



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Mise en évidence de l'expression du PDGF dans des organocultures de veine saphène humaine

Grognard, David

Award date:
1997

[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
NOTRE-DAME DE LA PAIX



NAMUR

SECRETARIAT BIOLOGIE
F. U. N. D. P.
Rue de Bruxelles, 61
B - 5000 NAMUR

Faculté des Sciences

**MISE EN EVIDENCE DE L'EXPRESSION DU PDGF DANS DES
ORGANOCULTURES DE VEINE SAPHENE HUMAINE**

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

David GROGNARD

Juin 1997

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Tél. 081/72.41.11 - Telex 59222 Facnam-b - Telefax 081/23.03.91

Mise en évidence de l'expression du PDGF dans les organocultures de veine saphène humaine

GROGNARD David

Résumé

Les pathologies veineuses constituent un problème de santé majeur mais leur étiologie reste cependant peu connue. Afin d'expliquer la cascade d'évènements biochimiques et morphologiques conduisant à l'apparition des varices, une nouvelle hypothèse a été proposée au laboratoire : ce serait l'hypoxie résultant des stases veineuses qui activerait les cellules endothéliales (CE), induisant leur synthèse de facteurs inflammatoires et mitogènes. Les fonctions des leucocytes et cellules musculaires lisses (CML) sont alors perturbées dans la paroi veineuse, ce qui conduit finalement à des modifications telles que celles observées dans les veines variqueuses.

Dans ce travail, nous avons utilisé le modèle de l'organoculture de veine saphène humaine qui permet de suivre, dans leur environnement tissulaire d'origine, l'évolution des CE et des CML dans différentes conditions expérimentales sur une période allant jusqu'à 15 jours. L'expression du facteur de croissance PDGF a été étudiée sur des coupes réalisées dans les fragments de veine maintenus en culture, au niveau protéique par l'immunohistochimie et au niveau de l'ARNm par l'hybridation *in situ*. Pour cette technique, nous avons fabriqué deux sondes ARN marquées à la digoxygénine complémentaires d'une séquence de l'ADNc du PDGFA et de la β -actine. Les résultats obtenus à l'aide de ces deux approches montrent que le PDGF est exprimé dans les CML des couches sous-endothéliales, c'est-à-dire dans la néointima. Ils suggèrent un rôle potentiel de ce facteur dans le développement d'un épaississement pathologique de la paroi veineuse et indiquent la nécessité d'études plus approfondies.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 1997

Promoteur: Michiels C.

Copromoteur : Remacle J.

Au terme de ces 5 mois de travail, je tiens à remercier cette grande équipe qui m'a aidé, soutenu et encouragé.

Merci au directeur du stade J. Remacle de m'avoir permis de faire mes premiers pas sur la pelouse scientifique. Son enthousiasme professionnel, ainsi que sa façon de le faire passer aux autres, a éveillé en moi la soif de connaissances.

Merci à Carine Michiels, coach de l'équipe "Varice et artifice", qui sait par ses qualités scientifiques et humaines ainsi que par son dynamisme, remonter le moral de ceux qui l'entourent. Merci pour ton aide et tes conseils.

Merci à Rose Thibaut, coéquipière lors de mes premiers matchs contre l'équipe "Hybridrapa" et qui, par ses connaissances du terrain m'a permis de développer pleinement ma tactique de jeu.

Merci à Sandrine dont l'ordre, la rigueur et surtout le calme au moment d'envoyer la balle lui ont permis de supporter mon fouillis moléculaire et mes nombreuses questions sur les règles du jeu.

Merci à Isabelle Ernest, joueuse de fin de période, qui a effacé, pour moi, la dernière ligne adverse alors que les autres joueurs étaient déjà presque tous rentrés au vestiaire.

Merci à Noël, Berthe et Dominique, les aides-soignantes sans qui j'aurais eu difficile d'arriver au bout du match en un seul morceau. Merci pour vos efforts et votre dévouement.

Merci aux autres joueurs de l'équipe pour leur coup de mains, de pieds etc...merci à Patrick, Isa Géron, Michet, Anne et Marc.

Merci également aux pom-pom girls de service Anne-Catherine, Laurence et Jean-Baptiste (?), simplement pour leur amitié et leur présence aux moments des coups de cafard.

Merci aux hordes de supporters qui ont mis l'ambiance dans le stade. Merci à Alex, Martine, Najat, Nancy, Fred, Armand, Andrée, François, Benoît, Edouard, Dédé, Mumu et les autres.

Après cinq mois de pensées, 25 minutes de téléphone et 10 kilos de lettres et E-mails d'encouragement, tu es à mes côtés pour le but final. Merci à toi, mon Isabelle.

Je remercie également toute ma famille et mes cokoteurs qui ont toujours été là quand j'en avais besoin.

Merci à Yves Poumay, Mme Leclercq et Raphaël pour leur aide, leur savoir-faire ainsi que pour l'utilisation de leur matériel.

Merci enfin à l'hôpital Ste Elisabeth et à Mr Goffinet pour le matériel qu'ils ont mis à notre disposition.

ABBREVIATIONS

ADN	: Acide désoxyribonucléique
ADNc	: Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPc	: Adénosine monophosphate cyclique
APTS	: Aminopropyltriéthoxysilane
ARNm	: Acide ribonucléique messenger
ATP	: Adénosine triphosphate
bFGF	: basic fibroblast growth factor
BCIP	: X-phosphate/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate
BSA	: Albumine sérique bovine
CML	: Cellule musculaire lisse
dNTP	: Desoxy (A, C, G ou U) triphosphate
DAB	: Diaminobenzidine
DEPC	: Diéthylpyrocarbonate
DIG	: Digoxigénine
EDRF	: Endothelium-derived relaxing factor
EDTA	: Ethylène diamine tétraacétate
GMPc	: Guanosine monophosphate cyclique
HUVEC	: Human umbilical vein endothelial cell
ICAM-1	: Intercellular adhesion molecule-1
IgG	: Immunoglobuline de type G
NADH	: Nicotinamide adenine dinucléotide réduit
NBT	: 4-nitroblue tetrazolium
PAF	: Platelet-activating factor
PBS	: Phosphate-buffered saline
PCR	: Polymerase chain reaction
PDGF	: Platelet-derived growth factor
PG	: Prostaglandine
PGF_{2α}	: Prostaglandine F _{2α}
PLA₂	: Phospholipase A ₂
PMN	: Polymorphonucléaire neutrophile
PTCA	: Percutaneous transluminal coronary angioplasty
SDS	: Sodium dodecyl sulfate
SSC	: Sodium saline citrate
TBE	: Tris borate EDTA
TRIS	: Tri(hydroxyméthyl)aminométhane
UTP	: Uridine triphosphate

Table des matières

A) INTRODUCTION	1
1) Cadre général du travail	1
2) Modèles expérimentaux et hypothèse expliquant l'apparition des varices	2
3) Modèle de l'organoculture	10
4) Le PDGF	13
4-1) Rôle du PDGF dans le modèle des pathologies variqueuses	13
4-2) Origine du PDGF	14
4-3) Caractéristiques biochimiques du PDGF	14
4-4) Synthèse et expression du PDGF	15
4-5) Fonctions du PDGF	16
4-6) Les récepteurs du PDGF	18
5) L'hybridation <i>in situ</i>	20
5-1) Historique et évolution de la méthode	20
5-2) Méthodes directe et indirecte	21
5-3) Les marquages les plus utilisés	22
5-4) Les différents types de sondes	23
5-5) Précautions liées à la méthode	25
5-6) Les pièges de l'hybridation <i>in situ</i>	25
6) But du mémoire	29
B) MATERIEL ET METHODES	31
1) Organoculture de veine saphène humaine	31
1-1) Mise en culture	31
1-2) Fixation et enrobage de fragments de veine saphène	35

2) Réalisation de coupes histologiques	37
2-1) Préparation des lames	37
2-2) Réalisation proprement dite des coupes	38
3) Immunohistochimie	41
3-1) Matériel et solutions	41
3-2) Mode opératoire	43
4) Hybridation <i>in situ</i>	46
4-1) Réalisation des sondes	46
A) Les plasmides utilisés	46
B) Les méthodes utilisées	47
C) Modes opératoires	48
C-1) Restriction d'une partie d'un plasmide	48
C-2) Amplification PCR de la séquence comprenant l'insert et les séquences T3 et/ou T7	49
D) Electrophorèse sur gel d'agarose	55
E) Transcription <i>in vitro</i>	57
F) Vérification, purification et quantification des sondes	59
F-1) Vérification sur gel d'agarose	59
F-2) Purification des sondes	59
F-3) Estimation du marquage des sondes par dot blot	60
F-4) Vérification de la spécificité des sondes par dot blot	64
4-2) Hybridation <i>in situ</i>	68
 C) RESULTATS ET DISCUSSION	 76
 1) L'organoculture de veine saphène humaine	 77
2) Immunohistochimie	78
2-1) Méthode indirecte en deux étapes	78
2-2) Méthode indirecte en trois étapes	79
3) Hybridation <i>in situ</i>	83
A) Réalisation de la sonde PDGFA	83
A-1) Restriction du plasmide pPAR	84
A-2) Amplification par PCR	85
A-3) Transcription <i>in vitro</i>	86
A-4) Dot blot n°1	87
A-5) Dot blot n°2	87

B) Hybridation <i>in situ</i>	90
B-1) Test de concentration en protéinase K	90
B-2) Test de saturation des sites non-spécifiques	91
B-3) Test d'hybridation <i>in situ</i>	92
C) Réalisation de la sonde β -actine	92
C-1) Amplification par PCR	93
C-2) Transcription <i>in vitro</i>	93
C-3) Dot blot n°1	94
C-4) Dot blot n°2	95
C-5) Vérification des sondes	95
D) Test d'hybridation <i>in situ</i>	96
D) DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	98
E) BIBLIOGRAPHIE	102

Coupe transversale.

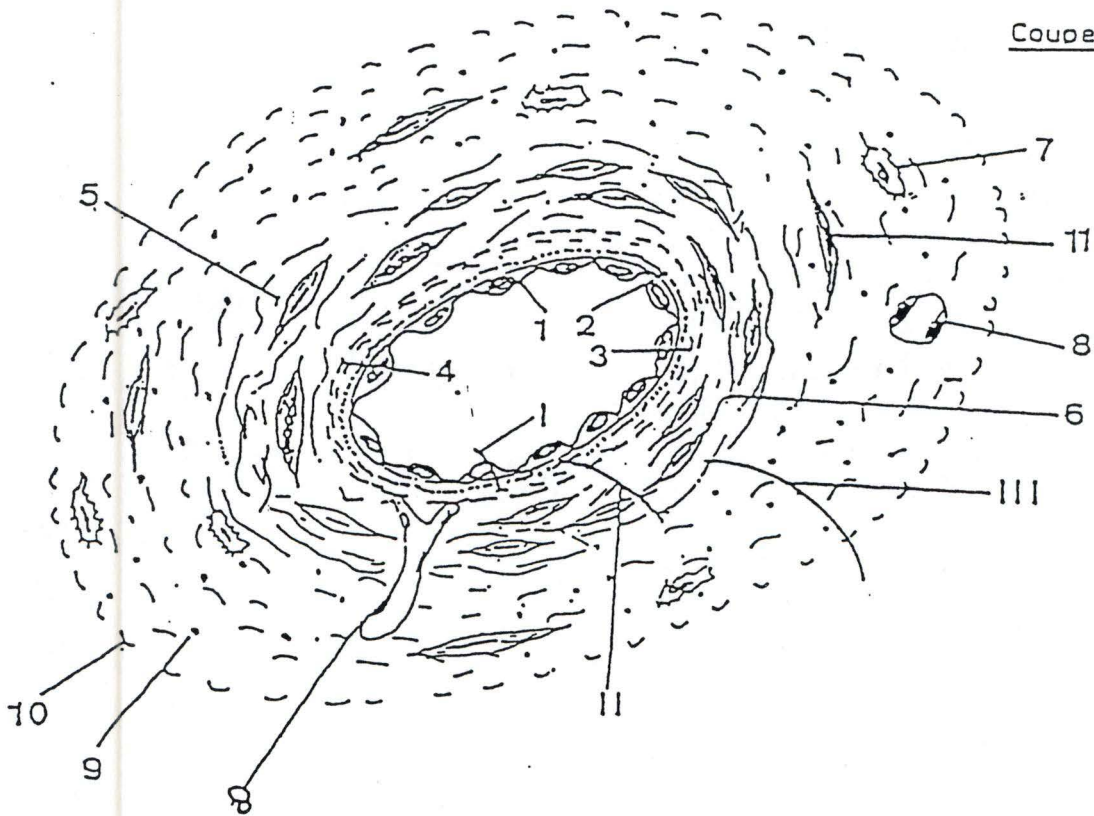


Figure 1-1 : Représentation schématique en vue transversale de la paroi veineuse. Celle-ci est formée de trois tuniques : I = l'intima, II = la média, III = l'adventice. 1 : endothélium, 2 : membrane basale, 3 : couche sous-endothéliale, 4 : limitante élastique interne, 5 : cellules musculaires lisses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

A) Introduction

1) Cadre général du travail

Les veines variqueuses sont monnaie courante dans nos pays occidentaux, puisqu'environ une personne sur trois en souffre. On a relevé une quantité importante de facteurs pouvant influencer le développement de la maladie : le sexe, la sédentarité, la surcharge pondérale, la position assise et le régime alimentaire pauvre en fibres semblent être corrélés à la prévalence des varices au sein de la population mondiale. La station debout prolongée est aussi incriminée, tout comme l'insuffisance valvulaire et une forte pression sanguine. Parallèlement, les études épidémiologiques ont montré qu'il faut aussi tenir compte de facteurs héréditaires (Carpentier et Priollet, 1994).

Une composante majeure de ces différents facteurs est la présence d'une stase du sang dans les veines. Lors d'une stase veineuse, l'oxygène normalement apporté aux tissus par le sang vient à manquer. Les premières cellules à souffrir de cette déficience sont les cellules endothéliales. Ce sont elles qui forment la première barrière de protection des vaisseaux sanguins (Braquet *et al.*, 1994).

C'est pourquoi la plupart des recherches ayant pour but l'étude de cette pathologie tentent de mettre à jour l'influence de la stase veineuse sur l'endothélium et son environnement immédiat. Quand on parle d'environnement immédiat, on pense, bien évidemment, aux autres couches cellulaires constituant la paroi de la veine (voir figure 1-1) mais aussi aux constituants sanguins qui sont en contact direct avec les cellules endothéliales.

Comme dans toute étude, pour tenter d'expliquer les différents changements dans une veine variqueuse, il faut mettre en place une série de modèles expérimentaux. Ce sont ces modèles qui seront décrits dans le chapitre suivant.

2) Modèles expérimentaux et hypothèse expliquant l'apparition des varices

Comme il est évidemment impossible de suivre directement sur le patient l'évolution d'une veine saine vers une veine malade, il a fallu mettre au point des modèles expérimentaux permettant de simuler l'environnement de la veine *in vivo* et ainsi tenter de découvrir les réactions en chaîne menant à l'apparition de la varice.

Lors d'une stase veineuse, la réduction de la pression partielle en oxygène conduit à une diminution de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale de la cellule endothéliale. Il en résulte un ralentissement des phosphorylations oxydatives, ce qui diminue la régénération de l'adénosine triphosphate (ATP) avec, comme mécanisme de compensation, une stimulation de la glycolyse.

Si la cellule ne peut pas satisfaire tous ses besoins en ATP, les modifications métaboliques qui en résultent peuvent conduire à sa mort. Cependant, avant que ne surviennent ces altérations irréversibles, l'hypoxie peut influencer les fonctions des cellules endothéliales, entraînant une cascade d'évènements qui peuvent conduire à force d'être répétés aux modifications typiquement observées dans les parois veineuses pathologiques (Michiels *et al.*, 1994).

Le modèle expérimental sur lequel l'effet de l'hypoxie a été étudié est constitué d'une primo culture de cellules endothéliales isolées à partir de la veine ombilicale humaine (HUVEC, *human umbilical vein endothelial cells*) exposées à une hypoxie. Cette hypoxie mime le manque d'oxygène résultant de la stase veineuse.

Dans les conditions expérimentales de ce modèle, la pression partielle en oxygène dans le milieu atteint 10 mm Hg après 15 minutes (Michiels *et al.*, 1992). Dans ces conditions, on n'observe pas de mort cellulaire pendant les deux premières heures d'hypoxie. La mort cellulaire est cependant provoquée par des périodes plus longues d'incubation sous hypoxie : il n'y a plus que 50% des cellules qui survivent après 6 heures d'hypoxie (Michiels *et al.*, 1994).

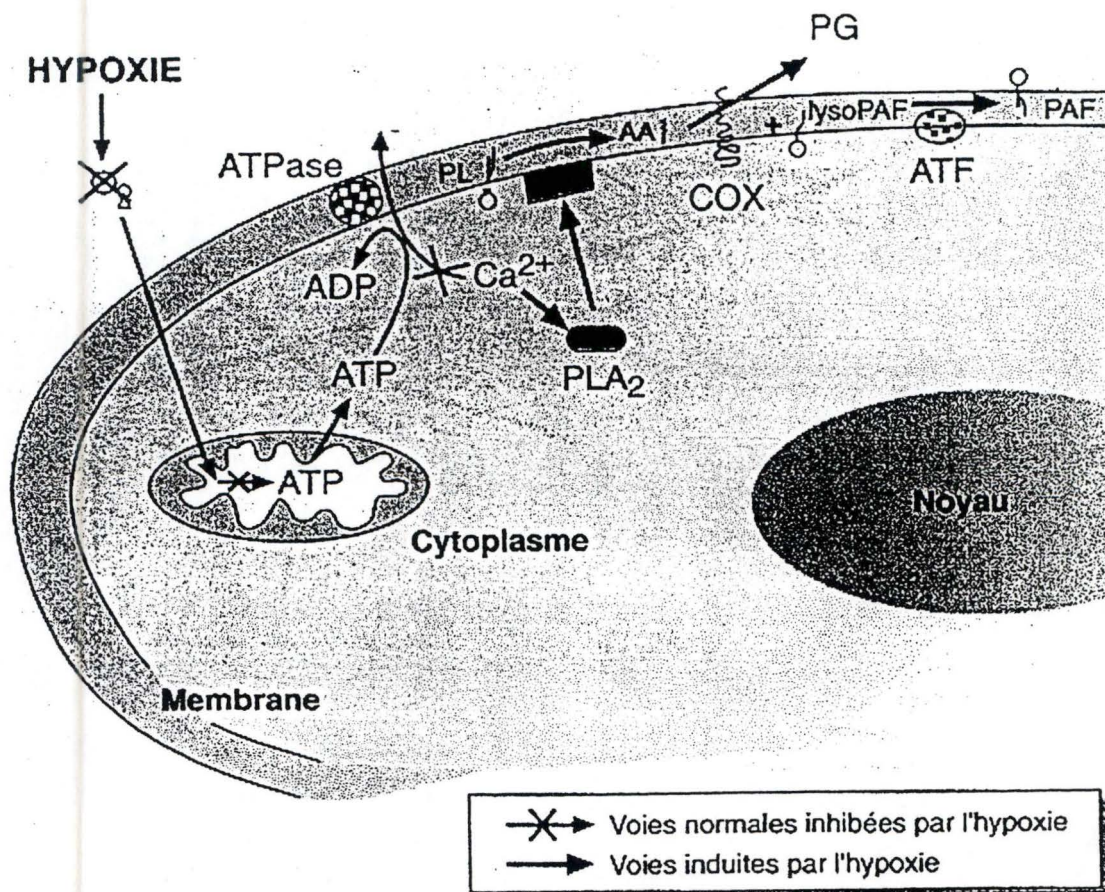


Figure 1-2 : Schéma illustrant l'activation des cellules endothéliales par l'hypoxie.
 PLA₂ : phosphatase A₂; PL : phospholipide; AA : acide arachidonique; Cox :
 cyclooxygénase; PG : prostaglandine; PAF : platelet-activating factor; ATF : acétyl
 transférase.

Durant l'hypoxie, la première modification biologique observée est la diminution de la concentration en ATP. Après 2 heures d'incubation sous hypoxie, on observe une diminution de 43% de la concentration en ATP chez les HUVEC.

Ce déficit en ATP conduit à un ralentissement de l'activité des pompes dépendant de l'ATP et notamment de la Ca^{2+} -ATPase, ce qui entraîne une perturbation de l'homéostasie ionique de la cellule. Une augmentation de la concentration calcique cytosolique est observée chez les HUVEC : celle-ci passe de 33 à 230 nM après 2 heures d'incubation sous hypoxie (Arnould *et al.*, 1992).

Le calcium est un second messager capable d'activer de nombreuses enzymes, dont par exemple la phospholipase A_2 (PLA_2) qui synthétise des médiateurs pro-inflammatoires.

On a montré que la PLA_2 était activée lorsque les HUVEC étaient incubées sous hypoxie (Michiels *et al.*, 1994). Cette activation conduit au relargage d'acide arachidonique et de lyso-PAF (*platelet-activating factor*) à partir des phospholipides membranaires. L'acide arachidonique est ensuite principalement transformé par la cyclooxygénase en prostaglandine (PG) dans les cellules endothéliales. Une très forte induction de la synthèse de PG, jusqu'à six fois, est mesurée lorsque les HUVEC sont incubées 2 heures sous hypoxie (Michiels *et al.*, 1993). Le lyso-PAF est, quant à lui, transformé en PAF par l'acétyltransférase. En conditions normales, les cellules endothéliales ne synthétisent pas de PAF. Cependant, pendant l'incubation sous hypoxie et à la suite de l'activation de la PLA_2 , une importante production de PAF par les HUVEC est mesurée. Le PAF n'est pas libéré dans le milieu et reste associé aux cellules (voir figure 1-2).

Ces résultats montrent que l'hypoxie est capable d'activer fortement les cellules endothéliales, conduisant à la libération de différents facteurs inflammatoires qui peuvent à leur tour interagir avec d'autres types cellulaires. Dans la paroi veineuse, les cellules endothéliales sont principalement en contact avec deux types cellulaires : les cellules musculaires lisses (CML) sous-jacentes, qui constituent les principales cellules de la média et sont responsables du tonus vasculaire, et les leucocytes circulant dans le sang. Parmi ceux-ci, les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) sont les plus abondants et sont sensibles aux médiateurs inflammatoires (Pober *et al.*, 1990).

Il fallait donc ensuite étudier comment l'hypoxie pouvait influencer les interactions entre les cellules endothéliales, d'une part, et les neutrophiles ou les cellules musculaires lisses, d'autre part.

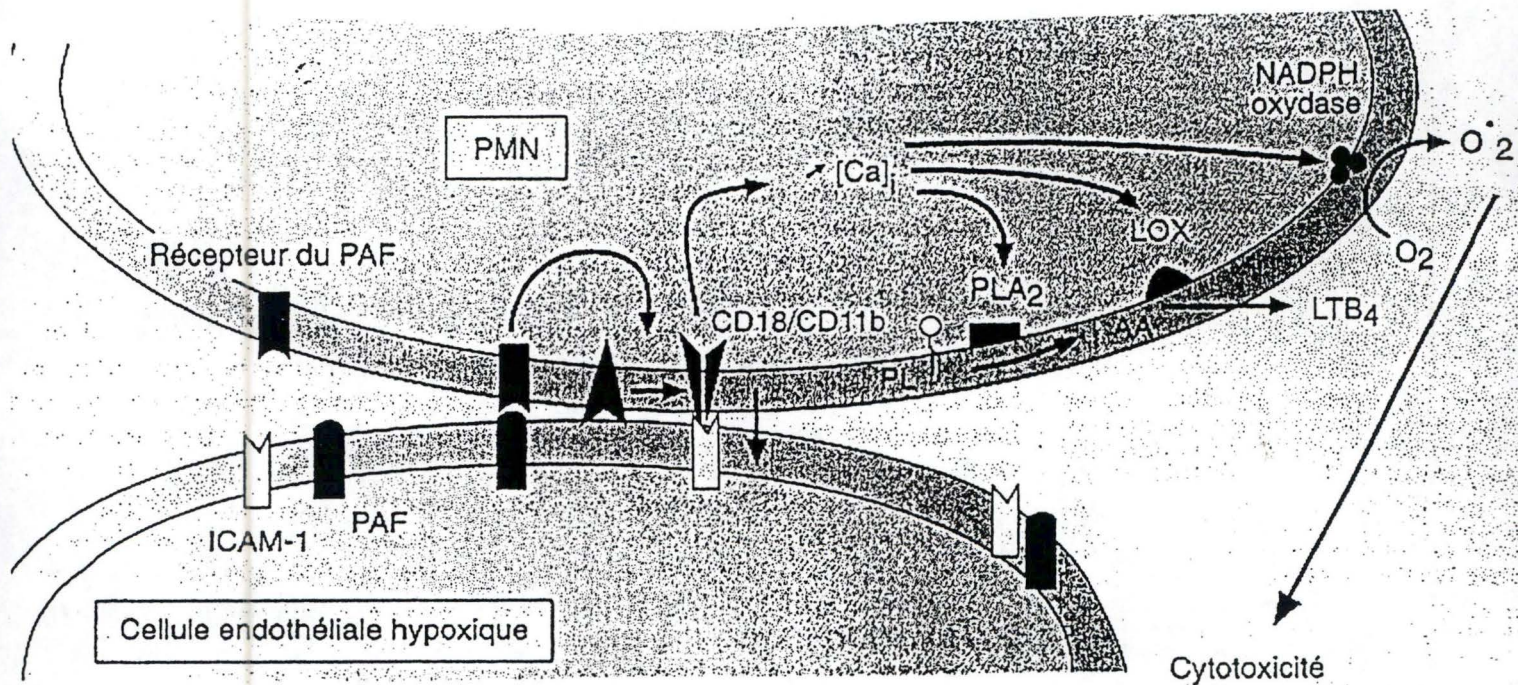


Figure 1-3 : Schéma illustrant les interactions induites par l'hypoxie entre cellule endothéliale et neutrophile.
 ICAM-1 : intercellular adhesion molecule-1; PAF : platelet-activating factor; PL : phospholipide; AA : acide arachidonique; Lox : lipoxygénase; LTB₄ : leukotriène B₄

L'adhérence des PMN aux cellules endothéliales est très faible dans des conditions normales, mais elle devient plus importante lorsque les PMN ou les cellules endothéliales sont activés (Zimmerman *et al.*, 1990). On observe que l'adhérence des PMN humains non stimulés aux HUVEC est augmentée si ces cellules ont été préalablement incubées sous hypoxie, et ce, d'autant plus que l'incubation sous hypoxie est longue. Cette adhérence est directement induite par le PAF présent à la surface des HUVEC ayant subi une incubation de 90 minutes sous hypoxie : elle est, en effet, complètement inhibée si la synthèse de PAF par les HUVEC est inhibée ou si la mesure de l'adhérence se fait en présence d'un antagoniste des récepteurs du PAF. Les PMN s'accrochent donc au PAF présent à la surface des HUVEC via leurs récepteurs du PAF, ce qui provoque l'activation des intégrines CD18/CD11b exprimées par les PMN (Arnould *et al.*, 1993). Celles-ci interagissent avec ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) exprimée de manière constitutive chez les HUVEC et stabilisent l'adhérence des PMN aux HUVEC. ICAM-1 est une molécule d'adhérence exprimée à la surface de nombreuses cellules. C'est une glycoprotéine appartenant à la famille des immunoglobulines et qui sert de ligand pour les intégrines exprimées par les leucocytes (Scozaec et Lesèche, 1993).

L'adhérence des PMN aux cellules endothéliales activées par l'hypoxie conduit aussi à une activation des PMN eux-mêmes, par suite de la liaison entre CD18/CD11b et ICAM-1. On peut ainsi observer une augmentation de la concentration calcique cytosolique dans ces PMN adhérents. Ils relarguent aussi une grande quantité d'anions superoxydes, ce qui implique l'activation de la NADPH oxydase et synthétisent du leucotriène B₄ suite à l'activation de la PLA₂ et de la 5-lipoxygénase (Arnould *et al.*, 1994). L'activation de ces différentes enzymes est probablement liée à l'augmentation de la concentration cytosolique en calcium. Une des conséquences importantes de cette activation des PMN est que ces cellules induisent alors une cytotoxicité au niveau des HUVEC auxquelles ils adhèrent : cette cytotoxicité est médiée par les radicaux libres sécrétés par les PMN (Arnould *et al.*, 1994).

Ces différents résultats montrent que l'hypoxie perturbe fortement les interactions "pacifiques" normales entre cellules endothéliales et PMN et engendre ainsi une situation typiquement inflammatoire avec adhérence et activation des PMN. Ces différentes interactions entre ces deux types cellulaires sont résumées dans la figure 1-3.

Un troisième type cellulaire peut également être impliqué dans ce processus : il s'agit des cellules musculaires lisses (CML) qui, dans la paroi veineuse, sont sous-jacentes aux cellules endothéliales. Les interactions entre ces deux types cellulaires ont été étudiées de manière indirecte en examinant l'influence de milieux conditionnés par des HUVEC maintenues sous

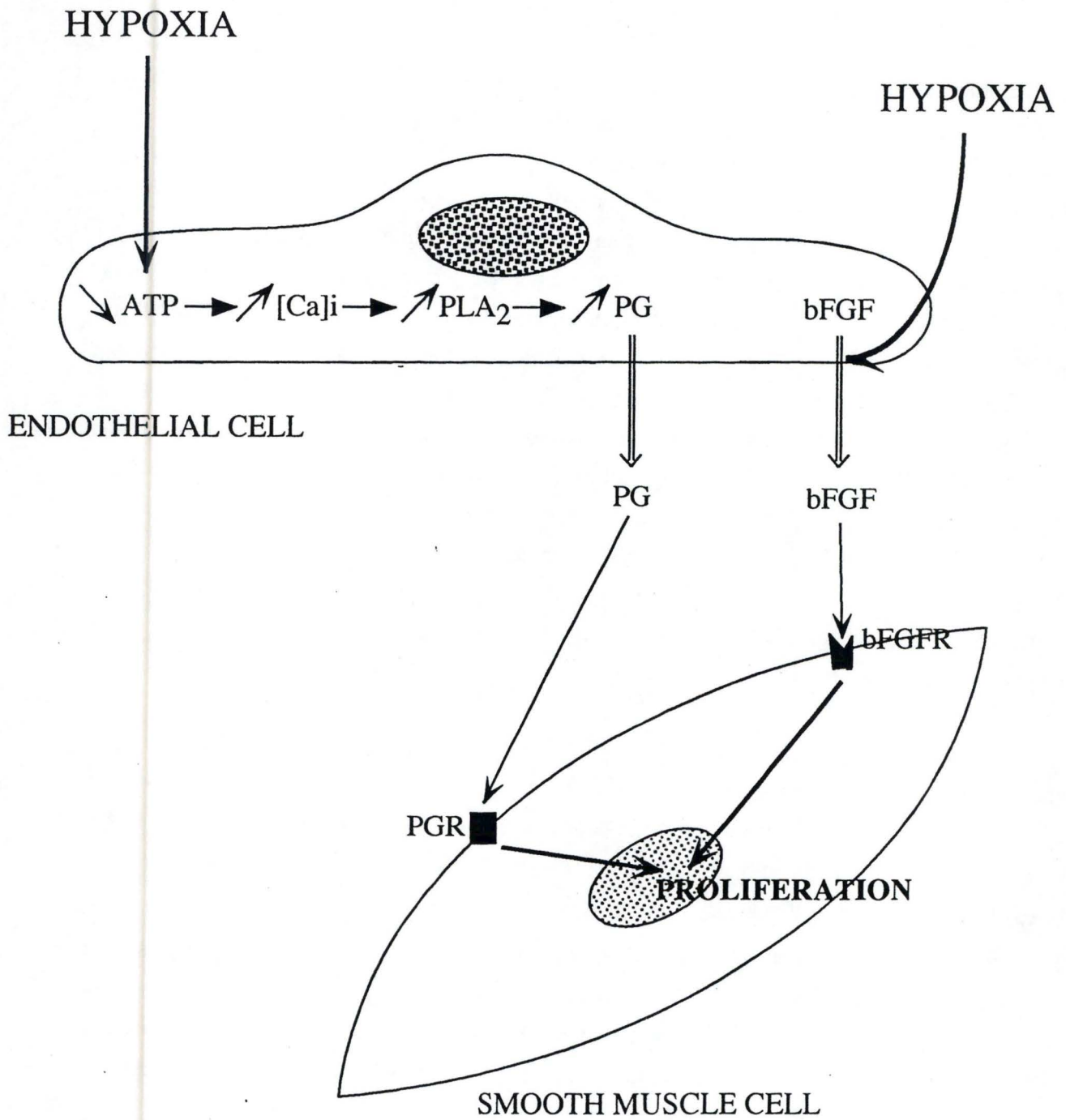


Figure 1-4 : Représentation schématique de l'action combinée de la $PGF_{2\alpha}$ et du bFGF sur la prolifération des cellules musculaires lisses induite par les cellules endothéliales hypoxiques (D'après Michiels *et al.*, 1994).

hypoxie, sur la prolifération de CML *in vitro*. Le milieu conditionné est obtenu en incubant des HUVEC sous hypoxie pendant deux heures et en reprenant le milieu d'incubation. Ce milieu est alors ajouté aux CML et leur prolifération est mesurée au cours du temps. Une activité pro-proliférative pour les CML a pu être mise en évidence en présence du milieu conditionné par les HUVEC sous hypoxie par comparaison au milieu de cellules témoins (Michiels *et al.*, 1994). Elle est le résultat de l'activation des HUVEC par l'hypoxie car, lorsque l'activation de ces cellules est bloquée par le β -hydroxybutyrate, on n'observe plus de prolifération des CML. Diverses expériences réalisées en présence de différents inhibiteurs ont permis de démontrer que les prostaglandines synthétisées en grande quantité par les HUVEC incubées sous hypoxie étaient en partie responsables de cette activité mitotique. La $\text{PGF}_{2\alpha}$ a l'effet le plus important. Elle agit en synergie avec un autre facteur, qui n'est ni une protéine synthétisée *de novo*, ni le PAF, mais probablement le bFGF (*basic fibroblast growth factor*) (Michiels *et al.*, 1994) (voir figure 1-4).

Ces différents résultats montrent clairement que les cellules endothéliales peuvent être stimulées *in vitro* par l'hypoxie, une situation qui mime l'ischémie qui se produit *in vivo* dans les vaisseaux sanguins durant la stase veineuse : l'ischémie, occasionnée par un arrêt de la circulation sanguine, entraîne une diminution de l'apport en oxygène et en nutriments au tissu normalement irrigué et prévient l'élimination des déchets métaboliques et du CO_2 . Par ailleurs, l'hypoxie réalisée *in vitro* n'entraîne qu'une diminution en oxygène. Le modèle expérimental est donc réductionniste, mais il a l'avantage de pouvoir disséquer l'influence de chaque paramètre, ici le rôle de l'oxygène, sur une population pure de cellules. Il reste cependant tout à fait pertinent car de nombreuses études sur des organes isolés ou perfusés *in situ* ont montré que la diminution de la pression partielle en O_2 est l'acteur principal des dommages occasionnés par une ischémie.

L'activation des cellules endothéliales par l'hypoxie initie une cascade d'évènements impliquant neutrophiles et cellules musculaires lisses qui peut, lorsqu'elle est transposée *in vivo*, expliquer le développement de veines variqueuses.

L'adhérence des PMN aux cellules endothéliales n'est que la première étape du processus de diapédèse qui conduit à l'infiltration des PMN dans l'intima et dans la média des veines (Montefort et Holgate, 1991). Ces PMN sont aussi 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.

Pour tenter d'expliquer l'apparition des varices *in vivo*, l'hypothèse proposée est la suivante : ce sont les modifications du métabolisme des cellules de la paroi veineuse, induites par l'ischémie résultant de la stase du sang dans les membres inférieurs, qui initieraient une cascade d'évènements conduisant, finalement à la situation pathologique. Le mécanisme biochimique décrit ci-dessus a été proposé par Michiels *et al.* (1994) pour relier cette stase veineuse aux modifications tissulaires observées dans ces maladies. Ce lien a pour acteur principal la réaction de l'endothélium à l'hypoxie.

En 1995, après de nombreux autres travaux réalisés sur la veine ombilicale humaine montrant des effets similaires de l'hypoxie sur l'endothélium d'une veine complète par rapport aux cellules endothéliales isolées (Arnould *et al.*, 1995), la même équipe a mis au point un nouveau modèle expérimental qui se rapproche plus de la situation physiopathologique réelle (Bouaziz, 1995). Ce modèle a tout son intérêt ici puisqu'il utilise des fragments de veine saphène humaine. La veine saphène est, en effet, un des territoires principalement affectés par les varices.

Cette recherche a montré qu'en incubant ces fragments pendant des temps croissants sous hypoxie, l'adhérence des polymorphonucléaires neutrophiles non activés à l'endothélium des veines saphènes augmente considérablement, et ce, d'autant plus que le temps d'incubation sous hypoxie est long.

L'équipe a également montré que l'adhérence des PMN à l'endothélium des veines saphènes pré-incubées en hypoxie est considérablement inhibée par les antagonistes du PAF, par l'acide oléique inhibiteur de la synthèse de ce médiateur et par l'anticorps monoclonal anti-ICAM-1. En comparaison avec les travaux réalisés au laboratoire sur la veine ombilicale complète et sur les cellules endothéliales isolées, ces résultats montrent que le même mécanisme biochimique est mis en jeu dans les trois modèles expérimentaux, c'est-à-dire que le PAF joue un rôle important dans l'initiation de l'adhérence des PMN aux cellules endothéliales qui se renforce alors via la liaison de leurs intégrines CD11b/CD18 aux molécules d'ICAM-1 exprimées à la surface des cellules endothéliales.

Grâce à des études morphologiques, N. Bouaziz (1995) a constaté que les neutrophiles adhérents à l'endothélium des veines saphènes préalablement incubées en hypoxie montrent une surface rugueuse caractérisée par la présence de nombreux replis membranaires qui témoignent de leur état activé.

On peut donc penser que l'adhérence des neutrophiles à l'endothélium de veines saphènes hypoxiques, leur activation avec libération de radicaux libres et de médiateurs de l'inflammation et leur éventuelle infiltration subséquente miment probablement très bien ce qui se passe *in vivo* lors de la stase veineuse conduisant ainsi aux agressions pariétales qui, à force d'être répétées, vont conduire à l'épaississement de la paroi des veines variqueuses.

Au vu de ces informations, on peut conclure que d'un point de vue tissulaire et cellulaire, tous les éléments de la paroi vasculaire subissent des modifications. Ces dernières surviennent à la suite d'évènements provenant d'interactions entre les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses.

On observe quatre grandes modifications dans les veines variqueuses, les voici décrites et interprétées une par une à la lumière de cette hypothèse :

a) L'endothélium est conservé

Dans la paroi des veines variqueuses, l'endothélium est toujours présent même si d'autres types cellulaires comme les cellules musculaires lisses subissent de profonds changements.

In vitro, expérimentalement, il a été montré que l'hypoxie, mimant l'ischémie résultant d'une stase veineuse, induit effectivement des changements métaboliques importants au sein des cellules endothéliales sans induire de mortalité. Suite à l'hypoxie, les cellules endothéliales sont activées et relarguent des médiateurs de l'inflammation et des facteurs de croissance influençant les cellules musculaires lisses. Cependant, la viabilité cellulaire est conservée. Ainsi, l'hypoxie permet d'expliquer le recrutement des neutrophiles et la prolifération des cellules musculaires lisses alors que la barrière endothéliale reste intacte. Tout ceci provoquera ensuite un remaniement de la paroi vasculaire.

b) Présence d'enzymes lysosomales et de radicaux libres

Une grande quantité d'enzymes lysosomales (Niebes, 1990) est retrouvée dans les couches cellulaires sous-endothéliales de la paroi vasculaire.

Le modèle expérimental du laboratoire montre que les neutrophiles adhèrent à l'endothélium activé par l'hypoxie. Lors de ce processus, les neutrophiles sont activés et relarguent différents médiateurs de l'inflammation tels que des radicaux libres et des

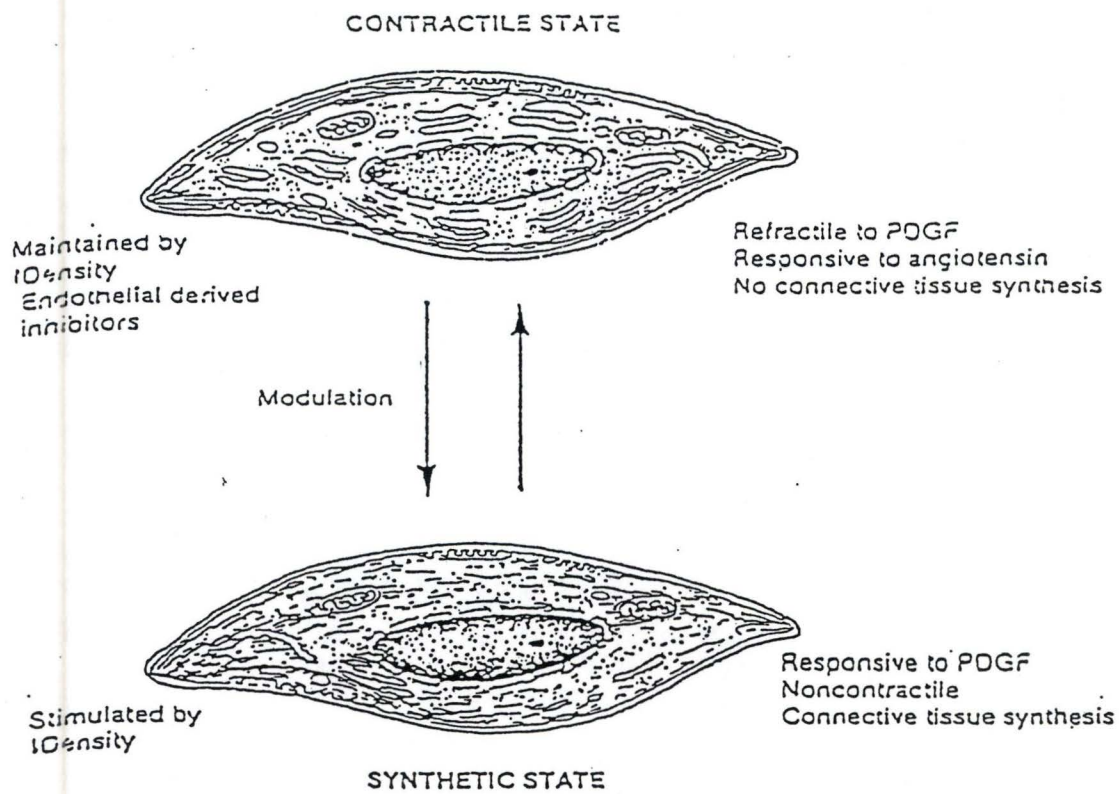


Figure 1-5 : Représentation de la modulation phénotypique de l'état contractile vers l'état synthétique chez les cellules musculaires lisses (D'après Ross, 1981).

protéases. Ceci peut donc expliquer la présence d'enzymes lysosomales dans la paroi veineuse.

c) Modification du collagène

Les molécules de collagène et les protéoglycanes sont altérés dans la paroi des veines variqueuses. On constate notamment une augmentation de la quantité de collagène soluble.

