



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Effets de l'hypoxie sur l'adhérence des neutrophiles à l'endothélium des veines saphènes: rôle dans le développement des veines variqueuses

Bouaziz, Najat

*Award date:*  
1995

*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.



8920120 2011  
FACULTES UNIVERSITAIRES N.-D. DE LA PAIX  
NAMUR  
FACULTE DES SCIENCES

---

**Effets de l'hypoxie sur l'adhérence des neutrophiles à  
l'endothélium des veines saphènes: rôle dans le  
développement des veines variqueuses**

Mémoire présenté pour l'obtention du grade  
de Licencié en Sciences  
biologiques

Bouaziz Najat  
Décembre 1995

## Effets de l'hypoxie sur l'adhérence des neutrophiles à l'endothélium des veines saphènes : rôle dans le développement des veines variqueuses

BOUAZIZ Najat

### Résumé

Si les pathologies veineuses sont connues depuis longtemps, leur origine reste encore controversé. La stase veineuse est souvent associée à cette condition pathologique et l'ischémie qui en résulte pourrait être à l'origine des modifications de la paroi veineuse variqueuse. Dans le but de comprendre les mécanismes à la fois biochimiques et morphologiques qui sont responsables de cette altération des veines, nous avons choisi un modèle *ex vivo* utilisant des fragments complets de la veine saphène humaine. Ce modèle consiste à exposer ces fragments à une hypoxie sévère. Nous avons pu montrer que l'incubation de la veine saphène sous hypoxie augmente fortement l'adhérence des neutrophiles non activés à l'endothélium de cette veine et ce, d'autant plus que le temps d'hypoxie est long. De plus, cette adhérence est quantitativement comparable à celle obtenue pour la stimulation de l'endothélium veineux par l'interleukine-1. Cette adhérence met en jeu à la fois le PAF synthétisé par les cellules endothéliales et les différentes molécules d'adhésion présentes à la surface des deux types cellulaires. Par ailleurs, elle induit une activation importante des neutrophiles adhérents, cette activation est mise en évidence d'une part par la présence de nombreux replis et feuilletts cytoplasmiques à leur surface, et d'autre part par la synthèse d'anions superoxydes et de leucotriène B<sub>4</sub>. Par ailleurs, nous avons montré via une étude comparative des aspects morphologiques de la paroi des veines saphènes saines et variqueuses, que celle-ci subit d'importants changements dans la veine variqueuse. Nous observons principalement un épaississement de la média lié à une prolifération des cellules musculaires lisses et au dépôt de collagène. Ces travaux constituent une nouvelle approche pour l'étude du rôle de la stase veineuse dans le développement des modifications de la paroi veineuse observées dans les veines variqueuses et permettent également de mettre en évidence le rôle prépondérant joué par l'endothélium dans le recrutement et l'activation des neutrophiles.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Décembre 1995

Promoteur : J. Remacle

*Au terme de ce travail, je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont soutenue dans mon cheminement.*

*A commencer par Monsieur le Professeur J. Remacle pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Sa rigueur scientifique, ses connaissances et ses conseils judicieux ont véritablement dynamisé mon travail.*

*Ma gratitude s'adresse également à Farine Michiels et Thierry Arnould qui, en plus d'avoir suivi l'intégralité de ce travail jour après jour, m'ont permis de répondre aux nombreuses questions que je me suis souvent posées.*

*Mes remerciements vont ensuite à Madame Rose Thibaut et à Madame Noëlle Paulus-Ninane qui m'ont fait profiter de leur expérience et leur grande disponibilité, ce qui m'a permis de mener à bien la partie morphologique de ce travail.*

*Un grand merci à Monsieur R. Leloup, directeur du département d'histologie de la faculté de médecine et de l'Unité de Microscopie Electronique pour l'utilisation du matériel de son département.*

*Je n'oublie évidemment pas tout ceux que j'ai côtoyés tous les jours au sein du laboratoire de Biochimie Cellulaire, en particulier Nancy pour sa grande gentillesse.*

*Mons époux Abdellah aurait sûrement préféré rester dans l'ombre mais, pour son soutien, sa compagnie agréable et son aide précieuse, je lui dois une fière chandelle.*

*Je dédie ce travail à mes parents en qui j'ai toujours puisé la force et la volonté de persévérer.*

*Enfin, je voudrais remercier le Docteur Guillaume et le Docteur Guisnier de la Clinique Sainte Elisabeth de Namur pour les prélèvements de veines saphènes utilisés lors de cette étude. Mes remerciements s'adressent aussi au personnel de la Croix-Rouge de Belgique pour les pochettes de sang fournies.*

# ABREVIATIONS

<b>AMP</b>	: Adénosine monophosphate
<b>AMPC</b>	: Adénosine 3', 5'-monophosphate cyclique
<b>ATP</b>	: Adénosine triphosphate
<b>CE</b>	: Cellules endothéliales
<b>CML</b>	: Cellules endothéliales
<b>EDRF</b>	: Endothelium-derived relaxing factor
<b>ELAM-1</b>	: Endothelium leukocyte adhesion molecule-1
<b>ET-1</b>	: Endothéline-1
<b>fMLP</b>	: formyl-Methionyl-Leucocyl-Phenylalanine
<b>HUVEC</b>	: Human umbilical vein endothelial cells
<b>ICAM-1</b>	: Intercellular adhesion molecule-1
<b>IGF-1 like</b>	: Insuline-like growth factor 1
<b>IL</b>	: Interleukine (IL-1, IL-6, IL-8)
<b>IP</b>	: Inositol phosphate (IP2, IP3)
<b>LTB4</b>	: Leucotriène B4
<b>PAF</b>	: Platelet-activating factor (Lyso PAF: Lyso-platelet - activating factor)
<b>PDGF</b>	: Platelet-derived growth factor
<b>PG</b>	: Prostaglandine( PGE <sub>2</sub> , PGD <sub>2</sub> , PGF <sub>2</sub> α, PGI <sub>2</sub> )

<b>PKc</b>	<b>: Protéine kinase c</b>
<b>PLA<sub>2</sub></b>	<b>: Phospholipase A<sub>2</sub></b>
<b>PLC</b>	<b>: Phospholipase C</b>
<b>PMN</b>	<b>: Polymorphonucléaires neutrophiles</b>
<b>PO<sub>2</sub></b>	<b>: Pression partielle en oxygène</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>: Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math></b>
<b>TXA<sub>2</sub></b>	<b>: Tromboxane A<sub>2</sub></b>

# ***TABLE DES MATIERES***

<b>CHAPITRE I: INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>I. LE SYSTEME VASCULAIRE</b>	<b>3</b>
I.1. Constitution	3
I.2. Morphologie et structure de la paroi veineuse	4
I.3. Les valvules	6
I.4. Les veines saphènes	7
I.5. Les veines variqueuses et facteurs de risque	8
<b>II. L'ENDOTHELIUM: SA STRUCTURE ET SES FONCTIONS</b>	<b>12</b>
II.1. Structure de l'endothélium	13
II.2. Caractéristiques morphologiques des cellules endothéliales	14
II.3. Fonctions de l'endothélium	15
II.4. L'endothélium dans la bataille de l'hypoxie	19
<b>III. INFLUENCE DE L'HYPOXIE SUR LES INTERACTIONS ENTRE LES CELLULES ENDOTHELIALES ET LES PMN HUMAINS</b>	<b>25</b>

III.1. Description des PMN	26
III.2. Activation des neutrophiles	27
III.3. Les effets des neutrophiles activés	32
III.4. Adhérence des PMN aux cellules endothéliales	36
<b>IV. But du Mémoire</b>	<b>40</b>
<b>CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES</b>	<b>42</b>
<b>I. PREPARATION DES POLYMORPHONUCLEAIRES</b>	<b>42</b>
I.1. Purification des polymorphonucléaires humains	42
I.2. Identification des PMN purifiés	43
<b>II. ETUDES BIOCHIMIQUES</b>	<b>45</b>
II.1. Mise sous hypoxie des veines saphènes	45
II.2. Test d'adhérence des PMN à l'endothélium de la veine saphène	46
II.3. Mesure de la production des radicaux superoxydes libérés par PMN adhérents à l'endothélium de la veine	47
II.4. Dosage du leucotriène B <sub>4</sub> (LTB <sub>4</sub> )	48
<b>III. ETUDES MORPHOLOGIQUES</b>	<b>51</b>
III.1. Microscopie optique (ou photonique)	51
III.2. Microscopie électronique à transmission	53
III.3. Microscopie électronique à balayage	56

## **CHAPITRE III. RESULTATS ET DISCUSSION 58**

### **I. ASPECTS MORPHOLOGIQUES DE LA PAROI DES VEINES SAPHENES HUMAINES 58**

I.1. Morphologie de la veine saphène saine 59

I.2. Morphologie des veines variqueuses 60

I.3. Discussion 62

### **II. ETUDE DES EFFETS DE L'HYPOXIE SUR L'ADHERENCE DES PMN A L'ENDOTHELIUM DES VEINES SAPHENES HUMAINES 63**

II.1. Adhérence des PMN à l'endothélium de veines saphènes incubées en hypoxie 63

II.2. Effet de l'interleukine-1 $\beta$  recombinante humaine sur l'adhérence des PMN 67

II.3. Etude du mécanisme de l'adhérence des PMN 68

II.4. Discussion 69

### **III. ETUDE DE L'ACTIVATION DES PMN ADHERENTS A L'ENDOTHELIUM DE LA VEINE SAPHENE HYPOXIQUE 73**

III.1. Production de radicaux superoxydes 73

III.2. Production de leukotriène B<sub>4</sub> 75

III.3. Discussion 76

**CHAPITRE IV : DISCUSSION GENERALE ET  
PERSPECTIVES 78**

**BIBLIOGRAPHIE 84**

## *CHAPITRE I : INTRODUCTION*

Les veines variqueuses constituent un problème de santé majeur : environ une personne sur trois en souffre dans les pays occidentaux. L'étiologie de cette pathologie n'est pas encore totalement élucidée mais on sait qu'elle fait intervenir des déterminants génétiques et des facteurs environnementaux. Il est par contre établi que la maladie veineuse est une maladie pariétale (Rose et Ahmed , 1986. Tibbs, 1986).

Dans la plupart des cas où des varices se développent, une stase veineuse est observée pendant laquelle l'irrigation des tissus est diminuée et une situation ischémique se développe.

Au sein de la paroi veineuse, il existe une tunique clé, l'endothélium qui, en conditions normales, concourt au maintien de l'intégrité vasculaire et qui, en conditions pathologiques, pourrait initier les désordres physiopathologiques qui s'étendront ensuite à toute la paroi (Michiels et al, 1993b).

De part leur localisation anatomique à l'interface sang-tissu, les cellules endothéliales qui forment la première couche de la paroi veineuse, l'intima, sont les premières à subir de plein fouet la stase et son corollaire, la diminution de l'apport en oxygène ou hypoxie (Suval et al, 1987, Dinnerman et Mehta, 1990).

Les cellules endothéliales activées par l'hypoxie secrètent des médiateurs de l'inflammation et des facteurs de croissance. Les premières molécules sont capables de recruter certains leucocytes, comme les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN), d'induire leur adhérence à l'endothélium (Arnould et al, 1993) et leur activation (Arnould et al, 1994).

Une fois dans la paroi, les neutrophiles activés peuvent y relarguer des protéases et des radicaux libres, molécules connues pour leur capacité d'hydrolyser des composants de la matrice extracellulaire. Par ailleurs, les facteurs de croissance sont capables d'induire la prolifération des cellules musculaires lisses (Michiels et al, 1994c) qui constituent le type cellulaire principal de la média située sous l'endothélium.

Cette cascade d'événements résultant d'une situation d'hypoxie a été proposée comme un mécanisme plausible pour expliquer les modifications cellulaires, biochimiques et morphologiques qui surviennent au cours du développement des varices.

Dans une telle approche, il apparaît indispensable d'étudier les effets de l'hypoxie sur l'endothélium des veines saphènes humaines étant donné qu'elles sont un des principaux territoires impliqués dans la pathologie variqueuse.

Dans cette introduction, nous aborderons les thèmes suivants:

- Nous décrirons tout d'abord la structure générale des vaisseaux sanguins, ce qui nous permettra de nous familiariser avec la veine en tant qu'unité structurelle et fonctionnelle susceptible d'être perturbée lors d'une ischémie et de se transformer en une veine variqueuse.

- Ensuite, nous ferons le point sur les connaissances actuelles concernant la structure et les fonctions que l'endothélium est appelé à remplir au sein du système vasculaire. Nous passerons également en revue les perturbations engendrées par l'hypoxie au niveau de l'endothélium.

- Enfin, la dernière partie décrira les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN), globules blancs ou leucocytes les plus abondants dans le sang. Nous décrirons les facteurs nécessaires à leur activation, leur effets une fois activés, leur mécanisme d'adhérence aux cellules endothéliales ainsi que leur mode d'infiltration dans les couches plus profondes de la paroi veineuse.

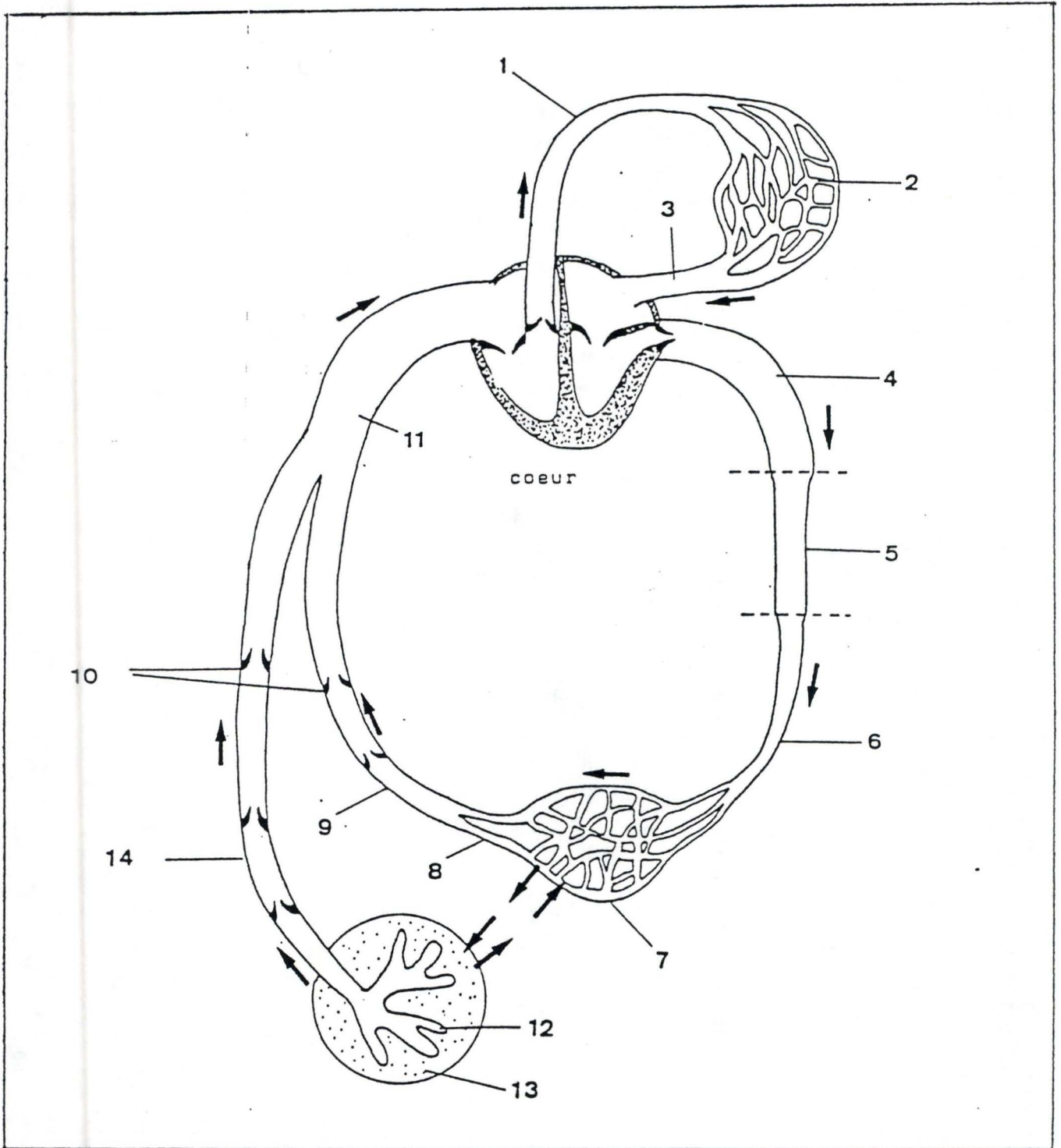


Figure I.1: Schéma simplifié de la circulation sanguine.  
 1: artère pulmonaire, 2: réseau capillaire pulmonaire, 3: veine pulmonaire,  
 4: artère élastique, 5: artère musculaire, 6: artériole, 7: réseau capillaire  
 dans un organe, 8: vénule, 9: veine propulsive, 10: valvules, 11: veine  
 cave, 12: capillaire lymphatique, 13: liquide interstitiel, 14: vaisseau  
 lymphatique (D'après R. Leloup, cours d'Histologie spéciale).

# I. LE SYSTEME VASCULAIRE.

## I.1. Constitution (Fig 1.1).

Le système vasculaire se divise en trois parties, les artères qui assurent le transport du sang chargé en oxygène et en substances nutritives du coeur vers les tissus (circulation artérielle), les réseaux capillaires où se produisent les échanges avec le milieu interstitiel et les veines qui, avec le système lymphatique, ramènent le sang chargé en gaz carbonique et en déchets des tissus vers le coeur (circulation veineuse). Ce transport du sang, du coeur vers les tissus et inversement, constitue la circulation systémique.

Le sang joue donc un rôle de vecteur qui permet: le transport des éléments nutritifs vers tous les tissus depuis leurs lieux d'absorption ou de diffusion, le transport des déchets du métabolisme vers les lieux d'excrétion, le transport d'effecteurs humoraux comme les hormones, le transport des cellules et des substances impliquées dans la défense immunitaire, le transport d'ions et de sels, le transport d'oxygène fixé à l'hémoglobine des érythrocytes depuis les poumons vers les tissus et de CO<sub>2</sub> des tissus vers les poumons....

Les vaisseaux sanguins sont conçus pour permettre un maximum d'échanges entre les tissus et le sang et ont donc une structure particulière. Leur paroi permet le passage de nombreuses substances qui en fonction de leur taille, leur solubilité dans l'eau et les lipides, transitent par les "fenêtres", parties fortement amincies de l'endothélium, qui peuvent être fermées ou ouvertes par des pores (Fig I.2) ou par pinocytose dans des vésicules qui transportent ces substances d'un côté à l'autre de la cellule ou par des canaux transitoires ouverts grâce à la réunion de plusieurs vésicules ou enfin par simple diffusion.

Chez l'homme, grâce à leur élasticité, les veines constituent le réservoir principal de sang, la répartition de celui-ci est très variable en fonction de l'espèce ainsi que de l'activité de l'individu, mais on peut estimer que 5 à 15 % du sang se trouve dans le coeur, 8 à 15 % dans la circulation pulmonaire et 70 à 85 % dans la circulation systémique. Dans cette dernière, 80 % du sang est stocké dans les veines soit plus de 50 % du sang total de l'organisme (Fig I.3).

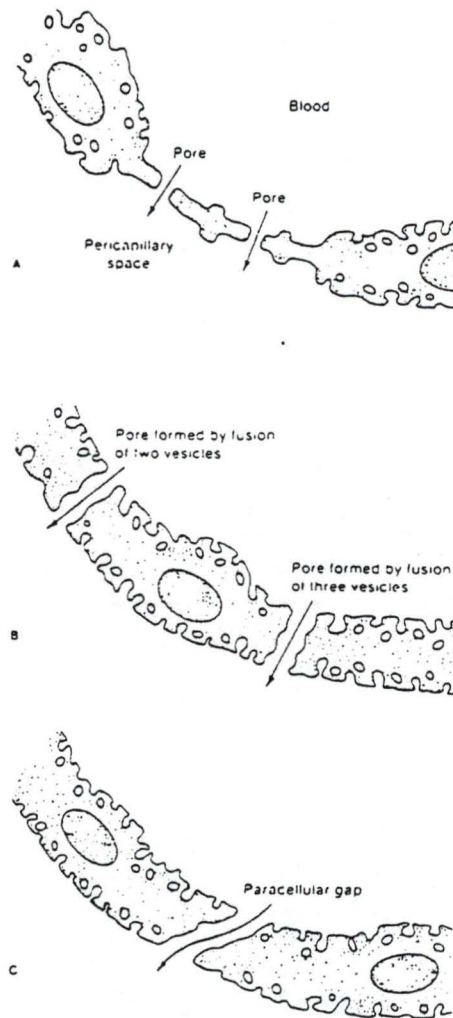


Figure I.2: Possibilités de passage des grosses molécules à travers l'endothélium des vaisseaux sanguins (D'après J. L. Bister, cours de Physiologie spéciale, 1993).

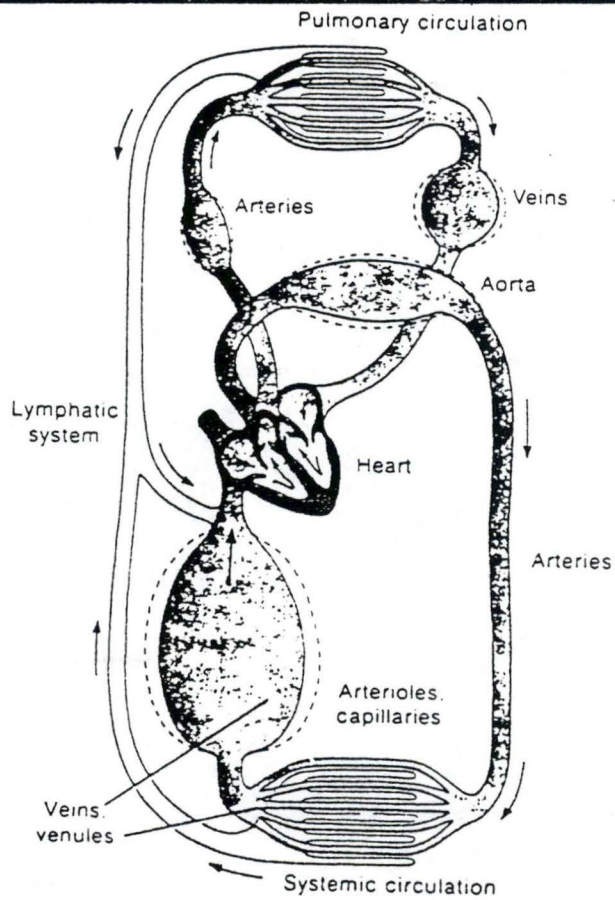


Figure I.3: Proportion relative du sang dans les différentes parties de la circulation chez les mammifères (D'après J. L. Bister, cours de Physiologie spéciale, 1993).

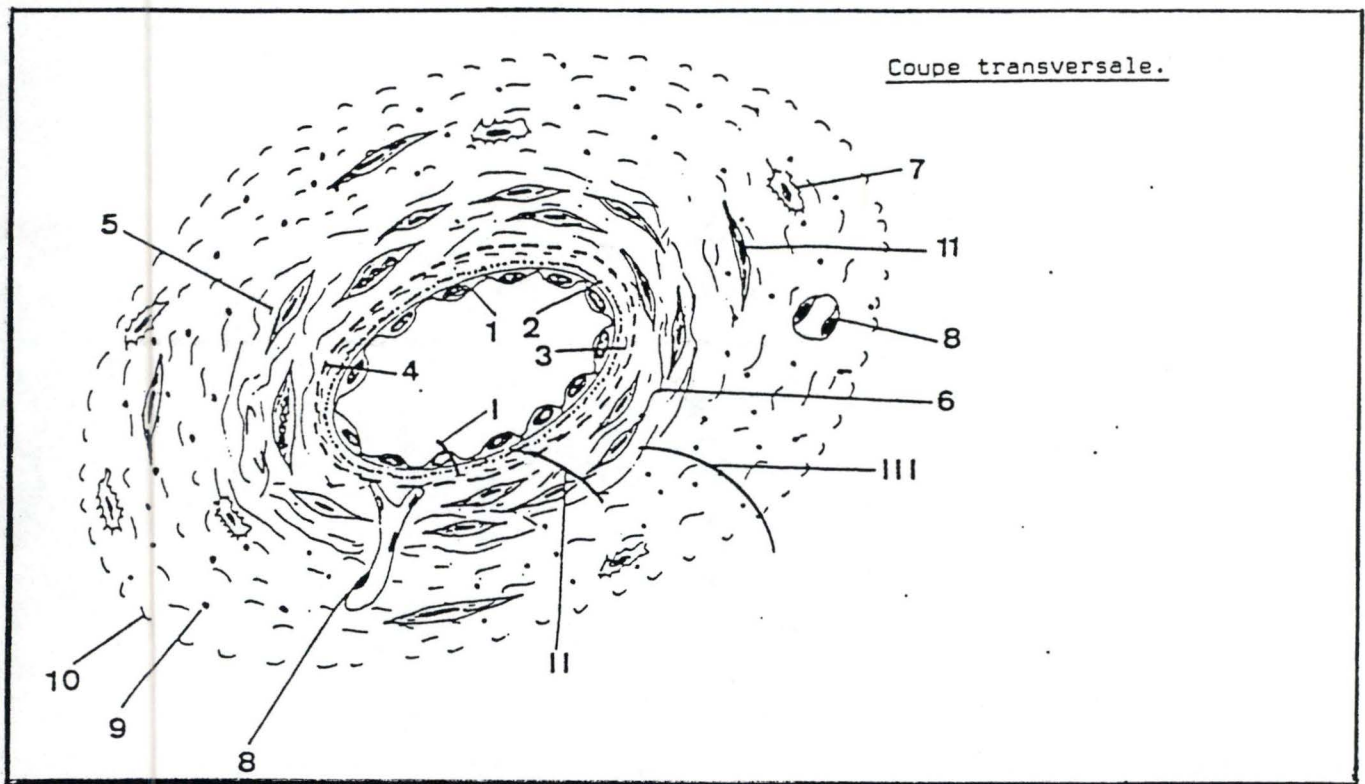


Figure I.4: Représentation schématique en vue transversale de la paroi veineuse. Celle-ci est formée de trois tuniques: I=INTIMA, II=MEDIA, III=ADVENTICE. 1: endothélium, 2: membrane basale, 3: couche sous- endothéliale, 4: limitante élastique interne, 5: cellules musculaires lisses de la média, 6: tissu conjonctif de la média, 7: fibroblaste, 8: vasa vasorum, 9: fibres élastiques, 10: fibres conjonctives de l'adventice, 11: cellules musculaires lisses de l'adventice (D'après R. Leloup, cours d'Histologie spéciale).

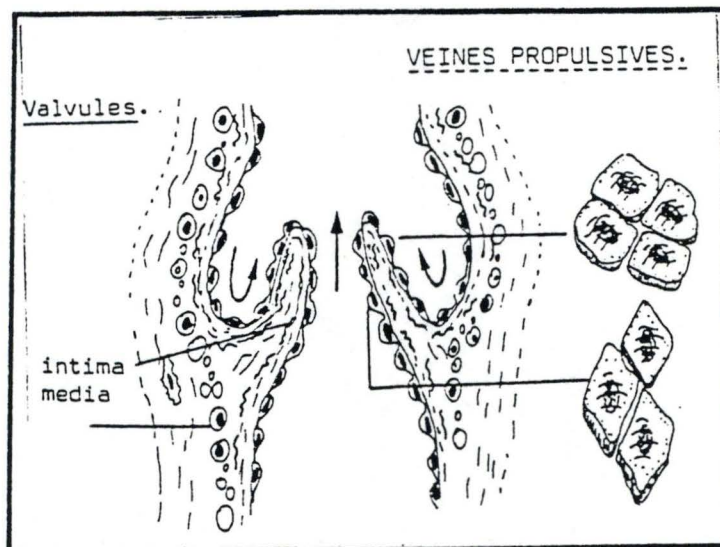


Figure I.5: Localisation des valvules au sein de l'intima de la veine (D'après R. Leloup, cours d'Histologie spéciale).

## **I.2. Morphologie et structure de la paroi veineuse**

Le système veineux est constitué par un ensemble hétérogène de vaisseaux sanguins, puisqu'il inclut à la fois des capillaires, des veinules et des veines de fort calibre comme les veines caves, fémorales ou saphènes. Toutefois, aussi différentes qu'elles puissent apparaître, les veines ont toutes une structure histologique commune.

Ajoutons encore que les veines de petit et de moyen calibre possèdent des valvules qui sont particulièrement nombreuses dans les veines des membres inférieurs comme la veine saphène (Thomas, 1982). Ces valvules anti-reflux sont chargées, avec l'aide de la contraction des muscles striés squelettiques qui entourent ces vaisseaux, de propulser le sang en direction du coeur.

La paroi veineuse est constituée de trois tuniques classiques (Junqueira et Carneiro, 1987). On trouve, de la lumière du vaisseau vers l'extérieur, l'intima, la média et l'adventice (Fig I.4).

### **a) L'intima (tunique interne) :**

L'intima est composée d'une membrane basale (fine couche de tissu conjonctif lâche) sur laquelle repose une monocouche de cellules endothéliales, tapissant la lumière du vaisseau et dont les replis forment des valvules (Fig I.5).

Les constituants de la membrane basale sont synthétisés par les cellules endothéliales. On y trouve principalement du collagène de type IV, des protéoglycanes comme l'héparan sulfate, de la fibronectine, de l'élastine, de la laminine, de la vitronectine et de l'acide hyaluronique. Les interactions des cellules endothéliales avec ces constituants leur permettent l'étalement, l'adhérence, la prolifération et la migration.

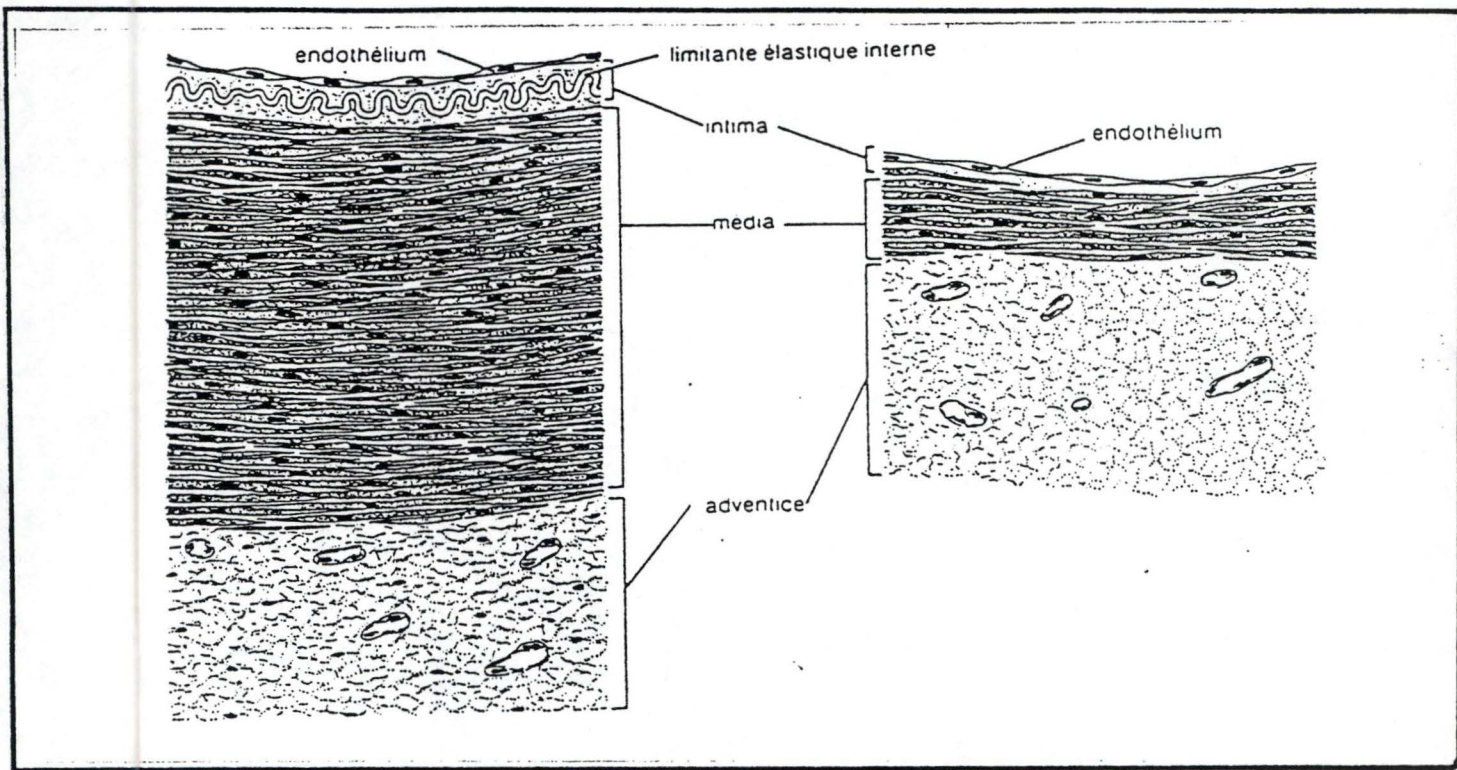


Figure I.6: Schéma comparant les proportions relatives des trois tuniques qui composent une artère de moyen calibre (à gauche) et une veine (à droite) (D'après Junqueira et Carneiro, 1987).

## **b) La média (tunique moyenne):**

Essentiellement constituées de fibres musculaires lisses, ces cellules musculaires sont impliquées d'une part, dans les propriétés mécaniques de la paroi vasculaire et d'autre part, dans la synthèse d'une matrice extracellulaire constituée de fibres élastiques, de fibres collagène de type I et III et de protéoglycanes.

Une limitante élastique interne (en générale discrète) sépare l'intima et la média des veines de gros calibre. Elle est fenestrée pour permettre aux substances nutritives de diffuser vers les cellules musculaires profondément enfouies.

La disposition et l'importance de la musculature de la média varie selon le type de la veine et sa localisation. En ce qui concerne les veines des membres inférieurs, la musculature des veines superficielles est plus développée que celle des veines profondes, elle est plus importante à l'extrémité du membre inférieur qu'à sa racine (Bouissou, 1988).

## **c) L'adventice (tunique externe):**

C'est la couche la plus externe, composée de tissu conjonctif lâche, comportant des fibres de collagène de type I et des fibres élastiques. Ces éléments sont principalement synthétisés par des fibroblastes.

Le tissu conjonctif possède une capacité de soutien qui lui permet de résister à la pression hydrostatique. Il est lâche pour permettre l'adaptation permanente du calibre des vaisseaux aux variations du débit cardiaque et possède un double rôle: d'une part, attacher le vaisseau aux tissus voisins et d'autre part, limiter l'extension de l'ensemble de la paroi.

L'adventice est une tunique d'épaisseur importante et son épaisseur augmente au fur et à mesure que la veine s'élargit. De par sa localisation éloignée du sang circulant, elle ne peut être nourrie par imbibition comme c'est le cas pour l'intima et pour la partie profonde de la média. Sa nutrition est alors assurée par des vasa vasorum nourriciers.

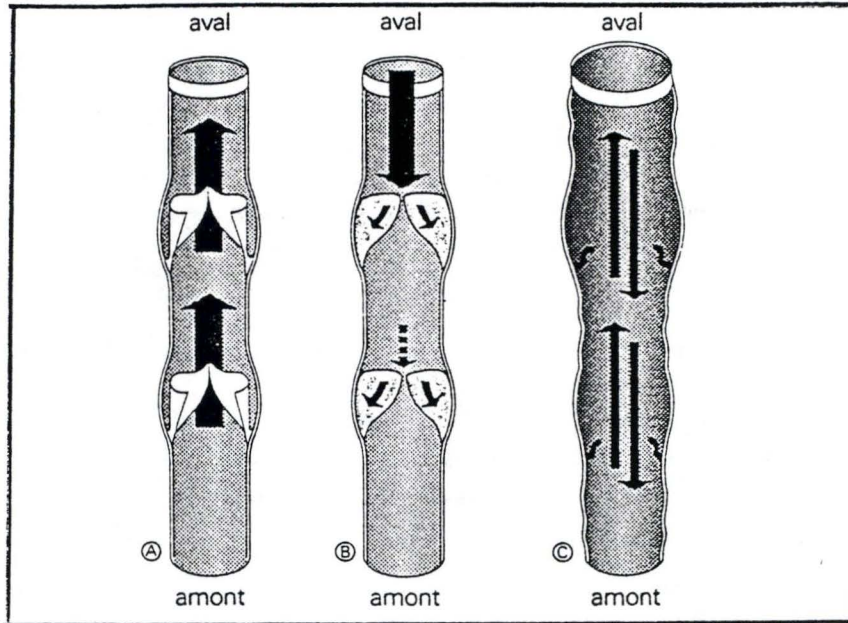


Figure I.7: Représentation schématique des valvules et de leur fonctionnement. A: flux veineux en direction du coeur : les valvules sont ouvertes. B: fermeture des valvules lorsque la pression en aval devient plus importante qu'en amont (reflux). C: syndrome variqueux: la destruction valvulaire permet un reflux veineux, la direction de la colonne sanguine est alors influencée par le seul jeu des gradients de pression (D'après Ramelet et Monti, 1994).

Ces trois tuniques sont celles qui forment aussi la paroi artérielle, cependant leur proportion relative dans une artère diffère de celle d'une veine (Fig I.6).

En effet, dans la paroi veineuse, l'intima et la média sont beaucoup moins développées et l'adventice est souvent mal individualisée dans une veine par rapport à ce que l'on observe dans une artère ou dans une artériole.

De même, les veines diffèrent des artères, d'une part par leur calibre plus large, et d'autre part par le fait que les constituants élastiques et musculaires sont beaucoup moins développés. Toutefois, elles sont suffisamment extensibles pour s'adapter aux variations de volume et de pression de sang qui y circule (Tortora et Anagnostakos, 1988).

Lorsque le sang quitte les capillaires et s'engage dans les veines, il a perdu beaucoup de sa pression originale. On peut vérifier cette différence de pression dans un vaisseau sectionné. Dans le cas d'une veine, le sang coule régulièrement, alors que dans le cas d'une artère, il s'écoule en brèves giclées. La plupart des différences structurales entre les artères et les veines reflètent cette différence de pression. Ainsi, les veines n'ont pas besoin de paroi aussi forte que les artères. La basse pression qui y règne possède cependant ses désavantages. Lorsque nous nous mettons en position verticale, la pression qui pousse le sang dans les veines vers le haut, dans les membres inférieurs, est tout juste suffisante pour contrebalancer la force de gravité qui le pousse vers le bas. C'est pourquoi la plupart des veines, notamment celles qui se trouvent dans les membres inférieurs, contiennent des valvules qui empêchent le reflux du sang.

### **I.3. Les valvules**

Les valvules sont formées de deux replis endothéliaux concaves, dans lesquels se glisse une lame fibro-élastique qui assure leur étanchéité (Ramelet et Monti, 1994). La paroi veineuse est donc amincie au siège valvulaire, ce qui augmente sa vulnérabilité lors d'une trop forte pression ou d'une altération de la paroi veineuse. Les valvules flottent dans la lumière de la veine. Elle ne se ferment que lorsque la pression veineuse en aval devient plus importante qu'en amont (Fig I.7A et B), pour autant qu'elles ne soient pas incontinentes (Fig I.7C).

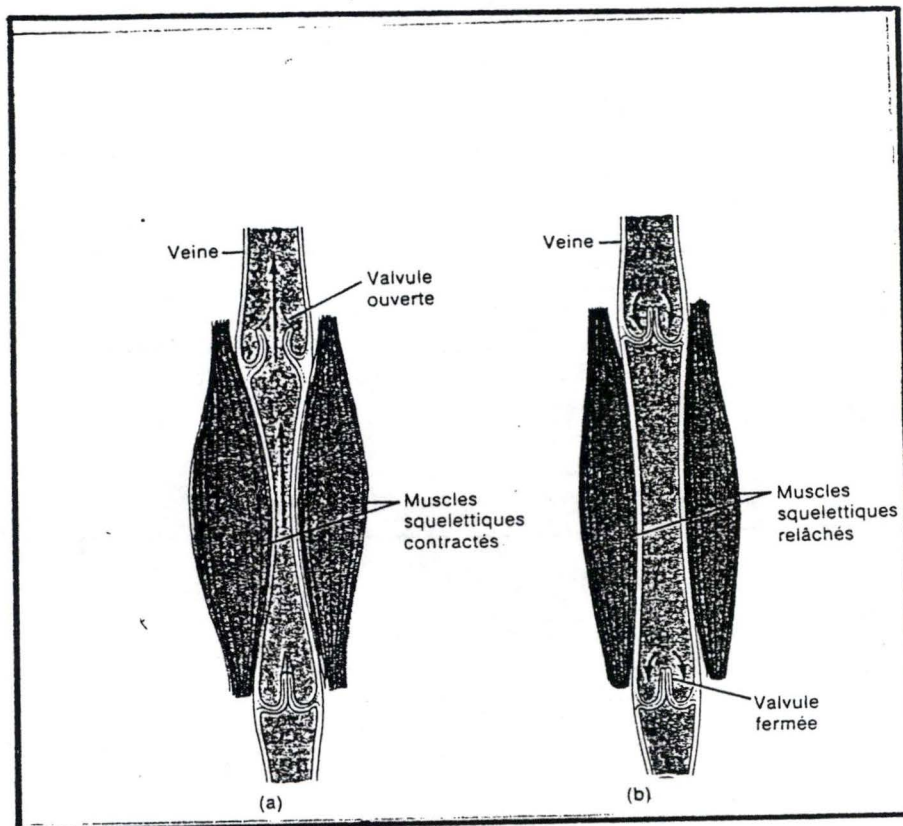


Figure I.8: Rôle des contractions des muscles squelettiques et des valvules veineuses dans le retour veineux. (a): lorsque les muscles squelettiques se contractent, les valvules s'ouvrent et le sang est repoussé en direction du coeur. (b): lorsque les muscles squelettiques se relâchent, les valvules se referment afin de prevenir le reflux de sang provenant du coeur (D'après Gasling et al, 1985).

Disposées tout au long des veines des membres inférieurs, les valvules sont plus nombreuses dans les veines profondes que dans les veines superficielles. Leur rôle principal est de protéger les veinules et les capillaires des variations brutales de la pression veineuse qu'engendre l'exercice musculaire.

En effet, il existe une combinaison entre les contractions des muscles squelettiques et les valvules dans les veines (Fig.I.8). Cette combinaison est importante pour le retour du sang veineux jusqu'au coeur. Lorsque les muscles squelettiques se contractent, ils se resserrent autour des veines qui les parcourent et les valvules s'ouvrent. Cette pression dirige le sang en direction du coeur, c'est ce que l'on appelle la compression musculaire. Lorsque les muscles se relâchent, les valvules se referment afin d'empêcher le sang de refluer loin du coeur.

**Application clinique:** chez les personnes dont les valvules veineuses sont faibles, la gravité pousse un volume important de sang dans les parties distales de la veine. Cette pression surcharge la veine et distend sa paroi. Lorsque la surcharge est prolongée, la paroi perd de son élasticité, elle s'étire et devient flasque. Ces veines dilatées et tortueuses dont l'origine est dans ce cas une insuffisance valvulaire sont appelées : veines variqueuses (varices). Comme la paroi de la veine variqueuse ne peut pas offrir une résistance suffisante au sang, ce dernier a tendance à s'accumuler dans la poche externe ainsi formée, ce qui provoque un oedème et chasse le liquide plasmatique dans les tissus environnants. Les veines situées près de la surface des jambes sont très vulnérables aux varices. Par contre, les veines plus profondes ne sont pas aussi vulnérables, parce que les muscles squelettiques qui les entourent empêchent l'étirement excessif de leurs parois (Arnouldi et Lindeholm, 1969).

#### I.4. Les veines saphènes

Parmi les veines des membres inférieurs, les plus vulnérables aux varices sont les veines saphènes (Fig I.9). Ces veines font partie de la catégorie des veines musculaires (Maillet et Chiarasini, 1985). Leur diamètre varie de 1 à 9 mm. On y reconnaît en général les trois tunique classiques. L'intima comporte une monocouche de cellules endothéliales et une couche conjonctivo-

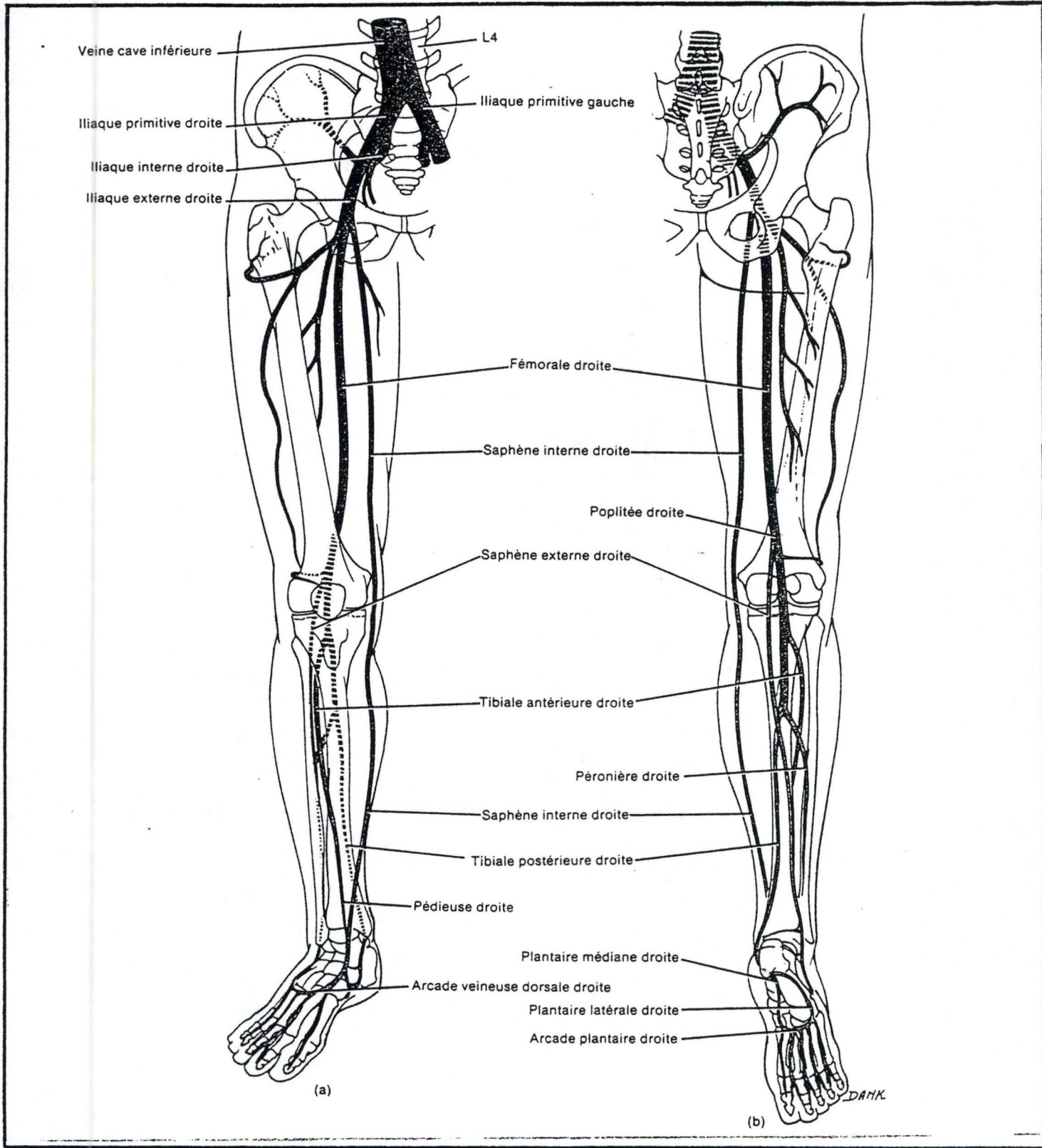


Figure I.9: Veines du bassin et du membre inférieur droit.  
 (a): vue antérieure (b): vue postérieure (D'après Tortora et Anagnostacos, 1988).

