



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Effets de l'hypoxie sur le métabolisme des cellules endothéliales de la veine ombilicale: étude de l'augmentation de la concentration en calcium cytosolique et de la libération du bFGF

Geron, Isabelle

Award date:
1994

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.



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

**EFFETS DE L'HYPOXIE SUR LE MÉTABOLISME DES CELLULES
ENDOTHÉLIALES DE LA VEINE OMBILICALE : ÉTUDE DE
L'AUGMENTATION DE LA CONCENTRATION EN CALCIUM
CYTOSOLIQUE ET DE LA LIBÉRATION DU bFGF**

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

**GÉRON Isabelle
Décembre 1994**



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

**EFFETS DE L'HYPOXIE SUR LE MÉTABOLISME DES CELLULES
ENDOTHÉLIALES DE LA VEINE OMBILICALE : ÉTUDE DE
L'AUGMENTATION DE LA CONCENTRATION EN CALCIUM
CYTOSOLIQUE ET DE LA LIBÉRATION DU bFGF**

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

**GÉRON Isabelle
Décembre 1994**

**Effets de l'hypoxie sur le métabolisme des cellules
endothéliales de la veine ombilicale : étude de l'augmentation
de la concentration en calcium cytosolique et de la libération
du bFGF**

GÉRON Isabelle

Résumé

Au cours des pathologies veineuses telles que les varices, la paroi veineuse subit de profonds réarrangements. Ces réarrangements seraient principalement dus aux altérations du métabolisme des cellules endothéliales (CE) déclenchées par l'hypoxie résultant de la stase veineuse.

Parmi ces altérations, nous avons montré que la concentration en calcium cytosolique était augmentée dans les CE incubées sous hypoxie. Cette augmentation serait due à une activation des pompes Na^+/H^+ et $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ suite à la diminution du pH_i induite par l'induction de la glycolyse : nous pouvons en effet bloquer cette augmentation du calcium à l'aide d'inhibiteurs spécifiques de ces deux pompes.

Par ailleurs, les altérations du métabolisme des CE conduisent, via la libération de facteurs de croissance comme le bFGF (basic fibroblast growth factor), à la prolifération des cellules musculaires lisses présentes dans la média. Nous avons ainsi déterminé la localisation précise du bFGF dans les CE ainsi qu'éclairci son mode de libération. Il ne serait pas libéré grâce à une modification de la perméabilité de la membrane plasmique mais suivrait plutôt une voie d'exocytose non classique et indépendante de l'appareil de Golgi.

Ces différents résultats permettent de mieux comprendre les différents processus biochimiques qui se passent dans la paroi veineuse lors des stases veineuses et ainsi de mieux appréhender le développement d'une situation pathologique qui conduit finalement aux varices.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Décembre 1994

Promoteur : J. Remacle

Au terme de ce travail de longue haleine, je tiens à remercier les nombreuses personnes qui ont été à mes côtés.

En premier lieu, je voudrait remercier le Professeur Remacle pour m'avoir accueillie au sein de son équipe pendant cette année. Ses connaissances et son expérience ont été très enrichissantes.

Je remercierai ensuite Carine, pour m'avoir montré comment mener à bien ce travail. Ses conseils judicieux furent très utiles.

Un grand merci à Andrée pour l'apprentissage qu'elle m'a apporté en matière de culture cellulaire. Merci aussi à François et à Edouard.

Merci beaucoup à tous les membres du labo, l'ambiance et la bonne humeur qui y ont régné tout au long de cette année m'ont beaucoup plu. Ces moments feront longtemps partie de mes souvenirs.

Un merci personnalisé à Mumu, Fred, Patsy, Barbara, Khalid et Anne d'abord parce qu'ilssont chacun à leur tour intervenu dans mon apprentissage , ensuite pour leur gentillesse et leur humour. Enfin et surtout un grand merci à Nancy pour sa compagnie agréable et son aide précieuse ces derniers jours.

Je voudrais encore remercier Christine pour son amitié et son soutien pendant ces cinq années.

Un grand merci enfin à mes parents sans qui l'entreprise de ces études n'aurait pas été possible. Merci à vous deux.

Pour terminer, je remercie Christophe pour avoir été à mes côtés tout au long de cette année que ce soit lors des périodes de découragement que le n'ai pas manqué de traverser ou lors des moments plus agréables.

ABRÉVIATIONS

AF	autofluorescence
AMP	adénosine monophosphate
ATP	adénosine triphosphate
bFGF	basic fibroblast growth factor
BPE	bovine pituitary extract
BSA	bovine serum albumin
[Ca ⁺⁺] _i	concentration en calcium intracellulaire
cDNA	acide désoxyribonucléique codant
CE	cellule endothéliale
cpm	coups par minute
DCB	dichlorobenzamil
DMSO	diméthyl sulfoxide
DO	densité optique
ECDGF	endothelial cell-derived growth factor
ECGS	endothelial cell growth supplement
EDRF	endothelial-derived relaxing factor
EDTA	acide éthylènedinitrilotétraacétique
EGTA	éthylèneglycol-bis (β-aminoéthyl Ether)
ELISA	enzyma-linked immuno sorbent assay
ET-1	endothéline-1
FC	facteur de croissance
FGF	fibroblast growth factor
GMP	granular membrane protein
HBSS	Hank's buffer saline solution
IGF-1 like	insulin like growth factor 1
IL-1	interleukine 1
IL-1β	interleukine 1β
K _d	constante de dissociation
L-14	lectine de 14 500 Da
L-29	lectine de 29 000 Da
LDH	lactate déshydrogénase
MDR	multidrug resistance
NAD ⁺ /NADH	nicotinamide dinucléotide (oxydé/réduit)
PAF	platelet-activating factor
PDGF	platelet-derived growth factor

PFA	paraformaldéhyde
PGE ₂	prostaglandine E ₂
PGF _{2α}	prostaglandine F _{2α}
PGI ₂	prostacycline
PBS	phosphate buffered saline
PTCA	percutaneous transluminal coronary angioplasty
TRIS	trishydroxyméthylaminométhane
TRITC	tétraméthyl rhodamine isothiocyanate

TABLE DES MATIÈRES

CHAPITRE I : INTRODUCTION.....1

I. Le système vasculaire.....	3
I.1. La morphologie de la paroi veineuse	4
I.2. Le système vasculaire dans les pathologies veineuses.....	9
<i>I.2.1. La resténose.....</i>	<i>9</i>
<i>I.2.2. Les veines variqueuses.....</i>	<i>11</i>
II. Les cellules endothéliales	16
II.1. Les caractéristiques cytologiques de la cellule endothéliale	17
II.2. Altération au niveau de la cellule endothéliale au cours de l'ischémie	24
III. Le calcium	29
IV. Le basic Fibroblast Growth Factor (bFGF).....	32
V. But du Mémoire	37

CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES..... 39

I. Culture de cellules endothéliales.....	39
I.A. Mise en culture	39
<i>I.A.1. Matériel et solutions</i>	<i>39</i>
<i>I.A.2. Méthode</i>	<i>40</i>
I.B. Repiquage	41
<i>I.B.1. Matériel et solutions.....</i>	<i>41</i>
<i>I.B.2. Méthode.....</i>	<i>42</i>
I.C. Congélation-décongélation.....	42
<i>I.C.1. Matériel et solutions.....</i>	<i>42</i>
<i>I.C.2. Congélation.....</i>	<i>43</i>
<i>I.C.3. Décongélation.....</i>	<i>43</i>
II. Mise sous hypoxie.....	44
II.A. Principe	44
II.B. Matériel et solutions.....	44
II.C. Méthode	44

III. Dosage des protéines.....	45
III.A. Principe.....	45
III.B. Matériel et solutions.....	45
III.C. Méthode.....	45
<i>III.C.1. Récolte des protéines cellulaires.....</i>	<i>45</i>
<i>III.C.2. Dosage des protéines cellulaires.....</i>	<i>46</i>
IV. Dosage du calcium cytosolique	46
IV.A. Principe.....	46
IV.B. Matériel et solutions.....	47
IV.C. Méthode au cytofluorimètre.....	48
<i>IV.C.1. Repiquage.....</i>	<i>48</i>
<i>IV.C.2. Chargement de la sonde.....</i>	<i>48</i>
<i>IV.C.3. Mesure de la concentration en</i> <i>calcium cytosolique.....</i>	<i>49</i>
<i>IV.C.4. Calcul de la concentration en</i> <i>calcium cytosolique.....</i>	<i>49</i>
IV D. Méthode au fluorimètre.....	50
<i>IV.D.1. Principe.....</i>	<i>50</i>
<i>IV.D.2. Matériel et solutions.....</i>	<i>50</i>
<i>IV.D.3. Dosage du calcium cytosolique.....</i>	<i>51</i>
V. Dosage de l'ATP.....	53
V.A. Principe.....	53
V.B. Matériel et solutions.....	53
V.C. Méthode.....	53
<i>V.C.1. Repiquage.....</i>	<i>53</i>
<i>V.C.2. Récolte de l'ATP relargué.....</i>	<i>54</i>
<i>V.C.3. Dosage de l'ATP relargué.....</i>	<i>54</i>
<i>V.C.4. Mesure de la stabilité de l'ATP.....</i>	<i>54</i>
VI. Mesure de la viabilité des cellules endothéliales grâce au trypan bleu.....	55
VI.A. Principe.....	55
VI.B. Repiquage.....	55
VI.C. Matériel et solutions.....	55
VI.D. Méthode.....	56

VII. Mesure de la perméabilité des cellules	
endothéliales	56
VII.A. Principe.....	56
VII.B. Repiquage	57
VII.C. Matériel et solutions.....	57
VII.D. Méthode.....	57
VIII. Dosage de la LDH (Lactate déshydrogénase).....	58
VIII.A. Principe	58
VIII.B. Matériel et solutions.....	58
VIII.C. Méthode	59
VIII.C.1. Repiquage	59
VIII.C.2. Récolte des surnageants.....	59
VIII.C.3. Dosage de la LDH	59
VIII.C4. .Calcul de la quantité de LDH	
<i>présente</i>	59
IX. Mesure de la libération de ⁵¹Cr.....	60
IX.A. Principe	60
IX.B. Matériel et solutions.....	60
IX.C. Méthode.....	60
IX.C.1. Repiquage.....	60
IX.C.2 Récolte du ⁵¹ Cr libéré.....	61
IX.C.3 Dosage du ⁵¹ Cr libéré.....	61
X. Dosage du bFGF	61
X.A. Repiquage	61
X.B. Récolte des milieux d'incubation.....	62
X.C. ÉLISA.....	62
X. C.1. Principe	62
X. C.2. Matériel et solutions	63
X. C.3. Méthode.....	63
X. C.4. Mesure de la quantité de bFGF.....	64
XI. Immunofluorescence	64
XI.A. Principe	64
XI.B. Repiquage.....	65
XI.C. Matériel et solutions.....	65
XI.D. Méthode.....	66

XII. Fractionnement différentiel.....	67
XII.A. Principe.....	67
XII.B. Matériel et solutions	67
XII.C. Méthode	67
XII. C.1. Repiquage	67
XII. C.2. Fractionnement.....	68
XII. C.3. Dosage enzymatique.....	69

CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION 70

I. Étude de l'augmentation de la concentration en calcium.....	70
I.1. Dosage du calcium cytosolique au cytofluorimètre	72
I.1.1.. Dosage du calcium à l'aide de la sonde Fluo-3.....	72
I.1.2. Dosage du calcium à l'aide de la sonde Fura-2	74
I.1.3. Dosage du calcium à l'aide de la sonde Calcium green-1.....	76
I.2. Dosage du calcium cytosolique au fluorimètre.....	78
I.3. Discussion	79
II. Étude de la libération de bFGF par les cellules endothéliales.....	81
II.1. Étude des changements de perméabilité au sein des cellules endothéliales sous hypoxie.....	82
II.1.1. Étude de la libération de la LDH par les cellules endothéliales sous hypoxie.....	82
II.1.2. Étude de la libération du ⁵¹ Cr par les cellules endothéliales sous hypoxie.....	83
II.1.3. Étude de la libération de l'ATP par les cellules endothéliales sous hypoxie.....	84
II.1.4. Étude de l'entrée du trypan bleu dans les cellules endothéliales sous hypoxie.....	85

I.1.5. <i>Étude de l'entrée du dextran-fluorescéine dans les cellules endothéliales sous hypoxie</i>	86
I.1.3. <i>Discussion</i>	89
II.2. <i>Étude du mécanisme de libération du bFGF sous hypoxie</i>	91
II.2.1. <i>Mesure de la libération du bFGF sous hypoxie par les cellules endothéliales</i>	91
II. 2.2. <i>Première approche pour l'étude du mécanisme de libération du bFGF : utilisation d'inhibiteurs</i>	92
II.2.3. <i>Seconde approche pour l'étude du mécanisme de libération du bFGF : localisation du bFGF dans la cellule</i>	95
II.2.4. <i>Discussion</i>	100

CHAPITRE IV : CONCLUSION	105
---------------------------------------	------------

Bibliographie	110
----------------------------	------------

CHAPITRE I : INTRODUCTION

Les pathologies veineuses sont des maladies fortement répandues dans nos pays industrialisés et malheureusement encore souvent mal comprises. Elles font donc l'étude de recherches approfondies. La paroi vasculaire n'est pas seulement une simple barrière physique mais elle est surtout une machinerie biochimique où chaque constituant a son rôle propre. Deux types cellulaires y sont importants. Tout d'abord, les cellules endothéliales qui forment une monocouche, l'endothélium, à l'interface sang-tissu. Ces cellules sont en contact direct avec les éléments du sang et constituent une barrière à perméabilité sélective indispensable à l'intégrité des tissus. Les cellules musculaires lisses constituent quant à elles le principal constituant cellulaire de la média située sous l'endothélium. Lorsqu'un phénomène comme l'ischémie se déroule dans une veine, lors d'un arrêt ou une diminution de la circulation sanguine, il provoque le déclenchement de modifications fonctionnelles et structurelles indésirables au niveau de la paroi vasculaire des vaisseaux sanguins affectés. On comprend mieux pourquoi une étude plus approfondie de ces modifications cellulaires et moléculaires, grâce à un modèle *in vitro*, devient nécessaire pour une meilleure compréhension des maladies veineuses telles que les varices. En effet, la stase veineuse est souvent associée à ces maladies et constitue elle aussi une perturbation de la circulation sanguine.

L'introduction de ce mémoire est composée de quatre parties :

- Dans un premiers temps, nous nous familiariserons avec la veine en tant qu'unité structurelle et fonctionnelle. Les rôles de celle-ci seront

d'abord décrits en conditions normales, ensuite deux conditions pathologiques seront abordées : la resténose et les varices.

- En second lieu, une étude approfondie des cellules endothéliales sera envisagée. Comme précédemment, le rôle de ces cellules sera ensuite décrit dans la situation pathologique des veines variqueuses.

- Troisièmement, nous étudierons les différents rôles de l'ion calcium dans le métabolisme des cellules endothéliales. Nous analyserons par la suite les modifications qui apparaissent au niveau de la concentration en calcium dans les cellules endothéliales soumises à une ischémie. Ce point fera en effet l'objet de la première partie de notre travail expérimental.

- Enfin, la dernière partie décrira les caractéristiques du basic fibroblast growth factor (bFGF), un facteur de croissance libéré par les cellules endothéliales et qui a une action sur les cellules musculaires lisses de la média. L'étude de sa libération par les cellules endothéliales sous hypoxie constituera la deuxième partie du travail de ce mémoire.

I. LE SYSTÈME VASCULAIRE

Le système vasculaire sanguin est constitué d'un vaste réseau de tubes disposés en circuit fermé à l'intérieur desquels circule le sang. Son origine embryologique est le mésoblaste intra-embryonnaire.

Différents éléments constituent ce système; d'une part, le coeur, véritable pompe qui propulse le sang vers les différentes régions du corps, et d'autre part, les vaisseaux sanguins qui transportent le sang chargé en oxygène et en substances nutritives du coeur vers les différents tissus –circulation artérielle– ou qui ramènent vers le coeur le sang chargé en gaz carbonique et en déchets –circulation veineuse– (Maillet et Chiarasini, 1985). La jonction entre le système artériel et le système veineux se fait par l'intermédiaire des capillaires sanguins disposés en réseau, au niveau desquels se font les échanges entre le sang et les tissus. Ce transport du sang, du coeur vers les tissus et inversement, constitue la circulation systémique.

Cependant, c'est par l'intermédiaire de la circulation pulmonaire que le sang, en passant au niveau des poumons, peut s'enrichir en oxygène et se débarrasser du gaz carbonique.

Le réseau sanguin est donc organisé de façon à apporter aux constituants des différents organes, les éléments qui leur sont nécessaires et à assurer l'élimination des déchets. Ces opérations sont rendues possibles grâce à la perméabilité de l'endothélium vasculaire et à la diffusion aisée au niveau de la membrane basale et de la matrice extracellulaire. Chaque type de vaisseau, suivant sa localisation, doit permettre la diffusion de substances depuis le sang vers les tissus et vice-versa, ainsi qu'avoir une élasticité suffisante pour répondre aux déformations qui lui sont imposées par le flux sanguin.

Pour mieux comprendre les rôles des vaisseaux sanguins, nous analyserons leurs fonctions et leur morphologie.

Cependant, nous ne rentrerons pas dans une description détaillée de tous les vaisseaux sanguins. Nous nous arrêterons plus particulièrement

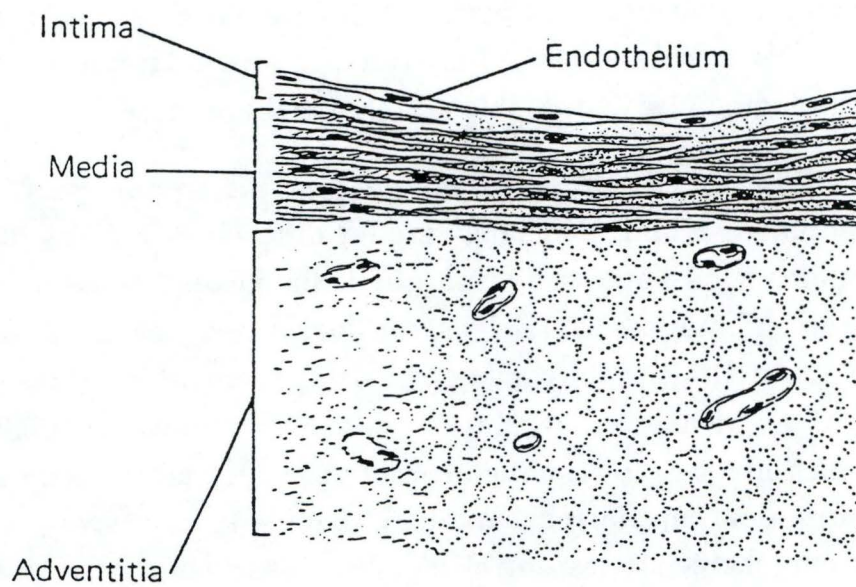


Figure I.1 : Représentation schématique de la paroi veineuse. Celle-ci est formée de trois tuniques : l'intima, la média et l'adventice (Junqueira *et al.*, 1989).

sur le système veineux : la veine étant le vaisseau concerné par la pathologie étudiée, elle sera décrite plus en détail.

I.1. LA MORPHOLOGIE DE LA PAROI VEINEUSE

Les veines sont les vaisseaux sanguins qui transportent le sang chargé en gaz carbonique et en déchets depuis les tissus vers le coeur. Étant donné que le flux sanguin est, à ce moment, à une pression réduite, la paroi doit effectuer des phénomènes de contraction-dilatation pour assurer le retour du sang de façon contrôlée. Les valvules constituées par les replis endothéliaux de l'intima et disposés en paire avec leurs concavités dirigées vers le coeur interviennent dans ce phénomène pour empêcher les reflux sanguins et propulser le sang veineux en direction du coeur à l'aide des contractions des muscles squelettiques de la paroi veineuse.

Les veines et les veinules comportent comme les artères et les artérioles, trois tuniques classiques (Figure I.1) (Maillet et Chiarasini, 1985) : nous trouvons, de la lumière du vaisseau vers l'extérieur, l'intima, la média et l'adventice qui est souvent mal individualisés dans les veines par rapport à ce que l'on observe dans les artères et les artérioles. 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. Leur paroi est plus mince, moins rigide et donc douée d'une plasticité plus grande. De plus, puisqu'on y trouve un tissu musculo-élastique peu développé, le tissu conjonctif est plus abondant.

Cette structure est fonction de la pression plus faible qui y règne. Cependant, il existe une grande variabilité dépendant des conditions circulatoires locales.

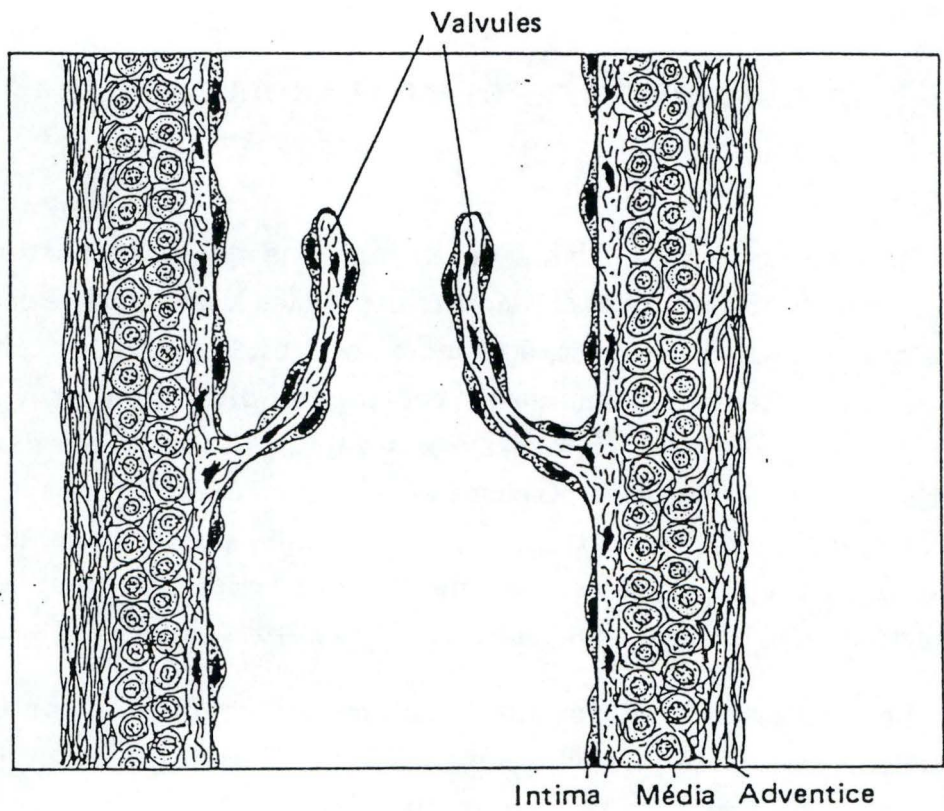


Figure I.2 : Valvule au sein de l'intima de la veine observée en vue longitudinale (Maillet et Chiarasini, 1989).

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

L'intima :

L'intima est composée d'une membrane basale sur laquelle repose une couche unicellulaire de cellules endothéliales, décrites plus en détail dans le deuxième chapitre de cette introduction, dont les replis forment des valvules (Figure I.2). Étant donné leur localisation à l'interface entre le sang d'une part et la paroi vasculaire avec les tissus interstitiels voisins d'autre part, les cellules endothéliales jouent un rôle essentiel dans le bon fonctionnement des vaisseaux sanguins. L'épaisseur de l'intima est généralement faible.

La média :

La média est constituée de cellules musculaires lisses disposées de façon concentrique, et de la matrice extracellulaire constituée de fibres d'élastine incluses dans une substance riche en protéoglycanes et en glycoprotéines, séparées par des fibres de collagène.

La média est la couche du vaisseau qui est impliquée dans les phénomènes de contraction et de dilatation vasculaires.

Les cellules musculaires lisses sont importantes: elles sont impliquées dans les propriétés mécaniques de la paroi mais elles sont aussi essentielles pour leur activité synthétique (éléments de la matrice extracellulaire, enzymes protéolytiques, dérivés des prostaglandines).

Les cellules musculaires lisses sont surtout présentes lorsque le diamètre veineux augmente en taille. Elles forment alors une couche

concentrique continue autour de l'intima et synthétisent des fibres de la matrice.

L'adventice :

L'adventice est la couche la plus externe. Elle comprend d'épaisses couches de collagène ordonnées longitudinalement. Le tissu conjonctif a une capacité de soutien qui lui permet de résister à la pression hydrostatique. Il est lâche pour permettre l'adaptation permanente du calibre des vaisseaux aux variations du débit cardiaque.

L'adventice a un double rôle : d'une part, attacher le vaisseau aux tissus voisins, d'autre part, limiter les possibilités d'extension de l'ensemble de la paroi. Cette tunique est la plus épaisse et son épaisseur augmente au fur et à mesure que la veine s'élargit. Elle comprend principalement des fibroblastes qui vont synthétiser tous les éléments du tissu conjonctif.

L'adventice par sa localisation éloignée du sang circulant, ne peut être nourrie par imbibition comme c'est le cas pour l'intima et pour la partie la plus interne de la média. La nutrition est donc assurée par des vasa vasorum qui se ramifient abondamment dans la partie la plus externe de la média et dans l'adventice.

On classe habituellement les veines en quatre catégories (Maillet et Chiarasini, 1985) :

Les veinules post-capillaires :

Le premier type de veines qui apparaît après le système capillaire sont des veines de petite taille, dont le diamètre varie de 0,2 à 1 mm. Elles sont souvent appelées les veinules post-capillaires. L'organisation en trois couches n'est pas observée immédiatement à la sortie du lit capillaire. En effet, les premières veinules qui résultent de la jonction de plusieurs capillaires ont dans l'ensemble une structure identique à celle des capillaires. Au fur et à mesure que la taille des capillaires augmente pour donner de petites veines, la structure des trois tuniques s'individualise. Elles sont pourvues d'un endothélium entouré par une mince couche conjonctivo-élastique sous-endothéliale et par des cellules musculaires lisses circulaires dans les veinules à calibre plus grand.

Les veines musculaires :

La seconde catégorie est représentée par les veines musculaires. Leur diamètre varie de 1 à 9 mm. Elles se situent plus spécialement dans les membres et les viscères. C'est ce type de veines qui est le plus souvent atteints dans les pathologies variqueuses. On y reconnaît en général les trois tuniques. L'intima comporte un endothélium et une couche conjonctivo-élastique sous-endothéliale. La limitante élastique interne, présente dans les artères, est souvent inexistante et quand elle existe, 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 pour la nutrition ainsi que des nervi vasorum pour la sensibilité nerveuse sont rprésent.

Les veines fibreuses :

Les veines du cerveau et du cervelet sont caractérisées par du tissu fibreux, on les appelle les veines fibreuses. La division de la paroi entre les trois tuniques est illusoire. La paroi est formée de tissu fibreux au sein duquel se trouve de rares éléments élastiques.

Les veines fibro-élastiques :

Il existe également les veines fibro-élastiques. Le tissu conjonctif y est bien développé avec un très riche réseau de fibres élastiques. Par contre, les cellules musculaires lisses y sont rares. Cette catégorie de veines comprend essentiellement les veines de l'étage supra-cardiaque : les veines axillaires, jugulaires.

La paroi vasculaire est comme nous l'avons vu, un organe bien structuré assurant certaines fonctions bien précises. Elle comporte et synthétise tout un ensemble de constituants qui, dépassant leurs fonctions de soutien et de squelette moléculaire, sont des interlocuteurs des facteurs sanguins souvent en cause dans les pathologies veineuses. En effet, lors de pathologies veineuses, la structure de la paroi est modifiée. Plusieurs phénomènes interviennent impliquant des changements au niveau des interactions cellulaires. Ce sont des modifications de structure et de fonction au sein des cellules endothéliales et des cellules musculaires de la paroi veineuse qui sont en cause principalement. Dans le point suivant,

nous allons présenter ces différentes modifications et expliquer les conséquences que cela implique dans deux pathologies : la resténose et les varices.

I.2. LE SYSTÈME VASCULAIRE DANS LES PATHOLOGIES VEINEUSES

I.2.1. La resténose

Les lésions athérosclérotiques dans les artères coronaires sont une cause importante de décès en Europe et en Amérique du Nord. Le premier signe de la lésion est l'apparition de stries lipidiques constituées de cellules dites spumeuses, qui sont des macrophages et dont le cytoplasme est rempli de vacuoles lipidiques contenant des esters de cholestérol.

Une lésion fibromusculaire se développe suite à la migration de cellules musculaires lisses de la média dans l'intima où elles prolifèrent.

Dans l'athérosclérose avancée, une accumulation de macrophages, de débris cellulaires, de cholestérol extracellulaire et de calcium a lieu. L'ensemble est entouré de cellules musculaires lisses et de tissus fibreux (Lovqvist *et al.*, 1993). Le tout constitue la plaque d'athérosclérose. Cette plaque diminue la lumière du vaisseau et peut engendrer la formation d'un thrombus.

Afin de restaurer le flux sanguin dans les vaisseaux affectés par les lésions sténotiques, une technique largement répandue est le PTCA (Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty). Cette technique permet suite à l'utilisation d'un petit ballonnet, d'écraser la plaque afin d'assurer à nouveau un écoulement sanguin normal. Alors que cette technique n'a aucune conséquence chez certains patients, d'autres subissent après un temps plus ou moins long une resténose c'est-à-dire un épaissement de la paroi artérielle qui va à nouveau entraîner l'occlusion du vaisseau (Lovqvist *et al.*, 1993).

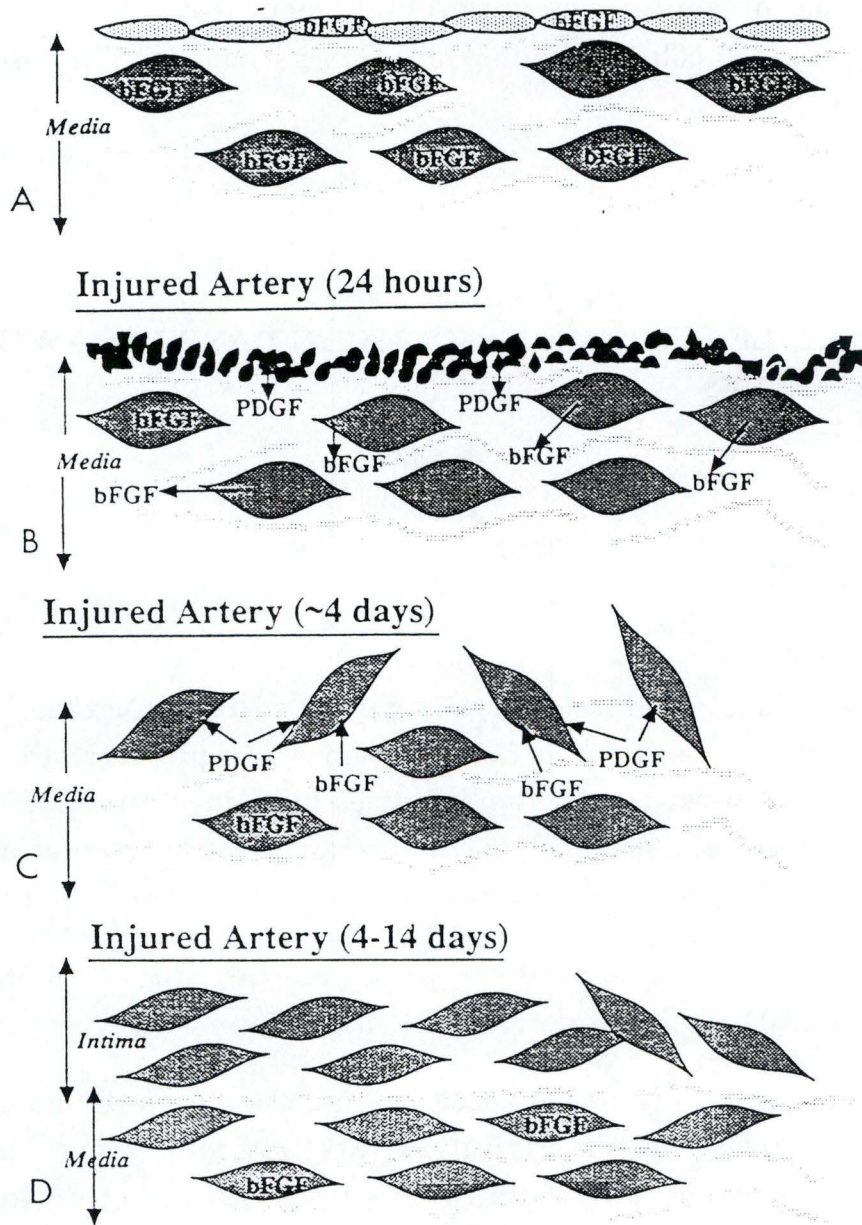


FIGURE 1. SMC replication in injured arteries. (A) In uninjured artery, SMCs express bFGF, and bFGF is localized in SMC and endothelium. SMCs express FGFR-1 and -2. (B) Basic FGF is released from injured cells and stimulates SMC replication. No increase of bFGF mRNA occurs in medial SMCs. PDGF from platelets does not stimulate SMC replication. (C) SMCs migrate to intima—stimulated by PDGF (from platelets) and bFGF (from injured SMCs). SMCs continue to replicate in media and intima. (D) Intimal SMCs replicate—low medial replication. There is no increase in bFGF mRNA in intimal SMCs and no up-regulation of FGFR mRNA by intimal SMCs.

Figure I.3 : Processus d'action du bFGF dans la prolifération des cellules musculaires lisses (Reidy, 1994)

La resténose est donc une complication majeure suite à l'angioplastie coronaire . Elle est due à la prolifération de cellules musculaires lisses dans l'intima ainsi qu'à la participation des cellules endothéliales et des plaquettes (Figure I.3). Il semblerait que les cellules musculaires lisses migrent à travers la lame élastique interne dans l'intima où elles prolifèrent. Cette prolifération suivrait de près l'angioplastie probablement en réponse à une libération de facteurs de croissance à partir des cellules endothéliales lésées suite à cette intervention et à partir des plaquettes accumulées. Rapidement après l'angioplastie, les cellules musculaires lisses sont en contact avec différents facteurs qui vont induire leur prolifération (Lovqvist *et al.*, 1993) :

- le PDGF (platelet-derived growth factor) libéré par les cellules endothéliales lésées, les cellules musculaires lisses elles-mêmes, les plaquettes et les cellules du système immunitaire. Il semblerait que le PDGF ne soit pas un médiateur important impliqué dans la multiplication des cellules musculaires lisses. Il interviendrait plutôt dans la migration de ces cellules vers l'intima (Reidy, 1993).
- le bFGF (basic fibroblast growth factor) est un facteur de croissance qui provoquerait la prolifération des cellules musculaires lisses (Reidy, 1993).
- des agents constricteurs libérés par les plaquettes.

A l'heure actuelle, il est connu que la resténose existe suite à une multiplication des cellules musculaires lisses en réponse aux altérations survenues après l'angioplastie. Le mécanisme qui est à l'origine de la resténose n'est pas encore bien connu. Il semblerait cependant que le bFGF libéré par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses ait un rôle important à jouer dans ce processus (Reidy, 1994).

Nous allons maintenant étudier le cas des veines variqueuses et ainsi remarquer que l'étiologie de celles-ci présente certaines homologues avec celle de la resténose.

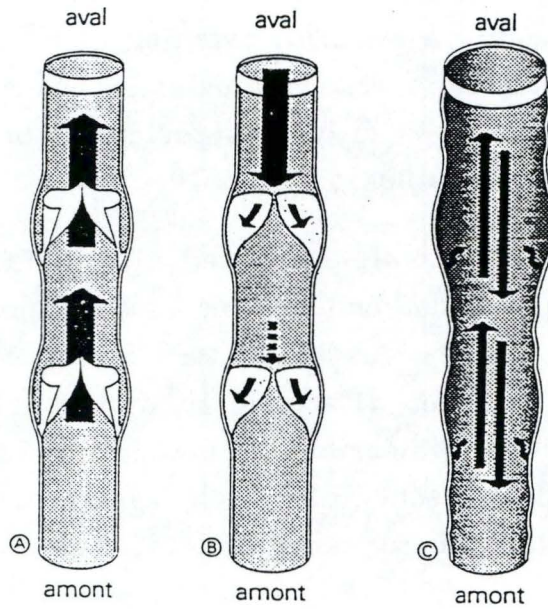


Figure I.4 : Représentation schématique des valvules et de leurs fonctionnement. A : Flux veineux en direction du coeur : les valvules sont ouvertes. B : Fermeture des valvules lorsque la pression en aval devient plus importante qu'en amont (reflux). C : Syndrome variqueux : la destruction valvaire entraîne un reflux veineux. La direction de la colonne sanguine est alors influencée par le seul jeu des gradients de pression.

I. 2. 2. Les veines variqueuses

Dans les pays occidentaux, une personne sur trois souffre de veines variqueuses. Celles-ci constituent donc un problème de santé majeur. Les varices sont caractérisées par une dilatation irrégulière et permanente d'une veine. De nombreux facteurs interviennent dans le développement des varices. En effet, l'hérédité, le sexe, la sédentarité, la surcharge pondérale, la position assise ou debout prolongée, le régime alimentaire sont des paramètres connus intervenant dans les phénomènes de jambes lourdes et de varices (Beaglehole, 1986, Charpentier et Priollet, 1994). Cependant, des valvules déficientes qui ne sont plus capables d'expulser le sang vers le coeur (Figure I.4), une perte de la capacité d'adaptation du tissu veineux suite à un tissu conjonctif et musculaire affaibli, ainsi qu'une pression sanguine plus élevée sont également impliqués dans l'étiologie de la veine variqueuse.

La plupart de ces phénomènes engendre une stase veineuse. On pourrait donc penser que c'est la stase du sang dans les membres inférieurs qui est la perturbation physiologique primaire aboutissant au développement des veines variqueuses.

L'hypothèse suivante a été proposée au laboratoire pour expliquer l'apparition d'une situation pathologique conduisant au développement des varices : les modifications du métabolisme des cellules de la paroi veineuse induite par l'ischémie résultant de la stase veineuse initieraient une cascade d'événements conduisant finalement à une situation pathologique (Michiels *et al.*, 1994a).

L'endothélium vasculaire étant la première barrière entre le sang et le tissu veineux, il est le premier affecté par ce phénomène comme nous le décrirons en détail au point II.

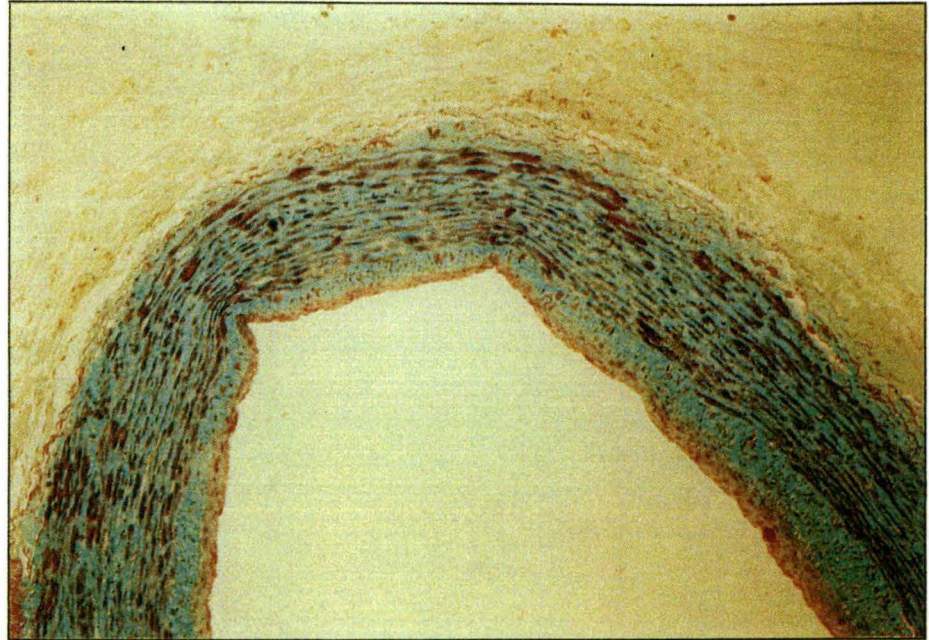
L'activation des cellules endothéliales par l'hypoxie *in vitro* qui mime l'ischémie observée *in vivo* initie une cascade d'événements, impliquant les polymorphonucléaires neutrophiles et les cellules musculaires lisses, qui peut lorsqu'elle est transposée *in vivo*, expliquer le développement des veines variqueuses. L'adhérence des neutrophiles aux cellules endothéliales est la première étape du processus de diapédèse qui conduit à l'infiltration des polymorphonucléaires dans l'intima et dans la média des veines (Montefort

et Holgate, 1991). Ces leucocytes sont de plus stimulés et peuvent relarguer diverses molécules actives telles que des radicaux libres et des éicosanoïdes. 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 similaires aux diverses altérations tissulaires observées dans les veines variqueuses.

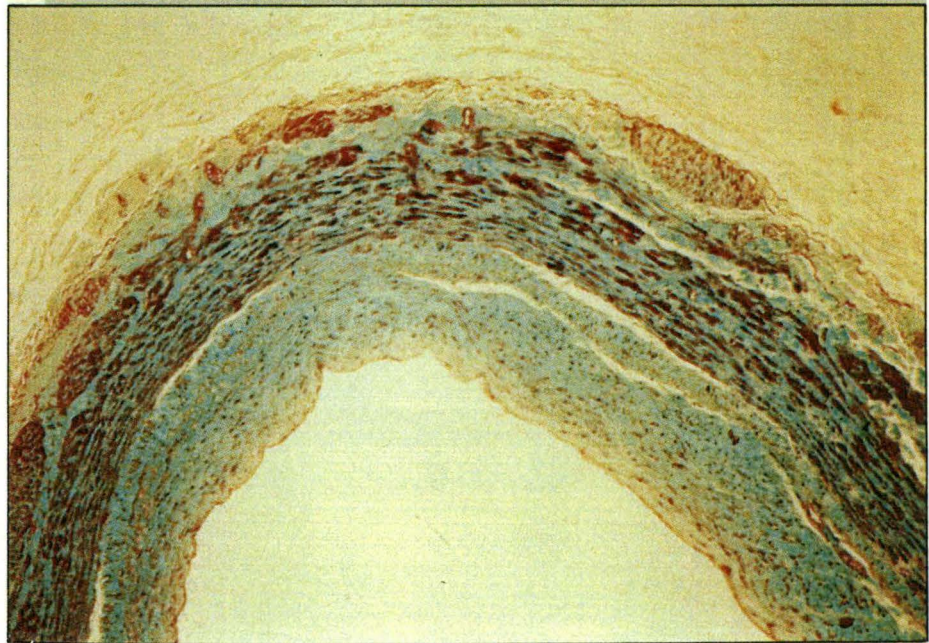
A la lumière de cette hypothèse, quatre caractéristiques principales des parois des veines variqueuses pourront être analysées (Niebes, 1987).

1. L'endothélium est conservé.

Dans la paroi des veines variqueuses, la barrière endothéliale est toujours présente alors que d'autres cellules comme les cellules musculaires lisses subissent de profonds changements. Il a été montré expérimentalement *in vitro* que l'hypoxie, qui mime l'ischémie résultant d'une stase du sang, induit effectivement des changements métaboliques importants au sein des cellules endothéliales sans induire de mortalité. Suite à l'hypoxie, il se produit au sein des cellules endothéliales une activation avec synthèse accrue de médiateurs de l'inflammation et de facteurs de croissance. Cependant, la viabilité cellulaire est conservée et les cellules endothéliales retrouvent leur homéostasie dès qu'elles sont remises dans des conditions de normoxie (Arnould *et al.*, 1992). Ainsi, l'hypoxie permet d'expliquer le recrutement des neutrophiles et la prolifération des cellules musculaires lisses alors que la barrière endothéliale reste intacte.



A



B

Figure I.5 : Photographies de coupes histologiques transversales mettant en évidence les remaniements structurels de la paroi d'une veine pathologique (B) par rapport à la structure d'une veine saine (A).

2. Présence d'enzymes lysosomiales.

Une grande quantité d'enzymes lysosomiales est retrouvée dans les couches cellulaires sous-endothéliales de la paroi vasculaire. Ces enzymes sont relarguées par les neutrophiles activés. Il a été montré expérimentalement au laboratoire que les neutrophiles qui adhèrent aux cellules endothéliales activées par l'hypoxie sont activées au cours de ce processus (Arnould *et al.*, 1994). C'est à la lumière de cette observation que la présence d'enzymes lysosomiales dans la paroi veineuse peut être expliquée. Comme l'infiltration des neutrophiles dans le tissu sous-jacent suit généralement leur adhérence à l'endothélium, on peut penser que ce serait également le cas dans ce modèle expérimental. Thierry Arnould a montré au laboratoire, en utilisant un cordon entier perfusé sous hypoxie, que les neutrophiles pénétreraient effectivement bien dans le tissu sous-endothélial (résultats non publiés). Une fois dans la média et suite à leur activation, ils y relargueraient leurs protéases par dégranulation.

3. Modification de la matrice extracellulaire.

Les molécules de collagène et les protéoglycanes sont altérés dans la paroi des veines variqueuses : la quantité de collagène soluble augmente. Les radicaux libres sont connus pour être capables de fragmenter le collagène et les protéoglycanes (Greenwald *et al.*, 1976). Les radicaux libres et les protéases qui ont été tous deux mis en évidence dans la paroi des veines variqueuses, sont relargués par les neutrophiles infiltrés et activés. Ces deux types de molécules peuvent agir de façon synergique et pourraient donc être responsables de l'hydrolyse partielle du collagène observée dans les veines pathologiques.

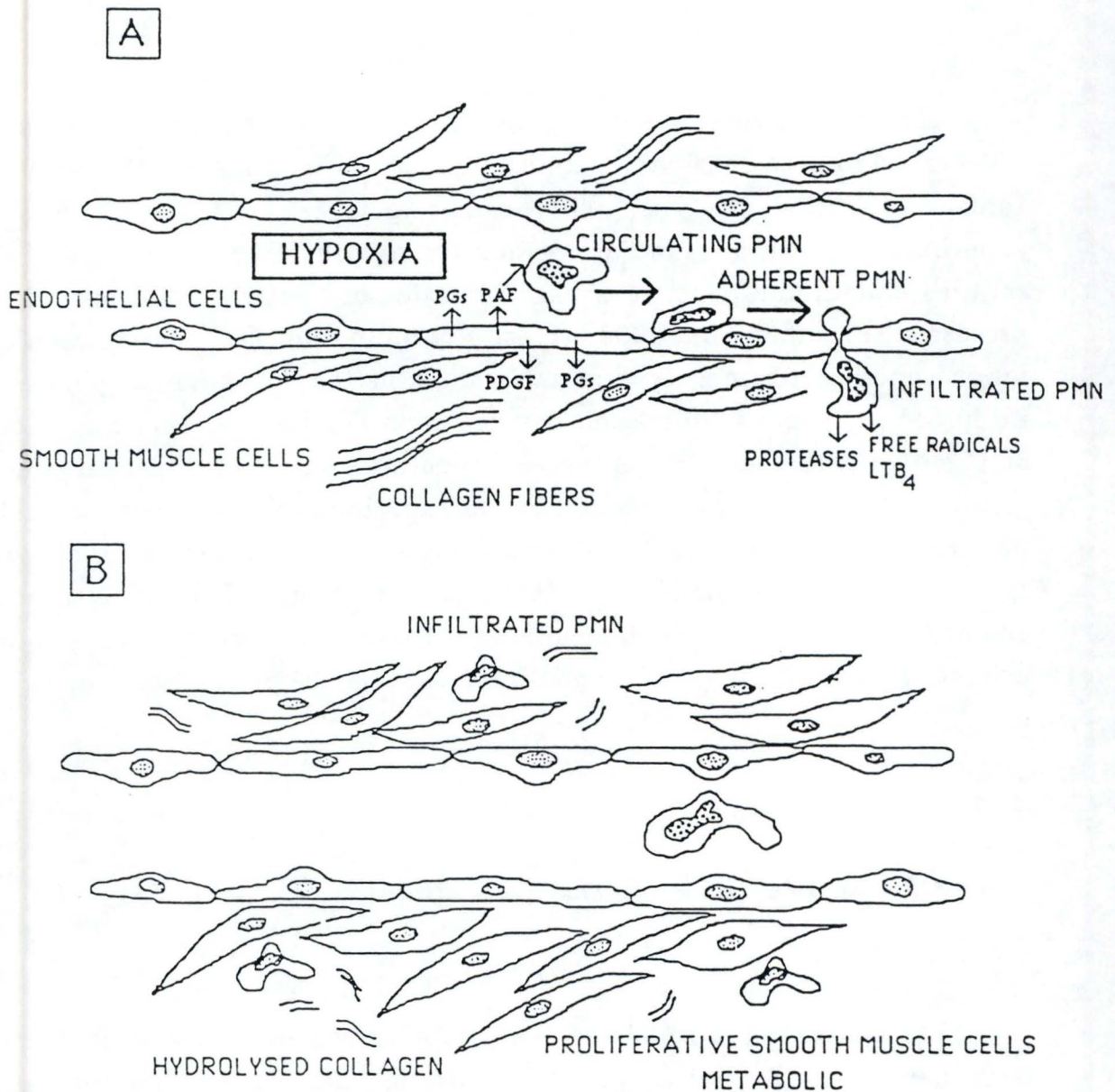


Figure I.6 : Présentation schématique des modifications apparaissant dans les cellules endothéliales mises sous hypoxie et influence de celles-ci sur les PMN et les cellules musculaires lisses. Ceci peut expliquer les altérations des paroi des vaisseaux sanguins observées dans les veines variqueuses. PMN = polymorphonucléaire neutrophile, PAF = platelet-activating factor, LTB₄ = leucotriène B₄, PDGF = platelet-derived growth factor, PGs = prostaglandines. A. Effet de l'hypoxie sur le métabolisme des cellules endothéliales et interactions avec les PMN dans un capillaire. B. Le même capillaire après l'infiltration des PMN, prolifération des cellules musculaires lisses et hydrolyse du collagène (Michiels *et al.*, 1993).

4. Désorganisation de la paroi vasculaire.

Un épaissement et une désorganisation de la paroi veineuse sont également des caractéristiques typiques des veines variqueuses (Charles et Gresham, 1993) (Figure I.5). Celui-ci est facilement explicable par la prolifération des cellules musculaires lisses observées *in vitro*; ces cellules constituent alors le type cellulaire majeur de l'intima. Il a été montré *in vitro* que cette prolifération peut être induite par diverses molécules relarguées par les cellules endothéliales activées par l'hypoxie. De plus, dans les veines malades, les cellules musculaires lisses passent d'un état contractile caractérisé par une abondance de filaments du cytosquelette et une faible proportion de réticulum endoplasmique, à un état synthétique dans lequel les cellules musculaires lisses possèdent un réticulum endoplasmique bien développé, sécrètent plus de matrice extracellulaire et notamment plus de collagène, sont prolifératives et perdent l'expression de la myosine et de l' α -actine (Ross, 1981; Yamamoto *et al.*, 1992). Cette modification phénotypique pourrait également être le résultat de l'action des médiateurs relargués par les cellules endothéliales activées par l'hypoxie. La prolifération des cellules musculaires lisses (Michiels *et al.*, 1994a), ainsi que la capacité accrue de synthèse des composés de la matrice extracellulaire (Okada *et al.*, 1990), peuvent donc facilement rendre compte de l'épaississement de la paroi veineuse pathologique.

En conclusion, la prolifération des cellules musculaires lisses, les changements qualitatifs et quantitatifs dans la synthèse des protéines de la matrice extracellulaire ainsi que l'hydrolyse partielle de ces protéines par les molécules relarguées par les neutrophiles infiltrés expliquent la désorganisation totale de la paroi vasculaire observée dans les veines variqueuses.

La figure I.6 présente un schéma de ces différentes altérations qui conduisent non seulement à la perte de la contractilité des cellules musculaires lisses mais aussi à des altérations du tonus vasculaire. Il est à remarquer que, dans ce processus, l'effet direct de l'hypoxie sur les neutrophiles eux-mêmes n'a pas été pris en compte. Certains résultats préliminaires semblent suggérer que l'hypoxie pourrait activer directement

ces neutrophiles et donc aggraver le processus décrit ci-dessus. Par contre, les cellules musculaires lisses semblent être très résistantes aux effets de l'hypoxie (De Leener, 1992).

De plus, d'autres cellules sanguines, telles que les plaquettes, les monocytes, ou les lymphocytes, connues pour leur réaction aux médiateurs relargués par les cellules endothéliales activées par l'hypoxie, peuvent aussi être impliquées dans ce processus et amplifier les altération tissulaires.

En conclusion, on remarque que l'activation des cellules endothéliales après ischémie, pourrait être le facteur initial de la maladie veineuse (Michiels *et al.*, 1994a).

L'endothélium paraît jouer un rôle important dans le remaniement vasculaire lors des pathologies veineuses, en produisant des médiateurs qui modifient la structure des veines et en interagissant avec les cellules musculaires lisses (Ross, 1981; Gibbons et Dzau, 1990; Weissberg, 1991).

Dans le chapitre suivant, nous allons étudier en détail les rôles de la cellule endothéliale *in vivo* d'abord dans des conditions normales, avant de préciser les changements fonctionnels qui s'y déroulent dans certaines situations pathologiques.

II. LES CELLULES ENDOTHÉLIALES

Les cellules endothéliales tapissent, en une monocouche cellulaire, l'intérieur de tous les vaisseaux et recouvrent une surface supérieure à 1000 m² (Jaffe, 1985). Cette monocouche aplatie et uniforme est une véritable mosaïque de cellules polygonales, allongées et orientées parallèlement à la direction du flux sanguin (Herman et Castellot, 1987). Elle est séparée des structures abluminales par une membrane basale (Florey, 1966; Simionescu et Simionescu, 1977). *In vivo*, la forme, la taille et l'arrangement des cellules endothéliales varient fortement suivant la localisation du vaisseau étudié dans l'organisme. Sa localisation à l'interface entre le sang circulant d'une part, la paroi vasculaire et les tissus interstitiels d'autre part, implique des propriétés structurelles et fonctionnelles spécialisées.

La barrière endothéliale possède au moins trois fonctions de base liées au fait que ces cellules sont en contact étroit les unes avec les autres (Cryer, 1983) :

- elle agit en tant que barrière à perméabilité sélective
- elle constitue un tissu synthétique, métabolique et sécrétoire. Les substances synthétisées et sécrétées par les cellules endothéliales peuvent avoir de nombreux effets locaux. Ces cellules élaborent, entre autres, les principaux constituants de la matrice extracellulaire et de la membrane basale.
- elle constitue un contenant compatible avec le sang

Suite à leur localisation et leur contact avec le sang circulant, les cellules endothéliales sont parfaitement positionnées pour moduler les différents systèmes biologiques au niveau du sang, particulièrement, le système de coagulation et la réactivité des plaquettes.

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

Dans les paragraphes qui suivent nous étudierons leurs caractéristiques morphologiques, les substances qu'elles synthétisent et surtout les modifications qui y sont engendrées suite à une hypoxie.

