

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Étude in vitro des mécanismes liés au phénomène d'hypoxie-réoxygénation sur des cellules endothéliales humaines en culture

ARNOULD, Thierry

Award date:
1989

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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



FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTÉ DES SCIENCES

**Etude *in vitro*
des mécanismes liés au phénomène
d'hypoxie-réoxygénation
sur des cellules endothéliales
humaines en culture**

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

Thierry ARNOULD

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, puis-je me permettre de remercier Monsieur le professeur J. Remacle de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Par son écoute attentive et ses conseils judicieux, il m'a guidé dans ce périple expérimental.

Mes remerciements vont ensuite à Madame C. Bille-Michiels qui m'a suivi pendant toute cette année. Elle m'a tout appris, ou presque. Malgré ses propres occupations, elle a conservé une infinie patience pour répondre à mes appels "au secours" et pour planifier ce travail. Sa grande disponibilité, sa compétence et sa volonté de travail m'ont beaucoup aidé.

Je remercie également Madame A. Houbion pour son aide technique qui, plus que précieuse, fut indispensable. Elle m'a fait profiter de toute son expérience et ses nombreux conseils furent très enrichissants.

Je pense également à toutes les personnes du laboratoire avec lesquelles j'ai eu moins de "contacts professionnels". Cette équipe si chaleureuse qui favorise l'intégration rapide des mémorants et qui dégage une atmosphère de bonne humeur.

J'adresse également mes plus vifs remerciements aux personnels de l'Hôpital Civil de Charleroi et de l'Hôpital Reine Fabiola de Sambreville pour les nombreux cordons qu'ils m'ont fourni. Sans ce substrat indispensable, ce travail n'aurait pas pu être entrepris dans de bonnes conditions.

Un grand merci tout particulier à Madame A. Arnould-Dervaux qui a tapé l'intégralité de ce travail et a veillé à sa présentation.

Enfin, le mémoire étant le couronnement d'un cycle de formation, je remercie aussi mes parents de m'avoir permis d'entreprendre ces études.

TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION	1
A. Les radicaux libres	2
(1) Définition – Généralités – Notions préliminaires	2
a) L'oxygène moléculaire ($^3\Sigma_gO_2$)	3
b) L'oxygène singulet ($^1\Delta_gO_2$)	4
c) Le radical superoxyde ($O_2^{\cdot(-)}$)	4
d) Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)	5
e) Le radical hydroxyl ($\cdot OH$)	5
(2) Sources des radicaux libres en biologie. Mécanismes possibles pour l'initiation des réactions radicalaires in vivo	7
a) Sources biologiques intracellulaires	7
1) <i>L'autooxydation de petites molécules</i>	7
2) <i>Xénobiotiques</i>	7
3) <i>Métaux de transition</i>	8
4) <i>Enzymes et protéines solubles</i>	8
5) <i>Les organites cellulaires</i>	9
b) Sources exogènes et extracellulaires	11
1) <i>Les phagocytes activés</i>	11
2) <i>L'irradiation</i>	12
3) <i>L'alimentation</i>	13
4) <i>La fumée de cigarette</i>	13
5) <i>Les oxydes d'azote</i>	13
(3) Cytotoxicité radicalaire et conséquences cellulaires	14
a) La peroxydation lipidique	15
b) Les protéines	17
c) Les acides nucléiques	17
d) Changements dans la détoxification des xénobiotiques	18
e) Molécules cytosoliques	18
f) Effets extracellulaires	19
(4) Défenses de l'organisme contre les attaques médiées par les radicaux libres dérivés de l'oxygène moléculaire	20
a) Mécanismes extracellulaires	20
b) Défenses cellulaires naturelles	21
1) <i>Protections enzymatiques</i>	22
2) <i>Protections non enzymatiques</i>	27
B. Les cellules endothéliales	32
(1) Principales caractéristiques de la cellule endothéliale	32
a) L'endothélium en tant que tissu	32
b) La cellule endothéliale	33

(2) Ischémie - Reperfusion.....	35
a) In vivo.....	35
1) <i>La reperfusion injury (paradoxe de l'oxygène)</i>	35
2) <i>Les sources potentielles de radicaux superoxydes dans les tissus post-ischémiés</i>	
b) In vitro - But de ce mémoire.....	39
II. MATERIELS ET METHODES	41
A. Mise en culture de cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine.....	41
B. Repiquage des cellules et sous-cultures.....	42
C. Mise en évidence de la protéine F VIII Rag du facteur VIII de la coagulation par immunofluorescence indirecte.....	43
D. Autoradiographie.....	44
E. Test d'incorporation de leucine tritiée.....	44
F. Modèle : hypoxie-réoxygénation.....	45
G. Micro-injection	47
H. Micro-injection de la peroxydase de "raifort" (HRP) dans des fibroblates WI38.....	48
I. Dosage enzymatique sur des homogénats cellulaires.....	49
(1) La catalase	49
(2) SOD	50
(3) La GPX.....	51
(4) La glutathion réductase (GRed).....	51
J. Test statistique	52
III. RESULTATS	53
A. Caractérisation des cellules endothéliales	53
(1) Mise en culture des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine.....	53
(2) Marquage par immunofluorescence du facteur VIII de la coagulation.....	54
B. Hypoxie - Réoxygénation : théorie radicalaire et/ou métabolisme énergétique ?.....	55

(1) Caractérisation du modèle expérimental.....	55
a) Courbe de temps	55
b) Effets sur différents paramètres cellulaires.....	56
1) Autoradiographie	57
2) Incorporation de leucine tritiée par des cellules endothéliales après différents temps d'hypoxie.....	58
3) Dosage des trois enzymes antioxydantes (SOD, CAT, GPX) dans les cellules endothéliales après hypoxie	59
(2) Expériences de protection.....	60
a) Etude de l'implication des radicaux libres dans l'hypoxie- réoxygénation.....	60
1) Effet de la vitamine E ou α -tocophérol	60
2) Effet de la vitamine C ou acide ascorbique	61
3) Effet du mannitol	62
4) Effet de la desferrioxamine B (DFO).....	62
5) Influence du GSH et de la cystéine.....	63
6) Importance des enzymes antioxydants extracellulaires.....	64
7) Effet de l'allopurinol	66
8) Effet de l'acide folique	67
b) Etude de l'implication du métabolisme énergétique de la cellule en hypoxie-réoxygénation	68
1) Effet du β -hydroxybutyrate (BOBA).....	68
2) Le système glucose + insuline	70
3) Effet du pyruvate	71
c) Etude de l'effet de la micro-injection d'enzymes antioxydantes sur la viabilité des C.E. soumises à l'hypoxie-réoxygénation	72
d) Etude de l'effet des combinaisons moléculaires sur les cellules endothéliales en hypoxie-réoxygénation : addition ou synergie des effets protecteurs ?.....	75
1) Effet du β -hydroxybutyrate + α -tocophérol et du β -hydroxybutyrate + desferrioxamine	75
2) Effet de l'allopurinol + α -tocophérol et de l'allopurinol + β -hydroxybutyrate	76
3) Effet de la vitamine E + vitamine C et de la vitamine E + DFO	76
IV. CONCLUSION GENERALE	78
V. BIBLIOGRAPHIE.....	I

I. INTRODUCTION

La comparaison des efficacités de la production d'ATP chez des organismes consommant ou pas l'oxygène moléculaire comme accepteur d'électrons dans la chaîne respiratoire, démontre les avantages du métabolisme énergétique en conditions aérobies. Mais de façon assez paradoxale, l'oxygène est également un composé toxique pour les êtres vivants. C'est probablement ce qui fait dire à Bast : « La vie aérobie est possible malgré et pas grâce à la présence de l'oxygène » (Bast, 1986). Cette toxicité est essentiellement due aux métabolites intermédiaires provenant de la réduction de l'oxygène moléculaire ($O_2^{\cdot(-)}$, H_2O_2 , $\cdot OH$). Ces intermédiaires activés sont dommageables pour les cellules et leurs composants subcellulaires. On retrouve ces composés toxiques dérivés de l'oxygène impliqués à des degrés divers dans de nombreuses conditions pathologiques : l'inflammation, l'hyperoxie, la "reperfusion injury"... C'est dans le cadre de la reperfusion injury (lésions postischémiques) que s'inscrit ce travail.

L'introduction de ce mémoire se composera de trois grandes parties :

— Dans un premier temps, il s'agit de se familiariser avec la notion de radicaux libres dérivés de l'oxygène moléculaire. Pour y parvenir, nous devons développer les différentes sources de radicaux libres. Nous analyserons ensuite comment la très grande réactivité de ces radicaux vis-à-vis des molécules biologiques occasionne des perturbations structurelles et fonctionnelles à la cellule. Nous exposerons enfin les mécanismes de protection naturels les plus importants qui défendent la cellule eucaryote aérobie.

— Il nous faudra ensuite donner quelques informations concernant le substrat cellulaire sur lequel nous avons travaillé : les cellules endothéliales.

— Pour terminer, nous développerons en détail le processus d'ischémie-reperfusion *in vivo* et son approche par des modèles *in vitro*. Nous mettrons en évidence les changements qui surviennent pendant ce phénomène et les mécanismes par lesquels il endommage la cellule endothéliale.

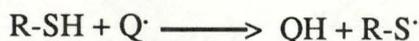
A. Les radicaux libres

(1) Définition – Généralités – Notions préliminaires

Les radicaux libres sont par définition des espèces chimiques qui possèdent un nombre impair d'électrons. Ils peuvent être chargés positivement, négativement ou rester neutres.

Exemples

* Le radical thiyl est un radical libre neutre. Il est généré par l'abstraction d'un atome d'hydrogène (H·) à partir d'un groupement thiol (R-SH) par un autre radical (Q·), selon la réaction suivante :



* Le radical libre pyridinyl est un exemple de radical positif. Les radicaux pyridinyls sont à considérer en relation avec le comportement de deux coenzymes importants, le NAD⁺ et NADP⁺ et le mode d'action d'un herbicide très répandu, le paraquat (Pryor, 1976). Le paraquat (PQ) est un herbicide connu pour générer des radicaux libres dérivés de l'O₂ et léser les cellules épithéliales des poumons conduisant éventuellement à une fibrose pulmonaire (Ody and Junod, 1985).

Des études récentes ont montré que le paraquat est réduit à l'intérieur de la cellule en présence de NADPH, aboutissant à la formation d'un radical positif (PQ·⁽⁺⁾). Ce dernier peut réagir avec l'O₂ et générer des radicaux superoxydes anioniques (O₂·⁽⁻⁾) (Ody and Junod, 1985).

* Les radicaux libres anioniques sont aussi très importants en biologie. Deux exemples remarquables sont le radical superoxyde (O₂·⁽⁻⁾) et l'électron solvaté (e_{aq}·⁽⁻⁾) qui est produit par l'action de radiations ionisantes sur la matière (Pryor, 1976).

La grande réactivité des entités radicalaires est due à la présence d'un électron célibataire. Elle est néanmoins très variable suivant les molécules et, tout comme la réactivité des autres espèces chimiques, elle est influencée par la température et par la concentration des molécules dans leur environnement. Cette réactivité est fonction de la nature du radical car même à une température de 37° celsius, les différences sont encore très apparentes. Certains comme les radicaux Cl· et ·OH sont si énergétiques qu'ils réagissent très rapidement (l'instabilité de ces entités

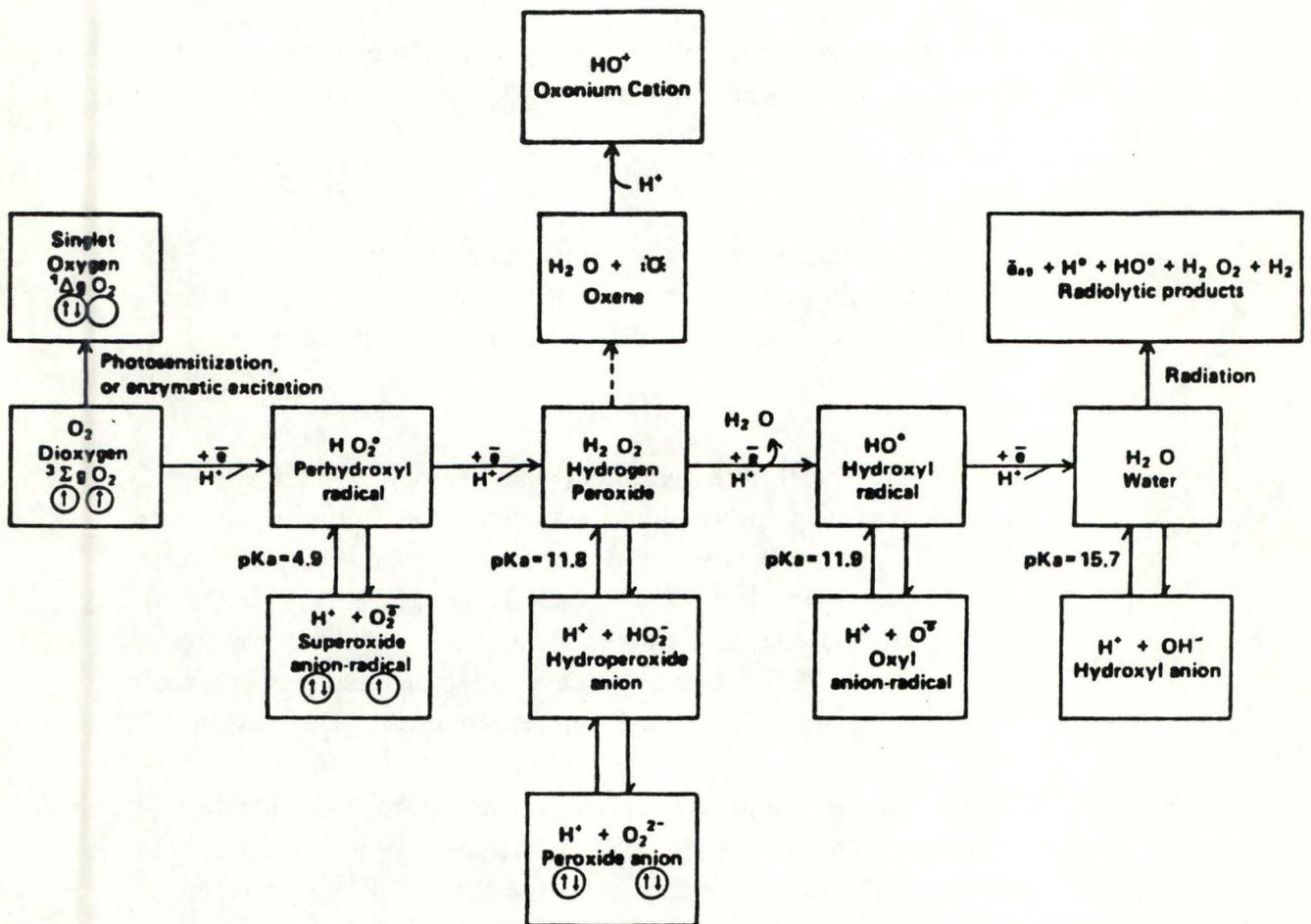
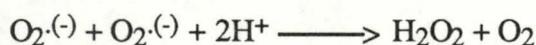


Figure 1 : La réduction monovalente de O_2 conduit à la production de radicaux libres. Ce schéma présente les différentes étapes de cette production et les formes sous lesquelles ces radicaux apparaissent (d'après Byczkowski et Gessner, 1988).

les rend très réactionnelles et leur confère un temps de vie très court). Ils existent donc en très faible concentration dans un milieu donné. La majorité des radicaux libres organiques, dont le radical thiyl, bien que moins réactionnels que les ·OH sont aussi de réactivité élevée. Certains radicaux libres possèdent une stabilité inhabituelle et réagissent lentement : le radical nitroxyde ($R_2N-O\cdot$) en est un exemple (Pryor, 1976).

Si deux radicaux réagissent ensemble, les deux sont éliminés. Cette affirmation est illustrée par la réaction de dismutation des radicaux superoxydes :



Si un radical réagit avec une molécule non radicalaire, un autre radical libre est produit. Cette propriété permet aux radicaux libres de participer à des réactions en chaîne comme la peroxydation des acides gras insaturés (voir *infra*).

Les radicaux peuvent aussi se comporter comme des oxydants ou des réducteurs. Le radical superoxyde est un bon réducteur et un oxydant moyen mais est capable d'initier des chaînes de réactions (Mc Cord, 1985).

Les radicaux libres dérivés de l'oxygène, très importants dans les systèmes vivants, vont particulièrement nous intéresser dans ce travail et nous voudrions donc développer quelque peu les informations à leur sujet. Ils sont produits à partir de la réduction monovalente de l' O_2 : un schéma des étapes successives de la réduction de O_2 et H_2O indiquant les différents états possibles de l'oxygène et ses espèces réactionnelles dérivées est présenté à la figure 1 (Byczkowski and Gessner, 1988).

a) L'oxygène moléculaire (${}^3\Sigma_g O_2$)

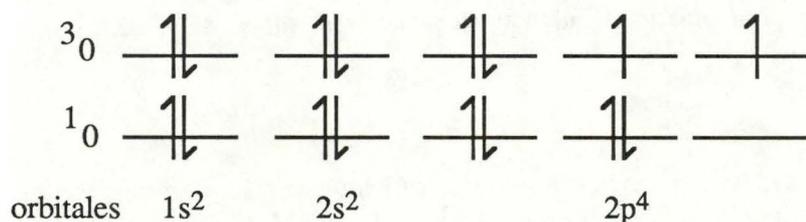
Dans son état fondamental, l'oxygène moléculaire possède deux électrons non appariés, de spins parallèles et localisés dans des orbitales antiliantes Π^* différentes (Byczkowski et Gessner, 1988). On parle de molécule paramagnétique qui révèle trois états dans un champ magnétique : il y a formation d'un triplet (Green *et al.*, 1984). Bien que thermodynamiquement, l' O_2 soit un bon agent oxydant, en l'absence d'enzyme ou de tout autre catalyseur, le transfert spontané et direct d'un doublet électronique sur cette molécule requière une énergie d'activation

trop importante pour que la réaction se produise (Mc Cord, 1979). Cette molécule à l'état triplet ne peut accepter qu'un électron isolé avec 1 spin antiparallèle à ceux déjà présents (en accord avec le principe de Pauli).

b) L'oxygène singulet ($^1\Delta_g\text{O}_2$)

L'inversion de spin d'un des électrons non appariés dans une orbitale $2\Pi^*$ de l'oxygène dans son état fondamental forme l'oxygène singulet $^1\Sigma_g\text{O}_2$ possédant 2 électrons non appariés avec des spins antiparallèles (Halliwell and Gutteridge, 1984). L'état singulet constitue une forme excitée de l'oxygène moléculaire dont la réactivité est supérieure à celle de la même molécule à l'état triplet (Sies, 1981).

L'oxygène singulet n'est pas un produit de la réduction de O_2 et se forme par une absorption d'énergie qui porte un électron dans un orbitale d'énergie supérieure (Klebanoff, 1982).



L'oxygène singulet est probablement l'état le plus abondant dans les systèmes biologiques mais ne constitue pas une molécule radicalaire puisqu'elle ne possède pas un nombre impair d'électrons. La différence de réactivité peut s'expliquer par le fait que les électrons des molécules organiques susceptibles de réagir avec l'oxygène moléculaire se présentent sous la forme de doublets électroniques (composés de 2 électrons de spins antiparallèles). L'**insertion simultanée** de ces 2 électrons dans une molécule d'oxygène à l'état triplet n'est pas compatible avec les lois de la mécanique quantique puisque 2 électrons de même spin se situeraient dans un même doublet.

c) Le radical superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot(-)}$)

L'oxygène à l'état triplet est donc peu réactionnel. Cependant, il est possible que deux électrons d'une même paire électronique soient transférés

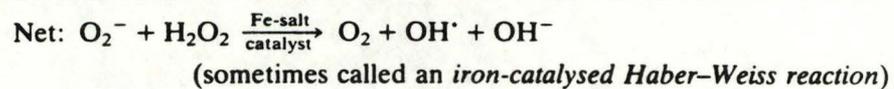
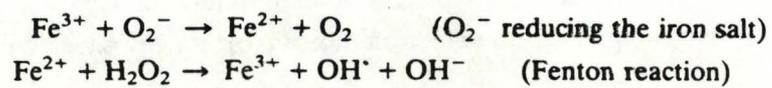


Figure 2 : Les métaux de transition comme le fer peuvent catalyser une réaction de production de OH^\cdot : la réaction de Fenton (d'après Halliwell and Gutteridge, 1985).

consécutivement sur O₂ moléculaire donnant ainsi naissance aux intermédiaires radicalaires de la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire.

La réduction complète de O₂ en H₂O nécessite l'addition de 4 électrons, qui peut se réaliser de façon monovalente (pour approximativement 5% de la consommation totale de l'oxygène par nos tissus dans des conditions normales), conduisant à la formation de radicaux libres dérivés de O₂ (fig. 1). Cette réduction peut cependant se poursuivre jusqu'à la réduction tétravalente. C'est le cas évidemment du système de la cytochrome oxydase mitochondriale, elle évite ainsi la libération de ces intermédiaires réactionnels (Rubanyi, 1988).

Le premier produit de cette réduction monovalente de O₂ fait apparaître le radical anionique superoxyde O₂^{·(-)}. Relativement instable en milieu aqueux, il est plus réactionnel que O₂. Il traverse les membranes en empruntant des canaux anioniques et se comporte dans la plupart des systèmes biologiques comme un agent réducteur (donneur d'électrons) (Frimer, 1982).

d) Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

L'addition d'un second électron au radical superoxyde forme le H₂O₂. Bien que cette molécule ne soit pas radicalaire nous la classerons tout de même parmi ces entités (par extension de sens). Elle est très stable en milieu aqueux et se comporte soit comme un agent oxydant, soit comme un réducteur selon les conditions. Elle diffuse rapidement au travers des membranes biologiques (Rubanyi, 1988).

e) Le radical hydroxyl (·OH)

Ce radical généré par l'ajout d'un troisième électron au peroxyde d'hydrogène est une espèce chimique très instable et un oxydant puissant (Halliwell and Gutteridge, 1984). Les ·OH sont capables de réagir instantanément avec la plupart des molécules organiques (Pryor, 1976). Ils peuvent également être générés dans la réaction d'Haber-Weiss catalysée par le fer (Fenton) (fig. 2). La réaction classique d'Haber-Weiss dont le mécanisme est le transfert univalent d'un électron est la suivante :



Cependant, la vitesse de cette réaction est faible comparée à des réactions compétitives telles que la dismutation spontanée des $O_2^{\cdot(-)}$. Pour cette raison, il est peu probable que les $\cdot OH$ soient générés de cette façon *in vivo*. Mais la réaction de Fenton dans laquelle un ion métallique (souvent le fer) est d'abord réduit par $O_2^{\cdot(-)}$ et oxydé ensuite par H_2O_2 est certainement une source importante de $\cdot OH$ (Fridovich, 1978). La dernière étape de cette réduction monovalente de O_2 aboutit à la formation de l'eau.

La réactivité de ces métabolites intermédiaires a une influence déterminante sur la diffusion éventuelle de ces molécules. Par exemple, les $\cdot OH$ ont une réactivité très forte, donc ces radicaux libres réagissent immédiatement à leur endroit de production cellulaire et diffusent peu. Par opposition, des radicaux moins réactionnels sont capables de réagir et d'exercer leurs effets toxiques à distance de leur site de formation (Freeman and Crapo, 1982).

Par leur forte réactivité, les radicaux libres sont susceptibles de réagir avec tous les types de biomolécules (acides nucléiques, protéines enzymatiques ou de structure, lipides...), d'interférer avec la physiologie cellulaire et de perturber le métabolisme normal de la cellule.

Pour lutter efficacement contre ces attaques radicalaires, l'évolution a sélectionné un grand nombre de mécanismes de protection ("Scavenger" de radicaux libres et défenses antioxydantes) qui sont essentiels au maintien de l'intégrité cellulaire. Ces mécanismes assurent une protection soit en réagissant avec le radical libre pour l'éliminer (Scavenger), soit en le détruisant (défenses antioxydantes) (Freeman et Crapo, 1982).

Les changements structurels et fonctionnels provoqués par la toxicité des radicaux libres ne se produisent que dans des conditions bien particulières. C'est le cas notamment lors d'une surproduction cellulaire de ces molécules faisant suite à des stress environnementaux (les xénobiotiques, les polluants, le tabac, l'hyperoxie et la reperfusion) ou d'une diminution de l'efficacité des systèmes de défense (états pathologiques, hypoxie...). Donc, chaque fois que l'on aura un déséquilibre entre la génération des radicaux et les mécanismes de protection, on observera des atteintes au bon déroulement des processus biologiques (Miki *et al.*, 1988).

Les méthodes de détection et de quantification directes de la production d'espèces réactionnelles dérivées de l' O_2 moléculaire dans un échantillon biologique incluent les techniques de chemoluminescence, d'électron spin résonance (ESR Spectroscopy) et un ensemble de réactions chimiques avec une détermination subséquente des produits par chromatographie, colorimétrie ou lectures spectroscopiques (Packer, 1984).

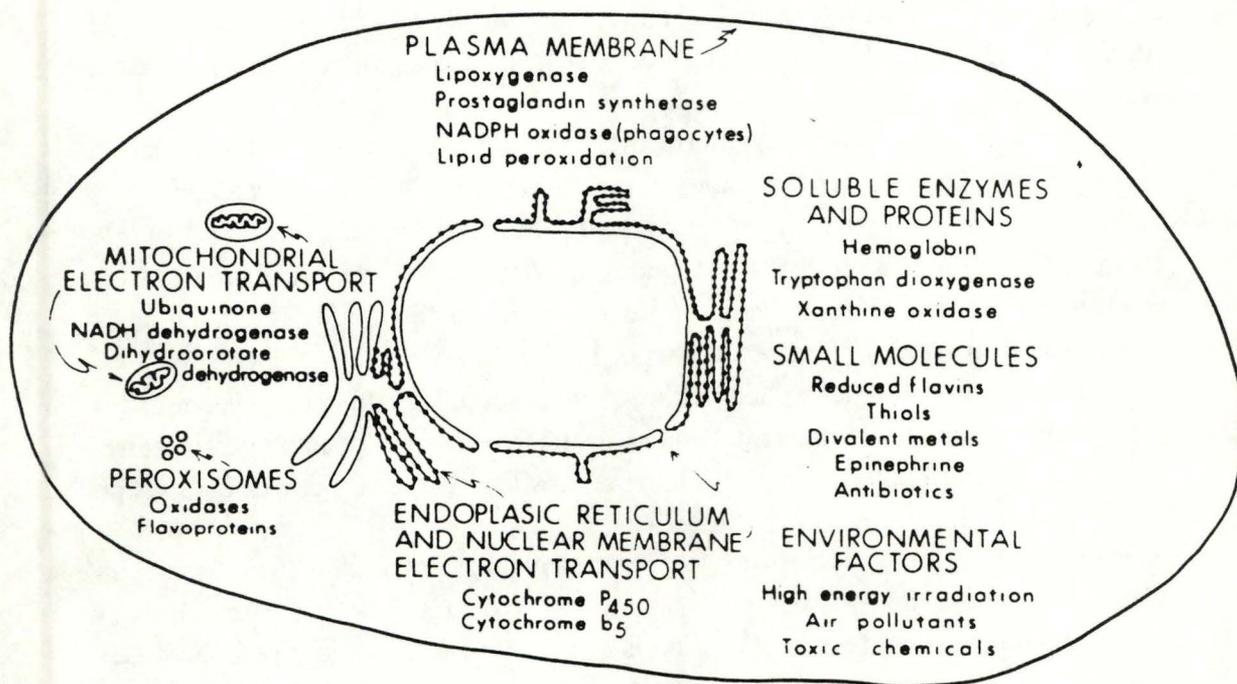


Figure 3 : Sources cellulaires de radicaux libres. Les organites subcellulaires, les composants structurels et le contenu cytoplasmique contribuent à la production d'une grande diversité d'espèces radicalaires (d'après Freeman et Crapo, 1982).

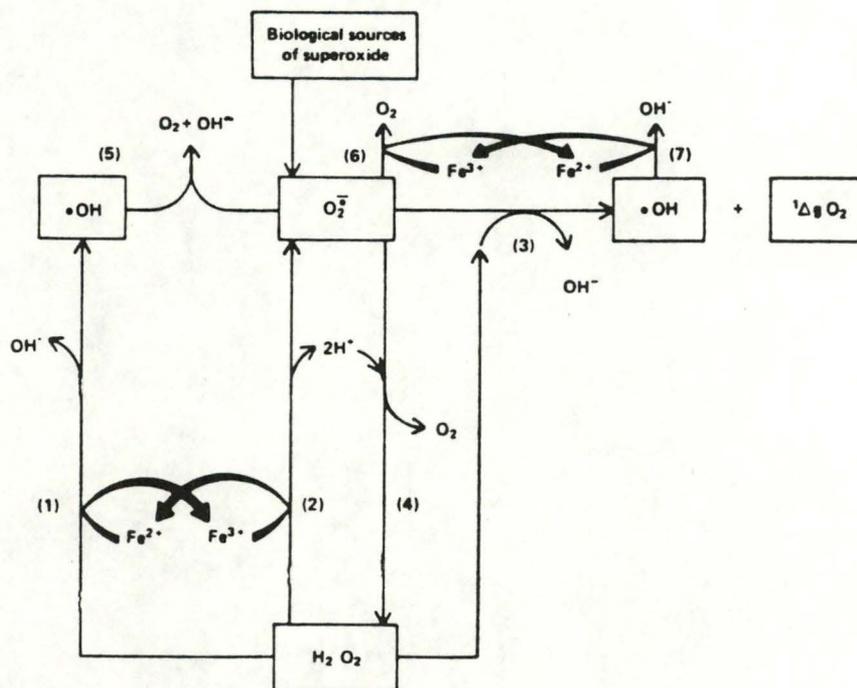


Figure 4 : Interrelations possibles entre les espèces réactionnelles dérivées de O_2 générées par les systèmes biologiques *in vitro* (d'après Byczkowski and Gessner, 1988).

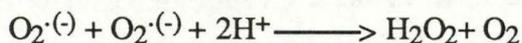
(2) Sources des radicaux libres en biologie. Mécanismes possibles pour l'initiation des réactions radicalaires *in vivo*

Dans un premier temps, nous allons nous intéresser aux sources et aux mécanismes de production des radicaux intracellulaires. La majorité des organismes aérobies génèrent des radicaux libres dérivés de l'oxygène qu'ils consomment et ce dans des conditions physiologiques normales. Il s'agit donc de productions continues dans la cellule. La figure 3 nous montre la diversité des origines endogènes de radicaux libres.

a) Sources biologiques intracellulaires

1) L'autooxydation de petites molécules

De nombreux composants cellulaires solubles, capables de subir des réactions d'oxydo-réductions en milieu aqueux neutre ont une contribution de radicaux libres intracellulaires. Ces composés incluent les groupements thiols (SH) (Baccanari, 1978), les hydroquinones (Moody *et al.*, 1982), les catécholamines (Fridovich, 1978) et les flavines (Ballou *et al.*, 1969). Dans tous les cas, $O_2^{\cdot(-)}$ est le premier radical formé lors de la réduction de O_2 par ces molécules. Le H_2O_2 est un produit secondaire formé par la dismutation spontanée ou enzymatiquement catalysée des $O_2^{\cdot(-)}$



Donc les processus cellulaires conduisant à $O_2^{\cdot(-)}$ produisent aussi H_2O_2 en tant que sous-produits de la dismutation des $O_2^{\cdot(-)}$ (Freeman et Crapo, 1982).

Ces radicaux réagissent ensemble en un réseau très complexe de réactions subséquentes (figure 4).

2) Xénobiotiques

Des agents antinéoplasiques comme l'adriamycine, des molécules anesthésiques et des antibiotiques qui possèdent des groupements quinoniques ou qui se lient à des ions métalliques pour leur activité sont capables de produire des radicaux libres. La majorité des effets chimiothérapeutiques et toxiques de ces xénobiotiques sont dus à leur capacité de réduire l'oxygène en $O_2^{\cdot(-)}$, H_2O_2 et $\cdot OH$ (Freeman et Crapo, 1982).

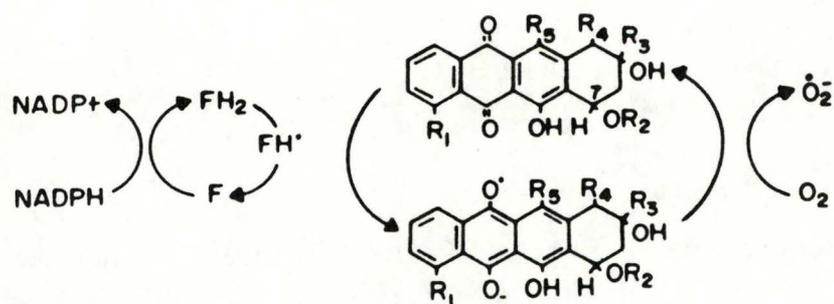


Figure 5 : Mécanisme de production d' $O_2^{\bullet -}$ par un système enzymatique catalysant la réduction de l'anthracycline. Le "cycle rédox" peut également être la source d' $O_2^{\bullet -}$ en catalysant la réduction de nombreuses autres molécules (d'après Mason, 1982).

La plupart de ces médicaments et autres xénobiotiques subissent une réduction catalysée par des systèmes enzymatiques capables de réaliser le transfert d'un électron à partir du NADPH (figure 5) (Mason and Chignell, 1982). Ces intermédiaires radicalaires dérivés du xénobiotique peuvent se réoxyder en réduisant le dioxygène par le transfert de cet électron formant ainsi le radical superoxyde anionique (Mason, 1982).

3) Métaux de transition

Les réactions engendrées par des métaux de transition. Dans un tube à essais, des sels de fer, de cuivre et de cobalt catalysent une réaction entre le H₂O₂ et O₂⁽⁻⁾ aboutissant à la formation de ·OH (Halliwell, 1987).

Alors que dans les organismes vivants, le fer est disponible pour réaliser des interactions avec les dérivés de l'oxygène, la fonction du cuivre est plus discutée (Halliwell and Gutteridge, 1984).

Bien qu'*in vitro*, toutes les réactions de la figure 4 sont susceptibles de se produire, la situation diffère quelque peu *in vivo*. Mais malgré de nombreuses controverses à propos des mécanismes exacts de ces interactions et de l'importance physiologique occupée par certaines de ces réactions, il est évident que la libération de H₂O₂ et/ou de O₂⁽⁻⁾, en présence des métaux de transition ou de leurs complexes, conduit à la formation de molécules encore plus réactionnelles comme les ·OH (Alleen and Bielski, 1982).

L'exemple le mieux connu est la réaction de Fenton (Fantone et Ward, 1982).

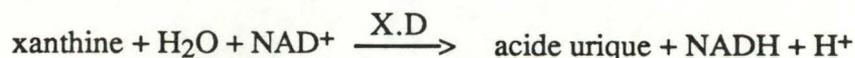
4) Enzymes et protéines solubles

Plusieurs enzymes impliquées dans des réactions d'oxydo-réduction et catalysant le transfert d'un électron produisent des radicaux libres pendant leur cycle catalytique (Fridovich, 1983).

L'enzyme la plus étudiée est sans conteste la xanthine oxydase (Fried, 1980).

In vivo, cette enzyme se présente principalement sous forme d'une déshydrogénase (XD) à NAD⁺ et ne génère pas d'intermédiaires radicalaires.

Elle catalyse la réaction suivante :



Cette xanthine déshydrogénase ne transfère pas ses électrons à l'oxygène mais réduit le NAD⁺ en NADH. C'est la forme la plus abondante puisqu'elle représente environ 90 % de l'activité totale dans un tissu sain (Mac Cord, 1985).

MITOCHONDRIAL ELECTRON TRANSPORT

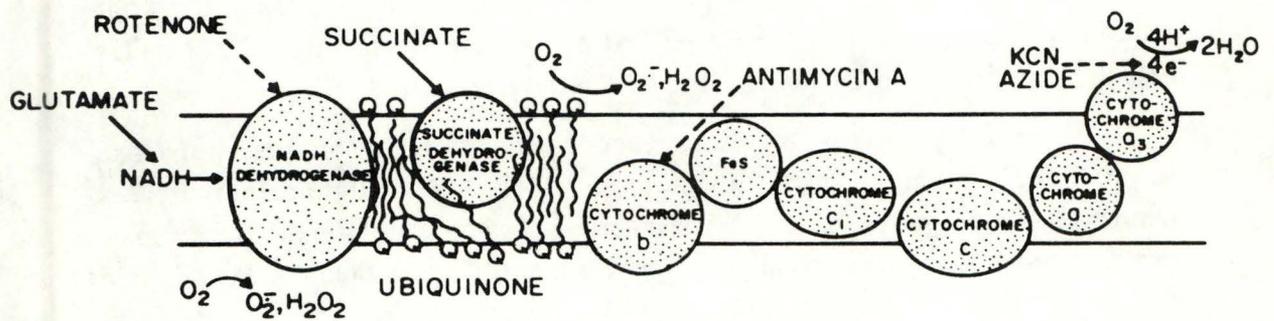
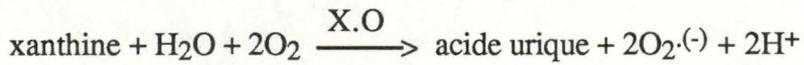


Figure 6 : La source principale de radicaux libres générés par la mitochondrie est la chaîne des transporteurs d'électrons localisée dans la membrane mitochondriale interne (d'après Freeman et Crapo, 1982).

Une protéolyse partielle ou une oxydation de certains groupements thiols sont responsables de la conversion de la forme déshydrogénase en oxydase (X.O) :



La xanthine oxydase utilise l'O₂ comme accepteur d'électrons en lieu et place de NAD⁺ et génère des O₂^{·(-)}, H₂O₂ ou les deux à la fois (Mc Cord, 1985).

Certains états métaboliques de la cellule tels que l'hyperoxie, l'ischémie-reperfusion et des thérapies à base d'antibiotiques peuvent favoriser une production excessive de radicaux libres comparée au taux de production basal (Freeman et Crapo, 1982).

D'autres enzymes comme des déshydrogénases à flavines, des peroxydases et la NADPH oxydase produisent des radicaux anioniques superoxydes (Del Maestro, 1980).

5) Les organites cellulaires

La mitochondrie qui est le site des oxydations cellulaires par excellence a une contribution relativement importante dans la production d'O₂^{·(-)} et H₂O₂ formés par la dismutation de ces O₂^{·(-)} (Boveris, 1984). La réduction de l'oxygène moléculaire en eau par la cytochrome C oxydase mitochondriale implique le transfert de quatre électrons sans libérer d'intermédiaires radicalaires, cette enzyme n'est pas la source de la production d'O₂^{·(-)} mitochondriale (Chance *et al.*, 1979). Par l'analyse de particules submitochondriales et l'utilisation du complexe I et III de la chaîne respiratoire, les sites de production des radicaux superoxydes ont pu être localisés au niveau de l'ubiquinone-cytochrome b et de la NADH déshydrogénase (figure 6). C'est à la transition entre un transfert bivalent et un transfert univalent d'électron par la succinate déshydrogénase-cytochrome b que se forment la majeure partie des O₂^{·(-)} produits par la mitochondrie (Forman and Boveris, 1982).

Entre 1 et 4% de l'oxygène total consommé par la mitochondrie sont utilisés pour la production d'O₂^{·(-)}. Le pourcentage restant est réduit par la cytochrome oxydase dans un processus tétravalent (Naqui *et al.*, 1986). Environ 20% des radicaux superoxydes intramitochondriaux sont expulsés dans le cytosol échappant ainsi à la superoxyde dismutase (Mn SOD) localisée dans la matrice mitochondriale (Forman and Boveris, 1982). Les H₂O₂ formés peuvent également être libérés dans le cytoplasme mais les mécanismes du passage transmembranaire sont totalement différents. Alors que le H₂O₂ traverse les membranes par le phénomène de diffusion (tout comme les molécules d'eau), les O₂^{·(-)} empruntent des canaux anioniques (Freeman et Crapo, 1982). La génération des radicaux superoxydes par la mitochondrie s'amplifie quand les transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire sont sous leur forme réduite (Turrens and Boveris, 1980). Donc, les

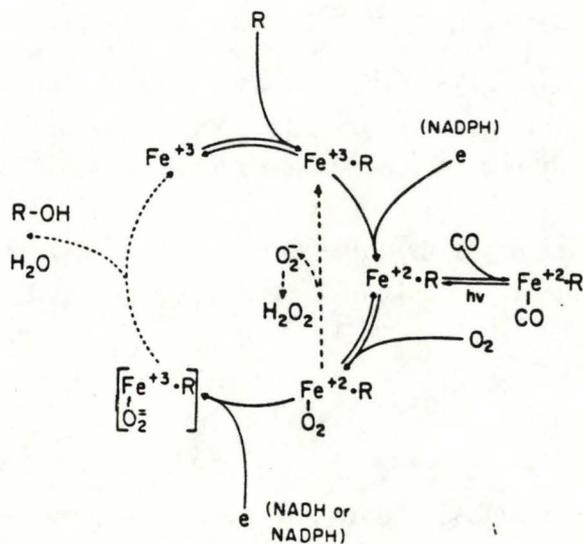


Figure 7 : Mécanisme d'action et production éventuelle de radicaux libres par le cytochrome P450 (d'après Chance *et al.*, 1979).

facteurs endogènes qui influencent l'intensité de la production radicalaire par la mitochondrie sont ceux qui régulent la respiration (disponibilité en ADP, en O₂). Quand la pression partielle en O₂ diminue (situation des cellules en hypoxie), on observe une accumulation de cofacteurs réduits conduisant à une augmentation de la production d'O₂⁽⁻⁾ par les mitochondries de cellules en ischémie (Jobsis and Lamanna, 1978).

Le réticulum endoplasmique et la membrane nucléaire sont également capables de produire des radicaux libres. Ces deux systèmes membranaires intracellulaires contiennent les cytochromes P₄₅₀ et b₅. Ces cytochromes sont impliqués dans les voies métaboliques de détoxification d'une grande variété de xénobiotiques en réduisant l'oxygène moléculaire (Aust *et al.*, 1972). La figure 7 nous détaille le mode d'action du cytochrome P₄₅₀. La fonction première de ces oxydases est de convertir des composés non polaires en dérivés hydroxylés par des réactions de transferts d'électrons afin de les rendre hydrosolubles et de faciliter leur élimination par les reins. C'est lors du métabolisme de ces molécules que des dérivés radicalaires sont produits. Il est cependant très difficile d'estimer la contribution relative du réticulum et de la membrane nucléaire dans la production cellulaire totale d'O₂⁽⁻⁾ et H₂O₂ (Freeman et Crapo, 1982).

Les peroxysomes sont une source potentielle de production de H₂O₂ en raison des fortes concentrations en oxydases (D-amino acide oxydase, urate oxydase) que ces organites contiennent. Cependant aucune de ces enzymes n'a démontré qu'elle engendrait des radicaux superoxydes comme précurseurs immédiats de l'H₂O₂ (Masters and Holmes, 1977). La catalase peroxysomale est l'enzyme qui métabolise et dégrade la majeure partie de cet H₂O₂ produit. Elle limite ainsi à quelques pourcents la proportion de ces molécules capables de diffuser dans le cytoplasme (Freeman et Crapo, 1982).

La production des O₂⁽⁻⁾ se manifeste aussi dans le règne végétal puisque des chloroplastes isolés et les thylakoïdes préparés à partir de ces organites montre une libération de radicaux superoxydes en provenance du système de transport des électrons, exposés à la lumière (Fayer and Hall, 1980).

Les membranes plasmiques elles-mêmes jouent un rôle important. Illustrons-le par deux exemples :

— La surface cellulaire est polyanionique et attire une forte concentration de contre-ions qui sont souvent des H⁺. Cet environnement légèrement acide favorise la production des formes protonnées de O₂⁽⁻⁾, les radicaux peroxyls :



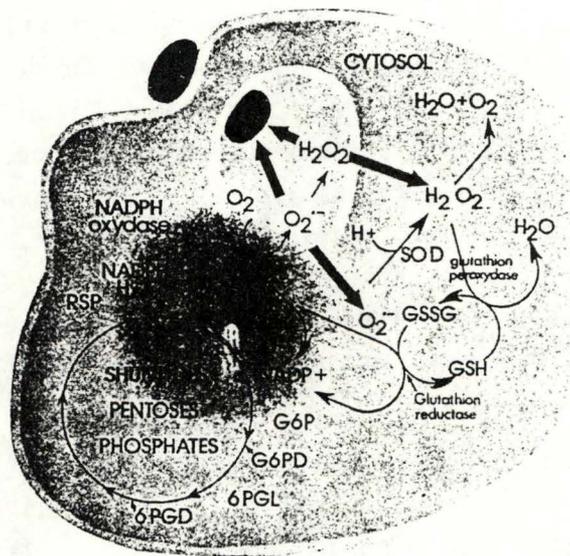


Figure 8 : Cette représentation schématique d'un phagocyte décrit les réactions générant des $O_2^{\bullet -}$ par la NADPH oxydase, les réactions de défenses cellulaires et l'importance du cycle de pentoses phosphates dans la régénération du NADPH (d'après Clark *et al.*, 1987).

Ce radical est un oxydant plus puissant et plus réactionnel que $O_2^{\cdot(-)}$. Il pénètre plus facilement les membranes et provoque des dommages plus importants. Les surfaces cellulaires peuvent modifier certaines espèces radicalaires pour les rendre plus perméables et plus réactionnelles (Kellogg and Fridovich, 1977).

— Des enzymes associées aux membranes telles que la lipoxigénase et la cyclooxygénase forment des intermédiaires radicalaires lors de la conversion oxydative de l'acide arachidonique en produits bioactifs que sont les prostaglandines, les thromboxanes et les leukotriènes (Mason *et al.*, 1980).

Non seulement, les organismes vivants aérobies produisent des radicaux libres dérivés de l'oxygène moléculaire lors du métabolisme normal mais ils sont aussi exposés à des agents environnementaux exogènes comme de nombreux médicaments, herbicides et carcinogènes dont le mécanisme d'action s'explique par la génération de radicaux. Ces molécules toxiques sont regroupées sous le nom générique de xénobiotiques.

b) Sources exogènes et extracellulaires

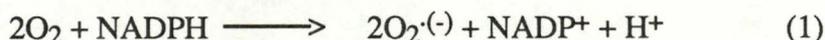
Un individu peut se retrouver exposé à un large éventail de radicaux libres autres que ceux produits par les processus métaboliques intracellulaires.

1) Les phagocytes activés

Habituellement, les cellules intactes ne relarguent pas les espèces réactionnelles dérivées de O_2 dans le milieu environnant car bien qu'elles soient diffusibles les mécanismes de protection les éliminent rapidement (Babior, 1978). Sur ce point, les cellules phagocytaires sont particulières. En effet, une fois stimulées, ces cellules accroissent leur consommation en O_2 . L'oxygène utilisé pendant cette poussée respiratoire n'entre pas dans la production énergétique mais est transformé pour 90 % en $O_2^{\cdot(-)}$ et H_2O_2 (figure 8) Ces composés constituent un des moyens bactéricides du phagocyte et peuvent être libérés dans le fluide extracellulaire (Babior, 1984). La toxicité radicalaire s'exerce à l'encontre des bactéries mais se dirige aussi contre la cellule productrice et les tissus avoisinants. La NADPH oxydase membranaire qui est responsable de la production et de l'expulsion de ces entités réactionnelles est un complexe enzymatique intervenant dans une chaîne de transfert d'électrons comprenant une flavoprotéine à FAD, un cytochrome (cyt b559) et une quinone (Clark *et al.*, 1987). Beaucoup de particules et d'agents solubles sont potentiellement capables d'activer la NADPH oxydase et de stimuler la production de ces entités réactionnelles lors de la poussée respiratoire des phagocytes (Bender and Epps, 1985).

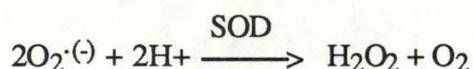
La séquence des événements moléculaires proposée pour l'élaboration des dérivés toxiques de O₂ est la suivante : (Klebanoff, 1982)

— Activation de la NADPH oxydase associée à la membrane qui catalyse la transformation de O₂ en O₂^{·(-)} par l'oxydation du NADPH en NADP⁺.



Le shunt des hexoses monophosphates permet de régénérer le NADPH à partir du NADP⁺.

— Ces radicaux superoxydes dismutent soit spontanément, soit dans la réaction catalysée par la superoxyde dismutase pour former le H₂O₂.



— Une réduction supplémentaire de H₂O₂ par les O₂^{·(-)} dans la réaction de Fenton aboutit à la formation de radicaux hydroxyls.

Malheureusement les événements impliqués dans le signal de la transduction ne sont pas encore complètement élucidés.

L'oxygène singulet (¹O₂) participe lui aussi à la destruction des bactéries par les phagocytes (Babior, 1978). L'importance de l'activité oxydative dans les défenses de l'hôte est attestée par un déficit génétique en NADPH oxydase conduisant à la maladie granulomateuse chronique. Cette pathologie est caractérisée par l'incapacité des cellules phagocytaires de produire des O₂^{·(-)} (Baehner *et al.*, 1982). La myéloperoxydase est une enzyme qui oxyde en présence de H₂O₂ des anions tels I⁻ et Cl⁻ en dérivés toxiques comme l'hypochlorite (HClO). Elle serait aussi impliquée dans la régulation de la production des radicaux superoxydes en provoquant l'inhibition de la NADPH oxydase par un mécanisme de feedback (Edwards and Swan, 1986).

2) L'irradiation

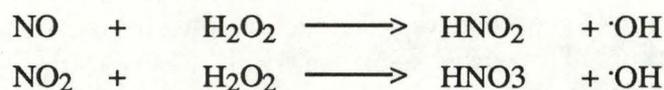
L'irradiation des organismes par des radiations électromagnétiques (Rayons X et γ) et particulaires (électrons, protons, neutrons, particules α et β) engendre des radicaux primaires. Les radiations transfèrent leur énergie aux composants cellulaires et principalement à l'eau (Freeman et Crapo, 1982). La radiolyse de H₂O est l'origine d'électrons hydratés (e_{aq}⁻), d'atomes d'hydrogène (H[·]), de radicaux hydroxyls (·OH) aussi bien que de O₂^{·(-)} et/ou de H₂O₂ en conditions aérobies (Czapski, 1971). Ces radicaux primaires peuvent ensuite interagir avec d'autres molécules, aboutissant à la formation d'un ensemble très varié de produits radicalaires secondaires (Slater, 1984).

3) *L'alimentation*

L'alimentation apporte sa part de radicaux. Les aliments sont souvent des composés organiques complexes (d'origine végétale et animale) auxquels sont souvent ajoutés des agents de conservation. L'irradiation, le stockage, le chauffage et l'autooxydation de ces aliments entraînent la formation de molécules radicalaires dérivées de O₂ (Chan, 1987).

4) *La fumée de cigarette*

La fumée de cigarette comporte un nombre considérable de radicaux libres qui peuvent être détectés par la méthode ESR (Electron Spin Resonance). Le goudron de chaque bouffée de cigarette contient près de 10¹⁴ radicaux. La fumée de cigarette contient aussi de fortes concentrations des composés gazeux comme le mono- et dioxyde d'azote (NO et NO₂). Ce dioxyde d'azote est capable d'attaquer des composés insaturés riches en doubles liaisons. Il peut aussi réaliser des abstractions d'hydrogène et provoquer ainsi la peroxydation lipidique, l'oxydation de la cystéine et du glutathion. De plus NO et NO₂ peuvent réagir avec H₂O₂ pour produire des ·OH.



La fumée est également capable d'induire la production de H₂O₂ et O₂⁽⁻⁾ par la stimulation des macrophages alvéolaires pulmonaires. Le goudron se compose principalement d'hydrocarbures aromatiques complexes et les radicaux générés sont très stables puisque les électrons non appariés sont délocalisables sur de larges structures aromatiques cycliques (Halliwell and Gutteridge, 1985).