Les radicaux libres sont connus pour être capables de fragmenter le collagène et les protéoglycanes. Ils sont, comme diverses protéases, relargués par les neutrophiles 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.

d) Désorganisation de la paroi vasculaire

Un épaissement et une désorganisation de la paroi veineuse sont aussi les caractéristiques typiques des veines variqueuses. Elles sont explicables par la prolifération des cellules musculaires lisses observées *in vitro*. Ces cellules constituent alors le type cellulaire majeur de l'intima (Thibaut-Vercriyssen *et al.*, soumis). 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, secrètent plus de matrice extracellulaire et notamment plus de collagène, sont prolifératives et perdent l'expression de la myosine et de l' α -actine. Cette modulation phénotypique pourrait également être le résultat de l'action des médiateurs relargués par les cellules endothéliales activées par l'hypoxie.

Ces changements fonctionnels chez les cellules musculaires lisses entraînent des modifications quantitatives et qualitatives dans la synthèse des protéines du tissu conjonctif. Ce phénomène porte le nom de « modulation phénotypique », il correspond au passage des cellules musculaires lisses d'un état principalement contractile à un état synthétique et/ou mitotique (Thyberg *et al.*, 1990 ; Chamley-Campbell, 1981) (figure 1-5). L'épaississement de l'intima est dû à une accumulation de matrice extracellulaire ainsi qu'à une migration et une prolifération des cellules musculaires lisses (Ross, 1981).

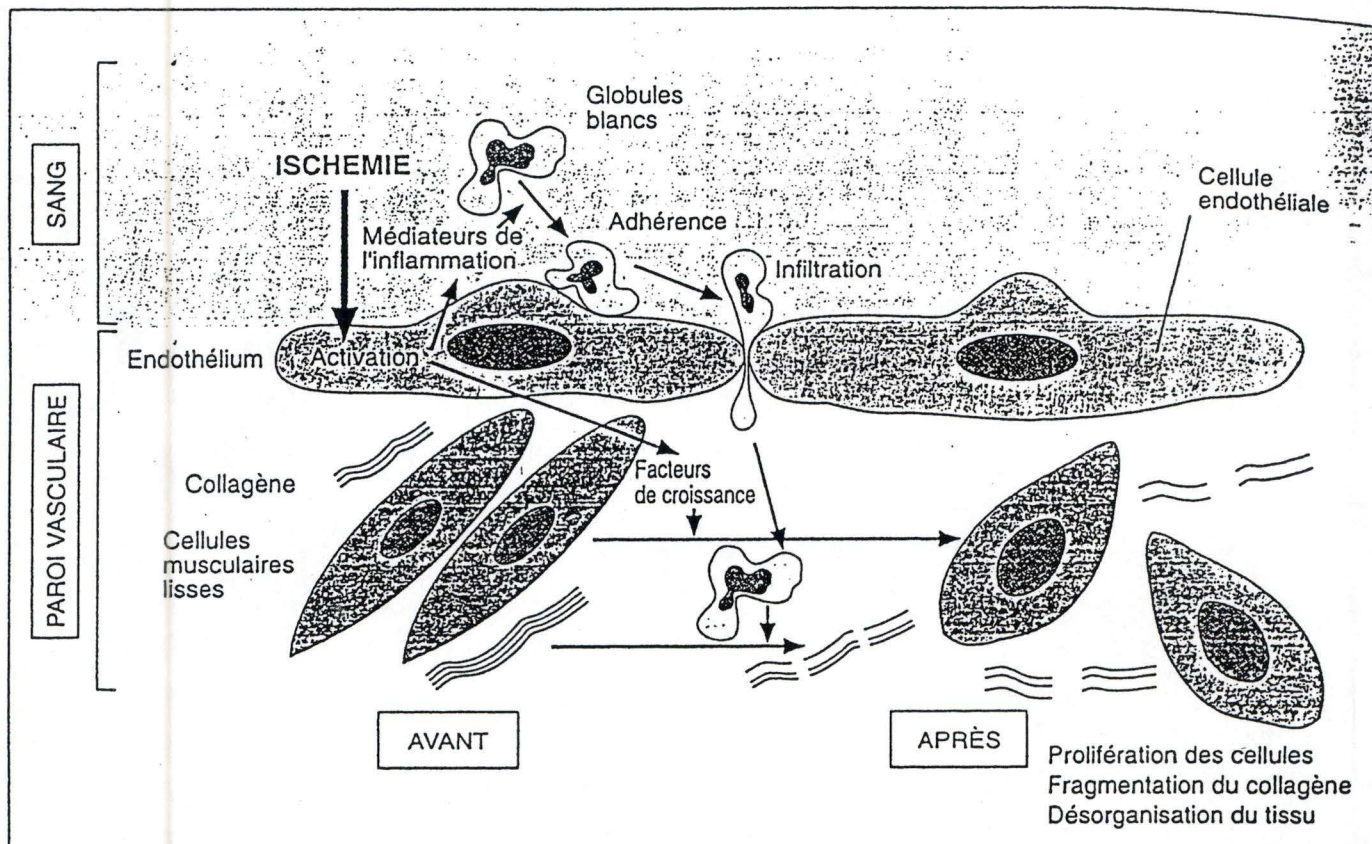


Figure 1-6 : Désorganisation de la paroi d'une veine soumise à l'ischémie. L'activation des cellules endothéliales avec les PMN neutrophiles entraînent une désorganisation et une altération de la paroi vasculaire caractérisées par une prolifération des cellules musculaires lisses qui perdent leurs propriétés contractiles, des altérations de la matrice extracellulaire (collagène et protéoglycanes) sous l'effet des anions superoxydes et des protéases.

La prolifération des cellules musculaires lisses, ainsi que leur capacité accrue de synthèse des composés de la matrice extracellulaire peuvent donc facilement rendre compte de l'épaississement de la paroi veineuse pathologique.

Tout ceci explique la désorganisation observée dans les veines variqueuses. Cette désorganisation du tissu conjonctif et la perte de la contractibilité des cellules musculaires lisses conduisent également à des altérations du tonus vasculaire.

En conclusion, on remarque que l'activation des cellules endothéliales pendant la stase veineuse est le facteur initial de la maladie veineuse. L'endothélium paraît jouer un rôle important dans le remaniement vasculaire, en produisant des médiateurs qui modifient la structure des veines en interagissant avec les cellules musculaires lisses (voir schéma général du modèle figure 1-6).

3) Modèle de l'organoculture

Si les études décrites précédemment ont permis de développer une hypothèse pouvant expliquer l'apparition des veines variqueuses et ont mis en évidence le rôle primordial des cellules endothéliales, elles ont cependant leurs limites.

D'une part, les cultures de cellules pures, cellules endothéliales ou cellules musculaires lisses, si elles permettent un suivi à long terme, sur plusieurs jours, ne permettent pas d'étudier les interactions entre types cellulaires dans une topologie tissulaire correcte ni dans le contexte de leur matrice extracellulaire d'origine. D'autre part, les perfusions de veines ombilicales ou saphènes ne peuvent donner des résultats interprétables que sur des périodes courtes, de l'ordre de quelques heures.

Afin de se rapprocher le plus possible de l'évolution d'une veine saine vers une veine variqueuse, le modèle de l'organoculture de veine saphène humaine a été développé au laboratoire (Gille, 1996). Il s'agit de maintenir en culture des petits morceaux de veine saphène. Ce modèle présente les avantages d'utiliser le tissu principalement touché *in vivo* par la pathologie étudiée et de pouvoir suivre dans une paroi veineuse intacte l'organisation mais aussi la prolifération, la différenciation et le métabolisme des différents types cellulaires présents dans cette paroi. On peut ainsi espérer mieux comprendre le développement des altérations tissulaires typiques des veines variqueuses.

Les premières organocultures de paroi vasculaire ont été mises au point par Pederson et Bowyer en 1985 à partir de segments d'aorte de lapin. La viabilité de ces fragments est maintenue pendant 3 semaines et ce modèle a permis de suivre la prolifération des cellules endothéliales et la cicatrisation de l'endothélium après dénudation.

Ce modèle d'organoculture a ensuite été adapté à la veine saphène humaine par Soyombo *et al.* (1990). Il est possible de suivre la viabilité des fragments en dosant la quantité d'ATP associée au tissu. Par ailleurs, l'intégrité de l'endothélium est préservée comme le montrent les études en microscopie électronique à balayage (Soyombo *et al.*, 1990; Gille, 1996).

Des coupes transversales ont mis en évidence qu'une néointima se développait "spontanément" dans les organocultures. Les marquages immunocytochimiques ont révélé

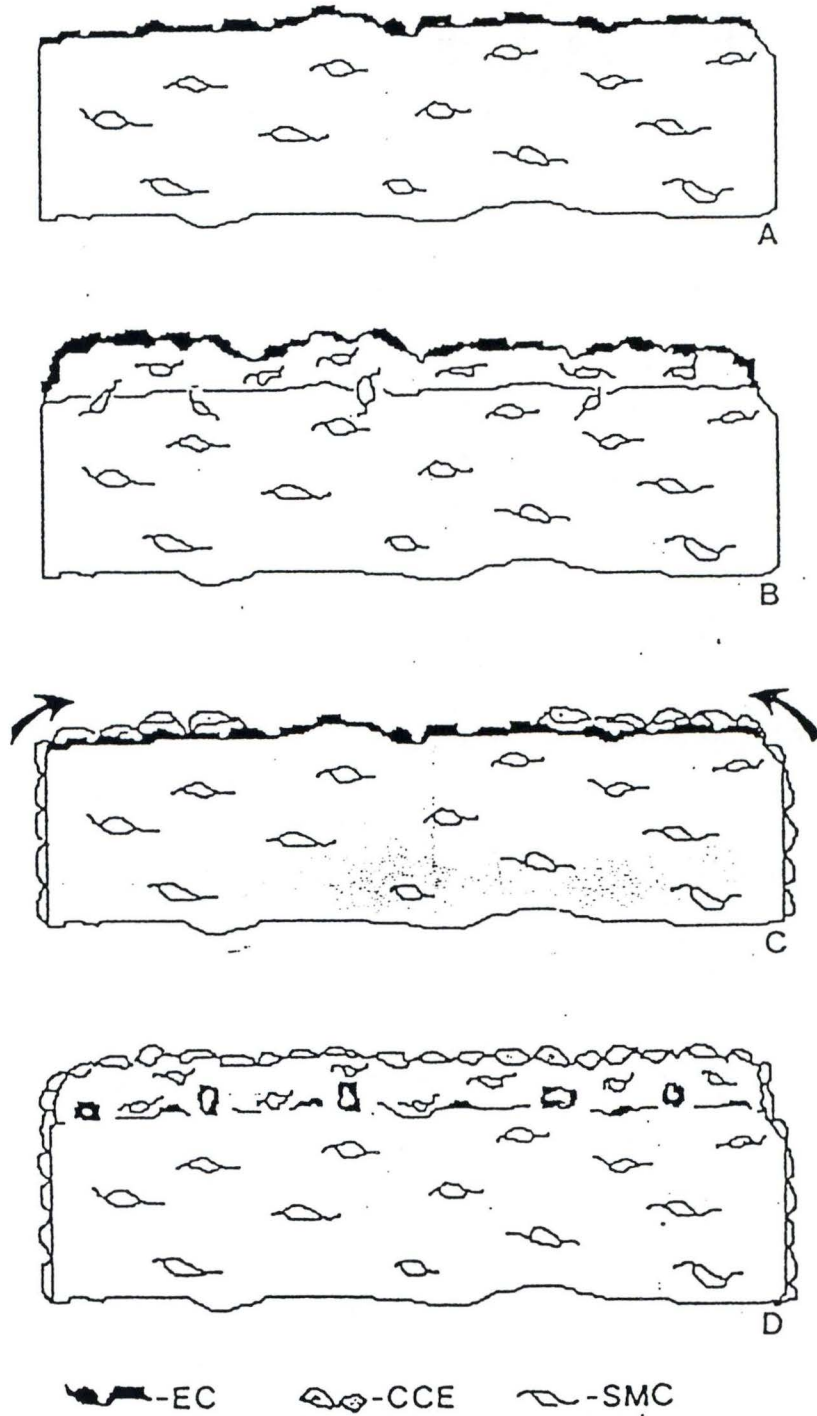


Figure 1-7 : EC=cellules endothéliales, CCE=cellules provenant du bord coupé de l'échantillon, SMC=cellules musculaires lisses.
A-B=évolution schématique d'un morceau de veine saphène subissant une organoculture. formation de la néointima. C= Prolifération des CML du bord coupé de ce même morceau de veine en culture. D=vision schématique de la néointima observée par Slomp *et al.*, avec les cellules endothéliales englobées et les capillaires sanguins (D'après Slomp *et al.*, 1995).

que cette néointima était composée de cellules musculaires lisses. De plus, par incorporation de thymidine tritiée et autoradiographies, une prolifération de ces cellules musculaires lisses a été démontrée. Ces résultats suggèrent que le développement de la néointima résulte à la fois de la migration et de la prolifération des cellules musculaires lisses, phénomènes probablement initiés par de légers traumatismes induits à la paroi veineuse lors de la préparation proprement dite des fragments de veines à l'organoculture (Soyombo *et al.*, 1990).

Il est à noter que le développement d'une néointima spontanée se passe également dans les organocultures d'artères mammaires (Holt *et al.*, 1992). Récemment Slomp *et al.* (1996) ont proposé que la néointima spontanée, dans une organoculture de veines saphène humaine, résulte non pas de la migration et de la prolifération dans la couche sous-endothéliale des cellules musculaires lisses de la média mais plutôt de la migration des cellules musculaires lisses des bords des fragments de veine au-dessus de l'endothélium où elles proliféreraient (voir figure 1-7). Des différences au niveau des conditions de culture sont peut-être responsables des différences observées au niveau des résultats.

Il faut noter que les études morphologiques réalisées par I. Gille (1996) en microscopie électronique à balayage ont montré que, dans les conditions de culture utilisées au laboratoire, l'endothélium reste intact à la surface des fragments de veine maintenus en culture.

Comme le processus de développement de la néointima spontanée est bien caractérisé, il reste possible d'étudier l'effet d'autres processus mécaniques ou de la présence de facteurs de croissance qui peuvent accentuer le développement d'un épaissement de la paroi veineuse.

Ainsi, Soyombo *et al.* (1993 a) et Holt *et al.* (1992) ont mis en évidence que le fait d'induire un étirement exagéré des fragments provoque un épaissement très important de la néointima.

Les mécanismes biochimiques responsables de ce processus peuvent également être étudiés. Ainsi, Soyombo *et al.* (1995) ont montré qu'il était possible de prévenir l'épaississement de l'intima induit mécaniquement sur des fragments de veines saphènes par l'ajout d'un analogue de l'AMPc ou du GMPc qui sont des agents qui miment respectivement l'action de la prostacycline et de l'oxyde nitrique ou EDRF (*endothelium-derived relaxing factor*). Ces deux molécules sont deux médiateurs vasoactifs synthétisés par les cellules endothéliales. Par ailleurs, Soyombo *et al.* (1993 b) ont suggéré un rôle du bFGF dans la prolifération des cellules musculaires lisses responsables du développement de la néointima. En effet, les anticorps neutralisants anti-bFGF inhibent la formation de la néointima. De plus,

George *et al.* (1995) ont mis en évidence une augmentation de l'expression du PDGF dans les cellules musculaires lisses de la néointima et proposent un rôle de ce facteur de croissance dans la migration des cellules musculaires lisses de la média vers les couches sous-endothéliales.

Le modèle de l'organoculture constitue donc un bon modèle expérimental pour étudier le développement d'un épaissement au niveau de la paroi veineuse ainsi que pour investiguer le rôle des différents médiateurs dans ce processus.

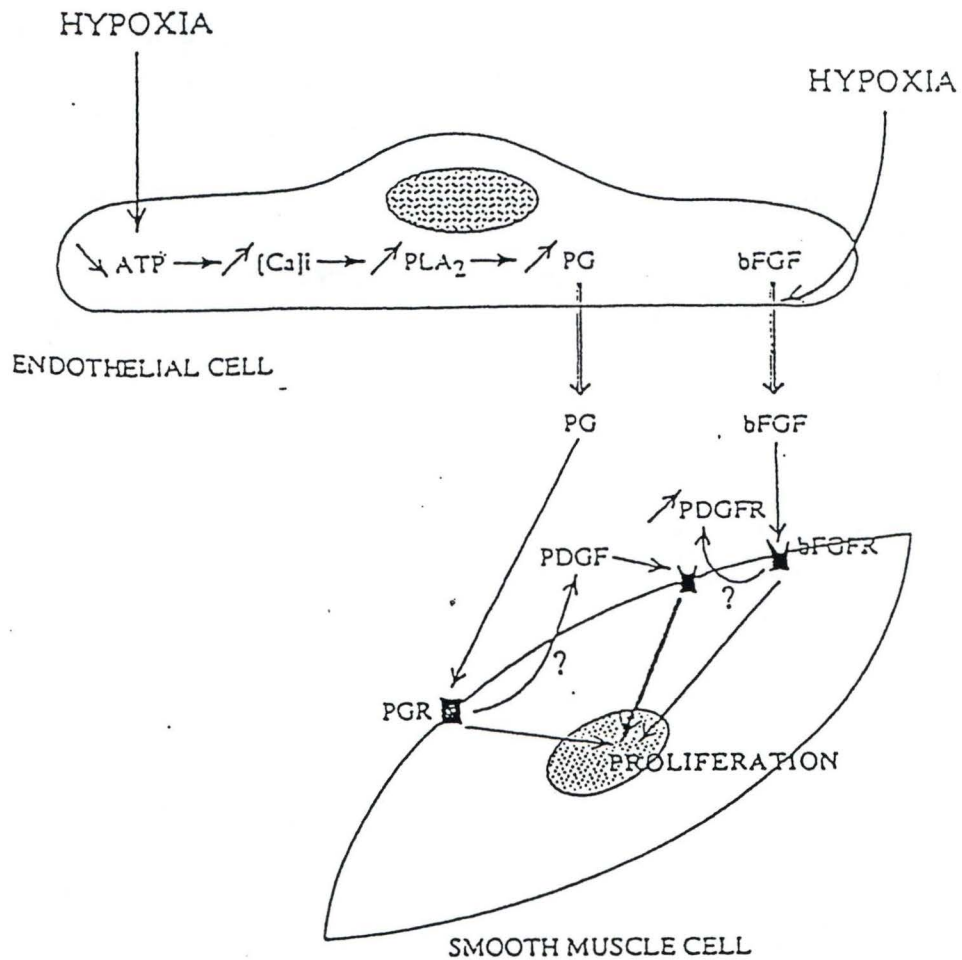


Figure 1-8 : Hypothèse expliquant l'action synergique de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ et du bFGF dans la prolifération des cellules musculaires lisses induite par les cellules endothéliales hypoxiques, ainsi que le rôle éventuel du PDGF (D'après Michiels *et al.*, 1994).

4) Le PDGF

4.1) Rôle du PDGF dans la pathologie des veines variqueuses

Facteur de croissance ubiquitaire, le PDGF intervient dans la croissance et la prolifération de plusieurs types de cellules normales et pathologiques. Il est également impliqué dans les processus de réparation tissulaire, dans certaines transformations néoplasmiqmes et dans les maladies fibrosantes, telles que l'athérosclérose, la myélofibrose ou la fibrose pulmonaire (Bryckaert *et al.*, 1991).

Lors de l'étude de l'effet de l'hypoxie sur les HUVEC en culture par Michiels *et al.* en 1994, il a été montré que ces dernières relarguaient dans le milieu de culture, des prostaglandines (PG) et du bFGF. Lorsque ce milieu a été mis en présence de CML, la même équipe a montré que ces facteurs agissaient en synergie pour provoquer la prolifération de ces cellules musculaires. Ils ont remarqué que, si ces deux facteurs agissaient par eux-mêmes sur les mécanismes de prolifération des CML, une action synergique entre ces 2 facteurs est observée : les PG induiraient la synthèse de PDGF par les CML et le bFGF serait, lui, responsable de la synthèse du récepteur de ce même PDGF. Il s'agirait alors d'une induction de synthèse autocrine du PDGF par les cellules musculaires lisses qui provoquerait la prolifération accrue de ces dernières (Michiels *et al.*, 1994) (voir figure 1-8).

Des résultats obtenus dans les recherches sur l'origine de l'athérosclérose avaient déjà suggéré que les CML pouvaient être stimulées de façon autocrine et paracrine par le PDGF (Hannink et Donoghue, 1989) et que ce PDGF pouvait être important dans le développement de la néointima.

Le rôle du PDGF dans le développement des veines variqueuses n'est pas du tout connu mais son étude est essentielle car la plupart des cellules qui y sont impliquées sont capables soit de le synthétiser, soit d'induire sa synthèse par les CML. De plus, la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses que l'on observe lors de cette pathologie pourraient

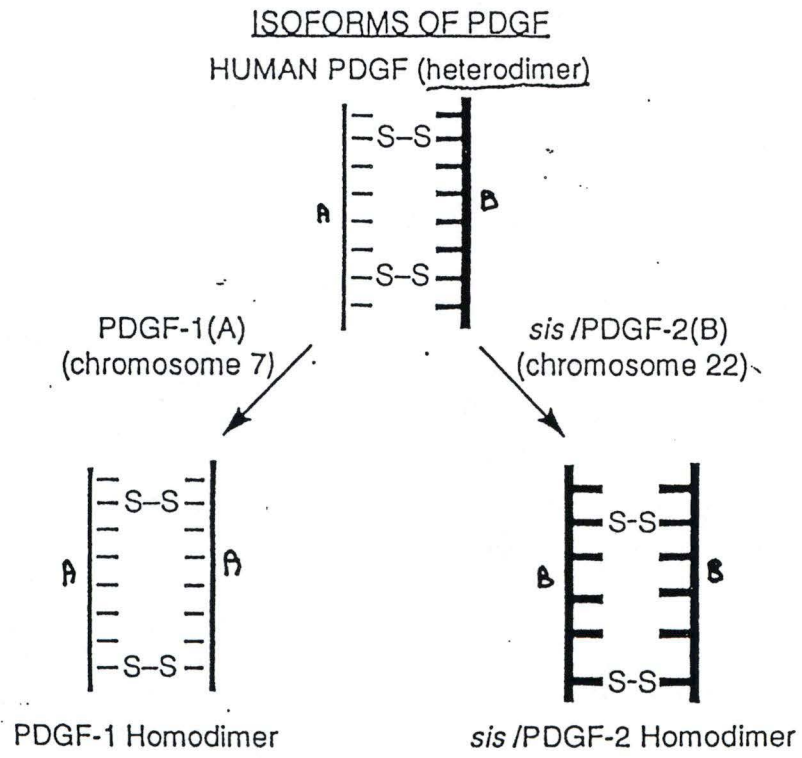


Figure 1. Isoforms of platelet-derived growth factor.

Figure 1-9 : Les différentes isoformes du PDGF (D'après Antoniades, 1991).

être grandement favorisées par ce facteur de croissance, qui a effectivement un rôle mitogène et chémoattracteur sur ces cellules.

Les caractéristiques biochimiques de ce facteur de croissance seront décrites dans la suite de ce chapitre.

4.2) Origine du PDGF

Le PDGF (*platelet-derived growth factor*) a été le premier polypeptide isolé et reconnu comme facteur de croissance dans le sérum humain (Scher *et al.*, 1974; Antoniades *et al.*, 1975). Il représente la majeure partie de l'activité stimulatrice de la croissance et sa concentration dans le sérum est estimée aux alentours de 50 ng/ml (Antoniades et Scher, 1977).

Pendant plusieurs années, on a cru que l'origine cellulaire du PDGF était limitée aux plaquettes - d'où son nom. Balk *et al.* (1971) avaient, en effet, constaté que le sérum obtenu après coagulation du sang stimulait la prolifération des fibroblastes alors qu'un plasma pauvre en plaquettes était dépourvu d'activité mitogène. On sait aujourd'hui que plusieurs types de cellules normales ou transformées peuvent synthétiser et sécréter le PDGF, premier facteur de croissance reconnu, en 1983, comme étant le produit d'un oncogène, le *c-sis* (Bryckaert *et al.*, 1991).

4.3) Caractéristiques biochimiques du PDGF

La glycoprotéine PDGF est un dimère de 30 kDa composé de deux chaînes polypeptidiques. Deux chaînes différentes peuvent être exprimées selon le type de cellules : la chaîne A et la chaîne B. Ces deux chaînes ont 60% d'homologie de structure et peuvent se dimériser sous forme AA, BB ou AB (voir figure 1-9). La présence de 16 résidus cystéine confère à la molécule une grande stabilité (Bryckaert, 1991). La position de ces résidus étant homologue sur la chaîne A et la chaîne B, il en résulte une structure tertiaire identique pour les différentes isoformes. Le PDGF humain injecté intravasculairement chez un singe a un temps de demi-vie de plus ou moins 2 minutes (Bowen-Pope *et al.*, 1984). Sa purification a montré qu'il était relativement stable à la chaleur, fortement cationique et sensible aux agents réducteurs.

4.4) Synthèse et expression du PDGF

Depuis sa découverte dans les plaquettes, le PDGF a été localisé dans un grand nombre de cellules normales et transformées : macrophages, cellules endothéliales activées, CML, etc... .

La distribution des différents dimères du PDGF est variable suivant le type cellulaire. Dans les plaquettes humaines, par exemple, l'isoforme AB est prédominante, alors que les deux isoformes AA et BB ne représentent que 27% à 41% du total (Hart *et al.*, 1988). Dans les cellules endothéliales, c'est le PDGFB qui est prédominant, mais cela uniquement en cas de "blessure" de l'endothélium; dans les CML c'est le PDGFA qui se rencontre le plus souvent (Lindner et Reidy, 1995). Ces différences de distribution posent le problème de la régulation de l'expression des chaînes A et B.

Ces deux chaînes sont codées par deux gènes situés sur des chromosomes différents : le chromosome 7 pour la chaîne A et le chromosome 22 pour la chaîne B (Betsholtz *et al.*, 1986). La découverte que cette dernière est codée par le protooncogène *c-sis*, homologue cellulaire de l'oncogène viral du sarcome simien, a constitué la première démonstration d'une relation directe entre le produit d'un oncogène et un facteur de croissance (Waterfield *et al.*, 1983).

Le gène de la chaîne A code pour 3 ARN messagers (1,9 ; 2,3 et 2,8 kb) et pour seulement deux précurseurs alternatifs issus d'un épissage alternatif qui diffèrent par leur région C-terminale. En revanche, le gène de la chaîne B code pour un seul ARN messager de 3,5 kb. Il semblerait que la régulation des gènes des deux chaînes du PDGF soit indépendante, sans doute pour permettre une régulation de la concentration des différentes formes du PDGF.

La chaîne A et la chaîne B ont une séquence signal. Elles ont cependant des propriétés différentes : la chaîne A est plus facilement sécrétée que la chaîne B qui, quant à elle, reste volontiers associée aux membranes et à l'appareil de Golgi et se caractérise par un pouvoir transformant plus important (La Rochelle et Giese, 1990).

Lors d'études sur l'athérosclérose, un groupe de recherche a mis en évidence que la synthèse des ARNm de PDGFA et B était localisée dans une zone de l'artère qu'ils étudiaient; zone qui avait été abîmée volontairement par PTCA (*percutaneous transluminal coronary*

angioplasty). Cela suggère que l'expression de ces facteurs est directement liée à la réponse de réparation (Ueda *et al.*, 1996).

4.5) Les différentes fonctions du PDGF

Voici un aperçu d'une série de fonctions découvertes chez le PDGF ; on ne les a, sans doute, pas encore toutes découvertes. De plus, il existe aussi beaucoup d'interactions avec d'autres molécules que nous ne décrirons pas ici.

1) L'action mitogène

L'action majeure du PDGF est d'induire des mitoses dans des cellules quiescentes ciblées, telles que les fibroblastes, les ostéoblastes, les cellules musculaires lisses et les cellules gliales du cerveau. Ces cellules expriment le récepteur du PDGF qui est sensible à de très faibles concentrations en PDGF (0,1 nM). Toutes les isoformes du PDGF peuvent exercer une action mitogène (Hosang *et al.*, 1989). Comme décrit par Hosang *et al.* (1989), les différences d'efficacité mitogénique des différentes isoformes ne sont pas relatives à leurs différences intrinsèques mais, plutôt déterminées par le type de récepteur de la cellule ciblée (voir les récepteurs ci-après).

2) Mode d'action du PDGF dans la régulation de la croissance cellulaire

Les premières études ont montré que le PDGF seul ne produisait pas une stimulation optimale de la réplication de l'ADN ni de la division cellulaire sur des cultures de cellules 3T3. L'action synergique du PDGF et du plasma pauvre en plaquettes est requise pour une croissance cellulaire optimale (Pledger *et al.*, 1978). Certains des facteurs du plasma nécessaires pour l'action synergique du PDGF ont été montrés comme appartenant à une famille de polypeptides possédant une activité insulín-like, aussi nommée somatomédine (Stiles *et al.*, 1979). Ces découvertes ont permis une meilleure compréhension du contrôle de la croissance cellulaire, au niveau de la transition entre la phase G_0/G_1 et la phase S du cycle cellulaire. Cette transition se divise donc en deux étapes : la première appelée la « compétence » est contrôlée par le PDGF et permet à la cellule d'entrer en phase G_1 tandis que la seconde appelée « progression », est contrôlée par des facteurs issus d'un plasma pauvre en plaquettes et permet d'entrer dans la phase S. Cela sous-entend que le signal induit

par le PDGF dans les cellules « compétentes » est stable, même après la disparition du PDGF.

3) L'action chémotactique du PDGF

En plus de stimuler la croissance, le PDGF s'est montré être un chémoattracteur puissant pour des CML d'artère en culture (Grotendorst *et al.*, 1981) et pour des fibroblastes (Seppa *et al.*, 1982). Les effets chémotactiques sont induits avec des concentrations comparables ou même plus basses que celles nécessaires pour la synthèse d'ADN. La migration, à l'inverse de la synthèse de l'ADN, ne nécessite pas la présence de facteurs de « progression » venant du plasma. La capacité du PDGF à stimuler la migration et la prolifération des cellules indique son rôle important dans la cicatrisation des blessures et le remodelage des tissus.

4) D'autres fonctions du PDGF

Le PDGF est aussi promoteur de divers effets pléiotropiques sur le métabolisme de la cellule. Il stimule le transport des acides aminés et la synthèse des protéines (Owen *et al.*, 1982), ainsi qu'une augmentation de l'estérfication du cholestérol (Chait *et al.*, 1980).

Le PDGF s'est aussi montré être un agent vasoconstricteur potentiel, ses effets sont même plus prononcés que celui d'autres vasoconstricteurs bien connus comme l'angiotensine II (Berk *et al.*, 1986).

D'autres fonctions ont été découvertes, comme la stimulation de la synthèse des composants principaux de la matrice extracellulaire, c'est-à-dire du collagène, des glycosaminoglycans et des protéoglycans.

L'activité collagénase des fibroblastes humains du derme est également stimulée par le PDGF (Bauer *et al.*, 1985). Cette enzyme est impliquée dans l'initiation de la dégradation du collagène. Le PDGF, par son action stimulatrice de la synthèse et de la dégradation du collagène, joue un rôle important dans le remodelage des tissus et leur développement. Cependant, malgré ces effets stimulateurs sur les fibroblastes du derme, le PDGF ne stimule pas la production de l'ARNm de la collagénase dans les fibroblastes synoviaux, ce qui suggère des différences d'action du PDGF en fonction du type de fibroblastes (Kumkumian *et*

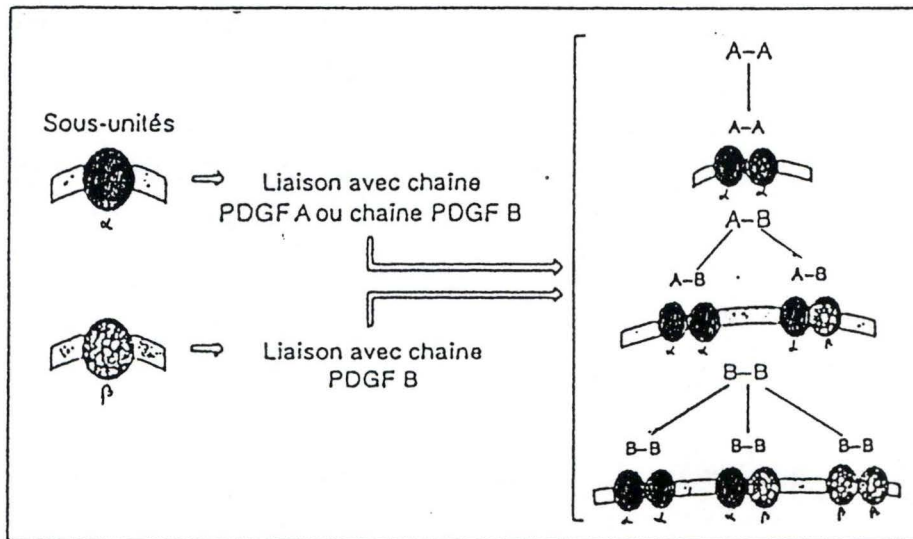


Figure 1-10 : Modèle représentant les différentes sous-unités du récepteur du PDGF. Le récepteur du PDGF est formé de deux sous-unités α et β . La sous-unité α fixerait les chaînes A et B, la sous-unité β fixerait uniquement la chaîne B. Dans ce modèle, le PDGF AA se lierait à un récepteur dimérique α/α , le PDGF AB à des récepteurs dimériques α/α ou α/β et enfin, le PDGF BB à des récepteurs α/α , α/β et β/β (D'après Bryckaert *et al.*, 1991).

al., 1989). Au vu de cette découverte, les recherches se sont alors portées sur les récepteurs du PDGF qui sembleraient jouer un rôle dans la modulation des fonctions de ce dernier.

4.6) Les récepteurs au PDGF

Le PDGF exerce une quantité d'effets biologiques sur les cellules cibles ; mais pour être une cellule cible, il faut exprimer en surface un récepteur spécifique au PDGF. Les cellules qui ne sont pas, par exemple, réceptives à l'action mitogène du PDGF, comme les cellules épithéliales et endothéliales, n'expriment pas de récepteur au PDGF.

Le récepteur du PDGF a été initialement décrit comme étant une glycoprotéine de 180 kDa, formée de trois domaines : un domaine extracellulaire, un domaine intracellulaire doté d'une activité tyrosine kinase et un domaine intramembranaire.

L'existence de plusieurs récepteurs pour le PDGF a été démontrée par des études de liaisons des différentes isoformes du PDGF (AA, BB et AB) sur une même cellule (Heldin *et al.*, 1988). Seifert *et al.*, en 1989, ont proposé un modèle de récepteur formé de deux sous-unités α et β . La sous-unité α fixerait les chaînes A ou B et la chaîne β fixerait uniquement la chaîne B. Dans ce modèle, le PDGF AA se lierait uniquement à un récepteur dimérique α/α ; le PDGF BB se lierait à des récepteurs dimériques α/α , α/β ou β/β ; et enfin le PDGF AB, à des récepteurs dimériques α/α ou α/β (figure 1-10).

Deux sites importants d'autophosphorylation ont été localisés sur le récepteur du PDGF, l'un concerne la Tyr-751 du domaine *KI insert*, l'autre la Tyr-857 du deuxième domaine tyrosine kinase (Kazlauskas *et al.*, 1989).

La biologie moléculaire a permis de confirmer l'existence de deux sous-unités par récepteur, qui ont été clonées et séquencées ; les séquences protéiques déduites de l'analyse des ADNc des sous-unités α et β ont une étroite homologie. Le gène de la sous-unité β est situé sur le chromosome 5 et celui de la sous-unité α est situé sur le chromosome 4. Comme pour la régulation des chaînes A et B du PDGF, très peu de choses sont connues sur la régulation de l'expression des sous-unités du récepteur. Si la plupart des cellules expriment les deux sous-unités réceptrices, l'expression de chaque sous-unité est différente selon le type cellulaire considéré.

La liaison du PDGF à son récepteur entraîne différents événements intracellulaires qui vont conduire à la mitose. Des progrès importants ont été réalisés dans l'identification des

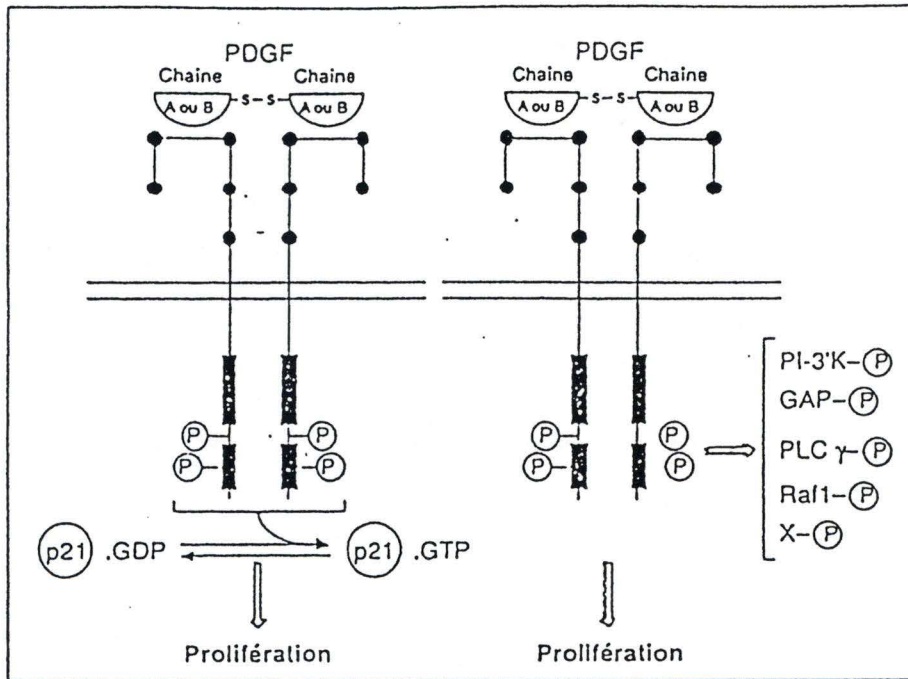


Figure 1-11 : Différentes voies d'activation du PDGF. La phosphorylation du récepteur du PDGF entraîne la phosphorylation de différents substrats dépendant de la tyrosine kinase et qui viennent se complexer au récepteur. Parmi ces substrats, la phospholipase C PLC γ , la GAP (GTPase activating protein), la PI-3-kinase et la sérine-thréonine kinase raf-1. Par ailleurs, la fixation du PDGF augmenterait la proportion de la protéine p21, présente sous sa forme active liée au GTP (p21-GTP) aux dépens de la forme liée au GDP, inactive (p21-GDP) (D'après Bryckaert *et al.*, 1991).

différentes voies d'activation consécutive à l'autophosphorylation du récepteur du PDGF, mais nous n'en discuterons pas plus longtemps ici, car cela ne concerne pas directement ce travail (voir pour information la figure 1-11).

5) L'hybridation *in situ*

5.1) Historique et évolution de la méthode

Les techniques d'hybridation *in situ* permettent de détecter spécifiquement des séquences d'acides nucléiques dans des chromosomes, des cellules ou des sections de tissus. Pour reconnaître une séquence bien définie, l'hybridation *in situ* utilise la haute spécificité que possède toute séquence d'acides nucléiques pour s'hybrider (en associant nucléotide après nucléotide) avec la séquence qui lui est complémentaire. Pour utiliser une séquence complémentaire comme sonde afin de localiser la séquence intéressante, il suffit d'inclure dans cette sonde des nucléotides marqués, détectables après hybridation. En combinaison avec l'immunocytochimie, l'hybridation *in situ* peut dévoiler des informations topologiques microscopiques sur l'activité de certains gènes aux niveaux ADN, ARNm et enfin protéique.

La technique fut originellement développée par Pardue et Gall (1969) et indépendamment par John *et al.* (1969). A cette époque, les radioisotopes étaient le seul moyen de marquer les acides nucléiques et l'autoradiographie servait à les détecter. Par ailleurs, comme le clonage moléculaire n'était pas encore possible, l'hybridation *in situ* était restreinte à des séquences qui pouvaient être purifiées et isolées par les méthodes biochimiques (par exemple : l'ADN satellite de souris, l'ARN viral, l'ARN ribosomal).

Le clonage moléculaire des acides nucléiques et les progrès en matière de marquage ont permis de changer radicalement cette image. De nos jours, les techniques de détection radioactive *in situ* sont capables de dénicher des très petits nombres de copies d'ARNm dans des cellules individuelles.

Malgré sa très grande sensibilité et le large éventail de ses applications, l'hybridation *in situ* se limitait à être utilisée en laboratoire de recherche. Cela était sans doute dû aux problèmes associés aux sondes radioactives qui nécessitent une infrastructure de protection appropriée.

Il faut dire aussi que l'hybridation *in situ* n'avait pas que des avantages, les autoradiographies prenaient un temps assez long et pour une surface, ainsi explorée, très limitée.

Par la suite, la préparation de sondes d'acides nucléiques marquées non-radioactivement volatilisait la plupart des obstacles liés à cette technique, ce qui propulsa son utilisation. Il fut même possible de combiner différents marqueurs sur un même échantillon. L'énorme machinerie de détection par anticorps pouvait désormais servir à l'hybridation *in situ*, en allant révéler les sondes, ce qui augmenta encore la flexibilité de la méthode (Grünewald *et al.*, 1996).

5.2) Méthodes directe et indirecte

Il existe deux types de méthodes d'hybridation non radioactive : directe et indirecte.

Dans la méthode directe, la molécule détectable (le rapporteur) est directement liée à la sonde d'acides nucléiques, ainsi les sondes qui ont reconnu leur cible peuvent être directement visualisées au microscope.