II.1. LES CARACTÉRISTIQUES CYTOLOGIQUES DE LA CELLULE ENDOTHÉLIALE

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

1. *Le glycocalyx*

La surface des cellules endothéliales est entourée d'une enveloppe qui constitue le glycocalyx, riche en carbohydrates présents sous forme de protéoglycanes (héparan-sulfate en particulier), d'où émergent de nombreuses microvilosités. Néanmoins, cette couche de glycocalyx serait structurellement et chimiquement différente au pôle luminal et au pôle basal de la cellule, lui conférant ainsi une certaine polarité. L'héparan-sulfate apporte un ensemble de charges négatives qui limitent l'adhésion des plaquettes et des leucocytes chargés similairement et empêchent l'activation de la cascade de coagulation dans les vaisseaux sanguins intacts. Ce protéoglycane de surface a les mêmes caractéristiques que l'héparine (Ross, 1981; Herman et Castellot, 1987). Cependant, la thromborésistance de l'endothélium n'est pas seulement due à l'héparine, d'autres molécules interviennent également.

2. Les vésicules transendothéliales

De nombreuses invaginations se forment à partir de la membrane, témoignant d'une intense activité, pouvant mener à la formation de vésicules de pinocytose. Ces phénomènes conduisent à l'internalisation des substances d'échange entre le sang et les tissus. Certains de ces phénomènes se font par un mode passif. Pour la plupart, cependant, les échanges se réalisent grâce à des mécanismes actifs : endocytose et pinocytose. Tous ces mécanismes définissent la propriété de perméabilité sélective de l'endothélium. Les jonctions interendothéliales, "tight junctions" et "gap junctions", sont également impliquées dans le transport de molécules solubles à travers l'endothélium.

3. Le cytosquelette

En plus des organites habituels, le cytoplasme contient trois types de filaments : les microfilaments (actine), les filaments intermédiaires (vimentine) et les filaments épais (myosine). Les cellules endothéliales possèdent donc les outils nécessaires pour se contracter. Ce phénomène pourrait affecter ou réguler la perméabilité endothéliale.

4. Les corps de Weibel-Palade

La grande caractéristique des cellules endothéliales est la présence d'inclusions appelées corps de Weibel-Palade. Ces granules ovoïdes sont un véritable critère pour la reconnaissance des cellules endothéliales. Ce sont des inclusions intracytoplasmiques composées d'un faisceau de tubules parallèles à l'axe du corps. L'ensemble est entouré d'une matrice dense et d'une membrane.

Les corps de Weibel-Palade sont probablement formés à partir du complexe de Golgi (Herman et Castellot, 1987). Malheureusement, leur rôle n'est pas connu, mais il est admis qu'ils stockent le facteur de von Willebrand (facteur VIII) qui est une glycoprotéine participant à l'adhésion des plaquettes et le GMP 140 (granular membrane protéine-140) ou P-sélectine, une molécule d'adhérence pour les neutrophiles.

Grâce à ces différentes caractéristiques, on peut facilement distinguer les cellules endothéliales des autres types cellulaires.

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

Leur mode de croissance *in vitro* se fait selon un modèle très régulier. Elles prolifèrent en une monocouche de cellules étroitement accolées (Ross, 1981). *In vitro*, elles répondent au phénomène d'inhibition de contact, c'est à dire que lorsqu'elles arrivent à confluence, elles cessent de se diviser, ne se chevauchent pas. Elles forment alors une monocouche de cellules jointives.

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

Les capacités de synthèse des cellules endothéliales sont très grandes et très diversifiées. Ces cellules présentent une particularité très originale : elles sont polarisées à la fois aux niveaux morphologique et fonctionnel (Ross, 1981). Cette polarité entre leur surface apicale et leur surface

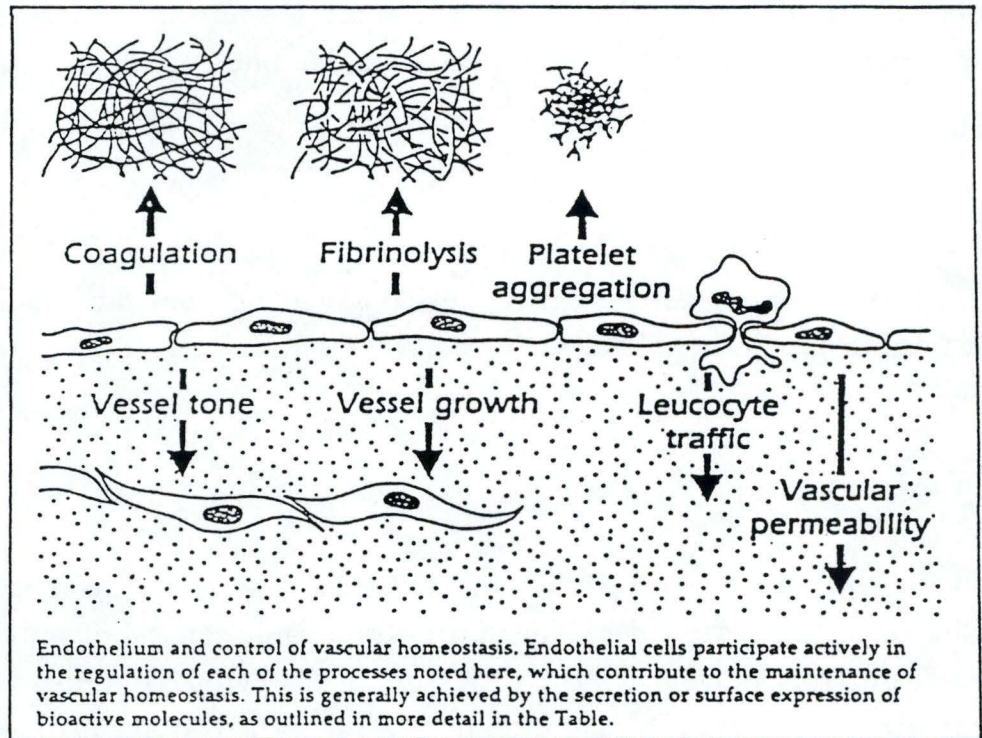


Figure I.7 : Illustration des fonctions de l'endothélium vasculaire dans le contrôle de l'homéostasie du vaisseau sanguin (Pearson, 1991).

basolatérale reflète leur spécialisation dans les interactions avec les cellules du sang et celles de la paroi vasculaire (Stoll et Spector, 1989). Chaque pôle, à la fois le pôle luminal en contact avec le sang et le pôle sous-endothélial, fabriquent des substances à fonctions spécifiques.

1. Les éléments de la matrice extracellulaire sous-endothéliale

Les cellules endothéliales reposent sur la membrane basale qui constitue une barrière secondaire pour le passage des liquides et des éléments formés dans le compartiment extravasculaire. La membrane basale contient 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.

Les cellules endothéliales, *in vitro*, synthétisent et sécrètent plusieurs types de collagènes. Les cellules endothéliales de la veine ombilicale sécrètent du collagène de type IV dans le milieu de culture et du collagène de type IV et V dans la matrice extracellulaire sous-endothéliale (Jaffe, 1985).

2. Les facteurs contrôlant la thromborésistance

La matrice extracellulaire sous-endothéliale est ordinairement recouverte par les cellules et dans ce cas, les plaquettes non stimulées ne peuvent pas y adhérer. L'endothélium contrôle donc l'homéostasie vasculaire (Figure I.7). Cependant, l'enlèvement ou la contraction des cellules endothéliales expose cette matrice qui sera rapidement recouverte par une couche de plaquettes. Celles-ci, une fois activées, vont dégranuler et déclencher tout le processus de coagulation.

Le collagène sous-endothélial de type IV et V ainsi que les microfibrilles causent l'adhésion plaquettaire et la libération de thromboxane A₂ alors que la laminine, l'élastine et l'héparan-sulfate ne le

font pas. L'adhésion des plaquettes à la matrice sous-endothéliale est dépendante du facteur de von Willebrand. Ce facteur est une glycoprotéine qui une fois libéré dans la circulation sanguine s'associe rapidement au facteur VIII de la coagulation.

Ces cellules sont en outre le siège d'un intense métabolisme des prostaglandines. Ces lipides acides ont pour précurseur l'acide arachidonique transformable par la cyclooxygénase en métabolites intermédiaires, les endoperoxydes. Ces endoperoxydes donnent principalement naissance dans les cellules endothéliales à la prostacycline (PGI₂) grâce à une enzyme, la prostacycline synthétase.

La prostacycline est un important vasodilatateur et un inhibiteur puissant des plaquettes au même titre que la PGE₂ (Sinzinger *et al.*, 1990). Le temps de demi-vie de cette molécule est très bref, d'une minute ou deux. Elle se dégrade alors en un composé stable, la 6-céto-PGF_{1-α}. La synthèse continue de la prostacycline par les cellules endothéliales est très faible et le taux plasmatique de cette prostaglandine est très bas chez l'homme. Par contre, dans certaines conditions, la sécrétion de la prostacycline peut être stimulée de façon efficace, en particulier *in vitro*, en présence par exemple de thrombine (une enzyme-clé de la coagulation) (Ross, 1981).

3. Les facteurs vasodilatateurs

Les cellules endothéliales produisent des substances influençant directement la paroi vasculaire. Ces cellules contrôlent le tonus vasculaire en libérant des molécules aux activités antagonistes, actives sur les cellules musculaires lisses. Elles relarguent dans le milieu extracellulaire des facteurs relaxants (endothelial-derived relaxing factor : EDRF, PGI₂) (Clarke *et al.*, 1990) et aussi des facteurs avec un effet permettant la contraction des vaisseaux (endothéline) (Michel *et al.*, 1990; Dominiczak et Bohr, 1989; Inoue *et al.*, 1990). Ces molécules libérées entrent alors en contact avec les cellules de la paroi vasculaire, en particulier, avec les

cellules musculaires lisses, contrôlant la dilatation et la contraction de cette paroi.

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

4. Les facteurs de croissance

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

Le rôle des cellules endothéliales sur le contrôle de la prolifération des cellules musculaires lisses a fait l'objet de nombreuses études. Les cellules de l'endothélium sécrètent à la fois des facteurs d'inhibition et de stimulation de la croissance de ces cellules (Xu *et al.*, 1991).

De nombreuses expériences ont montré que les cellules musculaires lisses se divisent rarement spontanément (Brinkman *et al.*, 1990). La multiplication et le développement des cellules musculaires lisses dépendent de la présence de facteurs de croissance; la plupart de ces facteurs provenant de la cellule endothéliale (Vender *et al.*, 1987).

Les cellules endothéliales libèrent donc plusieurs substances peptidiques stimulant la croissance des cellules musculaires lisses. Elles incluent un facteur d'abord découvert dans les plaquettes (PDGF), un facteur de croissance dérivé des cellules endothéliales (ECDGF), un facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF-1 like), un facteur de croissance ressemblant à celui qui est sécrété par les fibroblastes (FGF), l'endothéline

(ET-1) (Michel *et al.*, 1990), certaines prostaglandines (Brinkman *et al.*, 1990) et l'interleukine 1 (IL-1) (Vender *et al.*, 1987). Les autres prostaglandines et les substances analogues à l'héparine inhibent par contre la croissance des cellules musculaires lisses (Desmoulière *et al.*, 1991).

On voit donc que de nombreux facteurs stimulant ou inhibant la croissance des cellules musculaires lisses sont synthétisées par les cellules endothéliales. La présence de récepteurs sur la membrane des cellules musculaires lisses est indispensable à l'effet stimulateur ou inhibiteur de ces facteurs de croissance (Schwartz *et al.*, 1990). Ces facteurs sont en interaction constante et une synergie entre ces substances de croissance est nécessaire à la prolifération des cellules musculaires lisses.

En outre, la cellule endothéliale, en réponse à différents stimuli, a la capacité de synthétiser le PAF (1 - O - alkyl - 2 - acétyl - sn - glycéro - 3 - phosphocholine). En restant associée à la surface de la cellule endothéliale, elle permet l'agrégation des plaquettes et des interactions avec les leucocytes. Mais, si le PAF est libéré dans l'intima, il interagit avec les cellules musculaires lisses, en stimulant probablement la prolifération de celles-ci : le PAF augmenterait l'effet du PDGF sur les cellules (Stoll et Spector, 1989).

En conclusion, au vu de l'ensemble des caractéristiques décrites ci-dessus, les cellules endothéliales sont indispensables au bon fonctionnement du système vasculaire. Ces cellules, à l'interface sang-tissu, agissent sur toute l'écologie vasculaire. Elles sont multifonctionnelles. L'endothélium est en interaction permanente avec les cellules circulant dans le sang d'une part et avec celles de la paroi du vaisseau sanguin, en particulier avec les cellules musculaires lisses d'autre part (Dominiczak et Bohr, 1989).

Après avoir présenté les cellules endothéliales avec leurs caractéristiques morphologiques et fonctionnelles dans des conditions normales, nous allons maintenant étudier les changements qu'on peut observer au sein de son métabolisme suite à une pathologie telle que les veines variqueuses.

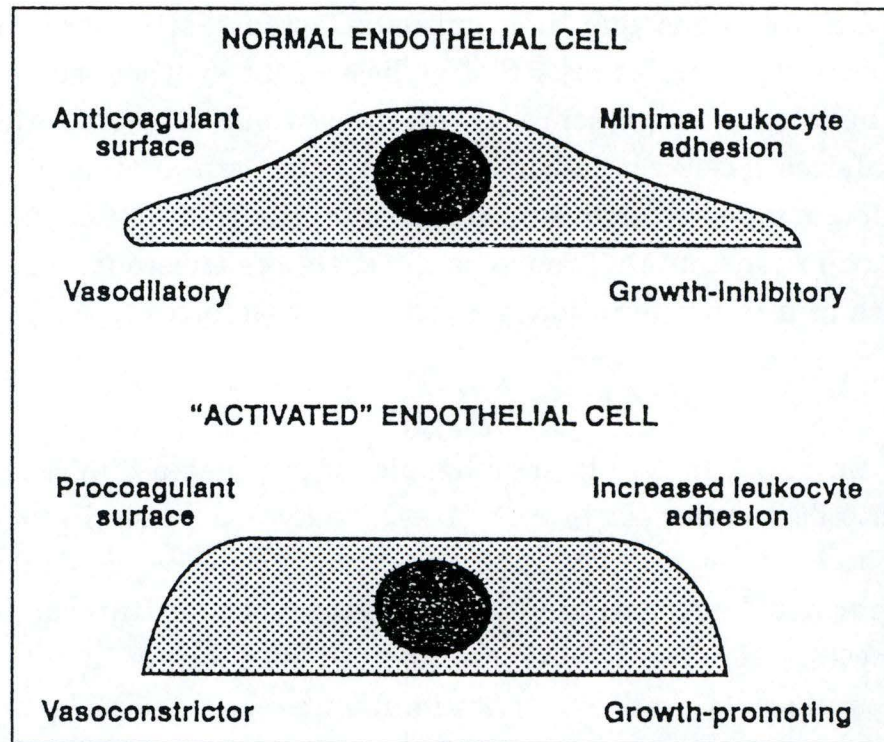


Figure I.8 : Les cellules endothéliales en situation normale constituent une surface anticoagulante. Cependant, dans les cas pathologiques, ces cellules sont activées et deviennent procoagulantes (Meredith *et al.*, 1993).

II.2. ALTÉRATION AU NIVEAU DE LA CELLULE ENDOTHÉLIALE AU COURS DE L'ISCHÉMIE

Comme nous l'avons déjà vu, l'endothélium constitue une barrière à perméabilité sélective. L'endothélium vasculaire joue un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie circulatoire et peut répondre à des changements par la synthèse et le relargage d'une variété de molécules biologiques actives.

Les cellules endothéliales en bonne santé constituent une surface antithrombotique qui décourage la migration des cellules inflammatoires (leucocytes) dans la paroi du vaisseau et inhibe la croissance vasculaire ainsi que la prolifération des cellules musculaires lisses (Figure I.8).

Cependant, lors d'une pathologie, il est également le premier affecté et ses fonctions peuvent être plus ou moins perturbées. En effet, une fois activées en réponse à une lésion, les cellules endothéliales deviennent prothrombotiques, favorisent l'adhésion des leucocytes ainsi que la croissance des cellules musculaires lisses. De plus, l'endothélium perd sa capacité vasodilatatoire suite à une synthèse prédominante de substances vasoconstrictives.

Il est actuellement reconnu que les dysfonctionnements qui ont lieu au sein des fonctions de l'endothélium sont les acteurs principaux des manifestations ischémiques dans de nombreuses pathologies telles que les maladies coronaires et, les veines variqueuses pour ne citer qu'elles (Meredith *et al.*, 1993).

Une interruption de la circulation du sang dans les tissus pendant une période d'ischémie provoque d'important dommages cellulaires. Ils sont la conséquence d'un défaut d'apport d'éléments nutritifs ainsi que d'un manque d'oxygène, conduisant à une déplétion en ATP et ils entraînent une mort tissulaire d'autant plus rapide que l'organe touché est plus hautement spécialisé et plus fragile.

Ces effets délétères peuvent, cependant, être amplifiés lors de la reprise du flux sanguin dans ce tissu. La reperfusion conduit elle aussi à des changements cellulaires néfastes dans un territoire préalablement

ischémié. Ces altérations sont regroupées sous la dénomination de "reperfusion injury" (Flaherty et Weisfeld, 1988; Piper, 1989).

In vitro, l'ischémie est mimée par la mise sous hypoxie, c'est-à-dire sous une atmosphère composée dépourvue d'oxygène, du matériel cellulaire.

Examinons en détail la séquence des événements intracellulaires qui ont lieu lors d'une ischémie (Figure I.9).

1. Les altérations au niveau du métabolisme énergétique

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

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

Pour compenser ce manque d'énergie, les cellules activent la glycolyse anaérobie, seul mécanisme énergétique fonctionnant sans apport d'oxygène. Cependant, celle-ci ne peut fournir que deux molécules d'ATP par molécule de glucose. Dans de telles conditions, la cellule, ne peut régénérer suffisamment d'ATP pour une survie à long terme.

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

2. Les altérations au niveau de la membrane

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

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

L'utilisation de β -hydroxybutyrate, une molécule qui inhibe la diminution de l'ATP suite à l'hypoxie, inhibe l'augmentation de la concentration en calcium dans les cellules endothéliales. Ces résultats suggèrent qu'une déficience en énergie est une cause importante de l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire observée dans les cellules endothéliales suite à une incubation sous hypoxie (Arnould *et al.*, 1992).

3. Les conséquences de l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire

L'ion calcium est un second messager intracellulaire important. Il est un activateur potentiel de nombreuses enzymes, telles que la protéine kinase C et la phospholipase A_2 impliquées dans la réponse des cellules à une stimulation induite par un agoniste (Rasmussen *et al.*, 1990).

Le calcium présent en plus grande quantité dans la cellule suite à l'hypoxie peut donc aussi servir de second messager pour induire différentes réponses telles que la synthèse de médiateurs de l'inflammation (Whatley *et al.*, 1990).

En effet, suite à l'augmentation de la concentration en calcium dans la cellule endothéliale induite par l'hypoxie, il a été observé que la phospholipase A₂ était fortement activée ce qui mène à la libération d'acide arachidonique clivé de la position *sn*-2 des phospholipides de la membrane phospholipidique. L'acide arachidonique libéré peut être ensuite métabolisé dans les cellules endothéliales par une enzyme, la cyclooxygénase, qui génère différents types de prostaglandines. Les prostaglandines synthétisées par les cellules endothéliales sont les PGE₂, PGD₂, PGF₂ α , PGI₂ à raison de 3,8, 2,7, 20,8 et 72,8 % des prostaglandines totales synthétisées (Michiels *et al.*, 1993b).

Suite à l'hypoxie et donc de l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire, la synthèse des prostaglandines est fortement augmentée. L'induction de la synthèse mène à une induction de 845, 953, 452 et 517 % pour les PGD₂, PGE₂, PGF₂ α et PGI₂ respectivement après deux heures de mise sous hypoxie. Ce sont donc la PGD₂ et la PGE₂ qui sont les plus induites dans ce type de conditions (Michiels *et al.*, 1993b).

Ces prostaglandines ont différents effets mais toutes semblent impliquées dans la régulation de l'inflammation. Elles entraînent une augmentation de la perméabilité vasculaire, ce qui mène à un oedème et provoque la souffrance cellulaire (Weissman, 1980). Les prostaglandines peuvent avoir des effets opposés, notamment sur la contraction vasculaire et la relaxation. Elles interagissent aussi avec différents types cellulaires et entre autres avec les cellules musculaires lisses de la média.

L'activation importante de la phospholipase A₂ suite à l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire conduit également à la synthèse de lyso-PAF qui peut être transformé en PAF (Platelet-Activating Factor). Le PAF présent à la surface des cellules endothéliales peut activer les neutrophiles qui entrent à leur contact suite à une augmentation des glycoprotéines d'adhésion comme l'intégrine CD18/CD11_b.

L'ensemble de ce processus entraîne l'adhérence des polymorphonucléaires sur l'endothélium.

En conclusion, les cellules endothéliales en réponse à un événement ischémique sont à l'origine de tout un processus, depuis l'augmentation de la concentration en calcium cellulaire jusqu'au recrutement des polymorphonucléaires et leur adhérence à l'endothélium vasculaire. La transition entre la diminution de l'ATP et l'augmentation du calcium intracellulaire dans les cellules endothéliales est encore un phénomène complexe qui sera décrit en détail dans le point suivant.

III. LE CALCIUM

L'ion calcium est un messenger 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 retrouve, à des mécanismes aussi variés que la contraction des muscles, la sécrétion d'hormones, d'enzymes digestives et de neurotransmetteurs, le transport de l'eau et du sel à travers la paroi intestinale et le métabolisme du glycogène dans le foie. Donc, de minuscules courants de calcium à travers la membrane cellulaire assurent la fonction de messagers intracellulaires; le calcium ne remplit sa fonction de messenger que si sa concentration est très faible et bien définie, des concentrations trop élevées perturbant le fonctionnement normal des cellules (Rasmussen, 1989).

Les cellules possèdent un ensemble de mécanismes simples pour moduler leur concentration en ions calcium. Elles établissent le passage de ces ions à travers la membrane plasmique qui entoure la cellule, la membrane interne des mitochondries et les membranes des réservoirs des ions calcium (le réticulum sarcoplasmique dans les cellules musculaires et les calciosomes dans les autres cellules). La concentration en ions calcium dans la cellule reste quasi constante, cependant, les courants à travers la membrane plasmique peuvent être très variables.

La sensibilité des cellules à de très petites modifications de la concentrations en ions calcium résulte de la concentration intracellulaire très faible. Elle est généralement 10 000 fois plus faible à l'intérieur de la cellule que dans le milieu extracellulaire. 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 également le passage des ions calcium par l'intermédiaire d'un gradient électrochimique en sodium (Rasmussen, 1989).

En tant que régulateur, toute augmentation de la concentration intracellulaire en calcium provoque l'activation de plusieurs systèmes enzymatiques. En effet, quand une cellule est stimulée par un signal extracellulaire, les canaux de sa membrane plasmique s'ouvrent et laissent les ions calcium pénétrer dans la cellule deux à quatre fois plus rapidement

qu'en l'absence de signal. Ces canaux sont spécifiques des ions calcium. La conséquence de cette stimulation cellulaire est donc une augmentation de la concentration en ions calcium dans le cytosol. Les ions calcium se fixent alors sur certaines protéines du cytosol comme la calmoduline. Les complexes calcium-protéine interagissent avec d'autres protéines cellulaires et modifient le fonctionnement de la cellule. Il existe dans la membrane plasmique une pompe à calcium qui est stimulée par la présence du complexe calmoduline-calcium et par la phosphorylation réalisée par la protéine kinase C. Cette pompe va augmenter le flux de Ca^{++} au sein de la cellule activée et donc entraîner une réponse cellulaire.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la diminution de la concentration en ATP cytosolique entraîne une rentrée d'ions calcium au sein de la cellule endothéliale soumise à une hypoxie, via une baisse de régime de l'activité des pompes ATPasiques (Arnould *et al.*, 1992). Ce surplus de calcium peut notamment activer des phospholipases endogènes, comme la phospholipase A₂. Cette activation provoque dans les cellules endothéliales l'augmentation de la synthèse de molécules pro-inflammatoires. Parmi celles-ci, citons les prostaglandines et le PAF (Platelet-Activating Factor) (Michiels *et al.*, 1993b; Arnould *et al.*, 1993).

Au sein des myocytes de l'artère pulmonaire, les conséquences de l'hypoxie sur le métabolisme du calcium ont déjà été bien étudiées. Il est bien établi que l'hypoxie mène à la contraction de la vascularisation pulmonaire. Cette réponse dirigerait la circulation pulmonaire en dehors des régions qui sont faiblement ventilées vers les régions fortement ventilées du poumon de façon à maintenir une oxygénation artérielle adéquate (Salvaterra et Goldman, 1993).

Il apparaît que l'hypoxie agit aussi directement sur les muscles lisses de l'artère pulmonaire, ce qui modifie le transport du calcium et augmente la contractilité. Il a été démontré sur des myocytes cardiaques soumis à une anoxie que la concentration en calcium cytosolique augmente graduellement après le début de la rigidité. La lenteur de l'augmentation du calcium et le fait qu'elle peut être bloquée par des cations bivalents ayant un rayon ionique similaire démontrent que le calcium traverse le sarcolemme par des petits pores et non par des grands trous (Piper, 1989).

La cause primaire de l'intrusion du calcium dans la cellule semble être une perte au niveau de la balance en sodium cellulaire. L'échange

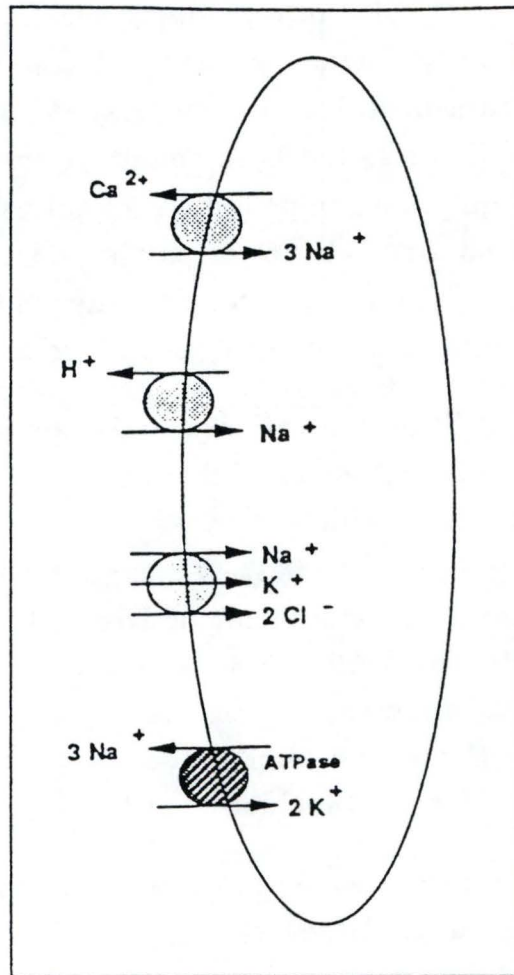


Figure I.10 : Représentation schématique des systèmes de cotransport du sodium au sein de la cellule musculaire lisse (O'Donnell et Owen, 1991).

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ semble représenter le mécanisme par lequel le calcium entre dans la cellule (Piper, 1989). En effet, il existe bien au sein des cellules musculaires lisses des vaisseaux un échange de trois ions Na^+ pour un ion Ca^{++} (Figure I.10). Cet échange se fait normalement lorsque la concentration en ions Na^+ est faible ou lorsque la concentration en ions Ca^{++} est élevée (O'Donnell et Owen, 1991). Cependant, dans des conditions de concentration suffisamment élevée en sodium intracellulaire, l'échange $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ semble être responsable d'une élévation du calcium intracellulaire (O'Donnell et Owen, 1991).

Il existe également un autre échange qui concerne les ions sodium au niveau de la membrane plasmique des cellules musculaires lisses des vaisseaux. C'est l'échange Na^+/H^+ qui permet l'entrée d'un ion sodium contre la sortie d'un ion hydrogène. Dans les conditions physiologiques, cet échange agit surtout comme un système alcalinisant du cytoplasme. Cet échange est donc dépendant du pH intracellulaire. Dans le cas d'une acidification du milieu intracellulaire, les ions H^+ seront échangés contre des ions Na^+ pour rétablir un pH intracellulaire adéquat (O'Donnell et Owen, 1991).

L'ion calcium est donc un élément très important dans les phénomènes d'activation cellulaire et l'augmentation de son entrée dans les cellules endothéliales soumises à une hypoxie pourrait être liée à des échanges avec d'autres ions.

Au laboratoire, il a été démontré que des cellules endothéliales soumises à une hypoxie étaient caractérisées par une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire suite à une chute de l'ATP cytoplasmique. Ces études ainsi que celles réalisées par de nombreuses équipes sur d'autres types cellulaires également soumises à une hypoxie ont montré que l'augmentation du calcium intracellulaire était importante dans l'étiologie de nombreuses pathologies. Ce processus mérite donc toute notre attention.

IV. LE BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR (bFGF)

Le basic fibroblast growth factor (bFGF) appartient à la famille des facteurs de croissance se liant à l'héparine (Gospodarowicz *et al.*, 1987). C'est une molécule d'un poids moléculaire de 18 000 Da qui est un mitogène et un morphogène puissant pour de nombreux types de cellules venant du mésoderme ou du neuroectoderme. Il est produit par de nombreux types cellulaires, incluant les cellules endothéliales, les cellules de la granulosa et de nombreux types de cellules tumorigéniques. Le bFGF intervient dans la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire (Rifkin et Moscatelli, 1989). Cependant, le bFGF agit également sur les cellules endothéliales qui le relarguent. En effet, à la surface de ces cellules, le récepteur au bFGF est présent (Neufeld et Gospodarowicz, 1988). La migration des cellules endothéliales *in vitro* est dépendante de la libération du bFGF endogène, ce qui suggère une fonction autocrine pour le bFGF (Sato et Rifkin, 1988).

Les cellules qui produisent le bFGF, telles que les cellules endothéliales, ne sécrètent pas le bFGF dans le milieu de culture quand elles sont en culture cellulaire (Schweigerer *et al.*, 1987). Ce comportement peut être expliqué par l'absence d'une séquence-signal conventionnelle dans le gène codant pour le bFGF (Abraham *et al.*, 1986).

En effet, chez les eucaryotes, les protéines destinées à l'exportation sont transportées à travers la membrane du réticulum endoplasmique vers la lumière du réticulum. Cet espace fait partie d'un réseau de canaux par lesquels les protéines néosynthétisées se déplacent jusqu'à atteindre la membrane plasmique. Les protéines de sécrétion sont emportées, dans de petites vésicules, du réticulum endoplasmique à l'appareil de Golgi. Des vésicules de sécrétion se détachent de la face *trans* (tournée du côté de la membrane plasmique) de l'appareil de Golgi et se déplacent vers la membrane plasmique où leur contenu quittera la cellule par exocytose.

Le noeud du processus qui permet la séquestration des protéines dans ces différents organites réside dans la première vingtaine de résidus de la

chaîne polypeptidique naissante. La séquence des résidus enlevés au précurseur est appelée séquence-signal ou peptide-signal. Il est connu que ce peptide commande à la cellule de transporter la protéine à laquelle est attachée ce peptide dans le réticulum endoplasmique au cours de la synthèse de la protéine. Les peptides-signal sont de longueur et de composition variable mais le prototype est long de 16 à 30 résidus, dont 4 à 12 sont des résidus hydrophobes. Il semble que le caractère hydrophobe du peptide compte plus pour le transport que sa composition primaire précise. En effet, on peut substituer simultanément bon nombre d'acides aminés d'un peptide-signal sans dommage pour sa fonction (Rawn, 1990).

Le bFGF ne contient pas de peptide-signal dans sa séquence et ne peut donc être exporté à l'extérieur de la cellule via le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Cependant, il est reconnu que ce facteur de croissance agit extracellulairement. Il possède deux modes d'action. Il peut agir de façon paracrine sur les cellules avoisinantes de celle qui le libère mais il peut également agir de manière autocrine sur la cellule dont il provient.

En effet, de nombreuses formes de récepteurs pour le bFGF sont présentes sur la membrane plasmique de nombreuses cellules (Neufeld et Gospodarowicz, 1988). Le nombre de récepteurs au bFGF par cellule semble être inversement proportionnel à son contenu en facteur de croissance (Moscatelli et Quarto, 1989) ce qui suggère l'existence d'une "down regulation" des récepteurs cellulaires. De plus, des quantités significatives sont trouvées extracellulairement associées aux protéoglycanes de type héparan-sulfate de la matrice extracellulaire *in vitro* (Bashkin *et al.*, 1989) et sont présentes dans la membrane basale *in vivo* (Folkman *et al.*, 1988). Enfin, il a été démontré au laboratoire que le surnageant conditionné par les cellules endothéliales hypoxiques induisait la prolifération des cellules musculaires lisses, ce qui signifie que ce surnageant contient des éléments mitogéniques. Cependant, si des anticorps neutralisants contre le bFGF sont utilisés en présence du surnageant des cellules endothéliales pour la culture des cellules musculaires lisses, l'effet prolifératif du surnageant est annulé (Michiels *et al.*, 1994b). Ces différents résultats suggèrent que le bFGF agit extracellulairement via un mécanisme paracrine.

Toutefois, le bFGF peut également agir extracellulairement via un mécanisme autocrine. On observe effectivement la présence de récepteur au

bFGF sur la membrane plasmique des cellules endothéliales ainsi que du bFGF associé à la matrice extracellulaire de ces cellules. De plus, l'utilisation d'anticorps neutralisant contre le bFGF altère plusieurs propriétés des cellules produisant le bFGF, y compris la morphologie, la croissance dans l'agar, la synthèse de l'activateur de plasminogène et la migration cellulaire (Sasada *et al.*, 1988; Sato et Rifkin, 1988).

Malgré le fait qu'aucun mécanisme pour la libération du bFGF n'ait été décrit, la mort ou des dommages à la membrane plasmique ont été proposés en tant que mécanisme possible pour l'externalisation du bFGF. De nombreuses équipes ont étudié ce processus par différentes méthodes.

Mc Neil et ses collaborateurs (1989) ont montré qu'une blessure sublétales entraînait une augmentation de la libération du bFGF par les cellules endothéliales.

Muthukrishnan et son équipe (1991) ont montré qu'une libération de bFGF par les cellules endothéliales altérées par "scraping" était en corrélation avec une augmentation de la LDH dans le milieu.

Galloway *et al.* (1984) ont montré qu'une libération du bFGF par les tissus du myocarde était en corrélation positive avec le taux de créatine phosphate retrouvé dans le milieu. La créatine phosphate sert de moyen de mesure des dommages cellulaires.

Brooks *et al.* (1991) ont montré une coïncidence entre l'augmentation de la libération du bFGF et la diminution du nombre de cellules au niveau de la monocouche, l'augmentation de la concentration en LDH et l'augmentation des cellules et des débris cellulaires dans le milieu.

Mignatti *et al.* (1992) ont mesuré l'effet de différentes molécules et de différentes conditions sur la libération du bFGF par les cellules NIH 3T3 et ont conclu à l'existence d'un mécanisme d'exocytose indépendant du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi.

Donc, les lésions au sein de la membrane plasmique peuvent être à l'origine d'un trafic moléculaire hors et vers le cytoplasme (McNeil et Ito, 1989). Cependant, il reste à déterminer si la lésion cellulaire est

physiologiquement responsable du mode de libération du bFGF *in vitro* (Mignatti *et al.*, 1992).

La localisation du bFGF dans les cellules endothéliales n'est pas non plus bien définie. Plusieurs études sur la localisation subcellulaire du bFGF dans des cellules SK-Hep1 et NIH 3T3 transfectées avec du cDNA de bFGF ont démontré une localisation prédominante d'une forme de bFGF dans le noyau alors que le bFGF de 18 kDa serait localisé dans le cytoplasme (Renko *et al.*, 1990). D'autres chercheurs ont montré la présence du bFGF dans le noyau, les nucléoles et le cytoplasme périnucléaire. Aucune présence de bFGF n'est observée au niveau des vésicules de pinocytose, du complexe de Golgi, du réticulum endoplasmique, des corps de Weibel-Palade, de la membrane nucléaire ou des jonctions intercellulaires (Yu *et al.*, 1993).

Comme signalé ci-dessus, les cellules endothéliales incubées sous hypoxie libèrent divers facteurs mitogènes. En effet, l'utilisation du milieu conditionné par ces cellules pour la culture des cellules musculaires lisses induit la prolifération de ces dernières. Tandis que l'utilisation d'anticorps neutralisant contre le bFGF bloque cette prolifération.

Par ailleurs, l'usage d'indométhacine, un inhibiteur de la synthèse des prostaglandines, lors de la culture des cellules endothéliales entraînait également une chute de l'activité mitogénique du milieu conditionné des cellules endothéliales hypoxiques sur les cellules musculaires lisses. Les prostaglandines interviennent donc aussi dans ce processus de prolifération. Des courbes de concentration des quatre prostaglandines différentes synthétisées par les cellules endothéliales ont été réalisées à l'aide de prostaglandines synthétiques afin d'étudier la prolifération des cellules musculaires lisses. Il a ainsi pu être montré que la $\text{PGF}_2\alpha$, la PGD_2 et la PGE_2 stimulent la prolifération des cellules musculaires lisses (Michiels *et al.*, 1994b). En comparant la concentration à laquelle ces trois prostaglandines étaient présentes dans le milieu conditionné par les cellules endothéliales hypoxiques avec la concentration à laquelle ces molécules montraient un effet pro-prolifératif, il a pu être démontré que seul la $\text{PGF}_2\alpha$ pouvait intervenir dans la prolifération des cellules musculaires lisses; les

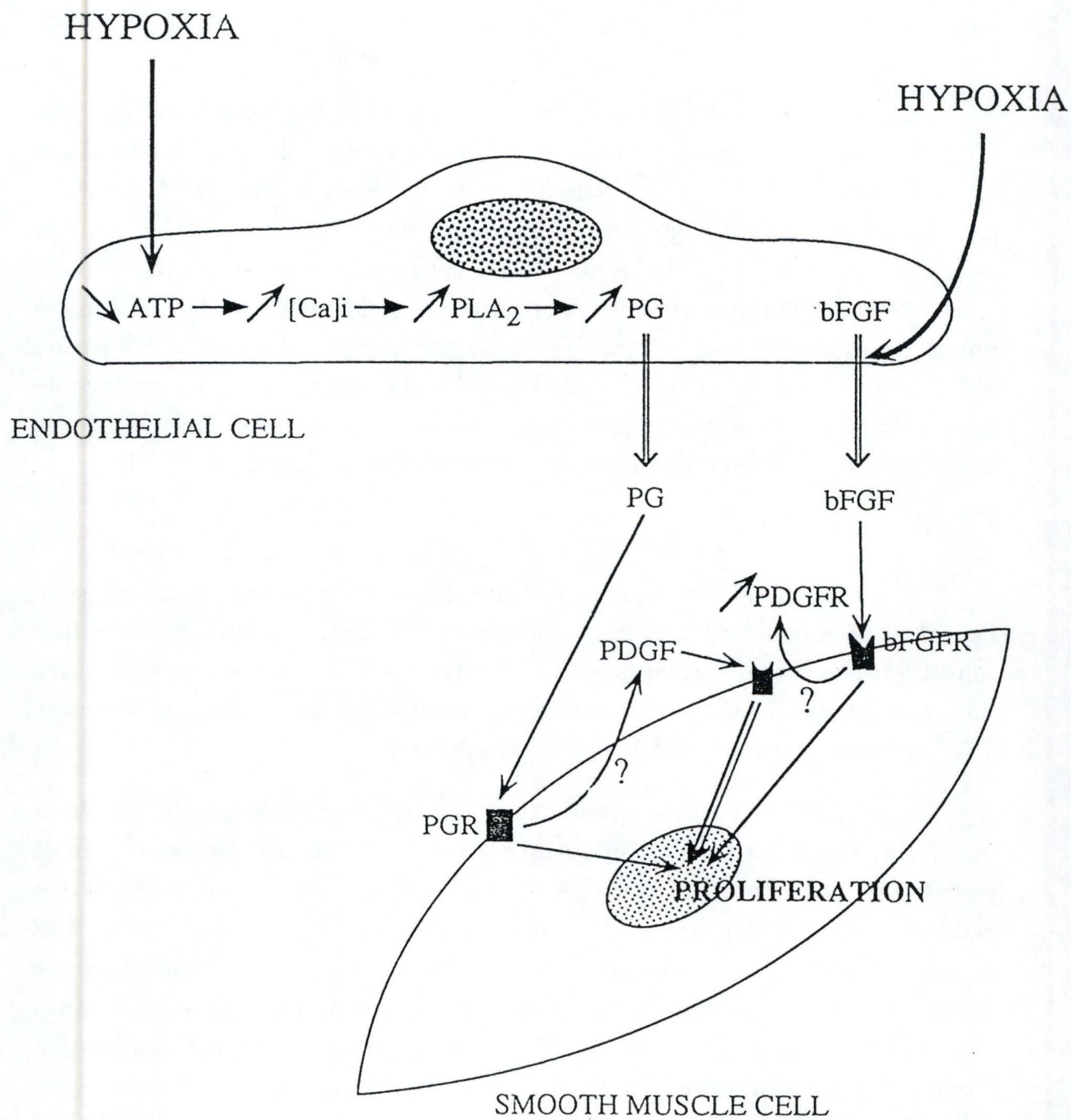


Figure I.11 : Hypothèse pour l'intervention simultanée de la $PGF_{2\alpha}$ et du bFGF dans la prolifération des cellules musculaires lisses (Michiels *et al.*, 1994).

deux autres prostaglandines étant inactives à la concentration à laquelle elles sont présentes dans le milieu conditionné.

Les résultats de ces expériences montrent donc que la $\text{PGF}_{2\alpha}$ intervient dans la prolifération des cellules musculaire lisses en plus du bFGF.

L'utilisation de bFGF pure et de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pure simultanément pour la culture des cellules musculaires lisses montre un effet additif de ces molécules ce qui signifie bien que ces deux molécules agissent ensemble (Michiels *et al.*, 1994b).

Afin d'expliquer l'action simultanée de ces deux molécules, une hypothèse a été proposée. Il est connu que la liaison d'éicosanoïdes à son récepteur sur la cellule musculaire lisse entraîne une libération de PDGF par ces cellules. Il est également connu que la liaison du bFGF à son récepteur sur ces mêmes cellules entraîne une augmentation des récepteurs au PDGF en surface des cellules musculaires lisses. De plus, le PDGF entraîne la prolifération de ces cellules. Il est donc possible que l'augmentation des récepteurs au PDGF et la présence du PDGF lui-même expliquèrent cette prolifération élevée au niveau des cellules musculaires lisses (Figure I.11).

Ces différents résultats illustrent le rôle important joué par le bFGF dans différentes conditions pathologiques. Cependant, son mode de libération à partir des cellules qui le synthétisent dans ces conditions pathologiques reste hypothétique et mérite donc une étude systématique.

V. BUT DU MÉMOIRE

Comme nous venons de le décrire, le phénomène d'ischémie vasculaire répété conduit à un remaniement complet de la paroi des vaisseaux sanguins et en particulier de la paroi veineuse. Si l'endothélium reste intact au niveau des cellules endothéliales, de nombreuses modifications ont lieu et l'endothélium est responsable du recrutement et de l'activation des neutrophiles ainsi que de la prolifération accrue des cellules musculaires lisses.

Si la cascade d'activation des cellules endothéliales par l'hypoxie est bien décrite, il reste cependant deux mécanismes biochimiques qui n'ont pas été entièrement élucidés : celui qui conduit à l'élévation de la concentration calcique cytosolique et celui qui entraîne la libération de bFGF à partir des cellules endothéliales.

Le but de ce mémoire était donc, dans un premier temps, d'essayer de mettre en évidence les mécanismes biochimiques responsables de l'augmentation du calcium intracellulaire dans la cellule endothéliale incubée sous hypoxie. Il a été montré au laboratoire que la concentration en ATP diminue suite à l'hypoxie et entraîne une augmentation de la concentration en calcium cytosolique. Cette augmentation a des conséquences importantes puisque le calcium va activer la phospholipase A₂ et entraîner la production de PAF qui intervient dans l'inflammation d'une part et d'autre part de PGF₂α qui induit la prolifération des cellules musculaires lisses. La première partie de ce mémoire s'attachera donc à éclaircir ce processus en se basant sur une hypothèse déjà mise en évidence sur les cardiomyocytes et qui fait intervenir des flux d'ions H⁺ et Na⁺.

Dans un second temps, nous nous sommes penchés sur la libération de bFGF par les cellules endothéliales hypoxiques dans la prolifération des cellules musculaires lisses. Le bFGF est une molécule peu connue, sa localisation dans la cellule endothéliale ainsi que son mode de libération par

ces cellules suite à l'hypoxie sont encore inconnus. Il s'agit donc d'un problème particulièrement difficile à aborder.

Cette étude est réalisée *in vitro* mais elle permet d'étudier de manière systématique les modifications apparaissant au sein de la cellule endothéliale lorsqu'elle est soumise à une hypoxie. Ces résultats devront par la suite être transposés au tissu complet et dans des situations d'ischémie afin de pouvoir expliquer les changements qui interviennent dans la paroi vasculaire lors de stases veineuses répétées.

CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. CULTURE DE CELLULES ENDOTHELIALES

I. A. MISE EN CULTURE

I. A. 1. Matériel et solutions

1. Solution de récolte et de conservation des cordons ombilicaux à pH 7,36 et composée de :

- KCl 4 mM (Merck, Darmstad, Allemagne)
- NaCl 140 mM (Merck)
- Hépes 10 mM (Janssen-Chimica, Beerse, Belgique)
- D-glucose 1 mM (Merck)
- Streptomycine 100 µg/ml (Sigma, St Louis, MO, USA)
- Pénicilline 100 U/ml (Sigma)
- Fungizone (Amphotéricine B) 0,25 µg/ml (Sigma)

Cette solution est stérilisée par filtration (pompe péristaltique et filtre stérivex GV, 0,22 µm, Millipore, Bedford, MD, USA) et stockée à 4°C dans des bouteilles en verre stérilisées pendant 8 heures à 180°C ou autoclavées 20 minutes à 120°C.

2. Solution saline de rinçage (0,15 M en NaCl) tamponnée par du phosphate 10 mM (PBS) à pH 7,4 et stérilisée par filtration. Cette solution contient les antibiotiques et la fungizone aux mêmes concentrations que la solution de récolte. Elle est stockée à 4°C dans des bouteilles en verre stérilisées.

3. Collagénase type II (Sigma) 0,05 % dans du milieu M199 et stérilisée par filtration (filtre minisart NML, 0,2 µm, Sartorius, Gottingen, Allemagne).

4. Gélatine (Merck) 0,2 % dans de l'eau distillée et stérilisée par filtration.

5. Milieu de culture M 199 composé de sels de Hanks (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne), Hépes 10 mM, NaHCO₃ 1,75 g/l (Merck), L-glutamine 100 mg/ml (Gibco) et porté à pH 7,2 avec du NaOH (Merck).

6. Milieu de culture MCDB (Gibco) + 10 % ou 20 % S (sérum) : milieu MCDB auquel on a ajouté 10 % ou 20 % de sérum de veau foetal (Gibco).

7. Milieu de culture MCDB + 20 % S + FC (facteurs de croissance) : milieu MCDB auquel on a ajouté 20 % de sérum de veau foetal (Gibco) ainsi que des facteurs de croissance à savoir du BPE (Bovine Pituitary Extract, Becton-Dickinson, Bedford, MD, USA) à une concentration finale de 10 µg/ml et du ECGS (Endothelial Cell Growth Supplement, Becton-Dickinson) à une concentration finale de 30 µg/ml.

8. Pots en plastique stérilisés à l'alcool dénaturé pour le stockage des cordons.

9. Boîtes de Pétri en verre stérilisées.

10. Berlins en verre stérilisés.

11. Tubes stériles en plastique (Stérilin, Staffordshire, Grande-Bretagne).

12. Boîtes de culture T25 (Corning, 25 cm², New-York, NY, USA).

I. A. 2. Méthode

Les cordons sont stockés après l'accouchement dans des pots en plastique contenant 50 ml de solution de récolte et conservés à 4°C.

Au cours de la mise en culture, le cordon est avant tout lavé extérieurement dans 25 ml de solution saline de rinçage dans un berlin puis essuyé à l'extérieur avec un papier imbibé d'alcool dénaturé. Ensuite, la veine ombilicale est perfusée avec 25 ml de solution saline de rinçage au moyen d'un système seringue-cathéter. La veine est alors canulée avec deux

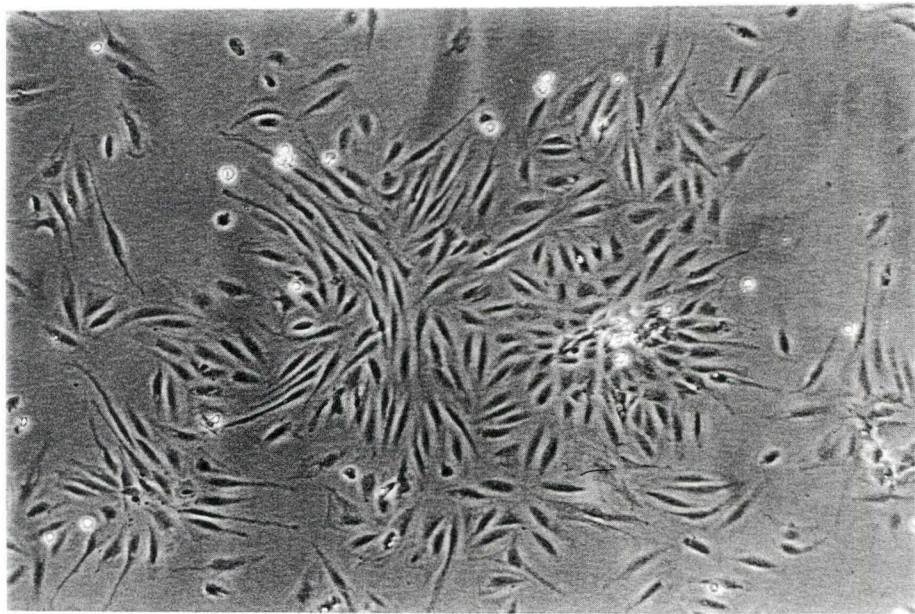


Figure II.1 : Photographies en microscopie à contraste de phase des cellules endothéliales le lendemain de la mise en culture (grossissement = 115 X).

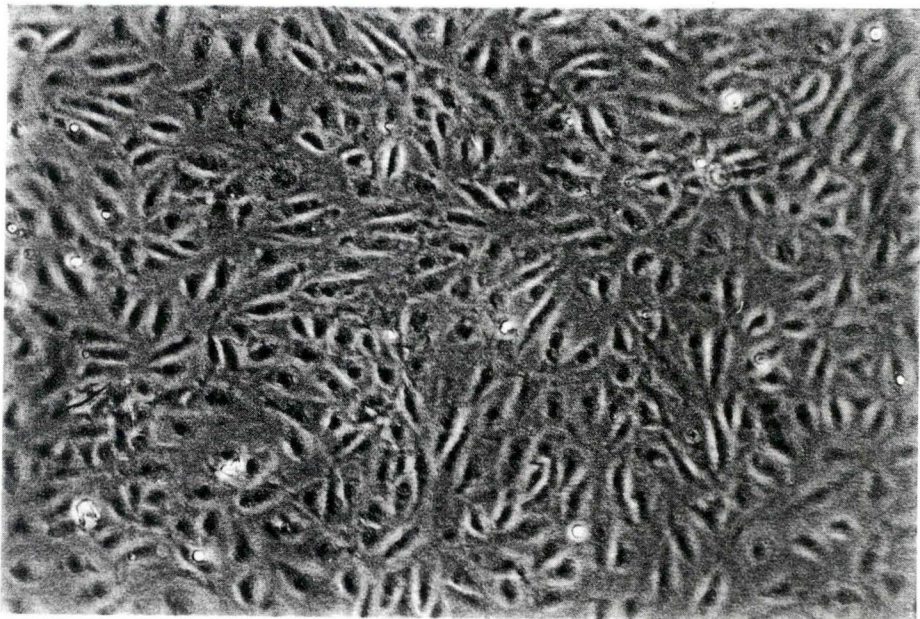


Figure II.2 : Photographies en microscopie à contraste de phase des cellules endothéliales à confluence (grossissement = 115 X).

serre-joints et incubée avec 3-4 ml de collagénase type II (0,05 %) pendant 35 minutes à 37°C dans une boîte de Pétri en verre. Les cellules endothéliales détachées de la paroi veineuse sont récoltées dans du milieu de culture M199 + 10 % S dans un berlin (le sérum a pour but d'inhiber la collagénase). Les cellules endothéliales sont transvasées dans un tube stérile et centrifugées à 1000 rpm pendant 10 minutes puis le culot cellulaire est resuspendu dans 5 ml de MCDB + 20 % S. Cette suspension est placée dans une boîte de culture T25 préalablement recouverte de gélatine (1 ml/T25), facilitant ainsi l'adhérence et la multiplication des cellules endothéliales.

Le lendemain, les cellules attachées sont rincées 2 à 3 fois avec 5 ml de M199 afin d'éliminer les globules rouges, les cellules mortes et les autres cellules sanguines (Figure II.1). Ensuite, le milieu est décanté et remplacé par 5 ml de milieu MCDB + 20 % S + FC afin d'optimiser la croissance des cellules. Les cellules sont gardées à 37°C jusqu'à leur confluence (Figure II.2).

I. B. REPIQUAGE

I. B. 1. Matériel et solutions

1. Milieu de culture M 199 composé de sels de Hanks, Hépes 10 mM, NaHCO₃ 1,75 g/l, L-glutamine 100 mg/ml et porté à pH 7,2 avec du NaOH.

2. Milieu MCDB + 10 % S : milieu MCDB auquel on a ajouté 10 % de sérum de veau foetal.

3. Milieu MCDB + 20 % S + FC : milieu MCDB auquel on a ajouté 20 % de sérum de veau foetal ainsi que des facteurs de croissance.

4. Trypsine-EDTA 0,25 % (Gibco).

5. Gélatine 0,2 %.

I. B. 2. Méthode

Lorsque les cellules sont arrivées à confluence et forment une monocouche uniforme, elles sont rincées deux fois pendant 30 secondes avec 5 à 10 ml de milieu M199 sans sérum. Le milieu est décanté et remplacé par 2 à 4 ml de trypsine-EDTA (l'EDTA chélate les ions Ca^{++} et accélère le détachement des cellules du substrat). La quantité de trypsine à ajouter dépend du type de boîte contenant les cellules (T25 ou T75). Les boîtes sont alors incubées 2 à 3 minutes à 37°C. L'évolution de la trypsinisation est suivie au microscope optique à contraste de phase (ZEISS).

Lorsque les cellules sont détachées, on ajoute 6 à 8 ml de milieu MCDB + 10 % S pour inhiber l'action de la trypsine.

