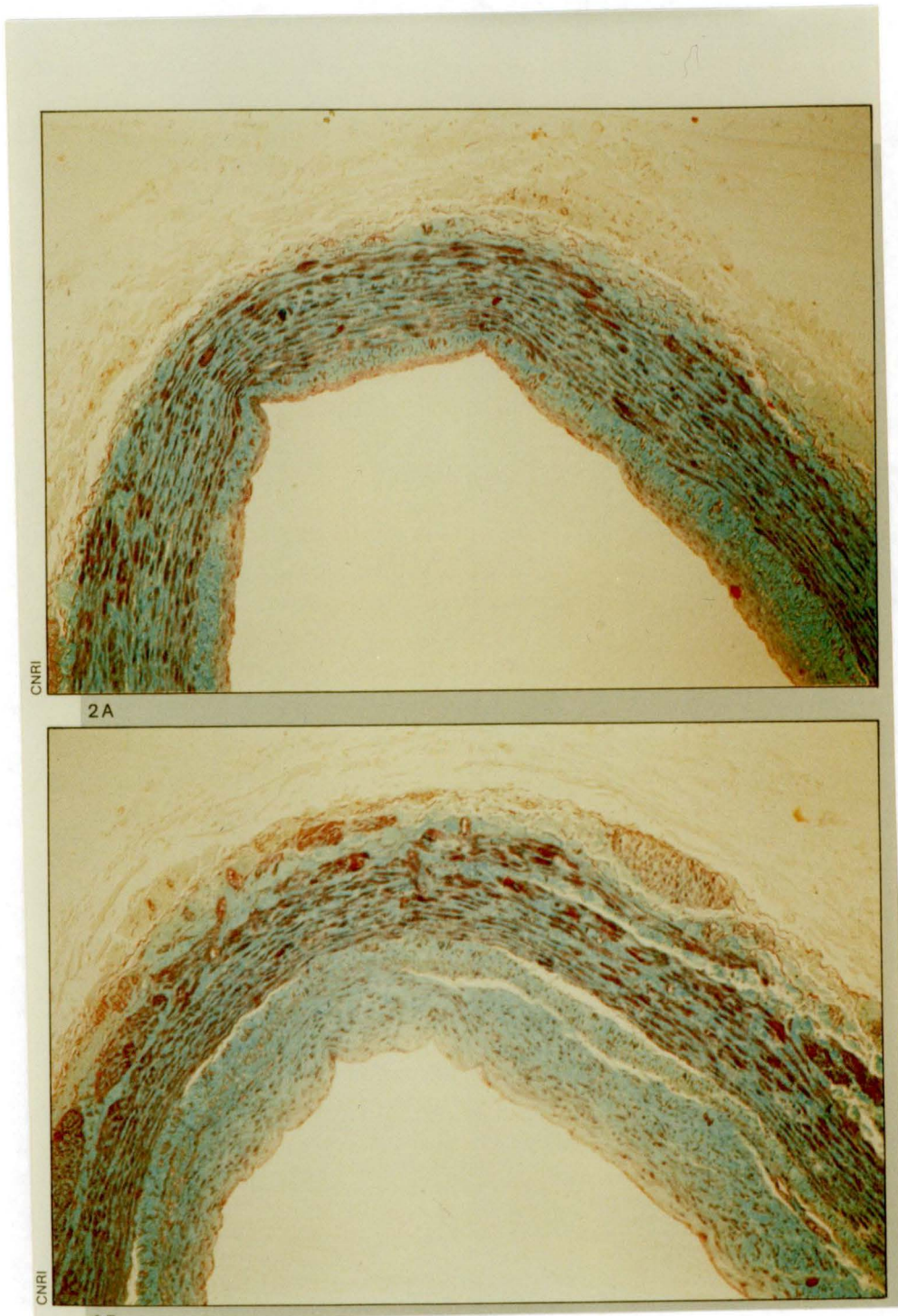
modifications des flux ioniques transmembranaires et de la libération du calcium des réserves intracellulaires, entraînant une augmentation de la concentration intracellulaire du calcium. Le calcium est également un important médiateur de la prolifération des cellules musculaires lisses (Weissberg, 1991; Michel *et al*, 1990). Le PDGF est également responsable de la migration des cellules musculaires lisses (Fingerle *et al*, 1989).

Les cellules musculaires lisses, pour proliférer, doivent passer de l'état contractile à l'état métabolique. Cette modulation phénotypique apparaît être indispensable pour la division de ces cellules (Weissberg, 1991). Cet état synthétique leur donne, en plus de la capacité de proliférer, la capacité de produire des protéines de la matrice extracellulaire et des divers types de fibres de collagènes (Weissberg, 1991), différents de ceux synthétisés lors de leur état contractile (Ross, 1981). Elles perdent aussi des filaments d'actine- α , de desmine et de myosine (Yamamoto *et al*, 1992; Kocher *et al*, 1991). Ces filaments contractiles sont remplacés par des organites de synthèse tels que le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Weissberg, 1991).

Ces changements fonctionnels chez les cellules musculaires lisses entraînent des modifications quantitatives et qualitatives dans la synthèse des protéines du tissu conjonctif. L'augmentation de l'épaississement de l'intima est due surtout à une accumulation de matrice extracellulaire (Clowes *et al*, 1989; Durmowicz *et al*, 1991). Ces éléments subissent en plus une hydrolyse partielle par les molécules, comme par exemple des radicaux libres, libérées par les monocytes et les macrophages infiltrés dans la paroi de la veine (Weissberg, 1991). Cette infiltration est rendue possible par une altération de la perméabilité de la barrière endothéliale (Ross, 1981).

Tout ceci explique la désorganisation observée dans ces vaisseaux variqueux (illustrations 7 et 8). Cette désorganisation du tissu conjonctif et la perte de la contractibilité des cellules musculaires lisses conduisent également à des altérations du tonus vasculaire. Cependant, ces processus peuvent être réversibles. L'intégrité de la paroi vasculaire peut alors être reconstituée (Ross, 1981).

En conclusion, on remarque que l'activation des cellules endothéliales, après ischémie, est le facteur initial de la maladie veineuse (Michiels, sous presse a). L'endothélium paraît jouer un rôle important dans le remaniement vasculaire, en produisant des médiateurs qui modifient la structure des veines en interagissant avec les cellules musculaires lisses, lors des pathologies veineuses (Ross, 1981; Gibbons and Dzau, 1990; Weissberg, 1991).



a

b

Illustration 8 :
Photographies de coupes histologiques transversales mettant en évidence les remaniements structurels de la paroi d'une veine pathologique (b) par rapport à la structure d'une veine saine (a).

1.3. BUT DU MEMOIRE

Comme nous venons de le décrire, le phénomène d'ischémie vasculaire répété conduit à un remaniement complet de la paroi des vaisseaux sanguins et en particulier des veines. Si l'endothélium reste intact, les cellules musculaires lisses passent d'un état contractile à un état synthétique caractérisé par une prolifération accrue. Ces altérations sont morphologiquement bien décrites mais les mécanismes biochimiques responsables de ce processus restent inconnus. Il était donc intéressant de développer un modèle *in vitro* qui reproduise ces altérations. Un modèle *in vitro* permet en effet de cibler un type cellulaire bien précis en éliminant les autres composants qui sont toujours présents lors d'expérimentations sur des organes isolés et perfusés ou sur des organismes entiers.

Deux hypothèses devaient être envisagées concernant la prolifération des cellules musculaires lisses observée dans ces pathologies : soit l'hypoxie agit directement sur ces cellules en les activant, soit, comme Thierry Arnould l'a montré au laboratoire, l'hypoxie active les cellules endothéliales et celles-ci libèreraient des facteurs qui influenceraient ensuite l'état métabolique des cellules musculaires lisses.

Ces deux hypothèses ont été testées dans le cadre de ce travail et sont décrites dans les deux grandes parties de ce mémoire.

Dans un premier temps, nous voulions voir s'il existe un effet direct de l'hypoxie sur les cellules musculaires lisses. Ceci a été réalisé en comparaison avec les résultats déjà obtenus sur les cellules endothéliales (Arnould *et al*, 1992; Michiels *et al*, sous presse b). Différentes expériences ont été réalisées :

- Nous avons ainsi étudié la viabilité cellulaire après hypoxie. Ce paramètre a été suivi par deux méthodes différentes : par la méthode à l'hexoaminidase et par la méthode à l'érythrosine.

- Nous avons ensuite observé l'effet de la réoxygénation sur la récupération de la prolifération des cellules musculaires lisses après hypoxie.

- Puis, nous avons étudié l'activation éventuelle de ces cellules après hypoxie. Cette étude a été réalisée par la mesure de la concentration en calcium intracellulaire et par la mesure de l'activation de la phospholipase A₂ et de la synthèse des prostaglandines.

- Enfin, nous avons observé si la privation d'oxygène avait un effet sur la morphologie des filaments d'actine et de myosine, filaments contractiles des cellules musculaires lisses, par un double marquage en immunofluorescence.

Dans la deuxième partie de ce mémoire, nous avons étudié l'effet de surnageants de cellules endothéliales ayant subi une hypoxie sur la prolifération des cellules musculaires lisses. Nous avons ensuite essayé de déterminer, grâce à des inhibiteurs de différentes voies métaboliques, quel(s) type(s) de facteur de croissance pouvai(en)t stimuler la prolifération des cellules musculaires lisses. Après avoir trouvé le facteur mitogène, nous l'avons ajouté au milieu de ces cellules pour démontrer son effet sur la prolifération cellulaire.

Ces deux approches nous ont ainsi permis de mieux comprendre les phénomènes biochimiques qui se déroulent *in vivo* au niveau de la paroi vasculaire lors d'une ischémie.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. LES CELLULES ENDOTHELIALES

2.1.1. MISE EN CULTURE DE CELLULES ENDOTHELIALES DE LA VEINE OMBILICALE HUMAINE

Les cellules endothéliales sont isolées à partir de la veine de cordons ombilicaux humains selon la méthode décrite par Jaffe *et al.* (1973). Les cordons sont stockés à 4 °C juste après la naissance dans une solution de conservation équilibrée et tamponnée, à laquelle on ajoute des antibiotiques. Cette solution stérile se compose de KCl 4 mM, NaCl 140 mM, Hépes 10 mM, glucose 1 mM, streptomycine 100 µg/ml (Sigma, St Louis), pénicilline 100 U/ml (Sigma, St Louis, USA) et fungizone [amphotéricine B] 0,25 µg/ml (Sigma, St Louis, USA), pH 7,3. Ce milieu est préalablement stérilisé par filtration (pompe péristaltique et filtre 0,22µm, Millipore) et conservé à 4°C dans des récipients stérilisés à l'alcool dénaturé .

Mode opératoire

Les différentes étapes de la mise en culture se déroulent sous hotte à flux laminaire et requièrent l'emploi d'un matériel stérilisé (Stérilisateur-Autoclave).

Avant la mise en culture, le cordon est rincé avec 50 ml de solution saline (0,15 M en NaCl) et tamponnée par du phosphate 10 mM (PBS : phosphate buffer saline), pH 7,4 stérilisée par filtration sur un filtre Stérvex GV 0,22 µm (Millipore, France). Cette solution contient les antibiotiques et la fungizone aux mêmes concentrations que le milieu de récolte. La veine est cannulée avec deux cathéters et incubée avec 3-4 ml de collagénase type II (Sigma, St Louis, MO) 0,05 % dans du PBS pendant 35 minutes à 37 °C dans une boîte de Pétri. La collagénase détache les cellules endothéliales de la membrane basale. On les récolte ensuite dans du milieu

M199 additionné de 20 % de sérum de veau foetal. Le milieu M199 se compose de sels de Hanks, Hépes 10mM, NaHCO_3 1,75 g/l, L-glutamine 100 mg/l (Gibco, Grande-Bretagne) et est porté à pH 7,2 avec du NaOH. Ce milieu est destiné ici à récupérer un maximum de cellules et à inhiber la collagénase. Elles sont alors centrifugées 10 minutes à 1000 rpm et placées dans 6 ml de milieu de culture dans des boîtes de culture de 25 cm² (Cell-Cult, Sterilin, Grande-Bretagne : T25) préalablement recouvertes de gélatine (Merck, RFA.) à 0,20 %. Ce substrat organique est nécessaire pour l'adhérence des cellules endothéliales sur le fond de la boîte ainsi qu'à leur multiplication. Après un jour, les cellules qui se sont attachées sont rincées afin d'éliminer les globules rouges, les cellules mortes et d'éventuelles autres cellules sanguines.

On suit l'évolution de la culture en observant la croissance des cellules en microscopie à contraste de phase. La surveillance du milieu de culture et plus particulièrement de l'indicateur de pH qu'il contient nous renseigne sur le moment opportun pour le renouveler.

Pour toutes les expériences réalisées, les cellules sont utilisées après le premier repiquage.

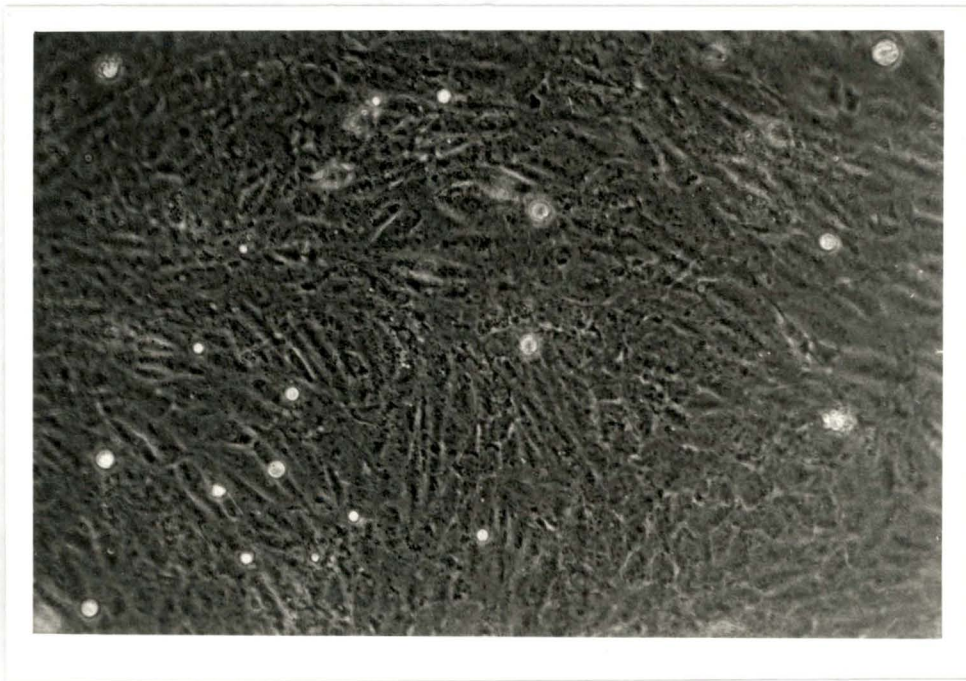
2.1.2. REPIQUAGE DES CELLULES ENDOTHELIALES

Lorsque les cellules arrivent à confluence et forment une monocouche cellulaire, on rince la boîte deux fois pendant 2 à 3 minutes avec du M199 (ou du milieu de rinçage ne contenant pas de sérum), on ajoute ensuite 2 ml de trypsine + EDTA 0,25 % (Gibco, Grande-Bretagne). L'EDTA chélate les ions Ca^{++} et accélère la trypsinisation. Les boîtes sont alors incubées 3-4 minutes à 37 °C. L'évolution de la trypsinisation est suivie au microscope optique à contraste de phase (Zeiss).

Lorsque les cellules se détachent, on ajoute du M199 + sérum afin d'inhiber l'action de la trypsine et on récupère les cellules dans un tube (Sterilin, Grande-Bretagne) à l'aide d'une pipette pasteur, après avoir splashé.

La centrifugation et les étapes ultérieures sont identiques à celles de la mise en culture. On décante le surnageant contenant la trypsine et le culot cellulaire est resuspendu dans un volume adéquat de milieu de culture M199+sérum.

Le choix du type de boîtes de culture pour le repiquage est entièrement déterminé par l'utilisation ultérieure des cellules.



Photographie 1 :
Photographie représentant les cellules musculaires lisses (A7r5) arrivées à confluence
(grossissement 115 X).

2.2. LES CELLULES MUSCULAIRES LISSES

Les cellules musculaires lisses (CML) proviennent d'une lignée cellulaire isolée à partir d'une aorte de rat (A7r5) disponible à l'ATCC (American Tissue Culture Collection). Cette lignée est immortelle et ses caractéristiques sont décrites dans l'introduction au point 1.1.5.1.2. Elles poussent dans des boîtes de culture de 75 cm² (Cell-Cult, Sterilin, Grande-Bretagne : T75) contenant 20 ml de Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, Grande-Bretagne) additionné de 10% de sérum de veau foetal (D+S) dans lequel on fait buller une atmosphère contenant 8% de CO₂ - 92% d'air. Cette concentration de gaz carbonique est nécessaire pour maintenir d'une façon optimale le pH du milieu de culture. Le milieu Dulbecco est porté à pH 7,2 avant de le filtrer.

2.2.1. REPIQUAGE DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES

Lorsque les cellules arrivent à confluence et forment une monocouche, on rince la boîte une fois pendant deux minutes avec 10 ml de milieu de rinçage ne contenant pas de sérum. On décante à la pipette Pasteur et on ajoute 2 ml de trypsine. Après quelques secondes, on observe déjà que la trypsinisation est commencée. On décante alors la trypsine. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant une dizaine de minutes.

Quand les cellules commencent à se détacher de la boîte, on ajoute 10 ml de D+S et on splash.

Le choix du type de boîtes de culture pour le repiquage est entièrement déterminé par l'utilisation ultérieure des cellules. Pour les sous-cultures, on divise en deux le volume de la T75 avec les cellules en suspension dans deux nouvelles boîtes. On passe alors à la génération suivante, 1 T75 donnant 2 T75 soeurs avec la même quantité de cellules.

La photographie 1 représente les cellules musculaires lisses (A7r5) arrivées à confluence.

2.3. MODELE IN VITRO D'HYPOXIE-REOXYGENATION

2.3.1. MODE OPERATOIRE

L'ischémie-reperfusion est simulée en exposant les cellules à une hypoxie sévère (atmosphère composée à 100 % d'azote) suivie d'une réoxygénation dans une atmosphère normale, c'est-à-dire contenant 20 % d'oxygène. Dans toutes les expériences ayant pour but la mesure de viabilité cellulaire, soit par la méthode à l'érythrosine soit par celle à l'hexoaminidase, nous avons adopté la démarche suivante:

- Les cellules sont repiquées dans des boîtes de Pétri, comme décrit au point 2.2.1:

a) Pour le test à l'érythrosine :

On les repique dans des boîtes de 6 cm de diamètre (Falcon, New Jersey) préalablement quadrillée à l'aide d'un diamant stérilisé à l'alcool. Pour faciliter le comptage, les cellules sontensemencées à faible densité, 500 cellules/cm² dans 4 ml de D+S.

b) Pour le test à l'hexoaminidase :

Les cellules sont repiquées dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre (Falcon, New Jersey) contenant 2 ml de D+S. Les cellules sontensemencées à une densité moyenne calculée grâce au comptage préalable des cellules en suspension dans la T75 (Cellule de Neubauer).

- Le jour suivant, juste avant l'expérience, on décante le milieu et on réalise deux rinçages avec 1,5 ml de "Hank's Balanced Salt Solution" (HBSS dont la composition est: NaCl 140 mM, Glucose 5,5 mM, KCl 5 mM, MgSO₄ 0,4 mM, MgCl₂ 0,5 mM, Na₂HPO₄ 4,3 mM, KH₂PO₄ 0,4 mM, pH 7,2). Le CaCl₂ est ajouté avant l'expérience à la concentration de 1 mM. Cette solution physiologique est réduite à un fin film uniforme pour faciliter la diffusion des gaz, c'est-à-dire 1,5 ml et 0,7 ml d'HBSS respectivement pour les boîtes de Pétri de 6 et 3,5 cm de diamètre.

- L'hypoxie est produite en exposant les cellules à une atmosphère de 100 % d'azote (N₂). La PO₂ du milieu est alors inférieure à 10 mmHg. Pendant l'incubation, les cellules sont placées en chambre chaude (37 °C) sur un agitateur mécanique.

- La réoxygénation est restaurée en plaçant les cellules dans une étuve à 37 °C (95 % air humide-5 % CO₂). On ajoute une quantité appropriée de Dulbeco+S pendant la réoxygénation afin d'éviter la dessiccation des cellules. Pour ne pas avoir de problème de contamination après les 24 heures de réoxygénation, toutes les opérations sont effectuées stérilement sous hotte à flux laminaire.

2.3.2. ESTIMATION DE LA VIABILITE CELLULAIRE

a) Pour le test à l'érythrosine, on compte les cellules avant l'hypoxie (microscope optique). Puis on réalise un comptage directement après hypoxie pour les boîtes de cellules qui ne subissent pas de réoxygénation. Les cellules réoxygénées le sont dans 4 ml de D+S pendant 24 heures, après avoir décanté et rincé une fois les boîtes à l'HBSS. On prend comme contrôles des boîtes de cellules non exposées à une atmosphère de 100 % d'azote, et placées dans les même conditions que les autres (contrôle air).

L'estimation de la viabilité cellulaire est réalisée en suivant l'incorporation d'érythrosine B après les différentes incubations. On couvre les cellules avec 2 ml d'une solution d'érythrosine B (0,4 %) dans du PBS pendant 2 minutes. Pour chaque détermination, un minimum de 150 cellules sont comptées. Les cellules incapables d'exclure le colorant vital sont considérées comme mortes (Philipps, 1973).

La formule permettant de calculer la viabilité cellulaire reposant sur le principe d'exclusion d'un colorant vital est la suivante :

$$\% \text{ de cellules vivantes} = \frac{\text{nombre de cellules non colorées après hypoxie}}{\text{nombre de cellules avant hypoxie}} \times 100$$

b) Pour la méthode à l'*hexoaminidase*, on décante le milieu et on rince une fois avec de l'HBSS après l'incubation dans la chambre chaude. On ajoute 2 ml de D+S pour la réoxygénation. On incube les boîtes pendant deux heures à 37°C avec 0,5 ml de solution C. Cette solution conservée à -20°C est composée, dans un rapport 1/1, d'une solution A et d'une solution B. Solution A : P-nitrophénol-N-acétyl-B-D glucosaminide 7,5 mM (Sigma, Saint-Louis, USA) dans tampon citrate 100 mM (Merck, Allemagne) à pH 5. Solution B : triton X100 0,5 % (Merck, Allemagne) (Landegren, 1984). Les contrôles ne subissent pas d'hypoxie.

L'estimation de la viabilité cellulaire est représentée par l'absorbance à 405 nm (spectrophotomètre), après avoir ajouté 1 ml de tampon glycine 150 mM (Janssen Biochimica, Belgique) + EDTA 5 mM (Merck, Allemagne) pH 10,4 , à conserver à 4°C. Le principe réside dans l'activation d'une enzyme qui utilise comme substrat la solution C. La N-acétyl- b-D-Hexoaminidase est une enzyme lysosomale ayant pour rôle de dégrader les constituants cellulaires glycosylés. Son dosage permet une quantification indirecte de la prolifération cellulaire. Le produit enzymatique apparaît jaune à pH basique. Plus la valeur de la D.O. est haute, plus il y a d'enzyme donc plus il y a de cellules vivantes.

2.4. DOSAGE DU CALCIUM LIBRE PAR LA SONDE FURA-

2

Pour toutes les expériences relatives au calcium, les cellules musculaires lisses sont repiquées selon la méthode décrite au point 2.1. La solution finale comprenant les cellules est répartie dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre (Falcon, New Jersey) à raison de 2 ml par boîte. Dans chacune d'elle, on a préalablement déposé un couvre-objet en verre (13 mm x 27 mm) stérilisé à l'alcool.

2.4.1. CHARGEMENT DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES AVEC LE FURA-2 AM

2.4.1.1. PRINCIPE :

Afin de mesurer les concentrations en calcium libre cytosolique, nous avons utilisé la sonde fluorescente Fura-2 selon la méthode décrite par Grynkiewicz *et al.*(1985). Le Fura-2 se présente sous la forme d'un ester acétoxyméthyl (Fura-2 AM) qui permet à la sonde de pénétrer dans les cellules.

En effet, une sonde fluorescente doit être capable de traverser la membrane cellulaire. Cependant, les indicateurs fluorescents présentent souvent un caractère hydrophile car ce sont des anions polycarboxyliques sous leur forme non estérifiée qui ne peuvent dès lors traverser la bicouche lipidique hydrophobe. Le passage transmembranaire est rendu possible par la présence de cette estérification. Une fois incorporée dans le cytoplasme, l'indicateur sera clivé par des estérases cytosoliques libérant la sonde active capable de complexer le Ca^{2+} avec une stoechiométrie 1:1. La perte de ce groupement ester empêchera la sonde de ressortir de la cellule et d'entrer dans les organites limitant donc la mesure au calcium cytosolique (Tsien *et al.*,1984). La fluorescence est obtenue après l'excitation de la molécule (absorption d'un photon). Un électron passe d'un niveau vibrationnel de son niveau fondamental à l'un des niveaux vibrationnels d'un état excité. L'électron pour revenir à son état fondamental doit dissiper son énergie sous forme de photon provoquant ainsi un phénomène de fluorescence. La longueur d'onde d'émission est plus grande que la longueur d'onde d'excitation et est caractéristique de l'élément considéré (510 nm). Les mesures se font à température ambiante (20°C). La constante de dissociation (Kd) du Fura-2 à cette température est de 135 nmoles.

2.4.1.2. CONSERVATION DU FURA-2 :

La sonde estérifiée Fura-2 AM (Molecular Probe, USA) est fournie à la concentration de 1 mM dans du diméthylsulfoxyde (DMSO). Pour rendre la sonde sous une forme facilement utilisable, nous la mélangons avec du DMSO dans rapport 1/10.

2.4.1.3. CHARGEMENT DES CML AVEC LE FURA-2 AM :

La solution stock est décongelée à l'abri de la lumière et 2,5 µl de Fura-2 AM 0,1mM sont ajoutés à 1 ml de milieu de culture Dulbeco+S. On y ajoute également 1,25 µl d'acide pluronique, 20% dans de l'eau distillée; cette molécule facilite la pénétration de la sonde dans les cellules. La concentration finale du Fura-2 est de 2 µM. Les cellules sont alors incubées en présence de la sonde pendant 60 min à 37°C.

Ensuite, on décante le milieu de culture et on réalise 3 lavages doux avec 2 ml d'HBSS pH 7,3, 37°C (pour ne pas détacher les cellules du couvre-objet) afin d'éliminer l'excès de sonde fluorescente. La monocouche cellulaire est recouverte de 0,7 ml de HBSS et incubée sous hypoxie.

2.4.1.4. HYPOXIE DES CML CHARGÉES :

L'hypoxie est réalisée comme décrite au point 2.3.1.

2.4.2. MESURE SPECTROFLUORIMETRIQUE EN LA CONCENTRATION DE CALCIUM INTRACELLULAIRE

2.4.2.1. PRINCIPE :

La fluorescence émise par la sonde est mesurée au moyen d'un spectrofluorimètre Kontron SFM-25. Le monochromateur est placé successivement à 340, 358 et 380 nm pour la longueur d'onde d'excitation. Ces longueurs d'onde sont absorbées par la sonde qui devient à son tour une source d'émission fluorescente pour un second monochromateur placé à 90° et qui sélectionne le signal réémis à 510 nm. La sensibilité utilisée est de 400 V. L'intensité de fluorescence est alors mesurée par un photodétecteur.

- Après les temps d'incubation sous hypoxie, on transfère les couvre-objets portant les cellules chargées dans une cuvette en quartz à 4 faces polies (Hellma, Benelux) et remplie au préalable avec 3 ml de HBSS ($\text{Ca}^{2+} = 1\text{mM}$). Le couvre-objet est disposé sur la diagonale de la cuvette de façon à former un angle de 45° avec les sources d'excitation et d'émission.

- Les étapes permettant de déterminer la concentration en calcium sont les suivantes:

1) Après quelques secondes nécessaires pour stabiliser la température, on expose successivement la monocouche de cellules aux longueurs d'onde d'excitation de 340, 358, et 380 nm et on mesure les intensités fluorescentes correspondantes. Ces 3 valeurs sont respectivement nommées F340 (Fx), F358 et F380 (Fx). Le passage de 340 à 380 nm doit se faire très rapidement.

2) On ajoute ensuite 30 μl de Triton X-100 (Merck, RFA) à 10% dans du HBSS, pH 7,4 qui a pour effet de perméabiliser les cellules et de provoquer une fluorescence maximale par exposition de la sonde à un excès de calcium. On mesure alors les valeurs maximales appelées F 340 max, F 358 max et F 380 max.

3) On ajoute alors 300 μl d'EDTA dans un tampon TRIS (EDTA 50 mM, TRIS 1M, pH 8,3). L'EDTA à la concentration finale de 5 mM est suffisante pour chélater tout le calcium présent et maintenir la sonde sous forme libre. On lit alors les valeurs de F340 min, F358 min, et F380 min.

4) Afin d'obtenir la valeur d'autofluorescence des cellules et du couvre-objet à 340 et 380 nm, on ajoute 3 μl de MnCl_2 1M. Ces valeurs sont respectivement nommées AF340 et AF 380.

2.4.2.2. MÉTHODE DE CALCUL DE LA CONCENTRATION EN CALCIUM :

La méthode de calcul se base sur les rapports de fluorescence (Grynkiewicz *et al.*, 1985). Toutes les intensités fluorescentes obtenues à 340 et 380 nm sont corrigées en ajustant les valeurs à un plateau fixe de 500 et en discriminant les valeurs d'autofluorescence respectives selon la formule:

$$F_x(\text{nm}) \text{ ajustée} = F_x(\text{nm}) + (500 - F_{358}) - AF_x(\text{nm})$$

La formule permettant de déterminer la concentration en calcium cytosolique libre est complexe et se base sur les rapports entre les valeurs de fluorescence obtenues à 340 nm et à 380 nm.

$$[\text{Ca}^{2+}]_i \text{ (nanomole/litre)} = K_d \text{ } 20^\circ\text{C} \frac{(R - R_{\text{min}}) \times F_{380 \text{ min}}}{(R_{\text{max}} - R) \times F_{380 \text{ max}}}$$

$$\text{où, } R = \frac{F_{340} + (500 - F_{358}) - AF_{340}}{F_{380} + (500 - F_{358}) - AF_{380}}, \quad R_{\text{min}} = \frac{F_{340 \text{ min}}}{F_{380 \text{ min}}}, \quad R_{\text{max}} = \frac{F_{340 \text{ max}}}{F_{380 \text{ max}}}$$

$K_d \text{ } 20^\circ\text{C}$, la constante de dissociation du calcium avec la sonde vaut 135 nanomoles à 20°C .

