

# **THESIS / THÈSE**

## MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Modulation phénotypique des cellules musculaires lisses en culture: synthèse et dégradation de la matrice extracellulaire

Schoevaerdts, Magali

Award date: 1996

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.

SECRETARIAT BIOLOGIE F. U. N. D. P. Rule de Brusselles. 61

FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX



NAMUR

# FACULTE DES SCIENCES

-----

Reçu le 0 2 DEC. 1996

# MODULATION PHÉNOTYPIQUE DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES EN CULTURE : SYNTHESE ET DEGRADATION DE LA MATICE EXTRACELLULAIRE

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

> Magali SCHOEVAERDTS décembre 1996

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

# Modulation phénotypique des cellules musculaires lisses en culture : synthèse et dégradation de la matrice extracellulaire

SCHOEVAERDTS Magali

## <u>Résumé</u>

Les cellules musculaires lisses (CML) semblent jouer un rôle important dans le développement des veines variqueuses. Elles subissent dans ces pathologies une transition d'un état contractile à un état synthétique et prolifèrent. La prolifération serait induite par les facteurs mitogènes  $PGF_{2\alpha}$  et bFGF libérés par les cellules endothéliales (CE) activées par la stase veineuse.

Dans ce travail nous avons établi un modèle expérimental qui permet d'obtenir les deux phénotypes des CML. Leur caractérisation biochimique montre que les CML synthétisent plus de protéines et plus de collagène que les CML contractiles. Les CML sont également capables de sécréter des métalloprotéinases matricielles.

Par ailleurs, le bFGF, la PGF2 $\alpha$  et les facteurs libérés par les CE activées par l'hypoxie inhibent la synthèse de collagène. Ils ne sont donc pas à proprement parler capables d'induire une dédifférenciation des CML contractiles en CML synthétiques.

Ils joueraient toutefois un rôle essentiel dans la stimulation de la prolifération des CML et donc dans le développement des altérations de la paroi veineuse observées dans les veines variqueuses.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques Décembre 1996 Promoteur: C. Michiels Co-promoteur: Professeur J. Remacle Tout au long de ce travail, j'ai été aidée et conseillée par un grand nombre de personnes, je tiens à leur exprimer toue ma gratitude.

Je commencerai par le professeur Remacle en le remerciant de m'avoir accueillie dans son équipe pendant ces quelques mois. Son expérience et son savoir furent souvent très précieux.

Ensuite, je remercie Carine Michiels pour sa gentillesse, sa grande disponibilité et pour ses connaissances qui m'ont tant apporté dans la réalisation de ce travail. Je n'oublierai pas non plus la patiente qu'elle a eue envers moi.

Merci à Andrée Houbion qui m'a initiée à la culture cellulaire, ansi qu'à François Eliaers qui a toujours été là pour me préparer les milieux de culture.

Merci également à Nancy Berna qui a toujours été prête à m'assister à tout moment.

Merci à Edouard Delaive, the King of the SUN, et à Isabelle Roland dont je n'oublierai pas la compétence et les nombreux conseils.

Merci aussi à Monsieur Van Acker qui a toujours été là pour le développement de nos photos ,gels,...

J'aimerais dire enfin un grand merci à tout le reste de l'équipe, grâce à qui une bonne ambiance régnait au labo.

A tous,

Merci beaucoup.

Magali Schoevaerdts

# TABLE DES MATIÈRES

A. INTRODUCTION	1
I. LES VAISSEAUX SANGUINS	2
I.1. L'appareil vasculaire	2
I.2. Morphologie de la paroi veineuse	3
a. Tunique interne, Intima b. Tunique moyenne, Média c. Tunique externe, Adventice	3 3 3
II. LES CELLULES ENDOTHELIALES	4
II.1. L'endothélium vasculaire et la coagulation	5
II.2. L'endothélium vasculaire et la matrice extracellulaire	5
II.3. L'endothélium vasculaire et la vasomotricité II.3.1. Les facteurs dilatateurs * Prostacycline * EDBE	6 6
II.3.2. Les facteurs constricteurs * Endothéline	7
<ul><li>II.4. L'endothélium vasculaire et les facteurs de croissance</li><li>II.4.1. Le PDGF</li><li>II.4.2. Le bFGF</li><li>II.4.3. Le EDGF</li></ul>	7 8 8 8
III. LES MALADIES VEINEUSES	9
III.1. Définition	9
III.2. La veine malade	9

III.3. Facteurs de risque de l'insuffisance veineuse III.3.1. Les facteurs constitutionnels * Age * Hérédité * Sava	10 10
III.3.2. Les facteurs non constitutifs a. Facteurs comportementaux * La taille et le poids * La sédentarité	11
<ul> <li>b. Facteurs dynamiques</li> <li>* Troubles de la statique</li> <li>* Influence des sports</li> </ul>	12
c. Facteurs hormonaux * Grossesse * Contraception	12
# Hypothèse	13
<ul> <li># Modèle expérimental</li> <li>b. 1.) Altération d'ordre énergétique</li> <li>b. 2.) Altérations d'ordre membranaire</li> <li>b. 3.) Altération d'ordre synthétique</li> <li>b. 4.) Explication des altérations morphologiques</li> </ul>	13 14 14 15 15
IV. LES CELLULES MUSCULAIRES LISSES	17
IV.1. Modulation phénotypique	18
IV.2. CML contractiles: aspect morphologique	19
IV.3. CML synthétiques: aspect morphologique	20
V. LA MATRICE EXTRACELLULAIRE	21
V.1. Synthèse de la MEC par les CML	21
V.1.1. Les différents composants de la MEC * Fibronectine * Laminine * Les protéoglycans	21 21 22 22
V.1.2. Le Collagène a. Structure moléculaire b. Nomenclature c. MMP	22 23 23 24

# VI. BUT DU MEMOIRE

# **B. MATERIEL ET METHODES**

I.	CULTURE DES CELLULES MUSCULAIRES	
]	LISSES	28
	I.1. Matériel et solutions	28
	I.2. Décongélation et mise en culture	28
	I.3. Repiquage	29
	,	
II.	CULTURE DES CELLULES ENDOTHELIALES	29
	II.1. Matériel et Solutions	30
	II.2. Mise en culture	31
	II.3. Repiquage et sous-culture	31
	II.4. Incubation sous hypoxie	32
III	. DOSAGE DE LA SYNTHESE TOTALE DES	32
	PROTEINES	
	III.1. Principe	32
	III.2. Solutions	32
	III.3. Méthode	33
	III.4. Dosage proprement dit	34
	III.5. Calcul	34
IV	DOSAGE ADN	34
1.1		54
	IV.1. Principe	34
	IV.2. Solution	34
	IV.3. Méthode	34
V	DOSAGE DE LA SVNTHESE TOTALE DE	35
• •	COLLAGENE	55
	V.I. Principe	35
	V.2. Solutions	35
	V.3. Marquage des protéines	36
	V.4. Dosage proprement dit	36