élastique sous-endothéliale. La limitante élastique interne, présente dans les artères, est aussi souvent existante dans les veines saphènes. Elle apparaît formée par des renforcements irréguliers des éléments élastiques de la couche sous-endothéliale. La média quant à elle, est caractérisée par une nette dominance du tissu conjonctif au sein du tissu conjonctivo-élastique. Enfin, l'adventice est généralement bien développée. Des vasa vasorum nourriciers ainsi que des nervi vasorum pour la sensibilité nerveuse sont présents.

Les veines saphènes font partie des veines superficielles des membres inférieurs. Elles sont de deux types (Fig I.9) (Kubiks,1985).

**La veine saphène interne**, veine la plus longue du corps, elle commence à l'extrémité médiane de l'arcade veineuse dorsale du pied. Elle passe devant la malléole interne, puis remonte le long de la face médiane de la jambe et de la cuisse. D'un diamètre de 4 à 7 mm, la saphène interne possède une tunique musculaire bien développée: elle est pourvue de 6 à 14 valvules, distantes de 6 à 9 cm.

**La veine saphène externe**, elle commence à l'extrémité latérale de l'arcade veineuse du pied. Elle passe derrière la malléole externe et remonte sous la peau de la face dorsale de la jambe. D'un diamètre de 4 mm, la saphène externe possède 4 valvules et une valvule ostiale. Sa tunique musculaire est moins développée que celle de la saphène interne.

## **I.5. Les veines variqueuses et facteurs de risque**

Les pathologies veineuses et en particulier les veines variqueuses touchent une partie importante de la population des pays industrialisés. Elles constituent donc un problème de santé majeur: environ une personne sur trois en souffre dans les pays occidentalisés. Cependant, l'étiologie de cette anomalie est encore incertaine, mais on sait que de nombreux facteurs peuvent influencer le développement de varices chez les patients (Beaglehole, 1986; Browse et Burnand, 1982; Carpentier et Priollet, 1994). L'épidémiologie des varices a montré l'influence de divers paramètres à la fois génétiques et environnementaux sur l'apparition de la maladie.

Nous allons maintenant passer en revue certains de ces paramètres cas par cas :

**L'âge**, constitue un facteur de risque majeur: à 70 ans, 70 % des hommes et des femmes présentent des varices tandis que moins de 20 % en présentent avant 25 ans (Callam,1992)

En ce qui concerne les altérations liées au vieillissement, la sénescence de la paroi veineuse (Bouissou, 1988) survient à tout âge, chez les deux sexes et dans tout segment veineux. La paroi s'épaissit, la masse de collagène augmente, les tuniques, particulièrement l'intima, se fibrosent. La densité de fibres élastique diminue, les couches musculaires de l'intima et de la média s'atrophient.

Les valvules, elles sont rarement touchées par le vieillissement. Leur nombre ne paraît pas diminuer avec l'âge, contrairement à une idée répandue.

**La sédentarité et le mode de vie:** la position assise sur une chaise favorise la stase veineuse. La station debout prolongée est aussi incriminée : elle est bien connue comme facteur de risque pour le syndrome des jambes lourdes (Carpentier et Priollet, 1994), mais aussi selon certains auteurs, pour le développement des varices (Beaglehole, 1986).

Certains loisirs qui se développent actuellement dans les sociétés européennes, représentent aussi un grand risque (ex: les loisirs assis devant la télévision, couché immobile au soleil).

**Le régime alimentaire:** les changements d'habitudes alimentaires entraînent une diminution de l'ingestion de fibres alimentaires et une surcharge en graisse et en sucre. Cela favorise, outre l'obésité, la constipation et le ballonnement intestinal, peu favorable au retour veineux.

**L'obésité:** la surcharge pondérale semble jouer un rôle plus défavorable chez les femmes que chez les hommes (Janbon, 1990).

**Les grossesses et les facteurs hormonaux:** le nombre de grossesses joue un rôle aggravant pour la femme qui a des tendances variqueuses. En effet, les varicosités de la grossesse sont favorisées par la progestérone et

peuvent régresser voir disparaître au cours du post-partum (Griton et Widmer, 1992).

Une intervention des hormones sexuelles a longtemps été suspectée chez la femme (sur base de l'apparition des varices pendant la grossesse). Sadik et Niedt (1990) ont montré que ces hormones ne semblent pas exercer un rôle direct sur la paroi veineuse (absence de récepteurs aux hormones sexuelles dans la paroi veineuse des membres inférieurs) et que la symptomatologie veineuse hormono-dépendante s'expliquerait mieux par la modification de certains mécanismes métaboliques des lipides et des hydrates de carbone.

**Insuffisance valvulaire:** c'est une perturbation de nature mécanique (Fig.I.7C), la paroi veineuse est amincie en regard des valvules, ce qui augmente sa vulnérabilité lors d'une trop forte pression. De plus, la dilatation de la veine écarte les valvules l'une de l'autre, compromettant leur étanchéité. Cette inadéquation de l'appareil valvulaire semble être associée à l'apparition des varices (Watts, 1986).

**L'hérédité:** des études épidémiologiques ont montré qu'il faut aussi tenir compte des facteurs héréditaires. On révèle en effet des antécédents familiaux chez 80 % des sujets porteurs de varices. Certains travaux confortent l'hypothèse que le trait génétique concerne la transmission d'un tissu veineux de qualité médiocre (Niebes, 1983). En effet, les individus qui ont hérité d'un trop petit nombre de valvules veineuses semblent avoir plus de risque de développer une insuffisance veineuse que ceux qui ont à leur naissance un nombre de valvules veineuses normal.

Selon une étude récente (Cornu et al, 1990), le risque d'un enfant de développer des varices est de 89 % si les deux parents sont variqueux, de 47 % si un seul des parents est atteint et de 20 % si les deux parents ne présentent pas de signes d'insuffisance veineuse.

Enfin, il faut noter que ce problème héréditaire est encore mal apprécié et mériterait une étude génétique plus approfondie.

Outre ces facteurs étiologiques, deux situations sont souvent présentes: ce sont le reflux du sang des veines internes vers les veines externes et la réapparition des varices après une intervention chirurgicale quand une partie de la veine est toujours située en dehors du flux sanguin normal. On pourrait donc postuler que la stase du sang dans les veines des membres

inférieurs est une des principales perturbations physiologiques conduisant au développement des veines variqueuses. Un mécanisme biochimique a été proposé par Michiels et al pour relier cette stase veineuse aux modifications tissulaires observées dans ces maladies (Michiels et al, 1994b). La clé de ce lien est comme nous allons le voir, la réaction de l'endothélium à l'hypoxie.

Comme l'endothélium constitue la première barrière entre le sang et le tissu veineux, il est par conséquent le premier à souffrir de cette situation: la stase veineuse engendre une situation ischémique qui diminue l'apport d'oxygène au tissu.

Pour mieux comprendre et étudier le rôle de l'hypoxie au niveau des cellules endothéliales, différents modèles expérimentaux ont été proposés: les premiers travaux ont été réalisés à partir de culture de cellules endothéliales isolées de la veine de cordon ombilical humain (HUVEC) (Michiel et al, 1992). Le modèle consiste à exposer les cellules à une hypoxie sévère pendant différents temps. Il montre clairement que les cellules endothéliales peuvent être activées *in vitro* par l'hypoxie.

L'activation des cellules endothéliales par l'hypoxie initie une cascade d'évènements impliquant polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) et cellules musculaires lisses, qui peut, lorsqu'elle est transposée *in vivo*, expliquer le développement de veines variqueuses. L'adhérence des PMN aux cellules endothéliales n'est que la première étape des processus de la diapédèse qui conduit à l'infiltration des PMN dans l'intima et dans la média des veines (Montefort et Holgate, 1991). Les PMN sont aussi stimulés et peuvent relarguer diverses molécules actives telles que des radicaux libres, des éicosanoïdes et des enzymes protéolytiques. Ces médiateurs en conjonction avec ceux libérés par les cellules endothéliales elles-mêmes, se retrouvent dans la paroi veineuse où ils peuvent induire différentes réactions tissulaires comme celles observées dans les veines variqueuses.

Il faut cependant noter que l'ischémie qui se produit *in vivo* dans les vaisseaux sanguins durant la stase veineuse, occasionne une diminution de l'apport en oxygène et en nutriments au tissu normalement irrigué et prévient l'élimination des déchets métaboliques et du CO<sub>2</sub>. Par ailleurs, l'hypoxie réalisée *in vitro* n'entraîne qu'une diminution de la pression partielle en oxygène (PO<sub>2</sub>). Ce modèle expérimental est donc réductionniste mais reste cependant tout à fait pertinent car de nombreuses études sur des organes isolés au perfusés *in situ* ont montré que la diminution de la PO<sub>2</sub> est l'acteur principal des dommages occasionnés par une ischémie.

En 1994, la même équipe a développé un autre modèle expérimental *ex vivo* qui se rapproche plus de la situation physiopathologique. Ce modèle utilise une veine ombilicale complète perfusée en hypoxie (Arnould et al, sous presse). Dans ce modèle, on montre également une adhérence des neutrophiles à l'endothélium ainsi que leur activation. De plus, les mécanismes responsables de cette adhérence semblent les mêmes que ceux décrits dans le modèle *in vitro*.

Cependant, il apparaît que l'origine des cellules utilisées lors de ces études est primordiale pour que le modèle ait une validité réelle vis-à-vis de la pathologie étudiée.

C'est dans cet esprit que nous testerons dans ce travail l'utilisation de fragments de veines saphènes humaines comme proposé par Bloy et Secchi (1994).

Ce travail ayant pour but principal l'étude des relations qui existent entre l'hypoxie, les cellules endothéliales et un type particulier de leucocytes (les polymorphonucléaires neutrophiles). Ce sont trois points importants que je me propose d'aborder dans les chapitres suivants.

## **II. L'ENDOTHELIUM : SA STRUCTURE ET SES FONCTIONS**

L'endothélium constitue la première couche cellulaire qui, avec la membrane basale, forme l'intima. Epousant les divers replis des veines et des valvules, il dresse à l'interface du flux sanguin et des tuniques sous-jacentes une immense barrière, dont on a cru longtemps qu'elle était biologiquement inerte. A son niveau, pensait-on, l'échange d'oxygène et de substances nutritives s'opérait grâce à un système de transport sélectif.

Toutefois, depuis leur utilisation en culture, on sait que les cellules endothéliales, loin de former une simple barrière, participent au contraire au contrôle de l'hémostase et de la modulation immunologique. Elle réagissent à

des altérations pathophysiologiques comme l'inflammation, la coagulation, l'athérosclérose, l'infection et l'hypoxie. Elles jouent donc un rôle important dans le remaniement vasculaire lors des pathologies veineuses en produisant des médiateurs qui modifient la structure des veines en interagissant avec les cellules musculaires lisses (Ross, 1981; Gibbons et Dzau, 1990).

L'endothélium est donc armé pour répondre rapidement aux situations extérieures auxquelles il doit faire face.

Dans ce chapitre, nous allons étudier la structure et les rôles de la cellule endothéliale d'abord dans les conditions normales, ensuite nous aborderons les changements fonctionnels et morphologiques induits par une situation d'hypoxie.

## II.1. Structure de l'endothélium

L'endothélium est un épithélium pavimenteux simple tapissant la lumière de tous les vaisseaux sanguins (Jaffe, 1985). Il est constitué d'une monocouche de cellules endothéliales aplaties et uniformes, formant une véritable mosaïque de cellules polygonales, allongées et orientées parallèlement à la direction du flux sanguin (Herman et Castellot, 1987).

Les cellules endothéliales sont polarisées comportant une face luminale, adjacente et abluminale par laquelle elles sont attachées aux constituants de la matrice subendothéliale grâce à de nombreux récepteurs glycoprotéiques (Albelda, 1991). Cette polarité reflète leur spécialisation dans les interactions avec les cellules du sang et celles de la paroi vasculaire.

L'épaisseur d'une cellule endothéliale varie de  $1\mu\text{m}$  à  $3\mu\text{m}$  en fonction de la proximité du noyau alors que ces dimensions vont de 25 à 50  $\mu\text{m}$  pour la longueur et de 10 à 15  $\mu\text{m}$  pour la largeur. La surface totale de l'endothélium chez l'homme est impressionnante et peut atteindre  $1000\text{ m}^2$ , soit environ  $10^{12}$  cellules (Dimerman et Mehta, 1990).

## **II.2. Caractéristiques morphologiques des cellules endothéliales**

Des études ultrastructurales réalisées en microscopie électronique ont montré que les cellules endothéliales sont en contact étroit les unes avec les autres par des jonctions lâches et serrées et communiquent par des jonctions de communication (Cryer, 1983). En plus de l'ultrastructure commune à toutes les cellules eucaryotes, on peut énumérer chez les cellules endothéliales au moins quatre caractéristiques cytologiques.

### **1. Le cytosquelette**

Le cytoplasme des cellules endothéliales contient tous les éléments qui composent le cytosquelette: les microfilaments d'actine, les filaments intermédiaires comme la vimentine et les filaments épais de myosine. Ces éléments sont à mettre en relation avec la capacité de rétraction, l'adhérence, les interactions cellulaires, la perméabilité vasculaire ainsi que la prolifération et la migration des cellules endothéliales.

### **2. Les corps de Weibel-Palade**

Une des grandes caractéristiques des cellules endothéliales est la présence d'inclusions spécifiques: les corps de Weibel-Palade qui sont probablement formés à partir du complexe de Golgi (Herman et Castellot, 1987). Ils sont le lieu de stockage du facteur de Von Willebrand (facteur VIII de la coagulation) (Tsai et al, 1991). Ce facteur constitue un véritable critère d'identification des cellules endothéliales (Jaffe et al, 1973).

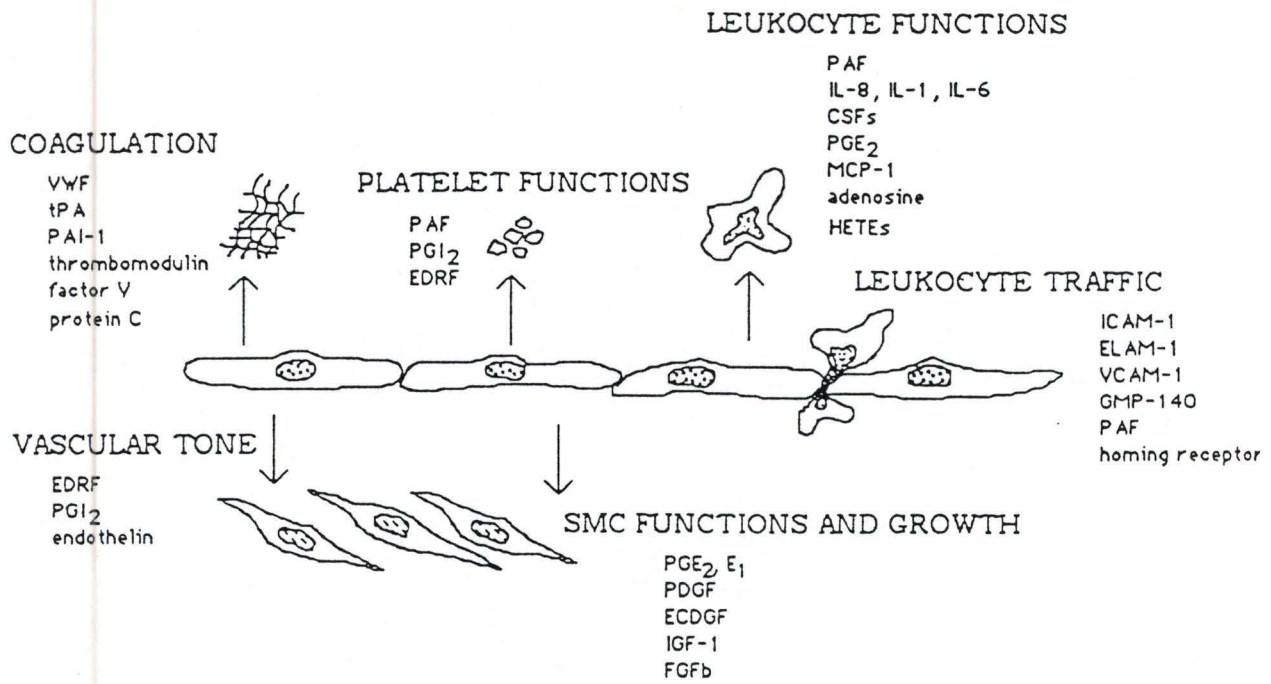


FIG. 1. Schematic presentation of the different functions of the endothelium. VWF=Von Willebrand factor, tPA=tissue plasminogen activator, PAI-1=plasminogen activator inhibitor-1, PAF=platelet-activating factor, PG=prostaglandin, EDRF=endothelium-derived relaxing factor, IL=interleukin, TNF $\alpha$ =tumor necrosis factor  $\alpha$ , CSFs=colony-stimulating factors, MCP-1=monocyte chemotactic factor-1, PDGF=platelet-derived growth factor, ECDGF=endothelial-cell-derived growth factor, IGF-1=insulin-like growth factor-1, FGFb=basic fibroblast growth factor, ICAM-1=intercellular adhesion molecule-1, ELAM-1=endothelial-leukocyte adhesion molecule-1, VCAM-1=vascular cell adhesion molecule-1, GMP-140=granular membrane protein-140, HETEs=hydroxyeicosatetraenoic acid.

Figure I.10: Représentation schématique des différentes fonctions de l'endothélium (D'après Michiels et al, 1993b).

### **3. Le glycocalyx**

Le glycocalyx est une enveloppe qui entoure la surface des cellules endothéliales, riche en carbohydrates présents sous forme de protéoglycanes (L'héparan-sulfate en particulier), d'où émergent de nombreuses microvillosités. Cette couche de glycocalyx serait structurellement et chimiquement différente aux deux pôles de la cellule, ce qui lui conférerait en effet une certaine polarité. L'héparan-sulfate apporte à la cellule des charges négatives qui vont limiter l'adhérence des plaquettes et des leucocytes chargés similairement et empêcher ainsi l'activation de la cascade de la coagulation dans les vaisseaux sanguins intacts.

### **4. Les vésicules transendothéliales**

Les nombreuses invaginations de la membrane témoignent d'une intense activité conduisant à la formation de vésicules de pinocytose: de tels phénomènes permettent l'internalisation des substances d'échange entre le sang et les tissus. Certains de ces phénomènes se font de manière passive, alors que la plupart des autres se font par des mécanismes actifs: endocytose et pinocytose. Les jonctions interendothéliales, "tight junctions" et "gap junctions" participent également au transport des molécules solubles à travers l'endothélium (Thorgeisson, 1983).

## **II.3 Fonctions de l'endothélium**

En conditions physiologiques, l'endothélium joue des rôles divers (Fig I.10).

### **1. Formation d'une barrière à perméabilité sélective**

Du fait que les cellules endothéliales sont en contact étroit les unes avec les autres, elles forment une barrière physique à l'interface entre le sang et les tissus. Elles sont dotées d'une perméabilité sélective contrôlant le flux de solutés (nutriments, hormones, électrolytes) qui sont acheminés par pinocytose

ou par des canaux transendothéliaux aux cellules sous-jacentes (Stoll et Spector, 1989).

La membrane basale sur laquelle repose les cellules endothéliales, constitue aussi une seconde barrière pour le passage des liquides et des éléments formés dans le compartiment extravasculaire. Elle est formée d'un ou plusieurs types de collagène, de l'élastine, des microfibrilles, de la laminine et des mucopolysaccharides ainsi que de la fibronectine et de la thrombospondine, une glycoprotéine matricielle capable d'initier la voie extrinsèque de la coagulation.

## 2. Contrôle de la thromborésistance

Les cellules endothéliales jouent également un rôle actif dans la régulation de la fibrinolyse et de la coagulation via la synthèse et la sécrétion de substances maintenant la fluidité sanguine ou favorisant la thrombose et l'hémostase.

La matrice extracellulaire sous-endothéliale est couverte en conditions normales par les cellules, ce qui fait que les plaquettes non stimulées ne peuvent pas y adhérer. Au contraire, en réponse à certains stimuli tels que les lipopolysaccharides bactériens, les cytokines, l'histamine, ... , l'endothélium peut se transformer en une surface pro-coagulante qui sera rapidement recouverte par une couche de plaquettes. Celles-ci, une fois activées, vont dégranuler et déclencher tout le processus de la coagulation.

L'adhésion plaquettaire est surtout favorisée par les collagènes sous-endothéliaux de type IV et V ainsi que par les microfibrilles et par la synthèse par les cellules endothéliales du thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>): un vasoconstricteur qui stimule l'agrégation des plaquettes. Enfin le facteur de Von Willebrand est un cofacteur de la liaison des plaquettes à l'endothélium lésé et le transporteur du facteur VIII plasmatique.

D'autres molécules comme la prostacycline (PGI<sub>2</sub>), l'endothélium-derived relaxing factor (EDRF) et l'adénosine sont des vasodilatateurs libérés par les cellules endothéliales du côté luminal. Ces molécules contribuent à l'action anti-coagulante de l'endothélium en inhibant l'agrégation, l'activation et l'adhérence des plaquettes. Elles sont également connues pour inhiber la

phospholipase C (PLC) et donc la mobilisation du calcium par l'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>). De plus, la prostacycline peut inhiber la synthèse du platelet-activating factor (PAF) ainsi que sa propre synthèse via une augmentation d'AMP cyclique dans les cellules endothéliales stimulées par des agonistes comme la thrombine (Heller et al, 1992).

### **3. Rôle vasodilatateur**

Les cellules endothéliales synthétisent des facteurs endogènes qui contrôlent le tonus vasculaire comme la prostacycline, l'adénosine et l'EDRF. Ces molécules ont un effet relaxant sur les cellules musculaires lisses et conduisent à une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité vasculaire (Moncada et al, 1990). D'un autre côté, l'endothélium synthétise également des facteurs vasoconstricteurs tels que les radicaux superoxydes, la PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , l'endothéline et le platelet-derived growth factor (PDGF).

Il est important de souligner ici que les molécules vasoactives se comportent également très souvent comme des facteurs de croissance exerçant des effets prolifératifs sur les cellules musculaires lisses. De nombreuses études ont montré que les cellules musculaires lisses se divisent rarement spontanément et que leur multiplication et leur développement dépendent de la présence de facteurs de croissance, dont la plupart proviennent des cellules endothéliales (Vender et al, 1987).

Les cellules endothéliales jouent donc un rôle essentiel dans les processus de remodelage vasculaire par la synthèse de plusieurs substances stimulant la croissance des cellules musculaires lisses, telles que le PDGF, l'insuline-like growth factor (IGF-1 like), l'endothéline (ET-1), certaines prostaglandines (Michiels et al, 1990c) et l'interleukine 1 (IL-1) (Vender et al, 1987). Mais d'autres facteurs libérés aussi par les cellules endothéliales exercent une inhibition sur la prolifération cellulaire, c'est le cas par exemple des oligosaccharides comme l'héparan-sulfate (Hearse et al, 1993).

### **4. Les cytokines**

Les cellules endothéliales sont non seulement des sources de cytokines mais également des cibles pour ces molécules (Borashi et al, 1991). Elles

expriment en effet des récepteurs de type I (80 kDa) pour l'IL-1 et des sites de fixation (75 kDa) pour le tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Ces deux cytokines activent les cellules endothéliales et transforment l'endothélium en une surface pro-inflammatoire et pro-coagulante. La réponse pro-inflammatoire des cellules endothéliales se traduit par une induction de la synthèse du PAF et une augmentation de la synthèse d'autres interleukines comme l'IL-1, l'IL-6 et l'IL-8 (Maruo et al, 1992).

L'action des cytokines ou du TNF- $\alpha$  sur les cellules endothéliales appelée "activation", se manifeste après plusieurs heures, soit le temps nécessaire à la synthèse *de novo* de protéines et à la réorganisation du cytosquelette des cellules endothéliales qui préparent la migration transendothéliale des leucocytes et augmentent la perméabilité vasculaire (Molony et Armstrong, 1991). Dans l'endothélium veineux, outre l'augmentation de l'expression de ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1), on voit apparaître une glycoprotéine d'adhésion appelée ELAM-1 (Endothelium Leukocyte Adhesion Molecule-1) dont la synthèse optimale est obtenue quatre heures après l'activation. ELAM-1 peut alors fixer les neutrophiles, qui sont activés par la présence de facteurs chimiotactiques, dont l'IL-8 également synthétisée par les cellules endothéliales. L'IL-8 diminue la liaison de neutrophiles par l'intermédiaire de l'ELAM-1, mais elle permet, en revanche, l'expression de certaines intégrines à la surface des neutrophiles, et donc augmente leur liaison à ICAM-1 des cellules endothéliales. Ce passage d'une molécule d'adhésion de haute affinité à des molécules de plus faible affinité permet le mouvement des neutrophiles à la surface des cellules endothéliales et leur diapédèse dans la paroi vasculaire (Hawrylowicz et al, 1991).

Cet aperçu simplifié des cellules endothéliales, de leurs caractéristiques morphologiques et de leurs multiples fonctions illustre la régulation très précieuse jouée par l'endothélium dans les conditions normales.

Le lien entre l'apparition des varices et la diminution du flux sanguin dans les membres inférieurs n'était jusqu'à présent pas connu. Or, une hypothèse a récemment été proposée, grâce à l'étude des effets de l'hypoxie sur les cellules endothéliales de la veine : cette hypoxie mime l'effet de la stase veineuse sur l'endothélium vasculaire, c'est-à-dire l'effet de la privation d'oxygène.

## II.4. L'endothélium dans la bataille de l'hypoxie

Comme nous l'avons déjà vu, de nombreux facteurs tels que la grossesse, l'obésité, les modes de vie sédentaire, la station debout prolongée,..., constituent des facteurs défavorables au retour veineux et favorisent le développement des varices.

### L'HYPOXIE

Dans ce chapitre, nous allons constater que ce phénomène d'hypoxie pourrait être responsable de toute une série de modifications du métabolisme de l'endothélium. L'étude de ces modifications nous conduira au développement d'une hypothèse concernant l'initiation du développement des varices.

De nombreuses maladies sont liées à la formation d'un caillot ou thrombus dans un vaisseau sanguin qui freine ou arrête la circulation du sang et l'irrigation des tissus situés en aval. C'est l'ischémie.

Le phénomène d'ischémie se caractérise par une diminution ou une suppression de l'apport d'oxygène et de nutriments aux tissus. Cette interruption, même temporaire de la circulation sanguine dans un tissu provoque d'importants dommages cellulaires, résultant notamment de la déplétion en ATP. Toutefois, la reperfusion provoque, elle aussi et c'est paradoxal, des altérations cellulaires, que l'on regroupe sous la dénomination de "reperfusion injury" (Flaherty et Weisfeld 1988; Piper, 1989).

En effet, on constate que la réintroduction soudaine de l'oxygène s'accompagne de perturbations dans l'intégrité cellulaire, alors que l'on s'attendrait à ce que la réoxygénation minimise les effets de l'ischémie, en permettant la récupération d'énergie dans la chaîne respiratoire.

Pour un certain nombre d'auteurs, les lésions cellulaires observées résulteraient d'une production excessive de métabolites réactionnels dérivés de l'oxygène (Radicaux libres :  $O_2^{\cdot(-)}$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^{\cdot}$ ) durant la reperfusion qui surpasse les systèmes de défense cellulaire (Engler, 1989). Un ensemble d'arguments directs et indirects semblent démontrer l'importance de ces radicaux qui seraient une des principales causes de la "reperfusion injury".

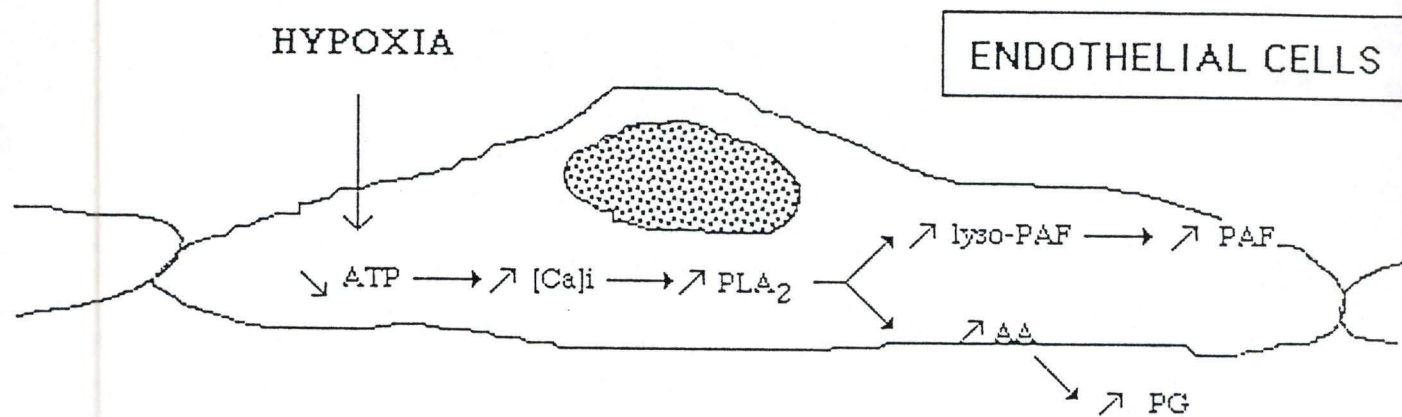


Figure I.11: Effet de l'hypoxie sur la cellule endothéliale.  
 ATP= adénosine triphosphate,  $[Ca^{2+}]_i$ = concentration en calcium cytosolique, PAF= platelet-activating factor, AA= acide arachidonique, PG= prostaglandines.

Concernant les pathologies veineuses, lors d'un ralentissement du flux sanguin, la réserve en oxygène du sang veineux s'épuise rapidement et des changements dans le métabolisme et la fonction de l'endothélium s'observent immédiatement. Vu leur localisation entre le sang et les tissus, les cellules endothéliales sont les premières cibles touchées par la diminution de la pression partielle en oxygène.

Afin de mimer ce qui se passe *in vivo* lors d'une ischémie, un modèle expérimental a été développé au laboratoire par C. Michiels et T. Arnould (Michiels et al, 1992). Il s'agit d'un modèle expérimental *in vitro* où les cellules endothéliales isolées à partir de la veine ombilicale humaine sont exposées à une atmosphère pauvre en oxygène.

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

#### **A. Altérations d'ordre énergétique (Fig I.11)**

Bien que l'oxygène soit essentiel à la survie des organismes aérobies et aussi étonnant que cela puisse paraître, il est aussi toxique pour tous les composants cellulaires. Ainsi donc, les cellules ne peuvent survivre que dans une zone étroite de concentrations en oxygène. Si cette concentration augmente (hyperoxie), la production de radicaux libres augmente et tue les cellules. Par contre, si la concentration en oxygène diminue trop (hypoxie), la cellule ne peut plus régénérer son ATP par les phosphorylations oxydatives et souffre d'un déficit énergétique qui peut conduire à sa mort.

Des travaux réalisés au laboratoire ont montré que la première altération métabolique observée dans les cellules endothéliales soumises à une hypoxie est une forte diminution de la concentration en ATP (jusqu'à 43 % après deux heures d'hypoxie) (Arnould et al, 1992).

Il existe en effet dans tous les tissus une balance finement régulée entre la production d'énergie et son utilisation. La conséquence la plus directe d'une ischémie est justement la perturbation de cet équilibre, qui a pour conséquence une diminution dramatique de la concentration en ATP

intracellulaire (Kehrer et al, 1990; Piper, 1989). L'arrêt de la circulation sanguine provoque une diminution de l'apport en oxygène, celui-ci étant utilisé comme accepteur final d'électrons dans les phosphorylations oxydatives mitochondriales.

Les mitochondries sont au centre du métabolisme énergétique. C'est grâce à leurs chaînes respiratoires que la cellule peut récupérer trente-six molécules d'ATP par molécule de glucose. Les membranes et les systèmes enzymatiques des mitochondries ne sont pas affectés de manière irréversible par cet arrêt des phosphorylations oxydatives. Mais la cellule elle, pour compenser ce manque, consomme le glucose et le glycogène cellulaire avec un rendement très faible au cours de la glycolyse anaérobie, seul mécanisme énergétique capable de fonctionner sans apport d'oxygène. Toutefois, celle-ci ne peut fournir que deux molécules d'ATP par molécule de glucose, soit dix-huit fois moins que pour les chaînes de phosphorylations oxydatives.

L'ATP vient alors à manquer et la cellule ne peut générer suffisamment d'énergie pour une survie à long terme (Rawn, 1990). Il faut cependant noter que cette diminution dans la production d'ATP est un phénomène réversible lorsqu'on remet les cellules en conditions normales.

Autre conséquence de l'accélération de la glycolyse est l'accumulation de produits terminaux de cette voie métabolique et notamment du lactate (Janssens et al, 1995), accumulation concomitante à celle du phosphore inorganique et de l'ion hydrogène, qui provoque une acidification du milieu intra et extracellulaire (Hill et La Via, 1980). Il faut noter que cette acidification semble bénéfique pour la cellule car elle semble inhiber les processus de dégradation activés par l'hypoxie.

Durant l'hypoxie, la faible quantité d'ATP intracellulaire entraîne une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire  $[Ca^{2+}]_i$ , qui pourrait être provoquée partiellement par diminution de l'activité des pompes à calcium dépendantes de l'ATP ou pompes ATP asiques (Fig I.11).

En conditions normales, ces pompes membranaires ont pour rôle de maintenir une concentration calcique intracellulaire inférieure à celle du milieu extérieur. Pour chaque molécule d'ATP hydrolysée, deux ions calcium sont expulsés.

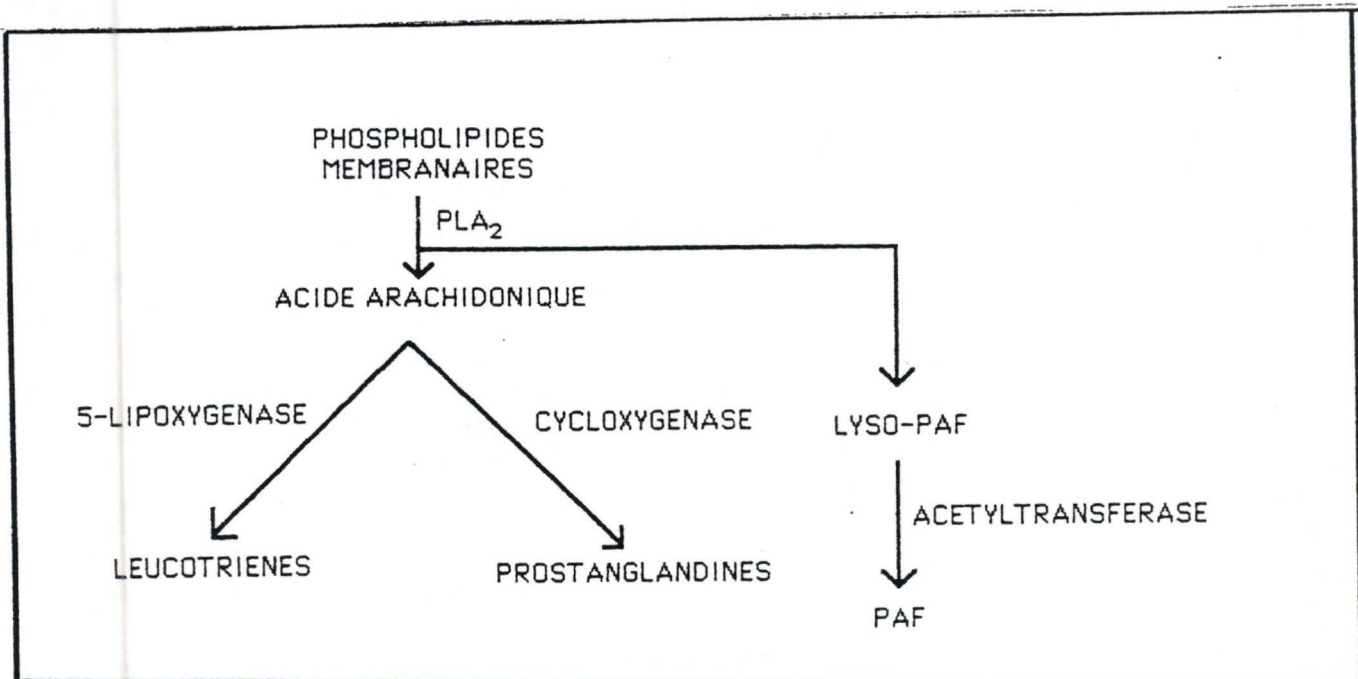


Figure I.12: Schéma de la synthèse des dérivés de l'acide arachidonique et du PAF.

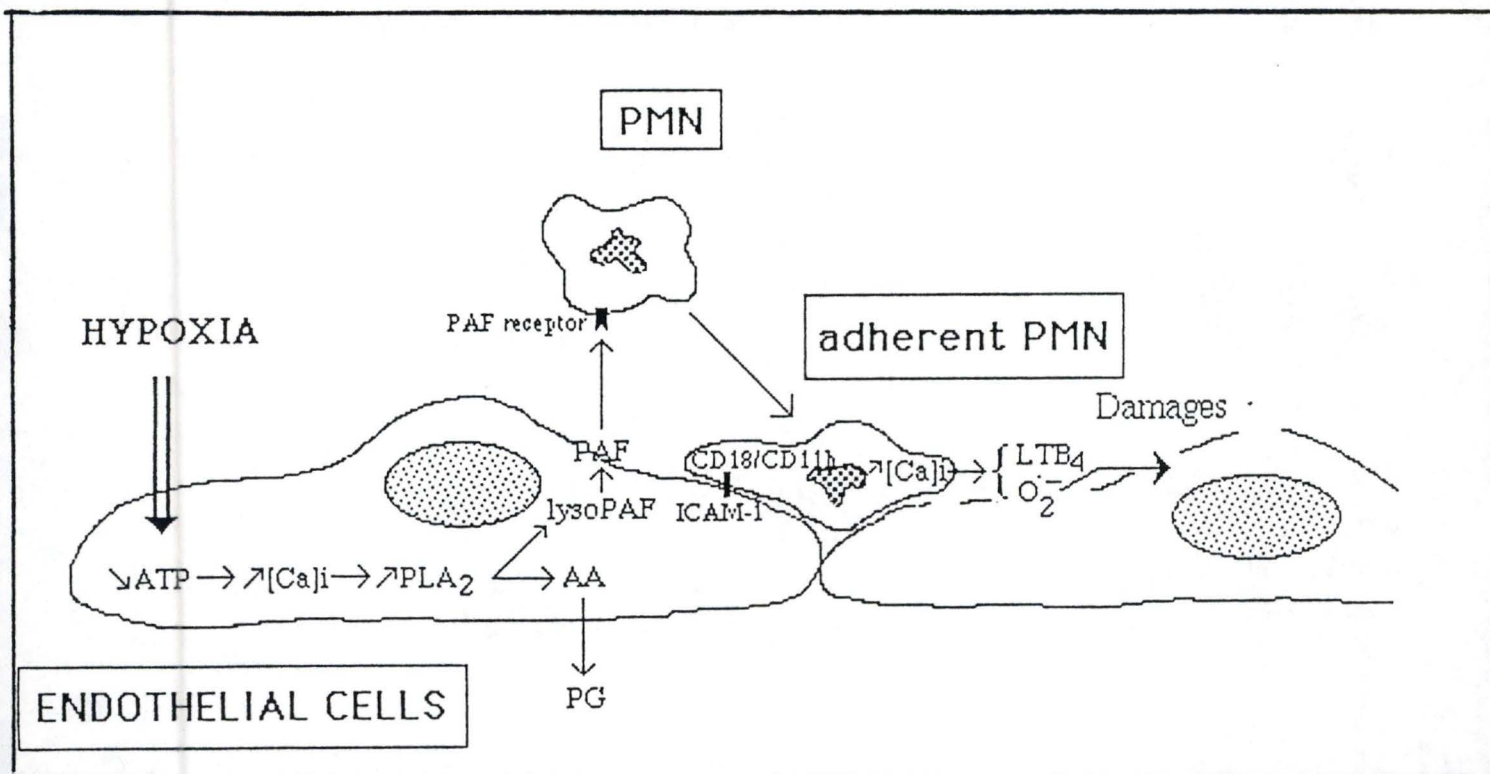


Figure I.13: Schéma illustrant les effets de l'hypoxie sur le métabolisme des cellules endothéliales et les conséquences que ces effets ont sur les interactions des cellules endothéliales avec les PMN.

L'augmentation de la concentration en calcium cytosolique libre entraîne une modification de l'activité d'une série d'enzymes. En effet, l'ion calcium est un messager secondaire important de la cellule et peut activer divers systèmes enzymatiques tels que la phospholipase A<sub>2</sub> et la protéine kinase C.

Michiels et al (1993a) ont mis en évidence une activation de la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) dans les cellules endothéliales soumises à une hypoxie. Cette enzyme libère l'acide arachidonique de la position sn-2 des phospholipides membranaires. Cet acide arachidonique est ensuite métabolisé dans les cellules par une enzyme, la cyclooxygénase qui génère différents types de prostaglandines telles que les PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>α, et PGI<sub>2</sub>.

Ces prostaglandines sont des molécules pléiotropiques qui exercent de nombreuses fonctions physiologiques dans l'organisme et dont les effets sont antagonistes en fonction de la localisation tissulaire de leur production, du type de PG et de leur concentration. Rappelons simplement les effets anti-thrombogènes et vasodilatateurs de la PGI<sub>2</sub> (Stern et al, 1991), les effets vasodilatateurs des PGE<sub>2</sub> et PGD<sub>2</sub> qui augmentent la perméabilité vasculaire, ce qui mène à un oedème et provoque la souffrance (Weissman, 1980). La PGF<sub>2</sub>α et la PGH<sub>2</sub> ont quant à elles des effets vasoconstricteurs (Muramatsu et al, 1992). Les effets antagonistes des prostaglandines concernent surtout la contraction vasculaire et la relaxation. Elles interagissent en effet avec différents types cellulaires et entre autre avec les cellules musculaires lisses de la média.

D'autre part, l'activation importante de la PLA<sub>2</sub> libère aussi du lyso-PAF qui sous l'influence d'une acétyltransférase et de l'acyl-coenzyme A donnera naissance au PAF (Platelet-Activating Factor) (Fig I.12). Une particularité des cellules endothéliales est que le PAF synthétisé reste principalement associé à la membrane plasmique (Zimmerman et al, 1992). Il peut agir comme un signal pour induire l'adhérence intercellulaire entre les cellules endothéliales et les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) via les intégrines de la famille CD18/CD11 disposées à la surface des neutrophiles et des ICAM-1 à la surface des cellules endothéliales (Arnould et al, 1993). Ces cellules jouent un rôle important dans la transformation d'un phénomène hypoxique en réponse inflammatoire. En effet, dans des conditions normales, les PMN n'adhèrent pas ou très peu à l'endothélium.

Le processus d'adhérence est capable d'induire l'activation des PMN. Ils produiront alors de grandes quantités de radicaux libres et du leucotriène B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) (Fig I.13).

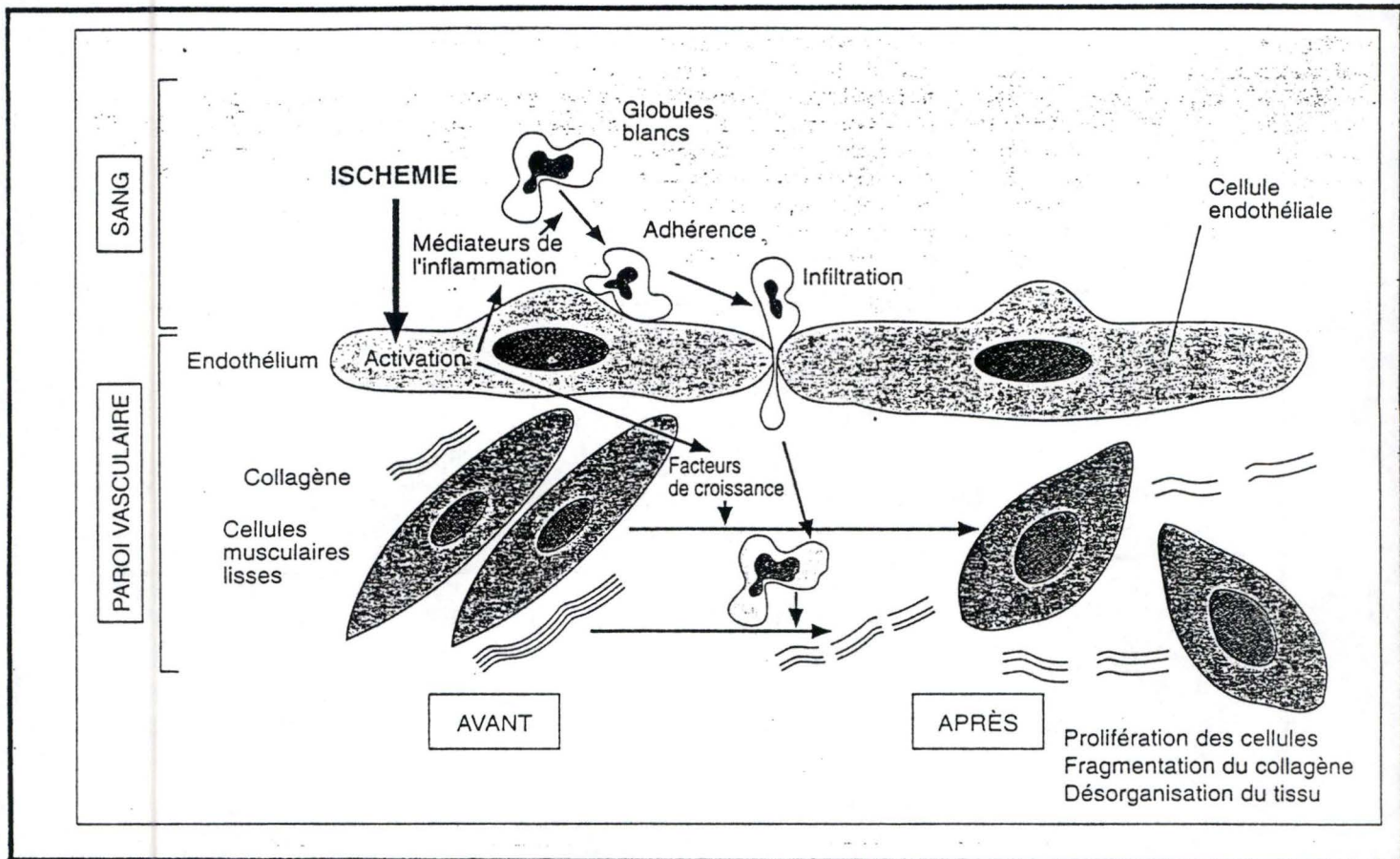


Figure I.14: Désorganisation d'une veine soumise à l'ischémie. L'activation des cellules endothéliales et leurs interactions avec les PMN neutrophiles entraîne une désorganisation et une altération de la paroi vasculaire caractérisée par une prolifération des cellules musculaires lisses qui perdent leurs propriétés contractiles et par des altérations de la matrice extracellulaire (collagène et protéoglycanes) sous l'effet des anions superoxydes et des protéases (D'après Michiels et al, 1994b).

L'adhérence des PMN, leur activation ainsi que leur infiltration dans la paroi vasculaire, sont trois points importants qui seront développés dans le chapitre suivant.

## **B. Altérations d'ordre synthétique (Fig I.14)**

Comme les cellules endothéliales (CE) sont constamment en contact avec les cellules musculaires lisses (CML), leur métabolisme module celui de ces dernières, à la fois dans les conditions normales et dans les conditions pathophysiologiques.

En effet, il est également connu que les CE synthétisent des molécules vasoactives qui modulent les fonctions des CML. Il était donc intéressant de savoir si l'hypoxie pouvait également perturber les interactions physiologiques entre CE et CML. A cette fin, Michiels et al (1994c) ont montré que les milieux conditionnés par les CE hypoxiques possèdent une activité proliférative pour les CML au contraire des milieux venant des cellules maintenues dans des conditions normoxiques.