Pour ce genre de méthode, il est essentiel que la liaison sonde-rapporteur résiste à l'hybridation et aux conditions de lavage. Peut-être encore plus important, il ne faut pas que le rapporteur interfère avec la réaction d'hybridation.

Voici quelques exemples de cette méthode :

- Sonde à ARN marquée avec un fluorochrome terminal, développé par Baumann *et al.* en 1980 et 1984.
- Sonde couplée à une enzyme (Renz et Kurz, 1984).
- Sonde à nucléotides marqués avec des fluorochromes pour détecter aussi bien l'ADN que l'ARN (Grünewald *et al.*, 1996).

Si par la suite, on envoie un anticorps dirigé contre la molécule rapporteur, la méthode directe est alors convertie en méthode indirecte de par cette amplification immunologique (Baumann *et al.*, 1981 ; Lansdorp *et al.*, 1984 ; Pinkel *et al.*, 1986).

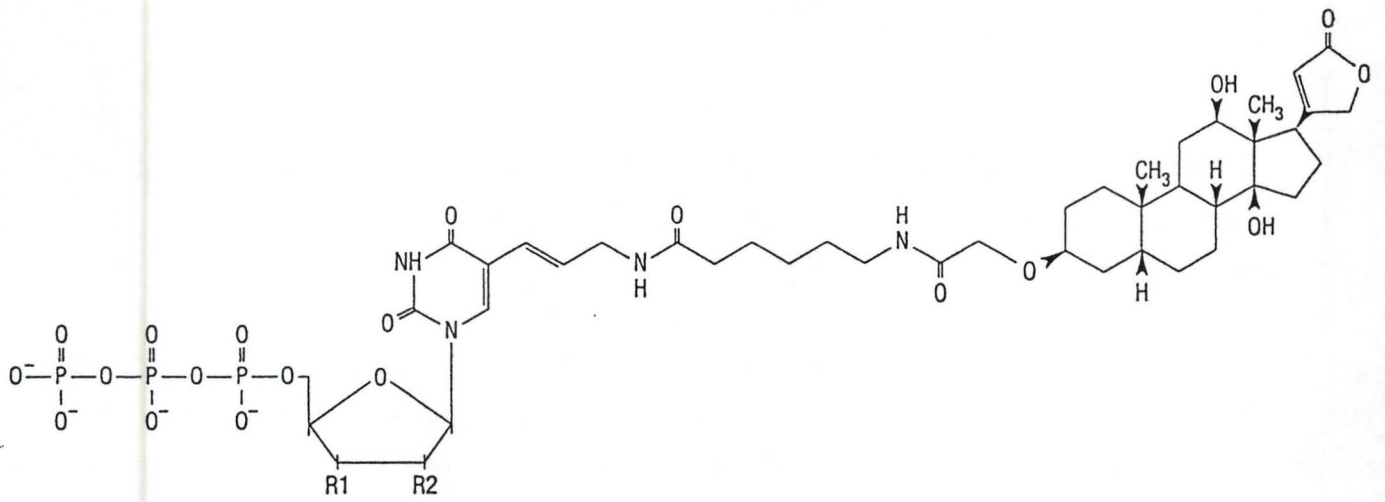


Figure 1-12 : Structure chimique de la digoxigénine-UTP/dUTP/ddUTP.
 Digoxigénine-UTP (R1=OH, R2=OH)
 Digoxigénine-dUTP (R1=OH, R2=H)
 Digoxigénine-ddUTP (R1=H, R2=H)

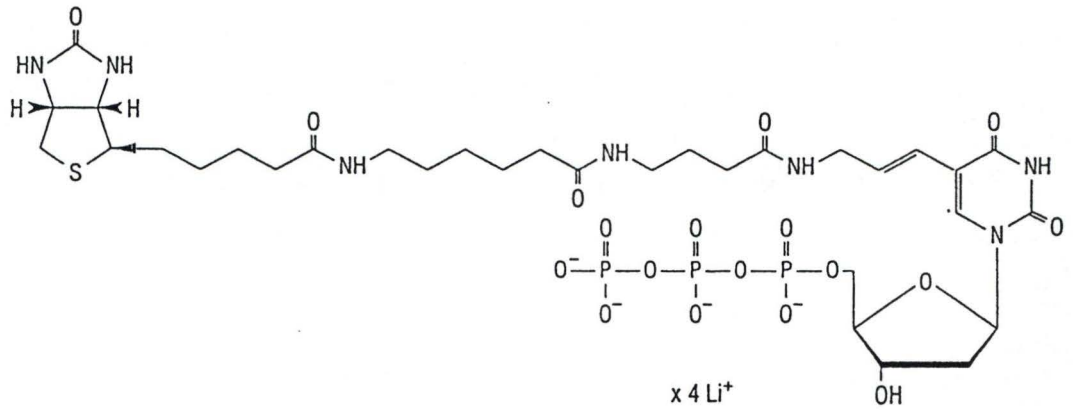


Figure 1-13 : Structure chimique de la biotine-dUTP.

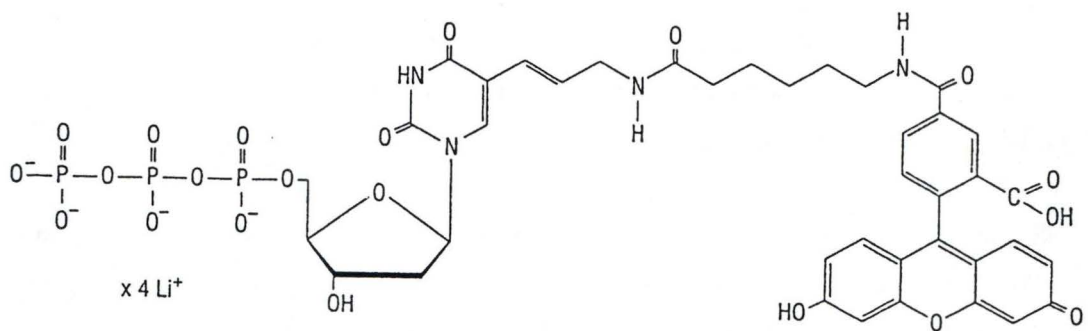


Figure 1-14 : Structure chimique de la fluorescéine-dUTP.

La méthode indirecte nécessite une sonde couplée à une molécule rapporteur, elle-même détectable par un anticorps qui lui est spécifique. La méthode indirecte a les mêmes contraintes d'hybridation, si ce n'est que le rapporteur doit, en plus, être accessible à son anticorps. La plupart du temps, on utilise des rapporteurs tels que la biotine ou la digoxigénine.

5.3) Les marquages les plus utilisés

A) Le marquage à la digoxigénine (DIG)

La méthode de marquage DIG est basée sur un stéroïde isolé des plantes digitales (*Digitalis purpurea* et *Digitalis lanata*), fleurs mauves assez répandues en Europe, tout comme la méthode de par son utilisation facile et rapide.

La molécule de digoxigénine est liée en position C-5 sur les nucléotides uridines via un long bras composé de onze atomes de carbone (figure 1-12).

Les nucléotides marqués à la DIG peuvent être incorporés, à une densité voulue, en même temps que les autres acides nucléiques lors de la construction de la sonde par l'ADN polymérase ou après sa construction par la terminale transférase.

Les sondes, marquées à la DIG et hybridées, peuvent être ensuite détectées par un anticorps anti-DIG possédant une grande affinité pour cette molécule. Cet anticorps est lui-même marqué par différentes méthodes permettant sa détection : phosphatase alcaline, peroxidase, fluorescéine, rhodamine ou encore à une bille d'or (Grünewald *et al.*, 1996).

B) Le marquage à la biotine

En principe, la biotine (figure 1-13) peut être utilisée de la même façon que la digoxigénine et peut être détectée par des anticorps anti-biotine. Cependant, la streptavidine ou l'avidine sont plus fréquemment utilisées que les anticorps, car ces molécules ont une très grande capacité de liaison à la biotine (Grünewald *et al.*, 1996).

C) Le marquage fluorescent

Des dUTP-fluorescéine (figure 1-14) sont incorporés au cours de la construction de la sonde comme vu précédemment. La différence ici, c'est que la fluorescéine est un marqueur direct, il n'y a pas besoin de détection par immunocytochimie et le background est réduit. En général, le désavantage des méthodes directes est leur sensibilité moindre que les méthodes indirectes décrites plus haut. Cependant, les molécules de fluorescéine peuvent, quand même être détectées par des anticorps anti-fluorescéine couplés à une enzyme ou par des anticorps non marqués reconnus par des anticorps secondaires couplés à la fluorescéine. La sensibilité de ce genre d'expérience correspond, alors, à celle des méthodes indirectes (Grünwald *et al.*, 1996).

D) Les marquages radioactifs

Dans la très grande majorité des cas, le soufre 35 s'impose comme le marqueur de choix par sa sensibilité, sa résolution cellulaire et sa disponibilité. Le phosphore 32 originellement employé a de moins en moins d'adeptes, en raison des problèmes de radio-protection, de sa demi-vie courte et de sa résolution limitée. Le tritium, qui fournit une excellente résolution subcellulaire est d'emploi limité dans la mesure où il nécessite un temps d'exposition très long (plusieurs mois) (Grünwald *et al.*, 1996).

En général, les sondes radioactives sont plus sensibles et aussi bien plus faciles à quantifier que les sondes froides, mais ces dernières conservent le monopole de l'utilisation en raison de leurs nombreux avantages : rapidité des résultats, résolution cellulaire et subcellulaire optimale en microscopie optique et électronique, absence de risque lié aux radioéléments et très grande stabilité des sondes permettant leur usage prolongé.

5.4) Les différents types de sondes

Il existe quatre types de sondes : les sondes ADN doubles brins, les sondes ADN simples brins (peu utilisées car de préparation complexe), les sondes ARN simples brins et les oligonucléotides synthétiques. Chaque type de sonde présente des avantages et des

inconvenients qui lui sont propres, les sondes ARN et les oligonucléotides étant, à ce jour, les plus intéressantes à considérer.

A) Les sondes ADN bicaténaire

Les sondes d'ADN les plus fréquemment utilisées correspondent à des fragments d'ADN complémentaires (ADNc) obtenus à partir d'ARN messagers. Elles ont été les premières utilisées et restent très performantes pour la détection d'ARNm abondants ou génomes viraux, mais elles semblent trouver leur limite pour la détection de faibles quantités d'acides nucléiques.

B) Les sondes ADN monocaténaire

L'ADN simple brin obtenu après le clonage dans le phage M13 n'a été que très rarement utilisé en hybridation *in situ* (Berger, 1986).

C) Les sondes ARN

Des équipes de plus en plus nombreuses privilégient, maintenant, l'emploi des sondes ARN simples brins, dont l'usage devient plus aisé et les résultats plus performants et plus reproductibles qu'il y a quelques années. Ces sondes se révèlent particulièrement sensibles mais restent d'emploi délicat car ayant tendance à donner du bruit de fond. Les sondes ARN sont obtenues par transcription *in vitro* après insertion de l'ADNc d'intérêt dans un plasmide modifié. Ces systèmes de transcription *in vitro* permettent de générer des sondes ARN « sens » et « antisens » (voir suite). L'efficacité de ce type de sonde est liée à la grande stabilité des hybrides ARN-ARN comparés aux hybrides ADN-ARN.

D) Les sondes oligo -nucléotidiques

Les sondes oligo-nucléotidiques présentent de nombreux intérêts : elles peuvent être préparées rapidement et simplement dans de très nombreux laboratoires, grâce aux synthétiseurs d'oligonucléotides. Elles sont sensibles, faciles à manipuler et simples d'emploi

en hybridation. Elles peuvent être conçues pour être rendues très spécifiques d'une région donnée d'un transcrit, ce qui est particulièrement utile pour étudier les phénomènes d'exision-épissage variable, ou pour différencier plusieurs ARNm d'une même famille ayant une structure voisine. Ces sondes sont synthétisées sous forme d'ADN monocaténaire de tailles variées et sont marquées après leur synthèse.

5.5) Précautions liées à la méthode

L'utilisation de sondes et/ou la détection d'ARNm propre à l'hybridation *in situ*, ne se fait pas dans des conditions autres que les conditions « anti-ARNase » (RNase free). Les enzymes ARNases ont, comme on le sait, la capacité de dégrader les brins d'ARN, ce qui pourrait conduire, suivant les cas, à la destruction de la sonde et/ou de l'ARNm que l'on souhaite détecter.

Les avis les plus divers existent concernant les précautions à prendre pour éviter la présence et l'action des ARNases au cours des expériences d'hybridation *in situ*. Il apparaît cependant que des précautions très rigoureuses (stérilisation de toutes les solutions, stérilisation des instruments, des lames...) semblent superflues. Par contre, le port constant de gants, la stérilisation de la vaisselle et des solutions servant à préparer les tampons d'hybridation et les tampons associés, l'emploi d'inhibiteurs d'ARNases (DEPC, SDS) sont recommandés. Certaines équipes travaillent même avec succès dans des conditions peu rigoureuses, similaires à celles utilisées pour l'immunohistochimie (Ayer et Lievre, 1992).

Bref, les avis sont une fois de plus partagés et le choix final sera lié au niveau de paranoïa du chercheur !

5.6) Les pièges de l'hybridation *in situ*

Le principe de l'hybridation *in situ* est relativement simple et le respect strict du protocole choisi et des précautions assorties permet d'éviter un certain nombre de déboires. Cependant, il faudra faire attention lors de l'interprétation des résultats obtenus et s'assurer en fin de compte que le marquage obtenu est bien spécifique et significatif.

A) La sensibilité

On peut améliorer la sensibilité d'une méthode en jouant sur l'accroissement du signal spécifique ou en diminuant le bruit de fond. On estime, à l'heure actuelle, que l'on doit disposer d'au moins une dizaine de copies d'ARN par cellules pour pouvoir obtenir un signal identifiable.

Pour accroître le signal spécifique, on peut utiliser un marqueur pour la sonde qui soit le plus visible possible, pour l'étude envisagée (voir après). On peut également intervenir au niveau de l'accessibilité des ARN cibles, lors de la fixation des tissus ou par un prétraitement complémentaire des coupes.

De façon simplifiée, on peut considérer deux types de fixateurs quant à leur effet sur les protéines du tissu. Les fixateurs « précipitants » et les fixateurs « liants ». Malheureusement, les fixateurs les meilleurs pour la préservation des ARN et de la morphologie des tissus (les fixateurs liants), sont aussi ceux qui sont les moins favorables à la pénétration des sondes et inversément. Il n'existe donc pas de fixateur idéal et le choix s'exercera en fonction du tissu, du niveau de détection souhaité (tissulaire ou intracellulaire), des aspects que l'on veut privilégier et, éventuellement (et c'est le cas dans ce travail), d'impératifs imposés par d'autres techniques de détection (immunocytochimie) que l'on souhaite coupler avec l'hybridation *in situ*. Les fixateurs les plus fréquemment utilisés sont :

- l'alcool acétique,
- le Carnoy (alcool, acide acétique, chloroforme),
- la paraformaldéhyde de 2 à 5% dans un tampon,
- le formol dilué.

On s'accorde, en général, pour éviter d'utiliser deux types de fixateurs classiques en histologie : les fixateurs à base d'acide picrique, comme le Bouin (acide picrique, formol, acide acétique), et ceux qui contiennent de la glutaraldéhyde.

Toutefois, si on doit choisir un fixateur peu favorable à l'accessibilité des ARN par la sonde, on peut compenser l'effet du fixateur par un traitement des coupes visant à les perméabiliser, avant l'hybridation. Cette perméabilisation peut résulter de traitements enzymatiques (pronase ou protéinase K), d'hydrolyse ménagée (HCl dilué, à température ambiante), d'exposition à des détergents (généralement présents dans le milieu d'hybridation, mais aussi Triton, sarcosyl...) ou à des solvants organiques (toluène, utilisé en tout cas pour les coupes de pièces incluses dans la paraffine, chloroforme...). Il est toutefois prudent de

limiter au maximum ce type de prétraitement sous peine d'aboutir à un effet inverse : une perte de signal et non une augmentation de la sensibilité (Ayer et Lievre, 1992).

Pour diminuer le bruit de fond, on doit s'arranger pour éviter un attachement non spécifique des sondes marquées sur le substrat ou sur les coupes. Cela peut s'obtenir de différentes façons :

- en prétraitant les lames par une incubation en présence de sérum, qui sature les sites de fixation non spécifique.

- par des rinçages en conditions aussi stringentes que possible dans les limites imposées par le pourcentage d'homologie de la sonde avec les ARN que l'on cherche à détecter : à des températures suffisamment élevées (dans les limites du raisonnable, en dessous de 60°C, sous peine d'assister au décollement des coupes), dans des solutions salines suffisamment diluées et éventuellement en présence de solutions diluées de détergents tels que SDS, sarcosyl..., ou en présence de formamide.

- Si des sondes d'ARN ont été utilisées, il est possible d'effectuer un traitement ménagé à l'ARNase qui attaquera d'abord les ARN libres ou les hybrides ARN/ADN, avant d'attaquer aussi les hybrides spécifiques ARN/ARN si l'action enzymatique est trop poussée, ce qui serait fort gênant.

B) Les témoins

Les témoins interviennent à divers niveaux et selon les cas, dans la mesure des possibilités offertes par le système étudié :

- Il peut y avoir une coupe contrôle où l'existence et la position de l'ARNm cible sont bien connus, c'est le contrôle positif. On peut se faire rapidement une idée de la réussite de l'expérience, du niveau de marquage de fond et de la richesse relative des tissus étudiés en ARNm recherché.

- Des sondes témoins peuvent aussi servir de contrôle *une sonde différente de la sonde spécifique qui ne s'hybridera pas avec les ARN des cellules étudiées ou dont l'hybridation présentera une distribution différente.

*deux sondes correspondant à des séquences différentes de l'ARNm à détecter mais ne se recouvrant pas et qui devront avoir la même distribution d'hybridation.

- Un prétraitement de certaines coupes à la ARNase permet de vérifier que le signal obtenu normalement est bien dépendant de la présence des ARNm.

- L'utilisation de la sonde « sens », dans le cas des sondes ARN et oligonucléotidiques, qui est complémentaire de l'antisens spécifique utilisé, et qui ne devrait pas hybrider avec l'ARN étudié. Toutefois ce type de sonde n'est pas un indicatif absolu du bruit de fond; il arrive que certaines sondes « sens » présentent une distribution de marquage relativement élevée qui leur est propre. Cela est explicable lorsque le brin complémentaire est aussi transcrit dans certains types cellulaires comme cela a été montré pour le bFGF (Ayer et Lievre, 1992).

- Les conditions d'hybridation, comme la température et la composition du milieu d'hybridation, sont des valeurs théoriques calculées pour la sonde utilisée. En pratique, des conditions moyennes d'hybridation sont fixées pour permettre l'hybridation de la plupart des sondes d'un type donné. Une augmentation progressive de la température d'hybridation et de rinçage peut cependant permettre de vérifier que le marquage spécifique disparaît à partir de la température critique.

- Enfin, on peut recourir à divers témoins pour vérifier la réalité de l'expression, dans les tissus étudiés, des ARN détectés par hybridation *in situ*. Il est possible de vérifier sur northern blots la présence d'ARNm spécifiques dans des extraits de tissus étudiés en utilisant la même sonde que pour l'hybridation *in situ*. Ce contrôle n'est cependant pas possible lorsque les ARNm recherchés sont exprimés à haut niveau par un petit nombre de cellules éparses : en effet, dans ces conditions les cellules marquées peuvent être aisément détectées par l'hybridation *in situ* alors que les niveaux d'ARNm recherchés dans les extraits des mêmes tissus peuvent se situer en dessous du seuil de détectabilité par hybridation sur blot (Ayer et Lievre, 1992).

Les résultats de l'hybridation *in situ* peuvent aussi être comparés avec ceux de l'immunocytochimie pour la détection de la protéine correspondant à l'ARNm étudié. Les deux techniques peuvent être appliquées sur des coupes consécutives des mêmes blocs ou dans les meilleurs cas sur les mêmes coupes. L'interprétation des résultats doit cependant prendre en compte un transport ou un stockage possible de la protéine recherchée.

6) But du mémoire

Toujours pour mieux comprendre ce qui se passe lorsqu'une veine saine évolue vers une veine variqueuse, les recherches du laboratoire se suivent mais ne se ressemblent pas.

Grâce à la technique de l'organoculture de veine saphène développée au laboratoire en 1996, il est possible d'étudier l'influence de différents facteurs pouvant intervenir dans le développement des modifications observées dans la paroi d'une veine variqueuse. Par ailleurs, ce modèle permet également de suivre au cours du temps l'expression et la localisation de différents médiateurs et ainsi de pouvoir en estimer leur importance dans le processus étudié.

Dans le cadre de ce travail, nous avons choisi d'étudier l'expression du facteur de croissance PDGF. A ce jour, le rôle de ce facteur dans le développement des veines variqueuses reste totalement inconnu. Il nous a donc paru intéressant d'en étudier son expression pour deux raisons. Premièrement, il a été montré dans de nombreuses études que ce facteur joue un rôle important dans la migration des CML lors du développement de la néointima, de lésions artérielles athéromateuses ou resténosiques. D'autre part, les études réalisées au laboratoire suggèrent que, lors de la prolifération des CML induite par les mitogènes libérés par les cellules endothéliales activées par l'hypoxie, le PDGF pourrait jouer un rôle via une sécrétion autocrine (voir paragraphe 4-1).

Le but du mémoire était donc de suivre l'expression de ce facteur de croissance au cours d'une organoculture de veine saphène humaine s'étalant sur des périodes de temps croissant.

Afin de détecter le PDGFA aussi bien sous sa forme ARNm que protéique, deux techniques ont été utilisées.

La première, l'immunocytochimie, va permettre de détecter les protéines du PDGF; c'est une technique classique fréquemment utilisée.

La deuxième, l'hybridation *in situ*, est une technique qui permet de détecter l'ARNm de la protéine d'intérêt directement sur les coupes histologiques; elle sera ainsi développée pour la première fois au laboratoire.

Ces deux techniques permettront de localiser le PDGF directement sur les coupes des fragments de veines maintenus en organoculture.

Grâce aux résultats obtenus, il sera possible de préciser l'évolution et l'expression de ce facteur de croissance lors de l'organoculture de veine saphène. Par la suite et en conjonction avec d'autres travaux, il sera alors permis de mieux définir le rôle que joue le PDGF dans le développement des veines variqueuses.

B) Matériel et méthodes

1) Organoculture de veine saphène humaine

1.1) Mise en culture (Soyombo *et al.*, 1990; Pederson *et al.*, 1985)

La mise en culture des morceaux de veine saphène se fait sous une hotte à flux laminaire. Le matériel utilisé est soit stérilisé (6 heures à 180 °C dans un stérilisateur), soit autoclavé (20 minutes à 120°C).

Les milieux de culture utilisés sont, quant à eux, stérilisés par filtration sur filtre Sartorius Minisart 0,20 µm (Sartorius AG, Göttingen, Allemagne).

Toutes les solutions utilisées sont stériles et préalablement chauffées à 37°C.

Les veines saphènes proviennent de la clinique Sainte Elisabeth ou du Centre Hospitalier Régional. Nous les récupérons suite à une intervention chirurgicale sur des patients (ou plus souvent des patientes) atteints de varices.

1.1.1) Matériel et solutions

a) La solution de récolte des veines saphènes est un milieu de culture RPMI 1640 (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne) à pH 7,36 auquel sont ajoutés des antibiotiques et de la fungizone.

Ce milieu se compose :

- de sels inorganiques
- de D-glucose : 200 mg par litre

- de glutathion : 1 mg par litre
- d'acides aminés
- de streptomycine : 100 µg par ml (Sigma, Saint Louis, U.S.A.)
- de pénicilline : 100 unités par ml (Sigma, Saint Louis, U.S.A.)
- de fungizone (amphotéricine B) : 0,25 µg par ml (Sigma, Saint Louis, U.S.A.)

b) La solution de rinçage et de dissection des veines saphènes est un milieu de culture RPMI 1640 (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne) à pH 7,36 et tamponné avec de l'Hépès 10 mM (Janssen Chimica, Beerse, Belgique). Ce milieu est également supplémenté avec des antibiotiques et de la fungizone. Leur concentration est identique à celle de la solution de récolte. On additionne à ce milieu de rinçage de la glutamine (Sigma, Saint Louis, U.S.A.) qui constitue un substrat énergétique pour les cellules. Sa concentration finale est de 200 mM.

c) Le milieu de culture des veines saphènes est un milieu RPMI 1640 (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne) à pH 7,36 dans lequel on retrouve également des antibiotiques, de la fungizone et de la glutamine dans des concentrations identiques à celles du milieu de dissection. Il contient cependant 30% de sérum de veau fœtal.

d) Des pots en plastiques sont stérilisés à l'alcool dénaturé. Ces pots vont servir à récolter et transporter les veines saphènes.

e) Des boîtes de Pétri en verre pouvant être autoclavées sont également utilisées. Le fond de ces boîtes est recouvert d'un à deux millilitres de Silicone Elastomer. Ce silicone est lui aussi autoclavable et il permet de piquer des aiguilles dans la boîte de Pétri (voir suite). Ce silicone provient d'un kit Syliguart 182, Silicone Elastomer (Dow Corning GmbH, Wiesbaden, Allemagne).

f) Le matériel de dissection se compose de pinces, de ciseaux et de lames de scalpel.

g) On utilise enfin une gaze en laine de polyester et des micro-aiguilles en acier inoxydable.

1.1.2) Mode opératoire

A) La récolte des prélèvements

Les veines saphènes que nous utilisons proviennent du stripping des varices. Cette opération est pratiquée pour soulager les patients atteints d'insuffisance veineuse chronique ou de peau ulcérée.

Immédiatement après l'opération, la veine est placée dans un pot en plastique stérile contenant 60 ml de milieu de récolte. A partir de là, le prélèvement est maintenu à température ambiante.

Notons que les pots ont été portés à la clinique antérieurement à l'opération et qu'il a été demandé aux infirmières du bloc opératoire de les maintenir à 4 °C jusqu'au moment de l'intervention chirurgicale.

B) La dissection

Le but de la dissection est de limiter l'épaisseur de la paroi veineuse car cette épaisseur représente le facteur limitant pour l'organoculture. En effet, si la paroi vasculaire est trop épaisse, les cellules qui y sont présentes ne seront ni oxygénées, ni nourries de façon correcte. Elles auront donc tendance à se nécroser.

La méthode employée est la suivante :

- Maximum une heure après son prélèvement, la veine est retirée du milieu de récolte et est placée dans une boîte de Pétri stérile, contenant du milieu de rinçage stérile et préalablement chauffé à 37 °C. C'est dans ce milieu que la dissection va avoir lieu.

- La première chose à faire est de retirer l'adventice et la graisse qui l'accompagne. Cette étape est primordiale afin de limiter au maximum l'épaisseur de la paroi veineuse. Il est important de ne pas abîmer la média afin de préserver l'intégrité de cette couche et d'éviter les mécanismes de cicatrisation qui interféreraient avec les phénomènes que l'on désire observer.

- Ensuite, on ouvre longitudinalement la veine. Lors de cette étape, il faut faire très attention de ne pas érafler, avec la pointe des ciseaux, l'endothélium qui se trouve juste en face de l'incision. De plus, il ne faut pas tirer de façon trop brutale sur les parois de la veine, car cela pourrait stimuler voire endommager les cellules endothéliales et les CML.

- Enfin, on découpe le rectangle ainsi obtenu en de petits carrés d'environ 1 cm². Ce sont ces morceaux qui seront, par la suite, mis en culture.

C) La mise en culture proprement dite

Les morceaux de veines de 1 cm², obtenus en fin de dissection, vont ensuite être délicatement placés dans une boîte de Pétri en verre contenant 6 à 8 ml de milieu de culture à 37°C. Le fond de ces boîtes étant recouvert de silicone, il est donc possible de piquer l'échantillon à l'aide de 4 micro-aiguilles, ceci pour éviter que le morceau ne flotte à la surface du milieu de culture.

Le morceau de veine n'est cependant pas directement posé sur le silicone, car si c'était le cas, la partie en contact étroit avec ce dernier ne serait ni oxygénée, ni nourrie, ce qui engendrerait une nécrose tissulaire. Pour éviter ce problème, nous plaçons entre le morceau de veine et le silicone, un petit bout de gaze en laine de polyester. Ce dernier permet de maintenir un film de milieu de culture en dessous de la face inférieure du morceau de veine.

Au cours de ces manipulations, trois précautions sont à prendre en considération :

- Tout d'abord, lors du transfert depuis le milieu de rinçage (dissection) vers le milieu de culture, il faut, avec la pince, prendre le morceau de veine le plus près possible du bord afin de ne pas endommager l'endothélium.

- Ensuite, il faut s'assurer lorsqu'on pose le morceau de veine sur la gaze que l'endothélium soit bien dirigé vers le haut.

- Finalement, à aucun moment, le morceau ne doit sécher. C'est pourquoi, il est préférable de mettre d'abord le milieu de culture dans les boîtes de Pétri avant d'y placer les morceaux de veine.

L'organoculture est maintenue pendant quinze jours et le milieu de culture est changé toutes les 48 à 72 heures.

La mise en culture se fait selon un schéma d'expérience bien précis. Dans le cas qui nous concerne, nous avons besoin de fragments de veine maintenus en organoculture pendant des durées croissantes. Ces fragments seront ensuite fixés dans la paraformaldéhyde (voir méthode ci-après).

Le planning expérimental est le suivant :

- Il faut 5 morceaux de 1 cm² pour une expérience.
- Le premier morceau est fixé juste après la dissection. Il n'a donc pas subi d'organoculture et correspond au jour de réception de la veine, appelé aussi jour 0. Les autres morceaux sont mis en culture.
- Au jour 5 de la culture, un autre morceau est fixé. Il en va de même pour les 3 morceaux suivants qui sont respectivement fixés au jour 8, 12 et 15 de la culture.

1.2) Fixation et enrobage de fragments de veine saphène

Les échantillons de veine de saphène maintenus en organoculture sont fixés à la paraformaldéhyde et enrobés dans la paraffine. Toutes ces manipulations doivent se faire RNase free afin de préserver les ARNm présents dans ces échantillons.

1.2.1) Matériel et solutions

a) PBS (phosphate buffer salin).

- ↳ 20 ml de tampon $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,5 M pH=7,4
- ↳ 9 gr de NaCl
- ↳ ajuster à pH=7,4
- ↳ porter à 1 litre

b) Paraformaldéhyde (Merck, Darmstadt, Allemagne) 4% dans PBS.

c) Ethanol 70, 85, 95 et 100%.

d) Toluol.

e) Paraffine (Paraplast Plus, Sherwo Medical Co, Saint Louis, U.S.A.).

1.2.2) Méthode

1) Rincer l'échantillon deux fois avec du PBS dans une boîte de Pétri stérile.

2) Fixer dans la paraformaldéhyde 4% la nuit à 4 °C.

3) Rincer 2 fois 15 minutes dans PBS à température ambiante.

4) Déshydrater les échantillons à température ambiante :

↳ 2 x 30 minutes dans de l'éthanol 70%

↳ 1 x 30 minutes dans de l'éthanol 85%

↳ 1 x 30 minutes dans de l'éthanol 95%

↳ 2 x 30 minutes dans de l'éthanol 100%

5) Inclure l'échantillon dans la paraffine.

↳ 2 x 50 minutes dans du toluol à température ambiante

↳ la nuit dans de la paraffine à 60 °C

↳ la matinée dans un nouveau bain de paraffine à 60 °C

6) Enrobage (appareil Histocentre avec des moules RNase free).

2) Réalisation de coupes histologiques

Après fixation et enrobage des différents fragments de veine ayant subi l'organoculture, nous avons à notre disposition 5 blocs de paraffine dans lesquels il est possible de réaliser un grand nombre de coupes histologiques.

2.1) Préparation des lames

Les lames de verre destinées à recevoir les coupes de veine doivent subir différents prétraitements avant d'être utilisées. En effet, sans ces prétraitements, les coupes de veine n'adhèrent pas parfaitement à la surface de verre et risquent de se décoller lors des manipulations suivantes.

De plus, pour l'hybridation *in situ*, les lames ne doivent pas être en contact avec des RNases afin de préserver les ARNm qu'elles contiennent (voir paragraphe 4-5). Toutes les manipulations seront réalisées dans des conditions RNase free.

2.1.1) Matériel et solutions

- a) Lames porte-objet SuperFrost en verre (Menzel-Glaser, Allemagne).
- b) Bacs de coloration en verre munis de leur chariot, permettant d'y ranger les coupes pour les différents bains (RNase free pour l'hybridation *in situ*).
- c) Acétone.
- d) 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTS) (Sigma, Saint Louis, U.S.A.) servant à augmenter l'adhésion de la coupe à la lame de verre.
- e) Eau distillée (RNase free pour l'hybridation *in situ*).

f) Silica gel (Vel, Leuven, Belgique) permettant d'enlever l'humidité de l'air dans la boîte où l'on conserve les lames après le traitement.

g) Séchoir à 70°C.

2.1.2) Mode opératoire

1) Placer les lames SuperFrost dans un chariot.

2) Plonger le chariot contenant les lames dans les bains suivants :

↳ passage de 30 secondes dans l'acétone

↳ passage de 4 minutes dans une solution d'acétone + APTS 2%

↳ passage dans un bain d'eau distillée (RNase free), secouer légèrement 3 à 4 fois

3) Mettre le chariot dans le séchoir pour minimum 30 minutes afin d'enlever l'eau.

4) Ranger les lames dans une boîte (RNase free) contenant des petits sachets de Silica gel.

2.2) Réalisation proprement dite des coupes

La réalisation des coupes se réalise dans des conditions RNase free nécessaires à l'hybridation *in situ*.

Pour le nettoyage des instruments, on utilise du sodium dodesyl sulfate (SDS) (Janssen Chimica, Geel, Belgique) dissous dans l'eau chaude pour obtenir une concentration en SDS de 10%. Cette solution va détruire les RNases présentes sur le matériel qui ne peut pas être mis au stérilisateur.

2.2.1) Matériel et solutions

- a) SDS 10%.
- b) Microtome (American Optical Corporation) nettoyé au SDS 10%.
- c) Un à deux couteaux pour microtome prétraités :
 - ↳ nettoyer au Toluol
 - ↳ plonger 10 minutes dans le SDS 10%
 - ↳ laver à l'eau RNase free
 - ↳ sécher
- d) Une planche neuve pour récupérer les rubans.
- e) Un erlenmeyer (RNase free) contenant de l'eau (RNase free).
- f) Les lames porte-objet prétraitées réalisées précédemment (RNase free).
- g) Les blocs de paraffine réalisés précédemment (RNase free).
- h) Une bouteille de mollifex (BDH Laboratory Supplies, Poole, Angleterre) RNase free.
- i) Une étuve à 45 °C.
- j) Une plaque chauffante à 55 °C.
- k) Des pinces, un scapel et des gants RNase free.
- l) Une boîte de rangement avec du Silica gel (Vel, Leuven, Belgique).

2.2.2) Mode opératoire

- 1) Dégrossir les blocs de paraffine, avec le microtome muni de son couteau (RNase free).
- 2) Faire tremper les blocs pendant au moins 60 minutes dans le mollifex pour les rendre moins durs à la coupe.

- 3) Après cela, on réalise des coupes de 5 à 6 μm d'épaisseur toujours avec le même microtome mais avec une lame neuve prétraitée.
- 4) Les coupes sont ensuite déposées sur une lame porte-objet sur laquelle on a préalablement déposé une goutte d'eau (RNase free) qui avec la chaleur d'une plaque chauffante (55 °C) va permettre à la coupe de bien s'étaler sur la lame.
- 5) Après avoir égoutté l'eau, on met les lames dans l'étuve (45 °C) pendant 45 minutes, pour que l'eau s'évapore et que la coupe adhère parfaitement à la lame.
- 6) Enfin, les lames sont rangées dans leur boîte (RNase free, avec du Silica gel) et doivent être utilisées endéans 2 semaines .

3) Immunohistochimie

Le principe de l'immunohistochimie est le suivant : pour mettre en évidence des protéines directement sur des coupes histologiques, on utilise des anticorps qui reconnaissent spécifiquement ces protéines. Ensuite, on révèle la présence de ces anticorps par un second anticorps couplé à une molécule qui permet la détection (fluorochrome, radioactivité ou enzyme telle que peroxydase ou phosphatase alcaline).

3.1) Matériel et solutions

a) Coupes de veine.



Il faut noter que, pour l'immunohistochimie, il n'est pas nécessaire d'avoir des coupes RNase free puisque l'on détecte ici des protéines, mais pour pouvoir utiliser les mêmes blocs, à la fois pour hybridation *in situ* et pour l'immunohistochimie, nous sommes obligés de réaliser les coupes de l'immunohistochimie avec les conditions RNase free décrites précédemment. La suite des manipulation ne doit plus être faite en conditions RNase free.

b) Pour déparaffiner et réhydrater les coupes, il faut :

- du toluol
- du méthanol
- du méthanol 70%
- de l'eau

c) Tampon PBS/ABC de pH égal à 7,2 (environ 2 litres par expérience) dont voici la composition :

Pour un litre de tampon :

- 0,10 gr de CaCl₂ (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- 0,20 gr de KCl (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- 0,20 gr de KH₂PO₄ (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- 0,10 gr de MgCl₂.6H₂O (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- 8,00 gr de NaCl (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- 1,45 gr de Na₂HPO₄.2H₂O (Merck, Darmstadt, Allemagne)

Il est préférable de respecter l'ordre lors de la réalisation de ce tampon afin d'éviter toute précipitation non désirée.

d) Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂ 3% dans de l'eau) (Merck, Darmstadt, Allemagne).

e) Tampon PBS/BSA (environ 2 litres par expérience) dont voici la composition :

Pour un litre de tampon :

- 500 ml de tampon PBS/ABC (ci-dessus)
- 0,5 gr de BSA (Albumine Sérique Bovine lyophilisée) (Organon Technika, Boxtel, Hollande)
- 0,1 gr de Triton x 100 (0,02 % final) (Merck, Darmstadt, Allemagne)

f) L'anticorps (primaire) anti-x où le x est l'antigène que l'on veut détecter.

g) Kit LSAB+ peroxydase (Dako Corporation, Carpinteria, U.S.A.), contenant :

- une bouteille d'anticorps (secondaire) anti-souris, chèvre, lapin-biotinisé
- une bouteille d'un complexe streptavidine-peroxydase

h) Solution chromogène (environ 10 ml par expérience, à préparer juste avant emploi) composée de :

- 1 pastille de diaminobenzidine (DAB) (Dako Corporation, Carpinteria, U.S.A.)
- 10 ml de tampon PBS/BSA
- 75 µl d'H₂O₂ 30% (Merck, Darmstadt, Allemagne)

i) Tétroxyde d'osmium 1 % dans l'eau (Johnson Matthey Chemicals Limited, Rayston, Angleterre).

j) Glycergel (Dako Corporation, Carpinteria, U.S.A.).

k) Une chambre fermée en plastique ou en verre et pouvant contenir l'ensemble des coupes à plat dans une atmosphère humide (= la chambre humide).

l) Bacs de coloration munis de leur chariot pour effectuer les différents bains (environ 200 ml de solution pour un bain).

m) Marqueur hydrophobe (Dako Corporation, Carpinteria, U.S.A.).

3.2) Mode opératoire

1) Pour réaliser un marquage en immunohistochimie à partir de coupes fixées à la paraffine, il faut tout d'abord déparaffiner et réhydrater les coupes :

- ↳ 2 bains de 3 minutes dans du toluol
- ↳ 2 bains de 3 minutes dans du méthanol 100 %
- ↳ 1 bain de 3 minutes dans du méthanol 70 %
- ↳ ensuite, on rince les coupes à l'eau de ville

2) Les coupes sont ensuite passées dans le tampon PBS/ABC :

- ↳ 3 bains de 5 minutes à température ambiante

3) Pour inhiber l'activité des peroxydases endogènes, on incube les coupes dans le peroxyde d'hydrogène (3 % dans de l'eau distillée) :

- ↳ 1 bain de 10 minutes à température ambiante

4) On rince ensuite les coupes dans le tampon PBS/ABC :

- ↳ 3 bains de 30 secondes à température ambiante

5) On trace sur les lames un cercle hydrophobe juste autour de la zone de l'échantillon de veine.



Ce cercle va permettre d'incuber les coupes avec de petites gouttes de solution, ce qui permet d'utiliser de très petites quantités de solution. Il faut cependant réaliser ces incubations dans une chambre humide car le peu de liquide (100 µl) déposé à l'intérieur du cercle hydrophobe (formant une goutte sur l'échantillon) risquerait de s'évaporer.


6) On sature les sites de fixation non spécifique pour l'anticorps primaire avec un passage des lames dans du tampon PBS/BSA.

- ↳ 100 µl par coupe, 30 minutes, en chambre humide et à température ambiante


7) On incube ensuite les coupes avec l'anticorps primaire spécifique de la protéine que l'on veut détecter. Cet anticorps est dilué 100 fois dans le tampon PBS/BSA.

- ↳ 100 µl par coupe, 3 heures, en chambre humide et à température ambiante

- 8) On enlève le surplus d'anticorps primaire par des bains de PBS/BSA.
↳ 3 bains de 5 minutes à température ambiante
- 9) On incube ensuite les coupes avec 1 à 2 gouttes de la bouteille jaune du kit LSAB+, contenant l'anticorps secondaire anti-souris, chèvre, lapin-biotinisé.
↳ 15 minutes, en chambre humide et à température ambiante
- 10) On enlève le surplus d'anticorps secondaire par des bains de PBS/BSA.
↳ 3 bains de 5 minutes à température ambiante
- 11) On incube ensuite les coupes avec 1 à 2 gouttes de la bouteille rouge du kit LSAB+, contenant un complexe streptavidine-peroxydase qui a une affinité spécifique pour la biotine fixée à l'anticorps secondaire.
↳ 15 minutes, en chambre humide et à température ambiante
- 12) On enlève le surplus de complexe streptavidine-peroxydase par des bains de PBS/BSA.
↳ 3 bains de 5 minutes à température ambiante
- 13) On incube les coupes avec la solution chromogène préparée extemporanément.
↳ de 2 à 4 minutes, à température ambiante et sous microscope

 On suit la coloration éventuelle des coupes au microscope optique, un chrono à la main pour faire en sorte que toutes les coupes aient le même temps d'incubation que la première (c'est le seul moyen de pouvoir comparer l'intensité du marquage entre les différentes coupes).