Les cellules sont resuspendues au moyen d'une pipette Pasteur et récoltées dans un tube stérile. La suspension est centrifugée pendant 10 minutes à 1000 rpm. Le surnageant contenant la trypsine est décanté et le culot cellulaire est resuspendu dans du milieu de culture. Le type de milieu et la quantité requise pour la suspension est déterminée par l'usage ultérieure des cellules et par le type de boîte utilisé.

En général les cellules sont repiquées dans un rapport de un à deux ou de un à trois et le milieu est changé tous les quatre à cinq jours.

I. C. CONGÉLATION-DÉCONGÉLATION

I. C. 1. Matériel et solutions

1. Milieu de culture M199 composé de sels de Hanks, Hépes 10 mM, $NaHCO_3$ 1,75 g/l, L-glutamine 100 mg/ml et porté à pH 7,2 avec du NaOH.

2. Trypsine-EDTA 0,25 %.

3. Milieu de culture MCDB + 40 % S : milieu MCDB auquel on a ajouté 40 % de sérum de veau foetal.

4. DMSO + 20 % S : DMSO (Diméthyl sulfoxide, Merck) auquel on a ajouté 40 % de sérum de veau foetal.

5. Ethanol absolu (Merck).

6. Ampoules stériles de 1,8 ml (Cryotubes, Nunc, Roskilde, Danemark).

7. Milieu de culture MCDB + 20 % S : milieu MCDB auquel on a ajouté 20 % de sérum de veau foetal.

8. Milieu de culture MCDB + 20 % S + FC : milieu MCDB auquel on a ajouté 20 % de sérum de veau foetal ainsi que des facteurs de croissance.

9. Boîtes de culture T75 (Corning, 75 cm²).

I. C. 2. Congélation

Les cellules à confluences dans les boîtes de culture T75 sont rincées deux fois avec 10 ml de milieu M199 pendant 30 secondes environ. Le milieu est décanté et remplacé par 4 ml de trypsine-EDTA. Les boîtes sont incubées pendant 2 minutes à 37°C. Lorsque les cellules sont détachées, on ajoute 8 ml de milieu M199 + 10 % S et les cellules sont resuspendues au moyen d'une pipette Pasteur. Les cellules sont récoltées dans un tube stérile et centrifugée pendant 10 minutes à 1000 rpm. Le surnageant est décanté et le culot cellulaire est resuspendu dans 0,4 ml de milieu MCDB + 40 % S. La suspension est ensuite transférée dans une ampoule à congélation. Juste avant la congélation, on ajoute 0,4 ml de DMSO + 20 % S. Les ampoules sont placées dans un récipient contenant de l'alcool absolu et le tout est transféré à -70°C.

I. C. 3. Décongélation

L'ampoule contenant les cellules congelées est placée dans de l'eau à 40°C. Quand l'ampoule est décongelée, elle est centrifugée pendant 10 minutes à 1000 rpm. Le surnageant est décanté et le culot est resuspendu dans 20 ml de milieu MCDB + 20 % S et placé dans une boîte de culture T75. Le lendemain, si les cellules ne sont pas encore à confluence, le milieu est décanté et remplacé par 15 ml de milieu MCDB + 20 % S + FC. Si les cellules sont à confluence, elles peuvent être repiquées.

II. MISE SOUS HYPOXIE

II. A. PRINCIPE

L'ischémie est simulée en exposant les cellules endothéliales à une hypoxie sévère (atmosphère composée à 100 % d'azote) pendant un temps plus ou moins long (Michiels *et al.*, 1992).

II. B. MATÉRIEL ET SOLUTIONS

1. Tampon HBSS pH 7,36 porté à 37°C : NaCl 140 mM (Merck), D-glucose 5,5 mM (Merck), KCl 5 mM (Merck), MgSO₄ 0,4 mM (Merck), MgCl₂ 0,5 mM (Merck), Na₂HPO₄ 4,3 mM (Merck), KH₂PO₄ 0,4 mM (Merck), CaCl₂ 1 mM (Merck).

2. Bouteille d'azote (L'Air Liquide).

3. Enceinte hermétique munie de deux ouvertures.

II. C. MÉTHODE

Les cellules sont repiquées dans des boîtes appropriées à la confluence voulue pour l'expérience.

Avant l'expérience, les cellules sont rincées trois fois avec du HBSS porté à 37°C, ensuite elles sont recouverte d'un volume minimum de HBSS, ceci afin de favoriser les échanges gazeux et donc la mise en place des conditions d'hypoxie tout en assurant la viabilité des cellules. Les boîtes sont déposées dans l'enceinte et exposées à un flux d'azote à 100 % pendant deux minutes. La casserole est alors fermée hermétiquement et placée dans la chambre à 37°C pour la durée de l'hypoxie. Des contrôles réalisés dans les mêmes conditions mais maintenus en normoxie sont toujours réalisés en parallèle.

III. DOSAGE DES PROTÉINES

III. A. PRINCIPE

Les protéines du tapis cellulaires seront dosées par la méthode de Lowry *et al.* (1951). Les protéines sont dénaturées par le NaOH et exposent de cette façon leurs groupements aux réactifs. Les ions cuivriques de la solution alcaline utilisée pour le dosage forment un complexe bleu avec les liaisons peptidiques, tandis que le complexe phosphomolybdique-phosphotungstique du réactif de Folin est réduit par les résidus tyrosine et tryptophane des protéines. L'intensité de la coloration bleu est mesurée à 660 nm au spectrophotomètre et est proportionnelle à la quantité de protéines présentes.

III. B. MATÉRIEL ET SOLUTIONS

1. Solution d'étalon protéine (sérum albumine bovine) à 200 µg/ml (Sigma).
2. NaOH 0,5 N et NaOH 1 N (Merck).
3. Mixture alcaline (solution A) à préparer juste avant l'emploi :
 - 100 ml Na₂CO₃ 0,19 M (Merck)
 - 1 ml CuSO₄.5H₂O 0,04 M (Merck)
 - 1 ml NaKC₄H₄O₆.1H₂O 0,07 M (Merck)
4. Réactif de Folin à diluer deux fois (Merck).

III. C. MÉTHODE

III. C. 1. Récolte des protéines cellulaires

Les cellules sont rincées trois fois avec du HBSS. Les protéines sont dénaturées en ajoutant 0,5 ml de NaOH 0,5 N pendant 30 minutes. Parallèlement, on prépare le blanc et l'étalon :

- blanc : 0,2 ml d'eau + 0,2 ml de NaOH 1 N pendant 30 minutes

- étalon : 0,2 ml d'étalon + 0,2 ml de NaOH 1 N pendant 30 minutes

Les protéines cellulaires sont resuspendues et deux fractions de 0,2 ml sont récoltées. Le blanc et l'étalon sont gardés tels quels. Ces fractions peuvent soit être dosées directement, soit être congelées à -20°C pour un dosage ultérieur.

III. C. 2. Dosage des protéines cellulaires

Les fractions de protéines cellulaires, le blanc et l'étalon sont décongelés. Pour tous les tubes, toutes les 30 secondes, 2 ml de mixture alcaline sont ajoutés. Celle-ci doit réagir pendant 5 à 15 minutes. Les tubes sont vortexés directement. Ensuite, 0,2 ml de réactif de Folin sont ajoutés en respectant l'ordre des tubes et le temps et vortexés immédiatement après. La densité optique (DO) à 660 nm est lue au spectrophotomètre après 30 minutes.

La concentration en protéines se calcule comme suit :

$$\text{Concentration en } \mu\text{g/ml} = 200 \times \frac{(\text{DO } \text{éch.} - \text{DO bl.})}{(\text{DO } \text{ét.} - \text{DO bl.})}$$

IV. DOSAGE DU CALCIUM CYTOSOLIQUE

IV. A. PRINCIPE

Afin de mesurer la concentration en ions calcium (Ca^{++}) libres dans le cytoplasme des cellules endothéliales, nous avons utilisé plusieurs sondes fluorescentes, à savoir les sondes Fluo-3, Fura-2, Calcium green-1.

Ces sondes sont disponibles sous forme d'ester d'acétoxyméthyl (Fluo-3 AM, Fura-2 AM, Calcium-green-1 AM), ce qui permet leur passage à travers la membrane cellulaire hydrophobe.

En effet, une sonde fluorescente doit être capable de traverser la membrane cellulaire. Cependant, les indicateurs fluorescents présentent souvent un caractère hydrophile car ce sont des anions polycarboxyliques sous leur forme non estérifiée qui ne peuvent dès lors traverser la bicouche

lipidique hydrophobe. Le passage transmembranaire est rendu possible par la présence de cette estérification. Une fois incorporé dans le cytoplasme, l'indicateur sera clivé par des estérases cytosoliques libérant la sonde active capable de complexer le Ca^{++} avec une stoechiométrie 1:1. La perte de ce groupement ester empêchera la sonde de ressortir de la cellule et d'entrer dans les organites limitant donc la mesure au calcium cytosolique (Tsien *et al.*, 1984). La fluorescence est obtenue après l'excitation de la molécule (absorption d'un photon). Un électron passe d'un état fondamental à l'un des niveaux d'état excité. L'électron pour revenir à son état fondamental doit dissiper son énergie sous forme de photon provoquant ainsi un phénomène de fluorescence. La longueur d'onde d'émission est plus grande que la longueur d'onde d'excitation et est caractéristique de l'élément considéré (526 pour le Fluo-3, 510 nm pour le Fura-2 et 530 pour le Calcium-green-1). Les mesures se font à température ambiante (20°C). La constante de dissociation (K_d) à température ambiante est de 450 nmoles pour le Fluo-3, 135 nmoles pour le Fura-2 et 189 nmoles pour le Calcium-green-1.

IV. B. MATÉRIEL ET SOLUTIONS

1. Sonde estérifiée Fluo-3 AM (Molecular Probe, Eugene, OR, USA). La sonde est fournie sous forme lyophilisée en aliquots de 50 μg . Chaque aliquot sera resuspendu dans 24 μl de DMSO avant l'emploi, ce qui constitue une solution stock de 2,375 mM. La sonde doit être conservée à -20°C et à l'obscurité.

2. Sonde estérifiée Fura-2 AM (Molecular Probe). La sonde est fournie sous forme lyophilisée en aliquot de 50 μg à resuspendre dans 50 μl de DMSO avant l'emploi. On obtient ainsi une solution stock de 0,1 mM. La conservation se fait à -20°C et à l'obscurité.

3. Sonde estérifiée Calcium-green-1 (Molecular Probe). La sonde est fournie sous forme lyophilisée en aliquot de 50 μg à resuspendre dans 78 μl de DMSO avant l'utilisation. La solution stock réalisée a une concentration de 5 mM. Les aliquots sont conservés à -20°C et à l'abri de la lumière.

4. DMSO (diméthylsulfoxyde).

5. Milieu de culture MCDB + 10 % S.

6. Tampon HBSS pH 7,36 porté à 37°C.

7. Acide pluronique (Molecular Probe) à dissoudre à 37°C dans du DMSO pour obtenir une solution finale de 2,5 mM.

8. Triton X-100 (Merck) 1 % dans du HBSS.

9. TRIS 1 M (Merck) - EGTA 50 mM (Sigma) pH 8,3.

IV. C. MÉTHODE AU CYTOFUORIMÈTRE

IV. C. 1. Repiquage

Les cellules endothéliales à confluence sont repiquées dans des boîtes multipuits de 24 puits (Corning) à raison de 0,5 ml de suspension cellulaire dans du milieu MCDB + 10 % S par puits.

IV. C. 2. Chargement de la sonde

Une fois que les cellules sont arrivées à confluence dans les boîtes multipuits, le milieu est décanté et remplacé par 0,5 ml de milieu MCDB + 10 % S contenant la sonde à une concentration de 10 μ M final pour la sonde Fluo-3 AM, 0,25 μ M final pour la sonde Fura-2 AM et 2 μ M final pour la sonde Calcium-green-1 AM. Les cellules sont incubées pour une durée d'une heure à 37°C et à l'obscurité. Ensuite, le milieu d'incubation est décanté et les cellules sont rincées trois fois avec 1 ml d'HBSS à 37°C pour éliminer l'excès de sonde. La monocouche cellulaire est recouverte de 0,2 ml de HBSS à 37°C et incubée sous hypoxie pour une durée allant de 30 à 120 minutes.

IV. C. 3. Mesure de la concentration en calcium cytosolique

La fluorescence émise par la sonde est mesurée au moyen d'un cytofluorimètre (Cytofluor, Millipore). La sonde est excitée par une longueur d'onde de 488 nm pour le Fluo-3, 348 nm pour le Fura-2 et de 488 nm pour le Calcium-green-1. La sonde devient de cette façon fluorescente et réémet à une longueur d'onde de 526 nm pour le Fluo-3, 510 nm pour le Fura-2 et 530 nm pour le Calcium-green-1. L'intensité de la fluorescence réémise est mesurée par un photodétecteur.

Après les différents temps d'incubation sous hypoxie, les cellules sont rincées trois fois avec 1 ml d'HBSS à 37°C avant d'ajouter 0,7 ml d'HBSS à 37°C pour la mesure. Une première mesure appelée F est réalisée. Ensuite, 70 µl de Triton X-100 à 1 % sont ajoutés sur les cellules afin de les perméabiliser et de provoquer une fluorescence maximale suite à l'exposition de la sonde à un excès de calcium. On mesure alors cette valeur maximale appelée Fmax. Enfin, une troisième mesure appelée Fmin est réalisée après l'ajout de 70 µl de tampon TRIS-EGTA. L'EGTA est à une concentration suffisante pour chélater tout le calcium présent et maintenir la sonde sous forme libre suite à un renversement de l'équilibre chimique. On mesure alors une valeur minimale appelée Fmin.

IV. C. 4. Calcul de la concentration en calcium cytosolique

La concentration en ions calcium présents dans le cytoplasme des cellules endothéliales peut être calculée grâce à la formule suivante :

$$[Ca^{++}] = Kd \frac{F - Fmin}{Fmax - F} \text{ nM}$$

$$Kd \text{ Fluo-3} = 450 \text{ nM}$$

$$Kd \text{ Fura-2} = 135 \text{ nM}$$

$$Kd \text{ Calcium-green-1} = 189 \text{ nM}$$

IV. D. MÉTHODE AU FLUORIMÈTRE

IV. D. 1. Principe

Pour la mesure de la concentration en calcium cytosolique ($[Ca^{++}]_i$) au spectrofluorimètre, nous avons utilisé la sonde Fura-2. Après désestérification, le Fura-2 se trouve sous sa forme active et est alors capable de complexer spécifiquement les ions calcium avec une stœchiométrie 1:1. Le monochromateur est placé successivement et le plus rapidement possible sur 340, 358 et 380 nm pour la longueur d'onde d'excitation. Ces longueurs d'onde sont absorbées par la sonde qui devient à son tour une source d'émission fluorescente pour un second monochromateur placé à 90° et qui sélectionne le signal réémis à 510 nm. L'intensité de fluorescence est alors mesurée par un photodétecteur.

La liaison du calcium à la sonde Fura-2 déplace le pic d'excitation de la sonde de 380 nm à 340 nm. Nous mesurons la fluorescence réémise à 510 nm. La longueur d'onde d'émission est plus grande que la longueur d'onde d'excitation de la sonde et est caractéristique de l'élément considéré. Les mesures se font à température ambiante (20 °C). La constante de dissociation (Kd) du Fura-2 à cette température est de 135 nM.

IV. D. 2. Principe

1. Sonde estérifiée Fura-2 AM dissoute dans 50 µl de DMSO. Elle est stockée sous forme solubilisée à -20 °C et à l'obscurité.
2. Solution d'acide pluronique à 20 % dans du DMSO.
3. Tampon HBSS pH 7,36.
4. Triton X-100 à 10 %.
5. Tampon Tris (1M) -EDTA (50 mM) à pH 8,3
6. Solution de $MnCl_2$ (1M) (Merck)

IV. D. 3. Dosage du calcium cytosolique

Pour le dosage de la $[Ca^{++}]_i$, les cellules sont repiquées sur des couvre-objet dont les dimensions s'adaptent à la cuvette du spectrofluorimètre. Pour la mesure, le couvre-objet est placé sur la diagonale d'une cuvette en quartz à 4 faces polies (Hellma, Benelux) contenant 3 ml de tampon HBSS qui est rapidement transférée dans le spectrofluorimètre (SFM-25, Kontron). L'orientation du couvre-objet doit former un angle de 45° avec la source d'excitation ainsi qu'avec le filtre d'émission. On suit ensuite la fluorescence au cours du temps avec une longueur d'onde d'émission de 510 nm et une sensibilité de 400 V.

On expose successivement la monocouche de cellules aux longueurs d'onde d'excitation de 340, 358 et 380 nm et on mesure les intensités fluorescentes correspondantes. Ces trois valeurs sont respectivement nommées F 340, F 358 et F 380. Le passage de 340 à 380 doit se faire très rapidement.

On ajoute ensuite 30 μ l de Triton X-100 (10 %) afin de perméabiliser les cellules et de provoquer une fluorescence maximale par exposition de la sonde au calcium extracellulaire (1 mM). On mesure alors les valeurs maximales appelées F 340 max, F 358 max et F 380 max.

On ajoute alors 300 μ l de tampon d'EDTA 50 mM dans du tampon Tris-HCl 1 M à pH 8,3. L'EDTA à la concentration finale de 5 mM est suffisante pour chélater tout le calcium présent et maintenir la sonde sous forme libre. On lit alors les valeurs minimales de fluorescence appelées F 340 min, F 358 min et F 380 min.

Afin d'obtenir la valeur d'autofluorescence (AF) des cellules, du milieu et du couvre-objet à 340 et 380 nm, on ajoute 3 μ l de $MnCl_2$ (1M). Ces valeurs sont respectivement nommées AF 340 et AF 380. Le $MnCl_2$ empêche la sonde d'émettre de la fluorescence ("quenching").

Afin de contourner la variation importante observée entre plusieurs mesures d'un même échantillon et produite par la présence du couvre-objet dans la cuvette, il est nécessaire d'introduire un facteur correctif destiné à réduire ce bruit de fond. Nous utilisons le mode de correction mis au point au laboratoire de cytologie par Verhoye (1989). Ainsi, toutes les intensités de fluorescence obtenues à 340 et 380 nm sont corrigées en ajustant les valeurs à un plateau fixe de 500 et en discriminant les valeurs d'autofluorescence respectivement selon la formule :

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

Avec F_x (nm), F358 et AF $_x$ (nm qui sont les valeurs respectivement lues à 340 ou 380 nm et la valeur d'autofluorescence lue à 340 ou 380 nm.

La formule permettant de déterminer la concentration en calcium cytosolique est complexe et se base sur les rapport entre les valeurs de fluorescence ajustées obtenues à 340 nm et à 380 nm. Cette méthode permet d'estimer plus précisément la concentration en calcium que les méthodes qui se basent uniquement sur la fluorescence mesurée pour une seule longueur d'onde d'excitation. En utilisant ces valeurs ajustées, nous utilisons la forme décrite par Grynkiewicz *et al.* (1985) :

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

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

$$R_{max} = \frac{F_{340min}}{F_{380max}}$$

$$R_{min} = \frac{F_{340min}}{F_{380min}}$$

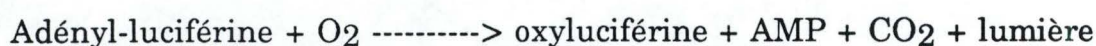
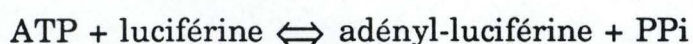
K_d (20 °C) est la constante de dissociation du calcium avec la sonde, soit 135 nM à 20 °C.

V. DOSAGE DE L'ATP

V. A. PRINCIPE

L'ATP relargué par les cellules endothéliales peut être dosé par une détermination bioluminescente. L'ATP est mis en présence d'une mixture réactionnelle contenant de la luciférine et de la luciférase.

Les réactions sont les suivantes :



C'est la lumière émise qui est dosée grâce à un luminomètre (Lumac, Landgraaf, Pays-Bas). Cette émission est proportionnelle à la quantité d'ATP présente au départ.

V. B. MATÉRIEL ET SOLUTIONS

1. Eau distillée à pH 7,8 stérilisée par filtration (filtre minisart NMC, 0,2 μm , Sartorius) utilisée pour le dosage et les dilution d'ATP cellulaire.

2. ATP Assay Mix (Sigma) : mixture de révélation contenant la luciférase et la luciférine.

V. C. MÉTHODE

V. C. 1. Repiquage

Les cellules endothéliales confluentes sont repiquées dans des boîtes de 3,5 cm de diamètre (10 cm^2) dans un rapport de un à un.

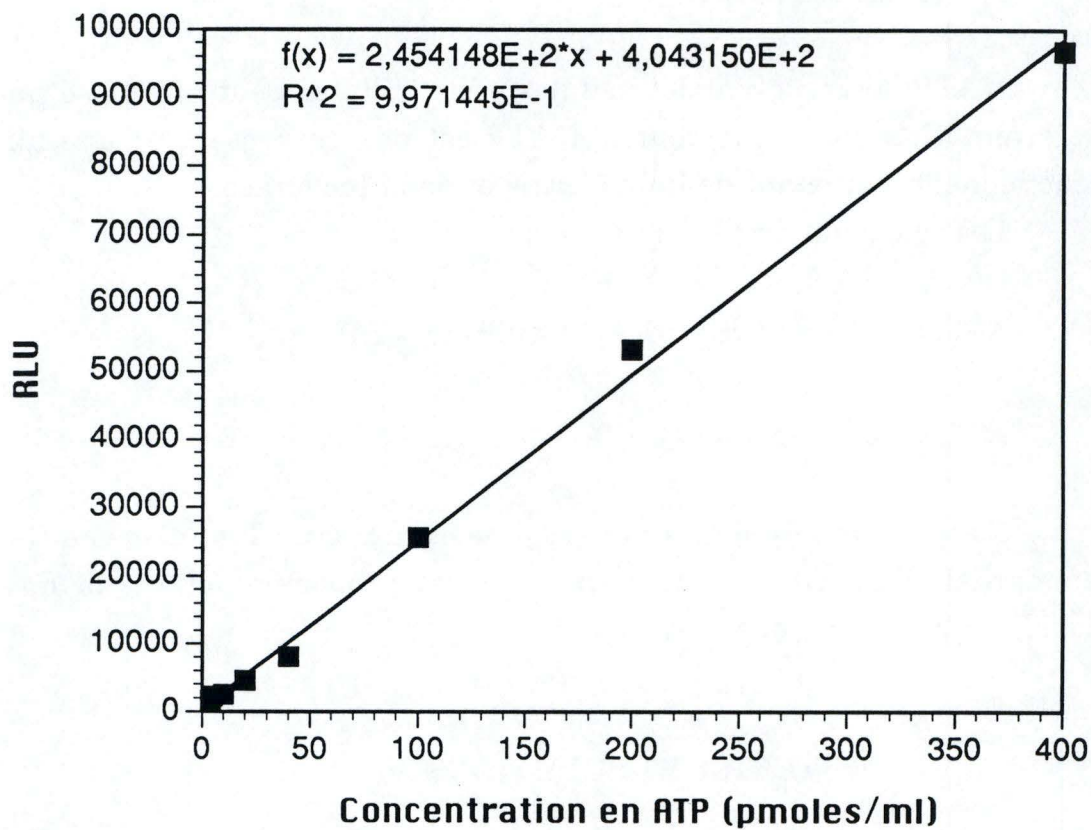


Figure II.3 : Droite d'étalonnage donnant la concentration en ATP en picomoles/ml en fonction des RLU (relative light units).

V. C. 2. Récolte de l'ATP relargué

Après l'incubation sous hypoxie, le surnageant contenant l'ATP libéré par les cellules endothéliales est récolté en aliquots de 200 µl et les aliquots sont congelés à -70°C.

V. C. 3. Dosage de l'ATP relargué

Les échantillons sont dégelés à 4°C ainsi que la mixture de révélation. Le tout est conservé dans la glace pendant la durée du dosage. Dans un tube adapté (Lumac), le mélange suivant est ajouté :

- 400 µl d'eau distillée pH 7,8 à température ambiante
- 20 µl de mixture de révélation
- 10 µl d'ATP cellulaire dilué de façon adéquate dans de l'eau distillée pH 7,8 à 4°C

L'intensité de la lumière émise est mesurée grâce au luminomètre.

La quantité d'ATP est calculée selon la droite d'étalonnage présentée à la figure II.3.

V. C. 4. Mesure de la stabilité de l'ATP

Les cellules endothéliales étant soumises à une hypoxie dans du tampon HBSS, c'est dans ce milieu également que l'ATP va être récolté. Cependant, il est utile de savoir si l'ATP est stable dans l'HBSS, que ce soit pendant l'hypoxie à 37 °C ou pendant le stockage à -70 °C en attente du dosage.

Pour ce faire nous avons utilisé une solution d'ATP (Sigma) à une concentration de 10 mg/l dans du tampon HBSS. Cette solution a été mise dans des conditions de températures variables afin de déterminer sa stabilité :

- la solution a été dosée immédiatement après sa préparation
- la solution a été dosée après avoir été placée pendant 2 heures à 37 °C dans la HBSS
- la solution a été dosée après avoir été placée pendant 6 jours à -70 °C dans le HBSS
- la solution a été dosée après avoir été placée pendant 2 heures à 37 °C suivie de 6 jours à -70 °C dans le HBSS

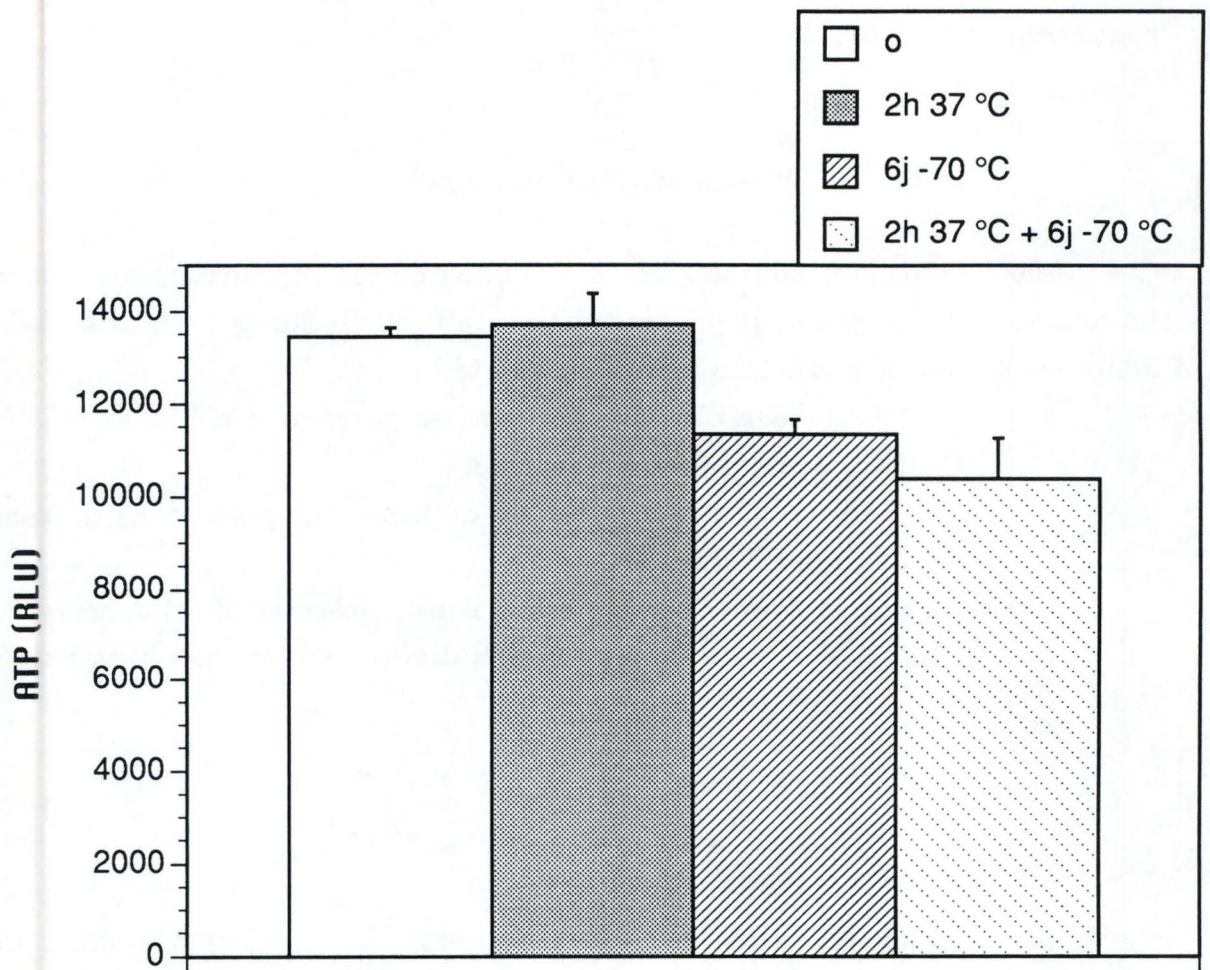


Figure II.4 : Mesure de la stabilité de l'ATP dans le tampon HBSS après 2 heures à 37 °C, 6 jours à -70 °C et 2 heures à 37 °C suivies de 6 jours à -70 °C. Les résultats sont exprimés en RLU.

Nous observons à la figure II.4 qu'il y a peu de modification entre les différentes mesures. Une faible diminution est observée pour les échantillons congelé sans doute suite à la décongélation mais on n'observe pas de dégradation de l'ATP dans l'HBSS à 37 °C.

VI. MESURE DE LA VIABILITÉ DES CELLULES ENDOTHÉLIALES GRÂCE AU TRYPAN BLEU

VI. A. PRINCIPE

Le trypan bleu est un colorant qui entre dans les cellules suite à une altération de l'intégrité de la membrane cytoplasmique. Les cellules qui ont leur membrane altérée se colorent en bleu. Grâce à cette molécule, on peut estimer la proportion de cellules dont la perméabilité membranaire est fortement altérée, c'est-à-dire la proportion de cellules mortes.

VI. B. REPIQUAGE

Les cellules endothéliales à confluence sont resuspendues dans 5 ml de milieu MCDB + 20 % S après centrifugation et 6 gouttes de cette suspension sont déposées dans des boîtes de Pétri de 6 cm de diamètre contenant 4 ml de MCDB + 20 % S et préalablement grillagées pour faciliter le comptage.

VI. C. MATÉRIEL ET SOLUTIONS

1. Tampon HBSS pH 7,36 porté à 37°C.
2. Trypan bleu 0,4 % (SIGMA) préparé dans 0,81 % de NaCl et 0,06 % de K₂HPO₄.

VI. D. MÉTHODE

Le milieu de culture est décanté et les cellules sont rincées trois fois avec 2 ml de HBSS, avant d'ajouter 1,5 ml de HBSS pour l'incubation sous hypoxie. Après l'incubation, le surnageant est décanté et 1 goutte de trypan bleu est déposée sur les cellules pour une durée de 2 à 3 minutes. Le trypan bleu est décanté et les cellules colorées ainsi que les cellules non colorées sont comptées au microscope optique à contraste de phase (ZEISS).

En faisant le rapport entre les cellules colorées au trypan bleu et les cellules incolores, un pourcentage de viabilité cellulaire pour différent temps en hypoxie peut être calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ de viabilité} = \frac{\text{nombre de cellules non colorées}}{\text{nombre de cellules colorées} + \text{nombre de cellules non colorées}}$$

VII. MESURE DE LA PERMÉABILITÉ DES CELLULES ENDOTHÉLIALES

VII. A. PRINCIPE

Afin de mettre en évidence une altération mineure de la perméabilité des cellules, on peut suivre la pénétration dans le cytoplasme de ces cellules d'une molécule fluorescente de faible poids moléculaire. Nous avons choisi pour ce faire le dextran-fluorescéine de 9300 Da. Cette pénétration peut être révélée en examinant les cellules en microscopie à fluorescence. Une molécule de poids moléculaire largement supérieur (147 800 Da) a également été utilisée afin de vérifier si l'altération de la perméabilité de la membrane plasmique était importante ou non.

VII. B. REPIQUAGE

Les cellules endothéliales sont resuspendues dans 5 ml de milieu MCDB + 20 % S après centrifugation et 5 gouttes de cette suspension sont déposées dans des boîtes de Pétri de 3,5 cm de diamètre (10 cm²) contenant 2 ml de milieu MCDB + 20 % S.

VII. C. MATÉRIEL ET SOLUTIONS

1. Tampon HBSS pH 7,36 porté à 37°C.

2. Dextran fluorescéine (PM 9 300 ou PM 147 800, Sigma) dans le HBSS (10 mg Dextran / ml HBSS).

VII. D. MÉTHODE

Après avoir décanté le milieu, les cellules sont rincées trois fois avec 1,5 ml de HBSS puis 0,7 ml de HBSS contenant le dextran-fluorescéine sont ajoutés pour l'incubation sous hypoxie. Après l'hypoxie, les cellules sont à nouveau rincées trois fois avec 1,5 ml de HBSS. Une lamelle porte-objet est déposée sur les cellules et celles-ci peuvent être observées au microscope à fluorescence (Leitz, Dialux 22, Allemagne).

Des photographies sont réalisées sur un film dias 400 ASA couleurs. Chaque boîte est photographiée à la fois en contraste de phase et en fluorescence afin de pouvoir déterminer où se trouve la fluorescence et donc afin de localiser le dextran-fluorescéine par rapport au cellules.

VIII. DOSAGE DE LA LDH (LACTATE DÉSHYDROGÉNASE)

VIII. A. PRINCIPE

Dans le but de mesurer la perméabilité membranaire des cellules endothéliales soumises à l'hypoxie, un dosage de la LDH libérée dans le milieu d'incubation de ces cellules a été réalisé. La quantité de LDH restante dans la cellule endothéliale après l'incubation sous hypoxie a également été déterminée afin d'avoir une stimulation de la quantité totale de LDH récupérée.

La quantité totale de LDH présente dans le lysat cellulaire de cellules endothéliales non traitées a également été mesurée. A l'aide de ces données, un pourcentage de la quantité de LDH relarguée suite à l'hypoxie peut être calculée.

La lactate déshydrogénase est une enzyme qui catalyse la réaction suivante :



L'activité de la LDH est mesurée par le taux de consommation du pyruvate et du NADH. Le NADH ayant son maximum d'absorbance à 340 nm, on mesure à cette longueur d'onde la diminution d'absorbance due à l'oxydation du NADH.

VIII. B. MATÉRIEL ET SOLUTIONS

1. Tampon phosphate 0,05 M - pyruvate $3,1 \cdot 10^{-4}$ M à pH 7,5.
2. NADH $8 \cdot 10^{-3}$ M (Sigma) à préparer extemporanément.
3. Tampon PBS contenant 0,9 g NaCl et 2 ml de tampon phosphate 0,5 M pH 7,4.
4. Triton X-100 à 1 % dans du PBS

VIII. C. MÉTHODE

VIII. C. 1. Repiquage

Les cellules sont repiquées à confluence dans des boîtes de 3,5 cm de diamètre (10 cm²).

VIII. C. 2. Récolte des surnageant

Après l'hypoxie, des aliquots de 250 µl de milieu d'incubation sont récoltés et stockés à -70°C. Ensuite, les cellules sont perméabilisées pendant dix minutes en ajoutant 700 µl de Triton X-100 à 1 %. Des aliquots de 250 µl du lysat cellulaire sont également récoltés et stockés à -70°C.

VIII. C. 3. Dosage de la LDH

Les échantillons sont décongelés à 4°C et conservés dans la glace pendant la durée du dosage. Dans une cuvette en quartz, les composés suivants sont ajoutés successivement :

- 2,5 ml de tampon - phosphate contenant le pyruvate
- 0,05 ml de NADH
- 0,10 ml de l'échantillon contenant la LDH

La cuvette est placée dans le spectrophotomètre et la diminution de la densité optique est suivie à 340 nm pendant trois minutes pour chaque échantillon.

VIII. C. 4. Calcul de la quantité de LDH présente

La quantité de LDH présente dans les différents échantillon peut être calculée grâce à la formule suivante :

$$\Delta \text{abs}_{340 \text{ nm}} \text{ moyen/minute} \times 100 = \text{LDH en unité/ml échantillon}$$

Le pourcentage de libération est calculé suivant la formule suivante :

$$\% \text{ de libération} = \frac{\text{activité de la LDH dans le milieu}}{\text{act. milieu.} + \text{act. lysat}}$$

IX. MESURE DE LA LIBÉRATION DE ^{51}Cr

IX. A. PRINCIPE

Afin de mettre en évidence une modification de la perméabilité membranaire des cellules endothéliales, une mesure de la libération de ^{51}Cr préalablement incorporé a été réalisée. Pour ce faire, ces cellules sont incubées avec du chrome radioactif pendant 3 heures et la quantité de ce chrome libérée dans le milieu d'incubation est mesurée..

IX. B. MATÉRIEL ET SOLUTIONS

1. Milieu MCDB + 20 % S.
2. Milieu MCDB.
3. Chrome 51 (Amersham, Buckinghamshire, Grande Bretagne) à une activité spécifique de 250-200 mCi/mg de chrome..
4. Tampon HBSS pH 7,36.
5. NaOH 1 N.

IX. C. MÉTHODE

IX. C. 1. Repiquage

Les cellules endothéliales sont repiquées à confluence dans des boîtes de 3,5 cm de diamètre (10 cm²) dans du milieu MCDB + 20 % S.

IX. C. 2. Récolte du ^{51}Cr libéré

Le milieu MCDB + 20 % S est d'abord décanté, ensuite les cellules sont rincées 3 fois avec 1,5 ml de milieu MCDB sans sérum. Enfin, 1 ml de MCDB contenant 10 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^{51}Cr est ajouté pour une durée de 3 heures.

Une fois l'incorporation terminée, les cellules sont rincées 5 fois avec 1 ml de HBSS puis incubée sous hypoxie.

Après l'incubation, le milieu est récolté dans des tubes en plastique. 700 μl de NaOH 1 N sont ajoutés sur les cellules pendant 30 minutes puis le lysat est également récolté dans des tubes en plastique.

IX. C. 3. Dosage du ^{51}Cr libéré

Les tubes sont fermés hermétiquement avec un capuchon en plastique et mis à compter dans un détecteur à radiation pendant 30 secondes.

Le pourcentage de libération est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ de libération du } ^{51}\text{Cr} = \frac{\text{cpm dans le milieu}}{\text{cpm dans le milieu} + \text{cpm du lysat}} \times 100$$

X. DOSAGE DU bFGF

X. A. REPIQUAGE

Les cellules endothéliales sont repiquées à confluence dans des boîtes de Pétri de 3,5 cm de diamètre (10 cm^2).

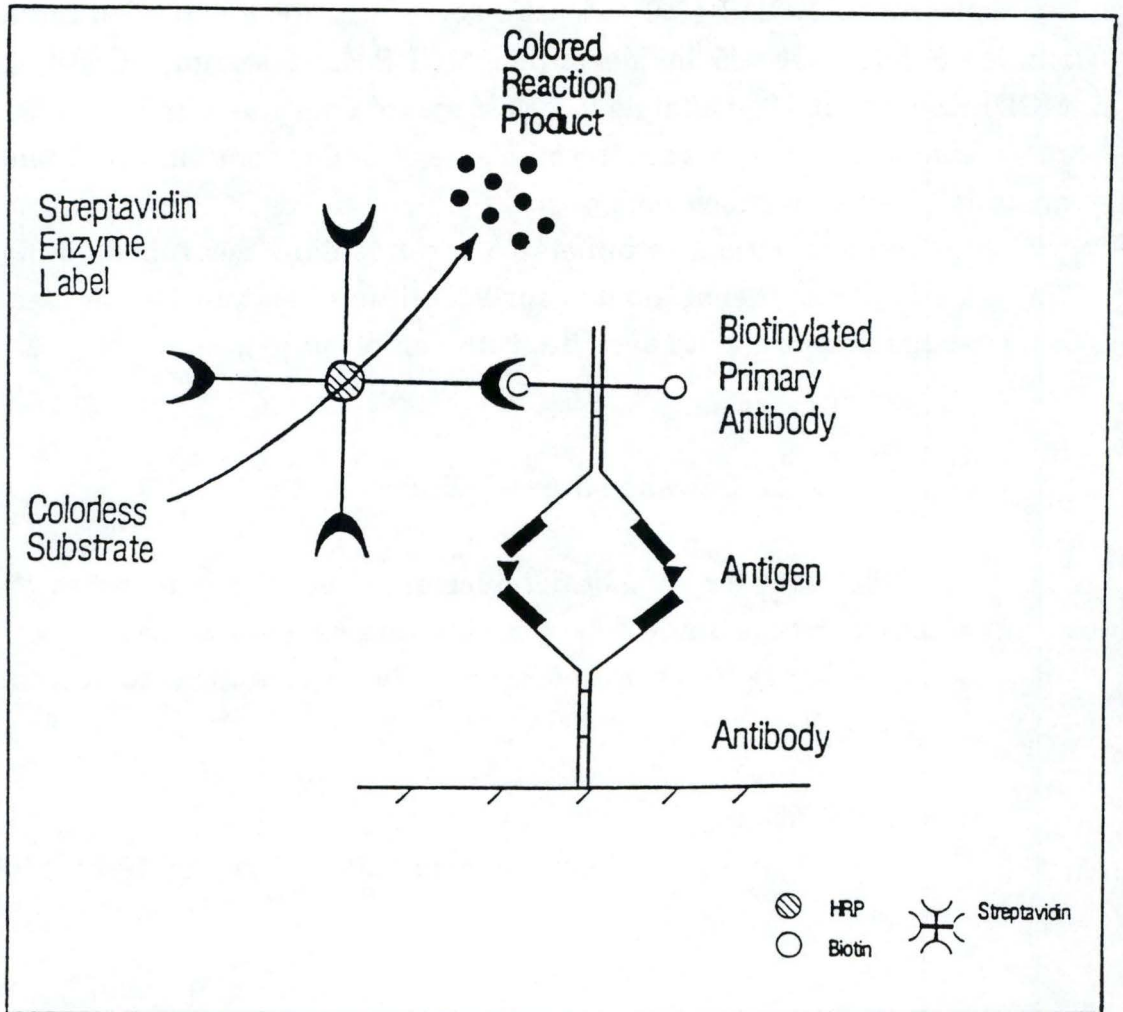


Figure II.5 : Principe du test ELISA direct utilisé pour le dosage du bFGF (d'après Immuno Stain Handbook).

X. B. RÉCOLTE DES MILIEUX D'INCUBATION

Le milieu de culture est décanté et les cellules sont rincées trois fois avec 1 ml de HBSS à 37°C. Avant d'ajouter 0,7 ml de HBSS à 37°C par boîte pour l'incubation sous hypoxie.

Après l'incubation, le milieu est récolté en aliquots de 200 µl dans des tubes Épendorfs qui sont conservés à -70°C jusqu'au moment du dosage.

Ensuite, 0,7 ml de NaOH 1 N sont déposés sur les cellules pendant 30 minutes pour dénaturer les protéines. Celles-ci sont alors récoltées en aliquots de 200 µl et congelées à -20°C en attendant leur dosage par la méthode de Lowry *et al.*, (1951).

Le dosage des protéines permet de rapporter la quantité de bFGF relargué par les cellules endothéliales au cours de l'hypoxie à la quantité de protéines associées aux cellules et donc à la quantité de cellules.

X. C. ÉLISA

X. C. 1. Principe

L'ÉLISA permet de doser un constituant biologique quantitativement grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques de celui-ci. Pour ce faire, nous avons à notre disposition une plaque multipuits recouverte avec des anticorps monoclonaux spécifiques du composé à doser. Les échantillons sont déposés dans des puits. Les anticorps vont reconnaître le composé va se fixer dans le fond des puits. Tous les autres constituants seront éliminés par lavage. Ensuite, un anticorps polyclonal également spécifique du composé à doser mais lié lui-même à une enzyme de révélation est ajouté. Après la liaison de ce second anticorps, une solution contenant le substrat chromogène de cette enzyme est déposé dans les puits. La coloration obtenue suite à la réaction enzymatique est proportionnelle à la quantité de composé présent au départ (Figure II.5).

Parallèlement, une courbe d'étalonnage est réalisée afin de déterminer la concentration en composé présente dans chaque échantillon.

X. C. 2. Matériel et solutions

1. Kit (BIOTRAK, Amersham, Buckinghamshire, Grande-Bretagne) contenant :

- une plaque multipuits recouverte avec les anticorps monoclonaux spécifiques du bFGF
- une fiole de solution standard pour faire la courbe de calibration
- une fiole de diluant
- une fiole de solution de rinçage à diluer 25 fois dans de l'eau distillée
- une fiole d'anticorps polyclonaux spécifiques du bFGF conjugués à la peroxydase
- une fiole de réactif A (H_2O_2) et de réactif B (tétraméthylbenzidine) à mélanger en quantité égale pour former la solution de révélation
- une fiole de solution stop pour arrêter la réaction

X. C. 3. Méthode

Les standards de concentrations connues sont préparés pendant que les échantillons dégèlent à 4°C. Une fiole de solution standard est resuspendue dans 2 ml de HBSS pour obtenir une solution à 640 pg/ml. La reconstitution prend 10 minutes au cours desquelles on agite régulièrement. Pendant ce temps, les tubes Épendorfs qui vont contenir différentes dilutions sont préparés (320 pg/ml-160 pg/ml-80 pg/ml-40 pg/ml-20 pg/ml-10 pg/ml-5 pg/ml-0 pg/ml). 500 µl d'HBSS sont ajoutés dans chaque tube Épendorf ainsi que 500 µl de solution standard à 640 pg/ml dans le premier tube Épendorf. Enfin, une dilution de deux en deux est réalisée.

Dans tous les puits nécessaires, 50 µl de diluant AD1J, une solution de saturation, sont ajoutés, suivis de 200 µl d'échantillon ou de standard. La plaque est recouverte avec un film plastique et laissée à température ambiante pendant deux heures.

Quand le temps est écoulé, les puits sont rincés trois fois avec 400 µl de solution de rinçage en prenant soin de bien enlever tout le liquide se trouvant dans les cupules c'est-à-dire en retournant la plaque et en la frappant sur du papier absorbant.

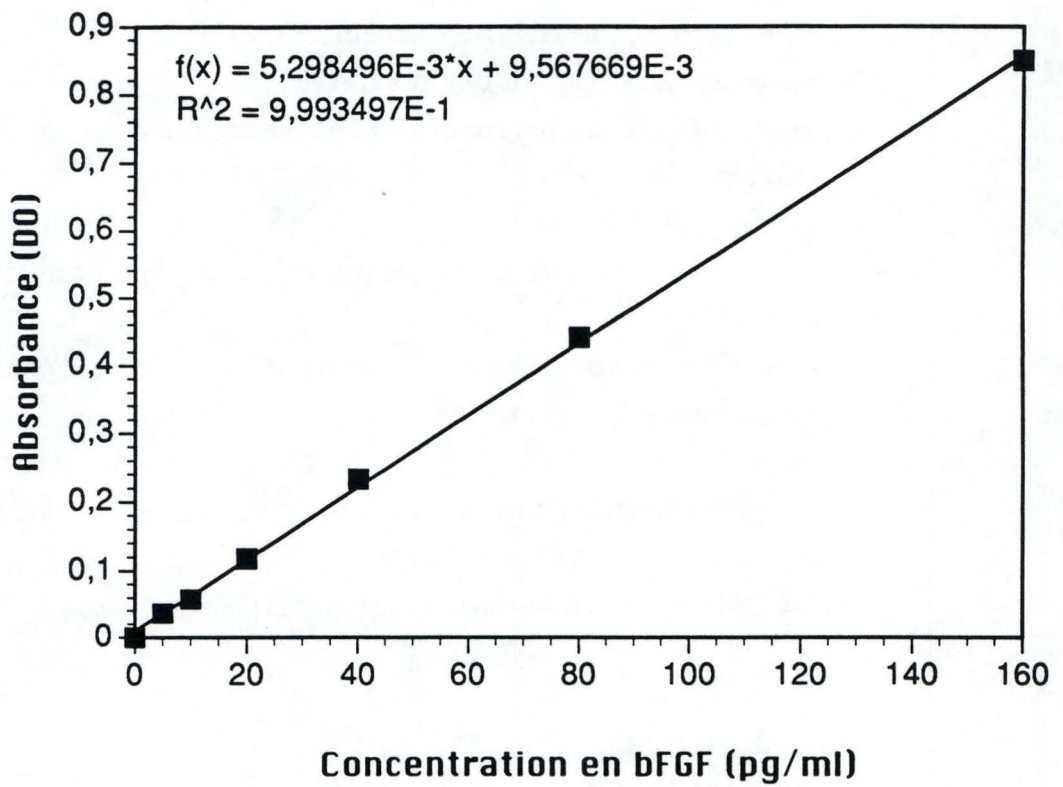


Figure II.6 : Droite d'étalonnage donnant la concentration en bFGF en pg/ml en fonction de la densité optique.

L'étape suivante consiste en l'addition de 250 μ l du conjugué bFGF (c'est-à-dire l'anticorps polyclonal spécifique du bFGF conjugué à la peroxydase de raifort). La plaque est à nouveau recouverte avec un film plastique et laissée à température ambiante pendant deux heures.

Ensuite, les puits sont à nouveau rincés trois fois avec 400 μ l de solution de rinçage comme précédemment. A ce moment, 200 μ l de la solution de révélation (préparée en mélangeant en quantité égale la solution A et la solution B) sont ajoutés et incubent pendant 20 minutes. La réaction est arrêtée en ajoutant 50 μ l de solution stop dans chaque puits. Pour assurer un meilleur résultat, la solution stop est ajoutée dans les différents puits dans le même ordre que celui appliqué pour l'ajout de la solution de révélation.

Enfin, la densité optique à 450 nm est mesurée dans les trente minutes grâce à un lecteur de plaque multipuits (Biorad, USA).

X. C. 4. Mesure de la quantité de bFGF

A l'aide de la courbe d'étalonnage, on peut calculer la quantité de bFGF présent dans chaque échantillon (Figure. II.6). Afin de tenir compte de la quantité de cellules présentes dans chaque boîte, un dosage de protéines est réalisé et la quantité de bFGF est exprimée en pg/mg de protéines.

XI. IMMUNOFLUORESCENCE

XI. A. PRINCIPE

L'immunofluorescence est une technique qui permet de mettre en évidence la localisation d'un composé particulier dans la cellule grâce à l'utilisation d'anticorps spécifique de celui-ci et donc de préciser sa localisation subcellulaire. La révélation se fait par l'ajout d'un anticorps spécifique du premier et couplé à une molécule qui devient fluorescente quand elle est excitée à la longueur d'onde adéquate.

Dans le cas qui nous intéresse, la localisation du bFGF sera étudiée.

XI. B. REPIQUAGE

Les cellules endothéliales sont resuspendues dans 5 ml de milieu MCDB + 20 % S après centrifugation etensemencée à raison de 4 gouttes de cette suspension cellulaire dans une boîte de Pétri contenant un couvre-objet en verre et 2 ml de MCDB + 20 % S.

XI. C. MATÉRIEL ET SOLUTIONS

1. Tampon HBSS pH 7,36 porté à 37°C.

2. Paraformaldéhyde (1 % dans du PBS, Merck) dissous en faisant bouillir la solution sous une hotte aspirante.

3. Triton X-100 à 0,5 % dans du PBS.

4. PBS.

5. PBS/BSA : PBS contenant 1 % de BSA (albumine sérique bovine, BOSERAL, Boxtel, Pays-Bas).

6. Anticorps primaire spécifique du bFGF (Anti-bFGF polyclonaux, British Biotechnology, Oxon, Grande-Bretagne) dilué dans du PBS/BSA à une concentration finale de 100 µg/ml.

7. Anticorps secondaire de souris anti-lapin marqué à la TRITC-rhodamine (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA) et dilué dans du PBS/BSA à une concentration finale de 20 µg/ml.

8. Glycérol (MERCK) /PBS contenant 1 mg/ml de paraphénylènediamide (MERCK) pH 8-9 (dix parts de glycérol pour une part de PBS).

XI D. MÉTHODE

Les cellules endothéliales sont rincées trois fois avec 1,5 ml de HBSS à 37°C puis incubées sous hypoxie en présence de 0,7 ml de HBSS.

Après l'hypoxie, les cellules sont rincées 3 fois avec 1,5 ml de HBSS. Ensuite, 2 ml de paraformaldéhyde à température ambiante sont ajoutés pendant dix minutes pour fixer les cellules pendant 15 minutes. Les cellules sont rincées trois fois pendant avec 2 ml de PBS. Ensuite, 1 ml de Triton X-100 à 0,5 % est ajouté pour perméabiliser les membranes et permettre l'entrée des anticorps. Ensuite, un premier rinçage avec 2 ml de PBS a lieu suivi d'un second rinçage avec 2 ml de PBS/BSA. Les couvre-objets sont transférés dans des boîtes à puits carrées dont les dimensions sont celles des couvre-objets. Un dernier rinçage avec 2 ml de PBS/BSA est réalisé.

Après cette étape de fixation et de perméabilisation, 150 µl d'anticorps primaire anti-bFGF sont ajoutés. Les contrôles négatifs sont incubés avec 150 µl de PBS/BSA. Le marquage se réalise pendant 1h30 à 20°C dans une atmosphère humide.

Les cellules sont ensuite rincées trois fois avec 2 ml de PBS/BSA et décantées. 150 µl d'anticorps secondaire couplé à la rhodamine sont déposés et incubés 1 heure à 20°C dans l'obscurité et dans une atmosphère humide. Les cellules sont enfin rincées trois fois avec 1 ml de PBS/BSA.

Les couvre-objets sont montés dans une goutte de glycérol/PBS contenant 1 mg/ml de paraphénylènediamide sur une lame porte-objet lavée à l'alcool. Les lamelles sont scellées au vernis à ongle et le tout est placé à l'obscurité. Les préparations sont observées au microscope à fluorescence.

Des photographies des différents couvre-objets sont réalisées à l'aide d'un film 400 ASA couleur ou 1600 ASA noir et blanc.