Cette activité mitogénique semble due à la présence de prostaglandines car si la synthèse des prostaglandines est volontairement bloquée pendant l'incubation des CE en hypoxie par l'indométhacine, l'activité mitogénique est inhibée (Michiels et al, 1994c).

De plus, le basic fibroblast growth factor (bFGF), un facteur de croissance qui est un mitogène et un morphogène puissant pour de nombreux types de cellules, agit en synergie avec la  $PGF_2\alpha$  pour induire la prolifération des CML (Michiels et al, 1994c). Ceux-ci suggèrent donc que les CE activées par le manque d'oxygène, libèrent différents facteurs mitogéniques pour les CML, ce qui induit la prolifération de ces cellules.

On sait de plus que les CML qui prolifèrent présentent un phénotype synthétique au contraire du phénotype contractile normalement présent dans la paroi de veines normales. Lorsqu'elles sont synthétiques, les CML synthétisent plus de composants de la matrice extracellulaire et perdent l'expression des

Modifications observées dans une veine variqueuse	Proposition d'explication par l'hypothèse
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Endothélium conservé</li>   <li>-Présence de protéases et de radicaux libres</li>   <li>- Augmentation du collagène soluble dans la média</li>   <li>- Epaissement de la paroi veineuse</li>   <li>- Perte de contractilité</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- L'hypoxie active les cellules endothéliales sans en altérer la viabilité</li>   <li>- Les PMN infiltrés sont activés et libèrent des radicaux libres et des protéases</li>   <li>- Radicaux libres et protéases sont capables d'hydrolyser partiellement le collagène, ce qui le rend plus soluble</li>   <li>- Les cellules endothéliales libèrent des facteurs de croissance pour les CML, qui changent de phénotype et synthétisent plus de matrice extracellulaire</li>   <li>- Les CML en changeant de phénotype perdent l'expression des filaments contractiles d'actine</li> </ul>

**TABLEAU I.1:** Comparaison des modifications structurelles observées dans une veine variqueuse et des possibilités d'explication de ces modifications à la lumière de l'hypothèse proposée ci-dessus.

filaments contractiles. La prolifération et la synthèse accrue des composants de la matrice extracellulaire conduisent à l'épaississement de la paroi veineuse alors que la perte des filaments d'actine rend compte de la perte de contractilité globale de la veine.

Les modifications observées dans une veine variqueuse sont repris dans le tableau I.1. Si l'endothélium n'est pas dénudé, on observe un épaississement de la média et de l'intima avec hypertrophie des CML (Barbier et al, 1994; Lengyel et Acsady, 1990). De même, l'état du collagène et des protéoglycanes est modifié avec une proportion accrue du collagène soluble, ce qui fait baisser le tonus de la veine. Enfin, on trouve dans la paroi des veines variqueuses une quantité importante d'enzymes lysosomiaux par rapport à la veine normale (Niebes, 1990).

En conclusion, l'hypoxie peut activer les CE sans en altérer la viabilité, il n'y a donc pas de dénudation de la paroi veineuse. Par contre, les cellules activées par l'hypoxie libèrent des facteurs inflammatoires capables de recruter et d'induire l'adhérence et l'infiltration des leucocytes dans les couches sous-endothéliales ce qui explique leur présence à cet endroit. De plus, lors du processus d'adhérence, les neutrophiles sont activés et relarguent des protéases et des radicaux libres. Ces deux types de molécules sont connus pour avoir la capacité de dégrader de nombreuses molécules biologiques dont les composants de la matrice extracellulaire comme le collagène qui devient alors plus soluble.

On peut donc proposer à partir des résultats expérimentaux obtenus sur le modèle des CE exposées à une hypoxie, une nouvelle hypothèse concernant l'origine des varices: ce serait une cascade d'interactions cellulaires faisant intervenir leucocytes et CML initiée par l'activation des CE par l'hypoxie conduisant aux modifications structurelles et fonctionnelles dans la veine variqueuse *in vivo* (Fig I.14).

### **III. INFLUENCE DE L'HYPOXIE SUR LES INTERACTIONS ENTRE LES CELLULES ENDOTHELIALES ET LES PMN HUMAINS**

Les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) circulants sont attirés sur les sites inflammatoires par différents facteurs chémotactiques tels que: le fragment C5a du complément, le fMLP libéré par les bactéries, le PAF, le LTB<sub>4</sub>, l'IL-8,..., (Lucchesi, 1990; Thornton et al, 1991). Les neutrophiles, avant d'atteindre ces sites inflammatoires, devront mettre en place une séquence d'évènements coordonnés comprenant: l'adhérence à l'endothélium, la diapédèse et la migration à travers les tissus sous-jacents.

Etant donné que nous avons consacré une part importante de notre travail à étudier l'adhérence et l'activation des PMN suite à leur contact avec les CE préalablement incubées sous hypoxie, nous allons dans ce paragraphe, expliciter les mécanismes qui régissent les interactions entre ces deux types de cellules lorsqu'elles sont activées.

Nous commencerons d'abord par décrire le deuxième type de cellule qui fait l'objet de notre étude: les polymorphonucléaires neutrophiles, ensuite nous passeront en revue leurs principales voies d'activation. Nous verrons également que l'adhérence des neutrophiles à l'endothélium vasculaire lors d'une inflammation est observée suite à une incubation de celui-ci sous hypoxie.

### III.1. Description des PMN

(Pour une revue : Haumont, 1976).

#### 1). Morphologie.

Les polymorphonucléaires neutrophiles constituent 60 à 70 % des leucocytes circulants chez l'être humain. Ils ont un diamètre allant de 10 à 12  $\mu\text{m}$ .

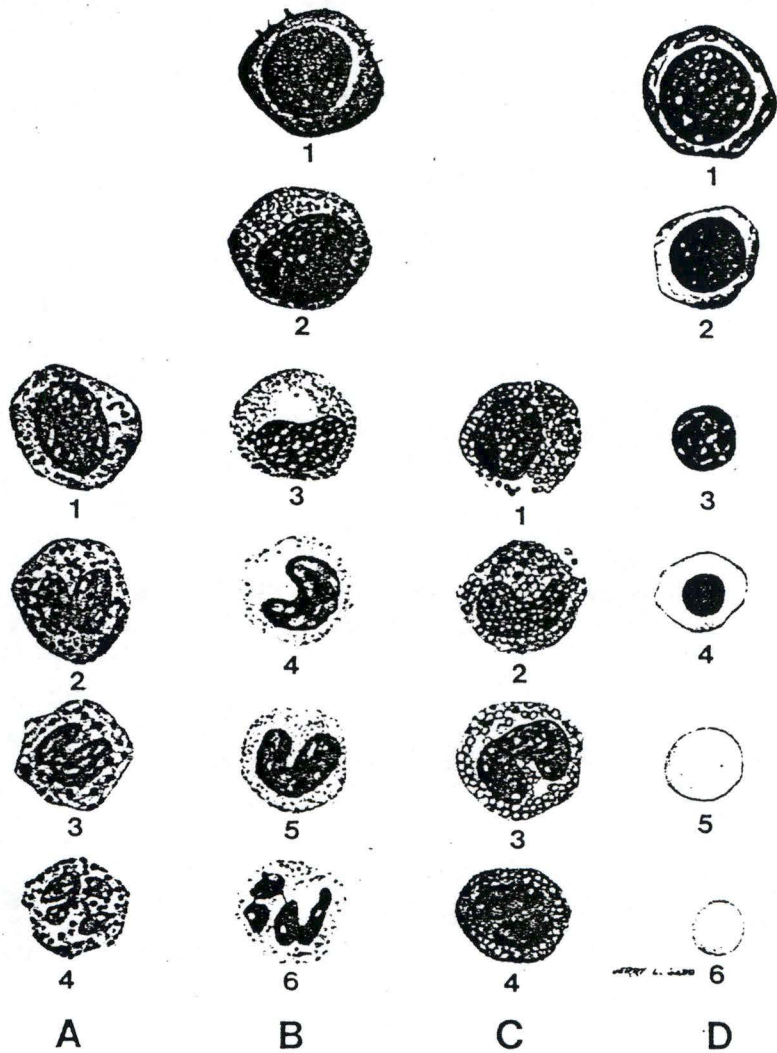
Leur noyau est formé de plusieurs lobes réunis par de fins étranglements, la chromatine qui est condensée et les nucléoles ne sont pas apparents. Le nombre de lobes augmente avec l'âge moyen d'une population de neutrophiles. Il suffit pour cela de calculer le pourcentage de noyaux à 1,2,3,4,5 lobes ou plus (formule d'Arneth). Ainsi, les neutrophiles immatures possèdent un noyau non segmenté en forme de fer à cheval. Les neutrophiles dont le noyau possède plus de 5 lobes sont appelés hypersegmentés et constituent des éléments âgés.

Le cytoplasme est finement granulaire. Il apparaît gris-mauve après coloration de May-Grünwald-Giemsa. On y décrit deux types de granulations :

-les granulations azurophiles ou primaires (0,5 $\mu\text{m}$ ), apparaissent les premières au stade de promyélocyte. Au cours du processus de maturation, leur nombre diminue au fur et à mesure des divisions cellulaires successives. Elles contiennent des hydrolases acides (phosphatase acide, 5'-nucléotidase,  $\beta$ -galactosidase,...) et de la peroxydase. Elles sont donc l'équivalent des lysosomes.

- Les granulations spécifiques ou secondaires (0,2  $\mu\text{m}$ ) apparaissent au stade du myélocyte. Elles sont deux fois plus nombreuses et contiennent de la phosphatase alcaline, du lysozyme et de la lactoferrine. Elles ont une activité antibactérienne.

Chez l'homme, on a décrit un troisième type de granules beaucoup plus petits contenant de la phosphatase acide mais pas de peroxydase. On trouve également dans le cytoplasme des neutrophiles, des mitochondries, des inclusions lipidiques, un réticulum endoplasmique et un système de Golgi peu développé (Haumont, 1976).



Hemopoiesis

- | A                            | B                              | C                              | D                                  |
|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| 1. Myélocyte basophile       | 1. Myéloblaste                 | 1. Myélocyte éosinophile       | 1. Proérythroblaste                |
| 2. Métamyélocyte basophile   | 2. Promyélocyte                | 2. Métamyélocyte éosinophile   | 2. Erythroblaste basophile         |
| 3. Basophile à noyau encoché | 3. Myélocyte neutrophile       | 3. Eosinophile à noyau encoché | 3. Erythroblaste polychromatophile |
| 4. Basophile                 | 4. Métamyélocyte neutrophile   | 4. Eosinophile                 | 4. Erythroblaste orthochromatique  |
|                              | 5. Neutrophile à noyau encoché |                                | 5. Réticulocyte                    |
|                              | 6. Neutrophile                 |                                | 6. Erythrocyte                     |

Figure I.15: Développement des lignées granulocytaires (D'après Gartner et Hiatt, 1992).

## 2). Origine.

Les neutrophiles se différencient dans la moelle osseuse à partir d'un hémocytoblaste. Celui-ci en se divisant produit des myéloblastes dont la structure est identique dans les trois lignées granulocytaires (les neutrophiles, les basophiles et les éosinophiles). En se divisant activement, le myéloblaste donne naissance aux promyélocytes (Fig I.15).

Le promyélocyte neutrophile est une cellule plus petite, les granules spécifiques neutrophiles apparaissent autour de son noyau puis se distribuent dans tout le cytoplasme. La basophilie disparaît progressivement. Ensuite, le myélocyte neutrophile se divise et les granules se partagent entre les cellules filles. Après, le myélocyte devient un métamyélocyte.

Le métamyélocyte neutrophile est une cellule encore petite. Son cytoplasme est rempli de granulations neutrophiles. Les grains azurophiles sont rares. Le noyau est échancré et prend la forme d'un fer à cheval au cours de sa maturation. La dernière étape de différenciation se traduit par la lobulation nucléaire.

Immédiatement après leur formation, ces granulocytes passent dans la circulation. La transformation d'un myéloblaste en granulocyte dure environ 7 jours. Le transit dans le sang ne dépasse pas une dizaine d'heures et l'activité des neutrophiles dans les tissus cesse après un ou deux jours. En cas d'infection importante, les neutrophiles peuvent quitter la moelle avant même la fin de leur maturation. Ils interviennent donc dans la défense de l'organisme contre les infections bactériennes et dans les réactions inflammatoires.

### **III.2. Activation des neutrophiles**

De nombreuses données expérimentales montrent que les tissus ischémiés et reperfusés présentent un certain nombre de caractéristiques typiques d'une réaction inflammatoire où les granulocytes et plus particulièrement les PMN sont les premières cellules à être recrutées (Fig I.16) (Mullane et al, 1984).

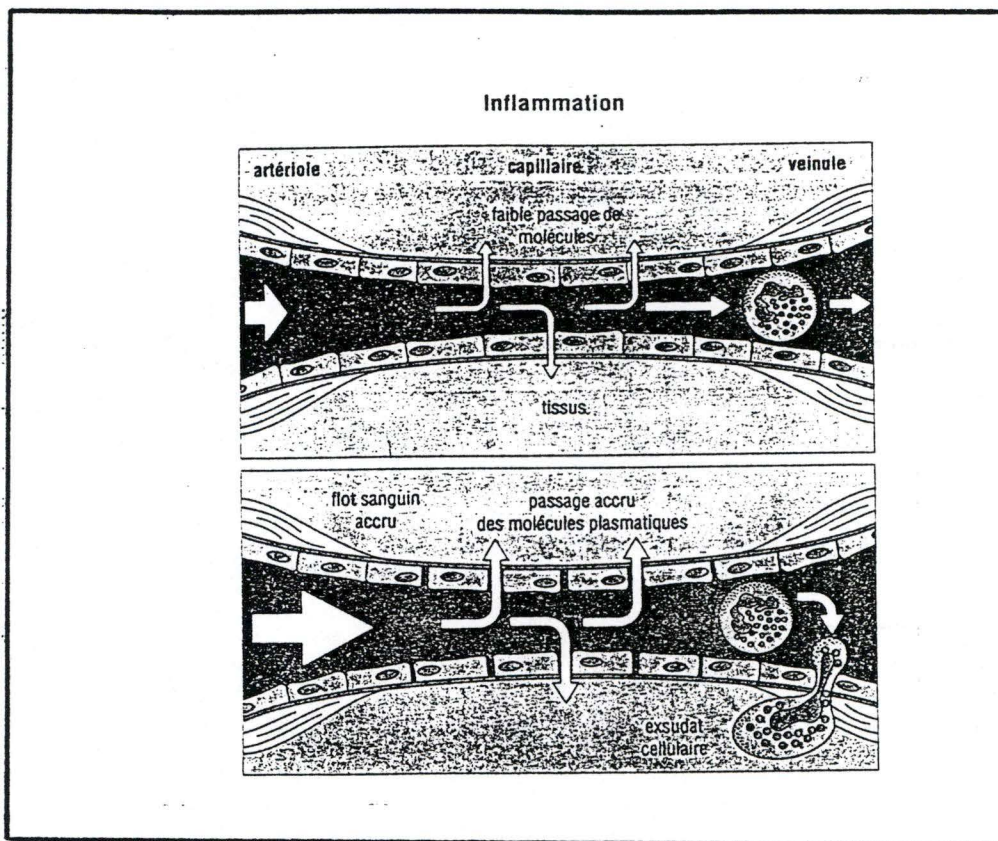


Figure I.16: Schéma représentant le tissu normal (en haut) et les trois principales modifications qui caractérisent l'inflammation (en bas). On observe une augmentation du flux sanguin, une augmentation de la perméabilité capillaire aux macromolécules du sang, et la migration des leucocytes à travers les veinules (D'après Roitt et al, 1994).

Molécules chimiotactiques			
facteur	caractéristiques	source	cellules cibles
C5a	peptide de 77 acides aminés	extrémité N-terminale de la chaîne $\alpha$ de C5	neutrophiles, éosinophiles, macrophages
f.Met-Leu-Phe	tripeptide avec extrémité N-terminale bloquée	procaryotes	neutrophiles, éosinophiles, macrophages
LTB <sub>4</sub>	métabolite de l'acide arachidonique (voie de la lipoxygénase)	mastocytes, basophiles, macrophages	neutrophiles, macrophages, éosinophiles (présent dans ECR)
IL-8	protéine de 10 kDa	monocytes activés	neutrophiles, basophiles

Figure I.17: Principales molécules chimiotactiques agissant sur les leucocytes (D'après Roitt et al, 1994).

L'adhérence est en fait l'évènement initial qui contrôle le mouvement des PMN dans les tissus tant dans les conditions physiologiques que pathologiques. Cette étape est donc capitale car elle est indispensable à l'activation et à l'infiltration subséquente des PMN. C'est aussi un des premiers signes précoces du développement d'une inflammation.

Les PMN sont guidés pendant leur migration vers le foyer infectieux ou inflammatoire par un gradient de concentration en substances chimiotactiques (Anderson et al, 1991). Une fois activés, on observe chez les neutrophiles une série de fonctions cellulaires telles que la phagocytose, la dégranulation, la production de radicaux libres et la libération de médiateurs de l'inflammation.

Examinons en détail les principales voies de communication intracellulaires conduisant à l'activation des neutrophiles.

### III.2.1. Les facteurs chimiotactiques

(d'après: Roitt et al, 1994).

Le chimiotactisme est défini comme la migration de cellules dans la direction définie par le gradient de concentration d'une molécule chimiotactique, vers un foyer inflammatoire ou une réaction d'hypersensibilité. Le déclenchement d'une migration unidirectionnelle est le propre des facteurs chimiotactiques.

Les leucocytes sont extraordinairement sensibles à ces signaux puis qu'une différence de concentration en facteurs chimiotactiques aussi faible que 0,1 % entre les deux pôles de la cellule est suffisante pour induire la migration. Les substances chimiotactiques sont responsables de la margination des neutrophiles (adhérence aux cellules endothéliales) et leur diapédèse (traversée de la paroi capillaire).

De nombreuses molécules chimiotactiques agissent sur les leucocytes, en particulier sur les neutrophiles (Fig I.17). Ces cellules ont en effet des récepteurs pour le peptide fMet-Leu-Phe (fMLP). Ce récepteur reconnaît des peptides bloqués à leur extrémité N-terminale par une méthionine formylée. Les procaryotes (ex: bactéries) utilisent cet acide aminé comme site initial de traduction de toutes les protéines, à la différence des eucaryotes, ce site

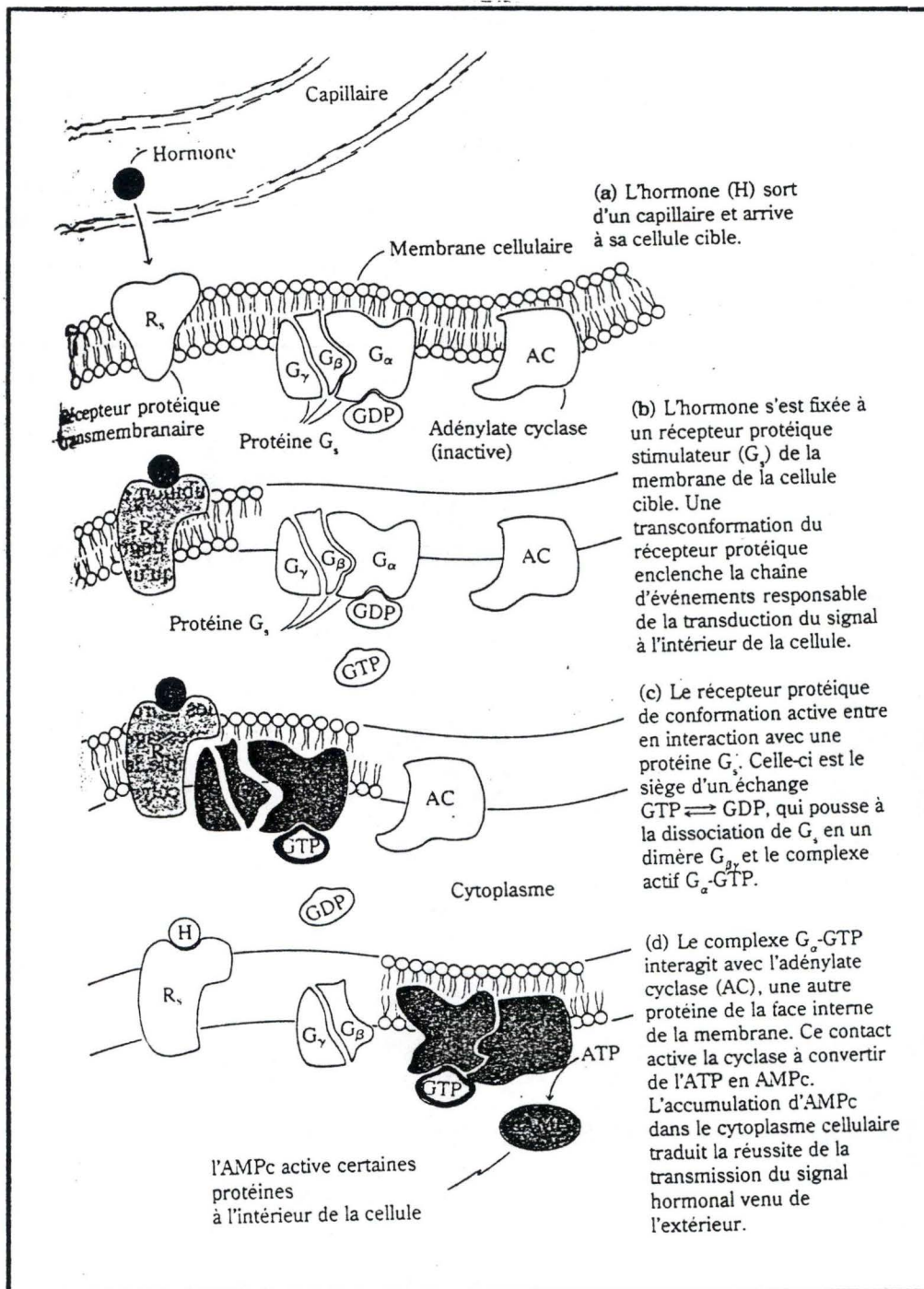


Figure I. 18: Mécanisme de formation de l'AMPc. On voit une hormone se fixer sur son récepteur protéique stimulateur, ce qui enclenche la chaîne d'événements induisant l'activation de l'adénylate cyclase et de la synthèse de l'AMPc (D'après Rawn, 1990).

constitue un signal spécifique permettant aux phagocytes de reconnaître la présence de bactéries.

Les neutrophiles ont aussi des récepteurs pour le C5a et le LTB<sub>4</sub> libérés d'une part par l'activation du complément, et d'autre part par l'activation de différents types cellulaires tels les macrophages dans les foyers inflammatoires.

D'autres facteurs comme l'IL-8 produite par les cellules endothéliales, les médiateurs lipidiques comme le LTB<sub>4</sub> et le PAF participent également au recrutement des neutrophiles en se liant à des récepteurs spécifiques de haute affinité couplés à des protéines G.

L'IL-1 produite par les monocytes et le TNF- $\alpha$  libéré par les macrophages agissent aussi sur l'endothélium vasculaire et augmente encore la migration cellulaire des neutrophiles (Freischlag et Hanna, 1991).

### III.2.2. Voies des messagers secondaires

A l'heure actuelle, trois voies de communication intracellulaire importantes sont bien connues : la voie de l'AMPc, la voie du calcium et la voie du DG et l'IP<sub>3</sub>.

#### a)- La voie de l'AMPc

C'est le plus ancien second messager connu. L'AMPc est obtenu grâce à la transformation de l'ATP par l'adénylate cyclase, enzyme membranaire activée via la protéine G lors de la liaison du ligand sur son récepteur membranaire (Fig I.18).

La stimulation des neutrophiles conduit également à la production de l'AMPc, ce dernier est largement connu pour inhiber de nombreuses fonctions cellulaires des neutrophiles telles que :

- La production des radicaux superoxydes.

- La dégranulation, en empêchant la polymérisation des microtubules.
- La production des médiateurs de l'inflammation en inhibant la PLA<sub>2</sub>.

En conclusion, la voie de l'AMPc serait une voie de régulation négative de l'activation cellulaire dans les neutrophiles.

#### b/ La voie du calcium

Comme nous l'avons déjà mentionné précédemment, le calcium joue un rôle majeur dans la régulation du métabolisme cellulaire. C'est un messager ionique quasi universel, transmettant dans les cellules les signaux reçus à leur surface. Il participe ainsi, en fonction du type de cellule dans lequel il se trouve, à des mécanismes aussi variés que la contraction musculaire, la sécrétion d'hormone, d'enzymes digestives, le transport de l'eau et du sel au travers de la paroi intestinale.

Le calcium remplit sa fonction de messager car sa concentration est très faible dans la cellule. Dans le cytosol, elle est généralement 10.000 fois plus faible (0,1  $\mu\text{M}$ ) qu'à l'extérieur de la cellule (1  $\mu\text{M}$ ). Cette différence résulte de deux caractéristiques de la membrane plasmique. En effet, celle-ci est peu perméable aux ions calcium et elle possède des pompes à calcium qui nécessitent de l'énergie sous forme d'ATP pour leur fonctionnement. Elle permet aussi le passage des ions calcium par l'intermédiaire d'un gradient électrochimique en sodium (Rasmussen, 1989).

Quand une cellule est stimulée par un signal extracellulaire, les canaux de sa membrane plasmique s'ouvrent et laissent les ions calcium pénétrer deux à quatre fois plus rapidement qu'en l'absence de signal.

Dans les neutrophiles, les canaux calciques sont très abondants et leur ouverture a pour conséquence une augmentation de la concentration en calcium cytosolique libre qui se fixe alors sur certaines protéines du cytosol comme la calmoduline (Brown et Roth, 1991). Cette protéine cytoplasmique complexe et véhicule cet ion vers les sites d'activation de nombreuses enzymes dont l'activité est calmoduline-dépendante. Parmi ces enzymes, on soulignera l'importance de la NADPH oxydase qui est une enzyme-clé pour la production des radicaux superoxydes (Bellavite, 1988), de la PLA<sub>2</sub>, de la 5-lipoxygénase, de l'acétyltransférase, de la protéine kinase C et de l'adénylate cyclase.

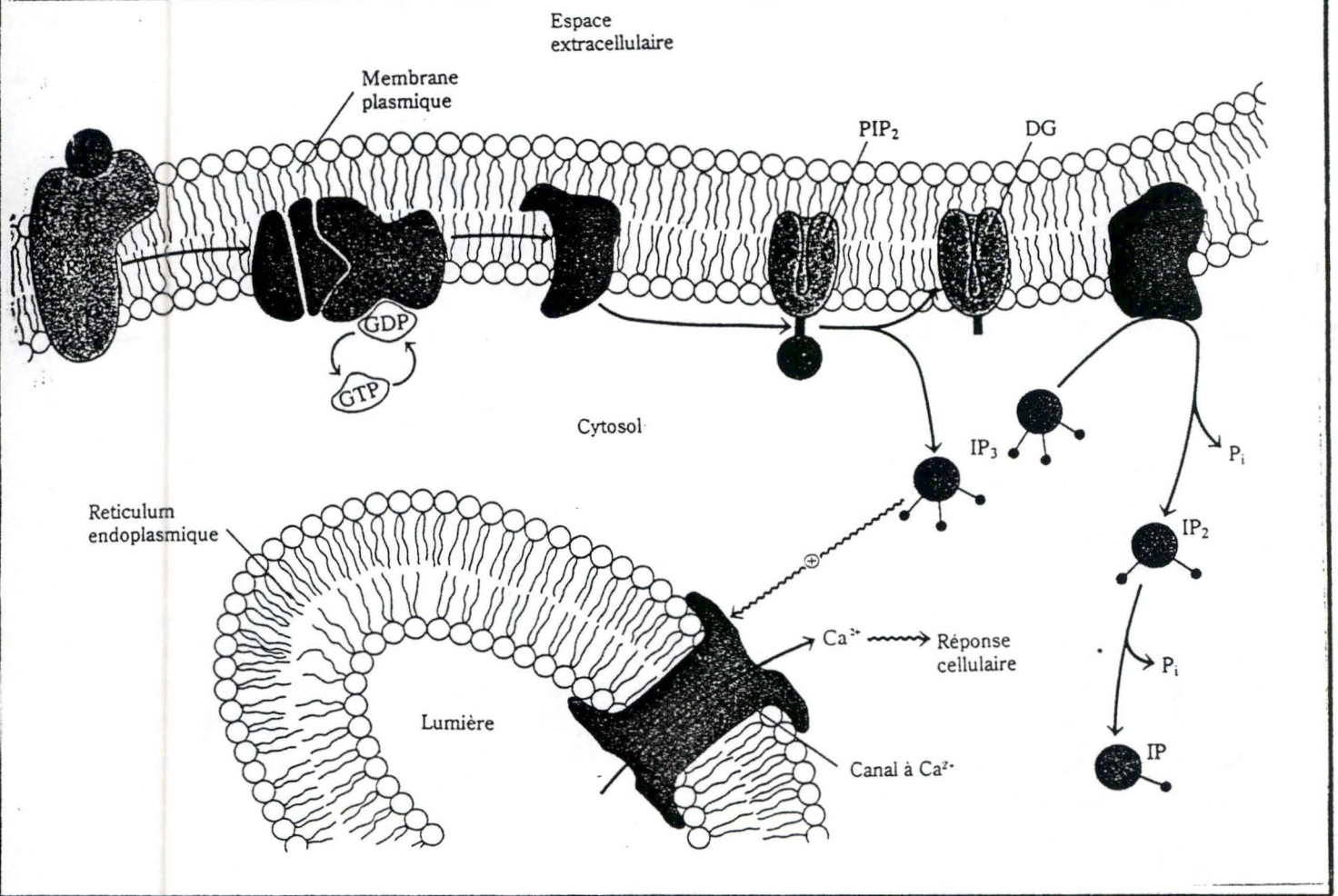


Figure I.19: Mécanisme de formation du DG et de l'IP<sub>3</sub>. A la liaison d'une hormone (H) à son récepteur plasmique (R) succède une cascade d'événements qui commence par l'activation de la PLC par une protéine G<sub>s</sub>. Cette enzyme hydrolyse PIP<sub>2</sub> en PI<sub>3</sub> et 1,2 DG. IP<sub>3</sub> se fixe alors à un canal à calcium de la membrane du réticulum endoplasmique, canal qui s'ouvre et conduit à la liaison des ions Ca<sup>2+</sup> dans le cytosol. Ces ions Ca<sup>2+</sup> vont alors agir sur de nombreux processus cellulaires (D'après Rawn, 1990).

L'ion calcium joue donc un rôle considérable dans l'activation des fonctions cellulaires des neutrophiles.

### c)- La voie du DG et de l'IP3

Le diacylglycérol (DG) et l'inositol triphosphate (IP3) sont des messagers secondaires très importants.

Les protéines G jouent un rôle dans la libération de ces deux messagers. Dès l'attachement d'un ligand à son récepteur protéique, le complexe ligand-récepteur interagit avec une protéine G et active ainsi une enzyme amplificatrice : la phospholipase C (PLC). Cette enzyme hydrolyse le phosphatidyl inositol 4,5 biphosphate (PIP2) en deux et génère le DG et l'IP3 (fig I.19).

Libérée catalytiquement par la phospholipase C, la molécule d'IP3 va se fixer à une protéine d'un canal à calcium du réticulum endoplasmique, ce qui aboutit à une décharge d'ion  $Ca^{2+}$  de la lumière du réticulum vers le cytosol (Fig I.19). Ces ions  $Ca^{2+}$  ont des effets multiples, parmi lesquels l'activation des protéine kinases dépendantes de la calmoduline (Berridge et Irvine, 1989).

Le DG a pour rôle principal de déclencher l'activation d'une protéine kinase spécifique appelée protéine kinase C (PKC). Une des fonctions de la PKC est d'activer l'IP3-ase qui converti l'IP3 en IP2, abolissant l'effet de l'IP3.

Par ailleurs, dans les neutrophiles la PKC semble jouer un rôle très important, celui d'activer la NADPH oxydase, le principal producteur d'anions superoxydes ( $O_2^{\cdot(-)}$ ) (Gerard et al, 1986; Smith et al, 1988).

En effet, de grandes quantités de radicaux superoxydes sont produites lorsque les cellules sont activées par des agents qui miment l'action du DG tels que les esters de phorbol ou l'oléylacétylglycérol qui activent directement la

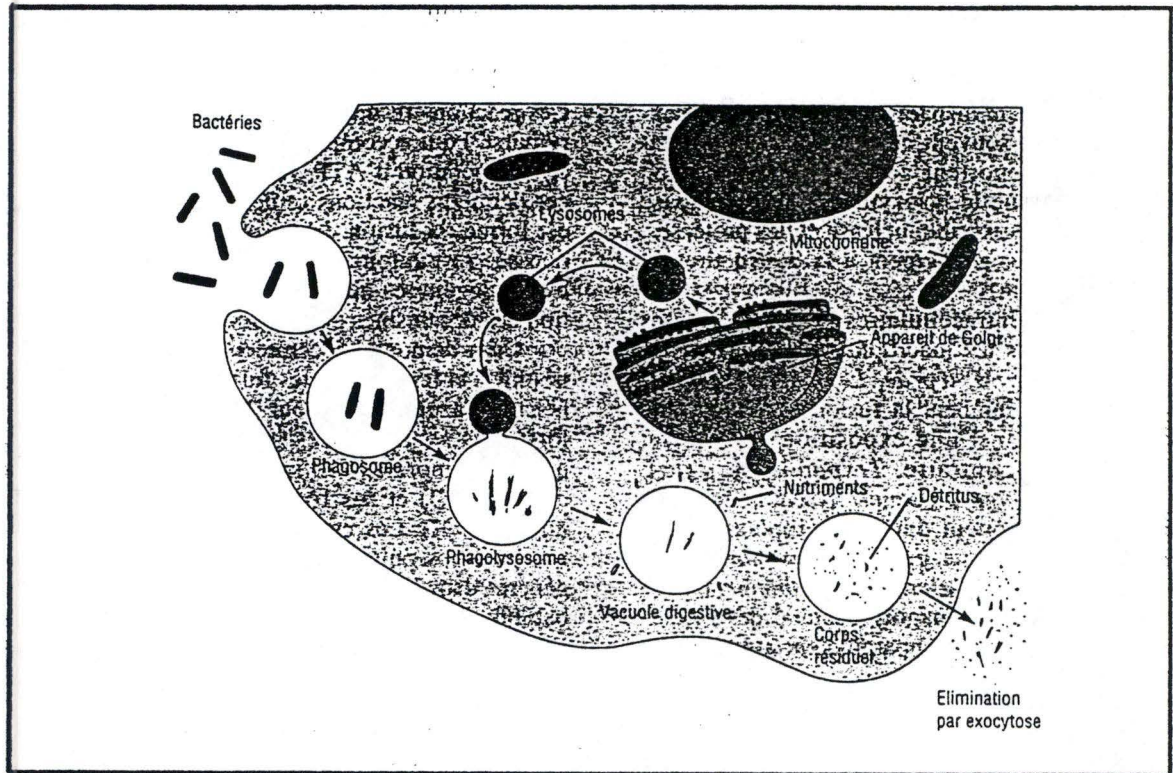


Figure I.20: Schéma de la phagocytose montrant l'ingestion, la digestion intracellulaire et l'exocytose (D'après Prescott et al, 1995).

PKC. Tandis que les inhibiteurs de la PKC inhibent cette activité (Christiansen et al, 1988).

### **III.3. Les effets des neutrophiles activés**

#### **III.3.1. Phagocytose et dégranulation**

La migration, la phagocytose et la dégranulation sont des processus étroitement liés chez les neutrophiles.

Les cellules phagocytaires (monocytes, macrophages et neutrophiles) doivent être capables de reconnaître les micro-organismes envahisseurs (Fig I.20). Elles le font grâce à des récepteurs de surface qui permettent leur fixation non spécifique sur une variété d'organismes (Horowitz, 1982).

Les neutrophiles se mettent en contact avec un agent phagocytale ou un agent chimotactique par l'intermédiaire de récepteurs membranaires. Ce contact provoque l'assemblage de microtubules qui émanent des centrioles situés au centre de la cellule. Les microtubules vont effleurer la membrane des granules et semblent être la cause de leur migration vers le centre de la cellule. Cette migration laisse ainsi une zone de cytoplasme sans granule sur le pourtour de la cellule. Simultanément, ce cytoplasme agranulaire forme des pseudopodes qui sont nécessaires à la mobilité de la cellule.

La formation de pseudopodes permet aussi d'entourer la particule à ingérer afin de l'envelopper d'une membrane et la transférer vers les lysosomes par fusion de la vésicule phagocytaire (phagosome) avec la membrane lysosomiale pour former une nouvelle vacuole, appelée un phagolysosome (Fig I.20).

Comme les lysosomes semblent disparaître du cytoplasme pendant cette fusion, on appelle souvent ce processus une dégranulation. Les lysosomes apportent au phagolysosome une variété d'hydrolases telles que le lysozyme, la phospholipase A<sub>2</sub>, une ribonucléase, une désoxyribonucléase et des protéases. Collectivement, ces enzymes participent à la destruction et à l'élimination de la particule emprisonnée.

### III.3.2. Production de radicaux libres

En plus des hydrolases lysosomiales oxygène-indépendantes, les lysosomes des neutrophiles et des macrophages en général contiennent des enzymes qui peuvent produire des intermédiaires réactionnels de l'oxygène (ROI pour "Reactive oxygen intermediates") tels que le radical superoxyde ( $O_2^{\cdot(-)}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ), le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ) et dans le cas des neutrophiles; des ions hypohalogénés (chlorure, iodure et bromure).

Ces réactions constituent la poussée respiratoire ("respiratory burst") (Babior 1984; Baggiolini et Wyman 1990) qui accompagne la consommation accrue d'oxygène et la génération d'ATP requise pour la phagocytose.

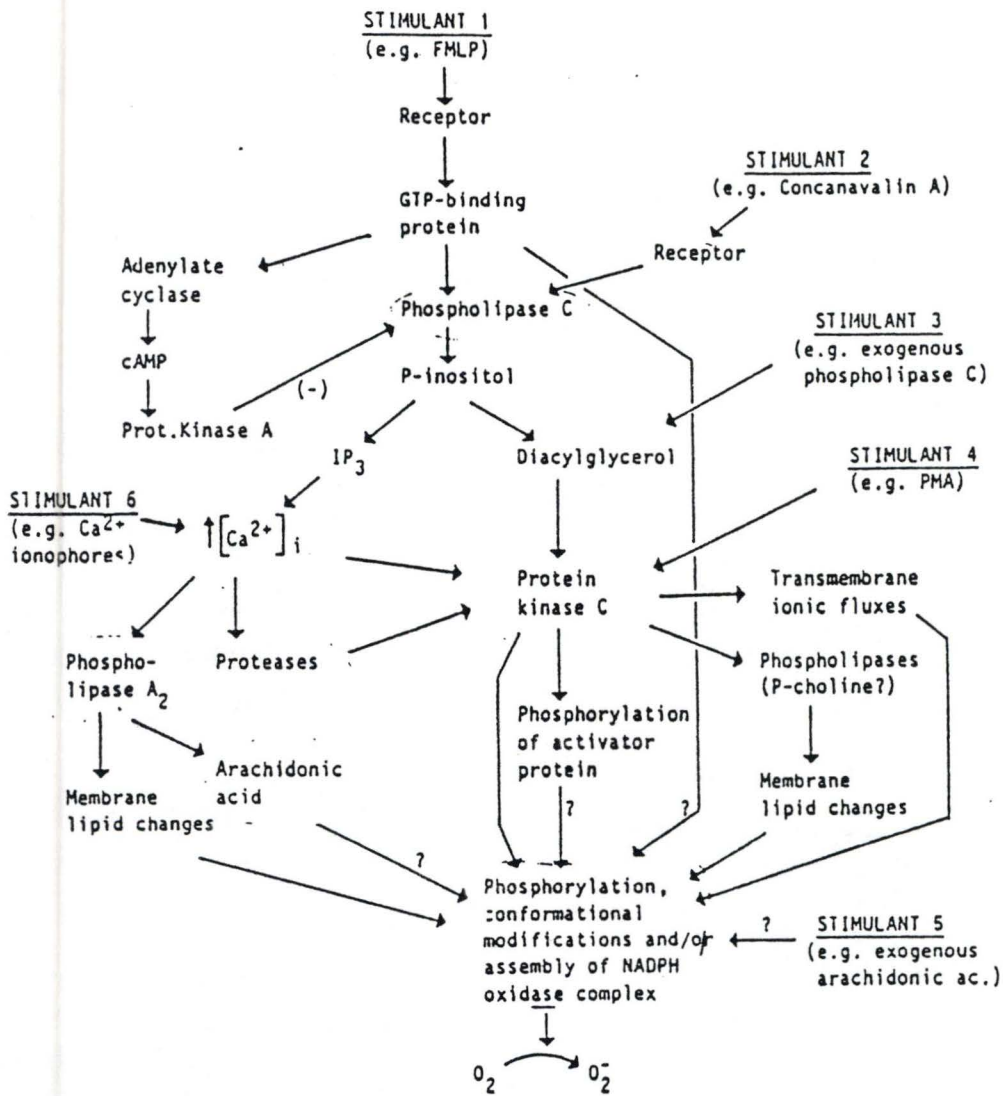
#### b1. Formation du radical superoxyde ( $O_2^{\cdot(-)}$ ).

Au contact d'une particule phagocytable ou lors d'une activation par des stimuli solubles, les PMN consomment une grande quantité d'oxygène non utilisé pour la respiration au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Il est transformé à plus de 90 % en radicaux superoxydes lors d'une réaction du NADPH, catalysée par un complexe enzymatique: la NADPH oxydase (Babior, 1987).



En raison de l'instabilité de cette enzyme, les études portant sur la purification et la caractérisation de la NADPH oxydase sont parfois contradictoires. Selon les hypothèses les plus récentes, l'activité de cette enzyme est due à un système enzymatique lié à la membrane plasmique. Ce système se composerait d'une flavoprotéine, d'un cytochrome de type b(558), d'au moins deux protéines cytoplasmiques et certainement d'autres cofacteurs tels que des quinones (Bellavite, 1988).

Ces facteurs s'assembleraient en une chaîne de transport d'électrons capable de transférer des équivalents réducteurs du NADPH vers une molécule d'oxygène, ce qui mène à la formation d' $O_2^{\cdot(-)}$  (Bellavite, 1988).



Possible pathways for activation of NADPH oxidase. For explanation see text. IP<sub>3</sub> = inositol 1,4,5-triphosphate; P-inositol = phosphatidylinositol; P-choline = phosphatidylcholine.

Figure I.21: Voies d'activation possibles de la NADPH oxydase.

Le mécanisme d'activation de la NADPH oxydase est resté également mystérieux durant une longue période. Aujourd'hui, certains mécanismes ont pu être clarifiés (Fig I.21).

Il semble que l'élévation de la concentration en calcium intracellulaire est nécessaire, mais pas suffisante pour activer la NADPH oxydase. Le véritable signal physiologique responsable de l'activation de la NADPH oxydase est la phosphorylation de cette enzyme par la PKC (Christiansen et al, 1988).

Toutefois, la PKC n'est pas le seul mécanisme capable d'activer la NADPH oxydase. La production d' $O_2^{\cdot(-)}$  par les neutrophiles stimulés par le fMLP est relativement sensible aux inhibiteurs de la PKC (ex: la staurosporine qui bloque l'hyperactivité respiratoire). D'autre part, la concanavoline A et le LTB<sub>4</sub> activent l'hyperactivité respiratoire sans induire la translocation de PKC du cytosol vers la membrane plasmique.

L'activation finale de la NADPH résulte de :

- la phosphorylation du cytochrome b,
- la phosphorylation des protéines de régulation,
- la modification de la composition des lipides dans l'environnement de l'enzyme et les changements conformationnels dépendant du potentiel de membrane (Bellavite, 1988).

## b2. Formation du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

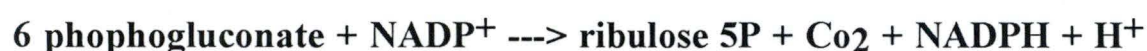
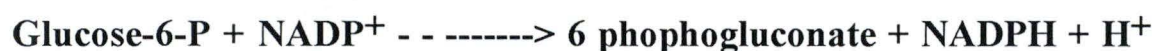
Il a été montré chez les neutrophiles que tout l'oxygène consommé au cours de l'hyperactivité respiratoire était converti en  $O_2^{\cdot(-)}$  et que 80 % de ces  $O_2^{\cdot(-)}$  étaient alors transformés en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par dismutation spontanée ou catalysée par la superoxyde dismutase (SOD).



En même temps, le glucose est métabolisé au travers du shunt des hexoses monophosphates dans le but de régénérer le NADPH qui a été consommé par les systèmes enzymatiques formateurs de  $O_2^{\cdot(-)}$ , mais aussi par le système de détoxification du peroxyde d'hydrogène assuré par le système glutathion peroxydase (GPX) / glutathion réductase (Gréd) et qui est aussi une seconde source de  $NADP^+$ .

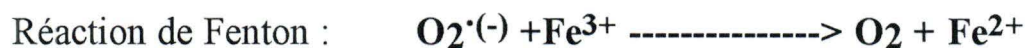


L'augmentation du taux intracellulaire du  $NADP^+$  stimule alors la voie des hexoses monophosphates qui permettra de régénérer le NADPH (Bellavite 1988). Cette voie métabolique fait intervenir la glucose-6-phosphate déshydrogénase qui oxyde le glucose-6-phosphate en anhydride carbonique et en sucre à 5 atomes de carbone par la réduction du  $NADP^+$  en NADPH.



### b3. Formation du radical hydroxyl ( $OH^{\cdot}$ )

C'est un élément très réactionnel qui se forme lors de la réduction de  $H_2O_2$  par  $O_2^{\cdot(-)}$  dans la réaction d'Haber-Weiss. *In vivo*, cette réaction se déroule en deux étapes et n'est possible que si elle est catalysée par des métaux de transition comme le  $Fe^{3+}$  ou le  $Cu^{2+}$  (réaction de Fenton).



#### b4. Production de l'acide hypochloreux

La myéloperoxydase est une enzyme exclusivement présente dans les granules azurophiles des neutrophiles et des monocytes. Elle se révèle particulièrement utile dans la lutte antibactérienne. En effet, elle catalyse l'oxydation des ions halogènes comme I<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup> et Br<sup>-</sup> qui, en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se transforment alors en halogénures (XO<sup>-</sup>).



Donc, si en fonction de sa concentration le peroxyde d'hydrogène est toxique par lui-même, son pouvoir bactéricide est fortement potentialisé par la myéloperoxydase.

#### III.4. Adhérence des PMN aux cellules endothéliales

Les molécules d'adhérence sont des molécules membranaires qui permettent à deux cellules voisines d'interagir entre elles. Ce sont souvent des glycoprotéines transmembranaires, liées au cytosquelette, que la cellule va utiliser comme point d'ancrage sur d'autres cellules ou sur la matrice extracellulaire pour pouvoir adhérer ou se déplacer.

L'augmentation du nombre des molécules d'adhérence sur la surface cellulaire peut être réalisé dans les minutes suivant l'activation de la cellule, par mobilisation d'un pool intracellulaire de molécules préformées stockées dans des vésicules, ou bien, en quelques heures, par la synthèse *de novo* de molécules d'adhérence et leur transport à la surface cellulaire (Springer, 1990).

L'adhérence est un phénomène très important chez les neutrophiles. Dans les conditions physiologiques, il existe une interaction continue entre les neutrophiles et les cellules endothéliales de la paroi des vaisseaux sanguins. En moyenne, chaque heure, un dixième de la réserve totale du sang en neutrophiles migre de la circulation au travers de l'endothélium par diapédèse.

FIG. 7 Leukocyte extravasation (a), and mechanisms for adhesion of lymphocytes (b) and neutrophils (c) to endothelium.