- 14) On arrête la coloration par un simple passage des coupes dans de l'eau distillée.
- 15) On peut renforcer le marquage par un passage supplémentaire dans le tétroxyde d'osmium 1 % dans l'eau.
↳ 100 µl par coupe, 5 à 15 secondes, à température ambiante

 Attention cependant lors de cette étape, car le tétroxyde d'osmium peut forcer le marquage à un point tel qu'il ne sera plus possible d'observer sa localisation. Cependant, cette

étape est indispensable au maintien de la coloration en vue des étapes ultérieures (contre-colorations et montage des coupes).

16) On stoppe le renforcement par l' OsO_4 par un simple passage des lames dans l'eau distillée.

17) {facultatif} Il est possible, à ce niveau, d'effectuer une, voire plusieurs contre-colorations (Hématoxiline, etc...).

18) Enfin, on monte les coupes au Glycergel.

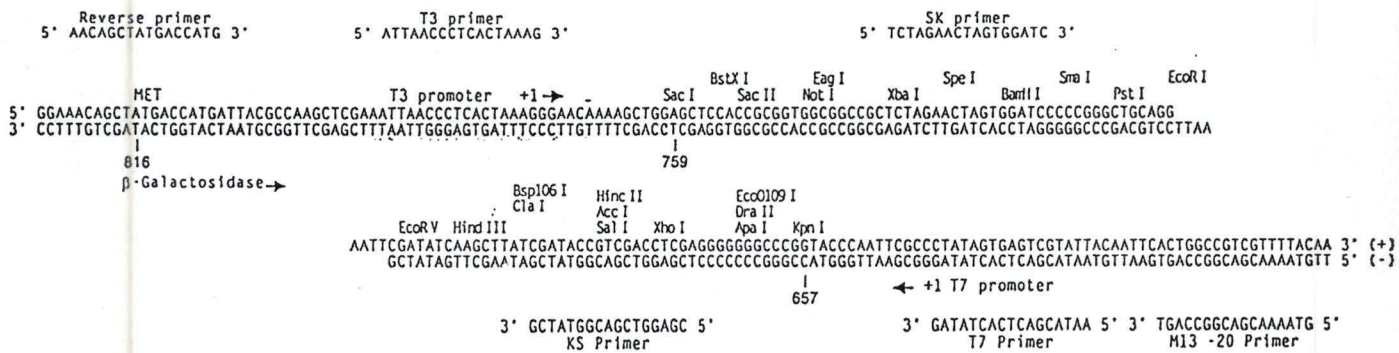
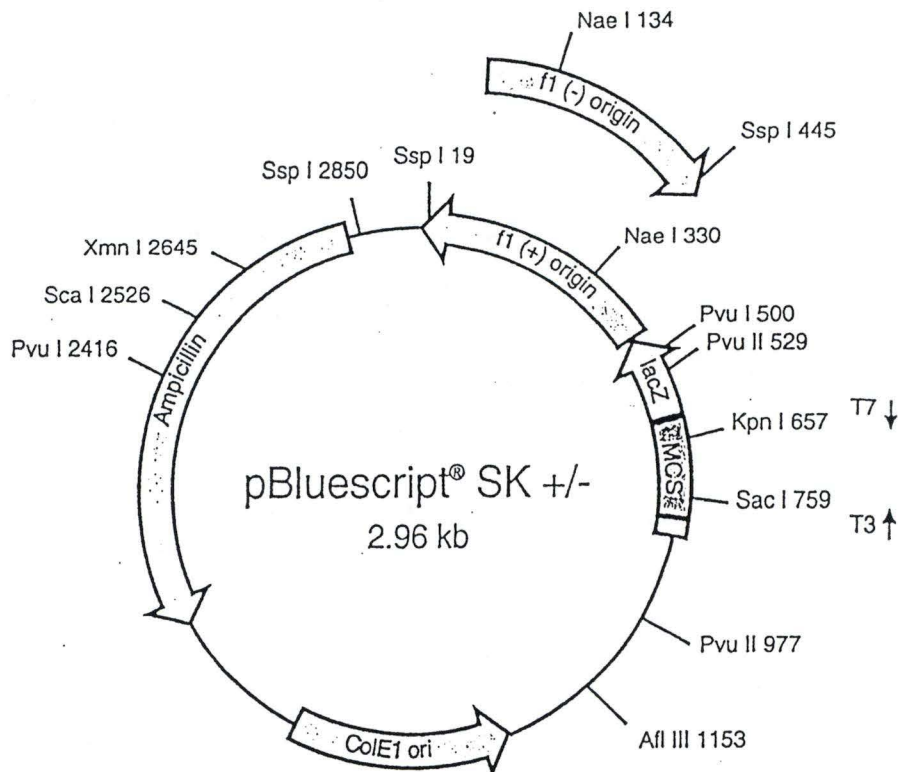


Figure 2-1 : Représentation schématique du plasmide pBlue script SK +/- . La séquence du site multiple de clonage (MCS) , les séquences T3 et T7 ainsi que celles des primers T3 et T7 sont également indiquées.

4) Hybridation *in situ*

L'hybridation *in situ* est une technique permettant de détecter de l'ARNm directement sur des coupes de tissu. Cela se réalise à l'aide de sondes spécifiques à la séquence de l'ARNm que l'on veut détecter. Outre l'hybridation proprement dite, cette technique nécessite la préparation des sondes spécifiques marquées (ici à la DIG). Les différentes étapes seront décrites dans ce chapitre.

4.1) Réalisation des sondes

Tout d'abord, il faut que les séquences d'ADN qui seront transcrites en sondes ARN soient insérées dans une « structure » qui va permettre, à la fois de les stocker, mais également de les amplifier. Cette « structure » s'appelle un plasmide.

Les sondes ARN seront réalisées par transcription *in vitro* de séquence d'ADN complémentaire. Pour ce faire, ces séquences cibles sont insérées dans des plasmides contenant des promoteurs spécifiques de la polymérase permettant la synthèse d'ARN.

A) Les plasmides utilisés :

Le plasmide utilisé ici est le plasmide pBlue script SK+/- schématisé dans la figure 2-1. Un plasmide est une séquence circulaire d'ADN contenant une origine de répllication de bactérie, permettant sa multiplication dans ces dernières. Il contient également différents gènes de résistance ayant pour rôle de maintenir la bactérie en vie sur un milieu sélectif, comme par exemple un milieu contenant de l'ampicilline. Dans ce cas, seules les bactéries qui auront reçu le plasmide et qui posséderont donc le gène de résistance qu'il véhicule, pourront survivre : c'est un moyen de sélection.

Un plasmide contient également une région appelée « site multiple de clonage » (MCS). Ce MCS se caractérise par un très grand nombre de séquences reconnues par des enzymes de restriction. Ces enzymes vont permettre de linéariser le plasmide afin d'y introduire une séquence nouvelle (= insert) (par exemple : un morceau de l'ADNc de PDGF, d'actine...). Lorsque le plasmide se recircularise grâce à l'action d'une ligase, l'insert se trouve dans le MCS; on dit alors que la séquence de l'insert a été « clonée » dans le plasmide. La figure 2-2

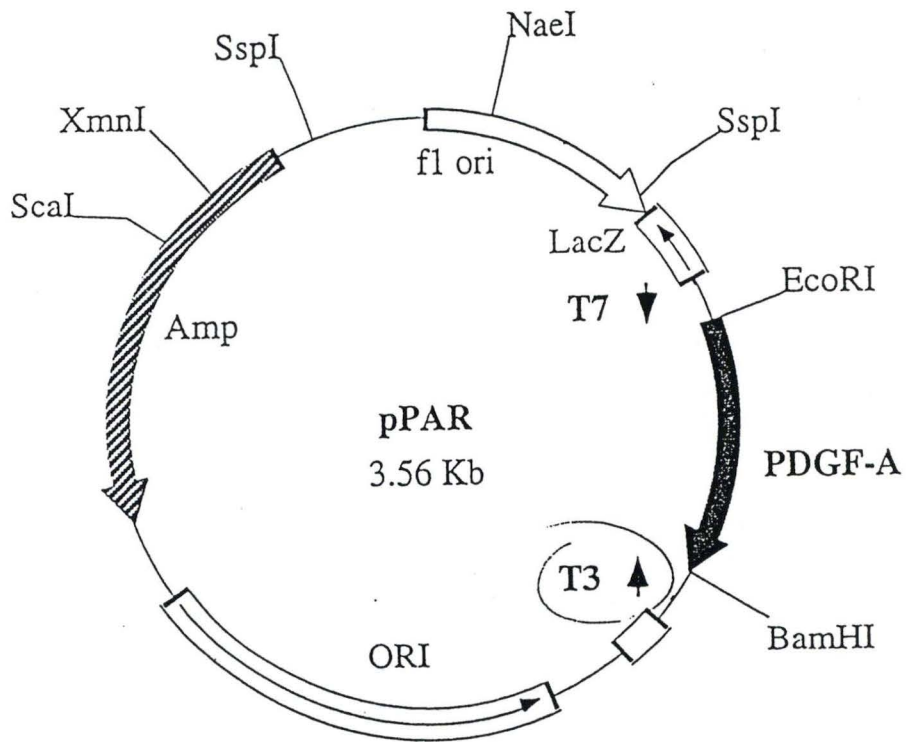


Figure 2-2 : Représentation schématique du plasmide pPAR. L'insert PDGFA (592pb) a été cloné entre les sites de restriction Bam H1 et Eco R1 du plasmide pBlue script SK+.

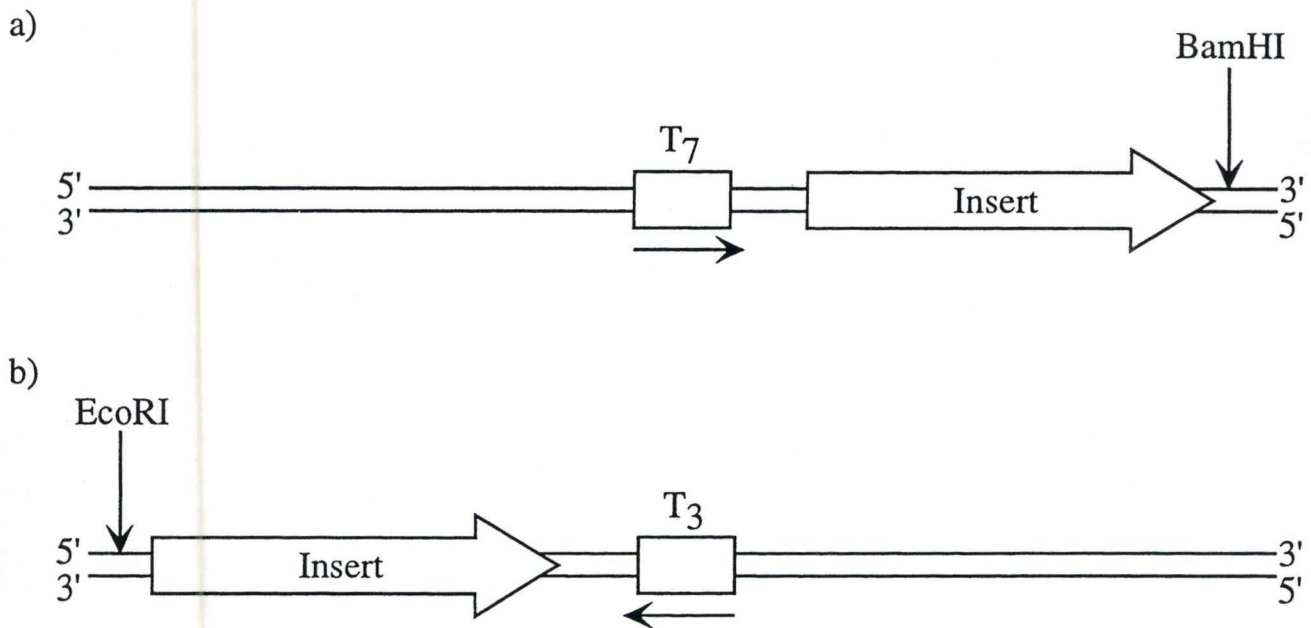


Figure 2-3 : Représentation schématique des deux types de linéarisation du plasmide pPAR (méthode I) a) linéarisation par Bam H1 b) linéarisation par Eco R1.

montre le résultat d'un tel clonage : l'insert PDGF a été cloné dans le plasmide pBlue script SK+, le résultat porte désormais le nom de pPAR.

Pour obtenir un très grand nombre de copies d'un plasmide, celui-ci est introduit dans des bactéries (*E. coli*). Cela ne peut se faire que si le plasmide contient une origine de réplication spécifique de la bactérie employée. Ensuite, les copies sont récupérées, purifiées et enfin stockées pour des utilisations ultérieures.

Lors de ce travail, nous utiliserons les 2 plasmides suivant : pBlue script SK+ contenant l'insert PDGFA humain (592 bp) (généreusement donné par le docteur Lindner, Maine Medical Center Research Institute) et pBlue script SK+ contenant l'insert Actine de souris (1109 bp) (reçu par le professeur Goffinet, Namur).

B) Les méthodes utilisées :

Le but de ces méthodes est d'obtenir une séquence (ADN de l'insert du plasmide) en grande quantité et prête à être transcrite en ARNm. Suivant le sens de la transcription effectuée, il sera possible d'obtenir les sondes sens et antisens de l'insert ADN. C'est dans ce but que le MCS du plasmide pBlue script SK+ est flanqué à ses extrémités de 2 séquences notées T3 et T7 qui initient la transcription du plasmide respectivement par les polymérases T3 et T7 dans un sens prédéterminé (voir figure 2-2).

Voici un aperçu général des différentes méthodes utilisées :

Méthode I - Le plasmide pur et déjà en grande quantité est restreint avec des enzymes de restriction qui coupent soit en amont soit en aval de l'insert. Cette restriction, effectuée avec l'un ou l'autre de ces enzymes, va conduire à deux types de linéarisation du plasmide, comprenant le promoteur de la polymérase T7 ou le promoteur de la polymérase T3 (voir figure 2-3). Par la suite, si la restriction a été totale, les polymérases respectives sont ajoutées ainsi que leur primer, permettant à celle-ci de se lier à l'ADN. Lors de la transcription par les polymérases, des dNTP couplés à la DIG (voir le chapitre 5-3 de l'introduction) sont ajoutés permettant un marquage de la sonde synthétisée, on obtient dans un cas la sonde sens et dans l'autre la sonde antisens, respectivement complémentaire et anti complémentaire à l'insert de départ. Cette méthode a été effectuée sur le plasmide pBlue script SK+ contenant l'insert PDGFA humain (voir suite).

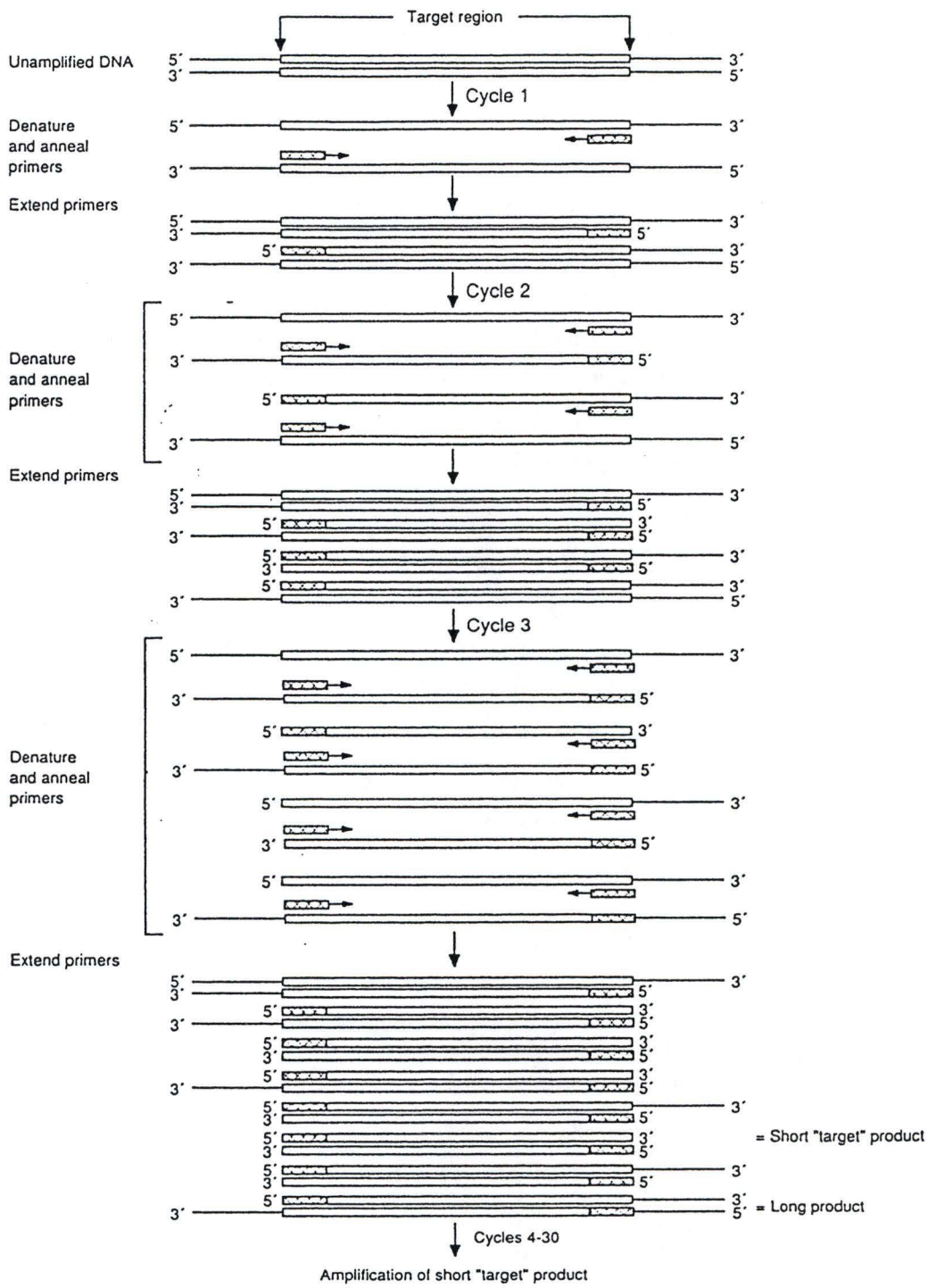


Figure 2-4 : Schéma général d'une PCR classique (Newton et Graham, 1994).

Méthode II - A partir de ce même plasmide non linéarisé, un fragment désiré peut être amplifié par PCR. Ce fragment devra toujours contenir une des 2 séquences promotrices respectives pour sa transcription par les 2 polymérase en plus de la séquence de l'insert (voir figure 2-4). Cette méthode a été effectuée sur le plasmide pBlue script SK+ contenant l'insert PDGFA humain (voir suite).

Méthode III - Cette PCR peut également se réaliser directement sur les bactéries lysées par de l'eau distillée et contenant le plasmide, ce qui évite une étape de purification. Cette méthode a été effectuée sur une colonie de bactéries lysées contenant le plasmide pBlue script SK+ contenant l'insert d'actine de souris (voir suite).

C) Modes opératoires

Après avoir déterminé, à l'aide d'un spectrophotomètre, la concentration en plasmide que nous avons à notre disposition, il est possible d'effectuer les méthodes suivantes.

C-1) Restriction d'une partie de ce plasmide (méthode I)

Le plasmide pBlue script SK+ a été restreint par l'enzyme BamH1 (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne) et une autre fraction par l'enzyme EcoR1 (Boehringer Mannheim, Allemagne), on obtient les deux types de linéarisation schématisés dans la figure 2-3.

1-1) Matériel :

- a) plasmide à restreindre (concentration connue).
- b) les différents enzymes de restriction (BamH1 et EcoR1).
- c) les différents tampons spécifiques à chaque enzyme de restriction (fournis par la firme).
- d) un bain-marie à 37°C.

1-2) Méthode :

- ↳ Incuber, dans un micro-tube, au bain-marie à 37°C pendant 4 heures
 - 4 µg de plasmide à restreindre
 - 3 µl de tampon 10x propre à l'enzyme

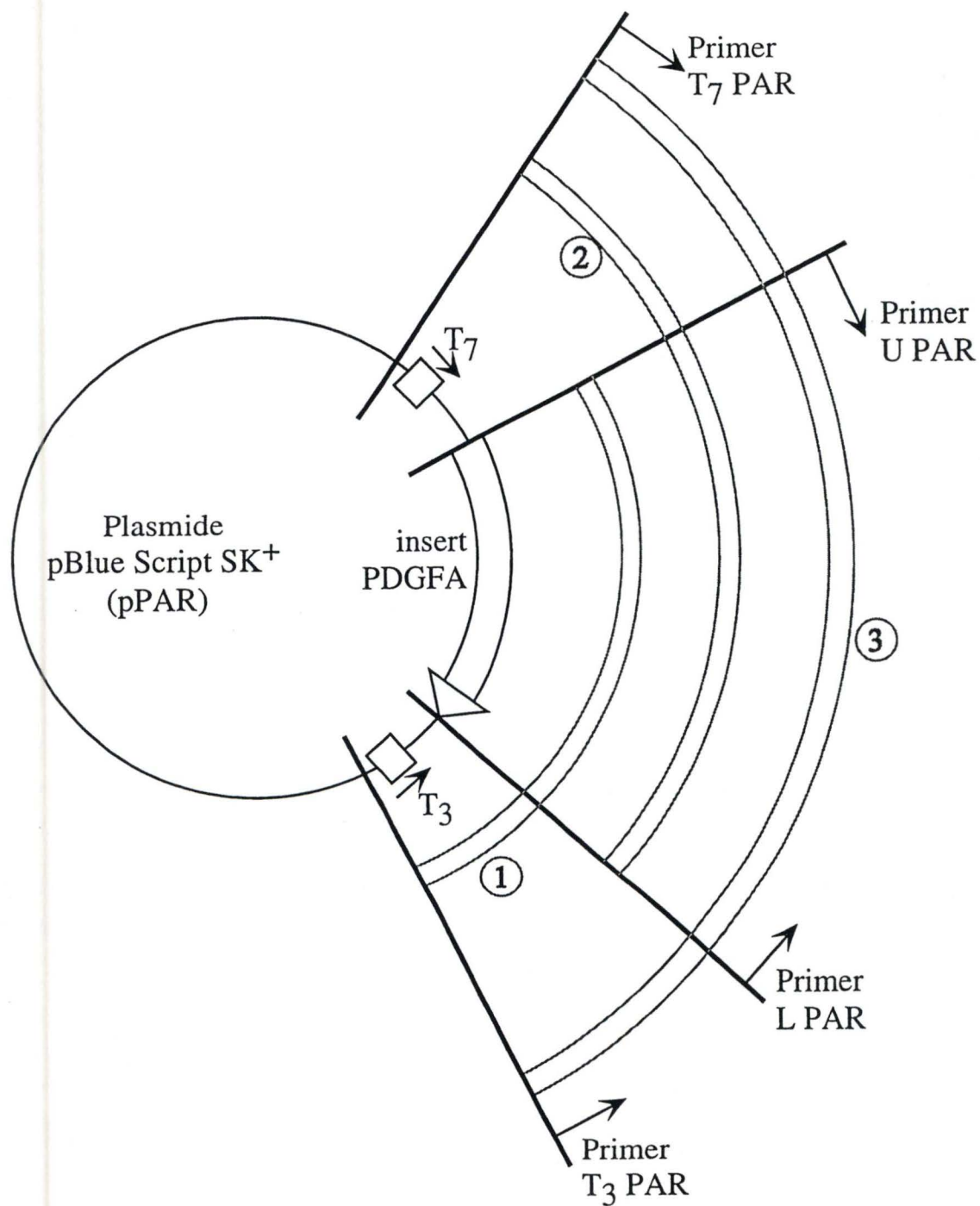


Figure 2-5 : Représentation schématique des 3 PCR effectuées sur le plasmide pBlue script SK+
 ① : amplification PCR de l'insert PDGFA et de la séquence promotrice T3 (avec les primers T3PAR et U PAR) (méthode II)
 ② : amplification PCR de l'insert PDGFA et de la séquence promotrice T7 (avec les primers T7PAR et L PAR) (méthode II)
 ③ : amplification PCR de l'insert et des séquences T3 et T7 (avec les primers T3PAR et T7PAR). Cette amplification a été réalisée sur le plasmide pBlue script SK+ contenant l'insert de β actine de souris (méthode III).

- 3 µl d'enzyme (10 Unités/µl)
- 20 µl d'eau
- pour un total de 30 µl par micro-tube
- ↳ purification du plasmide restreint par phénol / chloroforme (voir purification 1)
- ↳ vérification sur gel de la restriction (voir vérification)

Les deux types de fragments obtenus pourront être transcrits, par la suite, si la restriction a été totale.

C-2) Amplification par PCR (Polymerase chain reaction) de la séquence comprenant l'insert et les séquences T3 et/ou T7 (méthode II et III)

Pour cibler et pour démarrer la PCR sur un plasmide (exemple : pBlue script SK+) contenant l'insert voulu (PDGFA ou Actine dans notre cas), il faut une petite séquence d'ADN (= primer) qui va s'hybrider spécifiquement sur le plasmide dénaturé par la température. Ce primer est en fait le point de départ pour la synthèse effectuée par l'ADN polymérase thermorésistante. Cette dernière va prolonger cette petite séquence en prenant, comme modèle, la séquence du plasmide qui se trouve à la suite. En mettant 2 primers, on va amplifier spécifiquement les brins complémentaires d'une séquence d'ADN issue du plasmide et comprise entre ces deux primers. Cependant, il faudra respecter un cycle de température bien précis pour arriver à cette amplification :

- 94 °C température pour dénaturer les deux brins d'ADN du plasmide.
- 47 °C température d'hybridation des primers sur cet ADN cible (varie d'un primer à l'autre).
- 72 °C température à laquelle l'ADN polymérase est active et donc synthétise le brin complémentaire.

D'une PCR à l'autre, le temps que va durer chacune de ces phases et le nombre de cycles effectués peut varier (voir également le schéma général d'une PCR classique, figure 2-5).

Les séquences des primers sont choisies en analysant la séquence de la région à amplifier. Ils doivent être très spécifiques sinon ils risqueraient de s'hybrider en plusieurs endroits et ainsi de provoquer la multiplication de nombreux fragments non désirés. Pour trouver la meilleure séquence pour un primer, il est possible de simuler, via des programmes informatiques, par

exemple « amplify », la PCR employant la séquence des primers et la séquence du plasmide cible.

Lors de notre travail, 4 primers différents ont été utilisés, nommés arbitrairement : T3 pPar, T7 pPar, UPar et LPar. Leur position sur le plasmide est indiquée sur la figure 2-5. Ceux-ci ont été synthétisés par Eurogentec, Belgique. Ces primers permettent donc l'amplification des séquences d'ADN spécifiques des plasmides pBlue script SK+ (PDGFA ou Actine). En effet, en combinant ces primers 2 à 2, il est possible d'obtenir les fragments suivants :

1)- avec T3 pPar et UPar, on obtient un fragment amplifié contenant l'insert et la séquence propre à la polymérase T3 (voir figure 2-5) (PCR 1){méthode II}.

2)- avec T7 pPar et LPar, on obtient un fragment amplifié contenant l'insert et la séquence propre à la polymérase T7 (voir figure 2-5) (PCR 2){méthode II}.

3)- avec T3 pPar et T7 pPar, on obtient un fragment amplifié contenant l'insert et les séquences propres aux polymérases T3 et T7 (voir figure 2-5) (PCR 3){méthode III}.

Pour la réalisation de ces 3 types de PCR voici ci-dessous le mode opératoire général accompagné des petites variantes propres à chacune d'entre elles :

2-1) Matériel :

- a) Le plasmide cible pur (1 ng par PCR).
- b) Les primers à une concentration de 100 picomoles par μl (Eurogentec, Liège, Belgique).
- c) L'ADN polymérase thermostable (DyNAZyme II) (Finnzymes Oy, Espoo, Finlande) à 2 unités par μl .
- d) Le tampon 10x propre à cette ADN polymérase (Finnzymes Oy, Espoo, Finlande).
- e) Les 4 sortes de dNTP (A, G, C et T) nécessaires à la polymérase pour synthétiser l'ADN complémentaire (Boehringer Mannheim, Allemagne). Les 4 stocks sont à 10 μmole pour 100 μl . On réalise un mélange de ces 4 dNTP (exemple : 1 μl de chaque dNTP dans 76 μl d'eau).

f) L'appareil PCR permettant de réaliser les cycles de température nécessaire pour la PCR.

2-2) Méthodes :

I) PCR

1) Placer dans un microtube de 100 μ l, pour 1 PCR :

- 10 μ l de tampon 10x propre à l'ADN polymérase.
- 0,5 μ l d'ADN polymérase (2 unités par μ l).
- 16 μ l d'une solution de dNTP.
- 0,5 μ l de chacun des 2 primers à utiliser (ici ils sont à 100 picomoles par μ l)
- de l'eau, pour que le total contenu dans le tube après l'ajout de la cible soit de 100 μ l. Ici, on ajoute 71,5 μ l par tube PCR.

2) Ensuite, l'ADN cible est ajouté (1 ng par PCR, c'est-à-dire 1 μ l ici), ou de l'eau en même quantité que la cible. Les tubes contiennent désormais tous 100 μ l. Les tubes avec la cible seront les tubes test et ceux avec l'eau serviront de contrôle négatif afin de vérifier qu'aucune contamination externe n'a eu lieu. Dans les tubes contrôles, il ne devra pas y avoir d'amplification.

3) Les tubes sont ensuite placés dans l'appareil PCR.

3-1) Pour la PCR du plasmide pBlue script SK+ contenant l'insert PDGFA humain (méthode II), les temps des cycles sont les suivants :

- 1) 3 minutes à 94 °C
- 2) 36 fois le cycle suivant :
 - 30 secondes à 94 °C
 - 30 secondes à 47 °C
 - 30 secondes à 72 °C
- 3) 1 fois 10 minutes à 72 °C

3-2) Pour la PCR du plasmide pBlue script SK+ contenant l'insert Actine de souris (méthode III), où l'insert est plus grand, les temps des cycles sont les suivants :

- 1) 10 minutes à 94 °C
- 2) 40 fois le cycle suivant :
 - 30 secondes à 94 °C
 - 30 secondes à 47 °C
 - 60 secondes à 72 °C
- 3) 1 fois 10 minutes à 72 °C

4) Après ces PCR, les produits PCR seront purifiés afin d'éliminer les primers mais également l'ADN polymérase, via le kit Wizard (voir purification 2).

II) Purifications

❶ Pour pouvoir réaliser une transcription *in vitro* du fragment d'ADN restreint (méthode I), il faut que ce fragment soit purifié des enzymes de restriction qui l'ont généré. Cette purification se fait par une précipitation phénol-chloroforme :

1-1) Matériel :

- a) L'échantillon à purifier (plasmide restreint par une enzyme de restriction).
- b) Phénol : Chloroforme : Isoamyl alcool 25/24/1 (Sigma, Saint Louis, U.S.A.) RNase free.
- c) Chloroforme p.a. (Merk, Darmstadt, Allemagne) RNase free.
- d) Acetate de sodium 3M (Merk, Darmstadt, Allemagne) RNase free.
- e) Ethanol 100% (Merk, Darmstadt, Allemagne)

1-2) Méthode (en condition RNase free):

- 1) Porter le volume de l'échantillon à purifier à 100 µl avec de l'eau distillée.
- 2) Ajouter 100 µl de Phénol : Chloroforme: Isoamyl alcool
- 3) Vortexer 40 secondes puis centrifuger 5 minutes à 13000 g.
- 4) Mettre la phase supérieure dans un nouveau tube.
- 5) Ajouter 100 µl de chloroforme.
- 6) Vortexer 40 secondes puis centrifuger 5 minutes à 13000 g.
- 7) Mettre la phase supérieure dans un nouveau tube.
- 8) Ajouter un dixième du volume obtenu de NaAc 3M puis 2,5 volumes d'éthanol 100% à cette phase.
- 9) Vortexer 40 secondes puis laisser précipiter la nuit à -20 °C
- 10) Le lendemain centrifuger 15 à 20 minutes à 13000 g, enlever le surnageant et laisser sécher le culot pendant 30 à 60 minutes.
- 11) Resuspendre le culot dans 20 µl d'eau (RNase free)

② Pour purifier un produit de PCR, c'est-à-dire pour séparer le fragment amplifié des primers et des constituants nécessaires à la PCR, nous avons utilisé le kit Wizard PCR Preps (Promega, Madison, U.S.A.).

2-1) Matériel :

a) Le kit Wizard PCR Preps (Promega, Madison, U.S.A.).

b) Le Direct Purification Buffer compose de :

- 50 mM de KCl
- 10 mM de Tris-HCl pH 8,8
- 1,5 mM de MgCl₂
- 0,1% Triton X-100

2-2) Mode opératoire :

1) Placer dans un micro tube, 30 à 300 µl de produit PCR mais également 100 µl de Direct Purification Buffer.

2) Vortexer le mélange, puis ajouter 1 µl de résine (du kit) et revortexer de nouveau pendant 1 minute.

3) Placer une seringue de 2 ml sur le sommet de la colonne Wizard.

4) Placer le mix sur cette colonne. La solution traversera la colonne grâce à la pression exercée par la seringue sur le liquide.

5) Laver la colonne en ajoutant 2 ml d'isopropanol 80%.

6) Sécher la colonne grâce à une centrifugation de 2 minutes sous 10000 rpm (Heraes Sepatech, Biofuge 13).

7) Placer 50 µl d'eau stérile directement dans la colonne et attendre 1 minute.

8) Centrifuger durant 30 secondes sous 10000 rpm afin d'éluer les fragments d'ADN (Heraes Sepatech, Biofuge 13).

9) Stocker à 4 °C ou à -20 °C.

D) Electrophorèse sur gel d'agarose

Les vérifications des préparations de fragments d'ADN, obtenus par restriction ou par PCR, se font sur un gel d'agarose (BIO-RAD, Richmond, U.S.A.) dans un tampon TBE 1x (voir composition ci-dessous). Ce gel va être soumis à un champ électrique et si on y dépose des fragments d'ADN (chargés négativement) ils vont migrer au travers du gel, en direction de la borne positive.

La distance de migration d'un fragment est proportionnelle à la longueur du fragment, ce qui va nous permettre d'en estimer la taille par comparaison avec un marqueur de taille connue. De plus, une tache sera d'autant plus intense qu'il y aura de copies de même taille dans cette tache. En effet, lors de la réalisation du gel, on ajoute du bromure d'éthidium qui, par sa faculté à s'intercaler entre les bases de l'ADN, va permettre de visualiser les fragments d'ADN.

1) Matériel :

- a) Agarose (BIO-RAD, Richmond, U.S.A.).
- b) Tampon TBE : pour 1 litre de tampon :
 - Tris-Borate 0,85 M (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - EDTA 0,025 M (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - on porte à 1 litre avec de l'eau distillée
- c) Bromure d'éthidium (Sigma, Saint Louis, U.S.A.) (500 µg / ml).
- d) Cuve d'électrophorèse (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne).
- f) Marqueur moléculaire composé de différents fragments d'ADN de longueur connue (voir suite).
- g) Tampon d'échantillon contenant un colorant pour déterminer le front de migration :
 - ↳ 0,25% Bromophénol bleu
 - ↳ 0,25% Xylene cyanol FF
 - ↳ 15% Ficoll (type 400; Pharmacia) dans de l'eau

2) Méthode :

❶ Le gel

- 1) L'agarose est dissous dans 100 ml TBE 1x pour obtenir une solution de 1 ou 2 % en agarose suivant la taille théorique des échantillons à analyser. Cela se fait par chauffage au micro-onde jusqu'à ébullition.
- 2) Lorsque cette solution est refroidie, on ajoute 12 μl de bromure d'éthidium par 100 ml de gel.
- 3) La solution est ensuite coulée dans une cuve d'électrophorèse préparée à la recevoir via des palettes externes et des peignes servant à réaliser les puits dans le gel.



Suivant la taille des peignes utilisés on va créer, dans le gel, des petits ou des grands puits capables de recevoir respectivement de 5 à 20 et de 20 à 40 μl d'échantillon.

- 4) Une fois le gel « solidifié » les peignes et les palettes sont retirés.
- 5) La cuve est ensuite remplie de tampon TBE 1x pour que le courant venant des électrodes (100 Volts et moins de 100 Ampères) puisse traverser le gel. Il reste à préparer les échantillons et à les déposer dans les puits.

❷ Les échantillons et le marqueur

- 1) Une partie de la restriction à analyser sera mise sur le gel.
- 2) Par puits, on dépose X μl d'échantillon (suivant sa concentration) : on essaie d'obtenir dans chaque puits la même concentration en ADN (pour pouvoir les comparer) + 2 μl de colorant + Y μl d'eau.



La somme en μl de X+Y+2 doit pouvoir rentrer dans le puits prévu. Le marqueur est choisi en fonction de la taille des échantillons. Il faut que la taille des fragments des échantillons soit comprise dans l'échelle de tailles de fragments que couvre le marqueur.

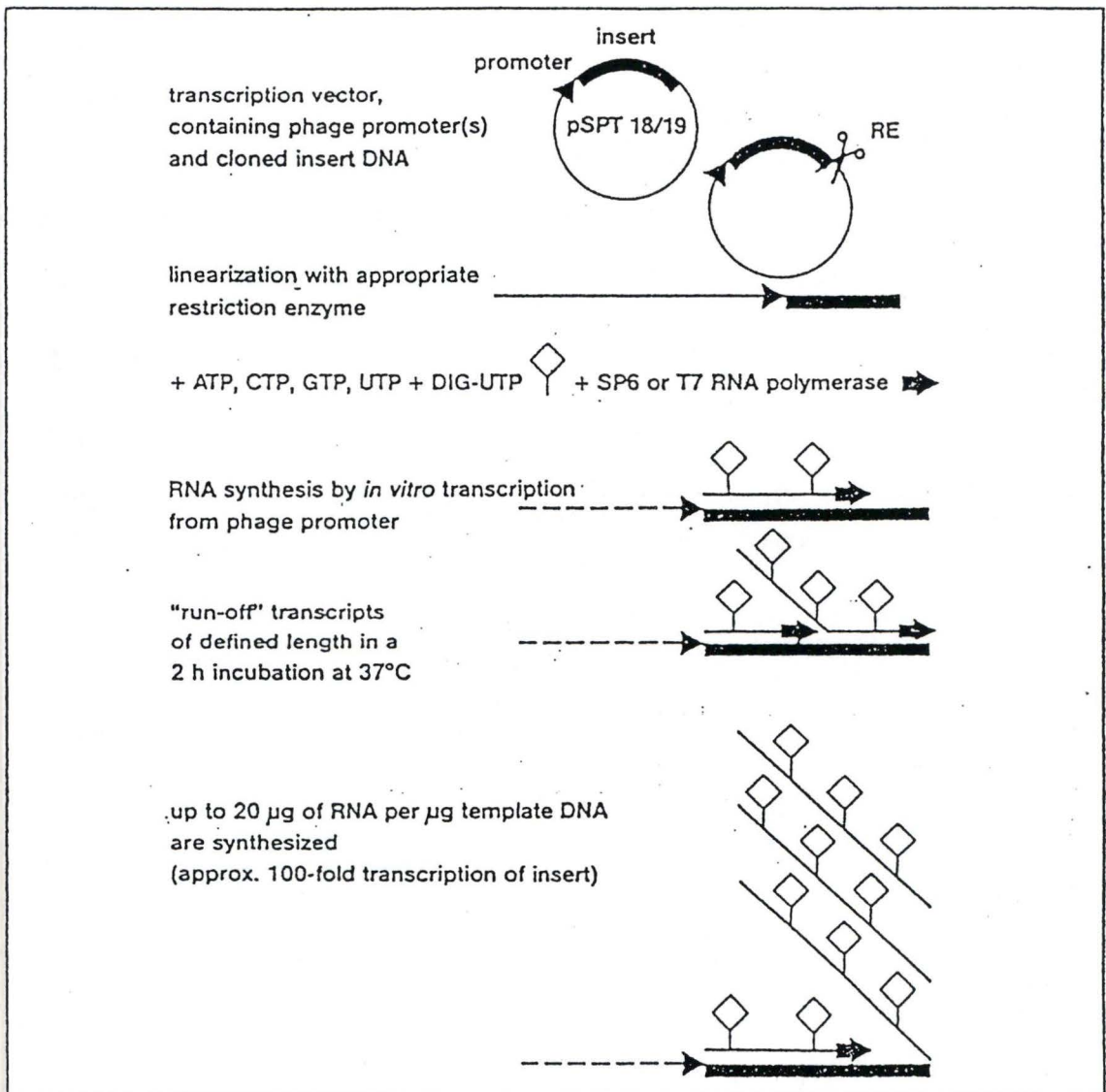


Figure 2-6 : Représentation schématique d'une transcription *in vitro* d'un plasmide restreint. Le marquage des sondes ARN se fait pendant la transcription par les ARN polymérase, via des UTP marqués à la DIG. Cette transcription peut également se faire à partir de fragments amplifiés par PCR.

3) Déposer les échantillons et le marqueur dans différents puits du gel.

4) La migration s'effectue pendant environ 1 heure.

5) On observe ensuite le gel sur une lampe UV.



La taille de chaque fragment d'ADN sera déterminée grâce au marqueur moléculaire.

E) Transcription *in vitro*

La transcription des fragments d'ADN obtenus par PCR ou par restriction enzymatique d'un plasmide se réalise suivant la même méthode. Suivant que l'on ait sur le fragment à transcrire la séquence « T7 » pour l'ARN polymérase T7 ou la séquence « T3 » pour l'ARN polymérase T3 (Méthode I et II) ou même ces deux séquences sur le même brin (Méthode III), il faut veiller à choisir la polymérase correspondante pour la bonne transcription.

Pour « fabriquer » la sonde, nous allons ajouter à la solution de transcription, des dNTP couplés au marqueur, ici le marqueur est la digoxigénine (=DIG) (voir figure 2-6).

1) Matériel :

a) Les fragments à transcrire, issus des méthodes I, II, ou III.

☛ Attention cependant lors de la transcription d'un fragment restreint, (méthode I) car s'il reste beaucoup de plasmides non restreints, les ARN polymérases risquent de transcrire l'entièreté du plasmide et ainsi « contaminer » la sonde proprement dite par de très longs transcrits.

b) Le kit DIG RNA labeling (Sp6 / T7) (Boehringer Mannheim, Allemagne). Ce kit contient :

- L'ARN polymérase T7 (20 Unités / μ l)
- Le tampon 10x, propre à la polymérase T7
- Les NTP comprenant les A, G, C et U parmi lesquels une certaine proportion de U sont marqués à la DIG
- Un inhibiteur d'ARNase

- Un fragment d'ADN (Pspt 18 Neo de 760 bp) servant de contrôle positif. Il sera transcrit par la polymérase T7.
- c) L'ARN polymérase T3 (20 Unités / μl) et son tampon spécifique 10x (Boehringer Mannheim, Allemagne).
- d) De l'eau RNase free.
- e) Une étuve à 37 °C.
- f) EDTA (Merck, Darmstadt, Allemagne) 0,2 M RNase free.