5) *Les oxydes d'azote*

Ces molécules sources de radicaux libres ne sont pas seulement produites dans la fumée de cigarette mais se dégagent lors de la combustion de matériels biologiques et à l'échappement des moteurs à explosion (Halliwell and Gutteridge, 1985).

En résumé une grande diversité d'agents environnementaux comprenant des polluants atmosphériques, des pesticides, des solvants organiques, des herbicides, des anesthésiants et la classe générale des hydrocarbures aromatiques provoquent des dommages d'origine radicalaire aux cellules. Ces xénobiotiques existent soit à

Target	Consequence
"Small" molecules	
Unsaturated and thiol-containing amino acids	Protein denaturation and cross-linking, enzyme inhibition
Nucleic acid bases	Organelle and cell permeability changes
Carbohydrates	Cell cycle changes, mutations
Unsaturated lipids	Cell surface receptor changes
	Cholesterol and fatty acid oxidation
	Lipid cross-linking
	Organelle and cell permeability changes
Cofactors	Decreased nicotinamide and flavin-containing cofactor availability and activity, ascorbate oxidation porphyrin oxidation
Neurotransmitters	Decreased neurotransmitter availability and activity, including serotonin, epinephrine
Antioxidants	Decreased availability, includes α -tocopherol and β -carotene
Macromolecules	
Protein	Peptide chain scission, denaturation
DNA	Strand scission, base modification
Hyaluronic acid	Change in synovial fluid viscosity

Tableau 1 : Tous les constituants cellulaires sont potentiellement capables de réagir avec les radicaux libres. Les modifications chimiques de ces molécules conduisent à des perturbations métaboliques et structurelles au sein des cellules capables ultimement d'entraîner la mort cellulaire (d'après Freeman et Crapo, 1982).

l'état de radicaux libres, soit ils sont convertis en entités radicalaires par le métabolisme cellulaire de détoxification (Freeman et Crapo, 1982).

Avant d'envisager les mécanismes de défense cellulaire contre les agressions radicalaires, il est indispensable d'étudier la réactivité de ces entités avec les biomolécules. La toxicité radicalaire perturbe les processus physiologiques cellulaires et entraîne éventuellement la mort de la cellule.

3) Cytotoxicité radicalaire et conséquences cellulaires

Pour rendre compte de la toxicité de l'oxygène, Halliwell a formulé la théorie de la toxicité des radicaux superoxydes, théorie selon laquelle les effets délétaires observés sur les cellules lors de leur exposition à une forte pression de O₂ (hyperoxie) sont dus à une production accrue des radicaux O₂^{·(-)} et de leurs dérivés H₂O₂, ·OH.

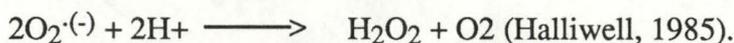
Plusieurs arguments sous-tendent cette théorie.

- Les radicaux O₂^{·(-)} sont produits naturellement par l'organisme vivant et ils peuvent entraîner une grande variété de dommages aux structures biologiques (Halliwell, 1985).

Le tableau 1 montre cette grande diversité de dommages (perte d'activité enzymatique, lyse cellulaire, oxydations...) dans des systèmes très différents. L'implication des O₂^{·(-)} est démontrée par le fait que la SOD protège souvent les structures cibles.

- En plus de leur propre action, les O₂^{·(-)} peuvent générer des espèces encore plus réactionnelles comme les ·OH (Fenton, réduction monovalente). Ces radicaux hydroxyles expliquent en partie la toxicité des radicaux superoxydes même si dans ce cas, elle est indirecte (Halliwell, 1985).

- Ajoutons encore l'ubiquité et l'abondance de la superoxyde dismutase dans nos tissus. Cette enzyme contribue à maintenir un taux faible d'O₂^{·(-)} dans la cellule en catalysant son élimination par dismutation :



Il est difficile de cerner l'ensemble des réactions d'attaques radicalaires en raison de la diversité des entités radicalaires produites et de la multitude des molécules biologiques qui en sont les cibles. (Voir tableau 1) (Freeman et Crapo, 1982).

Les membranes sont des sites importants de ces attaques radicalaires par le nombre de réactions susceptibles de s'y produire et par la gravité des perturbations

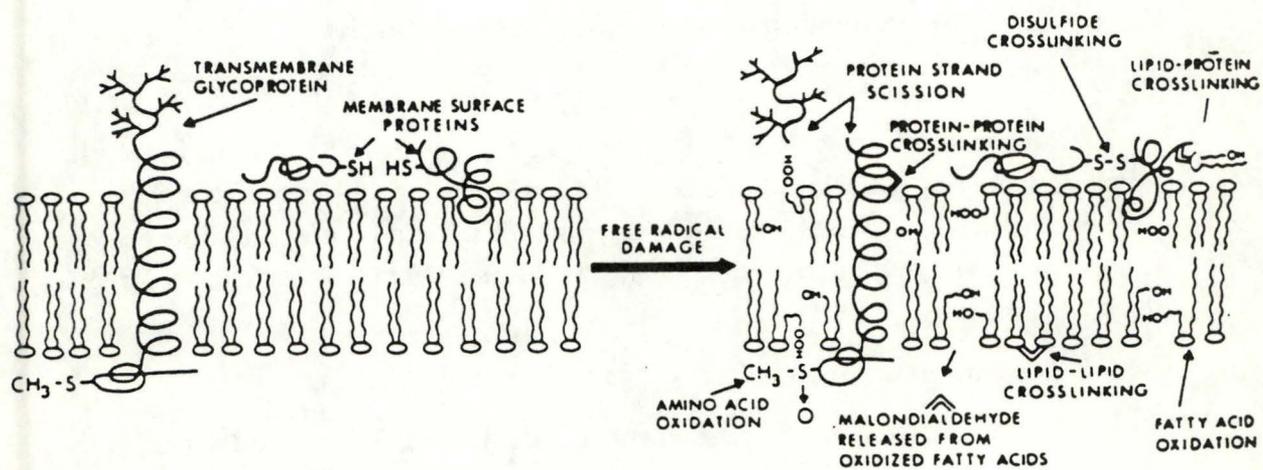


Figure 9 : Structure des membranes biologiques et conséquences des attaques radicalaires sur ses divers constituants.

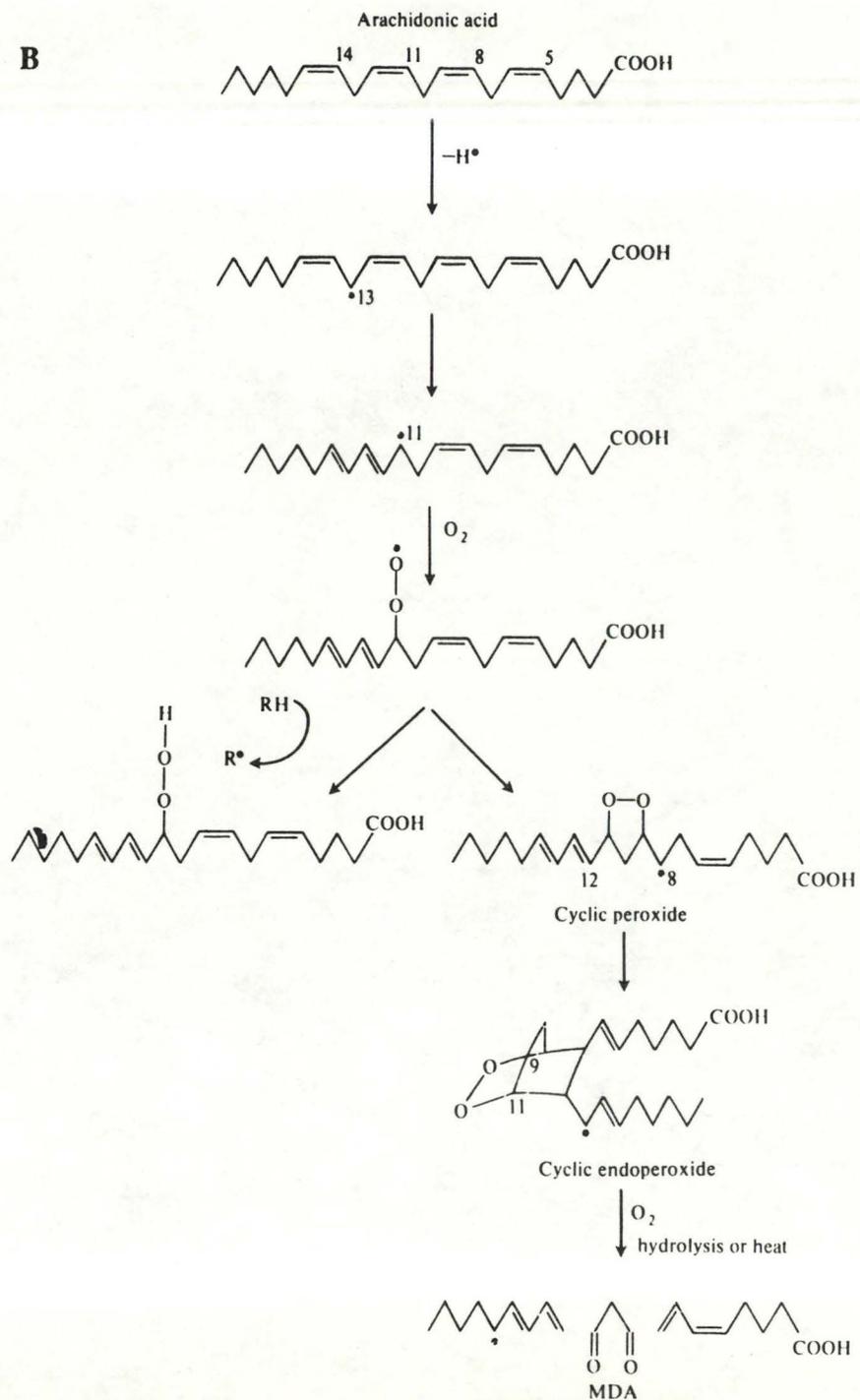
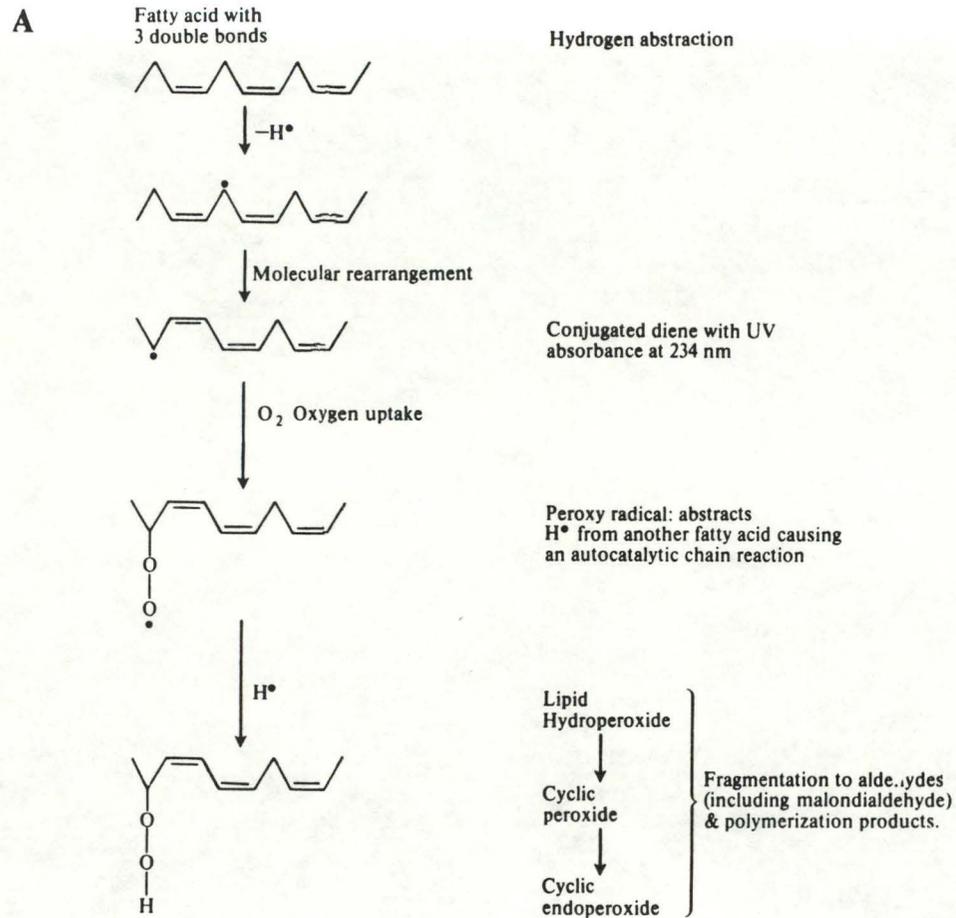


Figure 10 : A. Réactions d'initiation et de propagation de la peroxydation lipidique
 B. Formation d'hydroperoxydes, de peroxydes cycliques et malonaldehyde. (D'après Halliwell and Gutteridge, 1985)

occasionnées dans le métabolisme cellulaire qui surviennent lors de ces lésions membranaires (fig. 9).

L'intégrité structurelle et fonctionnelle de la membrane plasmique est indispensable à un fonctionnement cellulaire normal (Halliwell and Gutteridge, 1985). La structure de base des membranes biologiques peut se représenter comme une bicouche de phospholipides dans laquelle s'implantent des protéines (Singer and Nicolson, 1972). Il est aussi bien établi que les lipides régulent, en grande partie, l'intégrité structurelle et fonctionnelle de ces membranes biologiques (Stubbs, 1983 ; Stubbs and Smith, 1984).

Selon le modèle de la mosaïque fluide, les constituants membranaires sont capables de diffusion rotationnelle et translationnelle dans le plan de la membrane (Quinn and Chapman, 1980). C'est cette mobilité des composants membranaires que l'on appelle fluidité membranaire. Cette propriété biophysique inhérente aux membranes est indispensable au maintien des fonctions cellulaires telles que l'activité des enzymes associées à ces membranes, la perméabilité sélective, la transmission des signaux de transduction transmembranaire et la division cellulaire (Houslay and Stanley, 1983 ; Stubbs, 1983 ; Stubbs and Smith, 1984 et Quinn, 1980).

Patel et Block ont montré qu'en plus de la peroxydation lipidique par les radicaux libres dérivés de O_2 , on observe des modifications de la fluidité membranaire de cellules endothéliales exposées à de fortes pressions partielles en O_2 (Halliwell and Gutteridge, 1985).

a) La peroxydation lipidique

Cette réaction se déroule en 3 grandes étapes (voir fig. 10) :

- Initiation

Un radical $\cdot OH$ par sa grande réactivité peut arracher un $H\cdot$ à un acide gras insaturé d'un phospholipide membranaire (Abstraction d'un atome d'hydrogène). Le réarrangement moléculaire subséquent est le résultat de délocalisations électroniques conduisant aux diènes conjugués.

- Propagation

L'oxygène moléculaire réagit ensuite avec ce radical organique et conduit à la formation de radicaux peroxydes. Ces nouveaux radicaux formés sont capables à leur tour d'arracher $H\cdot$ à un acide gras voisin. On a donc l'apparition d'un hydroperoxyde et d'un autre acide gras radicalaire (Halliwell, 1985). Ce processus devient autocatalytique après l'initiation (Freeman et Crapo, 1982). Les peroxydes

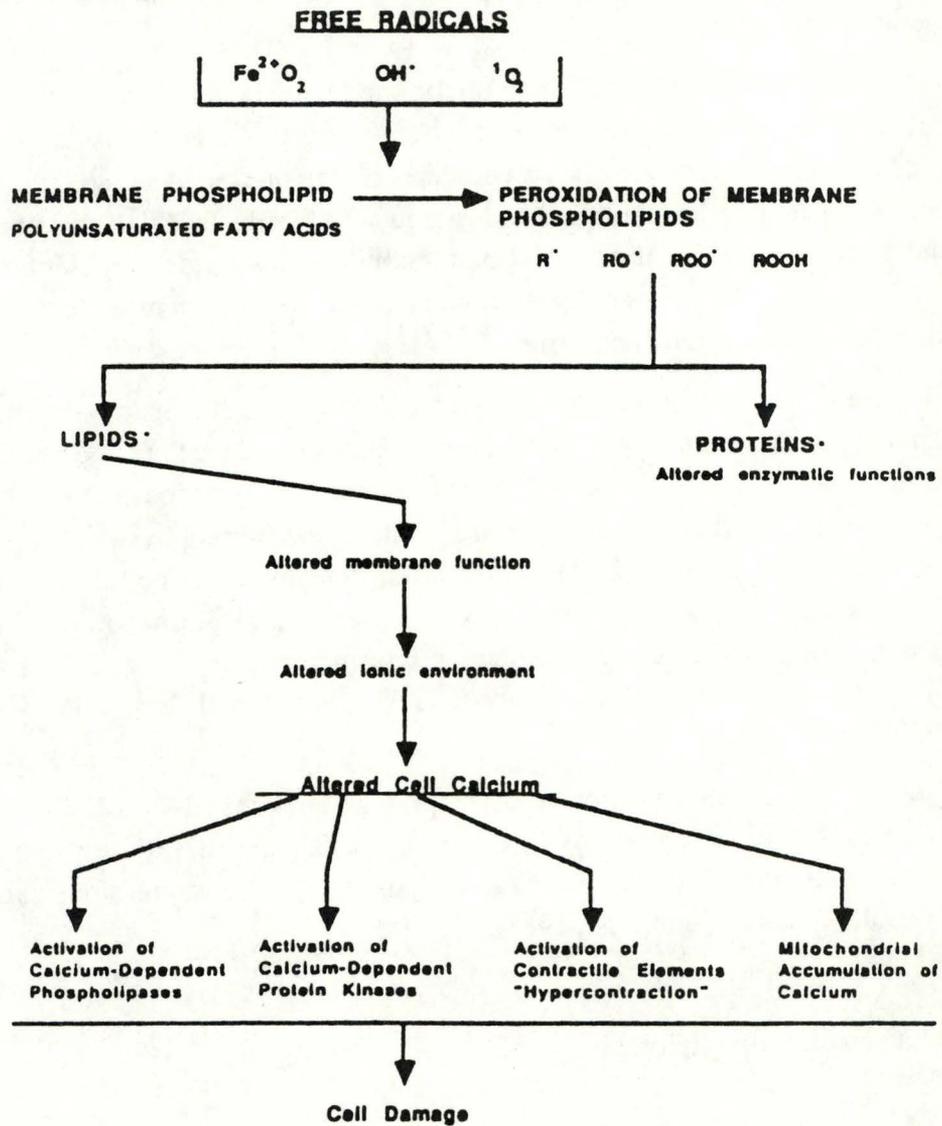


Figure 11 : Effets de la peroxydation lipidique sur les fonctions de la membrane cellulaire (d'après Burton, 1988).

lipidiques formés peuvent produire via les peroxydes cycliques, et les endoperoxydes cycliques la malonaldéhyde. Ce composé volatil est métabolisé *in vivo* et pourra réagir avec d'autres lipides ou protéines cellulaires.

La lipofuscine (pigment du vieillissement) est probablement le résultat de l'accumulation lysosomale de résidus insolubles formés par réaction d'aldéhydes provenant de la peroxydation lipidique comme la malonaldéhyde avec des fragments de protéines (Freeman et Crapo, 1982).



- Terminaison

Bien que théoriquement, les réactions de propagation peuvent se poursuivre indéfiniment, elles sont souvent stoppées par les "scavengers" de radicaux libres. Certains d'entre eux sont essentiels au maintien de l'intégrité cellulaire au point que leur déplétion conduit à la cytotoxicité radicalaire. D'autres molécules de protection tombent dans la catégorie des défenses antioxydantes (voir *infra*) (Freeman et Crapo, 1982). La réaction entre deux radicaux quelconques assurent aussi la terminaison de la réaction : $\text{R}\cdot + \text{R}\cdot \longrightarrow \text{R-R}$.

Conséquences de la peroxydation lipidique (fig. 11).

La peroxydation aboutit à la production de radicaux lipidiques ($\text{L}\cdot$), de radicaux alkoxy ($\text{LO}\cdot$), de peroxydes ($\text{LOO}\cdot$) d'hydroperoxydes (LOOH) et de leurs produits de dégradation comme les aldéhydes.

La présence d'acides gras à courte chaîne comprenant des groupements tels que R-OOH , R-COOH , R-CHO et R-OH déstabilisent les membranes et affectent sévèrement tant leur perméabilité que leur fluidité (Hochstein *et al.*, 1981).

L'oxydation des groupements sulfhydryles par les $\cdot\text{OH}$ peut inactiver des enzymes essentiels et les protéines de transport membranaire.

Ce type d'altération peut rendre la membrane plasmique incapable de maintenir ses gradients ioniques avec éventuellement un influx de calcium. Cette entrée massive de Ca^{++} peut encore amplifier les dommages cellulaires par l'activation de phospholipases et de protéases, en activant des protéines contractiles et favorisant la libération du calcium mitochondrial (Kako, 1987).

Souvent, les chaînes d'acides gras des phospholipides oxydés sont hydrolysées par la phospholipase A_2 présumant soit d'un processus de réparation, soit d'une étape dans la synthèse des prostaglandines (Sevanian *et al.*, 1981).

La malonaldéhyde produite peut causer des liaisons covalentes de type lipide-lipide, lipide-protéine, protéine-protéine et assurer la polymérisation de composants membranaires (Nielsen, 1981).

L'effet cumulatif de toutes ces altérations entraîne des modifications structurelles et fonctionnelles dans les membranes pouvant conduire à la lyse cellulaire (Chance *et al.*, 1979).

b) Les protéines

En raison de la grande réactivité des molécules insaturées et contenant des groupements (SH) avec les radicaux libres, les protéines contenant des acides aminés comme le tryptophane, la tyrosine, la phénylalanine, l'histidine, la méthionine et la cystéine peuvent subir des modifications (Pryor, 1976). Les enzymes comme la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase dont l'activité dépend de ces acides aminés seront inhibés lors de leur exposition aux radicaux libres (Buchanan and Armstrong, 1978).

Des liaisons covalentes se produisent au sein des protéines cytoplasmiques. Elles sont médiées par la formation de ponts disulfures interprotéines ou plus encore par des réactions irréversibles entre un radical libre et le résidu acide aminé attaqué (Freeman et Crapo, 1982).

Les acides aminés lysine et proline peuvent s'hydroxyler spontanément au contact de $O_2^{\cdot(-)}$, H_2O_2 et $\cdot OH$ (Trelstad *et al.*, 1981). Tous les autres acides aminés peuvent subir des abstractions d'hydrogène au niveau du carbone α .

Enfin la susceptibilité des protéines aux attaques radicalaires est fonction de leur composition en acides aminés, de la localisation et de l'importance des acides aminés impliqués dans la conformation et l'activité de la protéine et éventuellement de la possibilité de réparation des protéines endommagées. La localisation cellulaire des protéines et la sévérité des attaques radicalaires influencent aussi l'importance et l'étendue des dommages protéiques (Brot *et al.*, 1981).

c) Les acides nucléiques

Les radiations ionisantes entraînent des mutations et éventuellement la mort cellulaire par l'intermédiaire de réactions radicalaires avec l'ADN (Myers, 1980). généralement ce sont les $\cdot OH$ qui sont responsables de la mort cellulaire par irradiation à la fois chez les eucaryotes et les procaryotes. Cette cytotoxicité étant la

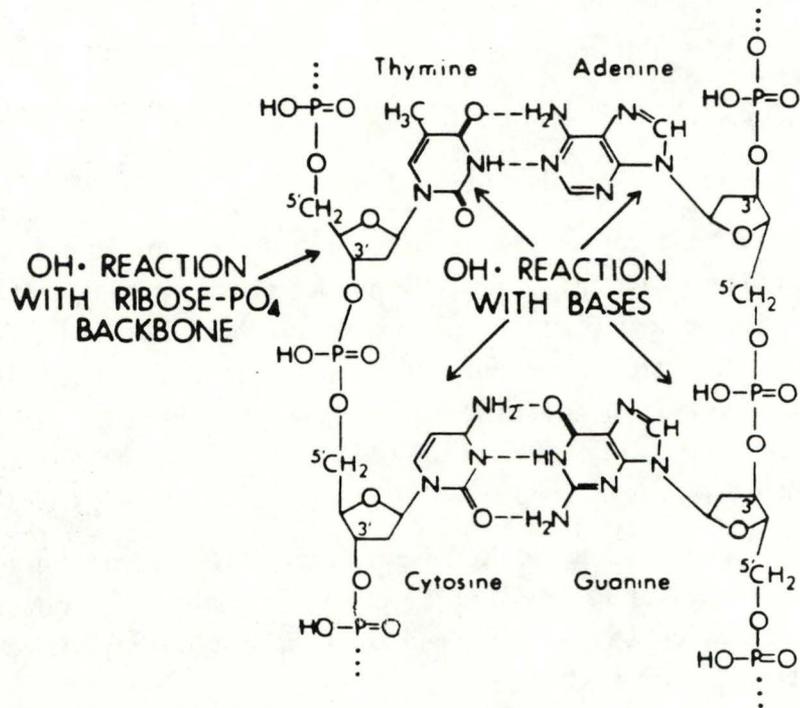


Figure 12 : Réactions des $\text{OH}\cdot$ avec l'ADN. La conséquence en est une modification des bases ou une scission dans la chaîne (d'après Freeman et Crapo, 1982).

conséquence des modifications dans la séquence de bases des acides nucléiques et des scissions dans les chaînes de l'ADN (Ward, 1981).

Des études en solution aqueuse ont montré que les $\cdot\text{OH}$ réagissent rapidement avec les désoxyriboses et les bases puriques et pyrimidiques de l'ADN (Kurabawa *et al.*, 1982).

Les scissions dans l'ADN résultent de réactions radicalaires avec les brins sucres phosphates alors que les modifications de bases sont le fruit de l'attaque des groupements azotés par des $\cdot\text{OH}$ (fig. 12) (Frenkel *et al.*, 1986).

Ajoutons encore que la MDA (Malonaldéhyde) produite par fragmentation de peroxydes lipidiques est tellement diffusible qu'elle peut réagir avec les bases azotées de l'ADN. La MDA est reconnue comme une molécule mutagène, carcinogène et génotoxique pour des cellules en culture (Donato, 1981).

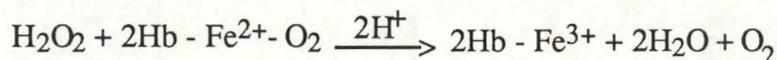
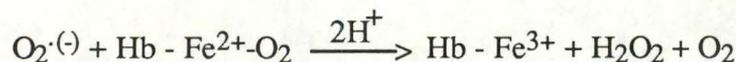
d) Changements dans la détoxification des xénobiotiques

En plus de l'activation directe de certains xénobiotiques, les espèces dérivées de O_2 causent des dommages aux membranes microsomales et perturbent le fonctionnement de certains enzymes impliqués normalement dans la détoxification comme le cytochrome P_{450} ou la glucuronyl transférase (Janes *et al.*, 1986). Ces radicaux libres dérivés de l' O_2 peuvent aussi inhiber les systèmes enzymatiques assurant leur élimination.

C'est le cas notamment des $\text{O}_2^{\cdot(-)}$ inhibant la catalase (Kono, 1982) et de H_2O_2 inactivant la superoxyde dismutase (Hodgsan et Fridovich, 1975) et la glutathion peroxydase (Pigeolet *et al.*, 1989).

e) Molécules cytosoliques

Des molécules cytosoliques contenant un groupement hémique telle l'hémoglobine (Hb) sont la cible de H_2O_2 et $\text{O}_2^{\cdot(-)}$. L'oxyhémoglobine (forme active avec Fe^{2+}) se transforme en méthémoglobine (forme inactive avec Fe^{3+}) par les réactions d'oxydo-réduction suivantes (Freeman et Crapo, 1982) :



f) Effets extracellulaires

Les radicaux libres jouent un rôle important dans la modulation de l'étendue de la réponse inflammatoire et dans les dommages tissulaires qui en résultent. Les composants extracellulaires qui en sont la cible incluent le collagène et l'acide hyaluronique (Greenwald, 1980). Ces polymères du tissu conjonctif sont affectés dans l'ostéo-arthrite. Les radicaux superoxydes produits par les leucocytes activés peuvent aussi réagir avec un constituant du plasma pour générer un facteur chimotactique favorisant l'infiltration d'autres cellules de l'inflammation au niveau de la région concernée (Mc Cord *et al.*, 1980).

Jusqu'à présent, nous n'avons considéré que les influences néfastes des dérivés radicalaires de l'oxygène moléculaire. Cependant, leur ubiquité atteste que ces radicaux libres sont impliqués dans des fonctions normales et ont parfois un rôle bénéfique pour l'organisme.

1) Nous avons déjà évoqué la poussée respiratoire des leucocytes activés au cours d'un processus inflammatoire. Dans ce cas, la toxicité des molécules radicalaires s'exerce normalement à l'encontre de particules étrangères à l'organisme (bactéries,...). Ajoutons que les radicaux ne sont pas les seuls à intervenir dans cette défense : les hydrolases lysosomales libérées dans le phagosome lors de la fusion lysosome-phagosome ont aussi un rôle essentiel.

Malgré leurs propres protections, les leucocytes stimulés finissent par devenir la cible de ces attaques radicalaires (Fantone et Ward, 1982).

2) Par leur pouvoir d'oxydation, les radicaux libres interviennent dans le métabolisme normal de certaines molécules. Ils sont notamment impliqués dans des réactions d'oxydation, de carboxylation et d'hydroxylation.

- on suspecte l'existence de radicaux $\cdot\text{OH}$ dans le mécanisme d'action d'hydroxylases. Des complexes $\text{Fe}^{2+} - \text{O}_2$ interviennent par exemple dans la réaction catalysée par les lysyl et polyl hydroxylases. Ces enzymes sont rencontrés dans la synthèse du collagène (Halliwell et Gutteridge, 1985).

- Les $\text{O}_2^{\cdot(-)}$ ont une fonction importante dans la synthèse de la prothrombine et des facteurs VII et IX de la coagulation. Ils favoriseraient la réaction de carboxylation des résidus d'acide glutamique nécessaire à la synthèse de ces facteurs.

- une étape d'oxydation dans la synthèse des catécholamines fait également appel aux dérivés radicalaires de l'oxygène moléculaire (Halliwell et Gutteridge, 1985).

3) Les radicaux anioniques superoxydes contribuent aussi à l'agrégation des plaquettes et à la libération de la sérotonine (Fried, 1980) ainsi qu'à la transformation de molécules du plasma en facteur chémoattractif pour les phagocytes (Halliwell et Gutteridge, 1985).

Malgré ces quelques implications bénéfiques des entités radicalaires, celles-ci agressent continuellement les cellules. Regardons maintenant les mécanismes de protection mis à la disposition des cellules pour se défendre contre ces attaques.

(4) Défenses de l'organisme contre les attaques médiées par les radicaux libres dérivés de l'oxygène moléculaire

La forte augmentation de la concentration en oxygène dans l'atmosphère est à mettre en relation avec l'évolution des organismes photosynthétiques il y a 2 ou 3 milliards d'années (Berkner *et al.*, 1964). Cette atmosphère oxydante a permis l'évolution concomitante des organismes dépendant d'un métabolisme énergétique aérobie.

Depuis cette époque, la survie des formes procaryotiques et eucaryotiques n'a été possible que grâce à l'élaboration d'un arsenal de défenses biochimiques qui protège les organismes des dommages engendrés par les radicaux libres. Ces protections comprennent à la fois des "scavengers" de radicaux libres de faible poids moléculaire et des systèmes enzymatiques complexes. Elles ont pour fonction principale de maintenir les concentrations des espèces radicalaires les plus faibles possibles. Les radicaux existants sont donc le résultat d'un équilibre dynamique entre leur production et leur élimination (Freeman et Crapo, 1982).

a) Mécanismes extracellulaires

- Les cellules endothéliales reçoivent l'oxygène par voie sanguine et ne sont donc pas directement exposées aux 20% de ce gaz contenu dans l'atmosphère. La proportion d'oxygène dissous dans la phase liquide du sang ne représente que quelques pourcents de l'oxygène total circulant dans un vaisseau. La majeure partie de l'oxygène est en effet fixée sur une hémoprotéine contenue dans les globules rouges : l'hémoglobine.

On peut considérer qu'elle représente un des premiers moyens de défense puisque l'oxygène y reste fixé jusqu'à sa libération dans les tissus (Jones, 1985).

- La transferrine, glycoprotéine plasmatique, est une molécule de transport ayant la capacité de fixer des atomes de fer. En empêchant ceux-ci de réagir dans la réaction de Fenton, cette protéine a une activité antioxydante secondaire (Halliwell et Gutteridge, 1985).

La céruloplasmine, protéine transportant le cuivre, et une superoxyde dismutase tétramérique de 134.000 daltons contenant du cuivre sont des protéines circulantes capables de métaboliser les $O_2^{\cdot(-)}$ (Marklund, 1982). Cependant, l'activité de dismutation de ces $O_2^{\cdot(-)}$ par la céruloplasmine est de 25 à 50.000 fois plus faible que celle de la SOD (Bannister *et al.*, 1980). D'autres mécanismes d'action sont donc à l'actif de la céruloplasmine qui pourrait détoxifier des ions hydroxyles et l'oxygène singulet; par son activité ferro-oxydasique, elle oxyde les ions Fe^{2+} en Fe^{3+} empêchant la formation d'ions hydroxyles par la réaction de Fenton (Fantone et Ward, 1982).

- En plus du contenu plasmatique en vitamine E, on y retrouve de faibles quantités d'enzymes antioxydantes de même nature que celles rencontrées de façon intracellulaire (voir infra). Cependant, le temps de demi-vie de ces enzymes dans le sang est très court (Hyalmarsson, 1987).

- Récemment, la bilirubine a été reconnue comme un scavenger des radicaux peroxylys ayant une importance physiologique non négligeable (Stocker *et al.*, 1987).

- L'acide urique présent dans le plasma humain à des concentrations de l'ordre de 0,12 - 0,45 μ moles par litre est un scavenger puissant de l'oxygène singulet et des radicaux hydroxyles. De plus, il peut inhiber la peroxydation lipidique (Arnes *et al.*, 1982).

b) Défenses cellulaires naturelles

On peut classer les antioxydants cellulaires de différentes façons selon qu'ils sont enzymatiques ou non, liposolubles ou hydrosolubles et enfin préventifs ou réparateurs. Par préventifs, nous entendons que l'antioxydant empêche le radical de réagir avec les biomolécules et qu'il stoppe les réactions de propagation. Les systèmes réparateurs interviennent pour remplacer les molécules altérées (protéolyse de protéine oxydées, réparation de l'ADN muté, clivage et remplacement des acides gras peroxydés, ...) (Slater *et al.*, 1987).

La classification utilisée ci-dessous repose sur la nature enzymatique ou non des antioxydants.

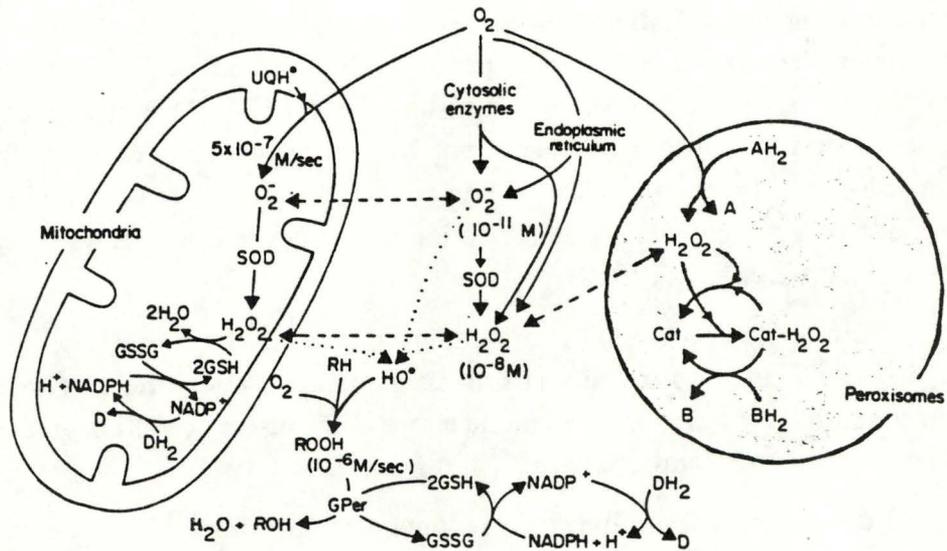


FIG. 1. General scheme of roles of catalase, glutathione peroxidase, and superoxide dismutase in different subcellular locations. Concentrations and formation rates of oxygen metabolites are estimated. UQH·, ubiquinone radical; GSSG, oxidized glutathione; GSH, reduced glutathione; DH₂ and D, a nonspecific NADP reducing system; SOD, superoxide dismutase; NADPH and NADP, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; O₂⁻, superoxide anion; HO·, hydroxyl radical; ROOH, an alkyl hydroperoxide; GPer, glutathione peroxidase; Cat, catalase; B and BH₂, hydrogen donors of a specificity appropriate to catalase, such as ethanol.

Figure 13 : Schéma général des rôles de la catalase, de la glutathion peroxydase et de la superoxyde dismutase. Cette figure présente les nombreuses interrelations possibles malgré une compartimentation différente. (D'après Chance *et al.*, 1979).

1) *Protections enzymatiques*

Elles sont au nombre de trois mais ne fonctionnent pas de manière totalement indépendante (figure 13). Le tableau 2 nous présente les caractéristiques essentielles de la catalase (CAT), de la superoxyde dismutase (SOD) et la glutathion peroxydase (GPX). Une quatrième, la glutathion réductase est impliquée dans un processus de régénération de cofacteur intervenant dans le mécanisme d'action de la GPX.

- Les superoxydes dismutases

Les métalloenzymes appelées superoxydes dismutases (SOD) fournissent une défense contre les $O_2^{\cdot(-)}$ et sont retrouvées dans tous les organismes aérobies (Fridovich, 1986). Ces enzymes catalysent la conversion des $O_2^{\cdot(-)}$ en $H_2O_2 + O_2$ appelée dismutation.

Historique

Depuis 1938, on a décrit de nombreuses protéines contenant du cuivre provenant de sources très diverses. Ainsi, "l'hémocupréine" des globules rouges, l'"hépatocupréine" du foie de cheval et la cérébrocupréine du cerveau faisaient partie de ces protéines à fonctions encore inconnues. Ces protéines riches en cuivre (0,38%) étaient considérées comme des stockeurs ou transporteurs de cuivre (Halliwell and Gutteridge). En 1970, on découvre que ce type de protéine contient du zinc et du cuivre (Fridovich, 1976).

Il revient à Mc Cord et Fridovich d'avoir montré que l'activité enzymatique de ces protéines n'était en fait que la dismutation des $O_2^{\cdot(-)}$ (Halliwell and Gutteridge, 1985).

Structure : Mécanisme d'action

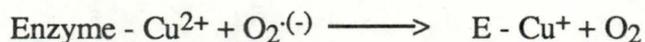
Des extraits tissulaires ou cellulaires contiennent habituellement plus d'un type de SOD. En fonction de la nature du métal retrouvé dans le site actif de l'enzyme, on parle de CuZnSOD, MnSOD et FeSOD.

La superoxyde dismutase à cuivre-zinc (CuZnSOD) est une enzyme très stable et facilement purifiable. Toutes les CuZnSOD ont un poids moléculaire d'environ 32.000 et contiennent 2 sous-unités protéiques, chacune portant un site

	Catalase	Glutathione Peroxidase		Superoxide Dismutase
		Se dependent	Non Se dependent; glutathione S-transferase B	
Enzyme structure				
Molecular weight	240,000	76,000	46,000	33,000
Subunits	4	4	2	2
Active center group	Fe ³⁺ -protoporphyrin	Selenium		Copper-zinc (cytosol) Manganese (mitochondria)
Enzyme function				
Reaction	$H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ (catalatic) $H_2O_2 + AH_2 \rightarrow 2H_2O + A$ (peroxidatic)	$ROOH + 2GSH \rightarrow ROH + H_2O + GSSG$	$2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$	
Subcellular distribution	Peroxisome, cytosol?	Cytosol, mitochondrial matrix	Cytosol, mitochondrial matrix	
Rate constants	$k_1 = 1.7 \times 10^7 M^{-1} \cdot s^{-1}$ $k'_1 = 2.6 \times 10^7 M^{-1} \cdot s^{-1}$ $k_2 = .2 - 1 \times 10^3 M^{-1} \cdot s^{-1}$	$5 \times 10^7 M^{-1} \cdot s^{-1}$	$2.4 \times 10^9 M^{-1} \cdot s^{-1}$	

Tableau 2 : Caractéristiques enzymatiques de la catalase, de la glutathion peroxydase et de la superoxyde dismutase de foie de rat. (D'après Chance *et al.*, 1979).

actif contenant un ion Cu^{++} et un Zn^{++} . Les CuZnSOD catalysent toutes la même réaction :



Réaction finale de dismutation : $\text{O}_2^{\cdot(-)} + \text{O}_2^{\cdot(-)} \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ (état triplet)

Le Cu^{2+} est indispensable à l'activité enzymatique. Il occupe le site actif et catalyse la dismutation des $\text{O}_2^{\cdot(-)}$ par une alternance de réductions/réoxydations lors des interactions successives avec les $\text{O}_2^{\cdot(-)}$ (Pryor, 1976). Les Zn^{++} ont une influence stabilisante sur l'enzyme et ces ions zinc peuvent être substitués par des Co^{2+} , Hg^{2+} tout en conservant la stabilité de l'enzyme (Fridovich, 1976).

Localisation

Dans la cellule eucaryote, tous les variants cytosoliques de la SOD sont des enzymes à cuivre-zinc. Cette forme de l'enzyme (CuZnSOD) est aussi retrouvée dans les érythrocytes et dans l'espace intermembranaire mitochondrial (Chance *et al.*, 1979).

La mitochondrie contient aussi dans son espace matriciel une enzyme à manganèse (MnSOD) semblable à celle rencontrée chez de nombreux procaryotes bactériens (Fridovich, 1974). La caractéristique commune est la présence de cations manganèse (Mn^{++}). La SOD (MnSOD) de *E. Coli* ou des mitochondries est entièrement différente de l'enzyme correspondante rencontrée dans le cytosol des cellules eucaryotes. Cette MnSOD de PM :40000 est moins stable et sa composition en acides aminés est totalement différente (Pryor, 1976). Cette ressemblance étroite entre la MnSOD des procaryotes et des mitochondries est un argument supplémentaire en faveur de la théorie endosymbiotique. On notera cependant que l'enzyme mitochondriale est tétramérique alors que la forme bactérienne est dimérique (Freeman et Crapo, 1982). Un autre type de SOD se retrouve encore chez les bactéries, la FeSOD possédant des ions fer et localisée dans l'espace périplasmique (Fridovich, 1976). Chez les eucaryotes, la localisation mitochondriale est parfaite pour s'opposer à l'action dommageable de $\text{O}_2^{\cdot(-)}$ produits par cet organe (Chance *et al.*, 1979).

L'analyse comparative des séquences d'acides aminés de nombreuses CuZnSOD chez différents eucaryotes et de leurs propriétés montre que cette enzyme est très bien conservée d'un point de vue évolutif (Lee *et al.*, 1985).

La réaction catalysée par les SOD peut se produire spontanément mais dans ce cas, la vitesse de réaction est 10^{10} fois plus faible (Rotilio *et al.*, 1972). Cette enzyme ne possède pas de constante de Michaelis-Mentem (K_m) et une

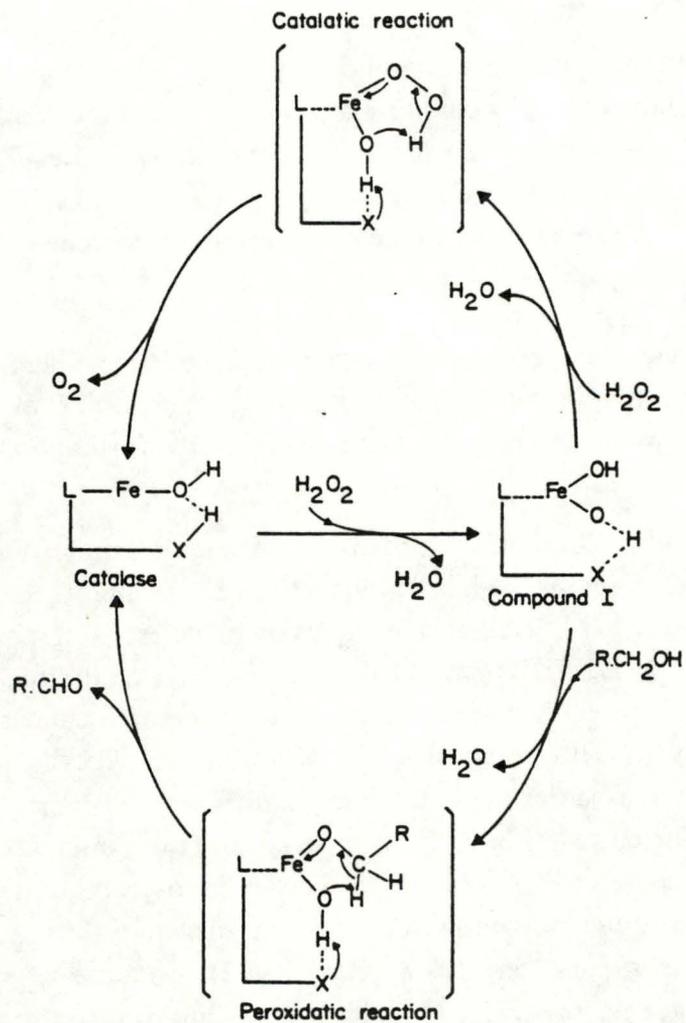


Figure 14 : Mécanismes proposés pour les réactions catalysées par la catalase.
(D'après Chance *et al.*, 1979).

augmentation de l'activité de ces enzyme répond de façon linéaire à une élévation de la concentration en substrat (Rotilio *et al.*, 1972). Une certaine forme de rétroaction négative est toutefois assurée par de trop fortes concentrations en H_2O_2 qui finissent par inactiver la SOD (Bray *et al.*, 1974).

- La catalase (CAT)

La catalase est présente en principe dans tous les types de cellules de mammifères. Cependant, on observe une grande variabilité dans les concentrations rencontrées. Le plus souvent, cette enzyme est localisée dans des organelles subcellulaires appelés peroxysomes. Dans certaines cellules, il se pourrait que la localisation soit en partie cytosolique et même mitochondriale (Chance *et al.*, 1979).

Structure

Cette enzyme de PM égal à 240.000 daltons se compose de 4 sous-unités identiques. Les sites actifs de l'enzyme occupés par un groupement protoporphyrine lié à un atome de Fe^{3+} (Chance *et al.*, 1979).

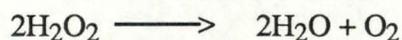
Mécanisme d'action

La catalase apparaît être la seule enzyme qui exhibe une double activité avec des caractéristiques cinétiques complètement différentes. Elle fonctionne, en effet, selon 2 modes : les modes catalasique et peroxydasique. Le substrat de cet enzyme est H_2O_2 et le type d'activité réalisé est fonction de la concentration en cette molécule. A faible concentration, la voie peroxydasique prédomine mais si la concentration en H_2O_2 est assez élevée, ce qui est souvent le cas dans les peroxysomes, c'est la voie catalasique qui prévaut (Chance *et al.*, 1979).

Les réactions chimiques de la figure 14 présentent ces deux modes.

- Action catalasique :

L'enzyme transforme le H_2O_2 en H_2O et O_2



On assimile la catalase aux antioxydants malgré cette action sur H_2O_2 . Nous savons déjà par ailleurs que dans la réaction de Fenton, ces H_2O_2 sont des précurseurs potentiels d' $\cdot OH$ et donc susceptibles de générer des radicaux libres. L'action catalasique ne requiert aucun cosubstrat autre que H_2O_2 .

- L'activité peroxydasique

Dans ce mode d'activité, l'enzyme recourt à l'utilisation d'un cosubstrat donneur d'atomes d'hydrogène.



Ce cosubstrat peut être par exemple un alcool (RCH_2OH) qui est oxydé en aldéhyde correspondant (RCHO) par réduction concomitante de H_2O_2 en H_2O (Halliwell, 1987).

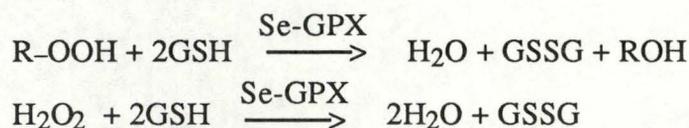
La séquence des réactions consécutives proposée pour rendre compte du mécanisme réactionnel est présentée figure 14.

Des arguments spectroscopiques et cinétiques démontrent l'existence d'un intermédiaire actif : le composé I. C'est un peroxyde ferrique engendré par la réaction de la catalase $-\text{Fe}^{3+}$ avec H_2O_2 . Cet intermédiaire a un temps de demi-vie très court et est commun aux deux modes de réactions (Chance *et al.*, 1979). L' O_2 qui est libéré est l'oxygène moléculaire dans son état triplet. Seul 0,5% de la quantité totale est sous forme d' O_2 singulet (Pryor, 1976). De nouveau, la catalase n'a pas de K_m et son activité augmente de façon linéaire avec la concentration en H_2O_2 . Cette propriété permet à cette enzyme d'assurer l'homéostasie des taux de ce peroxyde intracellulaire (Flohé, 1982).

- La glutathion peroxydase (GPX)

Il est aujourd'hui bien établi que la glutathion peroxydase (ou Se-GPX) est une enzyme à sélénium intracellulaire présente dans la plupart des tissus de mammifères.

Cette enzyme catalyse la réduction par le glutathion (GSH) de tous les hydroperoxydes produits dans le cytosol et la matrice mitochondriale, depuis le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) jusqu'aux hydroperoxydes d'acides gras selon la réaction : (Chance *et al.*, 1979)



La distribution intracellulaire de la GPX au sélénium est identique à celle de la SOD puisqu'elle se retrouve dans le cytoplasme et dans les mitochondries.

Structure et mécanisme catalytique

L'enzyme est un homotétramère dont le poids moléculaire est voisin de 85.000 daltons (Flohé, 1982). Chaque sous unité comporte un atome de sélénium au site actif, sous la forme d'un résidu séléncystéine incorporé dans la chaîne

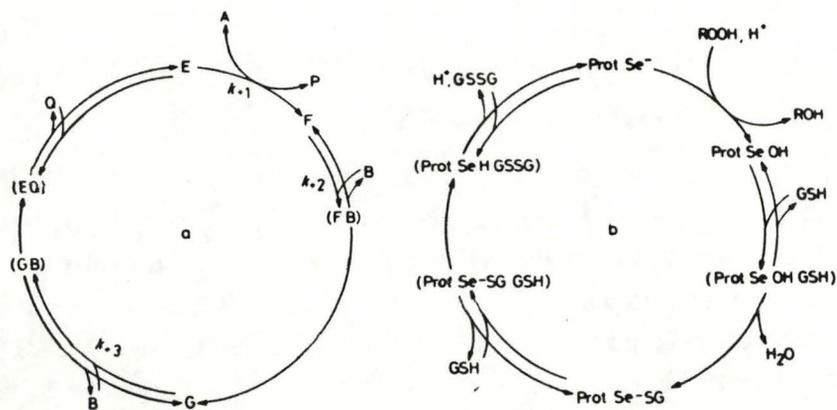


Fig. 4. Current view of the reaction mechanism of GSH peroxidase. Figure 4a represents a formal description of the reaction sequence as derived from kinetic measurement. A, B, and P, Q are substrates and products, respectively. E, F, and G stand for different enzyme forms, while the expressions in brackets represent enzyme-substrate or enzyme-product complexes; k_{+1} , k_{+2} , and k_{+3} are the rate constants determining the rate equation [Eq. (7)]. Figure 4b attempts to correlate knowledge of enzyme chemistry with functional studies. Kinetic entities E, F, and G correspond to three different redox states of the enzyme-bound selenium: a selenol, a selenenic acid derivative, and a seleno sulfide formed between the enzyme and GSH, respectively.