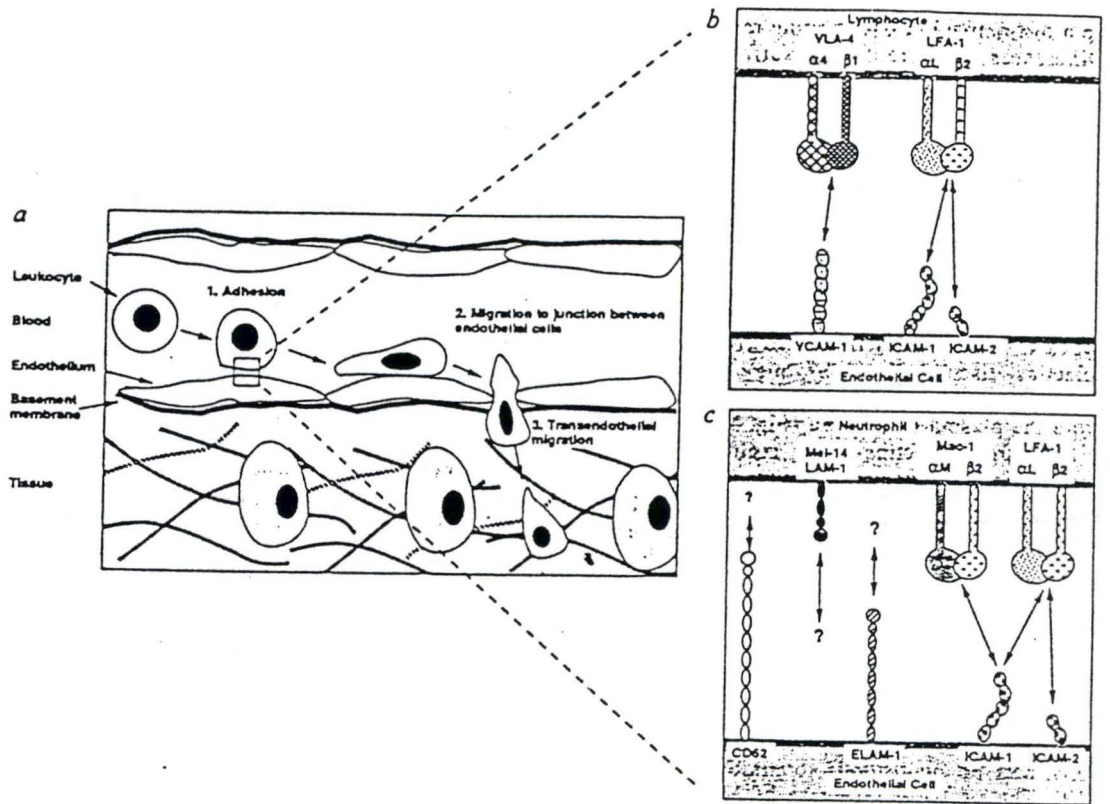


Figure I.22: Schéma reprenant les différentes molécules d'adhérence exprimées par les neutrophiles et les cellules endothéliales (D'après Springer, 1990).

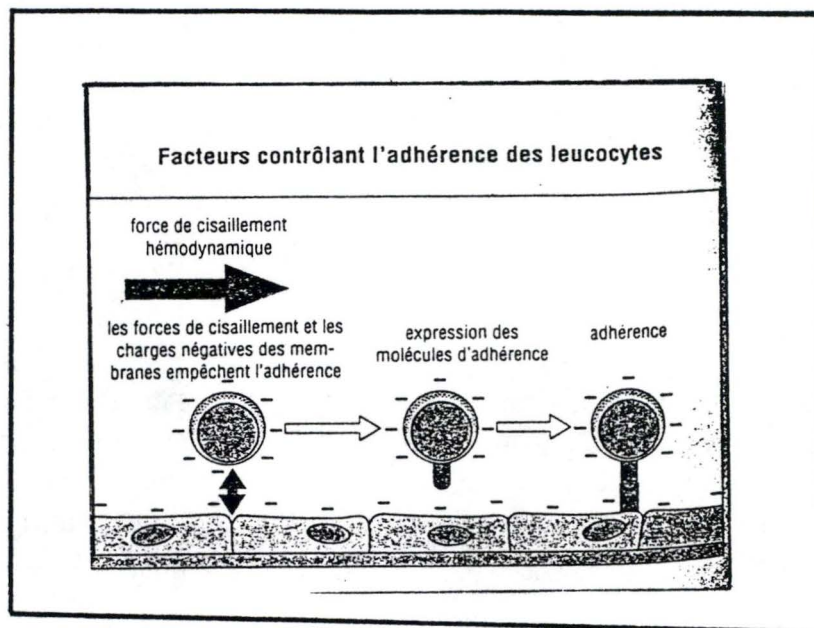


Figure I.23: Facteurs contrôlant l'adhérence des leucocytes (D'après Roitt et al, 1994).

Lors d'une réponse inflammatoire, cette adhérence augmente fortement et le premier contact des leucocytes avec l'endothélium est médié par les interactions entre les molécules d'adhérences exprimées à la surface de ceux-ci et les contre-récepteurs exprimés par les cellules endothéliales. Vu la multitude des molécules d'adhérence portées par de nombreux types cellulaires dont certaines ne sont pas encore connues (pour une revue : Pataroyo, 1991), nous nous limiterons à évoquer celles qui seront rencontrées dans notre travail.

### III.4.1. Mécanismes d'adhérence des neutrophiles (Fig I.22)

Les neutrophiles au repos, comme les autres cellules, présentent des charges négatives à leur surface, ce qui provoque une répulsion électrostatique entre cellules. Toute réduction de cette charge négative de surface engendrerait une réduction des forces répulsives électrostatiques (Fig I.23) (Harlan, 1985). Les neutrophiles adhèrent donc à l'endothélium quand l'interaction entre des paires de molécules d'adhérence est suffisante pour s'opposer à ces forces de répulsion.

Le premier mécanisme d'adhésion qui a été caractérisé est induit par des facteurs chémotactiques et d'autres médiateurs de l'inflammation (fMLP, fragments du complément, LTB<sub>4</sub>, PAF). Ces molécules provoqueraient une altération concomitante dans l'expression de glycoprotéines spécifiques (CD11/CD18) à la surface de la membrane plasmique des neutrophiles.

Les CD11/CD18 sont des intégrines spécifiques des leucocytes. Elles sont constituées chacune d'une chaîne  $\alpha$  variable de 177, 165 et 150 kDa désignées respectivement par CD11a, CD11b et CD11c liées de manière non covalente à une sous-unité  $\beta$ 2 commune de 95 kDa (CD18). L'association de ces molécules donne: CD11a/CD18 (ou LFA-1), CD11b/CD18 (ou Mac-1) et CD11c/CD18 (ou gp 150,95).

L'activation des PMN avec du fMLP augmente fortement l'expression des CD11b/CD18 ainsi que des CD11c/CD18 sans augmenter le nombre de CD11a/CD18. CD11b/CD18 semble être la molécule dominante associée à l'augmentation de l'adhérence des PMN. Elle serait préformée et stockée dans des granules spécifiques intracellulaires. Lors d'une stimulation des PMN par les agonistes chémotactiques, les molécules de CD11b/CD18 sont rapidement redistribuées dans la membrane plasmique par translocation et/ou subissent un changement de conformation (Carlos et Harlan, 1990).

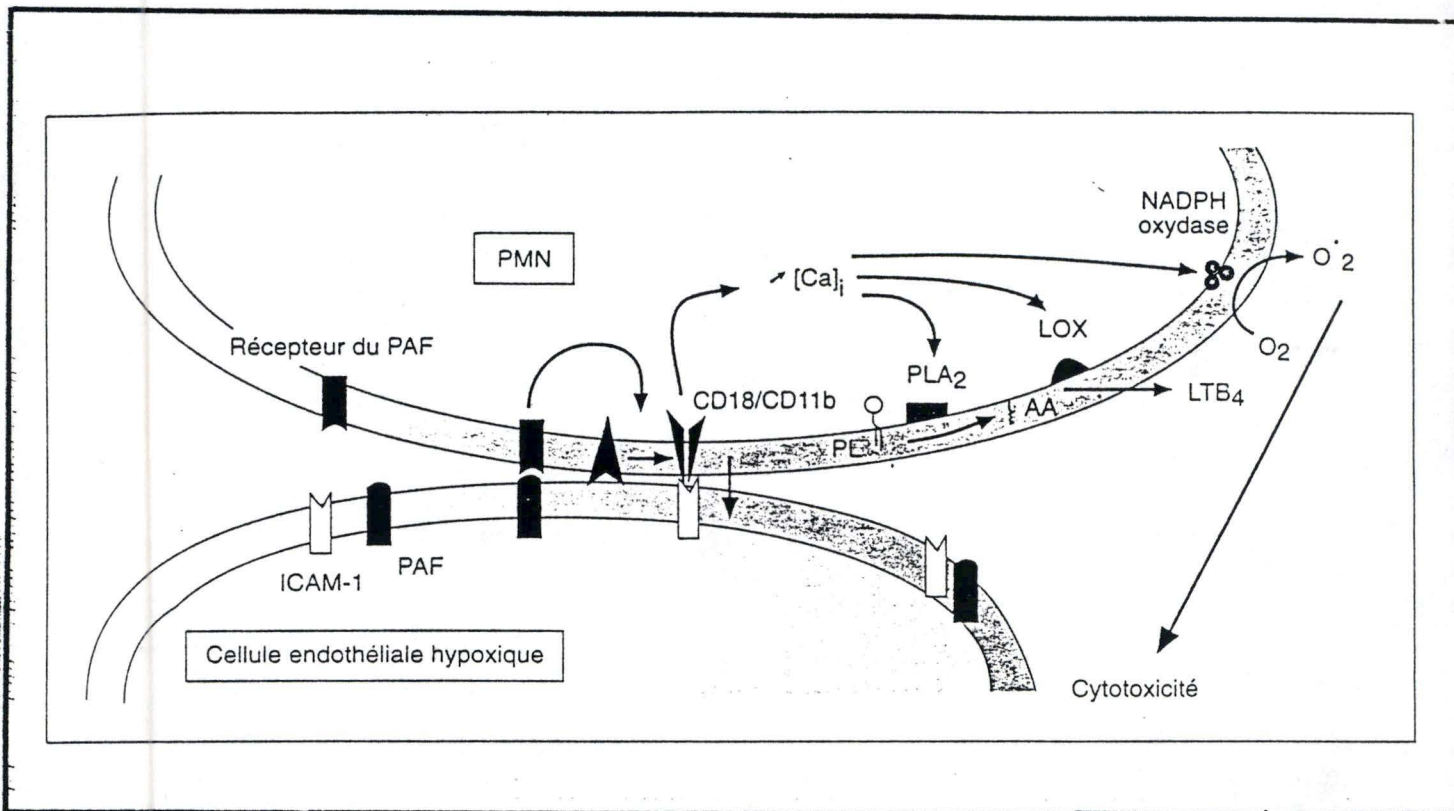


Figure I.24: Adhérence des PMN humains non stimulés aux cellules endothéliales. Le PAF (platelet-activating factor) exprimé à la surface de la cellule endothéliale hypoxique interagit avec son récepteur exprimé à la surface des PMN, ce qui provoque l'activation des intégrines CD18/CD11b qui se lie à la molécule d'adhérence endothéliale ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1). Les PMN s'activent en adhérant aux cellules endothéliales: l'élévation de  $[Ca^{2+}]_i$  stimule l'activité de PLA<sub>2</sub> (phospholipase A<sub>2</sub>), de la lipoxygénase (LOX) et de la NADPH oxydase, avec pour conséquence la production de molécules inflammatoires, leucotriène et radicaux libres. PL: phospholipides, AA: acide arachidonique, LTB<sub>4</sub>: leucotriène B<sub>4</sub>, O<sub>2</sub><sup>•-</sup>: radical superoxyde (D'après Michiels et al, 1994b).

### III.4.2. Molécules exprimées par les cellules endothéliales

Parallèlement aux CD11/CD18 des neutrophiles, il existe des contre-récepteurs exprimés par les cellules endothéliales.

Arnould et al (1993) ont montré que, l'adhérence des PMN non stimulés aux HUVEC est augmentée si ces cellules ont été préalablement incubées sous hypoxie, et ce, d'autant plus que l'incubation est longue (Fig I.24).

Cette adhérence est directement induite par le PAF présent à la surface des HUVEC ayant subi une incubation de 90 min sous hypoxie: elle est en effet, complètement inhibée, si la synthèse du PAF par les HUVEC est inhibée (ex: par l'acide oléique) ou si la mesure de l'adhérence se fait en présence d'un antagoniste des récepteurs du PAF (ex: le WEB-2086). Les PMN s'accrochent donc au PAF, ce qui provoque une augmentation de l'expression des intégrines CD11/CD18 par les PMN. Celles-ci interagissent avec ICAM-1 (intercellulaire adhesion molécule-1) exprimée de manière constitutive par les HUVEC et stabilisent l'adhérence des PMN aux HUVEC.

ICAM-1 est une molécule d'adhérence exprimée à la surface de nombreuses cellules. C'est une glycoprotéine de 90 kDa appartenant à la super-famille des immunoglobines et qui sert de contre-récepteur pour les intégrines CD11a/CD18 et CD11b/CD18 exprimées par les leucocytes (Schozaec et Lesech, 1993). Cette interaction est nécessaire pour que l'adhérence soit mesurable puisqu'on peut l'inhiber par des anticorps dirigés contre l'une de ces différentes molécules d'adhésion (ex: L'anticorps monoclonal anti-ICAM-1) et ce, même lorsque le PAF est présent à la surface des cellules endothéliales (Poher et Cotran, 1990).

D'autres mécanismes passant par l'activation des cellules endothéliales dans d'autres conditions expérimentales peuvent être également impliqués dans l'adhérence.

-L'expression de l'ICAM-1 peut être également induite par stimulation des cellules endothéliales par des cytokines comme l'IL-1, le TNF- $\alpha$  (Mantovani et al, 1992), mais nécessite plusieurs heures pour la synthèse de protéines *de novo*. Toutefois, ICAM-1 n'est pas la seule cible du CD11/CD18, une autre molécule apparentée et nommée ICAM-2 dont l'expression est constitutive et non inductible par les cytokines jouerait également un rôle important dans la liaison PMN-cellules endothéliales.

- ELAM-1 (Endothelial LeuKocyte Adhesion Molecule-1) est une glycoprotéine monomérique transmembranaire de 15kDa appartenant à la famille des sélectines. Elle est exprimée de façon constitutive mais son expression est induite transitoirement suite à la stimulation par des cytokines comme l'IL-1, le TNF- $\alpha$  ou les lipopolysaccharides (LPS) bactériens. L'expression de ELAM-1 requiert une synthèse de protéine *de novo* qui passe par un optimum entre 4 et 6 heures de stimulation (Poher et Cotran, 1990). Enfin, cette molécule pourrait lorsqu'elle se lie à son ligand, agir comme un stimulus activateur des PMN et induire l'expression des intégrines CD11/CD18.

En conclusion, l'adhérence des PMN neutrophiles aux cellules endothéliales peut être induite soit par l'activation des neutrophiles soit par l'activation des cellules endothéliales ou par les deux. Dans le cas de l'activation des cellules endothéliales par l'hypoxie, on observe non seulement une augmentation de l'adhérence des PMN mais aussi leur activation mise en évidence par la libération d'anions superoxydes et la synthèse accrue de LTB<sub>4</sub> (Arnould et al, 1994).

## IV. But du Mémoire

Comme nous venons de le décrire, la localisation des cellules endothéliales à l'interface sang-tissu fait qu'elles sont parmi les premières cellules du système vasculaire à être exposées à une diminution de la concentration en oxygène du sang comme celle qui a lieu pendant la stase veineuse. L'hypothèse développée dans l'introduction implique que l'hypoxie répétée entraîne des désordres au niveau des cellules endothéliales puis dans la paroi vasculaire et enfin au niveau du tissu sous-jacent.

La modélisation de tels phénomènes paraît des plus importante afin d'étudier l'évolution exacte des perturbations endothéliales dues à l'hypoxie et des modifications structurelles et fonctionnelles subséquentes de la paroi veineuse. Dans une telle approche, il est indispensable d'étudier le comportement de l'endothélium des territoires directement impliqués dans une pathologie donnée, car les cellules endothéliales ont des sensibilités variables vis-à-vis de l'hypoxie selon leur territoire d'origine.

Le but de ce mémoire était donc d'essayer de confirmer le rôle de l'hypoxie et de l'endothélium dans la pathophysiologie de la maladie veineuse, en étudiant *ex vivo* les effets de l'hypoxie sur l'endothélium de veines saphènes humaines et la manière dont ces changements vont affecter les interactions entre ces cellules et un deuxième type de cellule: les PMN circulants.

La première partie de ce travail sera consacrée à la comparaison morphologique de la veine saphène humaine normale et variqueuse à la fois en microscopie optique et en microscopie électronique à balayage.

Dans un second temps, nous nous intéresserons à étudier les effets de l'hypoxie sur la veine saphène humaine, pour cela, nous examinerons l'adhérence et l'activation de PMN après leur perfusion dans la veine. En parallèle, nous tenterons de compléter les études biochimiques par une étude morphologique qui nous permettra de

visualiser le phénomène d'adhérence des PMN à l'endothélium ainsi que leur état activé.

Cette étude est réalisée *ex vivo* sur des fragments complets de veines saphènes humaines provenant soit d'une région saine (pour les études biochimiques et morphologiques de l'effet de l'hypoxie) soit d'une région variqueuse (pour la comparaison morphologique entre veine normale et veine variqueuse). Elle devrait permettre de confirmer le rôle essentiel de l'activation de l'endothélium par l'hypoxie dans l'initiation des modifications de la paroi veineuse conduisant au développement des veines variqueuses.

## CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

### I. PREPARATION DES NEUTROPHILES

#### I.1. Purification des polymorphonucléaires humains

Les neutrophiles sont isolés à partir de sang de donneurs sains selon la méthode décrite par Boyum (1976). Le sang entier et citraté nous est rapidement fourni après prélèvement par la Croix-Rouge de Belgique (centre de transfusion de Namur).

##### a/- Solutions.

1. Dextran T500 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suède à 6 % dans une solution de NaCl 0,9 %.

2. Solutions de NaCl 0,2 % et 1,6 %.

3. Solution d'HBSS (Hank's Balanced Salt Solution modifiée sans calcium ni magnésium) de composition: NaCl 140 mM, KCl 5mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 H<sub>2</sub>O 3mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 mM et D-glucose 5,5 mM, PH 7,4.

4. Lymphoprep : solution stérile et sans pyrogène, de densité particulière :1,077 g/ml, osmolarité 280 mosm et pH 6,8 (Nycomed Pharma, Oslo, Norvège).

## SCHEMA DE L'APPAREILLAGE

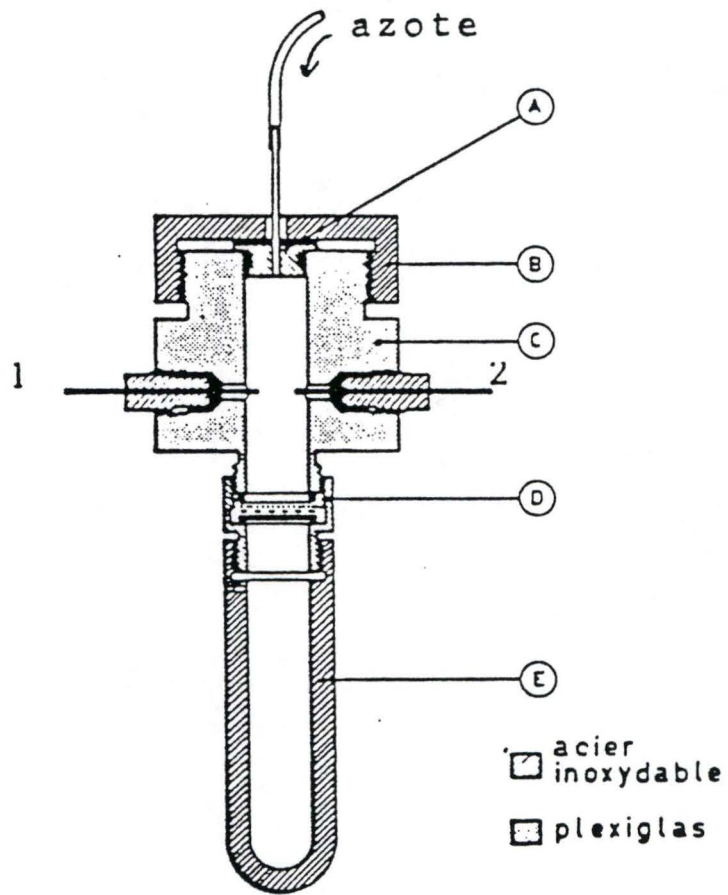


Figure II.1: Dispositif de filtration (selon P. Baudhuin).

A: bouchon maintenu par la pièce B

C: chambre en plexiglas avec les deux sondes de conductivité (1 et 2)

D: filtre Millipore

E: Support en acier inoxydable.

## **b/ -Méthode.**

Le sang citraté est fractionné en portions de 30 ml auxquelles on ajoute 5 ml de dextran. Après sédimentation des érythrocytes pendant une heure à 20°C, les phases supérieures riches en leucocytes sont regroupées et centrifugées à 1100 rpm pendant 10 min afin d'éliminer les plaquettes. La lyse des érythrocytes contaminants est réalisée par un choc osmotique en resuspendant les culots dans 7 ml d'une solution hypotonique de NaCl 0,2 % pendant 1 min. L'isotonicité du milieu est ensuite rétablie en ajoutant 7 ml d'une solution de NaCl 1,6 %. Les globules rouges lysés sont éliminés par une centrifugation à 1800 rpm pendant 5 min. Si le culot est encore contaminé par des érythrocytes, une seconde lyse peut s'imposer. Les cellules sont ensuite lavées deux fois par 10 ml de HBSS avant d'être resuspendues dans 9 ml de cette solution. Les PMN sont ensuite séparés des monocytes et des lymphocytes en déposant délicatement des fractions de 3 ml de suspension cellulaire sur 3 ml de lymphoprep et en centrifugeant à 1000 rpm pendant 20 min (International, Beckman). Après cette centrifugation, les culots cellulaires contenant les PMN sont resuspendus dans du HBSS et rincés deux fois.

## **I.2. Identification des PMN purifiés**

La quantité de PMN purifiés selon la méthode décrite ci-dessus est déterminée par un comptage à l'hémocytomètre (chambre de Neubauer). Les préparations obtenues par cette méthode contiennent environ 95 % de PMN dans un état de viabilité cellulaire dépassant 95 % de viabilité (Babbit et al, 1990).

L'identification des PMN peut se baser sur l'analyse de leurs caractéristiques morphologiques en microscopie électronique à balayage. 1 ml de la suspension finale de PMN purifiés a été examiné grâce au principe de la "Filtration".

## **a/ - Principe.**

Le procédé de filtration a pour but de concentrer la suspension cellulaire et d'obtenir une fine pellicule qui puisse être examinée en microscopie électronique dans toute son épaisseur. Le

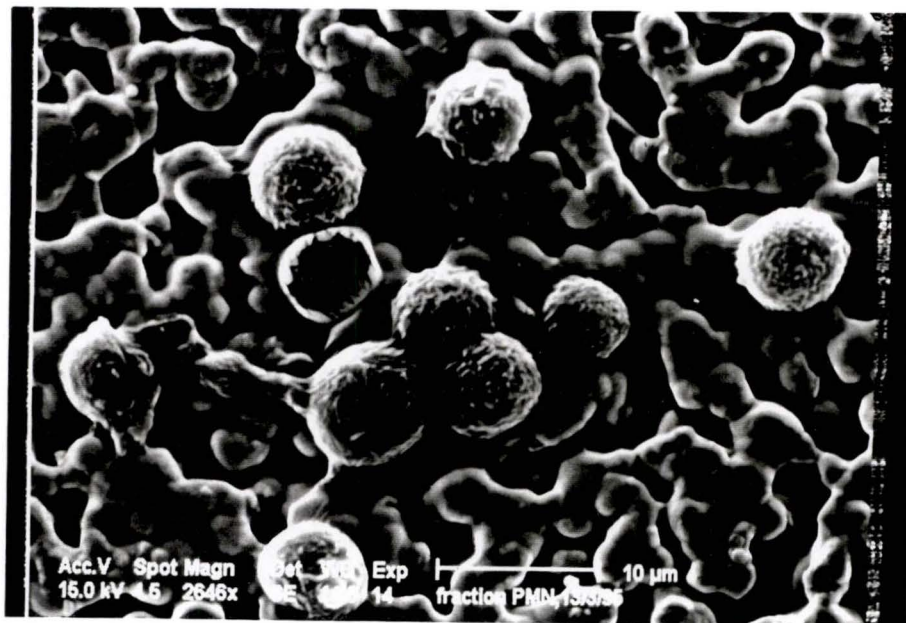


Figure II.2: Micrographie en microscopie électronique à balayage d'une suspension de PMN purifiés. Le support est un filtre à l'argent (G= 2646 X).

support pour la filtration est un filtre millipore à base d'argent et dont les pores ont un diamètre de 0,8  $\mu\text{m}$ . La pression engendre le passage du liquide mais comme le processus est très lent, on recourt à une surpression d'azote pour l'accélérer.

L'échantillon est contenu dans une chambre transparente en plexiglas (Fig II.1). Un système de contrôle automatique (deux sondes de conductivité) remet la chambre de filtration en pression atmosphérique lorsque la filtration est terminée. En effet, lorsque les sondes sont immergées de liquide, il y a connexion entre la chambre de filtration et une bonbonne d'azote sous pression. Cette connexion cesse dès que le niveau de liquide descend sous les sondes.

### **b/ - Mode opératoire.**

1 ml de la suspension finale de PMN est fixé par 1 ml de glutaraldéhyde 3% dans un tampon cacodylate de sodium 0,1 M pH 7,4 pendant 10 min à 0°C. Le filtre millipore est placé sur le support métallique comme indiqué sur la Fig II.1, la chambre de filtration est raccordée à l'unité de contrôle et la bonbonne d'azote ouverte. La suspension fixée est déposée sur le filtre, on y ajoute très lentement à la seringue du tampon cacodylate jusqu'à ce que le contact entre les sondes soit établi, on raccorde ensuite l'arrivée d'azote. Lorsque la filtration est terminée, le reste de tampon est enlevé au moyen d'une pipette Pasteur, le filtre est retiré et rincé dans le tampon cacodylate de sodium à 0°C. Ensuite, les cellules accrochées au filtre sont rapidement déshydratées par les passages successifs dans des solutions d'acétone à 30, 50 et 70 % pendant 2 min puis 1 min et finalement dans l'acétone 100 % pendant 2 min à 0°C. Enfin, la dessiccation servant à remplacer l'acétone dans les cellules par du CO<sub>2</sub> se réalise par la méthode du "point critique". Le filtre est ensuite collé sur un support en aluminium puis couvert d'une fine couche d'or (20 nm).

Nous avons constaté suite à l'observation au microscope électronique à balayage de ce filtre, que la suspension de cellules contient majoritairement des polymorphonucléaires neutrophiles (Fig II.2). On observe également sur cette micrographie que la surface de ces PMN conserve une apparence lisse, cette apparence est une caractéristique morphologique typique des neutrophiles non activés.

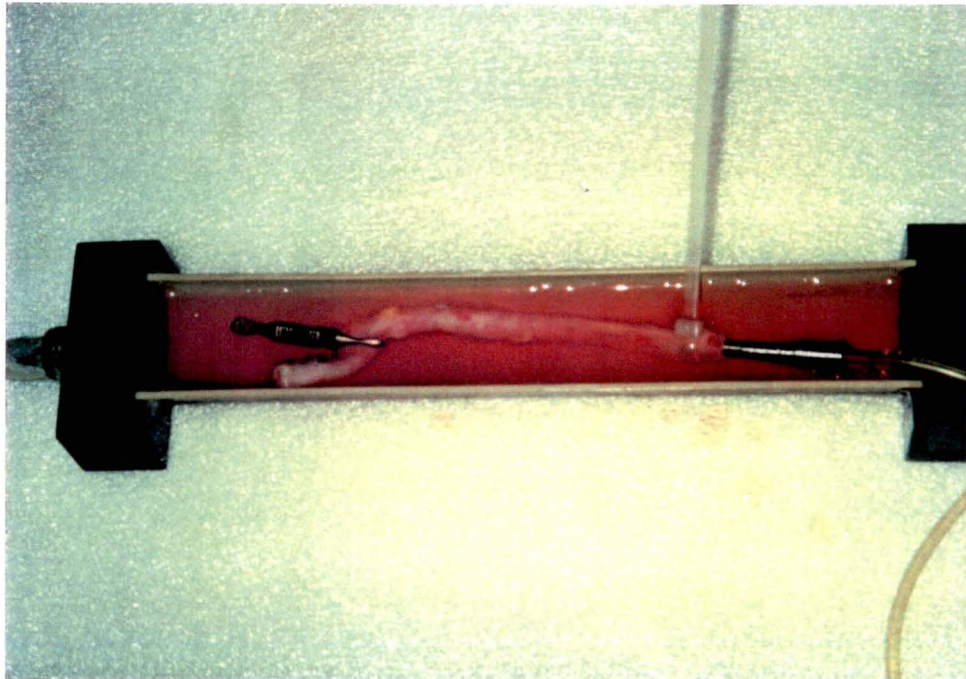
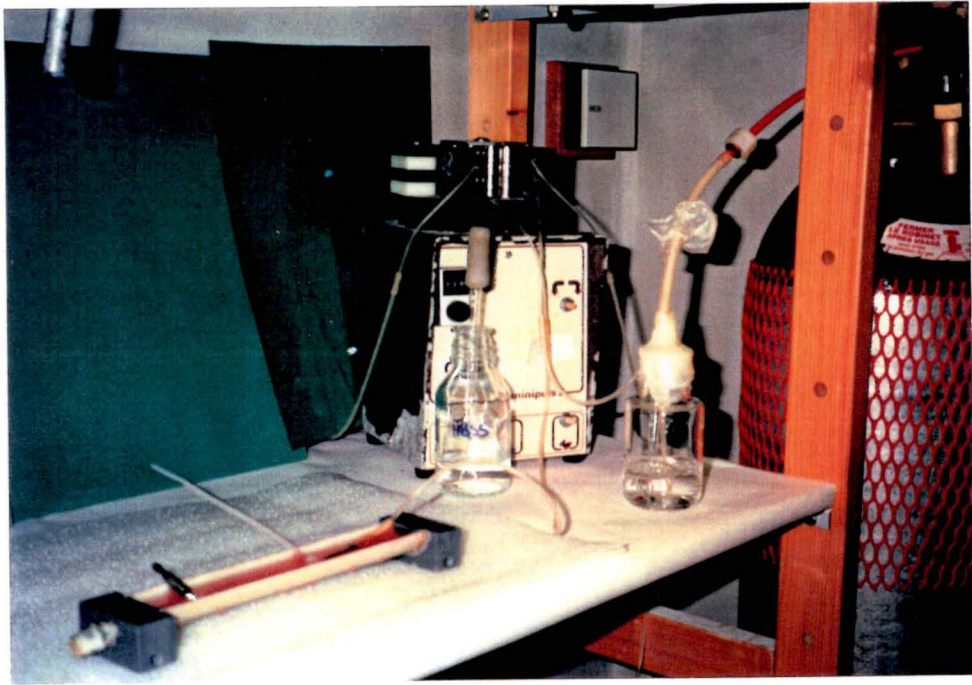


Figure II.3: Photographies du montage expérimental permettant de perfuser la veine saphène humaine et de la soumettre à l'hypoxie.

## II. ETUDES BIOCHIMIQUES

### II.1. Mise sous hypoxie des veines saphènes

#### a/ - Principe.

Dans cette étude, nous allons aborder les effets de la privation d'oxygène sur l'adhérence de PMN à l'endothélium de la veine saphène. Afin de mimer ce qui se passe *in vivo*, l'ischémie est simulée en exposant la veine à une hypoxie sévère pendant un temps plus ou moins long.

#### b/ - Matériel et solutions.

1. Solution de récolte des veines saphènes : milieu de culture RPMI (Gibco BRL, Paisley, G.B.) à pH 7,36.

2. Solution d'HBSS, pH 7,36 portée à 37°C, de composition légèrement modifiée (ne contenant pas de Na HCO<sub>3</sub>): NaCl 140 mM, KCl 5 mM, Mg SO<sub>4</sub> 0,4 mM, Mg Cl<sub>2</sub> 0,5 mM, Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> 4,3 mM, KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 0,4 mM, D-glucose 5,5 mM et du CaCl<sub>2</sub> 1 mM.

3. Bouteille d'azote (Air liquide).

4. Pompe péristaltique.

#### c/- Méthode.

Les fragments de veines saphènes sont rapidement stockés après leur prélèvement dans des pots en plastique contenant environ 60 ml de RPMI et conservés à température ambiante au maximum 1 heure avant leur utilisation.

Le système de perfusion de la veine saphène est présenté à la FigII.3. Après avoir coupé la veine en deux segments égaux d'environ 4 à 5 cm de long, chaque segment sera monté et connecté à une pompe péristaltique délivrant un flux de 1 ml/min puis cannulé aux deux extrémités et rincé pendant 5 min avec la solution d'HBSS afin d'éliminer

le reste du sang qui s'y trouve. L'hypoxie est réalisée par la perfusion d'une solution d'HBSS (50 ml) dans laquelle on a préalablement fait barboter de l'azote pendant 60 min. Ce temps permet d'éliminer l'oxygène dissous dans la solution et d'obtenir ainsi une PO<sub>2</sub> d'environ 10 mmHg dans le milieu. Lorsque le flux est continu (1 ml/min), la veine est obturée à son extrémité et remplie de solution. La pompe péristaltique est alors arrêtée pour simuler le clampage de la veine. Ces manipulations sont réalisées à 37°C et les contrôles sont constitués par un segment de la même veine qui est perfusé dans les mêmes conditions que le test mais par du HBSS oxygéné (PO<sub>2</sub> = 130 mmHg).

## **II.2. Test d'adhérence des PMN à l'endothélium de la veine saphène**

### **a/- Matériel.**

1. Chrome - 51 (cr<sup>51</sup>) (Amersham, Gand, Belgique) possédant une activité spécifique de 250-500 mCi/mg de chrome.
2. Interleukine-1 $\beta$  recombinante humaine (Janssen Biochimica, Beerse, Belgique).
3. Anticorps monoclonal anti-ICAM-1 (R&D systems, Abingdon, G.B.).
4. Antagoniste du récepteur au PAF : WEB2086 (Boehringer Ingelheim, Allemagne).
5. Inhibiteur de la synthèse du PAF : l'acide oléique (Sigma Chemicals, St Louis, U.S.A.).

### **b/- Marquage des PMN au Cr<sup>51</sup>**

Pour quantifier l'adhérence des PMN à l'endothélium de la veine saphène, les PMN sont marqués radioactivement. Après leur purification, les PMN sont incubés une heure à 37°C en présence de Cr<sup>51</sup> à 20  $\mu$ Ci/510<sup>6</sup> cellules. Après cette incubation, les PMN sont lavés 3 fois dans du HBSS sans calcium par centrifugation à 1500 rpm pendant 8 min. Finalement, les cellules sont resuspendues dans du HBSS contenant du calcium (1mM) à la densité de 510<sup>6</sup> cellules/ml.

### **c/- Mesure de la radioactivité associée à la veine.**

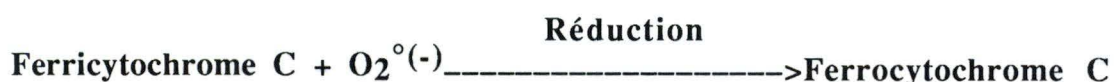
Au terme des incubations en hypoxie ou en normoxie, on perfuse la veine avec 5 ml d'une suspension de PMN ( $5 \times 10^6$  cellules/ml) marqués radioactivement au  $Cr^{51}$ . Les PMN sont alors co-incubés pendant des temps variables allant de 5 à 60 min. On rince ensuite la veine pendant 5 min par le flux d'HBSS (1 ml/min) afin d'éliminer les PMN non adhérents. La veine complète est récupérée puis mise dans un tube en plastique contenant 1 ml d'HBSS. La radioactivité associée à la veine est comptée dans un compteur gamma (1275 Minigamma LKB Wallac). Les résultats sont exprimés en cpm/veine.

Pour les expériences utilisant le WEB2086 (antagoniste du récepteur au PAF), les PMN marqués au  $Cr^{51}$  sont d'abord pré-incubés avec du WEB2086 ( $10^{-5}M$ ) pendant 15 min à  $37^{\circ}C$  avant leur perfusion dans la veine. Pour inhiber la synthèse du PAF par les cellules endothéliales de la veine soumise à l'hypoxie, on incube la veine en conditions hypoxiques en présence de  $10^{-7}M$  d'acide oléique. Pour neutraliser les molécules d'ICAM-1 à la surface des cellules endothéliales hypoxiques, on incube également la veine avec 20  $\mu g/ml$  d'anticorps monoclonal anti-ICAM-1 pendant l'hypoxie. Enfin, pour stimuler l'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales d'une veine maintenue dans des conditions normoxiques, on perfuse la veine avec 5 ml d'une solution de RPMI contenant 5 mg/ml d'interleukine- $1\beta$  recombinante humaine pendant 2 heures.

### **II.3. Mesure de la production des radicaux superoxydes libérés par les PMN adhérents à l'endothélium de la veine**

#### **a/- Principe du dosage.** (Mc Cord et Fridovich, 1969)

Le principe du dosage utilisé pour quantifier la production de radicaux superoxydes par les cellules repose sur la mesure spectrophotométrique de la réduction du ferricytochrome C en ferrocyclochrome C en présence d' $O_2^{\circ(-)}$ .



La spécificité du dosage est obtenue en soustrayant des tests, les valeurs des blancs qui contiennent la superoxyde dismutase (SOD). Cette enzyme dismute les ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et inhibe alors la réduction du ferricytochrome C. De cette manière, nous éliminons la réduction du cytochrome C qui n'est pas due aux radicaux surperoxydes.

#### **b/- Méthode.**






Deux fragments de la même veine sont soumis l'un à l'hypoxie et l'autre à la normoxie pendant 120 min. Au terme de ces incubations, on perfuse la veine par 5 ml d'une suspension de PMN ( $5 \cdot 10^6$  cellule/ml) dans du HBSS+CaCl<sub>2</sub> (1mM) contenant 1mg/ml de ferricytochrome C.

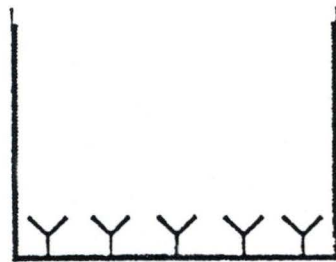
A la fin de cette co-incubation, on récolte le liquide de perfusion contenant les PMN non-adhérents et on le place dans la glace afin de stopper la réaction. On centrifuge à 300 g durant 5 min pour éliminer les cellules (PMN) du milieu.

La lecture de l'absorbance se fait sur le surnageant au spectrophotomètre à 550 nm. Les blancs servant à soustraire la réduction du cytochrome C non dues aux O<sub>2</sub><sup>°(-)</sup> sont réalisés dans les mêmes conditions que le test mais contiennent en plus 300 U/ml de SOD. La concentration en O<sub>2</sub><sup>°(-)</sup> est calculée en divisant la densité optique (D.O) des tests (desquelles on a retiré les D.O mesurées en présence de SOD) par le coefficient d'extinction molaire  $\epsilon = 2.10^{-3}M^{-1} cm^{-1}$ .

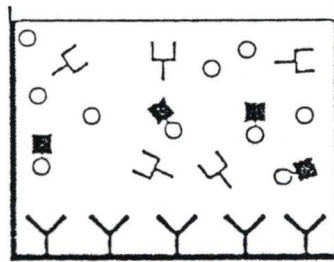
#### **II.4. Dosage du leucotriène B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>)**

Le dosage du LTB<sub>4</sub> est réalisé à partir de milieux conditionnés obtenus après une incubation de la veine en normoxie et en hypoxie ou résultant de la co-incubation des PMN avec la veine saphène.

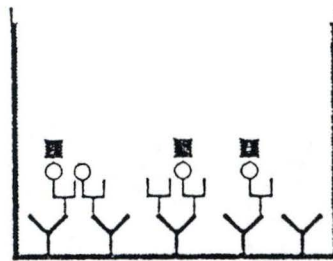
-  Mouse Monoclonal Antibody
-  Blocking Proteins
-  Acetylcholinesterase Linked to LTB<sub>4</sub> (Tracer)
-  Specific Antiserum to LTB<sub>4</sub>
-  Free LTB<sub>4</sub>



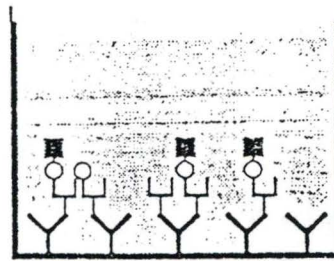
Plates are provided pre-coated with mouse monoclonal antibody and blocked with a proprietary formulation of blocking proteins



1. Add tracer, antiserum, and either standard or unknown sample to well and incubate



2. Wash to remove all unbound reagents



3. Develop the well with Ellman's Reagent

Figure II.4: Schéma illustrant le principe du dosage du leucotriène B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) par un test EIA.

Au terme des incubations en hypoxie ou en normoxie, on perfuse la veine avec 5 ml de PMN ( $5 \times 10^6$  cellules/ml) et on laisse incuber pendant 5 min. On récupère ensuite le liquide de perfusion dans un tube "sterilin", on le centrifuge à 1500 rpm pendant 8 min et on prélève le surnageant qu'on stocke immédiatement à  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### **a/- Matériel.**

1. EIA buffer: tampon de dilution des réactifs lyophilisés à reconstituer dans 500 ml d'eau ultra-pure.

2. Wash buffer: tampon de lavage à reconstituer dans 500 ml d'eau ultra pure auxquels on ajoute 0,25 ml de tween 20.

3. Tween 20.

4. Leukotriene B4 standard lyophilisé: LTB4 à reconstituer (5 mg/ml) puis à diluer dans l'eau bidistillée.

5. Leukotriène B4 acétylcholinestérase tracer: LTB4 marqueur couplé à une molécule d'acétylcholinestérase à reconstituer dans 6 ml de tampon de dilution.

6. Leukotriene B4 antisérum : sérum spécifique anti-LTB4 à reconstituer dans 6 ml de tampon de dilution.

7. Réactif d'Ellman : solution de révélation contenant le substrat de l'acétylcholinestérase à reconstituer dans 20 ml d'eau bidistillée.

8. Plaque multi-puits tapissée par des anticorps monoclonaux de souris anti LTB4.

#### **b/- Principe du dosage.**

Le dosage du LTB4 est réalisé à l'aide d'un kit de dosage (Enzyme Immunoassay kit, cayman Chemical Company, Ann Arbor, U.S.A.). Le dosage est basé sur la compétition entre le LTB4 libre présent dans les échantillons ou les standards et le LTB4 marqueur (molécule de LTB4 liée à une molécule d'acétylcholinestérase) pour un nombre limité de sites de liaison spécifiques pour le LTB4 créés par les anticorps monoclonaux de souris qui tapissent les puits. La concentration

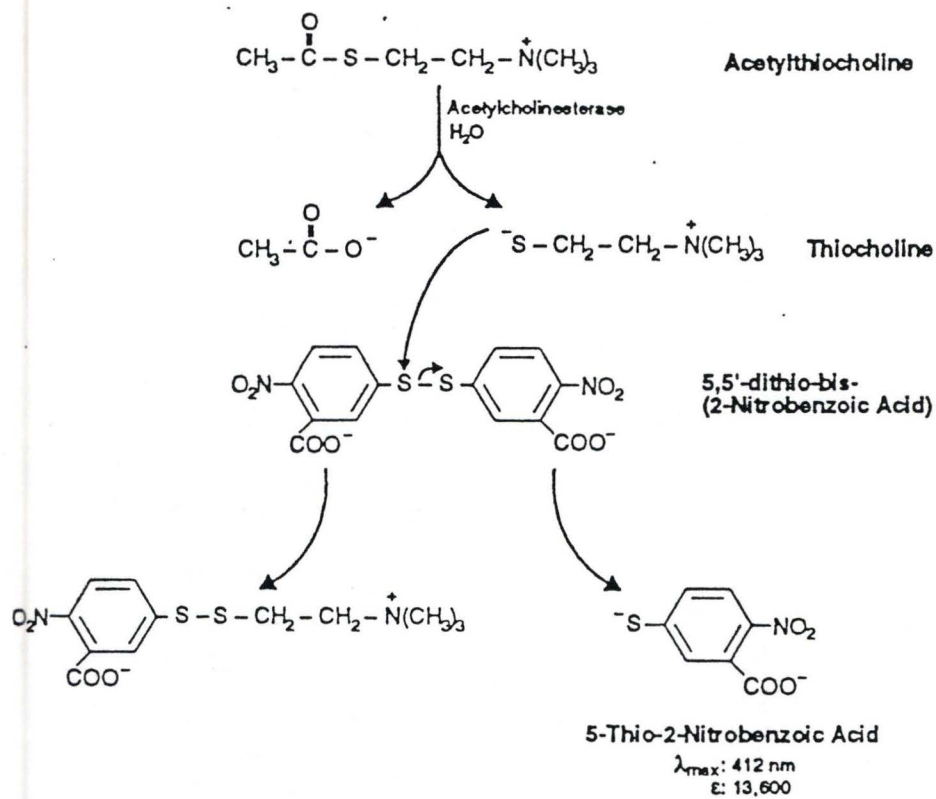


Figure II.5: Réaction catalysée par l'acétylcholinestérase couplée à l'anticorps anti-LTB4 dont le produit est un composé chromogène qui absorbe fortement à 412 nm.

en LTB<sub>4</sub> marqueur est variable. La quantité de LTB<sub>4</sub> marqueur capable de se lier spécifiquement à l'antisérum de lapin est inversement proportionnelle à la concentration en LTB<sub>4</sub> présente dans les puits (FigII.4). La quantification du marqueur est obtenue en mesurant l'activité de l'acétylcholinestérase en présence du réactif d'Ellman contenant de l'acétylcholine et du 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid). L'hydrolyse de l'acétylcholine conduit à la formation de thiocholine qui en réagissant avec le 5,5'-dithio-bis forme un composé qui absorbe fortement à 412 nm (FigII.5). L'intensité de cette coloration déterminée spectrophotométriquement est proportionnelle à la quantité de LTB<sub>4</sub> marqueur lié aux puits qui est inversement proportionnelle à la quantité de LTB<sub>4</sub> libre. L'absorbance est alors convertie en concentration de LTB<sub>4</sub> en se rapportant à une droite détalonnage (Fig II.6).

### c/- Méthode.

Après avoir préparé les standards à la bonne dilution et rincé les puits de la plaque avec 200 µl de tampon de lavage, on ajoute les différents réactifs de la manière suivante :

Puits	Tampon EIA	Marqueur	Antiserum	Standard	Echantillons
Blanc B	-	-	-	-	-
AT	-	-	-	-	-
LNS	100µl	50µl	50µl	-	-
Bo	50µl	50µl	50µl	-	-
St	-	50µl	50µl	50µl	-
Tests	-	50µl	50µl	-	50µl

avec : AT = activité enzymatique totale de l'acétylcholinestérase-LTB<sub>4</sub> marqueur, LNS = liaison non spécifique du LTB<sub>4</sub> marqueur au puits (même en absence d'antisérum spécifique, une faible quantité de LTB<sub>4</sub> marqueur reste liée au puits, la LNS est une mesure de cette faible liaison), Bo = liaison maximale (c'est la quantité maximale de LTB<sub>4</sub> marqueur que l'antisérum peut fixer en absence de LTB<sub>4</sub> libre), St = standards.