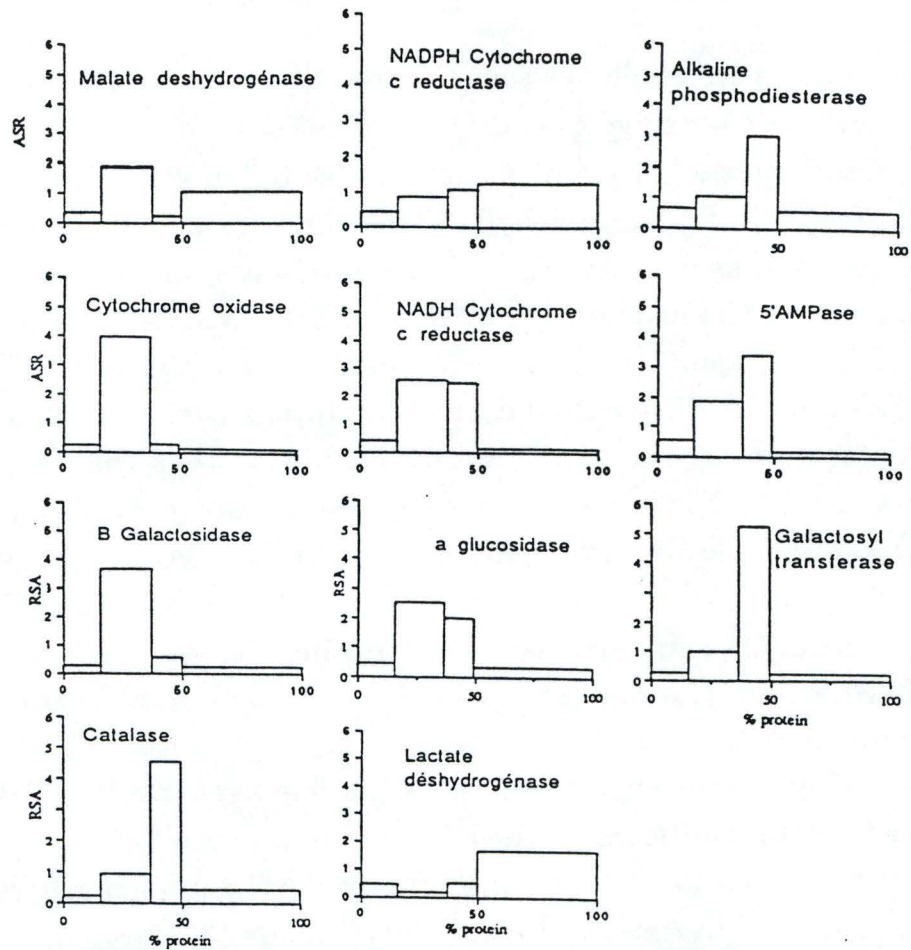


Fig.1. Distribution patterns of constituents after fractionation of E.C. by differential centrifugation. Graphs were constructed from data given in Table 1. Fractions are plotted in the order of the average coefficient of sedimentation of their subcellular components i.de. from left to right N, ML, P and S. Each fraction is represented separately in the ordinate scale by the relative specific activity of the constituent (percentage of total amount/percentage of total protein). In the abscissa scale each fraction is represented cumulatively by its percentage of protein.

Figure II.7 : Profil caractéristique des différentes enzymes marqueurs dans les fractions N (noyau), ML (mitochondries-lysosomes), P (membrane plasmique-réticulum endoplasmique-appareil de Golgi-Peroxysoxe) et S (cytoplasme) de cellules endothéliales humaines.

XII. FRACTIONNEMENT DIFFÉRENTIEL

XII. A. PRINCIPE

Afin de déterminer la localisation du bFGF dans la cellule endothéliale, nous avons choisi la technique de fractionnement par centrifugations différentielles. Par cette technique, les différents organites cellulaires sont séparés les uns des autres des centrifugations successivement à vitesse de plus en plus grande. Chaque fraction est définie grâce à l'utilisation d'enzymes marqueurs caractéristiques d'un organite cellulaire particulier (Figure II.7). C'est en comparant le profil de localisation du bFGF avec les profils de localisation des différentes enzymes marqueurs que nous pourrions déterminer la localisation subcellulaire du bFGF. Nous avons suivi pour ce travail le protocole mis au point pour les cellules endothéliales au laboratoire de Cytologie.

XII. B. MATÉRIEL ET SOLUTIONS

1. PBS.
2. Tampon imidazol (Merck) 3 mM-saccharose 0,25 M-EGTA 1 mM à 4 °C.
3. Tampon imidazol 3 mM-saccharose 0,25 M à 4 °C.

XII. C. MÉTHODE

XII. C. 1. Repiquage

Les cellules endothéliales de 10 boîtes T75 à confluence dans du milieu MCDB + 20 % S sont utilisées.

XII. C. 2. Fractionnement

Le milieu MCDB + 20 % S des boîtes de culture est décanté et les cellules sont rincées 1 fois avec 5 ml de PBS à 37 °C. Ensuite, elles sont rincées 1 fois avec 5 ml de tampon imidazol 3 mM-saccharose 0,25 M-EGTA 1 mM à 4 °C et enfin, elles sont rincées avec 5 ml de tampon imidazol 3 mM-saccharose 0,25 M à 4 °C.

Les cellules sont ensuite raclées par 2 boîtes à la fois avec 0,5 ml de tampon imidazol 3 mM-saccharose 0,25 M à 4 °C et rincées avec à nouveau 0,5 ml de tampon imidazol 3 mM-saccharose 0,25 M à 4 °C. L'ensemble des cellules est récolté dans un tube en plastique à fond conique. Le volume est ajusté à 8 ml avec du tampon imidazol 3 mM-saccharose 0,25 M à 4 °C.

Une première centrifugation à 1700 rpm pendant 10 minutes est réalisée. Le surnageant est récolté dans un tube gradué et constitue la fraction E. Le culot est homogénéisé à l'aide d'un petit dounce (5 aller-retour) puis le volume est ajusté à 5 ml avec du tampon imidazol 3 mM-saccharose 0,25 M à 4 °C. L'ensemble est centrifugé à 1500 rpm pendant 5'01" dans une centrifugeuse International PR-J (International Equipment Co, Needham Heights, MA). Le surnageant est récolté dans le tube gradué contenant la fraction E et le culot est à nouveau resuspendu dans 5 ml de tampon imidazol 3 mM-saccharose 0,25 M à 4 °C et centrifugé comme précédemment.

Après cette seconde centrifugation, le culot obtenu constitue la fraction N (noyau). La fraction E (16,5 ml) est partagée dans deux tubes à centrifuger à raison de 7 ml par tube. Le surplus de la fraction E servira pour les dosages. Les deux tubes sont centrifugés à 25 000 rpm pendant 5'22" (dans une ultracentrifugeuse Beckman L-5 GSB (Beckman Instruments Inc., Spinco Div., Palo Alto, CH) avec un rotor de type 40. Le surnageant est récolté dans un tube gradué, c'est la fraction PS. Le culot est homogénéisé à l'aide d'un petit dounce, le volume est ensuite ajusté à 5 ml avec du tampon imidazol 3 mM-saccharose 0,25 M à 4 °C puis centrifugé à 25 000 rpm pendant 4'16". Le surnageant est récolté dans le tube gradué contenant déjà la fraction PS. Le culot constitue la fraction ML (mitochondries-lysosomes).

La fraction PS (18,2 ml) est partagée dans deux tubes à centrifuger à raison de 9 ml par tube, et centrifugée à 39 000 rpm pendant 34 minutes avec un rotor de type 40. Le surnageant constitue la fraction S (cytoplasme) et le culot la fraction P (membrane plasmique - réticulum endoplasmique - appareil de Golgi - peroxyosomes).

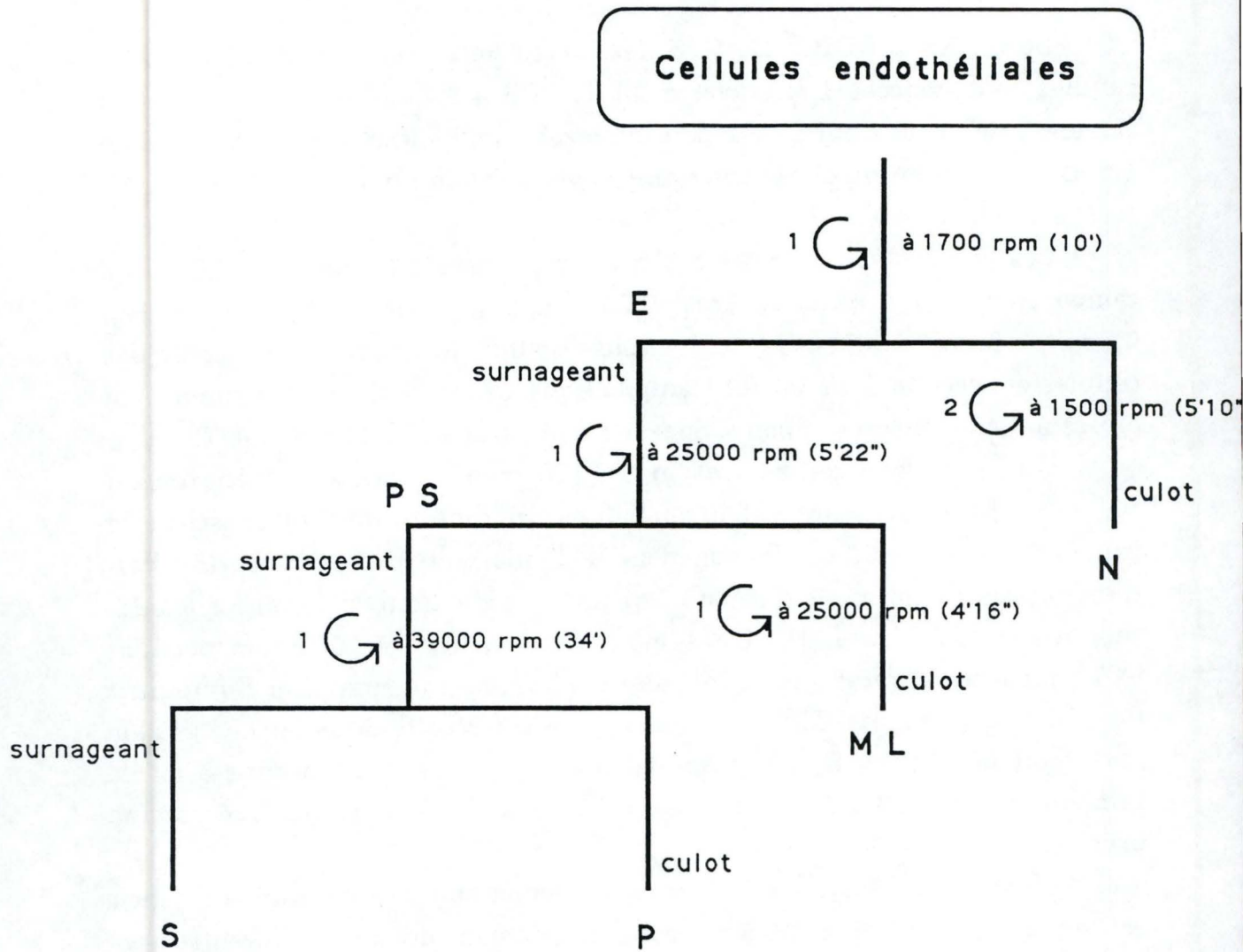


Figure II.8 : Schéma représentant les conditions de centrifugation successives permettant de séparer les organites cellulaires en différentes fractions.

Les culot N, ML et P sont resuspendus dans 1 ml de tampon imidazol 3 mM-saccharose 0,25 M à 4 °C et homogénéisés au petit dounce avant d'être pesés afin de déterminer le volume exact récolté (Figure II.8).

XII. C. 3. Dosage enzymatique

Différents enzymes marqueurs (Tableau II.1) des principaux organites cellulaires ont été dosés : la NADH cytochrome c réductase comme marqueur du réticulum endoplasmique; la cytochrome oxydase comme marqueur des mitochondries; la lactate déshydrogénase pour le cytoplasme; la phosphodiesterase alcaline comme enzyme de référence de la membrane plasmique; la β -galactosidase comme marqueur des lysosomes et la catalase pour les peroxysomes.

Nom	Substrat	Concentration	pH	Tampon	Autres composants	T° (°C)	Volume (ml) de l'échantillon	Mesure
NADH cytochrome c réductase	cytochrome C	0,5 mg/ml	7,4	Phosphate 400 mM	NADH 0,08mg/ml - Nicotinamide 30 mM - NaCN 0,4 mM	20 °C	0,1	Réduction du cytochrome c
Cytochrome oxydase	Cytochrome réduit	1,7 10 ⁻⁵ M	7,4	Phosphate 0,5 M	Triton X-100 0,05 % - EDTA 1 mM	25 °C	2	Oxydation du cytochrome c résiduel
Lactate déshydrogénase	Pyruvate	0,8 g/ml	7,5	Phosphate 0,1 M	NADH 0,1 mg/ml	25 °C	0,03	Oxydation du NADH
Phosphodiesterase alcaline	p-nitrophényl-thymidine 5'phosphate	1,88 mM	10	Glycine 0,125 M	Acétate de Zn 0,25 10 ⁻² M	37 °C	0,4	p-nitrophénol
β-galactosidase	p-nitrophényl-β-galactopyranoside	7,5 mM	3,6	Citrate 0,2 M	Triton X-100 0,2 %	37 °C	0,15	p-nitrophénol
catalase	H ₂ O ₂	0,005 %	7	Imidazol 0,02 M	Triton X-100 0,04 %	0 °C	0,1	H ₂ O ₂

Tableau II.1 : Conditions expérimentales des dosages enzymatiques des enzymes marqueurs utilisés pour caractériser les différentes fractions obtenues après centrifugation différentielle.

CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats présentés dans ce mémoire se diviseront en deux parties. Dans un premier temps, nous nous sommes penchés sur l'étude du mécanisme responsable de l'augmentation de la concentration en calcium observée dans les cellules endothéliales incubées sous hypoxie. Ensuite, nous avons voulu étudier le mécanisme de libération du bFGF par les cellules endothéliales sous hypoxie.

I. ÉTUDE DE L'AUGMENTATION DE LA CONCENTRATION EN CALCIUM

L'ischémie est à l'origine de nombreux changements métaboliques au sein de la cellule endothéliale. Suite à l'absence d'oxygène, la concentration en ATP dans la cellule chute dramatiquement comme nous l'avons détaillé dans l'introduction. A cette diminution de la concentration en ATP est liée une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire ($[Ca^{++}]_i$). Cependant, le mécanisme précis conduisant à cette augmentation de la $[Ca^{++}]_i$ est actuellement inconnu et nous avons tenté de le préciser : c'est donc l'étape qui a lieu entre la diminution de la concentration en ATP et l'augmentation de la $[Ca^{++}]_i$ que nous avons étudiée.

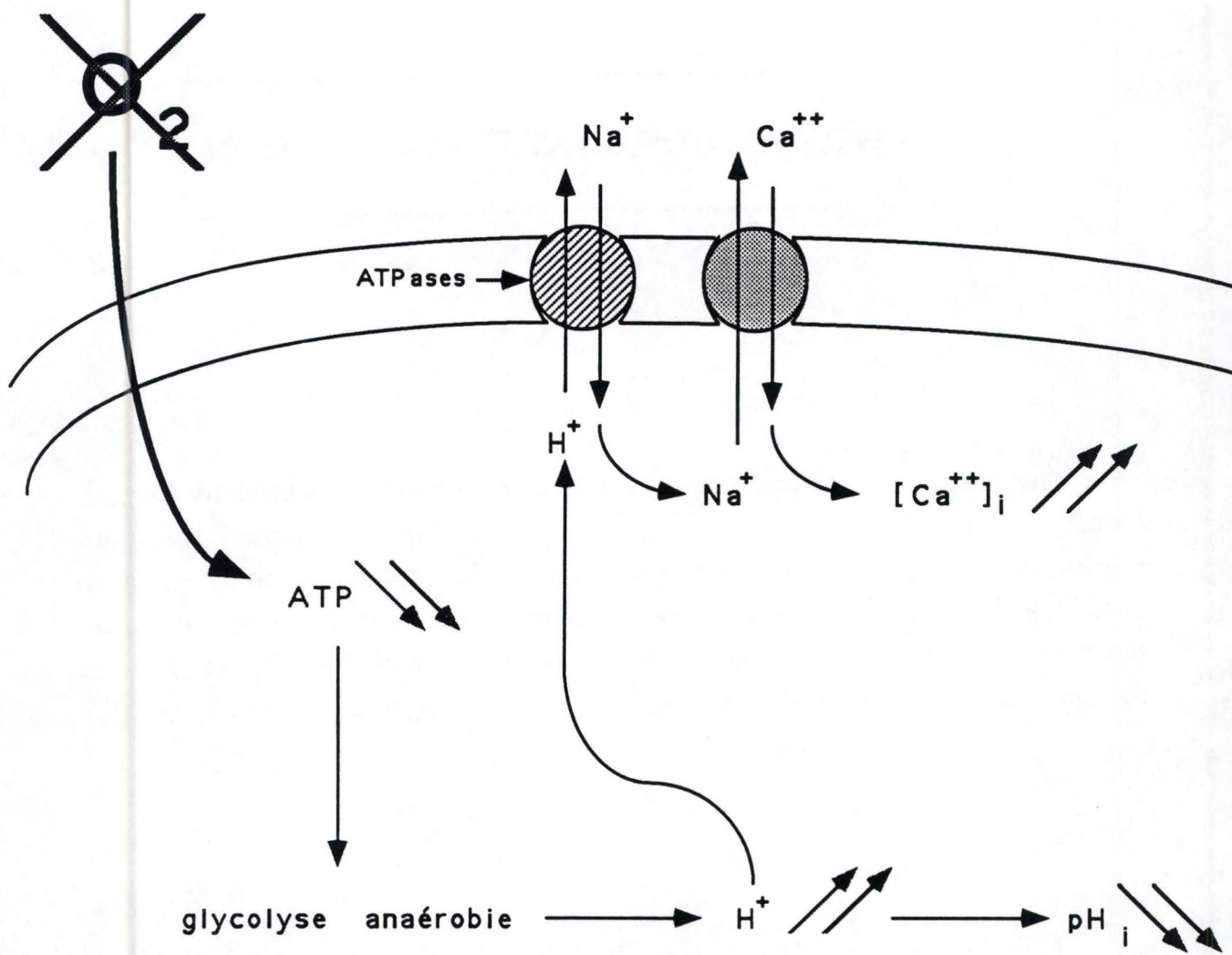


Figure III.1 : Modèle hypothétique schématisant un mécanisme possible expliquant l'augmentation de la concentration cytosolique en calcium observée dans la cellule endothéliale incubée sous hypoxie.

Pour ce faire, nous avons utilisé le modèle mis au point au laboratoire qui consiste à incuber dans une atmosphère dépourvue d'oxygène des cellules endothéliales en culture. Il avait précédemment été montré que dans ces conditions, la concentration en $[Ca^{++}]_i$ passe d'une valeur de 33 nM à 229 nM après 2 heures d'incubation sous hypoxie (Arnould *et al.*, 1992). Nous savions aussi que cette augmentation de la $[Ca^{++}]_i$ est due à la diminution du contenu en ATP des cellules induite par l'hypoxie puisque si on prévient cette diminution de l'ATP par du β -hydroxybutyrate à 10^{-4} M, on inhibe aussi l'augmentation de la $[Ca^{++}]_i$.

Suite à l'hypoxie, les phosphorylations oxydatives au niveau des mitochondries sont ralenties puisque l'oxygène, qui est l'accepteur final des électrons dans ces phosphorylations, est déficient lors de l'hypoxie. La conséquence directe du manque d'oxygène est donc une chute d'ATP au sein de la cellule. Pour pallier ce manque d'énergie, la cellule va induire la glycolyse anaérobie, ce qu'on observe effectivement dans les cellules endothéliales incubées sous hypoxie (Janssens *et al.*, soumis). L'hypothèse que nous avons émise pour relier la diminution de l'ATP et l'augmentation de la $[Ca^{++}]_i$ est la suivante : la glycolyse produit du lactate et des ions hydrogène en grande quantité qui vont provoquer une chute du pH intracellulaire. L'augmentation de la concentration en ions H^+ pourrait être compensée par la cellule grâce à l'activation d'une pompe Na^+/H^+ , située dans la membrane plasmique, qui échange un ion H^+ sortant pour un ion Na^+ entrant. Le pH intracellulaire optimal de la cellule serait ainsi rétabli. Cependant, cet échange a bouleversé l'équilibre des ions Na^+ dans la cellule. Ces ions pourraient être ensuite expulsés en échange d'ions Ca^{++} par l'intermédiaire d'une pompe Na^+/Ca^{++} , qui échange trois ions Na^+ pour un ion Ca^{++} , située également dans la membrane plasmique (Figure III.1). Cette hypothèse doit évidemment tenir compte du fait que la baisse d'ATP pourrait aussi diminuer l'efficacité des pompes $Ca^{++}/ATPase$.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons décidé d'utiliser des molécules inhibitrices qui agissent spécifiquement au niveau de ces différentes pompes pour bloquer leur fonctionnement. Nous avons à notre disposition l'hexaméthylène amiloride, qui est un inhibiteur spécifique de la pompe Na^+/H^+ et le dichlorobenzamil (DCB) qui est un inhibiteur spécifique de la pompe Na^+/Ca^{++} .

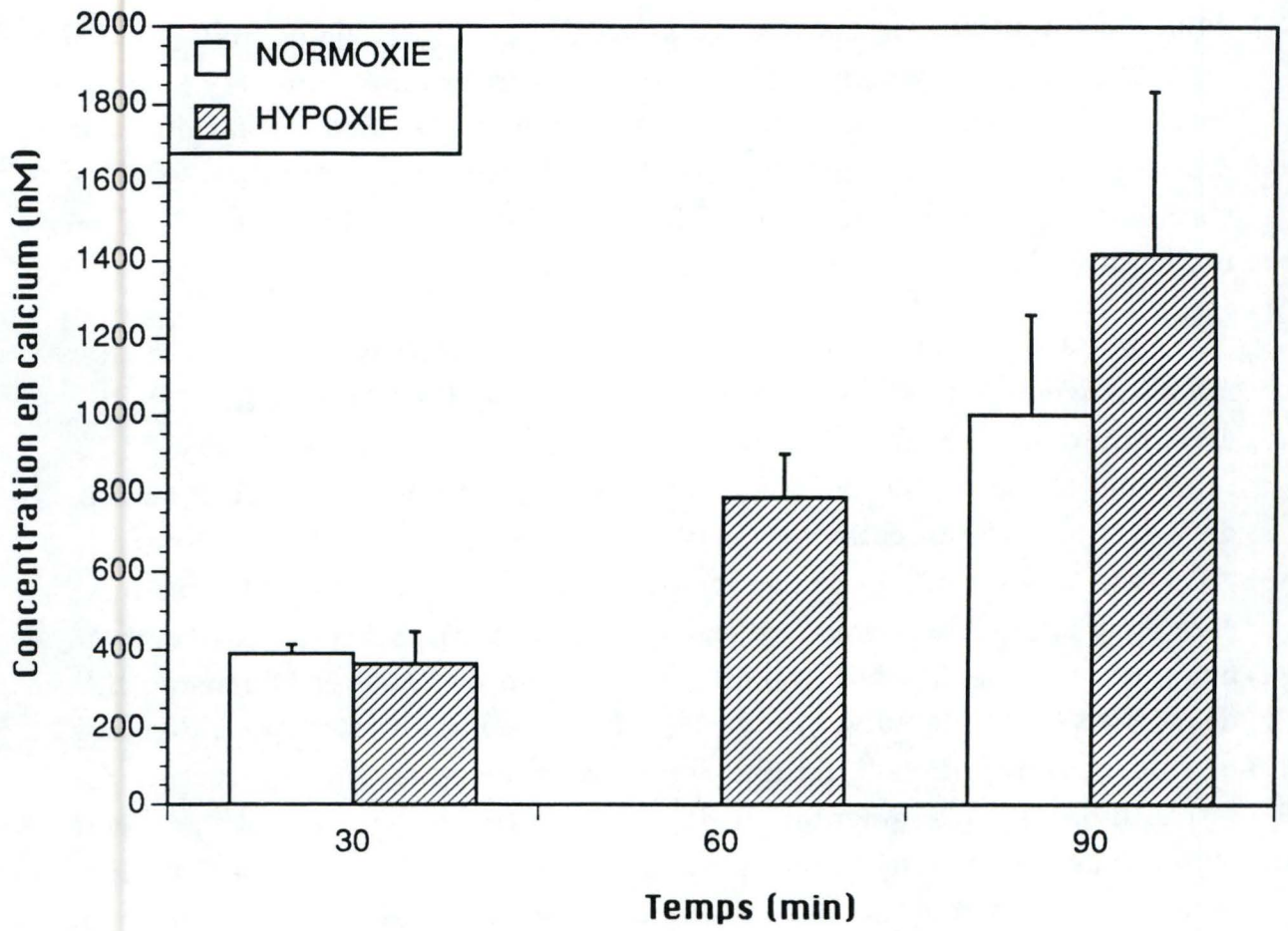


Figure III.2 : Évolution de la concentration en calcium cytosolique dans des cellules endothéliales incubées pendant des temps croissants en normoxie ou sous hypoxie. La mesure est réalisée au cytofluorimètre à l'aide de la sonde Fluo-3. Les résultats sont exprimés en tant que moyennes \pm un écart-type pour $n = 3$ ou 4 .

Avant de pouvoir utiliser ces différentes molécules, il nous fallait mettre au point un dosage de la $[Ca^{++}]_i$ qui serait facile et qui nous permettrait de réaliser de nombreux tests simultanément.

I.1. DOSAGE DU CALCIUM CYTOSOLIQUE AU CYTOFLUORIMÈTRE

Au laboratoire, le dosage de la $[Ca^{++}]_i$ dans les cellules endothéliales est couramment réalisé en utilisant un spectrofluorimètre. Cette technique est très astreignante et difficile d'utilisation et de plus permet de ne réaliser qu'une seule mesure à la fois. Ayant à notre disposition un appareil plus perfectionné, le cytofluorimètre, nous avons décidé d'adapter la technique du dosage du calcium au fluorimètre au cytofluorimètre. Cet appareil a un avantage important : il permet la mesure du $[Ca^{++}]_i$ dans des plaques multipuits et donc de réaliser facilement des multiples de la mesure assurant une meilleure reproductivité des résultats.

I.1.1. Dosage du calcium à l'aide de la sonde Fluo-3

Dans un premier temps, nous avons utilisé la sonde fluorescente préconisée par la firme fabriquant le cytofluorimètre : le Fluo-3. Nous avons mesuré le $[Ca^{++}]_i$ pour différentes durées d'incubation sous hypoxie, à savoir 30, 60 et 90 minutes. Des mesures équivalentes en normoxie pour des durées de 30 et 90 minutes ont été réalisées simultanément afin de s'assurer de l'effet spécifique dû à l'hypoxie. La figure III.2 présente les résultats obtenus. Nous observons d'abord, des valeurs très élevées de la concentration en calcium allant jusqu'à 1421 ± 415 nM après une hypoxie de 90 minutes, valeurs bien supérieures à celles mesurées au spectrofluorimètre après 2 heures d'hypoxie. De plus, ces valeurs sont déjà

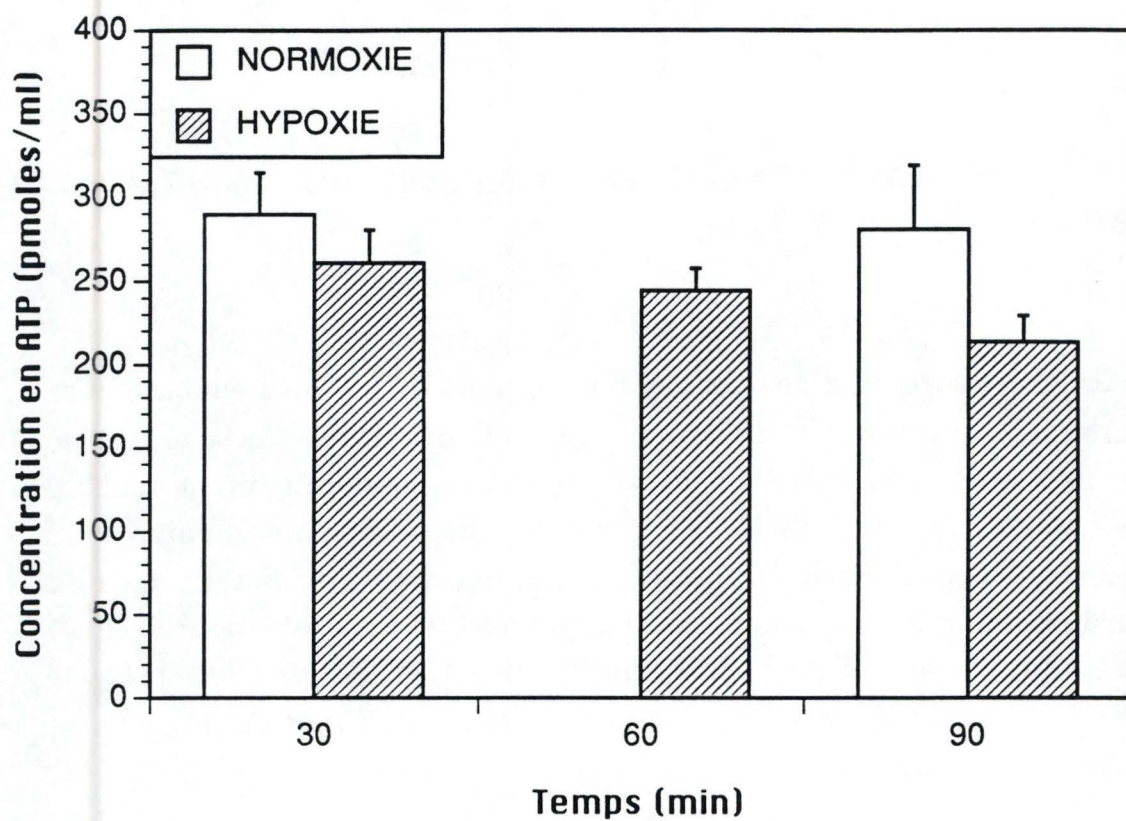


Figure III.3 : Évolution de la concentration en ATP dans des cellules endothéliales incubées pendant 30, 60 ou 90 minutes sous hypoxie ou en normoxie. Les résultats sont exprimés en pmoles/ml en tant que moyennes \pm un écart-type pour $n = 3$.

très élevées après 30 minutes de normoxie puisque nous observons une $[Ca^{++}]_i$ de $391 \pm 24,5$ nM alors que la concentration en calcium cytosolique dans la cellule est normalement de 20 à 50 nM. Enfin, nous observons bien une augmentation de la concentration en calcium au cours de l'hypoxie, mais nous observons également une augmentation de la concentration en calcium au cours de la normoxie alors que dans ce cas, elle devrait rester stable. Cette expérience a été reproduite plusieurs fois avec les mêmes résultats.

Par ailleurs, quand nous avons dosé l'ATP dans ces mêmes conditions d'hypoxie et de normoxie, nous avons observé une diminution croissante de la concentration en ATP pour des durées croissantes d'incubation sous hypoxie alors que nous n'observons aucun effet de la normoxie (Figure III.3). Ces résultats sur l'ATP sont en concordance avec les résultats obtenus précédemment. Ils nous permettent de penser que les résultats obtenus pour le dosage du calcium ne sont pas dus à un problème d'activation des cellules endothéliales sous hypoxie mais, peut-être, à un problème au niveau du dosage de la $[Ca^{++}]_i$.

Les résultats obtenus aux figures III.2 et III.3 pourraient suggérer que les problèmes observés au niveau du dosage du calcium seraient dus à un relargage de la sonde au cours du temps à partir des cellules, dans le milieu d'incubation. De plus, ce relargage pourrait être accentué par la faible agitation que subissent les cellules au cours de l'hypoxie et de la normoxie, agitation destinée à éviter un dessèchement des cellules au cours de l'incubation.

Nous avons donc réalisé une expérience en incubant les cellules en normoxie pendant 120 minutes avec ou sans agitation, ainsi qu'en changeant ou non le milieu d'incubation avant le dosage afin de ne mesurer que la fluorescence de la sonde restée associée aux cellules. Un contrôle en normoxie à 0 minute a également été réalisé afin d'obtenir la valeur basale de la $[Ca^{++}]_i$. Les résultats obtenus sont présentés à la figure III.4. Nous observons que la $[Ca^{++}]_i$ mesurée est beaucoup plus faible après avoir changé le milieu d'incubation que lorsque celui-ci est conservé, ce qui indique bien un relargage de la sonde dans ce milieu pendant les 120

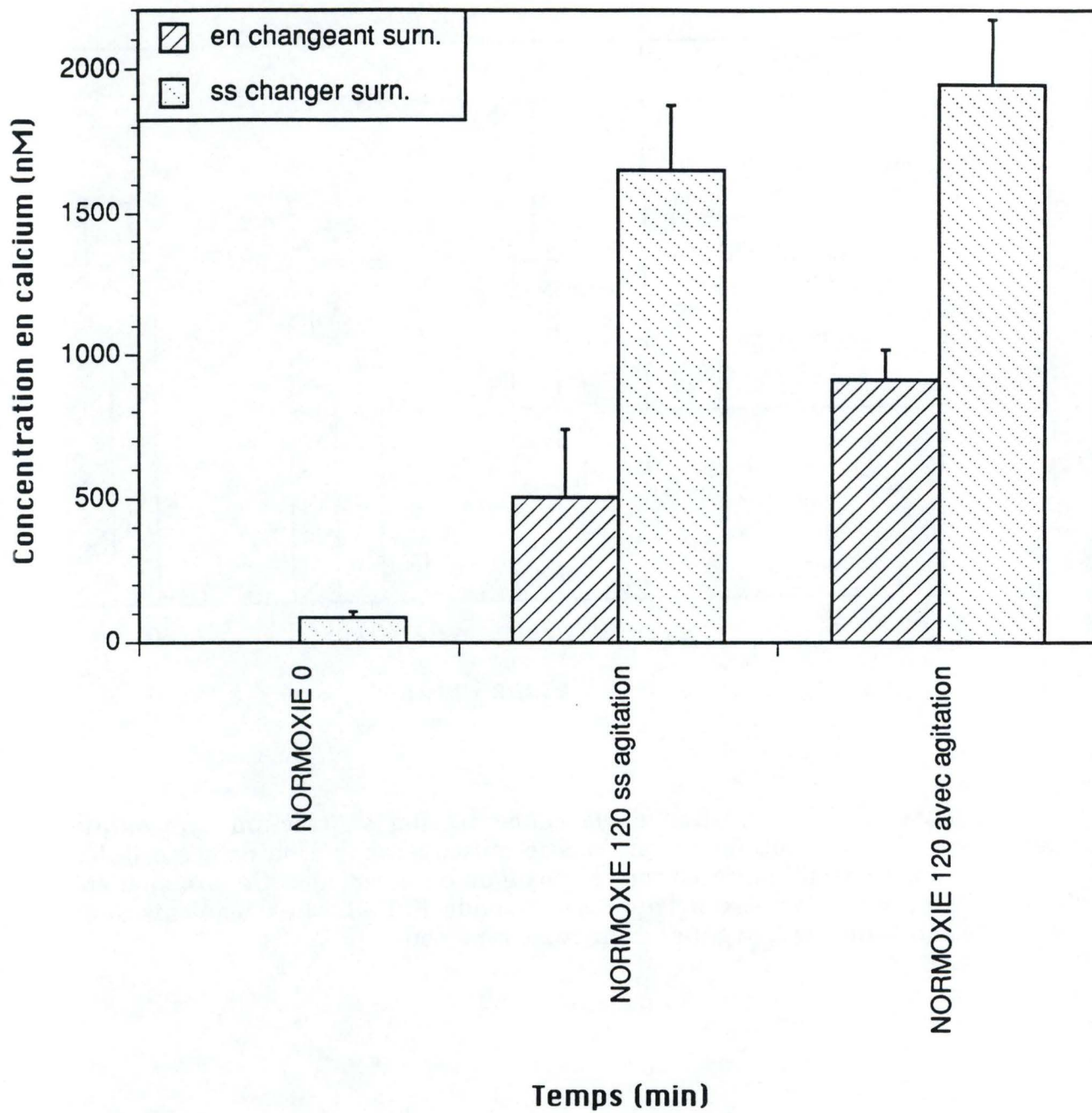


Figure III.4 : Évolution de la concentration en calcium cytosolique dans des cellules endothéliales incubées en normoxie avec ou sans agitation. Le dosage est effectué en changeant ou non le milieu d'incubation avant le dosage. Ce dosage a été réalisé au cytofluorimètre à l'aide de la sonde Fluo-3. Les résultats sont exprimés en tant que moyennes \pm un écart-type pour $n = 5$.

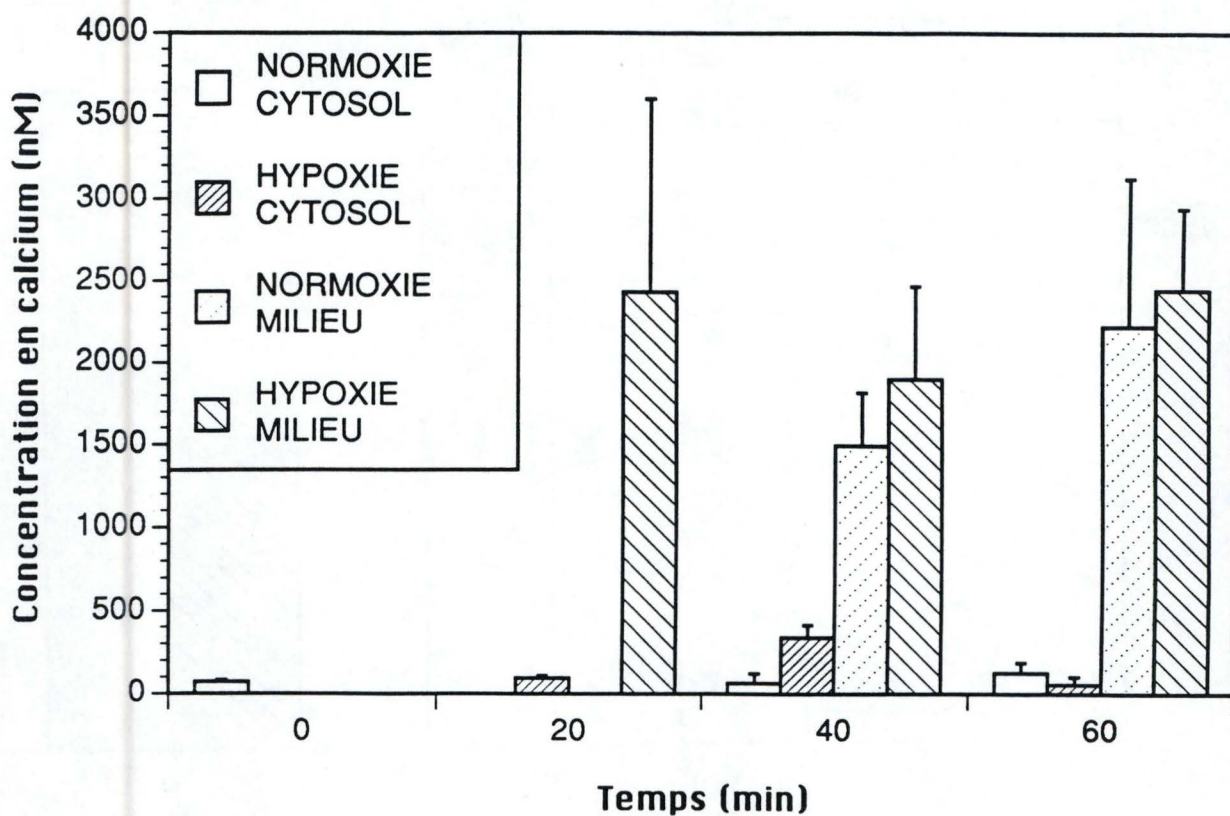


Figure III.5 : Évolution de la concentration en calcium cytosolique dans des cellules endothéliales et dans le milieu d'incubation de ces cellules incubées 20, 40 ou 60 minutes sous hypoxie ou en normoxie. Ce dosage a été réalisé au cytofluorimètre à l'aide de la sonde Fluo-3. Les résultats sont exprimés en tant que moyennes \pm un écart-type pour $n = 5$.

minutes d'incubation. Après avoir changé le milieu, nous éliminons la sonde relarguée par les cellules, qui en présence d'un excès de calcium dans le milieu, émet une fluorescence importante. Au vu de ces résultats, nous pouvons donc conclure qu'il existe un relarguage de la sonde dans le milieu au cours du temps dans les conditions de travail utilisées. Nous observons de plus que ce relarguage est amplifié par l'agitation. Toutes les incubations ultérieures se feront donc sans agitation.

Nous avons ensuite voulu savoir quelle proportion de la sonde était relarguée dans le milieu d'incubation en mesurant la concentration en calcium dans les cellules et la concentration en calcium dans ce milieu de manière indépendante.

Nous avons fait ces mesures pour différentes durées d'incubation sous hypoxie (20, 40 et 60 minutes). Des contrôles en normoxie ont également été réalisés à 0, 40 et 60 minutes. Nous pouvons observer à la figure III.5 que le relarguage de la sonde augmente avec le temps d'incubation et ceci, que ce soit sous hypoxie ou en normoxie. Nous remarquons également que la quantité de sonde restée dans la cellule est minime à côté de celle qui a été relarguée, et celle-ci n'est plus suffisante pour permettre un dosage correct de la $[Ca^{++}]_i$.

Il est donc impossible de mesurer la concentration en calcium cytosolique à l'aide de la sonde Fluo-3 dans ces conditions. Nous nous sommes alors tournés vers une autre sonde fluorescente, le Fura-2. Le Fura-2 est la sonde qui était utilisée avec succès dans la mesure de la $[Ca^{++}]_i$ au fluorimètre.

I.1.2. Dosage du calcium à l'aide de la sonde Fura-2

Pour mesurer le calcium avec une sonde fluorescente, une première mesure de la concentration en calcium est réalisée directement, elle est

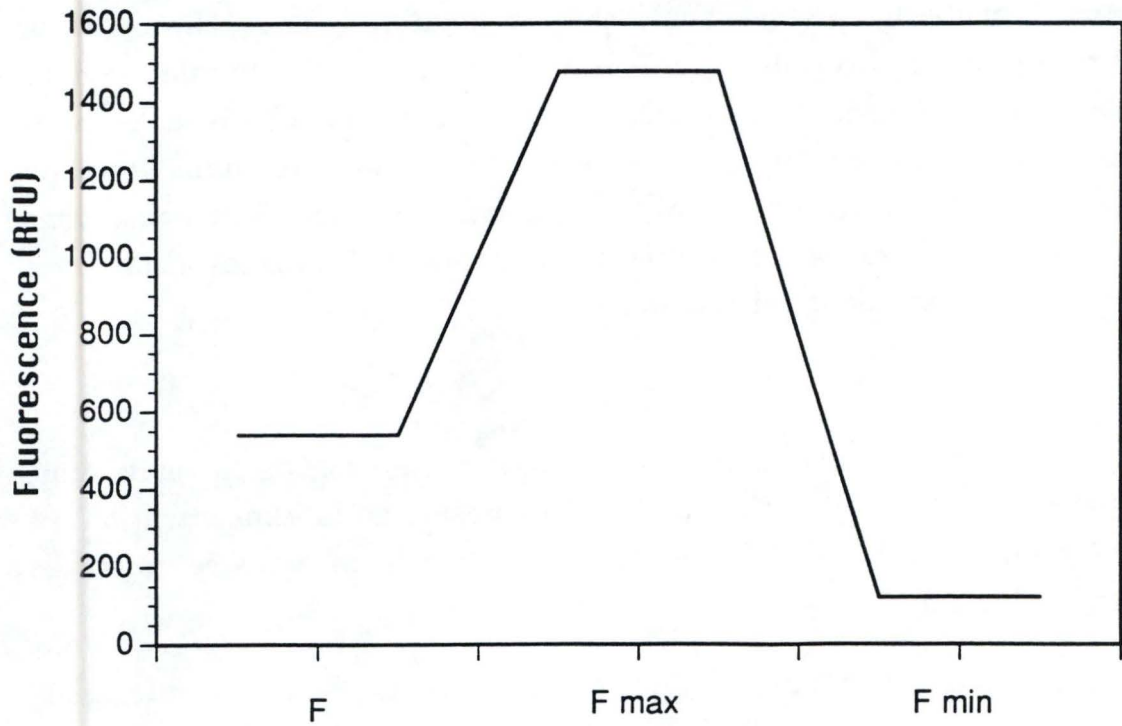


Figure III.6 : Représentation schématique des trois mesures réalisées pour doser la $[Ca^{++}]_i$ au fluorimètre à l'aide de la sonde Fura-2.

RFU = unités de fluorescence relative

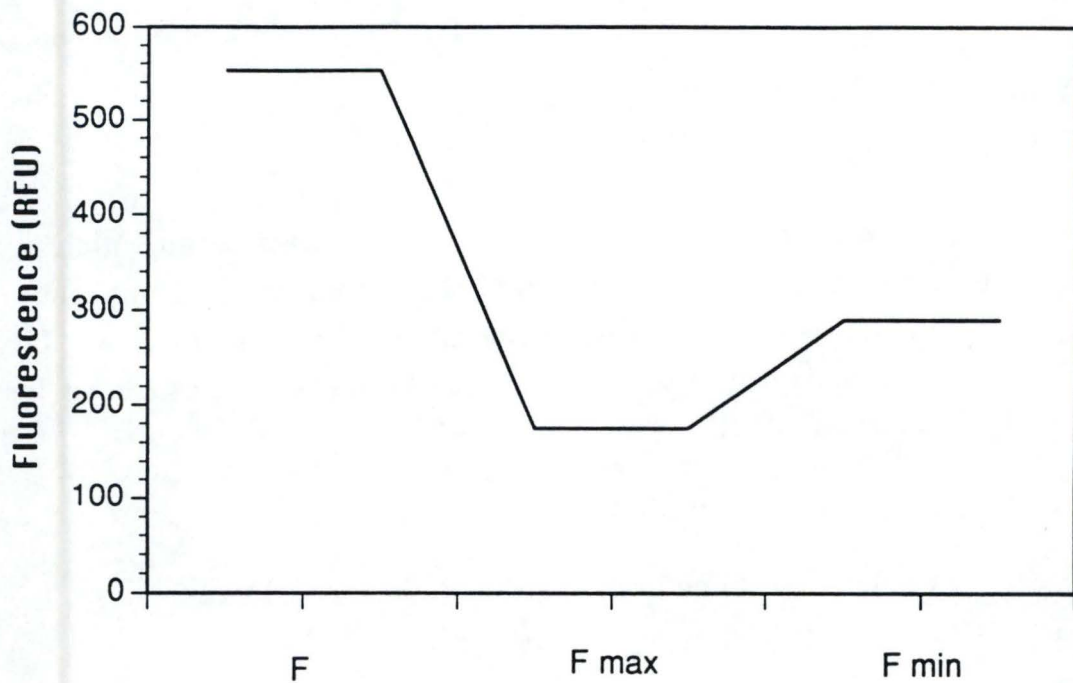


Figure III.7 : Représentation schématique des trois mesures réalisées pour doser la $[Ca^{++}]_i$ au cytofluorimètre à l'aide de la sonde Fura-2.

RFU = unités de fluorescence relative

appelée F. Ensuite, un perméabilisant de la membrane plasmique est ajouté, afin de saturer la sonde présente dans le cytosol avec des ions calcium venant du milieu extérieur. Cela donne une mesure de la quantité totale de sonde présente dans la cellule. La fluorescence mesurée est maximale, elle est appelée F_{max}. Le perméabilisant cellulaire utilisé dans ce cas est le Triton X-100 à 1 %. Enfin, un tampon contenant de l'EGTA à une concentration de 50 mM est ajouté. L'EGTA va chélater les ions Ca⁺⁺ associés à la sonde et on obtient la sonde sous sa forme libre suite à un déplacement de l'équilibre. La fluorescence mesurée est minimale, elle est appelée F_{min}. Ces trois mesures permettent à l'aide de la formule présentée ci-après d'obtenir la concentration réelle en calcium dans la cellule.

$$[Ca^{++}]_i = Kd \frac{F - F_{min}}{F_{max} - F} \text{ nM}$$

où Kd est la constante de dissociation entre la sonde et l'ion Ca⁺⁺. Elle vaut 135 nM pour le Fura-2 à 20 °C.

Une représentation schématique de ce qui est généralement obtenu au fluorimètre par cette méthode est présentée à la figure III.6.

Nous avons alors tenté de transposer cette technique au cytofluorimètre en utilisant la sonde Fura-2. Cependant, les résultats obtenus ne correspondent pas à ce profil. Un exemple de ce qui est observé est présenté à la figure III.7. La perméabilisation au Triton X-100 est beaucoup trop rapide par rapport au temps de mesure du cytofluorimètre : la valeur de F_{max} ne peut donc être enregistrée et nous ne pouvons donc pas calculer [Ca⁺⁺]_i à l'aide de la formule décrite ci-dessus.

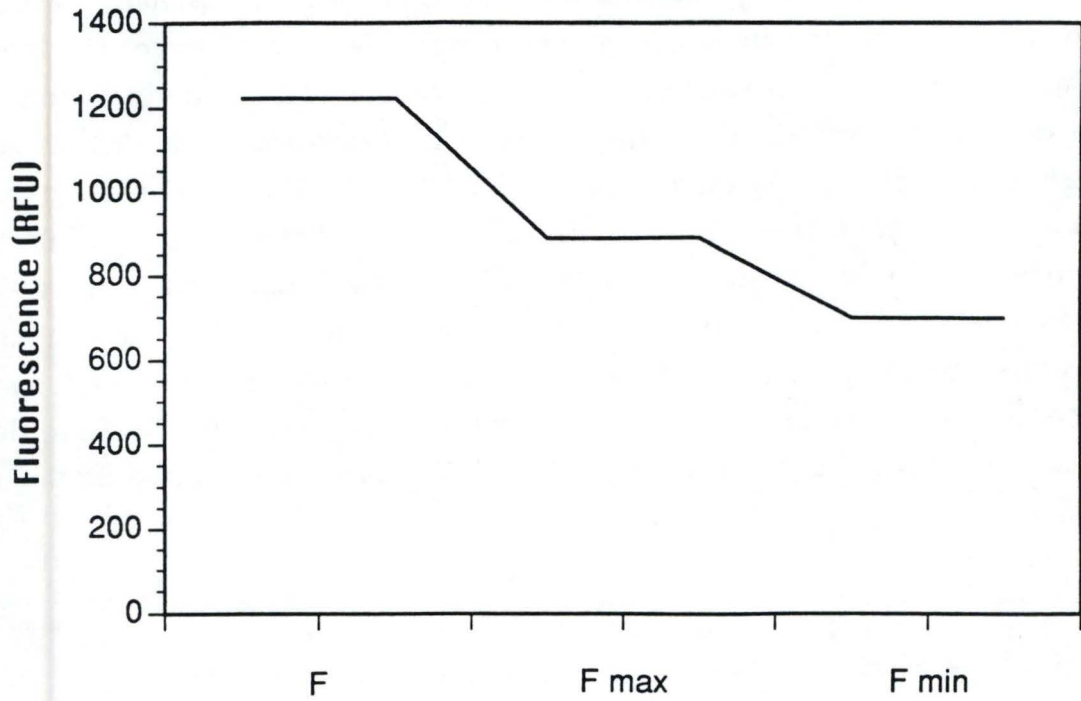


Figure III.8 : Représentation schématique des trois mesures réalisées pour doser la $[Ca^{++}]_i$ au cytofluorimètre à l'aide de la sonde Fura-2. Le triton X-100 a été remplacé par de la digitonine 25 mM.
RFU = unités de fluorescence relative

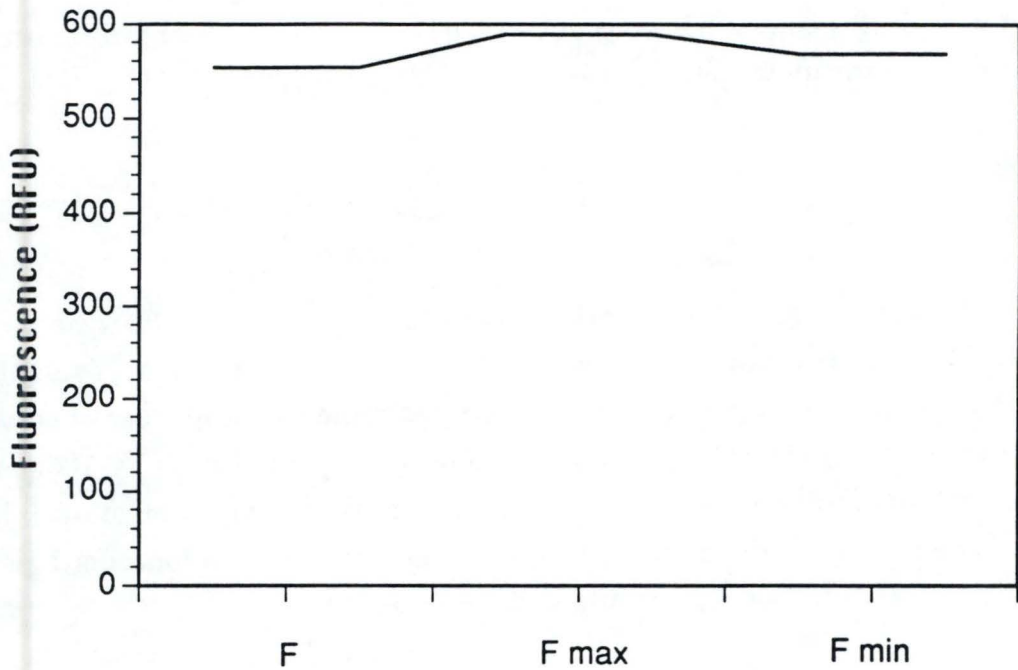


Figure III.9 : Représentation schématique des trois mesures réalisées pour doser la $[Ca^{++}]_i$ au cytofluorimètre à l'aide de la sonde Fura-2. Le triton X-100 a été remplacé par de la digitonine 1,25 mM. De la digitonine à une concentration de 25 mM est à nouveau ajoutée avec le tampon contenant l'EGTA.
RFU = unités de fluorescence relative

Nous avons ensuite testé une autre molécule perméabilisant la membrane plasmique. Nous avons utilisé la digitonine à une concentration de 25 mM parce que cette molécule a une action plus lente que le Triton X-100. Les figures III.8 et III.9 montrent les profils obtenus dans ces conditions. Il semble que la digitonine soit un perméabilisant membranaire encore trop rapide pour permettre une mesure au cytofluorimètre (Figure III.8). Puisqu'aucune valeur de F_{max} ne peut être mesurée, nous avons ensuite dilué 20 fois la digitonine (1,25 mM) afin de ralentir le processus, tout en rajoutant de la digitonine à une concentration de 25 mM avec l'EGTA afin d'être sûr que la perméabilisation soit bien réalisée pour l'action de l'EGTA. Mais les résultats obtenus ne sont pas plus concluants (Figure III.9). Dans ce cas, l'EGTA n'a plus l'effet attendu et aucune valeur cohérente de F_{min} ne peut être enregistrée. Ces différents résultats montrent que la sonde Fura-2 n'est pas compatible avec les performances techniques du cytofluorimètre pour doser la $[Ca^{++}]_i$.

Nous nous sommes alors tournés vers une troisième sonde, le Calcium green-1 : cette sonde, selon les spécifications techniques, ne serait pas relarguée aussi facilement que le Fluo-3 et aurait un temps de réponse aux ions calcium plus lent, ce qui serait compatible avec l'usage du cytofluorimètre.

I.1.3. Dosage du calcium à l'aide de la sonde Calcium green-1

Nous avons alors répété la première expérience en incubant des cellules endothéliales sous hypoxie pendant des durées de 30, 60 et 90 minutes. Des contrôles en normoxie à 0, 60 et 90 minutes ont également été réalisés. Après avoir fait trois expériences similaires, nous pouvons conclure que les résultats obtenus ne sont pas du tout reproductibles. Un exemple d'une telle expérience est illustré à la figure III.10. Aucune augmentation consistante de la concentration en calcium cytosolique n'est observée au cours des durées croissantes d'incubation sous hypoxie. De plus, les contrôles en normoxie ne sont pas stables.