Figure 15 : Séquence des réactions impliquées dans le cycle catalytique de la glutathion peroxydase (GPX). (D'après Flohé, 1982).

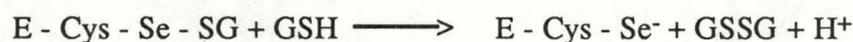
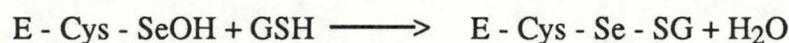
polypeptidique de manière cotraductionnelle. L'atome de sélénium se trouve ainsi au centre d'une poche hydrophobe très accessible au substrat.

Le mécanisme réactionnel est de type ping-pong et correspond à un cycle catalytique comportant trois étapes irréversibles (Flohé *et al.*, 1972). Il est admis que l'atome de sélénium est le siège de réactions rédox au cours du cycle catalytique (figure 15) (Chaudière and Tappel, 1983).

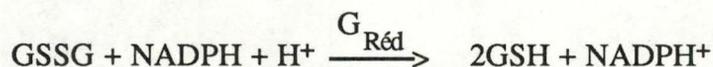
Première étape : le substrat est réduit par un groupement séléinol du site actif de l'enzyme pour former directement un intermédiaire sélénosulfure intramoléculaire entre cystéine et sélénocystéine.



Deuxième étape : l'incorporation des deux GSH avec la libération subséquente de GSSG et un groupement séléinol à nouveau libre pour entamer un nouveau cycle.



La régénération du glutathion est catalysée grâce à l'intervention de la glutathion réductase qui oxyde le NADPH, produit par le shunt des hexoses monophosphates. Ceci permet de maintenir un rapport GSH/GSSG élevé dans les cellules normales :



On comprend pourquoi la Se-GPX, du fait de son activité sur H₂O₂ et sur les hydroperoxydes lipidiques, contribue à limiter d'une part la production de radicaux hydroxyles ·OH (Beloqui and Cederbaun, 1986) et d'autre part l'efficacité des réactions d'oxydation en chaînes dans les membranes (Flohé, 1982). En fait, la GPX n'agit qu'après hydrolyse par la phospholipase A₂ des acides gras peroxydés.

Son rôle protecteur, dans des situations où la production de peroxydes augmente, est confirmé par des modèles d'injection intracellulaire permettant de prolonger la survie de fibroblastes placés en hyperoxie ou intoxiqués par des générateurs de radicaux libres (Michiels and Remacle, 1985).

La Se-GPX protège également les cellules endothéliales vasculaires et pulmonaires contre H₂O₂ d'origine extracellulaire (Horion *et al.*, 1984).

Après ce survol des protections enzymatiques, on peut s'apercevoir que ces enzymes n'agissent pas indépendamment l'une de l'autre. Bien qu'elles soient

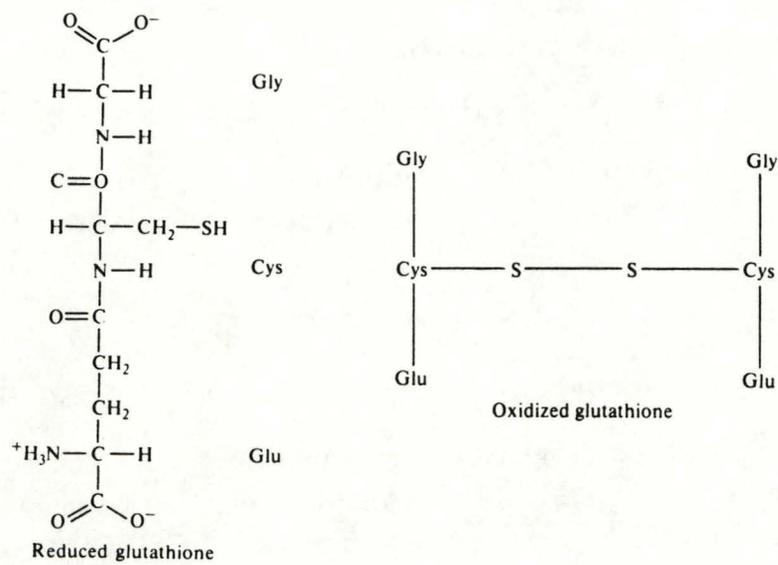


Figure 16 : Structure de la molécule de glutathion. Le tripeptide sous forme réduite est abrégée GSH (d'après Halliwell and Gutteridge, 1985).

localisées dans des compartiments cellulaires différents, elles entretiennent une coopération enzymatique qui vise à protéger au maximum tous les constituants cellulaires. Un aperçu des relations étroites entre ces différentes enzymes est présenté à la figure 13.

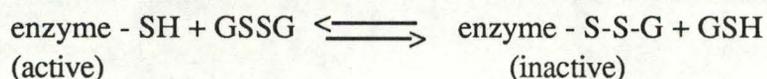
A côté des défenses enzymatiques, on rencontre des antioxydants de faible poids moléculaire capables de protéger la cellule contre les effets toxiques des radicaux libres.

2) *Protections non enzymatiques*

Nous ne nous intéresserons dans ce paragraphe qu'aux molécules les plus importantes rencontrées naturellement dans la cellule. D'autres synthétiques utilisées dans le travail expérimental seront décrites dans la partie "Résultats".

- Le glutathion (GSH)

Le rôle du GSH est de servir de cosubstrat à la GPX pour l'élimination des peroxydes ROOH et H₂O₂. Il sert également de substrat à d'autres enzymes comme la glutathion S-transférase. En plus, le glutathion est par lui-même un scavenger des radicaux hydroxyls et de l'oxygène singulet. Cette molécule est un tripeptide formé d'acide glutamique-cystéine-glycine (figure 16). Le GSH étant présent en concentrations assez élevées (1 à 10 mM) dans la plupart des cellules, peut également réactiver certaines enzymes inhibées par l'exposition à de fortes concentrations en O₂. L'inactivation de ces enzymes est lié à l'oxydation de groupements SH du site actif qui sont régénérées lors de l'incubation avec du GSH. Le produit d'oxydation des fonctions thiols de 2 GSH engendre la formation d'un pont disulfure intermoléculaire conduisant à l'accumulation de GSSG. La régénération du GSH se fait via la glutathion réductase. Lorsqu'une cellule est exposée à un flux intense de H₂O₂ ou d'OH, elle est incapable de maintenir son rapport GSH/GSSH dans des valeurs normales. Le GSSG s'accumule et peut alors inhiber bon nombre d'enzymes telles que l'adenylate cyclase et la phosphofructokinase (Halliwell and Gutteridge, 1985).



La cause de cette élévation en GSSG est la déplétion en NADPH nécessaire à la réduction de cette molécule pendant un stress radicalaire imposé à la cellule (Chance and Boveries, 1980). Le rapport GSH/GSSG détermine donc en partie l'état rédox de la cellule et se répercute sur l'ensemble du métabolisme cellulaire (Chance *et al.*, 1979).

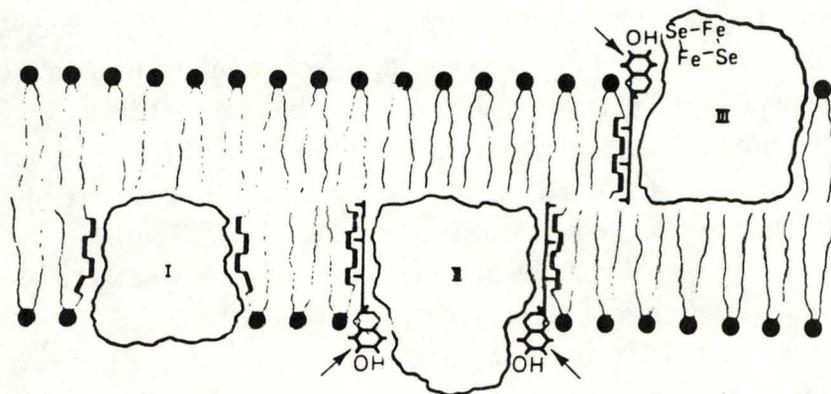


Figure 17 : Localisation intramembranaire de l' α -tocophérol (d'après Molenaar *et al.*, 1980).

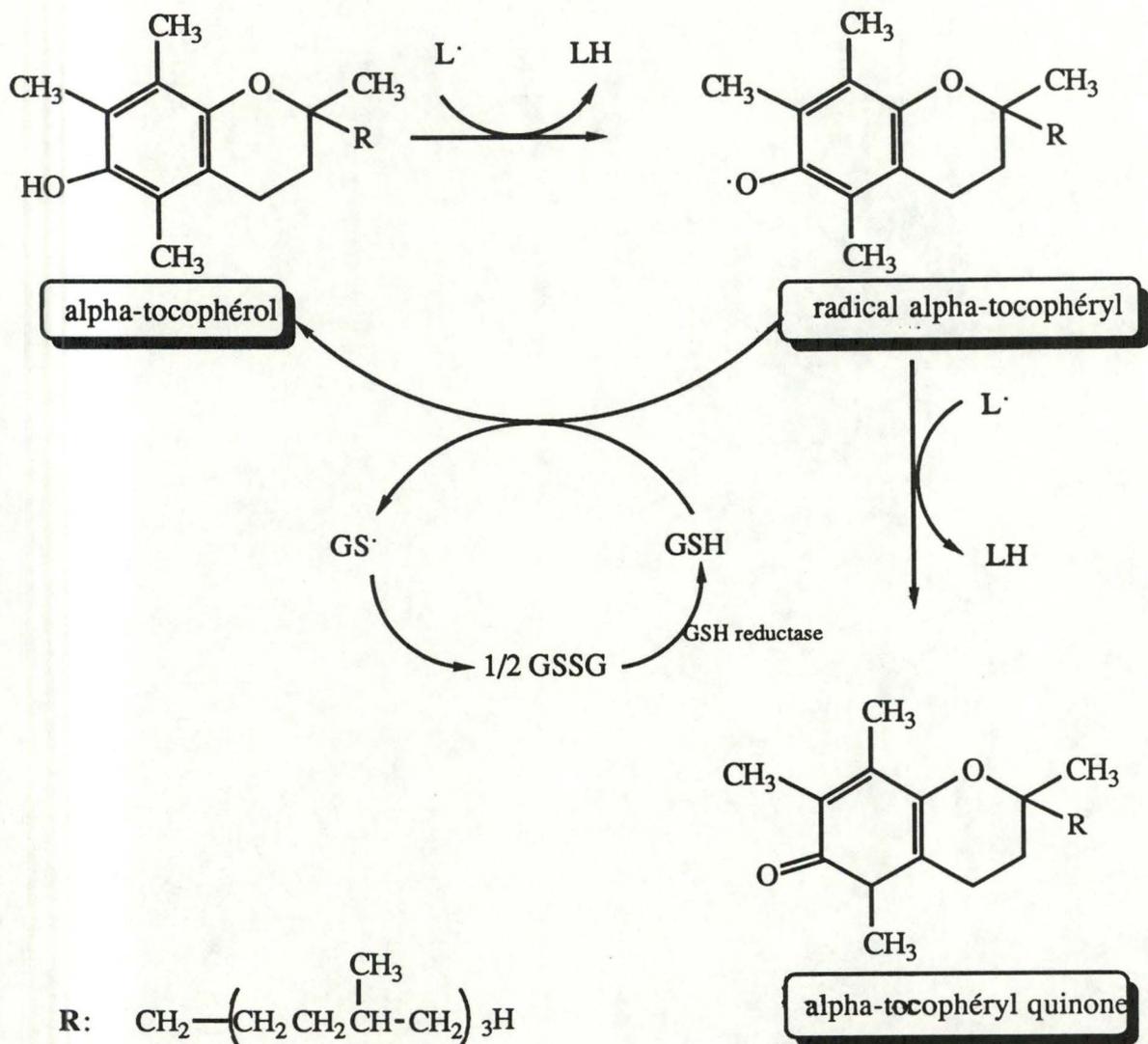


Figure 18 : Mode d'action de l' α -tocophérol en tant qu'antioxydant.

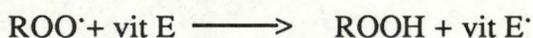
- La vitamine E

Encore connue sous le nom d' α -tocophérol, la vitamine E fait partie des vitamines essentielles que les animaux puisent dans l'alimentation. La vitamine E est une molécule liposoluble.

Etant fortement hydrophobe, elle se concentre à l'intérieur des membranes biologiques (voir figure 17). A titre d'exemple, les membranes mitochondriales contiennent une molécule d' α -tocophérol pour environ 2100 molécules de phospholipides. L' α -tocophérol se concentre également dans les lipoprotéines du sang où elle prévient leur peroxydation (Halliwell and Gutteridge, 1985).

La vitamine E est capable de réduire $O_2^{\cdot(-)}$, $\cdot OH$, l'oxygène singulet et d'autres espèces radicalaires (Nishikini *et al.*, 1980; Ozawa *et al.*, 1978).

Sa fonction la plus spectaculaire est d'agir comme un agent protecteur contre la peroxydation lipidique *in vivo*. Cette importance membranaire est liée au fait que la vitamine E peut réagir en donnant un atome d'hydrogène à un radical lipidique peroxy pour former un dérivé radicalaire de la vitamine E trop peu réactionnel que pour entraîner l'abstraction de H^{\cdot} des lipides voisins. Elle interrompt donc la chaîne de réactions de propagation en se comportant comme un terminateur. Le radical vit E produit est très stable en raison de la délocalisation possible sur toute la structure aromatique cyclique de l'électron non apparié porté par l'atome d'oxygène (figure 18) (Halliwell and Gutteridge, 1985).



La vit E agit en complémentarité de la GPX. En effet, l' α -tocophérol donnant un atome d'hydrogène à un radical peroxy forme un hydroperoxyde qui sera métabolisé par la GPX.

In vitro, des réactions secondaires se produisent à partir du radical vit E (Pryor, 1976).

- La vit E radicalaire subit une ouverture de son cycle et peut devenir elle aussi un peroxyde lipidique. Dans ce cas, la vit E n'a plus de fonction antioxydante.

- Si elle donne un second hydrogène à un autre radical peroxy voisin, chaque molécule de vit E élimine ainsi deux peroxy.

In vivo, le radical tocophéryl (après perte d'un H^{\cdot}) peut être réduit par du GSH. Cette réduction de la vit E par le GSH s'effectue via la vitamine C dans le voisinage immédiat des membranes (Willson, 1987). Ceci peut expliquer que la vitamine E est un antioxydant puissant s'opposant à la peroxydation lipidique.

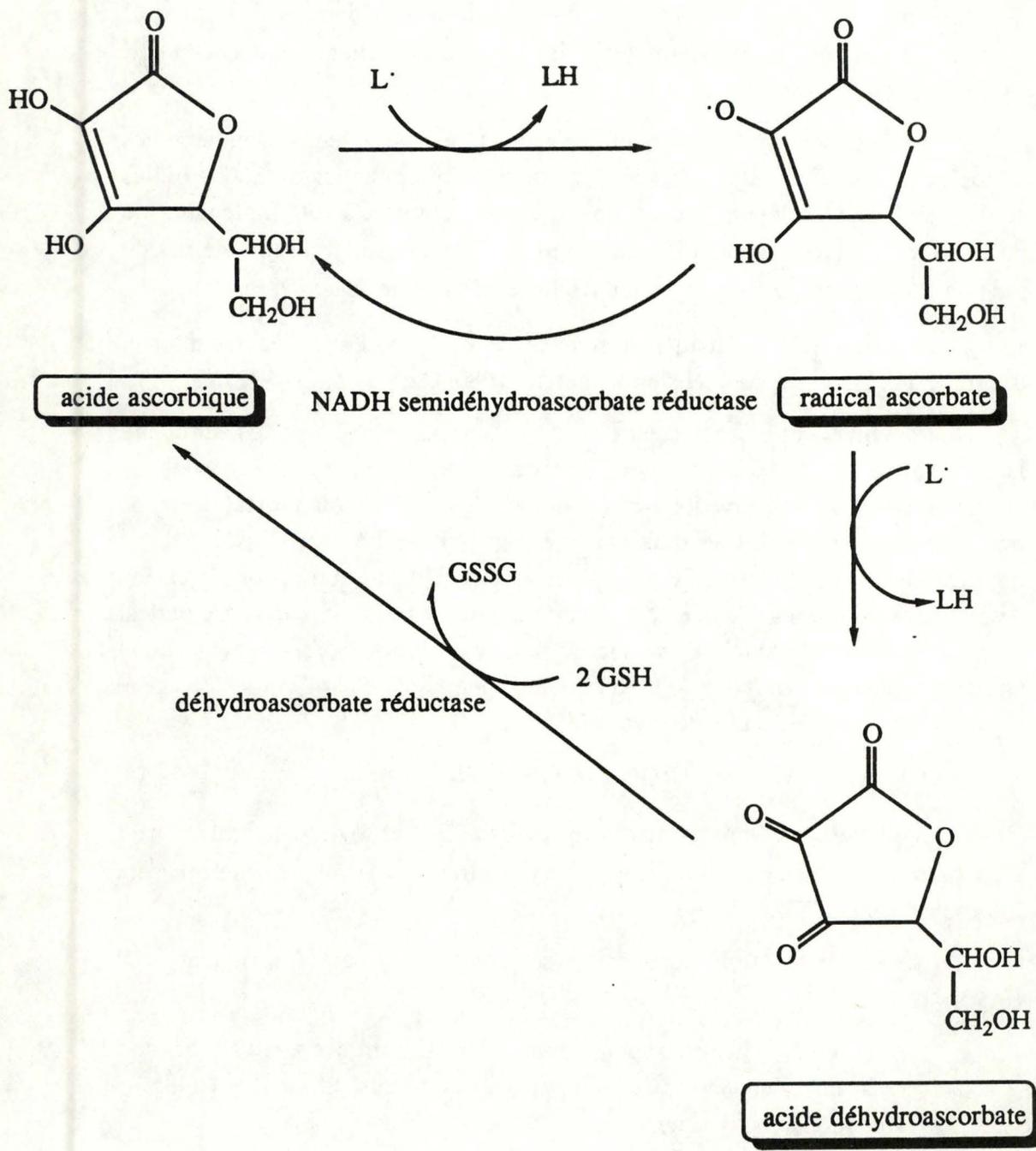


Figure 19 : Mode d'action de l'acide ascorbique en tant qu'antioxydant.

C'est grâce au groupement OH porté par le cycle chromanol que la vit E est active. Une estérification de ce groupement qui empêche la réaction avec les radicaux peroxydes atténue très fort l'efficacité de protection. Sa chaîne phytyl à caractère hydrophobe lui permet de s'ancrer dans les membranes (Halliwell and Gutteridge, 1985). L'organisation structurale de cette molécule et de son environnement lipidique pourrait être une contribution à son action. Des arguments expérimentaux sur cellules en culture montrent que la présence de vit E affecte le type d'acide gras incorporés dans les membranes (Halliwell and Gutteridge, 1985).

- La vitamine C ou acide ascorbique

L'acide ascorbique est une vitamine hydrosoluble. Les plantes et la plupart des animaux peuvent le synthétiser à partir du glucose mais l'homme et les autres primates ne possèdent pas les enzymes nécessaires à son élaboration. Ce qui impose que l'acide ascorbique tout comme l' α -tocophérol soit présent dans notre alimentation et fasse partie des vitamines essentielles.

L'acide ascorbique est utilisé *in vivo* comme cofacteur pour les proline hydroxylases et lysine hydroxylases. Ces deux enzymes sont impliquées dans la biosynthèse du collagène. La vitamine C est aussi indispensable à la conversion de la dopamine en noradrénaline par la dopamine β hydroxylase. Elle est aussi connue sous le nom de facteur anti-scorbutique car sa carence se manifeste par l'apparition du scorbut (Halliwell and Gutteridge, 1985).

Ce qui nous intéresse plus particulièrement, c'est l'acide ascorbique en tant qu'agent antioxydant. Cet agent réducteur est nécessaire au maintien des ions métalliques sous forme réduite dans les sites actifs enzymatiques des hydroxylases. On lui attribue aussi la capacité de réduire les radicaux organiques hydrosolubles directement ou indirectement via la réduction des radicaux α -tocophéryles.

Cependant, la vitamine C peut se révéler être toxique à trop forte concentration : en effet, l'autooxydation de l'acide ascorbique en présence d'ions de certains métaux de transition (cuivre) peut former une molécule pro-oxydante agissant comme un radical et générant des $O_2^{\cdot(-)}$.

Acide ascorbique (AH^{\cdot}) + O_2 \longrightarrow Radical ascorbate ($A^{\cdot(-)}$) + $O_2^{\cdot(-)}$ + H^+
(Bendich *et al.*, 1986).

L'acide ascorbique est donc capable de donner un électron formant ainsi le radical semidéhydroascorbate qui pourra être oxydé davantage et donner le déhydroascorbate (figure 19). Les radicaux semidéhydroascorbates ne sont pas particulièrement réactionnels mais peuvent se recombinaison en présence de protons pour donner :

2 semidéhydroascorbates \longrightarrow ascorbate + déhydroascorbate

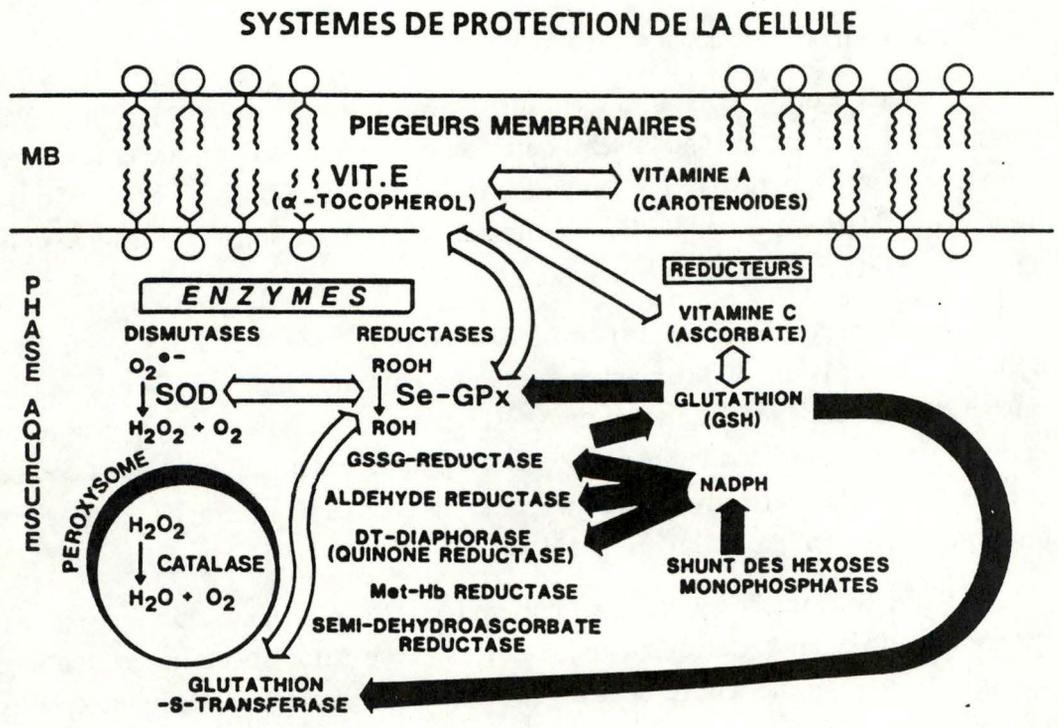


Figure 20 : Présentation des systèmes de protection de la cellule précisant leur localisation et leurs interrelations (d'après Chaudière, 1987).

Le déhydroascorbate est instable et se fragmente en acide oxalique et L-acide thréonique (Halliwell and Gutteridge, 1985).

Son action antioxydante vient du fait que cette oxydation réversible de la vitamine C peut se produire de façon concomitante à la réduction d'un radical peroxy. La vitamine C est également capable d'éliminer l'oxygène singulet et de réagir rapidement avec $O_2^{\cdot(-)}$ et $\cdot OH$ formant le radical semidéhydroascorbate.

Régénération de la vitamine C *in vivo* :

Pour se protéger des effets néfastes des produits du catabolisme du déhydroascorbate, les animaux et les plantes ont élaboré des mécanismes enzymatiques permettant de convertir les formes oxydées de l'acide ascorbique en formes réduites.

- la déhydroascorbate réductase qui catalyse la réaction suivante :



- les animaux possèdent également une NADPH semidéhydroascorbate réductase. Cette enzyme réduit le radical semidéhydroascorbate en acide ascorbique par l'oxydation du NADH en NAD^+ (Halliwell and Gutteridge, 1985).

De nombreux travaux rapportent que la vitamine C protège les cellules et des organes contre l'effet des oxydants. Une concentration élevée est d'ailleurs rencontrée dans les polymorphonuléaires neutrophiles, les macrophages et les mastocytes. Elle pourrait protéger ces cellules d'une autodestruction par les molécules radicalaires qu'elles produisent (Bendich *et al.*, 1986).

On peut donc conclure cette partie de l'introduction en constatant que les agressions radicalaires sont multiples mais que nous ne sommes pas démunis face à ces attaques. Une grande panoplie de protections existent et sont mises à la disposition de la cellule pour éviter au maximum les effets toxiques dus aux radicaux dérivés de l'oxygène moléculaire.

Le schéma récapitulatif (figure 20) est une représentation simplifiée de ces systèmes de protection. Il nous montre les effets de synergie et de protection mutuelle (traits vides) mais aussi les contraintes métaboliques ou de compartimentation (Chaudière, 1987).

Cependant, si l'organisme est apte à se défendre face aux radicaux libres dans des conditions physiologiques normales, il n'en va plus de même face à des conditions pathologiques dans lesquelles une production excessive de radicaux libres risque de déséquilibrer la balance existante entre les sources et les défenses. Cette surproduction peut dépasser les capacités de défenses cellulaires et

s'accompagne souvent d'une diminution de celles-ci par inactivation des enzymes protectrices. Ce système en déséquilibre laisse alors le terrain aux attaques radicalaires entraînant des perturbations dans le métabolisme, voire même la mort de la cellule.

De nombreux exemples impliquant ces poussées radicalaires sont connus. Même si les radicaux ne sont pas les seuls responsables, ils jouent souvent un rôle déterminant dans les dommages encourus : on peut penser à l'inflammation (bénéfique quand elle est contrôlée), aux pollutions atmosphériques, aux xénobiotiques provoquant des problèmes pulmonaires et hépatiques, mais surtout et c'est le cadre qui nous occupe, aux lésions qui résultent de l'ischémie (arrêt de la circulation sanguine dans un organe) et de la reperfusion (reprise de la circulation dans cet organe).

Il est temps d'aborder la seconde partie de cette introduction comportant les caractéristiques principales des cellules endothéliales (matériel sur lequel nous avons travaillé), le développement du phénomène ischémie-reperfusion (I/R) *in vivo* et son approche *in vitro*. Nous profiterons de ce dernier point pour présenter notre travail expérimental.

B. Les cellules endothéliales

(1) Principales caractéristiques de la cellule endothéliale

a) L'endothélium en tant que tissu

L'endothélium vasculaire est l'épithélium simple le plus répandu de tout l'organisme. Formé d'une assise unicellulaire pavimenteuse, il tapisse intérieurement les systèmes circulatoires sanguin et lymphatique.

Sa localisation à l'interface entre le sang circulant d'une part, la paroi vasculaire et les tissus interstitiels voisins d'autre part, implique des propriétés et des fonctions spécialisées.

Il y a au moins deux fonctions vitales de la "barrière endothéliale" qui sont directement liées à sa continuité : la perméabilité sélective aux macromolécules et la propriété de thromborésistance, c'est-à-dire sa non réactivité à l'état normal avec les plaquettes sanguines et les facteurs de coagulation (Thorgeirsson, 1983).

La mesure de sa surface totale chez l'homme adulte représente plusieurs centaines de mètres carrés, tandis que son épaisseur de quelques micromètres le rend bien adapté aux échanges de molécules (Cryer, 1983).

Par ailleurs, l'organisation de l'endothélium en une vaste monocouche sert à amplifier son impact en tant que tissu métaboliquement actif. Les substances synthétisées et sécrétées par les cellules endothéliales peuvent avoir des effets locaux ou systémiques. Les cellules endothéliales élaborent, entre autres, des glycoprotéines, des glycosaminoglycans, plusieurs types de collagène et participent aussi au métabolisme lipidique par fixation membranaire de la lipoprotéine lipase.

Vu ces nombreux rôles, on comprend aisément que des altérations dans la structure et/ou les fonctions de la barrière endothéliale contribuent à la genèse de processus pathologiques (Thorgeirsson, 1983).

Enfin, bien que les cellules endothéliales d'un même lit vasculaire se ressemblent morphologiquement, on distingue des différences régionales. En ultrastructure, on peut observer trois types fondamentaux d'endothélium : l'endothélium continu des artères, veines et capillaires musculaires, l'endothélium discontinu et l'endothélium fenestré, caractéristique des capillaires viscéraux (Genitsen, 1987).

A l'intérieur de ces catégories, on pourra noter des variations cytologiques dans le nombre et/ou la distribution des vésicules de pinocytose, des organites cytoplasmiques, des éléments du cytosquelette. D'autres différences existent aussi selon le type de vaisseau où l'on observe les cellules (veines, artères ou capillaires), que ce soit par exemple au niveau du métabolisme de l'acide arachidonique (Hall *et al.*, 1987), de la synthèse de peptides vasoactifs, de l'importance des récepteurs hormonaux ou des protections enzymatiques antioxydantes (Housset et Junod, 1982).

Quant à l'identification des cellules en culture, les cellules endothéliales possèdent certaines caractéristiques structurelles et fonctionnelles qui permettent de les distinguer des autres types de cellules dérivés de la paroi vasculaire à savoir les fibroblastes et les cellules musculaires lisses (Thorgeirsson, 1983). L'endothélium est séparé des tissus sous-jacents par une membrane basale (Juncqueira and Carneiro, 1987).

b) La cellule endothéliale

Les cellules endothéliales **en culture** prennent un aspect polygonal. Elles sont aplaties et possèdent un noyau ovoïde avec deux ou trois nucléoles. En plus des éléments qui se retrouvent dans le cytoplasme d'autres types cellulaires (nombreuses mitochondries, saccules de réticulum endoplasmique lisse et rugueux, d'un appareil de Golgi important...) et qui indiquent une activité métabolique intense, les cellules endothéliales contiennent des inclusions spécifiques : les corps de Weibel-Palade. Ces granules ovoïdes (0,1 x 3 μm), limités par une membrane, sont constitués de faisceaux parallèles de structures tubulaires d'un diamètre de 15 nm.

On retrouve ces corps de Weibel-Palade dans des cellules mises en culture, même après un nombre élevé de générations (Haudenschield, 1984). Ils sont localisés en périphérie du cytoplasme ou à proximité du Golgi (Jaffe *et al.*, 1984). On possède peu d'informations sur le rôle de ces granules, cependant on a montré le stockage de la protéine de Van Willebrand au niveau des corps de Weibel-Palade. La synthèse du facteur VIII de la coagulation (ou de Van Willebrand) est également une propriété spécifique des cellules endothéliales. Les techniques d'immofluorescence ont permis de localiser le facteur VIII uniquement dans l'endothélium des vaisseaux.

Donc, la recherche de cette protéine en immunofluorescence est une manière facile d'identifier les cellules endothéliales en culture.

La distribution de ce facteur VIII est granulaire et cytoplasmique. L'incorporation dans cette protéine d'acides aminés radioactifs a fourni la preuve de sa synthèse par la cellule endothéliale (Jaffe *et al.*, 1973).

Le facteur VIII est un complexe glycoprotéique du plasma (P.M. : 12.10⁶).

Il possède trois propriétés constitutionnelles :

- le facteur VIII anti-hémophilique (VIII_{AHF}) qui intervient dans la coagulation sanguine
- le facteur de Van Willebrand (VIII_{VWF}) qui participe à l'adhésion des plaquettes au collagène du sub-endothélium
- l'antigène du facteur VIII (VIII_{Ag}).

L'action anti-hémophilique dépend de la séquence des acides aminés dans la chaîne peptidique tandis que l'adhésion au collagène dépend de la glycosylation. Les cellules endothéliales en culture produisent l'antigène du facteur VIII et le facteur de Van Willebrand. L'activité anti-hémophilique n'est pas détectée dans les milieux de post-culture (Jaffe *et al.*, 1987).

Les dimensions et la forme des cellules sont assez variables suivant leur localisation dans le système vasculaire (Thorgeirsson, 1983).

Une propriété particulière est que les caractéristiques de la structure *in vivo* des cellules de l'endothélium tant humain que bovin sont conservées *in vitro* (Jaffe *et al.*, 1973). Donc, une observation morphologique en microscopie s'impose pour confirmer l'identification de ces cellules (Jaffe, 1984).

Mode de croissance

La croissance des cellules endothéliales *in vitro* prélevées à partir de la veine ombilicale se fait selon un modèle très régulier. Elles prolifèrent en une monocouche de cellules polygonales étroitement accolées. Arrivées à confluence, les cellules endothéliales ne répondent plus aux facteurs de croissance du sérum, elles arrêtent leur divisions, c'est ce que l'on appelle l'inhibition de contact (Haudenschild *et al.*, 1984).

Rem. : La confluence correspond à la rencontre des divers amas cellulaires d'une même boîte (voir photos : "Résultats").

Les cellules endothéliales produisent un matériel extracellulaire composé principalement de collagène et assimilé à une membrane basale. Elles sont intimement liées à cette matrice qui les entoure, à laquelle elles sont attachées et sur laquelle elles migrent et prolifèrent (Jaffe, 1984).

De nombreuses études sur les capacités de prolifération et le vieillissement des cellules endothéliales ont montré qu'elles avaient une durée de vie limitée et que l'on observait assez rapidement un processus de différenciation faisant perdre une grande partie des caractéristiques propres à ces cellules (Thorgeirsson, 1983).

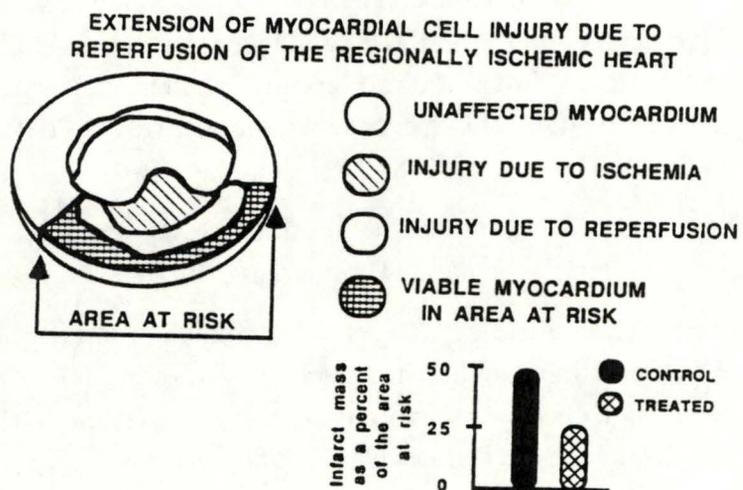


Figure 21 : Extension des lésions tissulaires accompagnant la reperfusion dans une région préalablement ischémiée, représentée ici par un coeur (d'après Simpson and Lucchesi, 1987).

Cependant, bien que les cellules endothéliales vieillissent beaucoup moins régulièrement que les fibroblastes, elles possèdent néanmoins un marqueur spécifique permettant de les identifier tout au long de leur vie en culture. En effet, l'antigène du facteur VIII de la coagulation est exprimé pendant toute la durée de la culture (Rosen *et al.*, 1981).

Deux modifications importantes sont toutefois observées au cours du vieillissement. Elles consistent en une augmentation de la surface d'attachement au substrat qui apparaît en même temps que la diminution des capacités prolifératives de la culture (Rosen *et al.*, 1981).

(2) Ischémie - Reperfusion

a) *In vivo*

Les nombreux processus pathologiques induits par l'ischémie sont la principale cause de mort dans nos pays. L'ischémie cardiaque et cérébrale apportent toutes deux une contribution importante dans la mortalité et la morbidité (Mc Cord, 1985).

L'interruption temporaire de la circulation sanguine dans un tissu provoque d'importants dommages cellulaires. Il est confirmé que la nécrose observée pendant la période d'ischémie est causée par une déplétion en ATP. Ces effets délétaires sont cependant exacerbés lors de la reprise du flot sanguin dans ce tissu. La reperfusion provoque donc elle aussi des altérations cellulaires dans un territoire préalablement ischémié (Fridovich, 1979).

1) *La reperfusion injury (paradoxe de l'oxygène)*

Alors qu'on pourrait s'attendre à ce que la réadmission de O₂ minimise les effets de l'hypoxie en permettant la récupération d'énergie dans la chaîne respiratoire, on constate que la réintroduction soudaine de l'oxygène s'accompagne de perturbations dans l'intégrité cellulaire. Ces modifications se traduisent dans un coeur isolé et perfusé, par une diminution de la capacité contractile (paramètre physiologique), par une libération plus importante d'enzymes intracellulaires comme la lactate déshydrogénase attestant une augmentation de la perméabilité membranaire (paramètre biochimique) ou encore par l'estimation de l'étendue de la nécrose cellulaire en microscopie électronique (paramètre morphologique). Cette nécrose cellulaire est observée dans des territoires encore viables après l'ischémie (figure 21) (Hearse *et al.*, 1978).

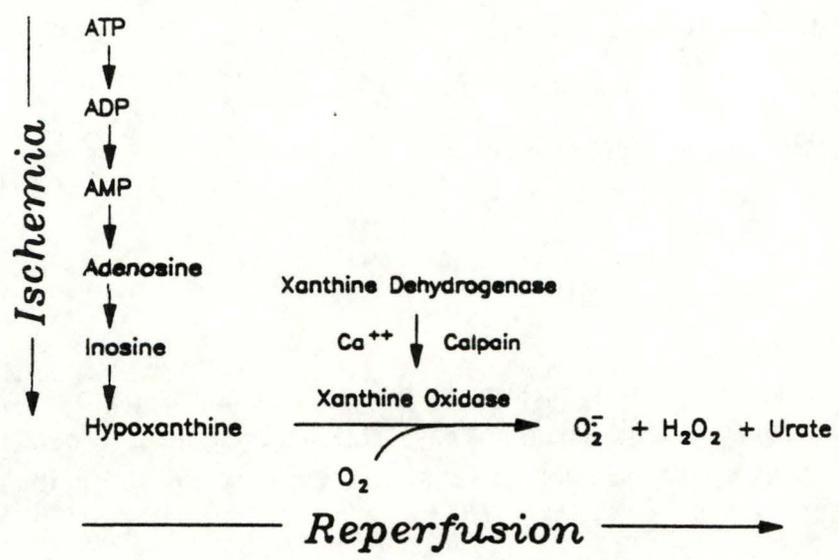


Figure 22 : Mécanisme proposé pour la génération de radicaux superoxydes pendant la reperfusion (d'après Mc Cord, 1985).

Une définition simplifiée de la reperfusion injury fait référence aux lésions cellulaires irréversibles (nécrose) qui surviennent au moment de la reperfusion, réintroduisant l'O₂ (Simpson and Lucchesi, 1987). Ce phénomène apparaît complexe et plurifactoriel: bien que plusieurs mécanismes possibles ont été suggérés pour en rendre compte comme la déplétion en ATP (Jennings *et al.*, 1978), une accumulation de calcium intracellulaire (Katz and Reuter, 1979; Nayler, 1981; Shen and Jennings, 1972) ou l'activation de phospholipases (Weglicki *et al.*, 1972), les radicaux libres dérivés de l'O₂ jouent vraisemblablement un rôle important dans les lésions tissulaires se produisant lors de la reperfusion suivant une ischémie (Rubanyi, 1988).

Des évidences directes et indirectes concernant l'importante place occupée par les radicaux libres sont apportées par de nombreuses études. Les arguments indirects sont ceux qui font appel à des agents qui interagissent avec ces espèces réactionnelles (SOD, CAT,...) ou des agents qui empêchent la production d'espèces radicalaires (allopurinol, desferrioxamine). De tels composés réduisent l'étendue de la destruction tissulaire du myocarde en ischémie-reperfusion (Simpson and Lucchesi, 1987). Des mesures qualitatives et quantitatives directes en E.S.R. (electron spin resonance) ont démontré une augmentation très importante de la production radicalaire lors de la reperfusion (Zweir *et al.*, 1986). La reperfusion injury est donc principalement le résultat de la génération excessive de radicaux libres cytotoxiques intra et extracellulaires (Tamura *et al.*, 1988).

2) *Les sources potentielles de radicaux superoxydes dans les tissus post-ischémiés sont :*

— La xanthine oxydase (X.O)

Rappelons que la forme native de l'enzyme *in vivo* est une déshydrogénase qui ne réduit donc pas l'oxygène moléculaire (donc incapable de générer des O₂^{·(-)}). Un tissu sain ne contient approximativement que 10% de l'activité enzymatique totale sous la forme d'oxydase (Roy and Mc Cord, 1983; Parks and Granger, 1983).

Les événements assurant la conversion de l'activité déshydrogénase en oxydase et la production d'O₂^{·(-)} sont les suivants : (figure 22)

Le processus commence avec la diminution de l'apport sanguin dans le tissu qui limite la quantité d'O₂ disponible nécessaire à la production d'ATP. La charge énergétique cellulaire diminue (déplétion en ATP) et la cellule devient incapable de maintenir les gradients ioniques de part et d'autre des membranes (en raison d'une diminution de l'efficacité des pompes ATP-dépendantes) ce qui conduit à une redistribution des ions calcium. L'élévation de la concentration cytosolique en

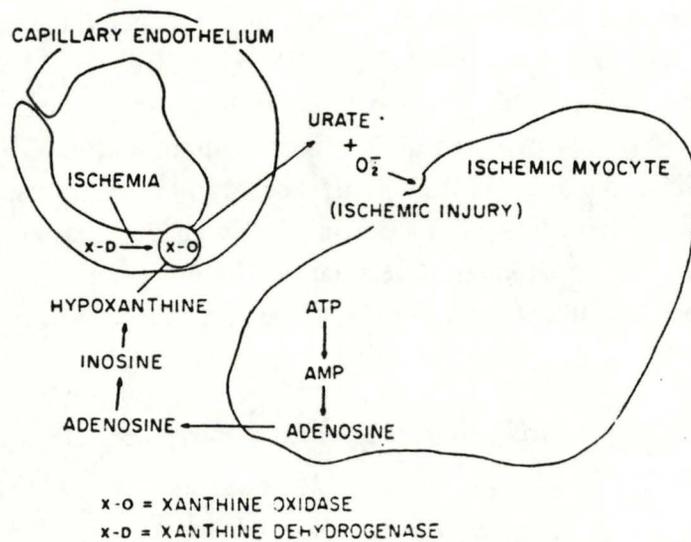


Figure 23 : La xanthine oxydase des capillaires du myocarde génère des radicaux superoxydes susceptibles d'altérer les myocytes lors de l'ischémie-reperfusion (d'après Hearse *et al.*, 1986).

calcium activerait une protéase (la calpaïne) capable de convertir la déshydrogénase en oxydase par une protéolyse limitée. Simultanément à cette transformation, la déplétion en ATP se traduit par une augmentation de la concentration en AMP. Cet AMP est alors catabolisé en adénosine, inosine et en hypoxanthine (Mc Cord, 1985). Donc l'ischémie induit deux changements importants au sein du tissu :

- L'apparition d'une nouvelle activité enzymatique et l'accumulation de son substrat. La vitesse de cette conversion est spécifique au tissu (Roy and Mc Cord, 1983). L'oxydation ultérieure de l'hypoxanthine en xanthine puis en acide urique par la X.O nécessite de l'O₂ comme accepteur d'électrons fournit lors de la reperfusion. Cette réaction s'accompagne d'une explosion de la production des O₂⁽⁻⁾ et H₂O₂ (Mc Cord, 1985; Granger *et al.*, 1981).

Bien que la xanthine oxydase soit largement distribuée dans les tissus : l'intestin, les poumons et le foie en sont particulièrement riches dans la plupart des espèces, les myocytes humains ne contiennent pas cette enzyme (Mc Cord, 1985). L'activité xanthine oxydasique du myocarde humain est exclusivement confinée à l'endothélium des capillaires vasculaires (figure 23) (Downey *et al.*, 1986; Khalidi and Chaglassian, 1965).

En plus de leur production par la xanthine oxydase, les espèces réactionnelles dérivées de l'O₂ pourraient être générées par d'autres systèmes tels que les neutrophiles activés, les ions métalliques et les mitochondries (Halliwell and Gutteridge, 1985).

Le choc hémorragique peut être perçu comme une ischémie généralisée. Tous les tissus sont insuffisamment perfusés pendant toute la durée du choc. Les taux d'ATP chutent considérablement conduisant à une élévation du taux d'hypoxanthine plasmatique. Le retour à un volume sanguin satisfaisant restaure la perfusion et l'oxygénation qui conduit inévitablement à la formation de radicaux libres (Jones *et al.*, 1968).

- Interface ischémie-inflammation

Nous avons vu que les leucocytes activés possédaient une NADPH oxydase dans la membrane plasmique qui réduit l'O₂ en O₂⁽⁻⁾ avec oxydation concomitante du NADPH cytosolique (Babior, 1978). C'est en 1980 que l'on découvre que les O₂⁽⁻⁾ produits lors de la reperfusion serviraient à activer un facteur chémoattractif latent présent dans les fluides extracellulaires. Sous l'action de ce facteur, et d'autres comme le C₅^a un recrutement important de neutrophiles activés s'observe dans la zone ischémisée lors de la reperfusion qui accélère le taux d'infiltration cellulaire dans le myocarde ischémié (Mullane *et al.*, 1985). Ce chémoattractant dépendant de l'anion superoxyde est un composé lipidique lié de façon covalente à l'albumine sérique (Petroni *et al.*, 1980). Un autre aspect de la reperfusion injury est donc une amplification de la production d'O₂⁽⁻⁾ par les neutrophiles recrutés.

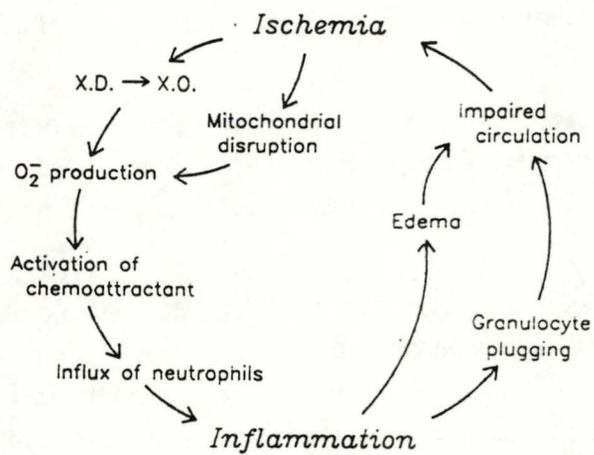


Figure 24 : Séquence hypothétique des événements par lesquels l'ischémie peut conduire à l'inflammation et vice-versa (d'après Mc Cord, 1987).

Les phagocytes adhèrent à l'endothélium vasculaire et cette proximité est responsable de lésions tissulaires accrues (Mullane *et al.*, 1984).

L'importance physiologique de cette composante est soutenue par de nombreux travaux rapportant une réduction significative de la zone nécrosée du myocarde chez des animaux neutropéniques (déprimés en neutrophiles) soumis à une ischémie-reperfusion (Romson *et al.*, 1983; Mullane *et al.*, 1984). Les $O_2^{\cdot(-)}$ dérivés de la xanthine oxydase et produits lors de la réoxygénation jouent un rôle important dans le recrutement et l'activation des granulocytes intervenant dans les dommages causés au système vasculaire lors de la reperfusion injury (Granger, 1988).

La figure 24 nous présente la séquence d'événements possibles du cercle vicieux entre l'ischémie et l'inflammation. Le lien entre l'ischémie-reperfusion et l'inflammation est postulé par l'intervention de facteurs chimiotactiques pour les neutrophiles. Le recrutement et l'activation de ces cellules représentent une seconde source de radicaux et augmentent les lésions. Ces cellules peuvent aussi conduire à une ischémie plus sévère par deux mécanismes différents :

1. Les $O_2^{\cdot(-)}$ générés par les phagocytes conduisent à une augmentation de la perméabilité vasculaire aboutissant à un oedème et une pression interstitielle plus élevée. Cette augmentation de pression comprime la structure vasculaire et arrête la circulation sanguine (Leaf, 1973).

2. L'accumulation de neutrophiles adhérant à l'endothélium provoque une occlusion physique du vaisseau, ralentissant la circulation dans le tissu (Craddock *et al.*, 1979).

- Le transport mitochondrial des électrons

Si nous supposons que pendant l'ischémie, les réserves du nucléotide adénine sont partiellement dégradées jusqu'à la formation d'hypoxanthine et que O_2 n'est plus fourni, la chaîne des transporteurs d'électrons s'arrête et les systèmes rédox sont tous dans leur état réduit au moment de la reperfusion. La conséquence est une augmentation du nombre d'électrons captés directement par O_2 pour générer $O_2^{\cdot(-)}$ (Mc Cord, 1987). De plus, on observe une diminution d'activité de 50% de la MnSOD mitochondriale ainsi qu'une perte du GSH (Guarnieri *et al.*, 1985).

L'ischémie-reperfusion conduit à une augmentation de la production radicalaire et une diminution des capacités à éliminer ces entités. Il en résulte une détérioration rapide de la machinerie oxydative cellulaire (figure 25).

Ces lésions oxydatives ne se limitent pas aux mitochondries mais s'étendent aux composants cytosoliques et membranaires amenant les dommages généralisés : la nécrose tissulaire (Mc Cord, 1987). La diminution de l'efficacité des défenses antioxydantes observées dans de nombreux organes suite à l'ischémie concourent à

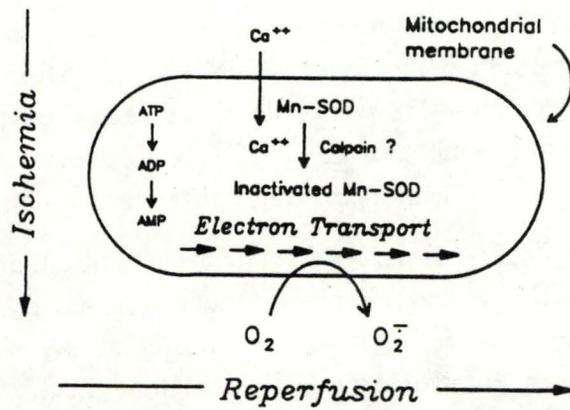


Figure 25 : Mécanisme par lequel les mitochondries sont lésées pendant l'ischémie et deviennent une source significative de radicaux superoxydes lors de la reperfusion. Incapables d'éliminer sa propre production d' $O_2^{\cdot-}$, elles représentent une menace pour le reste de la cellule (d'après Mc Cord, 1987).

l'accumulation des espèces radicalaires lors de la reperfusion (Mc Cord, 1985; Ferrari *et al.*, 1985).

Bien que la majorité des radicaux sont produits lors de la réoxygénation, on rapporte que des dérivés de O_2 sont aussi formés lors de l'occlusion dans des espèces (chien, homme) qui possèdent des vaisseaux collatéraux assurant un flux sanguin résiduel (drainant une faible quantité d' O_2) dans le tissu ischémié (Kramer, 1987).