La plaque est ensuite couverte par un film plastique et incubée pendant 18 heures à température ambiante. Les puits sont ensuite

**Droite étalonnage LTB4.**

$$f(x) = -2,117734E+1 * \ln(x) + 1,284994E+2$$

$$R^2 = 9,966545E-1$$

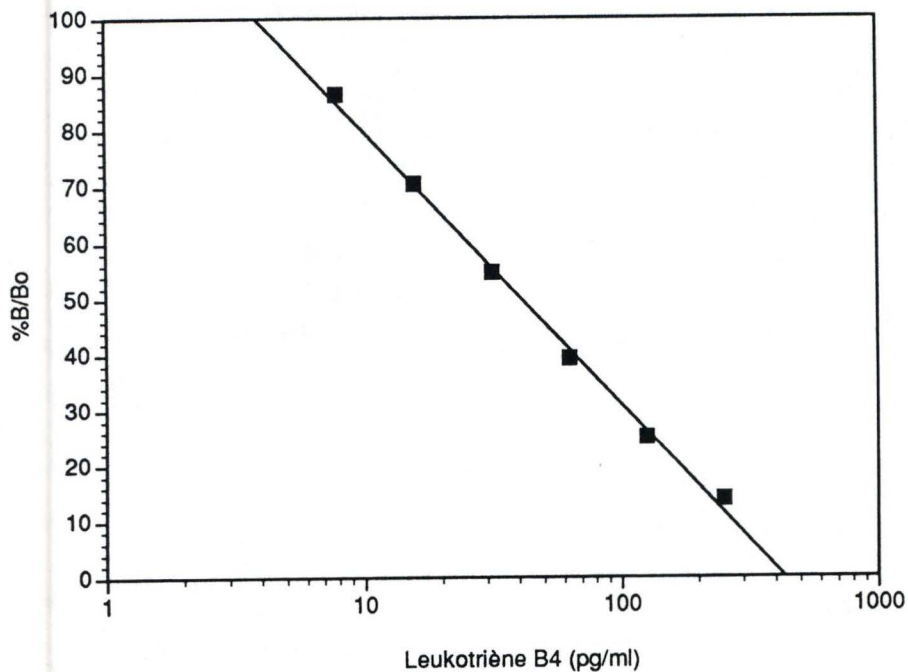


Figure II.6: Droite d'étalonnage établie pour le dosage du leucotriène B4 (LTB4) par un test EIA. Cette droite exprime les rapports (en pourcentage) des absorbances de B et de Bo lues à 412 nm en fonction de la concentration en LTB4 standart (pg/ml).

rincés 5 fois par 200 µl de tampon de lavage. On ajoute alors 200 µl / puits de solution d'Ellman et 5 µl de marqueur dans les puits mesurant l'activité totale (AT). La plaque est incubée sur un agitateur rotatif à température ambiante et à l'obscurité pendant 60 à 90 min jusqu'à l'obtention d'une coloration jaune ( $0,5 < B_o < 0,8$ ). Les puits sont enfin lus au lecteur de plaque à 412 nm et la concentration en LTB<sub>4</sub> est déterminée en rapportant les valeurs de B/B<sub>o</sub>(%) sur la droite d'étalonnage reprenant les pourcentages de B/B<sub>o</sub> obtenus pour les standards en fonction de la concentration en LTB<sub>4</sub> (pg/ml) (FigII.6).

### III. ETUDES MORPHOLOGIQUES

Ces études morphologiques ont été réalisées dans le but d'avoir à disposition un certain nombre de documents (coupes histologiques et micrographies en microscopie électronique) qui nous seront utiles afin de pouvoir compléter, illustrer et visualiser dans la mesure du possible les résultats obtenus au cours des études biochimiques.

Il n'est pas possible de décrire tous les détails techniques relatifs à la préparation des échantillons, toutefois, il est possible de citer les étapes primordiales pour l'obtention d'une bonne coupe histologique ou d'une micrographie en microscopie électronique.

#### III.1. Microscopie optique (ou photonique)

##### a/- Solutions.

1. Bouin, liquide fixateur dont la composition est la suivante : solution aqueuse saturée en acide picrique (75 %), formol de commerce (formaline) (20%), acide acétique glacial (5 %), pH 1,5.

2. Méthanol.

3. Toluène.

4. Paraffine liquide à 60°C.

5. Mollifex (BDH).

6. Eau gélatineuse : utilisée comme colle qui sert à faire adhérer la coupe à la lame de verre. Constituée d'eau distillée (250 ml) et de gélatine (grandeur d'un timbre poste) et d'une ou deux gouttes de formol pour la conservation.

### **b/- Mode opératoire.**

Au terme des différentes incubations, des petits fragments d'environ 0,5 cm de long sont découpés dans la veine puis traités immédiatement. Les principales étapes de préparation des coupes pour l'examen au microscope photonique seront examinées successivement.

#### **1/- Fixation**

Les fragments de veine sont immédiatement plongés dans un récipient contenant au préalable le liquide de Bouin pendant 17 heures.

Le but de la fixation est de maintenir les structures tissulaires aussi proches que possible de l'état vivant. Elle doit être rapide afin d'éviter l'autolyse des tissus sortis de leur milieu physiologique.

#### **2/- Déshydratation**

Les fragments sont placés dans trois bains successifs de méthanol (durée: 1 heure par bain) afin d'enlever l'eau des tissus et de la remplacer par un solvant miscible au milieu d'inclusion utilisé par la suite.

#### **3/- Inclusion et enrobage**

Les fragments de veine sont placés dans des bains successifs de toluène (3 fois 1 heure) afin d'imprégner les tissus avec un solvant miscible avec la paraffine. Ensuite, ils seront placés dans quatre bains successifs de paraffine fondue à 60°C (durée: 1 heure pour les trois premiers bains et minimum 12 heures pour le dernier bain).

La paraffine pénètre tout le tissu et même l'intérieur des cellules, rendant ainsi le tissu plus résistant à la coupe. D'après Gabe (1968), la prolongation du séjour dans la paraffine ne présente aucun inconvénient.

#### 4/- Coupe

Le bloc de paraffine solide emprisonnant le fragment de veine dégrossi puis ramolli dans le mollifex pendant au moins 1 heure est prêt pour la coupe. A l'aide d'un microtome (American Optical Corporation) équipé d'un couteau, on réalise des coupes de 5 à 6  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Ces coupes sont ensuite étalées sur des lames en verre revêtues d'eau gélatineuse pour que la coupe adhère à la lame et afin de permettre leur coloration ultérieure.

#### 5/- Coloration

Les coupes sont colorées afin de mettre en évidence les différents composants tissulaires et de permettre l'observation au microscope photonique.

### **III.2. Microscopie électronique à transmission**

#### **a/- Solutions.**

1. Glutaraldéhyde 1,5 % dans du tampon cacodylate 0,1 M (Ladd) à pH 7,4, 4°C.
2. Tampon cacodylate 0,1 M (BDH chemicals Ltd, Grande-Bretagne) pH 7,4; 4°C contenant 7,5 % de saccharose.
3. Tétroxyde d'osmium ( $\text{OsO}_4$ ) (Sigma Chemical Co, St Louis, U.S.A.) à 1% dans le tampon cacodylate 0,1 M pH 7,4.
4. Tampon maléate 0,05 M pH 5,2; 4°C.
5. Acétate d'uranyle 0,5 % dans du tampon maléate 0,05 M pH 5,2; 4°C.
6. Ethanol (Merck, Darmstadt, Allemagne).
7. Oxyde de propylène.
8. Epon (812) (TAAB 812 Résine).

9. Bleu de toluidine (MERK).

10. Reynolds (solution de citrate de plomb).

### **b/- Mode opératoire.**

La préparation des échantillons et l'examen au microscope électronique à transmission comportent plusieurs étapes qui seront examinées successivement. Le but de ces étapes a été décrit au point III.1b.

#### **1/- Fixation**

Pour les fragments de veines saphènes, la fixation débute par la perfusion de glutaraldéhyde 1,5 % pendant 20 min à 4°C. Un fragment de la veine est alors découpé en très petits cubes de 1 mm de côté à l'aide d'une lame de scalpel. Le tissu est constamment arrosé de fixateur car il ne peut sécher. Les blocs de veines sont ensuite fixés à proprement dit dans la glutaraldéhyde 1,5 % pendant 2 heures à 4°C. (Remarque: la basse température utilisée pour la fixation sert à ralentir les processus enzymatiques et autolytiques de la cellule).

Après trois rinçages de 10 min dans le tampon cacodylate-saccharose, les échantillons sont plongés dans un second fixateur à pénétration plus lente, le tétr oxyde d'osmium ( $\text{OsO}_4$ ) à 1% pendant 2 heures à 4°C. Cette post-fixation favorise particulièrement bien la conservation des membranes. Après rinçage dans du tampon maléate 0,05 M deux fois pendant 10 min, les éléments cellulaires seront contrastés en plongeant les blocs pendant 2 heures dans l'acétate d'uranyle 0,5 % à 4°C et à l'obscurité (car c'est un produit qui précipite à la lumière). On rince à nouveau dans le tampon maléate 0,05 M pendant 10 min.

#### **3/- Déshydratation**

Les échantillons sont placés trois fois 5 min dans des concentrations croissantes en éthanol (50°, 70°), ensuite deux fois 10 min dans l'éthanol 90° à 4°C. La déshydratation se termine par deux passages de 10 min dans l'éthanol 100° à la température du laboratoire (Remarque: la déshydratation doit impérativement être progressive afin d'éviter une contraction brutale des éléments cellulaires).

#### 4/- Inclusion et enrobage

Les échantillons sont placés deux fois 10 min dans l'oxyde de propylène, solvant du milieu d'inclusion, deux fois 15 min dans un mélange à part égale d'oxyde de propylène et d'Epon et ensuite pendant 1 heure 30 min, puis 1 heure sur rotor (10 tours/min), dans de l'Epon à 37°C. L'Epon (812) est une résine Epoxy, liquide à température ambiante et qui polymérise à 60°C, il constitue un milieu d'inclusion en microscopie électronique à transmission qui permet la réalisation de coupes fines.

Les échantillons sont placés dans le fond d'une capsule en plastique, recouverts d'Epon et placés une nuit, 24 heures et 72 heures dans une étuve respectivement à 37°C, 45°C et 60°C afin de polymériser la résine. Cette dernière étape constitue l'enrobage. L'échantillon est prêt pour la coupe.

#### 5/- Coupes semi-fines

Un pyramitome (Pyramitome 11800, LkB) permet de réaliser des coupes de 1 à 2  $\mu\text{m}$ , colorées au bleu de toluidine, ces coupes semi-fines permettent de choisir au microscope photonique, un endroit propice à la coupe ultra-fine.

#### 6/- Coupes ultra-fines

A l'aide d'un ultrotome, équipé d'un diamant, des coupes de 400 Å sont débitées, elles sont recueillies sur des grilles, à la surface d'un petit bac d'eau situé à l'arrière du couteau.

#### 7/- Coloration des grilles

Les grilles sont contrastées par le dépôt de métaux lourds principalement sur les structures membranaires.

Dans ce but, les grilles sont colorées 30 min avec une solution alcoolique d'acétate d'uranyle et 7 min avec du Reynolds. Les grilles sont prêtes pour l'examen au microscope électronique à transmission (Philips EM301).

### III.3. Microscopie électronique à balayage

#### a/- Matériel.

1. Glutaraldéhyde 1,5 % dans du tampon cacodylate 0,1 M (Ladd) à pH 7,4; 4°C.

2. Tampon cacodylate 0,1 M (BDH Chemicals Co, St Louis, U.S.A.) pH 7,4; 4°C.

3 Acétone.

#### b/- Mode opératoire.

Pour les fragments de veine saphène, la fixation débute par une perfusion avec la glutaraldéhyde 1,5 % pendant 20 min à 4°C. Au terme de la perfusion et après une légère rigidification du tissu, des petits blocs d'environ 0,5 cm de long sont découpés au scalpel de façon à obtenir trois incidences de coupes différentes (coupe: transversale, longitudinale de face et longitudinale de profil). Ensuite, les échantillons sont plongés pendant une nuit dans la glutaraldéhyde 1,5 % à 4°C.

Les veines sont des organes creux et donc peuvent se déformer fortement dans le fixateur, ce qui empêche leur orientation ultérieure. Le plus simple est d'étaler le fragment sur une plaque de cire et de plonger la plaque entière dans le fixateur. Après quelques heures, la pièce peut être séparée du support sans subir de déformation.

Au terme de la fixation, les échantillons sont rincés trois fois 15 min dans du tampon cacodylate 0,1 M et déshydratés rapidement à 4°C par des passages successifs dans des solutions d'acétone à 30, 50 70 et 90 % deux fois 10 min et finalement dans l'acétone 100 % deux fois 10 min à température ambiante.

On réalise ensuite la dessiccation des échantillons par le passage au "point critique" (Balser/CPDO30). Au cours de cette étape, l'acétone est d'abord remplacé sous une forte pression par du CO<sub>2</sub> liquide qui passera en phase gazeuse à son point critique. Les échantillons sont

ensuite collés sur des supports en aluminium via la colle à l'argent puis couverts d'une fine couche d'or (15 à 20 nm) qui rend les échantillons réfractaires d'électrons, puis observés et photographiés à l'aide du microscope électronique à balayage (Philips XL-20).

## CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION

### I. ASPECT MORPHOLOGIQUES DE LA PAROI DES VEINES SAPHENES HUMAINES

L'apparition et l'évolution de la maladie veineuse sont influencées par de nombreux facteurs génétiques, hormonaux et par des anomalies mécaniques et en particulier la stase, cause ou conséquence d'une atteinte valvulaire. Mais récemment, l'hypothèse d'une désorganisation pariétale des veines s'est imposée dans laquelle l'hypoxie a pu être considérée comme un point clef de l'installation de cette pathologie (Michiels et al, 1993b). La cellule endothéliale activée par l'hypoxie subit alors des modifications métaboliques qui induisent la synthèse de prostaglandines, de platelet-activating factor (PAF), ainsi que différentes cytokines et de facteurs de croissance (Browse et Burnand, 1982). Certains de ces facteurs, tel le PAF, vont provoquer l'activation des plaquettes et des leucocytes qui à leur tour, vont libérer des médiateurs de l'inflammation, et pour les leucocytes, pénétrer au sein de la paroi (Granger et al, 1993). L'ensemble de ces éléments altèrent aussi les cellules musculaires lisses et désorganise le tissu conjonctif pariétal. Ceci conduirait à de nombreuses modifications de la paroi veineuse similaires à celles observées dans les veines variqueuses et en favorisant la stase permettrait l'entretien et l'aggravation de la pathologie veineuse.

Afin de mieux comprendre et surtout de visualiser les principales modifications qui surviennent dans la paroi des veines variqueuses, nous avons tout d'abord cherché à comparer les aspects morphologiques et histologiques d'une veine saphène saine à ceux d'une veine variqueuse.

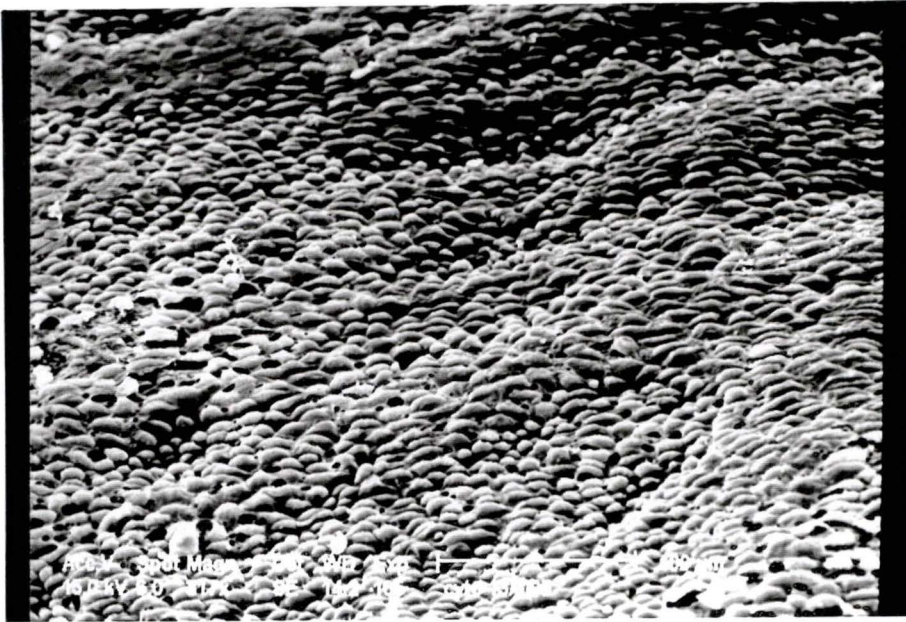
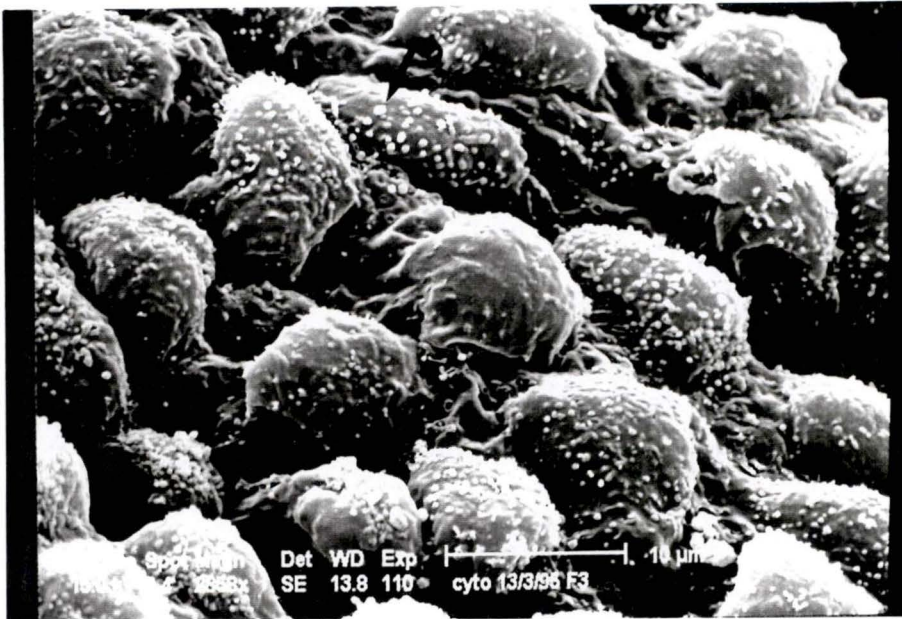
**A****B**

Figure III.1: Micrographies en microscopie électronique à balayage de la face luminale d'une veine saphène humaine saine. On peut observer la face apicale de la monocouche des cellules endothéliales (A: G= 317 et B: 2858 X). En B, la flèche indique une microvillosité à la surface d'une cellule endothéliale.

Dans cette étude, des prélèvements de veines saphènes obtenus chez des patients ayant subi soit une greffe de veines saphènes (pontage coronarien), soit une excision chirurgicale de veines saphènes variqueuses (stripping) ont été examinés. Les prélèvements qui sont destinés à la greffe pour les pontages coronariens proviennent en général de la saphène interne jambière qui est assez rarement variqueuse, ce sont ces prélèvements que nous avons utilisés pour l'étude de la veine saine.

## **I.1. Morphologie de la veine saphène saine**

### **a)- Observations en microscopie électronique à balayage**

Les prélèvements de veines saines fraîchement récoltés sont rincés avec du HBSS puis préparés pour l'analyse en microscopie électronique à balayage. Ce type de microscopie présente plusieurs avantages tels que: l'obtention d'une information tridimensionnelle et une grande profondeur de champ ce qui permet l'observation des échantillons sous des angles et directions divers.

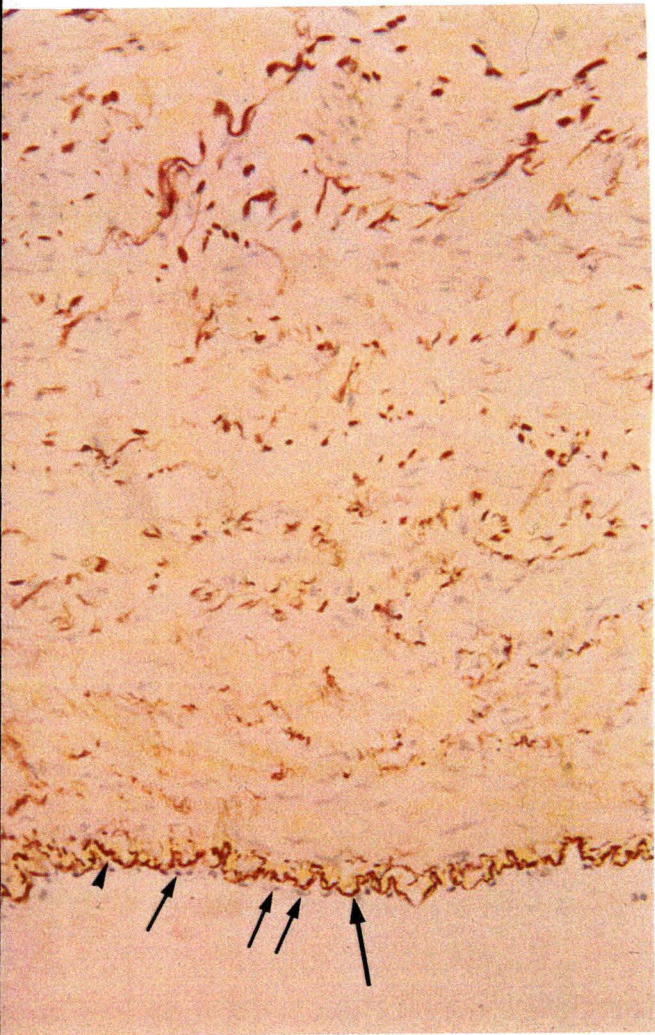
Les micrographies de la face luminale de la veine sont présentées à la figure III.1. Les images observées à partir des prélèvements sains montrent une surface lisse de l'endothélium, avec des cellules endothéliales en monocouche (le noyau n'est pas visible) (Fig III.1A). On observe également à la surface des cellules endothéliales de nombreuses microvillosités (Fig III.1B).

### **b)- Observations en microscopie optique**

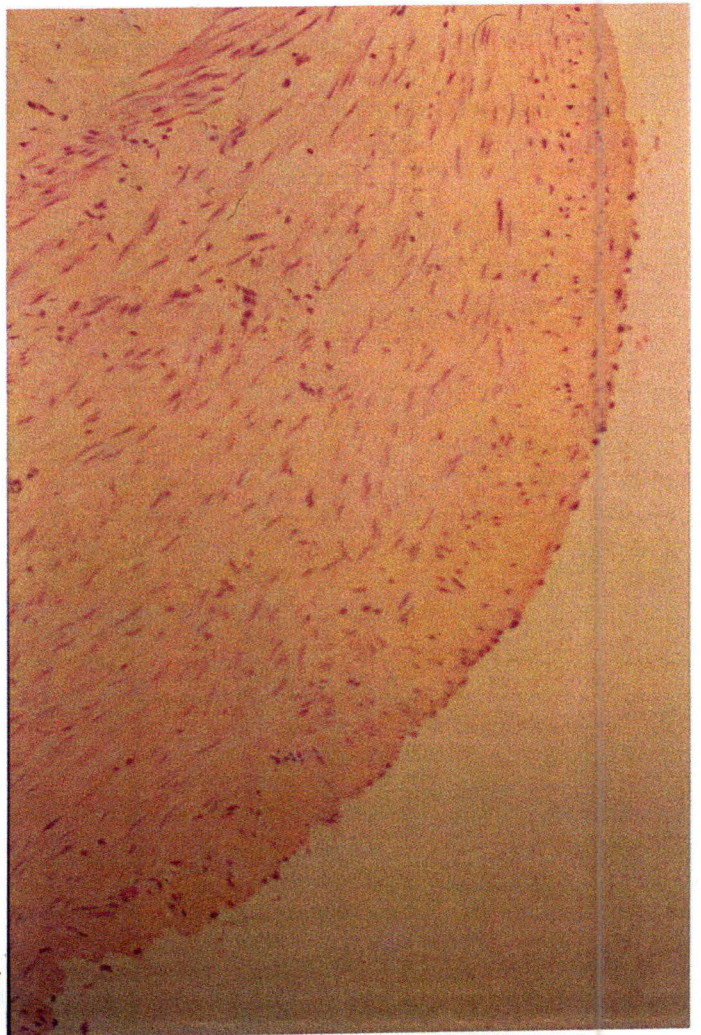
Afin de révéler plus finement les structures tissulaires de la paroi veineuse, nous avons réalisé des coupes histologiques transversales de la veine saphène. Nous avons utilisé quatre types de colorations afin de mettre en évidence les différentes structures de la paroi veineuse (Tableau III.1).

Type de coloration	Éléments mis en évidence
- Hémalum. Erythrosine. Safran (H.E.S.)	- L'hémalum colore toutes les substances basophiles et principalement les noyaux en bleu-violacé. L'érythrosine colore en rose tous les éléments tissulaires, à l'exception des substances basophiles précolorées à l'hémalum. Le safran colore spécifiquement les fibres conjonctives en jaune.
- Le trichrome vert de Masson.	- L'hémalum offre les mêmes avantages que dans l'H.E.S. La solution rouge colore les composants cytoplasmiques non basophiles en rouge. Le vert lumière colore les fibres du tissu conjonctif en vert.
- Le Wilder.	- Colore principalement les fibres réticuliniques en noir intense et le reste du tissu conjonctif en vert.
- L'orcéine.	- Colore principalement les fibres élastiques en brun acajou.

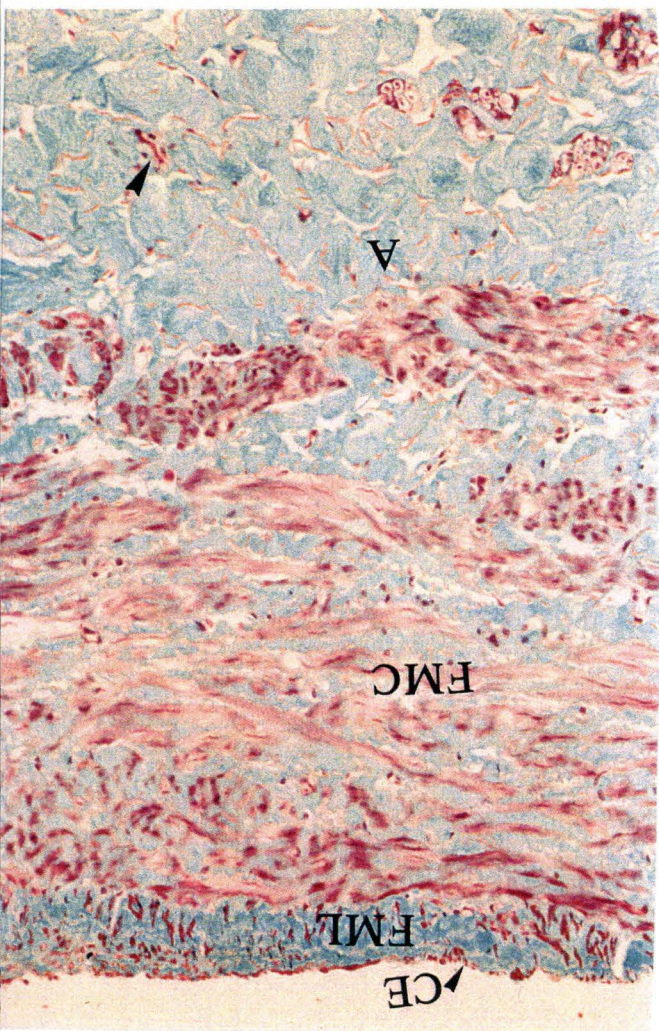
Tableau III.1: Colorations histologiques utilisées dans ce travail (D'après Gabe, 1968).



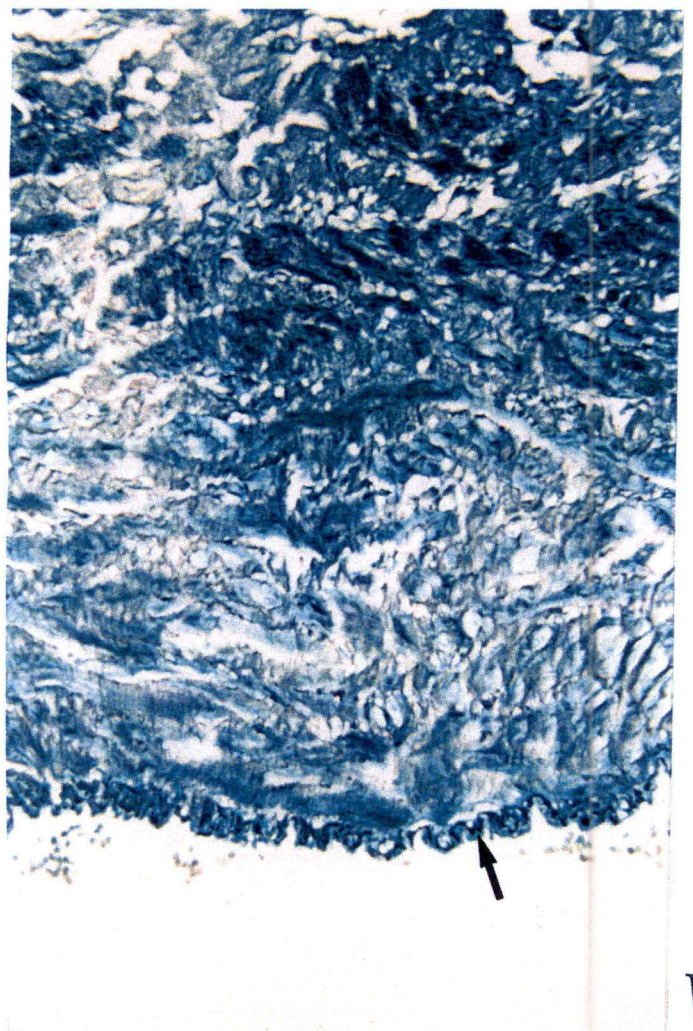
D



B



C



A

Figure III.2: Micrographies de coupes histologiques transversales d'une veine saphène saine. A: Mise en évidence de la membrane basale de l'intima (flèche) par la coloration au Wilder des fibres réticuliniques en noir (G= 180 X). B: Intima et Média, coloration H.E.S. (G= 180 X). C: Cellules endothéliales de l'intima (CE), les faisceaux musculaires longitudinaux (FML) et les faisceaux musculaires circulaires (FMC) de la média, l'adventice (A) dans laquelle on peut observer des vasa vasorum (tête de flèche). Coloration au trichrome vert de Masson (G= 180 X). D: Mise en évidence de la limitante élastique interne (LEI, flèche) par la coloration à l'orcéine, des noyaux des cellules endothéliales (petite flèche) et d'un fin liseré de la couche sous-endothéliale (tête de flèche) (G= 180 X).

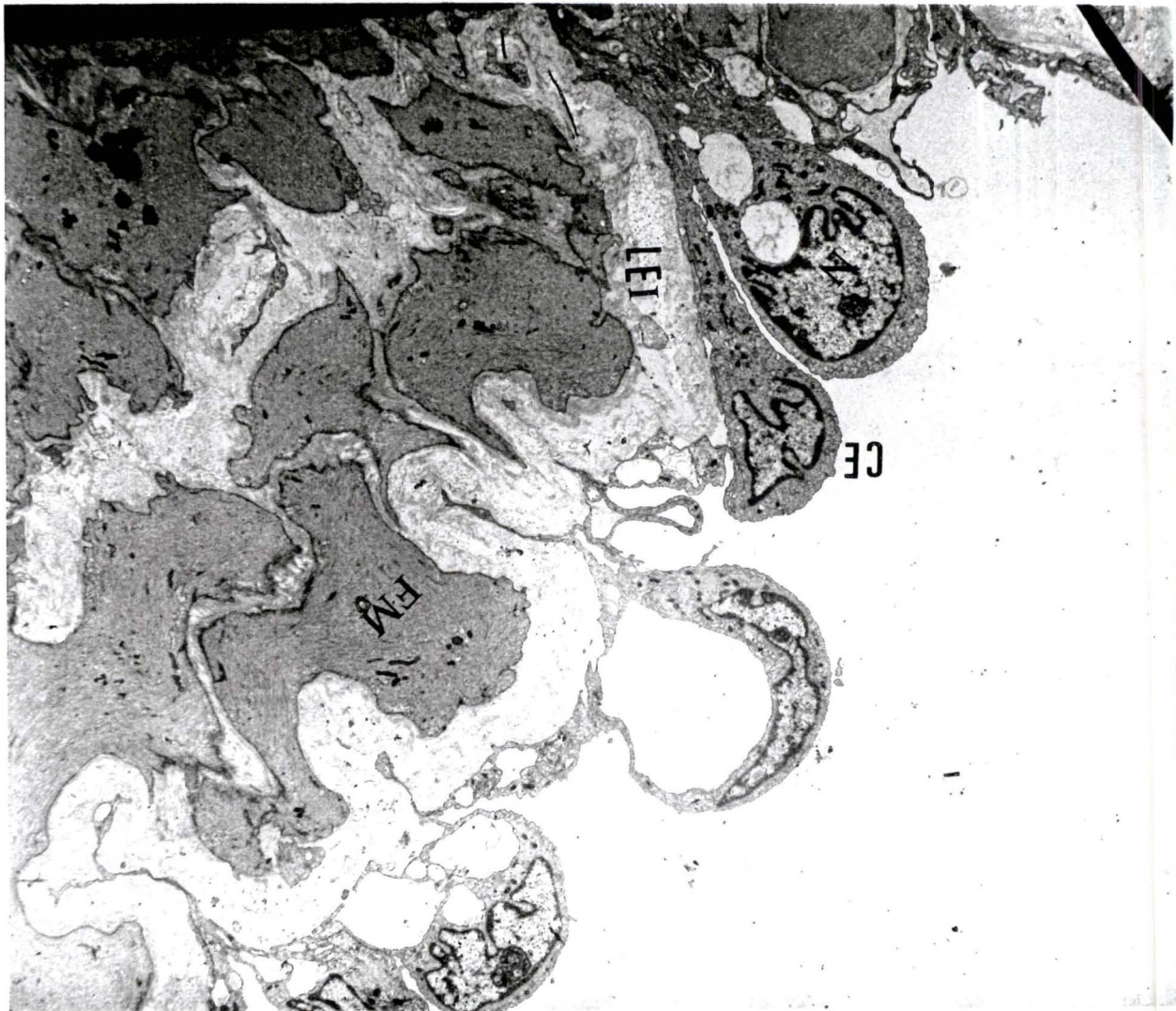


Figure III.3: Micrographies en microscopie électronique à transmission d'une veine saphène saine. CE: cellule endothéliale, N: noyau de la cellule endothéliale, VP: vésicule de pinocytose, JI: jonction interendothéliale, M: mitochondrie, LEI: limitante élastique interne présente sous les cellules endothéliales. Une portion de la média comprenant des faisceaux musculaires (FM) est également observable (G= 4320 et 15600 X).

On peut visualiser à la figure III.2 les trois tuniques classiques d'une veine: l'intima, constituée d'une membrane basale (mise en évidence en noir par le Wilder, figure III.2A) sur laquelle repose une monocouche de cellules endothéliales (dont les noyaux sont colorés en bleu-violacé par l'H.E.S., Figure III.2B). Ces noyaux sont également bien visibles au dessus de la limitante élastique interne (Fig III.2D). Sous l'endothélium, on devine la couche sous-endothéliale (Fig III.2D). la média, constituée de faisceaux de fibres musculaires lisses à orientation principalement circulaire (FMC) et dans une moindre mesure à orientation longitudinale (FML) du côté de l'intima, la composante conjonctive de la média est caractérisée par une dominance de fibres de collagène (Fig III.2C). La limite entre l'intima et la média est mise en évidence par la coloration à l'orcéine qui colore en brun les fibres élastiques de la limitante élastique interne (Fig III.2D). L'adventice, est la couche la plus externe, elle comprend d'épaisses couches de collagène ainsi que quelques faisceaux de fibres musculaires à disposition longitudinale et des vaisseaux sanguins nourriciers (Fig III.2C).

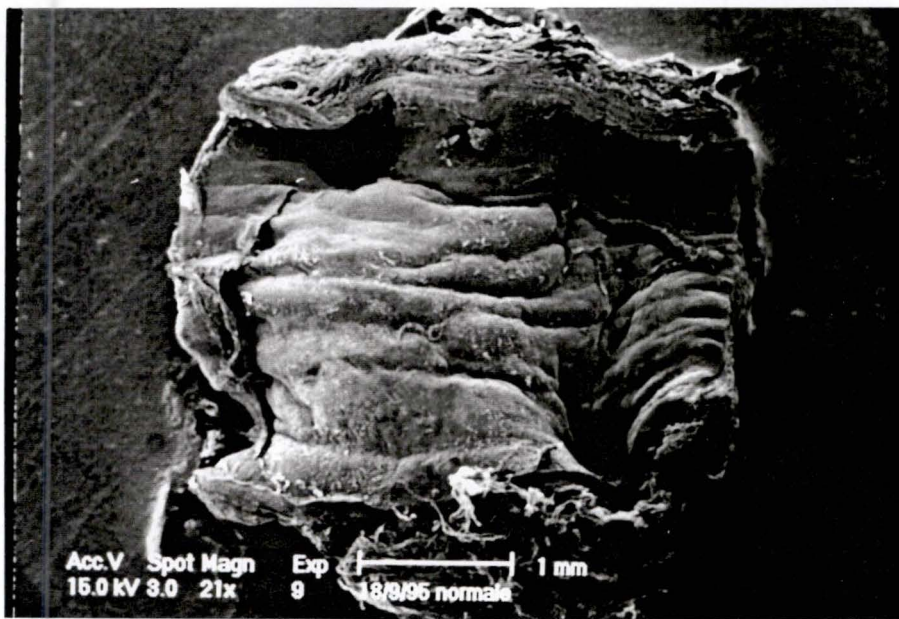
#### **b)- Observations en microscopie électronique à transmission**

Grâce à ce type de microscopie, nous avons pu analyser l'ultrastructure des cellules endothéliales, principales constituants de l'intima (Fig III.3). On observe une couche jointive de cellules endothéliales de forme et de dimension assez variables tapissant la lumière du vaisseau. Ces cellules endothéliales possèdent un noyau central et protubérant, et de nombreuses vésicules de pinocytose. On observe aussi les jonctions interendothéliales: "tight junctions" et gap junctions". La limitante élastique interne sépare cet endothélium de la média où des fibres musculaires sont observables dans une matrice extracellulaire abondante.

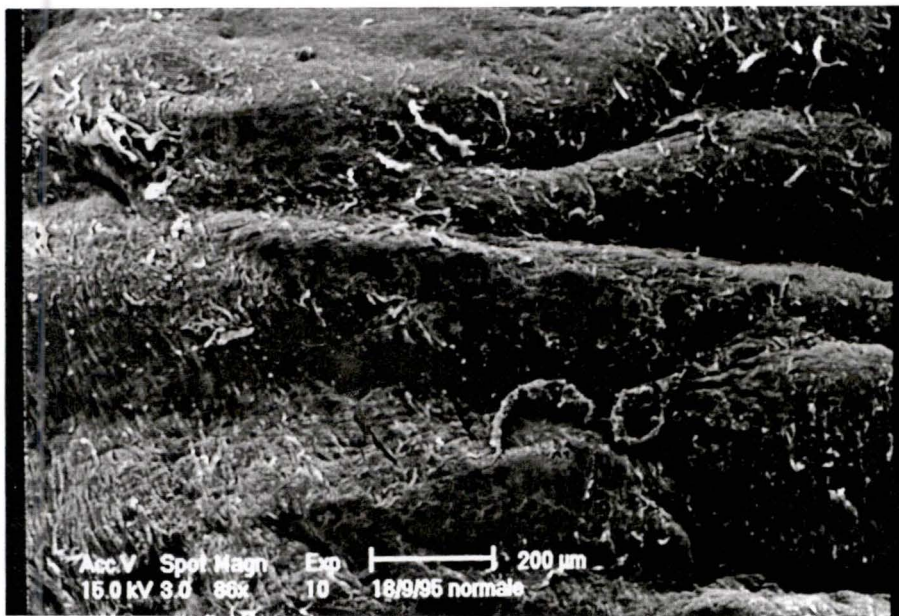
### **I.2. Morphologie des veines variqueuses**

Pour rendre compte des modifications structurales de la paroi des veines variqueuses, nous avons analysé en microscopie électronique à balayage et en microscopie optique deux prélèvements d'une veine saphène variqueuse. L'un provenant d'une région peu atteinte, l'autre provenant d'une région très atteinte (varice proprement dite).

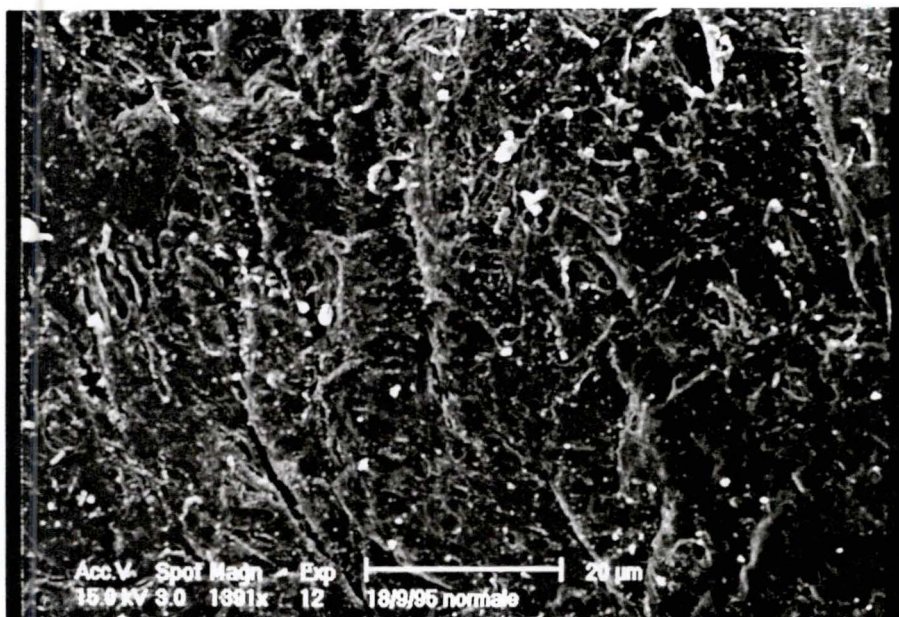
A



B



C



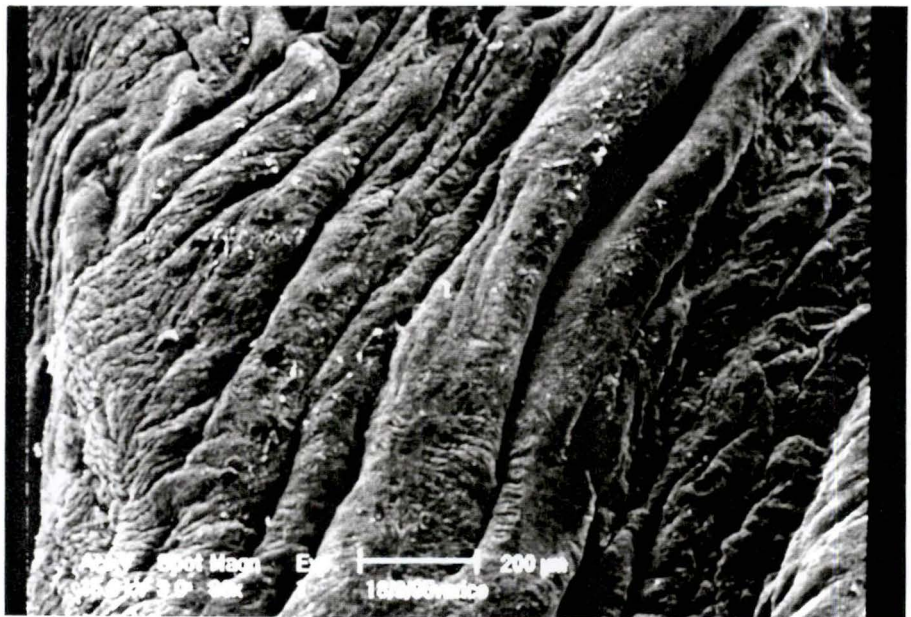
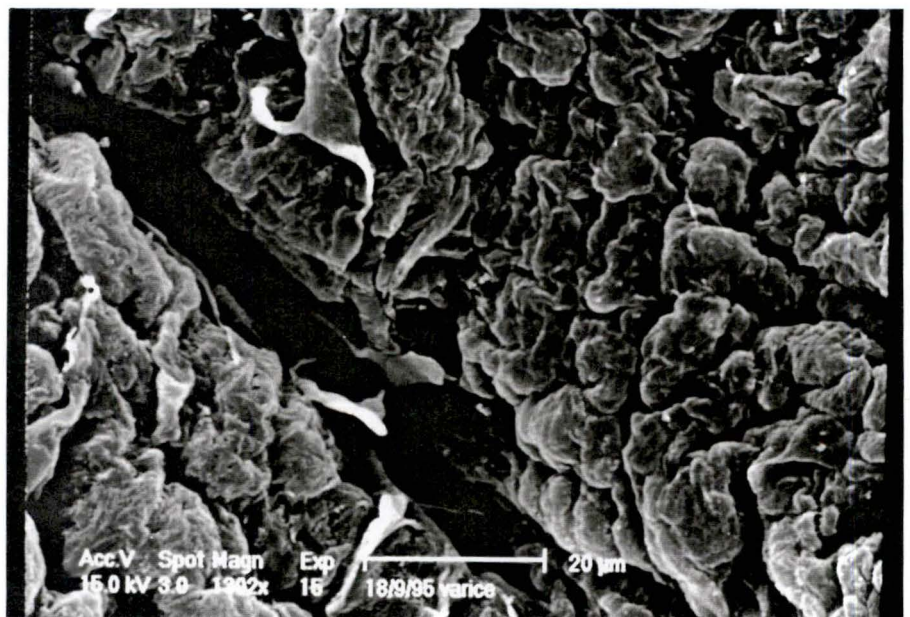
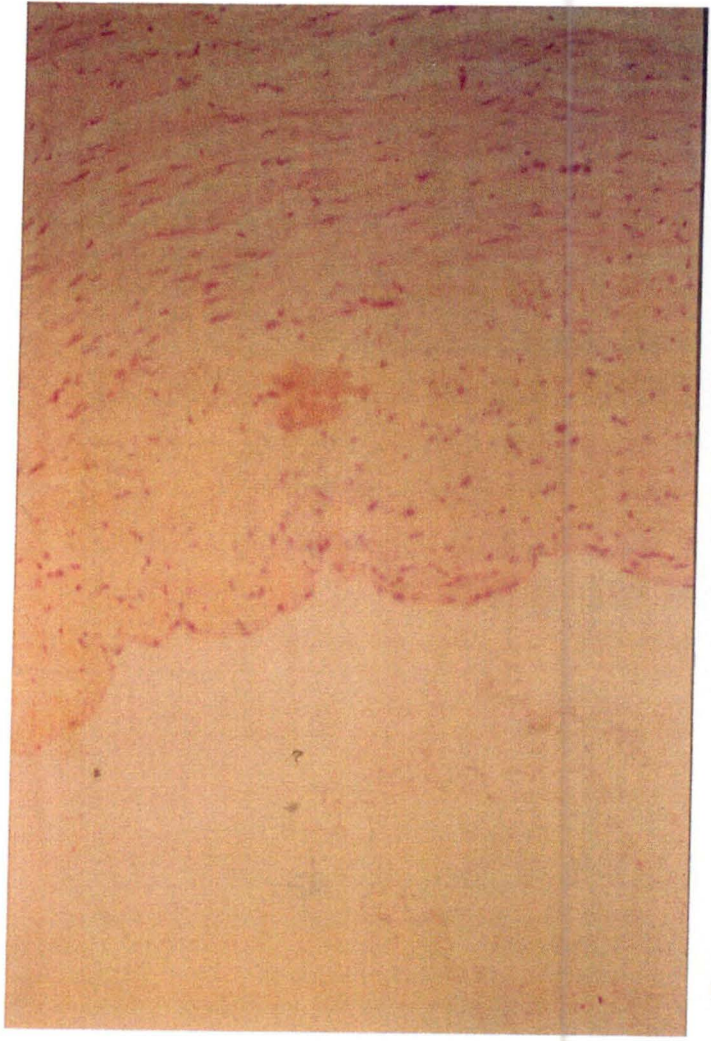
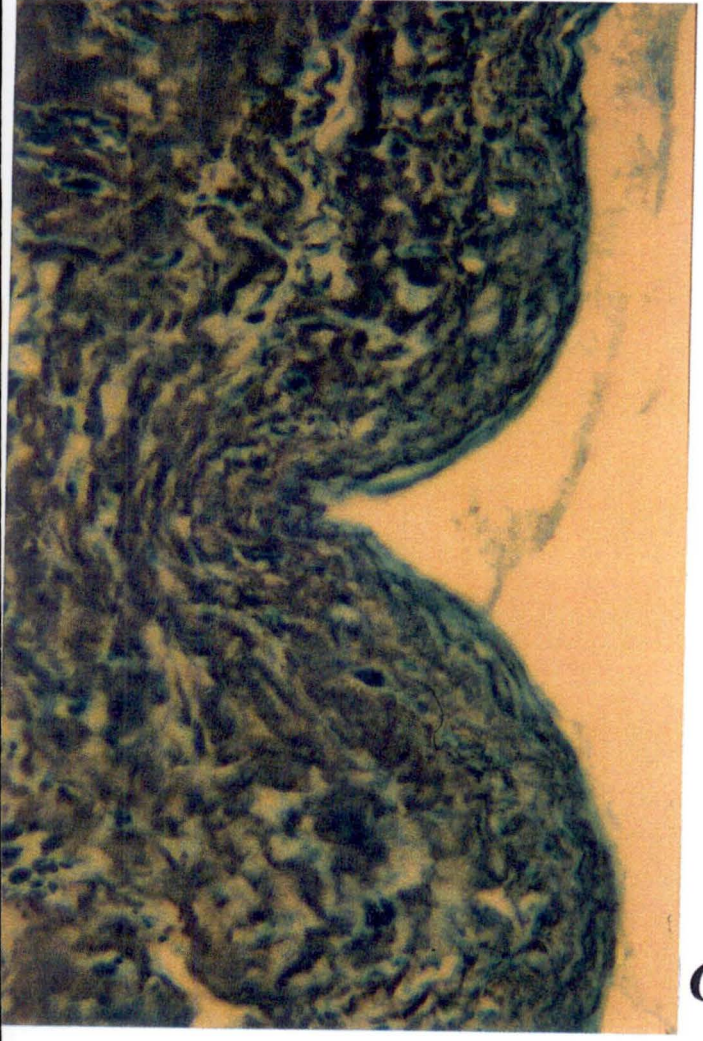
**A'****B'****C'**

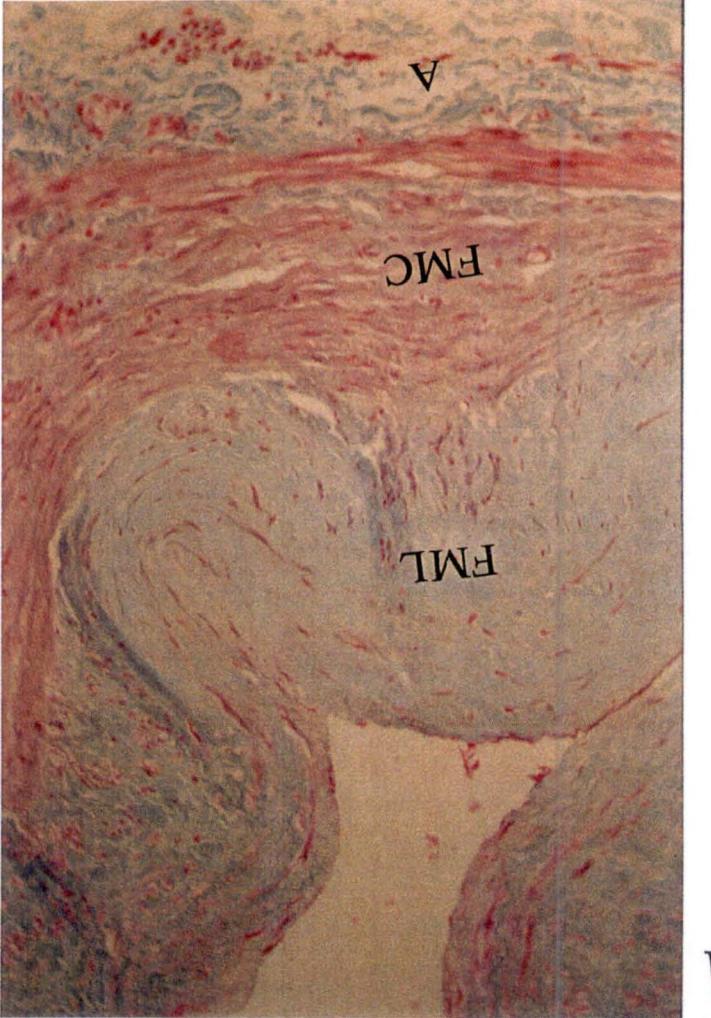
Figure III.4: Micrographies en microscopie électronique à balayage de la face luminale d'un prélèvement peu atteint d'une veine saphène variqueuse (A, B, C) (G= 21, 86 et 1391 X) et d'un prélèvement provenant de la varice proprement dite (A', B', C') (G= 20, 86 et 1302 X).