2.5. MESURE DE LA LIBERATION D'ACIDE ARACHIDONIQUE ($[^3\text{H}]$ -AA) ET D'ACIDE STEARIQUE ($[^{14}\text{C}]$ -AS) RADIOACTIF

2.5.1. PRINCIPE

Les cellules incubées à 37°C ont la capacité d'incorporer de l' $[^3\text{H}]$ -acide arachidonique dans les phospholipides membranaires. Ces cellules marquées, une fois stimulées, libèrent sous l'action de la phospholipase A_2 (PLA $_2$), l' $[^3\text{H}]$ -acide arachidonique estérifié en position sn-2 des phospholipides (Walsh *et al*, 1981). Il est dès lors possible de "doser" indirectement l'activité de cette enzyme en mesurant la quantité de radioactivité associée à l'acide arachidonique qui est relargué à partir des phospholipides au cours de la stimulation des cellules. L'acide stéarique quant à lui est préférentiellement incorporé en position sn-1 des phospholipides (Nagao *et al*. 1991) et n'est donc pas libéré par la PLA $_2$, mais par d'autres phospholipases.

2.5.2. MATERIEL

$[^3\text{H}]$ -acide arachidonique (Amersham, Belgique) avec une activité spécifique de 51,3 mCi/mmol.

$[^{14}\text{C}]$ -acide stéarique (Amersham, Belgique) avec une activité spécifique de 54 mCi/mmol.

2.5.3. METHODE

Les cellules musculaires lisses sont repiquées à une densité de 50 000 cellules par boîte de Pétri ($\varnothing=35$ mm) et marquées en présence de 0,125 mCi/ml d' $[^3\text{H}]$ -AA de Dulbeco+hydrolysate de lactalbumine (HLA à 0,2%) pendant 24 heures. Des boîtes soeurs sont quant à elles marquées en présence de 0,125 mCi/ml $[^{14}\text{C}]$ -

acide stéarique. Après ce temps d'incorporation, les cellules sont rincées 4 fois avec 1 ml de HBSS (pH 7,4) avant d'être exposées sous hypoxie.

Après incubation, on prélève 200 µl du surnageant de chacun des tests (et ce pour chaque isotope) auxquels on ajoute 5 µl d'Aqualuma (Lumac, Landgraaf, NL). Les fioles sont ensuite mises à compter pendant 3 min dans un compteur à scintillation (Beckman).

Immédiatement après le marquage de 24 heures, la radioactivité totale incorporée par les cellules est aussi comptée après une lyse des cellules avec 0,7 ml de NaOH (0,5N). Les pourcentages d'incorporation sont respectivement d'environ 80 et 20 % pour l'acide arachidonique et l'acide stéarique pour les cellules musculaires lisses A7r5.

Le pourcentage d'acide gras marqué libéré est calculé comme suit (Godfrey *et al*, 1987):

$$\text{Libération de l'acide gras (\%)} = \frac{\text{dpm dans le surnageant cellulaire}}{\text{dpm dans le lysat cellulaire}} \times 100$$

2.6. DOSAGE DES PROSTAGLANDINES EN GC-MS

La mesure de la synthèse des prostaglandines est réalisée selon la méthode mise au point en laboratoire par I.Knott et M.Dieu (Knott *et al*, soumis pour publication).

2.6.1. SOLUTIONS

Les réactifs utilisés pour l'*extraction* sont:

- HCl (Merck, RFA)
- Méthanol (Janssen Chimica, Belgique)
- Ethanol (Merck, RFA)

- Hexane (Janssen Chimica, Belgique)
- Méthylformiate (Merck, RFA)
- Prostaglandines deutérées (Cayman Chemical CO, USA) à une concentration de 10 ng/ml dans de l'éthanol absolu et conservées à -70 °C.

Les réactifs utilisés pour la *dérivatisation* sont:

- Bromure de PFB (2,3,4,5,6-pentafluor-benzylbromide) (Aldrich Chemie, RFA)
- N-éthyl-diisopropylamine (Aldrich Chemie, RFA)
- BSTFA (Bis[triméthylsilyl] trifluoroacétamide) (Janssen Chimica, Belgique)
- Méthoxime HCl (Janssen Chimica, Belgique)
- Acétonitrile (Janssen Chimica, Belgique)
- Dodécane (Janssen Chimica, Belgique)
- Pyridine sèche (Merck, RFA)

2.6.2. METHODE

Pour l'expérience visant à montrer l'effet de l'hypoxie sur la synthèse des prostaglandines (PGE₂, PGD₂, PGF₂α et PGI₂) par les cellules musculaires lisses, nous repiquons 100 000 cellules dans du Dulbecco + hydrolysate de lactalbumine (HLA à 2%) par boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre (Falcon, New Jersey). Les cellules sont utilisées lorsqu'elles arrivent à confluence. On rince chaque boîte avec 2 x 1 ml de HBSS (pH 7,2), on ajoute ensuite 0,7 ml de HBSS et les cellules sont incubées sous hypoxie.

Après les incubations sous hypoxie, on prélève le milieu de chaque boîte et on le transfère dans un tube en plastique (Stérilin, Grande-Bretagne). A chacun des tubes, on ajoute une quantité déterminée de prostaglandines deutérées : 7 ng de PGE₂, 1,75 ng de PGF₂α et 3,5 ng de 6-cétoPGF₁α pour les expériences où les cellules sont soumises à l'hypoxie et à l'air, et 4, 1, 2 de prostaglandines deutérées pour le contrôle correspondant à la synthèse des prostaglandines pendant 24 heures dans les conditions normales (Dulbecco + 0,2% d'hydrolysate de lactalbumine). Cette quantité est fonction de la quantité produite par les cellules. Les prostaglandines deutérées servent de standard interne et subiront les mêmes étapes expérimentales que les prostaglandines produites par les cellules. Ces fractions peuvent être conservées momentanément à

-70°C jusqu'à l'extraction des prostaglandines. Le tapis cellulaire est récupéré en ajoutant 1 ml de NaOH 0,5 N. Ceci nous permet de faire un dosage de protéines réalisé selon la méthode décrite par Lowry *et al.* (1951). La quantité de prostaglandines sera donc rapportée à la quantité de protéines et tous les résultats seront exprimés en ng de PG / mg de protéines.

2.6.2.1. EXTRACTION DES PROSTAGLANDINES :

- Aux différents tubes contenant le surnageant des cellules, on ajoute 0,25 ml de HCl 1M par ml de milieu récolté. Le pH de la solution est alors fort acide.

- On réalise l'extraction en utilisant un appareil relié à une pompe à vide (JT Backer-10 SPE System, Chemical CO, USA). Ce système sert de support aux colonnes éthyl-silice (C2 Amersham, Grande-Bretagne) utilisées pour extraire les prostaglandines.

- Les milieux sont déposés délicatement sur les colonnes conditionnées avec 2 ml de méthanol puis 2 ml d'eau distillée.

- Les colonnes sont ensuite lavées avec 5 ml d'eau distillée, 5 ml d'éthanol 10 % et 5 ml d'hexane. L'élution des prostaglandines se fait lors du passage de 5 ml de méthylformiate.

Les échantillons peuvent être congelés à -70 °C jusqu'à la dérivation

2.6.2.2. DERIVATISATION DES PROSTAGLANDINES :

Les étapes de la dérivation se basent sur la méthode décrite par Waddel *et al.* (1983). La dérivation permet la détection des PGs en ionisation chimique négative, une détection plus spécifique en alourdissant les molécules et de les rendre plus volatiles en masquant les groupements polaires. Les tubes sont évaporés à sec sous un flux d'azote.

- A chaque tube, nous ajoutons 50 µl de bromure de PFB dissous dans de l'acétonitrile (7% V/V) et 10 µl de diisopropylamine. Après une agitation au vortex, les tubes sont incubés pendant 10 min à température ambiante.

- Après évaporation sous azote, on ajoute 50 μ l de méthoxime HCl dissous dans de la pyridine sèche à une concentration de 2 %. On incube 90 minutes à température 60°C.

- Les échantillons sont ensuite évaporés sous azote. On ajoute 50 μ l de BSTFA dissous dans de la pyridine sèche (2:1 v/v). Les tubes sont incubés pendant 20 minutes à 60 °C.

- Après une dernière évaporation, les prostaglandines sont resuspendues dans 50 μ l de dodécane. Les tubes sont centrifugés 10 minutes à 3000 rpm (Hettich Universal). Le surnageant récupéré peut être congelé à -70 °C avant l'injection dans le GC-MS.

2.6.2.3. DETECTION ET LA QUANTIFICATION DES PROSTAGLANDINES PAR CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE COUPLEE A UN SPECTROMÈTRE DE MASSE (GC-MS) :

La spectrométrie de masse se base sur le principe de la détection de l'abondance des ions formés en fonction de leur rapport masse/charge.

Le GC-MS (Hewlett-Packard, USA) est un appareil équipé d'une colonne capillaire de 5% de phényl et 95 % de méthyl silicone dont le diamètre interne est de 0,32 mm et la longueur de 25 m. L'épaisseur du film de la phase stationnaire est de 0,17 μ m. L'échantillon injecté est entraîné dans un gradient de température par un gaz vecteur (hélium) à travers la colonne. Le gradient de température du four du GC-MS se réalise comme suit : 180°C pendant une minute, ensuite la température monte de 25°C par minute jusqu'à 270°C; la température de l'injecteur est de 260°C ; celle de la ligne de transfert (interface reliant le chromatogramme au spectromètre) est de 290°C, tandis que celle de la source d'ion est de 150°C. La caractérisation des prostaglandines se fait par ionisation chimique négative en présence de méthane. Les molécules ainsi ionisées sont identifiées par fragmentométrie de masse.

Les ions détectés à des masses de 524, 569 et 614 correspondent respectivement à la PGD₂ et la PGE₂, la PGF_{2 α} et la 6-céto-PGF_{1 α} (forme stable de la PGI₂).

La quantification des prostaglandines est réalisée à l'aide des prostaglandines deutérées (dPG) utilisées comme standards internes correspondant aux ions détectés à 528, 573 et 618. A chaque injection, on enregistre simultanément 6 chromatogrammes. Après intégration des pics par l'opérateur, la quantité de prostaglandines de chaque échantillon est calculée en rapportant les surfaces des pics

de prostaglandines de l'échantillon (S PG) à celles des standards internes correspondant (S dPG).

Un facteur correctif doit être introduit pour tenir compte de la quantité de PGs non deutérées (non dPG) qui se trouve dans la solution de dPG ajoutée à chaque échantillon. En effet, la solution de PG deutérée n'est pas totalement pure. Les résultats sont donc exprimés à partir de la formule suivante:

$$\text{Quantité de PG (ng)} = \frac{\text{S PG}}{\text{S dPG}} \times \text{quantité dPG} - \text{quantité non dPG}$$

Cette quantité de PG de l'échantillon est ensuite rapportée à la quantité de protéines. L'expression finale des résultats est donc en ng/mg de protéines.

2.7. IMMUNOFLUORESCENCE

2.7.1. LE REPIQUAGE

Les cellules musculaires lisses (CML) sont repiquées sur des couvre-objets en verre de 15 mm de côté placés dans des cases de 4 cm² d'une Multi-dish (Cell-Cult, Stérilin, Grande-Bretagne).

2.7.2. LA MODE OPERATOIRE

La méthode est décrite par Twort et Van Breemen (1988).

-On décante le milieu et on rince 2 fois avec du PBS (point 2.1.). Les cellules sont alors fixées par 1 ml de paraformaldéhyde (PFA) 1 % (Merck, Allemagne) dans du PBS pendant 5 min.

-On rince de nouveau 3 fois avec du PBS avant d'ajouter 1 ml d'acétone pendant 2 min à -20°C. On effectue une nouvelle fois deux rincages au PBS et un autre

avec un mélange PBS-SAB (serum albumine bovine) à 1 % (Boseral, Organon Technika, Belgique).

-On couvre alors les cellules musculaires lisses par 150 ml d'anticorps primaires polyclonaux de lapin dirigés contre la myosine musculaire (Sigma, St Louis, USA), et par 150 μ l d'anticorps primaires monoclonaux de souris (clone TA4) dirigés contre l'actine α des muscle lisses (Sigma, St Louis, USA), pendant 90 min dans une atmosphère humide à 20°C. La dilution utilisée est de 1/10 pour les Ac anti-myosine et 1/100 pour ceux dirigés contre l'actine.

-On enlève ensuite les anticorps non fixés par 3 rinçages avec du PBS-SAB avant d'ajouter 300 ml d'anticorps secondaires. Ces Ac secondaires sont du GAM-FITC, anticorps de chèvre dirigés contre des IgG de souris marqués à la fluorescéine isothiocyanate à 10 mg/ml, utilisés à une dilution de 1/80 (150 μ l), et du MAR-TRITC, anticorps de souris dirigés contre des IgG de lapin marqués à la tétranaéthylrhodamine isothiocyanate à 1,2 mg/ml, utilisés à une dilution de 1/30 (150 μ l) (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, USA), pendant 60 min à l'obscurité dans les mêmes conditions décrites précédemment.

-Les cellules sont alors montées sur une lame porte-objet dans un mélange de glycérol-PBS (10/1) à pH 9-10 contenant 1 mg/ml de PBS de P phénylènediamine (Janssen Geel, Belgique). L'observation est réalisée à l'aide d'un microscope à fluorescence. Les photos sont réalisées à l'aide d'un film dia Fuji 400 Asa.

Des contrôles négatifs sont réalisés en ajoutant directement l'anticorps secondaire sans marquage préalable par l'anticorps primaire.

2.8. MESURE DE L'EFFET DES SURNAGEANTS DE CELLULES ENDOTHELIALES SUR LA PROLIFERATION DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES

Grâce au principe de l'hexoaminidase qui peut estimer le nombre de cellules vivantes, on peut mettre en évidence l'effet des surnageants de cellules endothéliales sur la prolifération des cellules musculaires lisses.

Le principe de cette méthode réside dans l'activation d'une enzyme lysosomale : la N-acétyl-b-D-Hexoaminidase. Elle utilise comme substrat la solution C (voir au point 2.3.1.). A pH basique (Tampon glycine+EDTA, pH 10,4), le produit enzymatique apparaît jaune. La prolifération cellulaire est donc quantifiée, de façon indirecte, par le dosage de cette enzyme. Si la quantité d'enzymes est élevée, c'est-à-dire s'il y a beaucoup de cellules vivantes, la densité optique à 405 nm sera également haute.

2.8.1. MATERIEL

- HBSS et PBS sont décrits au point 2.3.1. et au point 1.
- La solution C et le tampon glycone+EDTA au point 2.3.
- Inhibiteurs : Cycloheximide (Sigma, St Louis, U.S.A.)
Indométhacine (Sigma, St Louis, U.S.A.)
β-hydroxybutyrate (Sigma, St Louis, U.S.A.)
Acide oléique (Sigma, St Louis, U.S.A.).
- Prostaglandines : PGF_{2α} : 3,63 10⁻⁶ M (Sigma, St Louis, U.S.A.)
PGE₂ : 1,9 10⁻⁶ M (Sigma, St Louis, U.S.A.)
6-céto-PGF_{1α} : 18,6 10⁻⁶ M (Sigma, St Louis, U.S.A.).

2.8.2. METHODE

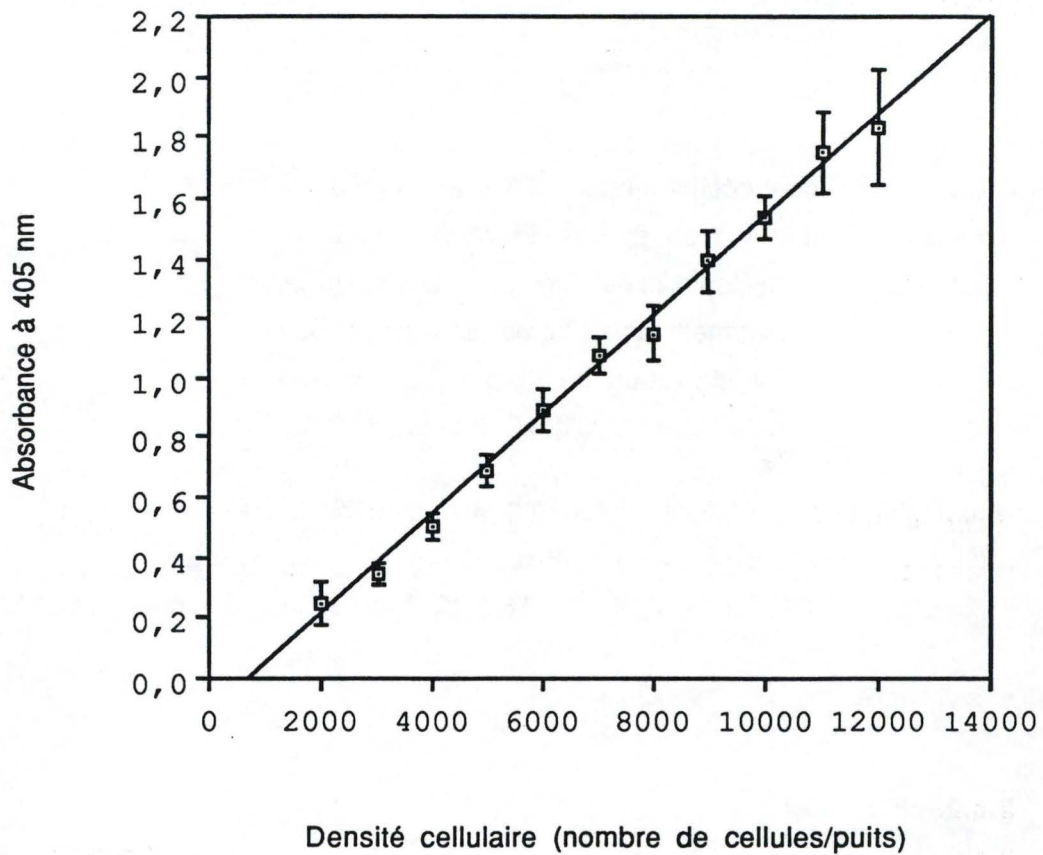
-Le repiquage des cellules endothéliales dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre contenant 2 ml de M199+S et l'hypoxie de 2 heures sont réalisés comme au point 2.1.2. et 2.3.

-Les cellules musculaires lisses sont repiquées, comme décrit au point 2.2.1., dans des plaques multi-puits de 96 puits (Cell-Cult, Stérilin, Grande-Bretagne). On utilise une plaque différente pour chaque jour. Chaque puits compte 3000 CML dans 200 µl de D+S (Dulbecco+10% de sérum de veau foetal).

-Le lendemain, on décante le milieu et on ajoute 100 µl de D+S ou D+HLA (Dulbecco+ 0,2% d'hydrolysate de lactalbumine) contenant le surnageant des cellules endothéliales, ayant subi deux heures d'hypoxie ou deux heures dans des conditions normales dans 0,7 ml d'HBSS, avec ou sans inhibiteur, ou contenant différentes prostaglandines. Les différents surnageants sont dilués 5 fois. Un contrôle négatif avec de l'HBSS seul a également été effectué. Ces manipulations se font sous hotte à flux laminaire et les surnageants sont stérilisés (seringue: Terumo, Belgique et filtre 0,22 µm : Sartorius, Allemagne).

-Les plaques multi-puits sont placés dans une étuve à 37°C contenant 5% de CO₂.

-L'estimation de la quantité de cellules est réalisée après 24 , 48 et 72 heures. On décante le milieu grâce à une pompe à vide avant de rincer les puits avec



Graphique 1 :

Courbe d'étalonnage de la mesure du nombre de cellules par puits par la méthode à l'hexoaminidase. Les cellules musculaires lisses sont incubées à 37°C à différentes concentrations dans du D+HLA pendant 18 heures. Les différentes densités cellulaires ont été réalisées suite à un comptage préalable des cellules (Cellule de Neubauer). Les résultats représentent la moyenne \pm 1 écart-type (n=8).

100 µl de PBS. Ensuite, 50 µl de solution C sont ajoutés dans chaque puits. Les CML sont alors incubées pendant 2 heures à 37°C. On lit l'absorbance à une longueur d'onde de 405 nm après avoir rajouté 100 µl de tampon glycine + EDTA.

-On réalise de la même façon un contrôle (sans surnageant de CE) au jour 0, à 0 heure.

Courbe d'étalonnage :

Pour pouvoir connaître la quantité de cellule correspondant à la densité optique, nous avons réalisé une courbe d'étalonnage (graphique 1). Grâce aux différents résultats obtenus, nous avons effectué une régression linéaire. Voici la formule :

$$Y = -0,12785 + 1,6647 \cdot 10^{-4} X$$

avec un coefficient de corrélation de 0,996.

Il suffit de remplacer Y par la densité optique pour connaître X. X représente le nombre de cellules dans le puits considéré.

2.9. ANALYSE STATISTIQUE

Les résultats sont exprimés comme la moyenne \pm un écart-type. Les différences entre les tests et les contrôles sont évaluées et acceptées significatives d'un point de vue statistique en utilisant un test t de Student.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

Ce mémoire se compose de deux parties. Dans un premier temps, nous nous sommes penchés sur l'étude des modifications des cellules musculaires lisses après une incubation sous hypoxie. Nous avons alors comparé ces changements à ceux observés sur les cellules endothéliales dans les mêmes conditions. En second lieu, nous nous sommes focalisés sur l'analyse du phénomène de prolifération des cellules musculaires lisses. Nous avons recherché si des molécules mitogènes stimulant la division des cellules musculaires lisses pouvaient être libérées par les cellules endothéliales incubées sous hypoxie.

3.1. EFFETS DE L'HYPOXIE SUR LES CELLULES MUSCULAIRES LISSES

La première partie des expériences réalisées lors de ce mémoire porte sur l'analyse des effets possibles de l'hypoxie sur le métabolisme des cellules musculaires lisses en comparaison avec ceux, déjà publiés, observés sur les cellules endothéliales. Au vu de leur localisation différente dans la paroi vasculaire, on peut penser pouvoir observer une différence au niveau de leur sensibilité à l'hypoxie.

Nous avons d'abord étudié l'effet de l'hypoxie sur la viabilité des cellules musculaires lisses, et l'effet de la réoxygénation, ultérieure à une hypoxie, sur la prolifération de ces mêmes cellules. Ensuite, nous avons regardé si l'hypoxie avait un effet activateur sur ces cellules musculaires lisses. Pour cela, nous avons dosé la concentration calcique cytosolique après hypoxie et mesuré l'activation des phospholipases membranaires. Finalement, l'effet de l'hypoxie sur le cytosquelette des cellules musculaires lisses fut étudié.

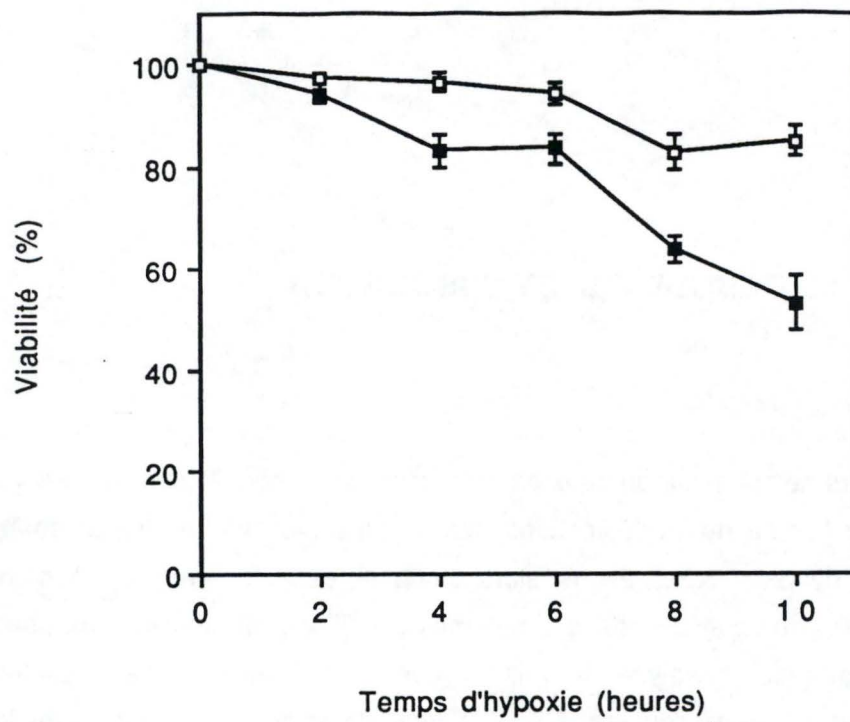


Figure 1 :
Effet de différents temps d'hypoxie sur la viabilité des cellules musculaires lisses. Les cellules sont incubées sous hypoxie (■) ou dans des conditions normales (□) et la viabilité est estimée par un test à l'érythrosine. Un minimum de 200 cellules est compté dans chaque boîte. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm 1 écart type (n=2).

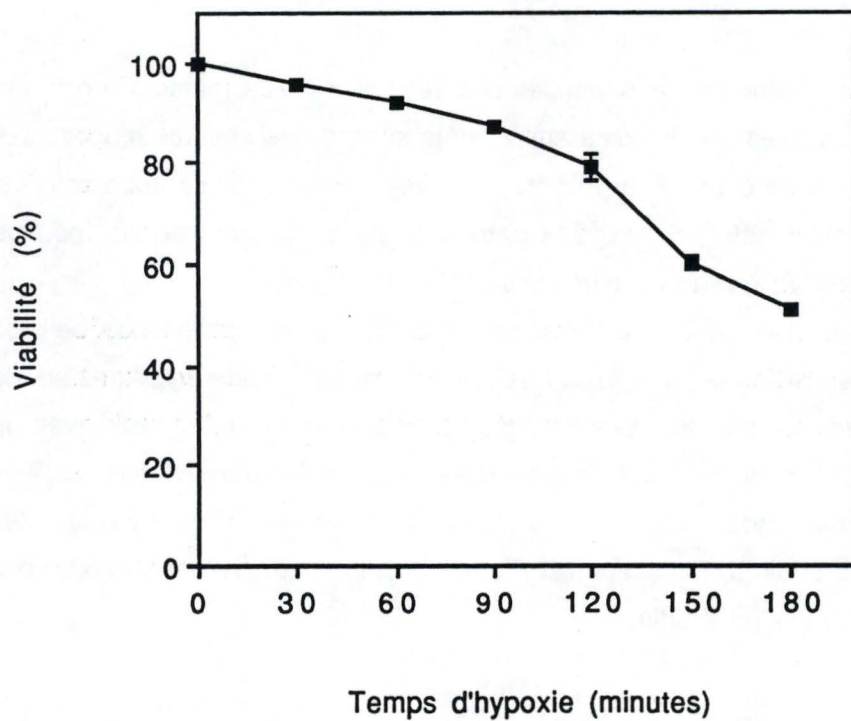


Figure 2 :
Effet de différents temps d'hypoxie sur la viabilité des cellules endothéliales. La viabilité est estimée par un test à l'érythrosine. Un minimum de deux cents cellules est compté dans chaque boîte. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm 1 écart-type (n=3).

3.1.1. ESTIMATION DE LA VIABILITE DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES APRES DIFFERENTS TEMPS D'HYPOXIE

L'effet direct de l'hypoxie sur la viabilité des cellules musculaires lisses a tout d'abord été étudié. Pour cela, les cellules ont été incubées sous hypoxie pendant des temps croissants et leur viabilité a été suivie.

TEST A L'ERYTHROSINE :

Les cellules musculaires lisses ont été soumises à différentes périodes d'hypoxie allant de 0 à 10 heures afin de suivre la viabilité cellulaire au cours de l'incubation sous hypoxie.

Nous avons utilisé la méthode à l'érythrosine. Elle nous permet de compter les cellules vivantes après l'hypoxie. Les cellules mortes se distinguent par le fait qu'elles sont rouges. Le colorant vital a pu traverser la membrane et rentrer à l'intérieur de la cellule. Vivantes, elles sont, par contre, capables d'expulser l'érythrosine. Le critère utilisé afin d'estimer la mort cellulaire est un comptage des cellules avant et après l'expérience. Cette technique de comptage est affinée en réduisant la taille des surfaces de comptage. Les résultats sont alors plus précis. Nous avons compté en moyenne 200 cellules par boîte de Pétri de 6 cm de diamètre.

La figure 1 et 2 montrent que la viabilité des *cellules musculaires lisses* et des *cellules endothéliales* diminue si le temps d'hypoxie augmente. Les cellules contrôles n'ayant pas subi d'hypoxie ont un taux de viabilité supérieur. L'hypoxie occasionne donc la mort des cellules.

Pour les *cellules musculaires lisses*, on observe une mortalité cellulaire à partir de quatre heures d'hypoxie et il faut 10 heures d'hypoxie pour avoir un taux de mortalité de 50 %. Par contre, les cellules endothéliales commencent à mourir dès une heure d'hypoxie. La vitesse de mortalité augmente déjà après deux heures. Après 3 à 4 heures d'hypoxie, la moitié des *cellules endothéliales* sont mortes. Ces cellules paraissent donc moins résistantes à l'hypoxie que les cellules musculaires lisses.