La première cible des radicaux dérivés de O_2 générés dans ce processus pathologique est le système vasculaire et plus spécialement l'endothélium riche en xanthine oxydase (Kantos *et al.*, 1984; Jarash *et al.*, 1981). Les attaques radicalaires sont la cause des modifications de la perméabilité vasculaire et de la formation oedémateuse subséquente (Jarash *et al.*, 1981). On observe des similitudes étroites entre les dommages occasionnés pendant la reperfusion injury et la perfusion d'organes sains avec des solutions générant des radicaux extracellulaires (le système xanthine-xanthine oxydase est fréquemment utilisé à cet effet) témoignant de l'importance des entités radicalaires cytotoxiques dans ce processus (Tamura *et al.*, 1988).

b) *In vitro* - But de ce mémoire

En raison de la présence ubiquiste des cellules endothéliales et de leur localisation à la frontière sang-tissu, ce type cellulaire a été proposé comme un site précoce des lésions tissulaires (Jarash *et al.*, 1986).

Des $O_2^{\cdot(-)}$ ou H_2O_2 générés de façon extracellulaire sur des cellules endothéliales en culture induisent des dommages cellulaires caractérisés par des changements morphologiques (vacuolisation, protubérances membranaires) ou par l'intensité de la libération de ^{51}Cr préalablement incorporé (Auger and Gardon, 1984).

Les cellules endothéliales ne font pas que de subir les effets de la reperfusion, elles y participent activement car la X.D de ces cellules peut se transformer en X.O pendant une ischémie (Jarash *et al.*, 1986). Les radicaux superoxydes sont encore produits *in vitro*. Ils peuvent être libérés ou pas dans l'espace extracellulaire (Rosen and Freeman, 1984).

Ce mémoire consiste d'abord en l'élaboration d'un modèle d'anoxie-réoxygénation tendant à simuler l'ischémie-reperfusion sur des cellules endothéliales en culture. Précisons toutefois que l'ischémie est différente de l'anoxie en ce sens que dans une ischémie, non seulement O_2 n'est plus fourni mais les nutriments ne sont plus disponibles. Dans notre modèle, les cellules sont

toujours recouvertes par un film de milieu pendant l'hypoxie. Un modèle *in vitro* (bien que toujours réductionniste dans les paramètres dont il tient compte) permet de cibler un type cellulaire bien précis en éliminant les autres composantes (cellules sanguines et parenchymateuses) qui sont toujours présentes lors d'expérimentations sur des organes isolés et perfusés.

- Dans un premier temps, nous devons vérifier que l'hypoxie-réoxygénation entraînait bien la mort d'un plus grand nombre de cellules que l'hypoxie seule. L'estimation de la viabilité cellulaire est réalisée par un comptage de cellules recouvertes par un colorant vital (Principe d'exclusion à l'érythrosine B).

- Une fois l'ajustement technique de ce modèle réalisé, nous avons cherché à tester l'efficacité de certains agents de protection face à l'agression des molécules radicalaires (Scavengers, antioxydants, inhibiteurs de la production radicalaire).

- On s'est également intéressé à l'importance de l'état énergétique de la cellule au moment de la réoxygénation, sur le taux de mortalité cellulaire.

- En plus de la réalisation d'expériences avec des molécules extracellulaires, nous avons entrepris grâce à la technique de microinjection cellulaire, des essais de protection par des antioxydants enzymatiques introduits directement dans la cellule.

L'observation des effets de protection face à l'hypoxie-réoxygénation par certaines molécules dont on connaît le mécanisme ou le site d'action permet d'obtenir des indicateurs sur la production, sur la nature et la toxicité des espèces radicalaires impliquées dans ce modèle. Ces indications nous permettront peut-être de mieux cerner les changements dans le métabolisme cellulaire survenus lors de l'exposition des cellules endothéliales à ce double choc que représente l'hypoxie-réoxygénation. Ce type d'approche est une étape préalable et indispensable dans la compréhension des mécanismes qui interviennent lors de ces situations dommageables pour la cellule. Cette approche permettra éventuellement par la suite la mise au point de molécules protégeant efficacement dans des situations de troubles physiologiques (Ischémie-reperfusion) se produisant dans de nombreux organes.

En résumé : le but de ce travail était de déterminer grâce à l'étude de divers agents de protection, les molécules de type radicalaire qui sont les plus dommageables pour les cellules endothéliales lors de leur réoxygénation après une période d'hypoxie. Une seconde question nous intéressait aussi : le métabolisme énergétique avait-il ou non une influence sur la mortalité cellulaire lors de la réoxygénation ?

II. MATERIELS ET METHODES

Les enzymes utilisées ainsi que leurs substrats proviennent de la firme "Sigma Chemical Company" (St-Louis, U.S.A.); les autres produits, sauf spécification sont issus de la firme "Merck A.G." (Allemagne fédérale).

A. Mise en culture de cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine

La méthode utilisée est adaptée d'un procédé décrit pour la première fois en 1963 par Maruyama (Balconi et Dejana, 1986; Fryer *et al.*, 1966; Jaffe *et al.*, 1973).

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

Le cordon ombilical séparé du placenta après la naissance de l'enfant est collecté dans un milieu de conservation de composition :

KCl 4 mM; NaCl 140 mM, Tampon Hepes 10mM (Janssen Chimica); D-glucose 1 mM; streptomycine 100 µg/ml (Sigma) et pénicilline 100 U/ml (Continental Pharma); fungizone 0,25 µg/ml (Gibco, Scotland). Cette solution est portée à pH 7,3 et se conserve en chambre froide à 4°C.

Ce milieu est préalablement stérilisé par filtration (pompe péristaltique et filtre 0,22 µm, Millipore) et conservé à 4°C dans des récipients stérilisés à l'alcool dénaturé (Tzafon, Israël).

Mode opératoire

On introduit un cathéter dans la veine ombilicale que l'on immobilise par un serre-joint en plastique. Le rinçage est réalisé par la perfusion de la veine avec une seringue de 50 ml (Terumo, Ribbon Pack, U.S.A.) contenant une solution de NaCl 0,15M tamponnée par du phosphate 10mM pH 7,4 (PBS) stérile contenant la fungizone et les antibiotiques de même type et à la même concentration que le milieu de récolte des cordons. L'autre extrémité de la veine est ligaturée par un second serre-joint. Un bouchon (Travenol laboratoires, U.S.A.) est placé sur le cathéter.

Pour détacher les cellules de la membrane basale, on utilise une solution de collagénase 0,02% (Sigma, Type II) que l'on injecte au moyen d'une seringue de 5ml avec aiguille au travers du bouchon. Le cordon est alors placé dans une boîte de Pétri en verre et incubé pendant 35 minutes en chambre chaude (37°C).

On suspend ensuite le cordon par une extrémité à un statif dont la pince a été passée à l'alcool, on recueille la solution de collagénase comprenant les cellules endothéliales et on perfuse la veine avec 10ml de milieu M₁₉₉ + S (M₁₉₉ = milieu en poudre (Gibco, Paris) contenant des sels de Hanks, Hepes 10mM, NaHCO₃ 1,75 g/l, L-glutamine 100 µg/ml (Sigma) et porté à pH 7,2 avec du NaOH; S = sérum de veau foetal (Gibco, Paris) représentant 20% du volume final). Ce milieu injecté est destiné à récupérer un maximum de cellules et à inhiber la collagénase. La solution recueillie est alors centrifugée (1000 RPM, 10 minutes, Hettich Universal). Le culot obtenu est ensuite resuspendu dans 5ml de M₁₉₉+S. L'ensemble de ce milieu (contenant les cellules) est transféré dans une boîte de culture de 25 cm² (Cell Cult, Sterilin, Angleterre). La nécessité de fournir un substrat organique à ces cellules nous impose de gélatiniser les boîtes avant d'y verser les cellules (gélatine à 0,2%). On ajoute encore de la fungizone (2 µl/ml). Le jour suivant, on change le milieu afin de retirer les globules rouges, d'autres cellules sanguines et la fungizone. On suit l'évolution de la culture en observant la croissance des cellules en microscopie à contraste de phase. La surveillance du milieu de culture et plus particulièrement de l'indicateur de pH qu'il contient nous renseigne sur le moment opportun pour le renouveler.

B. Repiquage des cellules et sous-cultures

Le fait que ces cellules se différencient rapidement n'autorise qu'un seul repiquage et leur utilisation subséquente.

Après avoir rincé la boîte avec du M₁₉₉ (ou milieu de rinçage ne contenant pas de sérum), deux fois pendant 2 à 3 minutes, on ajoute 2ml de trypsine + EDTA 0,25% (Gibco). L'EDTA chélate les ions Ca⁺⁺ et accélère la trypsinisation. L'évolution du détachement des cellules est suivie par intermittence au microscope de phase. Une fois les cellules en suspension dans le milieu, on ajoute du M₁₉₉+S (le sérum contient des inhibiteurs de trypsine) et on récupère les cellules en agitant le milieu à l'aide d'une pipette pasteur. La centrifugation et les autres étapes sont identiques à celles de la mise en culture. Le choix du type des boîtes de culture où l'on repique les cellules est important et entièrement déterminé par leur utilisation ultérieure (Pétri, Multidisch...). Cependant, quelle que soit la boîte, la gélatinisation préalable est toujours nécessaire. La gélatine est décantée avant de répartir les cellules.

Pour l'ensemble des expériences d'hypoxie-réoxygénation, nous utilisons une boîte multicompartimentée de 25 cases (Sterilin, Angleterre). Au fond de chaque loge, nous déposons un couvre-objet en verre (15mm x 15mm) quadrillé à l'aide d'un diamant pour faciliter le comptage ultérieur. Ces couvre-objets stérilisés

à l'alcool sont recouverts de gélatine. Ces cellules endothéliales ayant poussé sur couvre-objet sont aisément manipulables et pourront être transférées dans des boîtes de Pétri individuelles ($\varnothing = 6$ cm) (Falcon) pour les besoins de l'expérience.

C. Mise en évidence de la protéine F VIII : R_{ag} du facteur VIII de la coagulation par immunofluorescence indirecte

Le marquage se réalise sur des cellules ayant poussé sur couvre-objet en verre recouvert de gélatine. L'ensemble des manipulations se déroulent à la température du labo.

Fixation

Après un triple rinçage au PBS (1-2 min), on réalise la fixation des cellules par une solution de PBS contenant 3% de formaldéhyde (Belgolabo) pendant 20 minutes. On effectue trois lavages au PBS. Ensuite, les cellules passent dans une solution de NH₄Cl/PBS à 0,2% pendant 10 minutes. De nouveau trois lavages au PBS sont nécessaires. A ce moment, on peut stocker les cellules dans le PBS à 4°C pendant quelques heures.

Pour l'étape de perméabilisation des membranes, on utilise un détergent. On laisse incuber les cellules 5 minutes dans du triton X-100 (0,1%). Après trois rinçages au PBS, on peut commencer le marquage.

Le marquage commence par deux lavages avec du PBS/gélatine pendant 5 minutes (gélatine Merck à 0,2% dans PBS) ensuite, deux lavages avec du PBS seul. Dans une grande boîte de Pétri, des morceaux de papier filtre mouillé sont déposés sur lesquels on place des morceaux de Parafilm aplatis.

25 μ l d'anticorps de lapin anti-facteur VIII (Berhing Werke A.G., Allemagne fédérale) dilués 50 fois dans PBS/gélatine pour le test sont alors ajoutés sur le parafilm et 25 μ l de PBS pour le contrôle. On prend les couvre-objets à l'aide d'une pince, on draine l'excès de PBS et on les retourne sur les anticorps (cellules vers le bas). On incube 20 minutes en présence de ce premier anticorps. Juste avant l'utilisation des anticorps, on centrifuge 3 minutes dans une microfuge. Ensuite, on reprend les couvre-objets et on les replace dans le PBS/gélatine pour 2 lavages de 5 minutes suivis de 2 lavages dans du PBS seul également de 5 minutes. Le deuxième anticorps est une gamma-globuline anti-lapin de chèvre couplée à la fluorescéine et diluée 20 fois (Sigma). On procède comme pour le premier anticorps. Tous les couvre-objets sont cependant incubés en présence de ce second anticorps (marquage indirect). On rince deux fois dans du PBS/gélatine pendant 5 minutes puis 2 fois dans du PBS seul. Il faut encore monter les couvre-objets sur des lames porte-

objets propres et sèches. On retourne le couvre-objet sur une petite goutte de PBS/glycérol (1/9) déposée sur la lame. On utilise un vernis incolore pour sceller les bords du couvre-objet et on observe les cellules en microscopie à fluorescence (Dialux 22, Leiz). On peut prendre des photographies à l'aide d'un film couleur (Fuji 400 Asa).

D. Autoradiographie

La méthode utilisée est celle décrite par Cristofalo et Sharf (1973).

Après avoir repiqué des cellules endothéliales à faible dilution sur des couvre-objets en verre dans une multidish, on les incube sous hypoxie pendant différents temps dans des boîtes plastiques Falcon (diamètre 60mm). Après l'hypoxie, on restaure le volume initial du milieu en y ajoutant 1 μ l de thymidine tritiée (1 mCi/ml, NEM, Angleterre) et on les incube pendant 48 heures. Après avoir rincé avec une solution saline (PBS), les cellules sont fixées dans un mélange méthanol/acide acétique (3/1 en volume). La première fixation a une durée de 10 minutes dans du fixateur dilué 2 fois dans la solution saline, et la seconde se fait dans le fixateur pur pendant 20 minutes. Le lendemain, on recouvre les cellules d'une solution d'alun-gélatine (gélatine 0,5%; alun de chrome 0,05%). On laisse sécher pendant une journée.

En chambre noire, on recouvre les cellules avec l'émulsion photographique (Kodak) diluée dans 2 volumes d'eau distillée. Il est important d'éviter le contact d'objets métalliques avec l'émulsion. On retire l'excès par un égouttage des boîtes. Seule une fine pellicule reste sur les cellules. On place alors les boîtes dans une chambre noire contenant du silicalgel. On emballe et on place à 4°C pendant 2 à 3 semaines.

On développe alors l'émulsion (développeur D19 pendant 5 min) et après un rinçage à l'eau distillée, on fixe pendant 5 minutes avec un fixateur Kodak dilué dans quatre volumes d'eau. Un dernier lavage avant de laisser sécher et on pourra observer, compter et photographier les cellules en microscopie à contraste de phase.

E. Test d'incorporation de leucine tritiée

La méthode suivie a été décrite par Jaffe *et al.* (1973).

Les cellules sont repiquées à forte densité dans des boîtes de Pétri (Falcon, \varnothing 60mm, USA). On réduit l'épaisseur du milieu (M₁₉₉ + S : 1ml) et on soumet ces

cellules à l'hypoxie pendant des temps croissants. Après ce traitement, on restaure le volume initial de milieu (5ml) en ajoutant 5 μ l/ml de leucine tritiée (Amersham : 31,9Li/mmôle). On incube à l'étuve à CO₂ (37°C) pendant 6 heures. On lave ensuite deux fois avec du PBS froid (0°C) comprenant de la leucine non marquée à une concentration de 10⁻⁴M. On ajoute 2ml de solution de TCA (acide trichloracétique) et de leucine non marquée à 10⁻⁴M à 4°C et on incube pendant deux heures à 4°C. Le TCA sert à précipiter les protéines. On lave ensuite une fois avec du TCA 10% contenant le leucine à 10⁻⁴M et deux fois avec un mélange éthanol-éther (3:1 en volume) puis on laisse sécher à l'air. Les protéines précipitées sont ensuite solubilisées dans 1ml de NaOH 1N pendant une nuit à 37°C.

On prélève 200 μ l de ces protéines solubilisées que l'on dilue dans une fiole à l'aide de 5ml de liquide scintillant (Aqualuma) et on réalise un comptage du nombre de coups par minutes pendant trois minutes. Un dosage des protéines est réalisé par la méthode décrite par Lowry *et al.*, (1951).

F. Modèle : hypoxie-réoxygénation

Les cellules endothéliales sont repiquées à partir de boîtes presque à confluence (pour un comptage aisé) sur des couvre-objets en verre quadrillés dans une boîte multicompartimentée (Sterilin, Angleterre) avec du M₁₉₉ + S et placées à l'étuve à CO₂ jusqu'au lendemain. Les cellules sont utilisées au deuxième passage. Avant l'expérience, chaque couvre-objet est transféré dans une boîte de Pétri (diamètre 60mm, Falcon, U.S.A.) avec 1ml de M₁₉₉ + S (contrôle) ou M₁₉₉ + S contenant la molécule à la concentration voulue (tests). Cette diminution de la hauteur du milieu à une fine couche uniforme facilite les échanges gazeux en réduisant la distance de diffusion pour ces gaz tout en maintenant la viabilité cellulaire (le film de milieu est suffisant pour éviter la dessiccation des cellules). Un premier comptage de 250 à 300 cellules est effectué sur chaque couvre-objet. L'ischémie-reperfusion est simulée en soumettant les cellules à une hypoxie suivie par la réoxygénation. L'hypoxie est produite en faisant barboter du N₂ dans le milieu (chasse l'O₂) et en incubant chaque boîte dans une casserole à pression comportant deux entrées dans laquelle règne une atmosphère de 100% de N₂. Cette atmosphère d'azote est réalisée en purgeant la casserole avant chaque expérience par un flux de N₂ (100%) pendant deux à trois minutes. Pendant l'incubation, les boîtes sont en chambres chaudes à 37°C, sur un agitateur mécanique et ouvertes dans la casserole. Après le temps d'hypoxie, on ajoute 2ml de milieu (de même composition que celui contenu dans la boîte de Pétri) et la réoxygénation se produit en restaurant l'atmosphère normale dans une étuve à CO₂ (37°C). L'ajout de milieu apporte des nutriments et de l'O₂ en simulant la reperfusion. Pour chaque point

expérimental, quatre couvre-objets répartis dans quatre boîtes de Pétri différentes sont nécessaires. Sur deux couvre-objets, on réalise un second comptage directement après hypoxie alors que les deux autres boîtes sont comptées après la réoxygénation. Un repère permet d'effectuer ces deux comptages au même endroit. L'estimation de la viabilité cellulaire est réalisée grâce au principe d'exclusion d'un colorant vital : l'érythrosine B.

La composition de la solution du colorant est la suivante : 0,4 g d'érythrosine B et 0,81 g de NaCl sont ajoutés à 100ml de tampon phosphate 5mM, pH 7,4. La solution est chauffée pour dissoudre le colorant et ensuite gardée à la température ordinaire (Stock). Lors de l'utilisation, ce colorant est dilué 10 fois dans du PBS.

On décante le milieu et on dépose quelques gouttes de colorant sur le couvre-objet portant les cellules. Après deux à trois minutes, le comptage au microscope de phase peut commencer. Les cellules vivantes n'incorporent pas le colorant mais les cellules mortes se colorent (Phillips, 1973).

$$\text{Le \% de cellules vivantes} = \frac{\text{nombre de cellules non colorées}}{\text{nombre de cellules non colorées} + \text{colorées}} \times 100$$

Cette estimation de la viabilité est une mesure relative (rapport) et ne tient nullement compte de cellules mortes se détachant éventuellement du substrat pendant l'expérience. C'est la raison pour laquelle nous associerons aux graphiques rapportant la viabilité cellulaire, des résultats absolus rendant compte de la récupération cellulaire.

$$\text{Le \% de récupération cellulaire} = \frac{\text{nombre de cellules non colorées} + \text{colorées}}{\text{nombre total de cellules avant expérience}} \times 100$$

La mortalité après l'hypoxie-réoxygénation étant assez faible (au maximum 12%), ce modèle nous impose de compter beaucoup de cellules pour l'obtention de résultats significatifs. Un rapide calcul permet d'estimer la quantité de cellules comptées au microscope pour l'ensemble des expériences de ce mémoire.

Nombre de cellules comptées : $(300 \times 2) \times 25 \times 20 = 300.000$ cellules.

- 300 : Nombre de cellules comptées par couvre-objet
- 2 : Deux comptages (avant expérience + après hypoxie ou après réoxygénation)
- 25 : Le nombre de couvre-objets par expérience
- 20 : Le nombre d'expériences réalisées.

Il est à noter également que d'un contrôle à l'autre, nous avons une variabilité assez substantielle. Cette variabilité observée entre des souches cellulaires

différentes provenant de cordons ombilicaux différents est explicable par une différence de sensibilité de ces cellules à l'hypoxie-réoxygénation.

Les cellules injectées avec les enzymes antioxydantes et les non-injectées sont également placées sous une atmosphère de 100% N₂ durant l'hypoxie. La détermination de la viabilité et de la récupération cellulaire sont effectuées seulement après hypoxie-réoxygénation par la technique décrite ci-dessus.

Les pourcentages de protection des différentes molécules sont obtenus en comparant la viabilité des tests à celle des témoins. Si nous considérons l'écart entre les points hypoxie seule et hypoxie-réoxygénation des témoins égal à 0% de protection (100% de mortalité), on peut attribuer à chaque molécule et pour chaque concentration un pourcentage de protection. Ceci permettra d'établir un tableau comparatif des efficacités de protection de ces différentes molécules en assignant à chaque molécule la concentration qui donne 50% de protection. La formule permettant de rechercher le pourcentage de protection est la suivante :

$$\% \text{ protection} = \frac{(\% \text{ viabilité cellulaire des tests H+R}) - (\% \text{ viabilité cellulaire des témoins H+R})}{(\% \text{ viabilité cellulaire témoin H seule}) - (\% \text{ viabilité cellulaire des témoins H+R})}$$

G. Micro-injection

Une description du système de micro-injection et une photo le visualisant sont présentées à la figure 26.

Le système utilisé est celui décrit par Graessmann *et al.* (1980) et modifié par Ansorge (1982).

Par cette technique, on parvient à injecter des solutions enzymatiques dans les cellules. Les micro-pipettes sont réalisées à partir de capillaires en verre (Clark Electromedical instruments, Parrybourne, Angleterre). Ces capillaires sont étirés après avoir été chauffés à température de fusion (Microelectrode Puller Unit, Palmer, Angleterre). Le volume injecté est relativement faible. Le minimum injecté dans une cellule est de l'ordre de 10⁻¹¹ml (Graessmann *et al.*, 1980). Pour la micro-injection, on repique les cellules la veille à faible dilution (important) dans une boîte de culture de diamètre suffisant (diamètre 60mm, Falcon, U.S.A.) préalablement quadrillée pour faciliter le comptage des cellules. Les carrés circonscrivant les cellules permettent un repérage facile. Pendant toute la durée de la micro-injection, les cellules baignent dans la solution de Puck de composition : CaCl₂ 2H₂O, 160mg/l, KCl 400mg/l; KH₂PO₄, 150mg/l; MgSO₄ 7H₂O, 154mg/l; NaCl 8mg/l; NaH₂PO₄ 2H₂O, 290mg/l; glucose, 1100mg/l. Le tampon d'injection

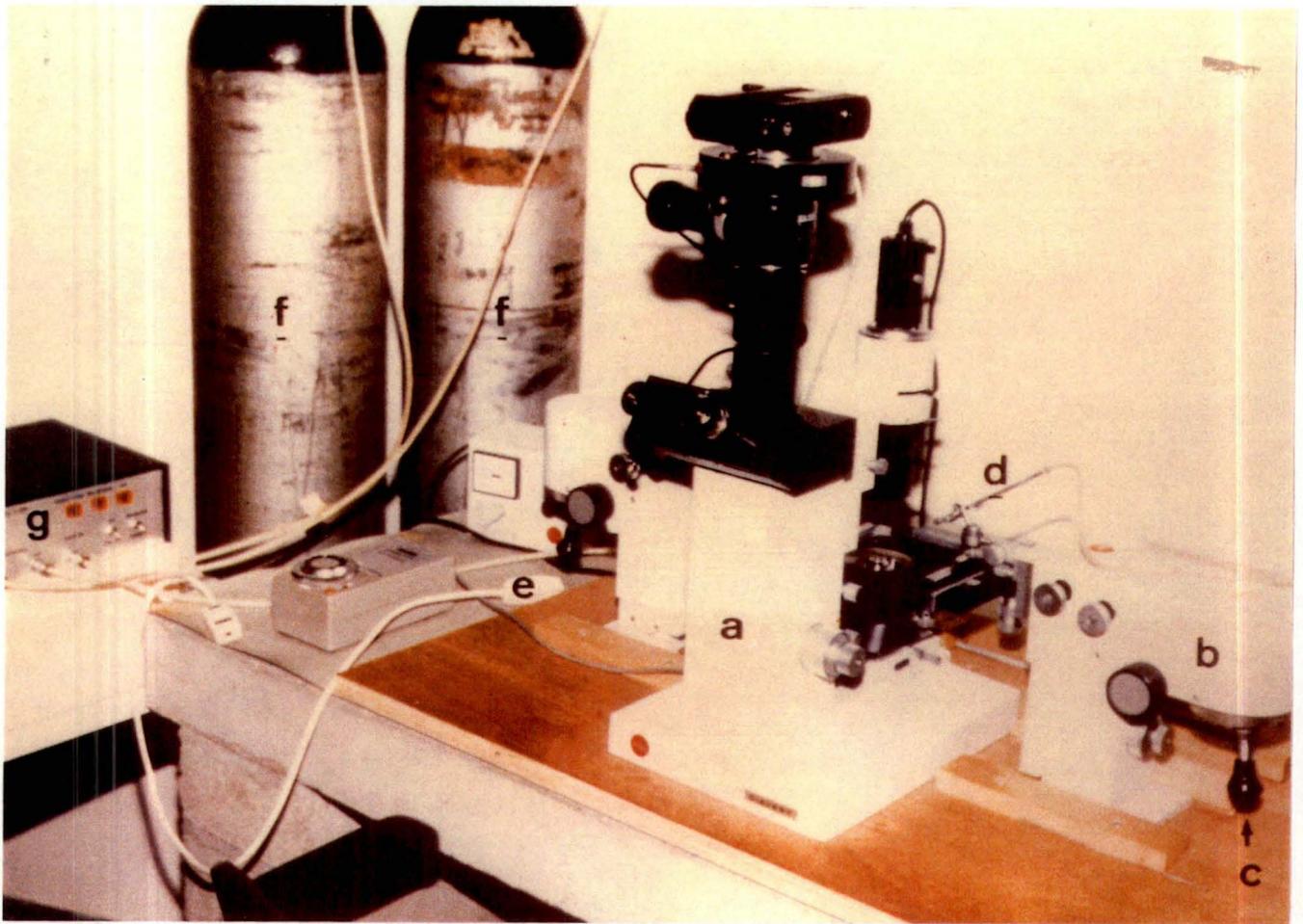


Figure 26 : Dispositif de micro-injection :

- (a) Microscope inversé DIAVERT Leitz
- (b) Micromanipulateur Leitz
- (c) Démultiplicateur de mouvements
- (d) Support de la micro-pipette reliée à l'unité de pression
- (e) Interrupteur d'injection
- (f) Bombonnes d'azote
- (f) Unité de pression à 3 sélections
 - pression de maintien
 - pression d'injection
 - haute pression.

dans lequel sont dissous les enzymes se compose de KH_2PO_4 5,45mM; KH_2PO_4 4,55mM; KCl 70,5mM et NaCl 7,05mM à pH 7,2.

La micro-pipette se déplace dans les trois dimensions de l'espace par le jeu de bras manipulateurs. L'approche et la descente sur la cellule sont des opérations délicates pour un novice. L'apparition d'un halo clair sur la surface de la membrane cellulaire signale l'introduction de la micro-pipette dans la cellule. Le déclenchement de l'injection se fait en actionnant un interrupteur relié à l'unité de pression.

Après injection, les cellules sont rincées deux fois avec du PBS contenant 1 U/ml de pénicilline (Gibco) et 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de streptomycine. Du $\text{M}_{199} + \text{S}$ est rajouté dans la boîte de culture. Pour réduire la variabilité expérimentale au maximum, on utilise une même boîte de culture pour réaliser une expérience comprenant trois groupes de 70 à 80 cellules :

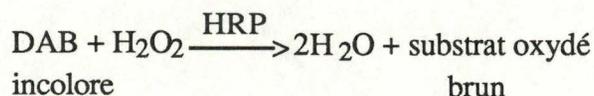
- Le premier groupe est injecté avec du tampon d'injection seul
- Le deuxième est injecté avec l'enzyme dissoute dans ce tampon
- Le troisième groupe de cellules n'est pas injecté.

Lors de la micro-injection, les boîtes doivent être ouvertes; pour minimiser au maximum les risques de contamination, les U.V. sont allumés la veille dans la salle et les changements de milieu se font stérilement sous hotte.

H. Micro-injection de la peroxydase de "raifort" (HRP) dans des fibroblastes WI38

La méthodologie suivie est celle décrite ci-dessus (Rodewald , 1980). La HRP est une enzyme extraite des radis et solubilisée dans le tampon d'injection (concentration : 0,5mg/ml). Un repiquage de fibroblastes WI38 à forte dilution est réalisé la veille de la micro-injection. Une partie de cette solution d'enzyme est inactivée à la température de 80°C pendant 90 minutes. On injectera trois groupes de 40 cellules. Un groupe avec HRP active, un second avec HRP inactive et un troisième avec du tampon d'injection. Après la micro-injection, on rince deux fois avec un tampon phosphate 100mM; MgCl_2 0,05% à pH 7,2. On fixe ensuite les cellules par une fixation douce n'interférant pas avec l'activité de l'enzyme. Cette fixation se réalise à l'aide d'une solution de glutaraldéhyde à 2% dans du tampon phosphate 50mM; 0,05% MgCl_2 à pH 7,4 pendant 10 minutes à 20°C puis 20 minutes à 4°C. On rince alors deux fois avec du tampon phosphate 10mM à pH 7,4. La révélation se fait par une incubation (15 minutes) des cellules fixées dans une solution de diaminobenzidine (DAB) fraîchement préparée. La solution de DAB (10ml) se composant de 9,9ml de tampon TRIS 0,1 M à pH 7,6 HCl; 5mg de DAB et 0,1ml de H_2O_2 1% est filtrée sur millipore avant usage. Le principe de la

révélation consiste en la détection colorimétrique du produit oxydé par l'enzyme active :



La coloration peut être suivie au microscope à contraste de phase. On lave ensuite trois fois avec du tampon phosphate 10mM, pH 7,4 à 4°C. Une post-fixation au tétr oxyde d'osmium (Os O4) 1% dans du tampon phosphate 10mM pendant 35 minutes à 20°C achève le protocole. On dépose un couvre-objet sur les cellules, on le fixe avec du vernis à ongles et on regarde au microscope à contraste de phase. On prend des photographies, ici avec un film noir et blanc.

I. Dosage enzymatique sur des homogénats cellulaires

Les cellules confluentes d'une boîte de 75cm² (Cell Cult, Sterilin, Angleterre) sont raclées dans du PBS et l'homogénéisation est réalisée à l'aide d'un homogénéiseur de Dounce.

(1) La catalase

Le dosage et le calcul de l'activité enzymatique sont réalisés grâce à la méthode décrite par Baudhuin *et al.*, (1964).

Le principe de ce dosage est d'ajouter le substrat de l'enzyme (H₂O₂) dans l'homogénat de cellules en présence de triton X-100, de façon à rompre les membranes peroxysomales (latence enzymatique). On mesure la quantité de H₂O₂ qui reste après 45 minutes d'incubation en bloquant la réaction avec de l'oxysulfate de titane, ce qui autorise une lecture au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 420nm (procédé colorimétrique).

Le calcul de l'activité enzymatique de la catalase se réalise au moyen de la formule suivante :

$$\text{Unité/ml} = \frac{(\text{Valeur Sc} - \text{valeur blanc}) \times 5,2 \times \text{dil.}}{(\text{Valeur test} - \text{valeur blanc}) \times 0,1 \times 45 \times 50}$$

Sc : valeur lue avec H₂O₂ sans homogénat (blanc substrat)

test : valeur lue pour les tubes avec H₂O₂ et homogénat

blanc : valeur lue sans H₂O₂ et sans homogénat (blanc-blanc)

Précision des paramètres de calcul :

0,1 = volume de l'homogénat ajouté en ml

5,2 = volume final en ml avec le mélange réactionnel

45 = temps d'incubation en minutes

50 car l'unité choisie d'activité est la quantité d'enzyme qui détruit 90% du peroxyde d'hydrogène fourni dans 50ml par minute.

Le dosage se réalise à température ambiante.

(2) SOD

La méthode utilisée est une mise au point du laboratoire de Biochimie cellulaire et consiste en une mesure de l'activité par chémoluminescence (Corbisier *et al.*, 1987).

Un système de production stable d'anions superoxydes réalisé par l'activité de la xanthine oxydase (Sigma, Grade III) qui oxyde la xanthine en acide urique en réduisant l'O₂ moléculaire en ions superoxydes, est couplé à la détection de la production de radicaux O₂⁽⁻⁾ par la mesure en chémoluminescence de la lucigénine (Sigma), spécifique de ces superoxydes. La mesure se réalise à l'aide d'un Lumac Biocounter 2010.

L'intensité de la chémoluminescence est notée après 30 secondes. L'activité de la SOD se calcule en pourcentage d'inhibition de la réaction de chémoluminescence :

$$\% \text{ inhibition} = 100\% - \left(\frac{\text{chémoluminescence du mélange réactionnel avec homogénat}}{\text{chémoluminescence sans homogénat}} \times 100 \right)$$

La conversion de ce pourcentage d'inhibition en unités enzymatiques est réalisée à l'aide d'une courbe d'étalonnage qui exprime la valeur du pourcentage

d'inhibition pour un nombre connu d'unités enzymatiques de la SOD. Ces unités ont été définies comme la quantité de SOD qui donne 50% d'inhibition de la production d'anions superoxydes dans le système xanthine/xanthine oxydase utilisé par Corbisier *et al.* (1987).

Ce dosage est réalisé à température ambiante et ne demande que 25µl d'homogénat par test.

(3) La GPX

Ce dosage fut mis au point par Mbemba *et al.* (1985) et modifié par Pigeolet (1985-1986).

Le principe de ce dosage repose sur la mesure au spectrophotomètre (Perkin-Elmer 557) de la diminution d'absorbance du NADPH à 366nm.

Le mélange réactionnel se compose de tampon phosphate (pH 8,5), de l'EDTA, de NADPH, du GSH et de la glutathion réductase. La diminution de NADPH nous renseigne sur l'activité de la glutathion réductase qui réduit le GSSG formé par l'activité de la GPX. Le substrat avec lequel l'enzyme est incubé est le ter-butylhydroperoxyde (TBHP : Aldrich-Europe, Belgique). Le mélange est conservé à 4°C pendant toute la durée du dosage. Celui-ci s'effectue à température ambiante.

L'activité est calculée par la formule :

$$\text{Activité} = \frac{\Delta D.O/\text{min} \times 10 \times \text{dil}}{6,22 \times 1,667}$$

1 unité = 1 µmole de NADPH oxydé/minute.

(4) La glutathion réductase (G_{Red})

La technique fut adaptée par Mbemba *et al.* (1985).

Cette enzyme utilise la NADPH pour réduire le GSSG. Le principe du dosage consiste à mesurer la disparition du NADPH par une lecture d'absorbance en continu au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 340nm.

Par définition, l'activité glutathion réductase sera égale au nombre de micromoles de NADPH oxydé.

$$\text{Activité} = \frac{\text{D.O./min} \times 10 \times \text{Dil}}{6,22 \times 1,667} \text{ } \mu\text{mole/min/ml}$$

soit 1 unité = 1 μ mole de NADPH oxydé/min à 25°C

$$\text{DO/min} \times 0,964 \times \text{Dil}$$

Les activités spécifiques des enzymes (U/mg) sont obtenues en rapportant l'activité enzymatique de ces quatre enzymes (U/ml) à la quantité de protéine de l'homogénat (en mg/ml) déterminée par la méthode décrite par Lowry *et al.*, (1951).

J. Test statistique

Tous les résultats graphiques sont exprimés en tant que la moyenne \pm 1 écart-type ($n = 2$).

III. RESULTATS

A. Caractérisation des cellules endothéliales

(1) Mise en culture des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine

Le choix de la veine ombilicale est d'ordre pratique. Dans un cordon ombilical, le diamètre de la veine est plus grand que celui des artères et donc plus facile à perfuser. Les artères plus musculeuses sont sujettes à une vasoconstriction importante lors de la section du cordon et de sa conservation à 4°C. Des auteurs précisent que l'on peut empêcher en partie cette vasoconstriction par une conservation à 37°C (Fryer *et al.*, 1966).

Le lendemain de la mise en culture, après avoir changé le milieu pour soustraire les globules rouges et les cellules mortes, nous observons les cellules au microscope de phase. Les cellules endothéliales (C.E.) en culture en présence d'érythrocytes pourraient phagocyter ces cellules et acquérir des caractéristiques morphologiques différentes (Fryer *et al.*, 1966). Il est donc impératif de changer le milieu de culture dès que les C.E. sont attachées à leur substrat. Leurs caractéristiques morphologiques nous renseignent sur leur identité : les cellules poussent en agrégats de quelques dizaines de cellules répartis sur l'ensemble du fond de la boîte de culture. La forme polygonale et le noyau possédant un ou plusieurs nucléoles sont des critères faciles qui permettent de distinguer ces cellules des fibroblastes. L'évolution de la culture est relativement lente et il faudra 4 à 6 jours pour atteindre la confluence. Les cellules prennent alors l'aspect d'un tapis cellulaire et connaissent un arrêt des mitoses (inhibition de contact) contrairement à d'autres types cellulaires comme les cellules musculaires lisses qui forment une couche pluriassiale. L'arrivée à confluence (monocouche) est le moment privilégié pour le repiquage et l'utilisation des cellules.

La planche 1 présente deux photographies de ces cellules prises l'une en début de culture et l'autre à confluence. On retrouve les caractéristiques morphologiques essentielles de ces cellules en microscopie optique.

La nécessité d'obtenir des cultures de cellules endothéliales exemptes au maximum de contamination par des fibroblastes ou des cellules musculaires lisses justifie le choix de la collagénase sur la trypsine pour détacher les cellules de la membrane basale. Certains auteurs rapportent aussi que la trypsine peut entraîner

Planche 1 : Evolution de la culture de cellules endothéliales (C.E.)

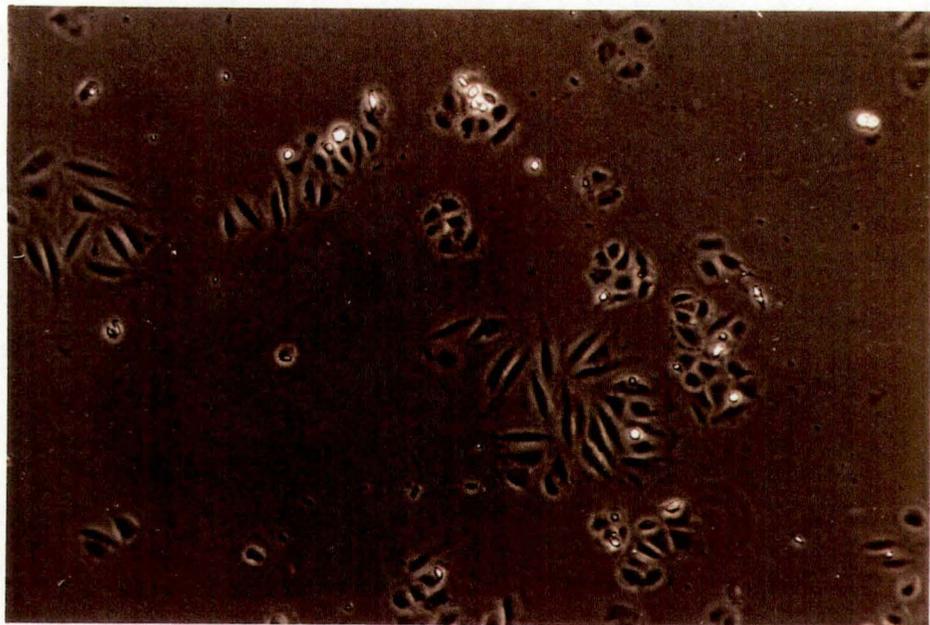


Photo A : C.E. au jour 1 après la mise en culture. Les cellules adhèrent au substrat gélatineux et se répartissent en petits agrégats dispersés sur le fond de la boîte. A faible densité, on observe la forme polygonale (G = 155 x).

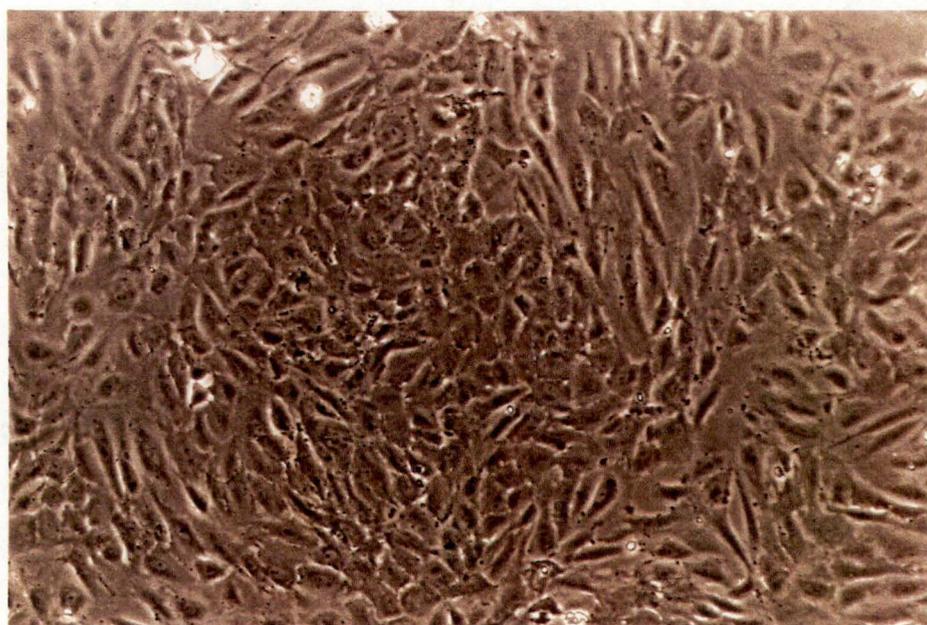


Photo B : Après 6-7 jours, les C.E. sont à confluence. La densité des cellules a augmenté fortement et elles ne se divisent plus. Leur forme reste polygonale (G = 115 x).

Planche 2 : Marquage de la protéine FVIII de la coagulation dans les cellules endothéliales.

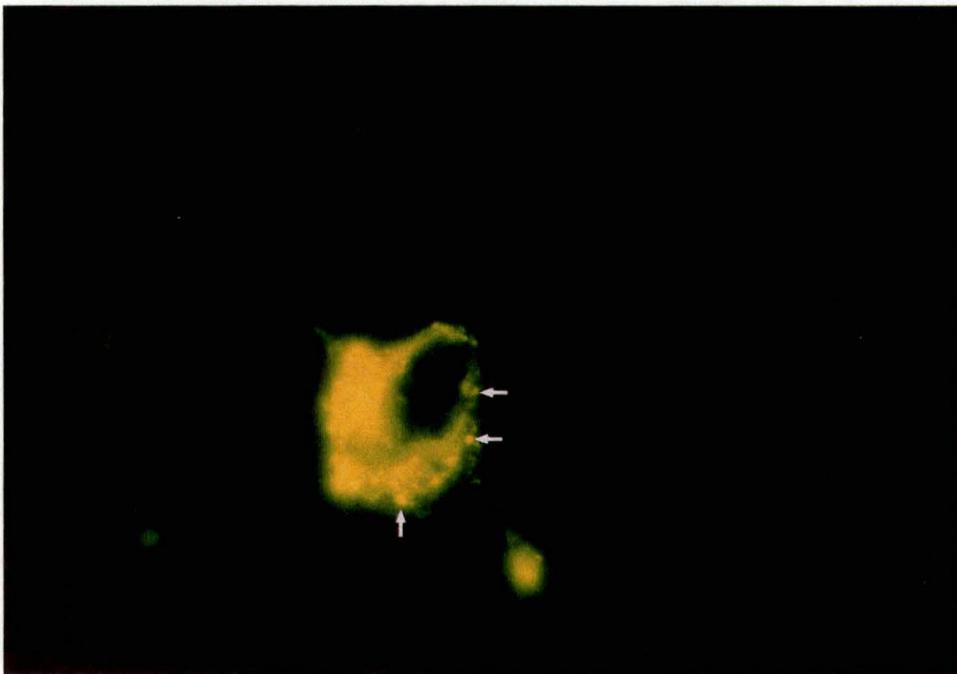


Photo A : Les flèches blanches indiquent un marquage plus intense au niveau des corps de Weibel-Palade. Marquage particulière en périphérie (G = 460 x).

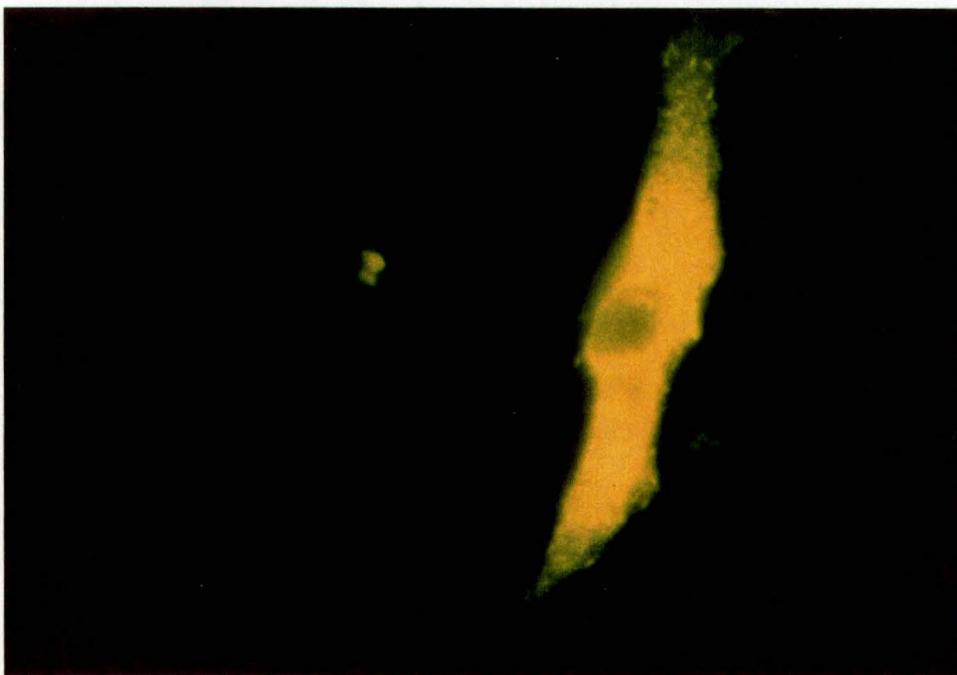


Photo B : Marquage plus diffus et cytoplasmique (G = 460 x).

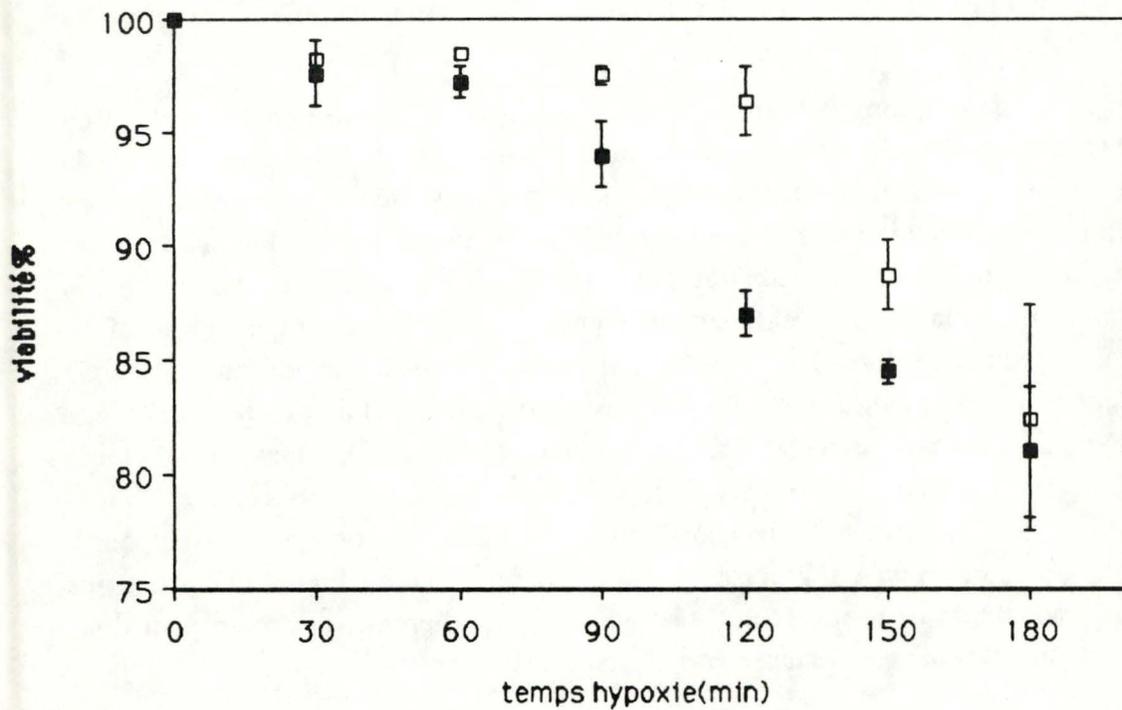
des aberrations chromosomiques perturbant la croissance cellulaire (Fryer *et al.*, 1966).

L'âge des cordons (temps séparant la récolte de la mise en culture) est un facteur déterminant pour la qualité des cellules et la rapidité avec laquelle la confluence est atteinte. Des cordons ombilicaux conservés depuis trop longtemps (plus de 7 jours) libèrent toutefois des cellules. Bien que ces cellules soient encore capables d'adhérer au substrat gélatineux, elles poussent beaucoup moins rapidement (ou plus du tout). Comme en témoigne l'autoradiographie (voir infra), les capacités de division des cellules diminuent dans des conditions d'hypoxie (concentration en O₂ diminuée) ou d'anoxie (l'oxygène n'est plus disponible). Cette hypoxie survient lors de la conservation du cordon ombilical dans un milieu qui finit par s'appauvrir en O₂ mais aussi par la formation de caillots sanguins dans la veine empêchant ainsi l'arrivée aux cellules de milieu de conservation tamponné, oxygéné, et riche en glucose. L'ATP n'étant plus régénéré, les processus dépendants de cette molécule riche en énergie s'altèrent. L'hypoxie peut donc interférer et gêner les mécanismes de division cellulaire.

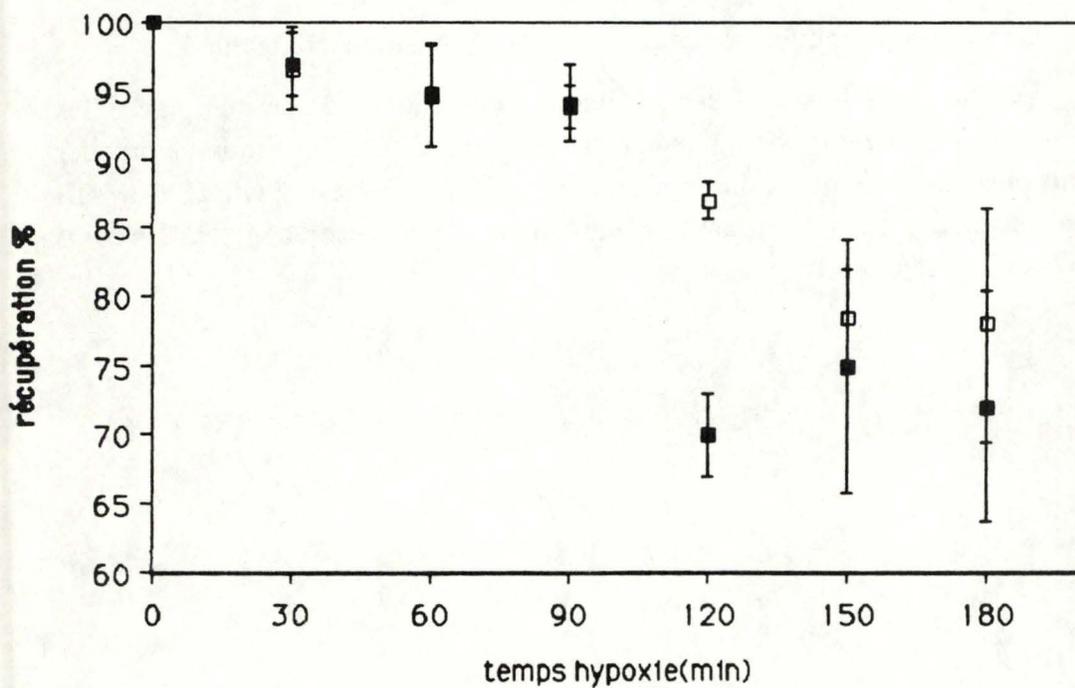
(2) Marquage par immunofluorescence du facteur VIII de la coagulation

Ce marquage est effectué sur des cellules en subculture à forte dilution.