2) Méthode :

- 1) Mettre dans un microtube RNase free, les composés suivants :
 - 1 μg de fragment à transcrire (l'ARN comprenant le promoteur respectif de la polymérase que l'on utilise).
 - 2 μl de mixture de NTP (DIG-UTP).
 - 2 μl d'ARN polymérase (T7 ou T3 suivant le fragment).
 - 2 μl de tampon 10x propre à la polymérase utilisée.
 - 1 μl d'inhibiteur de RNase.
 - X μl d'eau RNase free pour porter cette solution à un volume de 20 μl .

Ceci est réalisé pour les fragments transcrits par T7, pour les fragments transcrits par T3 et pour le contrôle transcrit par T7.

- 2) Mélanger doucement et centrifuger légèrement.
- 3) Incuber les solutions 2 heures à 37 °C.
- 4) Ajouter 2 μl de DNase I (RNase free) afin de dégrader l'ADN ayant servi de modèle pour la transcription.
- 5) Incuber la solution 15 minutes à 37 °C.

6) Ajouter 2 μ l d'EDTA (0,2 M) afin d'arrêter l'activité de la DNase.

7) Vérification et purification de la transcription.

F) Vérification, purification et quantification des sondes

F-1) Vérification sur gel d'agarose :

Le principe est le même que pour les gels d'ADN (voir D) si ce n'est que tout le matériel utilisé doit être RNase free. Les conditions RNase free sont les suivantes : passer la verrerie au stérilisateur (5 heures à 180 °C), utiliser du tampon préparé de manière RNase free et nettoyer la cuve pendant une nuit avec du SDS 1%.

F-2) Purification des sondes :

La purification d'une sonde ARN peut être faite grâce à une Quick spin colonne Séphadex G 50/RNase free (Boehringer Mannheim, Allemagne).

Mode opératoire :

- 1) Utiliser 1 colonne par échantillon à purifier de maximum 100 μ l.
- 2) Agiter et inverser plusieurs fois la colonne.
- 3) Enlever le capuchon du sommet de la colonne puis le tips du fond. Une partie du milieu de suspension des billes va s'écouler.
- 4) Placer la colonne dans un micro tube RNase free. Placer le tout dans un tube en plastique de 10 ml.
- 5) Centrifuger ce tube contenant la colonne et le micro tube, à 2400 rpm pendant 2 minutes.
- 6) Eliminer l'éluat.

- 7) Déposer 100 µl d'eau (RNase free) sur la colonne.
- 8) Centrifuger à 2400 rpm pendant 2 minutes et jeter le contenu du micro tube.
- 9) Placer la colonne dans un nouveau micro tube RNase free et déposer l'échantillon à purifier sur celle-ci. Si l'échantillon à un volume de moins de 50 µl, il est préférable de porter son volume à 50 µl avec de l'eau (RNase free). Déposer l'échantillon bien au centre de la colonne en tenant la colonne bien droite.
- 10) Centrifuger à 2400 rpm pendant 4 minutes.
- 11) Garder ce qui est sorti de la colonne, car il contient la quasi totalité de l'ARN purifié.
- 12) Vérification de la présence de la sonde purifiée sur gel d'agarose.

F-3) Estimation du marquage des sondes :

Le principe général est le suivant : les sondes ainsi que les contrôles seront fixés à une membrane de nylon chargée positivement, afin de les révéler. Les contrôles sont au nombre de deux, le premier est le contrôle positif réalisé lors de la transcription (C+); le second est constitué d'une sonde marquée à la DIG (n°5) que l'on trouve dans le kit DIG RNA labeling (Sp6 / T7) (Boehringer Mannheim, Allemagne).

Ce contrôle va être dilué avant d'être déposé en différentes concentrations connues sur la membrane. Les sondes et l'autre contrôle (C+) seront également dilués de la même façon avant d'être déposés sur la membrane. La révélation de la DIG, à l'aide des anticorps anti-DIG couplés à la phosphatase alcaline, permettra de voir si les sondes ont bien été marquées. Il sera également possible de comparer l'intensité des taches du contrôle du kit avec celles des sondes et du contrôle C+ : comme la concentration en sonde du contrôle du kit est connue, la concentration des sondes pourra être déduite.

1) Matériel :

- a) Le contrôle kit DIG RNA labeling (Sp6 / T7) (Boehringer Mannheim, Allemagne), en concentration de 100 µg par ml.
- b) Une membrane de nylon chargée positivement (Nylon Transfer membrane Hybond-N+, Amersham).
- c) Les différents produits nécessaires à la révélation des sondes c'est-à-dire :
 - L'anticorps anti-DIG couplé à la phosphatase alcaline (Boehringer Mannheim, Allemagne), 150 Unités pour 200 µl.
 - Le tampon n°1 (RNase free et à pH 7,5) composé :
 - d'acide maléique (Merck, Darmstadt, Allemagne) 100 mM
 - de NaCl (Merck, Darmstadt, Allemagne) 150 mM
 - Le tampon de lavage, composé de tampon 1 + 0,3 % de Tween 20 (Sigma, Saint Louis, U.S.A).
 - Le tampon de saturation, composé de tampon 1 + 0,1 % de lait en poudre Gloria (Nestlé, Bruxelles, Belgique).
 - Le tampon de détection, 100 mM de Tris-HCl (Merck, Darmstadt, Allemagne), 100 mM NaCl (Merck, Darmstadt, Allemagne) à pH 9,5.
 - Le NBT (4-nitrotetrazolium blue) (Sigma, Saint Louis, U.S.A) dilué dans du diméthyl formamide 70% pour avoir une concentration finale en NBT de 75 mg/ml.
 - Le BCIP (X-phosphate /5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) (Boehringer Mannheim, Allemagne) 50 mg / ml.

2) Méthode :

- 1) Découper la membrane avec une lame de scalpel RNase free et la déposer dans une boîte de Pétri RNase free.

- 2) Réaliser les dilutions suivantes du contrôle du kit :
 - 1 ère dilution : 5 μ l du stock (100 ng / μ l) + 20 μ l d'eau (RNase free), la concentration finale est alors de 20 ng / μ l.

 - 2 ème dilution : 2 μ l de cette 1 ère dilution + 38 μ l d'eau (RNase free), la concentration finale est alors de 1 ng / μ l.

 - 3 ème dilution : 5 μ l de cette 2 ème dilution + 45 μ l d'eau (RNase free), la concentration finale est alors de 100 pico g / μ l.

 - 4 ème dilution : 5 μ l de cette 3 ème dilution + 45 μ l d'eau (RNase free), la concentration finale est alors de 10 pico g / μ l.

 - 5 ème dilution : 5 μ l de cette 4 ème dilution + 45 μ l d'eau (RNase free), la concentration finale est alors de 1 pico g / μ l.

 - 6 ème dilution : 5 μ l de cette 5 ème dilution + 45 μ l d'eau (RNase free), la concentration finale est alors de 0,1 pico g / μ l.

 - 7 ème dilution : 5 μ l de cette 6 ème dilution + 45 μ l d'eau (RNase free), la concentration finale est alors de 0,01 pico g / μ l.

- 3) Pour nos sondes et le contrôle C+ de transcription, on effectue une première dilution pour obtenir une concentration proche de 20 ng / μ l. Cela peut s'estimer grâce à la quantité d'ADN ayant servi à faire la transcription : en supposant que le rendement de la transcription est celui repris dans le kit, il doit y avoir 10 fois plus d'ARN synthétisé que d'ADN ayant servi de matrice. Il est alors possible d'en déduire grossièrement la concentration et de faire une dilution qui rendrait cette concentration proche de 20 ng / μ l. Ensuite les dilutions 2, 3, 4, 5, 6 et 7 sont effectuées comme décrit ci-dessus.

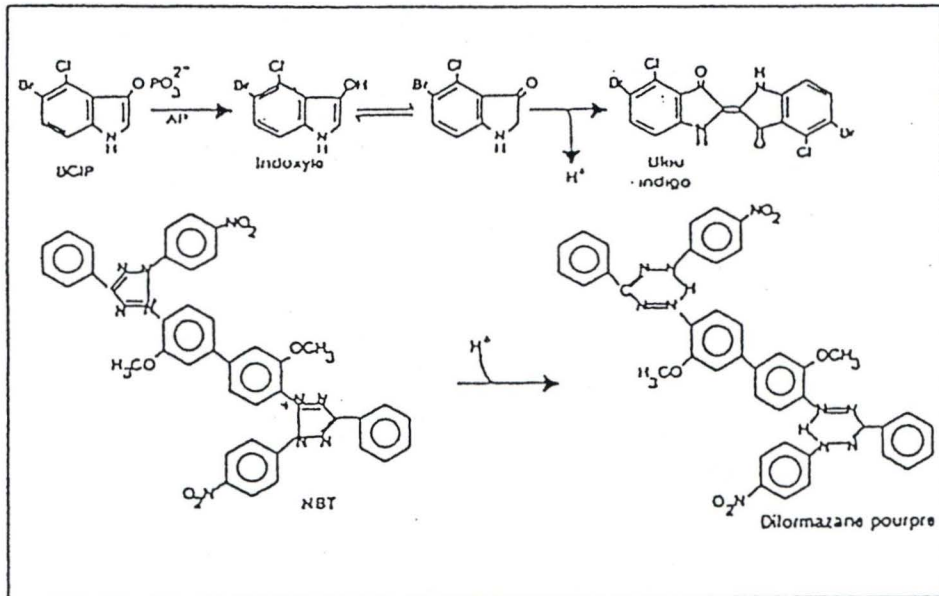


Figure 2-7 : Résumé de la réaction de coloration catalysée par la phosphatase alcaline avec le substrat BCIP combiné au NBT.

- 4) 1 µl de chacune des dilutions (contrôles et tests) est déposé sur la membrane en respectant l'ordre des dilutions. L'ARN étant négatif, il va se fixer à la membrane de nylon chargée positivement.
- 5) Les membranes sont placées 30 minutes à 120 °C ou 50 secondes sous UV afin de renforcer la fixation.
- 6) Laver la membrane avec du tampon de lavage une fois, rapidement.
- 7) Par la suite, la membrane est incubée 30 minutes à température ambiante dans du tampon de saturation.
- 8) Entretemps, l'anticorps anti-DIG est dilué 5000 x dans du tampon de saturation. Le volume final de cette dilution doit pouvoir recouvrir entièrement la membrane.
- 9) Incuber la membrane dans la solution d'anticorps pendant 30 minutes.
- 10) Laver 2 fois la membrane dans du tampon de saturation pendant 15 minutes.
- 11) Entretemps, faire la solution de révélation :
45 µl de NBT (75 mg/ml) + 35 µl de BCIP (50 mg/ml) + 10 ml de tampon de détection (à conserver dans le noir).
- 12) Incuber la membrane pendant 2 minutes dans du tampon de détection.
- 13) Incuber la membrane dans la solution de révélation, à température ambiante dans le noir, pour une période allant de 2 minutes à 16 heures. Le mieux est de regarder de temps en temps l'évolution de la coloration.



L'activité de la phosphatase alcaline (figure 2-7) produit un précipité de couleur bleu-mauve, visible à l'oeil nu, sur les membranes.

- 14) Stopper la réaction en lavant la membrane dans de l'eau RNase free.
- 15) Comparer l'intensité des spots des sondes avec celles du kit, afin d'estimer la concentration en sonde marquée.

F-4) Vérification de la spécificité des sondes par dot blot :

Après avoir estimé la concentration et le marquage de la sonde, nous avons vérifié sa spécificité à reconnaître la séquence complémentaire par la technique de dot blot.

Cela consiste à déposer, sur une membrane de nylon, différentes cibles pour les sondes que l'on veut tester (PDGFA ou Actine dans notre cas). Si les sondes s'hybrident spécifiquement à de l'ARN ou de l'ADN présent sur la membrane, on pourra les révéler grâce à l'anticorps anti-DIG couplé à la phosphatase alcaline. La stringence des lavages permettant de détacher les sondes fixées de manière non spécifique tout en gardant les sondes fixées spécifiquement pourra ainsi être déterminée.

1) Matériel :

- a) Membrane de nylon chargée positivement (Nylon Transfer membrane Hybond-N+, Amersham).
- b) Les sondes à tester.
- c) Différentes cibles qui serviront de contrôle positif ou négatif pour tester les sondes (voir résultats).
- d) Les différents produits nécessaires à la révélation des sondes c'est-à-dire :
 - L'anticorps anti-DIG couplé à la phosphatase alcaline (Boehringer Mannheim, Allemagne), 150 Unités pour 200 µl.
 - Le tampon n°1 (RNase free et à pH 7,5) composé de:
 - d'acide maléique (Merck, Darmstadt, Allemagne) 100 mM
 - de NaCl (Merck, Darmstadt, Allemagne) 150 mM
 - Le tampon de lavage, composé de tampon 1 + 0,3 % de Tween 20 (Sigma, Saint Louis, U.S.A).

- Le tampon de saturation, composé de tampon 1 + 0,1 % de lait en poudre Gloria (Nestlé, Bruxelles, Belgique).
- Le tampon de détection, 100 mM de Tris-HCl (Merck, Darmstadt, Allemagne), 100 mM NaCl (Merck, Darmstadt, Allemagne) à pH 9,5.
- Le NBT (Sigma, Saint Louis, U.S.A) dilué dans du diméthyl formamide 70% pour avoir une concentration finale en NBT de 75 mg /ml.
- Le BCIP (Boehringer Mannheim, Allemagne) 50 mg / ml.

e) Les solutions de lavage (RNase free) :

- Le SDS (10%) :

- ↳ dissoudre 100 gr de SDS (Janssen Chimica, Geel, Belgique) dans 900 ml d'eau chaude
- ↳ chauffer cette solution à 68 °C jusqu'à dissolution totale du SDS
- ↳ ajuster le pH à 7,2
- ↳ porter à 1 litre

- Le SSC (20x) :

- ↳ dissoudre 175,5 gr de NaCl (Merck, Darmstadt, Allemagne) + 88,2 gr de citrate de sodium (Merck, Darmstadt, Allemagne), dans 800 ml d'eau.
- ↳ ajuster le pH à 7,0
- ↳ porter à 1 litre
- ↳ ajouter 0,1 % de DEPC (Acros, New Jersey, U.S.A.). Mélanger vigoureusement et laisser agir une nuit à 37 °C
- ↳ autoclaver le lendemain

f) La solution de préhybridation (pour 10 ml de solution) :

- 2 ml de Denhardt 50x (Sigma, Saint Louis, U.S.A.)
- 3 ml de SSC 20x
- 100 µl de SDS 10%
- 250 µl d'ADN de sperme de saumon (10 mg / ml) dénaturé à 100 °C pendant 2 minutes puis déposé sur glace.
- 5 ml de formamide (Merck, Darmstadt, Allemagne)

Cette solution doit être RNase free.

2) Méthode générale :

- 1) Préparer autant de languettes de membrane de nylon qu'il n'y a de types de sondes à tester.
- 2) Préparer les différentes cibles choisies en les dénaturant à 100 °C pendant 2 minutes et en les déposant tout de suite après sur la glace.
- 3) Déposer 1 µl de chacune des cibles sur les différentes languettes de nylon. Cette opération se fait à 4 °C. Laisser sécher les membranes à 4 °C pendant environ 2 heures.
- 4) Fixer les cibles à la membrane par un chauffage des membranes dans une étuve à 80°C pendant 1 h 30.
- 5) Incuber, ensuite, les membranes dans la solution de préhybridation, à 42 °C pendant 2 heures, sous agitation légère.
- 6) Par la suite, incuber les membranes dans la solution de préhybridation contenant 100 ng de sonde par ml de solution. Ces sondes doivent préalablement être dénaturées à 100 °C (2 minutes) puis mises sur glace. Séparer les languettes suivant les sondes qu'elles reçoivent. Incuber les tubes la nuit à 42 °C.
- 7) L'étape suivante va être constituée d'une série de lavages qui peuvent varier d'une expérience à l'autre.



La stringence de la solution de lavage augmente si on augmente la température et/ou si on diminue sa concentration en SSC.

trois lavages différents ont été réalisés :

7-1) ↪ 3 fois 15 minutes dans une solution SSC 2x + SDS 0,1% à température ambiante

↪ 2 fois 15 minutes dans une solution SSC 0,1x + SDS 0,1% à température ambiante

7-2) ↪ 2 fois 15 minutes dans une solution SSC 4x + SDS 0,1% à 42 °C

↪ 2 fois 15 minutes dans une solution SSC 2x + SDS 0,1% à 42 °C

↪ 2 fois 15 minutes dans une solution SSC 1x + SDS 0,1% à 42 °C

7-3) ↪ 2 fois 15 minutes dans une solution SSC 2x + SDS 0,1% à 42 °C

↪ 2 fois 15 minutes dans une solution SSC 0,1x + SDS 0,1% à 42 °C

8) On effectue ensuite la révélation des sondes :

8-1) Incuber 30 minutes à température ambiante dans du tampon de saturation.

8-2) Entretemps, l'anticorps anti-DIG est dilué 5000 x dans du tampon de saturation. Le volume final de cette dilution doit recouvrir entièrement la membrane.

8-3) Incuber les membranes dans la solution d'anticorps pendant 30 minutes.

8-4) Laver 2 fois la membrane dans du tampon de saturation pendant 15 minutes.

8-5) Entretemps, faire la solution de révélation :

45 µl de NBT (75 mg/ml) + 35 µl de BCIP (50 mg/ml) + 10 ml de tampon de détection (à conserver dans le noir).

8-6) Incuber les membranes pendant 2 minutes dans du tampon de détection.

8-7) Incuber les membranes dans la solution de révélation, à température ambiante dans le noir, pour une période allant de 2 minutes à 16 heures. Le mieux est de regarder de temps en temps l'évolution de la coloration.

8-8) Stopper la réaction en lavant la membrane dans de l'eau RNase free.

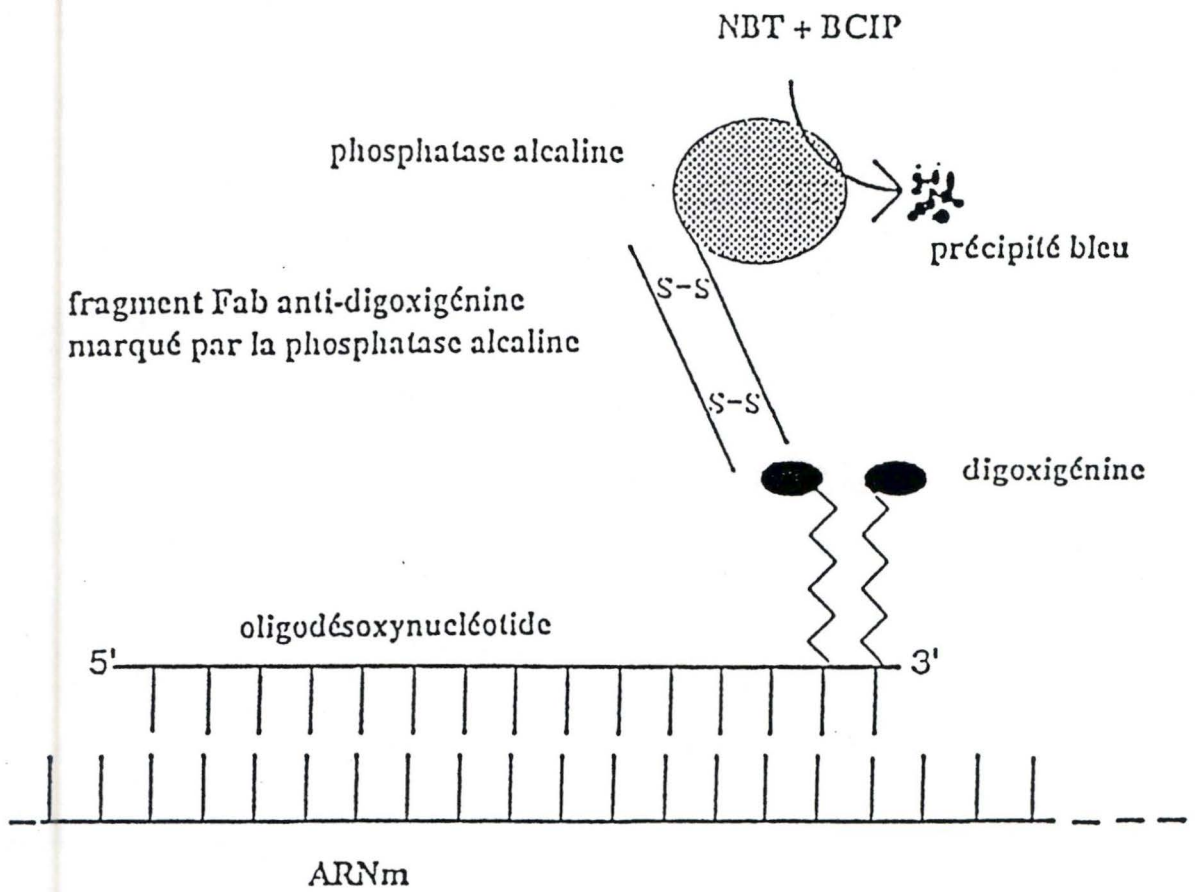


Figure 2-8 : Représentation schématique d'une hybridation *in situ* à l'aide d'une sonde marquée à la DIG et révélée par un anticorps couplé à la phosphatase alcaline.

G) Hybridation *in situ*

Ayant préparé les échantillons de tissus à analyser (coupes) ainsi que les sondes, il est maintenant possible de réaliser l'hybridation *in situ* proprement dite (figure 2-8).

1) Matériel :

- a) Des lames préparées RNase free du tissu où l'on veut mettre un/des ARNm en évidence (voir méthode ci-avant).
- b) Les sondes servant à détecter le/les ARNm que l'on veut mettre en évidence.
- c) De la verrerie RNase free (mise 5 heures au stérilisateur à 180 °C) :
 - 16 bacs à coloration + 6 chariots pouvant contenir chacun 10 lames
 - 4 crochets servant à soulever ces chariots
 - 2 cylindres gradués de 100ml
 - 2 erlenmeyer de 250 ml
 - 1 entonnoir en verre
 - 2 bouteilles de 100 ml
 - ainsi qu'une vingtaine de bouteilles de 500 ml (ou une dizaine de 1 litre) pour la réalisation d'un petit stock de produits, pour 2 expériences. Leurs bouchons doivent être passés au DEPC 0,1% puis autoclavés.
- d) Du SDS 10%, du SSC 20x, de l'eau RNase free (en grande quantité).
- e) Pour déparaffiner les coupes :
 - Du toluol, du méthanol 100% et du méthanol 70% (RNase free, si c'est une nouvelle bouteille, on peut considérer qu'elle est RNase free).
- f) Pour prétraiter et préhybrider les coupes : (dans des bouteilles RNase free)
 - HCl (Merck, Darmstadt, Allemagne) 0,2 M dans de l'eau RNase free (préparer 500ml) {conserver à température ambiante}.
 - PBS (RNase free), à conserver à 4 °C :
Pour 500ml,

- ↳ 4 gr de NaCl (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- ↳ 0,1 gr de KCl (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- ↳ 0,72 gr de Na₂HPO₄ (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- ↳ 0,12 gr de KH₂PO₄ (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- ↳ A diluer dans 400 ml d'eau RNase free, puis à mettre à pH=7,25 et enfin porter à 500 ml.

- Triton x100 (Merck, Darmstadt, Allemagne) 0,3% dilué dans du PBS.

- Protéinase K (Eurogentec, Liège, Belgique) 40 µg/ml. Conservée à 4 °C, en poudre et à diluer juste avant usage.

- Tampon de la protéinase K :

- ↳ 5 ml de Tris 1M (Merck, Darmstadt, Allemagne) à pH=8
- ↳ 0,93 gr de EDTA (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- ↳ porter à 50 ml avec de l'eau RNase free

- Glycine (Merck, Darmstadt, Allemagne) 0,2% dans du PBS), elle se conserve une semaine à 4 °C.

- Paraformaldéhyde (Merck, Darmstadt, Allemagne) 2% dans du PBS.

- Tampon de préhybridation (RNase free) :

- ↳ 10 ml de SSC 20x
- ↳ 40 ml d'eau RNase free
- ↳ 50 ml de formamide désionisé (Merck, Darmstadt, Allemagne) conservé à température ambiante, à l'abri de la lumière.
- ↳ à conserver à température ambiante pendant 1 à 2 semaines.

g) Pour l'hybridation des coupes :

- Les sondes ARNm marquées à la DIG.

- Le tampon d'hybridation qui peut se réaliser en partie à l'avance et être conservé au congélateur (-20 °C) en aliquot de 1 ml:

- ↳ Faire un stock d'environ 40 ml
- ↳ 200 µl de tris (Merck, Darmstadt, Allemagne) 2,5 M pH=7,5
- ↳ 500 µl de Denhardt 50x (Sigma, Saint Louis, U.S.A.)
- ↳ 3240 µl de SSC 20x
- ↳ 25 ml de formamide désionisée (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- ↳ 1250 µl de SDS 20%
- ↳ 10 ml de Dextran sulfate 50% dans de l'eau (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède), il faut l'autoclaver pour arriver à le dissoudre

Lors de l'expérience, on devra ajouter à ce tampon, 1250 µl d'ADN de sperme de saumon dénaturé (10 mg / ml).

h) Pour la posthybridation des coupes :

h-1) Des solutions de SSC 4x, 2x et 0,1x préparées à partir du stock de SSC 10x afin d'effectuer différents lavages, ainsi qu'une solution de SSC 2x contenant 20 µg/ml de RNase (Boehringer Mannheim, Allemagne), à bien isoler du reste des solutions.

h-2) Les différents produits de révélation des sondes :

- L'anticorps anti-DIG couplé à la phosphatase alcaline (Boehringer Mannheim, Allemagne), 150 Unités pour 200 µl.
- Le NBT (Sigma, Saint Louis, U.S.A) dilué dans du diméthyl formamide 70% pour avoir une concentration finale en NBT de 75 mg /ml.
- Le BCIP (Boehringer Mannheim, Allemagne), 50 mg / ml.
- Le tampon n°2 prévu pour diluer l'anticorps et pour effectuer différents lavages (en prévoir 1 litre) :
 - ↳ dans 800 ml d'eau RNase free, dissoudre
 - ↳ 15,06 gr de tris (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - ↳ 8,76 gr de NaCl (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - ↳ diminuer le pH jusque 7,5
 - ↳ porter la solution à 1 litre et conserver à température ambiante

- Tampon n°2 contenant du sérum de chèvre ou de veau foetal 20% (Sigma, Saint Louis, U.S.A).

- Le tampon n°3 :

↳ dans 400 ml d'eau RNase free.

↳ 6,05 gr de tris (Merck, Darmstadt, Allemagne).

↳ diminuer le pH jusque 9,5.

↳ porter la solution à 500 ml et conserver à température ambiante

- Le lévamisol (Sigma, Saint Louis, U.S.A), faisant partie de la solution de révélation avec le NBT et le BCIP. Le lévamisol sert à inhiber les phosphatases alcalines internes au tissu, il est dissous dans le tampon n°3 (5 mgr de lévamisol dans 20 ml de tampon n°3).

i) Couvre-objets et glycergel.

j) Marqueur hydrophobe (Dako Corporation, Carpinteria, U.S.A.)

2) Méthode :

TRAVAILLER DANS DES CONDITIONS RNASE FREE.

1) Prévoir les solutions qui peuvent se préparer à l'avance, ainsi que la vaisselle (RNase free).

2) La veille de l'expérience : noter les lames (numéro, date, et sonde qu'elles vont recevoir). Mettre également 1500 ml de PBS à température ambiante.

3) Le premier jour :

3-1) Mettre une étuve à 37 °C et préparer la paraformaldéhyde 2% dans PBS.

3-2) Déparaffiner et réhydrater les coupes (Les bains se font dans des bacs à coloration RNase free, 150 ml/bain et les coupes dans des chariots également RNase free) :

↳ 2 bains de 5 minutes dans du toluol 100%

↳ 2 bains de 5 minutes dans du méthanol 100%

- ↳ 1 bain de 5 minutes dans du méthanol 70%
- ↳ 1 bain de 1 minute dans de l'eau (RNase free)
- ↳ 1 bain de 5 minutes dans de l'eau (RNase free)

3-3) Incuber les lames dans l'HCl afin de réaliser une hydrolyse ménagée des coupes. Cette étape dénature les protéines mais réduit aussi l'action de fixation de la paraformaldéhyde.

- ↳ 1 bain de 20 minutes dans l'HCl 0,2M

◆ Entretien, réaliser le tampon pour la protéinase K.

3-4) Rincer les coupes au PBS (température ambiante).

- ↳ 3 bains de 5 minutes

◆ Entretien, faire le tampon de préhybridation, s'il n'a pas été fait, et le mettre à 37 °C.

◆ Diluer la protéinase K dans son tampon (20 µg/ml) et mettre le tout à 37°C pendant 30 minutes.

3-5) Incuber les coupes dans le Triton x100 0,3% dans PBS, afin de dénaturer les protéines, de contrecarrer l'action de fixation de la paraformaldéhyde et de perméabiliser les membranes cellulaires.

- ↳ 1 bain de 15 minutes

3-6) Rincer les coupes au PBS (température ambiante).

- ↳ 3 bains de 5 minutes

◆ Entretien, préparer une chambre humide, en employant des grandes boîtes de Pétri en verre RNase free, dans lesquelles se trouve un morceau de papier Wattman humidifié avec de l'eau (le tout RNase free).

◆ Tracer un cercle hydrophobe autour des échantillons de tissus afin de réaliser des incubations en goutte.

3-7) Incuber en goutte les lames avec la solution de protéinase K, afin de perméabiliser le tissu (La concentration en protéinase K peut légèrement varier en fonction du tissu utilisé, mais 20 µg/ml est la meilleure concentration pour les veines, voir suite).

↳ 100 µl par lame, à 37 °C, en chambre humide (pour éviter l'évaporation)

3-8) Incuber les lames dans la solution de glycine 0,2% dans PBS, afin d'arrêter l'action de la protéinase K.

↳ 1 bain de 1 minute, à température ambiante

3-9) Refixer le tissu dans la paraformaldéhyde 2% (car les attaques à l'HCl et enzymatiques ont « défait » l'action du fixateur), afin de maintenir en place les structures du tissu.

↳ 1 bain de 5 minutes à température ambiante

3-10) Rincer les coupes au PBS (température ambiante).

↳ 2 bains de 5 minutes à température ambiante

3-11) Incuber en goutte, les lames dans le tampon de préhybridation.

↳ 100 µl par lame, à 37 °C, en chambre humide, pendant 3 heures

♦ 20 minutes avant la fin des 3 heures, sortir le tampon d'hybridation du congélateur et y diluer les sondes ARN, marquées à la DIG, préalablement dénaturées (2 minutes à 72 °C puis 15 secondes sur glace).

3-12) Incuber en goutte, les lames dans le tampon d'hybridation contenant la sonde utilisée.

↳ 100 µl par lame, à 42 °C, en chambre humide, pour la nuit

♦ Préparer la solution SSC 2x + RNase (dans une autre pièce).

4) Le deuxième jour :

♦ Mettre la solution de SSC 2x + RNase à 37 °C puis ensuite mettre des gants.

♦ Mettre une solution de SSC 0,1x à 42 °C.

4-1) Effectuer les lavages suivant :

↳ 1 bain de 10 secondes dans du SSC 4x, à température ambiante

↳ 2 bains de 20 minutes dans du SSC 2x, à température ambiante

- ↳ 1 bain de 20 minutes dans la solution SSC 2x+RNase, à 37 °C
- ↳ 2 bains de 20 minutes dans du SSC 0,1x , à 42 °C
- ↳ 1 bain de 20 minutes dans du SSC 2x , à température ambiante

♦ Préparer le tampon 2 + 20% de sérum (100 µl par coupe).

4-2) Incuber les coupes dans du tampon 2.

- ↳ 1 bain de 5 minutes à température ambiante

4-3) Incuber les coupes dans du tampon 2 + sérum (en goutte).

- ↳ 100 µl par coupe, pendant 30 minutes, en chambre humide, température ambiante

♦ Préparer l'anticorps anti-DIG-phosphatase alcaline {1/500} dans du tampon 2 + sérum.

4-4) Incuber les coupes dans la solution d'anticorps + tampon 2 + sérum (en goutte)

- ↳ 100 µl par coupe, pendant 3 heures, en chambre humide, à température ambiante.

♦ 20 minutes avant la fin des 3 heures, préparer le lévamisol dans le tampon 3 et préparer, en chambre noire, le NBT et le BCIP. Pour 20 lames (100 µl par lames) utiliser 2500 µl de tampon 3 + 11 µl de NTB + 8,3 µl de BCIP + 0,6 mgr de lévamisol (= la solution de révélation).

4-5) Laver les lames.

- ↳ 2 bains de 10 minutes dans du tampon 2, à température ambiante
- ↳ 1 bain de 5 minutes dans du tampon 3, à température ambiante

4-6) Incuber en goutte, les lames (et en chambre noire) avec la solution de révélation.

- ↳ 100 µl par lame, dans le noir, à température ambiante et pour la nuit

5) Le troisième jour :

♣ Mettre le glycergel dans un bain à 60 °C pour qu'il devienne liquide.

5-1) Arrêter la coloration des lames par un simple passage à l'eau.

5-2) Nettoyer les couvre-objets au méthanol 100%.

5-3) Monter les lames au glycergel en essayant de ne pas faire de bulles lors du recouvrement des lames par le couvre-objet.

C) Résultats et discussion

La pathologie des veines variqueuses sévit d'une manière importante dans nos sociétés industrialisées, ce qui constitue un sérieux problème de santé publique.

En 1993, une hypothèse a été proposée pour tenter d'expliquer l'apparition des veines variqueuses (Michiels *et al*, 1996). Dans cette hypothèse, les conditions hypoxiques s'installant pendant la stase veineuse pourraient jouer un rôle clé dans la désorganisation de la paroi des veines et donc, dans l'instauration de la pathologie veineuse.

Dans le but de pouvoir suivre à long terme les modifications se produisant dans la paroi veineuse dans ces conditions, la même équipe a développé en 1996 un nouveau modèle expérimental : l'organoculture de veine saphène humaine.

Lors de la mise au point de ce modèle, une série de vérifications a été réalisée : on a ainsi montré que l'endothélium et la structure de la paroi veineuse étaient bien conservés et que la viabilité de l'organoculture se maintenait bien pendant les 14 jours que dure l'organoculture (Gille, 1996).

Dans ce travail, nous avons utilisé ce modèle d'organoculture de veine saphène humaine pour tenter de suivre l'expression du facteur de croissance PDGF. Cette mise en évidence a été réalisée à deux niveaux sur des coupes histologiques des fragments de veines maintenus en organoculture : au niveau de l'ARNm et au niveau protéique, respectivement par les techniques d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie.

1) L'organoculture de veine saphène humaine

Le modèle de l'organoculture de veine saphène humaine présente deux avantages majeurs par rapport aux modèles expérimentaux utilisés jusqu'à présent.

Dans un premier temps, il a l'intérêt de travailler sur la veine saphène humaine qui est le lieu privilégié d'apparition des varices. Ce modèle permet donc de se retrouver dans des conditions de travail proches de la réalité.

Deuxièmement, il autorise une analyse à long terme de la structure et des fonctions de l'endothélium et des cellules musculaires lisses de la média. On peut également suivre les interactions entre ces différentes couches tissulaires, l'une par rapport à l'autre, dans leur organisation tissulaire d'origine et ce, durant les quinze jours que dure l'organoculture.

Afin de suivre l'expression du PDGF au cours de l'organoculture, des fragments d'une veine saphène obtenue par stripping ont été mis en culture respectivement pendant 5, 8, 12 et 15 jours. Un morceau de cette veine a, par ailleurs, été directement fixé : il n'a donc pas été mis en culture afin de servir de témoin (jour 0). Après la culture, les échantillons ont été fixés à la paraformaldéhyde; ce fixateur a été choisi car il est relativement doux et préserve suffisamment la structure du tissu pour que les protéines et les ARNm soient toujours reconnaissables respectivement par un anticorps ou par une sonde nucléotidique.

Les morceaux de veine ont été ensuite enrobés dans la paraffine. Il sera donc possible de réaliser, à partir des blocs ainsi obtenus, toute une série de coupes histologiques sur lesquelles seront réalisées les expériences d'immunohistochimie ou d'hybridation *in situ*.

2) Immunohistochimie

Rappelons que l'immunohistochimie est une technique qui permet de détecter un antigène, le plus souvent une protéine à l'aide d'un anticorps qui lui est spécifique. Cette technique présente un très grand nombre de variantes (méthodes directes ou indirectes) qui rend cette technique adaptable à de nombreuses situations.

Le but de ce travail étant de détecter la présence du PDGFA dans les coupes de fragments de veine saphène humaine maintenus en organoculture, il nous fallait adapter un protocole de base de détection immunohistochimique (Bancroft et Stevens, 1996) à ce tissu et cet antigène. De plus, comme nous voulions utiliser les mêmes fragments à la fois pour la détection immunologique et pour l'hybridation *in situ*, la fixation et l'enrobage du tissu devaient être compatibles avec les deux techniques.

2-1) Méthode indirecte en deux étapes

Afin de mettre au point la technique d'immunohistochimie sur les coupes de veines saphènes, nous avons, tout d'abord, choisi de détecter l' α -actine de muscle lisse. Cette protéine est en effet exprimée en grande quantité dans les cellules musculaires lisses, abondantes dans la média de la veine. Les fragments de veine ont été fixés à la paraformaldéhyde et enrobés à la paraffine.

Le protocole de départ comporte différentes étapes que l'on peut résumer comme suit :

- 1) déparaffinage des coupes
- 2) réhydratation des coupes
- 3) inhibition des peroxydases endogènes au tissu par le H_2O_2
- 4) perméabilisation du tissu à l'aide de la trypsine
- 5) saturation des sites de fixation non spécifique pour l'anticorps, par la BSA (2% dans du tampon TBS)
- 6) incubation des coupes avec l'anticorps anti-actine monoclonal (= anticorps primaire)
- 7) incubation des coupes avec un anticorps anti-IgG de souris couplé à la peroxydase de raifort (= anticorps secondaire)
- 8) révélation de ce conjugué à l'aide de la DAB qui engendre un précipité brun
- 9) montage des coupes

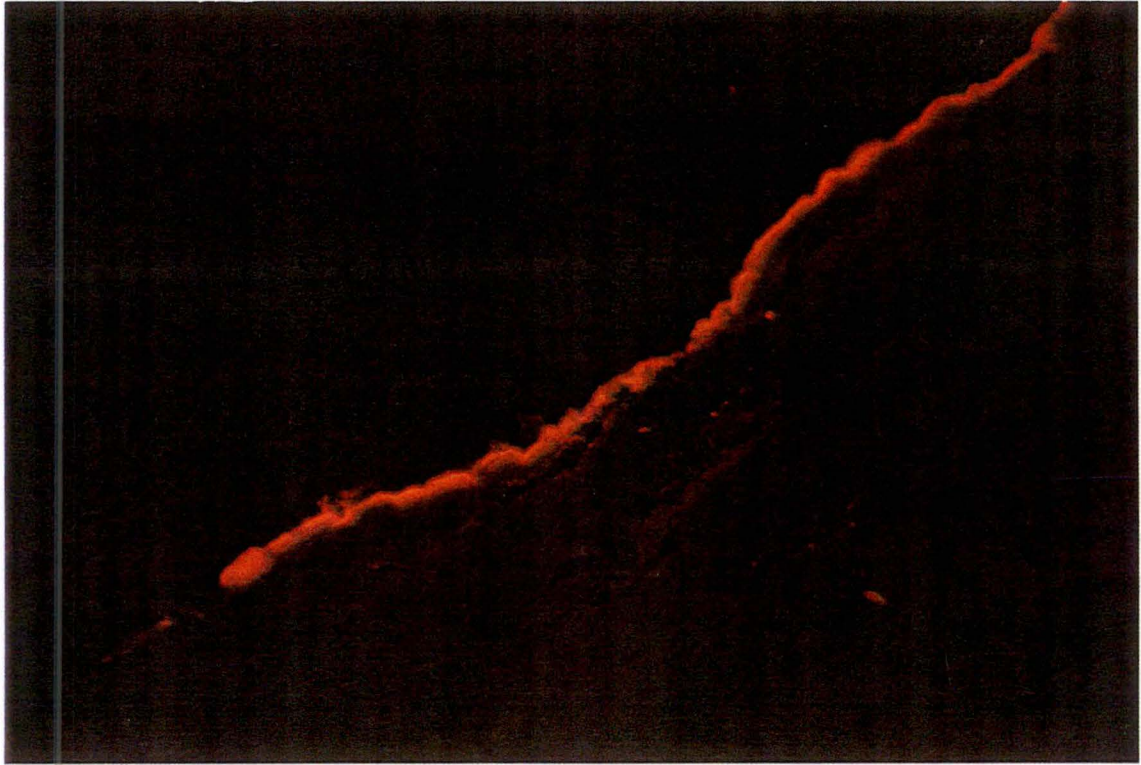


Figure 3-1 : Marquage par immunohistochimie de l'antigène du facteur VIII à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à la rhodamine sur une coupe à congélation de veine ombilicale humaine (G=686x)

La première expérience réalisée sur des coupes de veines saphènes n'ayant pas subi d'organoculture n'a montré aucun marquage spécifique de l' α -actine dans les CML. L'aspect des coupes incubées en présence de l'anticorps primaire était similaire à celui de la coupe incubée en absence de cet anticorps, coupe utilisée comme contrôle négatif.

Plusieurs vérifications ont alors été effectuées. Ainsi, l'activité peroxydase du conjugué anticorps anti-IgG de souris - peroxydase de raifort fut testée en l'incubant directement en présence de DAB et de H_2O_2 . Un précipité brun a bien été obtenu.

Ensuite, afin d'éviter, lorsque le marquage est peu marqué, que le précipité brun ne se dilue dans les différents bains réalisés entre la révélation et le montage des coupes, nous avons fixé et renforcé ce marquage en incubant les coupes une minute dans une solution d'acide osmique 1%. Cependant, l'expérience réalisée dans ces conditions n'a pas permis de mettre en évidence un marquage spécifique de l'actine dans les CML.