Ces deux premiers graphiques permettent de comparer l'évolution de la viabilité des cellules musculaires lisses et des cellules de l'endothélium sous hypoxie. On peut observer un parallélisme de l'effet létal de l'hypoxie entre ces deux types cellulaires. Cependant, on remarque que les cellules endothéliales, premier type cellulaire en contact direct avec le sang, sont plus sensibles à une diminution de

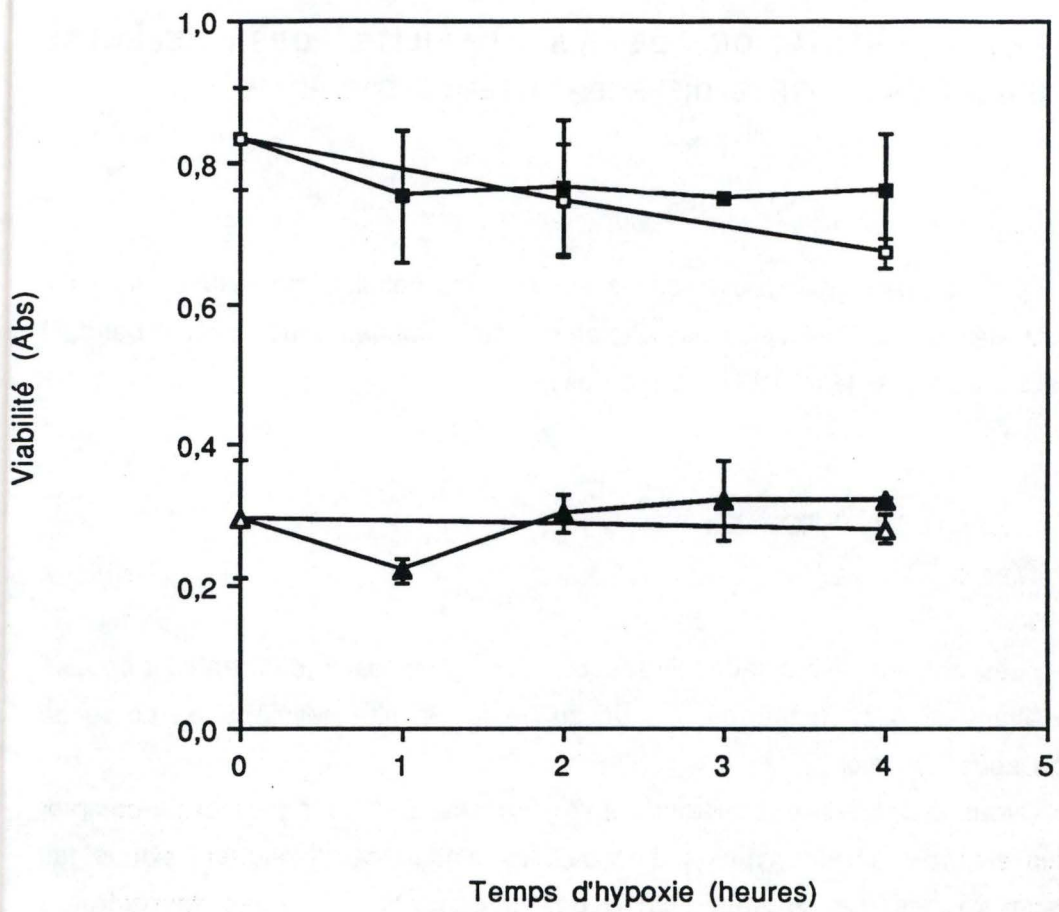


Figure 3 :
 Effet de différents temps d'hypoxie sur la viabilité des cellules musculaires lisses. Les cellules sont incubées sous hypoxie (■ ▲) ou dans les conditions normales (□ △). Les cellules ont été repiquées à une densité élevée (60.000 cellules, ■ et □) ou à une densité plus faible (20.000 cellules, ▲ et △). La viabilité cellulaire est estimée par un dosage de l'hexoaminidase. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm 1 écart type (n=2)

l'oxygène, par rapport aux cellules musculaires plus enfoncées dans les parois vasculaires.

TEST A L'HEXOAMINIDASE :

La même expérience a été réalisée en suivant la viabilité cellulaire par la méthode à l'hexoaminidase. Cette technique est basée sur le principe d'une quantification indirecte du nombre de cellules. Elle permet de doser l'activité d'une enzyme lysosomale chez les cellules vivantes.

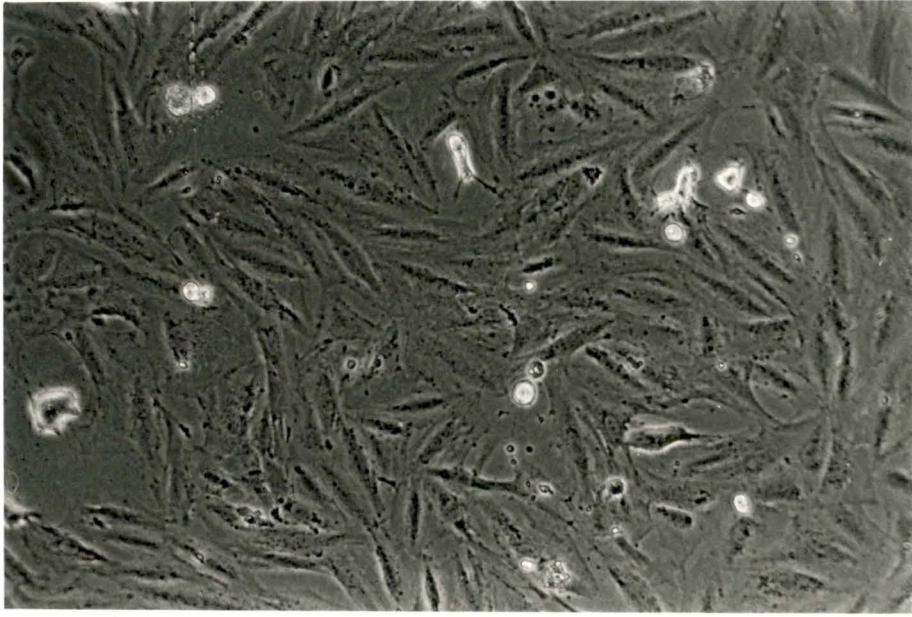
Les cellules ont été repiquées à deux densités différentes dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre. Une densité élevée de 60 000 cellules et une faible de 20 000 cellules.

On peut remarquer à la figure 3 que l'hypoxie jusqu'à quatre heures ne semble pas affecter la viabilité des cellules musculaires lisses. Nous ne pouvons mettre en évidence de différence par rapport aux cellules incubées dans des conditions normales. Ce résultat est légèrement différent de celui obtenu lors de l'expérience précédente où une mortalité de 17,6% était observée après quatre heures d'hypoxie.

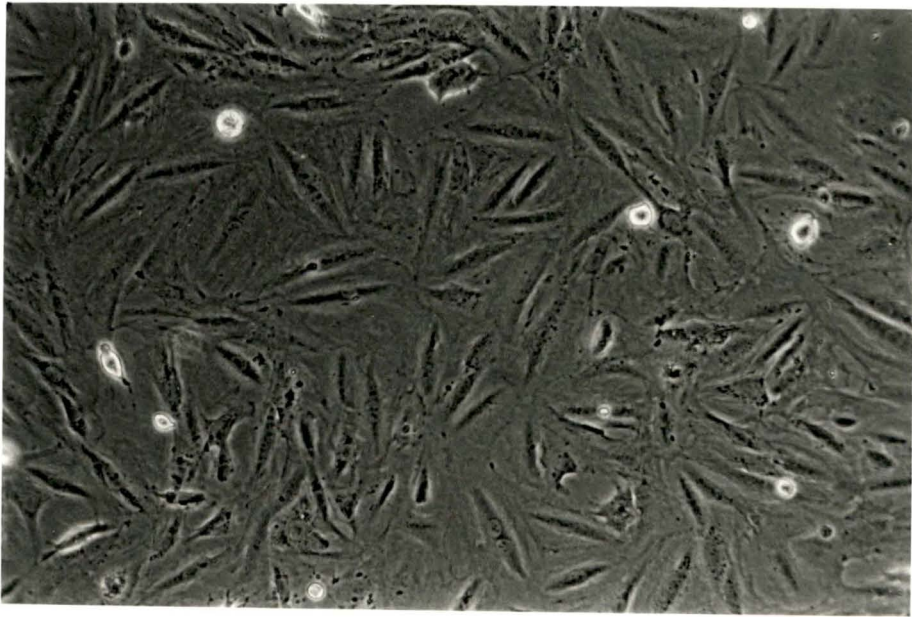
Ceci est probablement dû à la forte densité de cellules utilisée pour le test à l'hexoaminidase. Il faut en effet beaucoup moins de cellules pour le comptage des cellules au microscope optique lors du test à l'érythrosine et pour lequel les cellules sont à faible densité.

Les cellules musculaires lisses semblent donc plus sensibles à l'hypoxie, au niveau de leur viabilité, lorsqu'elles sont à très faible densité cellulaire.

Les photographies 2 a et 2 b représentent respectivement des cellules musculaires lisses après une incubation de quatre heures sous hypoxie à 37°C dans du HBSS avec calcium et les mêmes cellules après quatre heures dans les conditions normales, à l'air libre, également à 37°C dans du HBSS avec calcium. On ne remarque aucune différence au niveau morphologique.



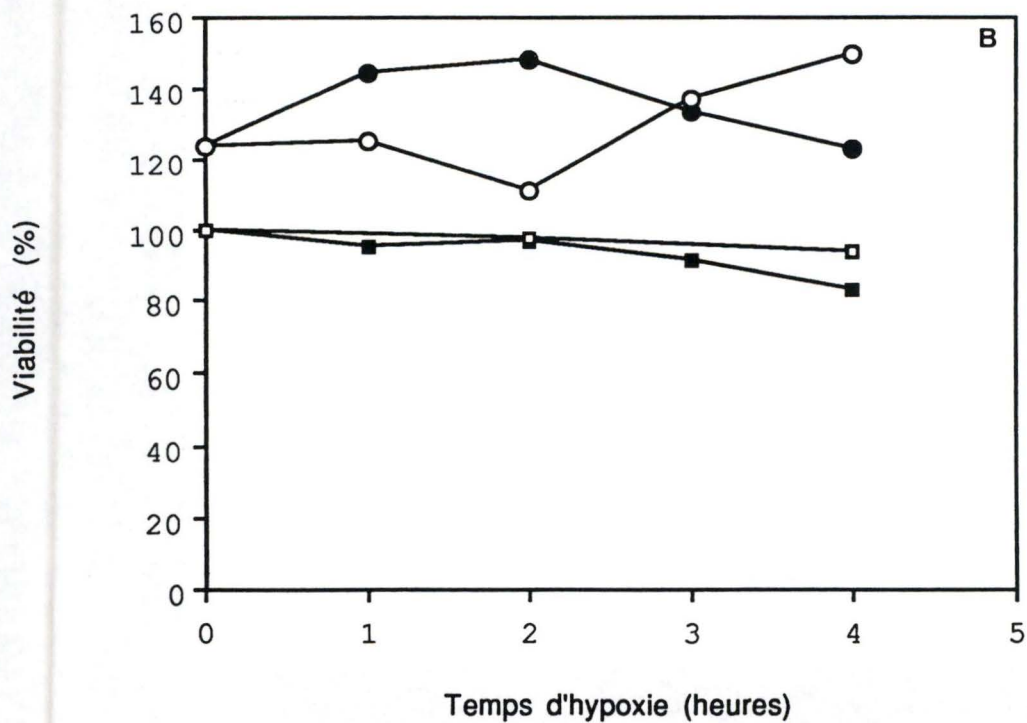
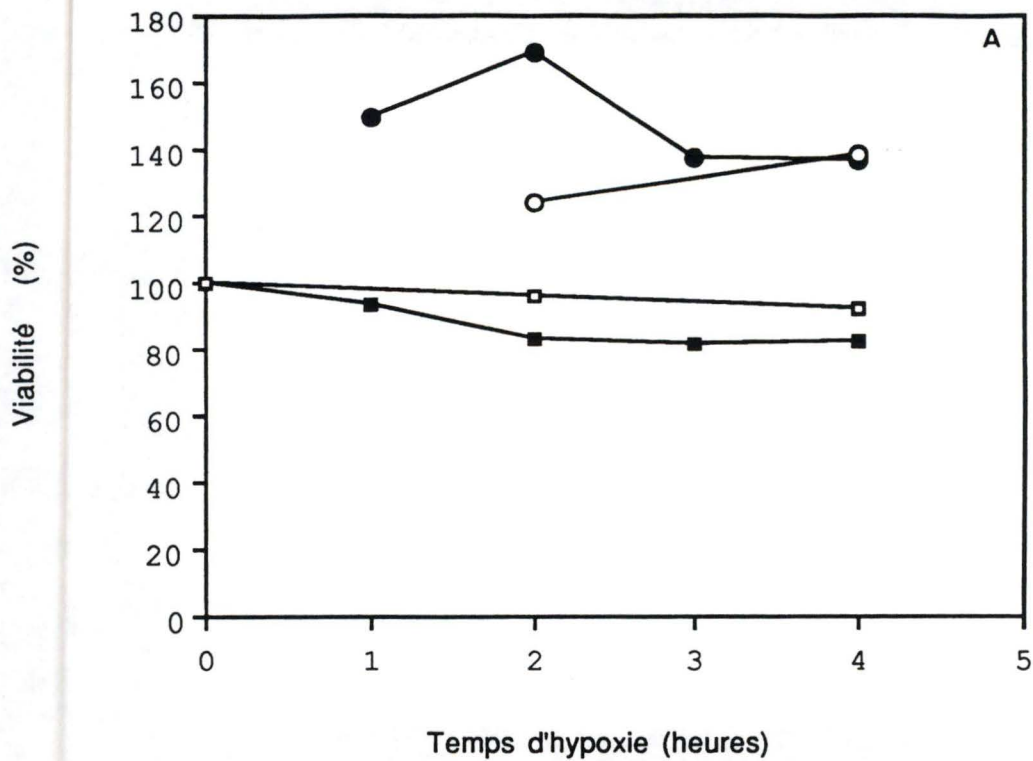
a



b

Photographies 2 :

Photographies représentant des cellules musculaires lisses après une incubation de 4 heures sous hypoxie (a) ou incubées pendant 4 heures dans des conditions normales (b) (grossissement 115 X).



Figures 4:

Effet de différents temps d'hypoxie suivie ou non de 24 heures de réoxygénation sur la viabilité des cellules musculaires lisses. Les cellules sont incubées sous hypoxie (■ ●) ou dans des conditions normales (○ □). La viabilité des cellules est ensuite estimée par un test à l'érythrosine tout de suite après cette incubation (□ ■) ou après 24 heures de réoxygénation dans des conditions normales (○ ●). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm 1 écart type (n=2).

Les figures a et b représentent les résultats de deux expériences séparées.

3.1.2. EFFET DE LA REOXYGENATION SUR LA PROLIFERATION DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES

La viabilité des cellules musculaires lisses ne semble pas être affecté de manière dramatique par une exposition sous hypoxie, tout au moins pour des périodes inférieures à quatre heures. Nous avons ensuite voulu savoir si cette incubation ne pouvait pas cependant affecter leur prolifération lorsque ces cellules sont replacées dans des conditions normales.

TEST A L'ERYTHROSINE :

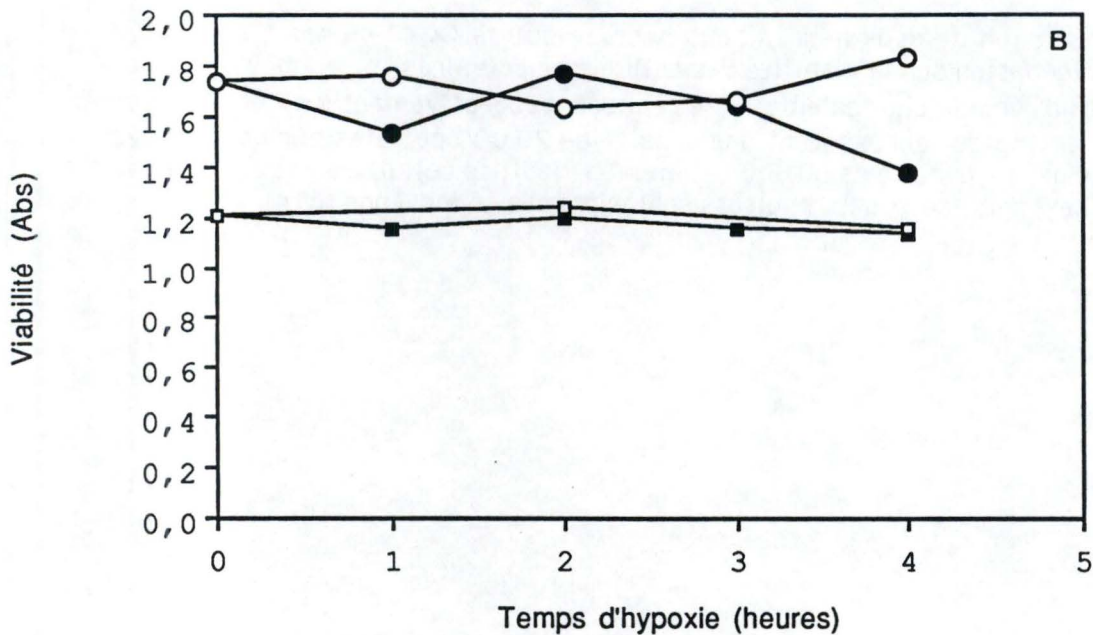
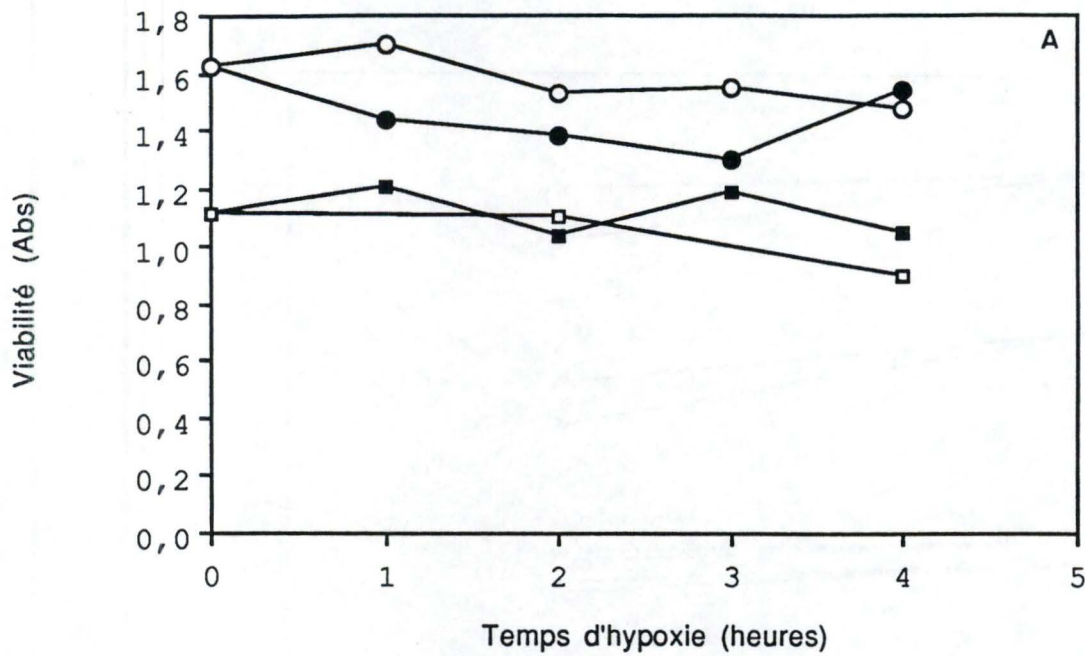
Nous avons réoxygéné à 37°C pendant une période de 24 heures, dans du Dulbecco + sérum, des cellules musculaires lisses ayant subi une hypoxie. Comme au point 3.1.1., nous avons réalisé quatre temps d'hypoxie différents. Des cellules ont été comptées directement après ces différents temps tandis que d'autres sont réoxygénées pendant un jour avant d'être également comptées. Des contrôles air qui n'ont pas subi d'hypoxie sont également réalisés pour chaque type d'incubation.

Nous observons sur les figures 4 a et 4 b que les cellules ayant subi une ou deux heures d'hypoxie et ensuite réoxygénées pendant 24 heures prolifèrent plus que les cellules contrôles. Cette différence n'est plus observée pour les temps plus longs de trois et quatre heures d'hypoxie.

La réoxygénation aurait un effet pro-prolifératif sur les cellules musculaires lisses qui ont préalablement subi deux heures d'hypoxie au maximum. Cet effet n'est pas observé pour des temps d'hypoxie plus longs.

TEST A L'HEXOAMINIDASE :

Afin de vérifier cet effet, nous avons réalisé le même type d'expérience en suivant la viabilité cellulaire par la méthode à l'hexoaminidase. Nous observons cependant pour ces expériences de nettes différences par rapport aux résultats précédents. En effet, aucun effet pro-prolifératif d'une exposition préalable sous hypoxie, quel que soit le temps d'exposition, n'est observé par rapport aux cellules contrôles (figures 5 a et 5 b).



Figures 5 :

Effet de différents temps d'hypoxie suivie ou non de 24 heures de réoxygénation sur la viabilité des cellules musculaires lisses. Les cellules sont incubées sous hypoxie (■ ●) ou dans des conditions normales (O □). La viabilité des cellules est ensuite estimée par un dosage de l'hexoaminidase tout de suite après cette incubation (□ ■) ou après 24 heures de réoxygénation dans des conditions normales (O ●). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm 1 écart type (n=2).

Les figures a et b représentent les résultats de deux expériences séparées.

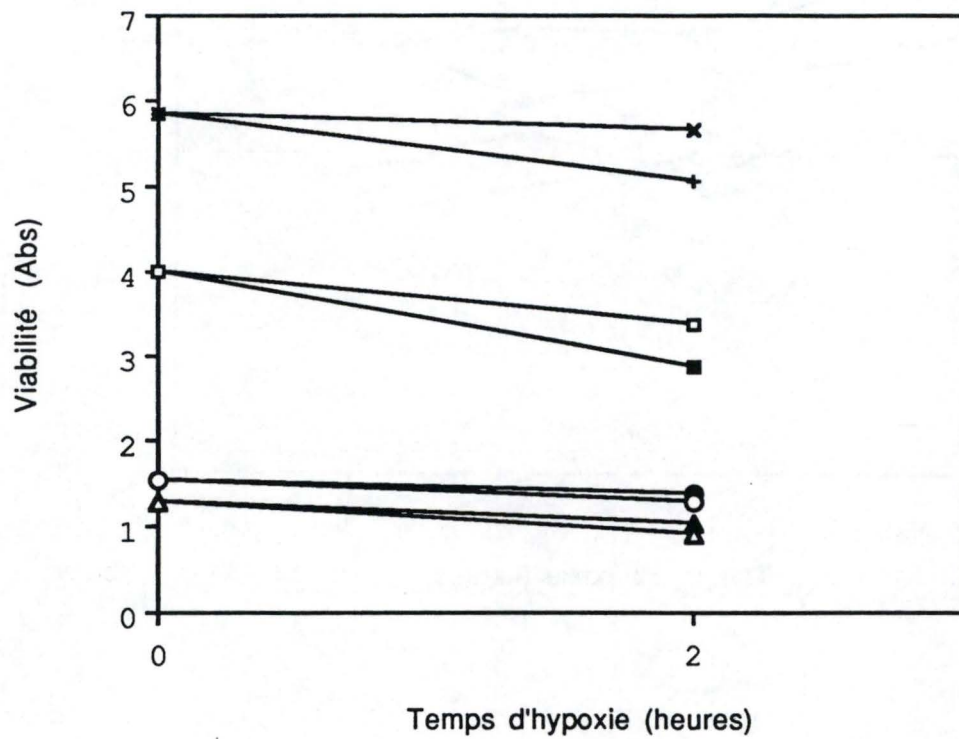


Figure 6:
 Effet d'une incubation de deux heures sous hypoxie suivie (X ●) ou non (■ ▲) de 24 heures de réoxygénation sur la viabilité des cellules musculaires lisses. Des contrôles n'ayant pas subi d'hypoxie ont également été réalisés (respectivement + ○ et □ △). Les cercles et les triangles représentent une densité de 20.000 cellules par boîte et les carrés et les croix une densité de 60.000 cellules. La viabilité cellulaire est estimée par un dosage de l'hexoaminidase. Les résultats sont exprimés en moyenne (n=4).

Puisque nous avons montré au chapitre précédent que la densité cellulaire avait une grande influence sur la sensibilité des cellules musculaires lisses à l'hypoxie. On peut aussi supposer que cette densité cellulaire soit un facteur important pour observer cet effet pro-prolifératif de la réoxygénation sur les cellules musculaires lisses. Cela voudrait dire qu'à faible densité, ces cellules prolifèrent plus après une hypoxie de une ou deux heures que les contrôles incubés dans des conditions normales.

Pour étayer cette hypothèse, nous avons réalisé la même expérience sur des quantités de cellules connues. On a alors repiqué les cellules à deux densités différentes, une de 20 000 cellules par boîte de Pétri et une plus élevée, de 60 000 cellules, et réalisé une expérience similaire.

La figure 6 montre les résultats de cette expérience. On peut observer que les cellules, qu'elles soient à faible ou à forte densité cellulaire, ne subissent pas l'effet pro-prolifératif de la réoxygénation.

Il semble difficile à partir de ces différents résultats de tirer une conclusion précise. Un effet prolifératif d'une réoxygénation de 24 heures pourrait effectivement s'observer lorsque les cellules sont à très faible densité cellulaire, inférieure à 10 000 cellules par boîte de Pétri. Au dessus de cette limite, plus aucun effet n'est observé.

La signification physiologique de ces résultats reste difficile à interpréter si l'on considère que les cellules sont plutôt concentrées dans la paroi veineuse. Il semble donc peu probable que la réoxygénation seule puisse par un effet direct induire une prolifération des cellules musculaires lisses *in vivo*.

3.1.3. DOSAGE DE LA CONCENTRATION DU CALCIUM INTRACELLULAIRE

La littérature nous renseigne abondamment sur l'importance du calcium comme messager secondaire intracellulaire dans différentes voies enzymatiques (Rasmussen, 1989). C'est par exemple le cas dans la régulation de la contraction cellulaire chez les cellules musculaires lisses (Twort and Van Breemen, 1988; Wu and Borh, 1991; Siskind *et al*, 1989), mais également lors de l'activation des cellules endothéliales (Arnould *et al*, 1992) et des cellules musculaires lisses lors de pathologies (Paoletti and Bernini, 1990). Il est donc intéressant de suivre l'évolution de la concentration cytosolique en calcium dans les cellules musculaires lisses placées

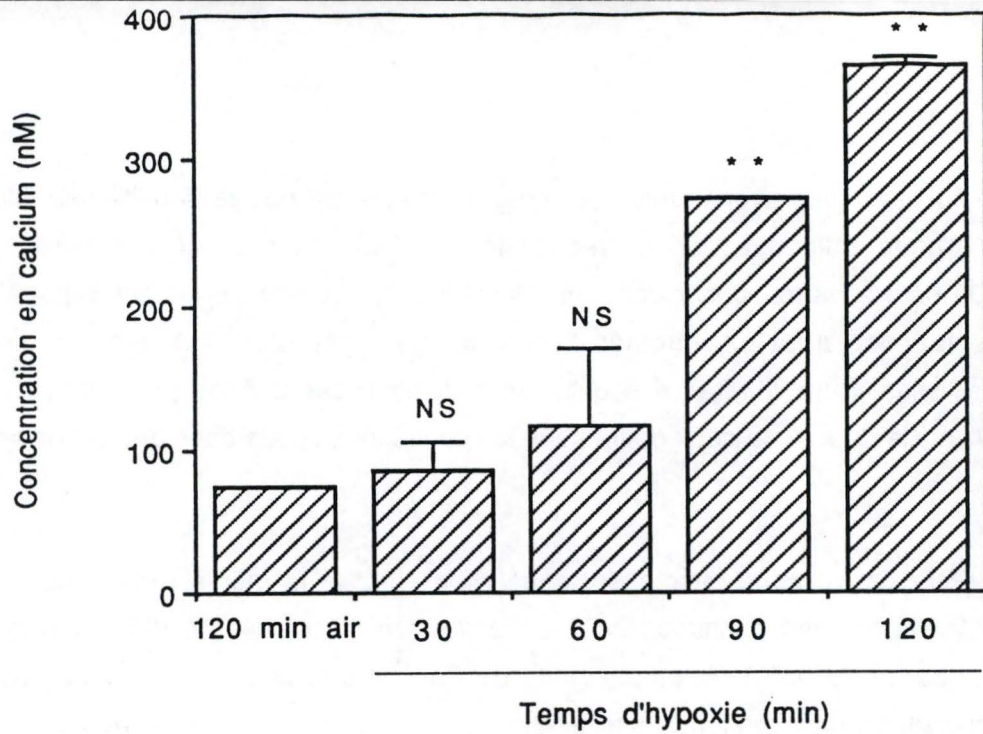
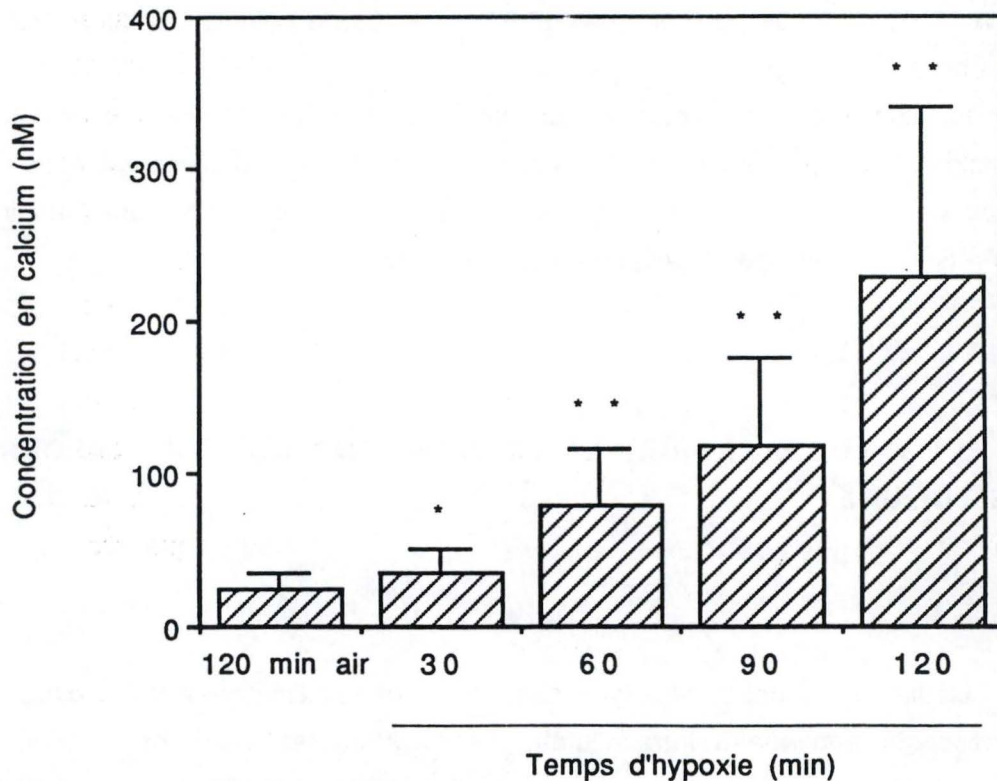


Figure 7 :

Effet de temps croissants d'hypoxie sur la concentration calcique dans les cellules musculaires lisses. Les monocouches de cellules sont incubées sous hypoxie dans du HBSS contenant du calcium. Les cellules contrôles sont incubées sous atmosphère normale pendant 120 minutes. La concentration en calcium cytosolique est mesurée trente secondes après la fin de l'incubation. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm 1 écart-type ($n=3$).