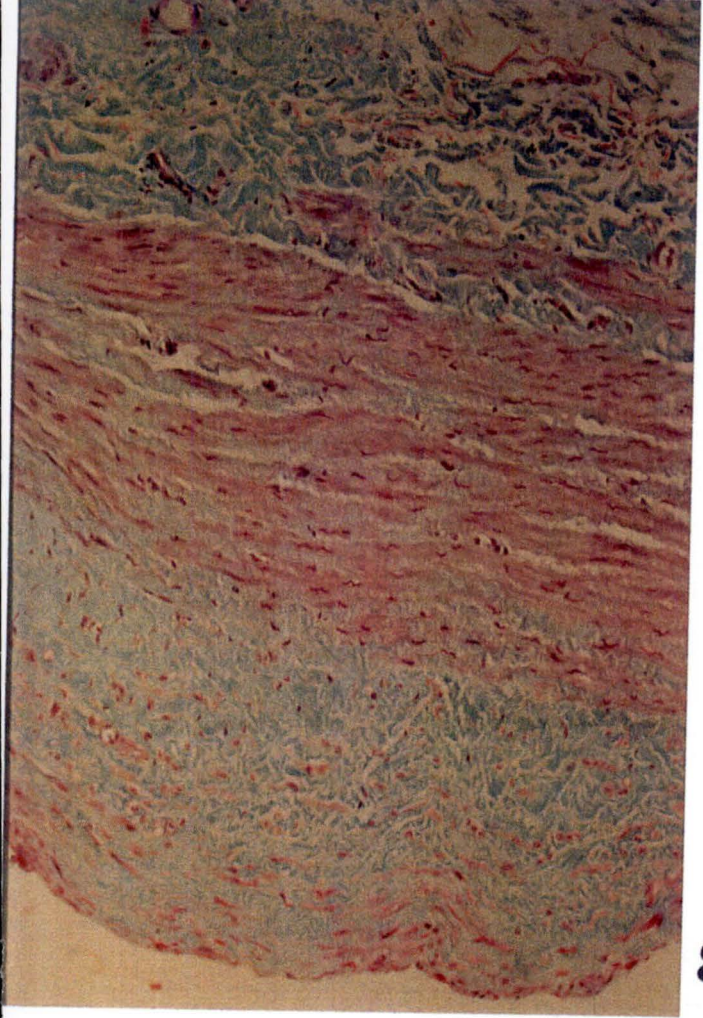
C



D



A



B

***E***

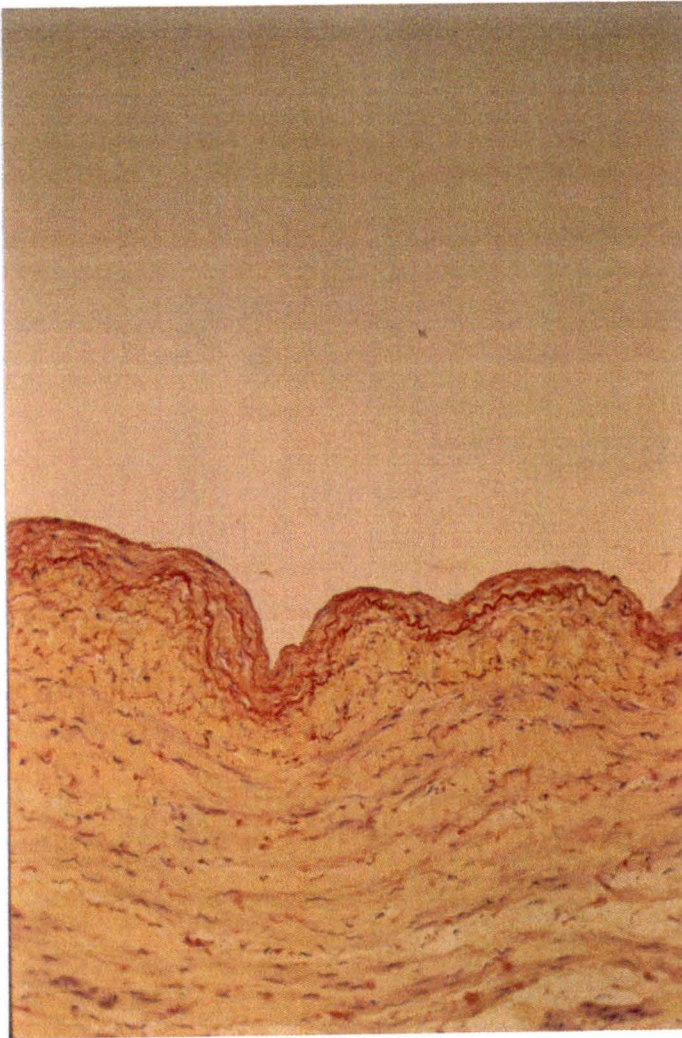


Figure III.5. Micrographies de coupes histologiques transversales d'une veine saphène variqueuse. A et B: Coloration au trichrome vert de Masson. A: Mise en évidence des faisceaux musculaires logitudinaux (FML), des faisceaux musculaires circulaires (FMC) et de l'adventice (G= 180 X). C: Coloration à l'H.E.S. (G= 180 x). D: Mise en évidence de la membrane basale de l'intima par la coloration au Wilder (G= 180 X). E: Mise en évidence de l'accumulation des fibres élastiques sous l'intima, coloration à l'orcéine (G=180 X).

### **c)- Observations en microscopie électronique à balayage**

L'analyse de ces échantillons en microscopie électronique à balayage en comparaison avec les micrographies obtenues pour les prélèvements sains (Fig III.1) montre certaines modifications de l'endothélium (Fig III.4). Alors qu'une veine saphène saine possède un endothélium avec une surface lisse, on observe l'apparition de vallées (ou replis macroscopiques) au niveau de l'endothélium de la veine variqueuse. Ces replis sont plus prononcés au niveau de la varice proprement dite. A ce stade, on remarque aussi que les cellules endothéliales semblent "boursoufflées".

Ces modifications graduelles observées sur les prélèvements de veines pathologiques se corréleront aux modifications que nous allons aborder dans le paragraphe suivant.

### **b)- Observations en microscopie optique**

Nous avons réalisé plusieurs colorations différentes de coupes faites dans la varice proprement dite afin de visualiser les atteintes des différents composants de la paroi veineuse. A la figure III.5A, on observe de larges replis de la paroi veineuse qui peuvent venir obstruer presque la totalité de la lumière vasculaire. En comparant ces observations à la paroi de la veine saine (Fig III.2C), on notera un épaississement et une désorganisation de la paroi des veines variqueuses. En effet, on constate que la couche des faisceaux musculaires longitudinaux de la média est fortement épaissie, on observe également une accumulation sévère de fibres de collagène au sein de cette même couche. La figure III.5E montre une atteinte des fibres élastiques mises en évidence par une coloration à l'orcéine. On y observe en effet une hyperplasie et une accumulation des fibres élastiques sous l'intima. La coloration au Wilder (Fig III.5D) montre que la membrane basale sous-endothéliale est bien présente et ne montre pas d'épaississement de l'endothélium. En ce qui concerne l'adventice, on n'observe pas de différence entre la veine variqueuse et la veine saine.

### I.3. Discussion

L'épaississement et la désorganisation de la paroi veineuse sont deux caractéristiques typiques des veines variqueuse (Charles et Gresham, 1993). La comparaison morphologique d'une veine saine et d'une veine variqueuse réalisée dans ce travail confirme ces observations. Si l'on observe dans une paroi veineuse saine trois tuniques bien individualisées avec un endothélium conservé, une média comprenant une à deux couches de faisceaux de fibres musculaires et une adventice de type conjonctive, certaines altérations de cette paroi sont remarquables dans la veine variqueuse. L'altération majeure consiste en un épaississement non homogène de la couche supérieure de la média (couche musculaire longitudinale) générant ainsi de nombreux replis visibles en microscopie électronique à balayage et sur les coupes histologiques. Cet épaississement semble résulter à la fois d'une prolifération cellulaire mais surtout d'une accumulation de la matrice extracellulaire principalement composée de fibres de collagène comme on l'observe à la figure III.5A.

Dans les veines malades, les cellules musculaires lisses passent d'un état contractile, caractérisé par une abondance de filaments contractiles et une faible proportion de réticulum endoplasmique, à un état synthétique dans lequel elles possèdent un réticulum endoplasmique bien développé, secrètent plus de matrice extracellulaire et notamment plus de collagène, sont prolifératives et perdent l'expression de la myosine et de l' $\alpha$ -actine (Chamley et al, 1979; Yamamoto et al, 1992). Cette modulation phénotypique pourrait également être le résultat de l'action de médiateurs relargués par les cellules endothéliales activées par l'hypoxie comme l'est la prolifération des cellules musculaires lisses (Michiels et al, 1994). Cette prolifération ainsi que leur capacité accrue de synthèse des composants de la matrice extracellulaire (Okada et al, 1990) peuvent donc facilement rendre compte de l'épaississement de la paroi veineuse pathologique.

Au niveau de l'intima, outre les replis résultant de l'épaississement non homogène de la média, l'endothélium semble bien conservé et la membrane basale intacte. Cependant, on observe une accumulation de fibres élastiques semblant indiquer la présence de plusieurs limitantes élastiques internes non continues. Les conséquences de cette altération ne sont pas encore bien définies.

## **II. ETUDE DES EFFETS DE L'HYPOXIE SUR L'ADHERENCE DES PMN A L'ENDOTHELIUM DE VEINES SAPHENES HUMAINES**

L'adhérence des neutrophiles aux cellules endothéliales est d'une importance physiopathologique fondamentale. L'adhérence est en effet l'évènement initial contrôlant l'infiltration des PMN dans les conditions inflammatoires. L'adhérence des PMN aux cellules endothéliales est très faible dans les conditions normales, mais elle devient plus importante lorsque les PMN ou les cellules endothéliales sont activés. De nombreuses études expérimentales ont montré la capacité de l'hypoxie à augmenter l'adhérence des neutrophiles aux cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine à la fois *in vitro* (Arnould et al, 1993) et *ex vivo* (Arnould et al, sous presse).

Dans le cadre de l'étude du mécanisme du développement des veines variqueuses, il restait à montrer que l'hypoxie qui mime la stase veineuse observée chez les patients, pouvait de la même façon induire l'adhérence des PMN à l'endothélium d'une veine saphène, territoire de prédilection de cette maladie. L'étude du mécanisme responsable de ce processus ainsi que l'étude de l'activation des PMN adhérents seront également décrits.

Il faut noter que pour des raisons d'approvisionnement en veines saphènes humaines, les différentes études ont été réalisées une seule fois.

### **III.1. Adhérence des PMN à l'endothélium de veines saphènes incubées en hypoxie.**

Nous avons d'abord quantifié l'adhérence de PMN à l'endothélium de veines saphènes incubées en normoxie ou en hypoxie. Cette adhérence est mesurée de façon indirecte par comptage de la radioactivité associée à la veine après perfusion de PMN marqués au chrome-51.

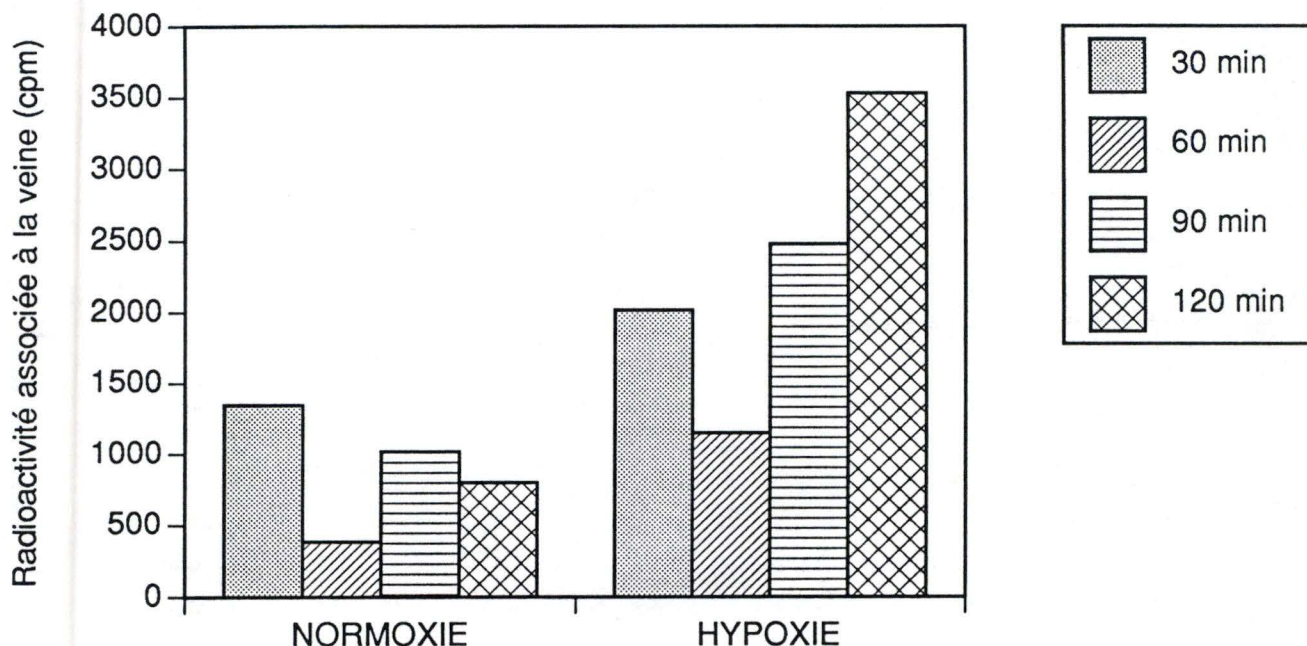


Figure III.6: Mesure de la radioactivité associée à la veine saphène humaine incubée en normoxie ou en hypoxie pendant des temps croissants puis perfusée avec 5 ml d'une suspension de PMN ( $5 \cdot 10^6$ /ml) marqués au  $Cr^{51}$ . Les résultats sont exprimés en cpm/veine.

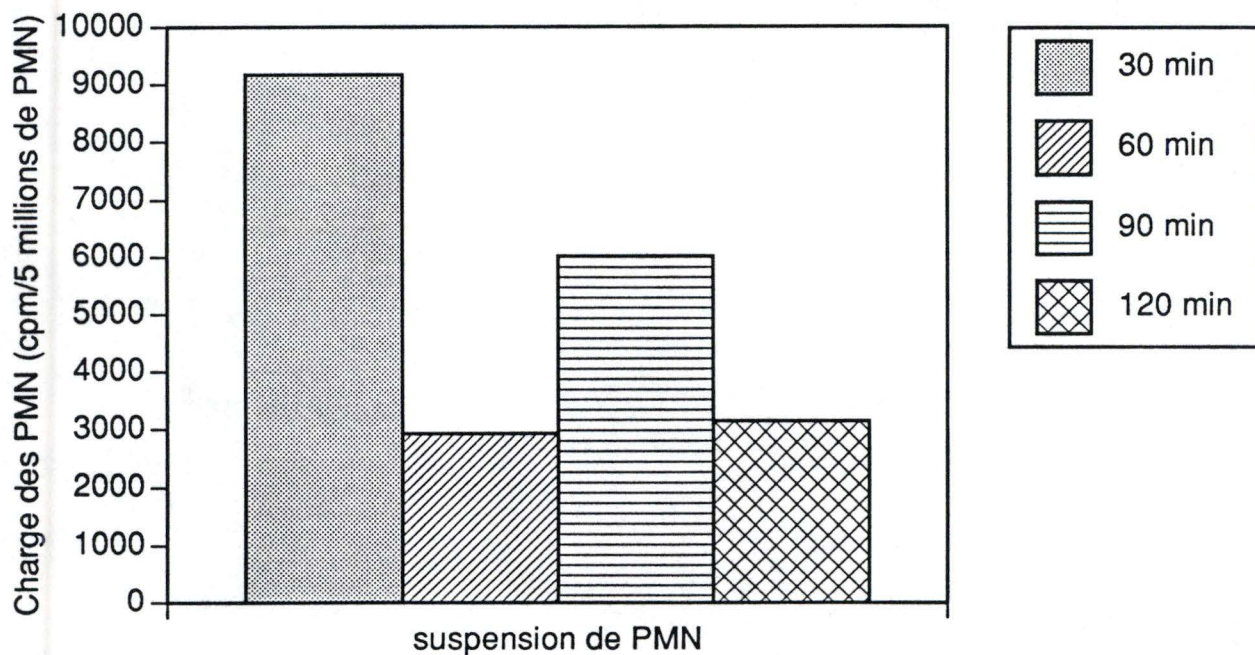


Figure III.7: Mesure de la radioactivité incorporée par les suspensions de PMN des différentes expériences présentées à la figure III.6.

Nous avons dans un premier temps incubé les veines saphènes pendant des temps croissants en hypoxie ( $PO_2 < 10$  mmHg) et en normoxie ( $PO_2 = 130$  mmHg). Pour chaque temps, deux morceaux de même longueur d'une même veine sont incubés respectivement en hypoxie et en normoxie afin d'éviter la variabilité entre donneurs.

La figure III.6 montre que la radioactivité associée aux veines incubées en hypoxie est toujours plus élevée que celle obtenue pour les contrôles réalisés en normoxie et cela pour chaque temps d'incubation. Si une tendance à l'augmentation en fonction du temps d'incubation semble se dessiner pour l'hypoxie, la quantité de radioactivité associée à la veine incubée en hypoxie pendant 60 min est cependant inférieure à celle mesurée dans la veine incubée pendant 30 min en hypoxie. Les résultats repris à la figure III.7 montrent que la radioactivité incorporée par 5 millions de PMN (c'est-à-dire 1 ml de suspension de PMN) est différente d'une expérience à l'autre. Par conséquent, nous avons corrigé la radioactivité associée à la veine par la charge des PMN. Cette correction sera toujours réalisée dans la suite du travail.

La figure III.8 montre que le nombre de PMN associés aux veines incubées en hypoxie augmente en fonction du temps d'incubation alors que le nombre de PMN associés aux veines normoxiques n'augmente pas ou peu. En effet, on observe que le nombre de PMN adhérents à l'endothélium de la veine incubée pendant 120 min en hypoxie est d'environ 4,5 fois supérieure (5648000 PMN/veine) à celui obtenu pour le contrôle (1286400 PMN/veine) alors qu'il est seulement 1,5 fois supérieur à celui obtenu pour le contrôle (736882 PMN/veine) lorsque la veine est incubée en hypoxie pendant 30 min (1102323 PMN/veine). Ceci suggère que l'hypoxie est capable d'induire une augmentation importante de l'adhérence des neutrophiles à l'endothélium de la veine saphène humaine et ce d'autant plus que le temps d'incubation est long (tout au moins jusqu'à deux heures).

Après avoir montré une augmentation de l'adhérence des PMN à l'endothélium des veines saphènes incubée en conditions hypoxiques, nous avons cherché à savoir si des temps d'incubation plus longs des PMN avec les veines peut augmenter d'avantage leur adhérence. Pour cela, deux temps de co-incubation (5 min et 60 min) de PMN avec des veines préalablement incubées en hypoxie ou en normoxie pendant 120 min ont été comparés (Fig III.9). Ces résultats montrent qu'en conditions hypoxiques, le nombre de PMN associés à la veine est largement supérieure à celui associé aux veines normoxiques. Il est légèrement supérieur après 60 min de co-incubation (6733612 PMN

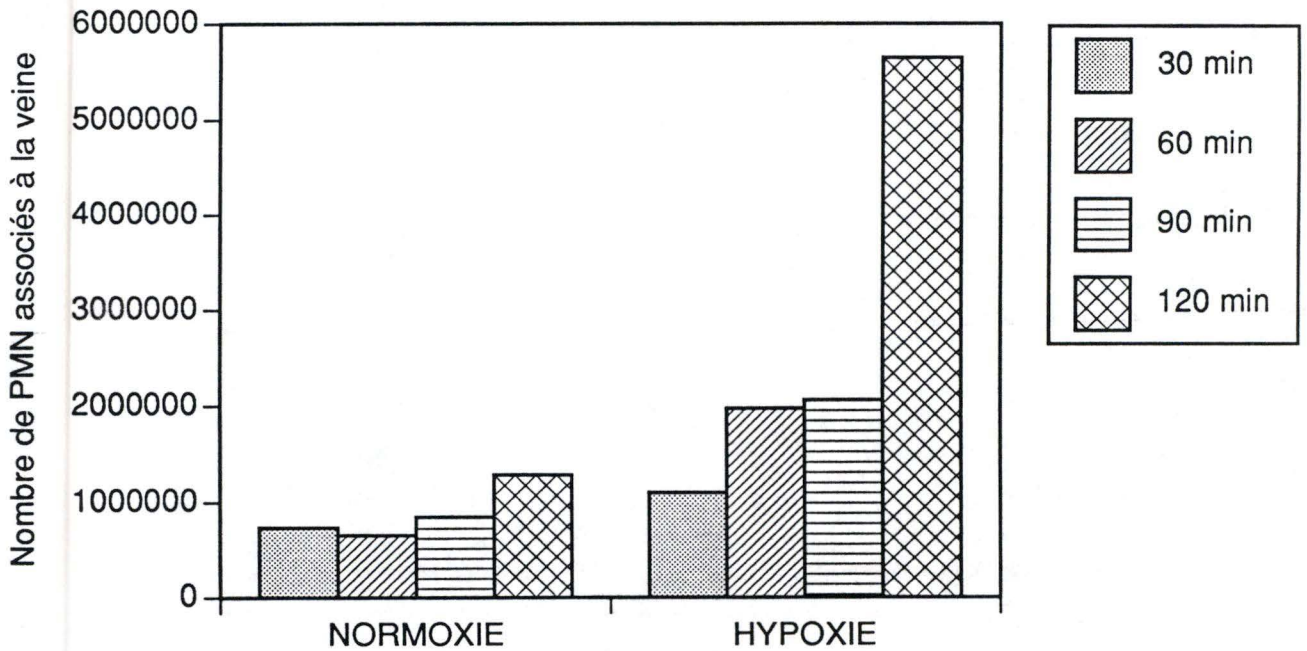


Figure III.8: Evolution de l'adhérence des PMN à l'endothélium de veines saphènes incubées en normoxie ou en hypoxie. Les veines sont incubées en normoxie ou en hypoxie pendant des temps croissants et perfusées ensuite avec 5 ml d'une suspension de PMN ( $5 \cdot 10^6/\text{ml}$ ) marqués au Cr-51. Les résultats sont exprimés en nombre de PMN associés à la veine.

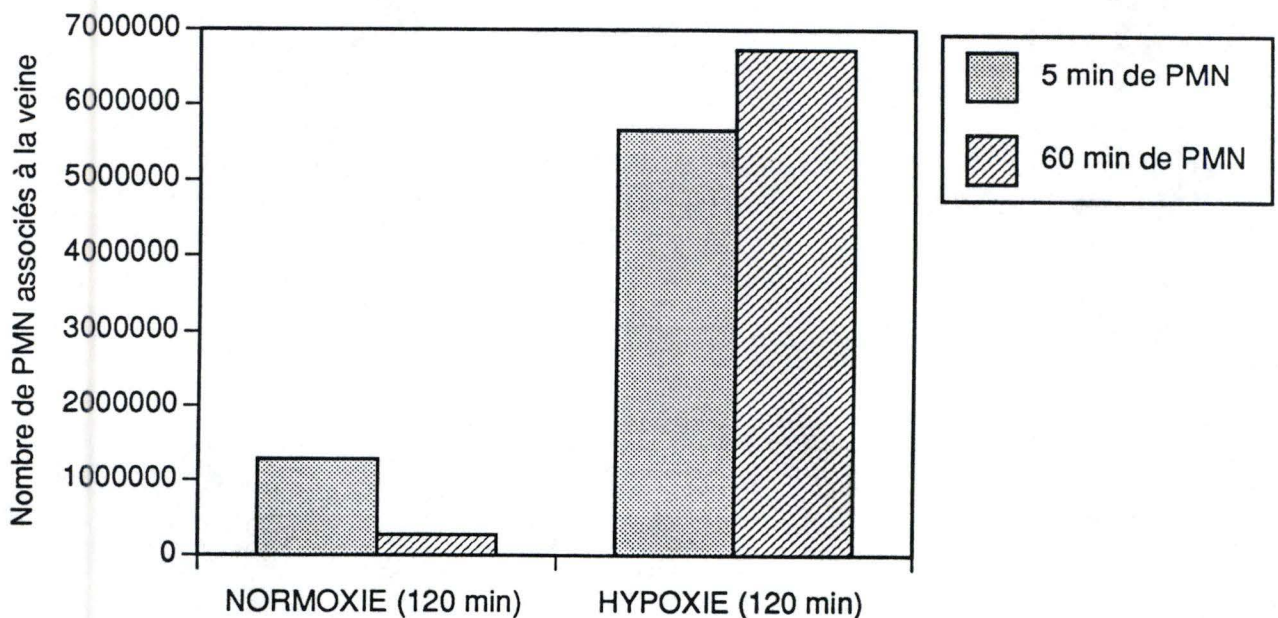
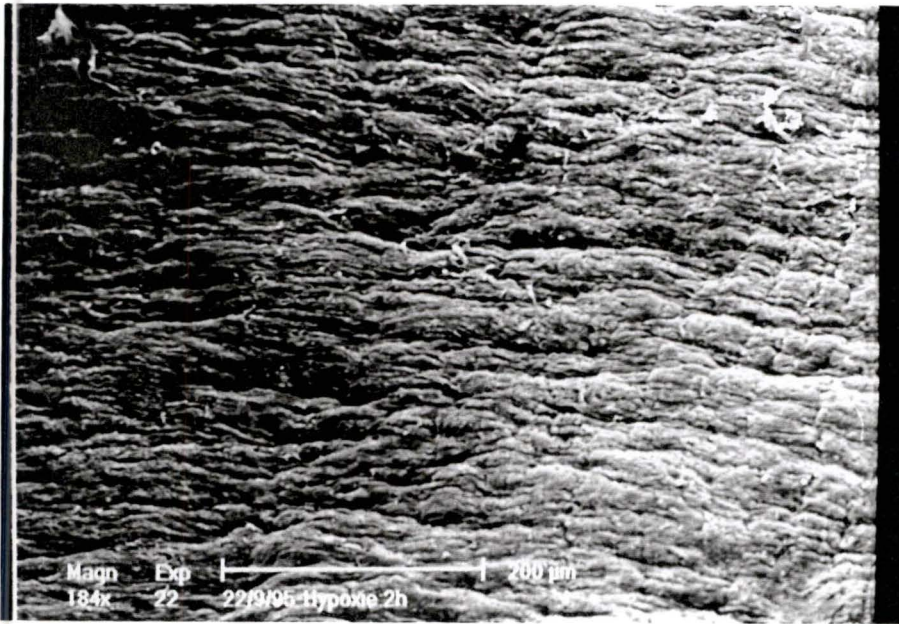


Figure III.9: Evolution de l'adhérence de PMN humains à l'endothélium de veines saphènes incubées en hypoxie ou en normoxie pendant 120 min en fonction du temps de co-incubation des PMN avec ces veines. Les résultats sont exprimés en nombre de PMN associés à la veine.

**A**



**B**

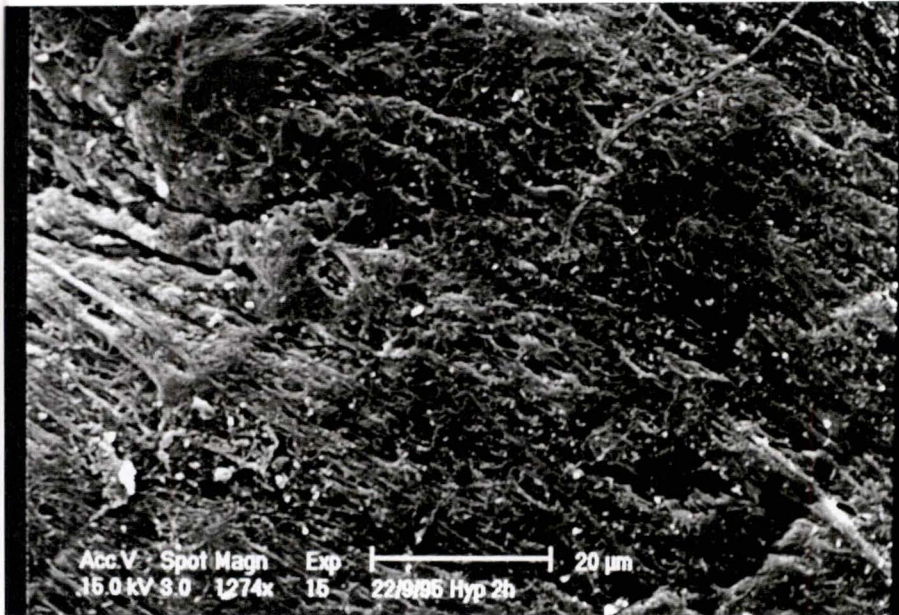
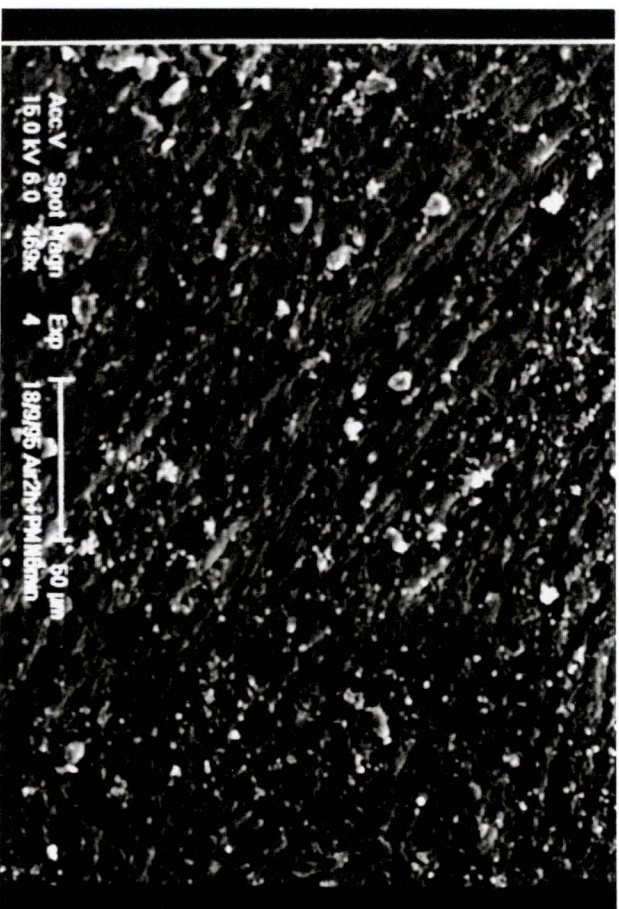


Figure III.10: Micrographies en microscopie électronique à balayage de la surface luminale de l'endothélium d'une veine saphène humaine maintenue sous hypoxie pendant 120 min (A, B) (G= 184 et 1274 X).

A



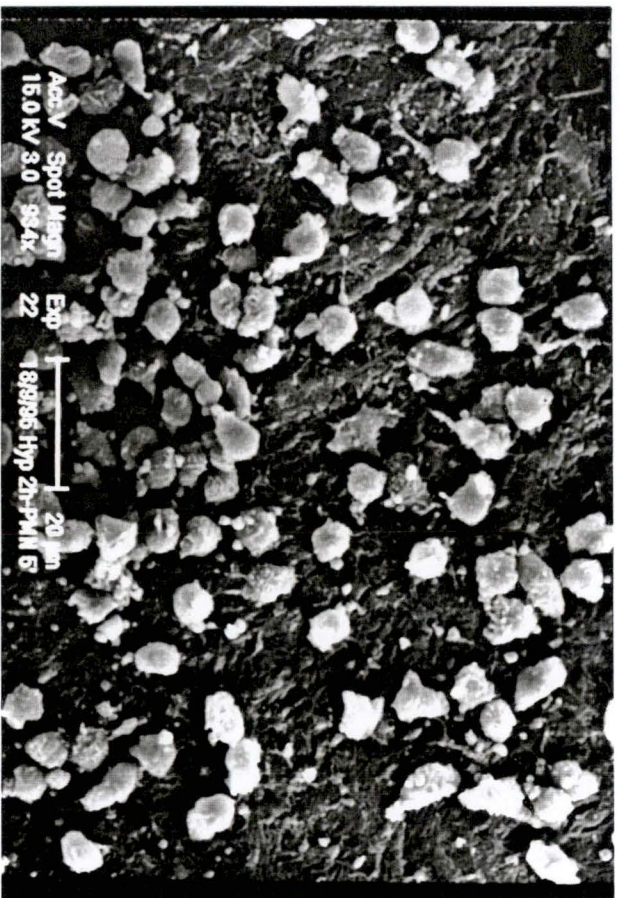
B



C



D



*E*

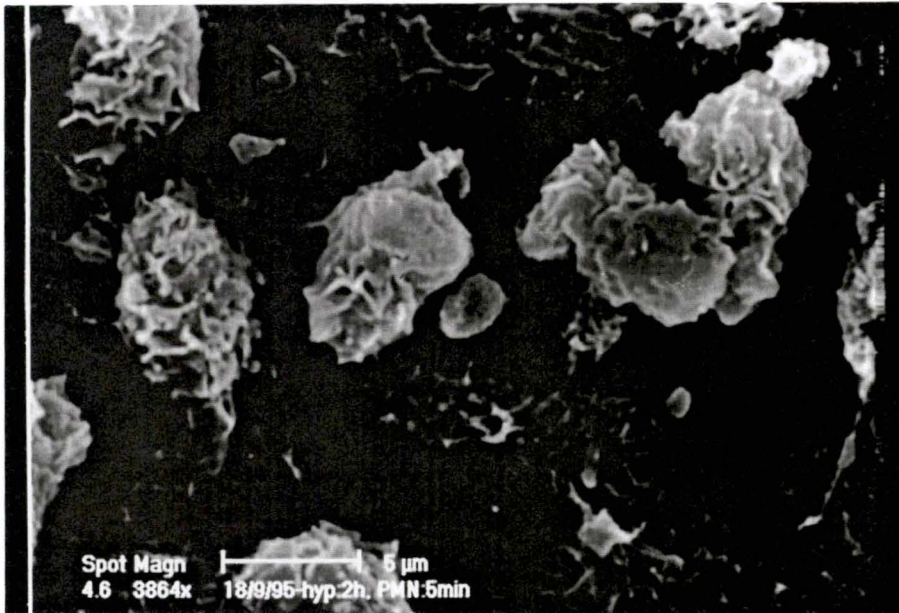


Figure III.11: Micrographies en microscopie électronique à balayage de PMN adhérents à l'endothélium de veines saphènes humaines préalablement incubées en normoxie (A, B) ou en hypoxie (C, D, E) pendant 120 min puis co-incubées avec les PMN pendant 5 min (G= 469 X pour la photo A, 938 X la photo B, 467 X pour la photo C, 934 X pour la photo D et 3864 X pour la photo E).

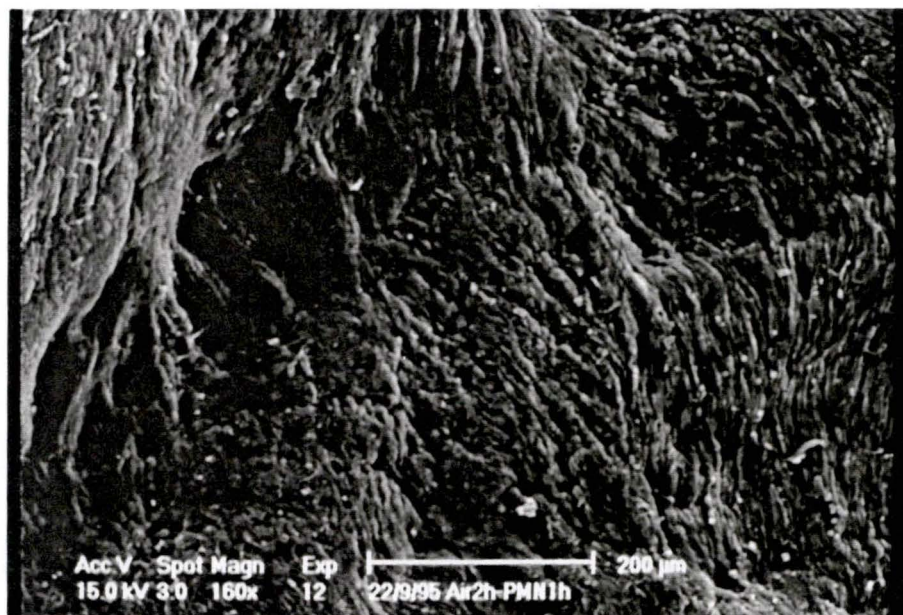
associés au lieu de 5648000 après 5 min de co-incubation). Mais il n'indique pas une nette augmentation de l'adhérence en fonction du temps de co-incubation. De plus, l'adhérence des PMN à l'endothélium des veines contrôles est plus importante après 5 min de co-incubation (1286400 PMN associés au lieu de 282872 après 60 min de co-incubation). Une hypothèse pourrait expliquer ce phénomène: en conditions normoxiques, l'adhérence est un phénomène labile et il est possible que les PMN se détachent de l'endothélium au cours du temps. Nous pouvons donc conclure qu'une co-incubation de 5 min de PMN avec les veines est largement suffisante pour obtenir une adhérence significative après l'hypoxie.

Si ces résultats biochimiques montrent une nette augmentation du nombre de PMN associés à la veine lorsque celle-ci a été incubée en hypoxie, ils ne nous permettent cependant pas de discriminer les PMN adhérents à l'endothélium des veines de ceux qui se sont éventuellement infiltrés dans les tissus sous-endothéliaux.

Afin d'aborder ce problème, des études morphologiques en microscopie électronique à balayage ont été réalisées en parallèle avec ces études biochimiques. Avant de mettre en évidence les PMN adhérents, nous avons voulu vérifier l'intégrité de l'endothélium de la veine saphène après une incubation de 120 min sous hypoxie. Les micrographies présentées à la figure III.10 montrent que l'endothélium reste lisse après cette incubation sous hypoxie et que les cellules endothéliales forment toujours une monocouche de cellules jointives (Fig III.10B). On ne peut donc pas attribuer l'augmentation du nombre de PMN associés à la veine après incubation sous hypoxie que nous avons mise en évidence dans les expériences précédentes, ni à un endommagement de l'endothélium ni à sa destruction.

Nous avons ensuite tenté de visualiser les PMN qui seraient adhérents à l'endothélium. La figure III.11 permet de visualiser les différences quantitatives de l'adhérence des PMN à l'endothélium d'une veine ayant été incubée sous hypoxie par rapport à une veine maintenue en normoxie. On remarque un nombre de PMN adhérents nettement supérieur si la veine a été incubée sous hypoxie par rapport au nombre de PMN adhérents à une veine normoxique. Ces observations confirment que la radioactivité qu'on mesure biochimiquement est bien associée à des PMN adhérents. On observe également à plus fort grossissement (Fig III.11E) que les PMN adhérents à l'endothélium d'une veine incubée en hypoxie présentent de nombreux replis et feuilletts cytoplasmiques témoignant de leur état d'activation.

**A**

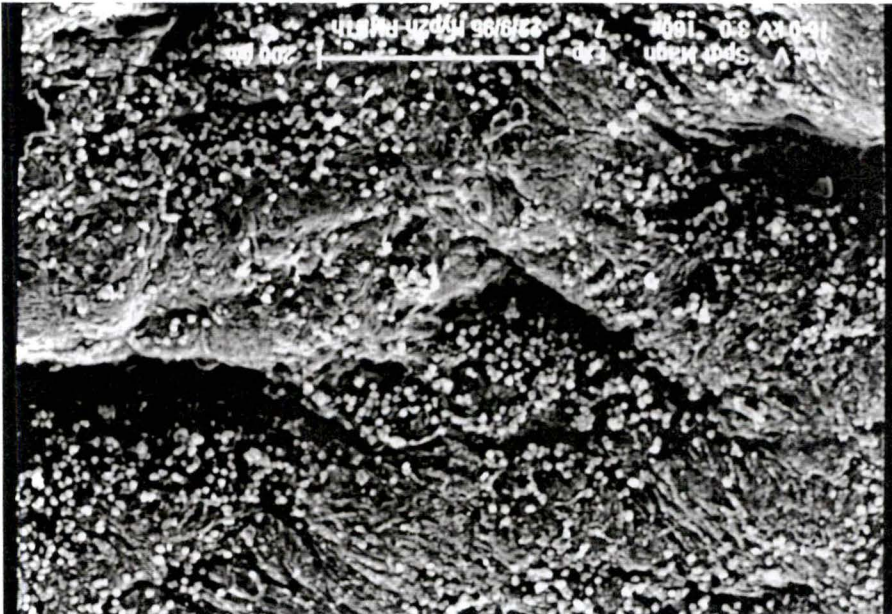


**B**





*D*



*C*

*E*

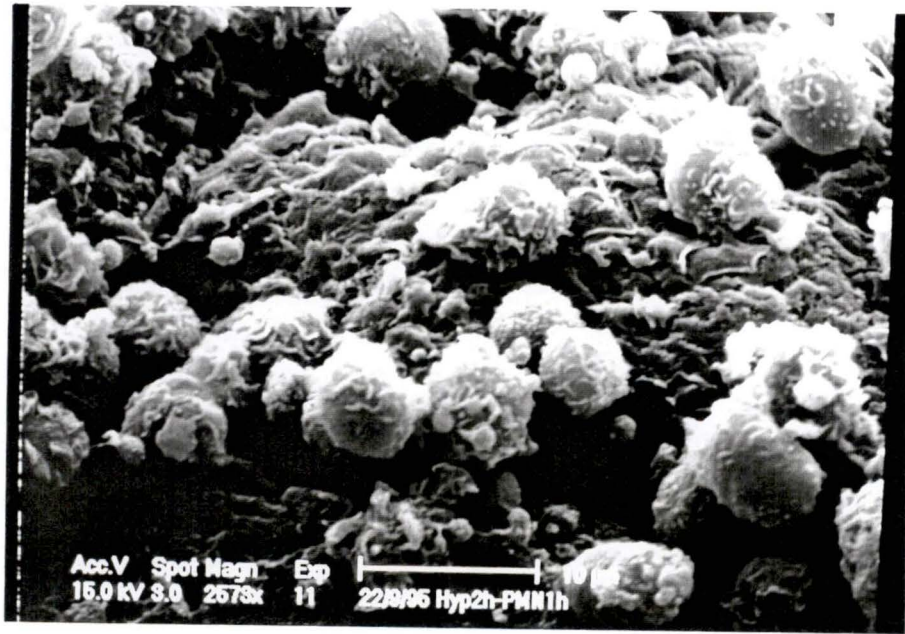


Figure III.12: Micrographies en microscopie électronique à balayage de PMN adhérents à l'endothélium des veines saphènes préalablement incubées en normoxie (A, B) ou en hypoxie (C, D, E) pendant 120 min puis co-incubées avec les PMN pendant 60 min. (G= 160 X pour les photos A et C, 1281 X pour les photos B et D et 2573 X pour la photo E).



Figure III.13: Micrographie en microscopie électronique à balayage de la surface luminale de l'endothélium d'une veine saphène humaine incubée en hypoxie pendant 120 min puis co-incubée avec des PMN pendant 60 min. Les flèches montrent des PMN polarisés (G= 660 X).