Différentes concentrations en anticorps primaire et/ou secondaire ont alors été testées :

- 20 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml et 200 μ g/ml d'anticorps primaire
- 50 μ g/ml et 100 μ g/ml d'anticorps secondaire

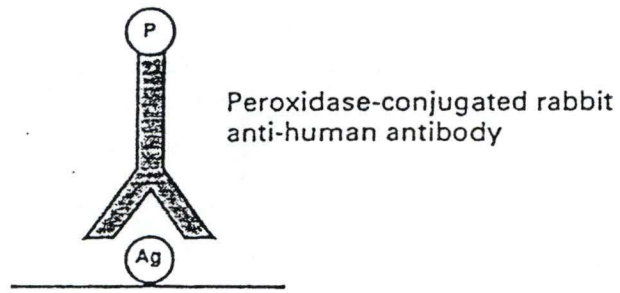
Cependant, aucun marquage spécifique n'a été observé.

La perméabilisation à la trypsine est également une étape importante. Elle doit être un compromis entre le fait de digérer suffisamment le tissu fixé pour permettre l'accès de l'anticorps mais pas trop pour ne pas détruire l'antigène en tant que tel. Différents temps d'incubation en présence de trypsine ont été testés (0, 10 et 20 minutes de perméabilisation). De plus, cette expérience a été réalisée avec deux anticorps primaires différents : un anticorps anti-actine et un anticorps anti-facteur VIII de Von Willebrand (polyclonal). Cette protéine est exprimée spécifiquement dans les cellules endothéliales.

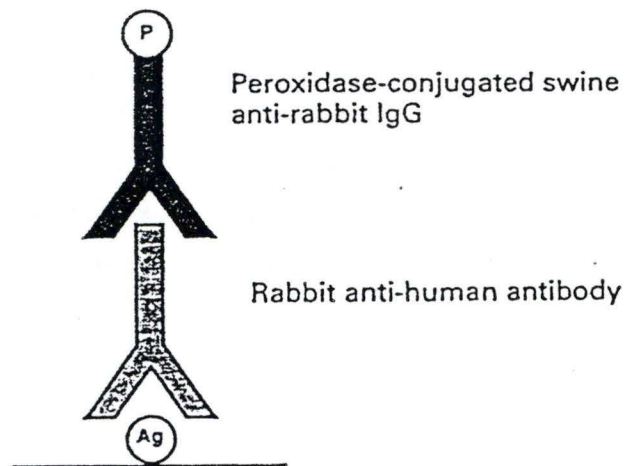
Malgré ces changements, aucun marquage spécifique n'a pu être détecté pour aucun des deux antigènes.

Bien que la littérature montre qu'une fixation à la paraformaldéhyde suivie d'un enrobage à la paraffine est compatible avec une détection immunohistochimique, nous avons voulu vérifier que cette procédure n'était pas responsable des résultats négatifs obtenus jusqu'à présent. A cette fin, nous avons réalisé en parallèle un marquage immunohistochimique et un marquage en immunofluorescence du facteur VIII sur des coupes à congélation de veine ombilicale humaine. Le protocole de traitement des coupes fut le même pour les deux méthodes jusqu'au moment d'ajouter l'anticorps secondaire : anticorps anti-IgG de lapin couplé à la

A



B



C

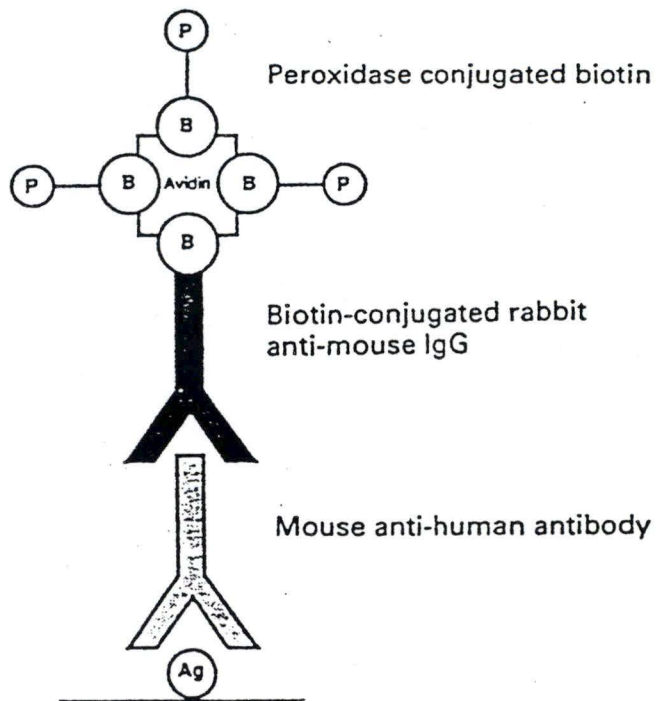


Figure 3-2 : Schéma représentant différentes méthodes d'immunohistochimie : A) méthode directe B) méthode indirecte en 2 étapes C) méthode indirecte en 3 étapes

peroxydase de raifort ou anticorps anti-IgG de lapin marqué à la rhodamine isothiocyanate. Si la détection en immunofluorescence met bien en évidence le facteur VIII présent dans les cellules endothéliales de la veine ombilicale (figure 3-1), aucun marquage spécifique n'a été observé sur les coupes révélées en immunohistochimie. Il semblerait donc que la sensibilité de cette méthode ne soit pas suffisante dans notre cas que pour détecter la présence des antigènes recherchés.

Nous avons donc décidé d'utiliser une autre méthode d'immunohistochimie possédant une sensibilité de détection plus importante que la méthode précédente.

2-2) Méthode indirecte en trois étapes

Cette méthode est aussi une méthode indirecte où un anticorps, dirigé contre la protéine à détecter, est mis en évidence par un anticorps secondaire, lui-même détecté par un complexe streptavidine-peroxydase qui reconnaît la biotine fixée à l'anticorps secondaire (figure 3-2). Pour chaque anticorps secondaire, un complexe streptavidine-biotine contenant plusieurs peroxydases sert à la détection, ce système permet donc d'amplifier fortement le signal. Cette méthode est disponible commercialement sous forme d'un kit de détection : "LSAB+ peroxydase detection kit".

A l'aide de cette méthode, nous avons d'abord tenté de mettre en évidence l' α -actine, antigène abondant, sur des coupes de veines saphènes fixées à la paraformaldéhyde. La figure 3-3 illustre les résultats de cette expérience. Il faut noter que nous avons également envisagé de contrecolorer certaines des coupes à l'hématoxylline de Mayer, qui colore les noyaux des cellules en bleu foncé et le cytoplasme en bleu clair.

Le contrôle négatif incubé en absence d'anticorps primaire ne montre aucun marquage brun correspondant à la présence de l'antigène (figure 3-3-A). Par contre, un marquage intense des cellules est observé en présence de l'anticorps (figure 3-3-C). Ce marquage est même trop intense que pour en distinguer la localisation cellulaire et dans la suite des expériences, l'anticorps primaire sera utilisé à une dilution 10x plus importante. La contrecoloration à l'hématoxylline de 4 minutes dans cette expérience était également trop intense et plus rien ne peut être distingué sur la coupe (figure 3-3-B).

Comme la sensibilité de cette technique s'est révélée suffisante que pour détecter l' α -actine, nous l'avons ensuite utilisée pour visualiser l'expression du PDGF. Le protocole proposé par le fabricant du kit ne présente pas d'étape de perméabilisation des coupes à la trypsine. Par contre, George *et al.* (1995) utilise une perméabilisation de 10 minutes avant de mettre en évidence le PDGF sur des coupes de veine saphène. Nous avons donc vérifié quelles

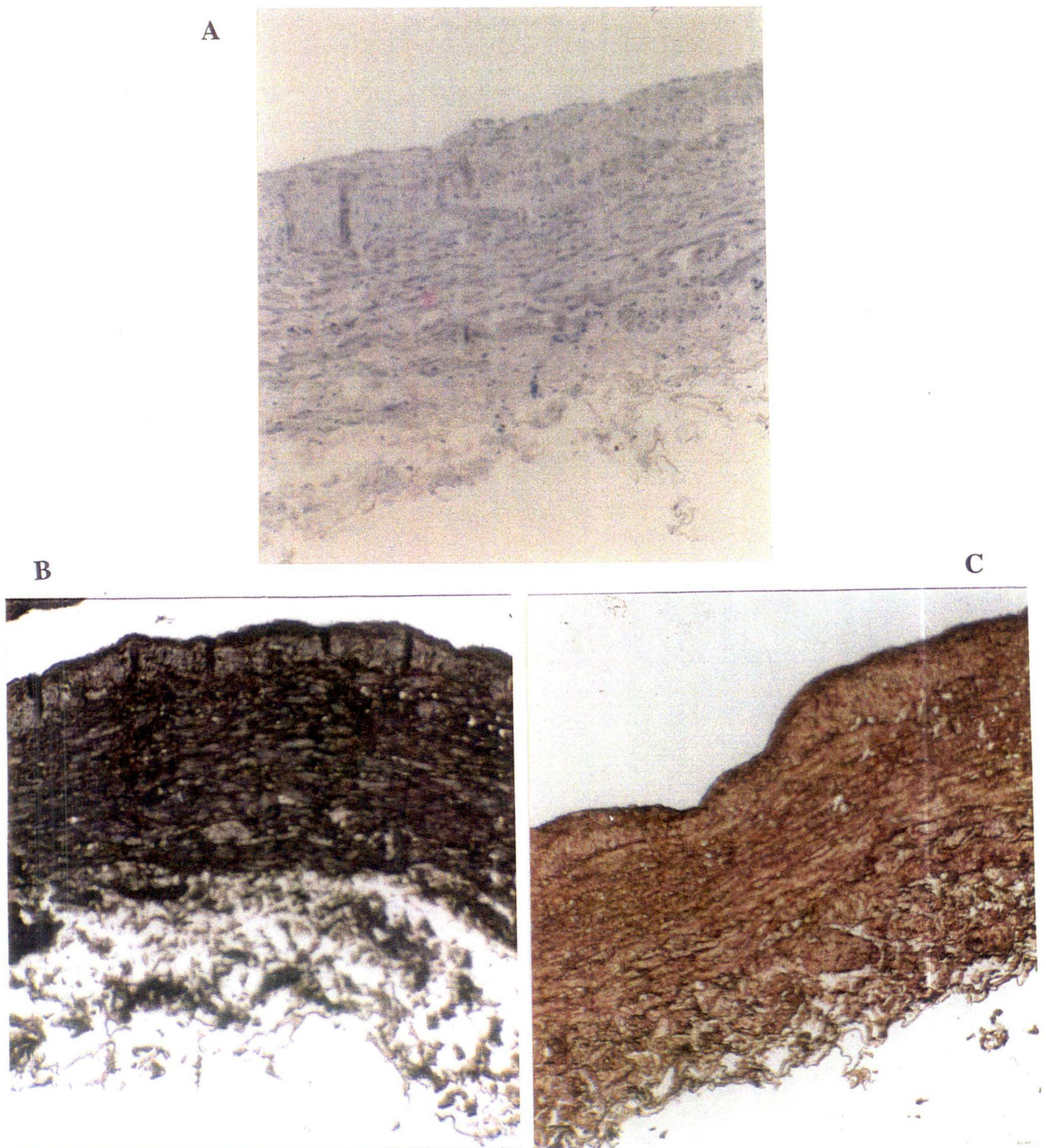
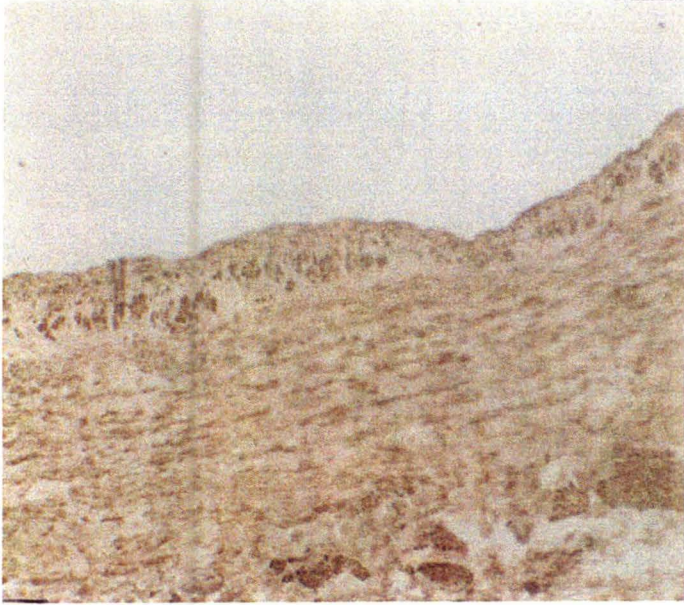
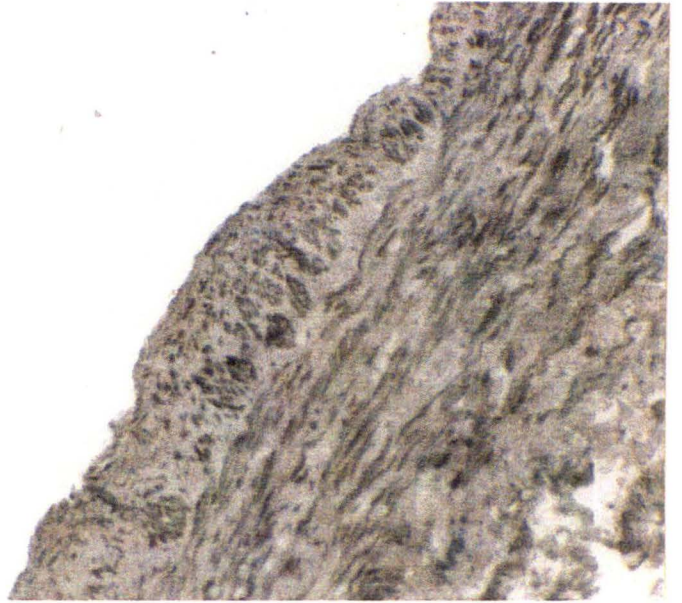


Figure 3-3 : Marquage par immunohistochimie (méthode indirecte en 3 étapes) de l' α actine sur des coupes de veine saphène n'ayant pas subi d'organoculture (jour 0). Ces coupes ont été (A, B) ou pas (C) contrecolorées 4 minutes à l'hématoxilline de Mayer. Le contrôle négatif sans anticorps primaire est également présenté (A) (G= 171x).

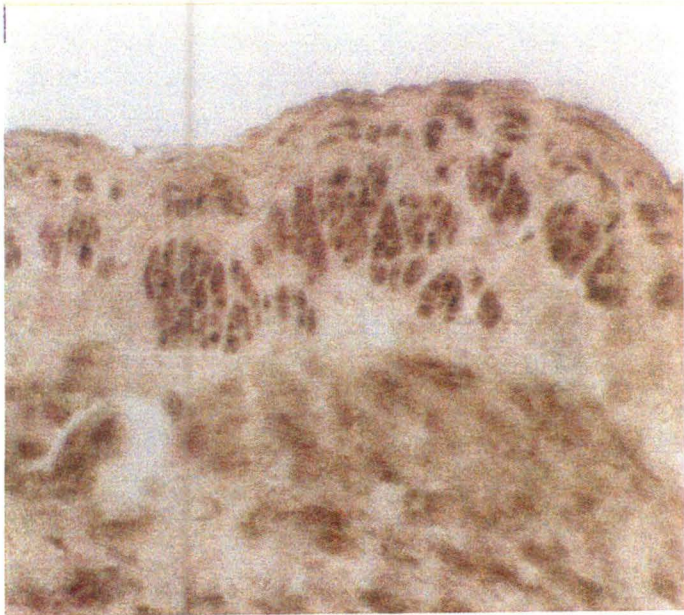
A



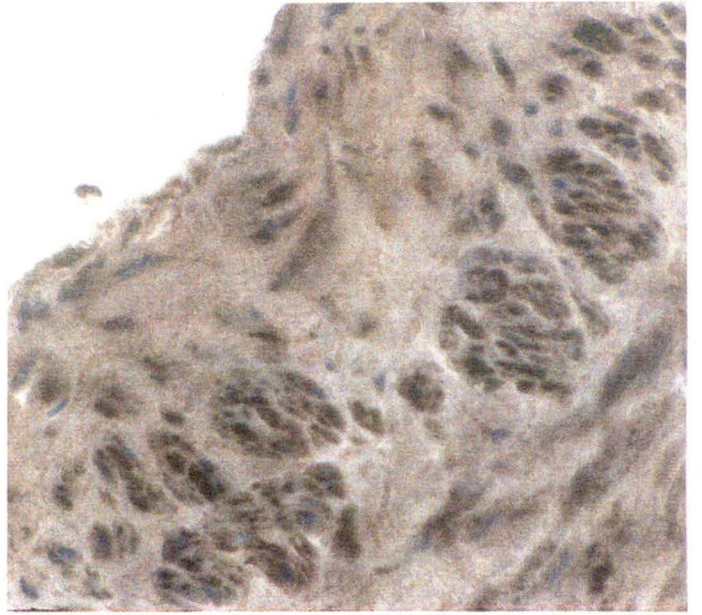
B



C



D



E



F

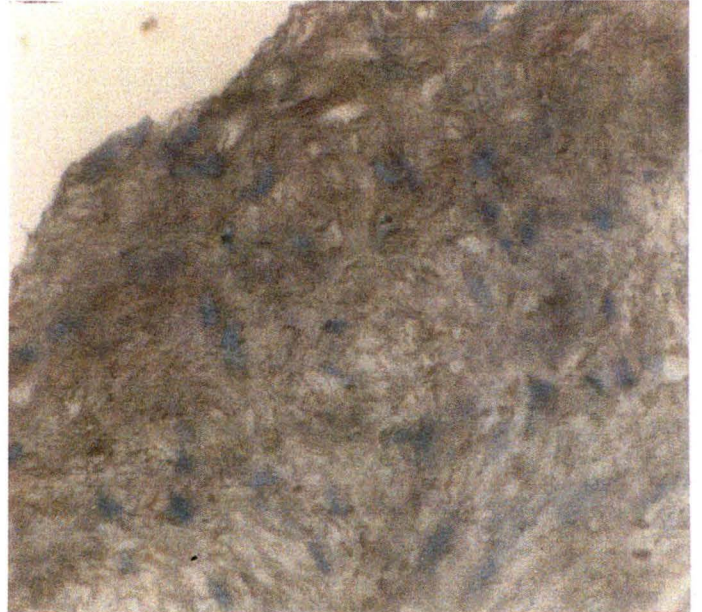


Figure 3-4 : Marquage par immunohistochimie (méthode indirecte en 3 étapes) du PDGF sur des coupes de veine saphène n'ayant pas subi d'organoculture (jour 0) avec (E, F) ou sans (A, B, C, D) perméabilisation à la trypsine. Ces coupes ont été (B, D, F) ou pas (A, C, E) contrecolorées 4 minutes à l'hématoxilline de Mayer. Le contrôle négatif sans anticorps primaire est présenté à la figure 3-3A (G= 171x pour A, B et G=686x pour C, D, E, F).

seraient les conditions optimales pour détecter cet antigène dans nos conditions expérimentales. Pour cela, différents temps de digestion à la trypsine ont été testés : 0, 10 et 20 minutes.

La figure 3-4 illustre les résultats de cette expérience. La photo 3-4-A montre que cette technique permet effectivement de détecter spécifiquement le PDGF (le contrôle négatif est présenté à la figure 3-3-A) : on retrouve cette protéine dans les CML de la média et de manière plus marquée dans la couche supérieure correspondant aux faisceaux de muscles longitudinaux, par rapport à la couche inférieure de muscles circulaires (figure 3-4-C). La contre-coloration à l'hématoxylline interfère plutôt que favorise l'observation du marquage à la DAB (figure 3-4-B) et nous ne l'utiliserons plus dans la suite du travail.

En ce qui concerne la perméabilisation à la trypsine, en comparant les coupes qui n'ont pas été perméabilisées (figure 3-4-C et 3-4-E) par rapport aux coupes perméabilisées à la trypsine pendant 20 minutes (figure 3-4-D et 3-4-F), on remarque que le marquage spécifique est perdu après perméabilisation. La trypsine a probablement détruit l'antigène, elle ne sera donc plus utilisée dans les expériences suivantes.

Grâce à cette technique maintenant mise au point, nous allons pouvoir tenter de mettre en évidence l'expression du PDGF sur les coupes de veine saphène humaine ayant subi différentes périodes d'organoculture (0, 5, 8, 12 et 15 jours). Cette expérience va nous permettre de suivre une éventuelle variation d'expression de ce facteur de croissance tant au cours du temps qu'au niveau de sa localisation tissulaire. Lors de cette expérience, nous avons également marqué en parallèle les protéines d' α -actine et de facteur VIII, respectivement pour mettre spécifiquement en évidence les CML et les cellules endothéliales.

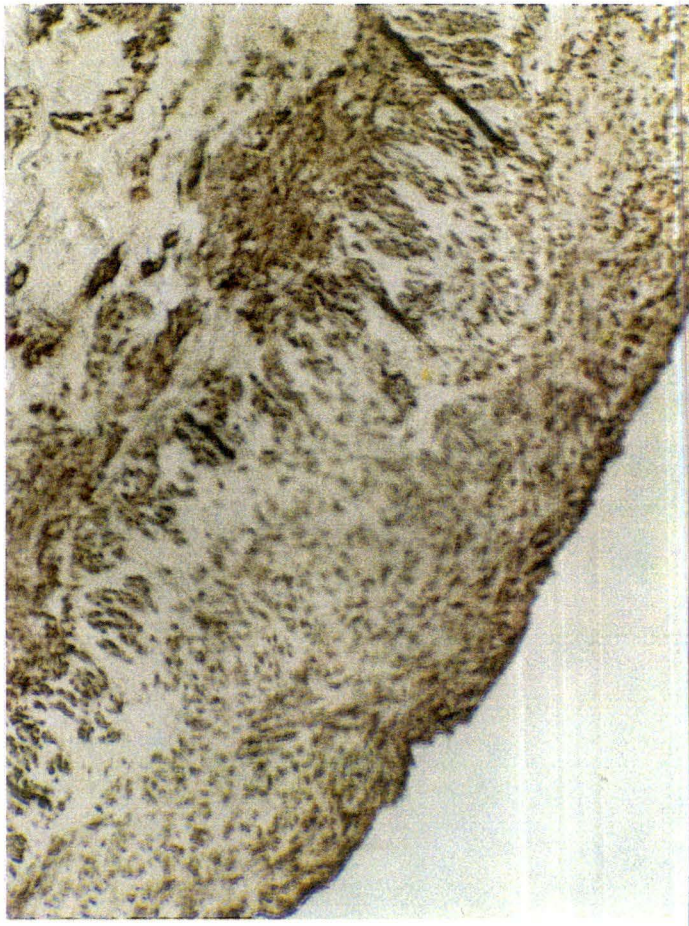
Les résultats de cette expérience d'immunohistochimie sont exposés dans la figure 3-5 pour l' α -actine et le facteur VIII et dans la figure 3-6 pour le PDGF.

La figure 3-5-B montre que le marquage de l' α -actine est bien localisé dans les cellules musculaires lisses. Par ailleurs, nous n'avons pas remarqué de changement dans l'expression de cette protéine au cours de l'organoculture, c'est pourquoi nous ne présentons qu'un exemple (jour 8) de ce marquage. De la même façon, l'anticorps anti-facteur VIII reconnaît une protéine exprimée spécifiquement dans les cellules endothéliales et ce marquage ne varie pas au cours de l'organoculture (figure 3-5-C). Comme nous avons pu mettre en évidence ce marquage dans tous les fragments de veine au cours de l'organoculture, cela suggère que l'endothélium reste intact à la surface du fragment de veine pendant toute la période de la culture, ce qui avait déjà été montré en microscopie à balayage par I. Gille en 1996.

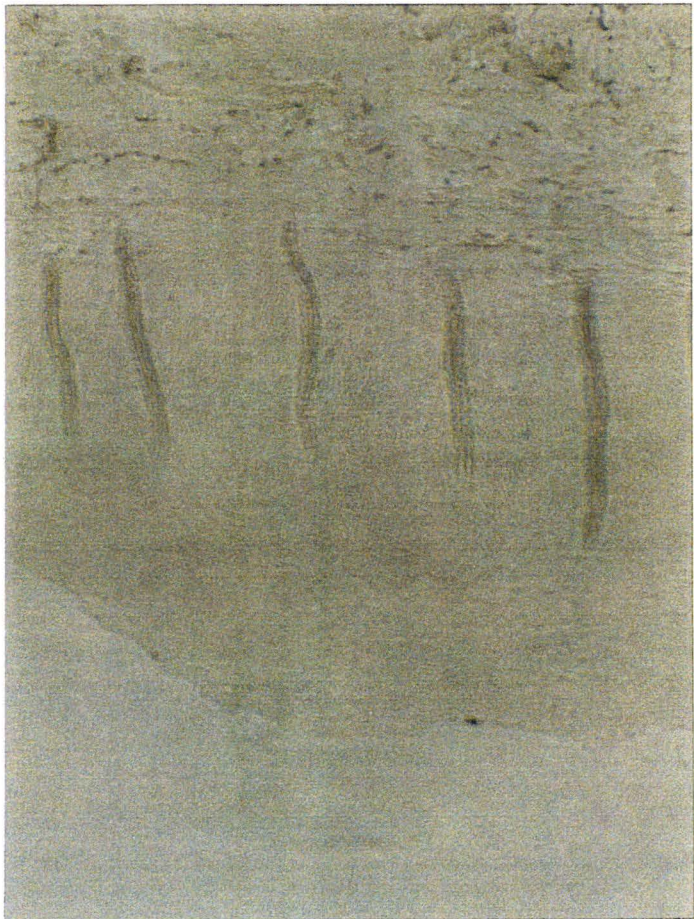
Figure 3-5 : Marquage par immunohistochimie (méthode indirecte en 3 étapes) de l' α actine (B) ou de l'antigène du facteur VIII (C) sur des coupes de fragment de veine saphène maintenu en organoculture pendant 8 jours. Le contrôle négatif sans anticorps primaire est également présenté (A) (G= 171x).



C



B



A



E



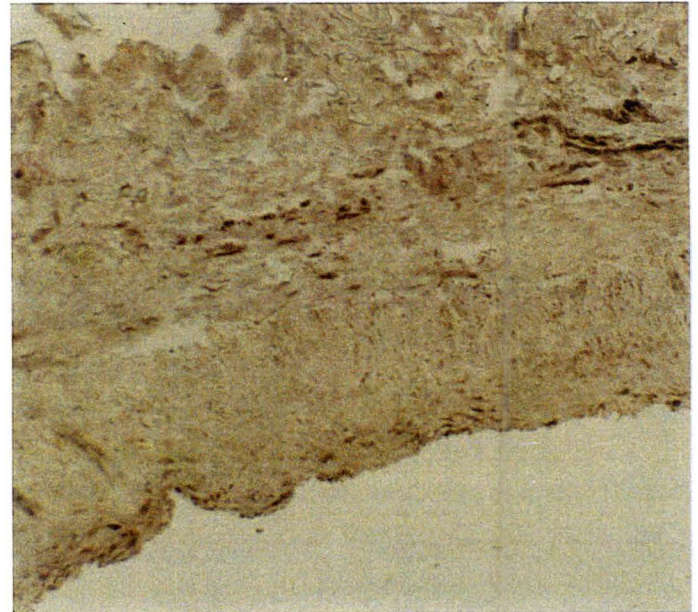
F



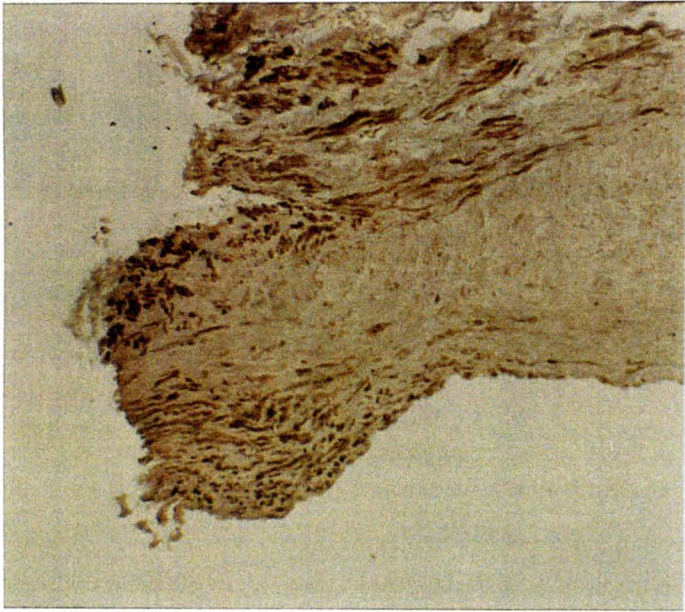
C



D



A



B

G**H****I****J**

Figure 3-6 : Marquage par immunohistochimie (méthode indirecte en 3 étapes) du PDGF sur des coupes de fragments de veine saphène maintenus en organoculture pendant 0 (A, B), 5 (C, D), 8 (E, F), 12 (G, H) ou 15 (I, J) jours. Les photos B, D, F, H et J présentent le bord du fragment de veine. Le contrôle négatif sans anticorps primaire est présenté à la figure 3-5A (G= 171x).

Quant au PDGF, on peut suivre son expression au cours de l'organoculture sur la figure 3-6. On observe que ce facteur est exprimé au jour 0 principalement par certaines des CML présentes dans la couche sous-endothéliale ou néointima (figure 3-6-A). Cette expression semble être perdue au cours de la culture de l'organoculture (jours, 5, 8 et 12 : figure 3-6-C, E et G) mais est de nouveau observable à la fin de l'organoculture (jour 15 : figure 3-6-I), de façon assez homogène dans les CML de la néointima.

L'observation des bords des fragments mis en culture est également intéressante. On y remarque aussi un marquage très intense, que ce soit au niveau de la média et au niveau de l'adventice, au jour 0 (figure 3-5-B) et à la fin de l'organoculture (jour 15, figure 3-5-J). Ce marquage existe dans une moindre mesure aux temps intermédiaires.

En conclusion, après de nombreuses mises au point, nous avons pu suivre l'expression du PDGF par immunohistochimie dans les fragments de veine saphène humaine maintenus en organoculture. Dans la suite du travail, nous avons voulu confronter ces résultats à ceux obtenus par une autre technique. Pour cela, nous avons utilisé la technique d'hybridation *in situ* qui permet de détecter par hybridation avec une sonde complémentaire l'ARNm de la protéine d'intérêt. L'interprétation physiologique des variations observées dans l'expression du PDGF au cours de l'organoculture sera alors envisagée.

3) Hybridation *in situ*

Rappelons que l'hybridation *in situ* est une technique qui permet de détecter une séquence d'ADN ou d'ARN à l'aide d'une sonde marquée qui lui est complémentaire. Cette technique présente le gros avantage de visualiser les ARN cibles directement dans leur environnement tissulaire, ce que permet une étude physiologique du rôle de la protéine correspondante.

Afin de pouvoir réaliser cette hybridation, nous avons besoin d'une sonde complémentaire de l'ARNm du PDGFA. Nous avons choisi de fabriquer une sonde ARN marquée à la digoxygénine (DIG) d'une part, parce que les hybrides ARN-ARN sont plus stables que les hybrides ADN-ARN et d'autre part, un marquage à la digoxygénine a été préféré à un marquage radioactif pour des raisons techniques et de précision de la localisation du marquage sur les coupes (voir paragraphe 5.3 de l'Introduction).

Les différentes étapes de la fabrication de cette sonde seront décrites dans la suite de ce chapitre avant d'aborder les résultats de l'hybridation.

A) Réalisation de la sonde PDGFA

Afin de fabriquer la sonde ARN complémentaire d'une partie de la séquence du PDGFA, il fallait, tout d'abord, avoir la séquence de l'ADNc correspondant dans un environnement qui permettait de réaliser une transcription *in vitro*. Cette séquence de l'ADNc du PDGFA de rat (592 bp) avait déjà été clonée dans un plasmide pBluescript SK+ par Lindner *et al.* (1995). Ce plasmide a été amplifié et purifié au laboratoire (revoir figure 2-2).

Le site multiple de clonage (MSC) de ce plasmide est flanqué de part et d'autre par les promoteurs des ARN polymérase T3 et T7 qui vont permettre la transcription de l'insert en une sonde sens (T7) et une sonde antisens (T3) (revoir figure 2-2).

Il faut cependant couper le plasmide après l'insert avant de réaliser la transcription *in vitro*, sinon l'ARN polymérase générera un transcrit correspondant à toute la séquence du plasmide.

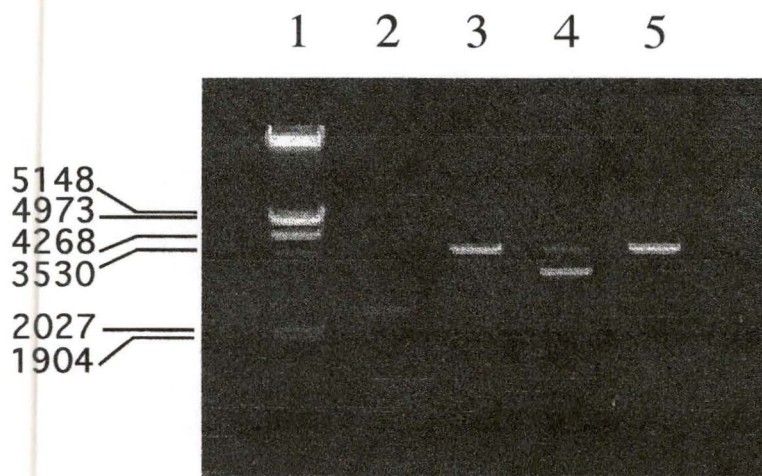


Figure 3-7 : Analyse par électrophorèse en gel d'agarose des produits de restriction du plasmide pPAR par BamH1 ou EcoR1.

- 1: marqueur de poids moléculaire III
- 2: pPAR non restreint.
- 3: pPAR restreint par BamH1 (Gibco, Saint Louis, U.S.A.)
- 4: pPAR restreint par Bam H1 (Boehringer Mannheim, Allemagne)
- 5: pPAR restreint par Eco R1 (Boehringer Mannheim, Allemagne)

A-1) Restriction du plasmide pPAR (méthode I)

Les enzymes que nous avons utilisés pour cette restriction sont les enzymes qui ont été utilisés pour cloner l'insert PDGFA dans le MCS du plasmide, c'est-à-dire BamH1 et EcoR1. Le plasmide restreint par BamH1 sera transcrit, par la suite, par l'ARN polymérase T7 pour donner la sonde sens et le plasmide restreint par EcoR1 sera, quant à lui, transcrit par l'ARN polymérase T3 pour donner la sonde antisens.

2 fois 4 µg de plasmide ont été engagés dans cette réaction.

Afin de vérifier si la restriction a été réalisée totalement, une partie de l'échantillon restreint ainsi qu'un échantillon de plasmide non restreint ont été déposés sur un gel d'agarose.

La figure 3-7 montre les résultats obtenus après migration.

La restriction du plasmide pPAR par BamH1 ou par EcoR1 (pistes 3 et 5) donne une bande de taille proche de 3530 pb (bande n°4 du marqueur III en partant du haut), voir légèrement plus grande. La taille attendue pour le fragment restreint est de 3560 pb c'est-à-dire la taille du plasmide entier. Les restrictions par ces 2 enzymes semblent donc bien être correctes. La position du plasmide non restreint (piste 2) s'explique par le fait qu'étant circulaire, il migre à une distance différente par rapport à un fragment linéaire de même taille. La restriction par BamH1 de la piste 4 montre 2 fragments, l'un de ± 3560 pb et l'autre de ± 3300 pb. L'enzyme de restriction semble avoir coupé à 2 endroits dans le plasmide, à l'endroit convenu et à un autre endroit donnant alors un fragment plus court et un petit fragment de ± 200 pb qui n'est pas visible sur le gel. Malheureusement, sur le gel, nous avons observé, en plus du fragment restreint, dans les pistes 3, 4 et 5, une bande de très faible intensité migrant à la même place que celle du plasmide non restreint, ce qui suggère que la restriction n'a pas été totale.

Dans le but d'obtenir une restriction totale, nous avons recommencé l'expérience, avec plus d'enzyme de restriction et en le laissant agir plus longtemps. Cependant, en visualisant les produits de la restriction sur gel d'agarose, on observe toujours une bande de faible intensité correspondant à du plasmide non restreint.

Nous avons alors tenté de séparer le plasmide restreint du plasmide non restreint via le kit Gene Clean II. Cette technique (non décrite ici) consiste à découper directement dans le gel la bande contenant le fragment d'intérêt et à le purifier du gel d'agarose par adsorption-élution sur billes de silice. Nous avons cependant eu des problèmes pour éliminer les billes de silice qui



Figure 3-8 : Analyse par électrophorèse en gel d'agarose des produits d'amplification par PCR de l'insert du plasmide pPAR.

- 1: marqueur de poids moléculaire VI
- 2: blanc de la PCR de la piste 3
- 3: PCR 1 réalisée avec les primers T3PAR et UPAR (50 pg de chaque primer)
- 4: blanc de la PCR de la piste 5
- 5: PCR 1 réalisée avec les primers T3PAR et UPAR (10 pg de chaque primer)
- 6: blanc de la PCR de la piste 7
- 7: PCR 2 réalisée avec les primers T7PAR et LPAR (50 pg de chaque primer)
- 8: blanc de la PCR de la piste 9
- 9: PCR 2 réalisée avec les primers T7PAR et LPAR (10 pg de chaque primer)

retiennent les fragments d'ADN. Nous avons finalement abandonné les restrictions et opté pour une amplification par PCR de l'insert.

A-2) Amplification par PCR (méthode II)

Nous avons amplifié par PCR deux fragments du plasmide pPAR qui contiennent l'insert flanqué de part et d'autre du MSC et respectivement du promoteur T3 (fragment 1) ou du promoteur T7 (fragment 2). Ces fragments, après leur purification, pourront être directement transcrits par l'ARN polymérase correspondante.

Grâce aux primers T3pPar et UPar (PCR 1), il sera possible d'amplifier la partie du plasmide à transcrire par l'ARN polymérase T3. Les primers T7pPar et LPar (PCR 2) vont, quant à eux, servir à l'amplification de la partie du plasmide à transcrire par l'ARN polymérase T7 (revoir figure 2-5).

Ces deux types de PCR ont en plus été réalisés avec chaque fois deux concentrations en primers : 50 pg/0,5 µl et 10 pg/0,5 µl dans le but d'obtenir des conditions optimales pour chaque PCR. La quantité de cibles utilisées est de 1 ng par PCR.

La figure 3-8 montre la vérification sur gel d'agarose du résultat de ces 4 amplifications par PCR.

Le marqueur moléculaire permet d'estimer que le fragment obtenu dans chacune des 4 PCR a une taille légèrement plus grande que la bande de 653 pb, la taille attendue des fragments est de 680 pb : 592 pb (insert) + une vingtaine de pb (une partie du MCS) + une soixantaine de pb (la séquence T3 ou T7). Ces 4 PCR ont donc amplifié le fragment compris entre les deux primers choisis.

Il faut noter que les blancs réalisés sans cible (sans plasmide) ne génèrent aucun fragment, ce qui indique que les fragments obtenus en présence du plasmide ne sont pas issus d'une contamination.

Nous avons ensuite refait 10 fois chaque PCR en utilisant une concentration en primers de 50 pg par PCR afin d'obtenir une plus grande quantité de chaque fragment qui sera alors destinée à la transcription *in vitro*. La vérification sur gel de cette expérience a confirmé que ces PCR ont permis d'amplifier les fragments voulus.

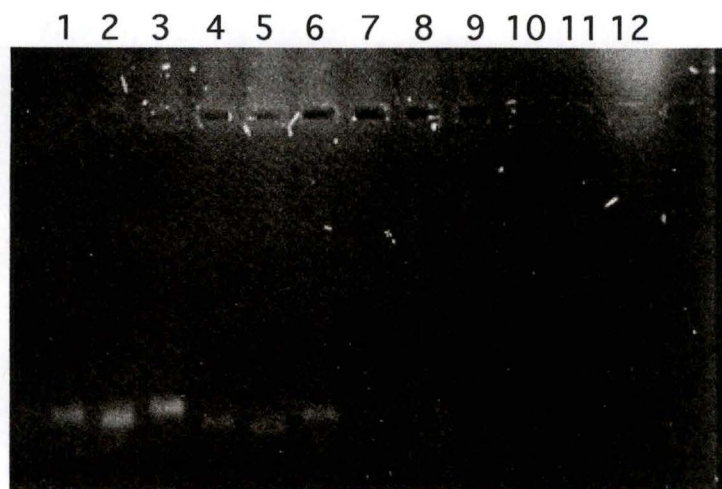


Figure 3-9 : Analyse par électrophorèse en gel d'agarose des produits de la transcription *in vitro* des fragments du plasmide pPAR amplifiés par PCR : sonde antisens en pistes 1, 4, 7 et 10; sonde sens en pistes 2, 5, 8 et 11 et sonde C+ en pistes 3, 6, 9 et 12.

pistes 1, 2, 3 : avant le passage sur la colonne de purification

pistes 4, 5, 6 : après le passage sur la colonne

pistes 7, 8, 9 : après le premier lavage de la colonne

pistes 10, 11, 12 : après le second lavage de la colonne

Enfin, nous avons poolé les 10 PCR 1 ensemble et les 10 PCR 2 ensemble avant de purifier les fragments amplifiés dans ces PCR par la méthode Phénol / Chloroforme. La mesure de la densité optique par spectrophotométrie à 260 nm a permis d'estimer la concentration de chaque fragment que nous avons à notre disposition après purification : 1,33 µg/µl pour la PCR 1 et 1,24 µg/µl pour la PCR 2.

A-3) Transcription *in vitro*

La transcription des deux fragments amplifiés par PCR a été réalisée à l'aide du kit DIG RNA labeling (Sp6/T7) complété de l'ARN polymérase T3 et de son tampon spécifique (Boehringer Mannheim, Allemagne). Lors de la transcription, on utilise un mélange de NTP où 1/3 des UTP sont couplés à la digoxigénine (DIG). Ces nucléotides marqués seront donc incorporés dans la sonde au cours de la synthèse.