La planche 2 montre les résultats photographiques de ce marquage. Les témoins étaient négatifs. Bien que le marquage soit diffus, on peut distinguer des points plus intensément marqués qui témoigneraient de la présence du facteur VIII de la coagulation dans les organites identifiant les cellules endothéliales : les corps de Weibel-Palade.



Graphique 1 : Effet de différents temps d'hypoxie seule (□) et d'hypoxie suivie de 45 minutes de réoxygénation (■) sur la viabilité cellulaire (n=2).



Graphique 2 : Effet de différents temps d'hypoxie seule (□) et d'hypoxie suivie de 45 minutes de réoxygénation (■) sur la récupération cellulaire (n=2).

B. Hypoxie - Réoxygénation : théorie radicalaire et/ou métabolisme énergétique ?

(1) Caractérisation du modèle expérimental

a) Courbe de temps

Dans une première approche, les cellules ont été soumises à des périodes variables d'hypoxie allant de 0 à 180 minutes suivies ou non par un temps de réoxygénation de 45 minutes pour déterminer la période optimale d'hypoxie/réoxygénation qui simule l'ischémie/reperfusion *in vivo*. Le temps de 45 minutes de réoxygénation a été retenu en raison d'une étude préliminaire comparative entre 45 minutes et 120 minutes de réoxygénation. La mortalité cellulaire n'étant pas plus importante après 120 minutes, nous avons estimé que l'ensemble des changements survenant lors de la réoxygénation se produisaient endéans les 45 minutes.

Nous pouvons constater que pour des temps d'hypoxie courts et inférieurs à 60 minutes, les effets de la réoxygénation ne se marquent pas : la viabilité des cellules n'ayant subi qu'une hypoxie est la même que celle des cellules ayant été soumises à l'hypoxie-réoxygénation. Par contre, pour des temps d'hypoxie très longs (supérieurs à 150 minutes), les cellules meurent lors de l'hypoxie seule et les écarts de viabilité entre hypoxie et hypoxie-réoxygénation ne sont plus apparents. Des expériences préliminaires ont montré que la viabilité cellulaire tend vers zéro pour des temps d'hypoxie de 4 à 5 heures. Il n'est donc plus possible de montrer l'effet dû à la réoxygénation pour des temps aussi longs. Dans le cadre de ce travail sur les effets toxiques de la réoxygénation, le temps optimal d'hypoxie est celui pour lequel la viabilité cellulaire après hypoxie seule est encore très élevée et pour lequel la réoxygénation entraîne la mort du plus grand nombre de cellules.

Sur base de ces résultats initiaux, nous avons sélectionné une période de 120 minutes d'hypoxie suivie par 45 minutes de réoxygénation comme temps optimum pour l'ensemble des expériences ultérieures (graphiques 1 et 2).

La planche 3 montre l'aspect des cellules au cours d'une telle expérience. Ce support photographique présente la morphologie de cellules témoins, de cellules après 120 minutes d'hypoxie et de celles qui ont subi 120 minutes d'hypoxie suivies par 45 minutes de réoxygénation. Ces photos illustrent les résultats obtenus au graphique 1.

Planche 3 : Morphologie des cellules endothéliales sous hypoxie-réoxygénation.

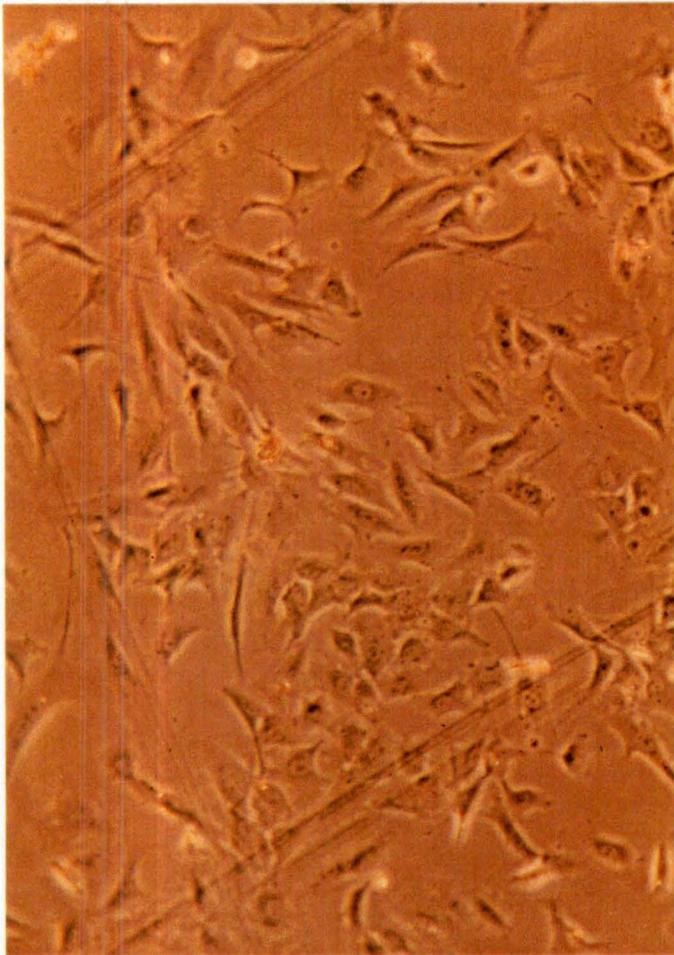


Photo A : Cellules endothéliales témoins en présence d'érythrosine B (G = 115x)

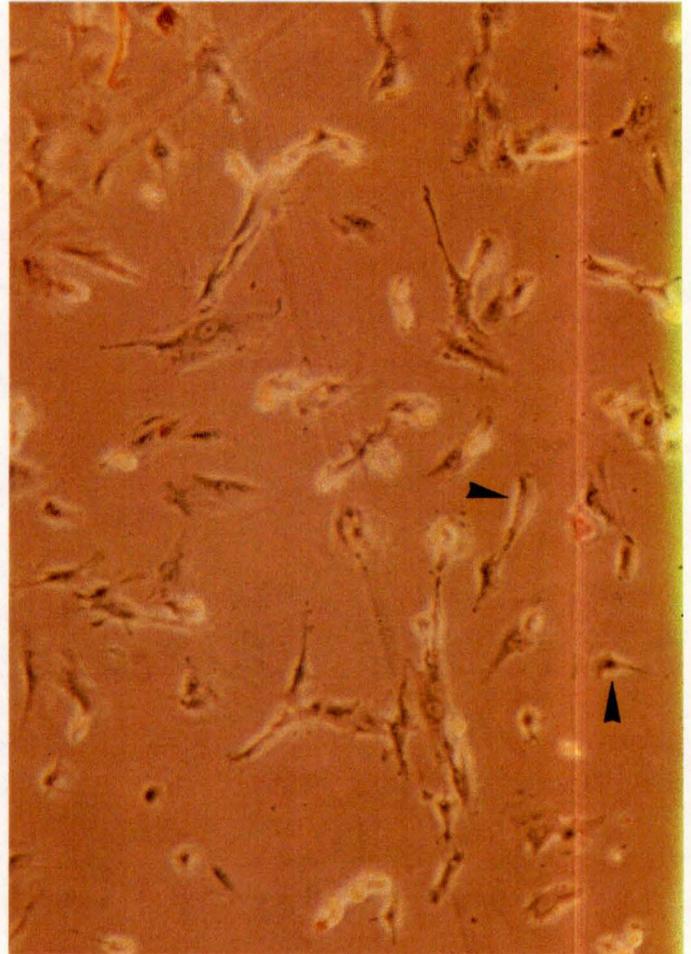


Photo B : Cellules endothéliales ayant subi 2 heures d'hypoxie. La densité cellulaire diminue légèrement, les cellules s'arrondissent mais restent viables (▶), elles ne se colorent pas en présence d'érythrosine B (G = 115x).



Photo C : Cellules endothéliales ayant subi 2 heures d'hypoxie et 45 minutes de réoxygénation. Après cette incubation, une partie des cellules restant attachées au support ne sont plus viables : elles deviennent rouges lors du test à l'érythrosine B (▶) (G = 115x).

Les critères utilisés afin d'apprécier la mort cellulaire sont au nombre de deux : un test d'exclusion de colorant (érythrosine B) qui permet de quantifier la viabilité cellulaire des cellules adhérant encore au substrat et un comptage des cellules avant et après l'expérience pour estimer l'importance du détachement des cellules après leur mort. Les graphiques présentant la récupération cellulaire évaluent l'importance de ce détachement. Il est utile d'associer ces graphiques de récupération à ceux de la viabilité. En effet, l'évolution de la viabilité cellulaire ne peut se faire que sur les cellules encore présentes et ne tient nullement compte des cellules mortes et détachées au cours de l'expérience. Pour les premières expériences réalisées, la technique de comptage n'était pas parfaite. Le comptage se réalisait sur des surfaces trop grandes nécessitant de nombreux champs microscopiques pour être balayées. Cette source d'imprécisions expliquent que certains graphiques de récupération montrent des valeurs assez variables et parfois supérieures à 100%. Avec la réduction de la taille des carrés de comptage, la technique s'est affinée et les résultats sont devenus plus précis.

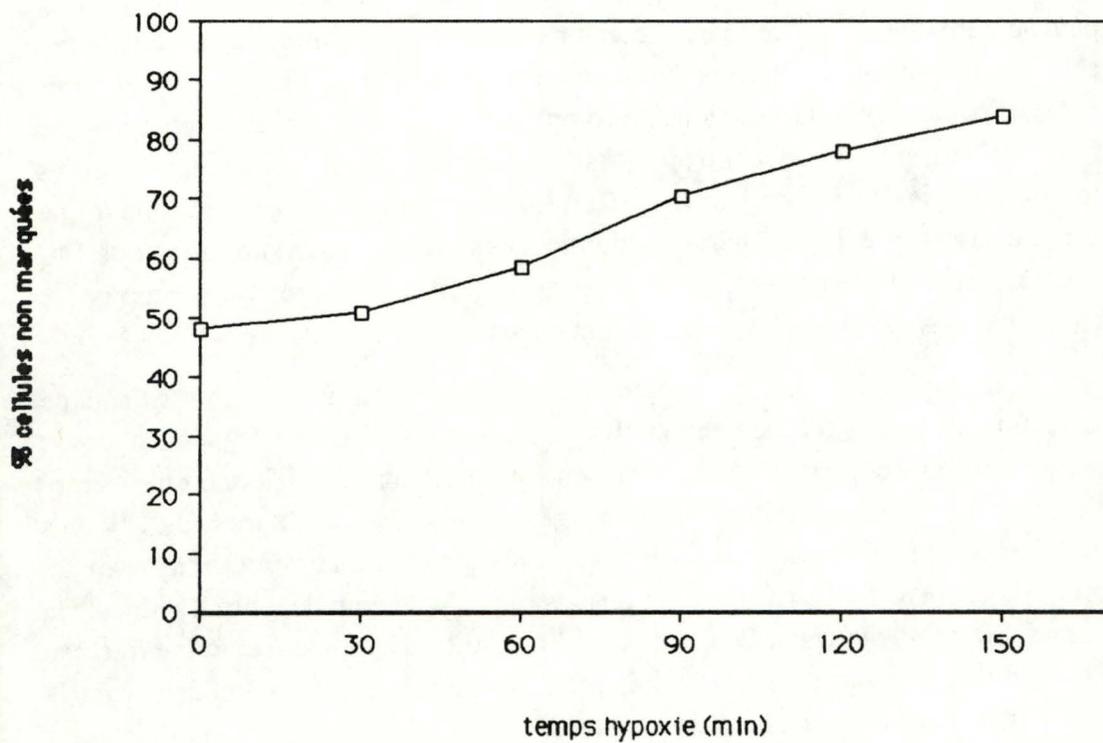
Les graphiques 1 et 2 permettent de comparer l'évolution de la viabilité et de la récupération des cellules endothéliales soumises à différents types d'hypoxie suivis ou non de réoxygénation. On peut observer un parallélisme étroit entre l'évolution de ces deux critères. La réoxygénation occasionne la mort de 13% des cellules ayant subi deux heures d'hypoxie. En augmentant les temps d'hypoxie, la mortalité devient trop forte que pour observer un supplément de mortalité lors de la réadmission de l'oxygène. Le temps de 120 minutes d'hypoxie n'entraîne que peu de mortalité cellulaire mais conduit à l'accroissement le plus important de la mortalité cellulaire lors de la réoxygénation.

Remarque : Bien que le pourcentage de mortalité cellulaire soit toujours plus important après la réoxygénation, il n'excède jamais 12-13%. On observe également une variabilité d'expériences à expériences. Cette variabilité peut s'expliquer par l'utilisation de cellules de souches différentes en provenance de cordons ombilicaux différents. Ces cellules de souches différentes présentent probablement des sensibilités distinctes au phénomène d'hypoxie-réoxygénation.

Sur base de cette courbe de temps, nous avons entamé les essais de protection.

b) Effets sur différents paramètres cellulaires

Cependant, jusqu'à présent, nous nous sommes contentés d'estimer l'influence de l'hypoxie-réoxygénation sur la mortalité des cellules endothéliales. Il



Graphique A : Evolution de la proportion de cellules endothéliales non marquées par la thymidine tritiée après des temps croissants d'incubation sous hypoxie. Le marquage fut réalisé pendant 48 heures.

Planche 4 : Incorporation de la thymidine tritiée par des C.E. après différents temps d'hypoxie (G = 144 x).

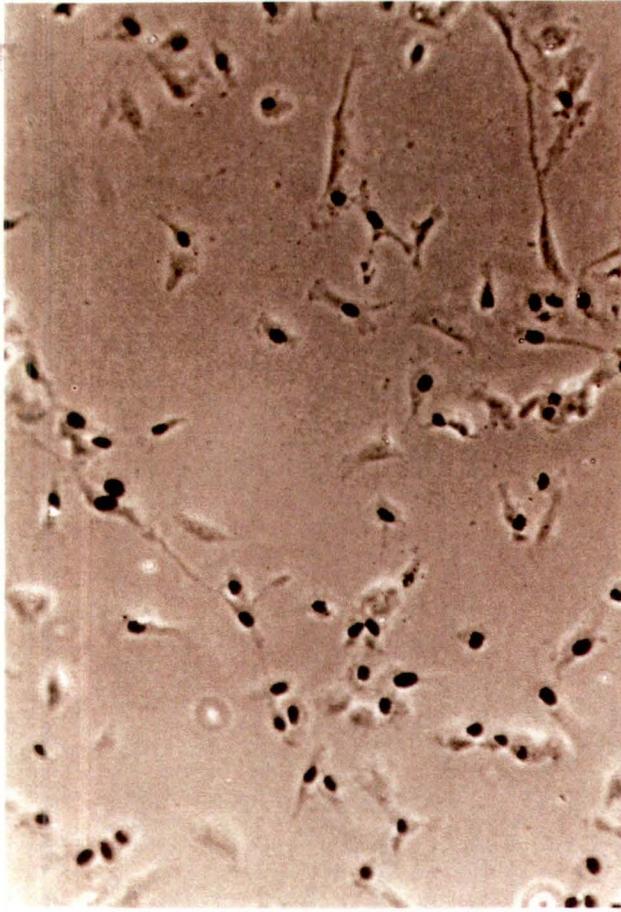


Photo A : 0 minutes d'hypoxie (témoin)



Photo B : 90 minutes d'hypoxie

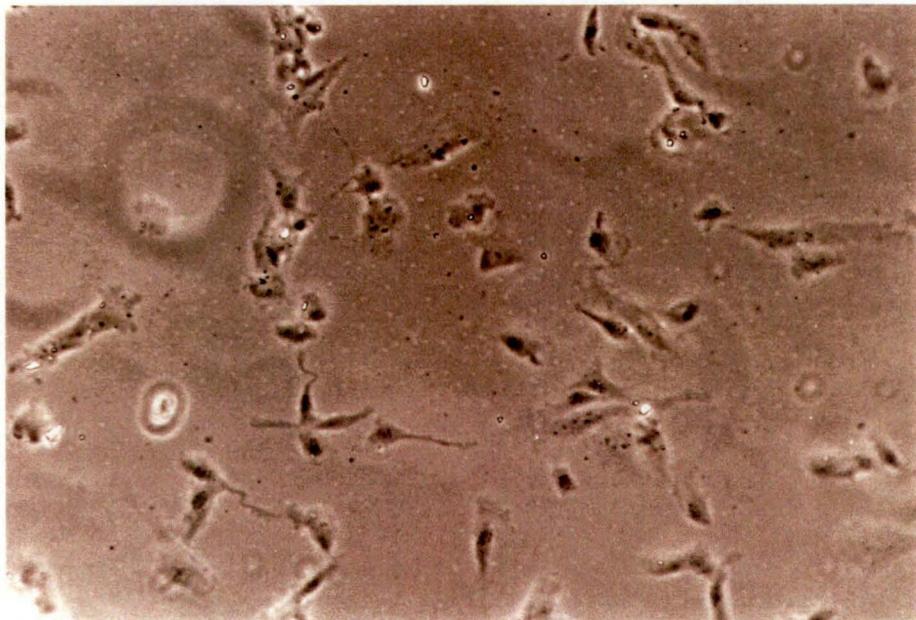


Photo B : 150 minutes d'hypoxie

est intéressant de voir si ce double choc n'induit pas d'autres changements métaboliques. Nous avons recherché l'implication éventuelle de l'hypoxie-réoxygénation sur les capacités de division des cellules, sur la synthèse des protéines et sur une diminution éventuelle des capacités de défense enzymatique.

1) Autoradiographie

Ce test d'incorporation de la thymidine tritiée dans l'ADN permet d'évaluer les capacités de division de la cellule et l'efficacité de synthèse de cette molécule.

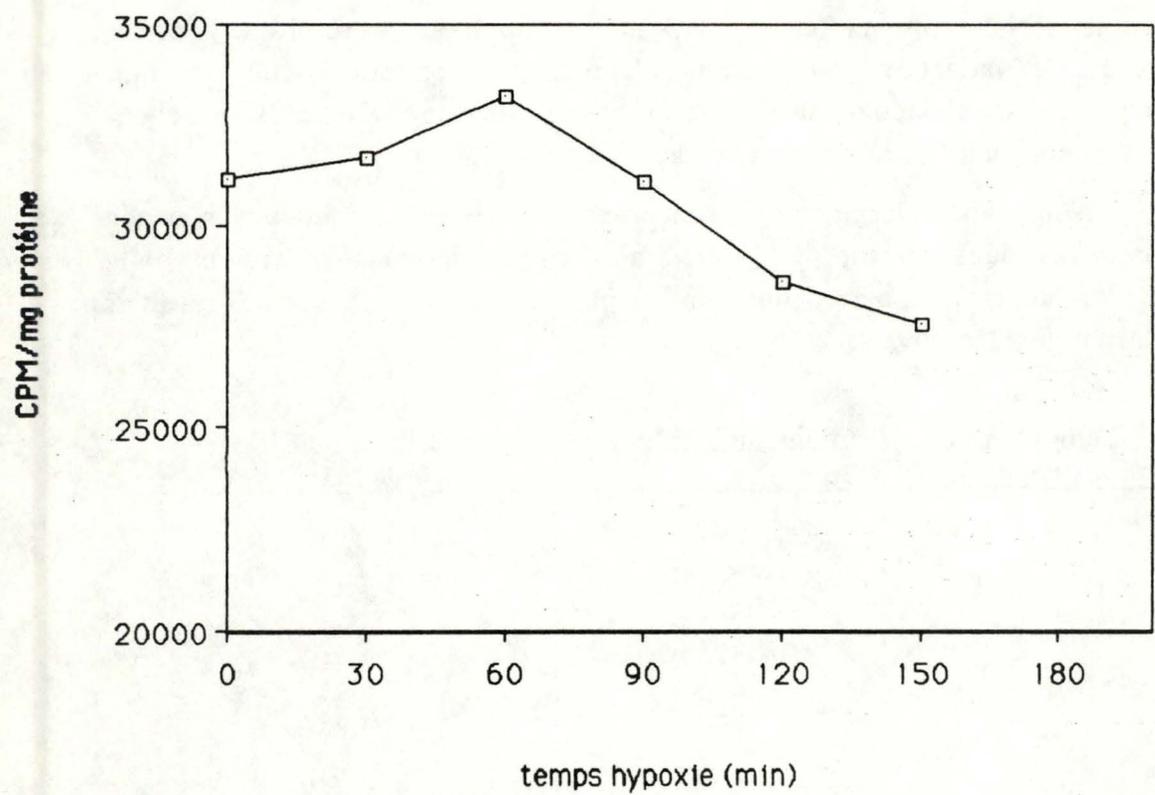
Pour avoir une idée de l'impact de l'hypoxie-réoxygénation sur la synthèse de l'ADN, on a incubé des C.E. avec de la thymidine tritiée pendant 48 heures dans une atmosphère normale (étuve à CO₂) après leur avoir fait subir une hypoxie, d'une durée variant de 0 à 150 minutes. La réoxygénation est inévitablement plus longue que 45 minutes en raison de l'incubation de 48 heures. Ce temps a été choisi en fonction du temps de doublement des C.E. = 36 heures.

Nous avons alors déterminé la proportion des cellules marquées et non marquées dans un lot de 500 cellules prises au hasard dans la boîte d'autoradiographie pour chaque temps d'incubation sous hypoxie; les résultats obtenus sont les suivants :

Temps hypoxie (minutes)	Cellules marquées (%)	Cellules non marquées (%)
0	52	48
30	49	51
60	41,5	58,5
90	29,5	70,5
120	22	78,0
150	16	84,0

Les résultats présentés au graphique A expriment le % de cellules non marquées en fonction du temps d'hypoxie. On constate qu'au temps 0, 50% des cellules se divisent alors qu'après 150 minutes d'hypoxie, seulement 16% incorporent la thymidine.

La planche 4 montre l'évolution photographique du marquage.



Graphique B : Effet de différents temps d'hypoxie sur l'incorporation de leucine tritiée par des cellules endothéliales.

Nous pouvons donc penser que l'hypoxie-réoxygénation perturbe les mécanismes de synthèse de l'ADN et donc la capacité de division des cellules qui y sont soumises.

2) *Incorporation de leucine tritiée par des cellules endothéliales après différents temps d'hypoxie*

Un moyen d'investiguer la synthèse protéique est de la suivre grâce à l'incorporation d'un acide aminé marqué. Des cellules endothéliales ayant subi différents temps d'hypoxie allant de 0 à 150 minutes sont incubées avec de la leucine tritiée pendant une période de 6 heures dans une atmosphère normale (étuve à CO₂). En connaissant le nombre de coups par minute (CPM mesuré par un compteur à scintillations) et la quantité de protéines (déterminée par la méthode de Lowry *et al.*, 1951), nous pouvons calculer le nombre de coups par minute par mg de protéines (CPM/mg de protéines) pour chaque temps d'incubation sous hypoxie. Une fois encore, le mode opératoire réclamant 6 heures d'incubation en présence de leucine nous impose un temps de réoxygénation plus long que les 45 minutes choisies pour les expériences de protection.

Les résultats sont rapportés sur le graphique B.

Temps d'hypoxie (minute)	CPM/mg de protéines
0	31 170
30	31 676
60	33 200
90	31 106
120	28 582
150	27 586

Nous pouvons considérer que nous sommes en présence d'un plateau jusqu'à 90 minutes d'hypoxie et qu'une descente s'amorce alors. Après 150 minutes, on peut constater une diminution de l'incorporation de l'ordre de 13%.

Des expériences supplémentaires (notamment avec des temps d'hypoxie plus longs) seraient nécessaires pour confirmer ces résultats.

Toutefois, tout en restant prudent, une diminution de l'incorporation de leucine tritiée traduisant une baisse de l'activité de synthèse protéique des cellules en hypoxie est explicable par le fait que cette synthèse est un processus dépendant de l'ATP.

3) *Dosage des trois enzymes antioxydantes (SOD, CAT, GPX) dans les cellules endothéliales après hypoxie*

Nous avons tenté de comparer l'activité de ces enzymes dans des cellules ayant subi 120 minutes d'hypoxie à l'activité de ces mêmes enzymes dans des cellules endothéliales n'ayant rien subi (témoin). L'idée d'entreprendre une telle expérience nous a été suggérée par la littérature abondante rapportant un amoindrissement des systèmes de défenses endogènes contre les radicaux libres pendant une ischémie.

Les résultats sont les suivants : les dosages ont été réalisés sur des boîtes soeurs pour écarter un maximum de variabilité résiduelle.

Enzyme	C.E. (témoin) (unités/mg protéines)	C.E. sous hypoxie (unités/mg de protéines)
SOD	22,4	18,7 ± 1,13
GPX	0,024	0,018 ± 0,0014
Catalase	0,0038	0,00325 ± 0,00035
G _{Réd}	0,018 (n = 1)	0,0155 ± 0,0014 (n = 2)

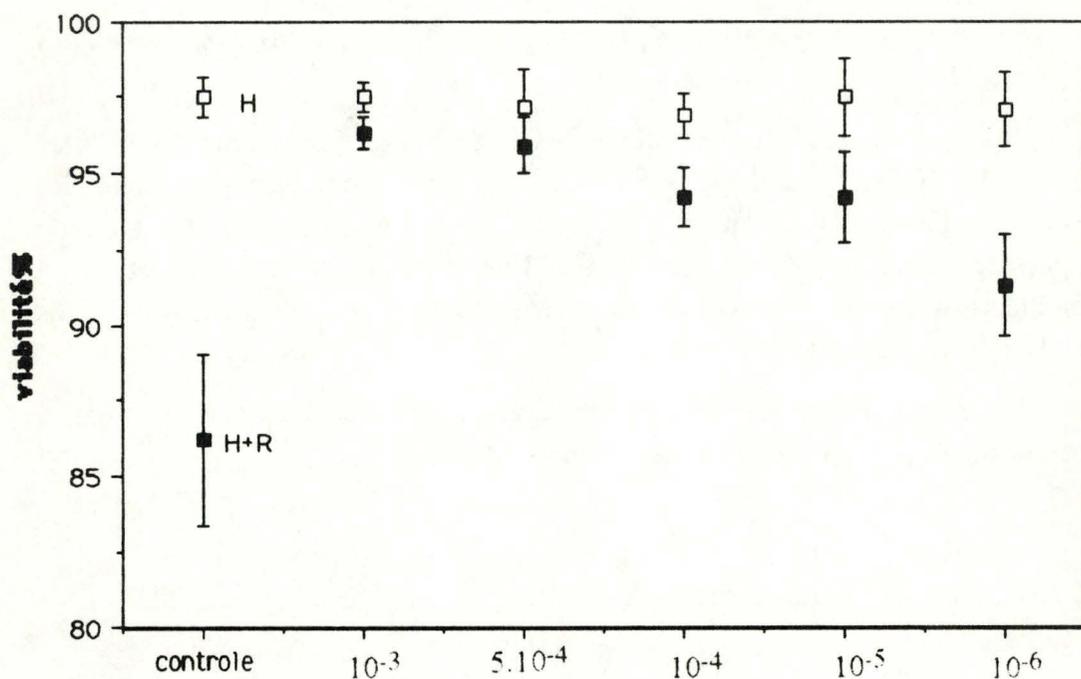
N'ayant qu'une valeur pour le témoin, il est impossible de prétendre à des résultats significatifs. La raison est que pour ces dosages, il faut partir de boîtes de cultures T75 à confluence qui demandent beaucoup de cellules. Néanmoins, on observe une tendance à la diminution des activités enzymatiques. Le fait que cette baisse soit observée pour les quatre enzymes et que les écarts types du test soient très faibles suggérerait qu'une diminution de l'activité de ces enzymes puisse se produire pendant l'hypoxie.

En se basant sur ces résultats, on peut donner le rapport de l'activité de chaque enzyme dans les C.E. sous hypoxie ou témoin.

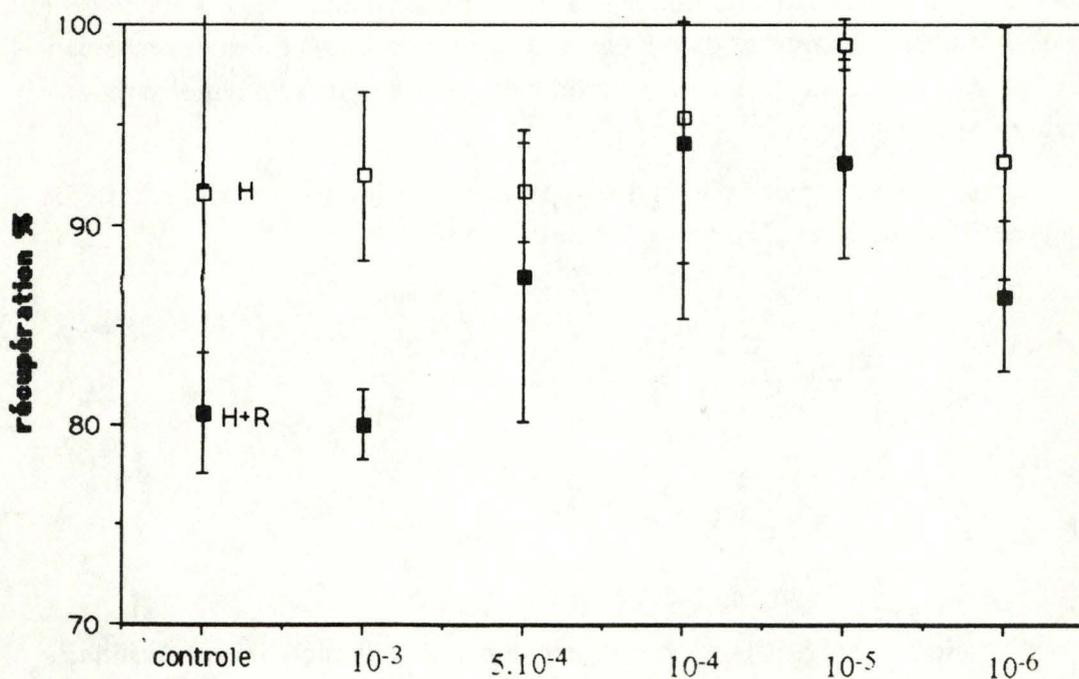
Rapport des activités des C.E. ayant subi
120 minutes d'hypoxie/témoin

SOD	83%
GPX	75%
Catalase	85%
G _{Réd}	86%

Guarnieri *et al.* (1980) ont observé une diminution de l'activité enzymatique à la fois de la GPX et de la SOD dans le myocyte après une hypoxie prolongée. Cette diminution des systèmes de défense pourraient rendre l'organe et les cellules plus



Graphique 3 : Effet de différentes concentrations en vitamine E sur la viabilité cellulaire après 120 minutes d'hypoxie seule (H) et après 120 minutes d'hypoxie + 45 minutes de réoxygénation (H+R). Le contrôle représente des cellules ayant subi les mêmes incubations sans addition de vitamine E (n=2).



Graphique 4 : Récupération cellulaire associée à l'expérience de protection par la vitamine E (n=2).

vulnérables aux attaques radicalaires se produisant lors de la reperfusion (Burton *et al.*, 1984).

Ces dernières expériences ne sont que des expériences préliminaires destinées à ouvrir des portes sur d'autres investiguant la répercussion de l'hypoxie-réoxygénation sur un certain nombre de fonctions métaboliques des cellules endothéliales. Elles montrent cependant déjà que, bien qu'on n'observe pas de différences de viabilité par rapport au témoin après une période de 2 heures d'hypoxie, la cellule subit un certain nombre de changements biochimiques susceptibles d'amoinrir les capacités de défense contre les radicaux libres libérés lors de la réoxygénation qui s'en suit.

(2) Expériences de protection

a) Etude de l'implication des radicaux libres dans l'hypoxie-réoxygénation

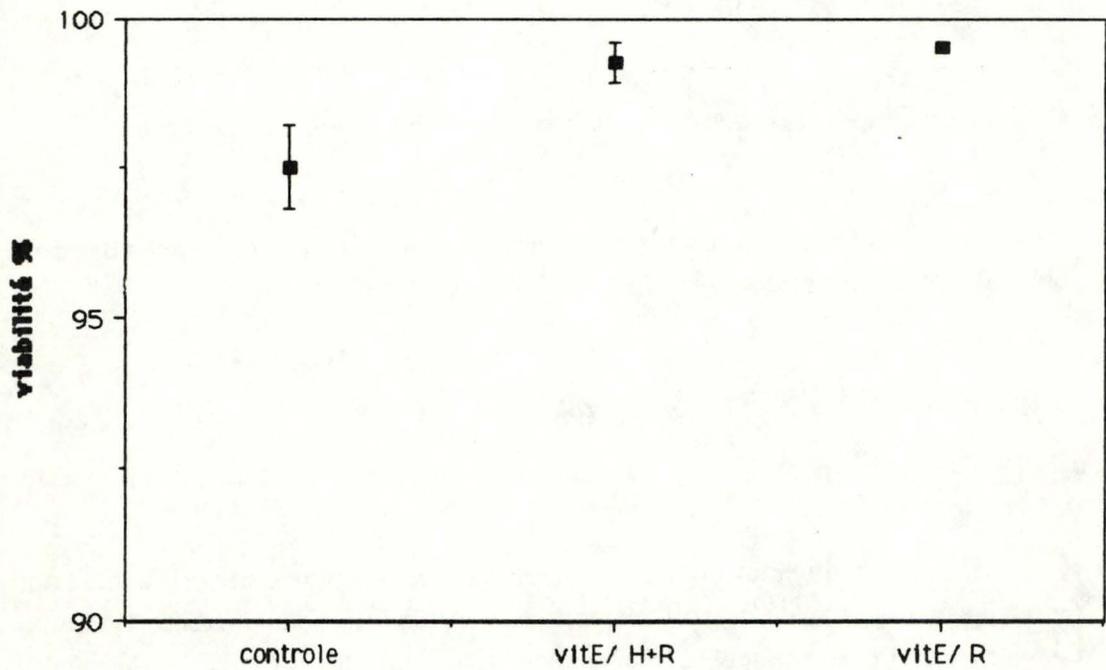
Pour investiguer les mécanismes radicalaires, nous avons fait appel à diverses molécules ayant des effets spécifiques.

1) Effet de la vitamine E ou α -tocophérol

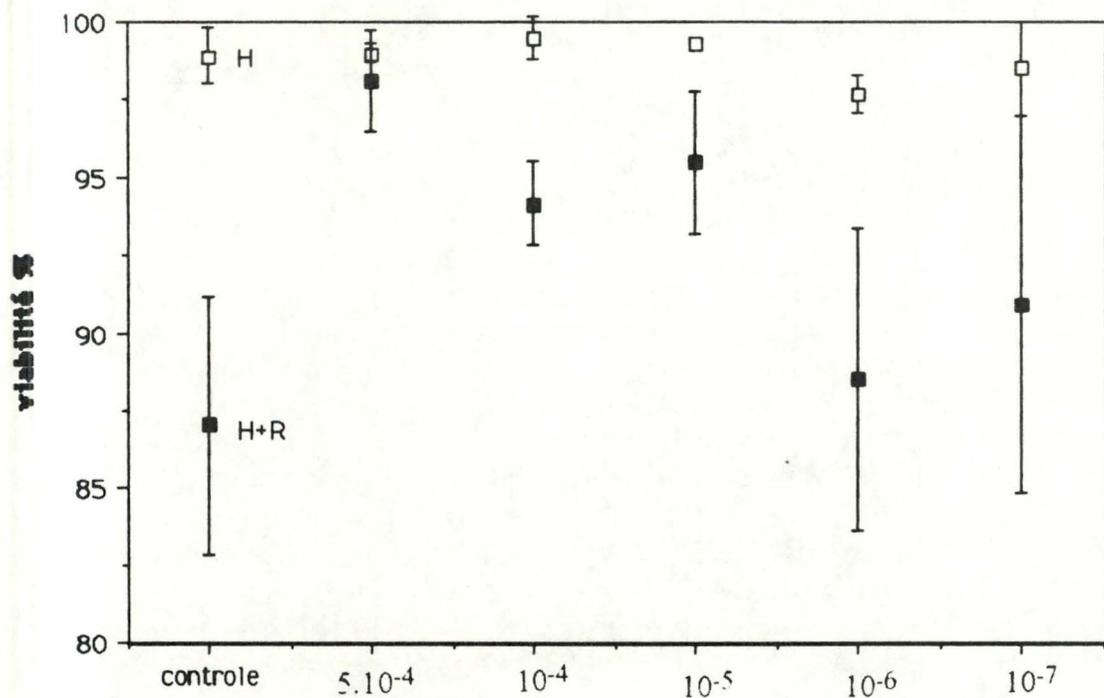
La caractérisation de cette molécule ainsi que son mode d'action sont décrits dans l'introduction.

Cette molécule étant lipophile nécessite d'être dissoute dans l'éthanol. Pour éviter l'effet toxique de ce solvant pour les cellules, la concentration finale en éthanol ne doit pas excéder 0,5%. Dans les boîtes de Pétri, les C.E. sont incubées pendant toute la durée de l'expérience avec différentes concentrations en vitamine E. Les résultats sont présentés aux graphiques 3 et 4. Si on prend en compte le critère de récupération cellulaire, on observe une nette protection par l' α -tocophérol aux concentrations de 10^{-3} M et de $5 \cdot 10^{-4}$ M. L'efficacité de protection diminue ensuite en fonction de la concentration en cette molécule. La concentration en α -tocophérol donnant environ 50% de protection se situe à 10^{-6} M. Remarquons aussi que cette molécule n'a pas d'effet protecteur sur la viabilité des cellules n'ayant subi qu'une hypoxie seule.

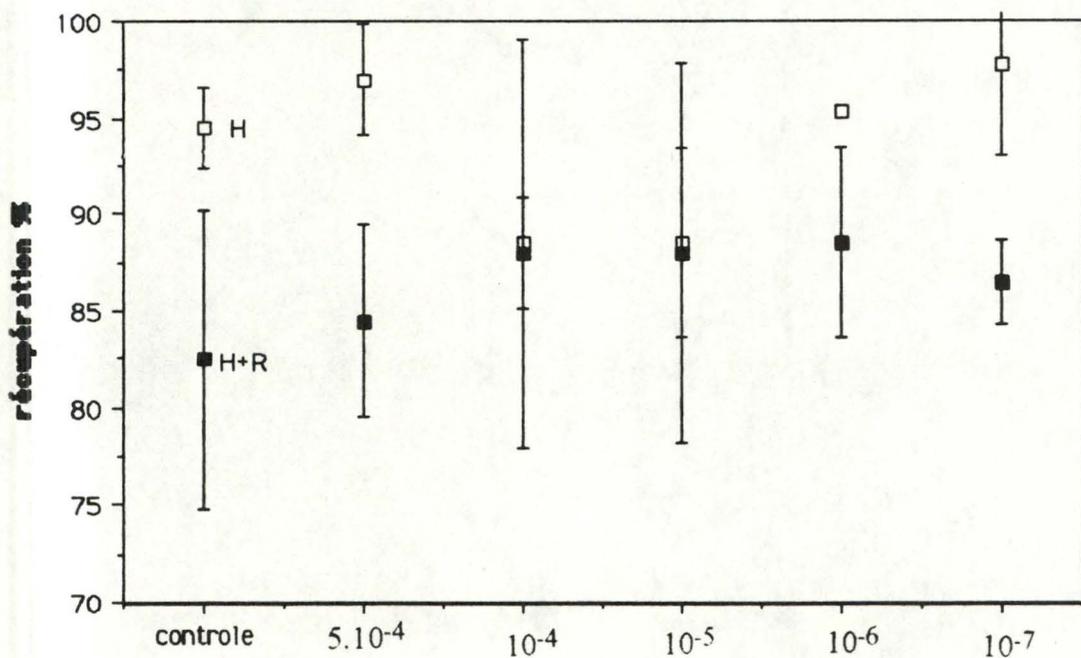
Bien que nous n'ayons pas encore beaucoup d'informations à ce niveau du travail, nous pouvons postuler que la capacité de cette vitamine à s'insérer dans les membranes et d'y empêcher les réactions de propagation de la peroxydation lipidique permet à cette molécule antioxydante de fournir un haut degré de



Graphique 5 : Comparaison de l'effet de la vitamine E à la concentration de $5 \cdot 10^{-4}M$ sur la viabilité des cellules endothéliales soumises à l'hypoxie-réoxygénation. La vitamine E est ajoutée au milieu de culture juste avant réoxygénation (R) ou présente dans le milieu pendant toute la durée de l'expérience (H+R) (n=2).



Graphique 6 : Effet de différentes concentrations en vitamine C sur la viabilité cellulaire après 120 minutes d'hypoxie seule (H) et après 120 minutes d'hypoxie + 45 minutes de réoxygénation (H+R). Le contrôle représente des cellules ayant subi les mêmes incubations sans addition de vitamine C (n=2).



Graphique 7 : Récupération cellulaire associée à l'expérience de protection par la vitamine C (n=2).

protection. Nous pouvons donc penser à une perte de l'intégrité membranaire qui conduirait à la mort cellulaire observée.

- Administration de l' α -tocophérol juste avant la réoxygénation

Si les cellules sont soumises à l'hypoxie dans du milieu M₁₉₉ + S et que la molécule protectrice n'est ajoutée au milieu de culture qu'au moment de la réoxygénation, on observe une efficacité de protection comparable à celle obtenue lors de l'ajout de la vitamine E pendant toute l'incubation (graphique 5).

Bien que le contrôle soit particulièrement élevé (souche peu sensible), ceci suggère que les dommages oxydatifs entraînant la mort cellulaire surviennent principalement au moment de la réoxygénation et pas pendant l'hypoxie puisque la vitamine E protège aussi bien lors de son rajout au moment de la réadmission de O₂. Pour cette expérience, nous avons utilisé une concentration en α -tocophérol qui protégeait très bien ($5 \cdot 10^{-4}M$).

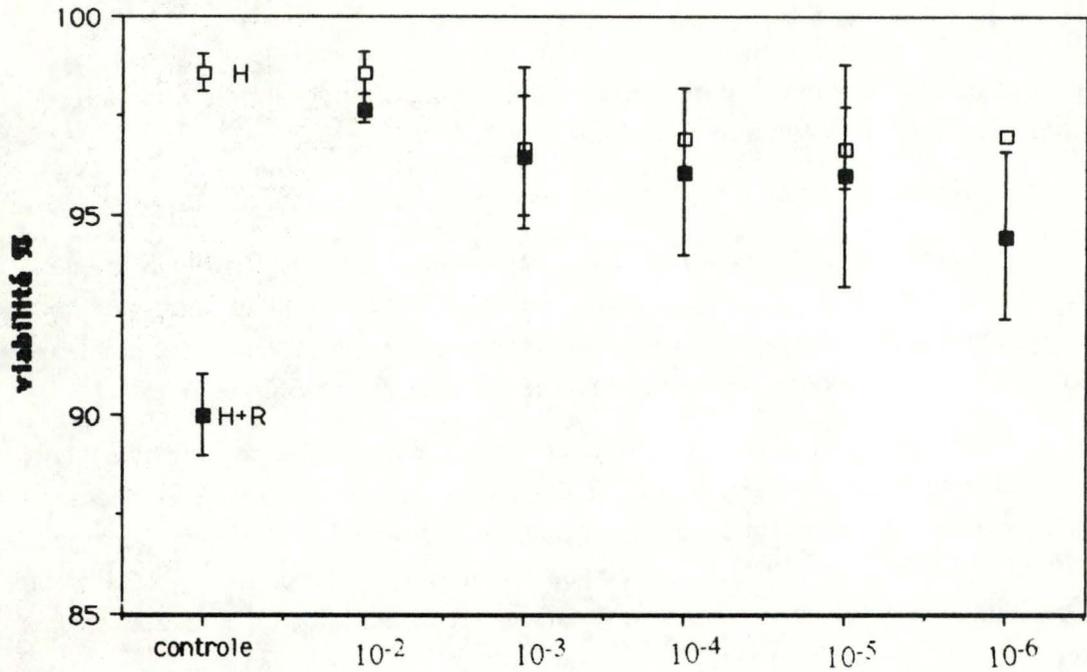
2) Effet de la vitamine C ou acide ascorbique

Fortement hydrophile, l'acide ascorbique se dissout directement dans le milieu de culture mais ne diffuse pas dans les membranes cellulaires. Sa pénétration dans la cellule est autorisée par un mécanisme de transport actif.

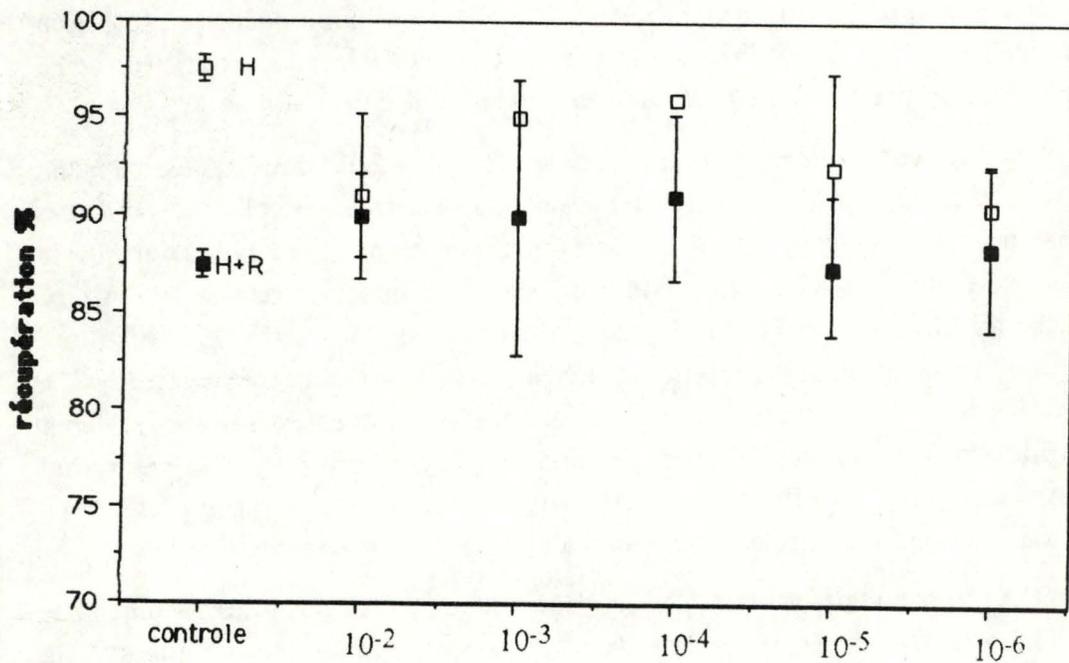
Les résultats sont présentés aux graphiques 6 et 7. On observe également une protection maximale sur la viabilité à $5 \cdot 10^{-4}M$, une diminution de la protection corrélée à la diminution de la concentration en vitamine C. La concentration en acide ascorbique donnant 50% de protection est de l'ordre de $5 \cdot 10^{-6}M$.

Son rôle de scavenger de radicaux libres hydrosolubles ainsi que sa capacité de réduire la vitamine E présente dans les cellules pourraient expliquer son action protectrice sur les cellules en hypoxie-réoxygénation. Nous avons vu que la vitamine C pouvait se révéler toxique à forte concentration par son action pro-oxydante. Malgré la présence d'ions cuivre présents dans le milieu de culture susceptibles de catalyser la réaction d'oxydation de la vitamine C (Lovstad, 1987), nous n'observons pas cet effet toxique. Deux raisons peuvent être invoquées pour l'expliquer : d'une part, les concentrations en acide ascorbique utilisées sont relativement faibles ($5 \cdot 10^{-4}M$) et d'autre part, le temps d'incubation en présence de la molécule n'est peut-être pas suffisant pour que la toxicité se manifeste.

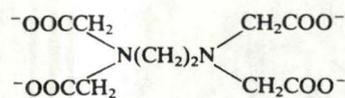
La protection par la vitamine E et par la vitamine C des cellules endothéliales de l'hypoxie-réoxygénation sont deux arguments importants en faveur de l'intervention des radicaux libres dérivés de O₂ dans ce modèle. Nous n'avons cependant pas encore d'indication quant à la nature de(s) espèce(s) radicalaire(s) impliquée(s).



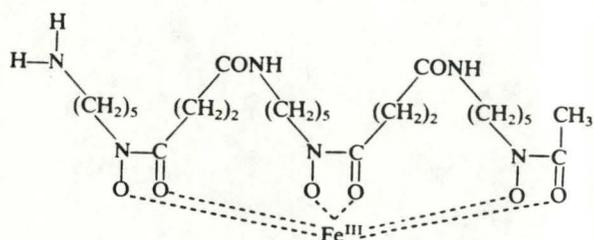
Graphique 8 : Effet de différentes concentrations en mannitol sur la viabilité cellulaire après 120 minutes d'hypoxie seule (H) et après 120 minutes d'hypoxie + 45 minutes de réoxygénation (H+R). Le contrôle représente des cellules ayant subi les mêmes incubations sans addition de mannitol (n=2).



Graphique 9 : Récupération cellulaire associée à l'expérience de protection par le mannitol (n=2).