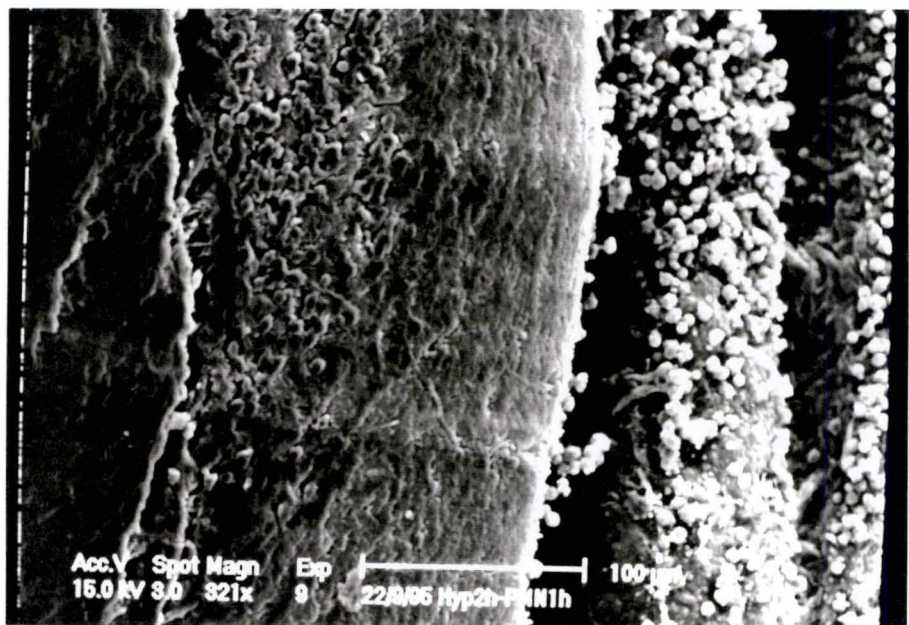


Figure III.14: Micrographie en microscopie électronique à balayage de PMN adhérents à l'endothélium de la veine saphène humaine préalablement incubée en hypoxie puis co-incubée avec les PMN pendant 60 min (G= 321 X).

Lorsque les PMN sont co-incubés 60 minutes avec la veine préalablement incubée en hypoxie ou en normoxie, on remarque également de nombreux PMN adhérents à l'endothélium de la veine hypoxique par rapport à l'endothélium de la veine normoxique où très peu de PMN sont observés (Fig III.12). Ces observations correspondent tout à fait aux résultats des études biochimiques où nous avons montré que le nombre de PMN associés à la veine hypoxique était nettement supérieur à celui des PMN associés à la veine normoxique et ce que ce soit après une co-incubation de 5 ou de 60 minutes (voir figure III.9).

Lorsqu'on observe les PMN à plus fort grossissement, on peut également remarquer, comme cela était le cas pour une co-incubation de 5 min, que ceux-ci présentent de nombreux replis membranaires témoignant de leur état activé (Fig III.12E). On peut de plus observer un changement de forme de certains PMN, ceux-ci deviennent nettement polarisés (Fig III.13). Ce changement de forme est la première étape de leur infiltration par diapédèse dans les tissus sous-endothéliaux.

Avant de clôturer ce chapitre, il est important de remarquer que la distribution des PMN adhérents à l'endothélium veineux n'est pas toujours homogène (Fig III.14). On observe en effet une zone longitudinale riche en PMN qui est parallèle à une zone dépourvue de PMN. Nous pouvons expliquer ce phénomène par le fait que lorsqu'on incube la suspension de PMN avec la veine pendant 60 minutes, ceux-ci peuvent par un phénomène de sédimentation se déposer sur la partie inférieure de la veine où ils pourront alors adhérer. Nous n'observons cependant que les PMN adhérents puisque la veine est rincée abondamment avant la fixation afin d'éliminer les PMN non adhérents. L'idéal aurait été d'avoir un système rotatif qui ferait tourner la veine pendant toute la durée de la co-incubation avec les PMN de manière à ce que la totalité de l'endothélium veineux soit en contact avec les PMN.

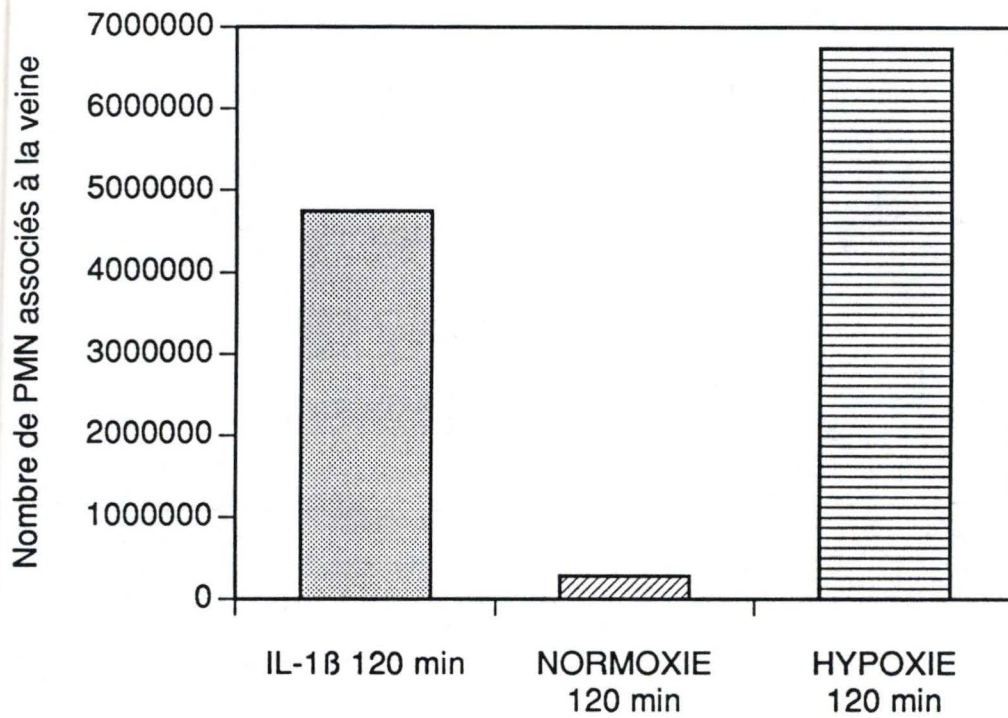


Figure III.15: Mesure du nombre de PMN associés à une veine saphène stimulée par l'interleukine-1 $\beta$  recombinante humaine (5 ng/ml) pendant 120 min puis co-incubée avec les PMN pendant 30 min. Le nombre de PMN associés aux veines incubées en normoxie ou en hypoxie pendant 120 min puis co-incubées pendant 60 min avec les PMN est également présenté.

## II.2. Effet de l'interleukine-1 $\beta$ recombinante humaine sur l'adhérence des PMN

Les résultats des expériences précédentes montrent que l'hypoxie est capable d'induire une forte augmentation de l'adhésivité de l'endothélium d'une veine saphène pour les PMN. Nous avons ensuite voulu comparer quantitativement et qualitativement cette augmentation à celle qui serait induite par une stimulation des cellules endothéliales par une cytokine (IL-1 $\beta$ ) bien connue pour activer de nombreuses fonctions cellulaires (Jordan et al, 1990).

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, les cellules endothéliales expriment des récepteurs de type I pour l'interleukine-1 $\beta$ . Cette dernière transforme l'endothélium en une surface pro-inflammatoire qui se traduit par l'induction de la synthèse du PAF et une augmentation de la synthèse d'autres interleukines comme l'IL-6 et l'IL-8. La stimulation des cellules endothéliales par l'IL-1 $\beta$  induit également, bien qu'avec des cinétiques différentes, l'expression des molécules d'adhérence telles que ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1), VCAM-1 (Vascular Adhesion Molecule-1) et ELAM-1 (Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1) (Hawrylowicz et al, 1991). Les cytokines induisent également une réorganisation du cytosquelette au sein des cellules endothéliales qui préparent la migration transendothéliale des leucocytes et augmente la perméabilité vasculaire (Molony et Armstrong, 1991).

Nous avons donc comparé l'augmentation de l'adhérence des PMN à l'endothélium d'une veine saphène activée par l'IL-1 à celle induite par l'hypoxie. A cette fin, une veine a été stimulée pendant 120 min par de l'interleukine-1 $\beta$  recombinante humaine (5 ng/ml) puis co-incubée avec les PMN pendant 30 min.

Les résultats de cette expérience sont présentés à la figure III.15, ils ont été comparés aux résultats de la figure III.9 dans laquelle une veine a été incubée en normoxie ou en hypoxie pendant 120 min puis co-incubées avec les PMN pendant 60 min. On observe que le nombre de PMN associés à la veine stimulée par l'IL-1 $\beta$  est environ 17 fois supérieur à celui associé à la veine maintenue en normoxie et du même

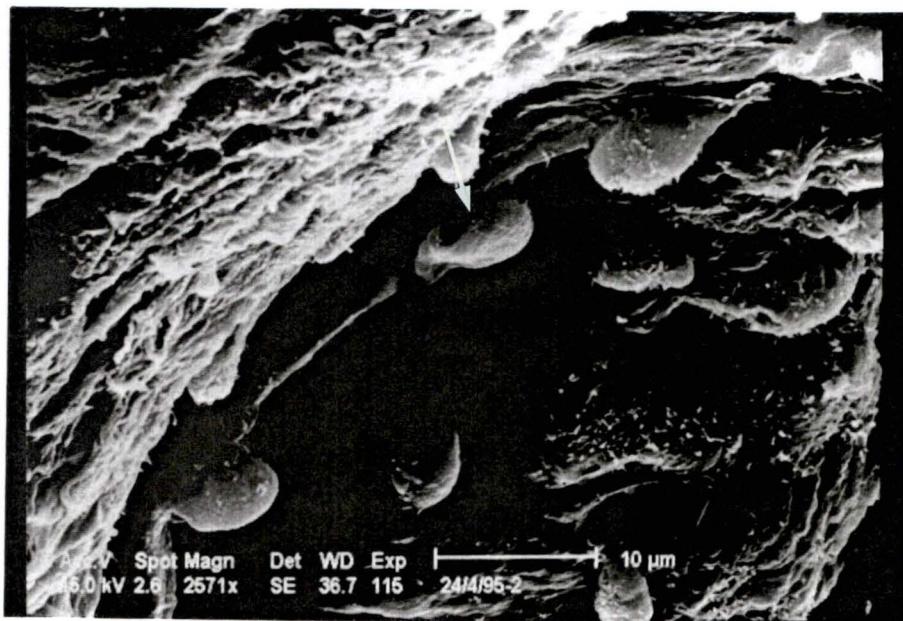
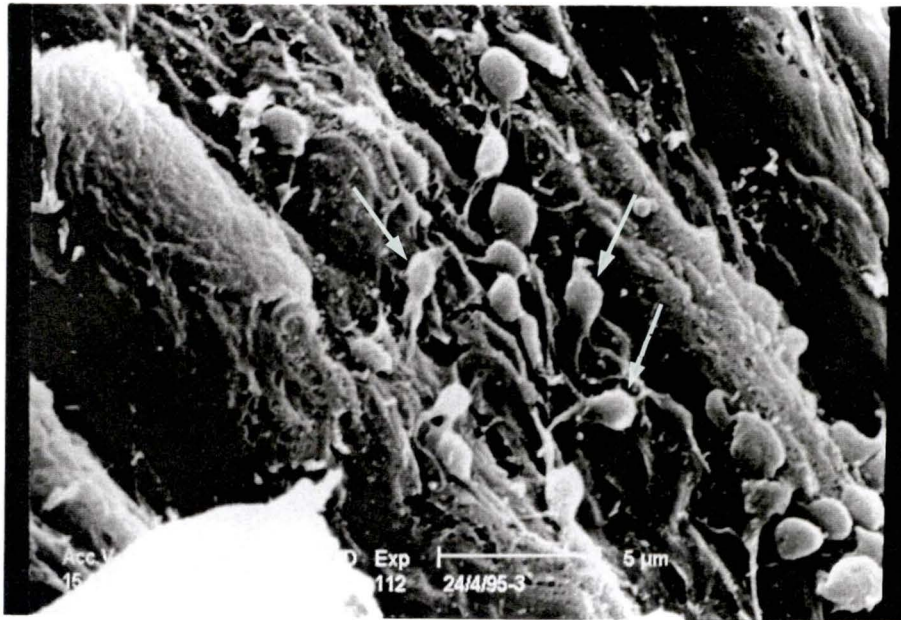


Figure III.16: Micrographies en microscopie électronique à balayage de la surface luminale de l'endothélium d'une veine saphène humaine stimulée pendant 120 min par l'interleukine-1 $\beta$  recombinante humaine (5 ng/ml) puis co-incubée avec des PMN pendant 30 min. Les flèches indiquent des PMN polarisés (G= 1285 et 2571 X).

ordre de grandeur que le nombre de PMN associés à la veine incubée 120 min en hypoxie. Ces résultats suggèrent que l'effet de l'hypoxie sur l'adhérence des PMN est important puisqu'il est quantitativement similaire à l'effet obtenu lors d'une stimulation des cellules endothéliales par une cytokine.

Les observations morphologiques d'une veine stimulée 120 min par de l'IL-1 $\beta$  puis co-incubée 30 min avec les PMN nous permettent de confirmer l'adhérence mesurée biochimiquement. On observe effectivement un nombre important de PMN adhérents à l'endothélium. De plus, certains de ces PMN présentent une forme polarisée (Fig III.16) due à l'émission de pseudopodes.

En conclusion, nous pouvons dire que l'augmentation de l'adhérence des PMN et leur activation subséquente suite à une incubation des veines en condition d'hypoxie, sont de même ordre de grandeur que celles obtenues après une stimulation de l'endothélium veineux par l'IL-1 $\beta$  recombinante humaine.

### II.3. Etude du mécanisme de l'adhérence des PMN

Après avoir montré que l'hypoxie augmente fortement l'adhérence des PMN à l'endothélium des veines saphènes, nous avons tenté de rechercher le (ou les) mécanisme(s) impliqué(s) dans ce processus.

Comme le rôle du PAF et de la glycoprotéine d'adhésion ICAM-1 avait déjà été montré pour les cellules endothéliales isolées (Arnould et al, 1993) ou pour l'endothélium de la veine ombilicale (Arnould et al, sous presse), nous avons voulu vérifier si l'adhérence des PMN à l'endothélium de la veine saphène était également médiée par ces molécules. A cette fin, des expériences en présence du WEB2086 ( $10^{-5}$  M) (antagoniste du récepteur au PAF), de l'acide oléique ( $10^{-7}$  M) (inhibiteur de la synthèse de PAF) ou de l'anticorps monoclonal anti-ICAM-1 (20 ng/ml) ont été réalisées.

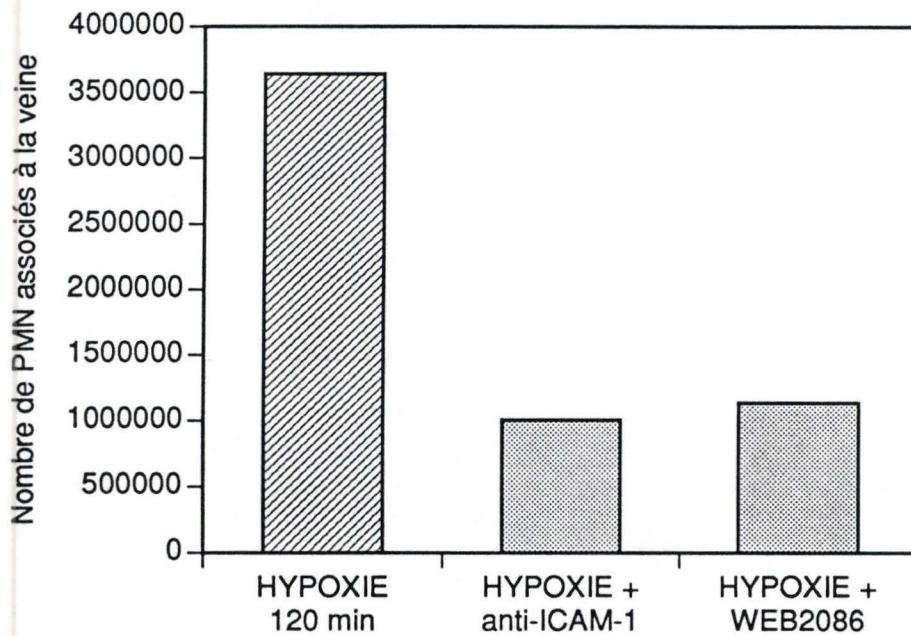


Figure III.17: Effet de l'anticorps monoclonal anti-ICAM-1 et du WEB 2086 sur l'adhérence des PMN. Les veines saphènes humaines sont incubées pendant 120 min en hypoxie en présence ou en absence de 20 ng/ml d'anticorps anti-ICAM-1 puis co-incubées pendant 5 min avec des PMN seuls ou des PMN pré-incubés pendant 15 min avec le WEB 2086 ( $10^{-5}M$ ). Les résultats sont exprimés en nombre de PMN associés à la veine.

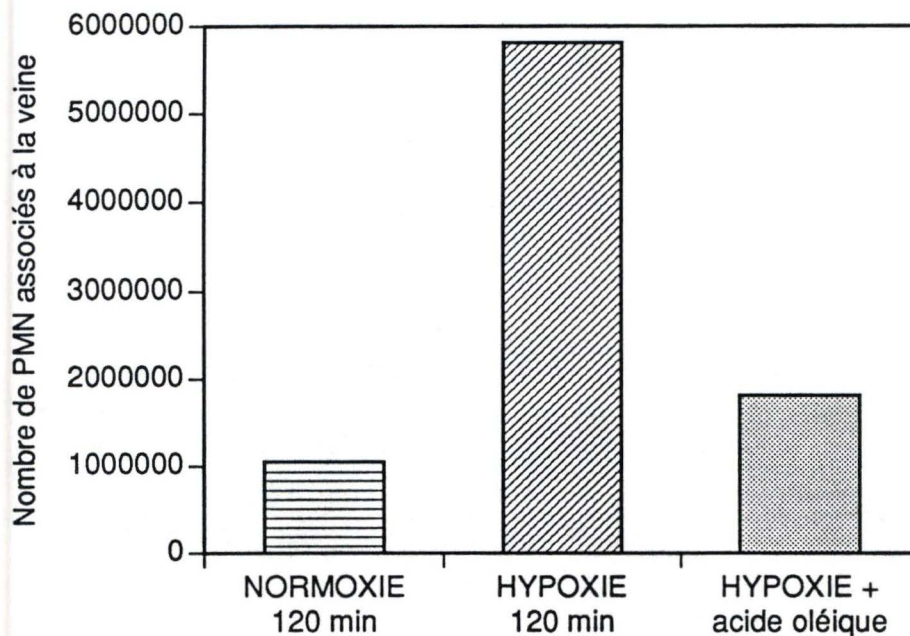


Figure III.18: Effet de l'acide oléique sur l'adhérence des PMN. La veine saphène est incubée en normoxie ou en hypoxie pendant 120 min en présence ou en absence de  $10^{-7}M$  d'acide oléique puis co-incubée avec les PMN pendant 5 min. Les résultats sont exprimés en nombre de PMN associés à la veine.

Les résultats de la figure III.17 montrent que l'adhérence des PMN à l'endothélium des veines saphènes incubées sous hypoxie en présence de l'anticorps anti-ICAM-1 est nettement inférieure à celle obtenue sans l'anticorps. Ceci montre que cette glycoprotéine est nécessaire pour l'adhérence des PMN à l'endothélium.

D'autre part, l'antagoniste du récepteur au PAF, le WEB2086 inhibe également fortement cette adhérence (Fig III.17), suggérant un rôle de ce médiateur lipidique dans ce processus. Comme on sait qu'*in vitro*, les cellules endothéliales incubées sous hypoxie synthétisent du PAF qui est ensuite impliqué dans l'augmentation de l'adhérence des PMN, nous avons alors examiné l'effet de l'inhibition de la synthèse du PAF par les cellules endothéliales sur l'adhérence des PMN. A cette fin, nous avons utilisé comme inhibiteur de cette synthèse, l'acide oléique à une concentration de  $10^{-7}$  M. A cette concentration, l'inhibition de la synthèse de PAF par les HUVEC incubées en hypoxie est de 100% (Arnould et al, 1993). L'acide oléique inhibe en fait l'acétyltransférase, dernière enzyme nécessaire à la formation de PAF (Remy et al, 1989).

Les résultats présentés à la figure III.18 montrent effectivement qu'en présence d'acide oléique, l'adhérence des PMN est nettement inférieure à l'adhérence mesurée pour la veine incubée en hypoxie: on obtient une inhibition de 84%. Ce résultat confirme donc l'intervention du PAF dans l'adhérence comme l'avait suggéré l'expérience précédente.

## II.4. Discussion

Dans le cadre général de l'étude des effets de l'hypoxie sur l'adhérence des PMN aux cellules endothéliales, de nombreuses études ont déjà été réalisées sur des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC) à la fois *in vitro* et *ex vivo*. Ces études montrent que: *in vitro*, l'adhérence moyenne des PMN non activés aux HUVEC maintenues en normoxie est très faible: 4,5% (n= 29). Cependant, quand ces cellules sont incubées sous hypoxie, l'adhérence des PMN augmente considérablement et atteint 21,5% (n=35) après 120 min d'hypoxie (Arnould et al, 1993). L'hypoxie de la veine ombilicale complète est également capable d'augmenter l'adhésivité de l'endothélium pour les PMN. Après 120 min, l'adhérence de PMN à l'endothélium veineux est du même ordre de grandeur que celle obtenue pour les cellules en culture (Arnould et al, sous presse).

Les résultats des travaux présentés ci-dessus montrent que l'hypoxie peut également augmenter l'adhésivité de l'endothélium de la veine saphène pour les PMN. Cette augmentation de l'adhérence des PMN après 120 min d'hypoxie est du même ordre de grandeur que celle observée. De plus, les études morphologiques confirment ces résultats en montrant bien l'adhérence des PMN à l'endothélium. Deux caractéristiques quantitatives de cette adhérence sont à remarquer. Premièrement, ce processus est d'autant plus marqué que le temps d'incubation de la veine sous hypoxie est long. Une cinétique similaire entre 30 et 120 min d'hypoxie avait été observée sur les HUVEC en culture (Arnould et al, 1993). Deuxièmement, une augmentation du temps de co-incubation des PMN avec la veine de 5 à 60 minutes n'augmente pas ou peu le nombre de PMN adhérents, ce qui était également vrai *in vitro*. Le processus d'adhérence est donc un processus très rapide et qui atteint son optimum endéans 5 minutes. Outre l'adhérence proprement dite, les études morphologiques suggèrent également une activation des PMN. Cette activation sera étudiée plus en détail dans la suite du travail (voir chapitre III des résultats).

Les mécanismes responsables de l'augmentation induite par l'hypoxie de l'adhérence des PMN aux cellules endothéliales *in vitro* ont été examinés au laboratoire impliquant le rôle du PAF et de la glycoprotéine d'adhésion ICAM-1.

Lorsque les HUVEC sont incubées sous hypoxie, la synthèse de PAF atteint un optimum après 90 minutes mais ensuite, le PAF n'est plus détectable après 120 minutes d'hypoxie. Le mécanisme expliquant la synthèse transitoire de PAF est encore controversé mais une activité basale de l'acétylhydrolase a été mise en évidence dans les homogénats de cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine non stimulées (Hirafuji et al, 1987). Satoh et al (1992) ont mis en évidence une activation de l'acétylhydrolase par le PAF nouvellement synthétisé. Hirafuji et al (1987) suggèrent donc qu'en présence d'une activité basale d'acétylhydrolase, c'est le processus d'activation et de désactivation de cette enzyme qui régule la quantité de PAF synthétisée par les cellules endothéliales. C'est sur l'acetyltransferase qu'agissent les acides gras insaturés tels que l'acide oléique pour inhiber la formation de PAF (Remy et al, 1989).

Sous hypoxie, la concentration en ATP des cellules endothéliales diminue ce qui conduit à une augmentation de la concentration calcique cytosolique (Arnould et al, 1992). Le calcium

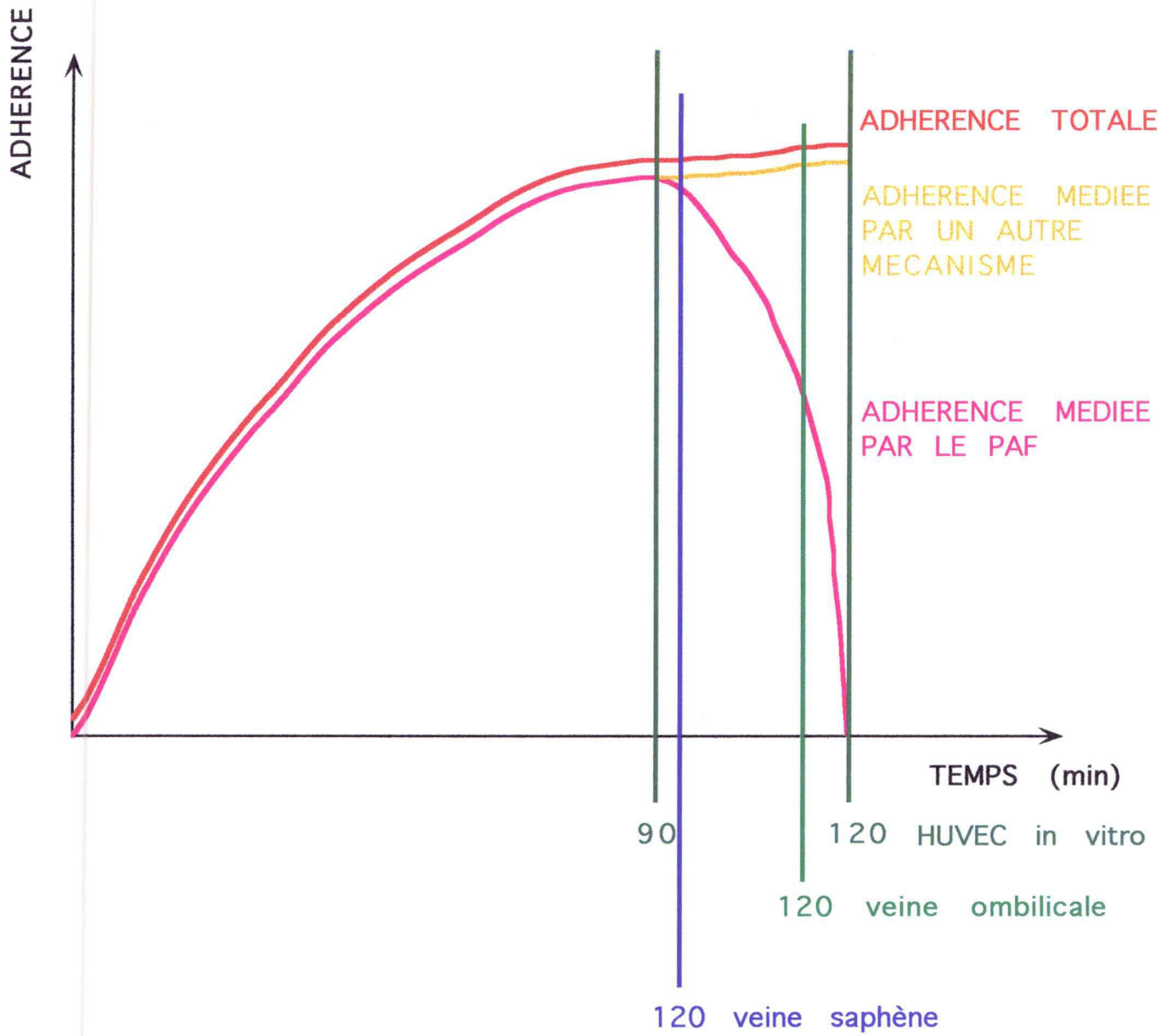
	Veine saphène	Veine ombilicale	HUVEC <i>in vitro</i>
<b>WEB2086</b>	<b>100%</b>	<b>43%</b>	<b>0%</b>
<b>Acide oléique</b>	<b>84%</b>	<b>68%</b>	<b>100%</b>
<b>Anti-ICAM-1</b>	<b>100%</b>	<b>77%</b>	<b>61%</b>

Tableau III.2: Effets comparés du WEB2086, de l'acide oléique et de l'anticorps anti-ICAM-1 sur l'adhérence des PMN à l'endothélium de la veine ombilicale, de l'endothélium de la veine saphène humaine ou aux HUVEC *in vitro* préalablement incubées en hypoxie pendant 120 min. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'inhibition de l'adhérence.

active alors une phospholipase A<sub>2</sub> conduisant à la production de médiateurs de l'inflammation tels que les prostaglandines et le PAF (Arnould et al, 1993). Le PAF associé à la surface des cellules pourrait servir de médiateur juxtacrine (Zimmerman et al, 1990) pour activer les neutrophiles, qui surexpriment alors leurs intégrines (CD18/CD11). Ces intégrines interagissent avec la molécule d'adhésion ICAM-1 exprimée de façon constitutive sur les cellules endothéliales pour permettre l'adhérence ferme des neutrophiles aux cellules endothéliales. Arnould et al (1993) ont également montré qu'à  $10^{-7}$  M, qui est la concentration permettant une inhibition totale de la synthèse du PAF, l'acide oléique inhibe totalement l'adhérence des PMN aux HUVEC après 90 minutes d'hypoxie mais aussi et ce de façon inattendue, après 120 minutes d'hypoxie. En effet, si la synthèse du PAF est inhibée pendant les 90 min d'hypoxie, l'augmentation de l'adhérence n'est plus observée et les agonistes des récepteurs au PAF bloquent l'adhérence des PMN. Par contre, après 120 min d'hypoxie, alors que le PAF n'est plus présent à la surface des HUVEC et que les antagonistes du PAF n'ont plus d'effet, l'adhérence est toujours très forte.

Ces résultats suggèrent que si le PAF n'est pas directement responsable de l'adhérence des PMN après 120 minutes d'hypoxie, sa synthèse pendant les 90 premières minutes d'hypoxie est indispensable pour observer l'adhérence après 120 minutes. Pour tenter d'expliquer ceci, l'hypothèse émise est que le PAF servirait de messager secondaire intercellulaire pour moduler la synthèse d'un autre médiateur qui agirait sur les PMN. Il pourrait aussi induire un autre mécanisme, par exemple dépendant des molécules d'adhésion des cellules endothéliales qui conduirait alors l'augmentation de l'adhérence observée après 120 min d'hypoxie.

Dans notre modèle expérimental utilisant la veine saphène, l'hypoxie est également capable d'induire une augmentation de l'adhésivité de l'endothélium pour les PMN. Il était donc important de vérifier si le même mécanisme que celui mis en évidence pour les HUVEC était impliqué. Les résultats montrent que cette adhérence est inhibée à 84% lorsqu'on inhibe la synthèse de PAF par l'acide oléique, ce qui est similaire aux 68% obtenus pour la veine ombilicale ou aux 100% obtenus pour les HUVEC *in vitro* (Tableau III.2). De plus, le WEB2086 inhibe également ce processus à 100% sur la veine saphène. Par ailleurs, le WEB2086 inhibe l'adhérence des PMN à la veine ombilicale incubée 120 min sous hypoxie à 43% mais n'inhibe pas l'adhérence aux HUVEC *in vitro*. Comme nous l'avons mentionné au dessus, une quantité importante de PAF est associée aux HUVEC incubées 90 min sous hypoxie et ce PAF sert de médiateur juxtacrine pour médier l'adhérence



**Figure III.19: Schéma illustrant le rôle de la cinétique de production du PAF dans l'adhérence des PMN aux cellules endothéliales de la veine saphène ou de la veine saphène perfusée ou aux HUVEC en culture après incubation sous hypoxie**

des PMN qui peut être inhibée alors à 100% par le WEB2086. Si l'hypoxie devient plus longue, le PAF est hydrolysé et n'est plus détecté après 120 min. Le fait qu'on observe une inhibition de 100% de l'adhérence des PMN à l'endothélium de la veine saphène incubée 120 min sous hypoxie signifierait donc que dans ce modèle expérimental, le PAF est présent en quantité importante à ce moment et qu'il médie directement l'adhérence des PMN. On peut alors penser que la cinétique de production du PAF est décalée vers des temps plus longs d'hypoxie pour l'endothélium de la veine saphène par rapport aux HUVEC *in vitro* (Fig III.19). L'endothélium de la veine ombilicale aurait un comportement intermédiaire comme l'indique les 43% d'inhibition obtenu dans ce modèle avec le WEB2086. Un dosage direct du PAF en fonction du temps d'hypoxie sur la veine ombilicale pourrait confirmer cette hypothèse.

Par ailleurs, l'adhérence des PMN est aussi bloquée à 100% pour la veine saphène et respectivement à 61% et à 77% pour les HUVEC *in vitro* et *ex vivo* quand les anticorps anti-ICAM-1 sont présents, ce qui signifie que cette glycoprotéine d'adhésion exprimée à la surface des HUVEC médie directement l'adhérence des PMN aux cellules endothéliales de la veine saphène. Ces effets inhibiteurs tout à fait similaires dans les trois conditions expérimentales nous permettent de penser que des mécanismes biochimiques semblables à ceux déjà élucidés en culture sur les cellules endothéliales de la veine ombilicale peuvent également être impliqués dans l'induction de l'adhérence des PMN à l'endothélium des veines saphènes humaines.

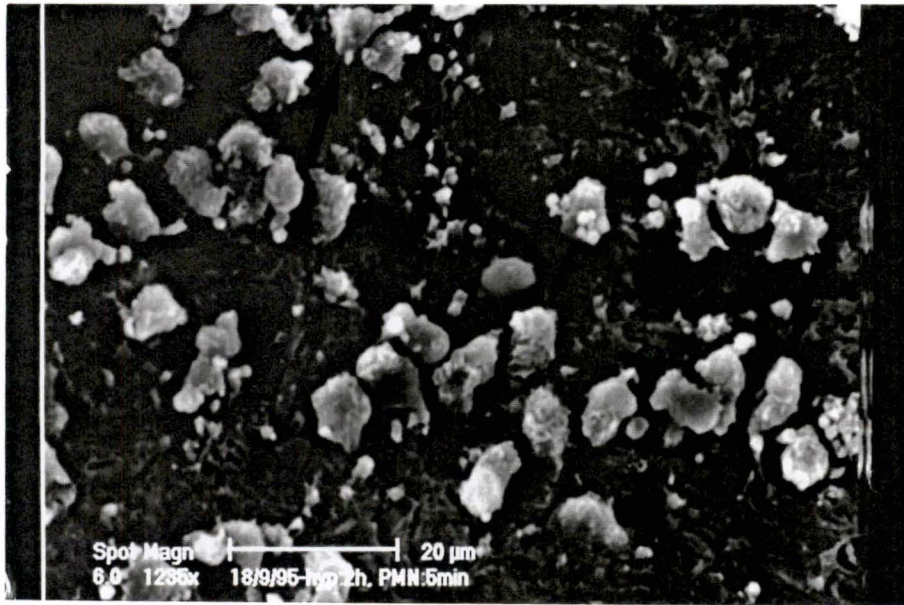


Figure III.20: Micrographie en microscopie électronique à balayage de PMN adhérents à l'endothélium de la veine saphène incubée 120 min sous hypoxie (G= 1235 X). Les grandes flèches indiquent des PMN polarisés et les petites flèches montrent des PMN avec de nombreux replis membranaires.

### III. ETUDE DE L'ACTIVATION DES PMN ADHERENTS A L'ENDOTHELIUM DE LA VEINE SAPHENE HYPOXIQUE

Au cours des chapitres précédents, nous avons montré que l'adhésivité de l'endothélium des veines saphènes pour les PMN augmente après une incubation en hypoxie. Nous avons également montré à l'aide des observations réalisées en microscopie électronique à balayage que les PMN adhérents à l'endothélium de ces veines préalablement incubées en conditions hypoxiques présentent de nombreux replis membranaires ou un changement de forme vers un état polarisé. Ces deux caractéristiques sont le signe d'un état activé (Fig III.20). Nous avons ensuite voulu vérifier biochimiquement cet état d'activation des PMN co-incubés avec une veine saphène pré-incubée en hypoxie. Deux paramètres typiques de cette activation ont été étudiés: la production de radicaux superoxydes ( $O_2\cdot(-)$ ) et la synthèse d'un médiateur de l'inflammation, le leucotriène B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>).

#### III.1. Production de radicaux superoxydes

Le terme d'hyperactivité oxydative s'applique à une série de phénomènes métaboliques qui se déclenchent lorsque les neutrophiles sont soumis à des stimuli adéquats. Le phénomène le plus important résultant de cette hyperactivité est l'activation du complexe de la NADPH oxydase et donc la production d'anions superoxydes ( $O_2\cdot(-)$ ). Il est donc intéressant d'utiliser cette production comme indicateur de l'activation des PMN. Pour ce fait, nous avons comparé la production d' $O_2\cdot(-)$  par une suspension de PMN ( $5 \cdot 10^6$  cellules) co-incubées pendant 5 min avec l'endothélium d'une veine saphène préalablement soumise à 120 min d'hypoxie à celle d'une suspension de PMN co-incubée pendant la même durée avec une veine contrôle maintenue en normoxie. Nous avons également réalisé en parallèle des contrôles positifs en co-incubant directement les PMN en suspension dans du HBSS contenant ou non du calcium (1mM) ou par du fMLP ( $10^{-7}M$ ).

Les résultats de cette expérience (Fig III.21) montrent que la production de radicaux surperoxydes par les PMN co-incubés avec la veine préalablement soumise à l'hypoxie est de 1,666 nanomoles/ml/min,

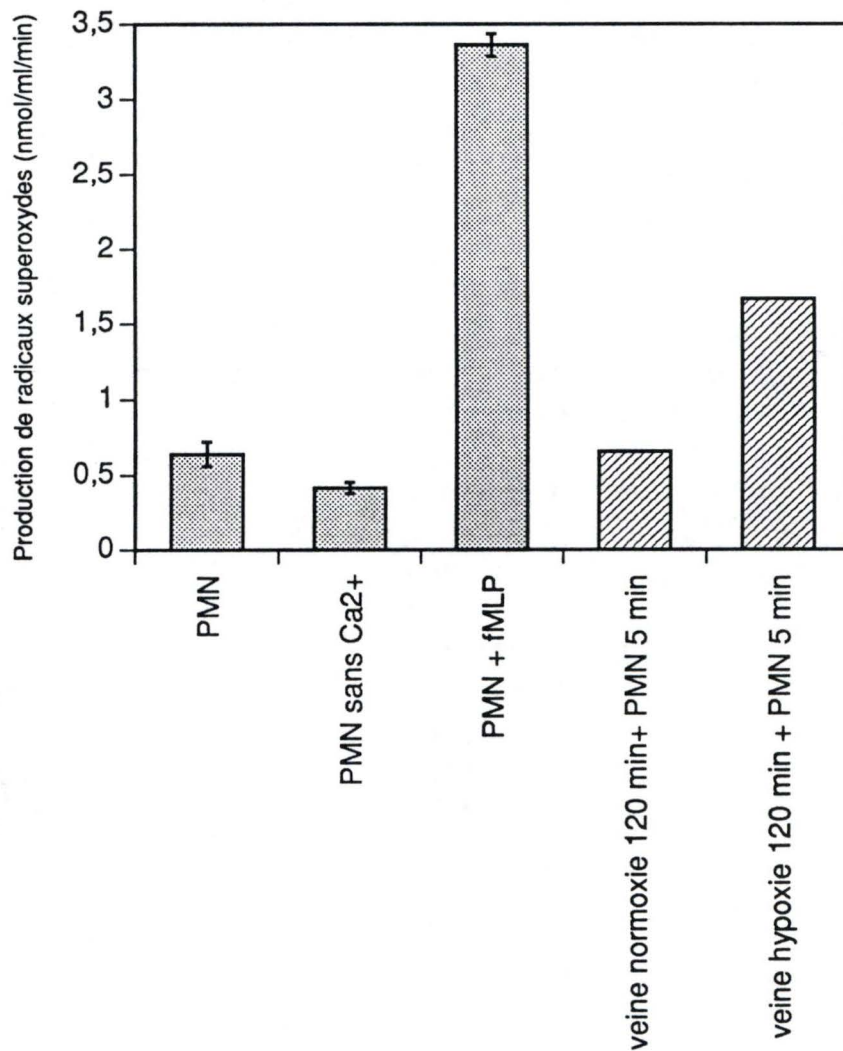
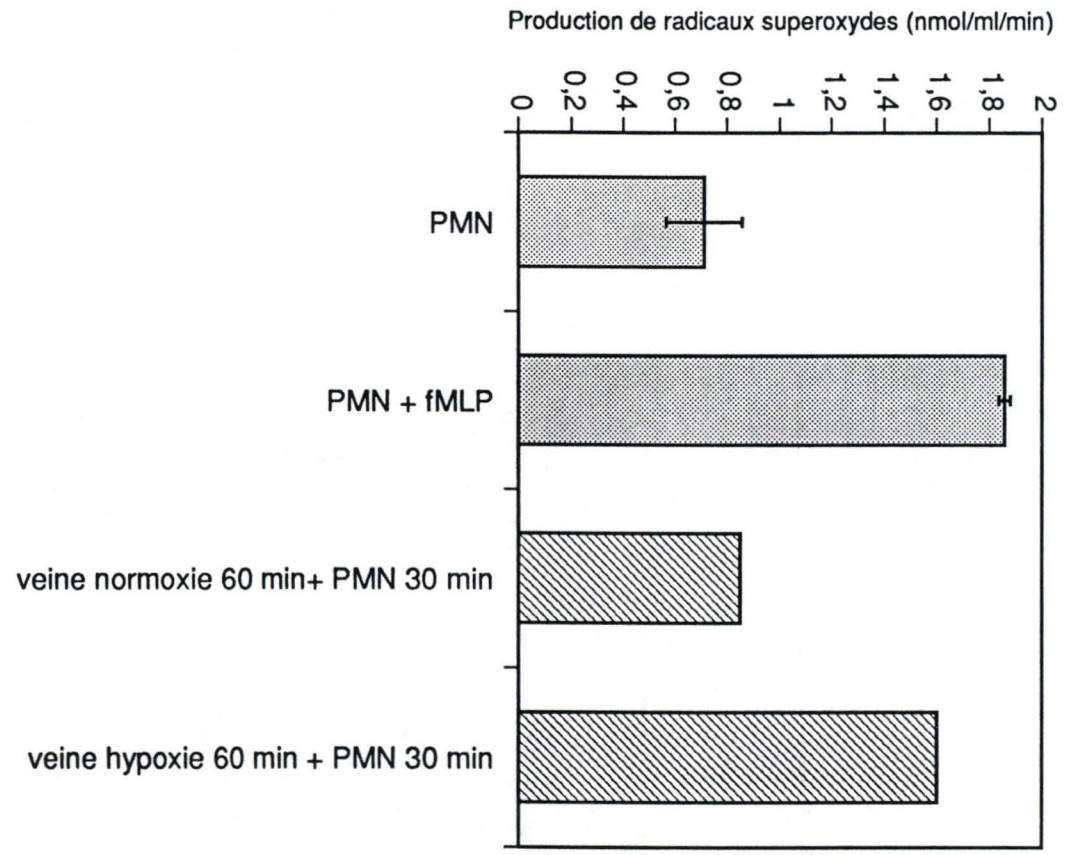


Figure III.21: Mesure de la production de radicaux superoxydes par les PMN humains ( $5 \cdot 10^6$  cellules) co-incubés pendant 5 min avec les veines saphènes humaines pré-incubées en normoxie ou en hypoxie pendant 120 min. La production de radicaux superoxydes par des PMN mis en suspension en présence ou en absence de calcium (1 mM) ou par des PMN stimulés pendant 5 min par le fMLP ( $10^{-7}$ M) est également présentée. Les résultats sont exprimés en nanomoles d' $O_2^{\cdot(-)}$ /ml/min en tant que moyennes  $\pm 1$  écart-type ( $n=3$ ) pour les PMN en suspension et pour une valeur pour les PMN co-incubés avec les veines.

alors qu'elle est seulement de 0,657 nanomoles/ml/min pour les PMN co-incubés avec la veine maintenue en normoxie. On peut également remarquer que la quantité de radicaux superoxydes produite par la suspension de PMN contenant du calcium (0,640 nanomoles/ml/min) est de même ordre de grandeur que celle produite basalement par la suspension de PMN co-incubés avec la veine normoxique et légèrement supérieure à la quantité produite par les PMN mis en suspension dans du HBSS sans calcium (0,412 nanomoles/ml/min). Ceci suggère qu'en conditions normoxiques, la production d' $O_2\cdot(-)$  par les PMN est la même que ce soit lorsqu'ils sont co-incubés ou non avec l'endothélium de la veine. Par ailleurs, pour pouvoir estimer l'importance de la stimulation des PMN en présence de veines pré-incubées en condition d'hypoxie, nous avons comparé cette production de radicaux superoxydes à celle obtenue en présence de stimulateurs connus comme le fMLP. La quantité d' $O_2\cdot(-)$  produite par les PMN co-incubés avec la veine hypoxique n'est que de deux fois inférieure à celle obtenue lors de la stimulation optimale en présence de fMLP. Il faut remarquer que lorsqu'on réalise la stimulation avec le fMLP, tous les PMN de la suspension répondent à ce stimulus c'est-à-dire 5 millions de PMN. Lorsqu'on incube les PMN en présence de la veine saphène et si les mêmes mécanismes que ceux mis en évidence sur les HUVEC *in vitro* sont mis en jeu, seules les PMN adhérents sont activés, ce qui correspond également à environ 5 millions de PMN. La production d' $O_2\cdot(-)$  observée dans le cas des PMN co-incubés avec la veine saphène est donc proportionnellement très importante puisqu'elle n'est que de deux fois inférieure à celle obtenue pour une stimulation optimale avec le fMLP.

Deux expériences similaires ont été également réalisées pour un temps d'incubation de la veine sous hypoxie plus court: 60 min et des temps de co-incubation des PMN de 30 et 60 min. On observe en effet déjà à ce moment une augmentation de l'adhérence des PMN (voir figure III.8) et ce temps se rapproche probablement plus de la durée physiologique d'une stase veineuse chez un patient. Les figures III.22 A et B montrent que les PMN co-incubés en présence d'une veine préalablement incubée 60 min sous hypoxie sont déjà activés puisqu'ils produisent une quantité d' $O_2\cdot(-)$  plus de deux fois supérieure à celle observée dans les veines normoxiques. Cette production est quantitativement importante si on la compare à celle obtenue lors d'une stimulation avec le fMLP.