** : significativement différent des cellules contrôles avec $P < 0,005$ (test t de Student).



Figúre 8 :

Effet de temps croissants d'hypoxie sur la concentration calcique dans les cellules endothéliales. Les monocouches de cellules sont incubées sous hypoxie dans du HBSS contenant du calcium. Les cellules contrôles sont incubées sous atmosphère normale pendant 120 minutes. La concentration en calcium cytosolique est mesurée trente secondes après la fin de l'incubation. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm 1 écart-type ($n=12$).

** : significativement différent des cellules contrôles avec $P < 0,01$ (test t de Student).

* : significativement différent des cellules contrôles avec $P < 0,05$ (test t de Student).

sous hypoxie et de comparer ces résultats avec ceux des cellules endothéliales (Arnould *et al*, 1992).

Nous avons donc étudié l'influence de l'hypoxie sur la concentration en calcium libre dans le cytosol des cellules musculaires lisses. Les monocouches de cellules sont incubées sous hypoxie et la concentration en calcium cytosolique est mesurée après différents temps. Des cellules contrôles ont été incubées dans du HBSS+Ca⁺⁺ pendant 120 minutes.

La figure 7 montre que, pendant l'incubation sous hypoxie, la concentration en calcium intracellulaire des *cellules musculaires lisses* augmente d'abord légèrement pendant la première heure d'hypoxie. Entre 60 et 120 minutes, cette augmentation est constante et plus forte. A 120 minutes, on atteint une concentration de 350 mM. Ce qui représente environ cinq fois la concentration obtenue après 120 minutes dans les conditions normales.

Pour les *cellules endothéliales*, la figure 8 montre également que la concentration du calcium intracellulaire augmente d'abord légèrement. Mais ici cette légère augmentation n'est présente que pendant les 30 premières minutes d'incubation. Après, elle devient plus forte, pouvant même atteindre 300 mM après deux heures. Cette concentration représente environ dix fois la concentration basale mesurée dans les cellules endothéliales au repos (Arnould *et al*, 1992). Alors que l'augmentation du calcium intracellulaire dans les *cellules musculaires lisses* ayant subi une hypoxie représente cinq fois la valeur de la concentration en calcium des cellules contrôles. L'hypoxie n'aurait donc peut-être pas un effet aussi important sur les cellules musculaires lisses que sur les cellules endothéliales.

Ces deux graphiques mettent bien en évidence l'effet de l'hypoxie sur la modification du calcium à l'intérieur de ces cellules. L'hypoxie induit une augmentation de la concentration en calcium libre dans la cellule. On peut expliquer cette augmentation par une diminution des pompes Na⁺/Ca⁺⁺ATPases provoquée par une diminution de la concentration en ATP intracellulaire qui résulte de l'arrêt de l'activité des chaînes respiratoires mitochondriales suite au manque d'oxygène (Arnould *et al*, 1992).

Le calcium peut provenir de l'extérieur ou de l'intérieur de la cellule (Twort and Van Breemen, 1988). Pour les cellules endothéliales, des expériences réalisées en présence de vérapamil (antagoniste des canaux calciques) ou en absence de calcium extracellulaire ont permis de mettre en évidence que l'augmentation en calcium induite par l'hypoxie est principalement due à un influx du calcium extracellulaire (65%) (Arnould *et al*, 1992). Ce qui nous laisse supposer qu'il en va de même pour les cellules musculaires lisses.

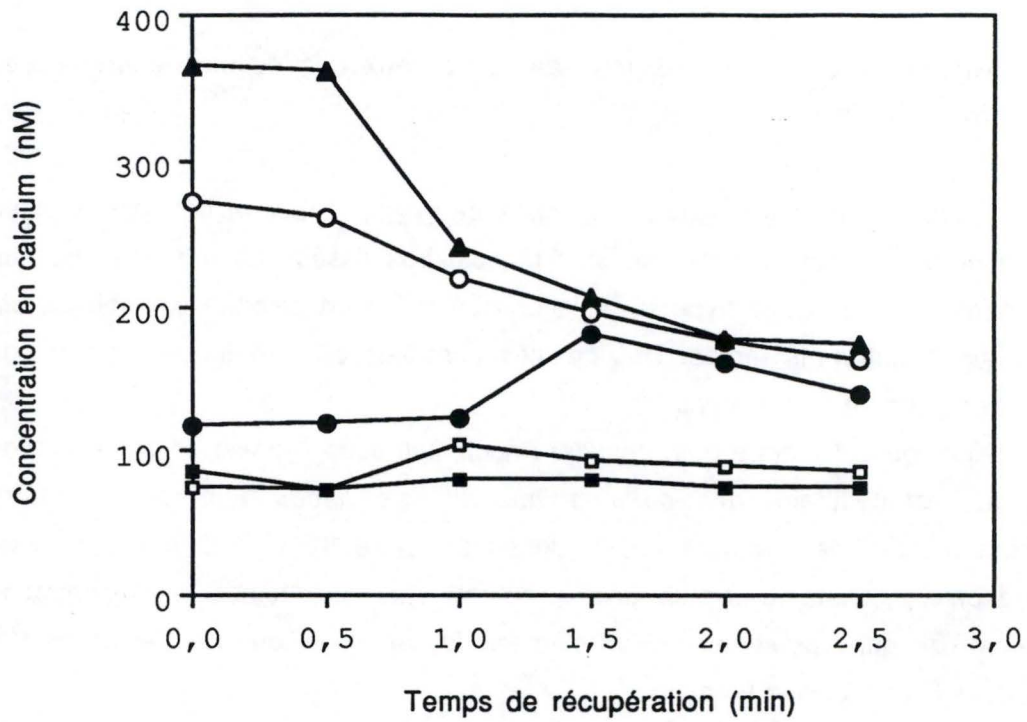


Figure 9 : Evolution de la concentration en calcium intracellulaire pendant la réoxygénation des cellules musculaires lisses incubées 120 minutes (▲), 90 minutes (○), 60 minutes (●) et 30 minutes (■) sous hypoxie. La même évolution est représentée pour les cellules contrôles (□) maintenues sous atmosphère normale.

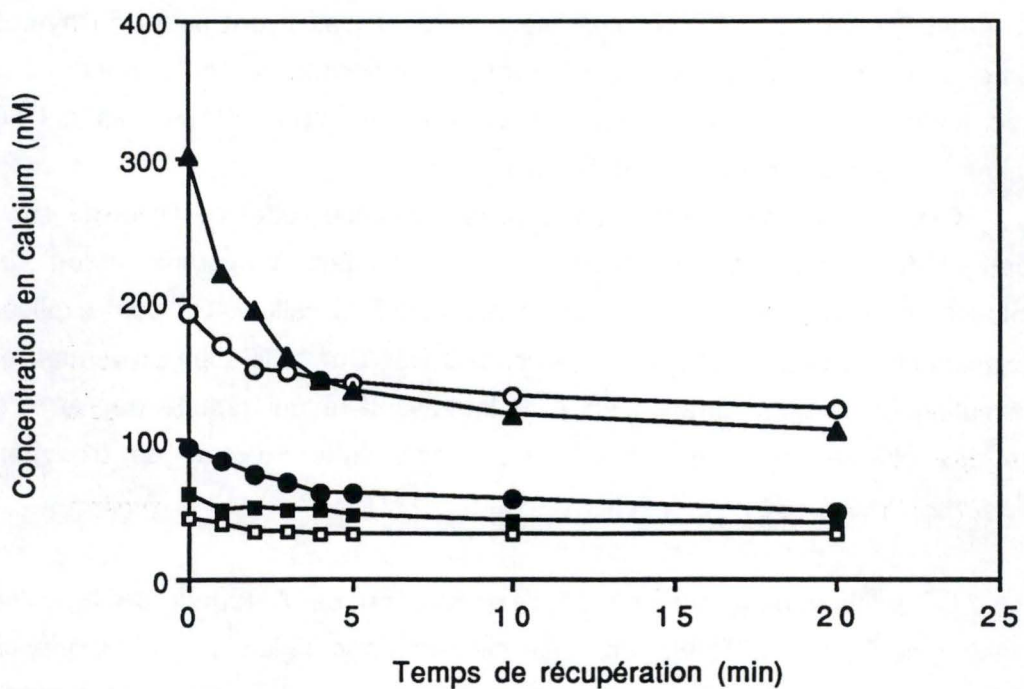


Figure 10 : Evolution de la concentration en calcium intracellulaire pendant la réoxygénation des cellules endothéliales incubées 120 minutes (▲), 90 minutes (○), 60 minutes (●) et 30 minutes (■) sous hypoxie. La même évolution est représentée pour les cellules contrôles (□) maintenues sous atmosphère normale.

Cependant, Twort et Van Breemen (1988) ont suggéré que la libération intracellulaire des stocks de calcium pouvait être une source importante de calcium-activateur pour les cellules musculaires lisses. On peut alors penser que la haute valeur de la concentration en calcium observée après 120 minutes sous hypoxie pourrait être due au relargage intracellulaire du calcium stocké dans ces cellules. Les cellules musculaires lisses contiennent en effet des organites de stockage pour le calcium. Ces organites sont plus nombreux (Twort and Van Breemen, 1988), plus volumineux et indispensables à la contraction cellulaire chez les cellules musculaires lisses; c'est le cas par exemple du réticulum sarcoplasmique (Twort and Van Breemen, 1988; Somlyo and Himpens, 1989). Il a également été démontré que l'augmentation du pH intracellulaire, chez les cellules musculaires lisses, conduit à une augmentation du calcium cytosolique via une libération des stocks intracellulaires de calcium (Siskind *et al*, 1989).

L'hypoxie, en tant que stress cellulaire, pourrait donc induire une libération du calcium stocké dans ces organites vers le cytosol, qui agirait en plus d'une augmentation de la perméabilité membranaire au calcium extracellulaire. Cette hypothèse reste à vérifier dans le cas des cellules musculaires lisses.

EFFET DE LA RÉOXYGÉNATION SUR LA CONCENTRATION DU CALCIUM INTRACELLULAIRE

La réoxygénation malgré les effets toxiques dus à la production de radicaux libres (Michiels *et al*, 1992; Rubanyi, 1988) permet aux cellules de récupérer après le stress occasionné par l'hypoxie. La concentration en calcium a été suivie pendant cette période de récupération. La réoxygénation s'opère quand le couvre-objet portant les cellules est placé dans la cuvette du fluorimètre dans une solution en équilibre avec l'air.

Les résultats montrent que, pendant la période de réoxygénation, la concentration cytosolique en calcium libre, dans les *cellules endothéliales* (figure 10) et dans les *cellules musculaires lisses* (figure 9), diminue fortement au début mais sans jamais atteindre les valeurs observées pour les cellules contrôles, et ce même pour des temps d'incubation supérieur à 30 minutes en ce qui concerne les cellules endothéliales. On remarque également que la concentration en calcium est plus faible après de courtes périodes sous hypoxie et que le retour vers une valeur normale (70-80 nM pour les cellules musculaires lisses et 30 nM pour les cellules endothéliales) est plus rapide dans ce cas.

Nous observons donc un parallélisme entre ces deux graphiques. La concentration en calcium intracellulaire chez les deux types cellulaires diminue lors d'une réoxygénation après hypoxie, ce qui traduit une régulation de leur homéostasie calcique. Mais cette diminution est beaucoup plus rapide chez les cellules musculaires lisses. Elle est de l'ordre d'une minute. Par contre, il faut au moins cinq minutes pour que la concentration de calcium dans le cytosol se stabilise chez les cellules endothéliales. Ceci est peut-être dû au nombreux organites de stockage dans les cellules musculaires lisses (Sombyo and Himpens, 1989). On peut donc supposer que ces cellules régulent plus rapidement et plus facilement leur homéostasie calcique en réincorporant le calcium dans les organites de stockage.

De plus, ces résultats indiquent que puisque les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses sont capables de réguler leur homéostasie, l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire induite par hypoxie n'est pas due à la mort des cellules.

L'augmentation de la concentration calcique à l'intérieur des cellules induite par l'hypoxie pourrait avoir plusieurs conséquences. Le calcium est en effet un messenger secondaire intracellulaire important. Il peut activer de nombreux enzymes membranaires ou liées à la membrane, telles que la protéine kinase C (Schachter *et al*, 1991) et la phospholipase A₂ (PLA₂) (Resink *et al*, 1989).

Comme chez les cellules endothéliales, l'augmentation de la quantité de calcium pourrait induire chez les cellules musculaires lisses une réponse cellulaire, en particulier la synthèse de médiateurs de l'inflammation. Les cellules de l'endothélium activées produisent entre autres, comme molécules pro-inflammatoires, des prostaglandines et du PAF (Arnould *et al*, soumis pour publication; Michiels *et al*, sous presse b).

L'activation des cellules musculaires lisses pourrait donc aussi se produire lors de la privation d'oxygène. Il a déjà été décrit dans la littérature que l'hypoxie induit des modifications chez les cellules musculaires lisses (Durmowicz *et al*, 1991; Dempsey *et al*, 1991). Nous avons donc étudié et recherché l'effet de l'hypoxie sur l'activation de la PLA₂ ainsi que sur la synthèse des médiateurs de l'inflammation que sont les prostaglandines.

3.1.4. MESURE DE L'ACTIVITE DE LA PHOSPHOLIPASE A₂ ET DE LA SYNTHÈSE DES PROSTAGLANDINES

Lors de l'activation de certaines cellules, comme les cellules impliquées dans les réactions inflammatoires (les cellules endothéliales, les polymorphonucléaires,...), une phospholipase A₂ activée par le calcium, et localisée dans la membrane plasmique et dans la membrane du réticulum endoplasmique, hydrolyse le groupement 2-acyl des phospholipides libérant ainsi l'acide arachidonique (AA) (C 20:4) et d'autres acides gras insaturés. L'acide arachidonique est préférentiellement libéré en raison de sa localisation spécifique en position 2-acyl dans les phospholipides (Craze de Paulet, 1983; Braquet and Braquet, 1983).

Cet acide gras sert de précurseur à la synthèse d'une grande variété de médiateurs lipidiques appelés eicosanoïdes. Ces voies métaboliques sont dépendantes de deux types d'oxygénases : la cyclooxygénase qui transforme l'acide arachidonique en prostaglandines (PG), en thromboxane (TXA₂) et en prostacycline (PGI₂) et la lipoxygénase qui transforme l'acide arachidonique en leucotriènes (LT) et en acides monohydroéicosatétraénoïques (HETE). Les effets biologiques de ces métabolites de l'acide arachidonique sont multiples et interviennent de manière prépondérante dans les réactions inflammatoires et les pathologies qui y sont liées (Smith, 1989).

Puisque les cellules musculaires lisses représentent une source potentielle de prostaglandines et qu'elles sont touchées par l'ischémie, nous avons étudié l'effet d'une exposition de ces cellules à l'hypoxie sur l'activité de la phospholipase A₂ et sur la synthèse des prostaglandines.

EFFET DE L'HYPOXIE SUR L'ACTIVITE DE LA PHOSPHOLIPASE A₂

Dans le cadre de cette étude de l'activation des cellules musculaires lisses par l'hypoxie, il était donc intéressant de déterminer le rôle éventuel de la phospholipase A₂. Dans cette optique, la mesure de la libération de l'acide arachidonique radioactif, préalablement incorporé dans les phospholipides membranaires par les cellules musculaires lisses placées en hypoxie, nous apportera une réponse sur l'activation de cette phospholipase. Cette activité est donc estimée par un dosage indirect mesurant la radioactivité libérée dans le surnageant par les cellules. Cette radioactivité mesurée correspond à l' [³H]-AA libre et ses métabolites.

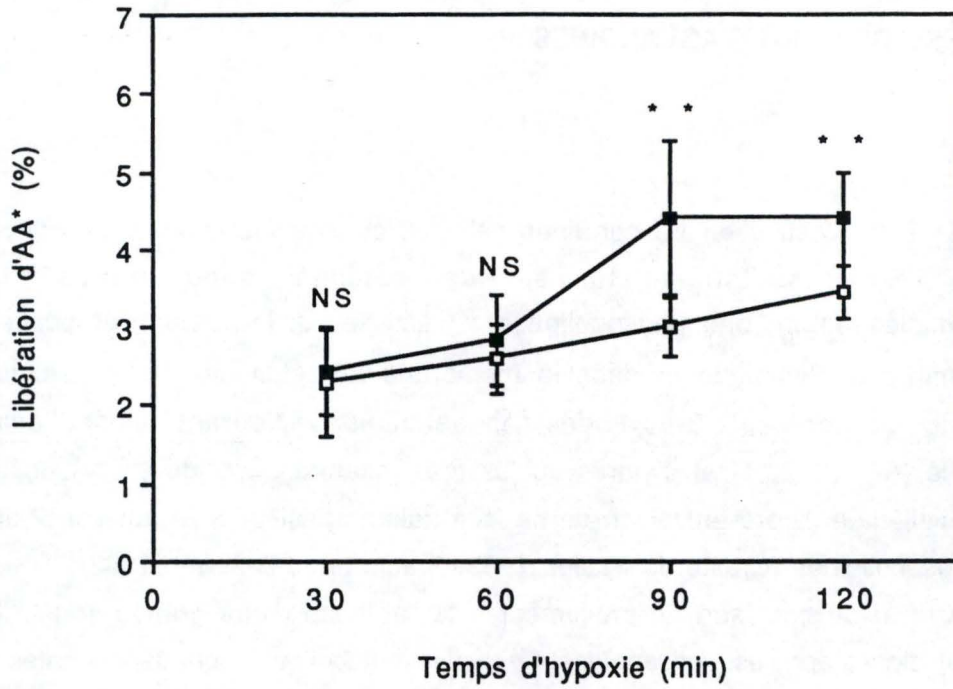


Figure 11 :

Effet de l'hypoxie sur l'activité de la phospholipase A₂. Les cellules musculaires lisses sont incubées pendant différents temps sous hypoxie (■) ou dans des conditions normales (□) et l'activité de la phospholipase A₂ a été estimée par la libération de [³H]-AA pendant ces incubations. Les résultats sont exprimés en % de libération et représentent la moyenne ± 1 écart-type pour trois expériences réalisées en triple (n=9).

** : significativement différent des cellules contrôles avec P<0,01 (test t de Student).

La figure 11 nous montre l'évolution de la libération de cette radioactivité en fonction de différents temps d'hypoxie. Avant 60 minutes, aucune libération significative n'a pu être mise en évidence sous hypoxie. Par contre, une augmentation de cette libération apparaît à 90 et 120 minutes d'hypoxie (4,5 %) par rapport aux cellules contrôles. On observe que la quantité de radioactivité libérée par les cellules musculaires lisses placées en hypoxie est plus importante pour les cellules laissées à l'air libre. Il semblerait donc qu'il existe une activation de la phospholipase A₂ sous hypoxie.

Mais y a-t-il vraiment activation spécifique de la phospholipase A₂ lors de l'exposition sous hypoxie des cellules musculaires lisses?

Pour confirmer ou infirmer ce résultat, nous avons comparé la libération d'³H-AA et d'¹⁴C-AS par les *cellules musculaires lisses* au cours de l'hypoxie. L'acide stéarique n'étant pas libéré spécifiquement par la phospholipase A₂, il trace l'activation des phospholipases en général. La figure 12 montre que, chez les cellules musculaires lisses, l'acide arachidonique incorporé en position 2 n'est pas préférentiellement libéré par rapport à l'acide stéarique incorporé en position 1. Nous constatons que la libération de l'acide stéarique augmente, comme celle de l'acide arachidonique, de façon significative. A 120 minutes après hypoxie, la libération représente pour ces deux acides au cours de l'incubation sous hypoxie que deux fois la valeur des cellules contrôles. Ceci est en opposition aux résultats observés chez les *cellules endothéliales* (figure 13). Dans cette figure, nous observons que la libération d'acide stéarique augmente de façon significative lors de l'hypoxie, mais elle ne représente que deux fois la valeur des contrôles incubés sous air. Par contre, la libération de l'acide arachidonique atteint six fois la valeur du contrôle. De plus, l'activation de la phospholipase A₂ est 6,2 fois plus grande que celle des phospholipases qui relarguent l'acide stéarique. Tous ces résultats nous permettent de suggérer que la phospholipase A₂ est activée spécifiquement par l'hypoxie chez les *cellules endothéliales* mais pas chez les *cellules musculaires lisses*.

Chez les cellules musculaires lisses, la libération de l'acide arachidonique marqué n'est donc pas dû à une libération spécifique par la phospholipase A₂. En réalité, l'activité de toutes les phospholipases membranaires est augmentée, comme l'atteste la libération parallèle de l'acide stéarique et de l'acide arachidonique.

Si on considère la libération de l'acide arachidonique comme une bonne estimation de l'activité de la phospholipase A₂ et celle de l'acide stéarique comme l'estimation de l'activité des autres phospholipases, on peut alors suivre l'évolution de

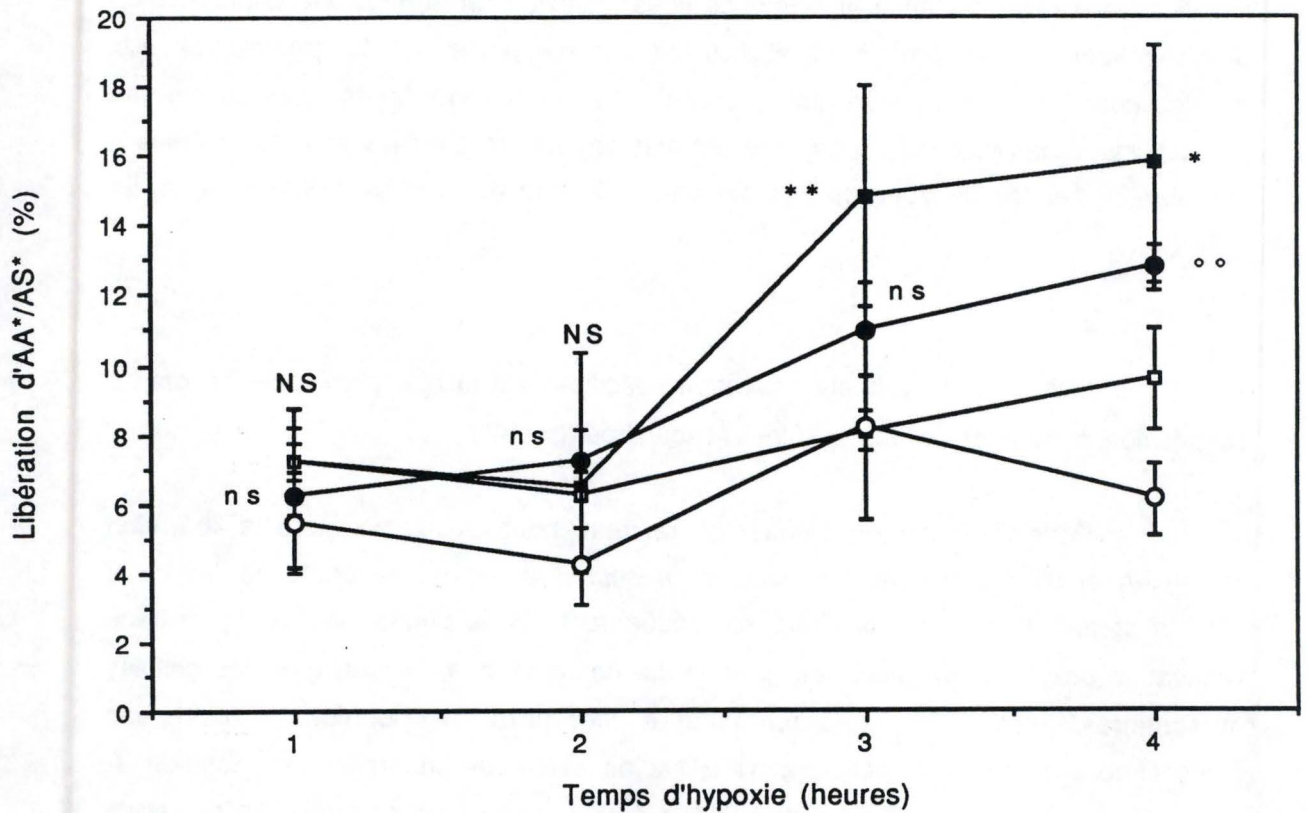


Figure 12 :

Comparaison de la libération d'acide gras marqué comme mesure indirecte de l'activation de la PLA₂ sous hypoxie. Les cellules musculaires lisses préalablement marquées avec de l'³H-acide arachidonique (AA) ou de l'¹⁴C-acide stéarique (AS) sont incubées pendant des temps croissants sous hypoxie ou sous air. L'activité de la PLA₂ est estimée par la libération d'³H-AA sous air (□) ou sous hypoxie (■). La libération d'¹⁴C-AS est également mesurée sous air (○) ou sous hypoxie (●). Les résultats sont exprimés en % de libération et représentent la moyenne ± 1 écart-type (n=3).

* : significativement différent des cellules contrôles avec $P < 0,025$ pour AA (test t de Student).

** : significativement différent des cellules contrôles avec $P < 0,01$ pour AA (test t de Student).

•• : significativement différent des cellules contrôles avec $P < 0,01$ pour AS (test t de Student).

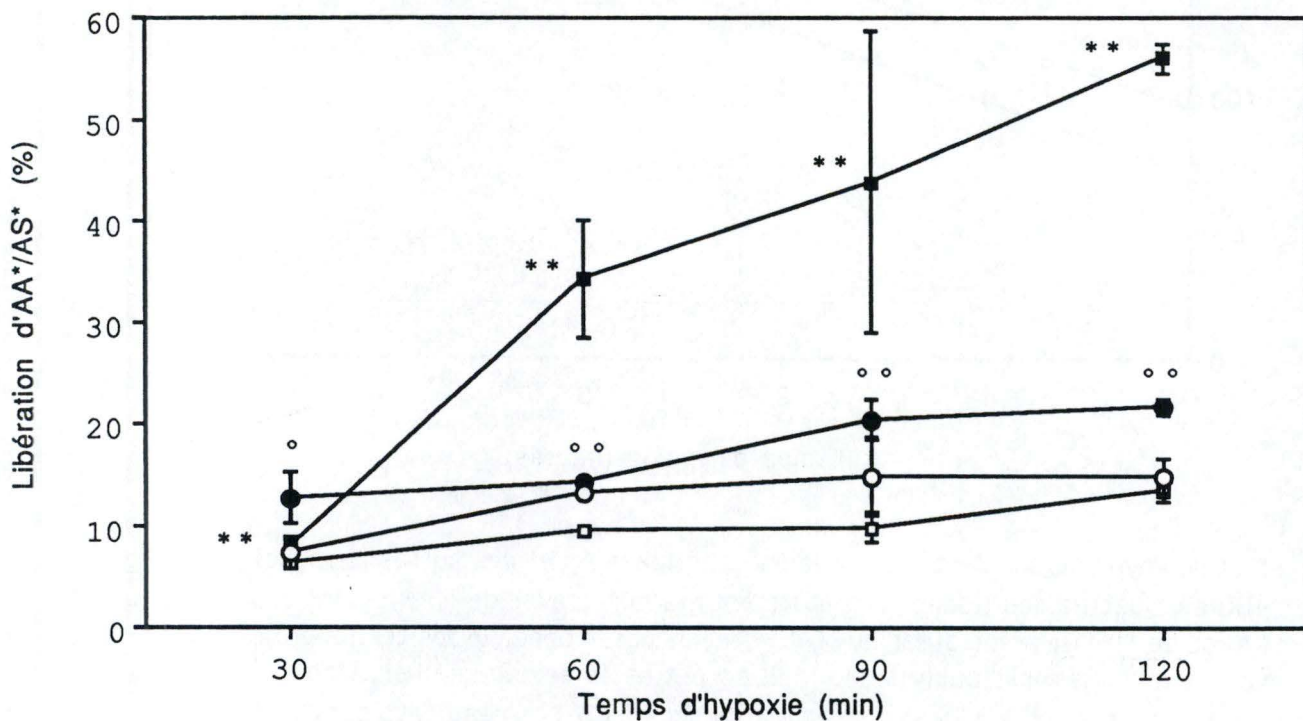


Figure 13 :

Comparaison de la libération d'acide gras marqué comme mesure indirecte de l'activation de la PLA₂ sous hypoxie. Les cellules endothéliales préalablement marquées avec de l'³H-acide arachidonique (AA) ou de l'¹⁴C-acide stéarique (AS) sont incubées pendant des temps croissants sous hypoxie ou sous air. L'activité de la PLA₂ est estimée par la libération d'³H-AA sous air (□) ou sous hypoxie (■). La libération d'¹⁴C-AS est également mesurée sous air (○) ou sous hypoxie (●). Les résultats sont exprimés en % de libération et représentent la moyenne ± 1 écart-type (n=3).

** : significativement différent des cellules contrôles avec P<0,01 pour AA (test t de Student).

•• : significativement différent des cellules contrôles avec P<0,01 pour AS (test t de Student).

• : significativement différent des cellules contrôles avec P<0,05 pour AS (test t de Student).

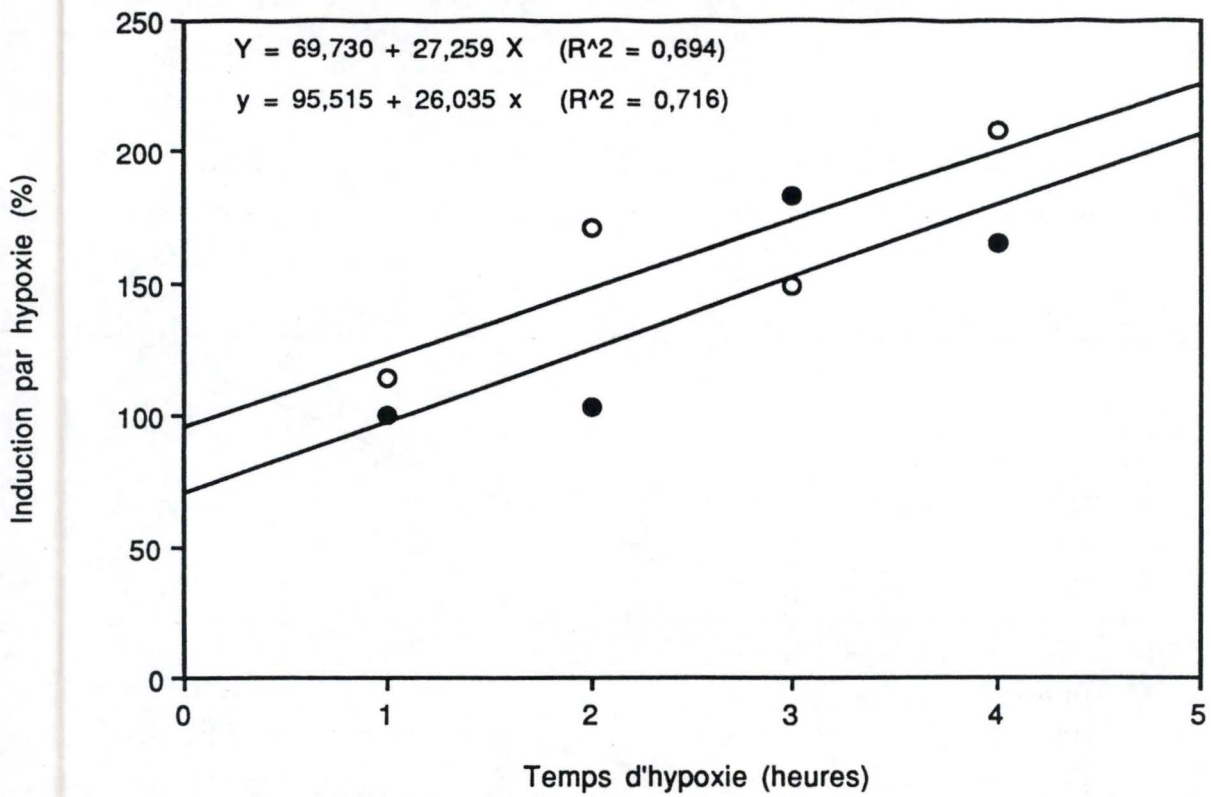


Figure 14 :

Effet de l'hypoxie sur l'activité de la phospholipase A₂ et des autres phospholipases. Les cellules musculaires lisses préalablement marquées avec de l'[³H]-acide arachidonique (AA) ou de l'[¹⁴C]-acide stéarique (AS) sont incubées pendant des temps croissants sous hypoxie ou sous air. L'activité de la PLA₂ est estimée par la libération d'[³H]-AA (●). La libération d'[¹⁴C]-AS est également mesurée (○). Les résultats sont exprimés en % par rapport au contrôle correspondant et représentent la moyenne (n=3).