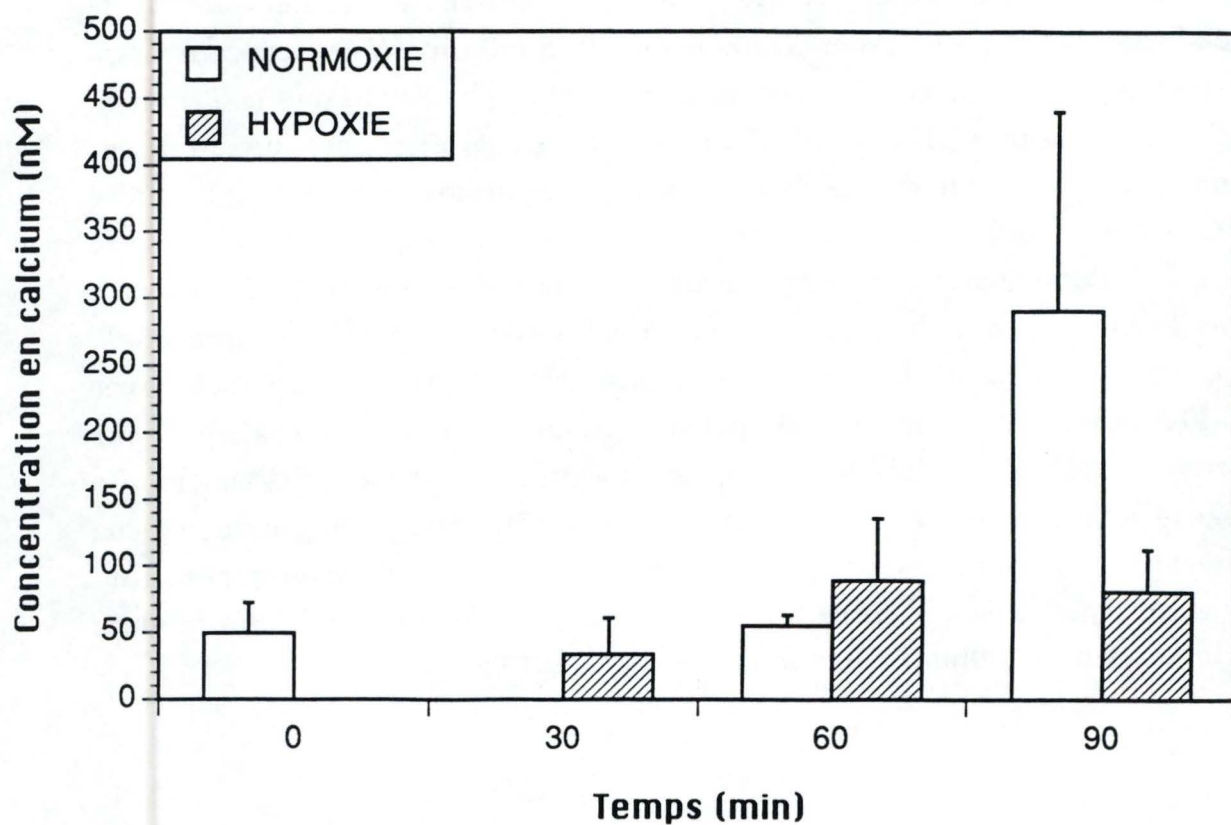


Figure III.10 : Évolution de la concentration en calcium cytosolique dans des cellules endothéliales incubées 30, 60 ou 90 minutes sous hypoxie ou en normoxie. La mesure est réalisée au cytofluorimètre à l'aide de la sonde Calcium green-1. Les résultats sont exprimés en tant que moyennes \pm un écart-type pour $n = 4$.

Les raisons de cette non-reproductibilité des résultats avec la sonde restent encore obscures. Il existe un relargage de la sonde Calcium green-1 au cours de l'incubation mais il est faible par rapport à celle du Fluo-3 et il reste théoriquement assez de sonde dans le cytosol afin de réaliser une mesure de la $[Ca^{++}]_i$.

Puisque nous ne pouvions obtenir de résultats fiables dans ces conditions, nous avons envisagé une dernière alternative qui consiste à charger les cellules avec une sonde fluorescente pendant les périodes d'incubation sous hypoxie ou en normoxie. Cette solution n'est certainement pas optimale car rien ne nous garantit que cette charge se fera de la même façon dans les deux conditions, en effet, l'hypoxie pourrait diminuer l'entrée de la sonde dans les cellules ou inhiber sa désestérification, mais elle a l'avantage d'éviter le relargage de la sonde préincorporée pendant ces incubations.

Nous avons donc incubé des cellules non chargées en présence de sonde estérifiée pendant une incubation de 90 minutes sous hypoxie ou en normoxie. Les sondes Fluo-3 et Calcium green-1 ont été utilisées dans ces expériences. Des mesures supplémentaires ont également été réalisées en présence de β -hydroxybutyrate à une concentration de 10^{-4} M. Celui-ci est connu pour inhiber l'augmentation de la $[Ca^{++}]_i$ suite à l'hypoxie (Arnould *et al.*, 1992) et nous permet donc de vérifier la spécificité de l'effet de l'hypoxie.

Les résultats sont présentés à la figure III.11. On observe que les valeurs de la $[Ca^{++}]_i$ sont globalement plus élevées lorsque le dosage est réalisé à l'aide de la sonde Fluo-3 par rapport à la sonde Calcium green-1. Ces valeurs mesurées sur les cellules issues de la même culture et incubées dans les mêmes conditions devraient être les mêmes. Aucune explication logique ne semble expliquer cette discordance.

De plus, aucun effet de l'hypoxie et/ou du β -hydroxybutyrate n'est mis en évidence dans ces conditions lorsque la $[Ca^{++}]_i$ est mesurée selon ce protocole.

Ici aussi, aucune explication évidente n'apparaît, si ce n'est que l'appareil utilisé ne semble pas approprié au dosage dans ces conditions.

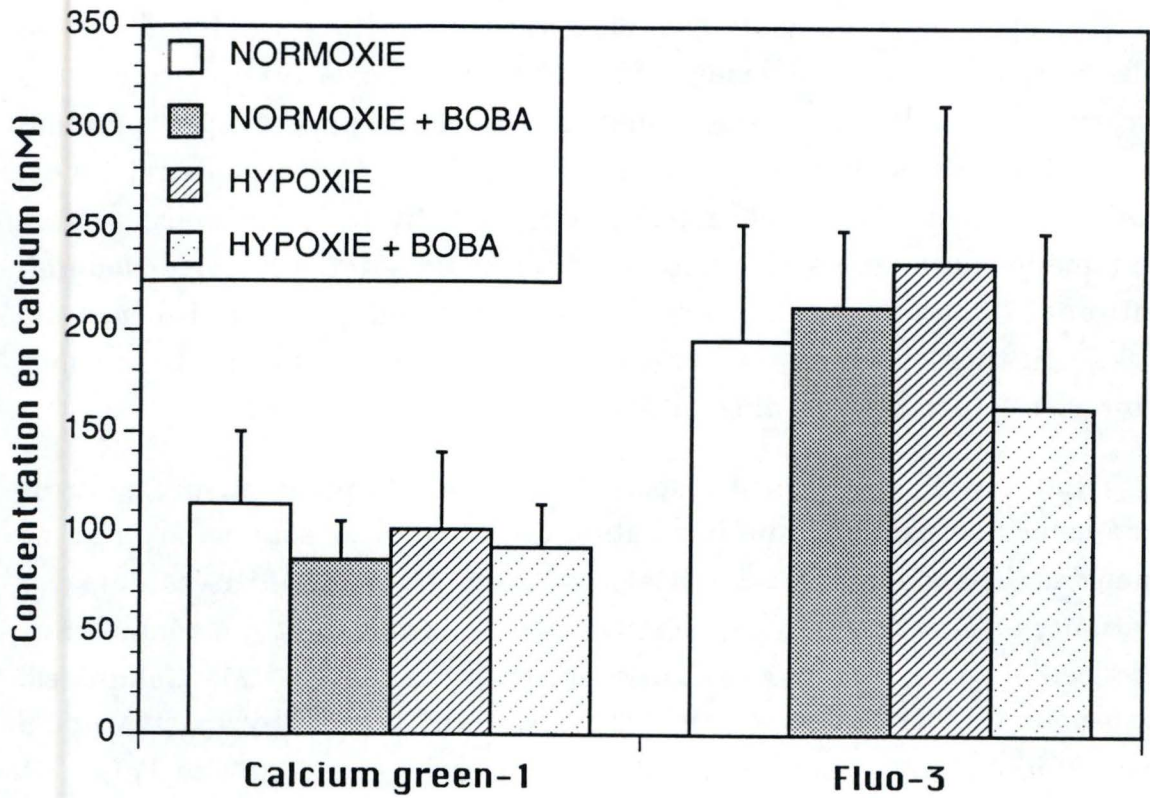


Figure III.11 : Dosage de la concentration en calcium cytosolique dans des cellules endothéliales incubées 90 minutes sous hypoxie ou en normoxie en présence de la sonde Calcium green-1 ou de la sonde Fluo-3. Le dosage a également été réalisé dans des cellules incubées dans les mêmes conditions mais en présence de β -hydroxybutyrate (BOBA) à 10^{-4} M. La mesure est réalisée au cytofluorimètre et les résultats sont exprimés en tant que moyennes \pm un écart-type pour $n = 4$.

I.2. DOSAGE DU CALCIUM CYTOSOLIQUE AU FLUORIMÈTRE

Après ces nombreux essais infructueux, nous avons donc décidé de revenir à l'ancienne méthode qui utilise un fluorimètre à cuvette, afin de tester l'hypothèse présentée au début de ce chapitre.

Cette méthode qui est beaucoup plus fastidieuse et qui ne nous permet pas de réaliser des mesures multiples, a cependant l'avantage de permettre un dosage précis de la $[Ca^{++}]_i$.

Des cellules endothéliales ont été incubées sous hypoxie en présence d'un inhibiteur spécifique de la pompe Na^+/H^+ ou de la pompe Na^+/Ca^{++} pendant une durée de 120 minutes. L'hexaméthylène amiloride, l'inhibiteur spécifique de la pompe Na^+/H^+ , est utilisé à une concentration de $10 \mu M$ tandis que le dichlorobenzamil (DCB), l'inhibiteur spécifique de la pompe Na^+/Ca^{++} , est utilisé à une concentration de $2 \mu M$.

Les résultats de cette expérience sont présentés à la figure III.12. Suite à l'incubation sous hypoxie pendant 120 minutes, nous observons une augmentation de la concentration du calcium cytosolique qui passe de 33 nM à 229 nM . Cette augmentation en calcium est 10 fois supérieur à celle observée pour des cellules restées pendant 120 minutes en normoxie et est consistante avec les résultats obtenus précédemment au laboratoire. Lorsque les cellules endothéliales sont incubées pendant 120 minutes sous hypoxie en présence d'hexaméthylène amiloride à $10 \mu M$, nous observons une inhibition de 49 % de l'augmentation de la concentration en calcium cytosolique, tandis que le DCB à $2 \mu M$ inhibe l'augmentation de la concentration en calcium cytosolique à raison de 65 %.

Nous avons donc pu montrer que le blocage de l'une des deux pompes membranaires – la pompe Na^+/H^+ ou la pompe Na^+/Ca^{++} – par des inhibiteurs spécifiques – l'hexaméthylène amiloride ou le dichlorobenzamil respectivement – diminuait bien l'augmentation de la concentration en calcium cytosolique induite par l'hypoxie dans les cellules endothéliales. Cette observation fournit un argument expérimental en faveur de l'hypothèse présentée au début de ce chapitre selon laquelle l'échange d'ions H^+ , Na^+ et Ca^{++} par différentes pompes interviendrait dans l'augmentation du calcium cytosolique sous hypoxie.

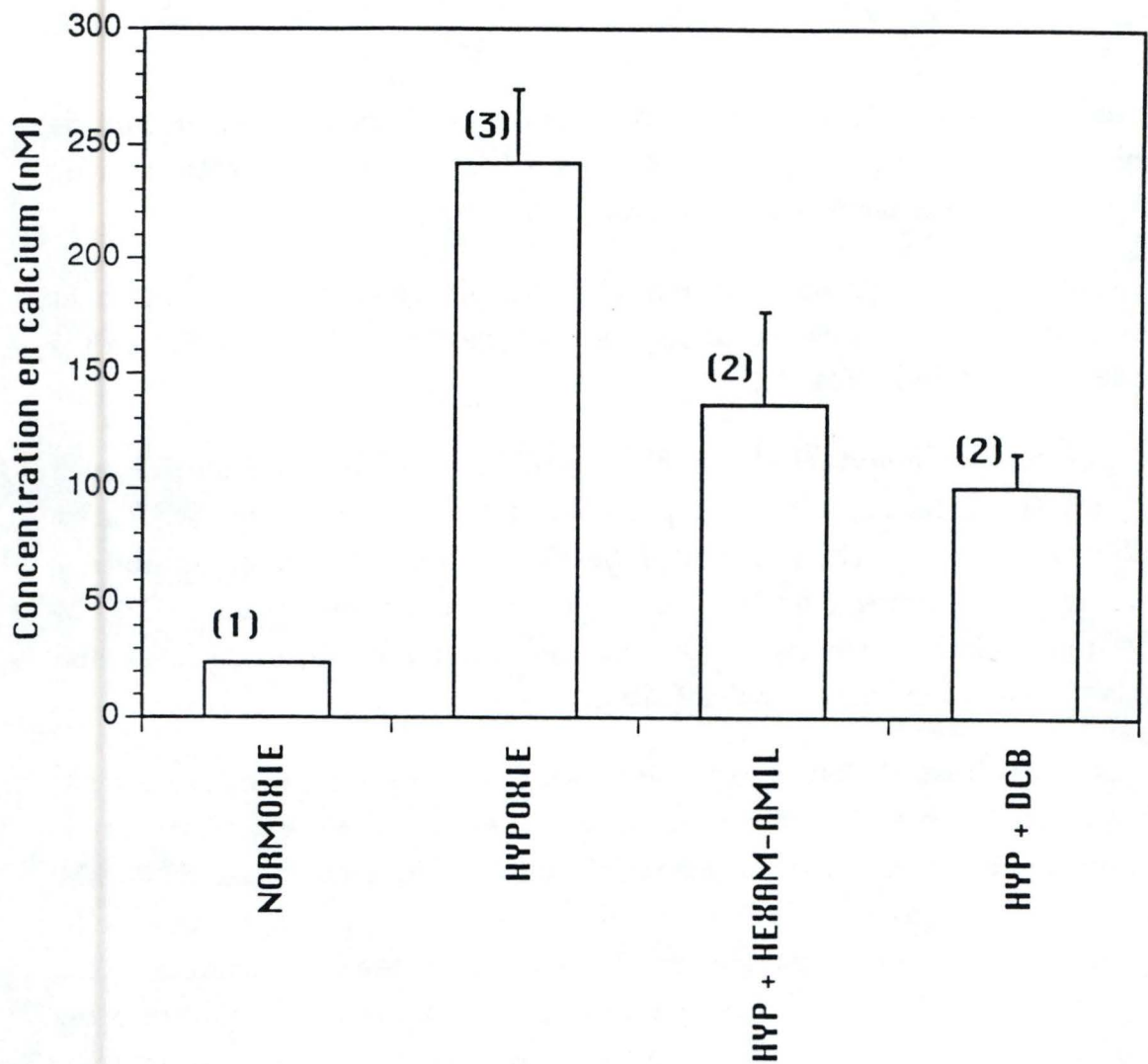


Figure III.12 : Effet des inhibiteurs spécifiques des pompes Na^+/H^+ (hexaméthylène amiloride à $10 \mu\text{M}$) et $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ (dichlorobenzamil à $2 \mu\text{M}$) sur l'augmentation de la concentration en calcium cytosolique dans les cellules endothéliales incubées 120 minutes sous hypoxie. Le dosage a été réalisé au fluorimètre à l'aide de la sonde Fura-2. Les résultats sont exprimés en tant que moyennes \pm un écart-type. Le nombre de mesures est indiqué entre parenthèses.

I.3. DISCUSSION

Dans le cadre général de l'étude de l'effet de l'hypoxie sur les cellules endothéliales en culture, l'hypothèse émise avait pour but d'expliquer comment la diminution de la concentration en ATP dans les cellules endothéliales sous hypoxie entraînait une augmentation de la concentration en calcium cytosolique.

La diminution de l'ATP est sans aucun doute le résultat d'une diminution de l'activité des chaînes respiratoires mitochondriales suite au manque d'oxygène. Afin de compenser cette déficience énergétique, la cellule active la voie glycolytique. Il a été montré au laboratoire, que, sous hypoxie, le transport du glucose est fortement augmenté dans les cellules endothéliales, signe d'une activation de la glycolyse. De plus, il a été également montré que la production de lactate, le produit final de la glycolyse anaérobie, était augmentée sous hypoxie (Janssens *et al.*, soumis). Tous ces résultats suggèrent bien une activation de la glycolyse anaérobie sous hypoxie.

Cependant, la glycolyse n'est pas suffisante pour régénérer totalement l'ATP nécessaire à la cellule, et on observe une diminution de la concentration en ATP des cellules. D'une part, la glycolyse en plus du lactate, produit également des ions H^+ qui vont acidifier le milieu interne de la cellule. D'autre part, une augmentation de la concentration en calcium cytosolique est observée. L'hypothèse qui a été proposée relie ces deux processus. En effet, dans la membrane plasmique, il existe différentes pompes ioniques dont une pompe Na^+/H^+ et une pompe Na^+/Ca^{++} . La cellule pourrait rétablir le pH intracellulaire suite à l'action de la pompe Na^+/H^+ . La concentration en ions H^+ redeviendrait ainsi normale, mais ceci provoque une augmentation de la concentration en ions Na^+ . Grâce à la pompe Na^+/Ca^{++} , la cellule endothéliale pourrait échanger les ions Na^+ contre des ions Ca^{++} . Ceci expliquerait l'augmentation de la concentration en calcium cytosolique dans la cellule endothéliale sous hypoxie.

Le rôle de ces deux pompes ioniques semble important pour réguler plusieurs fonctions cellulaires (Siffert et Akkerman, 1989). Ghigo *et al.* (1988) ont par exemple montré qu'un échange de Na^+/H^+ qui peut être inhibé par l'amiloride, est présent dans la membrane des cellules

endothéliales et que son activation est impliquée dans la régulation des influx de calcium et de la synthèse du PAF induit par la thrombine .

Par ailleurs et dans d'autres types cellulaires que les cellules endothéliales, les deux pompes semblent effectivement responsables de l'augmentation de la $[Ca^{++}]_i$ induite par des conditions ischémiques.

O'Donnell et Bickler (1984) décrivent une augmentation de la $[Ca^{++}]_i$ des tranches de cerveau de rat soumises à une hypoxie gazeuse ou à une hypoxie clinique. Cette augmentation est accentuée si le pH extracellulaire est diminué. Ils concluent qu'elle pourrait donc être due à des flux d'ions H^+ et Na^+ via des échangeurs ioniques. Des résultats similaires ont été obtenus pour les hépatocytes mais la régulation de l'augmentation de la $[Ca^{++}]_i$ semble dans ce cas également dépendre d'autres facteurs comme par exemple de la disponibilité en substrat (Gasbarrini *et al.*, 1994).

La situation pour les myocytes cardiaques semble plus claire. Lorsqu'on soumet les myocytes isolés à partir de coeur de rats nouveau-nés à une hypoxie, on observe une toxicité cellulaire et une augmentation de la $[Ca^{++}]_i$ qui peuvent être inhibées par le DCB et un analogue de l'amiloride (Harper *et al.*, 1993). Au vu de ces résultats, ces auteurs montrent que les deux pompes cibles de ces deux inhibiteurs joueraient un rôle dans la toxicité de l'hypoxie pour les myocytes et que le pH est un facteur important dans cette toxicité. Par ailleurs, l'amiloride a été montré comme pouvant inhiber certains aspects de la toxicité liée à une ischémie-reperfusion du coeur en empêchant une augmentation exagérée de la $[Ca^{++}]_i$ (Yano *et al.*, 1993). Au vu des différents résultats publiés dans la littérature, il semblerait donc bien, en tout cas pour les myocytes, que pendant l'hypoxie il y a une diminution du pH_i suite à l'activation de la glycolyse. Cette diminution active la pompe Na^+/H^+ entraînant l'activation subséquente de la pompe Na^+/Ca^{++} conduisant finalement à l'augmentation de la $[Ca^{++}]_i$ (Karmazyn et Moffat, 1993; Scholz et Albus, 1993).

Dans ce travail, nous avons quant à nous, montré que des inhibiteurs des pompes Na^+/H^+ et Na^+/Ca^{++} entraînaient une diminution de l'augmentation de la $[Ca^{++}]_i$ dans les cellules endothéliales incubées sous hypoxie. Cette diminution est de l'ordre de 49 % avec l'hexaméthylène

amiloride, l'inhibiteur spécifique de la pompe Na^+/H^+ et de l'ordre de 65 % avec le dichlorobenzamil, l'inhibiteur spécifique de la pompe $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$.

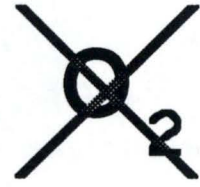
Au vu de ce qui est présenté dans la littérature, ces résultats semblent indiquer un processus commun de régulation du pH_i ayant pour conséquence une altération de la $[\text{Ca}^{++}]_i$ dans les myocytes et dans les cellules endothéliales. Le fait que ces inhibiteurs ne parviennent pas à empêcher totalement l'augmentation de la $[\text{Ca}^{++}]_i$ indique aussi que la diminution de l'activité de la $\text{Ca}^{++}/\text{ATPase}$ peut aussi contribuer à ce phénomène.

Au vu de ces résultats et pour confirmer cette hypothèse, il serait bon de mesurer le pH intracellulaire des cellules endothéliales soumises à l'hypoxie et de voir si il diminue effectivement.

II. ÉTUDE DE LA LIBÉRATION DE bFGF PAR LES CELLULES ENDOTHÉLIALES

Au cours des expériences sur l'étude de la prolifération des cellules musculaires lisses en présence de milieu de culture conditionné par les cellules endothéliales, il a pu être montré au laboratoire que les cellules endothéliales sous hypoxie libèrent des facteurs mitogènes pour les cellules musculaires lisses. Ces facteurs sont la prostaglandine ($\text{PGF}_{2\alpha}$) et probablement le bFGF (Michiels *et al.*, 1994). Nous avons voulu vérifier si le bFGF était bien libéré par les cellules endothéliales sous hypoxie et en étudier le mécanisme.

Étant donné que d'après la littérature, il semble que le bFGF soit libéré essentiellement par des cellules endothéliales lésées ou mortes, nous allons dans un premier temps étudier quels sont les changements qui apparaissent au point de vue de la perméabilité membranaire des cellules endothéliales soumises à une hypoxie. En second lieu, nous étudierons le



Dextran-Fluorescéine

PM = 9 300 PM = 147 800

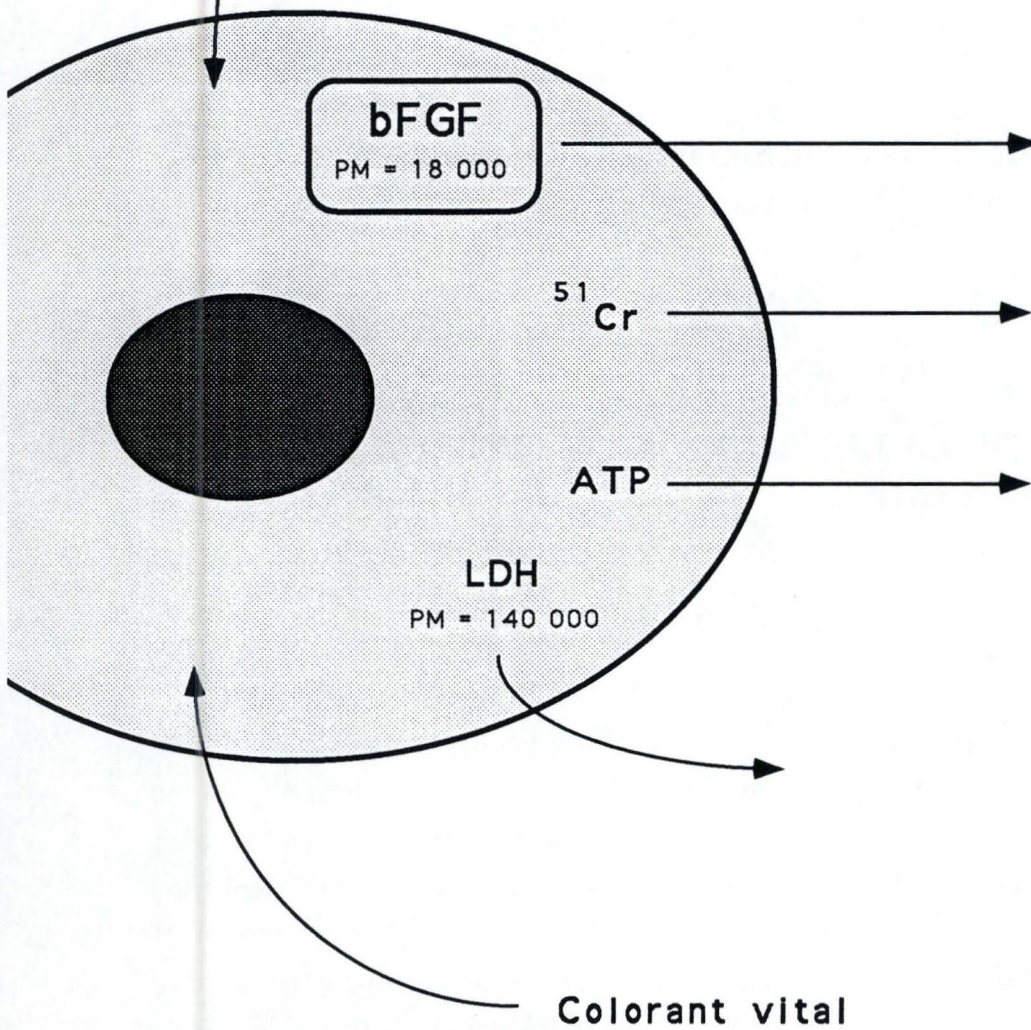


Figure III.13 : Modèle expérimental d'étude *in vitro* des modifications de la perméabilité membranaire de cellules endothéliales incubées sous hypoxie.

mécanisme de libération du bFGF sous hypoxie ainsi que sa localisation subcellulaire.

II.1. ÉTUDE DES CHANGEMENTS DE PERMÉABILITÉ AU SEIN DES CELLULES ENDOTHÉLIALES SOUS HYPOXIE

Notre hypothèse de départ était que les cellules endothéliales libèrent du bFGF lors d'une incubation sous hypoxie par de petits pores fournis dans la membrane plasmique. Le bFGF est un facteur de croissance de 18 000 Da. Afin de déterminer si cette libération était dépendante d'un changement au niveau de la perméabilité de la membrane plasmique des cellules endothéliales sous hypoxie, nous avons étudié si la LDH, le ^{51}Cr ou l'ATP sortaient de la cellule endothéliale sous hypoxie et si le trypan bleu ou le dextran de petit poids moléculaire ou de poids moléculaire élevé y entraient dans les mêmes conditions (Figure III.13).

II.1.1. Étude de la libération de la LDH par les cellules endothéliales sous hypoxie

La LDH est une enzyme présente en grande quantité dans le cytoplasme des cellules et est souvent utilisée pour mesurer une altération de la perméabilité membranaire. Cette enzyme a un poids moléculaire de 140 000.

L'étude de la libération de la LDH par les cellules endothéliales sous hypoxie a été réalisée en mesurant la quantité de LDH retrouvée dans le milieu d'incubation par rapport à la quantité de LDH qui est restée associée aux cellules. Ces cellules ont été soumises à des incubations sous hypoxie de 30, 60, 90 ou 120 minutes. Les contrôles en normoxie ont été réalisés dans les mêmes conditions pour des durées similaires d'incubation.

La figure III.14 montre que le pourcentage d'activité de la LDH qui est retrouvé dans le milieu d'incubation est très faible. La figure III.15 montre le pourcentage d'activité de la LDH qui reste associée aux cellules. Nous

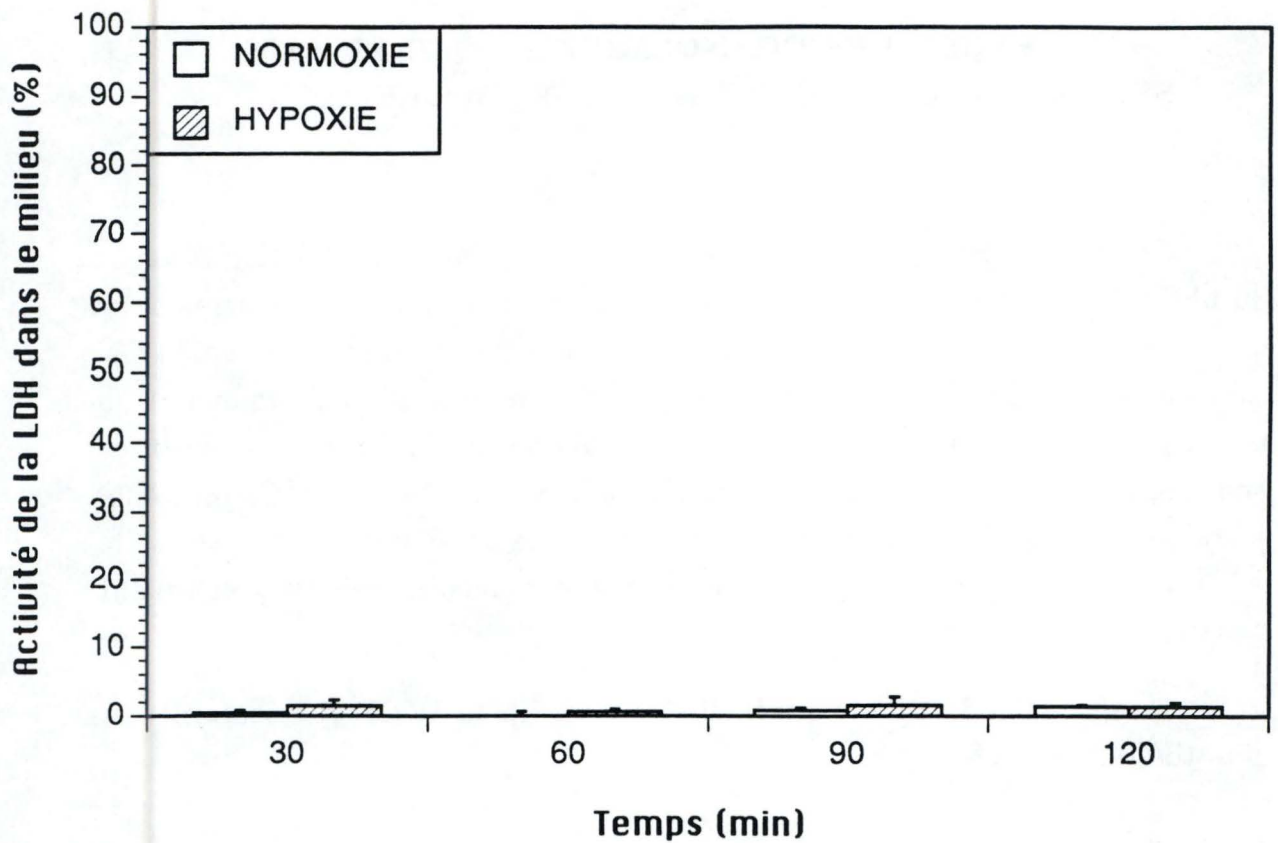


Figure III.14 : Évolution de la libération de LDH dans le milieu d'incubation par des cellules endothéliales incubées 30, 60, 90 ou 120 minutes sous hypoxie ou en normoxie. Les résultats sont exprimés en pourcents par rapport à l'activité totale de LDH de ces mêmes cellules en tant que moyennes \pm un écart-type pour $n = 3$.

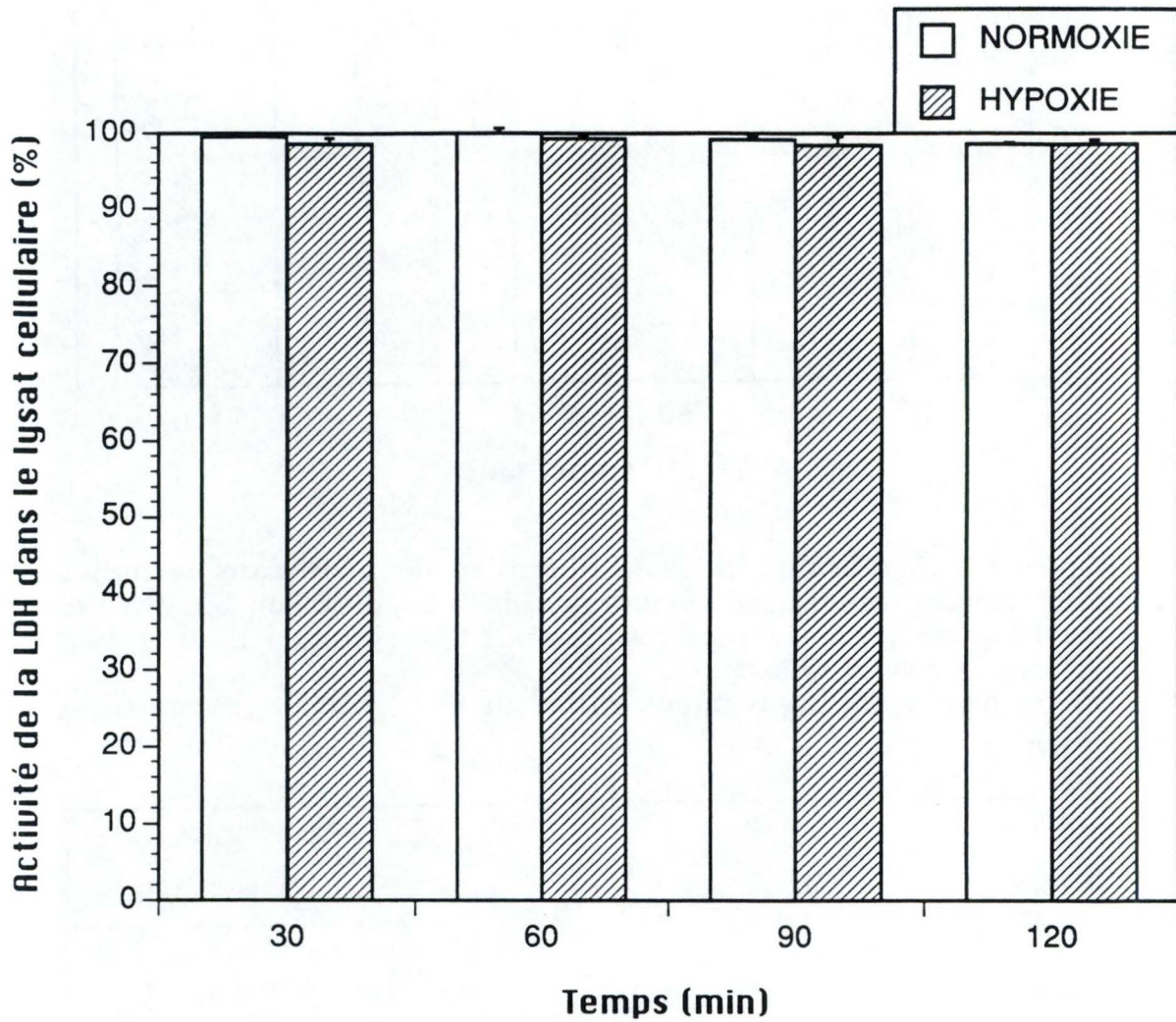


Figure III.15 : Évolution de l'activité de la LDH présente dans le lysat de cellules endothéliales incubées 30, 60, 90 ou 120 minutes sous hypoxie ou en normoxie. Les résultats sont exprimés en pourcents par rapport à l'activité totale de LDH de ces mêmes cellules en tant que moyennes \pm un écart-type pour $n = 3$.

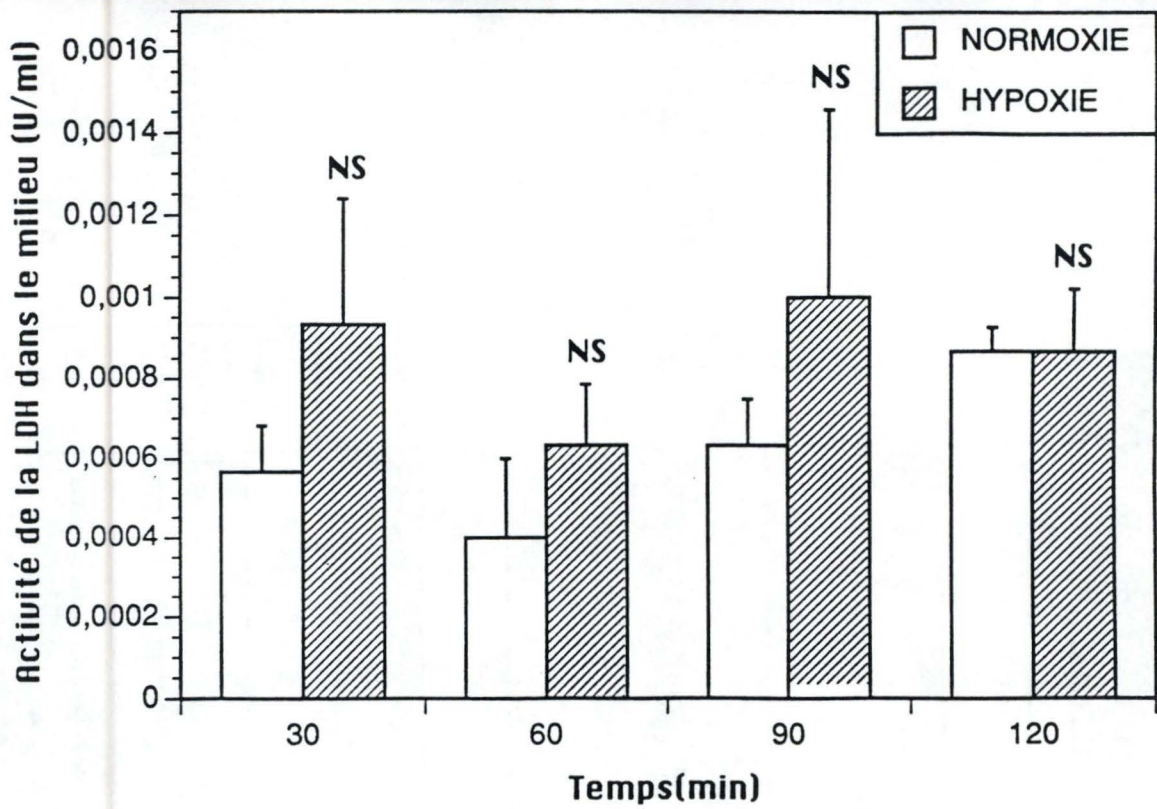


Figure III.16 : Évolution de la libération de LDH dans le milieu d'incubation par des cellules endothéliales incubées 30, 60, 90 ou 120 minutes sous hypoxie ou en normoxie. Les résultats sont exprimés en U/ml en tant que moyennes \pm un écart-type pour $n = 3$.

NS = non significativement différent du contrôle normoxique correspondant.

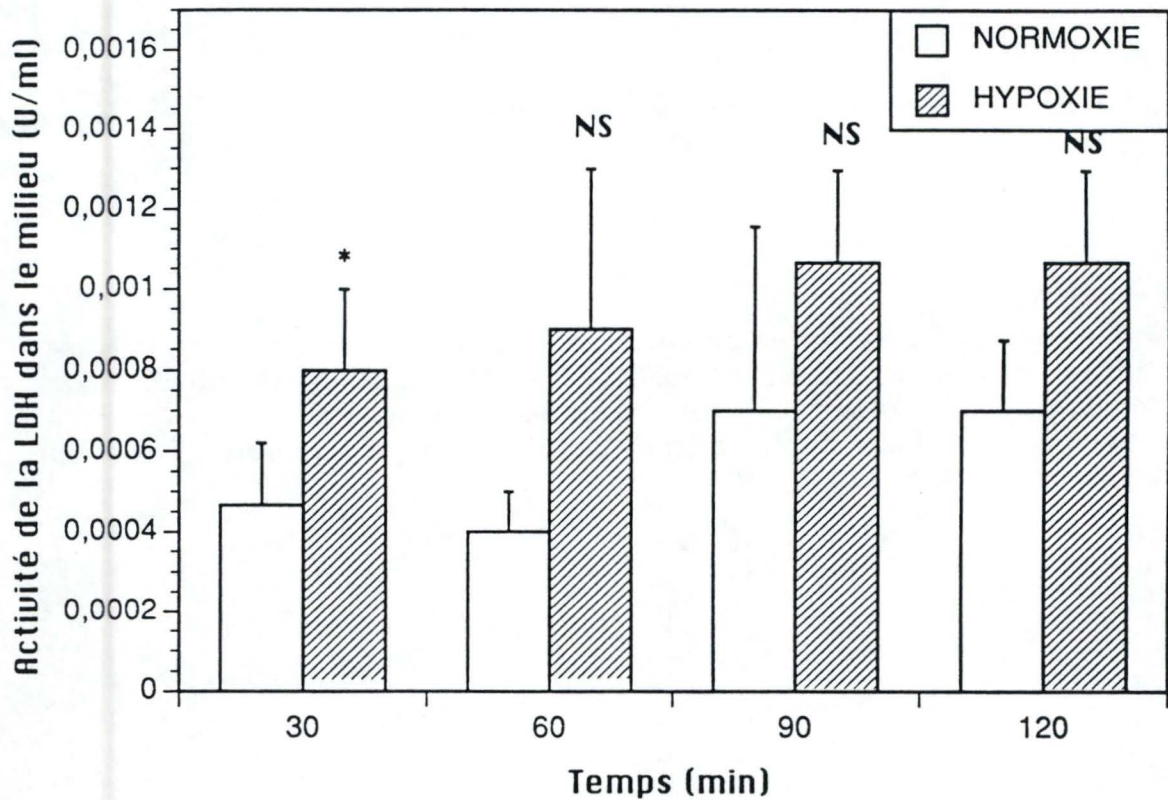


Figure III.17 : Évolution de la libération de LDH dans le milieu d'incubation par des cellules endothéliales incubées 30, 60, 90 ou 120 minutes sous hypoxie ou en normoxie. Les résultats sont exprimés en U/ml en tant que moyennes \pm un écart-type pour $n = 3$.

* = significativement différent du contrôle normoxique correspondant avec $P < 0,05$.

NS = non significativement différent du contrôle normoxique correspondant.

avons par ailleurs vérifié que l'activité totale de la LDH ne changeait pas au cours du temps que ce soit sous hypoxie ou en normoxie.

Sur ces graphes, l'échelle étant exprimée en pourcents, il est difficile de visualiser les variations au niveau de la libération de la LDH dans le milieu d'incubation pour des durées variables d'incubation sous hypoxie ou en normoxie. Nous avons donc présenté les mêmes résultats exprimés en unités d'activité de la LDH dans le milieu à la figure III.16. Cette expérience a été réalisée une seconde fois (figure III.17). Les résultats indiquent que la libération de LDH pendant les incubations de durées croissantes en normoxie ou sous hypoxie est très faible. De plus, aucune différence consistante ni statistiquement significative entre ces deux conditions d'incubation ne peut être observées. Ces observations suggèrent que la perméabilité de la membrane plasmique aux molécules de gros poids moléculaire ne semblent pas affectées par l'hypoxie.

II.1.2. Étude de la libération du ^{51}Cr par les cellules endothéliales sous hypoxie

La LDH était une protéine de haut poids moléculaire, elle n'est peut-être pas un bon paramètre pour mesurer une variation faible de la perméabilité de la membrane plasmique. Nous avons alors décidé d'étudier la libération de ^{51}Cr préalablement incorporé dans les cellules endothéliales. Ce ^{51}Cr ajouté aux cellules sous forme de chromate, est réduit dans le cytosol des cellules et s'associerait à certaines protéines du cytosol. On retrouve de la radioactivité associée au ^{51}Cr relargué par les cellules lorsque la perméabilité de leur membrane plasmique est altérée.

L'étude de la libération du ^{51}Cr par les cellules endothéliales a été réalisée de la même façon que celle de la libération de la LDH. Nous avons mesuré la quantité de ^{51}Cr libérée dans le milieu d'incubation de cellules endothéliales incubées pendant des durées croissantes (30, 60, 90 ou 120 minutes) sous hypoxie ou en normoxie. Dans ce cas, nous avons directement calculé le pourcentage de libération du ^{51}Cr dans le milieu par rapport à la quantité totale de ^{51}Cr intégré dans la cellule. C'est ce

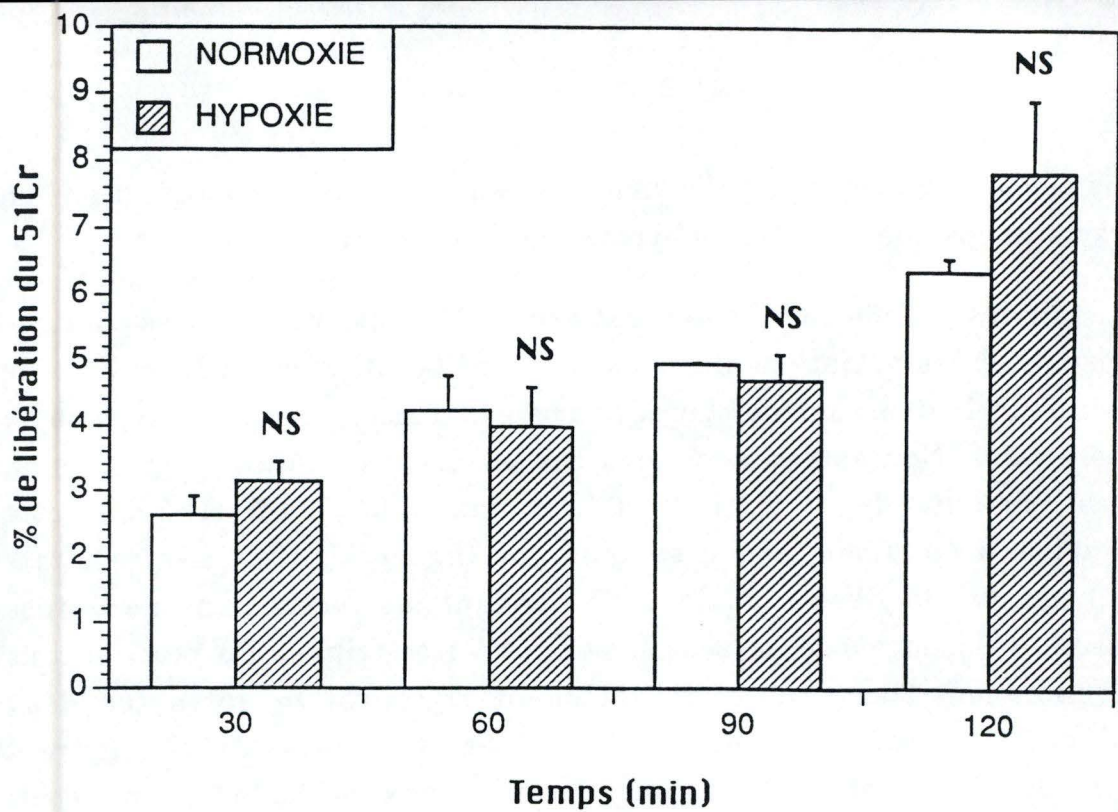


Figure III.18 : Évolution de la libération de ⁵¹Cr par des cellules endothéliales incubées 30, 60, 90 ou 120 minutes sous hypoxie ou en normoxie. Les résultats sont exprimés en pourcents par rapport à la quantité totale de ⁵¹Cr incorporée en tant que moyenne ± un écart-type pour n = 3.

NS = non significativement différent du contrôle normoxique correspondant.

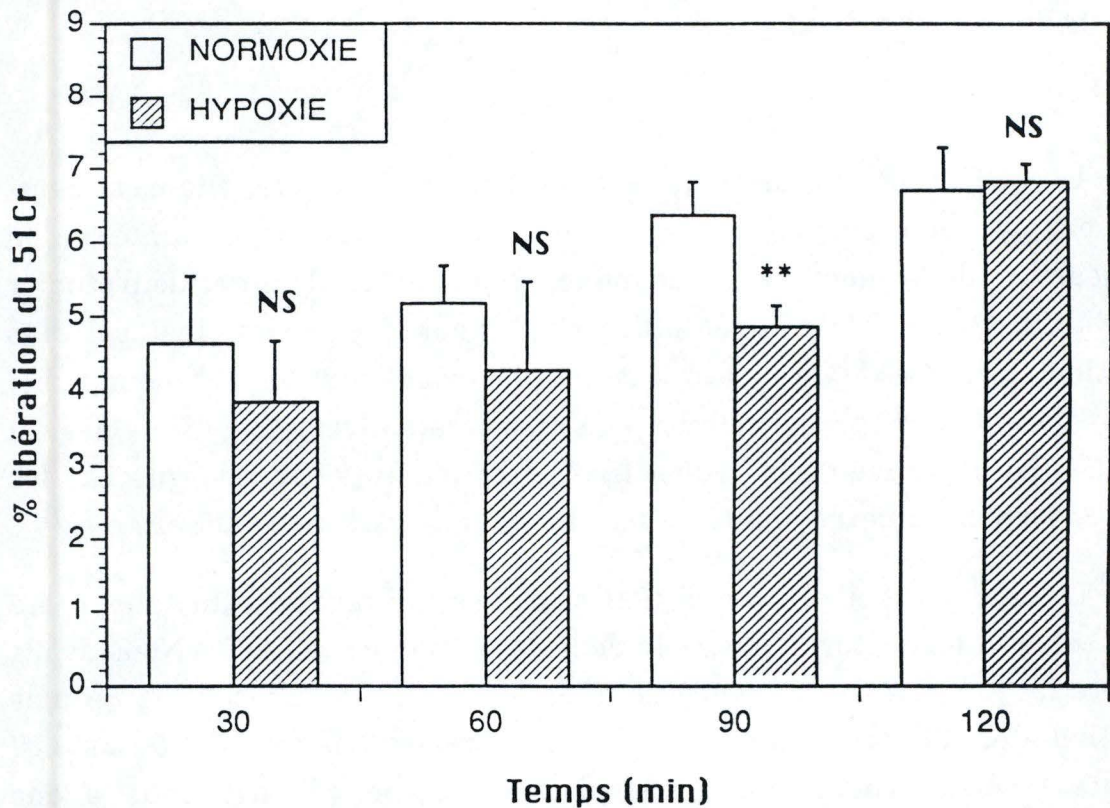


Figure III.19 : Évolution de la libération de ⁵¹Cr par des cellules endothéliales incubées 30, 60, 90 ou 120 minutes sous hypoxie ou en normoxie. Les résultats sont exprimés en pourcents par rapport à la quantité totale de ⁵¹Cr incorporée en tant que moyenne ± un écart-type pour n = 3.

** = significativement différent du contrôle normoxique correspondant avec P < 0,01.

NS = non significativement différent du contrôle normoxique correspondant.

pourcentage de libération du ^{51}Cr qui est présenté aux figures III.18 et III.19 pour deux expériences similaires.

Nous observons que la libération du ^{51}Cr est très faible, de l'ordre de 7 à 8 %, après 120 minutes d'hypoxie ou de normoxie. Cette libération augmente légèrement au cours du temps d'incubation sous hypoxie ou en normoxie, et ce, de la même façon pour les deux conditions expérimentales : on observe pas de différence significative entre les incubations sous hypoxie ou en normoxie. Il semble donc que cette libération soit le résultat d'un relargage spontané par les cellules au cours du temps mais qu'il n'y ait pas d'accentuation de ce relargage par l'hypoxie. Ces résultats indiquent une fois de plus que la perméabilité de la membrane plasmique des cellules endothéliales ne semble pas altérée sous hypoxie.

II.1.3. Étude de la libération de l'ATP par les cellules endothéliales sous hypoxie

Un troisième paramètre a finalement été étudié, il s'agit de la libération d'ATP. L'ATP est une molécule de faible poids moléculaire et elle pourrait donc être libérée lors d'une altération légère de la membrane plasmique. Nous avons tout d'abord vérifié que l'ATP libéré dans le milieu n'était pas dégradé au cours des incubations (voir point VI.C.4. du chapitre II). Ensuite, l'ATP libéré par les cellules endothéliales sous hypoxie ou en normoxie a été mesuré.

Comme l'illustrent les figures III.20 et III.21, la quantité d'ATP libérée dans le milieu d'incubation est très faible, ce qui explique la grande variabilité observée dans les mesures. Nous avons calculé que 0,68 % est libéré par rapport à la quantité totale d'ATP présente dans les cellules.

Nous observons également qu'il n'y a apparemment pas ou peu d'augmentation au niveau de la libération de l'ATP pour des durées croissantes d'incubation sous hypoxie et pas de différence significative entre les incubations sous hypoxie ou en normoxie.

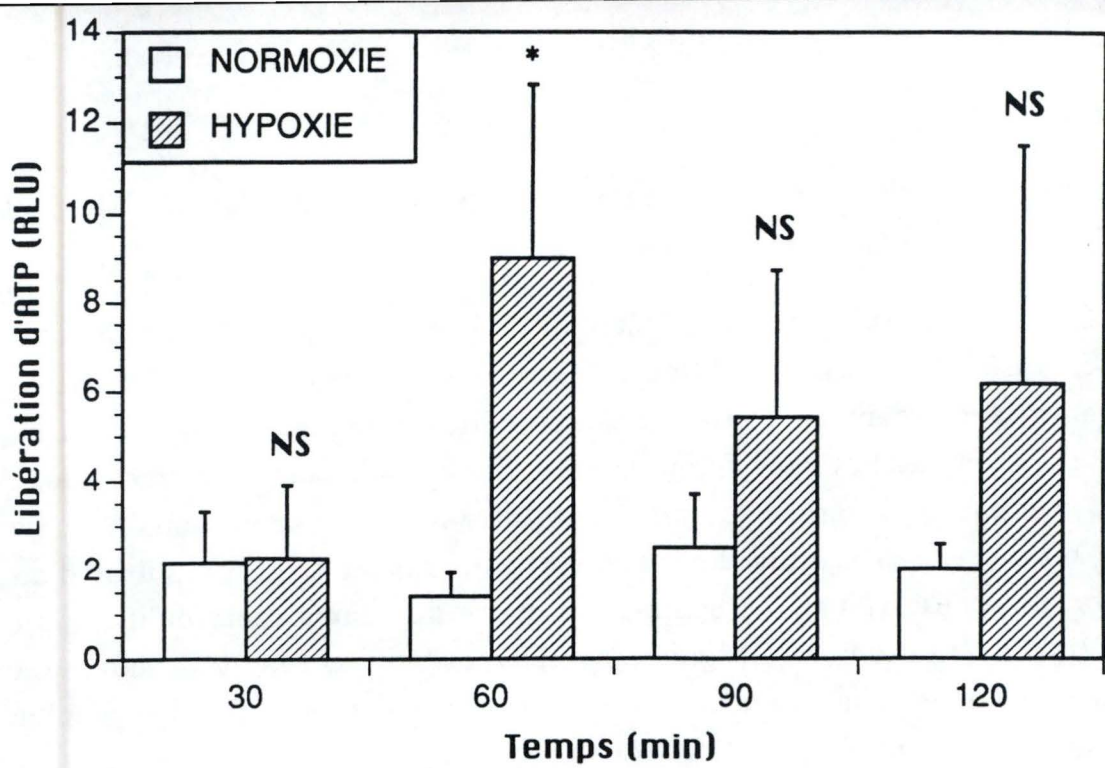


Figure III.20 : Évolution de la libération d'ATP par les cellules endothéliales incubées 30, 60, 90 ou 120 minutes sous hypoxie ou en normoxie. Les résultats sont exprimés en RLU (relative light units) en tant que moyennes \pm un écart-type pour $n = 3$.