L'ensemble de ces résultats suggère donc que les cellules endothéliales hypoxiques sont non seulement capables d'induire une



A

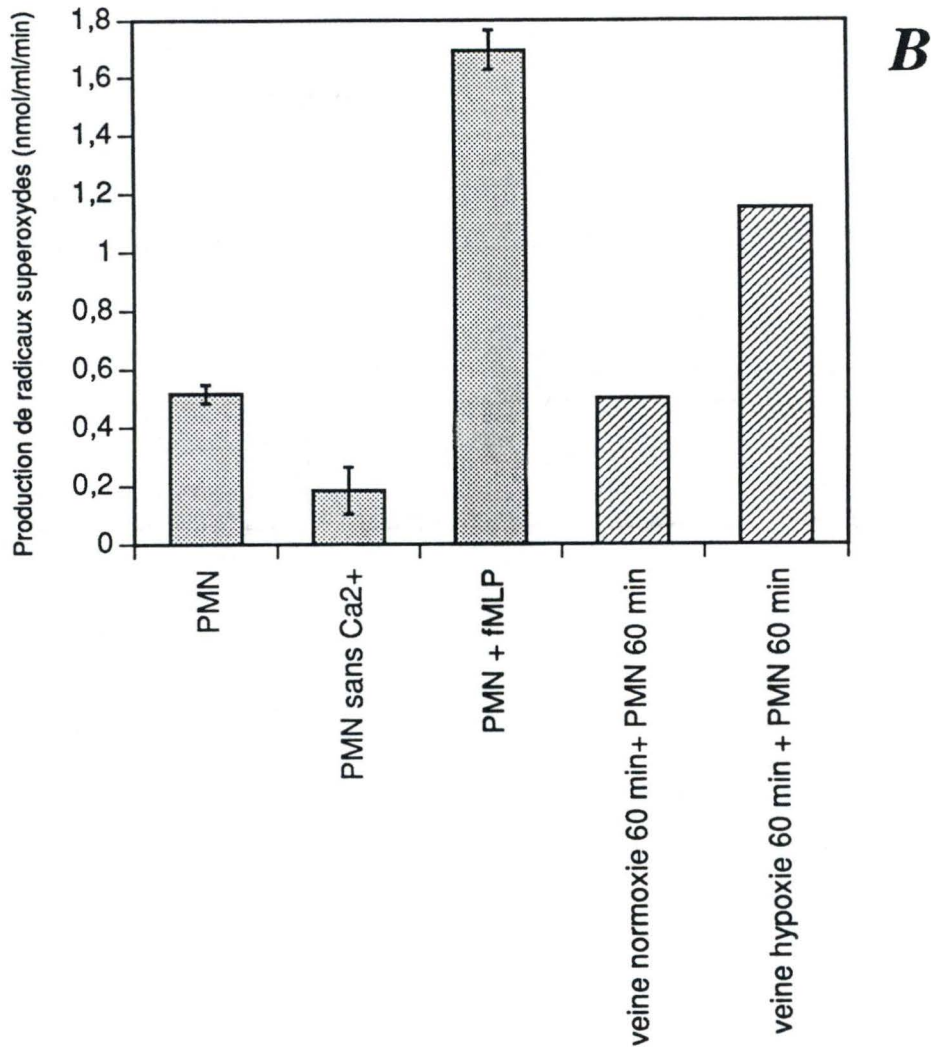


Figure III.22: Mesure de la production de radicaux superoxydes par les PMN humains ( $5 \cdot 10^6$  cellules) co-incubés pendant 30 (A) ou 60 (B) min avec les veines saphènes humaines pré-incubées en normoxie ou en hypoxie pendant 60 min. La production de radicaux superoxydes par des PMN mis en suspension en présence ou en absence de calcium (1 mM) ou par des PMN stimulés pendant 30 (A) ou 60 (B) min par le fMLP ( $10^{-7}$ M) est également présentée. Les résultats sont exprimés en nanomoles d' $O_2 \cdot (-)$ /ml/min en tant que moyennes  $\pm 1$  écart-type ( $n=3$ ) pour les PMN en suspension et pour une valeur pour les PMN co-incubés avec les veines.

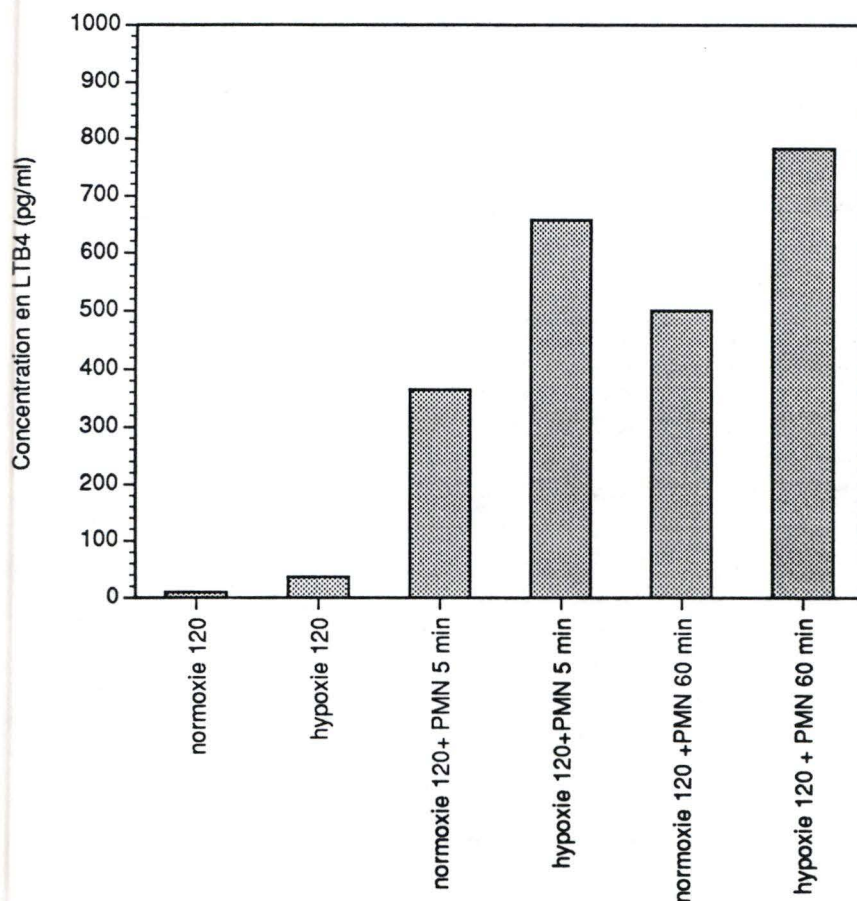


Figure III.23: Mesure de la production de LTB<sub>4</sub> par des PMN humains ( $5 \cdot 10^6$ ) co-incubés pendant 5 ou 60 min avec des veines saphènes humaines préalablement incubées en normoxie ou en hypoxie pendant 120 min. La production de LTB<sub>4</sub> par des veines saphènes seules incubées en normoxie ou en hypoxie pendant 120 min est également présentée. Les résultats sont exprimés en pg/ml pour n= 1 excèpté pour les tests normoxie et hypoxie 120 min + PMN 60 min (n= 2).

adhérence des PMN mais aussi d'activer directement ces leucocytes au cours de cette adhérence.

### III.2. Production de leucotriène B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>)

En plus de la production de radicaux superoxydes, d'autres voies métaboliques peuvent être stimulées lors de l'activation des PMN. A la base d'une de ces voies métaboliques, se trouve la phospholipase A<sub>2</sub>, qui lorsqu'elle est activée, clive les phospholipides membranaires en position sn-2 et libère l'acide arachidonique et d'autres acides gras insaturés. L'acide arachidonique libéré peut alors être transformé par deux voies métaboliques, celle des cyclooxygénases (Cox-1 et Cox-2) pour donner les prostaglandines et celle de la 5-lipoxygénase pour former les leucotriènes (Boltman et al, 1983). Le médiateur principal dérivé de l'acide arachidonique dans les PMN est le LTB<sub>4</sub>. C'est donc la production de celui-ci que nous avons recherchée comme indicateur supplémentaire de l'activation des PMN co-incubés avec des veines saphènes préalablement soumises à l'hypoxie.

Nous avons d'abord mesuré la production de LTB<sub>4</sub> dans les milieux conditionnés de veines saphènes incubées en hypoxie ou en normoxie. On observe que cette production par une veine maintenue tout simplement en normoxie (9,817 pg/ml) et par une veine incubée en hypoxie (35,993 pg/ml) pendant 120 min est très faible (Fig III.23). Par contre, la quantité de LTB<sub>4</sub> libérée par les PMN co-incubés avec des veines préalablement soumises à 120 min de normoxie ou d'hypoxie est beaucoup plus importante. De plus, la concentration en LTB<sub>4</sub> mesurée en condition d'hypoxie est nettement supérieure à celle mesurée en condition de normoxie et ce déjà après 5 min de co-incubation. Une prolongation de cette co-incubation de 5 à 60 min n'augmente que légèrement la production de LTB<sub>4</sub>. Rappelons également que le temps de co-incubation des PMN n'a que peu d'effet sur le nombre de PMN adhérents à l'endothélium de la veine hypoxique (voir figure III.19). Ces résultats suggèrent que l'activation des PMN dans de telles conditions est très rapide (voir figure III.9). On peut donc penser que l'augmentation de la production de LTB<sub>4</sub> par les PMN est le résultat de l'activation des PMN déjà adhérents après 5 min et non le résultat d'une augmentation du nombre de PMN qui adhèrent et s'activent au cours du temps.

### III.3. Discussion

Les résultats que nous venons de décrire montrent clairement que l'activation de l'endothélium des veines saphènes par l'hypoxie conduit à une activation subséquente des PMN co-incubés en leur présence. En effet, nous avons montré que dans ces conditions, les PMN adhérents produisent plus de radicaux superoxydes et de leucotriène B<sub>4</sub> que s'ils sont co-incubés avec une veine saphène normoxique. De plus, morphologiquement, ils présentent de nombreux replis membranaires signe de cette activation.

D'autres études réalisées au laboratoire montrent que l'adhérence des PMN aux cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine activées par l'hypoxie *in vitro* conduit aussi à une activation des PMN eux-mêmes. Cette activation résulte du processus d'adhérence en soi probablement via la liaison des CD18/CD11b des PMN aux ICAM-1 des cellules endothéliales. Une fois adhérents aux cellules endothéliales, la concentration en calcium cytosolique dans ces PMN augmente, ce qui pourrait alors activer la phospholipase A<sub>2</sub>, la synthèse de leucotriènes B<sub>4</sub> et la NADPH oxydase et donc la libération de radicaux libres par les PMN. Une des conséquences de cette activation des PMN est qu'ils induisent une cytotoxicité au niveau des HUVEC auxquelles ils adhèrent (Arnould et al, 1994).

Par ailleurs, on peut observer sur les micrographies en microscopie électronique à balayage un changement de forme de certains PMN qui deviennent alors nettement polarisés par l'émission de pseudopodes. Ce processus constitue la première étape de diapédèse. En effet, pour pouvoir s'infiltrer, les PMN devront d'abord adhérer à l'endothélium, s'aplatir et puis émettre des bras cytoplasmiques (pseudopodes) et enfin s'infiltrer lorsqu'ils atteignent un site de migration. Ce processus de transfert des neutrophiles du compartiment vasculaire aux tissus sous-endothéliaux est contrôlé d'une part par les intégrines de la surface des PMN en cours de migration, qui leur permettent d'interagir avec les cellules endothéliales et d'autre part par un gradient de facteurs chimiotactiques (Anderson et al, 1991).

Kuijpers et al (1992) ont montré que les cellules endothéliales pourraient également jouer un rôle dans la diapédèse grâce à leur rétraction et leur changement de forme suite à la phosphorylation des chaînes légères de myosine par des kinases.

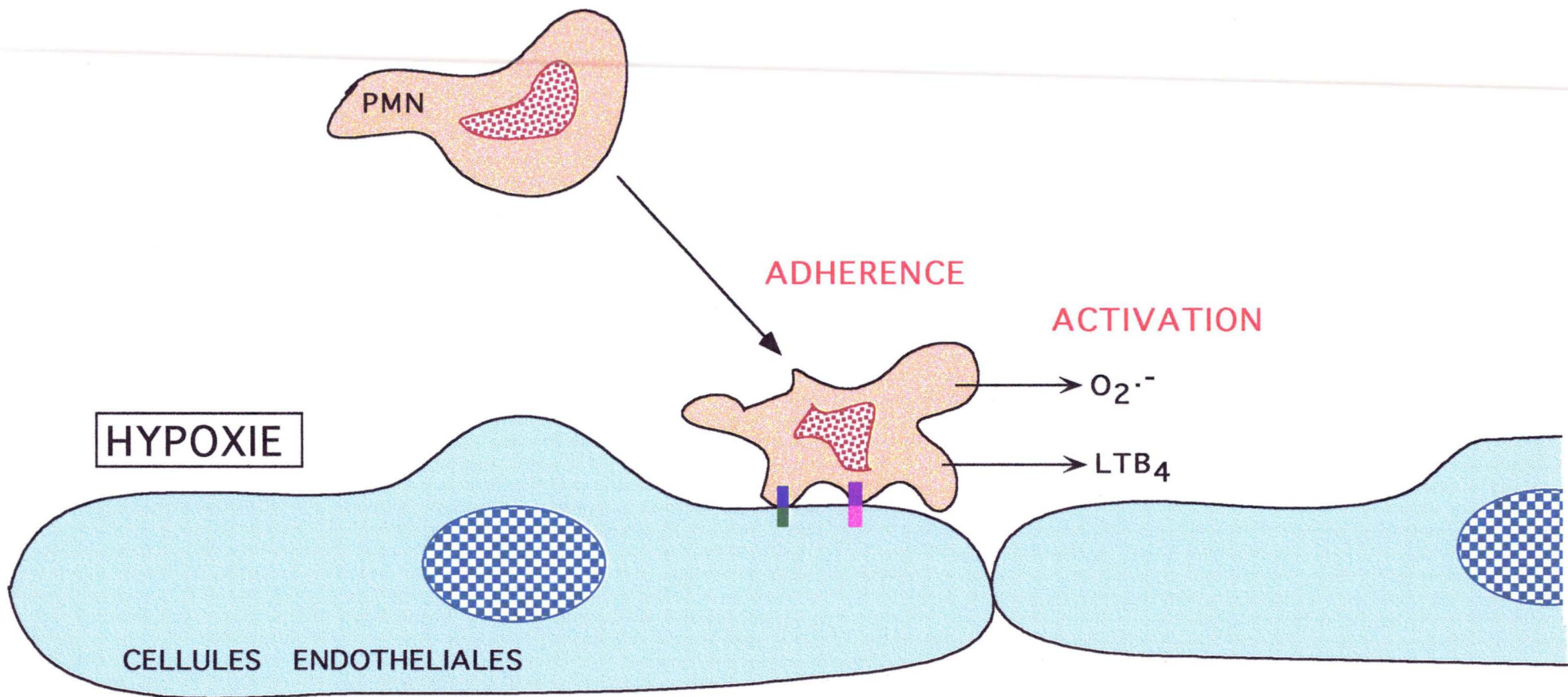
La migration des PMN se poursuit par l'allongement et la ramification du pseudopode jusqu'à ce que le corps cellulaire en entier franchisse l'endothélium. Le passage est rapide et résulte de changement dans l'expression des molécules d'adhérence des neutrophiles qui réduisent leur adhérence à l'endothélium et se lient aux composants de la membrane basale.

Si on transpose ces résultats *in vivo*, on peut imaginer retrouver des PMN activés et infiltrés dans les tissus sous-endothéliaux où ils induiront des dommages importants par leur relargage de radicaux libres et recrutement de nouveaux leucocytes par leur sécrétion de LTB<sub>4</sub>, qui est un chémoattractant puissant. L'hypoxie à elle seule serait donc capable d'activer les cellules endothéliales, d'induire de profonds changements dans les différentes fonctions de ces cellules et d'engendrer le développement d'un foyer inflammatoire. Elle pourrait donc être à l'origine des processus pathologiques observés dans les maladies variqueuses.

## CHAPITRE IV: CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

De nombreux travaux ont déjà été réalisés sur les maladies vasculaires car elles touchent une proportion élevée de la population des sociétés occidentales. Celles-ci peuvent être de nature très différente comme les maladies vasculaires périphériques telles que les artérites, les thromboses, les infarctus du myocarde, les ischémies cérébrales ou les insuffisances veineuses. Cependant, toutes possèdent une caractéristique commune: il s'agit de l'ischémie. A un moment ou à un autre, le tissu atteint souffre d'un déficit de l'apport sanguin, qui résulte en une diminution partielle ou totale de l'apport en oxygène et en nutriments et occasionne une souffrance du tissu qui n'est plus irrigué. Un deuxième point commun entre ces maladies est le rôle joué par les cellules endothéliales, qui de part leur localisation à l'interface sang-tissu, sont directement exposées aux cellules inflammatoires et les premières à être atteintes par les variations de la concentration en oxygène dans les tissus (Suval et al, 1987).

Contrairement aux observations réalisées dans les artères lors du développement de lésions athéromateuses où certaines zones de l'artère sont dépourvues de cellules endothéliales, et donc de ses protections vis-à-vis des cellules sanguines, il n'y a pas de perte de la barrière endothéliale dans la pathologie veineuse comme nous avons pu l'observer sur les coupes (Fig III.5). Cependant, le métabolisme et la vitesse de division des cellules composant la média de la veine sont modifiés, ainsi que la structure du tissu interstitiel. La question de l'explication de ces modifications apparaissant à l'intérieur du tissu variqueux alors que l'endothélium ne paraît pas altéré, est posée depuis longtemps et constitue en fait la question de l'étiologie de la pathologie veineuse.



**Figure IV.1: Schéma résumant les processus d'adhérence et d'activation des PMN par l'endothélium de la veine saphène incubée sous hypoxie.**

■ récepteur au PAF lié au PAF

■ CD18/CD11b lié à ICAM-1

Dans la première partie de notre travail, nous avons cherché avec diverses techniques morphologiques, à étudier la structure de la paroi des veines saphènes en conditions normales et variqueuses. Nous avons ainsi pu constater que lors de la pathologie variqueuse, la paroi vasculaire subit un réarrangement important. L'endothélium bien que fortement replié, reste intact mais la média quant à elle, subit un remaniement profond. Les cellules musculaires lisses prolifèrent et se caractérisent par une synthèse accrue des constituants de la matrice extracellulaire, en particulier la synthèse du collagène. Tout ceci conduit à l'épaississement de la partie supérieure de la média, à la désorganisation de la structure tissulaire et à la baisse du tonus de la veine.

Comme nous l'avons signalé à plusieurs reprises, ce serait l'activation des cellules endothéliales par l'hypoxie qui constitue la première étape pariétale de la maladie veineuse au cours de laquelle sont synthétisés prostaglandines et PAF, médiateurs pro-inflammatoires expliquant les phénomènes douloureux et inflammatoires observés lors de cette affection. Cette même activation des cellules endothéliales par l'hypoxie entraîne via la synthèse du PAF, l'adhérence subséquente de certains leucocytes ainsi qu'une prolifération des cellules musculaires lisses de la média due à la libération de prostaglandines. Ces événements initieraient la cascade d'événements conduisant finalement à une situation pathologique telle celle que nous avons observée dans la paroi de la veine variqueuse. Ce processus est repris schématiquement à la figure IV.1.

Une des étapes principales de cette cascade de processus conduisant à l'altération de la paroi veineuse est l'augmentation induite par l'hypoxie de l'adhésivité des cellules endothéliales pour les polymorphonucléaires neutrophiles. L'étude de l'influence de l'hypoxie sur les interactions entre l'endothélium des veines saphènes et les polymorphonucléaires neutrophiles a fait l'objet de la seconde partie de notre travail.

Nous avons alors pu montrer en incubant des fragments complets de veines saphènes en hypoxie pendant des temps croissants que l'adhérence des PMN non activés à l'endothélium des veines saphènes augmente considérablement, et ce, d'autant plus que le temps d'incubation en hypoxie est long. De plus, nous avons montré grâce à la stimulation de l'endothélium veineux par l'interleukine  $-1\beta$  recombinante humaine une forte augmentation de l'adhérence des PMN. Cette augmentation résulte de l'effet de l'interleukine- $1\beta$  qui augmente l'expression de glycoprotéines d'adhésion à la surface de l'endothélium veineux tels que

ICAM-1 et ELAM-1 qui vont alors fixer les neutrophiles. Quantitativement, l'adhérence induite par l'hypoxie est du même ordre de grandeur que celle induite par cette cytokine, ce qui indique l'importance de l'activation des cellules endothéliales induite par l'hypoxie. Les observations morphologiques réalisées en parallèle avec ces études biochimiques nous ont permis de visualiser le phénomène d'adhérence des neutrophiles à la surface de l'endothélium veineux.

Nous avons également montré que l'adhérence des PMN à l'endothélium des veines saphènes pré-incubées en hypoxie, est considérablement inhibée par le WEB2086 (antagoniste du récepteur au PAF), par l'acide oléique (inhibiteur de la synthèse de PAF) et par l'anticorps monoclonal anti-ICAM-1. En comparaison avec les travaux réalisés au laboratoire sur la veine ombilicale complète et sur les cellules endothéliales isolées, ces résultats montrent que le même mécanisme biochimique est mis en jeu dans les trois modèles expérimentaux, c'est-à-dire que le PAF joue un rôle important dans l'initiation de l'adhérence des PMN aux cellules endothéliales qui se renforce alors via la liaison de leurs intégrines CD11b/CD18 aux molécules d'ICAM-1 exprimées à la surface des cellules endothéliales. Il faut cependant noter que la cinétique de production de PAF et donc des différents mécanismes sous-jacents ce processus d'adhérence, serait différente dans les trois cas (voir figure III.19).

Nous avons ensuite constaté au cours des observations morphologiques que les PMN adhérents à l'endothélium des veines saphènes préalablement incubées en hypoxie, montrent une surface rugueuse caractérisée par la présence de nombreux replis membranaires qui témoignent de leur état activé. Nous avons alors cherché par des moyens biochimiques à confirmer l'activation de ces PMN après leur adhérence. A cette fin, nous avons mesuré deux paramètres marqueurs de cette activation. Nous avons ainsi pu observer la libération d'une grande quantité de radicaux superoxydes et une synthèse importante de leucotriène B<sub>4</sub> par ces cellules. Ces dernières observations sur la veine saphène correspondent parfaitement au processus mis en évidence *in vitro* sur les cellules endothéliales. La figure IV.1 résume ces observations.

L'adhérence des neutrophiles à l'endothélium de veines saphènes hypoxiques, leur activation avec libération de radicaux libres et de médiateurs de l'inflammation, et leur éventuelle infiltration subséquente miment probablement très bien ce qui se passe *in vivo* lors de la stase veineuse conduisant ainsi aux agressions pariétales, qui à force d'être répétées, vont conduire à la destruction de certains constituants de

la matrice extracellulaire comme le collagène et à l'épaississement de la paroi des veines variqueuses telle que nous l'avons montré dans la première partie de ce travail.

L'hypothèse que nous proposons selon laquelle le processus d'activation des cellules endothéliales induite par l'ischémie locale résultant de la stase veineuse pourrait être une origine possible du développement de la paroi variqueuse, semble en accord avec les données de la littérature obtenues *in vivo*. Cependant, il est à remarquer que dans notre étude, l'effet direct de l'hypoxie sur les neutrophiles eux-mêmes n'a pas été pris en compte. En effet, certains résultats préliminaires semblent suggérer que l'hypoxie pourrait activer directement les neutrophiles et donc aggraver le processus de désorganisation de la paroi veineuse.

Dans notre travail, nous n'avons pas non plus tenu compte ni de la participation éventuelle d'autres types cellulaires sanguines comme les plaquettes, les monocytes, ou les lymphocytes, connus également pour leur réaction au PAF et aux autres médiateurs de l'inflammation relargués par les cellules endothéliales activées par l'hypoxie, ni de changements dans le flux sanguin et donc dans l'intensité des forces de cisaillement que subissent les cellules endothéliales. Ces différents événements se superposent probablement à ceux que nous venons de mettre en évidence pour amplifier les altérations de la paroi veineuse et finalement conduire à la formation d'une varice.

## **PERSPECTIVES**

Dans la dernière partie de notre travail, nous avons mis en évidence une activation des PMN adhérents à l'endothélium de la veine saphène préalablement incubée sous hypoxie. De plus, morphologiquement, certains de ces PMN présentent une polarisation signe de leur migration. Comme ce changement de forme est décrit comme étant la première étape de leur infiltration par diapédèse dans les tissus sous-endothéliaux, il est nécessaire de poursuivre ces études afin de mettre directement en évidence cette infiltration. Pour ce faire, on pourrait réaliser des coupes à congélation de veines hypoxiques co-incubées avec les PMN. Il est nécessaire d'utiliser ces coupes à congélation car nous avons remarqué que la fixation à température ambiante par le

Bouin couramment utilisée pour les études en microscopie optique semble détacher les PMN qui adhèrent à l'endothélium. Afin d'augmenter les chances de repérer ces PMN infiltrés, deux approches complémentaires peuvent être suivies c'est-à-dire, réaliser soit des coupes sériées soit un marquage histochimique de la myéloperoxydase ou en immunofluorescence d'un antigène spécifique des PMN. Il faut remarquer qu'il sera en outre peut être nécessaire de faire varier les conditions expérimentales de co-incubation des PMN avec la veine saphène hypoxique afin de favoriser cette infiltration.

Par ailleurs, une grande quantité d'enzymes lysosomiales est retrouvée au sein des couches cellulaires sous-jacentes aux cellules endothéliales des veines variqueuses par rapport aux veines normales (Niebes, 1977). Ces enzymes sont relarguées par les PMN activés. Leur présence dans le tissu veineux variqueux peut donc être facilement expliquée puisque nous avons montré expérimentalement que l'adhérence des PMN à l'endothélium des veines saphènes hypoxiques, entraîne leur propre activation. On peut également penser que leur infiltration dans le tissu sous-jacent est aussi une conséquence de cette adhérence. Une fois dans la média et par suite de leur activation, ils y relargueraient leurs protéases par dégranulation. Il serait donc intéressant de poursuivre les études histologiques par des marquages histochimiques au sein de la paroi veineuse à fin de mettre en évidence l'activité des enzymes lysosomiales, et en même temps retrouver une altération de la structure du collagène qui résulterait de l'action de ces protéases.

La totalité de notre étude a été réalisée sur des fragments complets de veines saphènes humaines. Afin de compléter ces études, l'étude *in vitro* des effets directs de l'hypoxie sur des cellules endothéliales isolées à partir de la veine saphène et dans un deuxième temps, la comparaison de la sensibilité à l'hypoxie de ce type de cellules à celle déjà observée chez les cellules endothéliales de la veine ombilicale classiquement utilisées pourrait apporter des renseignements supplémentaires quant à la cinétique de l'effet de l'hypoxie sur la veine saphène. L'organoculture de morceaux de veines saphènes serait également un modèle de choix pour étudier les désorganisations pariétales éventuellement induite par l'hypoxie.

Enfin, ces études pourraient déboucher sur des travaux de pharmacologie. En effet, si l'hypoxie que les médecins connaissent bien sous le terme de stase veineuse, est une raison suffisante pour déclencher la pathologie veineuse et que celle-ci passe d'abord par l'activation des cellules endothéliales de la veine puis se poursuit par l'augmentation de

l'adhésivité des des cellules endothéliales pour les neutrophiles, on pourrait tester différents médicaments phlébotoniques sur l'inhibition de ces processus au cours de l'incubation de la veine saphène en hypoxie. En effet, de nombreuses études pharmacologiques ont été réalisées au laboratoire sur des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine à la fois en culture et sur la veine complète. Certains médicaments furent particulièrement étudiés et se sont avérés très efficaces : l'extrait de Ginkgo biloba (Michiels et al, 1991), le naftidrofuryl, le Réparil et le Venoruton qui ont des effets inhibiteurs *in vitro* aux concentrations mesurées dans le sang lors de leur usage thérapeutique. Ces préparations peuvent inhiber fortement, et avec un effet dépendant de la dose, les différents évènements de la cascade d'activation des cellules endothéliales. Il a également été montré au laboratoire qu'un autre médicament dérivé du Ginkgo biloba, le Ginkor fort, couramment utilisé dans le traitement des pathologies veineuses, inhibe à 70 % l'adhérence des neutrophiles induite par l'hypoxie que ce soit *in vitro* ou sur le modèle de la veine ombilicale complète (Michiels et al, 1994a).

L'effet de ces différents médicaments a fait l'objet d'études préliminaires. C'est en prévenant la chute de la concentration en ATP, probablement en préservant la fonction respiratoire des mitochondries au début de l'hypoxie (Janssens et al, 1995), que ces substances préviennent les événements subséquents de la cascade d'activation des cellules endothéliales sous hypoxie et donc notamment la synthèse de PAF diminuant ainsi leur adhésivité vis-à-vis des PMN. Ce qui pourrait alors apporter une explication rationnelle de l'effet thérapeutique potentiel de ces médicaments.

Dans une telle approche pharmacologique, il serait plus intéressant d'utiliser les cellules endothéliales des veines saphènes humaines, car elles proviennent des territoires directement impliquées dans la pathologie variqueuse.

# **BIBLIOGRAPHIE**

**Albelda S. M.**

Endothelial and epithelial cell adhesion molecules.  
Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 4 (1991) 195-203.

**Anderson B. O., Brown J. M., Shanley P. F. and D. D. Bernard.**

Marginating neutrophils are reversibly adherent to normal lung endothelium.  
Surg., 109 (1991) 51-61.

**Arnould T., Michiels C., Alexandre I. and J. Remacle.**

Effet of hypoxia upon intercellular calcium concentration of human endothelial cells.  
J. Cell. Physiol, 152 (1992) 215-221.

**Arnould T., Michiels C. and J. Remacle.**

Increased PMN adherence on endothelial cells after hypoxia, involvement of PAF, CD18 /CD11b, and ICAM-1.  
Am. J. Physiol., 264 (1993) C1102-C1110.

**Arnould T., Michiels C. and J. Remacle.**

Hypoxic human umbilical vein endothelial cells induce activation of adherent polymorphonuclear leukocytes.  
Blood, 83 (1994) 3705-3716.

**Arnould T., Michiels C., Janssens D., Delaive E. and J. Remacle.**

Hypoxia induces PMN adherence to umbilical vein endothelium.  
Cardiovasc. Res. (1995) sous presse.

**Arnouldi C. C. and M. H. Linderhoul.**

Venous pressure in the lower limb at rest and during exercise in patients with idiopathic dysfunction on the venous pump of the calf.  
Acta Chir. Scand., 135 (1969) 601-609.

**Babior B. M.**

The respiratory burst of phagocytes.  
J. Clin. Invest., 73 (1984) 599-601.

**Babior B.M.**

The respiratory burst oxidase.  
Trends Biochem. Sci., 12 (1987) 241-243.

**Babitt D. G., Forman M. B., Jones R., Bajaj A. K. and R. L. Hoover.**

Prevention of neutrophil-mediated injury to endothelial cells by perfluorochemicals.  
Am. J. Pathol., 136 (1990) 451-459.

**Baggiolini M. and M. Wymann.**

Turning on the respiratory burst.  
Trends Biochem. Sci., 15 (1990) 69-72.

**Barbier A., Carpentier P. and M. Finet.**

Hémodynamique veineuse des membres inférieurs.  
Presse Méd., 23 (1994) 206-212.

**Beaglehole R.**

Epidemiology of varicose veins.  
World J. Surg., 10 (1986) 898-902.

**Bellavite P.**

The superoxide-forming enzymatic system of phagocytes.  
Free Rad. Biol. Med., 4 (1988) 225-261.

**Berridge M. J. and R. F. Irvine.**

Inositol phosphates and cell signalling.  
Nature, 341 (1989) 197-205.

**Bloy C. and Secchi J.**

Mise au point d'un modèle d'étude du rôle de l'hypoxie sur la cellule endothéliale.  
Sang, Thrombose et veine, 3 (1994) 43-49.

**Boltman F., Castes De Paulet A. and L. Simon.**

in: Biochimie de l'inflammation. Ed Masson (1983).

**Borashi D., Rambaldi A., Sica A., Ghiara P., Wang J. M., De Rossi M., Zoia C., Remuzzi G., Bussolino F., Scapigliati G., Stoppcciaro A., Ruco I., Tagliabue A. and A. Mantovani.**

Endothelial cells express the interleukin-1 receptor type 1.  
Blood, 78 (1991) 1262-1267.

**Bouissou H.**

Les aspects tissulaires de la veine interne normale, vieille et variqueuse.  
Artères et Veines, 7 (1988) 432-435.

**Boyum A.**

Isolation of lymphocytes, granulocytes, and macrophages.  
Scand J. Immunol., 5 (1976) 9-15.

**Brown G. B. and J. A. Roth.**

Composition of the response of bovine and human neutrophils to various stimuli.  
Vet. Immunol. Immunopathol., 28 (1991) 201-218.

**Browse N. L. and K. G. Burnand.**

The cause of venous ulcerations.  
Lancet, 11 (1982) 243-245.

**Callam M.**

Prévalence of chronic leg ulceration and severe chronic venous diseases.  
Phlebology, in Western contries, 1 (1992) 6-12.

**Carlos T. M. and J. M. Harlan.**

Membrane proteins in phagocyte adherence to endothelium.  
Immunol. Rev., 114 (1990) 5-28.

**Carpentier P. and P. Pirollet.**

Epidémiologie de l'insuffisance veineuse chronique.  
Press. Méd., 23 (1994) 197-201.

**Chamley-Campbell J., Campbell G. R. and R. Ross.**

The smooth muscle cells in culture.  
Physiol Rev, 59 (1979).

**Charles A. and G. A. Gresham.**

Histopathologicals changes in venous graft and in varicose and non-varicose veins.  
J. Clin. Pathol, 46 (1993) 603-606.

**Christianssen N. O., Larsen C. S. and V. Esmann.**

A Study on the role of protein kinase C and superoxide generation.  
Biochim. Biophys. Acta, 971 (1988) 317-324.

**Cornu T. A.**

The role of heredity in the varicose vein disease: a case control study .  
Proceedings of the 5th annual Congress of the North American Society of Phlebology. San Francisco, (1990) 23-25.

**Cryer A.**

Scale and diversity of interaction at the endothelium.  
in: Biochemical interaction at the endothelium.  
Ed by Cryer. Elsevier. Amsterdam (1983) 1-3.

**Dinnerman J. L. and J. L. Mehta.**

Endothelial, platelet and leukocyte interaction in ischemic heart disease: insigth into potential mechanism and their clinical relevance.  
J. Am. Cardiol., 16(1990) 207-222.

**Engler R. L.**

Free radical and granulocyte-mediated injury in myocardial ischemia and reperfusion.  
Am. J. Cardiol., 63 (1989) 19-23.

**Flaherty J. T. and M. L. Weisfeld.**

Reperfusion injury.  
Free Rad. Biol. Med., 5 (1988) 409-419.

**Freischlag J. A. and D. Hanna.**

Neutrophil (PMN) phagocytosis and chemotaxis after 2 hr of ischemia.  
J. Surg. Res., 50 (1991) 648-652.

**Gabe M.**

Techniques histologiques.  
Edition Masson & Cie, Paris. (1968).

**Gartner L. P. and J. L. Hiatt.**

Atlas d'histologie en couleur.  
Département d'anatomie, Université du Maryland, Edition De Boeck,  
Bruxelles. (1992).

**Gasling J. A. et al.**

Atlas of human anatomy with integrate text  
Copyright by Bower Medical Publishing Ltd, (1985).

**Gerard C., McPhail L. C., Marft A., Stilmer-Gerard N.P., Bass D. A. and C. E. Mc Call.**

Role of protein kinase in stimulation of human polymorphonuclear leukocyte oxidative metabolism by various agonists.  
J. Clin. Invest., 77 (1986) 61-65.

**Gibbons G. H and V. J. Dzau.**

Endothelial function in vascular remodeling  
in : The endothelium: an introduction to current research.  
Ed by J. B. Warren, Wiley-Liss, New York (1990) 81-83.

**Granger D. N., Kvietys P. R. and M. A. Perry.**

Leucocyte endothelial cell adhesion induced by ischemia and reperfusion.  
Can. J. Physiol. Pharmacol. 71 (1993) 67-75.

**Griton P. and L. R. Widmer.**

Classification des varices et de l'insuffisance veineuse.  
J. Mal. Varic., 17 (1992) 102-108.

**Harlan J. M.**

Leukocyte-endothelial interactions.  
Blood, 65 (1985) 513-525.

**Haumont S.**

Histologie générale.  
Edition Acco, Louvain, (1976).

**Hawrylowicz C. M., Howells G. L. and M. Feldman.**

Platelet-derived interleukin-1 induces human endothelial adhesion molecule expression and cytokine production.  
J. Exp. Med., 174 (1991) 785-790.

**Heller R., Bussolino F, Ghigo D., Garbarino G., Pescarmona G. and A. Bsia.**

Nitrovasculatators inhibit thrombin-induced platelet-activating factor synthesis in human endothelial cells.

Biochem. Pharmacol., 44 (1992) 223-229.

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

Principles of pathobiology.

Oxford University Press, London (1980) 30-35.

**Hirafuji M., Mencia-Huerta J. M. and J. Beneveniste.**

Regulation of PAF-acether (platelet-activating factor) biosynthesis in culture human vascular endothelial cells stimulated with thrombin.

Biochim. Biophys. Acta, 930 (1987) 359-369.

**Horowitz M. A.**

Phagocytosis of microorganismes.

Rev. Inf. Dis., 4(1982) 104-108.

**Jaffe E. A.**

Physiologic function of normal endothelial cells.

Ann. N. Y. Acad. Sci., 454 (1985) 279-291.

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

Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins.

J. Clin. Invest., 52 (1973) 2745-2756.

**Janbon C.**

Obésité et pathologie de la circulation de retour.

Solal., Marseille (1990).

**Janssens D., Michiels C., Delaive E., Eliaers F., Drieu K. and J. Remacle.**

Protection of hypoxia-induced ATP decrease in endothelial cells by Ginkgo biloba extract and bilobalide.

Bioch. Pharmacol., 50 (1995) 991-999.

**Jordan S., Poper J. S. and S. Cotran.**

Cytokines and endothelial cell biology.

Physiol. Rev., 70 (1990) 427-449.

**Junqueira L. C and J. Carneiro.**

Histology, 3rd edition

Lange Medical Publication. USA, Los Altos, Californie., (1987) 256-269.

**Kehler J. P., Jones D. P., Lemaster J. J., Faber J. L. and H. Jaeschke.**

Mechanism of hypoxic cell injury.

Toxicol. Appl. Pharmacol., 106 (1990) 165-178.

**Kuijpers T. W., Hakkert B. C., Hart M. H. L. and D. Roos.**  
Neutrophils migration across monolayers of cytokine-prestimulated endothelial cells: a role for platelet-activating factor and IL-8.  
*J. Cell Biol.*, 148 (1992) 565-572.

**Kubik S.**  
Das venensystem der unteren extremität.  
*Informierte Artz*, 4 (1985) 31-48.

**Lengyell I. and G. Acsady.**  
Histomorphological and pathobiochemical changes of varicose veins. A possible explanation of the development of varicose veins.  
*Acta Morphol Hung.*, 38 (1990) 259-267.

**Lucchesi B. R.**  
Modulation of leukocyte-mediated myocardial reperfusion injury.  
*Ann. Rev. Physiol.*, 52 (1990) 4697-4699.

**Maillet M and D. Chiarasini.**  
Histologie spéciale humaine (2)  
ed by Breal. *Medecin-deug*, Montreuil (1985) 51-75

**Mc Cord J. M. and I. Fridovich.**  
Superoxyde dismutase. An enzymatic fonctuion for erythrocuprein (hemocuprein).  
*J. Biol. Chem.*, 244 (1969) 6049-6055.

**Maruo N. Morita I., Ishizaki Y. and S. I. Murota.**  
I nhibitory effect of interleukin-6 on prostaglandin 12 production in cultured bovine vascular endothelial cells.  
*Arch. Biochem. Biophys.*, 292 (1992) 600-604.

**Michiels C., Arnould T., Houbion A. and J. Remacle.**  
Etude de l'effet protecteur des différents plébotoniques sur les cellules endothéliales en hypoxie.  
*Plébiologie*, 44 (1991) 779-786.

**Michiels C., Arnould T., Houbion A. and J. Remacle.**  
Human endothelial cells submitted to hypoxia-reoxygenation: implication of free radicals, xanthine oxidase and energy deficiency.  
*J. Cell Physiol.*, 153 (1992) 53-61.

**Michiels C., Arnould T., Knott I., Dieu M. and J. Remacle.**  
Stimulation of prostaglandin synthesis by human endothelial cells exposed to hypoxia.  
*Am. J. Physiol.*, 264 (1993a) C866-C874.

**Michiels C., Arnould T. and J. Remacle.**  
Hypoxia-induced activation of endothelial cells as possible cause of venous diseases: hypothesis.  
*Angiology*, 44 (1993b) 643-646.

**Michiels C., Arnould T., Janssens D. and J. Remacle.**

Adhérence des neutrophiles à l'endothélium veineux: stimulation par l'hypoxie et effet de Ginkor FORT\*.  
Act. Vasc. Int, 24 (1994a) 26-31.

**Michiels C., Arnould T. and J. Remacle.**

Rôle-clé de l'hypoxie et des cellules endothéliales dans le développement des veines variqueuse.  
Méd/Sci., 10 (1994b) 845-853.

**Michiels C., De Leener F., Arnould T., Dieu M. and J. Remacle**

Hypoxia stimulates human endothelial cells to release smooth muscle cell mitogens: role of prostaglandins and bFGF.  
Exp. Cell Res., 13 (1994c) 43-54.

**Molony L. and L. Armstrong.**

Cytoskeletal reorganisation in human umbilical vein endothelial cells as a result of cytokine exposure.  
Exp. Cell Res., 196 (1991) 40-48.

**Moncada S., Palmer R. M. J. and E. A. Higgs.**

Nitric oxide: the endogenous regulation of vascular tone.  
in : The endothelium: an introduction to current research.  
Ed by Warren J. B., Wiley-Liss, New York (1990) 1-6.

**Montefort S. and S. T. Holgate.**

Adhesion molecules and their role in inflammation.  
Respir. Med., 85 (1991) 91-99.

**Montovani A., Bassolino F. and E. Dejana.**

Cytokine regulation of endothelial cell function.  
FASEB J., 6 (1992) 2591-2599.

**Mullane K. M., Read N., Saalmon J. A. and S. Moncada.**

Role of leukocytes in acute myocardial infraction in anesthetized dogs, relationship to myocardial salvage by antiinflammatory drugs.  
J. Pharmacol. Exp. Ther., 228 (1984) 510-522.

**Muramatsu M., Shimiza K., Asano H., Toki Y., Miazaki Y., Okumura K., Hashimoto H. and T. Ito.**

Hypoxia-elicited contraction of aorta and coronary artery via removal of endothelium-derived nitric oxide.  
Am. J. Physiol., 263 (1992) H1339-H1347.

**Niebes P.**

In: New trends in venous diseases.  
Vol 1. Bern: Hens Hubert. Publishers, (1977) 2231.

**Niebes P.**

Structure biochimique de la paroi de la paroi veineuse chez les porteurs de varices.

Phlébologie, 36 (1983) 55-56.

**Niebes P.**

Artères et veines.

Phlébologie, 9 (1990) 10-12.

**Okada Y., Katsuda S., Matsui Y., Watanabe. and I. Nakanishi.**

Collagen synthesis by cultured arterial smooth muscle cells during spontaneous phenotypic modulation.

Acta. Pathol, 40 (1990) 157-164.

**Pataroyo M.**

Leukocyte adhesion in host defense in tissue injury.

Clin. Immunol. Immunopathol., 60 (1991) 333-348.

**Paterson I. S., Klausner J. M., Goldman G., Kobzik L., Welbourn R., Valeri C. R., Shepro D and H. B. Hechtman.**

Thromboxane mediates the ischemia-induced neutrophil oxidative burst.

Surgery, 106 (1989) 224-229.

**Piper H. M.**

Energy deficiency, calcium overload or oxidative stress: possible causes of irreversible ischemic myocardial injury.

Klin. Wochensch., 67 (1989) 465-476.

**Prescott, Harley. and Klein.**

Microbiologie.

Ed De Boeck Université, Bruxelles., (1995).

**Poper J. S. and R. S. Cotran**

The role of endothelial cells in inflammation.

Transplantation, 50 (1990) 537-544.

**Ramelet A. A. and M. Monti.**

Phlébologie 3<sup>ieme</sup> édition, Paris., (1994).

**Rasmussen H.**

Les ions calcium, messagers intracellulaires.

Pour la Science, 146 (1989) 86-92.

**Rawn D. J.**

Traité de biochimie.

Ed De Boeck Université, Paris., (1990).

**Remy E., Lenoir G., Houben A. and J. Remacle.**

Inhibition of platelet-activating factor biosynthesis via the acetyltransferase by arachidonic and oleic acides in ionophore A23187-stimulated bovine neutrophils.

Bioch. Biophys. Acta, 1005 (1989) 87-92.

**Roitt I. M., Brostoff J. and D. R. Male.**

Immunologie.

3<sup>ieme</sup> Edition De Boeck Université, Bruxelles., (1994).

**Rose S.S. and A. Ahmed.**

Some thought on the aetiology of varicose veins.

J. Cardiovasc. Surg., 5 (1986): 534-543.

**Ross R.**

Atherosclerosis: a problem of the biology of arterial wall cells and their interaction with blood components.

Atherosclerosis, 1 (1981) 193-311.

**Sadick N. S. and G. W. Niedt.**

A study of estrogen and progesterone receptors.

In spider telangiectasias, 16 (1990) 620-623.

**Satoh K., Imaizumi T., Yoshida H., Hiramoto M. and S Takamatsu.**

Increased levels of blood platelet-activating factor (PAF) and PAF-like lipids in patients with ischemic stroke.

Acta Neurol. Scand, 85 (1992) 122-127.

**Scozaec J. and G. Lèche.**

Immunologie des cellules endothéliales et rejet de greffe.

Méd./Sci., 9 (1993) 1094-1101.

**Smith R. J., Sam L. M. and J. M. Justen.**

Diacylglycerols modulate human polymorphonuclear neutrophil responsiveness effects on intracellular calcium mobilization, granule exocytosis and superoxide anion production.

Leukocyte Biol., 43 (1988) 411-419.

**Springer T. A.**

Adhesion receptors in the immune system.

Nature, 346 (1990) 425-434.

**Stern D. M., Esposito C., Gerlach H., Gerlach M., Ryan J., Handley D. and P. Nawroth.**

Endothelium and regulation of coagulation.

Diabetes Care, 14 (1991) 160-166.

**Stoll L. L. and A.A. Spector.**

Interaction of platelet- activating factor with endothelial and vascular smooth muscle cells in coculture.

J. Cell. Physiol., 139 (1989) 253-261.

**Suval W. D., Duran W. N., Boric M. P., Hobson R. W., Berendson P. B. and A. B. Ritter.**

Microvascular transport and endothelial cell alterations preceding skeletal muscle damage in ischemic and reperfusion injury.

Am. J. Surg., 154 (1987) 211-218.

**Thomas M. L.**

Phlebology of the lower limb.  
Churchill livingstone. London (1982).

**Thornton A. J., Ham J. and S. L. Kunkel.**

Kupffer cell- derived cytokines induce the synthesis of a leukocyte chemotactic peptide, interleukin-8 in human hepatoma and primary hepatocyte cultures.  
Hepatology, 155 (1991) 1112-1122.

**Tibbs J.D.**

The intriguing problems of varicose veins.  
Int. Angiol., 5 (1986) 289-295.

**Torgeisson G.**

Structure and morphological features of vascular endothelium.  
in: Biochemical interactions at the endothelium.  
Ed by Cryer, Elsevier, Amsterdam (1983) 5-39.

**Tortora G. J. and N. P. Anagnostacos.**

Principes d'anatomie et de physiologie.  
Edition De Boeck, Montréal., (1988).

**Tsai H. M., Nagel R. L., Hacha V. B., Seaton A. C and I. I. Sussman.**

The high molecular weight form of endothelial cell Von Willebrand factor is released by the regulated pathway.  
Br. J. Haematol., 79 (1991) 239-245.

**Vender R. L., Clemmons D.R., Knock L. and M. Friedman.**

Reduced oxygen tension induced pulmonary endothelium to release a pulmonary muscle cell mitogen.  
Am. Rev. Resp. Dis., 135 (1987) 622-627.

**Weissman G.**

in : "Current concepts in Prostaglandins in acute inflammation".  
Upjohn Company, (1980) 5-29.

**Yamamoto M., Fujia K., Shinkai T., Yamamoto K. and T. Noumura.**

Identification of the phenotypic modulation of rabbit arterial smooth muscle cells in primary culture by flow cytometry.  
Exp. Cell. Res., 198 (1992) 43-51.

**Zimmerman G. A., Mc Intyre T.M., Mehra M. and S. M. Prescott.**

Endothelial cell-associated platelet-activating factor: a novel mechanism for signaling intercellular adhesion.  
J. Cell. Biol., 110 (1990) 529-540.

**Zimmerman G. A., Prescott S. M. and T. M. Mc Intyre.**

A fluid-phase and cell-associated mediator of inflammation: basic principles and clinical correlates.

in : Platelet-activating factor. Ed by J. I. Gallin, I. M. Goldstein and R. Snyderman, Raven Press, New York (1992) 149-176.