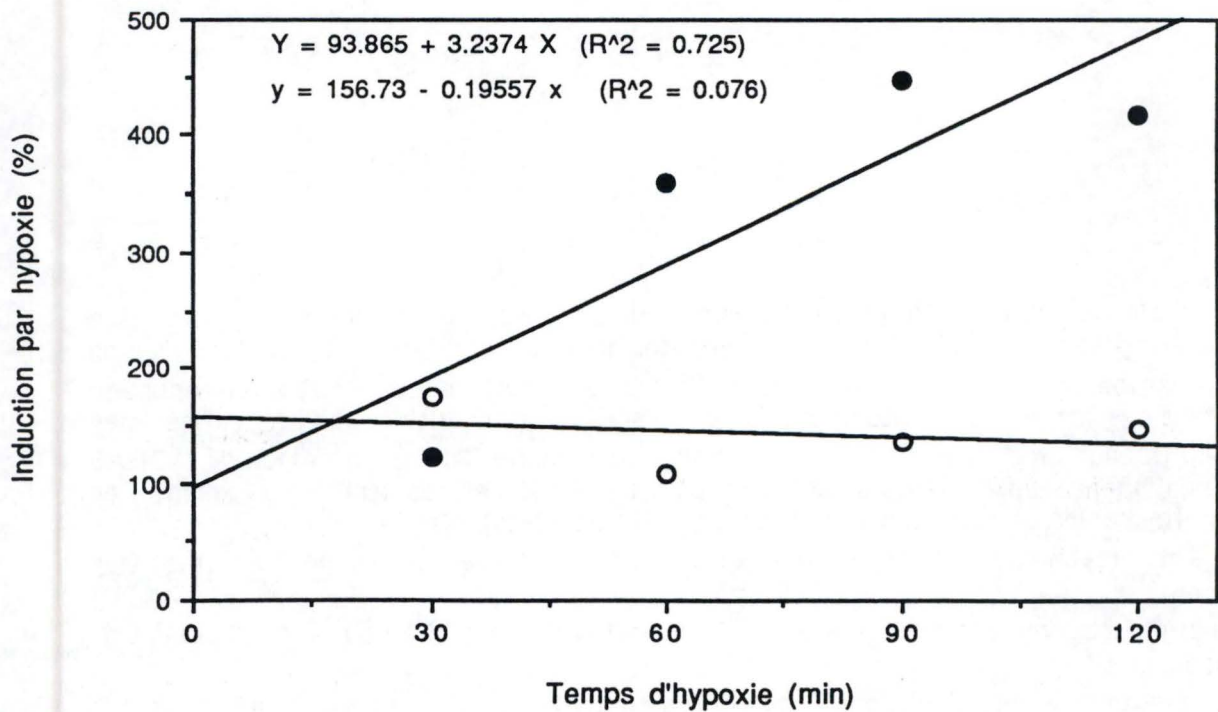


Figure 15 :

Effet de l'hypoxie sur l'activité de la phospholipase A₂ et des autres phospholipases. Les cellules endothéliales préalablement marquées avec de l'[³H]-acide arachidonique (AA) ou de l'[¹⁴C]-acide stéarique (AS) sont incubées pendant des temps croissants sous hypoxie ou sous air. L'activité de la PLA₂ est estimée par la libération d'[³H]-AA (●). La libération d'[¹⁴C]-AS est également mesurée (○). Les résultats sont exprimés en % par rapport au contrôle correspondant et représentent la moyenne (n=3).

ces enzymes au cours de l'hypoxie comme indiqué aux figures 14 et 15. On remarque que pour les *cellules endothéliales* (figure 15) il n'y a que la phospholipase A₂ qui est activée par l'hypoxie. L'activité des autres phospholipases membranaires n'évoluent pas en fonction du temps d'incubation sous hypoxie. Par contre, la figure 14 indique clairement que l'hypoxie induit toutes les phospholipases de la membranes des *cellules musculaires lisses* et pas spécifiquement la PLA₂. De plus, on atteint, déjà après deux heures d'hypoxie, une valeur pour l'acide arachidonique de 400 % pour les *cellules endothéliales* et seulement une valeur comprise entre 150 et 200 % pour les *cellules musculaires lisses* après quatre heures d'hypoxie.

Toutes ces résultats suggèrent donc que la phospholipase A₂ est spécialement activée après hypoxie dans les cellules endothéliales mais pas dans les cellules musculaires lisses. Pour confirmer ce résultat, nous avons comparé les effets de l'hypoxie sur la synthèse de diverses prostaglandines par ces deux types cellulaires. Rappelons que les prostaglandines sont des métabolites dérivés de l'acide arachidonique précédemment libéré par l'action enzymatique de la phospholipase A₂. Si, comme on le suggère, l'hypoxie n'induit pas l'activation de la PLA₂ dans les cellules musculaires, on ne devrait pas non plus une libération importante de prostaglandines par ces cellules dans ces conditions.

EFFET DE L'HYPOXIE SUR LA SYNTHÈSE DES PROSTAGLANDINES

La phospholipase A₂ est légèrement activée par l'hypoxie au même titre que les autres phospholipases membranaires chez les cellules musculaires lisses, ce qui est en opposition avec les résultats obtenus sur les cellules de l'endothélium; nous avons voulu vérifier ce résultat en étudiant l'effet de l'hypoxie sur la synthèse des prostaglandines produites à partir de l'acide arachidonique dans ces cellules. Les prostaglandines sont dans les cellules endothéliales les principaux métabolites de cet acide gras (Schorr, 1985).

Nous avons donc étudié l'effet de l'hypoxie sur la synthèse de différentes prostaglandines (PGD₂, PGE₂, PGF₂α et la 6-céto-PGF₁α) par les cellules musculaires lisses (figure 16). Un contrôle a été réalisé : il représente des cellules incubées pendant 24 heures dans du D+HLA à 37°C en conditions normales. Il nous renseigne sur la quantité de prostaglandines produites par les cellules musculaires lisses dans les conditions normales. Cette quantité est exprimée en ng de prostaglandines par mg de protéines. On remarque, sur la figure 16, que les *cellules musculaires lisses* ne synthétisent que de la PGE₂ et de la PGF₂α- les autres étant à

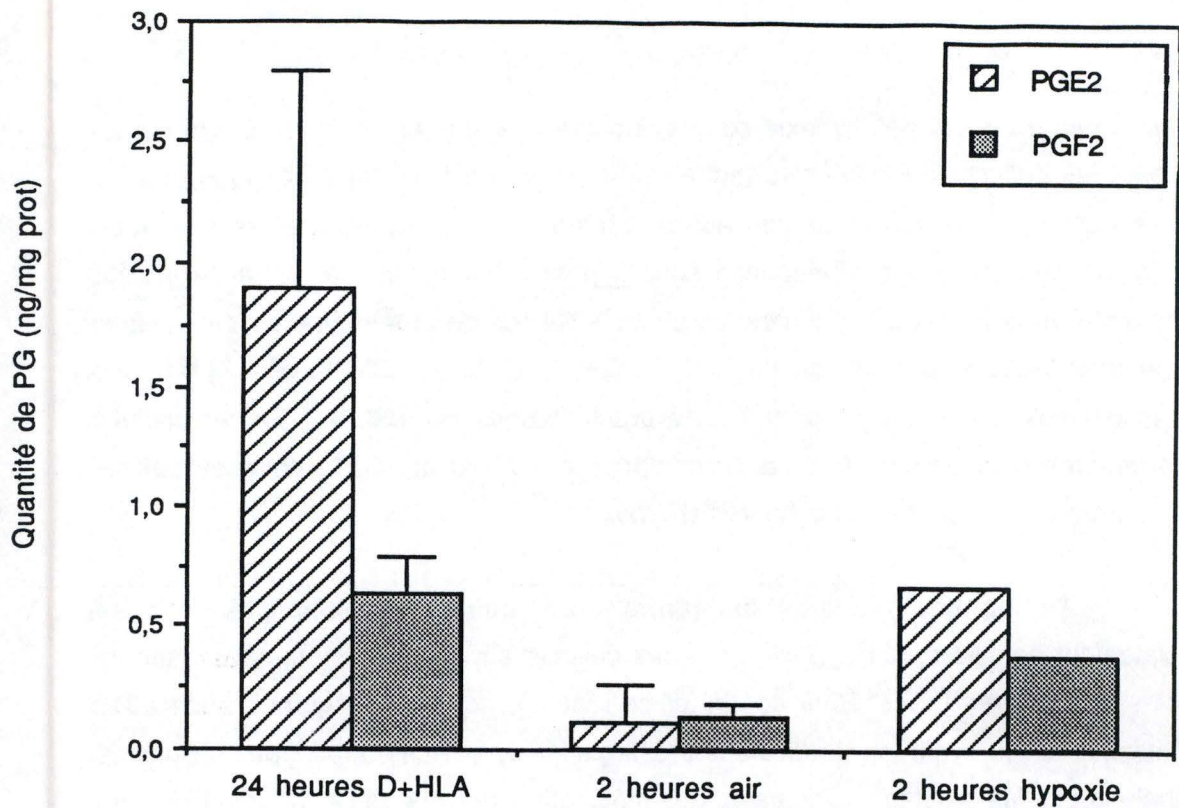


Figure 16:
Effet de l'hypoxie sur la synthèse des prostaglandines par les cellules musculaires lisses. Les cellules sont incubées pendant deux heures sous hypoxie ou sous atmosphère normale. Un contrôle représentant des cellules incubées pendant 24 heures dans du D+HLA à 37°C dans les conditions normales est également indiqué. Les résultats sont exprimés en ng/mg de protéines et représentent la moyenne \pm 1 écart-type (n=2).

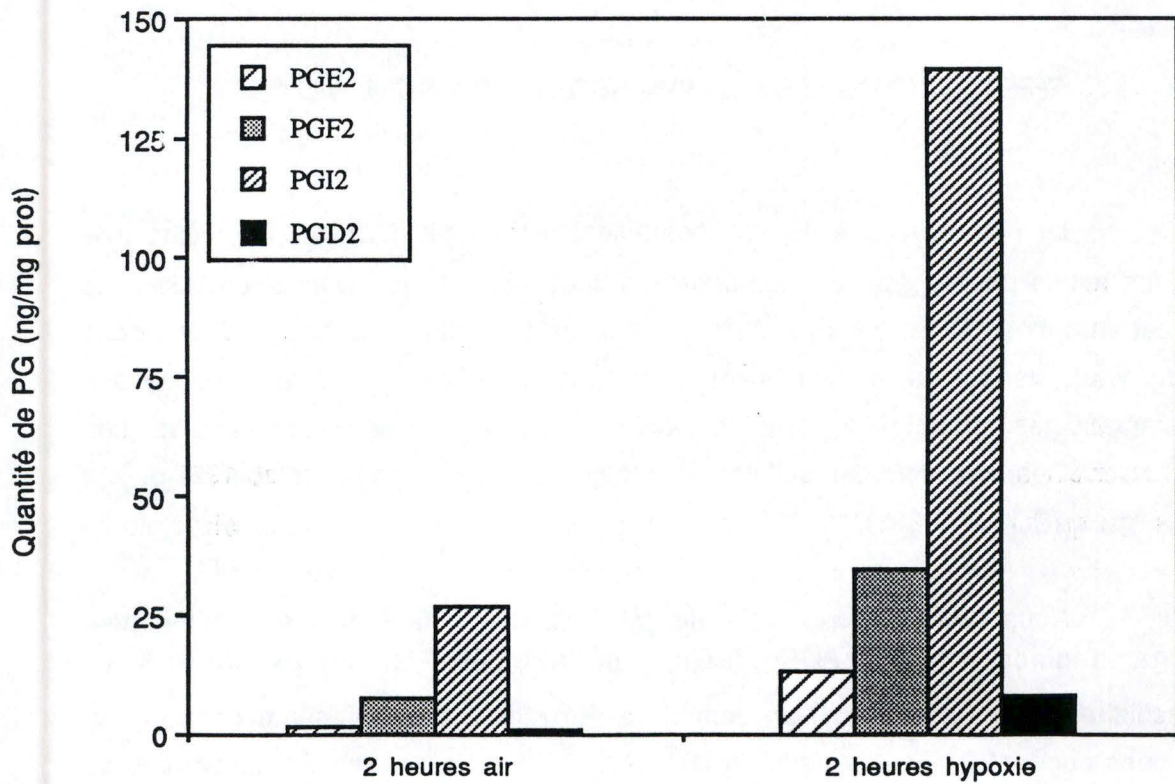


Figure 17 :
Effet de l'hypoxie sur la synthèse des prostaglandines par les cellules endothéliales. Les cellules sont incubées pendant deux heures sous hypoxie ou sous atmosphère normale. Les résultats sont exprimés en ng/mg de protéines et représentent la moyenne six expériences.

l'état de trace - et ce, en quantité minime (2,5 ng de prostaglandines par mg de protéines après 24 heures dans du D+HLA). Même si la quantité de prostaglandines est plus élevée après hypoxie par rapport aux contrôles incubés dans les conditions normales, cette quantité reste faible. Si on observe la figure 17, représentant la même expérience mais pour des *cellules endothéliales*, on remarque qu'elles synthétisent, par contre, une grande quantité de prostaglandines différentes (PGD₂, PGE₂, PGF₂α et la 6-céto-PGF₁α) après incubation sous hypoxie en comparaison aux cellules incubées sous air libre. Cette production de prostaglandines est extrêmement importante chez les cellules endothéliales, elle dépasse les 30 ng/mg de protéines pour les cellules qui n'ont pas subi d'hypoxie et atteint 195,92 ng/mg de protéines après deux heures d'hypoxie. Ceci montre que la phospholipase A₂ est bien activée chez les cellules endothéliales lors d'hypoxie (Michiels *et al*, sous presse b). Les cellules musculaires lisses, quant à elles, ne produisent que 1,054 ng de prostaglandines/mg de protéines après deux heures d'hypoxie. Les cellules musculaires lisses ne synthétisent donc pas une quantité importante de prostaglandines.

Ces nouveaux résultats confirment que la phospholipase A₂ n'est pas fortement activée lors d'une hypoxie chez les cellules musculaires lisses alors que l'hypoxie est un activateur puissant des cellules endothéliales.

Y a-t-il un lien entre l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire et l'activité de la phospholipase A₂?

Pour les cellules endothéliales, nous pouvons établir une corrélation entre l'activité de la PLA₂ mesurée par la libération d'acide arachidonique et l'élévation de la concentration calcique cytosolique lors de l'activation par hypoxie. Plus la concentration en calcium est élevée, plus la PLA₂ est activée. Rappelons que cette enzyme est directement activée par le calcium chez les cellules endothéliales. De plus, si on inhibe l'augmentation de la concentration du calcium à 65% par du vérapomil, on bloque aussi à 60% l'activation de la phospholipase A₂ (Arnould *et al*, 1992). Cela suggère que l'augmentation en calcium dans la cellule peut être directement responsable de l'activation de la cellule endothéliale pendant l'hypoxie.

Pour les cellules musculaires lisses, l'interprétation devient plus délicate. Même si on observe une augmentation du calcium intracellulaire suite à l'hypoxie, la phospholipase A₂, quant à elle, n'est pas activée. Clark *et al* (1986), grâce à un traitement au leucotriène D₄, ont pu activer la phospholipase A₂ chez un autre type de cellules musculaires lisses (BC3H₁). En fait, ils ont montré que l'augmentation de l'activité de la phospholipase A₂ était due à une induction de son expression. Deux

hypothèses peuvent être émises pour expliquer le fait que la phospholipase A₂ ne soit pas activée lors de l'hypoxie :

1) La phospholipase A₂ n'existe qu'en petite quantité dans les cellules musculaires lisses et nécessite une induction de son expression pour être activée. Cela expliquerait la faible quantité de prostaglandines synthétisées en conditions basales. L'hypoxie ne serait alors pas capable d'induire son expression, ce qui serait compréhensible puisque l'hypoxie est connue pour inhiber la synthèse protéique globale.

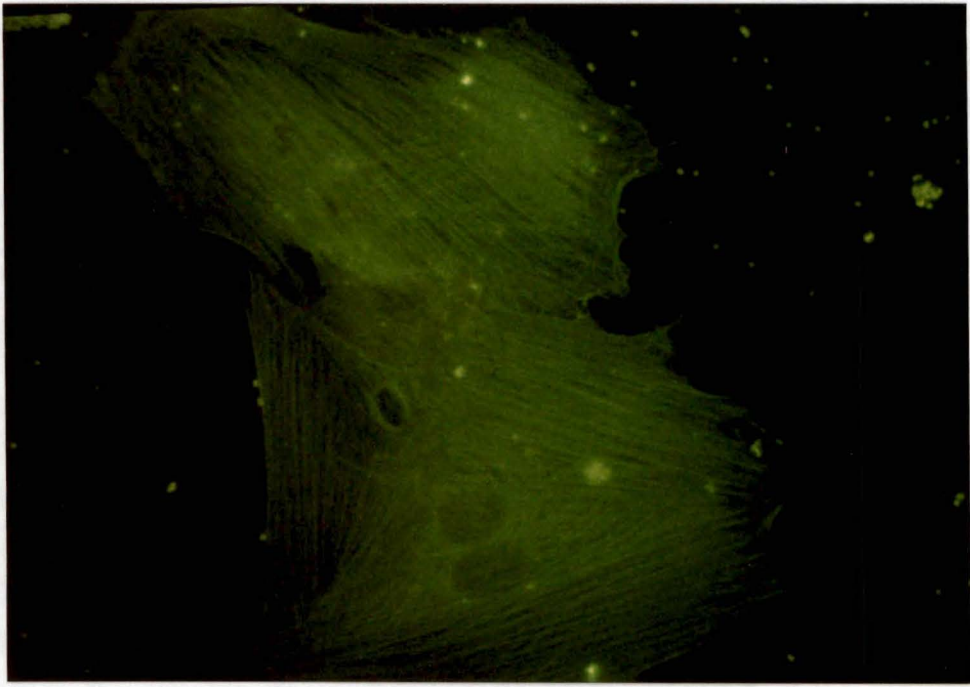
2) La phospholipase A₂ existe et peut être activée. On pourrait expliquer le fait qu'elle ne le soit pas sous hypoxie soit par le fait que le calcium active autre chose que la phospholipase A₂ chez les cellules musculaires lisses, comme par exemple la contraction cellulaire, ce qui correspondrait à la fonction normale de ce type cellulaire (Twort and Van Breemen, 1988; Wu and Borh, 1991; Siskind *et al*, 1989), soit que la phospholipase A₂ a besoin d'autre chose en plus que du calcium pour être activée dans les cellules musculaires lisses, comme par exemple d'être phosphorylée par la protéine kinase C.

Des expériences supplémentaires sont nécessaires afin de vérifier quel est l'impact d'une augmentation de la concentration calcique cytosolique sur les fonctions des cellules musculaires lisses et afin de pouvoir préciser laquelle de ces hypothèses est correcte.

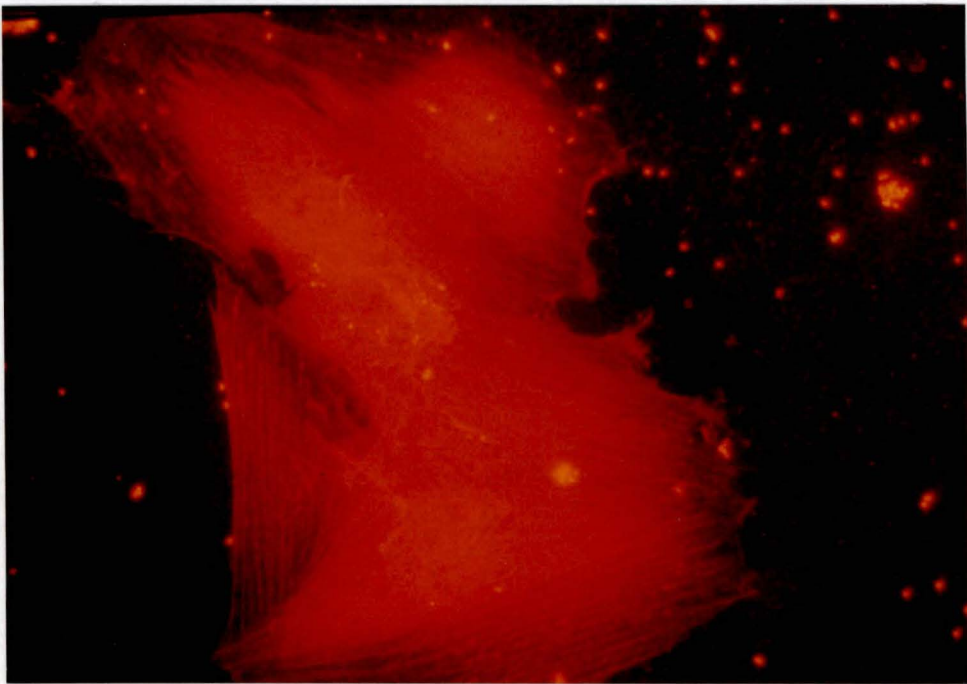
3.1.5. EFFET DE L'HYPOXIE SUR LE CYTOSQUELETTE DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES

Nous avons réalisé un double marquage en immunofluorescence des deux composants des filaments contractiles des cellules musculaires lisses : la myosine et l'actine alpha (Bennett *et al*, 1988). Il existe trois isotopes différents des filaments d'actine dans les cellules musculaires lisses : actine α , β et γ . Le nombre de filaments d'actine α est plus important lorsque ces cellules sont dans un état contractile. Les isotopes β et γ correspondent à des filaments non musculaires ou dits cytoplasmiques (Kocher and Madri, 1989).

Les protéines contractiles, telles que l'actine alpha, sont souvent utilisées comme marqueurs de la différenciation des cellules musculaires dans des conditions

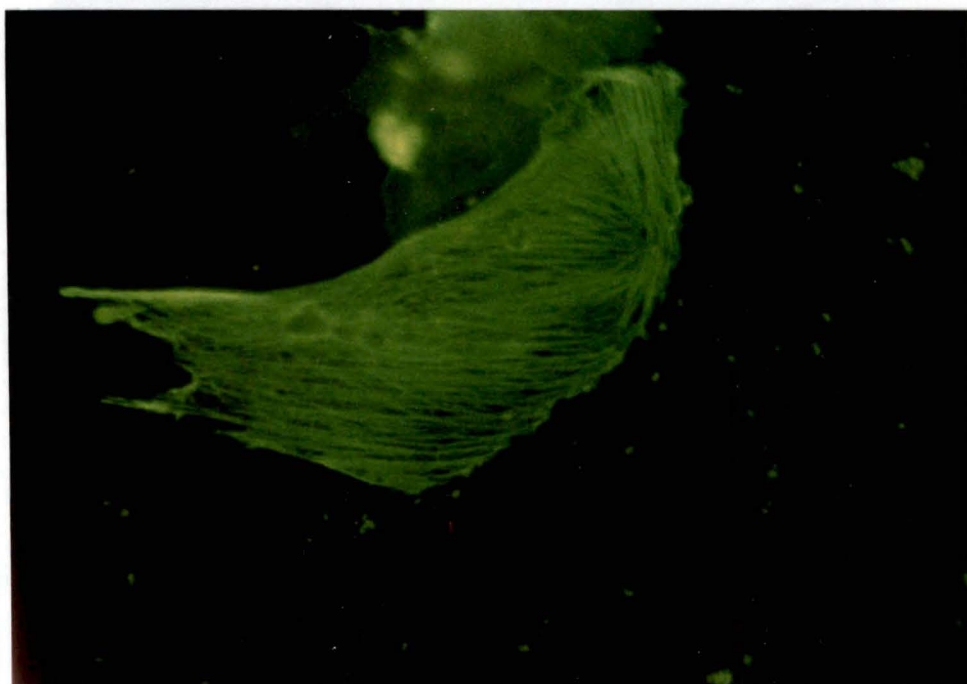


A

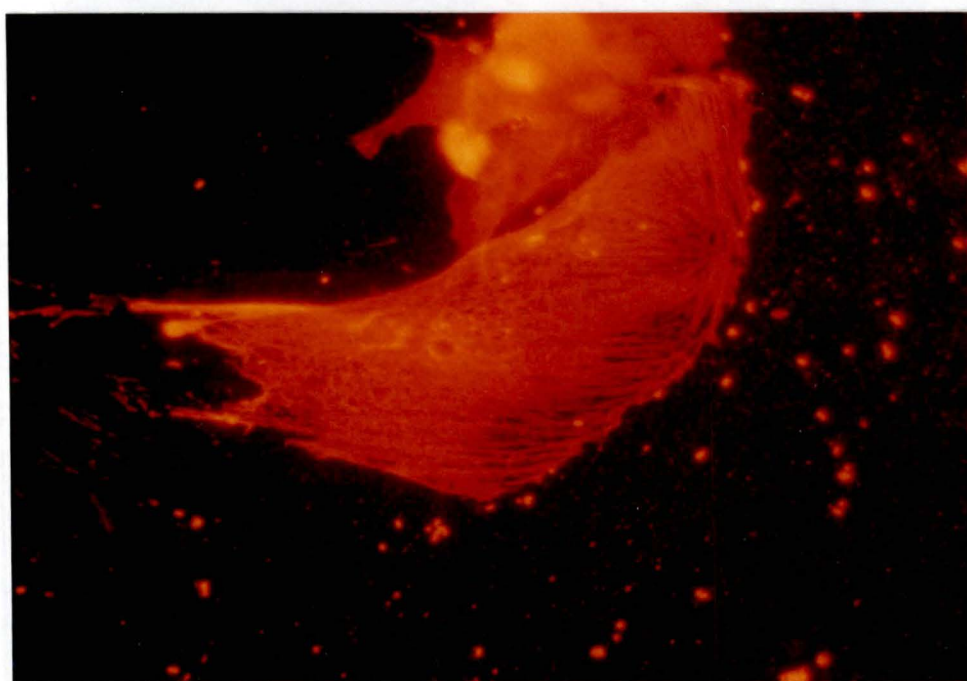


B

Photographies 3 :
Photographies représentant un double marquage en immunofluorescence de l'actine alpha des muscles lisses (fluorescéine) (a) et de la myosine musculaire (rhodamine) (b) des mêmes cellules musculaires lisses (grossissement 460 X). Les cellules musculaires lisses ont été incubées pendant 2 heures dans des conditions normales.



A



B

Photographies 4 :

Photographies représentant un double marquage en immunofluorescence de l'actine alpha des muscles lisses (fluorescéine) (a) et de la myosine musculaire (rhodamine) (b) des mêmes cellules musculaires lisses (grossissement 460 X). Les cellules musculaires lisses ont été incubées pendant 2 heures sous hypoxie.

pathologiques (Zanellata *et al*, 1990; Kocher and Madri, 1989). Lors des pathologies telles que les varices, les cellules musculaires lisses prolifèrent et migrent vers l'intima. Ces cellules passent dans ce cas d'un état contractile à un état synthétique.

Cette modulation phénotypique est bien caractérisée *in vitro* : en effet lorsque les cellules sont ensemencées à faible densité, elles prolifèrent et sont dans un état synthétique. Ensuite, lorsqu'elles arrivent à confluence, il y a inhibition de contact et expression du phénotype contractile. Les cellules acquièrent alors la capacité de se contracter spontanément et expriment en grande quantité la myokinase et l'actine phosphokinase (Kines and Brandt, 1976). On observe en parallèle un changement des types et du nombre de filaments d'actine (Kocher and Madri, 1989; Desmoulière *et al*, 1990).

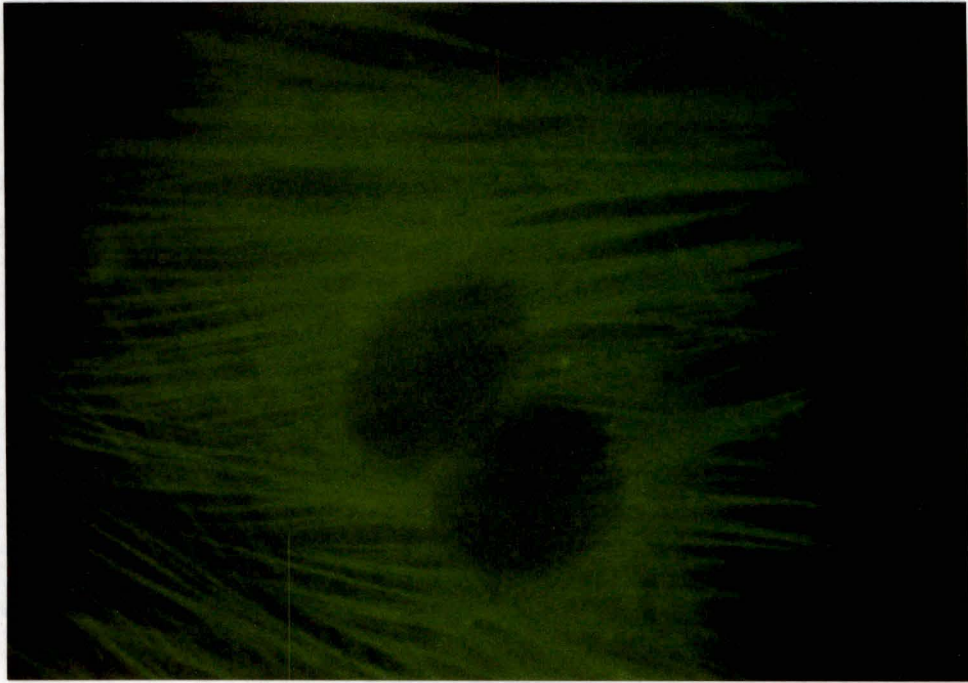
Lorsque les cellules passent de l'état contractile à l'état synthétique, on observe une diminution de l'expression de l'actine α (Blank *et al*, 1988; Hedin *et al*, 1990). Il y a alors une transition de l'isotype α en isotypes β et γ (Zanellato *et al*, 1990; Banskota *et al*, 1989) et une perte de l'expression de la myosine (Chambley-Campbell *et al*, 1979).