* = significativement différent du contrôle normoxique correspondant avec $P < 0,05$.

NS = non significativement différent du contrôle normoxique correspondant

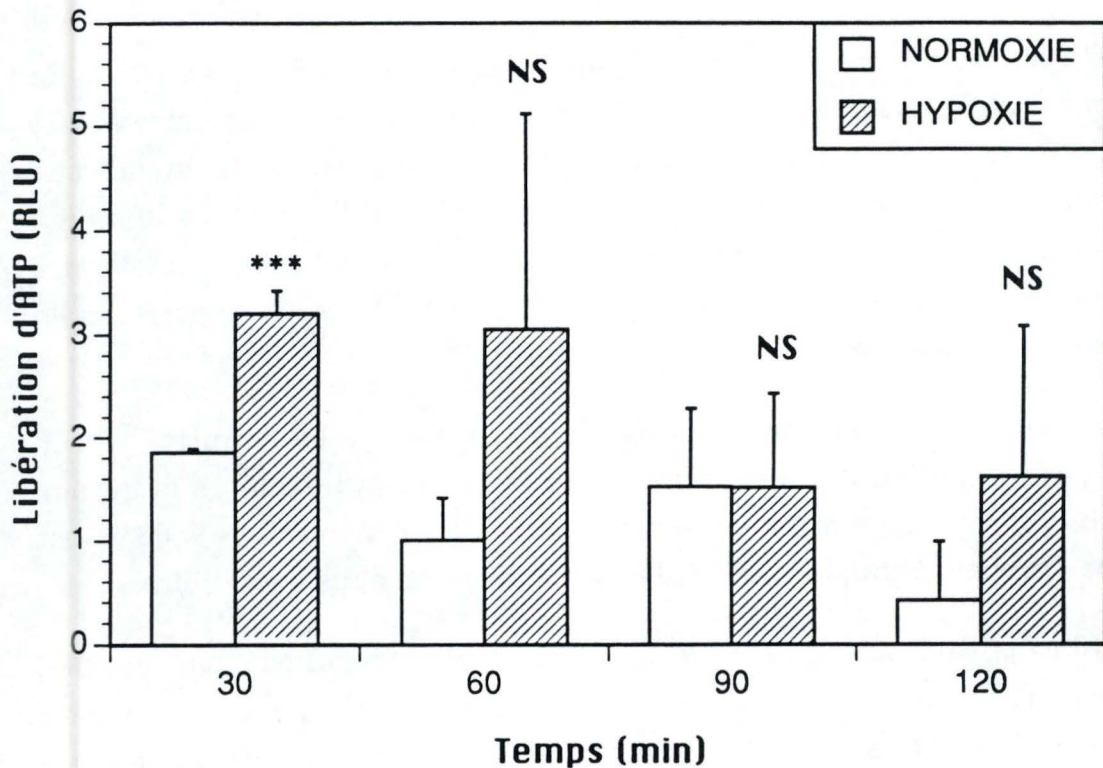


Figure III.21 : Évolution de la libération d'ATP par les cellules endothéliales incubées 30, 60, 90 ou 120 minutes sous hypoxie ou en normoxie. Les résultats sont exprimés en RLU (relative light units) en tant que moyennes \pm un écart-type pour $n = 3$.

*** = significativement différent du contrôle normoxique correspondant avec $P < 0,001$.

NS = non significativement différent du contrôle normoxique correspondant

II.1.4. Étude de l'entrée du trypan bleu dans les cellules endothéliales sous hypoxie

Les résultats décrits ci-dessus montrent qu'il ne semble pas y avoir d'altération de la perméabilité de la membrane plasmique des cellules endothéliales incubées sous hypoxie par rapport aux cellules maintenues en normoxie. Les résultats ont été obtenus en suivant la libération de diverses molécules à partir du cytoplasme des cellules. Nous avons voulu approfondir cette étude en suivant une éventuelle entrée de molécules extérieures dans ce cytoplasme. Deux approches ont été suivies : l'usage d'un colorant vital et l'observation en fluorescence de l'entrée de dextran de deux poids moléculaires différents.

Le trypan bleu est un colorant vital c'est-à-dire qu'il n'entre que dans les cellules mortes par des pores qui se sont ouverts au sein de la membrane plasmique. On ne peut donc mettre en évidence par cette méthode que des modifications drastiques de la perméabilité de cette membrane.

Les cellules ont été incubées sous hypoxie pendant des temps croissants et ensuite mises en présence d'une solution de trypan bleu. La quantité de cellules colorées par rapport à la quantité totale de cellules répertoriées nous donne le pourcentage de viabilité cellulaire. Des contrôles ont également été réalisés en normoxie.

La figure III.22 montre une diminution de 1,8 % et de 7 % de la viabilité cellulaire respectivement après 90 et 120 minutes d'incubation sous hypoxie. La viabilité des cellules maintenues en normoxie reste supérieure à 99 %. Cette expérience montre des changements de perméabilité beaucoup plus importants que dans toutes les autres expériences présentées précédemment. Cela est dû au fait que les cellules sont repiquées à faible densité pour permettre le comptage de ces cellules : dans ces conditions, les cellules sont beaucoup moins résistantes aux stress en général et à l'hypoxie en particulier. Dans les expériences précédentes, les cellules étaient repiquées à forte densité, et étaient donc moins sensibles au stress.

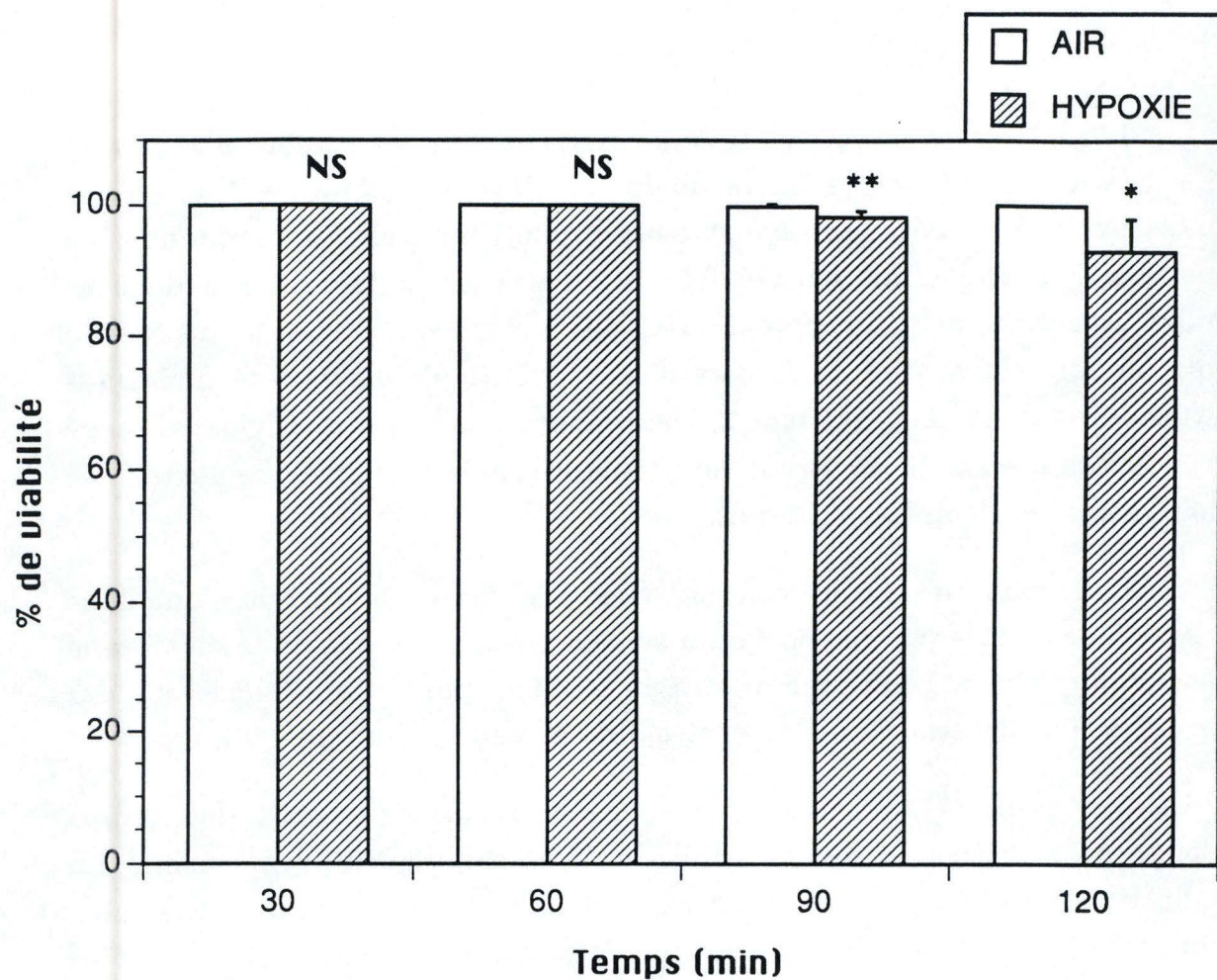


Figure III.22 : Évolution de la viabilité des cellules endothéliales mesurée par l'exclusion du bleu de trypan incubées 30, 60, 90 ou 120 minutes sous hypoxie ou en normoxie. Les résultats sont exprimés en pourcents de viabilité en tant que moyennes \pm un écart-type pour $n = 4$.

* = significativement différent du contrôle normoxique correspondant avec $P < 0,05$.

** = significativement différent du contrôle normoxique correspondant avec $P < 0,01$.

NS = non significativement différent du contrôle normoxique correspondant

I.1.5. Étude de l'entrée du dextran-fluorescéine dans les cellules endothéliales sous hypoxie

Nous avons voulu ensuite étudier l'entrée d'une même molécule, le dextran, mais de deux poids moléculaires différents. Ces expériences devraient nous permettre de mettre en évidence la présence de pores de petite ou de grande taille au niveau de la membrane plasmique.

Nous avons utilisé deux molécules de dextran-fluorescéine, une molécule de petit poids moléculaire (9300 Da) et une molécule de poids moléculaire plus élevé (147 800 Da).

Le dextran-fluorescéine qui est entré dans la cellule est mis en évidence par l'observation des cellules en microscopie à fluorescence et des photographies ont été prises pour des durées différentes d'incubation sous hypoxie (30, 60, 90 ou 120 minutes) ainsi que pour les contrôles correspondants maintenus en normoxie.

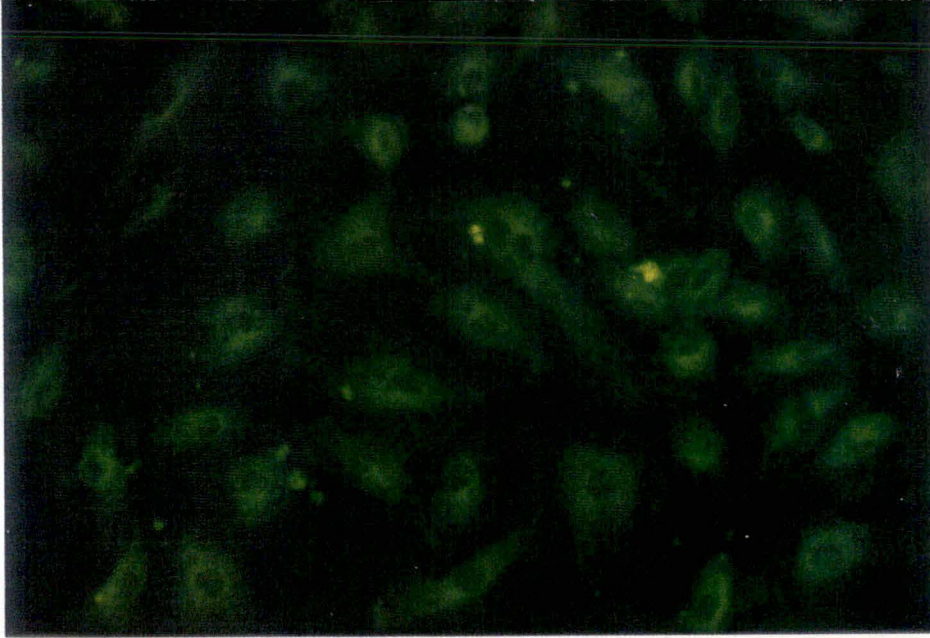
a. Entrée du dextran-fluorescéine de 9300 Da

La figure III.23 présente les différentes photographies obtenues pour l'entrée du dextran-fluorescéine de 9300 Da au cours d'incubation de 30, 60, 90 ou 120 minutes sous hypoxie et en normoxie. Dans chaque cas, une photographie en contraste de phase a été prise en plus de la photographie en microscopie à fluorescence pour chaque plage cellulaire.

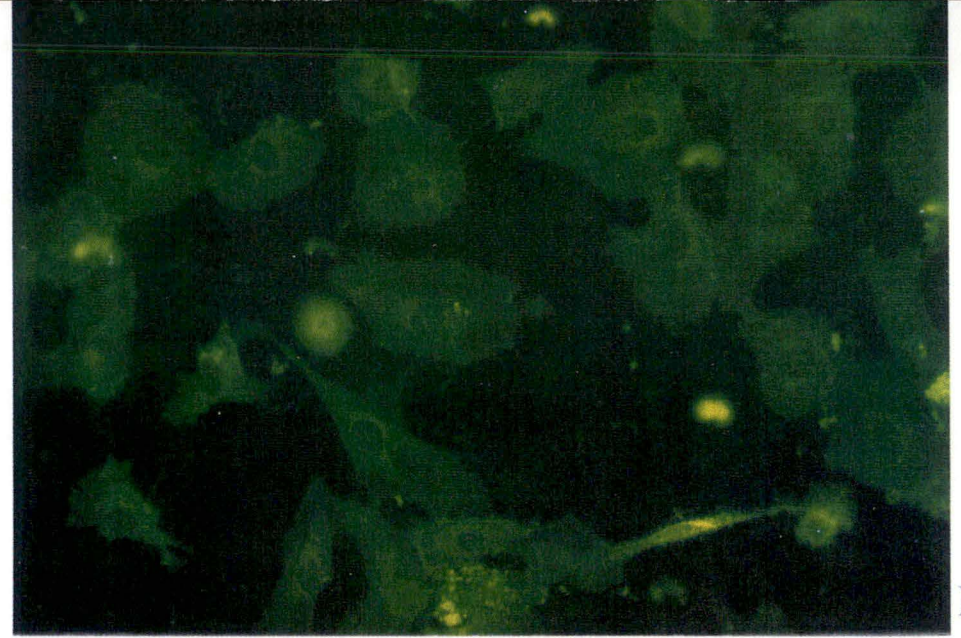
Nous avons tout d'abord vérifié que le dextran-fluorescéine ne s'adsorbait pas à la surface des cellules en lavant celles-ci en présence d'une solution à 10 mg/ml : aucun marquage fluorescent n'est en effet observé (Figure III.23 I₁).

Au niveau de la morphologie des cellules, on observe que les cellules gardent une forme régulière pendant toute la durée d'incubation en

A1



E1



A2

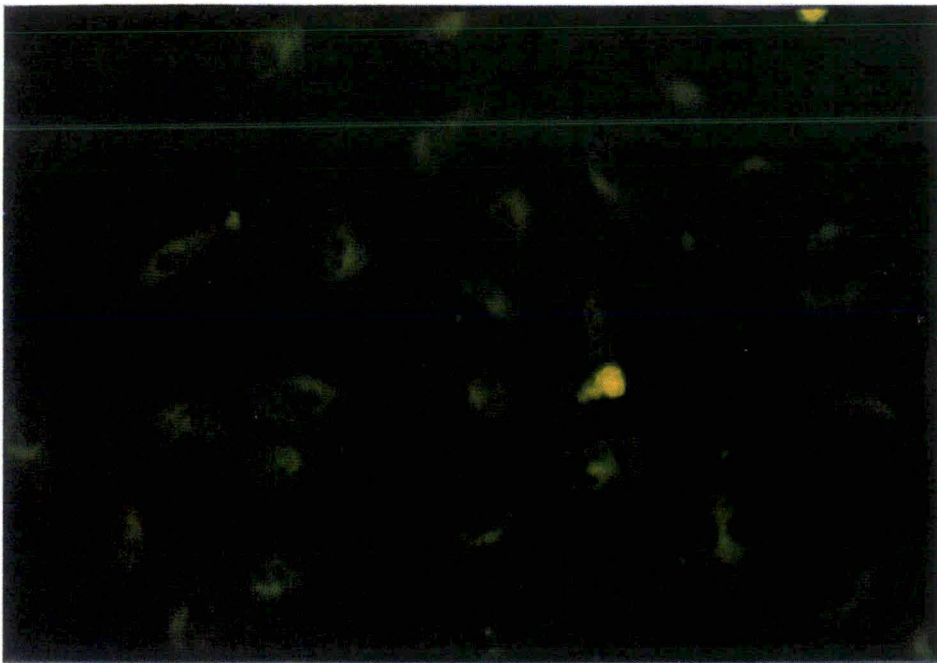


E2

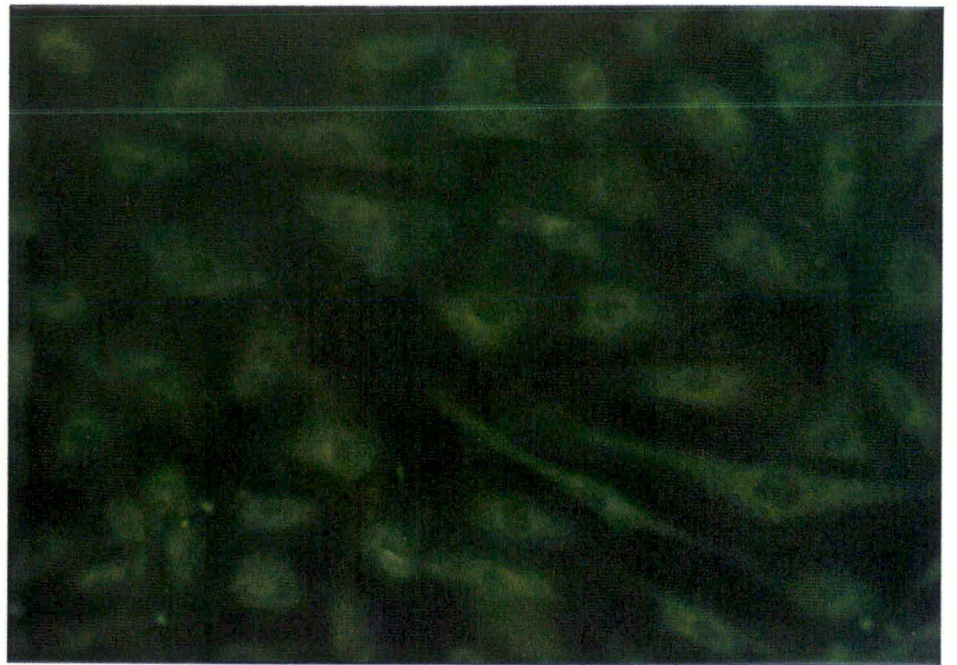


Figure III.23 : Photographies en microscopie à fluorescence (1) et à contraste de phase (2) de cellules endothéliales incubées en présence de dextran-fluorescéine de petits poids moléculaire (9300 Da) à 10 mg/ml 30, 60, 90 ou 120 minutes sous hypoxie (E, F, G, H) ou en normoxie (A, B, C, D) (grossissement = 288 X). Un contrôle négatif réalisé en lavant les cellules avec cette solution de dextran-fluorescéine a également été réalisé (I).

B1



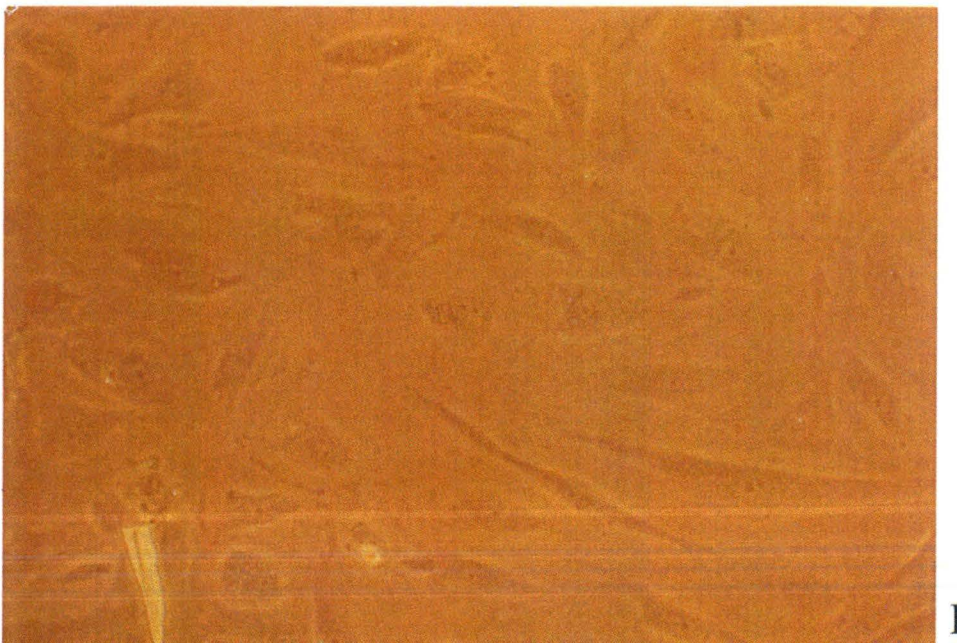
F1



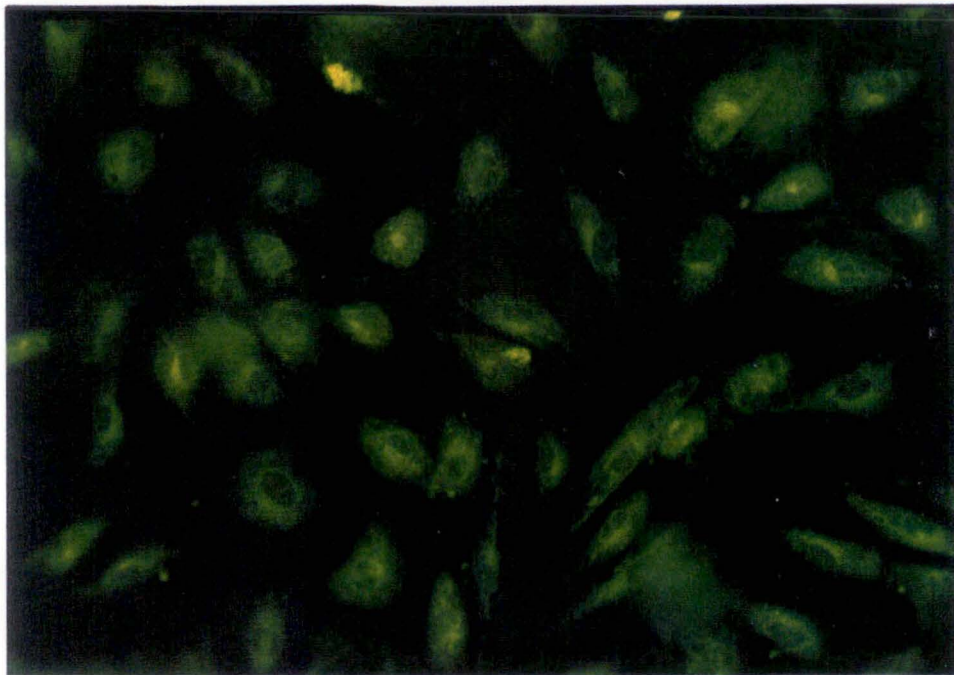
B2



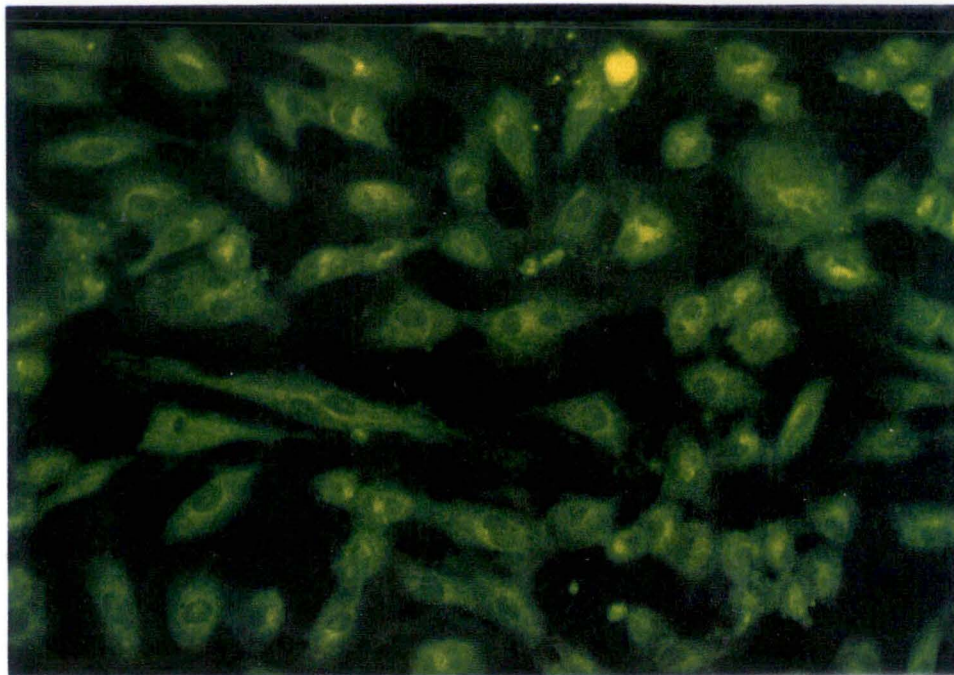
F2



C1



G1

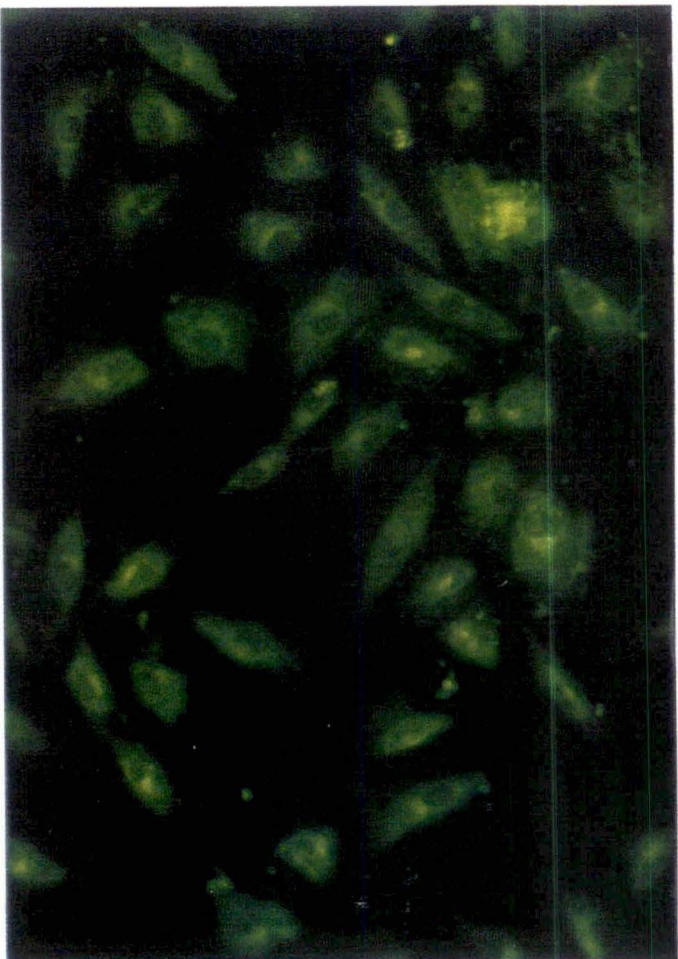


C2

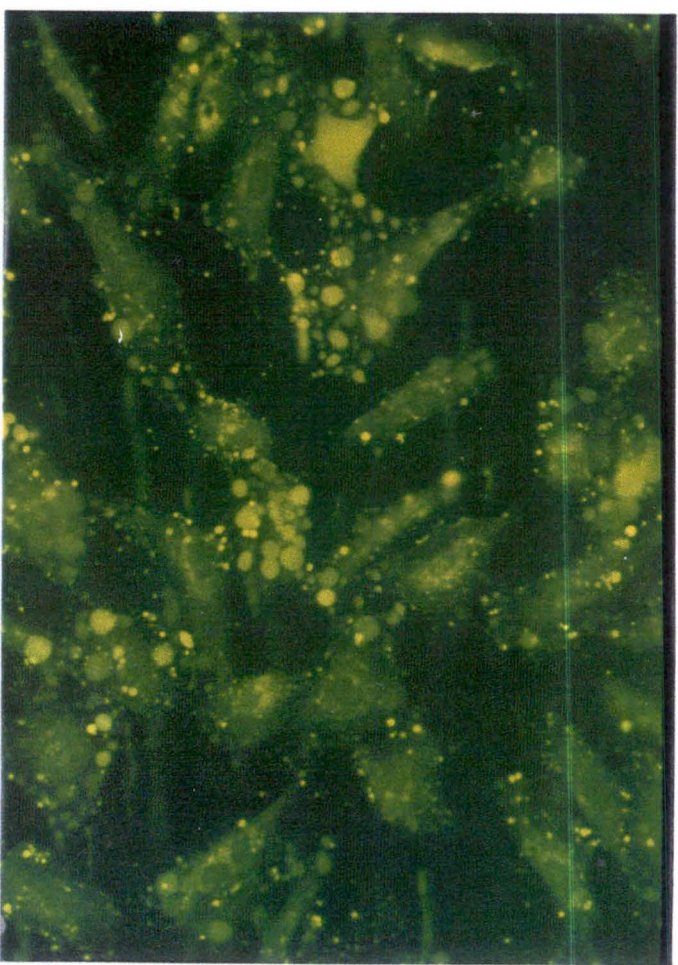


G2

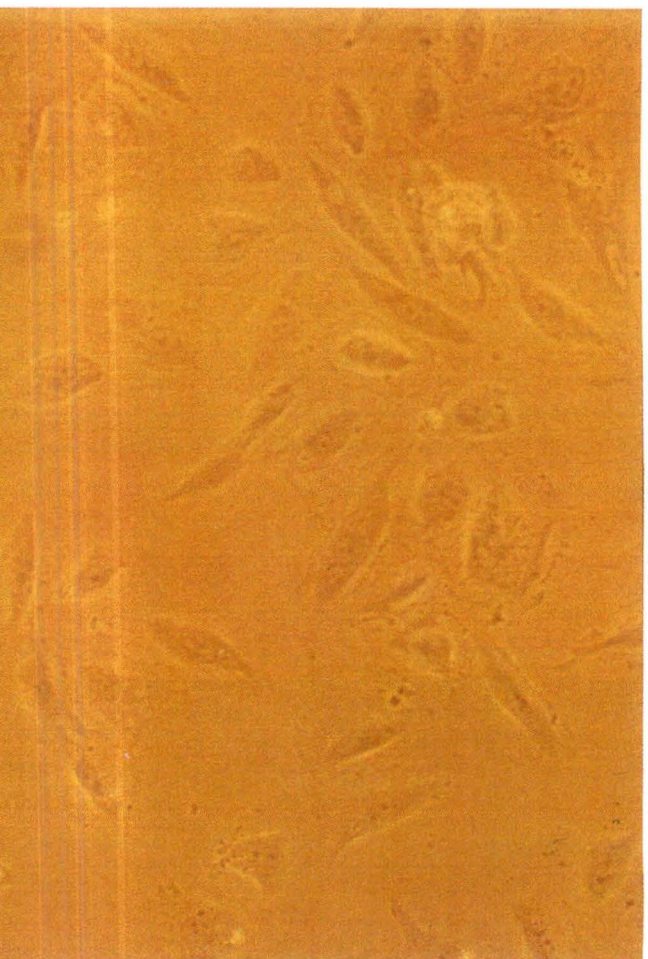




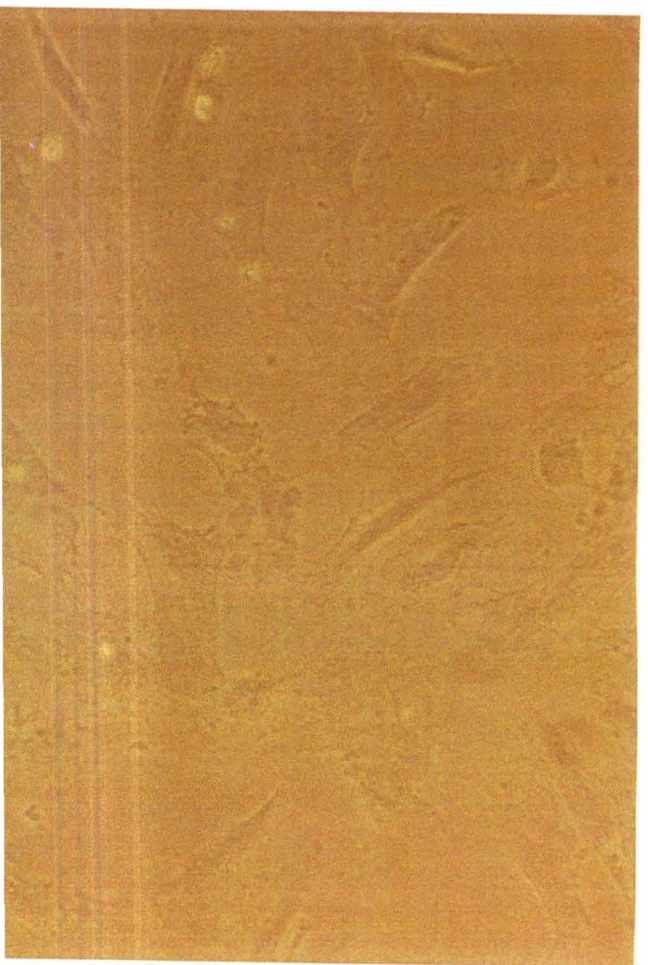
D1



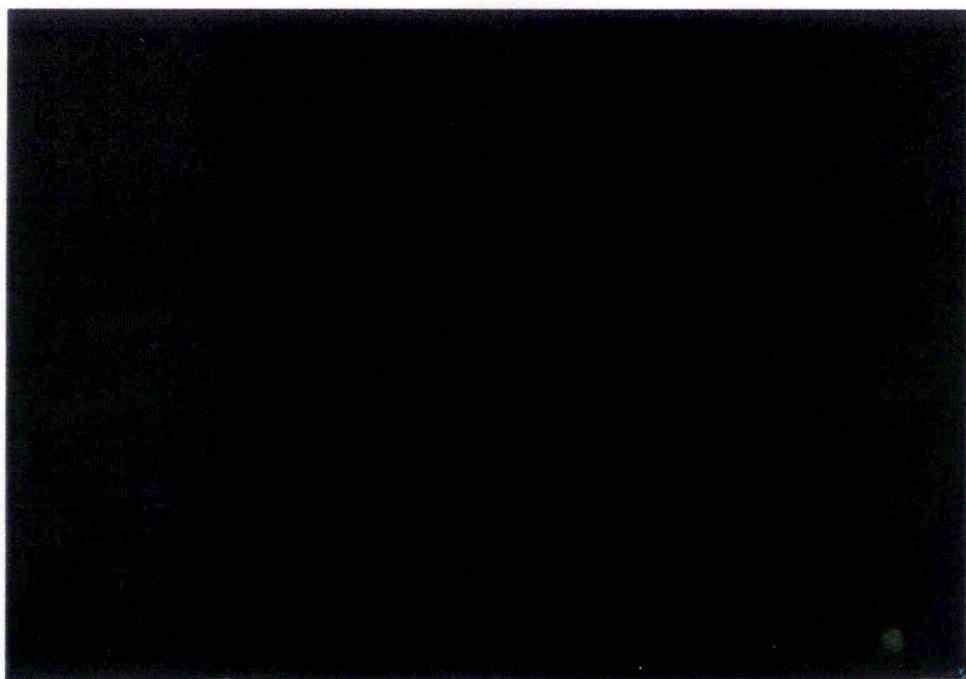
H1



D2



H2



normoxie (A-D₂) et pendant la première heure d'incubation sous hypoxie (E-F₂). Pour des durées plus longues d'hypoxie, les cellules semblent dégénérer lentement et quelques protubérances sont visibles après 2 heures (H₂). Il est à remarquer que cette altération de la morphologie n'est d'habitude pas observée lors d'une incubation de 2 heures sous hypoxie en absence de dextran-fluorescéine. Une légère toxicité de ce produit accentuée par l'hypoxie serait donc responsable de cette observation.

En ce qui concerne l'entrée du dextran-fluorescéine dans les cellules, on observe une entrée progressive de cette molécule dans les cellules au cours du temps d'exposition en normoxie (A-D₁) et sous hypoxie (E-G₁) sans noter de différence entre ces deux conditions tout au moins jusqu'à 90 minutes d'incubation. Après 2 heures d'hypoxie, les cellules deviennent beaucoup plus fluorescentes, ce qui signifie qu'elles ont incorporé ou fixés plus de dextran-fluorescéine que les cellules incubées 120 minutes en normoxie. Cependant, cette fluorescence est surtout associée à la présence de protubérance à la surface des cellules et ce serait donc plutôt le signe d'une toxicité.

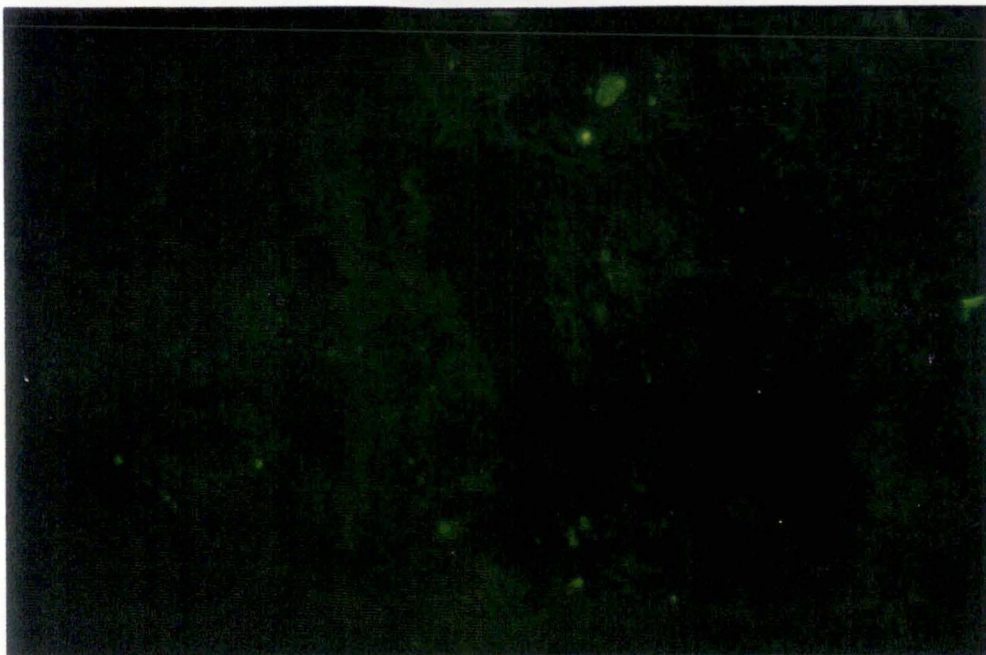
b. Entrée du dextran-fluorescéine de 147 800 Da

Une expérience similaire a été réalisée en présence de dextran-fluorescéine de poids moléculaires élevé.

Les résultats de cette expérience sont présentés sous forme de photographies à la figure III.24. Comme dans le cas précédent, des photographies en contraste de phase ont également été prises pour chaque plage cellulaire en plus des photographies en microscopie à fluorescence.

En normoxie, on peut observer une accumulation de vacuoles dans le cytoplasme des cellules au cours du temps sans, semble-t-il, induire de mortalité cellulaire (Figure III.24 A-D₂). Comme ces vacuoles ne sont pas fluorescentes, on peut proposer que ce seraient des vacuoles d'endocytose où la fluorescéine serait clivée de la molécule de dextran, cette dernière

A1



E1



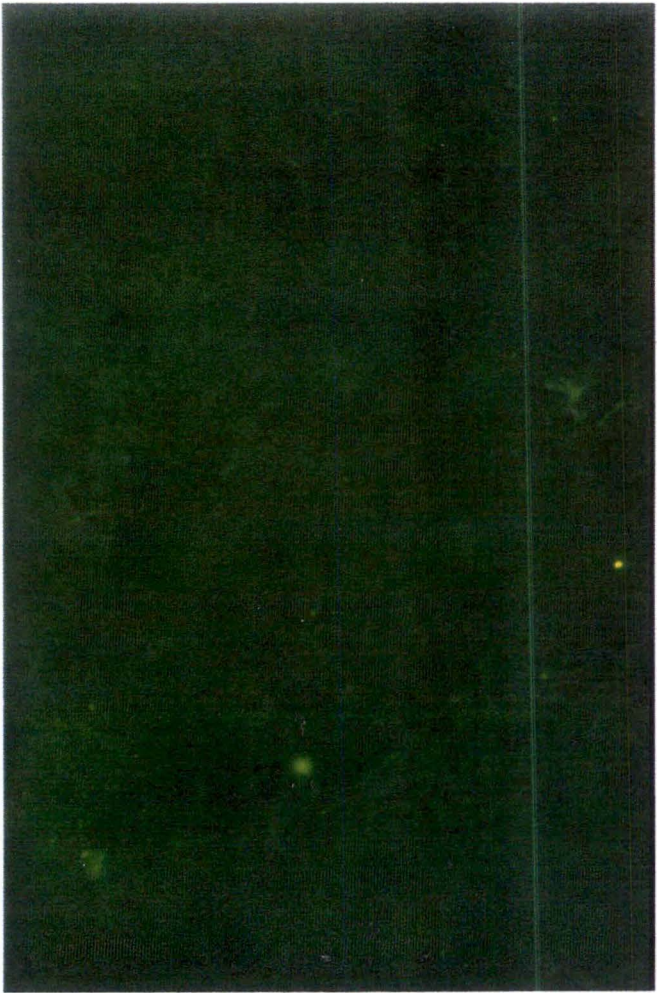
A2



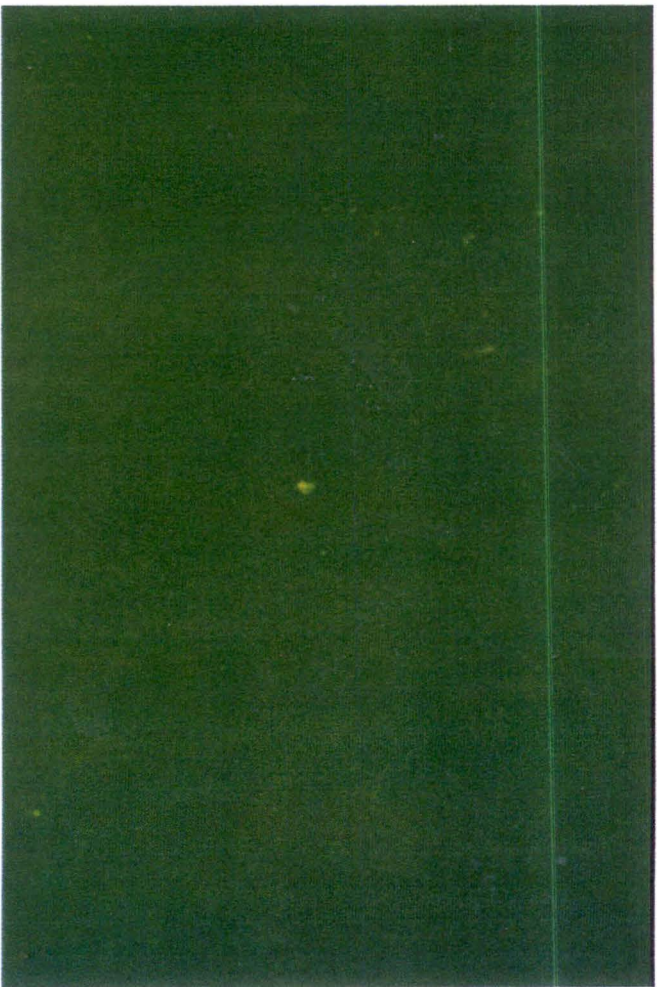
E2



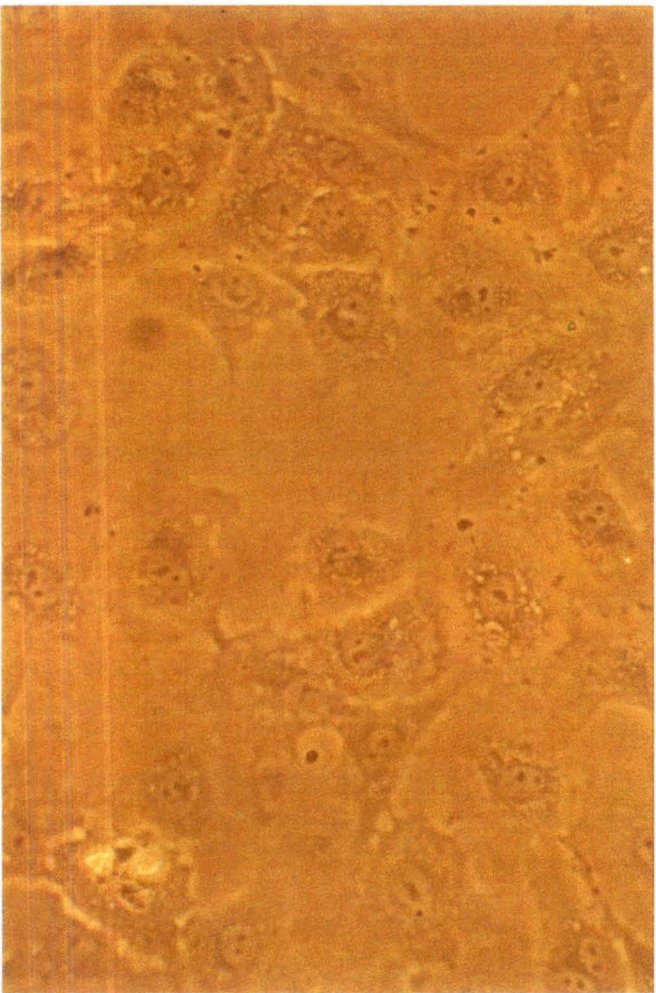
Figure III.24 : Photographies en microscopie à fluorescence (1) et à contraste de phase (2) de cellules endothéliales incubées en présence de dextran-fluorescéine de poids moléculaire élevé (147 800 Da) à 10 mg/ml 30, 60, 90 ou 120 minutes sous hypoxie (E, F, G, H) ou en normoxie (A, B, D) (grossissement = 460 X).



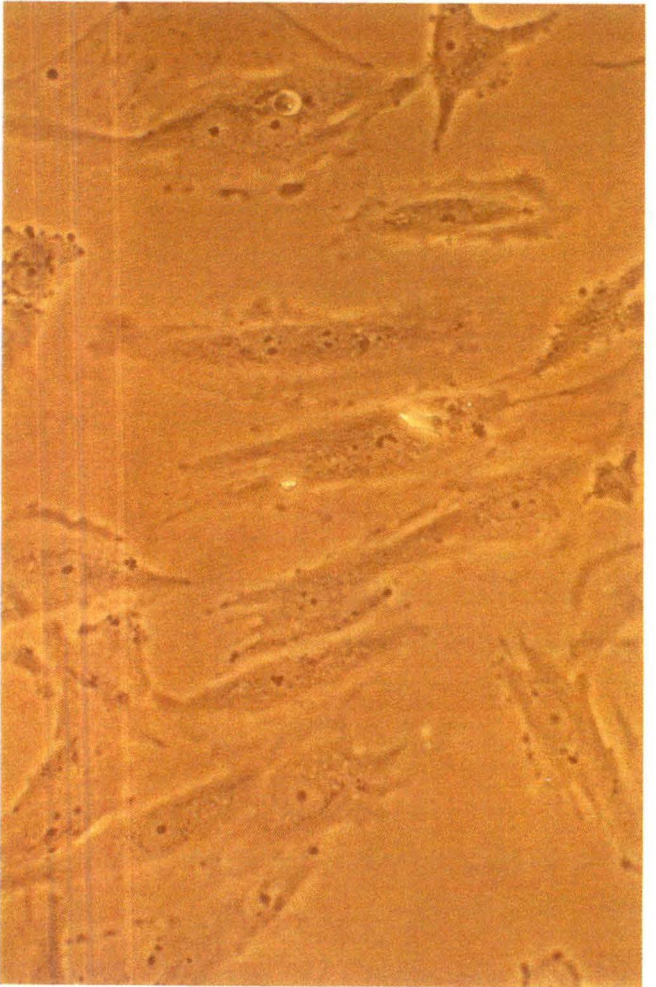
B1



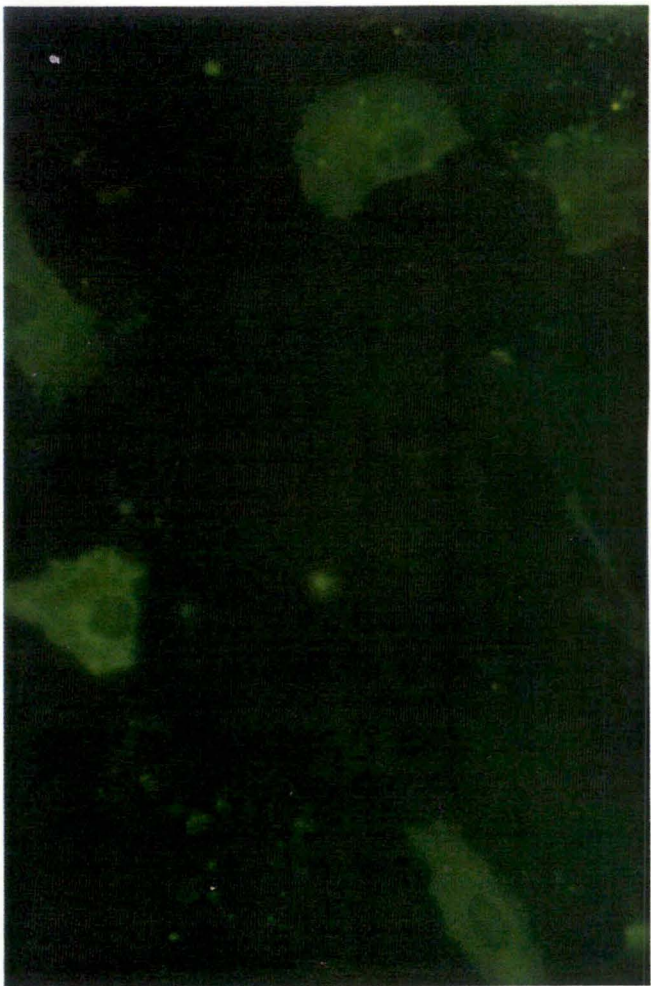
F1



B2



F2



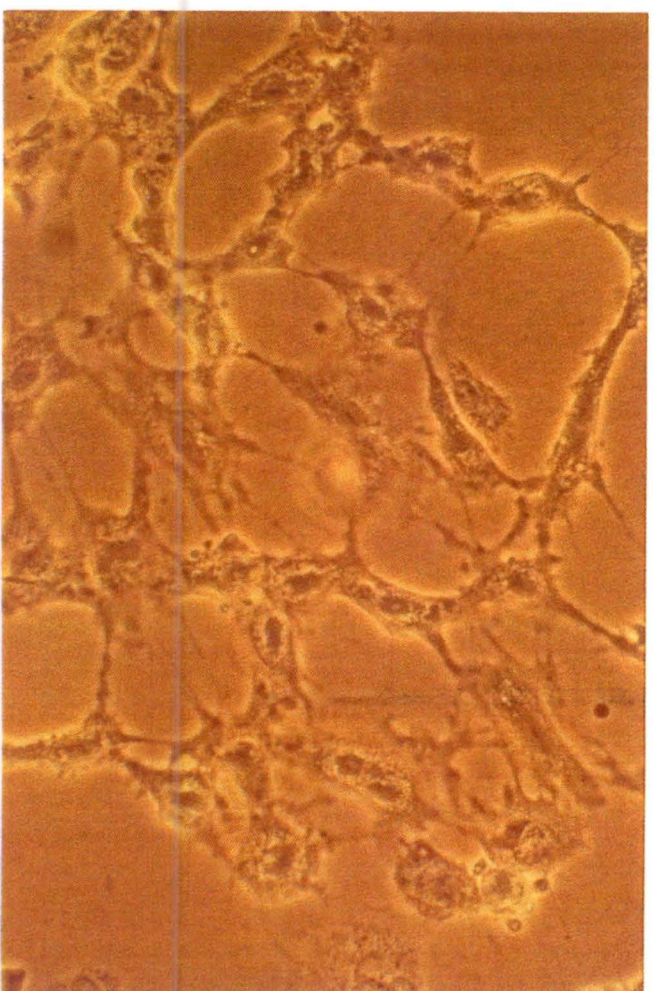
D1



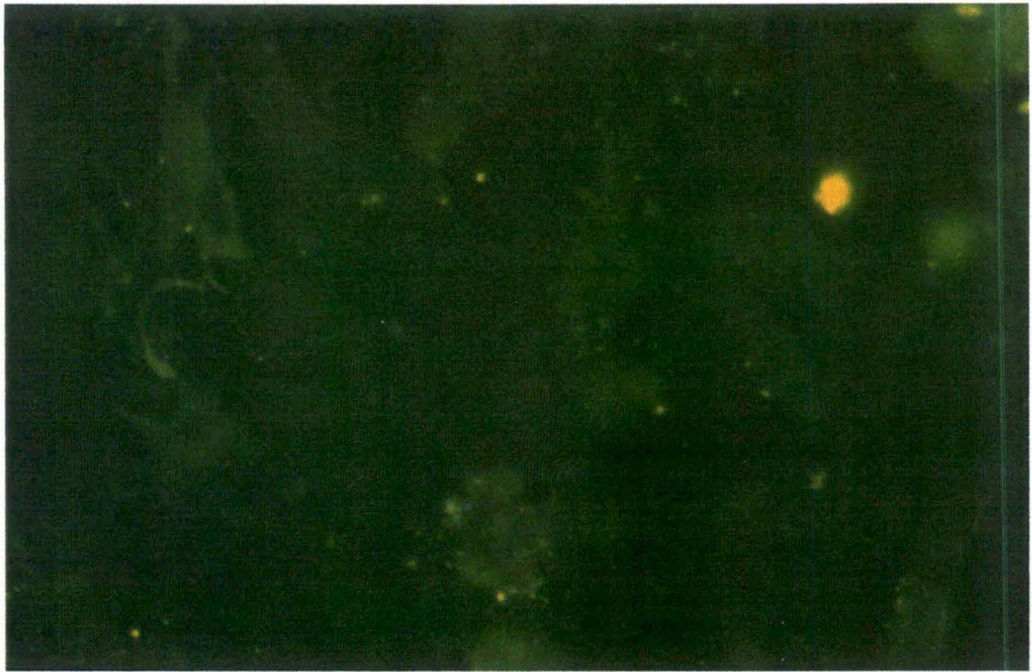
H1



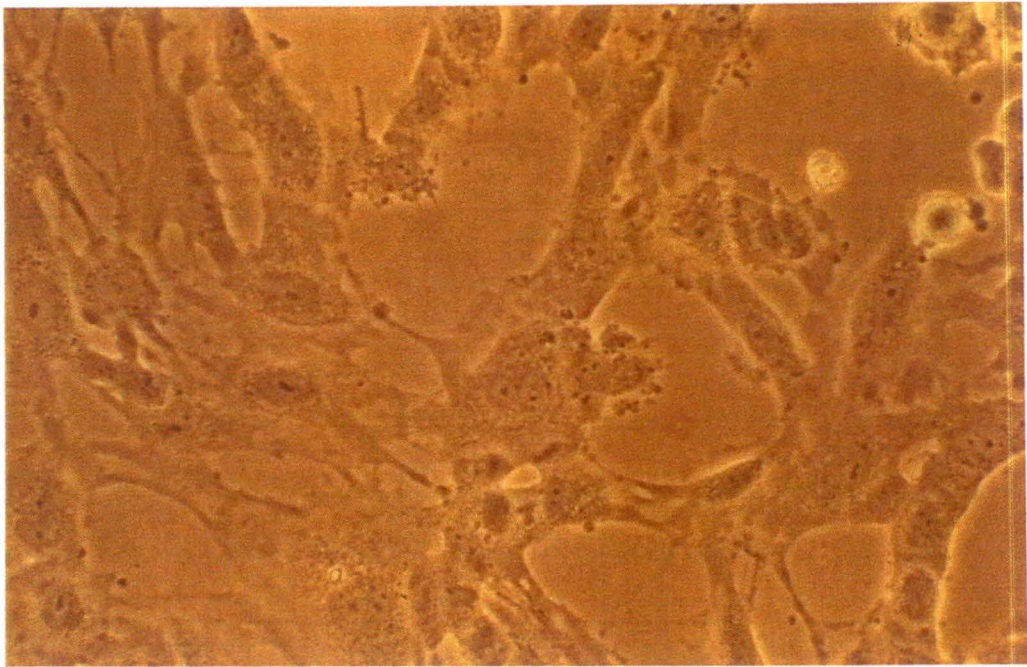
D2



H2



G1



G2

s'accumule dans ces vacuoles, observées en contraste de phase alors que la fluorescéine libre diffuse en dehors de la cellule.