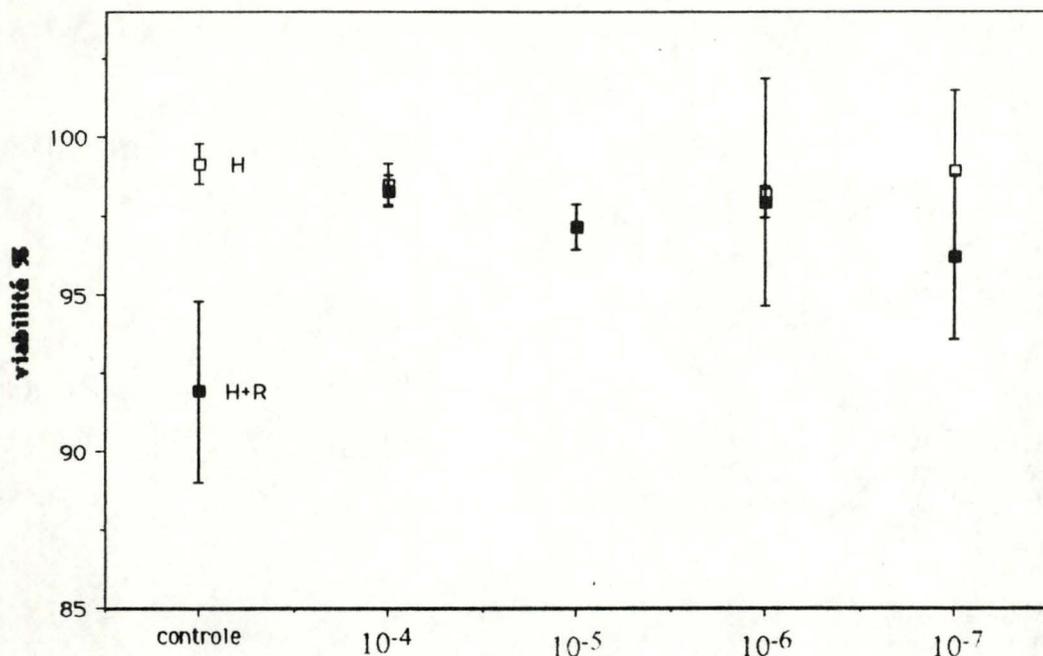


EDTA (ethylenediamine-tetraacetic acid), ion

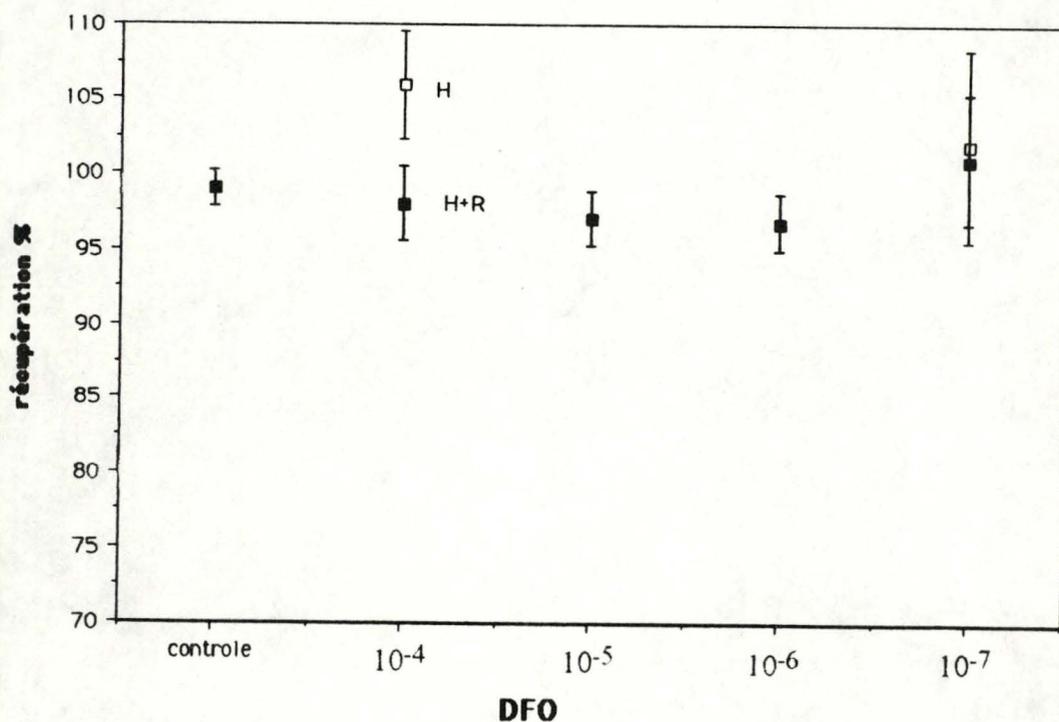


Desferrioxamine B

Figure 27 : Structure de l'EDTA et de la desferrioxamine B. Deux chélateurs d'ions métalliques (d'après Halliwell and Gutteridge, 1985).



Graphique 10 : Effet de différentes concentrations en desferrioxamine sur la viabilité cellulaire après 120 minutes d'hypoxie seule (H) et après 120 minutes d'hypoxie + 45 minutes de réoxygénation (H+R). Le fait qu'un seul point expérimental apparaisse parfois est dû à la surimposition des résultats H et H+R pour ces concentrations. Le contrôle représente des cellules ayant subi les mêmes incubations sans addition de desferrioxamine (n=2).



Graphique 11 : Récupération cellulaire associée à l'expérience de protection par la desferrioxamine (n=2).

3) Effet du mannitol

Cette molécule de faible poids moléculaire est reconnue comme un capteur spécifique des $\cdot\text{OH}$ et pénètre dans la cellule (Rubanyi, 1987). D'autres molécules telles que le diméthylsulfoxyde (DMSO) et la diméthylthiourée ont la même propriété que le mannitol. L'efficacité de la protection conférée par le mannitol dans notre modèle est présentée par les graphiques 8 et 9. Nous observons une protection maximale obtenue à 10^{-2}M , cette protection diminue lentement avec la concentration. La concentration en mannitol donnant 50% de protection est de 10^{-6}M .

Les radicaux hydroxyles sont les espèces les plus réactionnelles et sont capables d'initier la peroxydation lipidique en réalisant l'abstraction d'un atome d'hydrogène à un acide gras insaturé. La protection apportée par des molécules qui captent ces $\cdot\text{OH}$ pourrait signifier que les attaques radicalaires responsables des lésions cellulaires entraînant la mort de la cellule sont médiées en tout ou en partie par les $\cdot\text{OH}$. Une alternative pour cerner le rôle joué par les radicaux hydroxyles consiste à utiliser une molécule empêchant la formation des $\cdot\text{OH}$ par la réaction de Fenton. Le fer étant indispensable à la catalyse de cette réaction *in vivo*, l'utilisation d'un chélateur de cet ion devrait avoir un effet similaire à celui d'un scavenger des $\cdot\text{OH}$. Pour vérifier l'implication du fer dans la production de radicaux plus toxiques, nous avons testé la desferrioxamine.

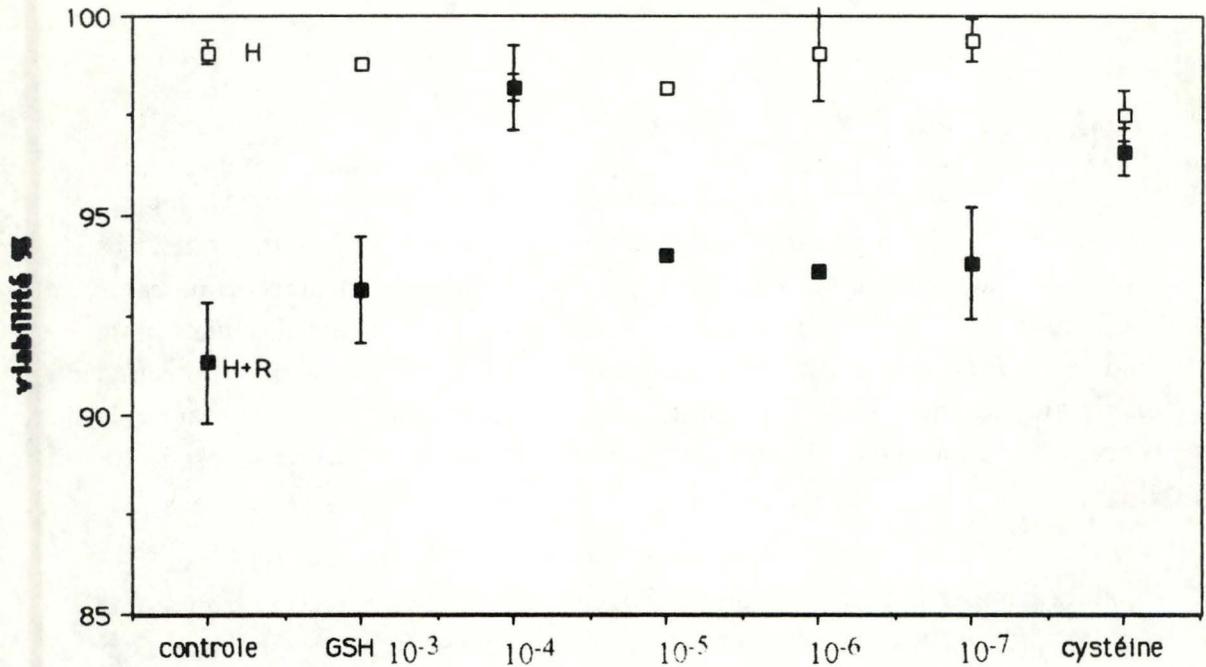
4) Effet de la desferrioxamine B (DFO)

La comparaison des structures de la DFO et de l'EDTA (acide éthylène diaminé tétraacétique) est montrée à la figure 27.

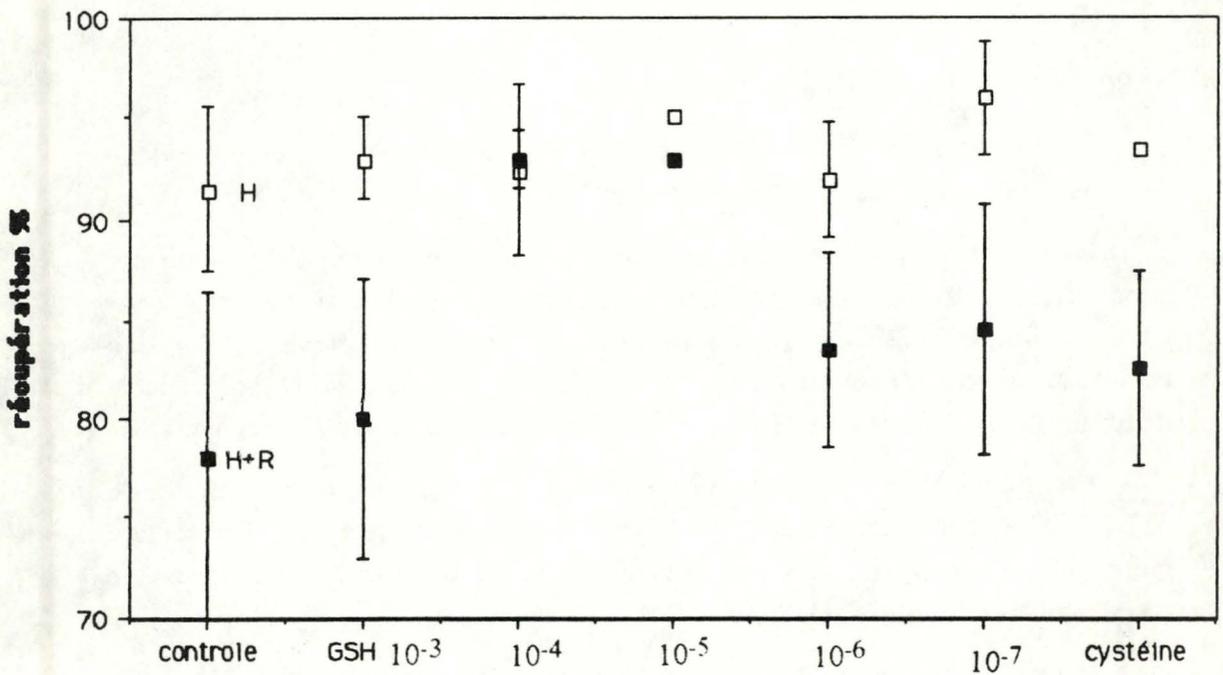
La desferrioxamine est un exemple de sidérophore (composé produit par certains microorganismes pour chélater le fer du milieu de culture et le transporter dans la cellule). La DFO, molécule linéaire, complexe spécifiquement le Fe^{3+} en créant six liaisons de coordination avec l'oxygène. Le fer lié à la DFO est incapable de réagir ultérieurement avec H_2O_2 ou les $\text{O}_2^{\cdot(-)}$ dans la réaction d'Haber-Weiss.

Commercialement disponible sous le nom de "Desferal", elle a un P.M. de 657. L'EDTA chélate également le Fe^{3+} et le Fe^{2+} mais autorise encore une réaction entre le fer et H_2O_2 ou avec les radicaux superoxydes puisqu'une liaison de coordination du fer est laissée libre.

Pour cibler le rôle joué par les $\cdot\text{OH}$, nous avons réalisé une expérience en présence de différentes concentrations en DFO. Les résultats sont montrés aux graphiques 10 et 11. On constate une protection qui s'avère très significative. La



Graphique 12 : Effet de différentes concentrations en GSH et de la cystéine à 10⁻⁴M sur la viabilité cellulaire après 120 minutes d'hypoxie seule (H) et après 120 minutes d'hypoxie + 45 minutes de réoxygénation (H+R). Le contrôle représente des cellules ayant subi les mêmes incubations sans addition de GSH ni de cystéine (n=2).



Graphique 13 : Récupération cellulaire associée à l'expérience de protection par le GSH et la cystéine (n=2).

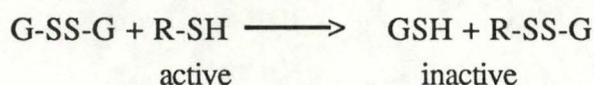
protection maximale s'observe entre $10^{-4}M$ et $10^{-8}M$. Par calcul, on montre qu'une concentration de $10^{-7}M$ donne encore 50% de protection. Cette molécule étant très bénéfique, les radicaux hydroxyls pourraient donc *in fine* être responsables des lésions cellulaires survenant lors de la réoxygénation après hypoxie. Ces $\cdot OH$ seraient générés majoritairement par la réaction de Fenton.

5) Influence du GSH et de la cystéine

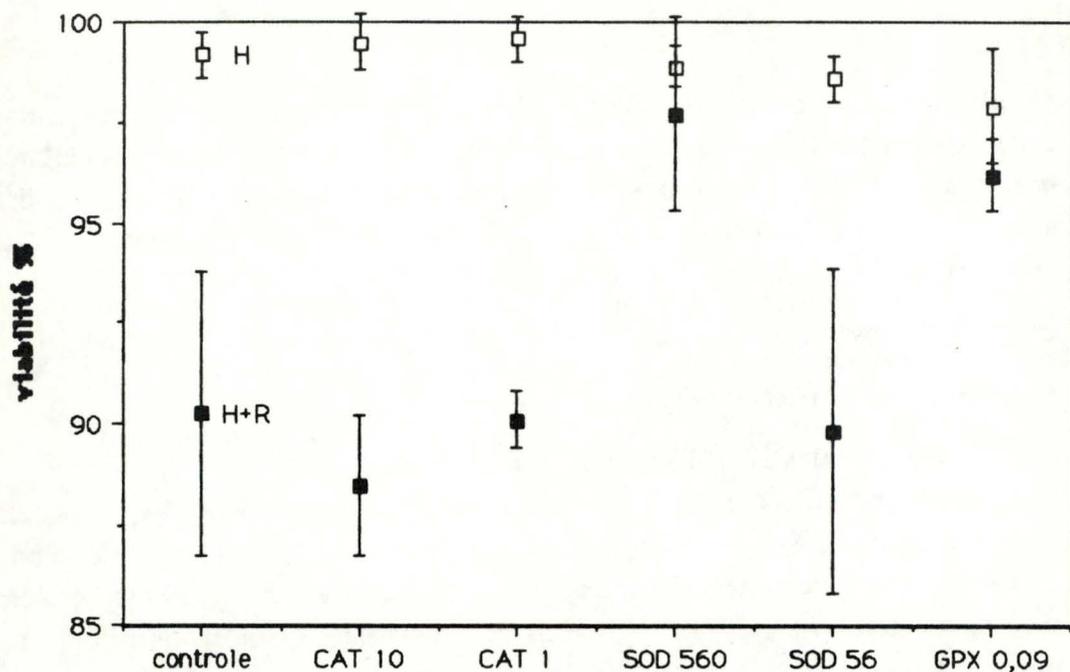
Les graphiques 12 et 13 représentent l'effet du glutathion et de la cystéine. Cette molécule n'influence pas la viabilité des cellules soumises à une hypoxie seule mais semble protéger les cellules soumises à une hypoxie suivie d'une réoxygénation : cette protection est maximale à $10^{-4}M$ mais diminue très rapidement si la concentration en GSH s'abaisse. Il faut remarquer qu'on n'observe pas de protection à une concentration de $10^{-3}M$. Cette expérience fut réalisée deux fois par deux expérimentateurs différents et deux fois, les mêmes résultats furent obtenus. La concentration pour laquelle la protection est de 50% est de l'ordre de $5 \cdot 10^{-5}M$. A la recherche d'une explication du mécanisme d'action éventuel de cette molécule, nous avons testé la cystéine. Le fait que la cystéine utilisée à la concentration optimale en GSH de $10^{-4}M$ protège efficacement autorise à penser que c'est grâce à l'intervention du groupement thiol porté par ces deux molécules qu'elles ont une activité protectrice.

Le glutathion et surtout le rapport GSH/GSSG a une importance considérable sur l'état rédox de la cellule (Halliwell and Gutteridge, 1985). La présence de cette molécule est importante dans la protection des cellules face aux radicaux libres. Le GSH possède une activité antioxydante en tant que tel puisqu'il réagit directement avec $O_2^{\cdot(-)}$ et $ROO\cdot$. De plus, cette molécule intervient dans le cycle catalytique de la GPX pour réduire les hydroperoxydes lipidiques (Chance *et al.*, 1979). Des études réalisées *in vitro* en l'absence d'enzymes ont montré que le GSH serait capable d'aider à la régénération de la vitamine C en formant avec elle un couple rédox (Winkler, 1987).

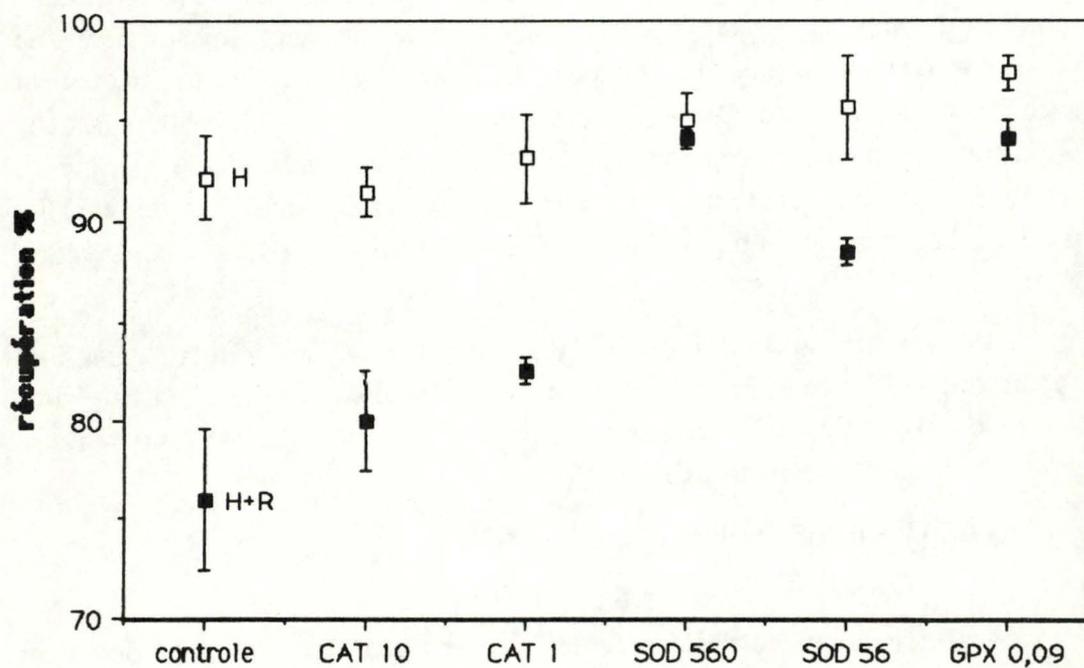
Une manifestation importante d'un stress oxydant cellulaire est une augmentation de la concentration en GSSG intracellulaire qui a des effets délétaires sur la configuration et l'activité des protéines enzymatiques contenant un groupement thiol (Freeman et Crapo, 1982) :



Après l'examen de ces molécules non enzymatiques ajoutées de façon extracellulaire dans le milieu de culture, nous pouvons dégager un certain nombre de points :



Graphique 14 : Effet comparatif des trois enzymes (Cat, SOD, GPX) administrées de façon extracellulaire sur la viabilité cellulaire après 120 minutes d'hypoxie seule (H) et après 120 minutes d'hypoxie + 45 minutes de réoxygénation (H+R). Les concentrations utilisées : catalase (10U/ml; 1U/ml), SOD (560U/ml; 56U/ml) et GPX (0,09 U/ml). Le contrôle représente des cellules ayant subi les mêmes incubations sans addition d'enzymes (n=2).



Graphique 15 : Récupération cellulaire associée à l'expérience de protection par les trois enzymes extracellulaires (n=2).

1. Toutes ces molécules ont au moins une concentration protégeant les cellules lors de la réoxygénation après hypoxie.

2. L'efficacité et l'intensité de la protection sont toutefois assez différentes d'une molécule à l'autre.

3. Tous les résultats obtenus sont cohérents avec une intervention des radicaux libres dans les dommages entraînant la mort cellulaire lors de la réoxygénation.

6) Importance des enzymes antioxydants extracellulaires

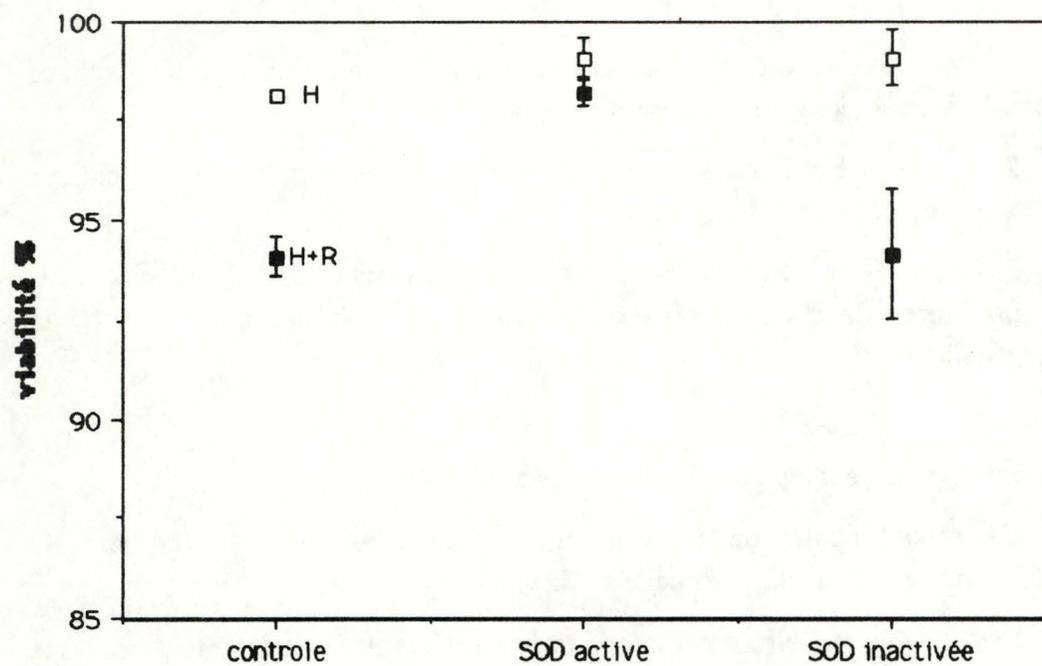
Examinons maintenant l'influence de la présence des enzymes (catalase, SOD et GPX) dans le milieu extracellulaire sur la viabilité cellulaire.

Dans notre modèle, nous avons utilisé différentes concentrations de ces enzymes anti-oxydantes : la catalase à 10 et 1 U/ml, la SOD à 560 et 56 U/ml et la GPX à 0,09 U/ml. Les résultats sont rapportés aux graphiques 14 et 15. Nous observons une absence de protection pour la catalase tant pour 10 U/ml que pour 1 U/ml. Par contre, le SOD à 560 U/ml ainsi que la GPX à 0,09 U/ml protègent très bien les cellules. La SOD à 560 U/ml apporte une protection de l'ordre de 83% et la GPX à 0,09 U/ml, 71%. La SOD à 56 U/ml n'apporte aucune protection. Ces expériences furent réalisées deux fois de manière reproductible.

De nombreux travaux rapportent une protection des territoires myocardiques ischémiés-reperfusés par une administration intravasculaire de la superoxyde dismutase et de la catalase (Zweir *et al.*, 1987). Par contre Ratych *et al.* (1987) dans leur étude du modèle d'anoxie-réoxygénation sur C.E. montrent que ni la SOD, ni la catalase ne protègent de façon isolée mais que leur combinaison confère une protection optimale.

Nous sommes en présence d'enzymes (molécules de haut poids moléculaire) et il est très improbable que ces entités pénètrent dans la cellule. Cependant, Zweir *et al.* (1987) s'interrogeant de savoir comment une macromolécule comme la SOD administrée intravasculairement est capable de diminuer la concentration en $O_2^{\cdot(-)}$ dans une cellule du myocarde postulent deux modes d'action différents :

- d'une part, la membrane cellulaire du myocyte ischémié devient plus perméable et permettrait à la SOD (P.M. 32.000) d'entrer dans la cellule. La libération de macromolécules comme les créatines kinases et phosphorylases par le myocyte et de lactate déshydrogénase par la cellule endothéliale en absence de nécrose (lyse) cellulaire atteste un changement de perméabilité membranaire de cellules en ischémie (Michale *et al.*, 1985).



Graphique 16 : Effet de la SOD active ou inactivée à la chaleur (1 heure à 80°C) à une concentration de 560U/ml sur la viabilité de cellules endothéliales sous hypoxie (H) et sous hypoxie-réoxygénation (H+R) (n = 2).

- la solution alternative est le maintien de la SOD à l'extérieur de la cellule et ce sont les $O_2^{\cdot(-)}$ ou leurs dérivés générés de façon intracellulaire qui diffusent dans le milieu environnant. Rappelons que la forme protonnée HO_2^{\cdot} (à pH plus faible) diffuse passivement au travers des membranes et que l'espèce ionisée ($O_2^{\cdot(-)}$) peut être expulsée de la cellule via des canaux anioniques membranaires (Freeman and Crapo, 1982).

La non protection par la SOD (15 U/ml) s'expliquerait alors par une activité insuffisante que pour dismuter les $O_2^{\cdot(-)}$ surproduits lors de la réoxygénation.

La catalase avec son P.M. de 240.000 n'a pas accès à l'intérieur de la cellule même si l'on conçoit un changement de perméabilité membranaire. Les H_2O_2 sont des espèces chimiques qui diffusent très aisément aux travers des membranaires. On devrait donc s'attendre à une protection. En effet, en plus de sa toxicité directe, H_2O_2 est capable par réaction avec $O_2^{\cdot(-)}$ en présence de fer de générer des espèces plus réactionnelles ($\cdot OH$). Pour rendre compte de l'inefficacité de cette enzyme dans notre modèle, nous pouvons postuler que les radicaux superoxydes produits inhibent la catalase ou que la quantité de H_2O_2 métabolisée est insuffisante que pour empêcher la formation d' $\cdot OH$ par la réaction de Fenton.

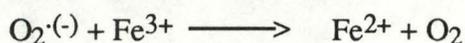
Bien que les mécanismes d'action soient plus difficiles à expliquer pour la GPX, puisque ses substrats sont en général de poids moléculaire important, son efficacité est élevée puisque cette enzyme confère environ 70% de protection pour une concentration de 0,09 U/ml.

- Comparaison des effets de la SOD (150 U/ml) active et inactive.

Nous observons que la SOD active protège efficacement alors que l'enzyme inactivée à la chaleur (1 heure à 80°C) ne protège pas (graphique 16). Cet effet de protection étant observé uniquement en présence de la protéine enzymatique active suggère que les radicaux superoxydes sont générés dans la cellule et que l'effet bénéfique de la SOD est bien le résultat d'une activité enzymatique détruisant les $O_2^{\cdot(-)}$ et non la simple conséquence d'une accumulation de protéines dans le milieu.

Bien que nous ne possédons que des arguments indirects en faveur de la production de radicaux libres dérivés de l'oxygène moléculaire pendant la réoxygénation de cellule préalablement soumises à l'hypoxie, nous pouvons déjà postuler le schéma suivant pour rendre compte en partie de la "reperfusion injury" dans ce modèle.

Durant l'hypoxie et la réoxygénation, de grandes quantités de radicaux $O_2^{\cdot(-)}$ sont générées (protection par SOD). Ces $O_2^{\cdot(-)}$ peuvent réagir pour former le radical hydroxyl $\cdot OH$, via la réaction de Fenton (protection par le manitol, DFO).



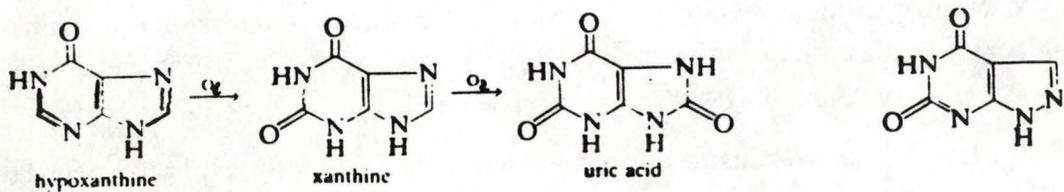
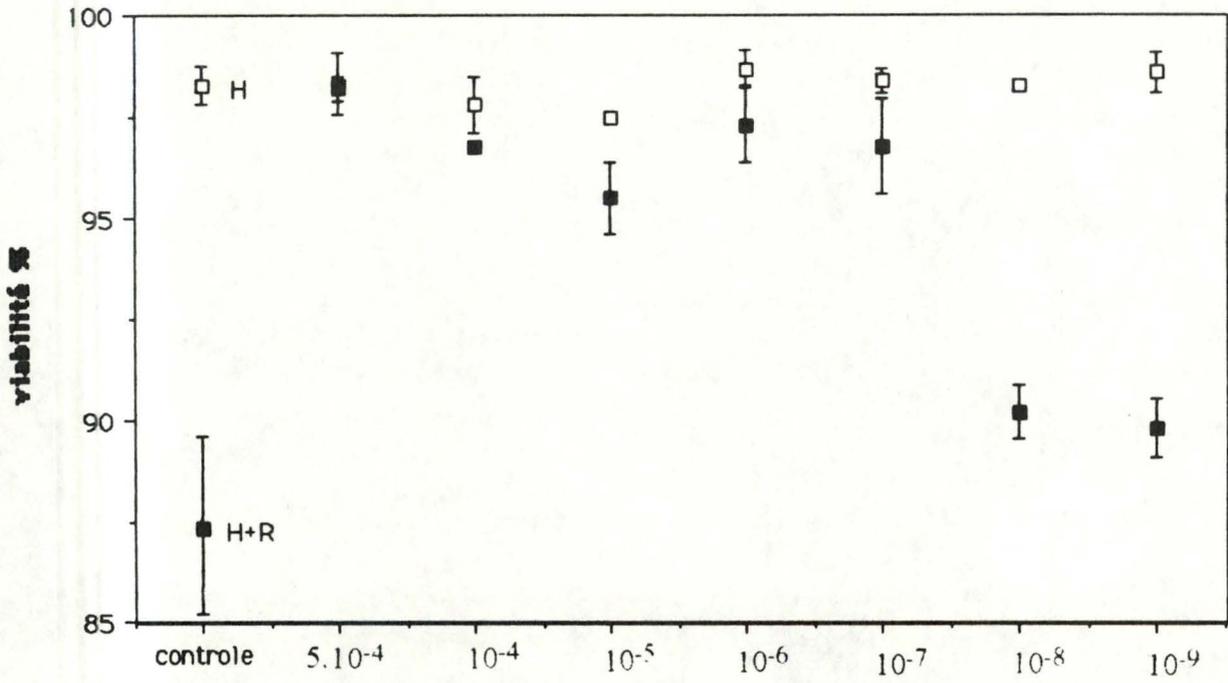
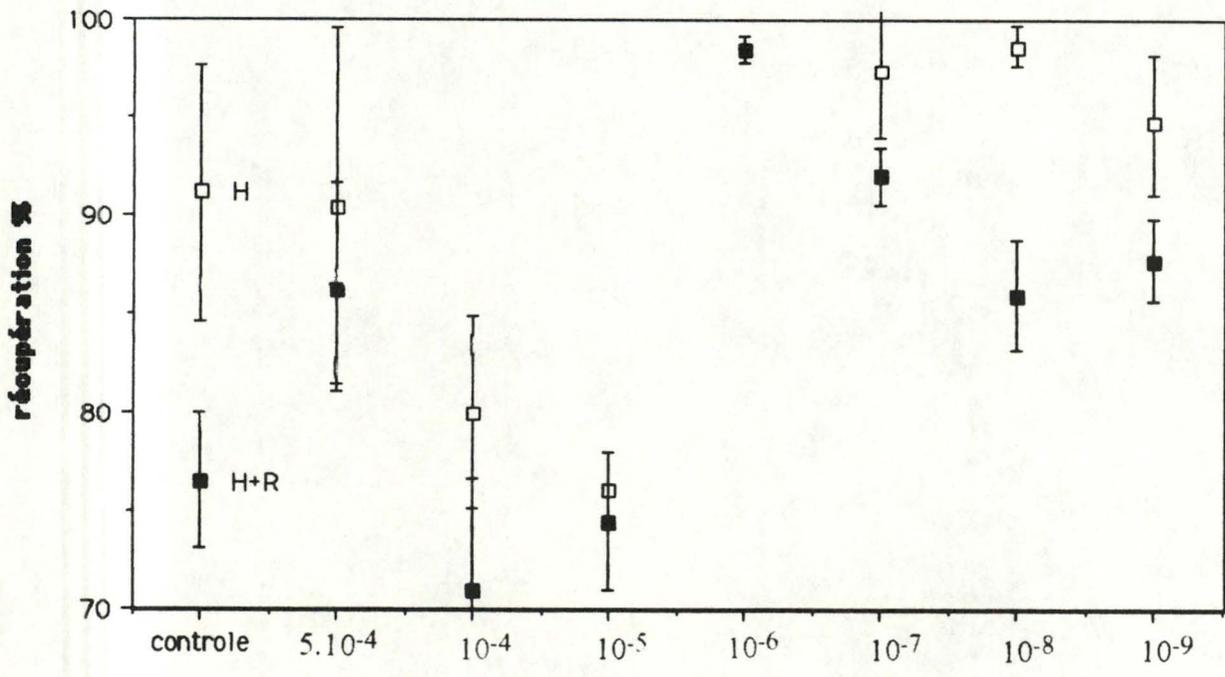


Figure 28 : Détail des étapes d'oxydation de l'hypoxanthine en acide urique par la xanthine oxydase. La formule de l'allopurinol présentée à droite montre l'analogie de structure avec les substrats de l'enzyme (d'après Halliwell et Gutteridge, 1985).



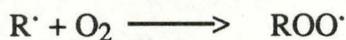
Graphique 17 : Effet de différentes concentrations en allopurinol sur la viabilité des cellules endothéliales soumises à l'hypoxie (H) et à l'hypoxie-réoxygénation (H+R) (n = 2).



Graphique 18 : Récupération cellulaire associée à l'expérience de protection par l'allopurinol (n = 2).



Les $\cdot\text{OH}$ produits réagissent à leur tour avec les molécules biologiques telles que les lipides membranaires en attaquant les chaînes d'acides gras insaturés conduisant à la peroxydation lipidique.



La peroxydation lipidique, une fois initiée par $\cdot\text{OH}$, s'autoperpétue. Ce processus serait la cause des perturbations membranaires (Protection par l' α -tocophérol, GPX, GSH, ascorbate).

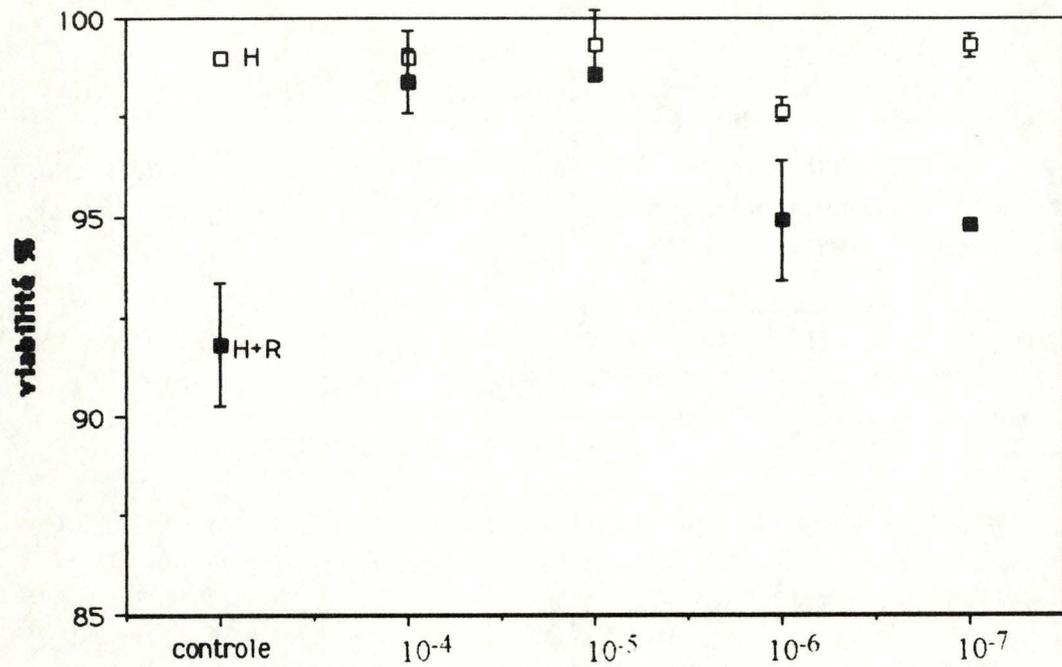
Nous n'avons encore aucune indication sur le système, la ou les source(s) générant ce $\text{O}_2^{\cdot(-)}$. La littérature souligne abondamment l'importance de la xanthine oxydase cellulaire. L'hypothèse originale de Granger *et al.* (1981) propose que les $\text{O}_2^{\cdot(-)}$ sont produits lors de la reperfusion par la xanthine oxydase (X.O.) cellulaire qui est activée à partir d'un précurseur, la xanthine déshydrogénase (X.D.) pendant la période d'ischémie.

Pour évaluer le rôle possible de ce mécanisme dans notre modèle *in vitro* sur cellules endothéliales, nous investiguerons (toujours par des tests indirects) l'impact de la xanthine oxydase en utilisant deux de ces inhibiteurs : l'allopurinol et l'acide folique.

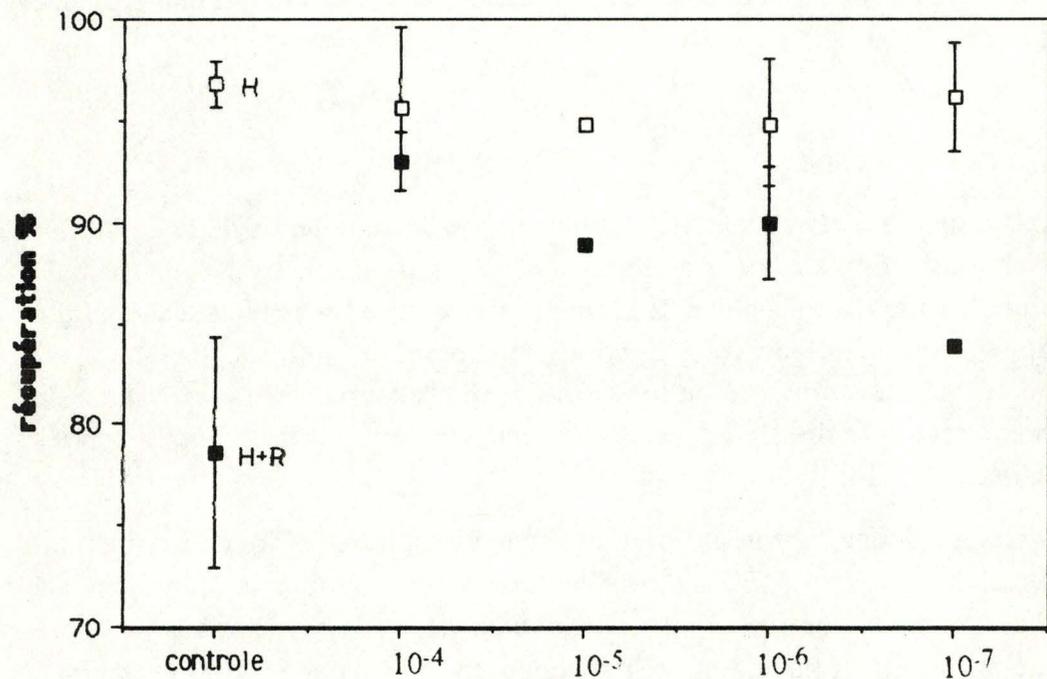
7) Effet de l'allopurinol

L'allopurinol est un inhibiteur compétitif de la xanthine oxydase de P.M. = 136 daltons. La figure 28 nous présente sa structure. Remarquons la forte analogie structurale entre l'hypoxanthine, la xanthine (substrats de l'enzyme) et l'allopurinol (inhibiteur compétitif de cette enzyme). L'allopurinol (Janssen Chimica) est introduit dans le milieu de culture juste avant l'expérience. Les résultats de l'hypoxie-réoxygénation en présence de cette molécule sont montrés sur les graphiques 17 et 18.

Ces graphiques illustrent l'effet de différentes concentrations de l'allopurinol sur les cellules soumises à 2 heures d'hypoxie suivies ou non de 45 minutes de réoxygénation. On observe une protection totale des cellules quant à la mortalité induite par la réoxygénation. Cette protection est optimale à $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ et diminue avec la concentration en allopurinol pour devenir très faible à 10^{-9}M . On peut constater encore une bonne protection pour des concentrations de l'ordre de 10^{-7} et 10^{-8}M . La concentration offrant 50% de protection est d'environ $5 \cdot 10^{-8}\text{M}$. Cette



Graphique 19: Effet de différentes concentrations en acide folique sur la viabilité cellulaire après 120 minutes d'hypoxie seule (H) et après 120 minutes d'hypoxie + 45 minutes de réoxygénation (H+R). Le contrôle représente des cellules ayant subi les mêmes incubations sans addition d'acide folique (n = 2).



Graphique 20 : Récupération cellulaire associée à l'expérience de protection par l'acide folique (n = 2).

grande efficacité de protection nous laisse penser que la xanthine oxydase est impliquée dans la production des $O_2^{\cdot(-)}$.

Bien que la protection fournie par l'allopurinol soit généralement attribuée à sa capacité d'inhiber la production d' $O_2^{\cdot(-)}$ par la xanthine oxydase, la conservation du pool d'ATP ainsi qu'un rôle direct comme scavenger de radicaux libres sont aussi fréquemment invoqués comme des explications alternatives aux effets de protection observés. L'allopurinol pourrait donc atténuer le catabolisme de l'ATP lors de l'hypoxie (Morris *et al.*, 1987).

Moorhouse *et al.* (1987) ont montré que l'allopurinol était un puissant capteur des radicaux hydroxyles *in vitro*. Cependant, ces effets ne se font sentir qu'à des concentrations beaucoup plus élevées que celles qui inhibent la xanthine oxydase. Comme on observe encore une protection à des concentrations très basses, ce n'est certainement pas par ces effets que l'allopurinol agit. L'allopurinol peut être métabolisé dans la cellule en oxypurinol, cette forme est un inhibiteur plus puissant que l'allopurinol (l'affinité pour le site actif de la X.O. est plus forte). La conversion de l'allopurinol en oxypurinol requiert un temps d'incubation préalable de cette molécule avec les cellules (Moorhouse *et al.*, 1987). Dans notre modèle, c'est donc plutôt l'allopurinol qui est actif.

Nous avons vérifié l'implication de la X.O. en utilisant un autre inhibiteur de cette enzyme : l'acide folique.

8) Effet de l'acide folique

La présence de cette molécule dans le milieu de culture des cellules apporte une protection face aux dommages cellulaires survenant lors de l'hypoxie-réoxygénation (graphiques 19 et 20). L'effet bénéfique optimal de l'acide folique s'observe à une concentration de $10^{-4}M$. Cette protection diminue par la suite en fonction de la concentration. L'acide folique confère encore une protection de 50% à une concentration de $10^{-6}M$.

La capacité que possèdent les dérivés de l'acide folique d'inactiver la xanthine oxydase fut reconnue vers la fin des années 1940 (Lewis *et al.*, 1984). Ces composés semblent inhiber la xanthine oxydase en se liant avec une forte affinité au site molybdène de l'enzyme (le site d'interaction avec les purines). L'acide folique perturbe donc l'interaction entre l'enzyme et son substrat. L'acide folique et une grande variété de dérivés incluant le méthotrexate sont décrits comme des inhibiteurs compétitifs de la xanthine oxydase ayant une constante d'inhibition comparable à celle de l'allopurinol (Lewis *et al.*, 1984).

L'analyse des résultats de protection de l'allopurinol confirmés par ceux de l'acide folique permet de suggérer que la source la plus importante de la production

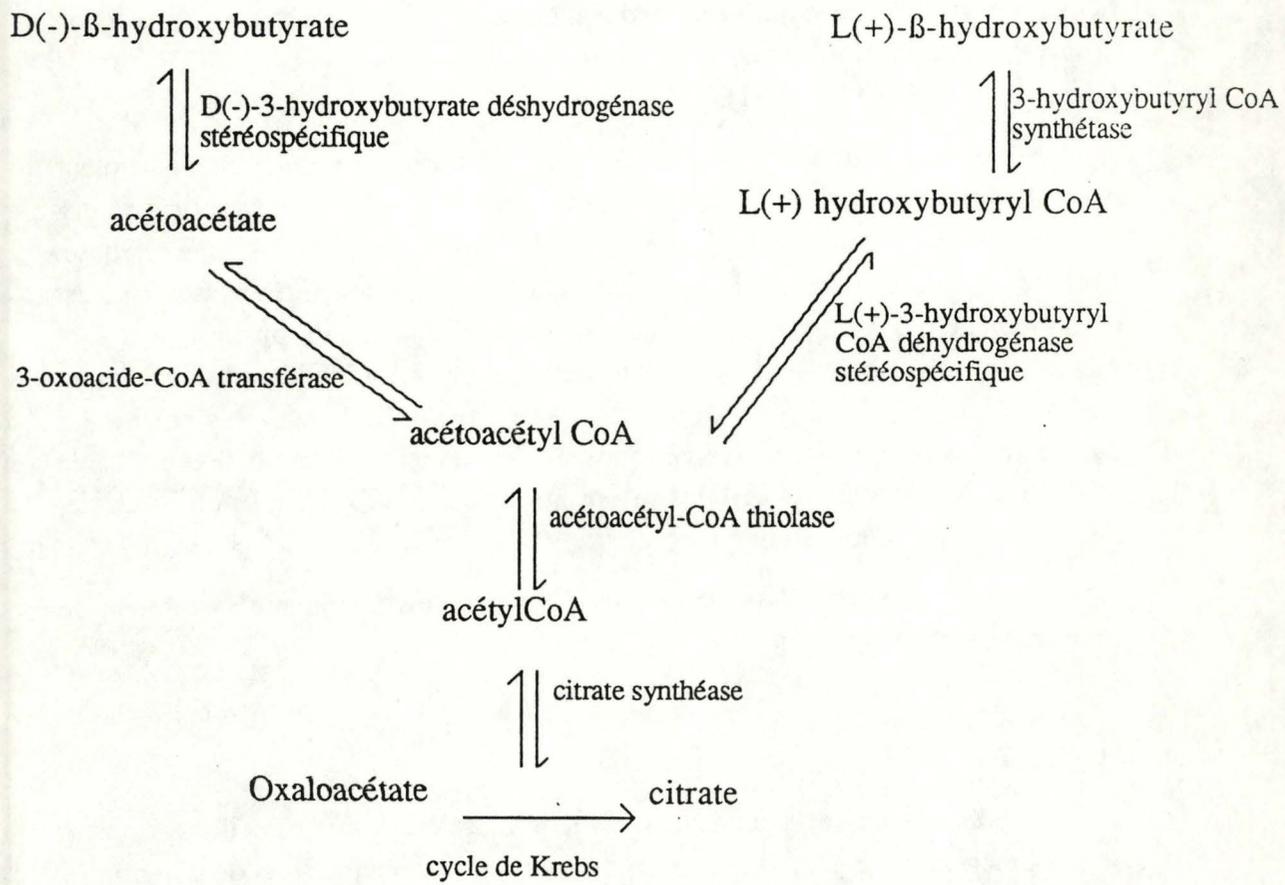


Figure 29 : Voies métaboliques de synthèse et d'oxydation du β -hydroxybutyrate. Ce corps cétonique est oxydé directement par l'intermédiaire du cycle de Krebs.

d'O₂⁽⁻⁾ dans notre modèle soit la xanthine oxydase. Ceci n'exclut pas que d'autres origines radicalaires comme la mitochondrie aient une contribution mineure.

Le schéma radicalaire est ainsi complété depuis la source des radicaux jusqu'à leurs effets éventuels. La production de radicaux libres est-elle le seul mécanisme intervenant pour conduire à la mort des cellules soumises à l'hypoxie-réoxygénation ? La seconde voie d'approche que nous proposons d'étudier maintenant s'oriente vers le métabolisme énergétique mais n'est cependant pas opposée aux effets radicalaires. Il existe en effet de nombreuses interconnexions entre le métabolisme énergétique et l'état rédox de la cellule ainsi qu'avec ses capacités de défenses antioxydantes.

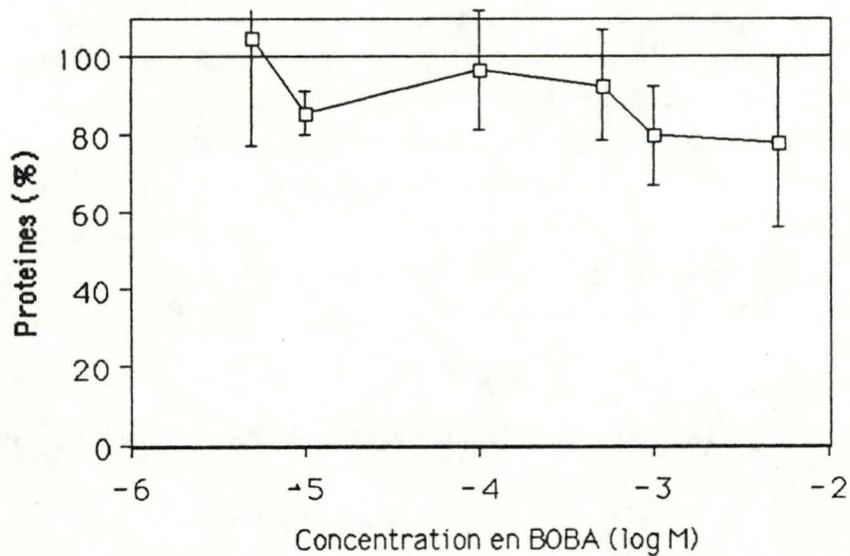
b) Etude de l'implication du métabolisme énergétique de la cellule en hypoxie-réoxygénation

La cellule en hypoxie connaît un déficit énergétique. La déplétion en ATP résulte d'un manque d'O₂ comme accepteur d'électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale qui finit par ralentir ou arrêter la respiration. Cet arrêt de la respiration ne permet plus d'assurer la phosphorylation oxydative assurant la régénération de l'ATP. Mc Cord (1985) rapporte le catabolisme de l'ATP pendant l'hypoxie conduisant à la formation d'hypoxanthine. Même si le déficit énergétique n'entraîne pas une perte de viabilité des cellules lors de l'incubation sous hypoxie (2-3%), il pourrait affaiblir les défenses cellulaires contre les espèces radicalaires libérées lors de la réoxygénation.

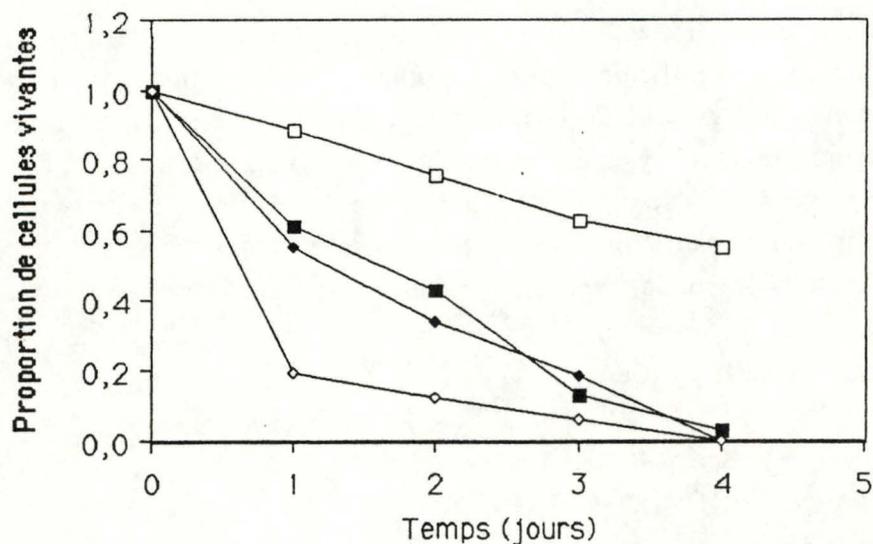
En vue de confirmer cette hypothèse, nous avons testé l'effet d'un renforcement énergétique de ces cellules en déficit sur la mortalité cellulaire survenant lors de la réoxygénation après hypoxie. La perte de viabilité des cellules après hypoxie seule n'étant que de 1 à 3%, il est difficile de montrer un effet de protection à ce niveau. Nous avons utilisé trois systèmes différents susceptibles d'avoir une action sur le métabolisme énergétique : le β -hydroxybutyrate, une augmentation de la teneur en glucose du milieu en présence d'insuline et l'addition de pyruvate avant l'hypoxie.