VI.	MARQUAGE ET PURIFICATION DES COLLAGENES	36
	VI.1. Solutions VI.2. Méthode	36 37
VII	. ANALYSE DES COLLAGENES PAR ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYMALIDE - SDS	38
	<ul><li>VII. 1. Principe</li><li>VII. 2. Solutions</li><li>VII.3. Préparation du gel</li><li>VII.4. Fluorogramme</li></ul>	38 38 39 40
VII	I. ZYMOGRAMME	40
	VIII.1. Principe VIII.2. Solutions VIII.3. Méthode	40 40 42
C.	RESULTATS	44
I. N	IODULATION PHÉNOTYPIQUE DES CML	44
	I.1. Caractérisation des deux phénotypes # Résultats # Discussion	44 45 46
	I.2. Effet des PG et bFGF sur la masse extracellulaire # Résultats # Discussion	47 48 48
	<ul> <li>I.3. Effet direct des milieux conditionnés de cellules endothéliales incubées sous hypoxie # Résultats # Discussion</li> </ul>	49 49 50

II.	MATRICE EXTRACELLULAIRE	52	
	II.1. Effet des mitogènes sur la synthèse de collagène		
	II.1.1. Synthèse totale II.1.2. Analyse des différents type de collagène II.1.3. Discussion	52 53 53	
	II.2. Métallo-protéinases matricielles	54	
	II.2.1. Libération des MMP par les CML	55	
	des métallo-protéinases II.2.3. Effet des prostaglandines sur la synthèse	55	
	des MMP	56	
	II.2.4. Effet du bFGF sur la synthèse des MMP II.2.5. Effet direct des milieux conditionnés de	56	
	cellules endothéliales incubées sous hypoxie	57	
	# Discussion	57	
D.	CONCLUSION	59	

# **D. CONCLUSION**

# **E. BIBLIOGRAPHIE**

62

# LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	:	acide désoxyribonucléique
APS	:	ammonium persulfate
ARNm	:	acide ribonucléique messager
ATP	:	adénosine triphosphate
$\beta-APN$	:	$\beta$ -aminopropionitrile
bFGF	:	basic fibroblast growth factor
BMI	:	body mass index
Ca++	:	ion calcium
CE	:	cellule endothéliale
CML	:	cellule musculaire lisse
DMSO	:	diméthylsulfoxyde
EDGF	:	endothelium-derived growth factor
EDRF	:	endothelium-derived relaxing factor
EDTA	:	ethylene diamine tetra-acetate
EHS	:	Engelbreth Holm Scharm
HBSS	:	Hank's balanced salt solution
HUVEC	:	human umbilical vein endothelial cells
MMP	:	métalloprotéinases matricielles
NEM	:	N-éthylmaléimide
NO	:	oxyde nitrique
O2	•	molécule d'oxygène
PAF	:	platelet-activating factor
PBS	:	phosphate buffer saline

PDGF	:	platelet-derived growth factor
PGF <sub>2</sub> a	:	prostaglandine $F_2\alpha$
PMN	:	polymorphonucléaire neutrophile
PMSF	:	phénylméthane sulfonyl fluoride
PO <sub>2</sub>	:	pression partielle en O2
SDS	:	sodium dodécyl sulfate
TCA	:	acide trichloroacétique

# A. INTRODUCTION

De nombreuses pathologies veineuses constituent encore une cause importante de morbidité et de mortalité dans nos pays industrialisés.

Il est donc très important de mieux comprendre l'étiologie de ces pathologies afin de pouvoir, dans le futur, définir de meilleures approches thérapeutiques.

Toute insuffisance veineuse se traduit par un ralentissement de la circulation dans les membres inférieurs, qu'elle prive alors partiellement de leur apport en oxygène. Cette hypoxie locale perturbe profondément le métabolisme des cellules de la paroi vasculaire. En effet, celle-ci n'est pas une simple barrière mécanique, mais assure de nombreuses fonctions et les deux types cellulaires qui la composent en sont affectés.

D'une part, les cellules endothéliales (CE), en contact direct avec les éléments du sang, constituent une barrière à perméabilité sélective indispensable à l'intégrité des tissus. D'autre part, les cellules musculaires lisses (CML), cellules principales de la média subissent également des modifications.

Ce sont ces modifications faisant intervenir cellules endothéliales et cellules musculaires lisses qui conduisent finalement au développement d'une veine variqueuse.

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

Dans un premier temps, nous décrirons les vaisseaux sanguins ainsi que les cellules endothéliales, cellules qui forment la première couche des vaisseaux sanguins. Nous examinerons également comment ces cellules réagissent à des conditions d'hypoxie.

Ensuite, nous décrirons les pathologies veineuses, en particulier, les varices et nous tenterons d'expliquer l'hypothèse émise aujourd'hui quant à l'origine de ces pathologies.

Enfin, nous nous focaliserons sur les cellules musculaires lisses ainsi que sur leurs propriétés. Nous étudierons principalement les caractéristiques biochimiques du collagène; sa synthèse en abondance par les CML ainsi que la dégradation par différents enzymes: les métallo-protéinases. Cette dernière partie étant le sujet principal de notre travail.

# I. LES VAISSEAUX SANGUINS

Les vaisseaux sanguins constituent le système vasculaire qui a pour origine embryologique le mésoblaste intra-embryonnaire. C'est un vaste réseau de tubes, disposés en circuit fermé, à l'intérieur duquel circule le sang, essence de la vie.

Chaque vaisseau est constitué d'une paroi vasculaire comprenant plusieurs types cellulaires organisés en plusieurs couches.

Cette paroi n'est pas seulement un décor, c'est également un lieu d'échanges indispensables pour la vie.

Chaque cellule vasculaire a son propre rôle et ses propriétés intrinsèques.

# I.1. L'APPAREIL VASCULAIRE

L'appareil vasculaire comporte différents éléments:

- Le coeur dont la fonction est de pomper le sang

- Une série de vaisseaux efférents: les artères, qui conduisent le sang contenant les éléments nutritifs et l'O<sub>2</sub> aux tissus.

- Un réseau diffus de fins capillaires qui irriguent les tissus et permettent des échanges avec le sang.

- Les veines qui ramènent le sang appauvri en O<sub>2</sub> au coeur et jouent le rôle de pompe-moteur.