En hypoxie, une accumulation de vacuoles semblent s'initier après 30 minutes (E₂) mais sans s'intensifier au cours des temps plus long d'hypoxie. Par contre, pour les incubations plus longues, une toxicité importante est observée conduisant à une proportion importante de cellules mortes après 2 heures (H₂). Les cellules vivantes ne deviennent pas fluorescentes, ce qui signifie que ce dextran-fluorescéine n'entre pas dans le cytoplasme à travers des pores dans la membrane plasmique au cours de l'hypoxie. Par contre, de plus en plus de cellules sont fortement marquées mais en comparant avec la photo en contraste de phase, on remarque que cela correspond à des cellules mortes dans lesquelles le dextran-fluorescéine s'adsorberait.

En conclusion, les expériences réalisées en présence de dextran fluorescéine de petit ou de haut poids moléculaire et en dépit de la toxicité liée à ce type de molécule, ne nous ont pas permis de mettre en évidence l'augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique des cellules endothéliales incubées sous hypoxie. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus dans les expériences précédentes.

I.1.3. Discussion

Le mécanisme de la libération du bFGF par les cellules endothéliales en général et sous hypoxie en particulier n'est pas connu. Cependant, de nombreux travaux ont montré qu'il pourrait être libéré suite à une blessure ou à un stress qui induirait une altération de la perméabilité de la membrane plasmique.

Mc Neil et ses chercheurs (1989) ont montré qu'une blessure cellulaire sublétalement induite par blessure mécanique pouvait être un moyen pour les cellules endothéliales en culture de libérer le bFGF.

Galloway et ses collaborateurs (1984) rapportent que le taux de bFGF libérés par les tissus du myocarde est en corrélation positive avec le taux de créatine phosphate, une enzyme couramment utilisée pour suivre les dommages cellulaires.

Brooks *et al.* (1991) ont montré que la libération du bFGF coïncide avec une diminution du nombre de cellules au sein de la monocouche, une augmentation de la concentration en LDH dans le milieu et une augmentation des cellules et des débris cellulaires dans le milieu, ce qui suggère que les dommages cellulaires et la lyse sont responsables de la libération de facteurs de croissance.

Muthukrishnan et son équipe (1991) ont montré que des cellules endothéliales altérées par "scraping", qui mime l'altération de la membrane plasmique dont souffrent les cellules *in vivo* lors d'une augmentation des forces de cisaillement, libèrent des facteurs de croissance. Dans ces conditions, 41 % du bFGF total sont libérés. Ils ont également mesuré la libération de la LDH par les cellules et ont ainsi montré une libération

sélective du bFGF par rapport à la libération de la LDH par les cellules endommagées (Muthukrishnan *et al.*, 1991).

Au vu de ces données de la littérature, nous nous sommes demandés si une altération de la perméabilité de la membrane plasmique des cellules endothéliales incubées sous hypoxie pourrait aussi expliquer la libération de bFGF dans ce cas. Pour ce faire, nous avons suivi la sortie de la LDH, du ^{51}Cr et de l'ATP hors de la cellule endothéliale incubée sous hypoxie ainsi que l'entrée du trypan bleu et du dextran-fluorescéine de petit poids moléculaire et de poids moléculaire élevé dans les mêmes conditions. Le ^{51}Cr et la LDH sont des molécules souvent dosées dans l'étude des changements de la perméabilité membranaire, cependant ils indiquent la sortie d'éléments cytoplasmiques de poids moléculaire élevé. Nous avons également mesuré la libération d'ATP, qui est une toute petite molécule. Ces différentes expériences ne nous ont pas permis de mettre en évidence le relargage accru de l'une ou l'autre de ces molécules par les cellules endothéliales pendant l'hypoxie. De plus, les études suivant l'entrée de molécules de poids moléculaires différents ne nous ont pas non plus indiqué la présence de pores dans la membrane plasmique comme le suggèrent Benzaquen *et al.* (1994), pour expliquer la sortie du bFGF à partir de cellules endothéliales traitées avec le complexe C5b-9 du complément.

Au vu de tous ces résultats, nous pouvons conclure qu'il n'y a pas de modification de la perméabilité membranaire des cellules endothéliales soumises à une hypoxie par rapport aux cellules maintenues en normoxie.

Le bFGF ne serait donc pas libéré des cellules endothéliales incubées sous hypoxie par de petits pores dans la membrane plasmique.

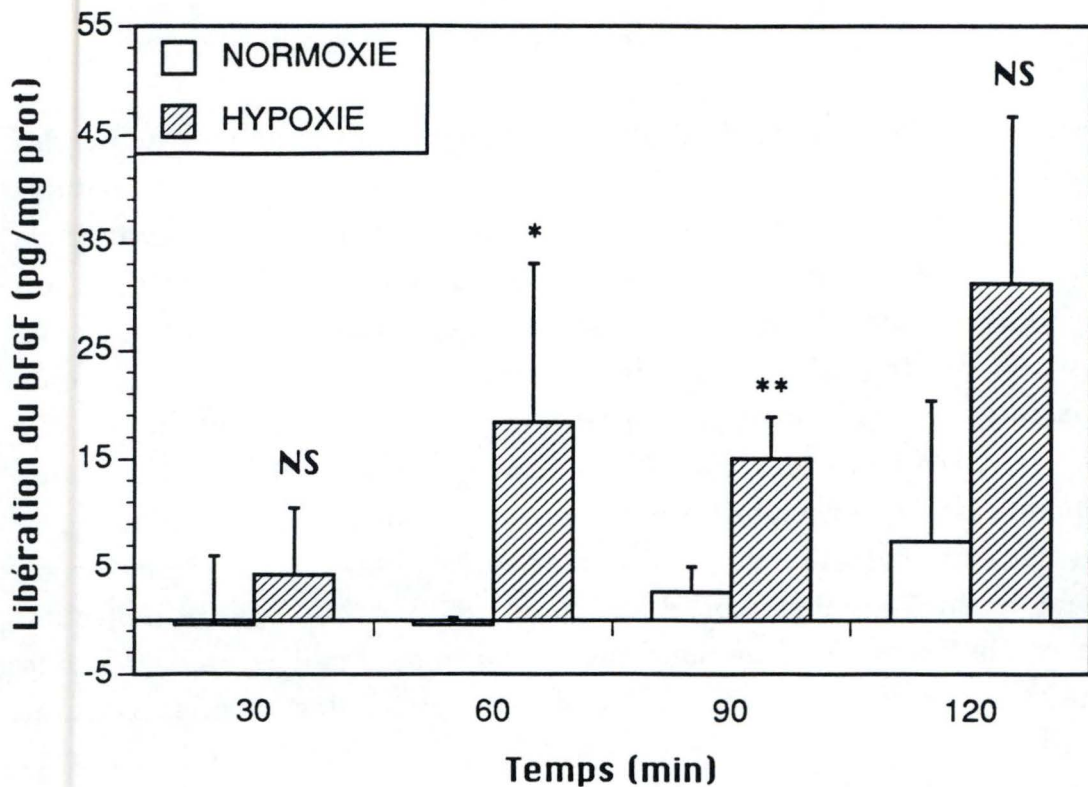


Figure III.25 : Évolution de la libération du bFGF par les cellules endothéliales incubées 30, 60, 90 ou 120 minutes sous hypoxie ou en normoxie. Le bFGF est dosé dans le milieu d'incubation ou à l'aide d'un ÉLISA. Les résultats sont exprimés en pg/mg de protéines en tant que moyennes \pm un écart-type pour $n = 3$.

* = significativement différent du contrôle normoxique correspondant avec $P < 0,05$.

** = significativement différent du contrôle normoxique correspondant avec $P < 0,01$.

NS = non significativement différent du contrôle normoxique correspondant

II.2. ÉTUDE DU MÉCANISME DE LIBÉRATION DU bFGF SOUS HYPOXIE

Afin d'essayer d'éclaircir le mécanisme par lequel le bFGF sort de la cellule endothéliale pendant l'hypoxie, nous avons dans un premier temps mesuré de manière précise la libération du bFGF sous hypoxie en le dosant à l'aide d'un ELISA. Ensuite, nous avons tenté de comprendre le mécanisme de libération du bFGF à l'aide d'inhibiteurs spécifiques de différentes voies métaboliques. Enfin, nous avons voulu savoir quelle était la localisation précise du bFGF dans les cellules endothéliales. Pour ce faire, nous avons utilisé les techniques d'immunofluorescence et de fractionnement subcellulaire.

II.2.1. Mesure de la libération du bFGF sous hypoxie par les cellules endothéliales

Il nous fallait premièrement quantifier de manière précise la libération du bFGF par les cellules endothéliales incubées sous hypoxie.

Nous avons donc mesuré dans le milieu d'incubation des cellules endothéliales incubées pendant 30, 60, 90 ou 120 minutes sous hypoxie ou en normoxie la quantité de bFGF libérée à l'aide d'un ELISA.

L'expérience a été réalisée à deux reprises et les résultats sont présentés aux figures III.25 et III.26. Nous observons en général une libération de bFGF très faible en normoxie, et ce quelque soit le temps d'incubation. Par ailleurs, cette libération est significativement plus élevée lorsque les cellules sont incubées 90 ou 120 minutes sous hypoxie. Après 120 minutes sous hypoxie, la quantité de bFGF libérée par les cellules endothéliales varie d'une expérience à l'autre de 30 pg/mg de protéines à 60 pg/mg de protéines. Une telle variation entre expérience est probablement due au fait que les cellules proviennent de cultures issues de cordons

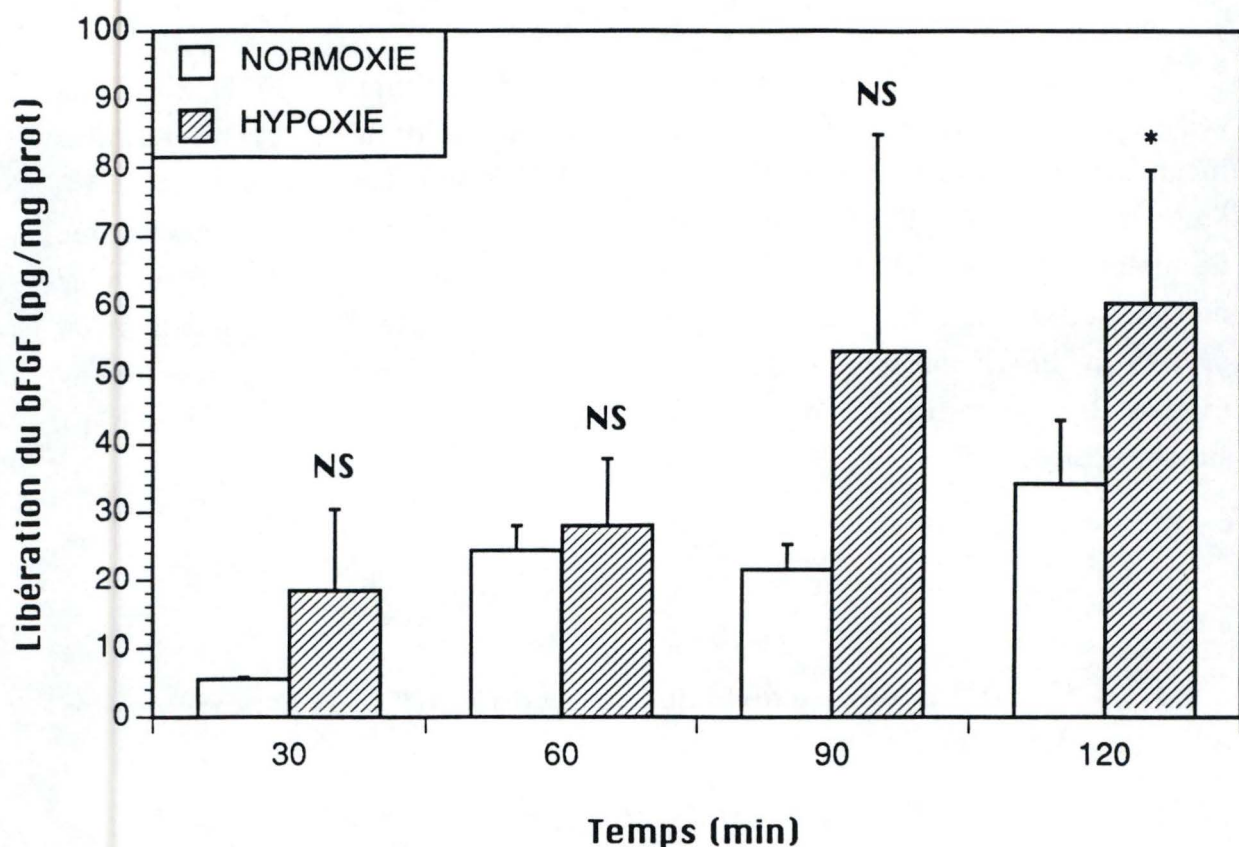


Figure III.26 : Évolution de la libération du bFGF par les cellules endothéliales incubées 30, 60, 90 ou 120 minutes sous hypoxie ou en normoxie. Le bFGF est dosé dans le milieu d'incubation ou à l'aide d'un ÉLISA. Les résultats sont exprimés en pg/mg de protéines en tant que moyennes \pm un écart-type pour $n = 3$.

* = significativement différent du contrôle normoxique correspondant avec $P < 0,05$.

NS = non significativement différent du contrôle normoxique correspondant

ombilicaux différents et elle a déjà été observée pour la synthèse des prostaglandines (Michiels *et al.*, 1993b).

Les résultats montrent donc bien que l'hypoxie induit la libération de bFGF par les cellules endothéliales après 2 heures d'hypoxie.

II. 2.2. Première approche pour l'étude du mécanisme de libération du bFGF : utilisation d'inhibiteurs

Étant donné que nous savons très peu de choses sur la façon dont les cellules endothéliales libèrent le bFGF suite à un stress comme l'hypoxie mais que cela ne semble pas dû à une altération de la perméabilité de la membrane plasmique, nous avons choisi une série de molécules à action inhibitrice sur différentes voies métaboliques et étudié leur effet sur la libération du bFGF par les cellules endothéliales pendant une incubation de 120 minutes sous hypoxie.

A la lumière des résultats présentés à la figure III.27, nous allons présenter chaque molécule et essayer d'expliquer les résultats obtenus.

Nous observons avant toute chose que l'effet de l'hypoxie après 120 minutes d'incubation entraîne une augmentation significative de 265 % de la libération du bFGF par rapport à une incubation de 120 minutes en normoxie.

La première molécule utilisée est la **cycloheximide**. Elle a été utilisée à une concentration de $5 \cdot 10^{-5}$ M. Cette molécule inhibe la synthèse protéique *de novo*. Elle a été préincubée pendant 4 heures en présence des cellules endothéliales avant la mise sous hypoxie pour éviter la présence de cette molécule dans le milieu d'incubation pendant l'hypoxie. Dans ces conditions et pendant les 2 heures d'hypoxie, on observe une inhibition de 93 % de la synthèse protéique (Michiels *et al.*, 1994). Nous observons que son action n'a pas d'effet sur la libération du bFGF pendant l'hypoxie. Ce résultat signifie que la synthèse protéique *de novo* n'est pas nécessaire et donc que le bFGF est sans doute déjà présent dans la cellule avant l'hypoxie qui ne provoque donc que sa libération et pas sa néosynthèse.

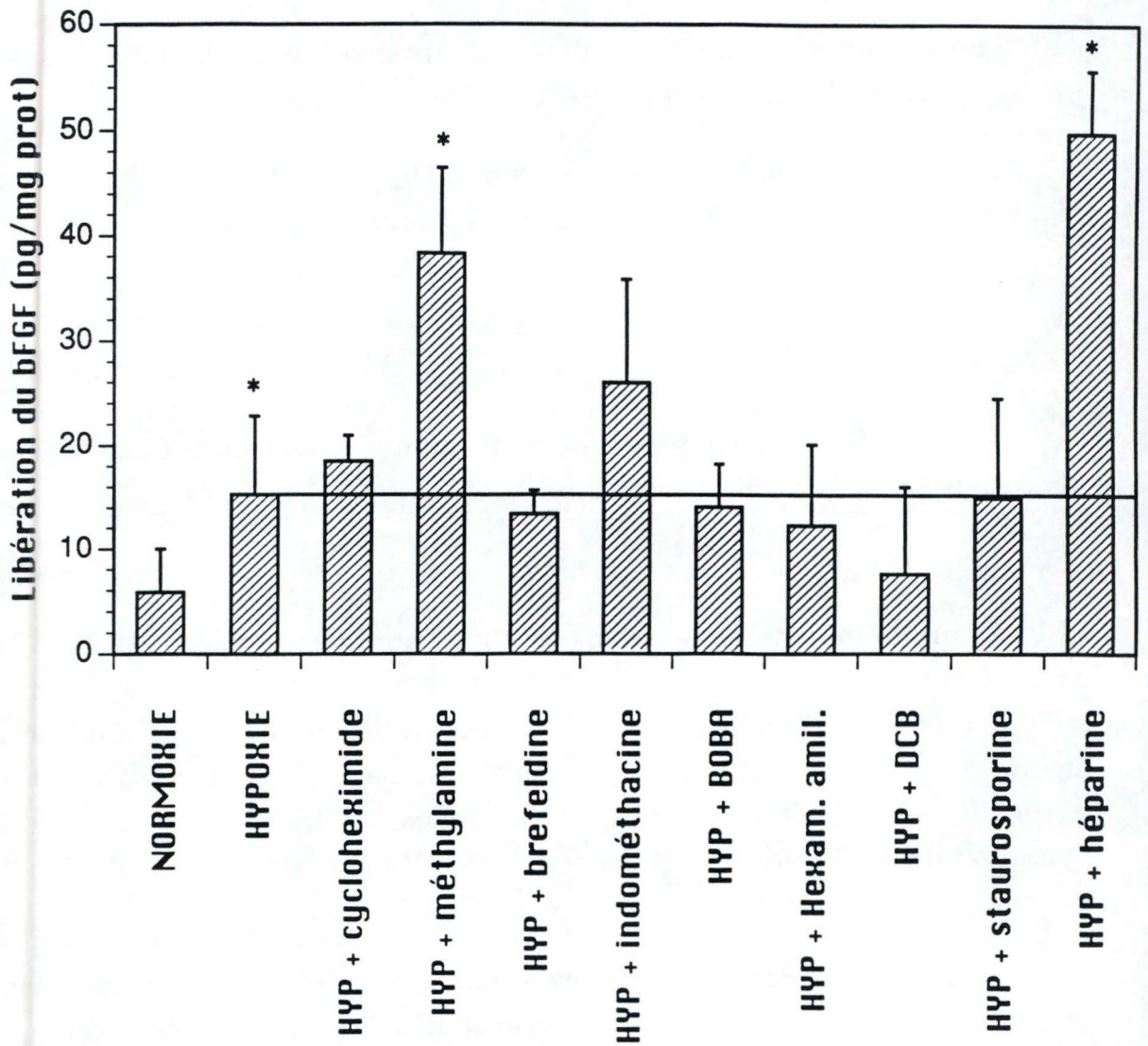


Figure III.27 : Évolution de la libération du bFGF par les cellules endothéliales incubées 30, 60, 90 ou 120 minutes sous hypoxie ou en normoxie en présence de différentes molécules inhibitrices. Le bFGF est dosé dans le milieu d'incubation à l'aide d'un ÉLISA. Les résultats sont exprimés en pg/mg de protéines en tant que moyennes \pm un écart-type pour $n = 3$.

(*) = significativement différent du contrôle normoxique correspondant avec $P < 0,05$.

*** = significativement différent des cellules incubées sous hypoxie sans molécule inhibitrice avec $P < 0,001$.

* = significativement différent des cellules incubées sous hypoxie sans molécule inhibitrice avec $P < 0,05$.

La seconde molécule utilisée est la **méthylamine** à une concentration de 10 mM. La méthylamine est une molécule lysosomotrope et inhibe l'endocytose et l'exocytose (Lindsted *et al.*, 1993). Si une inhibition était obtenue avec cette molécule, nous aurions pu penser qu'un mécanisme d'exocytose du bFGF serait impliqué. Les résultats observés sont inattendus puisque nous observons une augmentation de 250 % par rapport à la libération du bFGF après 120 minutes d'incubation sous hypoxie. Cependant, après l'hypoxie, une observation de la morphologie des cellules au microscope a révélé que les cellules étaient très abîmées sans doute suite à une toxicité du produit à cause d'une concentration trop élevée, de l'hypoxie ou des deux événements conjugués. L'augmentation importante de la libération du bFGF par les cellules endothéliales pourrait donc être due à une mortalité cellulaire importante et ne nous permet pas de tirer de conclusion sur l'effet de cette molécule.

La troisième molécule utilisée est la **bréfeldine A** à une concentration de 20 µg/ml. Cette molécule inhibe le passage des protéines contenant un peptide-signal du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi, elle inhibe donc l'exocytose de ces protéines (Tsai *et al.*, 1993). Les résultats montrent que la molécule n'a pas d'effet sur la libération du bFGF sous hypoxie ce qui est consistant avec le fait que le bFGF ne possède pas de peptide-signal.

La quatrième molécule utilisée est l'**indométhacine** à une concentration de 10^{-5} M. A cette concentration, l'indométhacine inhibe totalement la synthèse des prostaglandines par les cellules endothéliales sous hypoxie (Michiels *et al.*, 1993b). Nous observons une augmentation de la libération du bFGF sous hypoxie avec cette molécule. Nous n'avons pas d'explication à cette observation étant donné qu'aucun lien connu n'existe entre la synthèse des prostaglandines et la libération du bFGF.

La cinquième molécule utilisée est le **β-hydroxybutyrate** à une concentration de 10^{-4} M. Cette molécule inhibe la diminution de la concentration en ATP dans les cellules endothéliales soumise à l'hypoxie et la cascade d'activation qui en découle (Arnould *et al.*, 1992). Nous n'observons aucun effet de cette molécule sur la libération du bFGF, ce qui nous ferait penser que l'activation de la cellule endothéliale n'est pas impliquée dans ce processus.

La sixième molécule utilisée est l'**hexaméthylène amiloride**, un inhibiteur spécifique de la pompe Na^+/H^+ de la membrane plasmique. Nous avons utilisé cette molécule à une concentration de $10\ \mu\text{M}$ puisque nous avons montré qu'à cette concentration, cette molécule inhibe l'augmentation de la $[\text{Ca}^{++}]_i$ induite par l'hypoxie. Nous n'observons aucun effet de la molécule sur la libération du bFGF suite au stress hypoxique.

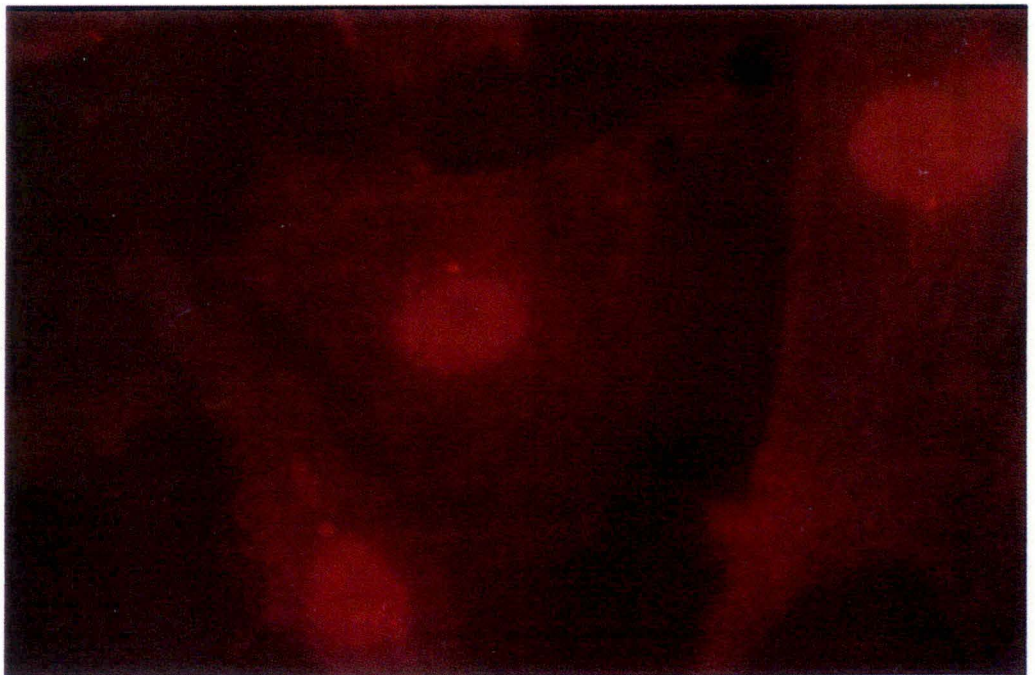
La septième molécule, le **dichlorobenzamil**, est une molécule à action inhibitrice spécifique sur la pompe $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ de la membrane plasmique. Elle est utilisée à une concentration de $1\ \mu\text{M}$, concentration efficace pour inhiber l'augmentation de la $[\text{Ca}^{++}]_i$ induite par l'hypoxie. Nous observons une diminution de 50 % de la libération du bFGF suite à l'action de cette molécule, ce qui nous ferait penser que les flux de calcium au niveau de la membrane.

La huitième molécule utilisée est la **staurosporine**. Cette molécule inhibe la protéine kinase C. Elle a été utilisée à une concentration de $10^{-7}\ \text{M}$. Nous n'observons pas de changement au niveau de la libération du bFGF, ce qui semble indiquer que les phosphorylations dépendant de la phosphorylase C ne seraient pas impliquées dans le processus de libération du bFGF.

La neuvième et dernière molécule utilisée est l'**héparine**. L'héparine est utilisée pour laver les cellules avant l'incubation sous hypoxie qui est alors réalisée avec une solution ne contenant pas d'héparine. L'héparine a une forte affinité pour le bFGF. Ce lavage permet ainsi d'éliminer le bFGF qui serait associé à la membrane et à la matrice extracellulaire et donc de détecter si le bFGF libéré provient bien de l'intérieur de la cellule. Nous avons utilisé cette molécule à une concentration de $100\ \mu\text{g/ml}$. Nous observons que l'héparine induit une augmentation très forte de la libération du bFGF suite à l'hypoxie. L'hypothèse que nous pouvons présenter à la vue de ces observations est la suivante : l'héparine par sa forte affinité pour le bFGF lave le bFGF qui est associé à la matrice extracellulaire. La cellule libérerait peut-être par la suite du bFGF en surface par un mécanisme de compensation ce qui expliquerait pourquoi on obtient une libération si élevée de bFGF après 120 minutes d'incubation sous hypoxie dans ces conditions.



A



B

Figure III.28 : Photographies en microscopie à fluorescence d'un marquage immunofluorescent du bFGF dans les cellules endothéliales en culture. Deux concentrations en anticorps primaires ont été utilisées : 10 (A) et 50 (B) $\mu\text{g/ml}$ (grossissement = 1150 X).

A la lueur de ces nombreuses observations, nous en savons un petit peu plus sur la façon dont la cellule endothéliale sous hypoxie libère le bFGF. Certaines molécules comme le dichlorobenzamil semblent montrer un lien avec le mécanisme déjà étudié d'augmentation de la concentration du calcium sous hypoxie. Cependant, les résultats obtenus avec le β -hydroxybutyrate et l'hexaméthylène amiloride semblent indiquer le contraire. Nous confirmons cependant que le bFGF est bien présent dans la cellule avant le stress qui ne provoque que sa libération et non pas sa synthèse de plus le bFGF ne passe pas par le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi vu son absence de peptide-signal. Nous apprenons également que les phosphorylations ne sont pas impliquées.

II.2.3. Seconde approche pour l'étude du mécanisme de libération du bFGF : localisation du bFGF dans la cellule

Afin de compléter l'étude du mécanisme de libération du bFGF par les cellules endothéliales pendant l'hypoxie, il était important de connaître la localisation subcellulaire de ce facteur de croissance dans les cellules endothéliales et si cette localisation pouvait être affectée par l'hypoxie. Deux approches ont été envisagées : l'immunofluorescence et le fractionnement subcellulaire.

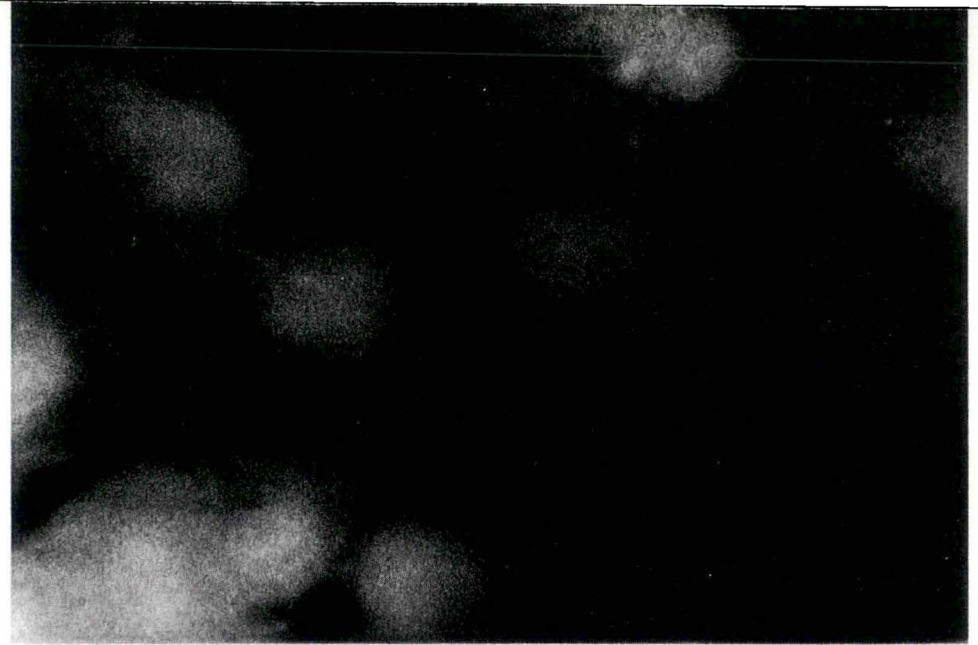
a. L'immunofluorescence

Nous avons d'abord voulu localiser le bFGF dans la cellule endothéliale, en utilisant la technique d'immunofluorescence.

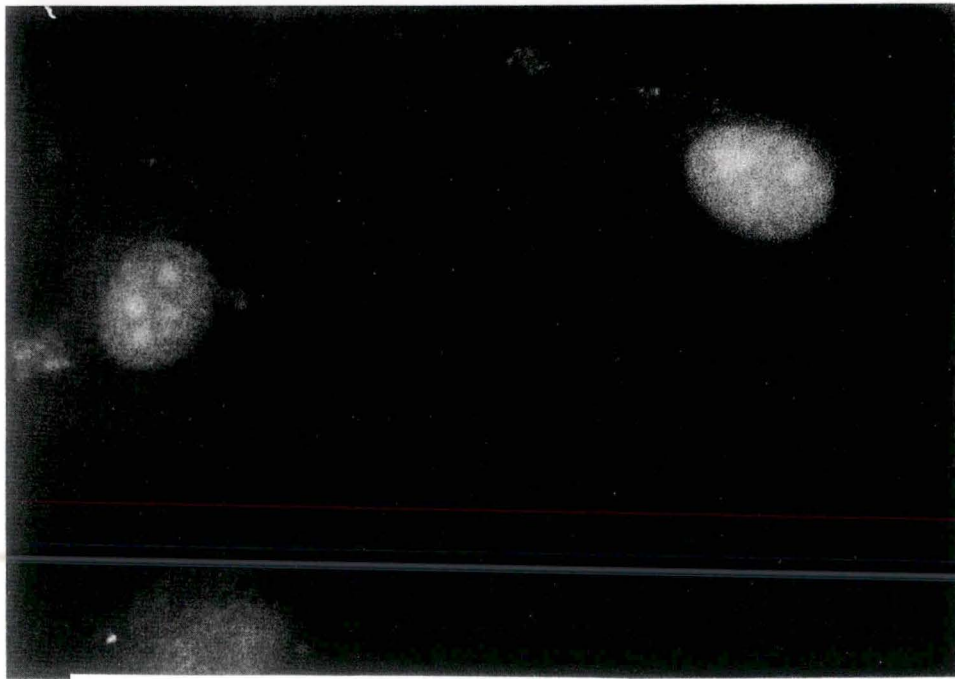
Nous avons tout d'abord mis au point cette technique pour le bFGF. Dans un premier temps, nous avons testé deux méthodes différentes de fixation et de perméabilisation des cellules endothéliales. D'une part, la fixation-perméabilisation au méthanol, d'autre part, la fixation à la paraformaldéhyde (PFA) suivie d'une perméabilisation au Triton X-100. La



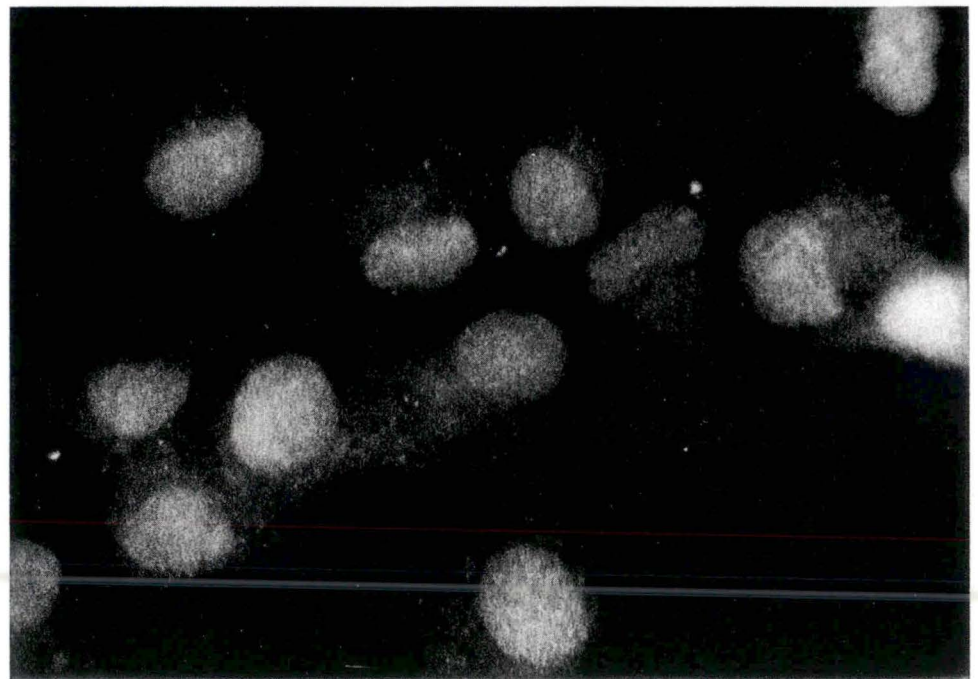
A



E

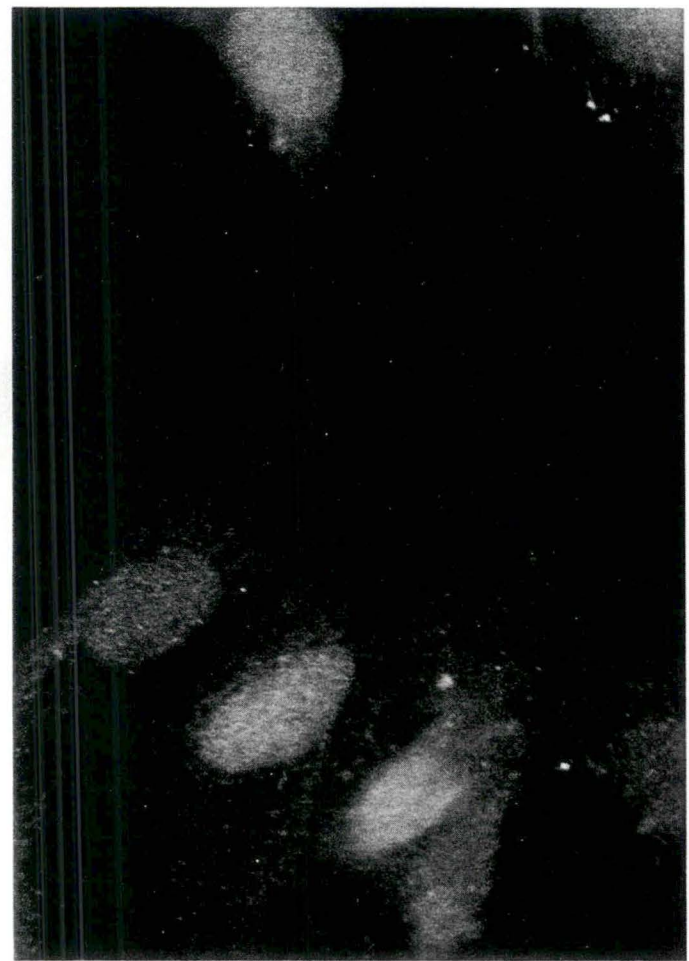
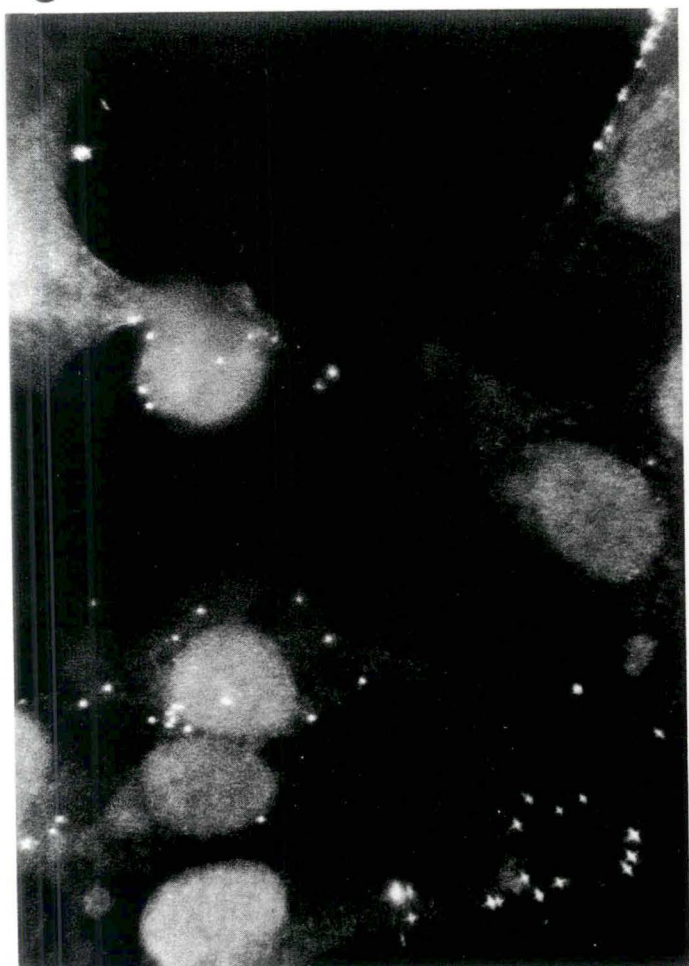
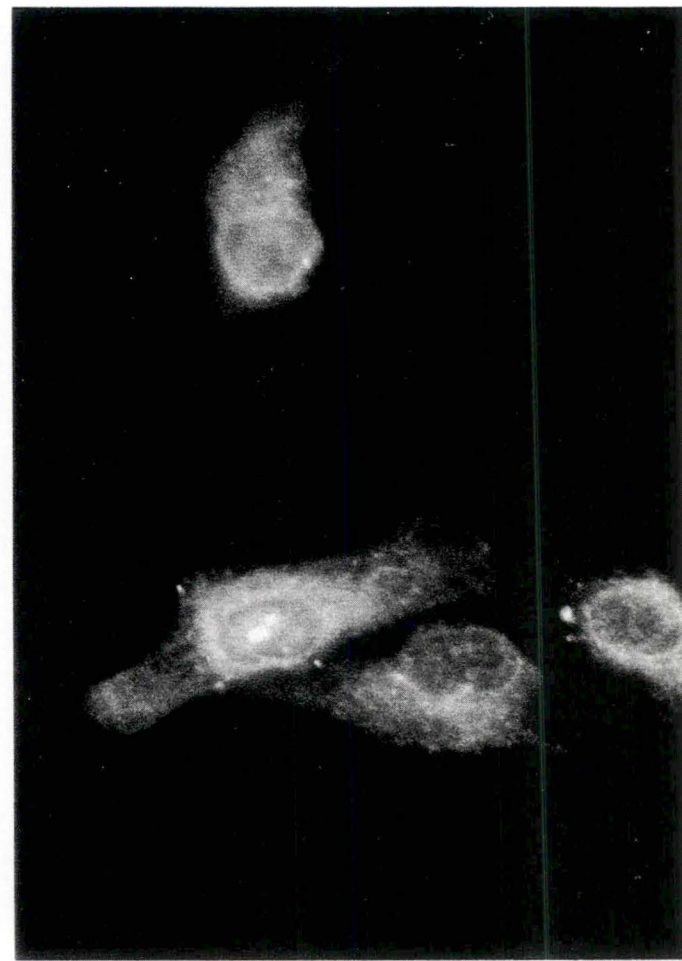
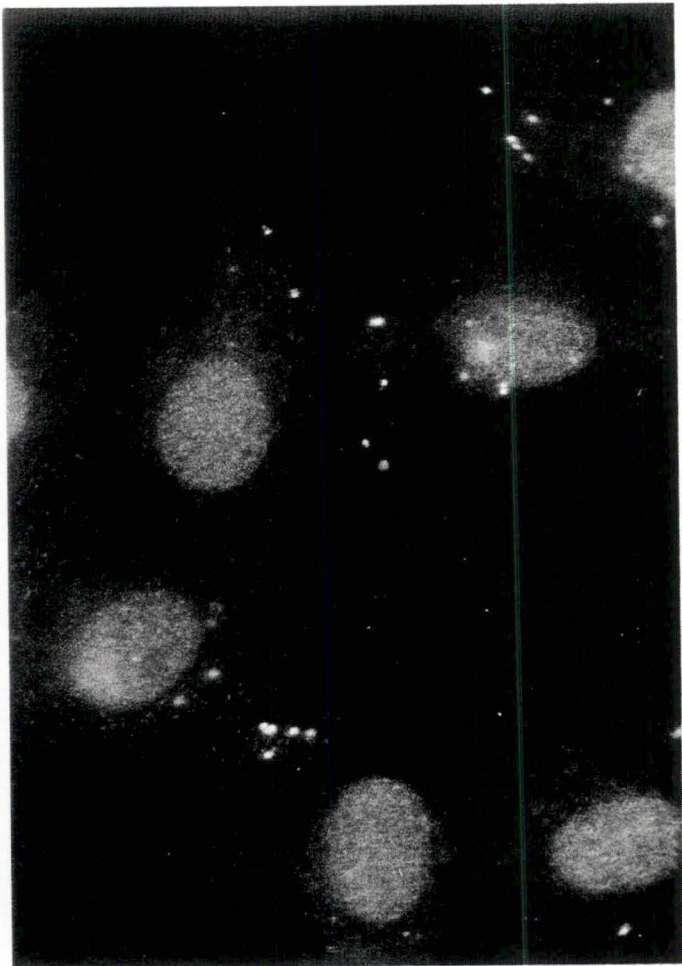


B



F

Figure III.29 : Photographies en microscopie à fluorescence d'un marquage immunofluorescent du bFGF dans des cellules endothéliales incubées 30, 60, 90 ou 120 minutes sous hypoxie (E, F, G, H) ou en normoxie (A, B, C, D). Un contrôle négatif a également été réalisé en absence d'anticorps primaire (I) (grossissement = 1150 X).

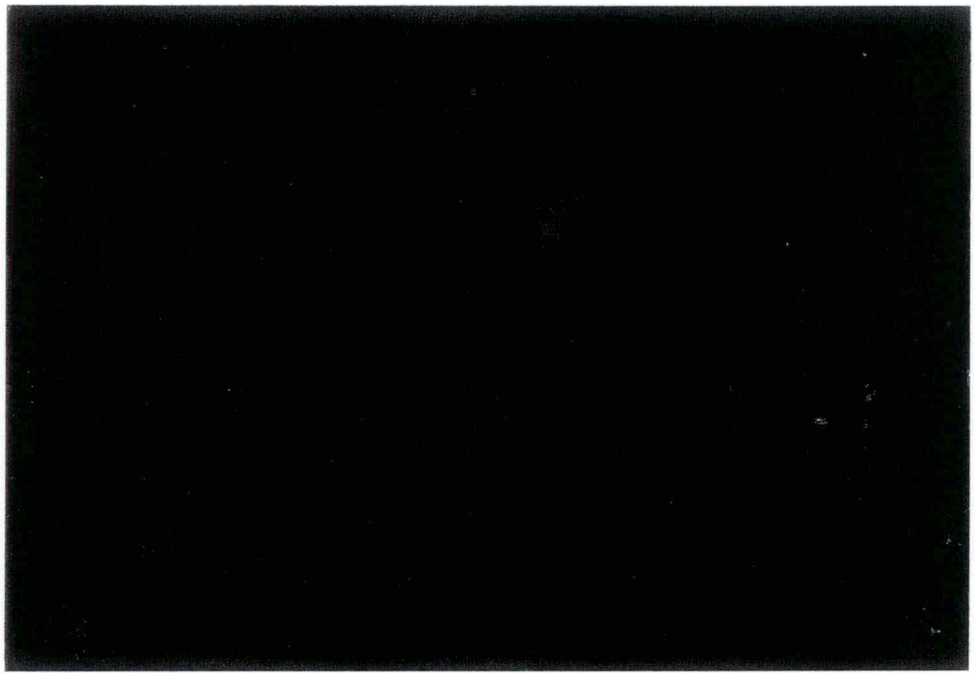


C

G

D

H



I

première méthode utilisant le méthanol était préconisée par Healy et Herman (1992) afin d'éviter une redistribution artéfactuelle du bFGF pendant la fixation des cellules. Cependant, nous n'avons obtenu aucun marquage positif avec cette méthode. Par contre, une fixation à la paraformaldéhyde suivie d'une perméabilisation au Triton X-100 nous a permis de mettre en évidence le bFGF dans les cellules endothéliales.

Dans un second temps, nous avons essayé plusieurs concentrations en anticorps primaires avec la deuxième méthode de fixation-perméabilisation afin d'améliorer le marquage obtenu.

La figure III.28 présente des photographies obtenues pour des concentrations en anticorps primaires de 10 $\mu\text{g/ml}$ et de 50 $\mu\text{g/ml}$. Nous observons que le marquage est meilleur avec une concentration de 50 $\mu\text{g/ml}$ en anticorps primaires mais pas encore parfait. Pour être sûrs d'obtenir un marquage optimal lors des expériences ultérieures, une concentration de 100 $\mu\text{g/ml}$ en anticorps primaires sera utilisée.

Une fois cette technique mise au point, nous avons suivi la localisation du bFGF après une incubation croissante sous hypoxie (30, 60, 90 ou 120 minutes) des cellules endothéliales. Les contrôles en normoxie ont été réalisés pour des temps identiques. La figure III.29 présente les photographies montrant les résultats obtenus. Le marquage est bien spécifique puisque le contrôle négatif réalisé en absence d'anticorps primaires reste noir. Nous observons un marquage intense au niveau du noyau et également un marquage granulaire dans le cytoplasme, ce qui fait penser à des petites vésicules. Aucun marquage homogène dans le cytosol n'est mis en évidence et nous n'observons pas de variation dans la localisation du marquage en fonction d'une durée croissante d'incubation sous hypoxie.

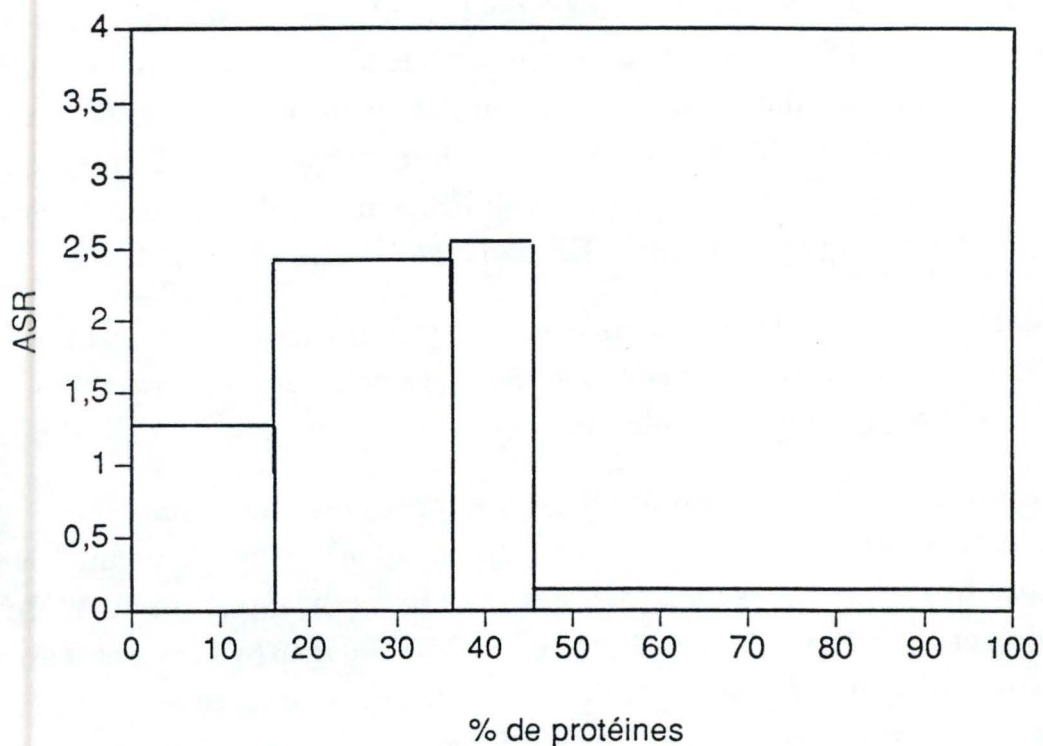


Figure III.30 : Distribution de la NADH cytochrome réductase dans différentes fractions d'un fractionnement différentiel des cellules endothéliales.

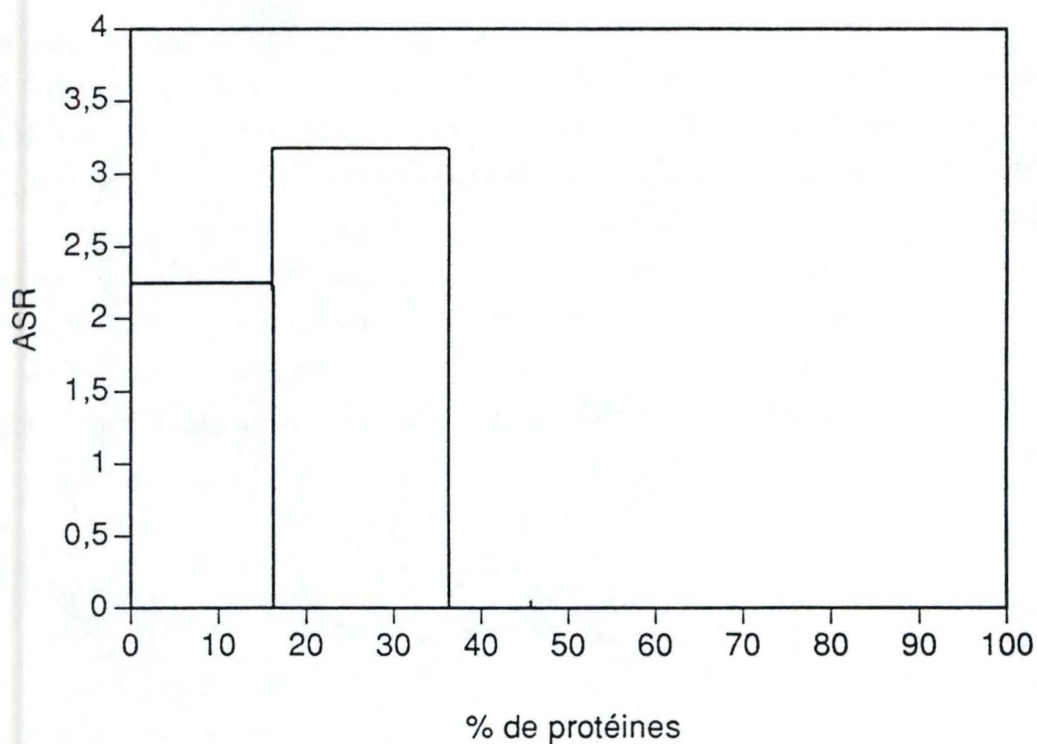


Figure III.31 : Distribution de la cytochrome oxydase dans différentes fractions d'un fractionnement différentiel des cellules endothéliales.

b. Le fractionnement

Nous avons réalisé un fractionnement par centrifugation différentielle de ces cellules afin de préciser la localisation du bFGF dans les cellules endothéliales.