Nous avons étudié l'influence de l'hypoxie sur l'expression de l'actine et de la myosine afin de vérifier si l'hypoxie pouvait induire directement un changement du phénotype des cellules musculaires lisses, sachant que ce changement éventuel pourrait être facilement visualisé en suivant l'organisation des microfilaments dans les cellules.

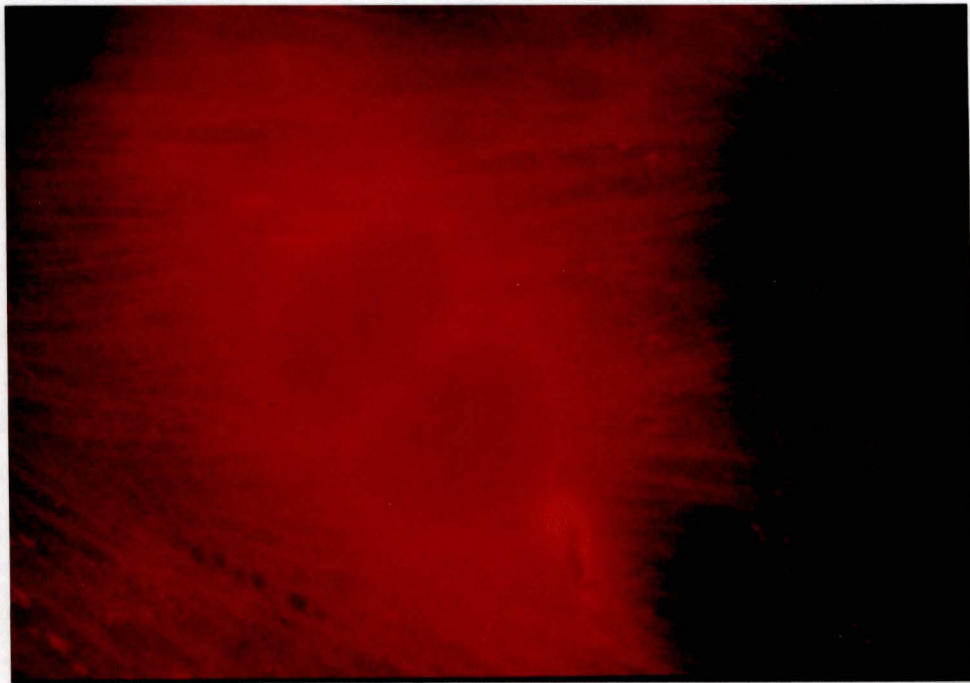
Les photographies 3 et 5 représentent les cellules contrôles. On remarque que les anticorps dirigés contre l'actine et la myosine marquent les mêmes structures dans le cytoplasme des cellules : ce sont les microfilaments. Ceux-ci sont arrangés en faisceaux de fins filaments droits et parallèles, principalement dans l'axe longitudinal des cellules. Certaines couches de faisceaux s'entrecroisent cependant.

Après incubation sous hypoxie, les cellules musculaires lisses présentent une désorganisation de leurs microfilaments (photographies 4 et 6). On observe en effet un réseau plus lâche de filaments plus ondulés. La densité des microfilaments semble aussi diminuée. L'organisation stricte des microfilaments observée dans les cellules contrôles semble perturbée.

On remarque aussi au gros grossissement que les anticorps anti-myosine marquent des structures globulaires en plus des microfilaments dans le cytoplasme des cellules. Ces agrégats de myosine résulteraient de la dépolymérisation de la myosine fibrillaire. Chambley-Campbell *et al* (1979) ont déjà montré que ces agrégats résultent bien de la désorganisation des microfilaments lors du passage des cellules musculaires lisses de l'état contractile à l'état synthétique.

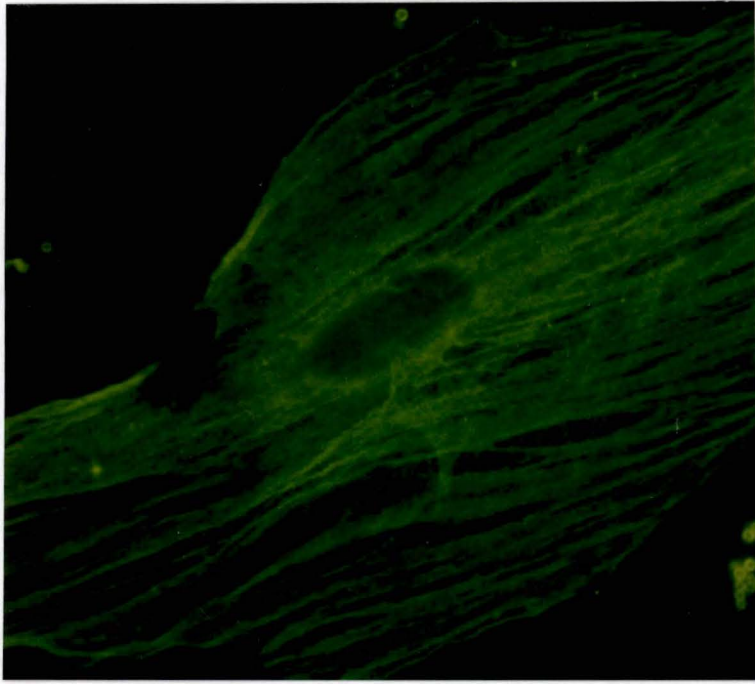


A

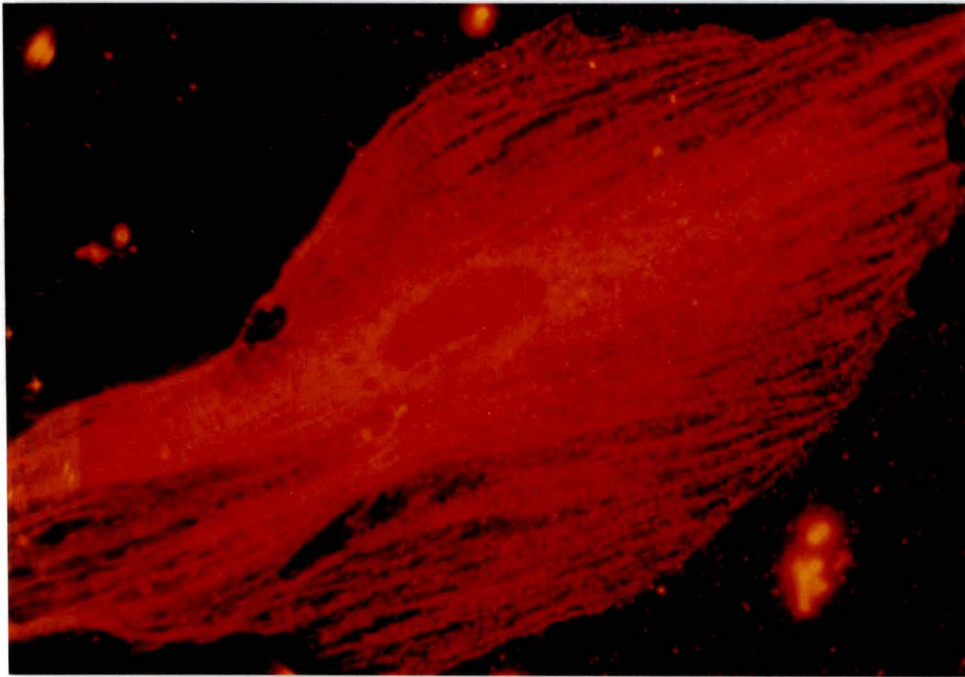


B

Photographies 5 :
Photographies représentant un double marquage en immunofluorescence de l'actine alpha des muscles lisses (fluorescéine) (a) et de la myosine musculaire (rhodamine) (b) des mêmes cellules musculaires lisses (grossissement 1150 X). Les cellules musculaires lisses ont été incubées pendant 2 heures dans les conditions normales.



A



B

Photographies 6 :

Photographies représentant un double marquage en immunofluorescence de l'actine alpha des muscles lisses (fluorescéine) (a) et de la myosine musculaire (rhodamine) (b) des mêmes cellules musculaires lisses (grossissement 1150 X). Les cellules musculaires lisses ont été incubées pendant 2 heures sous hypoxie.

<u>Types cellulaires :</u>	CML	CE	
<u>50% de viabilité :</u>	10 heures d'hypoxie	3-4 heures d'hypoxie	
<u>Calcium :</u>	2h AIR	70-80 nM	25-30 nM
	2h Hypoxie	350 nM	250-300 nM
<u>Release AA* :</u> (2 heures d'hypoxie)	8 %	55 %	
<u>AS* :</u>	8 %	20 %	
<u>Prostaglandines :</u> (2 heures d'hypoxie)	1,054	195,92 (ng/mg prot)	

Tableau 1 :

Tableau récapitulatif comparant les différents résultats obtenus lors des expériences sur l'étude de l'effet de l'hypoxie sur les cellules musculaires lisses et sur les cellules endothéliales.

Ces résultats montrent que l'hypoxie induit une altération de l'organisation du réseau de microfilaments des cellules musculaires lisses, sans doute due à l'induction de la dépolymérisation des composants de ces filaments et principalement de la myosine. La cause exacte de cette désorganisation n'est pas connue mais il est vraisemblable que l'augmentation de la concentration en calcium cytosolique induite par hypoxie joue un rôle important dans ce processus.

3.1.6. DISCUSSION

Si l'on compare les différents résultats obtenus dans cette première partie du travail (tableau 1), on remarque bien que les cellules musculaires lisses sont beaucoup plus résistantes à l'hypoxie que les cellules endothéliales. Il ne faut que trois à quatre heures d'incubation sous hypoxie pour que la moitié des cellules endothéliales meurent. Il faut, par contre, attendre dix heures pour avoir le même résultat pour les cellules musculaires lisses. Ceci est peut être dû au fait que les cellules musculaires lisses, étant situées plus profondément dans la paroi vasculaire par rapport aux cellules endothéliales vivent dans un environnement où la pression en oxygène est plus basse qu'au niveau du sang. Elles pourraient donc être moins sensibles à une hypoxie.

Quand on regarde la concentration en calcium intracellulaire après deux heures d'hypoxie, elle est dix fois plus grande, chez les cellules endothéliales, par rapport aux contrôles laissés à l'air libre. Même si cette concentration, chez les cellules musculaires lisses, est plus élevée après ce temps d'incubation, elle n'est, par contre, que cinq fois plus grande que celle des contrôles. De plus, ces cellules parviennent à réguler leur homéostasie calcique en quelques minutes lorsqu'elles sont replacées dans les conditions normales, alors qu'il faut plus de cinq minutes aux cellules endothéliales pour réguler leur concentration en calcium cytosolique. Ces résultats indiquent les cellules musculaires lisses régulent de manière très rapide leur concentration calcique, probablement via leurs nombreux organites de stockage et leur métabolisme serait par conséquent moins perturbé par un changement moins intense de la concentration calcique cytosolique.

En outre, lorsqu'on compare la libération de l'acide arachidonique mesurant l'activité de la phospholipase A₂ chez ces deux types cellulaires, on remarque qu'elle reste faible chez les cellules musculaires lisses. De plus, la libération de l'acide stéarique est du même ordre de grandeur que celle de l'acide

arachidonique chez les cellules musculaires lisses alors qu'elle est nettement inférieure chez les cellules endothéliales. Cela montrerait que la PLA₂ est spécifiquement activée par l'hypoxie dans ces cellules mais pas chez les cellules musculaires lisses.

Enfin, la quantité de prostaglandines sécrétées après deux heures d'hypoxie par les cellules endothéliales est environ deux cents fois plus grande que celle produite par les cellules musculaires lisses.

Au vu de ces résultats, nous pouvons suggérer que les cellules musculaires lisses ne sont pas activées par l'hypoxie comme le sont les cellules endothéliales. On peut peut-être expliquer ce résultat par leur régulation très fine de leur homéostasie calcique et par le fait que le calcium est tout d'abord destiné dans ce type de cellule à réguler la contraction cellulaire. Par contre, dans les cellules endothéliales, le calcium est reconnu comme facteur important pour la régulation de la synthèse des différents médiateurs inflammatoires. Comme l'hypoxie a pour premier effet d'augmenter la concentration en calcium dans le cytosol, l'effet de cette hypoxie se traduit de manière très différente sur les deux types cellulaires, dans lesquels le calcium joue un rôle différent.

Notons tout de même que l'hypoxie semble induire une modulation phénotypique des cellules musculaires lisses. Les microfilaments d'actine alpha et de myosine se désorganisent lors de l'incubation sous hypoxie. Cela suggère que ces cellules pourraient passer d'un état contractile à un état synthétique lors d'une hypoxie, leur permettant de proliférer si elles sont stimulées par des facteurs de croissance.

Les cellules endothéliales sont en contact direct avec la circulation sanguine. Par ce fait, elles sont les premières touchées lors d'hypoxie. Elles sont plus sensibles aux modifications se déroulant au début des pathologies veineuses, telles que les varices. Vu leurs nombreuses fonctions, qui sont décrites aux points 1.1.2.1 et 1.1.4.2., lors des phénomènes d'échanges et dans la synthèse de médiateurs cellulaires, leur activation pourrait engendrer des modifications au niveau de la perméabilité de l'endothélium et de la production de facteurs de croissance pour les cellules musculaires lisses. Ces facteurs, en provoquant la prolifération de ces cellules, conduiraient au remaniement de la paroi variqueuse.

Par contre, les cellules musculaires lisses paraissent moins sensibles à la privation en oxygène lors d'une ischémie. Vu leur localisation, elles ne joueraient

qu'un rôle ultérieur lors de pathologies veineuses suite à des altérations de leur métabolisme qui dépendraient de l'activation préalable des cellules endothéliales.

3.2. EFFET DES SURNAGEANTS DE CELLULES ENDOTHELIALES SUR LES CELLULES MUSCULAIRES LISSES

Lors du développement des varices, de nombreuses altérations tissulaires s'installent entraînant des modifications au niveau de la paroi vasculaire. Elles semblent résulter d'une suite d'événements provenant d'interactions entre les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. Ces différents changements tissulaires et cellulaires sont énumérés au point 1.2.2. Parmi les principales modifications, c'est la prolifération, puis la migration, des cellules musculaires lisses de la média vers l'intima qui sont la cause importante de la désorganisation de la paroi de la veine.

On vient de montrer qu'*in vitro*, l'hypoxie n'active pas directement les cellules musculaires lisses que ce soit au niveau de leur métabolisme de l'acide arachidonique ou au niveau de leur prolifération mais, par contre, on observe une désorganisation des microfilaments. Cependant, *in vivo* lors du développement des varices, on observe que les cellules musculaires lisses passent d'un état contractile à un état synthétique et prolifératif. De plus, les cellules endothéliales, principal type cellulaire de l'intima en contact avec la circulation, sont activées lors d'une hypoxie. Ce sont ces cellules de la paroi vasculaire qui sont les premières touchées lors d'une ischémie. Nous savons aussi que les cellules de l'endothélium dans leur état normal ou activé synthétisent de nombreux facteurs de croissance (point 1.1.4.1.) dont des prostaglandines en grande quantité.

C'est pour vérifier le rôle des cellules endothéliales dans le changement de l'état fonctionnel des cellules musculaires lisses observé *in vivo* que nous avons étudié l'effet des surnageants de cellules endothéliales ayant subi une hypoxie sur la prolifération des cellules musculaires lisses *in vitro*.

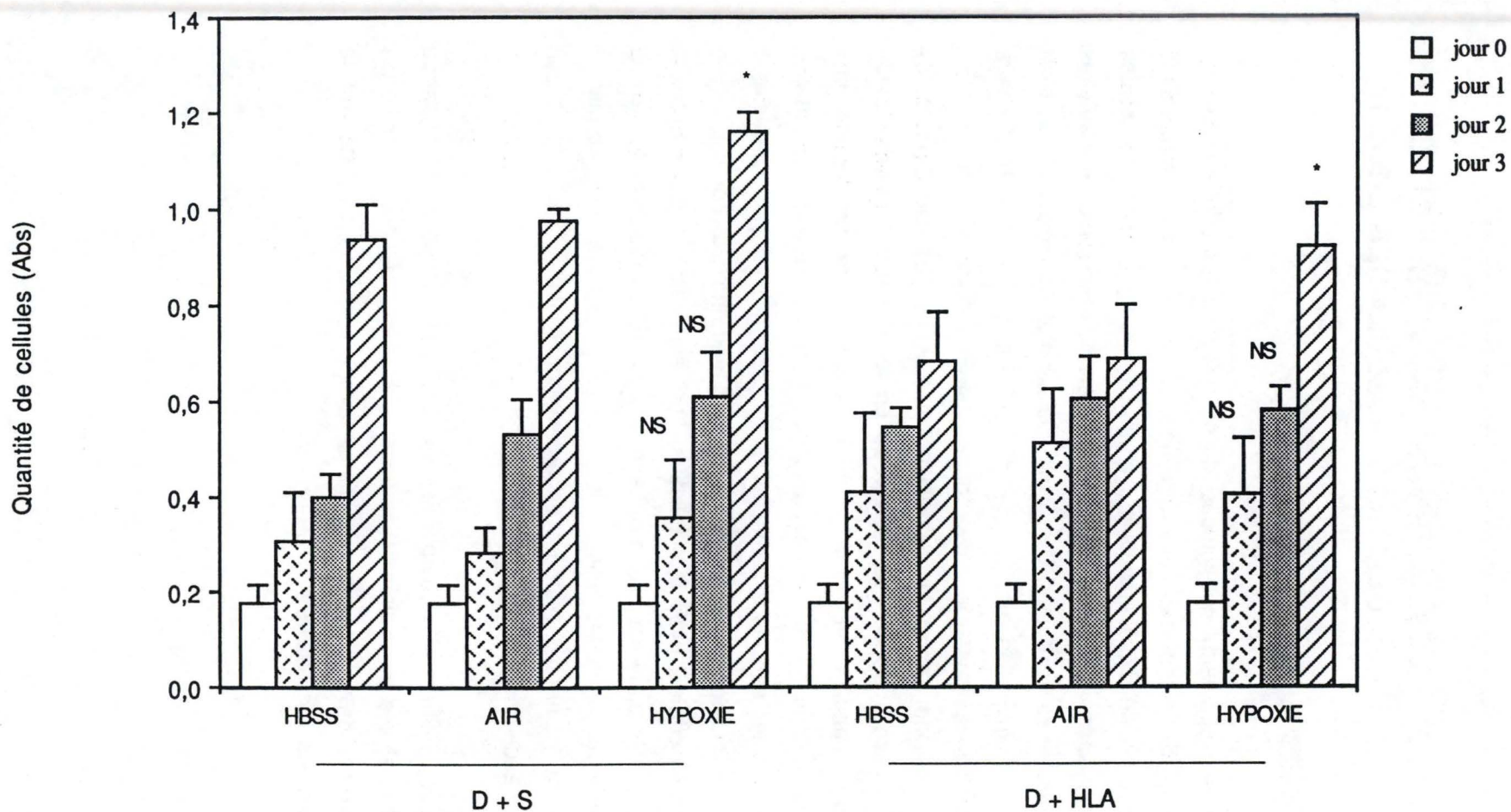


Figure 18 :
 Effet des surnageants de cellules endothéliales ayant subi deux heures d'hypoxie sur la prolifération des cellules musculaires lisses après un, deux et trois jours. La viabilité est estimée par la méthode à l'hexoaminidase. Les cellules musculaires lisses sont incubées dans deux milieux différents : du Dulbecco + sérum (D+S) et du Dulbecco contenant 0,2% d'HLA (D+HLA). Les surnageants sont dilués cinq fois. Les cellules contrôles sont incubées avec du surnageant de cellules endothéliales qui n'ont pas subi d'hypoxie ou avec du HBSS+calcium. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm 1 écart-type (n=8).
 * : significativement différent des cellules contrôles correspondantes (AIR) avec $P < 0,05$ (test t de Student).

3.2.1. EFFET PRO-PROLIFERATIF DES SURNAGEANTS DE CELLULES ENDOTHELIALES

Pour vérifier si les cellules endothéliales activées par hypoxie relarguent un ou des facteur(s) de croissance pour les cellules musculaires lisses, nous avons testé l'effet de surnageants de cellules endothéliales ayant subi deux heures d'hypoxie sur la prolifération des cellules musculaires lisses.

La mesure de la prolifération des cellules musculaires lisses s'est faite expérimentalement par une estimation du nombre de cellules par la méthode à l'hexoaminidase. Nous avons en effet montré précédemment grâce à la courbe d'étalonnage présentée au point 2.8. (graphique) que l'absorbance mesurée à 405 nm est directement proportionnelle à la quantité de cellulesensemencées dans le puits.

Les surnageants ont été dilués cinq fois dans deux milieux différents : Dulbecco avec 10% de sérum (D+S) et Dulbecco contenant 0,2% d'HLA (D+HLA). Ce dernier ne contient pas de facteurs de croissance et permet donc de mettre en évidence la présence de facteurs de croissance qui permettent à la cellule de boucler son cycle cellulaire complet. Le D+S, par contre, permet de mettre en évidence des facteurs qui augmentent la vitesse des mitoses déclenchées par les facteurs de croissance présents en grande quantité dans le sérum de veau foetal.

Nous avons comparé l'effet des surnageants de cellules endothéliales ayant subi deux heures d'hypoxie à l'effet de surnageants de cellules contrôles, afin de vérifier que l'hypoxie stimule bien la libération de facteurs provoquant la prolifération des cellules musculaires lisses. De plus, comme les cellules endothéliales sont incubées sous hypoxie en présence de HBSS+Ca⁺⁺, nous avons aussi réalisé un contrôle négatif où du HBSS+Ca⁺⁺ dilué cinq fois dans du D+S ou du D+HLA est testé sur la prolifération des cellules musculaires lisses.

La figure 18 présente les résultats d'une telle expérience. Différentes choses sont à remarquer. Premièrement, les cellules prolifèrent beaucoup plus en présence de sérum qu'en son absence, ce qui est tout à fait normal puisque celui-ci contient de nombreux facteurs de croissance. Ensuite, on observe une croissance exponentielle des cellules en fonction du temps. Enfin, et c'est ce qui est le plus important, les cellules mises en présence de surnageants de cellules endothéliales ayant subi deux heures d'hypoxie prolifèrent significativement plus que celles mises en présence d'un surnageant de cellules endothéliales contrôles. Cet effet est observé en présence de D+S et de D+HLA. Comme la croissance des cellules musculaires lisses en

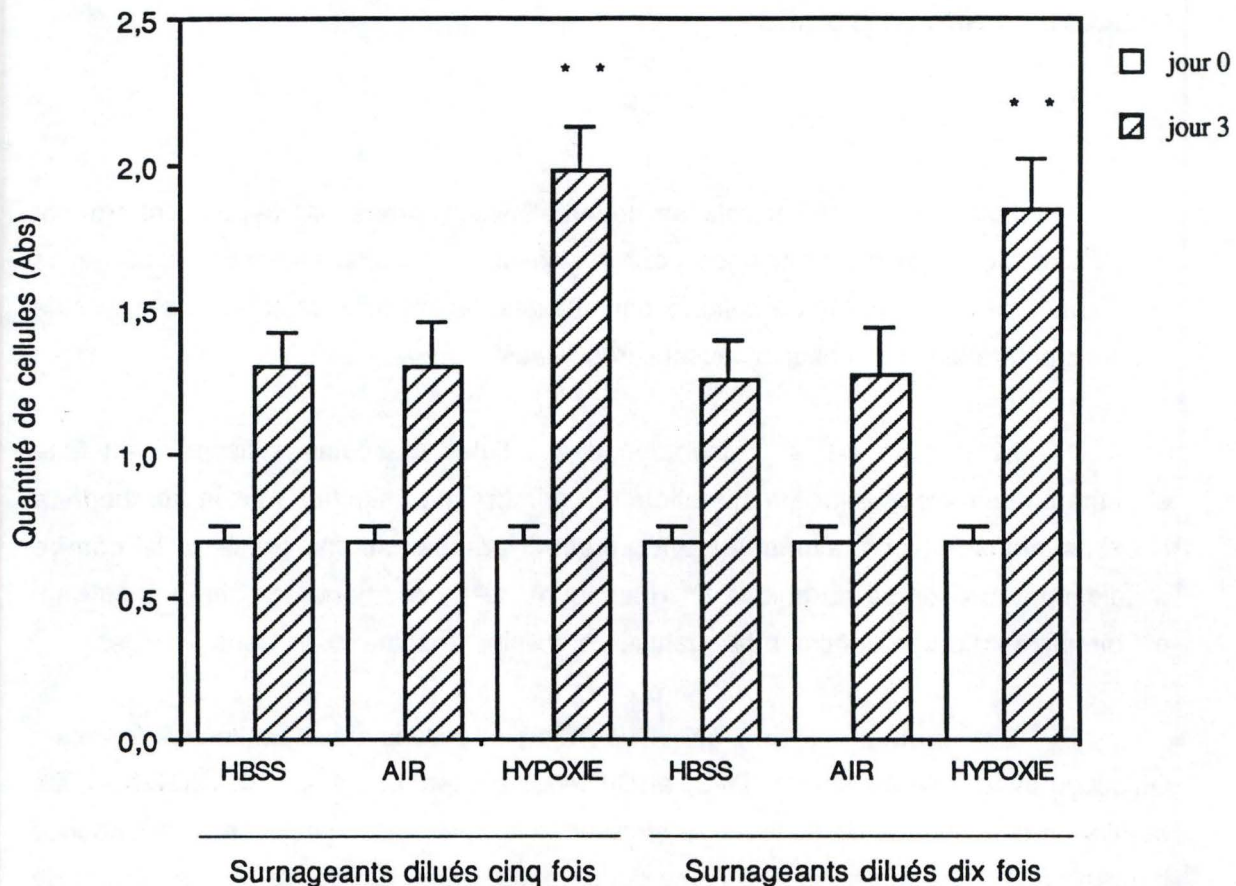


Figure 19 :

Effet des surnageants de cellules endothéliales ayant subi deux heures d'hypoxie sur la prolifération des cellules musculaires lisses après trois jours. La viabilité est estimée par la méthode à l'hexoaminidase. Les cellules musculaires lisses sont incubées dans du Duibecco + HLA. Les surnageants sont dilués cinq fois ou dix fois. Les cellules contrôles sont incubées avec du surnageant de cellules endothéliales qui n'ont pas subi d'hypoxie ou avec du HBSS+calcium. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm 1 écart-type (n=16). ** : significativement différent des cellules contrôles correspondantes (AIR) avec $P < 0,001$ (test t de Student).

présence de surnageants de cellules endothéliales contrôles est du même ordre de grandeur que celles incubées en présence de HBSS+Ca⁺⁺, on peut suggérer que les cellules endothéliales dans des conditions normales ne synthétisent pas ou peu de facteurs de croissance pour les cellules musculaires lisses.

L'effet pro-prolifératif des surnageants de cellules endothéliales ayant subi deux heures d'hypoxie a été observé dans neuf expériences sur douze réalisées.

Il est également intéressant de noter que cet effet semble spécifique et indique la présence de molécules activatrices de la croissance des cellules musculaires lisses, puisque l'effet pro-prolifératif des surnageants de cellules endothéliales qui ont subi deux heures d'hypoxie est dose-dépendant : en effet, l'effet observé lorsque le surnageant est dilué dix fois (42,3% d'augmentation de la croissance après trois jours) est plus faible que celui observé lorsqu'il est dilué cinq fois (49,6%) (figure 19).

3.2.2. EFFET D'INHIBITEURS SUR LA PROLIFERATION DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES

Afin de comprendre quel(s) facteur(s), libéré(s) par les cellules endothéliales activées par l'hypoxie, agi(ssen)t sur la prolifération des cellules musculaires lisses, nous avons utilisé divers inhibiteurs de différentes voies de synthèse.

Sur la figure 20, on observe, comme dans les expériences antérieures, que le surnageant de cellules endothéliales ayant subi deux heures d'hypoxie contient des médiateurs stimulant la division des cellules musculaires lisses et ce, au contraire du surnageant des cellules endothéliales contrôles.

Différentes molécules agissant sur l'activation des cellules endothéliales ont été utilisées : le β -hydroxybutyrate, la cycloheximide, l'indométhacine et l'acide oléique. Toutes ces molécules, à l'exception de la cycloheximide, ont été ajoutées dans l'HBSS pendant l'incubation des cellules endothéliales sous hypoxie ou sous atmosphère normale. La cycloheximide quant à elle a été ajoutée dans le milieu de culture des cellules endothéliales pendant quatre heures avant l'hypoxie. L'hypoxie a été ensuite réalisée dans du HBSS+Ca⁺⁺ seul. Nous avons procédé de cette façon afin d'éviter la présence de cycloheximide dans le surnageant mis sur les cellules musculaires lisses. En effet, cette molécule bloque à elle seule la division des cellules.