1) Effet du β -hydroxybutyrate (BOBA)

Dans le foie de l'homme et de la plupart des autres mammifères, un des métabolismes de l'acétyl-CoA formé au cours de l'oxydation abondante des acides gras peut se faire par la production de l'acétoacétate et du β -hydroxybutyrate qui avec l'acétone sont appelés des corps cétoniques. L'acétoacétate et le β -hydroxybutyrate ne sont pas oxydés dans le foie mais sont transportés par le sang



Graphique 21 : Résultat du dosage des protéines cellulaires effectué après trois jours d'hyperoxie (1 atmosphère de 95% O₂ - 5% CO₂). Effet du β -hydroxybutyrate sur la quantité de protéines cellulaires après 3 jours d'hyperoxie. 100% = quantité de protéines du témoin incubé dans les mêmes conditions sans β -hydroxybutyrate (n=3).



Graphique 22 : Effet de l'agent découplant (CCCP 30µM) sur la viabilité cellulaire estimée au cours du temps. Le contrôle M₁₉₉ + S (□), CCCP 30µM (○), CCCP 30µM + BOBA 10⁻³M (■) et CCCP 30µM + BOBA 10⁻⁴M (◆).

vers les tissus périphériques où ils sont oxydés par l'intermédiaire du cycle de l'acide citrique (figure 29) (Lehninger, 1979).

Les corps cétoniques jouent un rôle important dans le métabolisme intermédiaire et spécialement dans l'équilibre énergétique des mammifères. Ces substrats doivent traverser plusieurs membranes cellulaires et subcellulaires et plus spécialement la membrane plasmique et les membranes mitochondriales pour atteindre les enzymes métabolisant ces corps cétoniques. Le processus de transport est vraisemblablement un mécanisme de symport au niveau des membranes mitochondriales. L'ion associé à ce transport n'est pas encore défini avec certitude (Latruffe, 1987).

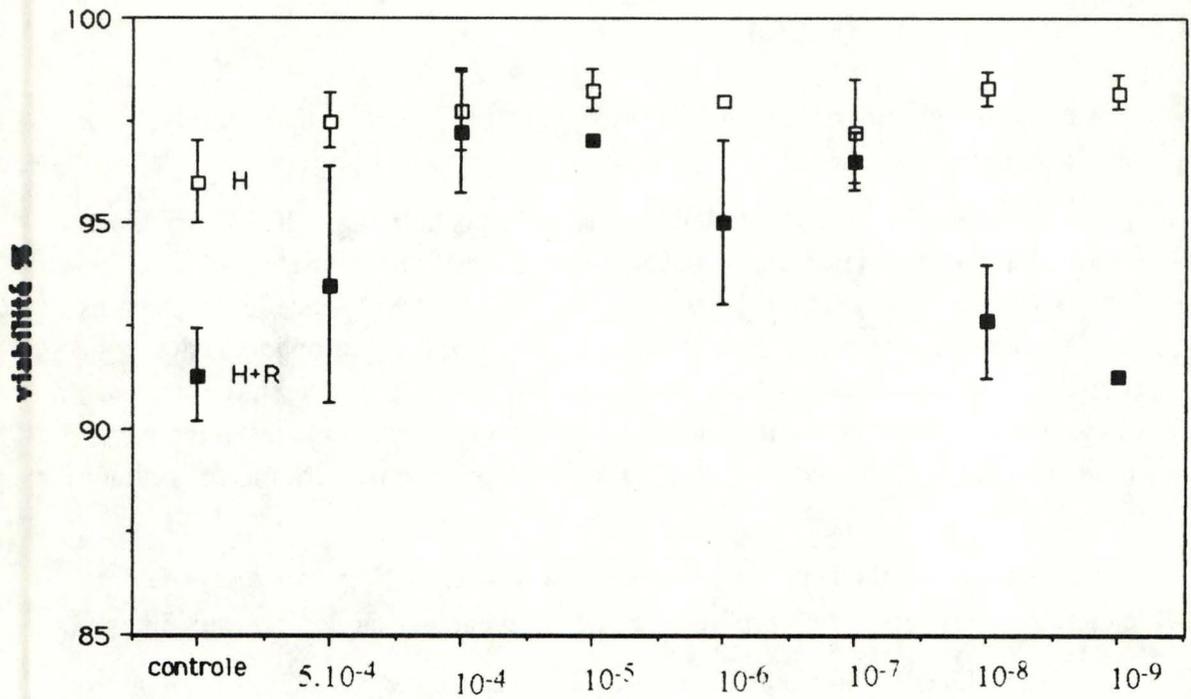
- Arguments plaidant en faveur de l'intervention du β -hydroxybutyrate dans le métabolisme énergétique et réfutant son action éventuelle sur les radicaux libres.

Des cellules endothéliales sont repiquées dans une boîte multicompartimentée en présence de différentes concentrations en BOBA. On soumet ces cellules à une hyperoxie (1 atmosphère O_2) pendant trois jours. L'incubation est réalisée au moyen de la même méthode que l'hypoxie mis à part le remplacement du flux de N_2 par O_2 . L'hyperoxie est connue pour engendrer une explosion de radicaux libres (Ody and Junod, 1985). Au terme de l'incubation (trois jours), on réalise un dosage des protéines sur les différentes cases (résultats présentés par le graphique 21). La quantité de protéines est exprimée en pourcentage de protéines par rapport au témoin exposé à l'hyperoxie mais non incubé en présence de BOBA.

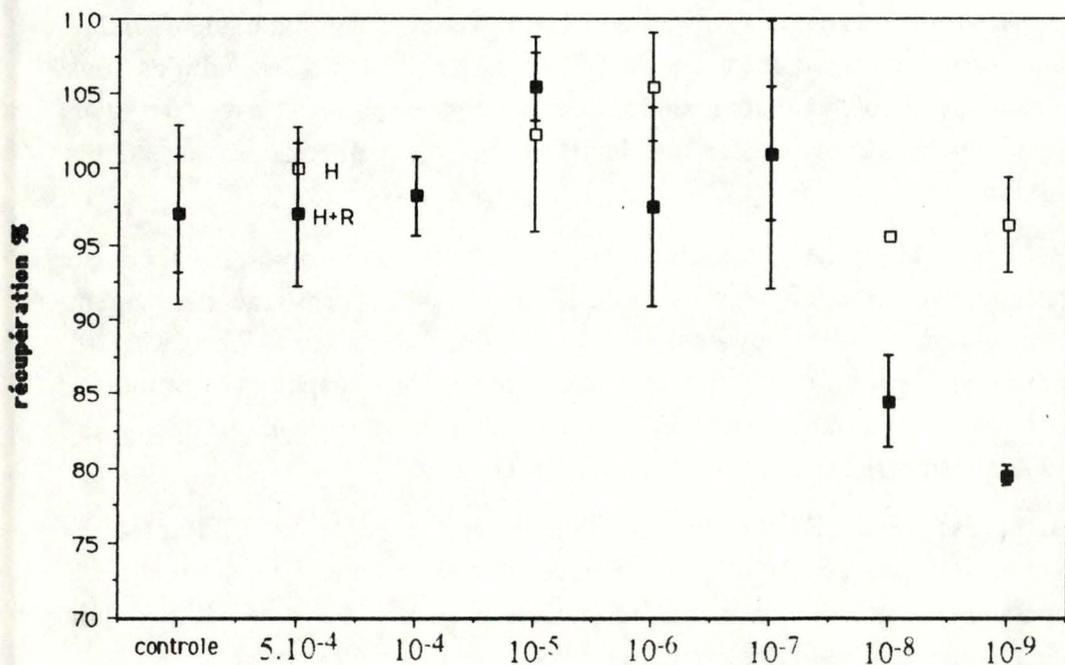
On observe une diminution du pourcentage de protéines accompagnant des concentrations de plus en plus élevées en BOBA. Cette courbe signe une mortalité cellulaire croissante et montre que le BOBA ne protège pas les cellules sous hyperoxie; il serait même plutôt toxique aux fortes concentrations. Ce résultat est un argument qui permet d'avancer que le BOBA n'exerce aucune action sur les radicaux libres.

L'expérience permettant de cerner son importance au niveau du métabolisme énergétique est la suivante : des cellules incubées en présence d'un agent découplant comme la carbonylcyanide *m*-Chlorophénylhydrazone (mCCCP) meurent rapidement au cours du temps. Cette molécule transporte les protons à travers la membrane mitochondriale interne résultant ainsi en une dissipation du potentiel de membrane (Heytler et Prichard, 1962).

La présence de BOBA lors de l'incubation avec le mCCCP protège efficacement (graphique 22). La proportion de cellules vivantes est déterminée par un comptage au cours du temps. La présence de BOBA à $10^{-3}M$ et $10^{-4}M$ réduit fortement la mortalité cellulaire causée par un déficit énergétique.



Graphique 23 : Effet de différentes concentration en β -hydroxybutyrate (BOBA) sur la viabilité cellulaire après 120 minutes d'hypoxie seule (H) et après 120 minutes d'hypoxie suivies par 45 minutes de réoxygénation (H+R). Le contrôle représente des cellules ayant subi les mêmes incubations sans addition de BOBA (n = 2).



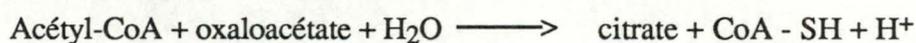
Graphique 24 : Récupération cellulaire associée à l'expérience de protection par le β -hydroxybutyrate (n = 2).

Ces résultats montrent bien que le β -hydroxybutyrate agit par le biais d'un mécanisme impliquant le métabolisme énergétique et que son effet protecteur n'est nullement le résultat d'un processus luttant contre les attaques radicalaires.

- Action du β -hydroxybutyrate sur les cellules endothéliales soumises à 2 heures d'hypoxie suivies par 45 minutes de réoxygénation (graphiques 23 et 24).

A la concentration de 10^{-4} M, cette molécule protège complètement les cellules et la protection reste très élevée jusqu'à 10^{-7} M. L'effet protecteur est perdu à 10^{-8} M. On peut également observer une légère amélioration de la viabilité des cellules n'ayant subi qu'une hypoxie seule. Par le calcul du pourcentage de protection, nous pouvons assigner à cette molécule la concentration qui donne environ 50% de protection : $5 \cdot 10^{-8}$ M.

L'action du BOBA est explicable par un apport important d'acétyl-CoA qui entre dans le cycle de Krebs sous l'action de la citrate synthase :

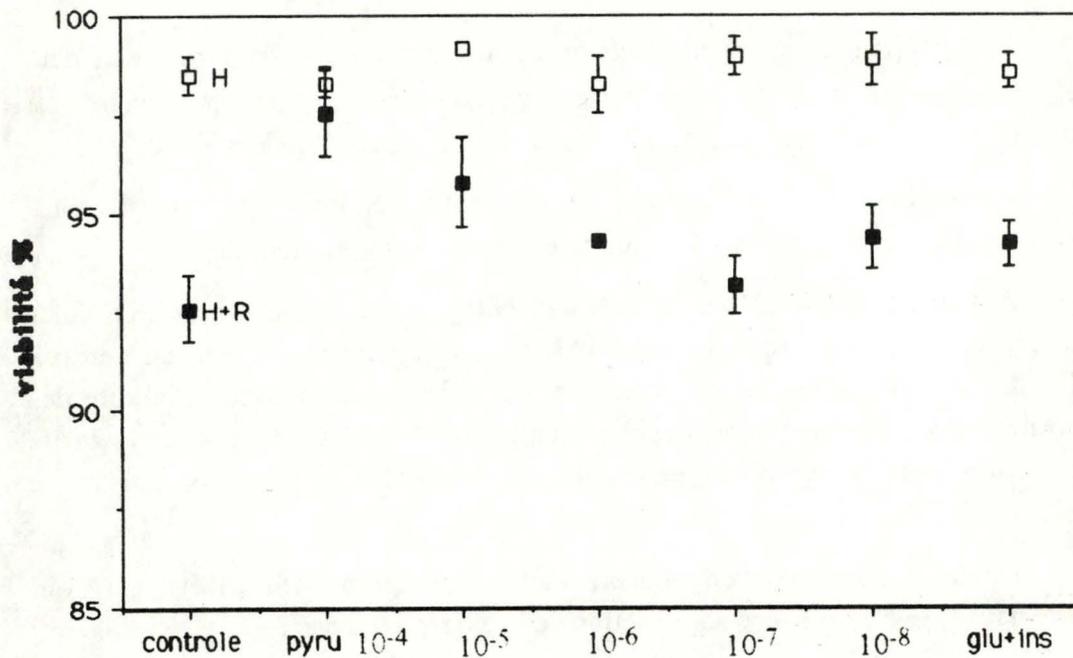


Le BOBA pourrait favoriser la récupération de la synthèse d'ATP pendant la réoxygénation. En effet, cette molécule agissant en tant que supplémentateur d'acétyl-CoA apporte un surplus de substrat qui favorisera la reprise de la respiration et de la phosphorylation oxydative lors de la réadmission de O_2 rétablissant progressivement le taux d'ATP.

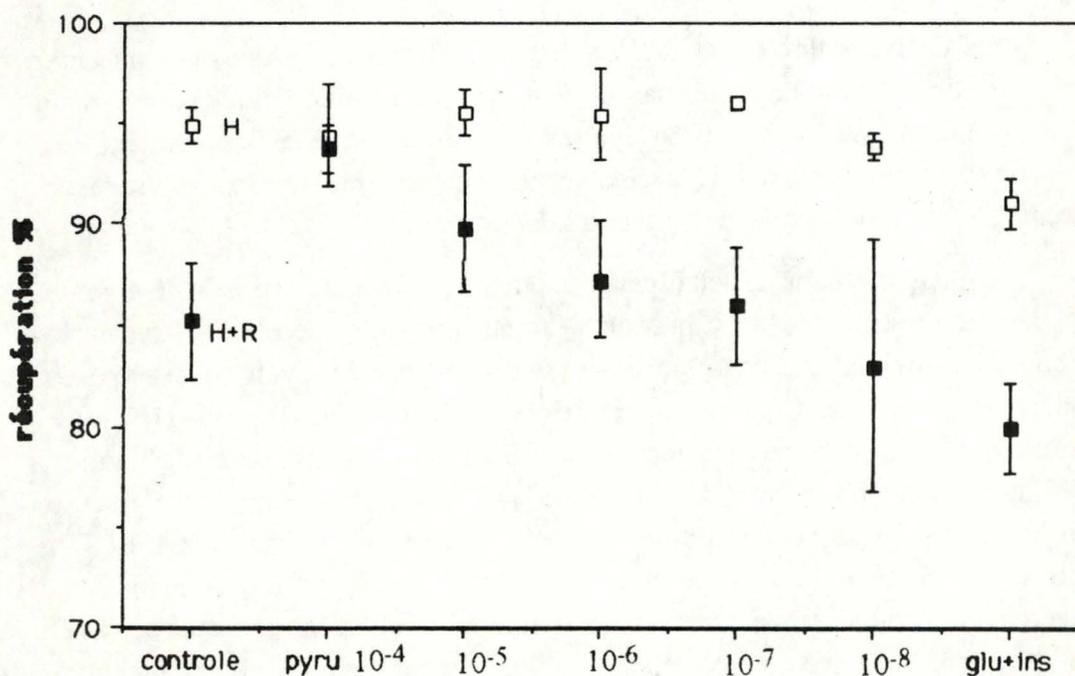
2) *Le système glucose + insuline*

Nous utilisons une concentration finale de 10mM en glucose et un taux d'insuline équivalent à 2,5 unités par ml de milieu. Le résultat unique est présenté sur les graphiques 25 et 26. Bien que les cellules endothéliales possèdent des récepteurs à l'insuline et sont donc capables de capter le glucose extracellulaire, ce système ne semble pas protéger les cellules dans ce modèle.

Le mécanisme nous faisant espérer un effet protecteur était l'entrée du glucose dans la cellule. Le glucose est phosphorylé par une molécule d'ATP formant le glucose 6-Phosphate. Cette molécule entrant dans le cycle des hexoses monophosphates permettrait de générer des équivalents réducteurs (NADPH). Ce NADPH est utilisé comme cofacteur par la glutathion réductase pour régénérer le GSH intervenant dans le cycle catalytique de la GPX. Il a été montré que le glucose + insuline ne protège pas les cellules incubées avec le CCCP alors que le BOBA apporte un effet très bénéfique (Corbisier, 1989). Ces résultats concordants suggèrent que le glucose n'est pas un bon supplémentateur d'énergie dans ce cas et expliqueraient l'absence de protection observée. Vu ces résultats divergents, nous



Graphique 25 : Effet de différentes concentrations en pyruvate sur la viabilité des cellules endothéliales soumises à l'hypoxie (H) et à l'hypoxie-réoxygénation (H+R). Ce graphique présente aussi l'effet du glucose (10mM) + insuline (2,5 U/ml) (n=2).

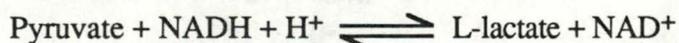


Graphique 26 : Récupération cellulaire associée à l'expérience de protection par le pyruvate et le glucose + insuline (n=2).

avons testé une autre molécule qui intervient au même endroit que le BOBA : le pyruvate.

3) Effet du pyruvate

Le pyruvate représente un point de jonction important dans le catabolisme glucidique. Dans les tissus animaux sous des conditions aérobies, le pyruvate est le produit de la glycolyse et le NADH formé par la déshydrogénation du glycéraldéhyde-3-phosphate est alors réoxydé en NAD⁺ par O₂ dans la chaîne respiratoire. Cependant, dans des conditions anaérobies, le NADH formé par la glycolyse ne peut être réoxydé par O₂ mais doit être réoxydé en NAD⁺ par le pyruvate qui se transforme en lactate. Ce NAD⁺ régénéré permet à la glycolyse de se poursuivre. La réduction du pyruvate est catalysée par la lactate déshydrogénase qui forme l'isomère L du lactate (Lehninger, 1979).



Ce phénomène se produit lors de l'ischémie-reperfusion sur des organes perfusés comme en témoigne un abaissement du pH dans la zone ischémisée (Zweir *et al.*, 1987).

Les résultats de l'exposition des cellules endothéliales à 120 minutes d'hypoxie suivies par 45 minutes de réoxygénation en présence de pyruvate sont présentés aux graphiques 25 et 26. Cette autre molécule source d'énergie protège au maximum les cellules à 10⁻⁴M. On observe que cette protection diminue avec la concentration en pyruvate. La concentration de 10⁻⁵M en pyruvate confère encore une protection de 50%. Le mode d'action du pyruvate serait similaire à celui du β-hydroxybutyrate, il interviendrait comme un fournisseur d'acétyl-CoA.

Le pyruvate peut fournir de l'acétyl-CoA et du CO₂ par un agrégat structuré d'enzymes appelé le "complexe de la pyruvate déshydrogénase" localisé dans les mitochondries des cellules eucaryotes. La réaction catalysée est la suivante (Lehninger, 1979) :



$$\Delta G^{\circ} = - 8,0 \text{ kcal/mol.}$$

Le pyruvate subit donc une décarboxylation oxydative. L'acétyl-CoA disponible peut entrer dans le cycle de Krebs.

Il semble donc bien que ces substrats énergétiques (BOBA, pyruvate) capables de compenser un déficit en ATP ont un effet bénéfique sur les cellules soumises à l'hypoxie-réoxygénation. Ce métabolisme énergétique "renforcé" pourrait avoir des répercussions sur la balance des équivalents réducteurs

Molécules	Concentration qui donne environ 50 % de protection
Vitamine E	10^{-6} M
Vitamine C	$5 \cdot 10^{-6}$ M
Mannitol	10^{-6} M
GSH	$5 \cdot 10^{-5}$ M
DFO	10^{-7} M
Allopurinol	$5 \cdot 10^{-8}$ M
Acide folique	10^{-6} M
BOBA	$5 \cdot 10^{-8}$ M
Pyruvate	10^{-5} M
Catalase extracellulaire	--
SOD extracellulaire	100 U/ml
Gpx extracellulaire	3.5 U/ml

Figure 30 : Tableau récapitulatif rapportant les concentrations qui donnent environ 50% de protection.

(NADPH/NADP) mais aussi conférer une résistance plus globale aux cellules les rendant moins vulnérables aux attaques radicalaires. Un exemple de cette résistance serait le maintien de l'activité des pompes ioniques en présence d'ATP. La cellule, capable de mieux réguler les flux d'ions survenant lors de la perméabilisation des membranes par les attaques radicalaires serait capable de résister plus longtemps. Au contraire, lors d'une déplétion en ATP, la cellule subit ces flux ioniques perturbés qui entraînent rapidement sa mort.

Nous pouvons donc imaginer que les radicaux produits lors de la réoxygénation exercent leur action toxique sur la cellule ayant subi un déficit énergétique pendant l'hypoxie. En tentant de s'opposer à cette déplétion énergétique par l'administration de molécules telles que le β -hydroxybutyrate ou le pyruvate, la cellule semble plus résistante. Peut être que le renforcement de l'état énergétique de la cellule agit par la voie de l'état rédox. Une cellule saine sur le plan énergétique est probablement plus apte à se défendre contre les agressions radicalaires survenant lors de la réoxygénation et donc moins vulnérable.

Au terme de ces expériences utilisant une administration extracellulaire des molécules protectrices, nous avons déterminé, pour chaque concentration, le pourcentage de protection (voir "Matériels et Méthodes").

Les concentrations donnant environ 50% de protection ont déjà été citées de façon éparse dans les diverses expériences. Nous les présentons sous forme d'un tableau récapitulatif à la figure 30.

Ce tableau permet de dégager et de comparer l'efficacité relative de chaque molécule. L'allopurinol et le BOBA qui protègent encore à $5.10^{-8}M$ ont une efficacité dans la défense des cellules beaucoup plus grande que le pyruvate ou la vitamine C.

Nous pouvons à présent aborder les expériences de micro-injection des trois enzymes de protection.

c) Etude de l'effet de la micro-injection d'enzymes antioxydantes sur la viabilité des C.E. soumises à l'hypoxie-réoxygénation

Des expériences préliminaires ont montré que la mortalité des C.E. due à la micro-injection (réalisée dans de bonnes conditions) est très faible. Nous injectons des cellules endothéliales de première subculture repiquées à faible dilution sur un couvre-objet préalablement quadrillé pour permettre un repérage et un comptage aisé. Ce couvre-objet est placé dans une boîte de Pétri pour la micro-injection.

SOD 0.9 10 ⁶ U/ml	95.0 ± 2	n = 3	93.0 ± 1.4	n = 2
tampon	95.5 ± 0.7	n = 2	96.0	n = 1
non injectées	96.7 ± 0.58	n = 3	95.0 ± 1.4	n = 2
catalase 110 U/ml	98.0 ± 2.8	n = 2	97.0 ± 0	n = 2
tampon	97.0 ± 0	n = 2	86.5 ± 9.19	n = 2
non injectées	95.0 ± 0	n = 2	95.5 ± 0.7	n = 2
Gpx 6 U/ml	99.5 ± 0.35	n = 2	97.7 ± 3.3	n = 3
tampon	95.5 ± 3.54	n = 2	93.3 ± 1.15	n = 3
non injectées	96.5 ± 0.7	n = 2	94.7 ± 0.58	n = 3

Figure 31 : Résultats comparatifs de l'efficacité de protection des trois enzymes antioxydantes micro-injectées dans les cellules endothéliales soumises à 120 d'hypoxie suivies de 45 minutes de réoxygénation pour deux expériences différentes. Les valeurs expriment les pourcentages de viabilité obtenus pour deux expériences.

Nous avons réalisé des micro-injections de trois enzymes purifiées : la catalase de foie de boeuf (EC 1.11.1.6), la GPX et la SOD d'erythrocytes bovins (respectivement EC 1.11.1.9 et EC 1.15.1.1). Les concentrations choisies sont :

Enzymes	activités (unité/ml)
SOD	0,910 ⁶
Catalase	110
GPX	6

Les dilutions sont réalisées à partir de solutions stock d'enzymes conservées à -70°C et maintenues à 0°C pendant toute la durée des injections. On peut estimer que le volume d'injection est de l'ordre de 10⁻¹⁰ml par cellule (Graessmann, 1980).

Il a déjà été démontré que lors d'expériences de micro-injection d'enzymes antioxydantes dans un but de protection (en hyperoxie), les effets observés sont bien le résultat de l'activité des enzymes injectées et non de l'introduction de protéines dans le cytoplasme. Les expériences qui l'ont montré portent sur la micro-injection d'enzymes dénaturées qui n'offrent aucune protection (Raes *et al.*, 1987).

Un argument en faveur de la conservation de l'activité enzymatique après la micro-injection est fourni par la révélation positive à la diaminobenzidine après l'injection de peroxydase de raifort (HRP) active dans des fibroblastes WI38.

La planche 5 montre les photographies prises après révélation à la diaminobenzidine de fibroblastes injectés avec de la peroxydase inactive (A) et active (B).

La révélation engendre un produit de réaction brun observé dans les cellules injectées avec la HRP active. La coloration est diffuse, homogène dans le cytoplasme et limitée au contour cellulaire. Ceci montre que l'enzyme ne reste pas au site d'injection mais diffuse dans tout le cytoplasme, que l'enzyme est encore bien active après l'injection et que l'injection n'est pas dommageable pour la cellule.

Chaque enzyme (SOD, catalase et GPX) est injectée dans 2 ou 3 lots de 80-90 cellules endothéliales juste avant la mise sous hypoxie-réoxygénation. Des témoins injectés avec du tampon et non injectés sont également réalisés. La détermination de la viabilité cellulaire est effectuée après l'hypoxie-réoxygénation uniquement. L'expérience a été reproduite deux fois. Les résultats sont présentés à la figure 31.

Malgré la valeur élevée des témoins, nous observons une protection significative conférée par la GPX et la catalase. La SOD n'a aucun effet protecteur. Ces résultats confirment que les cellules endothéliales subissent un stress oxydatif lorsque l'oxygène est réadmis après une période d'hypoxie et qu'elles peuvent être protégées par un apport intracellulaire d'enzymes antioxydantes. Il faut remarquer que, lors d'une hyperoxie (1 atm O₂), les cellules endothéliales peuvent également

Planche 5 : Micro-injection de HRP dans des fibroblastes WI38.

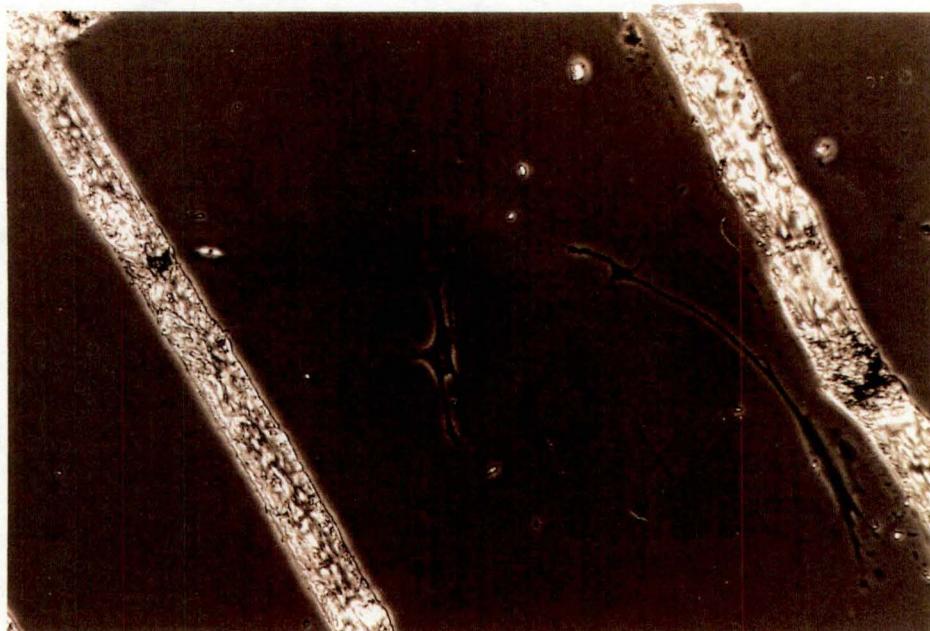


Photo A : Fibroblastes injectés avec la HRP inactivée et révélée à la DAB (G = 144x)

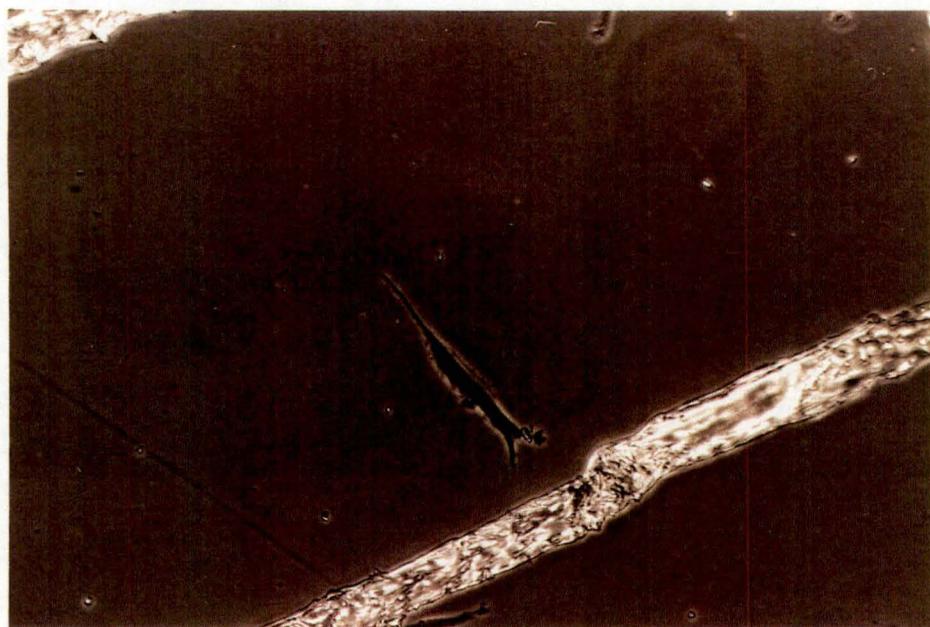


Photo B : Fibroblaste injecté avec la HRPactive révélée à la DAB (G = 144x).

être protégées par une injection de catalase ou de GPX mais pas de SOD (Michiels *et al.*, 1989). Ces résultats confirment bien ceux obtenus lors d'une hypoxie-réoxygénation.

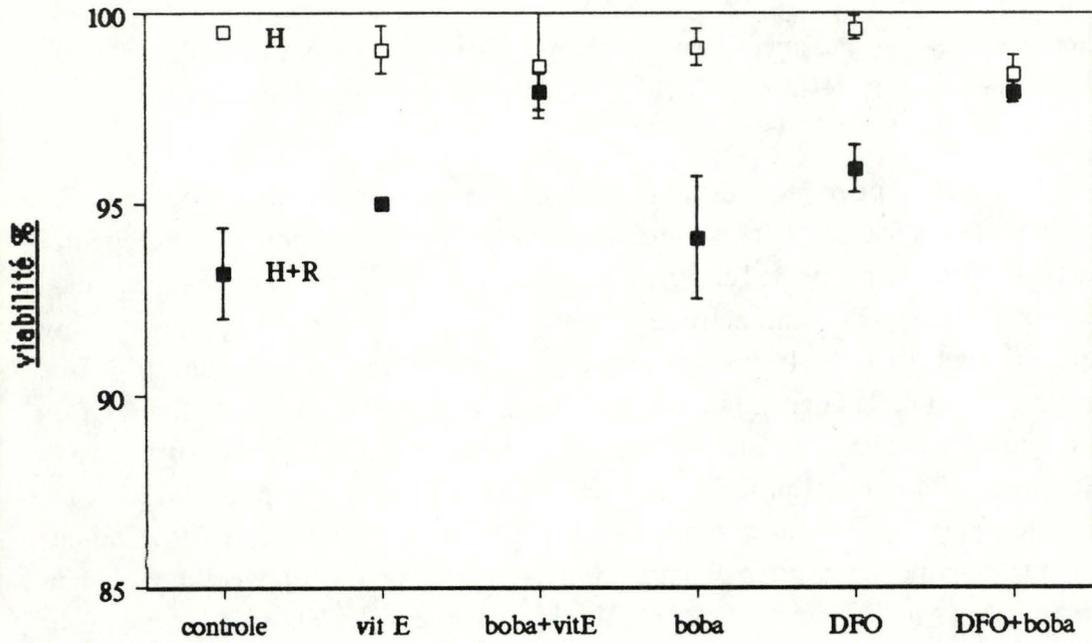
La raison pour laquelle nous n'observons pas de protection des cellules endothéliales soumises à l'hypoxie-réoxygénation par la SOD pourrait être imputée au type d'activité même de l'enzyme. La SOD catalysant la réaction de dismutation des $O_2^{\cdot(-)}$ en H_2O_2 , une activité trop importante de la superoxyde dismutase apparaissant lors de la micro-injection de cette enzyme conduirait à une augmentation de la concentration en peroxyde d'hydrogène dans la cellule. Or on sait que cette espèce chimique est toxique en tant que telle et qu'elle participe à la réaction de Fenton qui produit des radicaux hydroxyls encore plus toxiques. De plus, le H_2O_2 à forte concentration inactive la SOD (Chance *et al.*, 1979). Certains travaux montrent que pour obtenir un effet protecteur dans les cellules, il faut respecter un certain rapport entre la SOD et la catalase (Michiels *et al.*, soumis pour publication).

La catalase protège et la GPX également. On a souvent tendance à surestimer l'efficacité de la catalase par rapport à la GPX. Bien qu'il est impossible de le montrer par nos résultats, la littérature rapporte que la GPX aurait une efficacité supérieure à celle de la catalase dans les cellules endothéliales. Deux arguments peuvent en rendre compte. D'une part, le fait que la catalase soit localisée exclusivement dans les peroxysomes alors que la GPX est cytosolique et d'autre part, la GPX est non seulement active sur le peroxyde d'hydrogène mais elle métabolise également les peroxydes lipidiques (Suttorp *et al.*, 1986).

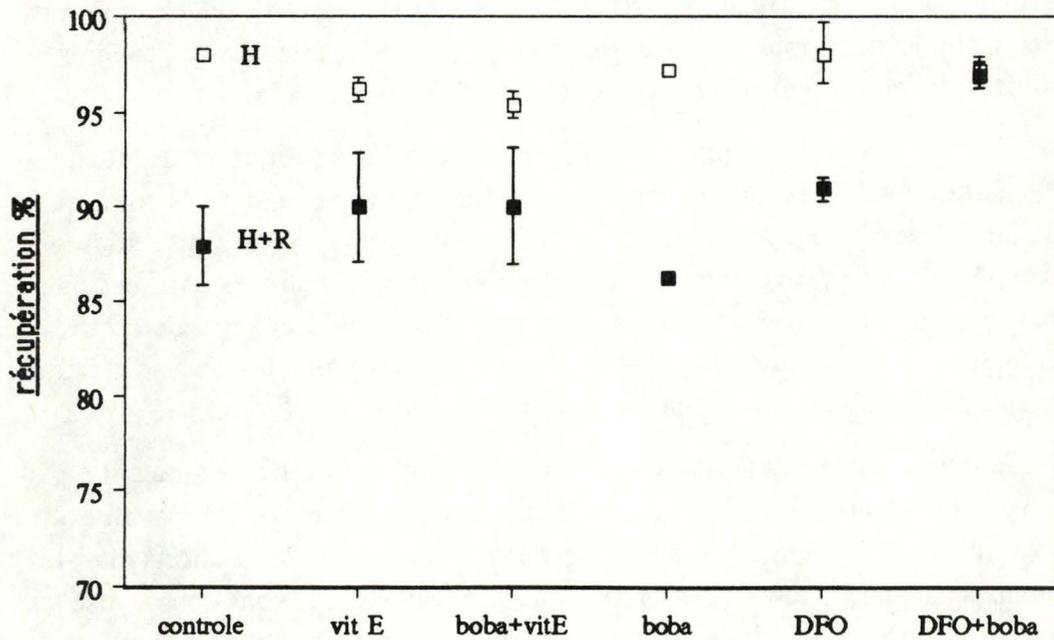
Les protections par la GPX et la catalase intracellulaires observées semblent indiquer que la détoxification des peroxydes lipidiques et de H_2O_2 sont des éléments importants pour la protection des C.E. contre les attaques radicalaires se produisant lors de la réoxygénation des cellules en hypoxie.

Dans le souci de montrer que le métabolisme énergétique et les attaques radicalaires sont deux phénomènes importants intervenant dans la mortalité cellulaire observée lors de l'hypoxie-réoxygénation, il était intéressant d'envisager des expériences de protection associant des molécules impliquées dans ces deux voies possibles. Ces combinaisons de molécules protectrices permettront éventuellement de mettre en évidence des interactions possibles entre différents éléments responsables des agressions radicalaires.

En raison de la mortalité assez peu élevée de nos témoins, la protection par une molécule unique à forte concentration était souvent totale. Il était donc illusoire de vouloir monter un effet additif ou synergique des protections par les combinaisons moléculaires à ces hautes concentrations. Nous avons donc utilisé les molécules en présence à des concentrations très faibles auxquelles elles ne



Graphique 27 : Effet des combinaisons de BOBA + vit E et de DFO + BOBA sur la viabilité des cellules endothéliales soumises à 120 minutes d'hypoxie seule (H) et soumises à 120 minutes d'hypoxie + 45 minutes de réoxygénation (H+R). Le contrôle représente des cellules ayant subi les mêmes incubations sans addition de molécule. Les concentrations utilisées sont $5 \cdot 10^{-7}M$ pour la vit E, $10^{-8}M$ pour le BOBA et $10^{-8}M$ pour la DFO (n = 2).



Graphique 28 : Récupération cellulaire associée à l'expérience de protection par BOBA + vit E et DFO + BOBA (n=2).

montraient plus (ou peu) d'effet protecteur lorsqu'elles étaient administrées séparément dans le milieu de culture.

d) Etude de l'effet des combinaisons moléculaires sur les cellules endothéliales en hypoxie-réoxygénation : addition ou synergie des effets protecteurs ?

1) *Effet du β -hydroxybutyrate + α -tocophérol et du β -hydroxybutyrate + desferrioxamine*

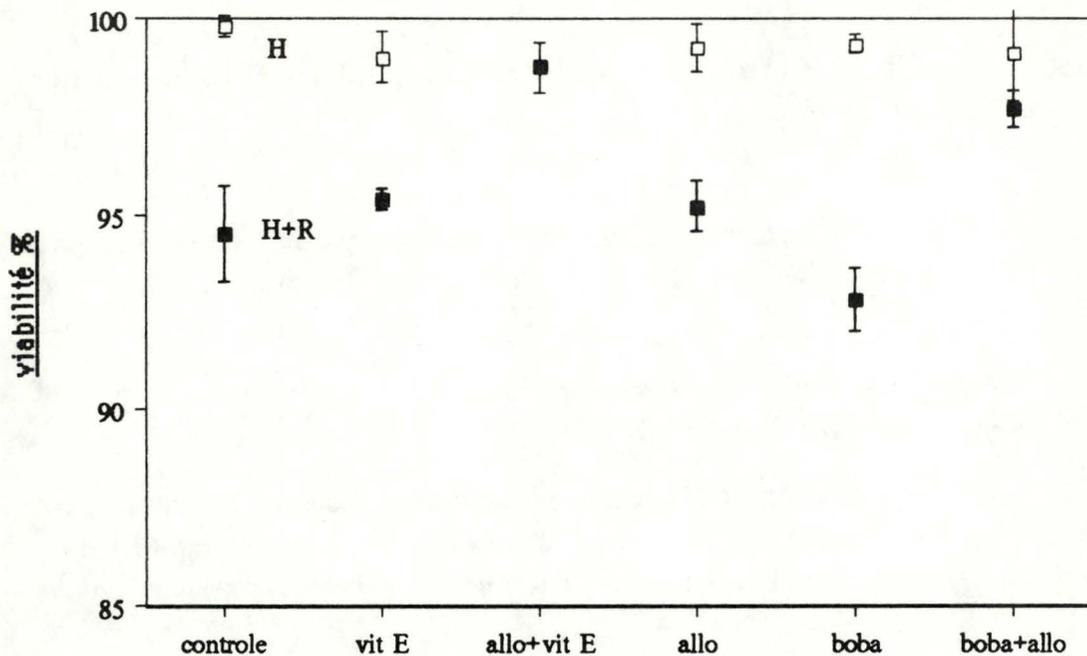
Dans cette première combinaison, on associe une molécule protégeant par le biais du renforcement de l'état énergétique et une molécule impliquée dans la protection contre les radicaux libres. Les résultats sont exposés sur les graphiques 27 et 28.

Nous observons que chaque molécule isolée ne protège que faiblement. Mais en présence l'une de l'autre, la protection est très élevée.

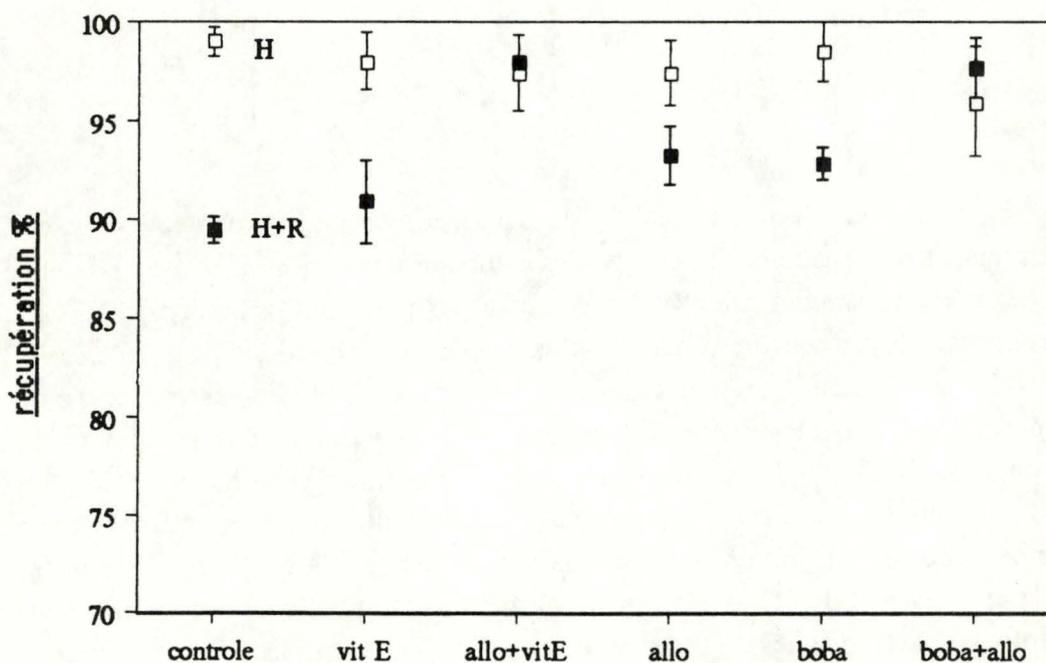
Nous avons calculé les % de protection par rapport au contrôle pour les molécules à faible concentration seules et pour les combinaisons :

	Protection molécule seule: %	Protections calculées pour les combinaisons: %	Protections observées pour les combinaisons: %
Vitamine E $5.10^{-7}M$	31		
BOBA $10^{-8}M$	18	> 49	> 77
DFO $10^{-8}M$	47	>65	> 85

Si nous avons un simple effet d'addition dans les protections, les pourcentages de protection conférés par les combinaisons moléculaires ne devraient pas dépasser les valeurs calculées en sommant les pourcentages individuels. Or, nous observons des valeurs beaucoup plus élevées. On peut donc postuler que la protection est le résultat d'une synergie d'action de ces molécules et pas d'une simple addition. Ce phénomène de synergie indique que ces molécules agissent en des endroits différents. En se rapportant à la fonction jouée par chaque molécule, nous pouvons suggérer qu'une légère augmentation des défenses antioxydantes membranaires (vit. E) ou une entrave à la production des $\cdot OH$ (DFO chélateur du Fe^{3+}) en présence de cellules moins perturbées sur le plan énergétique peuvent potentialiser les capacités de défenses de la cellule et réduire les effets délétaires. Notons encore que la DFO à $10^{-8}M$ exerce encore 47% de protection. Ceci confirme



Graphique 29 : Effet des combinaisons associant BOBA + allopurinol et vit E + allopurinol sur la viabilité des cellules endothéliales soumises à 120 minutes d'hypoxie seule (H) et soumises à 120 minutes d'hypoxie + 45 minutes de réoxygénation (H+R). Les concentrations utilisées sont $5 \cdot 10^{-7}M$ pour la vit E, $10^{-8}M$ pour le BOBA et $10^{-8}M$ pour l'allopurinol ($n = 2$).



Graphique 30: Récupération cellulaire associée à l'expérience de protection par les combinaisons de BOBA + allopurinol et de vit E + allopurinol ($n=2$).

bien que les 'OH interviennent comme un des éléments majeurs participant aux lésions.

2) *Effet de l'allopurinol + α -tocophérol et de l'allopurinol + β -hydroxybutyrate*

La combinaison associant un inhibiteur de la xanthine oxydase et un antioxydant membranaire se révèle protéger efficacement (graphiques 29 et 30). L'association de l'allopurinol et de BOBA présente une action tout aussi bénéfique pour la protection des cellules endothéliales soumises à l'hypoxie-réoxygénation.

Les faibles pourcentages de protection obtenus pour les molécules uniques à ces faibles concentrations démontrent que l'effet des combinaisons est de nouveau le fruit d'une synergie d'action et non le résultat d'une simple addition algébrique de ces pourcentages.

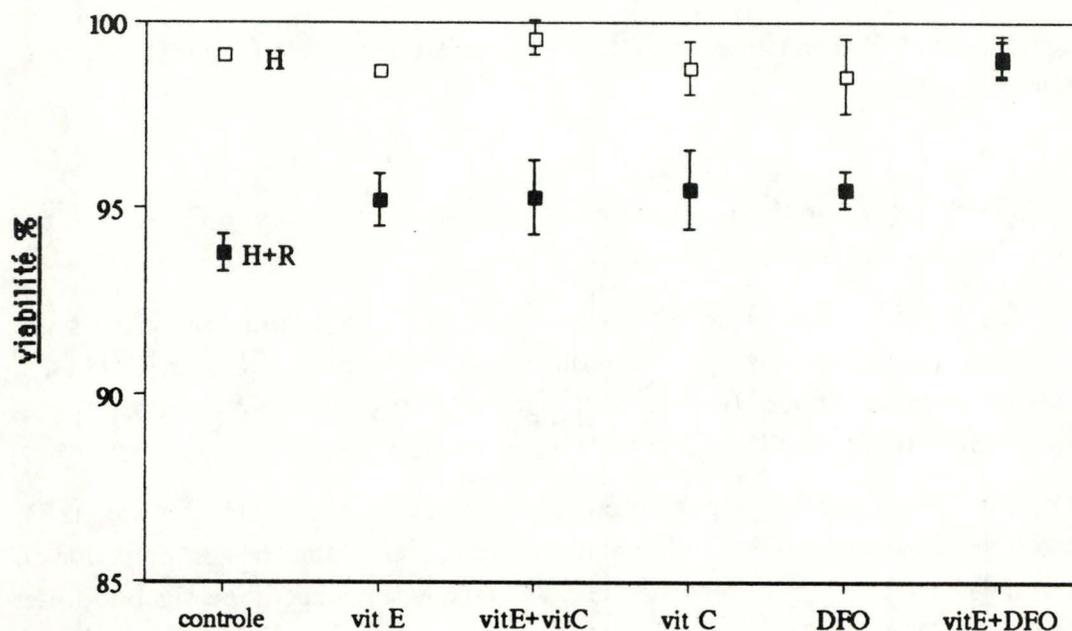
	% de protection molécule seule	Résultat additif des combinaisons	% de protections observé
Vitamine E $5.10^{-7}M$	17		
Allo $10^{-8}M$	32	> 49	> 91
Boba $10^{-8}M$	0	> 32	> 60

Cette expérience permet de dégager qu'en agissant à plusieurs niveaux, des molécules se révélant peu efficaces aux concentrations administrées sont capables d'augmenter leur action protectrice lors de leur association.

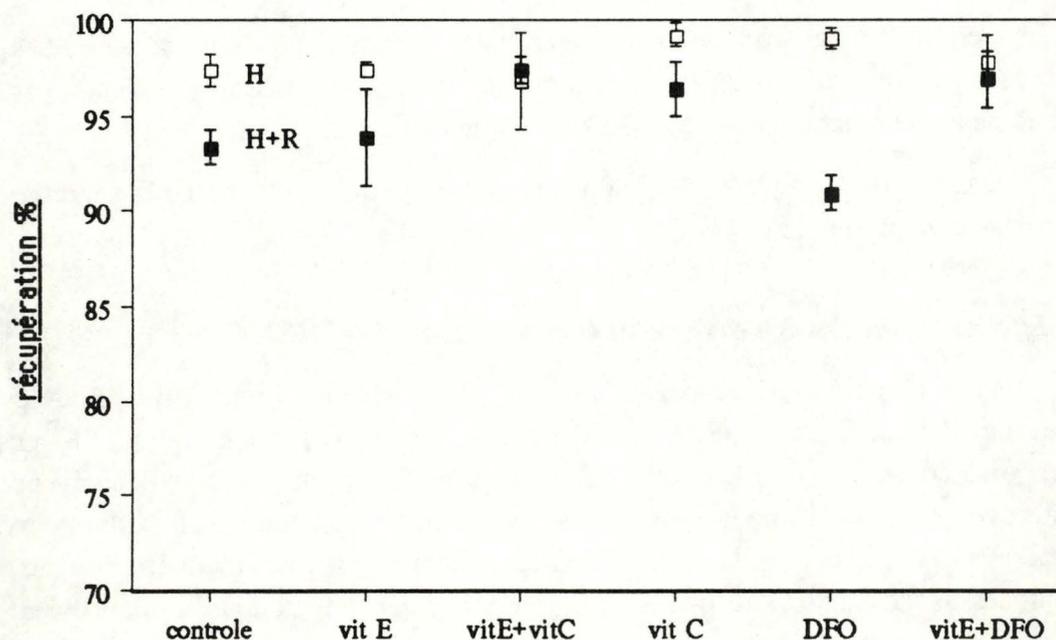
De plus, on retrouve le rôle important joué vraisemblablement par la xanthine oxydase et la production d' $O_2^{\cdot(-)}$.

3) *Effet de la vitamine E + vitamine C et de la vitamine E + DFO*

Nous associons ici des molécules ayant chacune une intervention dans le mécanisme radicalaire suspecté. Les résultats sont présentés aux graphiques 31 et 32. Nous constatons que la combinaison vit E + DFO protège très efficacement mais que la combinaison vit E + vit C reste sans effet. Nous pouvons postuler pour expliquer ces résultats que la vit E et DFO interfèrent à deux niveaux différents dans le processus radicalaire alors que la vit E + vit C exercent leur action sur un même et unique processus.