D'un point de vue fonctionnel, il y a deux types de circulation. La circulation pulmonaire permet les échanges entre l'air et le sang afin qu'il s'enrichisse en  $O_2$  et qu'il élimine le gaz carbonique, tandis que la circulation systémique permet en premier lieu de distribuer le sang riche en  $O_2$  à l'ensemble des tissus et en second lieu, par l'intermédiaire du système veineux, de ramener au coeur du sang désaturé en  $O_2$  et riche en  $CO_2$  et déchets.

Nous ne rentrerons pas dans une description poussée de tous les vaisseaux sanguins. Nous nous arrêterons principalement sur le système veineux, la veine étant l'endroit de la pathologie étudiée.



- 1. Endothelium
- 2. Sous-endothelium

3. Limitante élastique interne

- 4. Media
- 5. Limitante élastique externe
- 6. Adventice

# Figure 1: Morphologic de la paroi veineuse.

(D'après Carpentier, 1994)

## **I.2. MORPHOLOGIE DE LA PAROI VEINEUSE**

(Dr Leloup, cours d'histiologie spéciale)

Les vaisseaux sont structurellement adaptés en fonction de leur rôle physiologique. Ainsi, le système veineux est organisé de manière à assurer le retour du sang vers le coeur ; dans la lumière des larges veines, on trouve de nombreuses valvules et dans la couche externe du vaisseau, une épaisse musculature.

Au niveau fonctionnel, les veines peuvent être considérées comme des vaisseaux de grande capacité puisqu'elles contiennent continuellement plus de 70 % du volume sanguin total.

La paroi veineuse est constituée de trois tuniques. (cfr.figure 1) De la lumière du vaisseau vers sa périphérie, nous trouvons:

## a) La tunique interne ou INTIMA

Composée d'une fine couche de cellules endothéliales et reposant sur une membrane basale, l'intima comprend également une couche sousendothéliale formée de tissu conjonctif libre lâche, de glycoprotéines et parfois de CML.

### b) La tunique moyenne ou MEDIA

Constituée de couches concentriques de CML à l'origine d'un tissu conjonctif (surtout composé de fibres collagène ), la média est la couche principale de la paroi veineuse.

On y distingue deux types de CML: d'une part, celles qui contiennent en abondance des protéines contractiles responsables de la vasoconstriction (cellule contractile) et d'autre part, quelques rares cellules dont les organes métaboliques sont prépondérants (cellule synthétique).

#### c) La tunique externe ou ADVENTICE

Celle-ci enserre dans un tissu conjonctif lâche, des vasa vasorum, des vaisseaux lymphatiques et des terminaisons nerveuses sympathiques qui assurent la contraction de la musculature de la média et donc la vasocontraction veineuse.

Le tissu conjonctif lâche composé de fibres de collagène orientées longitudinalement permet au vaisseau de s'adapter aux différences du flux sanguin. Les vaso vasorum, vaisseaux nourriciers des larges veines, fournissent les métabolites à l'adventice et à la média, trop épaisses pour être nourries par diffusion à partir de la lumière. Ces vaisseaux sont plus nombreux dans les veines que dans les artères, probablement à cause de la pauvreté en O<sub>2</sub> et en substances nutritives du sang veineux.

L'adventice est la couche la plus épaisse des veines et augmente au fur et à mesure que la veine s'élargit.

Ces trois couches forment également la paroi artérielle. Cependant les trois tuniques sont plus différenciées dans la paroi artérielle qui est plus épaisse, plus pauvre en collagène et plus riche en cellules musculaires et en élastine que la paroi veineuse.

Les valvules sont formées de deux replis endothéliaux avec la concavité dirigée vers le coeur, dans lesquels se glisse une lame fibro-élastique qui assure leur étanchéité.

# **II. LES CELLULES ENDOTHELIALES**

Les cellules endothéliales sont situées entre le sang et la lymphe interstitielle: elles constitutent l'endothélium. Ce dernier est essentiel et permanent dans tout l'appareil circulatoire; il est renforcé extérieurement par des éléments conjonctifs et musculaires.

En microscopie optique: Les cellules endothéliales apparaissent aplaties (polygonales), étirées dans le sens du courant sanguin; jointives et imbriquées les unes dans les autres.

Le noyau est allongé dans l'axe du vaisseau, fusiforme, légèrement en saillie dans la lumière.

En microscopie électronique: les cellules endothéliales renferment tous les organites usuels et présentent un nombre important de vésicules claires ainsi que de nombreuses invaginations.

Ces vésicules et invaginations sont l'image d'un transport transcellulaire important et plus précisément d'une micropinocytose.

La surface de ces cellules est entourée d'une enveloppe riche en carbohydrates: le glycocalyx. (Luft, 1966) Celui-ci est constitué de glycosaminoglycans et de chaînes de polysaccharides de la membrane plasmique. (Parsons et Subjeck, 1972)



# Figure 2:

19 ITC 2: Schematic diagram shows endothelium-derived contracting factors (EDCF) produced in the blood vessel wall. Cyclooxygenase pathway after stimulation by receptors (open circles) or physical forces can form thromboxane  $A_1$  (TXA<sub>2</sub>), prostaglandin  $H_1$  (PGH<sub>2</sub>), or superoxide radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), which inactivate ( $\odot$ ) nitric oxide (NO). Hormones such as angiotensin [I (AII), epinephrine, and arginine vasopressin (AVP) and coagulation factors such as thrombin (Thr) and transforming growth factor  $\beta$  (TGF<sub>2</sub>) can stimulate the production of endothelin (ET). An endothelial renin-angiotensin system that provides locally formed angiotensin II also may exist. AI, angiotensin I; AA, arachidonic acid: A23187, calcium ionophore; ACE, angiotensin converting enzyme; Ach, acetylcholine; ADP, adenosine diphosphate; ATG, angiotensin; NE, norepinephrine; 5-HT, serotonin (S-hydroxytryptamine). Reproduced from Reference 7, by permission of the American Hean Association.

(D'après Thomas et al, 1992)



#### L.Fajardo

Figure 3: Roles of endothetial cells (ECs) in coagulation. This and the following two figures show diagrammatically an EC resting on its basal lamina (BL). In this agure the cell is attached to another one on the left but separated from the next cell on the right, leaving a gap of uncovered 3L A platelet aggregate is forming at this gap. The substances produced by ECs are indicated by arrows coming out of the cytoplasm. Substances produced elsewhere are indicated by arrows entering the cytoplasm or ending at blocks located on the plasma membrane (membrane receptors). Agonistic effects are indicated by uncrossed arrows, Antagonistic effects are indicated by lines that are crossed or that intersect the arrow of the infected function. See list of appendix.

(D'après Fajardo, 1989)

Il n'y a pas de séparation nette entre le glycocalyx et la bicouche lipidique, c'est pourquoi le glycocalyx est généralement considéré comme faisant partie de la membrane plasmique.