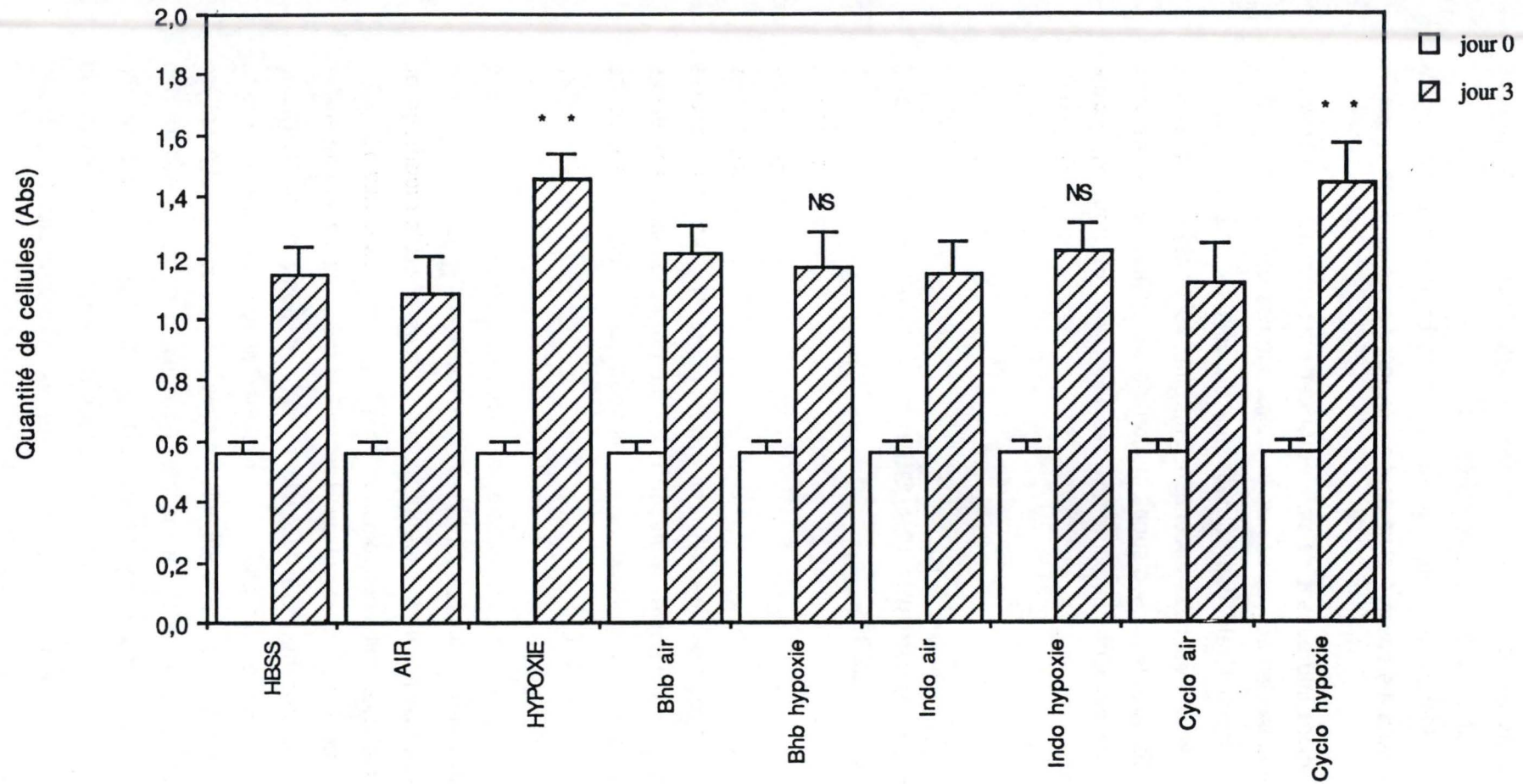


Figure 20 :

Effet des surnageants de cellules endothéliales ayant subi deux heures d'hypoxie en présence de différents inhibiteurs sur la prolifération des cellules musculaires lisses après trois jours. La viabilité est estimée par la méthode à l'hexoaminidase. Les cellules musculaires lisses sont incubées dans du Dulbecco + HLA. Les surnageants sont dilués cinq fois. Les cellules contrôles sont incubées avec du surnageant de cellules endothéliales qui n'ont pas subi d'hypoxie ou avec du HBSS+calcium. Les inhibiteurs utilisés sont le β -hydroxybutyrate (Bhb), l'indométhacine (Indo) et la cycloheximide (Cyclo). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm 1 écart-type (n=8).

** : significativement différent des cellules contrôles correspondantes (AIR) avec $P < 0,01$ (test t de Student).

Le *β -hydroxybutyrate* est un corps cétonique qui fournit de l'énergie à la cellule. Lorsqu'il est présent pendant l'hypoxie, il prévient l'augmentation calcique cytosolique chez les cellules endothéliales et par là, inhibe totalement l'activation de ces cellules par l'hypoxie (Arnould *et al*, 1992). La figure 20 nous montre que le β -hydroxybutyrate présent pendant l'incubation sous hypoxie des cellules endothéliales inhibe l'effet pro-prolifératif du surnageant de ces cellules ayant subi deux heures d'hypoxie. Si cette substance bloque cet effet, cela montre bien que la ou les molécules provoquant l'effet pro-prolifératif observé est bien synthétisée par les cellules de l'endothélium lors de leur activation par l'hypoxie.

La *cycloheximide* est l'inhibiteur le plus utilisé de la synthèse protéique. La figure 20 montre que cet inhibiteur ne bloque pas l'activation de la prolifération par les surnageants de cellules endothéliales ayant subi deux heures d'hypoxie. Aucune différence significative n'est observée par rapport au surnageant des cellules incubées sous hypoxie sans inhibiteur. Le ou les facteur(s) mitogène(s) sécrété(s) par les cellules de l'endothélium lors d'hypoxie ne semble donc pas être un peptide ou une protéine, ce qui exclut un rôle du PDGF, connu pour être synthétisé par les cellules endothéliales activées (point 1.1.4.2.).

L'*indométhacine* est un inhibiteur puissant de la cyclooxygénase et donc de la synthèse des prostaglandines. Sur la figure 20, nous observons que cette substance bloque totalement l'effet pro-prolifératif des surnageants des cellules endothéliales hypoxiques sur les cellules musculaires lisses : les cellules incubées pendant trois jours avec le surnageant contenant cet inhibiteur ne se sont pas multipliées plus que celles mises en présence du surnageant des cellules contrôles. Ceci montre que le ou les facteur(s) mitogène(s) semble(nt) dériver de la voie de la cyclooxygénase. Cela pourrait donc être une ou plusieurs des prostaglandines synthétisées en grande quantité par les cellules endothéliales incubées sous hypoxie.

L'*acide oléique* est un acide gras qui inhibe spécifiquement la production du PAF, agent pro-inflammatoire, via une inhibition de l'acyltransférase. Les résultats obtenus montrent que cette molécule n'a pas d'effet (résultats non montrés). Le PAF ne semble donc pas être le facteur de croissance recherché.

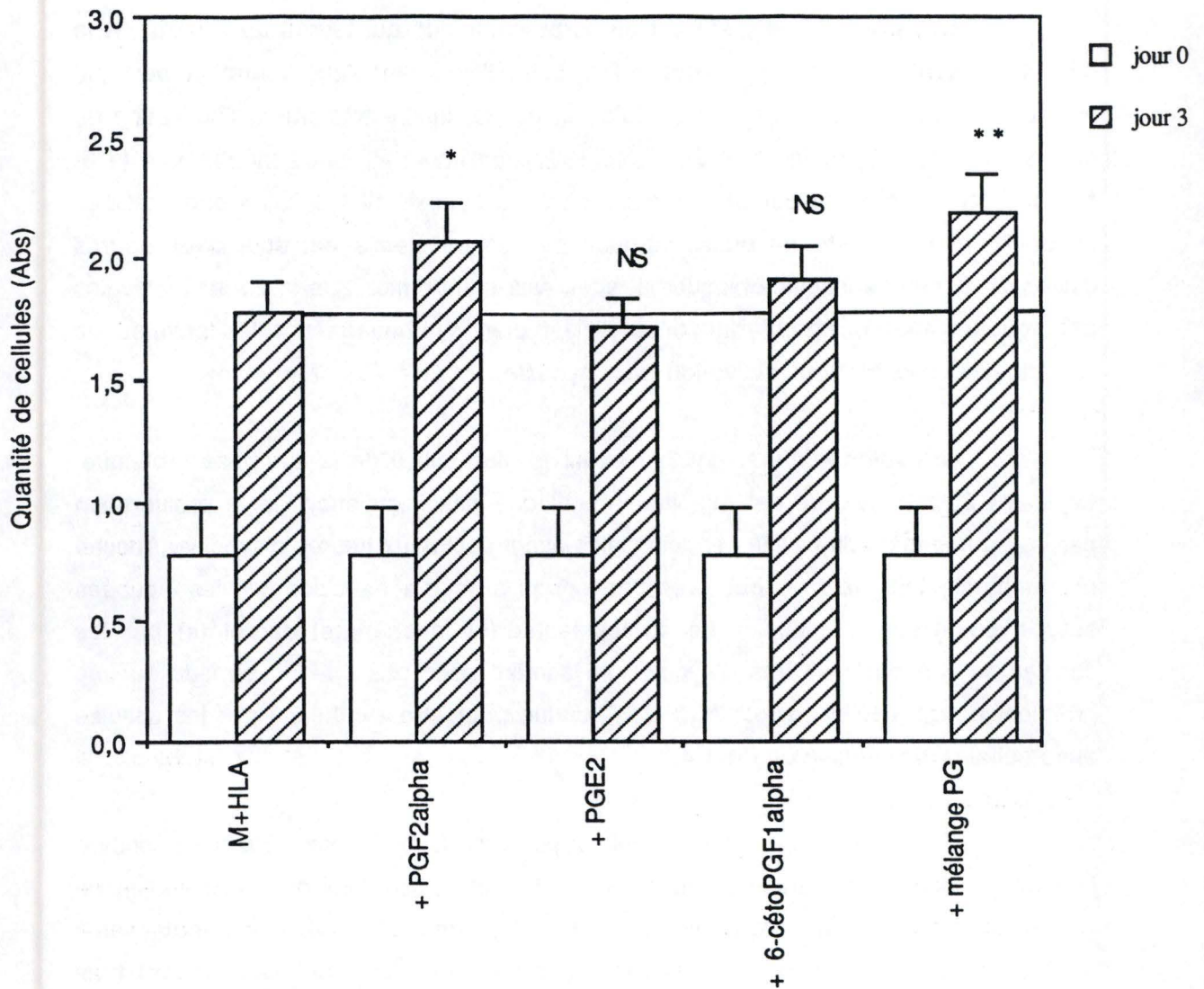


Figure 21 :

Effet direct des prostaglandines sur la prolifération des cellules musculaires lisses après trois jours. La viabilité est estimée par la méthode à l'hexoaminidase. Les cellules musculaires lisses sont incubées avec du Dulbecco + HLA. Les cellules contrôles sont incubées avec du Dulbecco + HLA sans prostaglandine. Les prostaglandines utilisées sont la $\text{PGF}_2\alpha$ ($3,36 \cdot 10^{-6}\text{M}$), la PGE_2 ($1,9 \cdot 10^{-6}\text{M}$) et la 6-céto- $\text{PGF}_1\alpha$ ($18,6 \cdot 10^{-6}\text{M}$).

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm 1 écart-type (n=16).

** : significativement différent des cellules contrôles avec $P < 0,01$ (test t de Student).

* : significativement différent des cellules contrôles avec $P < 0,05$ (test t de Student).

3.2.3. EFFET DIRECT DES PROTAGLANDINES SUR LA PROLIFERATION DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES

Pour prouver d'une façon directe l'effet potentiel des molécules dérivées de l'acide arachidonique via la cyclooxygénase, c'est-à-dire des prostaglandines, comme facteurs de croissance pour les cellules musculaires lisses, nous avons testé l'effet sur la prolifération des cellules musculaires lisses de prostaglandines pures en les ajoutant dans le milieu d'incubation.

Les concentrations des différentes prostaglandines rajoutées correspondent à celles que les cellules endothéliales secrètent après une incubation de deux heures sous hypoxie. Ces valeurs ont été calculées sur une moyenne de six expériences en considérant le facteur de dilution cinq fois utilisé pour les surnageants.

Nous avons testé les trois prostaglandines les plus abondantes : la PGE₂ à $1,9 \cdot 10^{-6}$ M, la PGF₂α à $3,36 \cdot 10^{-6}$ M et la 6-céto-PGF₁α, dérivé stable de la PGI₂, à $18,6 \cdot 10^{-6}$ M. Un mélange de ces trois molécules aux mêmes concentrations a été également testé.

Comme le montre la figure 21, la PGF₂α a un effet significatif sur la prolifération des cellules musculaires lisses. Les deux autres prostaglandines ne montrent par contre, pas d'effet activateur de la croissance cellulaire. Nous remarquons aussi un léger effet de la 6-céto-PGF₁α mais qui n'est pas statistiquement significatif. La PGE₂, pour sa part, n'a pas d'effet pro-prolifératif.

Nous observons également un effet hautement significatif du mélange des trois prostaglandines qui atteint une valeur similaire à celle observée avec la PGF₂α seule. Cette prostaglandine serait donc le facteur mitogène sécrété par les cellules endothéliales incubées sous hypoxie.

Nous avons ensuite réalisé des courbes de concentrations pour les prostaglandines PGF₂α et 6-céto-PGF₁α, afin de vérifier leurs effets respectifs (figure 22 a et b). Nous remarquons que la PGF₂α induit bien l'activation de la division cellulaire des cellules musculaires lisses. Cet effet est très net à 10^{-5} M et diminue avec la concentration en PGF₂α. L'effet pro-prolifératif de la PGF₂α est très puissant puisqu'il atteint presque celui observé en présence de 10% de sérum. La 6-céto-PGF₁α n'induit pas d'effet pro-prolifératif quelle que soit sa concentration, ce qui correspond aux résultats obtenus précédemment.

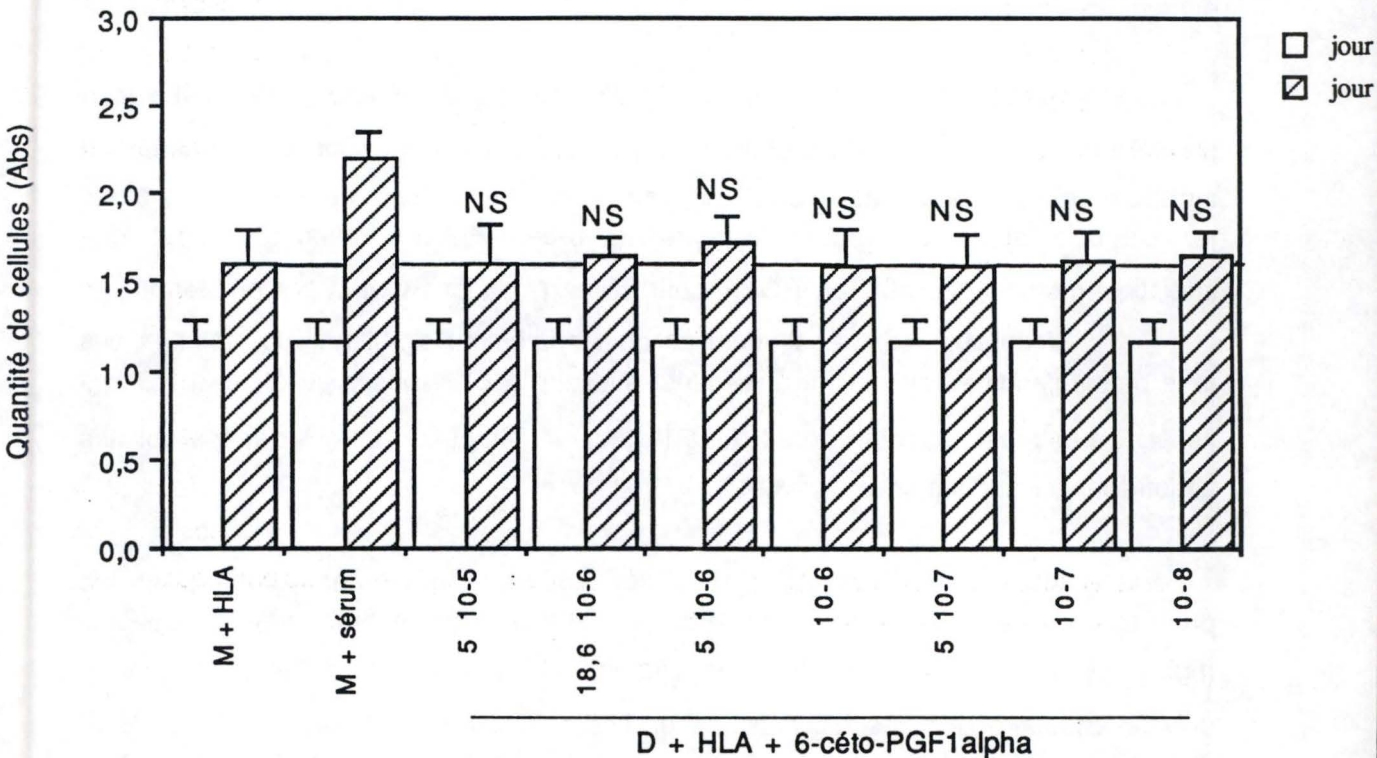
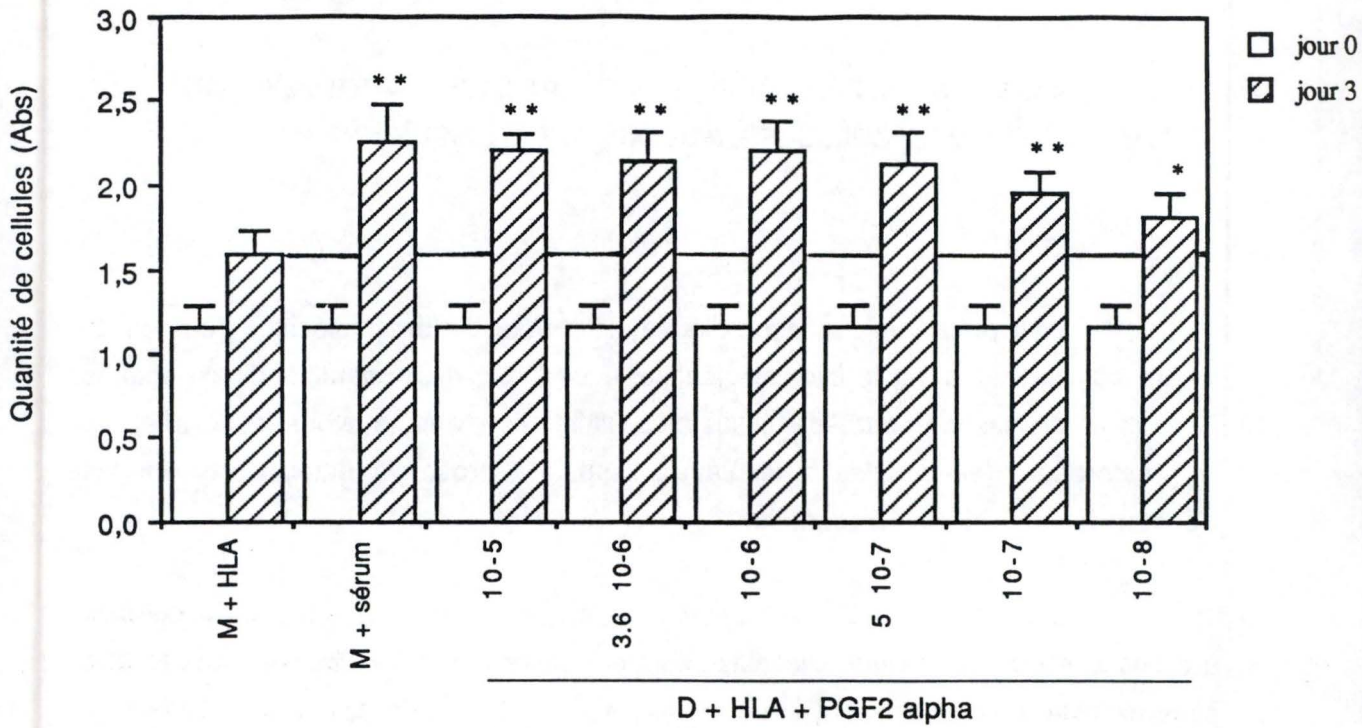


Figure 22 :

Effet de la PGF₂α (a) et de la 6-céto-PGF₁α (b) à différentes concentrations sur la prolifération des cellules musculaires lisses après trois jours. La viabilité est estimée par la méthode à l'hexoaminidase. Les cellules musculaires lisses sont incubées dans du Dulbecco + HLA. Les cellules contrôles sont incubées avec du Dulbecco + HLA sans prostaglandine. Les résultats sont exprimés en moyenne ± 1 écart-type (n=8).

** : significativement différent des cellules contrôles avec P<0,001 (test t de Student).

* : significativement différent des cellules contrôles avec P<0,005 (test t de Student).

3.2.4. DISCUSSION

A la vue de tout ces résultats, nous pouvons donc suggérer que les prostaglandines et surtout la $\text{PGF}_2\alpha$ sont responsables de la prolifération des cellules musculaires lisses lors de phénomènes comme l'ischémie. Les cellules endothéliales activées lors d'hypoxie synthétisent et secrètent des facteurs de croissance, telles que les prostaglandines, permettant d'activer la prolifération des cellules musculaires lisses. La désorganisation de la paroi vasculaire observée lors de varice, provoquée principalement par la prolifération des cellules de la média, en l'occurrence les cellules musculaires lisses, et de leur migration vers l'intima serait donc la conséquence de l'activation des cellules de l'endothélium par hypoxie. Vender *et al* (1987) montre également que la diminution de l'apport en oxygène *in vitro* peut induire la libération de molécules mitogènes par les cellules endothéliales et que ces molécules sont capables de stimuler la prolifération des cellules musculaires lisses.

Rappelons toutefois que la cellule endothéliale synthétise toute une série de molécules stimulatrices de la croissance des cellules musculaires lisses (Vender *et al*, 1987). De plus, ces cellules secrètent à la fois des substances activatrices et inhibitrices de la croissance cellulaire (Xu *et al*, 1991). Ces différentes substances ont été décrites au point 1.1.4.2. On peut donc penser que les prostaglandines pourraient agir de façon synergique avec d'autres médiateurs pour induire la prolifération des cellules musculaires lisses.

Le PDGF est un facteur de croissance très étudié (Ross, 1974; Golden *et al*, 1991; Banskota *et al*, 1989; Sachindis *et al*, 1990). Il pourrait agir en synergie avec les prostaglandines sur l'activation de la prolifération des cellules musculaires lisses. Cependant l'expérience réalisée avec la cycloheximide, inhibiteur de la synthèse protéique, montre que les substances peptidiques ne semblent pas être les facteurs de croissance recherchés. De plus, un dosage du PDGF des différents surnageants a également été réalisé. On n'a décelé aucune molécule de PDGF dans les surnageants des cellules endothéliales exposées sous hypoxie. Ceci prouve que les cellules endothéliales sous hypoxie ne secrètent pas de PDGF. On peut donc penser que les prostaglandines n'agissent pas en synergie avec le PDGF pour activer la croissance des cellules musculaires lisses.

Toute une série de prostaglandines sont synthétisées par les cellules endothéliales. Selon la littérature, elles peuvent avoir des rôles tantôt agonistes des facteurs de croissance, tantôt antagonistes (Brinkman *et al*, 1990). Certaines prostaglandines ont une action inhibitrice sur la croissance des cellules, qu'elles agissent seules (PGE_2) (Lei and Deng, 1989) ou ensemble (PGI_2 et PGE_1) (Sinzinger *et al*, 1990). D'autres cependant ont un pouvoir activateur de la prolifération des

cellules musculaires lisses. La PGI₂ et la PGF₂ alpha pourraient induire la réplication de l'ADN chez ces cellules (Palmeberg *et al*, 1991) et la PGE₁ et la PGE₂, ajoutées à du milieu contenant du sérum, stimuleraient la prolifération des cellules musculaires lisses dans les artères pulmonaires (Pasricha *et al*, 1992). L'effet différent observé dans ces expériences est probablement dû à la nature chimique de la prostaglandine testée et surtout au type de cellules étudiées. En effet, une même prostaglandine peut avoir des effets pro- ou anti-prolifératifs selon les cellules étudiées.

En conclusion, nous pouvons dire que certaines des prostaglandines synthétisées et sécrétées par les cellules endothéliales sous hypoxie ont un effet pro-prolifératif sur les cellules musculaires lisses. Cependant, cela n'exclut pas que cet effet puisse provenir d'une synergie avec d'autres facteurs activant ou inhibant la croissance cellulaire qu'ils soient synthétisés par les cellules endothéliales activées ou par les cellules musculaires lisses elles-même.

4. CONCLUSION

De nombreuses pathologies veineuses constituent une cause importante de mortalité dans nos pays industrialisés. L'ischémie résultant d'une occlusion, d'un traumatisme ou d'un simple rétrécissement de la lumière d'un vaisseau et les processus qui en découlent interfèrent avec les fonctions des différents types cellulaires au niveau des vaisseaux sanguins. L'hypoxie, diminution de la pression partielle en oxygène (PO_2) qui en résulte, apparaît lorsque l'irrigation sanguine d'un tissu est perturbée et notamment dans les stases veineuses.

La paroi vasculaire est constituée de trois tuniques : l'intima, la média et l'adventice. Les cellules endothéliales à l'interface du sang et des tissus sont le principal type cellulaire de l'intima. Les cellules musculaires lisses, principalement situées dans la média servent à la contraction des vaisseaux sanguins.

Lors de pathologies veineuses telles que les varices, la paroi vasculaire subit un réarrangement global. Si l'endothélium reste intact, les cellules musculaires lisses passent d'un état contractile à un état synthétique (modulation phénotypique) leur permettant de proliférer. Cette prolifération suivie d'une migration des cellules musculaires lisses vers l'intima constitue l'altération de la paroi veineuse la plus importante observée dans les pathologies veineuses.

Le choix du modèle *in vitro* pour mimer la déficience en oxygène apparaissant lors de l'ischémie permet un meilleur contrôle dans des conditions expérimentales même si à l'avenir nous devons confronter ces résultats à une situation plus physiologique. Ce modèle permet une meilleure compréhension des maladies veineuses telles que les varices.

L'hypoxie est réalisée en soumettant les cellules à une atmosphère de 100% en azote dans un incubateur à 37°C. La PO_2 dans le milieu chute alors rapidement de 130 mmHg (normoxie) à 10 mmHg (hypoxie).

Deux hypothèses avaient été envisagées concernant l'"activation" des cellules musculaires lisses observée *in vivo* dans les pathologies veineuses : soit l'hypoxie agit directement sur les cellules musculaires lisses en les activant, soit l'hypoxie active les cellules endothéliales et celles-ci libèreraient des facteurs qui influenceraient ensuite l'état métabolique des cellules musculaires lisses.

Nous nous sommes donc intéressés plus particulièrement à l'activité des cellules musculaires lisses lorsqu'elles sont incubées sous hypoxie en étudiant la viabilité cellulaire, la concentration en calcium cytosolique, l'activité de la phospholipase A₂ et la synthèse des prostaglandines. Nous avons également étudié l'effet des surnageants des cellules endothéliales sur la prolifération des cellules musculaires lisses afin de trouver quels facteurs de croissance activent la division de ces cellules lors de l'ischémie.

Nous avons d'abord étudié l'effet de l'hypoxie sur les cellules musculaires lisses en comparaison avec les résultats déjà obtenus sur les cellules endothéliales.

L'hypoxie a un effet moins néfaste sur les cellules musculaires lisses que sur les cellules de l'endothélium au niveau de leur viabilité. Il faut attendre dix heures d'incubation sous hypoxie pour avoir un taux de mortalité de 50% chez les cellules musculaires lisses. Par contre, il ne faut que trois à quatre heures d'hypoxie pour que la moitié des cellules endothéliales meurent. Ceci est peut-être dû au fait que les cellules musculaires lisses, étant situées plus profondément dans la paroi vasculaire par rapport aux cellules endothéliales, vivent dans un environnement où la PO₂ est plus basse qu'au niveau du sang.

Lors de l'étude des fluctuations calciques chez ces deux types cellulaires, on a montré que la concentration en calcium libre dans le cytosol est dix fois plus grande chez les cellules endothéliales ayant subi une hypoxie de deux heures par rapport aux cellules contrôles laissées à l'air libre. Chez les cellules musculaires lisses, même si cette concentration est plus élevée après une incubation de deux heures d'hypoxie, elle n'est que cinq fois plus grande que celle des cellules contrôles. De plus, ces cellules parviennent à réguler très rapidement leur homéostasie calcique probablement via leurs nombreux organites de stockage. Leur métabolisme est donc moins perturbé par une modification de la concentration en calcium cytosolique.

Le calcium est un messager secondaire intracellulaire impliqué dans de nombreuses voies d'activation cellulaire. Nous avons donc étudié l'effet de l'augmentation du calcium dû à l'hypoxie sur l'activité de la phospholipase A₂ (première enzyme de la cascade de l'acide arachidonique). Nous avons mis en évidence que la phospholipase A₂ est spécifiquement activée par l'hypoxie chez les cellules endothéliales mais pas chez les cellules musculaires lisses. De plus, la quantité de prostaglandines sécrétées par les cellules endothéliales après deux heures d'hypoxie est environ deux cents fois plus grande que celle produite par les cellules musculaires lisses.

Nous pouvons suggérer, à la vue de ces résultats, que les cellules musculaires lisses ne sont pas activées lors d'une hypoxie comme le sont les cellules endothéliales. Les cellules musculaires lisses possèdent sûrement une régulation très fine de leur homéostasie cellulaire due à l'importance du calcium dans le phénomène de

contraction cellulaire. Par contre, dans les cellules endothéliales, le calcium est connu en tant que régulateur de la synthèse de différents médiateurs inflammatoires.

Notons tout de même que l'hypoxie a un effet sur les cellules musculaires lisses. Après deux heures sous hypoxie, on peut observer des modifications au niveau du cytosquelette et plus particulièrement au niveau des filaments d'actine et de myosine.

Nous avons voulu ensuite vérifier si les cellules endothéliales synthétisent des facteurs de croissance pour les cellules musculaires lisses lorsqu'elles sont activées par l'hypoxie. Nous avons donc étudié l'effet des surnageants de cellules endothéliales ayant subi une hypoxie sur l'activation de la prolifération des cellules musculaires lisses.

Nous avons montré que les prostaglandines, et surtout la $\text{PGF2}\alpha$ synthétisées par les cellules endothéliales activées par l'hypoxie, étaient responsables d'une augmentation de la prolifération des cellules musculaires lisses. Les cellules endothéliales activées lors d'une hypoxie synthétisent et secrètent donc des facteurs de croissance permettant d'activer la division des cellules musculaires lisses. Cet effet pourrait expliquer la prolifération des cellules musculaires lisses apparaissant dans les parois vasculaires lors de varices comme étant la conséquence de l'activation des cellules endothéliales par l'hypoxie.

Cependant, ces résultats n'excluent pas que cet effet puisse provenir d'une synergie avec d'autres facteurs activant ou inhibant la croissance cellulaire qu'ils soient synthétisés par les cellules endothéliales activées ou par les cellules musculaires lisses elles-mêmes.

Nous pensons que de telles modifications biochimiques et morphologiques peuvent se passer dans une veine et aboutir aux altérations du tissu veineux typiques de la pathologie variqueuse. Il est évident que ce travail possède des implications physiologiques très importantes si l'on transpose ces résultats aux pathologies se déroulant *in vivo* lors d'ischémie.