Lors de cette expérience, 1 µg de chaque fragment d'ADN a été transcrit par l'ARN polymérase correspondante (PCR 1 par l'ARN polymérase T3 et PCR 2 par l'ARN polymérase T7) ainsi qu'un contrôle de transcription interne au kit (C+) qui va permettre de savoir si la transcription a bien eu lieu ou non.

Après transcription, il faut isoler la sonde du fragment d'ADN qui a servi de matrice, des nucléotides non incorporés et de l'ARN polymérase.

La purification des sondes (notées T3, T7 et C+) a été réalisée grâce à une colonne Quick spin Séphadex G50/ARN. Afin de vérifier que la majorité de la sonde est bien éluée lors de la première centrifugation et non lors des lavages suivants, nous avons déposé sur un gel d'agarose 1% (RNase free) un échantillon des éluats obtenus après les différentes étapes de la purification. De plus, ce gel nous a permis de vérifier qu'un transcrit a bien été généré.

La figure 3-9 présente le gel ainsi obtenu. On peut y observer les bandes correspondant aux sondes dans l'échantillon de départ avant le premier passage sur colonne (3 premières pistes) et dans l'éluat après le premier passage sur la colonne (les 3 pistes suivantes). Aucune bande n'est détectée dans les éluats des deux lavages suivants (les 2 x 3 pistes à l'extrême droite). Ces résultats indiquent que les sondes ont bien été transcrites et qu'elles sont bien éluées lors de la première centrifugation.

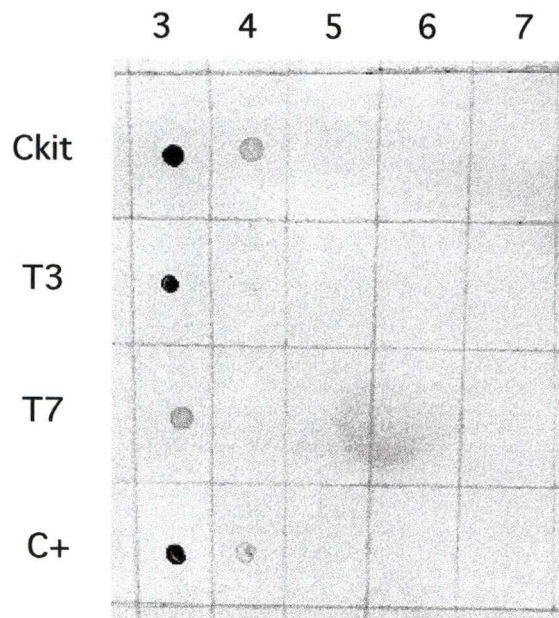


Figure 3-10 : Analyse par dot blot des sondes PDGFA sens et antisens. Des dilutions de 10 en 10 des sondes sens (3ème ligne), antisens (2ème ligne) et C+ (4ème ligne) ainsi que de la sonde Ckit (100 pg/ μ l) (1ère ligne) ont été déposées sur la membrane et révélées à l'aide de l'anticorps anti-DIG couplé à la phosphatase alcaline.

A-4) Dot blot n°1

Afin de vérifier que les sondes sont bien marquées à la DIG et d'en déterminer leur concentration, nous avons réalisé un dot blot : il s'agit de déposer directement sur une membrane de nylon chargée positivement un échantillon d'ADN ou d'ARN préalablement dénaturé. Celui-ci pourra être ensuite révélé soit par hybridation avec une sonde complémentaire marquée, soit directement dans ce cas-ci puisqu'il s'agit de sondes ARN marquées à la DIG. La révélation se fait à l'aide d'un anticorps anti-DIG couplé à la phosphatase alcaline.

Le kit « DIG RNA labeling » contient un fragment d'ARN marqué à la DIG que nous utilisons comme contrôle positif (C kit) sur le dot blot. La figure 3-10 montre que la révélation des concentrations décroissantes de ce contrôle (première ligne) donne des taches de moins en moins intenses. Ce résultat indique que l'étape de révélation fonctionne bien et est semiquantitative. Par ailleurs, les dilutions croissantes du contrôle interne de transcription (C+) (quatrième ligne) donne également des taches de moins en moins intenses, ce qui montre que la transcription *in vitro* a bien généré des fragments d'ARN marqués à la DIG.

Puisque les sondes T3 et T7 que nous avons transcrites donnent des taches, on peut en conclure qu'elles sont également bien marquées à la DIG.

En comparant l'intensité des taches des concentrations connues en sonde du contrôle du kit et l'intensité des taches des sondes T3 et T7, nous avons déduit la concentration de ces sondes :

- la première tache de la sonde T3 (dilution n°3) paraît être 4x moins intense que la dilution n°3 du kit. Puisque la tache n°3 du kit correspond à une concentration de 100 pg de sonde par μl , on peut estimer que la concentration de la sonde T3 serait de 25 pg de sonde par μl pour la dilution n°3, ce qui correspond à 100 ng de sonde par μl dans l'échantillon de départ ($\pm 50 \mu\text{l}$ au total).

- la première tache de la sonde T7 (dilution n°3) paraît être 10x moins intense que la dilution n°3 du kit. Puisque la tache n°3 du kit correspond à une concentration 100 pg de sonde par μl , on peut estimer que la concentration de la sonde T7 serait de 10 pg de sonde par μl pour la dilution n°3, ce qui correspond à 40 ng de sonde par μl dans l'échantillon de départ (± 50 au total).

A-5) Dot blot n°2

Pour savoir si la sonde était capable de s'hybrider spécifiquement sur l'ARNm complémentaire correspondant, nous avons réalisé un second dot blot en déposant non plus la

sonde directement, mais de l'ARN total. La présence de l'ARNm cible peut ensuite y être détectée par hybridation avec une sonde marquée qui sera ensuite révélée. Différentes conditions de lavage ont été utilisées afin d'en déterminer les conditions optimales.

Afin de pouvoir utiliser les sondes sens et antisens PDGFA (T7 et T3) que nous avons fabriquées dans une hybridation sur dot blot, il fallait disposer de l'ARN total de cellules exprimant le PDGFA. Les cellules musculaires lisses expriment le PDGFA (Okazaki *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 1993). De plus, l'expression de ce facteur de croissance peut être augmentée par une stimulation à la thrombine (Kanthou *et al.*, 1992) et peut-être, selon l'hypothèse de Michiels *et al.* (1994), par le bFGF. Par ailleurs, les cellules de la lignée monocyttaire THP-1 lorsqu'elles sont différenciées pendant 48 à 96 heures par le TPA (Shanker *et al.*, 1995) expriment également du PDGFA.

Nous avons donc mis en culture des cellules THP-1 (3 boîtes contenant $2,25 \cdot 10^6$ cellules) pendant 24 heures puis nous les avons différenciées en les incubant 48 heures en présence de 185 ng/ml de PMA. La différenciation en macrophages a bien eu lieu car dans ce cas les cellules deviennent adhérentes, ce qui est bien visible au microscope à contraste de phase. Nous avons ensuite extrait l'ARN total de ces cellules. C'est cet ARN total que nous avons utilisé en plus d'ARN total de CML A7r5 stimulées ou non 16 heures avec 5 ng/ml de bFGF, extrait par Long Le au laboratoire. Grâce à ces ARN totaux, l'efficacité des sondes sens et antisens PDGFA que nous avons fabriquées pourra être vérifiée par dot blot. En plus de ces ARN, nous avons également déposé sur le dot blot une partie du plasmide pPAR (case 1) qui devrait être reconnu à la fois par la sonde sens et par la sonde antisens puisqu'il contient la séquence ADN double brin qui a servi à la fabrication des sondes. Enfin, nous avons également déposé un autre plasmide (case 2) qui devrait servir de contrôle négatif.

De plus, trois conditions de lavage ont été testées en utilisant des stringences de plus en plus fortes :

- a) 3 fois 15 minutes dans une solution SSC 2x + SDS 0,1% à température ambiante.
2 fois 15 minutes dans une solution SSC 0,1x + SDS 0,1% à température ambiante.
- b) 2 fois 15 minutes dans une solution SSC 4x + SDS 0,1% à 42 °C.
2 fois 15 minutes dans une solution SSC 2x + SDS 0,1% à 42 °C.
2 fois 15 minutes dans une solution SSC 1x + SDS 0,1% à 42 °C.
- c) 2 fois 15 minutes dans une solution SSC 2x + SDS 0,1% à 42 °C.

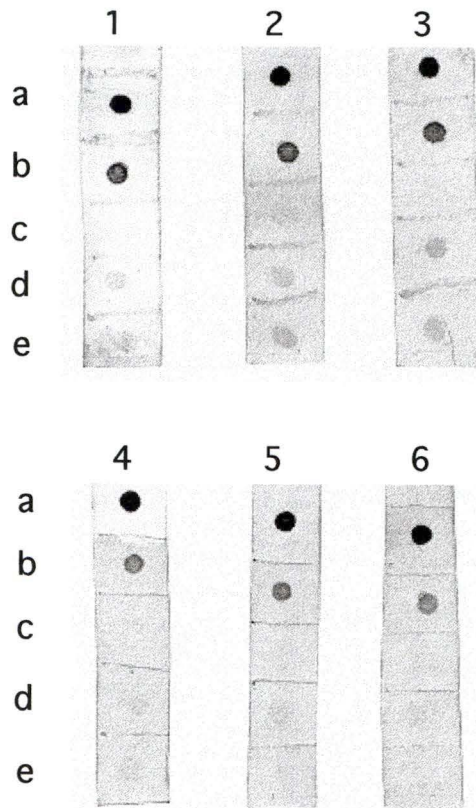


Figure 3-11 : Hybridation sur dot blot des sondes PDGFA sens (membranes 1, 2, 3) et antisens (membranes 4, 5, 6). 25 ng du plasmide pPAR (1ère case), 25 ng du plasmide pBlue Script SK+ (2ème case), 2 μ g d'ARN total provenant d'une culture de cellules (THP1) différenciées (3ème case), 2 μ g d'ARN total provenant d'une culture de CML non stimulées (4ème case) et 2 μ g d'ARN total provenant d'une culture de CML stimulées au bFGF (5ème case) ont été déposés sur la membrane. Après hybridation, les membranes 1 et 4 ont subi un dernier lavage dans du SSC 0,1x à température ambiante, les membranes 2 et 5 un lavage dans du SSC 1x à 42°C et les membranes 3 et 6 un lavage dans du SSC 0,1x à 42°C.

2 fois 15 minutes dans une solution SSC 0,1x + SDS 0,1% à 42 °C.

La figure 3-11 montre les résultats de ce dot blot.

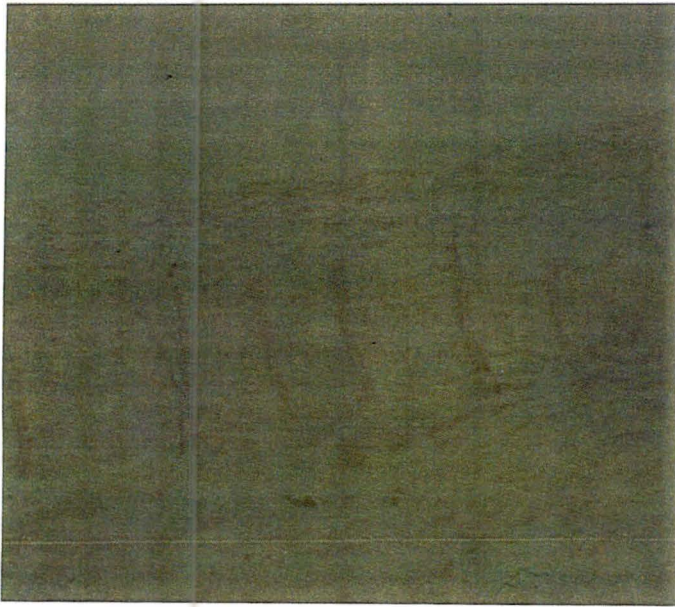
Les trois premières membranes, qui ont reçu la sonde sens T7, ont été plongées dans la solution de révélation un petit peu plus longtemps que les trois autres membranes qui ont reçu la sonde antisens T3, ce qui explique que toutes les taches sont légèrement plus colorées. Cependant, le marquage des ARN totaux n'est pas nettement marqué, il n'y a pas de coloration beaucoup plus intense avec la sonde antisens (qui devrait reconnaître les séquences d'ARNm de PDGFA) par rapport à la sonde sens (qui ne devrait rien reconnaître). Cela pourrait s'expliquer par la trop faible quantité d'ARN déposée sur le dot blot, la sensibilité de la détection serait trop basse pour permettre d'observer le marquage.

Par ailleurs, le plasmide pPAR (pur et en grande quantité par rapport aux spots d'ARN) a très bien été reconnu par les deux sondes, ce qui montre que les sondes sont capables de s'hybrider sur leur cible et peuvent ensuite être révélées par le conjugué anticorps anti-DIG - phosphatase alcaline. Le plasmide n°2 a également été reconnu mais donne une tâche d'intensité moindre que le plasmide pPAR. Ceci est probablement dû à une hybridation des sondes sur le site multiple de clonage commun aux deux plasmides. Par ailleurs, les différentes conditions de lavages testées ne semblent pas influencer les résultats obtenus.

En conclusion, cette expérience montre que les sondes marquées à la DIG que nous avons fabriquées sont capables de reconnaître leur cible par hybridation. Il semble cependant que la faible sensibilité de la technique du dot blot ne nous ait pas permis de détecter à l'aide de ces sondes, la présence d'ARNm du PDGFA dans les ARN totaux extraits de cellules macrophagiques ou de CML. Il faudrait probablement déposer plus de matériel sur la membrane pour pouvoir mettre en évidence la présence de cet ARNm. En outre, un contrôle négatif correct devrait être utilisé.

Sachant que les conditions d'hybridation et de lavages sur le dot blot ne sont pas directement transposables à celles qu'il faudrait utiliser sur lames pour une hybridation *in situ*, nous avons préféré mettre les conditions expérimentales au point directement sur lame plutôt que de recommencer sur membrane.

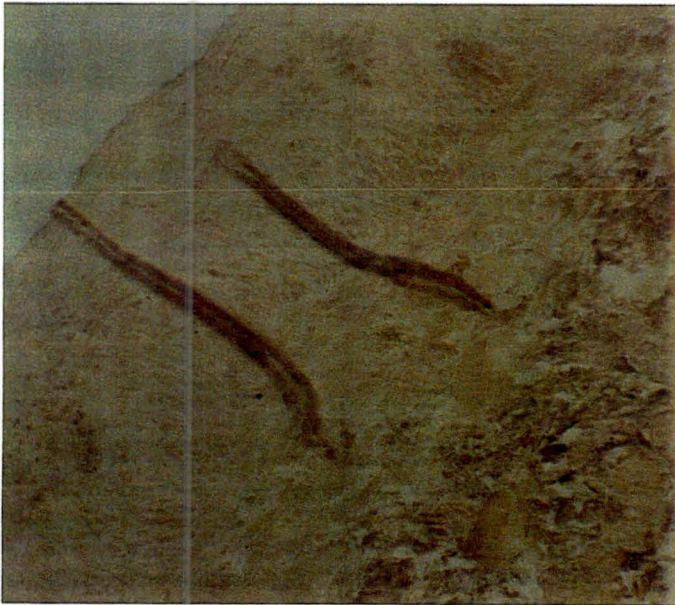
A



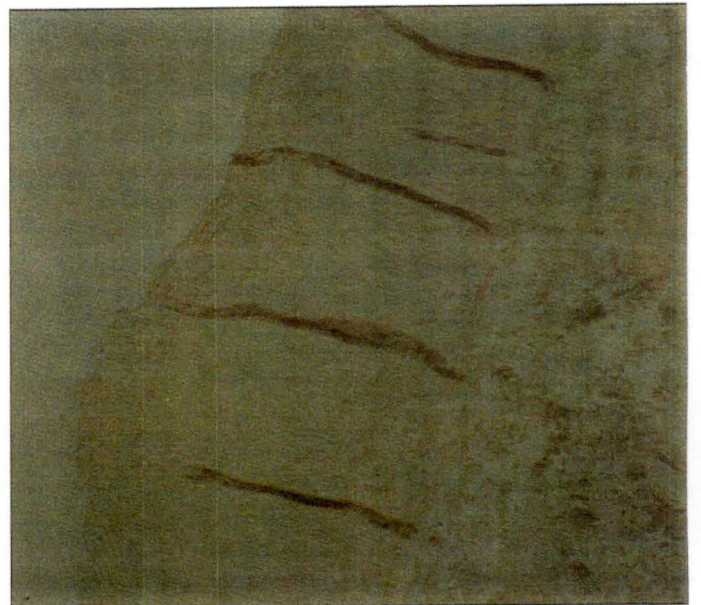
B



C



D



E



F



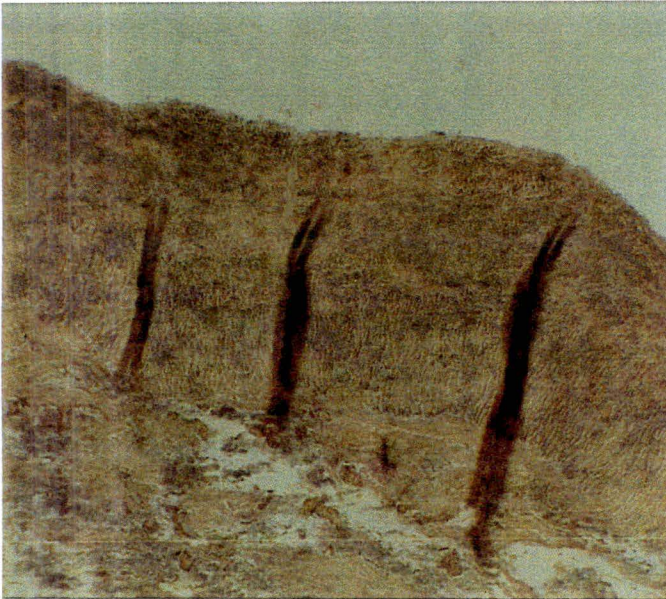
G



H



I



J



Figure 3-12 : Hybridation *in situ* de la sonde antisens (C, E, G, I) ou sens (D, F, H, J) complémentaire du PDFGA sur des coupes de veine saphène n'ayant pas subi d'organoculture (jour 0). Différentes concentrations en protéinase K ont été testées : 0 (C, D), 10 (E, F), 20 (G, H) et 40 $\mu\text{g/ml}$ (A, B, I, J). Les contrôles négatifs sans sonde et sans anticorps anti-DIG (A) et sans sonde avec anticorps anti-DIG (B) sont également présentés (G=171x).

B) Hybridation *in situ*

L'hybridation *in situ* comporte plusieurs étapes : prétraitement des coupes afin de favoriser l'accès de la sonde aux ARNm cibles, hybridation, lavages et révélation de la sonde hybridée à l'aide du conjugué anticorps anti-DIG - phosphatase alcaline.

Nous avons à notre disposition un protocole de base, utilisé par le département d'Histologie des Facultés Universitaires Notre Dame de la Paix que nous avons ajusté en fonction de notre tissu (veine au lieu de peau), de nos sondes et de la cible à détecter (PDGFA au lieu de cytokératines).

B-1) Test de concentration en protéinase K

L'étape de prétraitement des coupes doit être adaptée spécifiquement à chaque type de tissu et à chaque type de sonde. C'est pourquoi, dans la première expérience, différentes concentrations en protéinase K ont été testées. La protéinase K est utilisée pour digérer partiellement les coupes de tissu préalablement fixé afin d'augmenter l'accessibilité des sites de liaison pour la sonde. Cette digestion doit être un compromis entre le fait de favoriser l'accessibilité par digestion tout en ne digérant pas trop le tissu pour maintenir les structures et ne pas perdre les ARNm lors des différents bains subséquents. Des concentrations variant de 0-10 µg/ml pour des tissus « mous » tels que les embryons à 40 µg/ml pour des tissus « plus durs » de protéinase K sont préconisées dans la littérature (Boehringer Mannheim). 0, 10, 20 et 40 µg/ml ont donc été testées dans cette première expérience, où nous avons utilisé la sonde antisens (T3) en parallèle avec la sonde sens (T7), cette dernière servant de contrôle négatif.

Il faut noter que, dans cette expérience, les sites de liaison non spécifique pour l'anticorps anti-DIG ont été saturés à la BSA (2%).

De plus, nous avons utilisé, pour cette expérience, des coupes du bloc n°1 contenant le fragment de veine qui n'a pas été mis en culture.

La figure 3-12 présente les photos des différentes coupes réalisées.

L'analyse des différentes photos révèle que le marquage avec la sonde antisens n'est pas nettement différent du marquage avec la sonde sens. Sur la coupe qui n'a pas subi de digestion à la protéinase K (figure 3-12-C), le marquage est inexistant ou en taches, ce qui suppose que l'accessibilité des sondes à l'ARNm n'est pas homogène.

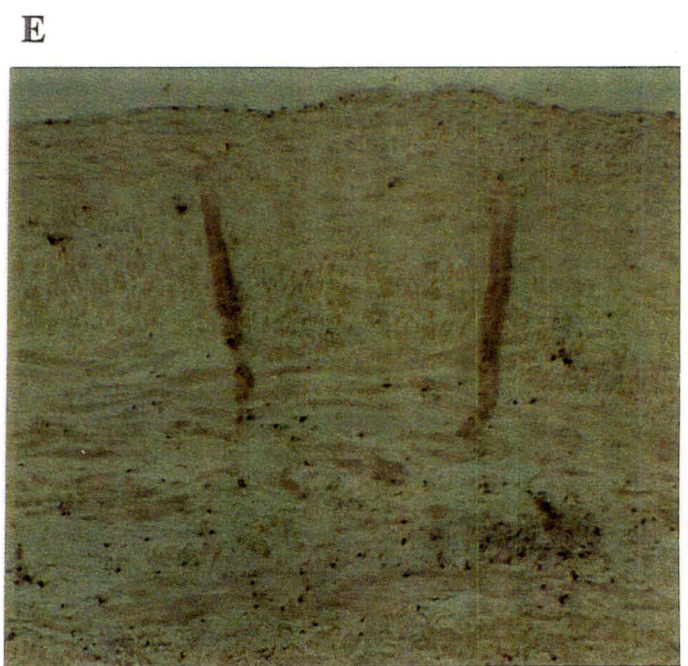
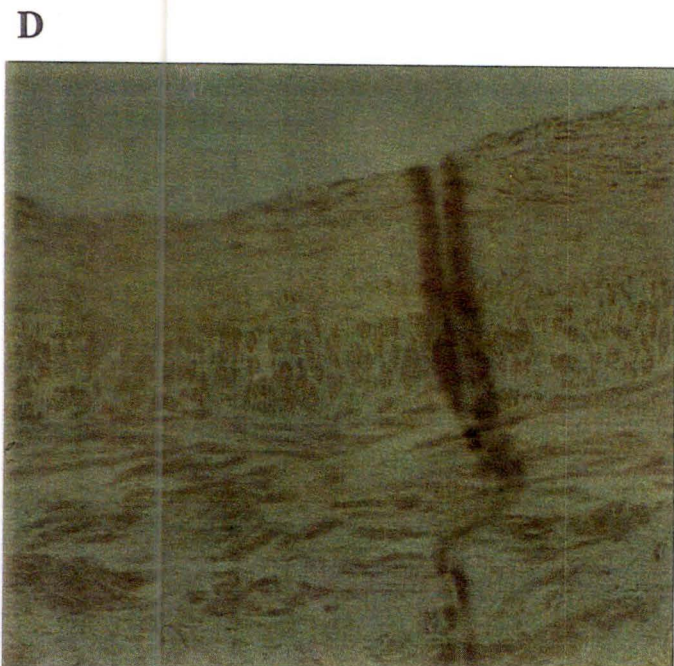
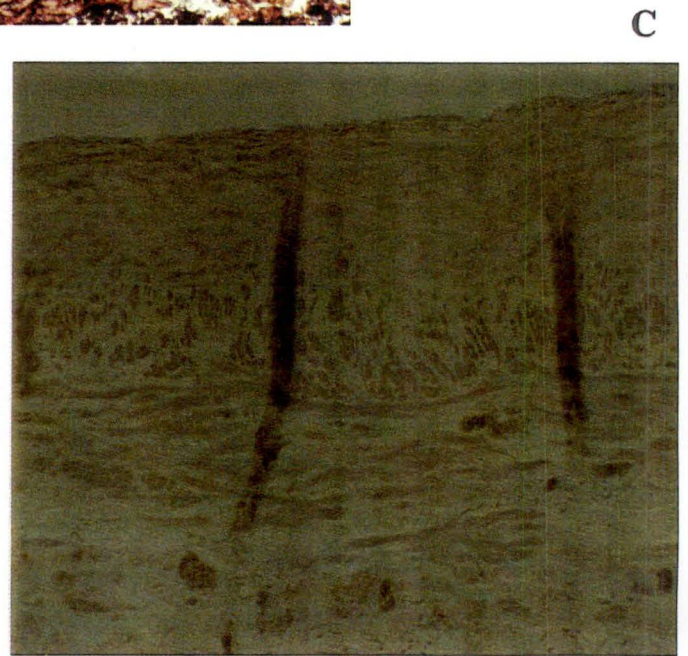
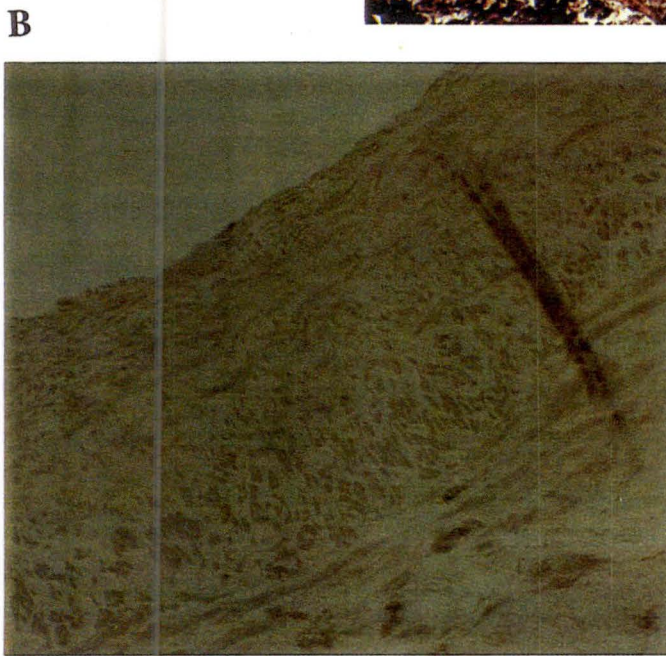


Figure 3-13 : Test de saturation des sites de fixation non-spécifique pour l'anticorps anti-DIG sur des coupes de veine saphène n'ayant pas subi d'organoculture (jour 0). Les coupes ont été saturées ou non (A) avec une solution de 2 % en BSA (E) ou avec 10 % (B), 20 % (C) ou 30 % (D) de sérum de chèvre.

Sur les coupes qui ont été digérées avec 10 ou 20 µg/ml de protéinase K, le marquage semble croissant en netteté et en intensité (figures 3-12-E et G). Enfin, sur les coupes digérées avec 40 µg/ml de protéinase K, l'ensemble des structures tissulaires semble avoir été altéré (figure 3-12-I) et le marquage par l'anticorps anti-DIG seul en absence de sonde est très important (figure 3-12-B), probablement parce que la protéinase K a mis énormément de sites non spécifiques en évidence.

En conclusion, 20 µg/ml semble une concentration en protéinase K optimale pour obtenir un marquage uniforme et ne pas risquer une désorganisation du tissu. Il faut cependant optimiser la saturation des sites de fixation non spécifique de l'anticorps anti-DIG avant de pouvoir interpréter les résultats obtenus avec les sondes antisens et sens.

B-2) Test de saturation des sites non-spécifiques

Comme nous avons des problèmes de fixation non spécifique de l'anticorps anti-DIG sur les coupes, nous avons réalisé une expérience destinée à diminuer ce bruit de fond. Pour cela, nous avons prétraité les coupes comme précédemment tout en utilisant la concentration en protéinase K optimisée (20 µg/ml) puis nous avons directement saturé les coupes avec différentes solutions soit de la BSA (poudre d'albumine bovine sérique) soit du sérum de chèvre complet à différentes concentrations, puis incubé les coupes en présence du conjugué anti-DIG - phosphatase alcaline. La présence de l'anticorps est ensuite révélée normalement. Les étapes d'hybridation n'ont pas été réalisées lors de ce test car elles sont lourdes d'un point de vue expérimental et consommatrices de sonde. Nous avons utilisé, pour cette expérience, des coupes du bloc n°1 contenant le fragment de veine qui n'a pas été mis en culture.

La figure 3-13-A montre qu'en absence de protéines servant à saturer les sites de liaison non spécifique de l'anticorps anti-DIG, on observe un marquage important sur l'ensemble de la coupe. La saturation avec 10% de sérum de chèvre (figure 3-13-B) semble laisser légèrement plus de sites non spécifiques accessibles aux anticorps que les saturations avec 20% (figure 3-13-C) ou 30% (figure 3-13-D). La saturation à la BSA, quant à elle, présente une série de taches et une saturation moins régulière que celle produite par le sérum de chèvre (figure 3-13-E). Nous avons donc décidé d'utiliser dans la suite des expériences une solution contenant 20% de sérum de chèvre pour saturer les sites de fixation non spécifique.

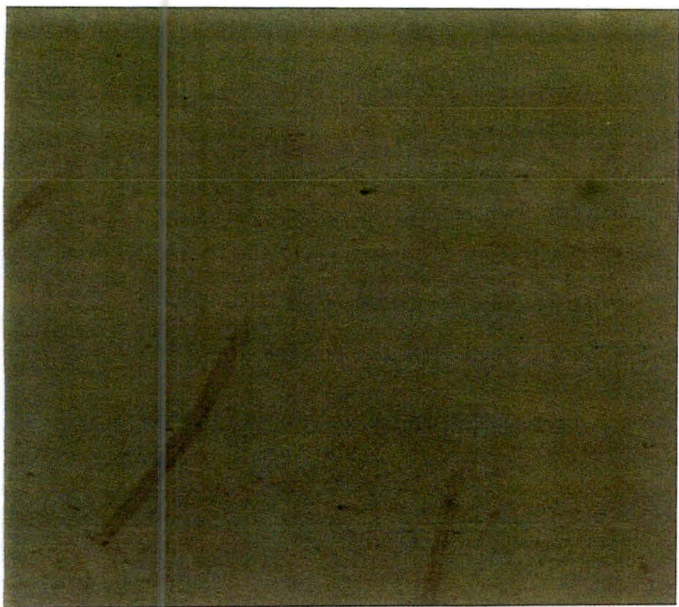
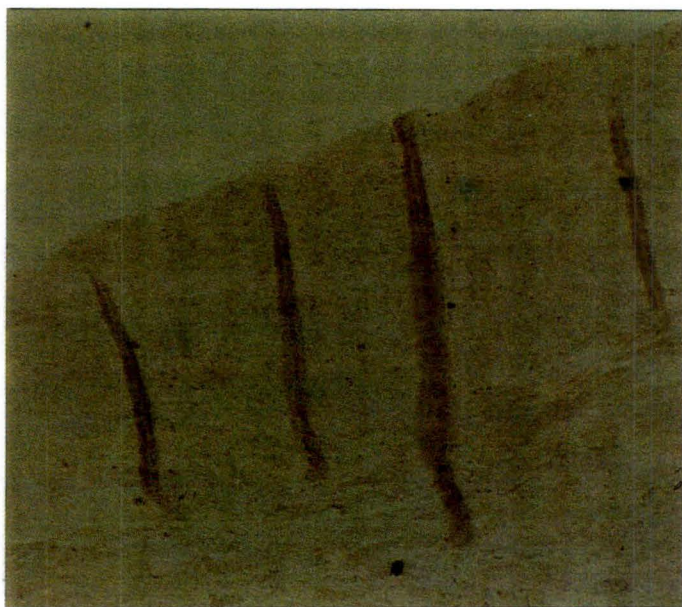
A**B****C****D**

Figure 3-14 : Hybridation *in situ* de la sonde antisens (C, D) complémentaire du PDFGA sur des coupes de veine saphène ayant subi 0 (C), 5 (B, D) ou 8 (A) jours d'organoculture. Les contrôles négatifs sans sonde et sans anticorps anti-DIG (A) et sans sonde avec anticorps anti-DIG (B) sont également présentés (G=171x).

B-3) Test d'hybridation *in situ*

Après avoir optimisé les conditions de l'hybridation *in situ* au cours des deux expériences précédentes (concentration en protéinase K de 20 µg/ml et 20% de sérum de chèvre pour la saturation des sites de fixation non spécifique pour l'anticorps), nous avons tenté de mettre en évidence l'expression de l'ARNm du PDGFA dans les fragments de veine ayant subi différentes périodes d'organoculture.

Outre les blancs sans sonde avec anticorps et sans sonde sans anticorps, les hybridations en présence de la sonde sens ont servi de contrôles négatifs.

Les photos de la figure 3-14 illustrent les hybridations qui ont été réalisées sur les différentes coupes.

Les figures 3-14-A et B montrent que le bruit de fond a bien été réduit au minimum et qu'il n'y a plus de fixation non spécifique de l'anticorps. En présence de la sonde antisens, on observe un marquage dans la néointima des fragments de veine. Ce marquage n'est cependant pas du tout homogène et se localise en amas comme si la sonde avait pu s'hybrider par endroits mais pas à d'autres (figures 3-14-C et D). Il ne s'observe que dans la néointima et pas dans les autres couches tissulaires et est beaucoup moins prononcé en présence de la sonde sens. Ces résultats suggèrent qu'une hybridation spécifique a eu lieu par endroit mais que les conditions expérimentales ne sont pas encore optimales.

C) Réalisation de la sonde β -actine

Les résultats mitigés obtenus dans les expériences précédentes nous ont conduit à réaliser une nouvelle sonde qui servirait de contrôle positif lors d'expériences réalisées en parallèle avec la sonde d'intérêt. Comme le niveau de sensibilité de la technique, c'est-à-dire la détection d'ARNm présent en très faible quantité dans le tissu, est relativement bas, nous avons réalisé une sonde qui détecterait un ARNm fortement exprimé dans les cellules du tissu considéré. Nous avons opté pour la séquence de la β -actine qui est largement exprimée dans la plupart des cellules. Nous n'avions cependant à notre disposition qu'un plasmide contenant une séquence de β -actine de souris et non d'humain. Il fallait donc vérifier que cette sonde pourrait s'hybrider à l'ARN humain. Nous avons donc réalisé un alignement de ces deux séquences à l'aide du programme Blast disponible sur internet et nous avons constaté qu'il y avait une homologie de 90% entre la séquence de la souris et celle de l'homme pour le fragment considéré. L'homologie

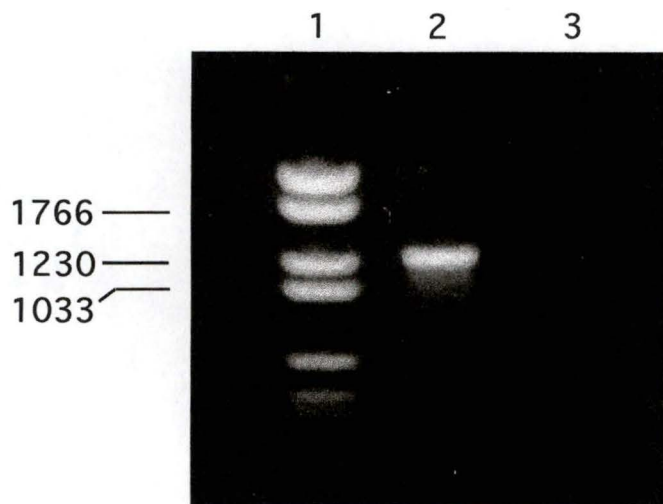


Figure 3-15 : Analyse par électrophorèse en gel d'agarose des produits d'amplification par PCR de l'insert de β -actine de souris dans le plasmide pBlue Script SK+.

- 1: marqueur de poids moléculaire VI
- 2: PCR 3 réalisée avec les primers T3PAR et T7PAR (50 pg de chaque primer)
- 3: blanc de la PCR de la piste 2

était donc suffisante pour pouvoir utiliser la séquence de souris. Nous avons donc décidé de fabriquer une sonde ARN marquée à la DIG à partir de cette séquence.

C-1) Amplification par PCR

La séquence de β -actine que nous avons à notre disposition était clonée dans le plasmide pBlue Script SK+, qui est le même plasmide que celui utilisé pour le clonage de la séquence du PDGFA. Nous pouvions donc réaliser les sondes suivant le même principe que celui utilisé pour les sondes PDGFA. Malheureusement, nous ne disposions que de 2 primers (T3par et T7par) sur les 4 nécessaires à la réalisation de deux fragments PCR (l'un contenant la séquence T3 et l'autre T7), les primers Upar et Lpar étant spécifiques à la séquence de l'insert PDGFA. Par contre, en utilisant ensemble les primers T3par et T7par (spécifiques au plasmide pBlue Script SK+), on peut amplifier un fragment unique plus grand, contenant à la fois les séquences T3 et T7 (revoir méthode III dans le matériel et méthodes).

Il faut noter que nous avons réalisé la PCR directement sur les bactéries lysées sans purification préalable du plasmide. Nous avons effectué cette PCR sur 40 μ l de la suspension de bactéries lysées à l'aide de 50 pg/PCR de chacun des deux primers T3par et T7par (PCR 3 figure 2-5 du matériel et méthodes).

Le résultat de cette PCR est présenté à la figure 3-15.

Nous pouvons voir sur ce gel une bande se situant légèrement au-dessus de la bande n°3 (1230 bp) du marqueur VI. Le fragment attendu par amplification PCR devait avoir une taille de 1160 bp (l'insert actine) + la quarantaine de bp du MSC + les séquences T3 et T7 (\pm 200 pb). La taille de la bande obtenue est donc bien celle que nous attendions.

Nous avons donc refait cette PCR 10x pour avoir suffisamment de matériel en vue de la transcription.

La purification du fragment d'ADN amplifié par ces 10 PCR poolées a été réalisée à l'aide du kit "Wizard PCR Preps DNA purification system". La mesure de la densité optique par spectrophotométrie à 260 nm a permis d'estimer la concentration en ADN à 45 ng par μ l.

C-2) Transcription *in vitro*

Le fragment purifié ainsi obtenu a ensuite été transcrit : une moitié par l'ARN polymérase T3 et l'autre par l'ARN polymérase T7 pour obtenir les sondes sens et antisens. Il faut noter

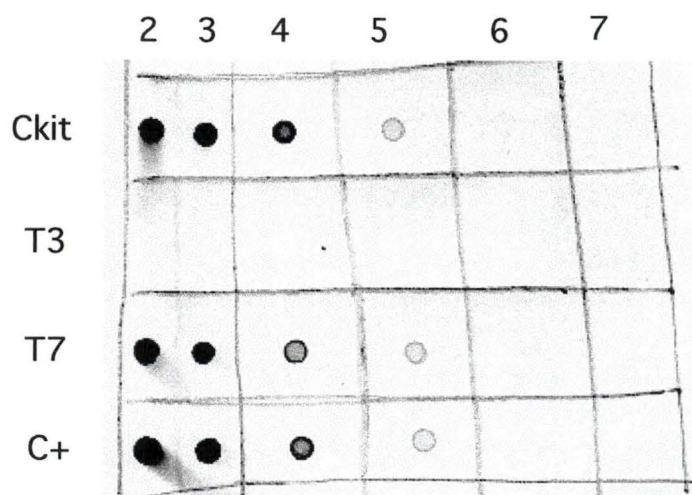


Figure 3-16 : Analyse par dot blot des sondes β -actine T3 et T7. Des dilutions de 10 en 10 des sondes T3 (2ème ligne), T7 (3ème ligne) et C+ (4ème ligne) ainsi que de la sonde Ckit (100 pg/ μ l) (1ère ligne) ont été déposées sur la membrane et révélées à l'aide de l'anticorps anti-DIG couplé à la phosphatase alcaline.

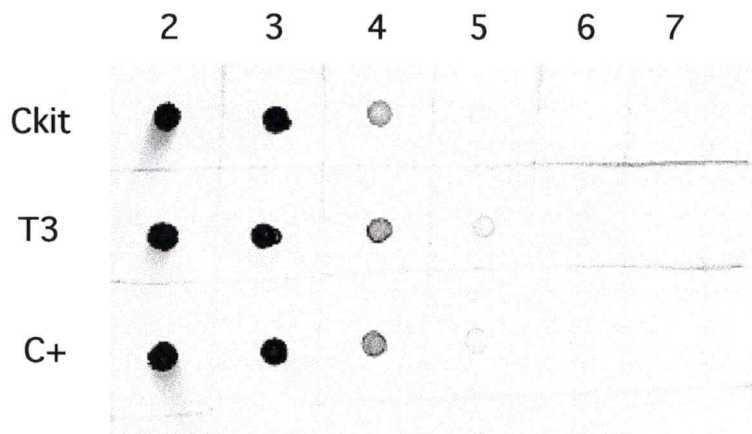


Figure 3-17 : Analyse par dot blot des sondes β -actine T3. Des dilutions de 10 en 10 des sondes T3 (2ème ligne) et C+ (3ème ligne) ainsi que de la sonde Ckit ($100 \text{ pg}/\mu\text{l}$) (1ère ligne) ont été déposées sur la membrane et révélées à l'aide de l'anticorps anti-DIG couplé à la phosphatase alcaline.

que l'on ne connaît pas l'orientation de l'insert dans le plasmide, on ne sait donc pas laquelle est la sonde sens et laquelle est la sonde antisens. Le marquage des sondes se fera pendant la transcription par l'ajout de UTP couplés à la digoxigénine (DIG).

Nous avons donc transcrit 2 x 1 µg de fragment amplifié par PCR par les deux polymérases respectives, ainsi que le contrôle du kit (C+) qui a été transcrit par la polymérase T7.

La purification des transcrits a été réalisée à l'aide d'une colonne Quick spin Séphadex G50/ARN. Nous savions que l'ADN purifié serait élué lors de la première centrifugation de la colonne au vu des résultats obtenus précédemment (voir A-3-2).

C-3) Dot blot n°1

Afin de déterminer la concentration en sonde obtenue après purification et de vérifier si le marquage a bien fonctionné, nous avons réalisé un dot blot. Les sondes actine T3 et T7 ainsi que la sonde contrôle C+ ont été fixées sur une membrane de nylon chargée positivement et révélées à l'aide de l'anticorps anti-DIG couplé à la phosphatase alcaline.

La figure 3-16 montre le résultat de ce dot blot.