L'endothélium intervient de façon capitale dans l'histophysiologie vasculaire par sa position, sa structure, mais surtout par ses propriétés. Les fonctions de l'endothélium sont à la fois globales concernant tout l'organisme et locales lorsqu'elles touchent les différents facteurs modulant les fonctions des cellules circulantes ou des tissus sous-jacents. Observons ces différents rôles:

# II.1. L'ENDOTHELIUM VASCULAIRE ET LA COAGULATION.

Tout d'abord l'endothélium participe à l'équilibre du système thrombolytique par ses propriétés anti-coagulantes qu'il doit notamment à la synthèse de l'activateur tissulaire du plasminogène et à l'expression à sa surface de thrombomoduline. Cette protéine lie la thrombine et lui fait perdre sa fonction pro-coagulante par l'intermédiaire de la protéine C qui, en présence de la protéine S, inactive les facteurs Va et VIIIa et augmente l'activité du plasminogène. (cfr. figures 2 et 3)

Polarisé négativement à cause du réseau de glycosaminoglycans, l'endothélium stimule l'antithrombine III; cette dernière inhibe alors toutes les sérines protéases de la coagulation et inhibe la thrombine et le facteur Xa.

Inversément, les cellules endothéliales sont capables de sécréter de façon constitutive des facteurs pro-coagulants tels que le facteur de Von Willebrand se liant au facteur VIII, autre co-facteur de l'agrégation plaquettaire. Celui-ci n'est libéré que sous l'action de stimuli. Les cellules endothéliales peuvent aussi exprimer, sous l'effet de stimuli, la thromboplastine favorisant la coagulation.

## II.2. L'ENDOTHELIUM ET LA MATRICE EXTRACELLULAIRE.

Les CE en culture sont capables de synthétiser différents éléments de la matrice extracellulaire, c'est-à-dire le collagène interstitiel (Madir et Williams, 1983), l'élastine (Carnes et al, 1979). Elles produisent également des glycosaminoglycans, des glycoprotéines telles que laminine, fibronectine...



Figure 5: Proposed mechanism for the contraction of smooth muscle mediated through the endothelial cell. Stimulation of endothelial cells by vasoconstrictants or shear stress induces genetic expression of pro-endothelin. Endothelin-1 (ET-1) is formed by the action of an endopeptidase and diffuses to the smooth muscle cell. Receptor-mediated activation of a G protein after the binding of ET-1 leads to formation of inositol-1.4.5 trisphosphate (IP<sub>3</sub>) by phospholipase C (PLC) and release of intracellular calcium (Ca<sup>-1</sup>). Concomitant formation of diacylglycerol (DAG) activates protein kinase C (PKC), resulting in the ghosphorylation of miyosin light chains (myosin-P) and initiation of the contractile response. Increases in intracellular calcium from endogenous and exogenous sources (through calcium channels) activates phospholipase  $A_2$  (PLA<sub>7</sub>), leading to formation of prostaglandin  $E_2$  (PGE<sub>2</sub>), PGE<sub>2</sub> can stimulate cyclic adenosine monophosphate (cAMP) formation by adenylate cyclase (AC). PGE<sub>2</sub> has vasorelaxant properties, while cAMP acts as a negative feedback signal on the contractile response.

(D'après Palombo et al, 1991)



gurc 4: Proposed mechanism for the relaxation of smooth muscle mediated through the endothelial cell. Activation of endothelial cells by receptor-mediated binding of a prorelaxant factor or by shear stress initiates the enzymatic conversion of arginine to citrulline with formation of nitric oxide (NO) and possibly other endothelium-derived relaxation factors (EDRF). NO diffuses through membranes to activate guanylate cyclase (GC) in smooth muscle cells and production of cyclic guanosine monophosphate (cGMP) from guanosine triphosphate (GTP). Subsequent initiation of a kinase/phosphorylase cascade by cGMP promotes dephosphorylation of myosin light chains (myosin-P) as a prelude to the relaxation

## (D'après Palombo et al, 1991)

# II.3. L'ENDOTHELIUM VASCULAIRE ET LA VASOMOTRICITE.

L'endothélium participe au contrôle du tonus vasculaire par la génération de différents facteurs de relaxation et de contraction dans le milieu extracellulaire.

Ceux-ci vont agir directement sur les cellules musculaires lisses.

## II.3.1. Les facteurs dilatateurs

(cfr. figure 4) (Presse Médicale, 1994)

- Prostacycline

La prostacycline est une substance produite par le métabolisme de l'acide arachidonique via la cyclo-oxygénase. Cette prostaglandine possède deux propriétés différentes: une action vasodilatatrice et un puissant effet antiagrégant à l'égard des plaquettes.

Par cette double action, la prostacycline module le tonus vasculaire et s'oppose à la thromboformation. Son mécanisme d'action passe par la formation d'adénosine monophosphate cyclique consécutive à l'activation d'adénylate cyclase.

- EDRF (Endothelium - Derived Relaxing Factor)

(Henderson, 1991)

Peu après l'identification de la prostacycline, Furchgott et al (1980) ont démontré que la relaxation provoquée par l'acétylcholine sur les vaisseaux isolés était dépendante de la présence d'un endothélium intact qui synthétisait et libérait un facteur appelé EDRF. Il fut identifié comme étant l'oxyde nitrique (NO).

Le NO est libéré par les cellules endothéliales suite à l'action par l'acétylcholine et par de nombreuses substances comme l'histamine, la bradykinine, la sérotonine, la thrombine ou par des forces de cisaillement. Le NO est un puissant agent vasodilatateur mais également un inhibiteur de la thrombose, de l'adhésion et de la prolifération cellulaire.

Il a été montré que l'EDRF est instable avec un temps de demi vie de quelques secondes. (Griffith et al, 1984)

#### II.3.2. Les facteurs constricteurs

(cfr. figure 5)

A côté des facteurs relaxants, les CE peuvent produire des facteurs constricteurs et, notamment, l'endothéline.

- L'endothéline

L'endothéline, peptide de 21 acides aminés découvert par Yanagisawa et al (1988), existe sous forme de trace dans le sang et est le plus puissant agent constricteur que l'on connaisse à ce jour. (Chabrier et al, 1991)

Elle dépend de la présence de  $Ca^{++}$  extracellulaire et entraîne une augmentation de cet ion à l'intérieur de la cellule.

Son action se réalise de manière paracrine sur les CML par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques appelés ET-A. La CE possède aussi un autre type de récepteurs, ET-B, présents en plus grand nombre que les récepteurs ET-A.

Par ailleurs, l'endothéline favorise la croissance des CML, agissant en synergie avec les autres facteurs de croissance. Un rôle physiopathologique de l'endothéline fut envisagé dans l'insuffisance vasculaire cérébrale où les taux d'endothéline semblent plus élevés.