Lors des phénomènes pathologiques telles que les varices, la paroi veineuse montre un remaniement global de sa structure. Si l'endothélium est bien conservé, les cellules musculaires lisses, par contre, subissent de profonds changements. On observe un épaississement de l'intima qui est dû à la prolifération des cellules musculaires lisses et de leur migration de la média vers la tunique interne de la paroi vasculaire.

Grâce aux résultats observés, on peut expliquer cette prolifération des cellules musculaires lisses par le fait que les cellules endothéliales, activées lors

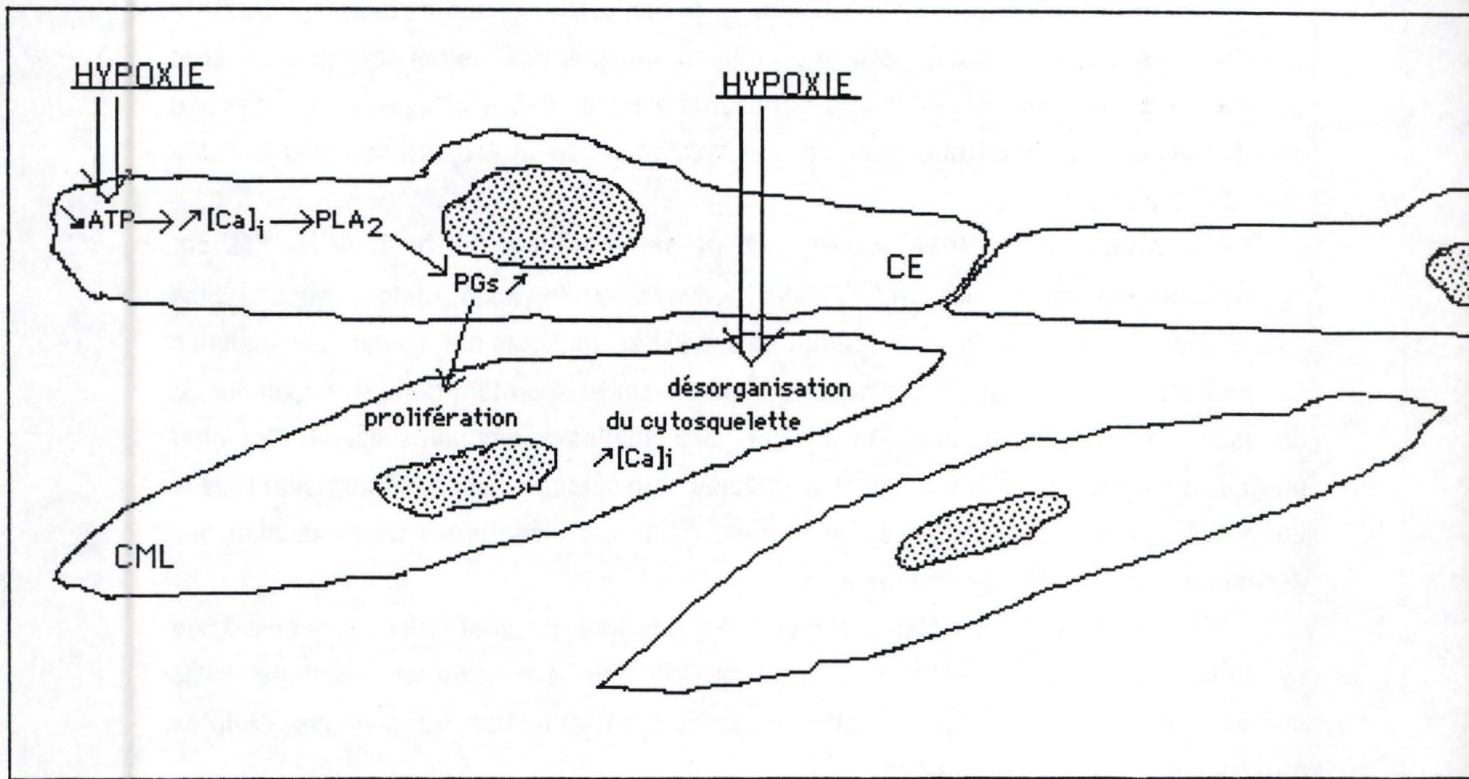


Figure 23 :

Représentation schématique des modifications se produisant dans les cellules musculaires lisses et dans les cellules endothéliales maintenues dans des conditions d'hypoxie et les influences éventuelles des interactions entre ces deux types cellulaires qui pourraient expliquer les altérations causées aux parois des vaisseaux sanguins dans la veine variqueuse.

d'une hypoxie, synthétisent des facteurs de croissance, telles que les prostaglandines activant la prolifération des cellules musculaires lisses.

La figure 23 résume toutes les observations que nous avons réalisées et met en évidence comment certains événements causés par une hypoxie conduisent à l'initiation de phénomènes pathologiques.

La prolifération des cellules musculaires lisses est un événement pathologique important et complexe. De nombreux agents pharmaceutiques incluant des inhibiteurs de la croissance cellulaire, comme l'héparine (Weissberg, 1991; Edelman *et al*, 1990), des antagonistes du calcium ou des inhibiteurs de la synthèse des prostaglandines pourraient être utilisés comme thérapie clinique pour inhiber la prolifération des cellules musculaires lisses et donc le développement des altérations de la paroi veineuse.

5. BIBLIOGRAPHIE

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D.
in : Molecular biology of the cell, Garland Publishing Inc., New York, 1983.

Andre, Ph., Michel, M., Schott, C., Stoclet, J-C.
Endothelial and smooth muscle cells from the same rat aorta.
In Vitro Cellular Developmental Biology, 27A, 1991, 687-688.

Ang, A.H., Tachas, G., Campbell, J.H., Bateman, J.F., Campbell, G.R.
Collagen synthesis by cultured rabbit aortic smooth muscle cells (alteration with phenotype).
Biochemical Journal, 265, 1990, 461-469.

Arnould, T., Michiels, C., Alexandre, I., Remacle, J.
Effect of hypoxia upon calcium in vascular endothelial cells.
Journal of Cellular Physiology, 152, 1992, 215-221.

Arnould, T., Michiels, C., Remacle, J.
Increased PMN adherence on endothelial cells after hypoxia : involvement of PAF, CD18/CD11b and ICAM-1.
American Journal of Physiology (soumis pour publication).

Banskota, N.K., Taub, R., Zellner, K., King, G-L.
Insulin, insulin-like growth factor I and platelet-derived growth factor interact additively in the induction of the protooncogene C-myc and cellular proliferation in cultured bovine aortic smooth muscle cells.
Molecular Endocrinology, 3, 1989, 1183-1190.

Bennett, J.P., Cross, R.A., Kendrick-Jones, J., Weeds, A.G.
Spatial pattern of myosin phosphorylation in contracting smooth muscle cells : evidence for contractile zones.
Journal of Cell Biology, 107, 1988, 2623-2629.

Berrou, E., Breton, M., Deudon, E., Picard, J.
Stimulation of large proteoglycan synthesis in cultured smooth muscle cells from pig aorta by endothelial cell-conditioned medium.
Journal of Cellular Physiology, 149, 1991, 436-443.

Beunk, J.
Les troubles de la circulation sanguine dans les veines.
in : Nouvelle encyclopédie de la médecine : les maladies (prévention et diagnostic).
Christophe Colomb, Milan, 1984, 92-99.

- Blank, R.S., Thompson, M.M., Owens, G.K.**
Cell cycle versus density dependence of smooth muscle alpha actin expression in cultured rat aortic smooth muscle cells.
Journal of Cell Biology, 107, 1988, 299-306.
- Bonin, P.D., Fici, G.J., Singh, J.P.**
IL-1 promotes proliferation of vascular smooth muscle cells in coordination with PDGF or a monocyte-derived growth factor.
Experimental Cell Research, 181, 1989, 475-482.
- Braquet, F. Braquet, M.**
Phagocytose et stimulation des processus d'oxydation cellulaire des macrophages.
in : Biochimie de l'inflammation, Masson, 1983, 67-92.
- Brinkman, H.J.M., van Buul-Wortebboer, M.F., van Mourik, J.A.**
Involvement of cyclooxygenase and lipoxygenase-mediated conversion of arachidonic acid in controlling human vascular smooth muscle cells proliferation.
Thrombosis and Haemostasis, 63, 1990, 291-297.
- Caen, J.**
in : Le sang et les vaisseaux, Herman, Paris, 1987, 3-64.
- Chamley-Campbell, J., Campbell, G.R., Ross, R.**
The smooth muscle cell in culture.
Physiological Reviews, 59, 1979, 1-61.
- Clark, M.A., Littlejohn, D., Conway, T.M., Mong, S., Steiner, S., Crooke, S.T.**
Leukotriene D₄ treatment of bovine aortic endothelial cells and murine smooth muscle cells in culture results in an increase in phospholipase A₂ activity.
Journal of Biological Chemistry, 261, 1986, 10718-10718.
- Clarke, J., Larkin, S., Davies, G., Maseri, A.**
Coronary vasomotion and the endothelium : possible role in ischemic syndromes.
in : The Endothelium : an introduction to current research, ed by John B. Warren, Wiley-Liss, New York, 1990, 107-117.
- Clowes, A.W., Clowes, M.M., Fingerle, J., Reidy, M.A. (a).**
Regulation of smooth muscle cell growth in injured artery.
Journal of Cardiovascular Pharmacology, 14, 1989, S12-S15.
- Clowes, A.W., Clowes, M.M., Fingerle, J., Reidy, M.A. (b).**
Kinetics of cellular proliferation after arterial injury : role of acute distension in the induction of smooth muscle proliferation.
Laboratory Investigation, 60, 1989, 360-364.
- Cornwall, C.V., Dore, C.J., Lewis, J.D.**
Leg ulcers : epidemiology and aetiology.
British Journal of Surgery, 73, 1986, 693-696.

Craste de Paulet, A.

Les grandes voies métaboliques de l'inflammation.
in : Biochimie de l'inflammation, Masson, 1983, 1-43.

Danthuluri, N.R. Brock, T.A.

Endothelin receptor-coupling mechanisms in vascular smooth muscle : a role for protein kinase C.
Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 254, 1990, 393-399.

Dartsch, P.C., Weiss, H-D., Betz, E.

Human vascular smooth muscle cells in culture : growth characteristics and protein pattern by use of serum-free media supplements.
European Journal of Cell Biology, 51, 1990, 285-294.

Desmoulière, A., Rubbia-Bradt, L., Gabbiani, G.

Modulation of actin isoform expression in cultured arterial smooth muscle cells by heparin and culture conditions.
Arteriosclerosis and Thrombosis, 11, 1991, 244-253.

Dempsey, E.C., Mcmurtry, I.F., O'Brien, R.F.

PKC activation allows pulmonary artery smooth muscle cells to proliferate to hypoxia.
American Journal of Physiology, 260, 1991, L136-L145.

Dominiczak, A.F. Bohr, D.F.

Vascular smooth muscle in hypertension.
Journal of Hypertension, 7, 1989, S107-S115.

Durmowicz, A.G., Badesch, D.B., Parks, D.B., Mecham, R.P., Stenmark, K.R.

Hypoxia-induced inhibition of tropoelastin synthesis by neonatal calf pulmonary smooth muscle cells.
American Journal of Respiratory Cell Molecular Biology, 5, 1991, 464-469.

Edelman, E.R., Adams, D.H., Karnovsky, M.J.

Effect of controlled adventitial heparin delivery on smooth muscle cell proliferation following endothelial injury.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 87, 1990, 3773-3777.

Engler, R.L.

Free radical and granulocyte-mediated injury during myocardial ischemia and reperfusion.
American Journal of Cardiology, 63, 1989, 19E-23E.

Fingerle, J., Johnson, R., Clowes, A.W., Malesky, M.W., Reidy, M.A.

Role of platelets in smooth muscle cell proliferation and migration after vascular injury in rat carotid artery.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 86, 1989, 8412-8416.

Flaherty, J.T. Weisfeld, M.L.

Reperfusion injury.

Free Radical in Biology and Medecine, 5, 1988, 409-419.

Fridovich, I.

Hypoxia and oxygen toxicity.

Advances in Neurology, 26, 1979, 255.

Gay, C.G., Winkles, J.A.

Interleukin 1 regulates heparin-binding growth factor 2 gene expression in vascular smooth muscle cells.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 88, 1991, 296-300.

Gibbons, G.H. Dzau, V.J.

Endothelial function in vascular remodeling.

in : The Endothelium : an introduction to current research, ed by John B. Warren, Wiley-Liss, New York, 1990, 81-93.**Gimbrone Jr, M.A., Cotran, R.S.**

Human vascular smooth muscle in culture (growth and ultrastructure).

Laboratory Investigation, 33, 1975, 16-27.

Godfrey, R.W., Johnson, W.J., Hoffstein, S.T.

Recombinant tumor necrosis factor and interleukin-1 both stimulate human synovial cell arachidonic release and phospholipid metabolism.

Biochemical and Biophysical Research of Communications, 142, 1987, 235-241.

Gordon, D. Schawartz, S.M.

Arterial smooth muscle differentiation.

in : Vascular smooth muscle in culture, ed by Campbell, J.H., Campbell, G.R., CRC Press, Florida, 1987, 1-14.**Golden, M.A., Au, Y.P.T., Kirkman, T.R., Wilcox, J.N., Raines, E.W., Ross, R., Clowes, A.W.**

Platelet-derived growth factor activity and mRNA expression in healing vascular grafts in baboons.

Journal of Clinical Investigation, 87, 1991, 406-414.

Greenwald, R.A.

Effect of oxygen-derived free radicals on connective tissue macromolecules.

in : Developments in biochemistry, ed by Bannister, W.H., Bannister, J.V., Elsevier, North Hollands, 1980, 160.**Greenwald, R.W., Moy, W.W., Lazanes, D.**

Degradation of cartilage proteoglycans and collagen by superoxide radicals.

Arthritis and Rheumatism, 19, 1976, 799-805.

Gryniewicz, G., Poeni, M., Tsien, R.Y.

A new generation of calcium indicators with greatly improved fluorescent properties.

Journal of Biological Chemistry, 260, 1985, 3440-3450.

Hassoun, P.M., Pasricha, P.J., Teufel, E., Lee, S.L., Fanburg, B.L.

Hypoxia stimulates the release by bovine pulmonary endothelial cells of inhibitor of pulmonary artery smooth muscle cell growth.

American Journal of Respiratory Cellular Molecular Biology, 1, 1989, 377-384.

Hedin, U., Sjölund, M., Hultgardh-Nilsson, A., Thybeg, J.

Changes in expression and organisation of smooth muscle specific α actin during fibronectin mediated modulation of arterial smooth muscle cell phenotype.

Differentiation, 44, 1990, 222-231.

Herbert, J-M. Maffrand J-P.

Heparin interactions with cultured human vascular endothelial and smooth muscle cells : incidence on vascular smooth muscle cell proliferation.

Journal of Cellular Physiology, 138, 1989, 424-432.

Herman, I.M., Castellot Jr, J.J.

Regulation of vascular smooth muscle cells growth by endothelial-synthesized extracellular matrices.

Arteriosclerosis, 7, 1987, 463-469.

Hill, R.B. and La Via, M.F.

in : Principles of Pathobiology, Oxford University Press, London, 1980, 30-55.

Ikeda, U., Ikeda, M., Oohara, T., Oguchi, A., Kamitani, T., Tsursurya, Y., Kano, S.

IL-6 stimulates growth of vascular smooth muscle cells in a PDGF-dependent manner.

American Journal of Physiology, 260, 1991, H1716-H1717.

Inoue, Y., Dike, M., Nakao, K., Kitamura, K., Kuraigama, H.

Endothelin augments unitary calcium channel currents on the smooth muscle cell membrane of guinea pig portal vein.

Journal of Physiology, 423, 1990, 171-191.

Jaffe, E.A., Nachman, R.L., Becker, C.G., Minich, C.R.

Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins.

Journal of Clinical Investigations, 52, 1973, 2745-2756.

Jennings, R.B., Hawkins, H.K., Lowe, J.E., Hill, M-C., Klottman, S., Reimer, K.D.

Relation between high energy phosphate and lethal injury in myocardial ischaemia in dog.

American Journal of Pathology, 92, 1978, 187.

Junquera, L.C. and Carneiro, J.

Tissus musculaires.

in : Histologie, Piccin, California, 1987, 249-253.

Kargacin, G.J., Ikebe, M., Foy, F.S.

Peptide modulators of myosin light chain kinase effect smooth muscle cell contraction.

American Journal of Physiology, 25, 1990, C315-C324.

Katz, A.M. Reuter, H.

Cellular calcium and cardiac cell death.

American Journal of Cardiology, 44, 1979, 188.

Kehrer, J.P., Jones, D.P., Lemasters, J.J., Farber, J.L., Jaeschke, H.

Mechanism of hypoxic cell injury.

Toxicology Applications Pharmacology, 106, 1990, 165-178.

Kimes, B.W., Brandt, B.L.

Characterization of two putative smooth muscle cell lines from rat thoracic aorta.

Experimental Cell Research, 98, 1976, 349-366.

Knott, I., Raes, M., Dieu, M., Lenoir, G., Burton, M., Lecomte, V., Remacle, J.

Prostaglandin assay by GC-MS in multiwell tissue culture plates application to human synoviocytes and chondrocytes.

Analytical Biochemistry (soumis pour publication).

Kocher, O., Gabbiani, F., Gabbiani, G., Reidy, M.A., Cokay, M.S., Peters, H., Hüttner, I.

Phenotypic features of smooth muscle cell during the evolution of experimental carotid artery intimal thickening.

Laboratory Investigation, 65, 1991, 459-470.

Kocher, O., Madri, J.A.

Modulation of actin mRNAs in cultured vascular cells by matrix components and TGF- β 1.

In Vitro Cell and Developmental Biology, 25, 1989, 424-434.

Krstic, R.V.

in : Atlas d'histologie général, Masson, Paris, 1988, 244-249.

Landegren, U.

Measurement of cell numbers by means of the endogenous enzyme hexoaminidase. Applications to detection of lymphokines and cell surface antigens.

Journal of Immunological Methods, 67, 1984, 379-388.

Lei, Z.Z., Deng, Y.P.

The effect of prostaglandin E₂ on growth, proliferation, morphology and protein synthesis of aortic smooth muscle cells in vitro.

Chung-hua-Ping-Li-Hsueh-Tsa-Chih, 18, 1989, 188-190.

Lengyel, I., Ascady, G.

Histomorphological and pathobiochemical changes in varicoes veins. A possible explanation of development of varicosis.

Acta Morphologica Hung, 38, 1990, 259-267.

Libby, P., Weiner, S.J.C., Friedman, G.B.

Interleukin 1 : a mitogen for human vascular smooth muscle cells that induces the release of growth-inhibitory prostanoids.

Journal Clinical Investigation, 81, 1988, 487-498.

Loppnow, H., Libby, P.

Functional significance of human vascular smooth muscle cell-derived IL-1 in paracrine and autocrine regulation pathways.

Experimental Cell Research, 198, 1992, 283-290.

Loppnow, H., Libby, P.

Proliferating or IL-1 activated human vascular smooth muscle cells secrete copious IL-6.

Journal Clinical Investigations, 85, 1990, 731-738.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.

Protein measurement with Folin phenol reagent.

Journal of Biological Chemistry, 193, 1951, 265-275.

Maillet, M. Chiararini, D.

in : Histologie spéciale humaine (2), ed by Breal, Medecin-Deug, Montreuil, 1985, 51-69.

Marks, T.N., Dubyak, G.R., Jones, S.W.

Calcium currents in the A7r5 smooth muscle-derived cell line.

Pflügers Archives, 427, 1990, 433-439.

McCord, J.M.

Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury.

New Englan Journal of Medecine, 312, 1985, 159-163.

Michel, J-B., De Roux, N., Plissonnier, D., Anidjor, S., Salzmann, J.L., Levy, B.

Pathophysiological role of the vascular smooth muscle cells.

Journal of Cardiovascular Pharmacology, 16, 1990, S4-S11.

- Michiels, C., Arnould, T., Remacle, J. (a).**
Hypoxia-induced activation of endothelial cells as possible cause of venous diseases : hypothesis.
Angiology (sous presse).
- Michiels, C., Arnould, T., Knott, I., Remacle, J. (b).**
Stimulation of prostaglandin synthesis by human endothelial cells exposed to hypoxia.
American Journal of Physiology (sous presse).
- Michiels, C., Arnould, T., Houbion, A., Remacle, J.**
Human umbilical vein endothelial cells submitted to hypoxia-reoxygenation *in vitro* : implication of free radicals, xanthine oxidase, and energy deficiency.
Journal of cellular physiology, 153, 1992, 53-61.
- Nagao, M., Ishili, S., Kitamura, K., Akino, T.**
Arachidonic acid metabolism in articular chondrocytes.
Clinical Orthopaedics and Related Research, 271, 1991, 288-295.
- Nakaki, T., Nakayama, M., Yomamoto, S., Kato, R.**
Endothelin-mediated stimulation of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells.
Biochemical and Biophysical Research Communications, 158, 1989, 880-883.
- Nayler, W.G.**
The role of calcium in the ischaemic myocardium.
American Journal of Physiology, 262, 1981, 167.
- Niebes, P**
in : New Trends in Venous Diseases, ed by Kappert A., Hans Hubert Publishing, Bern, 1977, 223.
- Owens, G.K., Rovner, A.S., Murphy, R.A.**
Contractile protein expression and cytodifferentiation in cultured vascular smooth muscle cells.
in : Vascular smooth muscle in culture, ed by Campbell, J.H., Campbell, G.R., CRC Press, Florida, 1987, 57-70.
- Palmeberg, L., Lindgren, J.A., Thybreg, J., Claesson, H.E.**
On the mechanism of induction of DNA synthesis in cultured arterial smooth muscle cells by leukotrienes. Possible role of prostaglandin endoperoxide synthase products and platelet-derived growth factor.
Journal of Cell Science, 98, 1991, 141-149.
- Palombo, J.D., Blackburn, G.L., Forse, R.A.**
Endothelial cell factors and response to injury.
Gynecology and Obstetrics, 173, 1991, 505-518.

- Paoletti, R. and Bernini, F.**
Calcium antagonists and intimal cell proliferation in atherogenesis.
Experimental Gerontology, 25, 1990, 257-260.
- Pasricha, P.J., Hassoun, P.M. Teufel, E., Landman, M.J., Fanbury, B.L.**
Prostaglandins E₁ and E₂ stimulate the proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells.
Prostaglandins, 43, 1992, 5-19.
- Pearson, J.D.**
Endothelial cell biology.
Radiology, 179, 1991, 9-14.
- Phillips, H.D.**
Dye exclusion tests for cell viability in tissue culture : method and application, ed by Kursc, P.F., Petterson, M.K., Academic Press, New York, 1973, 406.
- Piper, H.M.**
Energy deficiency, calcium overload or oxidative stress : possible causes of irreversible ischemic myocardial injury.
Klinische Wochenschrift, 67, 1989, 749-759.
- Rasmussen, H.**
Les ions calcium, messagers intracellulaires.
Pour la science, 67, 1989, 86-92.
- Rasmussen, H., Banett, P., Smallwood, J., Bollag, W., Isaacs, C**
Calcium ion as intracellular messenger and cellular toxin.
Environmental. Health Perspectives, 84, 1990, 17-25.
- Reilly, C.F., Kindy, M.S., Brown, K.E., Rosenberg, R.D., Sonenshein, G.E.**
Heparin prevents vascular smooth muscle cell progression through the G1 phase of the cell cycle.
Journal of Biological Chemistry, 264, 1989, 6990-6995.
- Resink, T.J., Scott-Burden, T., Bükler, F.R.**
Activation of phospholipase A₂ by endothelin in cultured Vascular smooth muscle cells.
Biochemical and Biophysical Research Communications, 158, 1989, 279-286.
- Resink, T.J., Scott-Burden, T., Boulanger, C., Weber, E., Bükler, F.R.**
Internalization of endothelin by cultured human vascular smooth muscle cells : characterization and physiological significance.
Molecular Pharmacology, 38, 1990, 244-252.
- Ross, R.**
Atherosclerosis : a problem of the biology of arterial wall cells and their interactions with blood components.
Arteriosclerosis, 1, 1981, 293-311.

- Ross, R., Glomset, J., Kariya, B., Harker, L.**
A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells *in vitro*.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 71, 1974, 1207-1210.
- Rossi, M.J., Chegini, N., Masterson, B.J.**
Presence of epidermal growth factor, PDGF and their receptors in human myometrial tissue and smooth muscle cells. Their action in smooth muscle cells *in vitro*.
Endocrinology, 130, 1992, 1716-1727.
- Rubanyi, G.M.**
Vascular effects of oxygen-derived free radicals.
Free Radicals in Biological and Medicine, 4, 1988, 107.
- Sachinids, A., Locher, R., Hoppe, J., Vetter, W. (a).**
The platelet-derived growth factor isomers, PDGF AA, AB and BB induce contraction of vascular smooth muscle cells by different intracellular mechanisms.
FEBS Letters, 275, 1990, 95-98.
- Sachinidis, A., Locher, R., Vetter, W., Totze, D., Hoppe, J. (b).**
Different effects of platelet-derived growth factor on rat vascular smooth muscle cells.
Journal of Biological Chemistry, 265, 1990, 10238-10243.
- Schater, J.B., Ivins, J.K., Pittman, R.N., Wolfe, B.B.**
Competitive regulation of phospholipase C responses by cAMP and calcium.
Molecular Pharmacology, 41, 1991, 577-586.
- Schorr, K.**
Prostaglandins, other eicosanoids and endothelial cells.
Basical Research in Cardiology, 80, 1985, 502-514.
- Schwartz, S.M., Heimark, R.L., Majesky, M.W.**
Developmental mechanisms underlying pathology of arteries.
Physiological Reviews, 70, 1990, 1177-1203.
- Simpson, P.J. Lucchesi, B.R.**
Free radicals and myocardial ischemia and reperfusion injury.
Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 110, 1987, 13-30.
- Sinzinger, H., Fitscha, P., Wagner, O., Koliman, J., Zidek, T., Rogotti, W.**
Additive benefit of PGI₂ and PGE₁ (via different mechanisms?) on inhibition of activation of human vascular smooth muscle cells.
Experimental Pathology, 40, 1990, 55-60.

- Siskind, M.S., MCCoy, C.E., Chabanian, A., Schwartz, J.H.**
Regulation of intracellular calcium by cell pH vascular smooth muscle cells.
American Journal of Physiology, 256, 1989, C234-C240.
- Smith, W.L.**
The eicosanoides and their biochemical mechanism of action.
Biochemical Journal, 259, 1989, 315-324.
- Somlyo, A.P., Himpens, B.**
Cell calcium and its regulation in smooth muscle.
FASEB Journal, 3, 1989, 2266-2276.
- Stoll, L.L. Spector, A.A.**
Interaction of platelet-activating factor with endothelial and vascular smooth muscle cells in coculture.
Journal of Cell Physiology, 139, 1989, 253-261.
- Tamura, Y., Chil, L., Driscoll, E.M., Hoff, P.T., Freeman, B.A., Gallagher, K.P., Lucchesi, B.R.**
Superoxide dismutase conjugated to polyethylene glycol provides sustained protections against myocardial ischemia/reperfusion injury in canine heart.
Circulation Research, 63, 1988, 944.
- Tan, E.M.L., Levine, E., Sorger, T., Unger, G.A., Hacobian, N., Planck, B., Iozzo, R.V.**
Heparin and endothelial cell growth factor modulate collagen and proteoglycan production in human smooth muscle cells.
Biochemical and Biophysical Research Communications, 163, 1989, 84-92.
- Thorgeirsson, G.**
Structure and morphological features of vascular endothelium.
in : Biochemical interactions at the endothelium, ed by Cryer, Elsevier, Amsterdam, 1983, 5.
- Tsien, R.Y., Pozzan, T., Rink, T.J.**
Measuring and manipulating cytosolic calcium with trapped indicators.
Trends in Biochemistry Science, 9, 1984, 263-266.
- Twort, C., Van Breemen, C.**
Human airway smooth muscle in culture.
Tissue and Cell, 20, 1988, 339-344.
- Vender, R.L.**
Role of endothelial cells in the proliferative response of cultured pulmonary vascular smooth muscle cells to reduced oxygen tension.
In Vitro Cellular Development Biology, 28A, 1992, 403-409.
- Vender, R.L., Clemmons, D.R., Knock, L., Friedman, M.**
Reduced oxygen tension induces pulmonary endothelium to release a pulmonary smooth muscle cell mitogen.
American Review of Respiratory Diseases, 135, 1987, 622-627.

- Waddel, K.A., Blair, I.A., Wellby, I.**
Combined capillary column gas chromatography negative ion chemical ionization mass spectrometry of prostanoids.
Biomedical Mass Spectrometry, 10, 1983, 83-88.
- Walsh, C.E., Waite, B.M., Thomas, M.J., Dechatelet, L.R.**
Release and metabolism of arachidonic acid in human neutrophils.
Journal of Biology and Chemistry, 256, 1981, 7228-7234.
- Weglicki, W.B., Waite, B.M., Stam, A.C.**
Association of phospholipase A with a myocardial membrane preparation containing the $(\text{Na}^+-\text{K}^+)-\text{Mg}^{2+}$ -ATPase.
Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 4, 1972, 195.
- Weissberg, P.L.**
Mechanisms of vascular smooth muscle cell proliferation.
Annals of the Academy of Medicine, 20, 1991, 38-42.
- Williams, S.P., Mason, R.M.**
Modulation of proteoglycan synthesis by bovine vascular smooth muscle cells during proliferation and treatment with heparin.
Archives of Biochemistry and Biophysics, 287, 1991, 386-396.
- Wu, C-C., Bohr, D.F.**
Mechanisms of Ca^{++} relaxation of vascular smooth muscle.
American Journal of Physiology, 261, 1991, H1411-H1416.
- Xu, C-B., Penak-Rasmussen, H., Stavenow, L.**
Interactions between cultured bovine arterial endothelial and smooth muscle cells : effects of injury on the release of growth stimulating and growth inhibiting substances.
Pharmacology and Toxicology, 69, 1991, 195-200.
- Yamamoto, M., Fujita, K., Shinkai, T.**
Identification of the phenotypic modulation of rabbit arterial smooth muscle cells in primary culture by flow cytometry.
Experiental Cell Research, 198, 1992, 43-51.
- Zanellata, A.M.C., Borrione, A.C., Tonello, M., Scannapieco, G., Pauletto, P., Sartore, S.**
Myosin isoform expression and smooth muscle cell heterogeneity in normal and atherosclerotic rabbit aorta.
Arteriosclerosis, 10, 1990, 996-1009.