Après le fractionnement, six enzymes marqueurs, en plus de l'ADN, ont été dosées dans les différentes fractions. Les différentes fractions sont :

- **la fraction N** qui contient principalement le noyau et les cellules restantes.
- **la fraction ML** enrichie par les mitochondries et les lysosomes.
- **la fraction P** qui comprend des petite vésicules de la membrane plasmique, du réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et les peroxyosomes.
- **la fraction S** qui contient essentiellement le cytoplasme et les ribosomes.

Chaque enzyme marqueur est spécifique d'un et parfois de deux organites particuliers, il a donc un profil particulier. Après avoir dosé le bFGF, nous obtenons le profil de localisation du bFGF dans la cellule endothéliale que nous pouvons comparer avec les différents profils des enzymes marqueurs et ainsi déterminer la localisation exacte du bFGF dans la cellule endothéliale.

Les enzymes marqueurs utilisées sont les suivantes :

- **la NADH cytochrome C réductase** est une enzyme de référence du réticulum endoplasmique. On en retrouve cependant une petite quantité dans la membrane mitochondriale externe. Nous l'avons retrouvée préférentiellement au sein des fractions N, ML et P. Aucune présence de cette enzyme n'est observée dans la fraction S (Figure III.30).

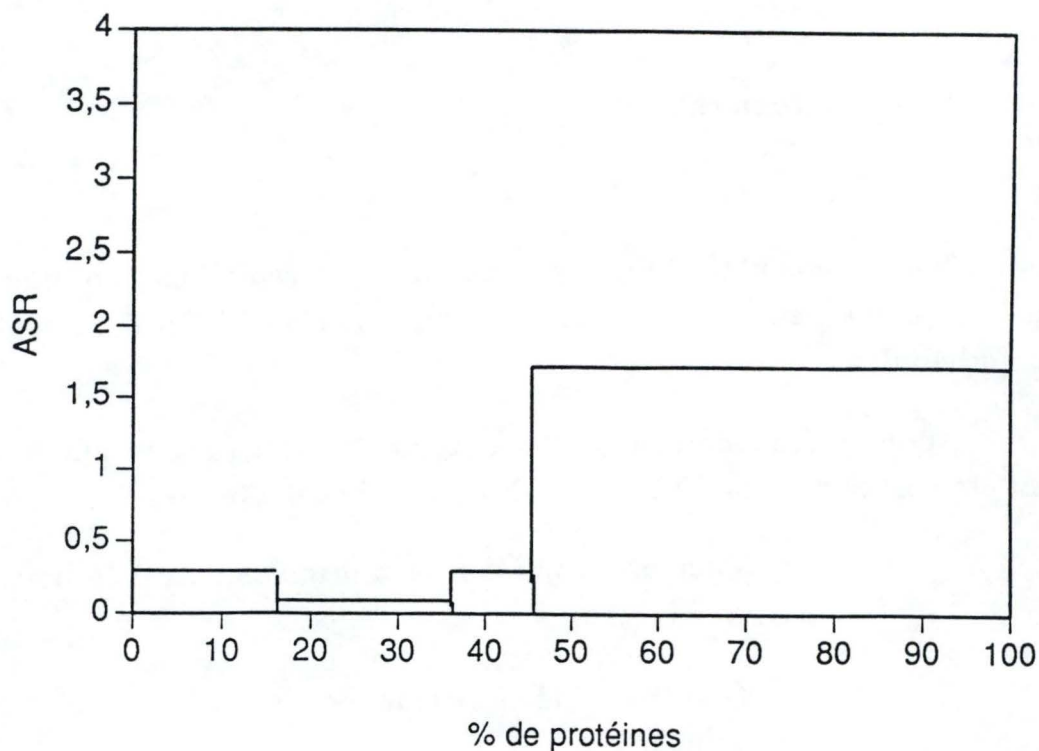


Figure III.32 : Distribution de la lactate déshydrogénase dans différentes fractions d'un fractionnement différentiel des cellules endothéliales.

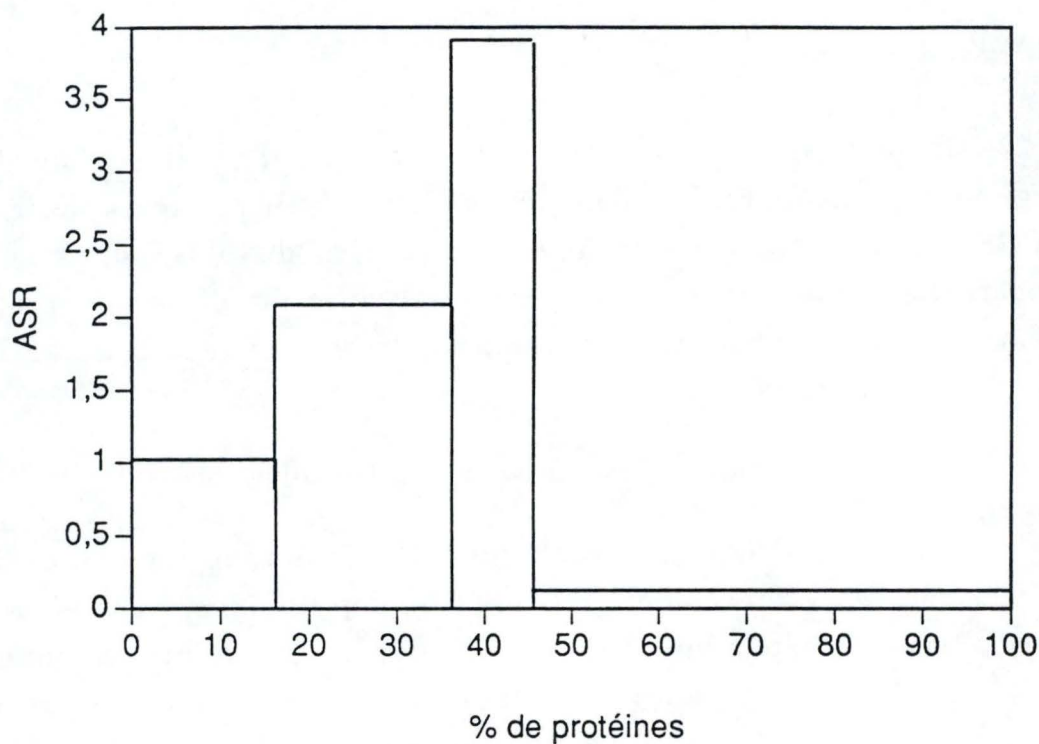


Figure III.33 : Distribution de la phosphodiesterase alcaline dans différentes fractions d'un fractionnement différentiel des cellules endothéliales.

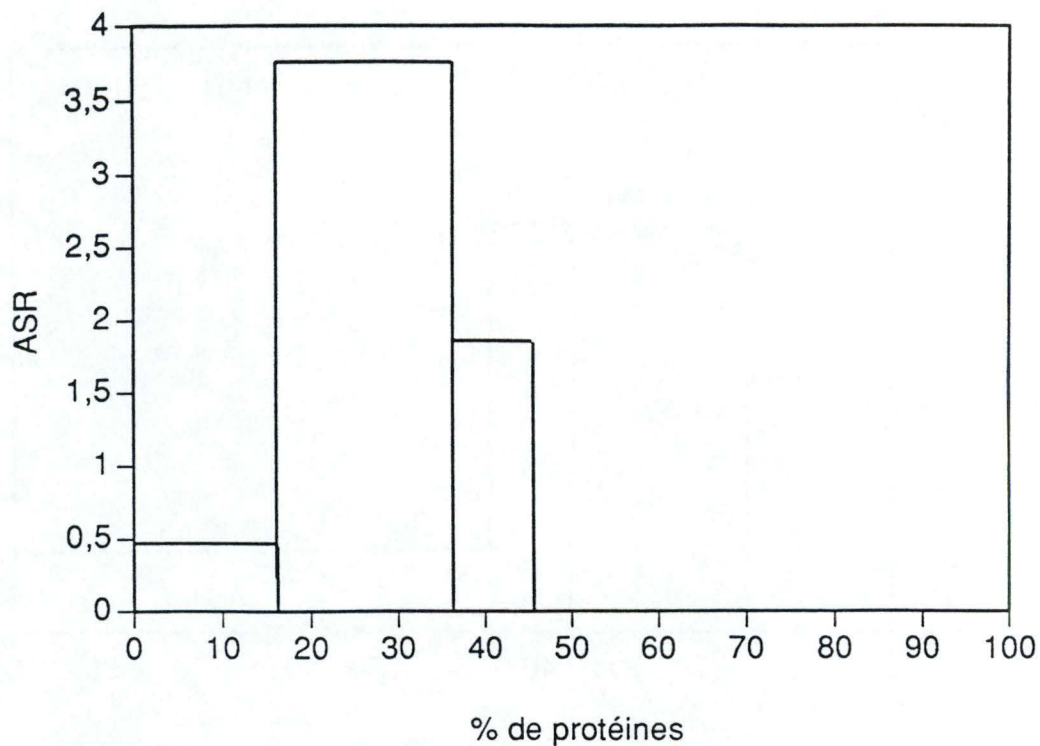


Figure III.34 : Distribution de la β -galactosidase dans différentes fractions d'un fractionnement différentiel des cellules endothéliales.

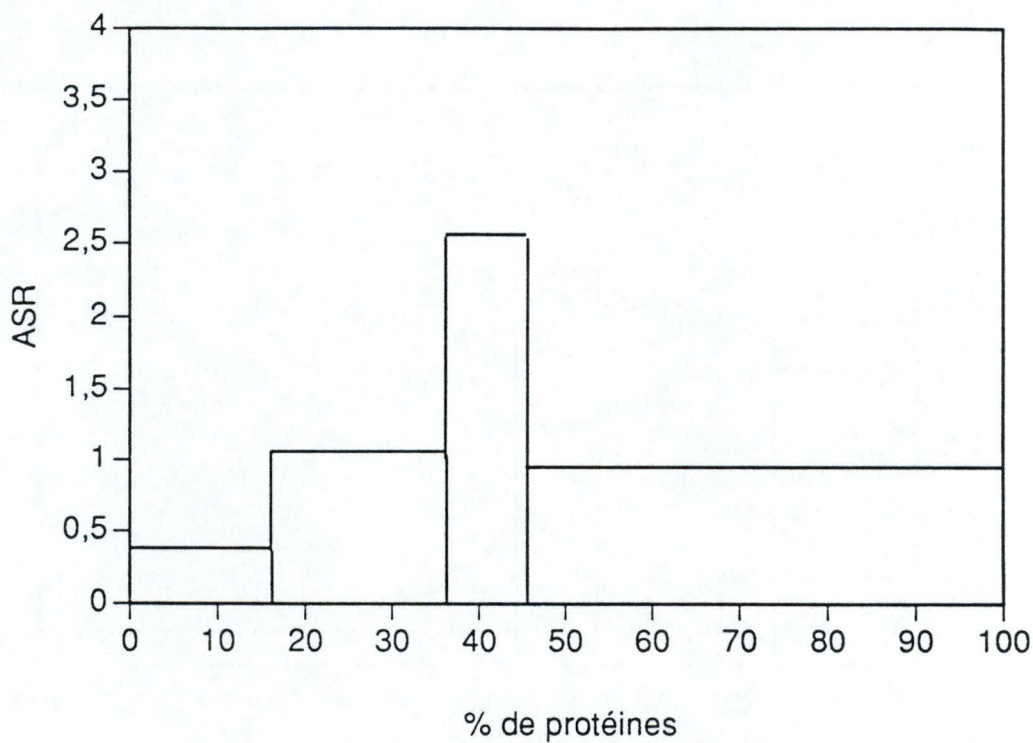


Figure III.35 : Distribution de la catalase dans différentes fractions d'un fractionnement différentiel des cellules endothéliales.

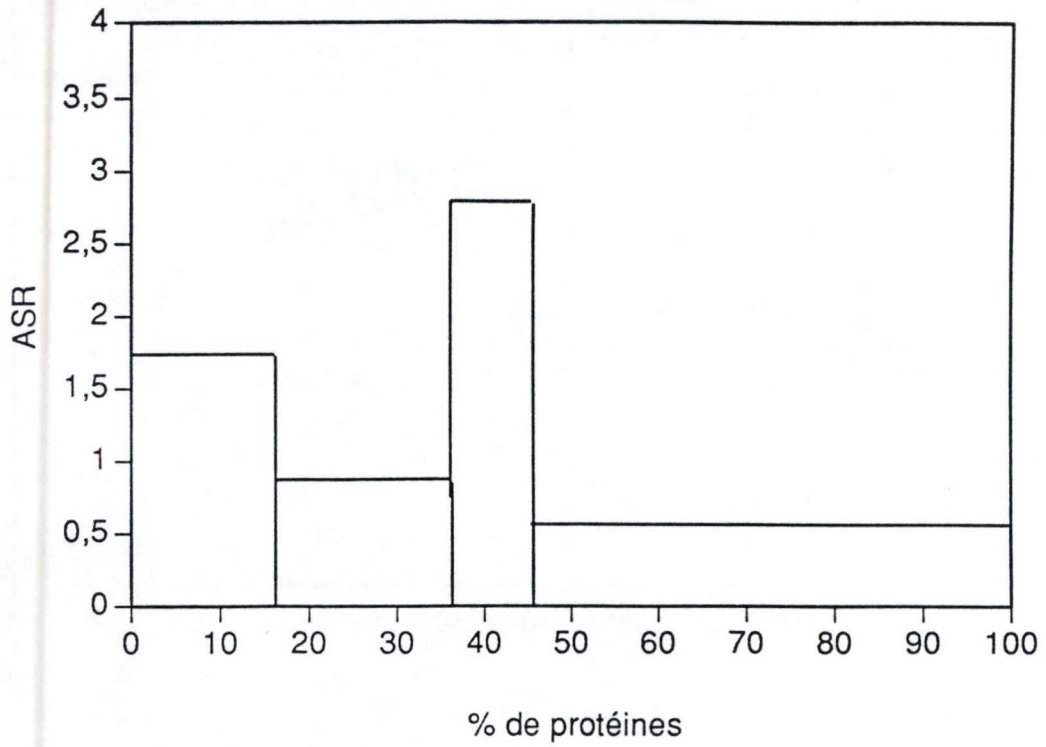


Figure III.36 : Distribution de l'ADN dans différentes fractions d'un fractionnement différentiel des cellules endothéliales.

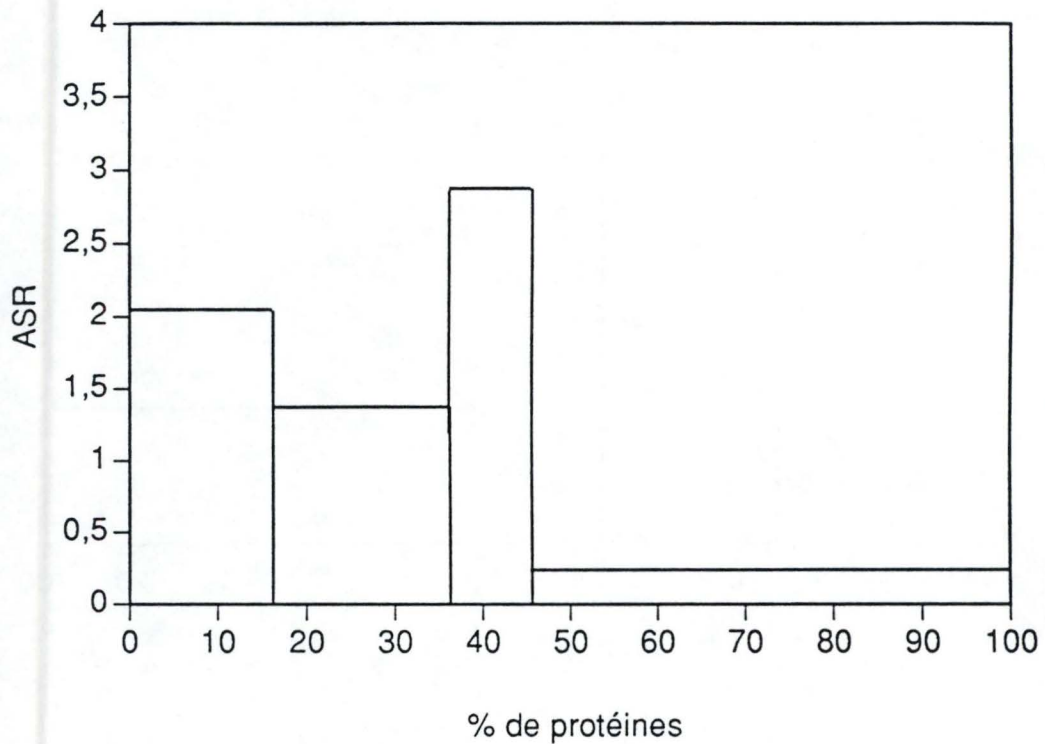


Figure III.37 : Distribution du bFGF dans différentes fractions d'un fractionnement différentiel des cellules endothéliales.

- la **cytochrome oxydase** est une enzyme de référence de la membrane interne des mitochondries. Nous observons qu'elle est localisée dans les fractions N et ML mais pas du tout dans les fractions P et S (Figure III.31).
- la **lactate déshydrogénase** est l'enzyme de référence pour localiser le cytoplasme. Nous la retrouvons au niveau de la fraction S (Figure III.32).
- la **phosphodiesterase alcaline** est l'enzyme de référence de la membrane plasmique. Nous remarquons qu'elle est fortement localisée dans la fraction P et moyennement dans les fractions N et ML (Figure III.33).
- la **β -galactosidase** est l'enzyme de référence des lysosomes C'est principalement dans la fraction ML et un peu dans la fraction P que nous l'avons retrouvée (Figure III.34).
- la **catalase** est l'enzyme de référence des peroxysomes. Nous voyons qu'elle est localisée dans la fraction P principalement avec une présence plus faible au sein des fractions ML et S (Figure III.35).

A la figure III.36 est présenté le profil de la localisation de l'ADN. Nous observons une présence importante d'ADN dans la fraction P, en plus de la localisation prépondérante dans les fractions N et ML.

Le tableau III.1 présente les pourcentages de récupération pour les différents marqueurs. Ils sont en général très acceptables sauf pour la cytochrome oxydase : le dosage n'était pas assez sensible pour la quantité de cellules utilisées et engendre donc des imprécisions.

Lorsque nous observons le profil de localisation du bFGF à la figure III.37, nous remarquons une grande similarité avec le profil de localisation de l'ADN dans les cellules endothéliales. Nous n'observons que très peu de bFGF au niveau du cytoplasme.

	Récupération (%)
Catalase	104 %
Phosphodiesterase alcaline	83 %
Lactate déshydrogénase	95 %
NADH cytochrome c réductase	67 %
β-galactosidase	69 %
Cytochrome oxydase	47,7 %
Protéines	102 %
DNA	90 %

Tableau III.1 : Pourcentage de récupération des différents marqueurs dosés dans les fractions obtenues après fractionnement différentiel des cellules endothéliales.

Face à ces résultats, deux explications quant à la localisation du bFGF sont possibles :

- Soit les noyaux ont été cassés lors de la récolte des cellules ou lors de l'homogénéisation, ce qui nous permettrait d'expliquer pourquoi nous observons tant d'ADN dans la fraction P. Le bFGF serait préférentiellement localisé dans le noyau et pourrait se retrouver dans la fraction P associé aux fragments d'ADN.
- Soit le bFGF se trouverait dans le noyau et dans de petites vésicules comme sembleraient l'indiquer les résultats obtenus par la technique d'immunofluorescence. On retrouve donc le bFGF au niveau de la fraction N et de la fraction P

II.2.4. Discussion

L'étude de la localisation du bFGF au sein de la cellules a fait l'objet de nombreuses recherches par de nombreuses équipes de chercheurs. Cependant, les conclusions ne semblent toujours pas décisives.

Zagzag *et al.* (1990) ont utilisé de l'antisérum de lapin dirigé contre le bFGF humain et montré la présence de bFGF à la fois dans les cellules endothéliales et les astrocytes néoplastiques des glioblastomes, dans les astrocytes tumoraux des astrocytomes, dans les capillaires adjacents aux tumeurs mais pas dans les capillaires éloignés ce qui suggère un rôle possible du bFGF dans la croissance des tumeurs et de l'angiogenèse des astrocytomes. Dans ces expériences, ils ont uniquement observé une immunoréactivité du bFGF au sein du cytoplasme. Cependant, d'autres équipes ont montré une présence de bFGF au niveau du noyau. L'absence de bFGF dans cet organe dans les expérience de Zagzag *et al.* peut être expliquée par une présence faible de bFGF au niveau du noyau, présence à la limite de détection immunochimique.

Yu *et al.* (1993) ont étudié la localisation immunohistochimique du bFGF dans l'artère coronaire bovine, le sinus coronaire et les cellules endothéliales du capillaire adrénal. Dans les cellules subconfluentes, l'immunoréactivité était localisée au niveau de la chromatine nucléaire, des nucléoles, du cytosol, des vésicules cytoplasmiques (certaines d'entre elles semblant fusionner avec la membrane plasmique) et de la matrice extracellulaire. Aucune réaction n'est observée au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi. Des cellules confluentes montrent moins d'immunoréactivité dans le noyau et dans le cytosol mais plus d'immunoréactivité au niveau de la matrice extracellulaire. Certaines cellules ayant une morphologie sénescence montrent uniquement un marquage cytoplasmique. Cependant, aucune cellule ne montre uniquement un marquage nucléaire. Ces données suggèrent que les cellules subconfluentes synthétisent le bFGF et le transportent dans le noyau et les vésicules d'exocytose alors que les cellules confluentes synthétisent peu de bFGF mais le stockent dans la matrice extracellulaire, les vésicules cytoplasmiques et le noyau.

Dell'Era *et al.* (1991) ont utilisé des anticorps dirigés contre le bFGF placentaire humain et montré une localisation du bFGF au sein du noyau et du cytoplasme dans les cellules endothéliales bovines en culture. Ils ont également quantifié le bFGF et montré que 25 à 30 % du bFGF total étaient localisés dans le noyau.

Cependant, Healy et Herman (1992) suggèrent que la localisation nucléaire du bFGF pourrait être un artéfact de fixation et que ce facteur de croissance s'accumulerait plutôt de façon continue dans la matrice extracellulaire.

Pour notre part, nous avons montré par la technique d'immunofluorescence la présence de bFGF de manière prédominante au niveau du noyau et également dans de petites vésicules dispersées au sein du cytoplasme. Ces résultats sont renforcés par la présence du bFGF dans les fractions N et P obtenues lors du fractionnement différentiel. Il semblerait donc que le bFGF serait localisé dans le noyau et dans des petites vésicules cytoplasmiques dans les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine en culture.

Le mécanisme de libération du bFGF par les cellules endothéliales a fait également l'objet d'une étude approfondie dans ce travail.

Comme nous l'avons déjà détaillé précédemment, une explication souvent fournie quant à la libération du bFGF serait une modification de la perméabilité membranaire des cellules qui le libèrent. En effet, la libération du bFGF a souvent été corrélée avec la libération de la LDH, de la créatine phosphate, de débris cellulaires dans le milieu, l'ensemble de ces observations étant des signes de l'altération qui a lieu au sein de la membrane plasmique. Par ailleurs, il ne peut être libéré via le processus habituel d'exocytose via le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi étant donné qu'il ne possède pas de peptide-signal, peptide indispensable à ce mécanisme d'exocytose.

Nous avons montré pour notre part que la perméabilité de la membrane plasmique des cellules endothéliales soumises à une incubation sous hypoxie pouvant varier entre 30 et 120 minutes, n'était pas altérée et nous ne pouvons pas conclure à une sortie du bFGF par des pores formés pendant l'hypoxie au niveau de la membrane plasmique.

Il semblerait donc que l'hypothèse première que nous avons proposée n'est pas correcte : la perméabilité de la membrane plasmique n'est pas altérée et le bFGF ne se retrouve pas dans le cytoplasme.

Nous proposons donc un autre mécanisme pour expliquer la libération par les cellules endothéliales pendant une incubation sous hypoxie. Celle-ci se base sur les résultats que nous avons obtenus mais aussi sur certaines données de la littérature.

Mignatti et ses collaborateurs (1992) ont montré, suite à l'utilisation d'un ionophore du calcium, le A23187, qui stimule l'exocytose et la synthèse protéique, une augmentation de la libération du bFGF. de plus, en utilisant de la méthylamine (qui bloque l'endocytose et l'exocytose), du milieu sans sérum, des conditions de température basse ou des anticorps dirigés contre le récepteur au bFGF, ils remarquent un même effet inhibiteur sur la libération du bFGF. Ces conditions qui entraînent une inhibition de la libération du bFGF n'agissent pas seulement au niveau de l'endocytose et de l'exocytose mais affectent également la sécrétion via le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi.

Par ailleurs, l'utilisation de monensine et de bréfeldine A qui affectent le transport des protéines via le système réticulum endoplasmique-appareil de Golgi n'inhibent pas la libération du bFGF. Similairement, la cyclosporine, le vérapamil et la réserpine qui inhibent les protéines "multidrug resistance" (MDR) n'ont pas d'effet sur la libération du bFGF.

Par conséquent, l'inhibition de la libération du bFGF avec la méthylamine, les conditions de culture dans un milieu sans sérum ou à faible température est probablement due à une inhibition de l'exocytose. Donc, Mignatti *et al.*, (1992) en concluent que le bFGF peut être externalisé via un mécanisme d'exocytose indépendant de la voie du réticulum endoplasmique-appareil de Golgi.

Récemment, deux exemples de protéines autres que le bFGF et ne possédant pas de peptide-signal libérées via une voie alternative ont également été reportés.

L'interleukine 1 β (IL-1 β) ne possède pas de peptide-signal et semble être libérée par des macrophages activés via une voie indépendante de la voie classique par le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. L'externalisation de l'IL-1 β est bloquée par la méthylamine, des températures faibles (18 °C), des conditions sans sérum et est augmentée par "heat shock" et par un ionophore du calcium, le A23187 (Rubartelli *et al.*, 1990).

Pendant la différenciation des myoblastes, une lectine de 14 500 Da (L-14) est également externalisée via un mécanisme d'exocytose différente de la voie classique (Cooper et Barodes, 1990).

Une lectine soluble de 29 000 Da (L-29) ne possède pas non plus de peptide-signal et a servi de marqueur pour Linstedt *et al.* (1993) afin de caractériser la voie alternative d'exocytose des protéines. Cette lectine est localisée de façon diffuse dans le cytosol avec peu ou pas de présence dans un compartiment vésiculaire. Sa sécrétion n'est pas inhibée par la bréfeldine A ou la monensine qui sont connues pour inhiber le transport protéique via la voie du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi. La sécrétion de la L-29 est augmentée 3 à 5 fois par un ionophore du calcium, le A 23187 et par une augmentation de la température à 42 °C. Ces conditions entraînent également la libération de la LDH ce qui serait un signe d'une libération non spécifique des protéines cytosoliques. Cependant, dans ces conditions, la libération de la L-29 est polarisée au niveau apical de la cellule, alors que la libération de la LDH est équivalente au niveau apical et basolatéral de la cellule. Ils en ont donc conclu que la L-29 partage les caractéristique de sécrétion non classique de l'IL-1 β . Elle diffère cependant par le fait que la méthylamine n'inhibe pas sa libération. Enfin, la diminution de la température à 20 °C et l'utilisation de nocodazole, qui est connu pour

dépolymériser les microtubules et donc empêcher la migration apicale des vésicules qui ont quitté le réseau du Golgi, empêche la sécrétion de la L-29 au niveau apical et l'augmente au niveau basal.

Nos résultats montrant une localisation nucléaire mais également dans de petites vésicules du cytoplasme et l'absence d'inhibition de la libération du bFGF par la bréfeldine suggèrent qu'un mécanisme similaire à celui observé pour la libération de l'IL-1 β , de la L-14 et de la L-29 pourrait expliquer la libération du bFGF par les cellules endothéliales soumises à une incubation sous hypoxie.

CHAPITRE IV : CONCLUSION

Les pathologies veineuses des membres inférieurs constituent une cause importante de souffrance et d'invalidité dans notre société occidentale. Des facteurs tels que le vieillissement de la population, le mode de vie de plus en plus sédentaire, l'hérédité, les grossesses multiples paraissent être responsables d'une fréquence accrue de ces pathologies (Ramelet *et al.*, 1990).

Le principal facteur en cause semble être une stase veineuse, entraînant une diminution de l'apport d'oxygène au tissu. Lors de pathologies veineuses telles que les varices, la paroi vasculaire subit un réarrangement global. L'endothélium reste intact mais la média quant à elle subit un remaniement important. Les cellules musculaires lisses passent en effet d'un phénotype contractile à un phénotype synthétique : elles prolifèrent et se caractérisent par une synthèse accrue des constituants de la matrice extracellulaire. Tout ceci conduit à un épaissement de la média et à une désorganisation de la structure cellulaire de la paroi veineuse.

Le choix du modèle *in vitro* pour mimer la déficience en oxygène apparaissant lors de ischémie permet un meilleur contrôle dans des conditions expérimentales. Ce modèle a permis d'apporter une meilleure compréhension des maladies veineuses telles que les varices.

Les cellules endothéliales utilisées sont soumises à une incubation sous hypoxie c'est-à-dire placées dans une atmosphère composée à 100 % d'azote. La PO_2 dans le milieu chute alors rapidement de 130 mm Hg (normoxie) à 10 mm Hg (hypoxie).

Ce modèle *in vitro* permet d'étudier les variations métaboliques qui ont lieu au sein de la cellule endothéliale incubée sous hypoxie. Il a été observé que suite à l'hypoxie, la quantité d'oxygène devient limitante pour la cellule, ce qui aboutit à un arrêt des phosphorylations oxydatives dans la chaîne respiratoire des mitochondries et donc à une chute de la concentration en ATP intracellulaire. La cellule, afin de compenser son manque d'énergie,

met en route un système de secours qui est la glycolyse anaérobie. La glycolyse, en plus de produire une quantité faible d'ATP, entraîne également la production de lactate et d'ions H^+ dans le cytosol. Le pH_i de la cellule diminue donc. Afin de rétablir son pH intracellulaire, la cellule se servirait des pompes Na^+/H^+ et Na^+/Ca^{++} qu'elle possède au niveau de sa membrane plasmique pour échanger les ions H^+ par des ions Na^+ et ensuite ces ions Na^+ par des ions Ca^{++} . Nous proposons que ce soit ce mécanisme qui explique l'élévation de la concentration intracellulaire en calcium observée sous hypoxie.

Nous avons montré dans la première partie de ce travail que la $[Ca^{++}]_i$ était en effet augmentée suite à l'hypoxie et que l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de ces deux pompes échangeuses d'ions, l'hexaméthylène amiloride pour la pompe Na^+/H^+ et le dichlorobenzamil pour la pompe Na^+/Ca^{++} diminuaient cette augmentation de la $[Ca^{++}]_i$ suite à l'hypoxie. Nous pensons donc que c'est bien un mécanisme d'échange entre les ions H^+ , Na^+ et Ca^{++} dans les cellules endothéliales hypoxiques qui explique l'augmentation de la $[Ca^{++}]_i$.

Cette augmentation entraîne des altérations importantes du métabolisme de la cellule. En effet, le calcium est un messager secondaire qui peut activer une série de voies métaboliques. Il peut notamment activer des phospholipases endogènes dont la phospholipase A_2 . Cette activation provoque, dans les cellules endothéliales une augmentation de la synthèse des molécules pro-inflammatoires. Parmi ces molécules on retrouve le PAF qui, en restant associé à la surface des cellules endothéliales, permet l'aggrégation des plaquettes et l'interaction avec les leucocytes sanguins. Cependant, si il est libéré dans l'intima, il peut, de plus, interagir avec les cellules musculaires lisses de la média en stimulant probablement leur prolifération (Stoll et Spector, 1984). D'autre part, l'acide arachidonique libéré par la phospholipase A_2 est transformé en prostaglandines. La PGF_{2a} ainsi libérée par les cellules endothéliales peut induire la prolifération des cellules musculaires lisses au niveau de la média.

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons étudié la localisation du bFGF dans les cellules endothéliales et sa libération par ces cellules lorsqu'elles sont incubées sous hypoxie. Le bFGF est un facteur mitogène impliqué dans la prolifération des cellules musculaires lisses dans les veines variqueuses; une meilleure connaissance de ces deux processus est

donc nécessaire à une meilleure compréhension de l'étiologie de la veine variqueuse.

Nous avons ainsi montré par deux approches différentes que le bFGF se localisait dans le noyau et dans de petites vésicules dispersées dans le cytoplasme des cellules endothéliales. On ne le retrouve par contre pas dans le cytosol.

De plus, nous avons montré grâce à l'utilisation de différentes molécules de petits poids moléculaires (ATP, dextran-fluorescéine de 9300 Da) et de poids moléculaires élevés (LDH, ^{51}Cr , dextran-fluorescéine de 147 800 Da) que la perméabilité de la membrane plasmique n'était pas altérée par l'hypoxie. En effet, nous ne montrons pas d'entrée ni de sortie importante de ces molécules suite à l'hypoxie.

Au vu de ces différents résultats, nous pouvons donc conclure que le bFGF ne sort pas de la cellule endothéliale pendant l'hypoxie via de petits pores dans la membrane plasmique ou via une altération de la perméabilité de cette membrane comme le suggéraient Benzaquen *et al.* (1994) ou Muthukrishnan *et al.* (1991).

Nous savons que le bFGF ne contient pas de peptide-signal et donc qu'il ne peut être externalisé via la voie classique du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi. Cependant, d'autres protéines comme l'interleukine 1b et la lectine L-29 ne possèdent pas non plus de peptide-signal et semblent posséder un moyen de sortir de la cellule via un processus d'exocytose indépendant de la voie classique. La localisation du bFGF que nous avons précisé dans les cellules endothéliales ainsi que l'effet de différents inhibiteurs sur la libération du bFGF induite par l'hypoxie nous laissent suggérer qu'un processus similaire à celui de ces deux autres protéines pourrait également expliquer la libération du bFGF par les cellules endothéliales incubées sous hypoxie. Ce processus faisant intervenir une voie d'exocytose non classique et indépendant du Golgi reste encore imprécis et nécessite des expériences supplémentaires afin de mieux comprendre comment le bFGF accède à l'intérieur de ces petites vésicules et quel serait le signal qui déclencherait la fusion de ces vésicules avec la membrane plasmique.

Le bFGF libéré par les cellules endothéliales hypoxiques agit sur les cellules musculaires lisses en combinaison avec la $\text{PGF}_2\alpha$ pour induire leur

prolifération. Transposés in vitro, ces résultats peuvent expliquer l'épaississement de la média observée dans les veines variqueuses. La compréhension de son mécanisme d'externalisation ainsi que de son interaction avec la PGF_2a sur la prolifération des cellules musculaires lisses permettrait d'éclaircir un processus important présent dans cette maladie. En effet, la prolifération des cellules musculaires lisses conduit non seulement à l'épaississement de la média et donc de la paroi de la veine mais aussi à une dédifférenciation des cellules musculaires lisses. Celles-ci passent en effet d'un phénotype contractile à un phénotype synthétique dans lequel l'expression des protéines des filaments contractiles diminue et celle des protéines de la matrice extracellulaire augmente. On retrouve alors une paroi veineuse déstructurée, épaissie et dont les capacités contractiles sont diminuées : c'est donc une paroi veineuse qui ne peut plus remplir une partie importantes de ces fonctions, ce qui renforce le processus de stase veineuse et ne fait qu'amplifier le phénomène.

Une meilleur connaissance des processus biochimiques qui sont à la source de ce phénomène est donc capitale afin de développer une stratégie thérapeutique adéquate ciblée sur le début de la cascade et permettant donc le développement des altérations subséquentes. Cette nouvelle stratégie serait essentiellement préventive et pourrait par exemple se centrer sur une prévention de l'activation des cellules endothéliales par l'hypoxie se développant pendant les stases veineuses.

PERSPECTIVES

Au cours de ce travail, nous avons étudié les modifications métaboliques qui apparaissent au sein des cellules endothéliales sous hypoxie, modifications qui, à l'échelle de la veine variqueuse, entraînent l'activation de la réponse inflammatoire d'une part et de la prolifération des cellules musculaires lisses d'autre part.

Ces études ont été réalisées sur des cultures de cellules endothéliales. De plus, l'étude des effets des milieux conditionnés par des cellules endothéliales sur les cellules musculaires lisses avaient été également réalisées sur des cultures de cellules musculaires lisses. Il serait à présent intéressant d'étudier l'effet direct des molécules libérées par les cellules endothéliales au cours de l'hypoxie sur les cellules musculaires lisses à l'aide de cocultures de ces deux types cellulaires et dans un deuxième temps, d'étudier les interactions entre ces deux types cellulaires dans une paroi veineuse entière. L'organo-culture de morceaux de veine saphène serait par exemple un modèle de choix dans cette étude.

Les résultats de ces études sur une paroi veineuse complète permettront d'étendre les conclusions de ce travail ainsi que celles obtenues précédemment au laboratoire et ainsi de confirmer l'hypothèse de l'activation des cellules endothéliales par l'hypoxie comme une origine du développement des veines variqueuses.

BIBLIOGRAPHIE

Abraham J.A., Mergia A., Whang J.L., Friedman J., Hjerrild K.A., Gospodarowicz D. and Fiddes J.C.

Nucleotid sequence of bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor.

Science 233 (1986) 543-548.

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

Effect of hypoxia upon intracellular calcium concentration of human endothelial cells.

J. Cell. Physiol. 152 (1992) 215-221.

Arnould T., Michiels C. and Remacle J.

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 Remacle J.

Hypoxic human umbilical vein endothelial cells induce activation of adherent polymorphonuclear leukocytes.

Blood 83 (1994) 3705-3716.

Bashkin P., Doctrow S., Klagsbrun M., Svahn C.M., Folkman S. and Vlodavski I.

Basic fibroblast growth factor binds to subendothelial extracellular matrice and his release by heparinitase and heparin-like molecules.

Biochem. 28 (1989) 1737-1743.

Beaglehole R.

Epidemiology of varicose veins.

World J. Surg. 10 (1986) 898-902.

Benzaquen L.R., Nicholson-Weller A. and Halparin J.

terminal complement proteins C5b-9 release basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor from endothelial cells.

J. Exp. Med. 179 (1994) 985-992.

Berrou E., Breton M., Deudon E. and Picard J.

Stimulation of large proteoglycan synthesis in cultured smooth muscle cells from pig aorte by endothelial cell-conditioned medium.

J. Cell. Physiol. 149 (1991) 436-443.

Brinkman H., Van Buul-Wortebboer M.F. and Van Mourik J.A.

Involvement of cyclooxygenase and lipoxygenase-mediated conversion of arachidonic acid in controlling human vascular smooth muscle cells proliferation.

Thrombosis and Haemostasis 63 (1990) 291-297.

Brooks A., Burrin J.M. and Kohner E.M.

Characteriation of release of basic fibroblast growth factor from bovine retinal endothelial cells in monolayer cultures.

Biochem. J. 276 (1991) 113-120.

Bussolino F., Wang J.M., Turrini F., Alessi D., Ghigo D., Costamagna C., Pescarmona G., Mantovani A. and Bosia A.

Stimulation of the Na⁺/H⁺ exchanger in human endothelial cells activated by granulocyte-and granulocyte-macophage-colony-stimulating factor.

Nature 337 (1989) 471-473.

Caen J.

in : Le sang et les vaisseaux, Herman, Paris., (1987) 3-64.

Charles A. and Gresham G.A.

Histopathological changes in venous grafts and in varicose and non-varicose veins.

J. Clin. Pathol. 46 (1993) 603-606.

Charpentier P. and Priollet P.

Epidemiologie de l'insuffisance veineuse chronique.

Presse Med. 23 (1994) 197-201.

Clarke J., Larkin S., Davies G. and Maseri A.

Coronary vasomotion and endothelium : possible role in ischemic syndromes.

in : *The endothelium : An introduction to current reseach ed; by J. B. Warren, WILEY-LISS, NY* (1990) 107-117.

Cooper D.N.W. and Barondes S.H.

Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and a novel secretion mechanism.

J. Cell Biol. 110 (1990) 1681-1691.

Cryer A.

Scale and diversity of interactions at the vascular endothelium.

in : *Biochemical interactions at the endothelium*, ed by Cryer, Elsevier, Amsterdam (1983) 1-3.

De Leener F.

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

Mémoire de licences (FUNDP) (1992)

Dell'Era P., Presta M. and Ragnotti G.

Nuclear localization of endogenous basic fibroblast growth factor in cultured endothelial cells.

Exp. Cell Res. 192 (1991) 505-510.

Desmouliere A., Rubbia-Bradt L. and Gabbiani G.

Modulation of actin isoform expression in cultured arterial smooth muscle cells by heparin and culture conditions.

Artherosclerosis and Thrombosis 11 (1991) 244-253.

Dominiczak A.F. and Bohr D.F.

Vascular smooth muscle in hypertension.

J. Hypertension 7 (1989) S107-S115.

Flaherty J.T. and Weisfeld M.L.

Reperfusion injury.

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

Florey L.

The endothelial cell.

Br. Med. J. 2 (1966) 487-490.

Folkman J., Klagsbrun M., Sasse J., Wadzinski M., Ingber D. and Vlodavski I.

A heparin-binding angiogenic protein-basic fibroblast growth factor-is stored within basement membrane.

Am. J. Pathol. 130 (1988) 393-400.

Galloway A.C., Pelletier R. and D'Amore P.A.

Do ischemic hearts stimulate endothelial cell growth?

Surgery 96 (1984) 435-438.

Gasbarrini A., Caraceni P., Farghali H. and Van Thiel D.H.
Effects of high and low pH on Ca⁺⁺i and on cell injury evoked by anoxia in perfused rat hepatocytes.
Bioch. Biophys. Acta 1220 (1994) 227-285.

Ghigo D., Bussolino F., Grabarino G., Heller R., Turrini F., Pescarmona G., Cragoe E.J., Pegoraro L. and Bosia A.
Role of Na⁺/H⁺ exchange in thrombin-induced platelet-activating factor production by human endothelial cells.
J. Biol. Chem. 263 (1988) 19437-19446.

Gibbons G.H. and Dzau V.J.
Endothelial functions on vascular remodeling.
in : *The endothelium : An introduction to current research*
ed; by J. B. Warren, WILEY-LISS, N-Y (1990) 81-83.

Gospodarowicz D., Ferrara N., Haaparanta T. and Neufeld G.
Basic fibroblast growth factor : expression in cultured bovine vascular smooth muscle cells.
Eur. J. Cell Biol. 46 (1988) 144-151.

Gospodarowicz D., Neufeld G. and Schweigerer L.
Fibroblast growth factor : structural and biological properties.
J. Cell. Physiol. 5(suppl) (1987) 15-26.

Greenwald R.W., Moy W.W. and Lazanes D.
Degradation of cartilage proteoglycans and collagen by superoxide radicals.
Arthritis and Rheumatism 19 (1976) 799-805.

Harper I., Bond J.M., Chacon E., Reece J., Herman B. and Lemasters J.J.
Inhibition of Na⁺/H⁺ exchange preserves viability, restores mechanical function, and prevents the pH paradox in reperfusion injury to rat neonatal myocytes.
Bas. Res. Cardiol. 88 (1993) 430-442.

Healey A.M. and Herman I.M.
Density-dependent accumulation of basic fibroblast growth factor in the subendothelial matrix.
Eur. J. Cell Biol. 59 (1992) 56-67.

Herman I.M. and Castellot J.J.J.
Regulation of vascular smooth muscle cells growth by endothelial-synthesised extravascular matrices.
Arteriosclerosis 7 (1987) 463-469.

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

in : Principles of pathobiology, Oxford University Press, London (1980) 30-35.

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

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

J. Physiol. 423 (1990) 171-191.

Jaffe E.A.

Physiologic functions of normal endothelial cells.

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

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

Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins.

J. Clin. Invest. 32 (1973) 1745-1756.

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

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

Biochem. Pharmacol. (Soumis)

Karmazyn M. and Moffat M.P.

Role of Na⁺/H⁺ exchange in cardiac physiology and pathophysiology: mediation of myocardial reperfusion injury by the pH paradox.

Cardiovasc. Res. 27 (1993) 915-924.

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

Mechanism of hypoxic cell injury.

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

Lindstedt R., Apodace G., Barondes S.H., Mosto K.E. and Leffer H.

Apical secretion of a cytosolic protein by Madin-Darby canine kidney cells.

J. Biol. Chem. 268 (1993) 11750-11757.

Lovqvist A., Emanuelsson H., Nilsson J., Lundqvist H. and Carlsson J.

Pathophysiological mechanisms for restenosis following coronary angioplasty : possible preventive alternatives.

J. Int. Med. 233 (1993) 215-226.

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

Protein mesurment with the folin phenol reagent.

J. Biol. Chem. 193 (1951) 265-275.

Maillet M. and Chiarasini D.

in : *Histologie spéciale humaine (2)*, ed by Breal, Medecin-deug, Montreuil (1985) 51-75.

McNeil P.L. and Ito S.

Gastrointestinal cell plasma membrane wounding and release in vivo.
Gastroenterology 96 (1989) 1238-1248.

McNeil P.L., Muthukrishnan L., Warder E. and D'Amore P.

Growth factors are released by mechanically wounded endothelial cells.
J. Cell Biol. 109 (1989) 811-822.

Meredith I.T., Anderson T.J., Vehata A., Yeung A.C., Selwyn A.P. and Ganz P.

Role of endothelium in ischemic coronary syndromes.
Am. J. Cardiol. 72 (1993) 27C-32C.

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

Pathophysiological role of vascular smooth muscle cells.
J. Cardiovasc. Pharmacol. 16 (1990) S4-S11.

Michiels C., Arnould T., Houbion A. and Remacle J.

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 Remacle J.

Stimulation of prostaglandin synthesis by human endothelial cells exposed to hypoxia.
Am. J. Physiol. 264 (1993b) C866-C874.

Michiels C., Arnould T. and Remacle J.

Hypoxia-induced activation of endothelial cells as possible cause of venous diseases : a hypothesis.
Angiology 44 (1993a) 639-646.

Michiels C., Arnould T. and Remacle J.

Rôle-clé de l'hypoxie et des cellules endothéliales dans le développement des veines variqueuses.
Med/Sci 10 (1994a) 845-853.

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

Hypoxia stimulates human endothelial cells to release smooth muscle cell mitogens : role of prostaglandine and bFGF.

Exp. Cell Res. 213 (1994b) 43-54.

Mignatti P., Morimoto T. and Rifkin D.B.

Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independant of the endoplasmic reticulum-golgi complex.

J. Cell. Physiol. 151 (1992) 81-93.

Montefort S. and Holgate S.T.

Adhesion molecules and their role in inflammation.

Resp. Med. 85 (1991) 91-99.

Moscatelli D. and Quarto N.

Transformation of NIH3T3 cells with basic fibroblast growth factor or the hst/K-fgf oncogene causes down-regulation of fibroblast growth factor receptor : reversal morphological transformation and restoration of receptor number by suramin.

J. Cell Biol. 109 (1989) 2519-2527.

Muthukrishnan L., Warder E. and McNeil P.L.

Basic fibroblast growth factor is efficiently released from a cytosolic storage site through plasma membrane disruption of endothelial cells.

J. Cell. Physiol. 148 (1991) 1-16.

Neufeld G. and Gospodarowicz D.

Identification of the fibroblast growth factor receptor in human vascular endothelial cells.

J. Cell. Physiol. 136 (1988) 537-542.

Niebes P.

Physiopathologie de la veine variqueuse.

Angiologie (1987)

O'Donnell B.R. and Bieckler P.E.

Influence of pH on calcium influx during hypoxia in rat cortical brain slices.

Stroke 25 (1994) 171-177.

O'Donnell M.E. and Owen N.E.

Sodium cotransport in vascular smooth muscle cells.

Blood Vessels 28 (1991) 138-146.

Okada Y., Katsuda S., Matsui Y., Wanatabe H. and Nakanishi I.
Collagen synthesis by cultured arterial smooth muscle cells during
spontaneous phenotypic modulation.
Acta Pathol. Jpn 40 (1990) 157-164.

Piper H.M.
Energy deficiency, calcium overload or oxidative stress : possible causes of
irreversible ischemic myocardial injury.
Klinische Wochenschrift 67 (1989) 749-759.

Rasmussen H.
Les ions calcium, messagers intracellulaires.
Pour la science 146 (1989) 86-92.

Rasmussen H., Barret P., Smallwood J., Bollag W. and Isaacs C.
Calcium ion intracellular messenger and cellular toxin.
Env. Health Persp. 84 (1990) 17-25.

Rawn D.J.
in : Traité de biochimie, De Boeck Université, Bruxelles (1990)

Reidy M.A.
Neointimal proliferation : the role of basic FGF on vascular smooth muscle
cell proliferation.
Thrombosis and Haemostasis 70 (1993) 172-176.

Reidy M.A.
Growth factors and arterial smooth muscle cell proliferation.
An. NY Acad. Sci. 714 (1994) 225-230.

Renko M., Quarto N., Morimoto T. and Rifkin D.B.
Nuclear and cytoplasm localization of different basic fibroblast growth factor
species.
J. Cell. Physiol. 144 (1990) 108-114.

Rifkin D.B. and Moscatelli D.
Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor.
J Cell Biol. 109 (1989) 1-6.

Ross R.
Atherosclerosis : a problem of the biology of arterial wall cells and their
interactions with blood components.
Atherosclerosis 1 (1981) 293-311.

Rubartelli A., Cozzolino F., Talio M. and Sitia R.

A novel secretory pathway for interleukin-1b, a protein lacking a signal sequence.

EMBO J. 9 (1990) 1503-1510.

Salvaterra C.G. and Goldman W.F.

Acute hypoxia increases cytosolic calcium in cultured pulmonary arterial myocytes.

Am. J. Physiol. 264 (1993) L323-L328.

Sasada R., Kurokawa T., Iwane M. and Igarashi K.

Transformation of mouse BALB/c 3T3 cells with human basic fibroblast growth factor cDNA.

Mol. Cell. Biol. 8 (1988) 588-594.

Sato Y. and Rifkin D.B.

Autocrine activities of basic fibroblast growth factor : regulation of endothelial cell movement, plasminogen activator synthesis and DNA synthesis.

J Cell Biol. 107 (1988) 1129-1205.

Scholz W. and Albus U.

Na⁺/H⁺ exchange and its inhibition in cardiac ischemia and reperfusion.

Bas. Res. Cardiol. 88 (1993) 443-455.

Schwartz S.M., Heimark R.L. and Majesty M.W.

Developmental mechanisms underlying pathology of arteries.

Physiol. Rev. 70 (1990) 1177-1203.

Schweigerer L., Neufeld G., Friedman J., Abraham J.A. and Fiddes J.C.

Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth.

Nature 325 (1987) 257-259.

Siffert W. and Akkerman J.W.N.

Na⁺/H⁺ exchange and Ca⁺⁺ influx.

FEBS 259(1) (1989) 1-4.

Simionescu N. and Simionescu M.

The cardiovascular system.

in : *Histology*, ed by L. Weiss and R. Greep, McGraw-Hill, NY (1977) 373-431.

Sinzinger H., Fitscha P., Wagner O., Koliman J., Zidek T. and Rogotti W.
Additive benefit of PGI₂ and PGE₁ (via different mechanism?) on inhibition
of activation of human vascular smooth muscle cells.
Exp. Pathol. 40 (1990) 55-60.

Stoll L.L. and Spector A.A.
Interaction of platelet activating factor with endothelial and vascular smooth
muscle cells in coculture.
J. Cell Physiol. 139 (1989) 253-261.

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

Tsai S., Adamik R., Haun R.S., Moss J. and Vaughan M.
Effects of brefeldin A and accessory proteins on association of ADP-
ribosylation factors 1, 3, and 5 with golgi.
J. Biol. Chem. 268 (1993) 10820-10825.

Tsien R.Y., Pozzan T. and Rink T.J.
Measuring and manipulating cytosolic calcium with trapped indicators.
Trends Biochem. Sci. 9 (1984) 263-266.

Vender R.L., Clemmons D.R., Konck L. and Friedman M.
Reduced oxygen tension induced pulmonary endothelium to release a
pulmonary smooth muscle cell mitogen.
Am. Rev. Resp. Dis. 135 (1987) 622-627.

Verhoye F.
Contribution à l'étude de l'athérogenèse : influence du stress oxydant sur les
cellules endothéliales humaine en culture. Etude de l'homéostasie calcique.
Mémoire de licence, FUNDP (1989)

Weissberg P.L.
Mechanism of vascular smooth muscle cell proliferation.
Ann. Acad. Med. 20 (1991) 38-42.

Weissman G.
Prostaglandin in acute inflammation.
Current concept, Kalamazoo, M I : Upjohn (1980)

Whatley R.E., Zimmerman G.A., McIntyre T.M. and Prescott S.M.

Lipid metabolism and signal transduction in endothelial cells.

Prg. Lipid Res. 29 (1990) 45-53.

Xu C.B., Penak-Rasmussen H. and Stavenow L.

Interaction between cultured bovine arterial endothelial and smooth muscle cells : effect of injury on the release of growth stimulating and growth inhibiting substances.

Pharmacol. Toxicol. 69 (1991) 195-200.

Yamamoto M., Fujita K. and Shinkai T.

Identification of the phenotypic modulation of rabbit arterial smooth muscle cells in primary culture by flow cytometry.

Exp. Cell Res. 198 (1992) 43-51.

Yano K., Maruyamat T., Makino N., Matsui H. and Yanaga T.

Effects of amiloride on the mechanical, electrical and biochemical aspects of ischemia-reperfusion injury.

Mol. Cell. Biochem. 121 (1993) 75-83.

Yu Z., Biro S., Fu Y., Sanchez J., Smale G., Sasse J., Ferrans V.J. and Casscells W.

Localisation of basic fibroblast growth factor in bovine endothelial cells : immunohistochemical and biochemical studies.

Exp. Cell Res. 204 (1993) 247-259.

Zagzag D., Miller D.C., Sato Y., Rifkin D.B. and Burstein D.E.

Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in astrocytome.

Cancer Res. 50 (1990) 7393-7398.