A l'inverse des autres vasocontracteurs, l'endothéline est beaucoup plus puissante pour contracter les veines que les artères.

# II.4. L'ENDOTHELIUM ET LES FACTEURS DE CROISSANCE.

L'endothélium synthétise différents facteurs de croissance.

Ces facteurs vont agir d'une part sur son propre renouvellement et d'autre part, sur la prolifération des cellules des tissus sous-jacents. Leur rôle principal semble être de contrôler l'expansion et le phénotype des cellules de la paroi vasculaire. (Gibbons et al, 1990)

Parmi ces facteurs, nous trouvons:

### II.4.1. Le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor)

Libéré dans le milieu par les CE, il est mitogène et chémotactique pour les fibroblastes et les CML.

Il jouerait un rôle pathologique potentiellement important et a été incriminé comme facteur principal dans la genèse de l'athérosclérose. (Ross, 1986)

### II.4.2. le bFGF (Basic Fibroblast. Growth Factor)

Ce facteur est un puissant mitogène pour les CE et pour les CML. Il n'est pas sécrété dans le milieu mais reste associé aux cellules ou est déposé dans la matrice extracellulaire.

#### II.4.3. EDGF (Endothelium-Derived Growth Factor)

Les CE produisent un facteur de croissance pour les cellules d'origine mésenchymateuse qui semble être différent du PDGF, on a appelé ce facteur de croissance EDGF.

En fait, l'ensemble de ces facteurs agit le plus souvent de manière concomitante lors d'une agression de l'endothélium. Ils pourraient donc intervenir dans la paroi veineuse en stimulant la prolifération des CML, les faisant passer d'un phénotype contractile à synthétique c'est-à-dire prolifératif. Ainsi apparaissent les premières modifications de la structure de la paroi veineuse qui va s'épaissir et perdre ses propriétés élastiques.

Nous pouvons en conclure que l'endothélium vasculaire veineux n'est donc pas qu'une simple barrière biologique inerte, mais bien au contraire, une couche cellulaire active capable d'intégrer des signaux, d'en émettre, puis de réagir aux altérations physiopathologiques.



Volumineuses varices non compliquées. לפרצה иncomplicated varicose veins.

Figure 6: (D'après Priolet, 1994)



Figure 7: a - (D'après La Pathologie Veineuse, Euthérapie Benelux)



Figure 8:

b - Comparaison entre la morphologie d'une veine saine (a) et celle d'une veine malade (b).

Nous observons une désorganisation et un épaississement de la paroi vasculaire d'une veine malade.

(D'après La Pathologie Veineuse, Euthérapie Benelux)

# III. LES MALADIES VEINEUSES

## **III.1. DEFINITION**

Longtemps méprisée, trop souvent méconnue, la pathologie veineuse des membres inférieurs touche une personne sur trois dans nos pays. Il est donc important de poursuivre son étude.

Les varices sont des dilatations importantes, irrégulières et permanentes d'une veine superficielle dont la paroi est anormale. (cfr.figure 6)

Elles sont souvent dues à une insuffisance des valvules, celles-ci perdent de leur élasticité entraînant alors un reflux sanguin. Le sang va alors stagner dans les membres inférieurs. On parle alors de stase veineuse entraînant une ischémie au niveau des tissus normalement irrigués. Cette stase veineuse serait donc à la base de la cascade d'événements transformant une veine normale en varice.

## **III.2. LA VEINE MALADE**

(Charles et Gresham, 1993)

D'un point de vue tissulaire et cellulaire, tous les éléments de la paroi vasculaire subissent des modifications dues à des événements séquentiels par interactions des CE et CML.

Les deux caractéristiques principales et typiques des veines malades sont un épaississement et une désorganisation de la paroi. (cfr.figures 7 et 8)

L'endothélium reste intact mais, activé par la stase veineuse, relargue différents médiateurs qui semblent être responsables de la modulation phénotypique que subissent alors les CML.

Ces dernières passent d'un état contractile à synthétique, avec régression des différents filaments contractiles. Elles acquièrent alors la capacité de proliférer et de synthétiser de la matrice extracellulaire en plus grande quantité.

Les CML vont ensuite proliférer et migrer de la média vers l'intima où il y aura une accumulation importante de la matrice extracellulaire, et en particulier de fibres de collagène (Ross;1981). Dans de pareilles circonstances,on parle alors d'une

hyperplasie non homogène de la média, responsable de nombreux replis typiques des veines variqueuses. Il semble également que la lamena élastique interne soit dupliquée.

L'augmentation de l'épaisseur de l'intima est surtout due à une accumulation de la matrice extracellulaire.

On observe également une hydrolyse partielle des éléments conjonctifs, hydrolyse qui pourrait être due aux radicaux libres libérés par les polymorphonucléaires qui se sont infiltrés dans la paroi.

Cette désorganisation du tissu conjonctif et la perte de la contractibilité des CML sont donc responsables du remaniement général observé dans les parois vasculaires pathologiques.

# III.3. FACTEURS DE RISQUE DE L'INSUFFISANCE VEINEUSE.

En connaissant l'ensemble des facteurs favorisants la maladie (même s'il n'est pas toujours possible de les combattre directement), en prenant conscience de leur importance et de leur impact, on pourra prévenir leurs conséquences parfois graves. Parmi ces facteurs, on distingue deux ordres:

### III.3.1. Les facteurs constitutionnels

### \* Age

L'âge apparaît comme l'un des facteurs de risque des plus importants. Les varices s'observent 6 à 10 fois plus souvent à 70 ans qu'à 30.

Chez la femme, les études démontrent que la corrélation entre l'âge et les varices de tout stade est linéaire. (Madir, 1986)

#### \* Hérédité

Aucune transmission simple de type mendélienne ne peut être démontrée. La participation génétique, si elle existe, est probablement multigénique. Cependant, l'importance d'un facteur familial ne fait guère de doute. Tout le problème est de savoir si ce lien familial est d'ordre génétique ou lié à une "hérédité d'habitudes".

Cette question n'est pas encore définitivement tranchée.

\* Le sexe

Il semble que la fréquence de la maladie variqueuse soit proche dans les deux sexes. Mais les femmes, plus attentives, plus poussées par un souci d'esthétique signalent et traitent plus tôt les symptômes liés à toute altération des veines superficielles. Il a bien sûr été démontré qu'aucun facteur ne peut être considéré indépendamment.

L'étude de Coon (Coon et Coll, 1973) a démontré l'effet cumulatif de plusieurs facteurs dans l'apparition de ces pathologies.

### III.3.2. Les facteurs non constitutifs

Ce sont des facteurs extérieurs qui demeurent accessibles à la prévention. Ils sont fondamentaux et ont l'avantage de pouvoir être modifiés.