Aucune tache n'est observable sur la membrane pour la sonde transcrite par l'ARN polymérase T3, ce qui suggère que la sonde n'a pas été produite ou qu'elle n'a pas été marquée. Cela est peut être dû à la polymérase elle-même ou à l'oubli d'un des composants de la « solution de transcription ». Nous avons donc refait, de la même façon que précédemment, la transcription avec une enzyme d'une autre marque (Boehringer Mannheim, Allemagne), la purification ainsi que le dot blot. La figure 3-17 montre le résultat de cette deuxième expérience. Nous y observons bien des taches correspondant à la sonde T3.

La comparaison de l'intensité des taches générées par les sondes à celle des taches de la sonde du kit (C kit) permet d'en estimer la concentration à 20 ng/µl pour la dilution n°1. Nous aurions donc 200 ng/µl (la dilution n°1 est une dilution 10x) et cela pour chacune des sondes T3 et T7 de β-actine de souris.

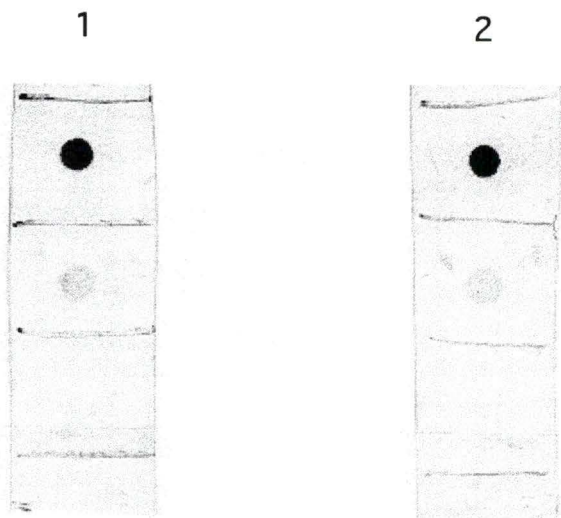


Figure 3-18 : Hybridation sur dot blot des β actine T3 (membrane 1) et T7 (membrane 2). 25 ng du plasmide pBlue Script SK+ contenant l'insert de β -actine de souris (1ère case), 2 μ g d'ARN total provenant d'une culture de fibroblates humains (2ème case) et 2 μ l d'eau RNase free ont été déposés sur la membrane.

C-4) Dot blot n°2

Pour savoir si la sonde était capable de s'hybrider sur l'ARNm complémentaire correspondant, nous avons réalisé un second dot blot en déposant non plus directement la sonde, mais de l'ARN total, ainsi que le fragment d'ADN amplifié par PCR (PCR 3). La présence de l'ARNm ou de l'ADN cible peut ensuite être détectée par hybridation avec la sonde marquée.

Afin de pouvoir utiliser les sondes sens et antisens actine (T7 et T3) que nous avons fabriquées dans une hybridation sur dot blot, il fallait disposer d'ARN total de cellules exprimant cette protéine. La plupart des cellules expriment en grande quantité l'ARNm de β -actine. De plus, comme nous voulions utiliser ces sondes sur des coupes de veine humaine, nous avons vérifié sur le dot blot si la sonde antisens de β -actine de souris pouvait effectivement reconnaître l'ARNm humain correspondant. Nous avons donc utilisé de l'ARN total de fibroblastes humains, extrait au laboratoire.

Les lavages qui ont été utilisés sont les suivants :

3 fois 15 minutes dans une solution SSC 2x + SDS 0,1% à température ambiante.

2 fois 15 minutes dans une solution SSC 0,1x + SDS 0,1% à température ambiante.

La figure 3-18 montre le résultat de ce dot blot.

Les deux sondes actine (T3 et T7) sont tout à fait capables de reconnaître leur séquence complémentaire provenant du fragment d'ADN amplifié par PCR (case 1). L'intensité des taches générées par l'ARN total de fibroblastes (case 2) n'est pas différente après hybridation en présence de la sonde T3 ou en présence de la sonde T7, ce qui indique que nous n'avons pas pu mettre en évidence d'hybridation spécifique. Il est possible que la quantité d'ARN total déposé sur la membrane (2 μ g par spot) soit trop faible que pour permettre la détection d'ARNm spécifique par cette technique. Ce test ne nous a donc pas permis d'identifier quelle était la sonde sens et quelle était la sonde antisens.

C-5) Vérification des sondes

Afin d'augmenter la sensibilité de la méthode et toujours dans le but de vérifier si la sonde β -actine de souris pouvait reconnaître l'ARNm humain complémentaire, un northern blot a été réalisé avec le même extrait d'ARN total que le dot blot précédent, c'est-à-dire purifié à partir de fibroblastes humains. Les avantages du northern blot par rapport au dot blot sont le fait qu'une plus grande quantité d'ARN est utilisée et le fait que les différents ARN sont séparés au cours



Figure 3-19 : Hybridation sur northern blot des sondes T3 (1ère membrane) et T7 (2ème membrane) complémentaires de la β -actine de souris. 4 X 20 μ g d'ARN total de fibroblastes humains ont été déposés par piste sur un gel d'agarose pour être ensuite transférés après migration sur chaque membrane.



Figure 3-20 : Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose des sondes T7 et T3 complémentaires de la β -actine de souris.

1: sonde T7
2: sonde T3

d'une migration dans un gel dénaturant avant d'être transférés sur la membrane de nylon : la sensibilité est donc augmentée de par la quantité plus grande et de par une accessibilité plus importante des ARNm pour l'hybridation.

La figure 3-19 montre que la sonde T3 et la sonde T7 ont reconnu un grand nombre de bandes correspondant à des ARN différents. De plus, l'intensité de ces bandes est similaire pour les deux sondes, ce qui indiquerait qu'il y a eu beaucoup de fixations non spécifiques. Cela est probablement dû au fait que les conditions de lavage n'ont pas été optimisées et ne seraient pas assez stringentes que pour décrocher les sondes fixées de manière non spécifique. Il faut cependant noter que la bande la plus marquée correspond effectivement à l'ARNm de la β -actine, comme l'a montré P. Dumont au laboratoire à l'aide d'une autre sonde actine marquée radioactivement.

Une autre hypothèse pour expliquer le marquage de différentes bandes au niveau du northern blot serait que les sondes soient fragmentées par la présence de RNases contaminantes. Afin de vérifier l'intégrité des sondes, un échantillon des deux sondes a été déposé sur un gel d'agarose dénaturant. Après migration (voir figure 3-20), on observe une seule bande pour la sonde T7 et une bande largement majoritaire de même taille pour la sonde T3. On peut donc en conclure que les sondes sont intactes. Nous les avons donc utilisées dans une expérience d'hybridation *in situ* dans le but d'avoir un contrôle positif reconnaissant un ARNm abondant.

D) Hybridation *in situ*

La dernière expérience réalisée dans le cadre de ce travail avait pour but de suivre l'expression de l'ARNm du PDGFA au cours de l'organoculture de veine saphène humaine, en utilisant en parallèle un contrôle positif, la sonde β -actine, complémentaire d'un ARNm normalement exprimé en grande quantité par les différents types cellulaires présents dans le tissu.

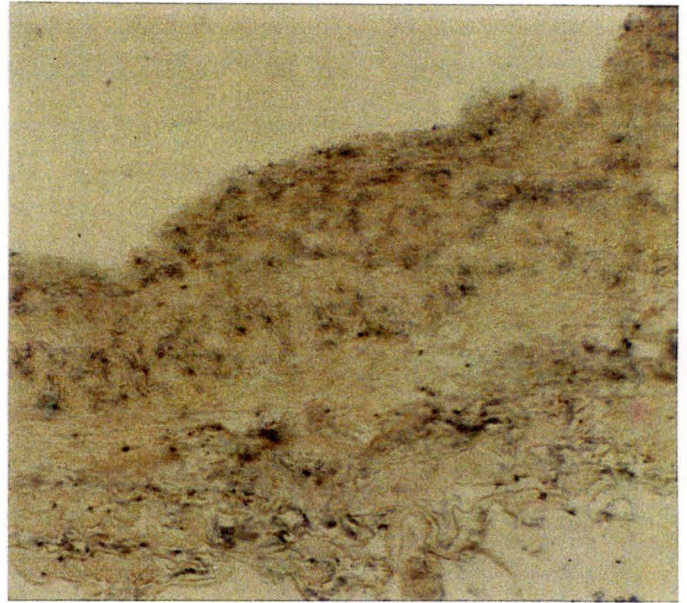
Quelques modifications ont été apportées au protocole d'hybridation *in situ* utilisé précédemment :

- a) nous avons utilisé du sérum de veau fœtal au lieu du sérum de chèvre car celui-ci était épuisé.
- b) deux fois plus de sondes PDGFA a été déposée sur chaque lame.
- c) un nouveau four à hybridation qui contrôle mieux la température du milieu a été utilisé et un préchauffage plus correct des solutions a été effectué.

A



B



C



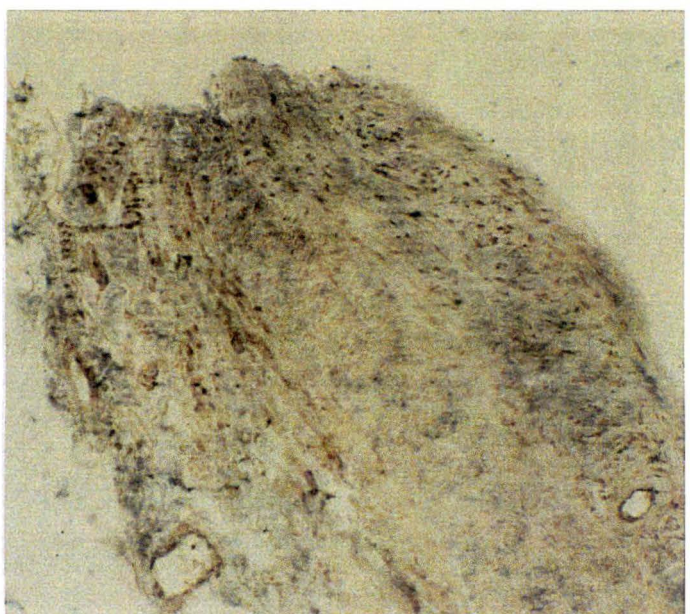
D



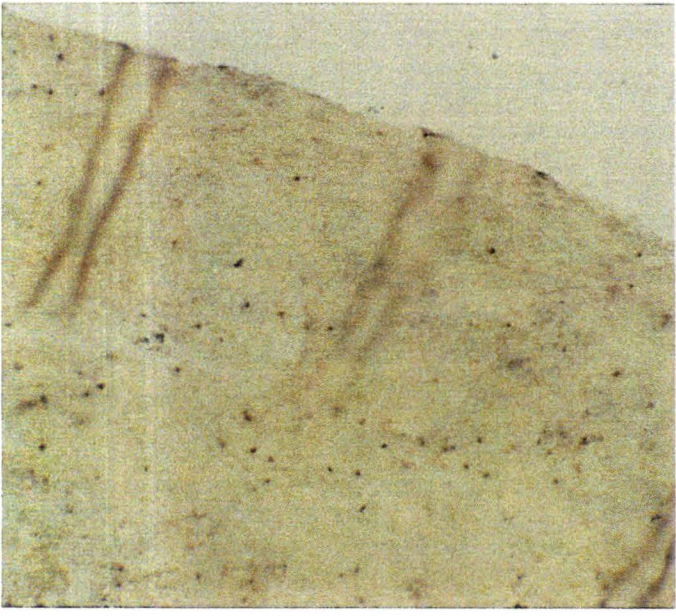
E



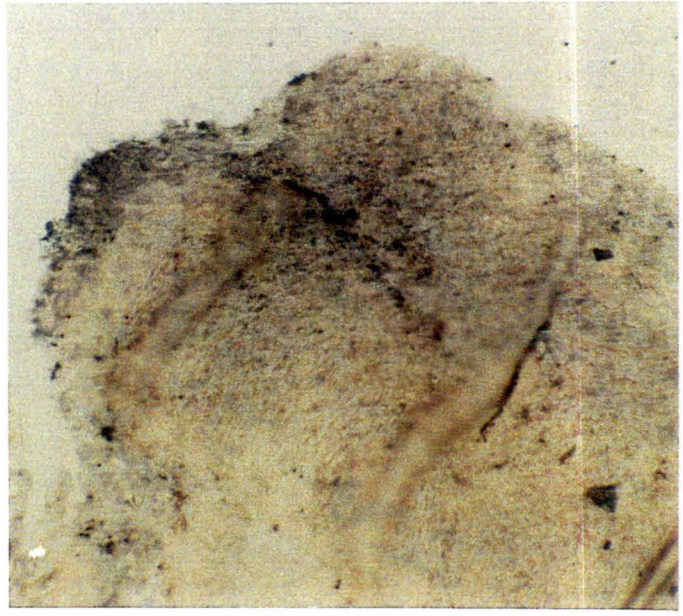
F



G



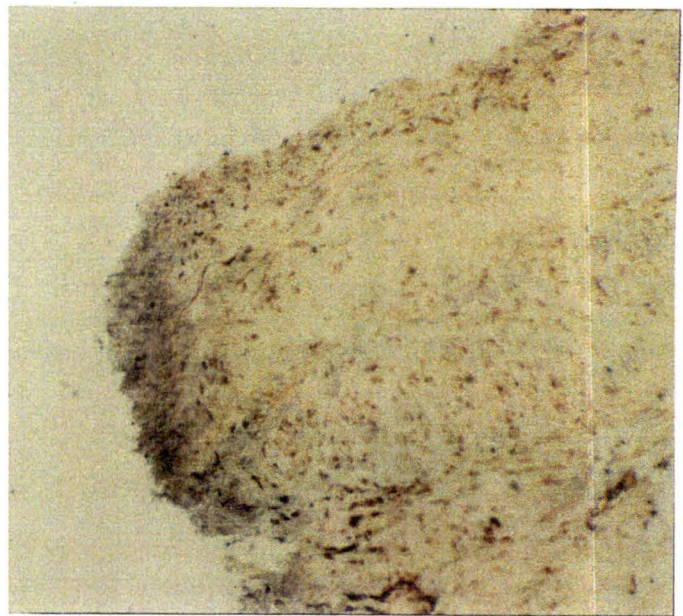
H



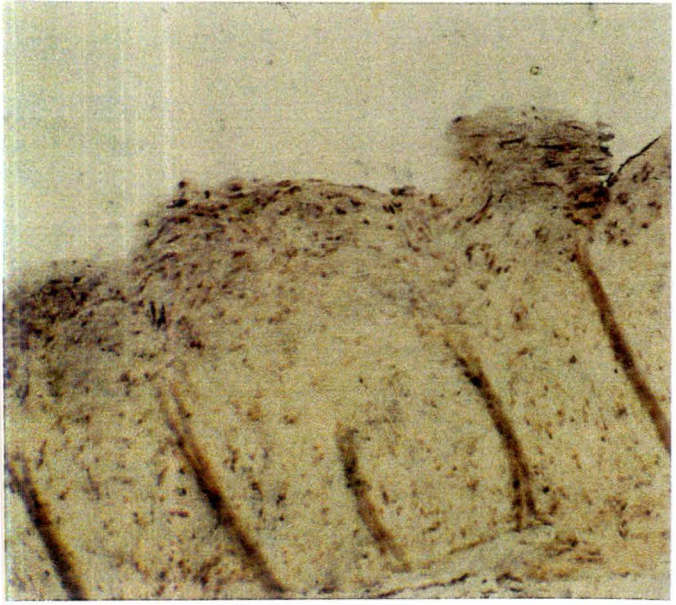
I



J



K



L

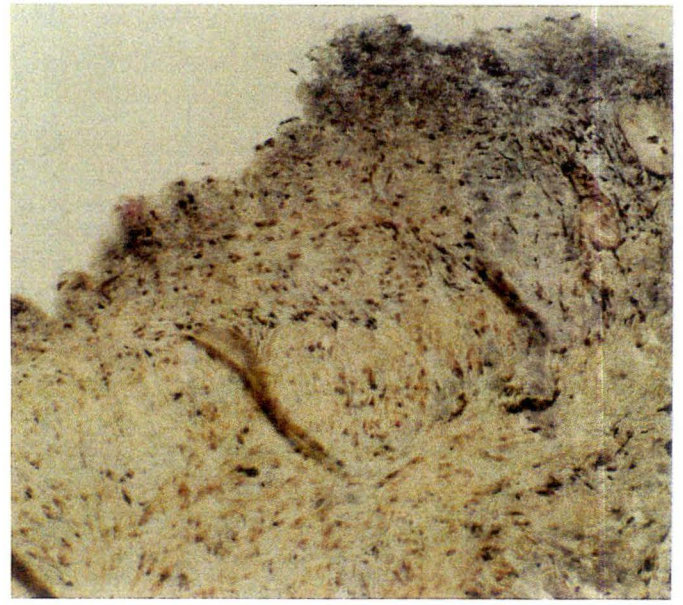


Figure 3-21 : Hybridation *in situ* de la sonde antisens (E-L) complémentaire du PDFGA, de la sonde T3 complémentaire de la β -actine de souris (C) ou de la sonde T7 complémentaire de la β -actine de souris (D) sur des coupes de veine saphène ayant subi 0 (B, C, D, E, F), 5 (A, G, H), 8 (I, J) ou 15 jours (K, L) d'organoculture. Les photos F, H, J et L présentent le bord du fragment de veine. Les contrôles négatifs sans sonde et sans anticorps anti-DIG (A) et sans sonde avec anticorps anti-DIG (B) sont également présentés (G=171x).

La figure 3-21-B montre que, comme nous l'avait suggéré les résultats obtenus précédemment (voir point B-2-1), le fait de saturer les sites de fixation non spécifique pour l'anticorps avec du sérum de veau foetal à la place du sérum de chèvre a généré un bruit de fond plus important.

Les hybridations réalisées en présence des sondes T3 (figure 3-21-C) et T7 (figure 3-21-D) de la β -actine n'ont pas engendré de marquage spécifique comme nous l'attendions. Une explication possible serait que la taille de ces sondes (3x plus grande que la sonde PDGFA) est trop importante pour que ces sondes puissent avoir accès à l'ARNm correspondant présent dans le tissu. Le traitement à la protéinase K avait en effet été optimisé pour l'utilisation de la sonde PDGFA de taille nettement inférieure (revoir point B-1-1).

En ce qui concerne les hybridations réalisées avec la sonde PDGFA, on observe sur certaines coupes un marquage qui semble spécifique. Un contrôle correct des températures des différentes incubations et/ou une concentration en sonde plus grande pourraient peut-être expliquer ces résultats meilleurs que ceux obtenus précédemment (revoir figure 3-14).

Le marquage de l'ARNm de PDGFA se révèle être principalement localisé dans les couches sous-endothéliales des fragments de veine saphène humaine maintenus en organoculture. Ce marquage correspondrait aux CML présentes dans la néointima et est particulièrement bien visible sur la coupe de fragments maintenus en culture pendant 15 jours (figure 3-21-K). Un marquage s'observe également de manière intense sur les bords des différents fragments (figures 3-21-H, 3-21-J, 3-21-L).

Les résultats de cette expérience sont évidemment à mettre en parallèle avec ceux obtenus lors de la mise en évidence de la protéine du PDGF par immunohistochimie. Nous avons ainsi observé la présence de l'ARNm du PDGFA aux mêmes endroits que la protéine PDGF qui en découle. Cette colocalisation est particulièrement bien visible sur les coupes des fragments au jour 0 et au jour 15.

Ces résultats sont encourageants puisque ces deux tests ont été réalisés sur les mêmes échantillons et laissent penser qu'on peut maintenant utiliser deux techniques pour suivre l'expression du PDGF dans des fragments de veines saphènes dans différentes conditions expérimentales.

D) Discussion générale et perspectives

Les pathologies veineuses constituent un sérieux problème de santé au sein des pays industrialisés : en effet, une personne sur trois, en moyenne, en souffre.

De nombreuses études ont été effectuées sur ce sujet mais l'étiologie de la maladie veineuse n'est pas encore bien connue.

A l'heure actuelle, les recherches s'accordent à dire que lors de la mise en place d'une telle maladie, une stase veineuse apparaît. Cette stase entraîne des problèmes d'oxygénation et de nutrition au niveau cellulaire et tissulaire. Les cellules et tissus souffrent lors de cette diminution de pression partielle en oxygène qui induit des modifications du métabolisme.

De par sa localisation à l'interface entre le sang et les tissus, l'endothélium est le premier touché par l'ischémie qui s'installe lors de la stase veineuse. Il faut cependant remarquer que si l'intégrité morphologique de l'endothélium est conservée lors de la pathologie, il est activé par l'ischémie et subit de nombreuses modifications de son métabolisme. C'est ainsi que Michiels *et al.* (1993) ont montré que les cellules endothéliales activées par l'hypoxie, mimant l'ischémie s'installant lors de la stase veineuse, synthétisent de nombreux médiateurs tels que le PAF, la $\text{PGF}_{2\alpha}$ et le bFGF.

Le PAF présent à la surface des cellules endothéliales provoque l'adhérence des leucocytes (Arnould *et al.*, 1993). Les polymorphonucléaires neutrophiles ainsi fixés sur la cellule endothéliale sont activés et peuvent alors s'infiltrer dans la paroi veineuse. Ils pourront alors provoquer la désorganisation de la paroi veineuse en produisant la destruction de certains constituants de la matrice extracellulaire. Ils ne sont cependant pas les seuls à intervenir au cours de ce processus.

De même, les effets du bFGF et de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ sur des monocouches pures de cellules musculaires lisses ont également été étudiés (Michiels *et al.*, 1994). Il a ainsi été montré que ces facteurs induisaient la prolifération des cellules musculaires lisses, ce qui suggérait que l'hypoxie pouvait être responsable, indirectement, de la désorganisation pariétale et de l'épaississement de la paroi observés dans la pathologie variqueuse puisque ces facteurs sont produits par les cellules endothéliales soumises à une hypoxie. La prolifération cellulaire induite par les deux facteurs simultanément suggère une action synergique de ces deux facteurs. Cette

constatation a conduit à l'hypothèse suivante : le bFGF, en plus de sa fonction mitogène, est responsable de la synthèse à la surface des cellules musculaires lisses de récepteurs au facteur de croissance PDGF. La $PGF_{2\alpha}$ est, quant à elle, responsable de la synthèse autocrine et paracrine de ce même facteur de croissance pour les CML. L'action conjuguée des facteurs bFGF et $PGF_{2\alpha}$ pourrait donc s'expliquer par l'intervention d'un autre facteur de croissance bien connu, le PDGF (Michiels *et al.*, 1993).

Les cellules musculaires lisses activées par ce facteur vont migrer et venir proliférer dans l'intima où elles déposent des composants de la matrice extracellulaire. Cette prolifération des cellules musculaires lisses concomitante à l'infiltration des PMN entraînerait une désorganisation pariétale similaire à celle observée dans la pathologie variqueuse.

Dans le but de vérifier cette hypothèse, il fallait pouvoir suivre au cours du temps cette cascade d'évènements sur une veine complète. C'est pourquoi, en 1996, I Gille a mis au point un modèle expérimental qui allait permettre de suivre les différents processus cités ci-dessus. Ce modèle est l'organoculture de veine saphène humaine, qui consiste à maintenir des morceaux de veines en culture pendant 14 jours. Ce modèle a non seulement l'avantage de permettre de suivre l'évolution des différents types cellulaires de la veine au cours du temps; mais en plus, il se réalise sur des veines saphènes humaines, lieu de prédilection de l'apparition des varices. Ces deux avantages permettent de travailler dans des conditions proches de la situation pathologique réelle.

Au cours de ce travail, nous avons utilisé ce modèle afin de mettre en évidence l'expression du PDGF sur des coupes de veine saphènes humaine maintenues en organoculture pendant 0, 5, 8, 12 et 15 jours.

Afin de visualiser la protéine du PDGF, ainsi que sa variation d'expression éventuelle durant la culture, nous avons fait appel à la technique de l'immunohistochimie. Cette technique nous a permis de détecter la présence de ce facteur dans les couches sous-endothéliales correspondant à la couche épaissie lors de la maladie veineuse (néo-intima), ce qui suggère un rôle potentiel de ce facteur dans l'évolution de cette maladie.

Nous voulions également suivre en parallèle, l'évolution de la synthèse de l'ARNm de cette protéine au cours de la culture et cela sur les mêmes échantillons que ceux utilisés pour l'immunohistochimie. La technique permettant une mise en évidence d'un ARNm directement sur des coupes histologiques est la technique de l'hybridation *in situ*.

Pour mener à bien cette expérience, nous avons dû réaliser des sondes ARN marquées, complémentaires de l'ARNm du PDGFA et, pour servir de contrôle positif, de la β -actine. Après plusieurs mises au point, nous avons détecté la présence de l'ARNm du PDGFA dans les CML de la néo-intima avec une expression plus importante du facteur à la fin de l'organoculture. Par ailleurs, un marquage important a été observé en immunohistochimie et en hybridation *in situ* au niveau des bords des fragments de veine maintenus en culture. Ce marquage peut s'expliquer par le fait que ce sont les bords des fragments qui subissent le plus de dommages mécaniques au cours de la préparation des échantillons. Le PDGF étant connu pour être impliqué dans les phénomènes de réparation tissulaire, on peut donc facilement expliquer l'augmentation de son expression à cet endroit.

Les résultats que nous avons obtenus en immunohistochimie et avec l'hybridation *in situ* sont concordants et montrent une expression du PDGFA principalement dans les CML de la néointima. Ce marquage est visible dans le fragment de veine obtenu au jour 0, semble diminuer pendant l'organoculture pour réapparaître de manière intense au jour 15. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par George *et al.* (1995) qui ont également suivi l'expression du PDGF pendant une organoculture de veine saphène humaine. Ils ont montré que l'expression de l'ARNm du PDGFB augmentait largement après 7 jours de culture et celle de l'ARNm du PDGFA après 14 jours de culture.

En ce qui concerne la localisation de ces ARNm, les études réalisées par cette équipe ont montré que l'expression des ARNm du PDGFA et B, avant la culture, était faible et localisée dans les cellules endothéliales. L'immunocytochimie leur avait, par ailleurs, révélé la présence de la protéine du PDGF dans le cytoplasme de ces cellules endothéliales ainsi que dans les CML de la média. Après les 14 jours de mise en culture, la plupart des cellules présentes dans la néo-intima formée pendant la culture expriment en grande quantité l'ARNm du PDGFA et en faible quantité l'ARNm du PDGFB. Ces cellules sont les CML car elles expriment l' α -actine. Une expression de ces facteurs fut également observée dans les couches supérieures de l'intima (principalement dans les cellules endothéliales).

Les résultats que nous avons obtenus suggèrent que le PDGF pourrait jouer un rôle important dans le développement de la néo-intima en induisant la migration et/ou la prolifération des cellules musculaires lisses. Il est donc essentiel de poursuivre les études concernant ce facteur dans le cadre des veines variqueuses et plus précisément pour comprendre comment ce facteur agit, s'il est impliqué, dans le développement de l'épaississement de la paroi veineuse observé dans les veines variqueuses.

La première chose à faire serait d'étudier l'influence de l'hypoxie sur le développement d'une néo-intima dans les fragments de veine saphène humaine maintenus en organoculture.

L'étude de l'expression du PDGF au niveau protéique et au niveau de l'ARNm permettrait d'approfondir le rôle joué par ce facteur dans les altérations pariétales observées dans les veines variqueuses et donc dans la mise en place de cette maladie.

Afin de pouvoir interpréter correctement les résultats de l'hybridation *in situ*, il faudrait encore perfectionner l'application de cette technique à nos conditions expérimentales. On pourrait notamment utiliser une sonde PDGFA humaine au lieu d'une sonde de rat. Cependant, George *et al.* (1995) ont également utilisé une sonde complémentaire du PDGFA de rat et obtenu un marquage spécifique bien marqué sur des coupes de veine saphène humaine.

Le problème que nous avons rencontré avec le contrôle positif pourrait également être résolu par l'emploi d'une autre sonde complémentaire d'un ARNm largement exprimé (*ex* : tubuline, GAPDH,...) ou en envisageant le raccourcissement de la sonde β -actine. Il est en effet préférable d'utiliser une sonde contrôle possédant approximativement la même taille que la sonde PDGFA utilisée pour le test. En effet, même si il y a beaucoup d'homologie entre ces deux sondes, la sonde humaine permettrait une hybridation totale et résisterait, ainsi, sans doute mieux à des lavages plus stringents qui favoriseraient la disparition du marquage non spécifique.

Enfin, afin de vérifier expérimentalement l'implication du PDGF, l'utilisation d'un anticorps anti-PDGF qui inhiberait la fonction de cette protéine s'avérerait utile.

D'autres facteurs sont évidemment impliqués dans le développement de cette pathologie et l'hybridation *in situ* pourrait être adaptée pour étudier la localisation et les variations de synthèse de l'ARN d'autres facteurs et servir lors de tests de différentes molécules d'intérêt pharmacologique, dans le cadre du développement d'une nouvelle thérapie.

E) Bibliographie

1. Antoniades, H. and C. Scher (1977). "Radioimmunoassay of a human serum growth factor for Balb/c 3T3 cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **74**: 1973-1977.
2. Antoniades, H., D. Stathakos, *et al.* (1975). "Isolation of cationic polypeptide from human serum which stimulates the proliferation of 3T3 cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **72**: 2635-2639.
3. Arnould, T., C. Michiels, *et al.* (1992). "Effect of hypoxia upon intracellular calcium concentration of human endothelial cells exposed to hypoxia." Journal of Cellular Physiology **152**: 215-221.
4. Arnould, T., C. Michiels, *et al.* (1995). "Hypoxia induces PMN adherence to umbilical vein endothelium." Cardiovascular Research **30**: 1009-1016.
5. Arnould, T., C. Michiels, *et al.* (1994). "Activation of adherent PMN to hypoxic HUVEC leads to cytotoxicity." Blood **83**(12): 3705-3716.
6. Arnould, T., C. Miciels, *et al.* (1993). "Increased PMN adherence on endothelial cells after hypoxia : involvement of PAF, CD18/CD11b and ICAM-1." American Journal of Physiology **264**: C 1102-1110.
7. Ayer, C. and L. Lievre (1992). Hybridation in situ, pièges et contrôles. Hybridation in situ : méthodes pratiques. S. F. d. M. Electronique: 33-41.
8. Balk, S. D. (1971). "Calcium as a regulator of the proliferation of normal, but not of transformed chicken fibroblasts in a plasma containing medium." Proc. Natl. Acad. Sci **68**: 271-275.
9. Bancroft, J., D. and A. Stevens (1996). Theory and practice of histological techniques. C. Livingstone.

10. Bauer, E. A., T. W. Cooper, *et al.* (1985). "Stimulation of in vitro human skin collagenase expression by platelet-derived growth factor." Proceedings of the National Academy of sciences of the USA **82**: 4132-4136.
11. Baumann, J., G., M. Van der Ploeg, *et al.* (1984). Fluorescent hybridocytochemical procedures : DNA-RNA hybridation in situ. Investigative microtechniques in medecine and microbiology. M. Dekker. New-York: 41-48.
12. Baumann, J., G., J., J. Wiegant, *et al.* (1980). "A new method of fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochrome-labeled RNA." EXP. Cell. Res. **138**: 485-490.
13. Baumann, J., G., J., J. Wiegant, *et al.* (1981). "CYtochemical hybridization with fluorochrome-labeled RNA. III. Increased sensitivity by the use of anti-fluorescein antibodies." Histochemistry **73**: 181-193.
14. Berger, C. N. (1986). "In Situ hybridization of immunoglobulin-specific RNA in single cells of the B lymphocyte lineage with radiolabelled DNA probes." EMBO **5**: 85-93.
15. Berk, B., C., R. Alexander, W., *et al.* (1986). "Vasoconstriction : a new activity of platelet-derived growth factor." Science **232**: 87-90.
16. Betsholtz, C., A. Johnsson, *et al.* (1986). "cDNA sequence and chromosomal localization of human platelet-derived growth factor A-chain and its expression in tumor cell lines." Nature **320**: 695-699.
17. Bouaziz, N. (1995). "Effets de l'hypoxie sur l'adhérence des neutrophiles à l'endothélium des veines saphènes : rôle dans le développement de la veine variqueuse." Mémoire.
18. Bowen-Pope, D., F., T. Malpass, W., *et al.* (1984). Blood **64**(458-469).
19. Braquet, P., P. E. Chabrier, *et al.* (1994). "Les fonctions de l'endothélium." La Presse Médicale **23**: 225-227.
20. Bryckaert, M.-C., M. Fontenay, *et al.* (1991). "Le PDGF(platelet-derived growth factor) et ses implications en pathologie humaine." Médecine/sciences **7**(5): 478-484.
21. Carpentier, P. and P. Priollet (1994). "Epidémiologie de l'insuffisance veineuse chronique." La Presse Médicale **23**: 197-201.

22. Chait, A., R. Ross, *et al.* (1980). "Platelet-derived growth factor stimulates activity of low density lipoprotein receptors." Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **70**: 4084-4088.
23. Chamley-Campbell, J. H. and G. R. Campbell (1981). "What controls smooth muscle phenotype?" Artherosclerosis **40**: 347-357.
24. George, S., J., A. Williams, *et al.* (1995). "An essential role for platelet-derived growth factor in neointima formation in human saphenous vein in vitro." Atherosclerosis **120**: 227-240.
25. Gille, I. (1996). "Mise au point de l'organoculture de veine saphène humaine." Mémoire.
26. Grotendorst, G. R., H. E. J. Seppa, *et al.* (1981). "Attachment of smooth muscle cells to collagen and their migration toward platelet-derived growth factor is chemotactic for fibroblasts." Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **78**: 3669-3673.
27. Grünewald-Janho, S., J. Keeseey, *et al.* (1996). Nonradioactive in situ Hybridization Application Manual Second Edition.
28. Hannink, M. and D. J. Donoghue (1989). "Structure and function of platelet-derived growth factor (PDGF) and related proteins." Biochimica and Biophysica Acta **989**: 1-10.
29. Hart, C., E., M. Bailey, *et al.* (1990). "Purification of PDGF-AB and PDGF-BB from human platelet extracts and identification of all three PDGF in human platelets." Biochemistry **29**: 166-172.
30. Hart, C., E., J. Forstrom, W., *et al.* (1988). "Two classes of PDGF receptor recognize different isoforms of PDGF." Science **240**: 1529-1531.
31. Heldin, C.-H., G. Backstrom, *et al.* (1988). "Binding of different dimeric forms of PDGF to human fibroblasts : evidence for two separate receptor types." EMBO Journal **7**: 1387-1393.
32. Holt, C. M., S. E. Francis, *et al.* (1992). "Intimal proliferation in an organ culture of human internal mammary artery." Cardiovascular Research **26**: 1189-1194.

33. Hosang, M., M. Rouge, *et al.* (1989). "Both homodimeric isoforms of PDGF (AA and BB) have mitogenic and chemotactic activity and stimulate phosphoinositol turnover." Journal of Cellular Physiology **149**: 558-564.
34. John, H., M. Birnstiel, *et al.* (1969). "RNA-DNA hybrids at the cytological level." Nature **223**: 582-587.
35. Kanthou, C., G. Parry, *et al.* (1992). "Thrombin-induced proliferation and expression of platelet-derived growth factor-A chain gene in human vascular smooth muscle cells." FEBS letters **314**(2): 143-148.
36. Kazlauskas, A. and J. A. Cooper (1989). "Autophosphorylation of the PDGF receptor in the kinase insert region regulates interactions with cell proteins." Cell **58**: 1121-1133.
37. Kumkumian, G. K., R. Lafyatis, *et al.* (1989). "Platelet-derived growth factor and II-1 interactions in rheumatoid arthritis." Journal of Immunology **143**: 833-837.
38. La Rochelle, W. J., N. Giese, *et al.* (1990). "Molecular localization of the transforming and secretory properties of PDGF a and PDGF b." Science **248**: 1541-1544.
39. Lansdorp, P., M., T. Van der Kwast, H., *et al.* (1984). "Stepwise amplified immunoperoxidase (PAP) staining. I. Cellular morphology in relation to membrane marker." J. Histochemical, Cytochem. **32**: 172-178.
40. Lindner, V., C. Giachelli, M., *et al.* (1995). "A subpopulation of smooth muscle cells in injured rat arteries expresses platelet-derived growth factor-B chain mRNA." Circulation Research **76**: 951-957.
41. Lindner, V. and M. A. Reidy (1995). "Platelet-derived growth factor ligand and receptor expression by large vessel endothelium in vivo." American Journal of Pathology **146**(n°6): 1488-1497.
42. Michiels, C., T. Arnould, *et al.* (1992). "Humbilical vein endothelial cells submitted to hypoxia-reoxygenation in vitro : implication of free radicals, xanthine oxidase and energy deficiency." Journal of Cellular Physiology **153**: 53-61.
43. Michiels, C., T. Arnould, *et al.* (1996). "Interactions between endothelial cells and smooth muscle cells after their activation by hypoxia." International angiology **15**(2): 124-130.

44. Michiels, C., T. Arnould, *et al.* (1993). "Stimulation of prostaglandin synthesis by human endothelial cells exposed to hypoxia." American Journal of Physiology **264**: C866-874.
45. Michiels, C., T. Arnould, *et al.* (1994). "Role clé de l'hypoxie et des cellules endothéliales dans le développement des veines variqueuses." Médecine/sciences **10**(8/9): 845-853.
46. Michiels, C., F. De Leener, *et al.* (1994). "Hypoxia stimulates human endothelial cells to release smooth muscle cell mitogens : role of prostaglandins." Experimental Cell Research.
47. Michiels, C. and J. Remacle (1995). Origine de la douleur dans la maladie veineuse : une hypothèse physiopathologique. Tempo medical. **numero 543**: 1-4.
48. Montefort, S. and S. Holgate (1991). "Edhesion molecules and their role in inflammation." Respir. Med. **85**: 91-99.
49. Niebes, P. (1990). "Artères et veines." Phlébologie **9**: 10-12.
50. Okazaki, H., M. Majesky, W., *et al.* (1992). "Regulation of platelet-derived growth factor ligand and receptor gene expression by a-thrombin in vascular smooth muscle cells." Circulation Research **71**(6): 1285-1293.
51. Owen, A., J., R. Geyer, P., *et al.* (1982). "Human platelet-derived growth factor stimulates amino acid transport and protein synthesis by human diploid fibroblast in plasma-free media." proceedings of the National Academy of Science of the USA **79**: 3203-3207.
52. Pardue, M., L. and J. Gall, G. (1969). "Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cyological preparations." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **64**: 600-604.
53. Pederson, D. C. and D. E. Bowyer (1985). "Endothelial Injury and Healing in Vitro
54. Studies Using an Organ Culture System." AJP **119**: 264-272.
55. Pinkel, D., T. Straume, *et al.* (1986). "Cytogenic analysis using quantitative, high sensitivity fluorescent hybridization." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**: 2934-2938.
56. Pledger, W. J., C. D. Stiles, *et al.* (1978). "An ordered sequence of events is required before Balb/c 3T3 cells become committed to DNA synthesis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **75**: 2839-2843.

57. Pober, J. and C. RS. (1990). "The role of endothelial cells in inflammation." Transplantation **50**: 537-544.
58. Renz, M. and C. Kurz (1984). "A colorimetric method for DNA hybridization." Nucleic Acid Res **12**: 3435-3444.
59. Ross, R. (1981). "Atherosclerosis : a problem of the biology of arterial wall cells and their interactions with blood components." Atherosclerosis **1**: 293-311.
60. Scher, C., D., D. Stathakos, *et al.* (1974). "Dissociation of cell division stimulating capacity for Balb/c 3T3 from the insulin-like activity in human serum." Nature **247**: 279-281.
61. Scozaec, J. and G. Lesèche (1993). "Immunologie des cellules endothéliales et rejet de greffe." Médecine/sciences **9**: 1094-1101.
62. Seifert, R. A., C. E. Hart, *et al.* (1989). "Two different subunits associate to create isoform-specific platelet-derived growth factor receptor." J. Biol. Chem **264**: 8771-8778.
63. Seppa, H., G. Grotendorst, *et al.* (1982). "Platelet-derived growth factor is chemotactic for fibroblasts." Journal of cell Biology **92**: 584-588.
64. Shanker, G., M. Sorci-Thomas, *et al.* (1995). "Estrogen modulates the inducible expression of platelet-derived growth factor mRNA by monocyte/macrophages." Life Science **56**: 499-507.
65. Slomp, J., A. C. Gittenberger-de Groot, *et al.* (1996). "Nature and origin of the neointima in whole vessel wall organ culture of the human saphenous vein." Virchows Arch **428**: 59-67.
66. Soyombo, A. A., G. D. Angelini, *et al.* (1990). "Intimal proliferation in organ culture of human saphenous vein." American Journal of Pathology **137**.
67. Soyombo, A. A., G. D. Angelini, *et al.* (1993a). "Surgical preparation induces injury and promotes smooth muscle cell proliferation in a culture of human saphenous vein." Cardiovascular Research **27**: 1961-1967.
68. Soyombo, A. A., G. D. Angelini, *et al.* (1995). "Neointima formation is promoted by surgical preparation and inhibited by cyclic nucleotides in human saphenous vein organ cultures." The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery **109**: 2-12.

69. Soyombo, A. A., V. J. Thurston, *et al.* (1993b). "Endothelial control of vascular smooth muscle proliferation in organ culture of human saphenous vein." European Heart Journal **14**: 201-206.
70. Stiles, C., D., G. Capone, T., *et al.* (1979). "Dual control of cell growth by somatomedins and 'competence factors'." Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **76**: 1279-1283.
71. Thibaut-Vercruyssen, R., C. Michiels, *et al.* (submitted). "Morphological evidence of intima development in varicose saphenous vein." .
72. Thyberg, J., U. Hedin, *et al.* (1990). "Regulation of differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells." Artherosclerosis **10**: 967-990.
73. Ueda, M., A. E. Becker, *et al.* (1996). "In Situ Detection of Platelet-Derived Growth Factor-A and -B Chain mRNA in Human Coronary Arteries after Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty." American Journal of Pathology **149**: 831-843.
74. Waterfield, M., G. Scrace, *et al.* (1983). "Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p28 sis of simian sarcoma virus." Nature **304**: 35-39.
75. Wilson, E., Q. Mai, *et al.* (1993). "Mechanical Strain Induces Growth of Vascular Smooth muscle cells via autocrine action of PDGF." The Journal of Cell Biology **123**: 741-747.
76. Zimmerman, G., T. McIntyre, *et al.* (1990). "Endothelial cells-associated platelet-activating factor : a novel mechanism for signaling intracellular adhesion." Journal of Cellular Biology **110**: 529-540.