Graphique 31: Effet des combinaisons de vit E + vit C et de vit E + DFO sur la viabilité des cellules endothéliales soumises à 120 minutes d'hypoxie seule (H) et soumises à 120 minutes d'hypoxie + 45 minutes de réoxygénation (H+R). Le contrôle représente des cellules ayant subi les mêmes incubations sans addition de molécule. Les concentrations utilisées sont $5 \cdot 10^{-7} M$ pour la vit E, $10^{-8} M$ pour le DFO et $10^{-6} M$ pour l'allopurinol ($n = 2$).



Graphique 32: Récupération cellulaire associée à l'expérience de protection par vit E + vit C et vit E + DFO ($n=2$).

	% de protection molécule seule	Résultat additif des combinaisons	% de protections observé
Vitamine C $5.10^{-6}M$	32	> 58	>28
Vitamine E $5.10^{-7}M$	26	>58	> 97
DFO $5.10^{-8}M$	32		

L'effet de protection totale par la DFO + vit E renforce l'hypothèse selon laquelle les $O_2^{\cdot(-)}$ produits par la xanthine oxydase exerceraient leur toxicité sur les membranes via la formation d'OH par Fenton. L'absence de protection de la combinaison vit C + vit E a été observée plusieurs fois. Une explication possible pourrait être une action exercée sur une même cible, mais on sait par ailleurs que la vitamine C favorise la réduction de la vitamine E oxydée. L'addition d'un léger supplément de vitamine C ne serait donc peut-être pas très utile.

Bien que nous ne disposons que d'arguments indirects (observation d'effets de protection ou pas, par différentes molécules dont on connaît le mécanisme d'action) pour investiguer les événements se produisant lors de la réoxygénation susceptibles de conduire à la mort cellulaire, nous pouvons en tirer un certain nombre de renseignements.

1) La mortalité cellulaire survient essentiellement lors de la réoxygénation. Après 120 minutes d'hypoxie, bien que les cellules subissent un stress (changement morphologique, modifications biochimiques,...), la mortalité se limite à 2 ou 3%.

2) La mortalité maximale obtenue après réoxygénation est de 12-13% mais peut varier d'une souche à l'autre. Ces différences de sensibilité observées sur des cellules provenant de cordons ombilicaux différents traduisent vraisemblablement des capacités globales de défenses différentes.

3) De nombreuses molécules sont susceptibles d'avoir des effets protecteurs significatifs permettant de visualiser les mécanismes conduisant à la mort de la cellule. L'utilisation de molécules de protection permet de cibler la nature des espèces radicalaires impliquées et leur origine, l'efficacité de protection permet d'estimer l'importance de tel ou tel radical sans toutefois pouvoir obtenir des indications quantitatives précises. L'implication de l'état énergétique est également apparu.

4) Les combinaisons montrent qu'en agissant sur plusieurs fronts, on obtient une protection optimale témoignant que ces agents protecteurs agissent en synergie.

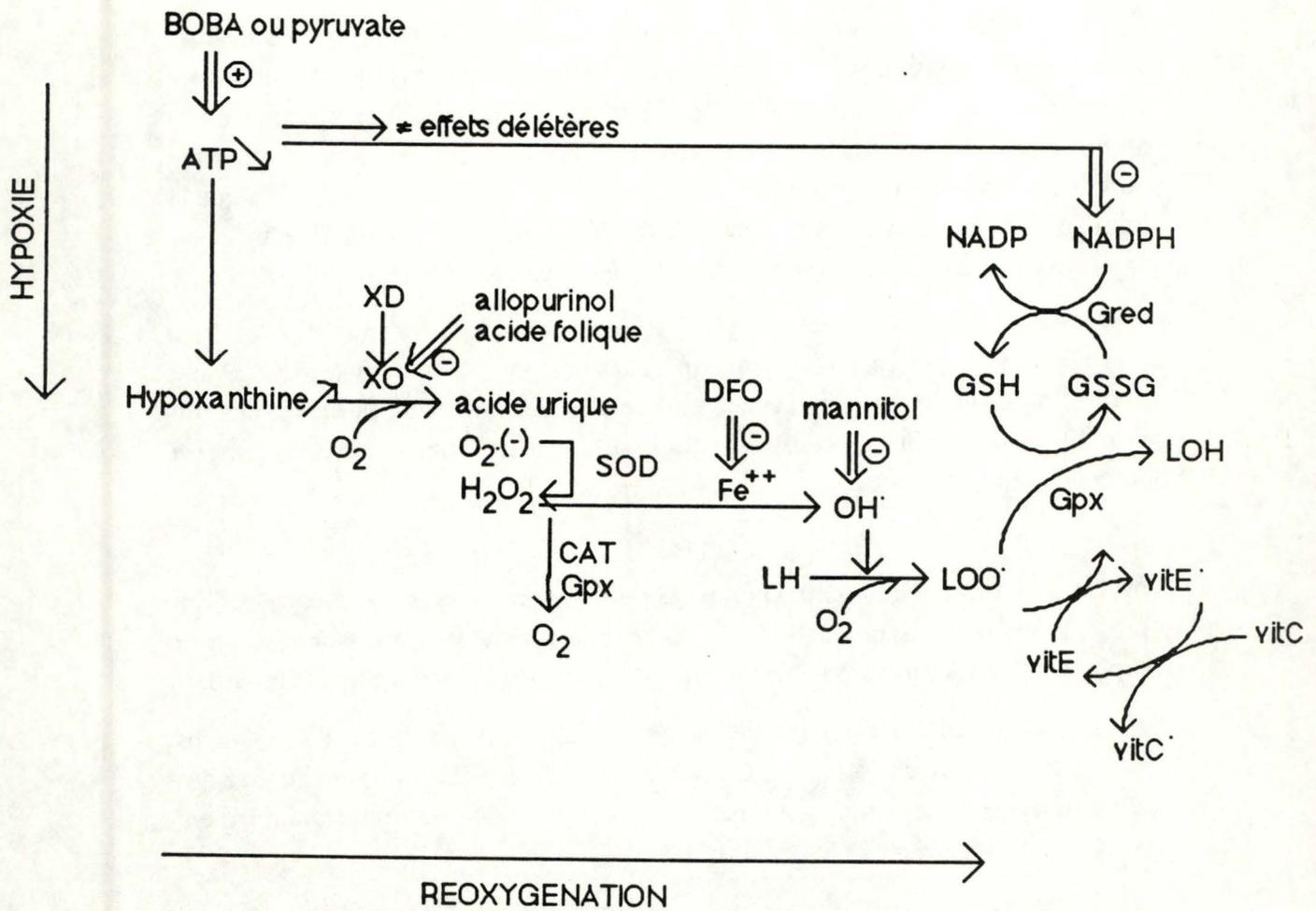


Figure 32 : Schéma récapitulatif des interactions et des événements conduisant à la mort cellulaire se produisant pendant l'hypoxie-réoxygénation : X.D (xanthine déshydrogénase), X.O (xanthine oxydase), LH (acide gras insaturé des phospholipides membranaires), LOO· (radical peroxy), LOH (alcool correspondant). Les mécanismes de protections interférant avec cette séquence y sont également représentés.

IV. CONCLUSION GENERALE

La lecture des nombreux travaux centrés sur le phénomène d'ischémie-reperfusion nous indique que la cellule endothéliale serait une des premières cibles atteintes par ce phénomène, et ceci par rapport aux couches plus profondes des tissus comme le myocarde (Rubanyi, 1988). Cependant, les causes de cette sensibilité et surtout les mécanismes qui sont responsables de cette dégénérescence ne sont pas encore bien compris. En effet, la plupart des études sont réalisées *in vivo* ou sur des organes perfusés et il est difficile dans ce cas d'établir quelles sont les causes réelles des dommages observés.

Au vu de ces problèmes, il nous a semblé intéressant de mettre au point un modèle *in vitro* dans lequel des cellules endothéliales humaines seraient soumises à une hypoxie-réoxygénation. Cette incubation mime l'ischémie-reperfusion observée *in vivo* tout en simplifiant les paramètres. Ce type d'approche permet de cibler un type cellulaire déterminé et de préciser un peu mieux les mécanismes qui occasionnent des dommages aux cellules lors de la réoxygénation après un temps d'anoxie. Il faut souligner que très peu d'équipes ont étudié ce phénomène par des études *in vitro*. Le fait que la mortalité cellulaire ne survienne qu'en modifiant les concentrations en oxygène suggère que l'O₂ seul joue un rôle important dans la toxicité observée.

Grâce à l'ensemble des informations indirectes que l'on peut déduire de ce travail, il est possible d'établir un schéma récapitulatif des événements se produisant dans la cellule endothéliale soumise à l'hypoxie suivie par la réoxygénation (figure 32). Cette figure précise et localise l'action des molécules utilisées ainsi que leurs interactions possibles.

Une seule équipe avait déjà utilisé une approche avec des cellules endothéliales de rat (Ratyck *et al.*, 1987). Comme cette équipe, nous avons pu mettre en évidence une mortalité supplémentaire due à la réoxygénation. Dans notre travail, 120 minutes d'hypoxie suivies de 45 minutes de réoxygénation sont des temps qui entraînent la mortalité la plus importante. Ce sont ces temps d'incubation que nous avons conservés pour toutes nos expériences. Une fois le modèle mis au point, nous avons essayé de protéger les cellules en utilisant de nombreuses molécules ayant des actions différentes.

Nous avons commencé par tester l' α -tocophérol, antioxydant lipophile, l'acide ascorbique, antioxydant hydrosoluble et le mannitol, scavenger des \cdot OH. Toutes ces molécules protègent les cellules lors de la réoxygénation attestant l'implication des radicaux libres dans les dommages cellulaires. Le fait que l' α -tocophérol confère une protection suggère que les membranes peuvent être la cible des atteintes radicalaires qui se manifestent par la peroxydation des acides gras

insaturés. Cet effet protecteur a déjà été montré par Burton (1988) qui rapporte que l' α -tocophérol réduit la zone de nécrose cellulaire et prévient l'accumulation d'acides gras non estérifiés dans le myocarde soumis à l'ischémie-reperfusion. L'effet protecteur de l'acide ascorbique peut s'interpréter par la régénération de la quantité de vitamine E contenue naturellement dans les membranes cellulaires (Niki, 1987). Nous avons montré également que les radicaux libres ne seraient générés qu'au moment de la réadmission de O_2 par le fait que l' α -tocophérol protège aussi bien les cellules lorsqu'il n'est ajouté au milieu de culture que pendant la période de réoxygénation.

Ensuite, pour vérifier l'implication du fer dans la production éventuelle des $\cdot OH$, nous avons testé la desferrioxamine (DFO) qui protège elle aussi très efficacement. Le fer jouerait donc un rôle important dans ces réactions en catalysant la réaction d'Haber-Weiss. Le fait qu'à la fois le mannitol et la desferrioxamine assurent la protection de nos cellules signifie que les radicaux $\cdot OH$ sont générés et responsables des dommages aux cellules. L'effet bénéfique de ces deux molécules a déjà été montré dans des modèles utilisant des organes perfusés (Granger, 1988).

La protection par le glutathion et la cystéine montrent l'importance des équivalents réducteurs dans la cellule. Il est probable que c'est par les groupements thiols de ces deux molécules qu'elles exercent leur protection. Menasche *et al.* (1986) avaient déjà suggéré un effet protecteur du glutathion dans des modèles *in vivo*.

En plus de ces molécules de faible poids moléculaire, la présence des enzymes antioxydantes dans le milieu extracellulaire fut testée. Les résultats révèlent que la SOD et la GPX protègent contrairement à la catalase qui n'a pas d'effet. Ces enzymes (de haut P.M.) étant normalement incapables de pénétrer dans les cellules, il est vraisemblable que les radicaux produits puissent s'échapper de la cellule. La protection par ces enzymes est alors explicable si la métabolisation de ces entités radicalaires survient avant la création des dommages à la cellule. La SOD protège d'ailleurs souvent dans des modèles *in vitro* et *in vivo* lors de son administration extracellulaire (Ratych *et al.*, 1987; Rubanyi, 1988). Il n'a jamais été montré que la catalase offrait une protection dans des modèles *in vitro*. Cependant, Ratych *et al.* (1987) ont montré qu'une combinaison de SOD et de catalase s'avérait bénéfique dans un modèle *in vitro* alors qu'aucune de ces enzymes seules ne l'étaient. Nous avons utilisé exactement les mêmes concentrations en enzymes que cette équipe. La différence au niveau de l'origine des cellules ou du modèle expérimental pourrait expliquer les divergences des résultats obtenus.

Nous avons renforcé l'hypothèse de la présence du stress oxydatif survenant lors de la réoxygénation par l'étude de la microinjection d'enzymes antioxydantes directement dans les cellules. Les résultats sont quelque peu différents de ceux obtenus par l'action extracellulaire de ces enzymes. En effet, la GPX et la catalase

s'avèrent protéger alors que la SOD n'a aucune effet bénéfique. Nous avons déjà tenté de proposer une explication à ces observations dans la partie "Résultats". Ces données tendent à démontrer que les cellules endothéliales subissent bien un stress oxydatif au moment de la réoxygénation suivant une hypoxie.

Après avoir mis clairement en évidence l'intervention des radicaux libres, nous nous sommes posé la question de l'origine de ces radicaux. La littérature rapporte essentiellement le rôle de la xanthine oxydase et l'importance physiologique des neutrophiles activés comme source secondaire d' $O_2^{\cdot-}$ (Granger, 1988). Dans ce modèle, on peut exclure l'intervention des cellules de l'inflammation. Nous avons donc testé l'allopurinol, un inhibiteur de cette enzyme. Cette molécule est active par elle-même mais peut être transformée en oxypurinol (métabolite de longue vie et inhibiteur plus puissant) (Granger, 1988). L'effet protecteur de cette molécule a déjà été montré à plusieurs reprises *in vivo* (Mc Cord, 1985; Simpson and Lucchesi, 1987) et *in vitro* (Ratych *et al.*, 1987). Dans notre modèle également, les effets de l'allopurinol furent bénéfiques. Pour confirmer que c'est bien par son action d'inhibiteur de la xanthine oxydase que l'allopurinol est protecteur et non par son effet antioxydant se révélant à des concentrations élevées décrit par Moorhouse *et al.* (1987), nous avons testé un autre inhibiteur de cette enzyme, l'acide folique. Cette molécule apporte également un effet protecteur.

Ces résultats cohérents nous permettent de penser que la xanthine oxydase est le candidat privilégié pour être une des sources principales des radicaux libres engendrés lors de la réoxygénation et causant des dommages aux cellules. Ces expériences tendent à démontrer que la cellule endothéliale en l'absence de cellules parenchymateuses ou de neutrophiles activés sont capables de produire elles-mêmes des radicaux libres lors de la réoxygénation qui suit une anoxie.

Dans un second temps, nous avons investigué l'importance d'un déficit énergétique dans la mortalité lors de l'anoxie-réoxygénation. La cellule en hypoxie subit une déplétion en ATP. Nous soupçonnions ce déficit énergétique de rendre la cellule plus vulnérable aux agressions survenant lors de la réoxygénation. Nous avons de plus montré que la cellule subissait différents changements biochimiques pendant l'hypoxie susceptibles de la rendre plus sensible aux attaques radicalaires survenant pendant la réoxygénation. En absence d' O_2 , la respiration mitochondriale s'arrête et la phosphorylation de l'ADP est fortement diminuée. Les conséquences de cette diminution d'ATP sont multiples : perturbation et arrêt des pompes ioniques, augmentation de l'importance de la glycolyse avec baisse de pH, entrée de calcium, arrêt des synthèses...

Toutes ces altérations conduisent à elles seules à la mort de la cellule due à de longs temps d'hypoxie. Mais quelle est l'importance de l'état de santé énergétique cellulaire dans les dommages causés par la réoxygénation qui suit une hypoxie

n'induisant pas de mort cellulaire à elle seule ? Nous avons donc utilisé des molécules agissant au niveau du métabolisme énergétique.

On a montré que le β -hydroxybutyrate et le pyruvate apportaient des effets bénéfiques protecteurs. Il est vraisemblable que dans une cellule déficitaire en énergie, un apport d'acétyl-CoA permet au cycle de Krebs de fonctionner. L'effet le plus important serait l'accélération de la récupération de la synthèse d'ATP pendant la réoxygénation. Le fait que ces molécules protègent, suggère qu'un état énergétique sain dans une cellule autorise une résistance globale accrue.

La fin de ce travail expérimental comporte des essais de protection par des combinaisons moléculaires. Les résultats obtenus confirment que des tentatives de protection sur plusieurs fronts sont efficaces alors que les concentrations de chaque molécule prise isolément sont insuffisantes que pour être bénéfiques. Ces combinaisons moléculaires rapportent également que la protection est le résultat d'actions synergiques de ces molécules et non la simple addition des effets.

Nous pouvons conclure en précisant que les radicaux libres ont un rôle important dans les lésions cellulaires conduisant à la mort de la cellule endothéliale lors de la réoxygénation suivant une période d'hypoxie. Ces radicaux peuvent être générés par la cellule endothéliale elle-même. La toxicité radicalaire est plus importante sur des cellules affaiblies par un déficit énergétique qui semblent beaucoup plus vulnérables. Malgré que nous ne disposons que de méthodes d'investigations indirectes, un certain nombre d'informations quant aux mécanismes supposés ont pu être déduites. Cependant, d'autres expériences complémentaires seraient nécessaires pour confirmer ou infirmer certains résultats.

La cellule endothéliale semble vraiment le site initial et l'origine de nombreux événements se produisant *in vivo* dans un tissu. Le fait que l'on parvienne à protéger les cellules endothéliales permettrait de conférer également un effet bénéfique aux tissus sous-jacents soumis à l'ischémie-reperfusion. En effet, la protection de l'endothélium s'accompagnerait d'une réduction de la perméabilité vasculaire évitant de ce fait la formation d'oedème, elle empêcherait aussi l'attraction, l'agrégation et l'activation des PMN... On peut donc concevoir qu'en protégeant l'endothélium, on supprime bon nombre d'agressions subséquentes à sa lésion qui sont responsables de l'amplification des dommages tissulaires observés lors de la réadmission du flux sanguin dans le territoire préalablement ischémié.

Il est certain que ces résultats peuvent présenter des implications thérapeutiques. En effet, l'intervention des radicaux libres apparaît de plus en plus, dans de nombreuses pathologies telles que l'arthrite rhumatoïde, l'athérosclérose ou le cancer (Halliwell, 1987). De nombreuses équipes s'attachent déjà à étudier les perspectives d'utilisation d'antioxydants dans les thérapies de pathologies qui montrent un rôle important joué par les radicaux libres. L'intérêt et les possibilités

de recherche dans ce domaine sont énormes vu l'importance et l'étendue du phénomène d'hypoxie-réoxygénation ou plutôt d'ischémie-reperfusion qui dépassent largement le cadre des infarctus puisqu'il se rencontre également dans le cadre des chocs hémorragiques et dans la problématique des transplantations d'organes. C'est dans ces cas que les perspectives d'utilisation d'antioxydants semblent les plus prometteuses. De nombreuses applications sont donc envisageables.

V. BIBLIOGRAPHIE

ALLEEN, A.O. and BIELSKI, B.M.J.

Formation and disappearance of superoxide radicals in aqueous solutions.
in Superoxide dismutase, edited by OBERLEY, L.W., vol. 1, CRC Press,
Boca Renton, Flo., (1982), 125.

ANSORGE, W.

Improved system for capillary microinjection in living cells.
Exp. Cell Res., **140**, (1982), 31.

ARNES, B.W., CATHCART, R., SCHWIERS, E., HOCHSTEIN, P.

Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant and
radical caused aging and cancer : a hypothesis.
Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., **78**, (1982), 6858.

AUGER, A. and GORDON, J.L.

Differential effects of hydrogen peroxide on indices of endothelial cell
function.
J. Exp. Med., **159**, (1984), 592.

AUST, S.D., ROERIG, D.L., PEDERSON, T.C.

Evidence for superoxide generation by NADPH-cytochrome C reductase of
rat liver microsomes.
Biochem. Biophys. Res. Comm., **47**, (1972), 1133.

BABIOR, B.M.

Oxygen - dependent microbial killing by phagocytes.
N. Engl. J. Med., **298**, (1978), 659.

BABIOR, B.M.

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

BACCANARI, D.P.

Coupled oxidation of NADPH with thiols at neutral pH.
Arch. Biochem. Biophys., **191**, (1978), 351.

BAEHNER, R.L., BOXER, L.A., INGRAHAM, L.M.

Reduced oxygen by products and white blood cells.
in Free radicals in Biology, vol. 5, edited by PRYOR, W.A., Academic
Press, New York, (1982), 91.

- BAKER, J.E., FELIX, C.C., OLINGER, G.N., KALYANARAMAN, B.**
Myocardial ischemia and reperfusion : direct evidence for free radical generation by electron spin resonance spectroscopy.
Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., **85**, (1988), 2786.
- BALCONI, G. and DEJANA, E.**
Cultivation of endothelial cells : limitations and perspectives.
Med. Biol., **64**, (1986), 231.
- BALLOU, D., PALMER, G., MASSEY, V.**
Direct demonstration of superoxide anion production during the oxidation of reduced flavin and of its catalytic decomposition by erythrocyte.
Biochem. Biophys. Res. Commun., **36**, (1969), 898.
- BANNISTER, J.V., BANNISTER, W.H., HAO H., MAHOOD, J.F., WILLSON, R.L., WOLFENDEN, B.S.**
Does caeruloplasmin dismutate superoxide ?
FEBS Lett., **118**, (1980), 127.
- BAST, A.**
Is formation of reactive oxygen by cytochrome P-450 perilous and predictable ?
Trends Pharmac. Sci., **7**, (1986), 266.
- BAUDHUIN, P., BEAUFAYS, H., RAHMAN-LI, V., SELLINGER, O.Z., WATTIAUX, R., JACQUES, P., DE DUVE, C.**
Tissue fractionnement studies. 17 intracellular distribution of monoamine oxidase, aspartate aminotransferase, alanine deshydrogenase, D-amino acid oxidase and catalase in rat liver tissue.
Biochem. J., **92**, (1964), 179.
- BELOQUI, O. and CEDERBAUNN, A.I.**
Prevention of microsomal production of hydroxyl radicals, but not lipid peroxidation by the glutathione-peroxidase system.
Biochem. Pharmacol., **35**, (1986), 2663.
- BENDER, J.G. and Van EPPS, D.E.**
Stimulus interactions in release of superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) from human neutrophils). Further evidence for multiple pathways of activation.
Inflammation, **9**, (1985), 67.
- BENDICH, A., MACHLIN, L.J., SCANDUNA, O., BURTON, G.W. and WAYNER D.D.M.**
The antioxidant role of vitamin C.
Adv. Free Rad. Biol. Med., **2**, (1986), 419.

BERKNER, L.V. and MARSHALL, L.C.

The history of oxygenic concentration in the earth's atmosphere.
Faraday Discuss. Chem. Soc., **37**, (1964), 112.

BOVERIS, A.

Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria.
Meth. Enzym., **105**, (1984), 429.

BRAY, R.C., COCKLE, S.A., FIELDEN, E.M., ROBERTS, P.B., ROTILIO, G. and CALABRESE, L.

Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide.
Biochem. J., **139**, (1974), 43.

BROT, M., WEISSBACH, L., WERTH, J. WEISSBACH, H.

Enzymatic reduction of protein-bound methionine sulfoxide.
Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., **78**, (1981), 2155.

BUCHANAN, J.D. and ARMSTRONG, D.A.

The radiolysis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.
Int. J. Radiat. Biol., **33**, (1978), 409.

BURTON, K.P., Mc CORD, J.M., GHAI, G.

Myocardial alterations due to free-radical generation.
Am. J. Physiol., **246**, (1984), 776.

BYCZKOWSKI, J.Z. and GESSNER, T.

Biological role of superoxide ion-radical.
Int. J. Biochem., **20**, (1988), 569.

CHAN, H.W.S.

Oxygen free radical in food.
Proc. Nutr. Soc., **46**, (1987), 35.

CHANCE, B.

An intermediate compound in the catalase - hydrogen peroxide reaction.
Acta Chem. Scand., **1**, (1947), 236.

CHANCE, B. and BOVERIS, A.

Hyperoxia and hydroperoxide metabolism.
in extrapulmonary manifestations of respiratory disease, edited by DEBS, E.R., Marcel Dekker, New York, (1980), 185.

CHANCE, B., SIES, H., BOVERIS, A.

Hydroperoxide metabolism in mammalian organs.
Physiol. Rev., **59**, (1979), 527.

CHAUDIERE, J.

La glutathion peroxydase : un élément central du système de protection de nos cellules.

in Biologie des lipides dans l'organisme humain, edited by DARSTE-BLAZY *et al.*, Lavoisier, (1987).

CHAUDIERE, J. and TAPPEL, A.L.

Purification and characterization of selenium-glutathione peroxidase from hamster liver.

Arch. Bioch. Biophys., **226**, (1983), 448.

CLARK, R.A., LEIDOL, K.G., PEARSON, D.W., NANSEEF, W.M.

NADPH oxidase of human neutrophils : subcellular localization and characterization of an arachidonate - activatable superoxide - generating system.

J. Biol. Chem., **262**, (1987), 4065.

CORBISIER, P.

Dissertation présentée pour l'obtention du grade de docteur en sciences, (juin 1989).

Importance des mitochondries dans un processus de vieillissement cellulaire.

CORBISIER, P., HOUBION, A., REMACLE, J.

A new technique for highly sensitive detection of superoxide dismutase activity by chemoluminescence.

Anal. Bioch., **164**, (1987), 240.

**CRADDOCK, P.R., HAMMERSCHMIDT, D.E., MALDOW, C.F.,
YAMADA, O., JACOB, H.S.**

Granulocyte aggregation as a manifestation of membrane interactions with complement : possible role in leukocyte margination, microvascular occlusion, and endothelial damage.

Semin. Hematol., **16**, (1979), 140.

CRISTOFALO, V.J. and SHARF, B.B.

Cellular senescence and DNA synthesis.

Exp. Cell Res., **76**, (1973), 419.

CRYER, A.

Scale and diversity of interactions at the vascular endothelium.

in Biochemical interactions at the endothelium, edited by CRYER, A., Elsevier, (1983), 1.

CZAPSKI, G.

Radiation chemistry of oxygenated aqueous solutions.

Ann. Rev. Phys. Chem., **22**, (1971), 171.

DEL MAESTRO, R.F.

An approach to free radicals in medicine and biology.
Acta Physiol. Scand., suppl. **221**, (1980), 77.

DONATO, H.

Lipid peroxidation cross-linking reactions and aging.
in Age pigments, edited by SOHAL, R.W., Elsevier/North Holland, (1981), 63.

DOWNEY, J., CHAMBERS, D., MINNA, T., YELLON, D., JAMES, D.

Allopurinol fails to limit infarct size in a xanthine oxidase-deficient species.
Circulation, **74**, (1986), 372.

EDWARDS, S.W. and SWAN, T.F.

Regulation of superoxide generation by myeloperoxidase during the respiratory burst of human neutrophils.
Biochem. J., **237**, (1986), 601.

FANTONE, J.C. and WARD, P.A.

Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocytes-dependent inflammatory reactions.
Am. J. Pathol., **107**, (1982), 397.

FAYER, C.H. and HALL, D.

Superoxide dismutase activity in the functioning chloroplast.
in Chemical and Biochemical aspects of superoxide and superoxide dismutase, edited by BANNISTER, J.V. and HILL, H.A.O., Elsevier/North Holland New York, (1980), 380.

FLOHE, L.

Role of GSH peroxidase in lipid peroxide metabolism.
in Lipid peroxides in Biology and Medicine, edited by YAGI K., Academic Press, (1982), 149.

FLOHE, L.

Glutathion peroxidase brought into focus.
in Free radicals in Biology, vol. 5, edited by PRYOR, W.A., Academic Press, New York, (1982), 223.

FLOHE, L., LOSCHEN, G., GUNZLER, W. and EICHELE, E.

Glutathione peroxidase, V. The kinetic mechanism, Hoppe Seyler's Z. *Physiol. Chem.*, **353**, (1972), 987.

FORMAN, H.J. and BOVERIS, A.

Superoxide radical and hydrogen peroxide in mitochondria.
in Free Radicals in Biology, vol. 5, edited by PRYOR, W.A., Academic Press, New York, (1982), 65.

FREEMAN, B.A., CRAPO, J.D.

Free radicals and tissue injury.
Lab. Invest., **47**, (1982), 412.

**FRENKEL, K., CHRZAN, K., TROLL, W., TEEBOR, G.W.,
STEINBERG, J.J.**

Radiation - like modification of bases in DNA exposed to tumor promoter-
activated polymorphonuclear leukocytes.
Carcinogenesis, **8**, (1986), 455.

FRIDOVICH, I.

Superoxide and evolution.
Arch. Biochem. Biophys., **1**, (1974), 1.

FRIDOVICH, I.

The biology of oxygen radicals.
Science, New York, **201**, (1978), 875.

FRIDOVICH, I.

Hypoxia and oxygen toxicity.
Adv. Neurol., **26**, (1979), 255.

FRIDOVICH, I.

Superoxide radical : an endogenous toxicant.
Ann.Rev. Pharmac. Toxicol., **23**, (1983), 239.

FRIDOVICH, I.

Superoxide dismutase.
Adv. Enzymol., **58**, (1986), 61.

FRIED, R.

Metabolic role of xanthine oxidase as a source of superoxide radicals and
hydrogen peroxide.
in Chemical and Biochemical aspects of superoxide and superoxide
dismutase, edited by BANNISTER, J.V. and HILL, H.A.O., Elsevier/North
Holland, New York, (1980), 65.

FRIMER, A.A.

The organic chemistry of superoxide anion radical.
in Superoxide dismutase, edited by OBERLY, L.W., vol. 2, (1982), 83.

FRYER, D.G., BIRNBAUM, G., LUTTREL, C.N.

Human endothelium in cell culture.
J. Atheroscl. Res., **6**, (1966), 151.

GENITSEN, M.E.

Functional heterogeneity of vascular endothelial cells.
Biochem. Pharmacol., **36**, (1987), 2701.

GRAESSMANN, A., GRAESSMANN, M., MULLER, C.

Microinjection of early S.V. 40 DNA fragments and T antigen.
Meth. Enzymol., **65**, (1980), 4831.

GRANGER, D.N.

Role of xanthine oxydase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury.
Am. J. Physiol., **255**, (1988), 1269.

GRANGER, D.N., RUTILI, G., Mc CORD, J.M.

Superoxide radicals in feline intestinal ischemia.
Gastroenterology, **81**, (1981), 22.

GREEN, M.J., ALLEN, H., HILL, O.

Chemistry and biochemistry of oxygen.
Meth. Enzymol., **105**, (1984), 3.

GREENWALD, R.A.

Effect of oxygen-derived free radicals on connective tissue macromolecules.
in Developments in biochemistry, vol. 11B, edited by BANNISTER, W.H.,
BANNISTER, J.V., Elsevier/North Holland, (1980), 160.

**GUARNIERI, C., FERRARI, R., CECONI, C., CURELLO, S.,
CALDERA, C.M., ALBERTINI, A. VISOLI, O.**

Oxygen-mediated myocardial damage during ischaemia and reperfusion : role
of the cellular defenses against oxygen toxicity.
J. Mol. Cell. Cardiol., **17**, (1985), 937.

**HALL, E.R., MANNER, Ch. E., CARINHAS, J., SNOPTO, R.,
RAFELSON, M.**

Selective internalisation of arachidonic acid by endothelial cells.
Biochem. J., **247**, (1987), 151.

HALLIWELL, B.

Free radicals and metal ions in health and disease.
Proc. Nutr. Soc., **46**, (1987), 13.

HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE, J.M.C.

Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease.
Biochem. J., **219**, (1984), 1.

HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE, J.M.C.

The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases.
Mol. Aspects Med., **8**, (1985), 89.

HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE, J.M.C.

in Free radicals in biology and medicine, edited by them,
Clarendon Press, (1985).

HAUDENSCHILD, C.C.

Morphology of vascular endothelial cells in culture.
in Biology of endothelial cells, edited by JAFFE, E.A., (1984), 130.

HEARSE, D.J., HUMPHREY, S.M., BULLOCK, G.R.

The oxygen paradox and the calcium paradox : two facets of the same problem.
J. Mol. Cell. Cardiol., **10**, (1978), 641.

HEARSE, D.J., HUMPHREY, S.M., NAYLER, W.G., SLADE, A, BORDU, D.

Ultrastructural damage associated with reoxygenation of the anoxic myocardium.
J. Mol. Cell. Cardiol., **7**, (1975), 315.

HEYTLER, P.G. and PRICHARD, W.W.

A new class of uncoupling agents, carbonylcyanoide phenylhydrazones.
Biochem. Biophys. Res. Comm., **7**, (1962), 272.

HOCHSTEIN, P., JAIN, S.K., RICE-EVANS, C.

The Physiological signifiacnce of oxidative perturbations in erythrocyte membrane lipids and proteins.
in The Red Cell : Fifth Am. Arber Conference, AR Liss. Inc., New York, (1981), 449.

HODGSAN, E.K. and FRIDOVICH, I.

The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide : inactivation of the enzyme.
Biochemistry, **14**, (1975), 5294.

**HORION, J.M., LEVINE, J.D., CALLABAN, K.S., SCHWARTZ, B.R.,
HARKER, L.A.**

Glutathione redox cycle protects cultured endothelial cells against lysis by extracellularly generated hydrogen peroxide.
J. Clin. Invest., **73**, (1984), 706.

HOUSLAY, M.D. and STANLEY, K.K.

in Dynamics of Biological membranes.
Edited by WILLEY and SAMS, New York, (1983).

HOUSSET, B. and JUNOD, A.F.

Effects of culture conditions and hyperoxia on antioxidant enzymes in pig pulmonary artery and aortic endothelium.
Biochim. Biophys. Acta, **716**, (1982), 283.

HYALMARSSON, J.S.

Isolation and sequence of the complementary DNA encoding for human extracellular SOD.
Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., **84**, (1987), 6340.

JAFFE, E.A., HOGER, L.W., NACHMAN, R.L.

Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells.

J. Clin. Invest., **52**, (1973), 2757.

JAFFE, E.A.

Synthesis of factor VIII by endothelial cells.

in Biology of endothelial cells, JAFFE, E.A. ed., (1984), 209.

JAFFE, E.A.

Cell biology of endothelial cells.

Hum. Pathol., **18**, (1987), 234.

JAFFE, E.A., NACHMAN, R.L., BECKER, C.G., MINICK, C.R.

Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins.

J. Clin. Invest., **52**, (1973), 2745.

JANES, T.W., THOR, H., ORRENIUS, S.

Cellular defense mechanisms against toxic substances.

Arch. Toxicol., Suppl. **9**, (1986), 259.

**JARASH, E.D., GRUND, C., BRUDER, G., HEID, H.W., KEENAN, T.W.,
FRANKE, W.N.**

Localization of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium and capillary endothelium.

Cell, **25**, (1981), 67.

JARASH, E.D., BRUDER, G., HEID, H.W.

Significance of xanthine oxidase in capillary endothelial cells.

Acta Physiol. Scand., **548**, (1986), 39.

**JENNINGS, R.B., HAWKINS, H.K., LOWE, J.E., HILL, M.C.,
KLOTTMAN, S., REIMER, K.A.**

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

Am. J. Pathol., **92**, (1978), 187.

JOBSIS, F.F. and LAMANNA, J.D.

Kinetic aspects of intracellular redox reactions : *in vivo* effects during and after hypoxia and ischemia.

in Extrapulmonary manifestations of respiratory disease, edited by ROBIN, E.G., **63**, Marcel Dekker, New York, (1978).

JONES, C.E., CROWELL, J.W., SMITH, E.E.

Significance of increased blood uric acid following extensive hemorrhage.

Am. J. Physiol., **214**, (1968), 1374.

JONES, D.P.

The role of oxygen concentration in oxidative stress : hypoxic and hyperoxic models.
in Oxidative stress, edited by SIES, H., Academic Press, London, (1985), 151.

JUNCQUEIRA, L.C. and CARNEIRO, J.

Tissus épithéliaux.
in Histologie (3rd edition), edited by PICCIN, N., (1987), 96.

KAKO, K.J.

Free radical effects on membrane protein in myocardial ischemia/reperfusion injury.
J. Mol. Cell. Cardiol., **19**, (1987), 209.

KANTOS, H.A., WEI, E.P., POVLISHOCK, J.T., CHRISTMAN, C.W.

Oxygen radicals mediate the cerebral arteriolar dilatation from arachidonate and bradykinin in cats.
Circ. Res., **55**, (1984), 292.

KASPAREK, S.

Chemistry of tocopherols and tocotrienols.
in Vitamine E. A comprehensive treatise, edited by MACHLIN, L.J., Marcel Dekker Inc., New York, (1980), 7.

KATZ, A.M. and REUTER, H.

Cellular calcium and cardiac cell death.
Am. J. Cardiol., **44**, (1979), 188.

KELLOGG, E.W. and FRIDOVICH, I.

Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymically generated superoxide and hydrogen peroxide.
J. Biol. Chem., **252**, (1977), 6721.

KHALIDI, U.A.S. and CHAGLIASSIAN, T.H.

The species distribution of xanthine oxidase.
Biochem. J., **97**, (1965), 318.

KLEBANOFF, S.J.

Oxygen - dependent cytotoxic mechanisms of phagocytes.
in Advances in Host Defense Mechanisms, edited by GALLIN, J.I. and FAUCI, A.S., vol. 1, Raven Press, New York, (1982), 111.

KONO, Y. and FRIDOVICH, I.

Superoxide radical inhibits catalase.
J. Biol. Chem., **257**, (1982), 5751.

KRAMER, J.A., ANAYO, C.M., WEGLIICKI, W.B.

Direct observation of free radical generation in ischemic hearts.
Circulation, **76**, (1987), 199.

KURABAWA, M., ZHI-YI, Z., YOSHII, G.

ESR of spin-trapped radicals in aqueous solutions of pyridine nucleosides and nucleotides : reactions of the hydroxyl radical.
Int. J. Radiat. Biol., **41**, (1982), 241.

LATRUFFE, N.

Transport of D- β -hydroxybutyrate across rat liver mitochondrial membranes.
Comp. Biochem. Physiol., **88b**, (1987), 797.

LEAF, A.

Cell swelling : a factor in ischemic tissue injury.
Circulation, **48**, (1973), 455.

LEE, Y.M., FRIEDMAN, D.J., AYALA, F.J.

Superoxide dismutase : evolutionary puzzle.
Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., **82**, (1985), 824.

LEHNINGER, A.L.

Biochimie.
Flammarion, (2de éd.), France, (1979).

LEWIS, A.S., MURPHY, L., Mc ALLA, C., FLEARY, M., PURCELL, S.

Folic acid is a potent inhibitor of xanthine oxidase.
J. Biol. Chem., **259**, (1984), 5.

LOVSTAD, R.A.

Copper catalysed oxidation of ascorbate (vitamin C). Inhibition effect of catalase, superoxide dismutase, serum proteins (ceruloplasmine, albumine, apotransferrine) and amino acids.
Int. J. Biochem., **19**, (4), (1987), 309.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.

Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem., **193**, (1951), 265.

MARKLUND, S.L.

Superoxide dismutase in human tissues, cells and extracellular fluids : clinical implications.
in Free radicals, aging and degenerative disease, edited by JOHNSON, J.E., WALFORD, R., HOUNAN, D., MIGUEL, J., ALAN R. LISS. Inc., New York, (1986), 509.

MASON, R.P.

Free radical intermediates in the metabolism of toxic chemicals.
in Free radicals in Biology, vol. 5, edited by PRYOR, W.A., Academic Press, New York, (1982), 161.

MASON, R.P. and CHIGNELL, C.F.

Free radicals intermediates in pharmacology and toxicology.
Pharmacol. Rev., **33**, (1982), 189.

MASON, R.P., KALYANARAMAN, B., TAINER, B.E., ELING, T.E.

A carbon centered free radical intermediate in the prostaglandin synthetase oxidation of arachidonic acid : spin trapping and oxygen uptake studies.
J. Biol. Chem., **256**, (1980), 5019.

MASTERS, C. and HOLMES, R.

Peroxisomes : new aspects of cell physiology and biochemistry.
Physiol. Rev., **57**, (1977), 891.

MBEMBA, F., HOUBION, A., RAES, M., REMACLE, J.

Subcellular localization and modification with ageing of glutathione, glutathione peroxidase and glutathione reductase activities in human fibroblasts.
Biochim. Biophys. Acta, **838**, (1985), 211.

Mc CORD, J.M.

Oxygen - derived free radicals in postischemic tissue injury.
N. Engl. J. Med., **312**, (1985), 159.

Mc CORD, J.M.

Oxygen-derived radicals : A link between reperfusion injury and inflammation.
Fed. Proc., **46**, (1987), 2402.

Mc CORD, J.M.

Superoxide, superoxide dismutase and oxygen toxicity.
in Reviews in Biochemical Toxicology, edited by HODGSON, E., BEND, J. and PHILPOT, R.M., vol. 1, Elsevier/North Holland New York, (1979), 109.

Mc CORD, J.M., WANG, K., STOKES, S., PETRONE, W., ENGLISH, D.

Superoxide and inflammation : a mechanism for the anti-inflammatory activity of superoxide dismutase.
Acta Physiol. Scand., **25**, (1980), 492.

MICHALE, L.H., HUNT, J.R., WEILBAECHER, D., PERRYMAN, M.V., ROBERTS, R., LEWIS, R.M., ENTMAN, M.L.

Creatine kinase and phosphorylase in cardiac lymph : coronary occlusion and reperfusion.
Am. J. Physiol., **248**, (1985), 350.

MICHIELS, C. and REMACLE, J.

Microinjection of catalase, SOD, GSH peroxidase in human diploid fibroblasts exposed to 2 atm of 95% O₂.
Arch. Int. Physiol. Biochem., **93**, (1985), S 27.

MICHIELS, C., TOUSSAINT, O., REMACLE, J.

Comparative study of oxygen toxicity on human fibroblasts and endothelial cells.
J. Cell. Physiol. (soumis pour publication).

MICHIELS, C., RAES, M., HOUBION, A., REMACLE, J.

Association of antioxydant systems in the protection of human fibroblasts against oxygen derived free radicals.
Free Rad. Biol. Med., (1989), soumis pour publication.

MIKI, S., ASHRAF, M., SALKA, S., SPERELATIS, N.

Myocardial dysfunction and ultrastructural alterations mediated by oxygen metabolites.
J. Mol. Cell. Cardiol., **20**, (1988), 1009.

MOODY, C.S. and HASSAN H.M.

Mutagenicity of oxygen free radicals.
Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., **79**, (1982), 2855.

MOLENAAR, I, HULSTAEERT, C.E., HARDONK, M.J.

Role of vitamine E in function and ultrastructure of cellular membranes.
in Vitamin E. A comprehensive treatise, edited by MACHLIN, L.J., Marcel Dekker Inc., New York, (1980), 373.

MORRIS, J.B., HAGLUND, U., BULKLEY, G.B.

The protection from postischemic injury by xanthine oxidase inhibition : blockade of free radical generation on purine salvage.
Gastroenterology, **12**, (1987), 1542.

MOORHOUSE, P.C., GROOTVELD, M., HALLIWELL, B. QUINLAN, J.G., GUTTERIDGE, J.M.C.

Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers.
FEBS Lett., **213**, (1987), 23.

MULLANE, K.M., READ, N., SALMON, J.A., MONCADA, S.

Role of leukocytes in acute myocardial infarction in anesthetized dogs : relationship to myocardial salvage by anti-inflammatory drugs.
J. Pharmacol. Exp. Ther., **228**, (1984), 510.

MULLANE, K.M., KRAEMER, R., SMITH, B.

Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium.
J. Pharmacol. Meth., **14**, (1985), 157.

MYERS, L.S.

Free radical damage of nucleic acids and their components.
in Free Radicals in Biology, vol. 4, edited by PRYOR, W.A., Academic Press, New York, (1980), 95.

NAQUI, A., CHANCE, B., CADENAS, F.

Reactive oxygen intermediates in biochemistry.
Ann. Rev. Biochem., **55**, (1986), 137.

NAYLER, W.G.

The role of calcium in the ischaemic myocardium.
Am. J. Physiol., **262**, (1981), 167.

NIELSEN, H.

Covalent binding of peroxidized phospholipid to proteins. III. Reaction of individual phospholipids with different proteins.
Lipids, **16**, (1981), 215.

NIKI, E.

Antioxidants in relation to lipid peroxidation.
Chem. Phys. Lipids, **44**, (1987), 227.

NISHIKIMINI, M., YAMADA, H., YOGI, K.

Oxidation by superoxide of tocopherols dispersed in aqueous media with deoxycholate.
Biochim. Biophys. Acta, **627**, (1980), 101.

ODY, J. and JUNOD, A.F. (1985)

Direct toxic effects of paraquat and oxygen on cultured endothelial cells.
Lab. Invest., **52**, (1985), 77.

OZAWA, T., HANAKI, A., MATSUMOTO, S., MATSUO, M.

Electron spin resonance studies of radicals obtained by the reaction of α -tocopherol and its model compounds with superoxide.
Biochem. J., **150**, (1975), 31.

PACKER, L.

Oxygen radicals in biological systems.
Meth. Enzymol., **105**, (1984), 1.

PARKS, D.A. and GRANGER, D.N.

Ischemia-induced vascular changes : role of xanthine oxidase and hydroxyl radical.
Am. J. Physiol., **245**, (1983), G285.

PETRONE, W.F., ENGLISH, D.K., WANG, K., Mc CORD, J.M.

Free radicals and inflammation : superoxide dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma.
Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., **77**, (1980), 1159.

PHILLIPS, H.J.

Dye exclusion tests for cell viability.
in Tissue culture, Methods and Application, chapter 3, edited by KRUSE, P.F., PETTERSON, M.K., Academic Press, New York, (1973).

PIGEOLET, E.

Rapport d'activité I.R.S.I.A., 1985-1986.
FNDP, Namur, (1986).

PIGEOLET, E., CORBISIER, P., HOUBION, A., LAMBERT, D., MICHIELS, C., RAES, M., ZACHARY, M.D., REMACLE, J.

Glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals.
Mech. Aging Dev., sous presse.

PRYOR, W.A.

The role of free radical reactions in biological system.
in Free radical in biology, vol. 1, edited by PRYOR, W.A., (1976), 1.

QUINN, P.J. and CHAPMAN, D.

The dynamics of membrane structure.
CRC Crit. Rev. Biochem., **8**, (1980), 1.

RAES, M., MICHIELS, C., REMACLE, J.

Comparative study of the enzymatic defense systems against oxygen-derived free radical : the key role of glutathione peroxydase.
Free Rad. Biol. Med., **3**, (1987), 3.

RODEWALD, R.

Distribution of immunoglobulin G receptors in the small intestine of the young rat.
J. Cell. Biol., **85**, (1980), 18.

ROMSON, J.L., HOOK, B.G., KUNKEL, S.L., ABRAMS, G.D., SHORK, M.A., LUCCHESI, B.R.

Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog.
Circulation, **67**, (1983), 1016.

ROSEN, G.M. and FREEMAN, B.A.

Detection of superoxide generated by endothelial cells.
Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., **81**, (1984), 7269.

ROTILIO, G., BRAY, R.C., FIELDEN, E.M.

A pulse radiolysis study of superoxide dismutase.
Biochem. Biophys. Acta, **268**, (1972), 605.

ROY, R.S. and Mc CORD, J.M.

Superoxide and ischemia : conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase.

in Oxy radicals and their scavenger systems : vol. II Cellular and molecular aspects, edited by GREENWALD, R. and COHEN, G., Elsevier Science, New York, (1983), 145.

RUBANYI, G.M.

Vascular effects of oxygen-derived free radicals.
Free Rad. Biol. Med., **4**, (1988), 107.

SEVANIAN, A., STEIN, R.A., MEAD, J.F.

Metabolism of epoxidised phosphatidylcholine by phospholipases A2 and epoxide hydrolase.
Lipids, **16**, (1981), 781.

SHEN, A.C. and JENNINGS, R.B.

Kinetics of calcium accumulation in acute myocardial ischaemic injury.
Am. J. Pathol., **67**, (1972), 441.

SIES, H.

Measurement of hydrogen peroxide formation in situ.
Meth. Enzymol., **77**, (1981), 15.

SIMPSON, P.J. and LUCCHESI, B.R.

Free radicals and myocardial ischemia and reperfusion injury.
J. Lab. Clin. Med., **110**, (1987), 13.

SINGER, S.J. and NICOLSON, G.L.

The fluid mosaic model of the structure of cell membranes.
Science, **175**, (1972), 720.

SLATER, T.F.

Free-radical mechanisms in tissue injury.
Biochem. J., **222**, (1984), 1.

SLATER, F.K., CHEESEMAN, K.H., DAVIES, M.J., PRANDFOOT, K., XIN, W.

Free radical mechanisms in relation to tissue injury.
Proc. Nutr. Soc., **46**, (1987), 1.

**STOCKER, R., YAMAMOTO, Y., Mc DONAGH, A.F., GLAZEY, A.N.,
ARNES, B.N.**

Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance.
Science, New York, **235**, (1987), 945.

STUBBS, C.D.

Membrane fluidity : structure and dynamics of membrane lipids.
Essays Biochem., **19**, (1983), 1.

STUBBS, C.D. and SMITH, A.D.

The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid
composition in relation to membrane fluidity and function.
Biochem. Biophys. Acta, **779**, (1984), 89.

SUTTORP, N., TOPFFER, W., ROKA, L.

Antioxidant defense mechanisms of endothelial cells : glutathione redox cycle
versus catalase.
Am. J. Physiol., **251**, (1986), 671.

**TAMURA, Y., CHIL, L., DRISCOLL, E.M., HOFF, P.T., FREEMAN, B.A.,
GALLAGHER, K.P., LUCCHESI, B.R.**

Superoxide dismutase conjugated to polyethylene glycol provides substained
protections against myocardial ischemia/reperfusion injury in canine heart.
Circul. Res., **63**, (1988), 944.

THEORELL, H.

The iron containing enzymes B. Catalases and peroxidases -
Hydroperoxidases.
in The Enzymes, edited by SUMMER, J.B. and MYRBACK, K.,
New York, Academic, vol. II, (1951), 397.

THORGEIRSSON, G.

Structure and morphological features of vascular endothelium.
in Biochemical interactions at the endothelium, edited by CRYER, A.,
Elsevier, Amsterdam, (1983), 5.

TRELSTAD, R.L., LAWLEY, K.R., HOLMES, L.B.

Nonenzymatic hydroxylations of proline and lysine by reduced oxygen
derivatives.
Nature, **289**, (1981), 310.

TURRENS, J.F. and BOVERIS, A.

Generation of superoxide anion by NADH dehydrogenase of bovine heart
mitochondria.
Biochem. J., **191**, (1980), 421.

WARD, J.F.

Symposium on radical processes in radiobiology and carcinogenesis : some biochemical consequences of the spatial distribution of ionizing radiation produced free radicals.

Radiat. Res., **86**, (1981), 185.

WEGLIICKI, W.B., WAITE, B.M., STAM, A.C.

Association of phospholipase A with a myocardial membrane preparation containing the $(\text{Na}^+ - \text{K}^+) - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$.

J. Mol. Cell. Cardiol., **4**, (1972), 195.

WILLSON, R.L.

Vitamin, selenium, zinc and copper interactions in free radical against ill-placed iron.

Proc. Nutr. Soc., **46**, (1987), 27.

WINKLER, B.S.

In vitro oxidation of ascorbic acid and its prevention by glutathione.

Biochim. Biophys. Acta, **925**, (1987), 258.

ZWEIR, J.L., RAYBURN, B.K., FLAHERTY, J.T., WEISFELDT, M.L.

The effect of superoxide dismutase on free-radical concentrations in postischemic myocardium.

Circulation, **74**, (1986), 371.