A) Facteurs comportementaux

\* La taille et le poids: Le poids, la taille et le BMI (Body Mass Index -Indice de masse corporelle) ont des retentissements évidents sur la prévalence de la pathologie veineuse et notamment les varices.

L'obésité, par un épaississement du panicule adipeux, provoquerait un étirement progressif du réseau veineux intermédiaire, placé entre le réseau sous-cutané et les troncs superficiels sus ou intra-aponévrotiques.

Si les varices et l'obésité sont liées de manière évidente et même statistique, le mécanisme de cette liaison demeure mal connu.

\* La sédentarité: toute absence d'effort favorise la stase veineuse laquelle, progressivement, fait le lit de la distension veineuse.

Ceci explique par le fait que la pompe musculaire du mollet ne joue plus correctement son rôle mécanique dans le retour veineux.



Figure 9: (D'après La Pathologie Veineuse, Euthérapie Benelux)

#### B) Facteurs dynamiques

\* Les troubles de la statique: le pied joue dans le retour veineux, un rôle de loin négligeable (Acher, Rettori, 1987). Le pied assure la marche, mais il est aussi à l'origine du drainage veineux du membre inférieur, par un dispositif anatomique dont l'un des aspects originaux est la "semelle de Lejars".

C'est une "éponge" qui contribue à la propulsion du sang veineux vers le coeur (Bonnel et al, 1987).

\* Influence des sports: certains sports sont à déconseiller car ils peuvent engendrer des perturbations au niveau des veines. C'est le cas de la musculation, sport par lequel on fournit des efforts brefs et violents, provoquant ainsi une contraction brutale du diaphragme. Cela va développer une hypertension du système cave inférieur, ayant un impact alors sur la première valvule. D'autre part, tout effort prolongé tels que l'équitation ou l'alpinisme génère des surcharges superficielles (homéostasie thermique), des surcharges profondes (apport artériel) accompagnées d'un relâchement progressif du tonus veineux. Il est donc préférable de pratiquer la marche, le jogging, le vélo, la natation, ...

#### C) Facteurs hormonaux

\* La grossesse: la grossesse semble accentuer toute insuffisance veineuse débutante. L'imprégnation progestative est le principal facteur intervenant. De plus, du bassin, les veines inférieures subissent une pression qui s'accentue au cours des neuf mois.

\* La contraception: toute contraception orale, comme tout traitement hormonal est aussi néfaste à l'état veineux. Les hormones interviennent indirectement par libération de substances ayant un effet sur le tonus veineux par le déséquilibre du système fibrinolyse/coagulation sur lequel les hormones stéroïdiennes interviennent.

Cette liste de facteurs favorisants n'est pas exhaustive. (cfr.figure 9) D'autres facteurs ont été étudiés afin de connaître leur impact sur l'évolution de cette pathologie. Par exemple, le diabète, l'historique de la maladie hémorroïdaire, l'usage du tabac, la pression sanguine, ...

## **HYPOTHESE:**

La stase veineuse observée lors des pathologies veineuses provoquerait une ischémie avec une diminution de l'apport d'O<sub>2</sub> dans les tissus.

Cette ischémie serait responsable de toute une série de modifications du métabolisme de l'endothélium. Du fait de leur localisation à l'interface sang-tissu, les cellules endothéliales sont les premières à souffrir de cette situation hypoxique.

On observe alors une cascade d'événements suite à l'activation des cellules endothéliales par cette hypoxie; on pourrait à partir de ces modifications expliquer le développement des varices.

## **MODELE EXPERIMENTAL:**

Pour mieux comprendre et étudier le rôle de l'hypoxie au niveau de ces cellules, différents modèles expérimentaux ont été utilisés: les premiers travaux étaient réalisés sur des cultures de CE isolées à partir de veines de cordons ombilicaux humains (HUVEC) (Michiels et al, 1992).

Ces cellules sont exposées à une hypoxie sévère pendant un certain temps. Les résultats montrent que les cellules endothéliales peuvent être activées in vitro par hypoxie avant que ne soit induite une mortalité importante.

Une fois les CE activées, on observe une cascade d'événements impliquant des interactions avec d'autres types cellulaires de la paroi: les CML, les PMN, ...

Il faut cependant noter que l'ischémie qui se produit in vivo dans les vaisseaux sanguins durant la stase veineuse occasionne une diminution de l'apport en O<sub>2</sub> et en nutriments au tissu.

Par ailleurs, l'hypoxie réalisée in vitro n'entraîne qu'une diminution de la pression partielle en  $O_2$  (PO<sub>2</sub>). Ce modèle est donc réductionniste mais reste cependant tout à fait pertinent car de nombreuses études sur des organes isolés ont montré que la diminution de la PO<sub>2</sub> est l'acteur principal des dommages occasionnés par une ischémie.

En 1994, le même équipe a développé un autre modèle ex vivo qui se rapproche plus de la situation physiopathologique. Ce modèle utilise une veine ombilicale complète perfusée en hypoxie. (Arnould et al, 1995)



Figure 10: Schéma des principales réactions à l'hypoxie des cellules endothéliales. Les réactions sont indiquées suivant leur suite logique par des flèches montrant les réactions inhibées ou activées après hypoxie. Le Ca2cytosolique est augmenté par inhibition de la pompe calcique (déplétion de l'ATP) et le relarguage à partir des organites. Il transmet le signal hypoxique (second messager) par activation de la phospholipase A, (PLA). L'acide arachidonique (AA) produit à partir des phospholipides (PL) est transformé en de nombreuses molécules inflammatoires. COX : cyclooxy genase, PG : prostaglandine, lyso-PAF, lyso-platelet-activating factor, ATF acetvltransferase, PAF : platelet-activating factor.





Figure 11: Interaction entre cellules endothéliales hypoxiques et polymorphonucléaires neutrophiles (PMN). Le PA (platelet-activating factor), exprime à la surface de la cellule endothéliale hypoxique, interagit avec son récepteu exprimé à la surface des PMN, ce qui provoque l'activation des intégrines CD18/CD11b qui se lient à la molécu d'adhérence endothéliale ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1). Les PMN s'activent en adhérant aux cellule endothéliales : l'élévation de [Ca<sup>2</sup>·]i stimule l'activité de PLA, (phospholipase A<sub>2</sub>), des lipoxygénases (LOX) et de NADPH oxydase, avec pour conséquence la production de molécules inflammatoires, leucotriènes et radicau libres. PL : phospholipide, AA : acide arachidonique, LTB, : leucotriène 8, 0, • : radical superoxyde.

(D'après Michiels et al, 1994)

### b. 1.) Altérations d'ordre énergétique

La première altération métabolique observée dans les CE soumises à une hypoxie est une forte diminution de la concentration en ATP intracellulaire (jusqu'à 43 % après 2 h d'hypoxie (Arnould et al, 1992).

En effet, l'O<sub>2</sub> est utilisé comme accepteur final des électrons dans les phosphorylations oxydatives mitochondriales. Lors de la respiration aérobie, 36 molécules d'ATP sont produites par molécule de glucose.

Par contre, au cours de l'hypoxie, la cellule tente de compenser l'arrêt de la respiration en augmentant la glycolyse anaérobie. Mais celle-ci ne fournit plus que deux molécules d'ATP/molécule de glucose, c'est-à-dire 18 fois moins qu'en conditions de normoxie. Si la cellule ne peut pas satisfaire tous ses besoins en ATP, les modifications métaboliques qui en résultent peuvent conduire à sa mort. (Piper, 1989).

Cependant, avant que ne surviennent ces altérations irréversibles, l'hypoxie peut influencer les fonctions des CE, entraînant une cascade d'événements qui impliquent leucocytes et CML. Ce sont des événements qui vont conduire aux modifications typiques observées dans les parois veineuses pathologiques.

#### b.2.)Altération d'ordre membranaire

En cas d'ischémie, l'ATP vient à manquer: le fonctionnement des pompes ioniques en est alors perturbé, en effet celles-ci dépendent de l'ATP. On observe une perturbation de l'homéostase ionique de la cellule : une augmentation de la (Ca <sup>++</sup>)i est observée au niveau des CE; celle-ci passe de 33 à 320 mM après 2 h d'incubation sous hypoxie (Arnould et al, 1992)

Le calcium extérieur ainsi que le calcium cytosolique sont impliqués dans cette élévation respectivement pour 60 et 40 %.

Cette augmentation de la  $(Ca^{++})i$  a différentes conséquences: en effet le  $Ca^{++}$  a plusieurs rôles dont celui de messager secondaire.

Il a donc la capacité d'activer de nombreuses enzymes. Parmi celles-ci,on retrouve la phospalipase A<sub>2</sub> qui est à l'origine de la synthèse de médiateurs inflammatoires.

D'une part, il y a production de prostaglandines à partir de l'acide arachidonique et de l'action de la cyclooxygénase.

D'autre part, il y a production de PAF à partir du lyso-PAF, libéré par cette enzyme à partir de phospho-lipides membranaires. (Michiels et al, 1993) (cf. figure 10) Notons qu'en conditions normales, les CE ne synthétisent pas de PAF.

Le PAF est associé à la membrane plasmique, il peut agir comme un signal pour induire l'adhérence intercellulaire entre les CE et les PMN via les intégrines de la famille CD18 / CD11 disposées à la surface des leucocytes. (cf. figure 11)

En conditions normales, les PMN n'adhèrent pas à l'endothélium. Mais lors de l'hypoxie, on a une augmentation de l'adhérence des PMN aux CE, le phénomène active alors ces PMN. Ils produisent en conséquence une grande quantité d'anions superoxydes ainsi que du leucotriène B4. Cette adhérence des PMN aux CE n'est que la première étape du processus de diapédèse conduisant à l'infiltration des PMN au niveau de l'intima et de la média des veines. (Montefort et Holgat, 1991)

#### b.3) Altérations d'ordre synthétique

Comme les CE sont associées dans la paroi veineuse avec les CML, des altérations de leur métabolisme doivent certainement influencer celui des CML, à la fois en conditions normales et pathologiques. En effet, sachant que les CE synthétisent des molécules vasoactives modulant les propriétés des CML, il était donc intéressant d'étudier s'il y avait également une influence des CE sur les CML en cas d'hypoxie.

C'est pourquoi Michiels et al (1994) ont montré que les milieux conditionnés par CE hypoxiques possèdent une activité pro-proliférative pour les CML au contraire des milieux venant des cellules incubées en conditions normales. Cette prolifération proviendrait de la libération de facteurs mitogènes tels que les prostaglandines et le bFGF,...

Ces deux types de molécules interagiraient avec leurs récepteurs respectifs à la surface des CML et chacune peut entraîner la prolifération des CML. (Michiels et al, 1994)

Les CML qui prolifèrent présentent un phénotype synthétique au contraire du phénotype contractile normalement présent au niveau de la paroi veineuse normale.

Dans leur état synthétique, elles perdent l'expression des fibres contractiles mais en revanche vont synthétiser plus de composants de la matrice extracellulaire.

### b.4) Explication des altérations morphologiques

Suite à l'hypothèse décrite, observons les caractéristiques principales d'une veine variqueuse. Cinq caractéristiques principales ont été décrites dans les parois des veines variqueuses. (Michiels et al, 1994) (cf. figure 12)



Figure 12: Désorganisation de la paroi d'une veine soumise à l'ischémie. L'activation des cellules endothéliales et leurs interactions avec les polymorphonucléaires neutrophiles de la paroi vasculaire caractérisées par une prolifération des cellules musculaires lisses qui perdent leurs propriétés contractiles, des altérations de la matrice extracellulaire (collagène et protéoglycanes) sous l'effet des anions superoxydes et des protéases.

(D'après Michiels et al, 1994)

1. Dans la paroi des veines variqueuses, la barrière endothéliale est toujours présente alors que d'autres cellules comme les CML subissent de profonds changements. Il a été expérimentalement montré qu'in vitro, l'hypoxie, qui mime l'ischémie résultant de la stase du sang, induit effectivement des changements métaboliques importants au suivi des CE tout en les maintenant vivantes.

Celles-ci en effet redeviennent normales lorsqu'elles sont replacées dans des conditions adéquates.

2. De nombreuses enzymes lysosomiales sont retrouvées alors dans les couches cellulaires sous-jacentes aux CE. (Niebes et al, 1977)

Ces enzymes sont en fait relarguées par les PMN activés: ceux adhérant aux CE de la paroi veineuse et s'infiltrant dans le tissu sous-jacent.

Une fois dans la média et par suite de leur activation, il y relargueraient des protéases par dégranulation ainsi que des radicaux libres.

(Arnould, 1995).

3. Le collagène et les protégoglycans sont altérés; on observe une augmentation de la quantité de collagène soluble. Celui-ci peut être fragmenté par les radicaux libres. (Borel et al, 1988)

Les PMN libèrent à la fois des radicaux libres et des protéases qui agissent en synergie pour hydrolyser le collagène que l'on observe dans les veines malades. (Arnould et al; 1992)

4. Un épaississement de la média est également observé. Celui-ci est facilement explicable par la prolifération des CML (in vivo) qui envahissent l'intima ainsi que par leur synthèse accrue de matrice extracellulaire.

In vitro, des expériences montrent que des molécules relarguées dans les CE activées par l'hypoxie induisent cette prolifération.

Ces CML subissent une modulation phénotypique, elles passent d'un état contractile caractérisé par une abondance de filaments du cytosquelette et une faible proportion de réticulum endoplasmique à un état synthétique dans lequel les CML possèdent un réticulum endoplasmique bien développé, secrètent plus de masse extracellulaire et notamment de collagène, sont prolifératives et perdent l'expression de la myosine et l' $\alpha$ actine. (Chamley-Campbell et al, 1979)

Cette modulation phénotypique pourrait être le résultat de l'action de médiateurs relargués dans les CE activées par l'hypoxie. La prolifération des CML (Michiels; 1994) ainsi que leur capacité accrue de synthétiser les différents composés de la matrice extracellulaire.(Okada et al, 1990) peuvent facilement rendre compte de cet épaississement. 5. Enfin, la prolifération des CML, les changements quantitatifs, qualitatifs au point de vue synthétique de la masse extracellulaire, l'hydrolyse partielle des protéines tels que le collagène et les différentes molécules libérées par les PMN, ... tout cela peut expliquer la désorganisation totale de la paroi vasculaire observée dans les veines variqueuses.

Cette désorganisation a notamment pour conséquence la perte de la contractibilité de la veine et du tonus vasculaire.

CONCLUSION: on peut proposer à partir des résultats expérimentaux obtenus sur le modèle des CE exposées à une hypoxie, une nouvelle hypothèse quant à l'origine des varices: ce serait une cascade d'interactions cellulaires faisant intervenir PMN et CML suite à l'activation des CE par hypoxie. Cela conduirait aux modifications structurelles et fonctionnelles que l'on trouve dans les veines variqueuses in vivo.

# **IV.LES CELLULES MUSCULAIRES LISSES**

#### (Capron, 1991)

Comme nous l'avons rappelé au début de ce travail, les veines sont composées de trois couches concentriques: l'intima, la média et l'adventice.

La couche moyenne, ou média, est normalement la plus épaisse, c'est un tissu conjonctif hautement organisé, composé d'un type cellulaire unique, les CML. (Hüttner et al, 1987).

Dans la média, les CML sont fusiformes, orientées perpendiculairement à l'axe longitudinal de l'artère. Elles sont serties dans une matrice extracellulaire dense, principalement composée de glucosaminoglycans (mucopolysaccharides) et de protéines fibreuses (élastine, collagène, glycoprotéines telles que la fibronectine).

La structure de la média est adaptée à sa fonction hémodynamique principale: fonction de soufflet (windkessel) pour les artères élastiques, accumulant pendant la systole le sang éjecté par le ventricule gauche pour le restituer pendant la diastole, et transformant ainsi l'écoulement discontinu du sang à la sortie du coeur en écoulement pulsé mais continu à la périphérie, fonction vasomotrice de contraction et de relaxation pour les artères musculaires, adaptant la distribution du sang aux besoins des organes.


Figure 13: Diagram illustrating the state of modulation of smooth muscle cells in which the contractile vs the synthetic state are maintained by different sets of factors.

(D'après Ross, 1981)

Outre leurs propriétés contractiles, les cellules musculaires lisses vasculaires, commes toutes les cellules conjonctives ont la capacité de proliférer et de synthétiser de la matrice extracellulaire. Dans diverses circonstances normales (croissance, vieillissement) et anormales, les CML expriment ces propriétés qui caractérisents leur phénotype dédifférencié.

Les deux phénotypes des CML sont désormais bien caractérisés (cfr figure 13) (Schwartz et al, 1986; Rubbia et al, 1989)

#### **IV.1. MODULATION PHENOTYPIQUE**

Les CML dans leur état contractile sont caractérisées par la présence d'une chromatine dense au niveau du noyau et d'un cytoplasme dominé par des myofilaments associés à des corps denses. (Thyberg et al, 1985).

Après un ou deux jours de culture, les myofilaments disparaissent et on observe alors organisé dans le cytoplasme un réticulum endoplasmique rugueux extensif et un large complexe de Golgi: les cellules sont dans un état synthétique. (cfr figure 14)

Dans ce phénotype synthétique dédifférencié, les CML peuvent entrer alors dans le cycle mitotique suivant les mécanismes communs à toutes les cellules.

Il est important de noter que ce phénomène de "différenciationdédifférenciation" ou modulation phénotypique semble nécessaire mais pas suffisant à la prolifération et la migration des cellules.

En effet, le cycle cellulaire s'enclenche sous l'influence de facteurs de croissance dont chaque signal est recueilli par un récepteur de membrane qui, généralement, est une enzyme douée d'une activité tyrosine kinase.

Une cascade de réactions cytoplasmiques et nucléaires transmet alors le message mitotique

# IV.2.CML CONTRACTILES:ASPECT MORPHOLOGIQUE (Chamley-Campbell, 1979)

La fonction majeure des CML dans est la contraction et la relaxation. Son cytoplasme est largement rempli de filaments. Ces filaments peuvent être divisés en trois groupes: selon la taille, la forme, la localisation ou la composition.

\* Le plus grand nombre de filaments ont entre 50 et 80 Å de diamètre. Ce sont des filaments d'actine et de tropomyosine. Ils ressemblent aux fins filaments des muscles striés. (Shoenberg et Needham, 1976) Des filaments similaires ont été observés dans des cellules non musculaires. (Hitchcock, 1977)

\* Le second type de filament a entre 120 et 180 Å de diamètre. Ce sont des filaments de myosine. Ce sont des filaments épais qui sont parallèles à l'axe des cellules et sont entourés par les fins filaments. Le nombre de filaments épais semble varier selon la quantité de myosine présente dans le tissu. (Small, 1977; Somlyo et al, 1973)

\* Le troisième type de filament fait 100 Å, il contient un polypeptide de 55 kiloDalton appelé "skeletin".

Ce sont des filaments intermédiaires ou encore appelés filaments cytoplasmiques ou  $\beta$ -filaments.(Goldman et Knipe, 1973; Mc Nutt et al, 1971)

On trouve également deux types de vésicules qui sont dispersées avec les corps denses le long du plasmalemme dans le cytoplasme.

1) des petites vésicules (700-2000 Å) appelées: vésicules de micropinocytose.

Leur fonction n'a pas encore été bien déterminée bien qu'il semble qu'elles seraient impliquées dans l'accumulation du Ca<sup>++</sup>

2) l'autre type de vésicule est observé occasionnellement à la surface des CML (1000 Å ou plus)

Elles ont la forme d'une "spherical polygonal basket" c'est pourquoi on parle de "coated vesicles". Elles seraient impliquées dans l'absorption des protéines par les cellules epithéliales.

La distribution du Ca<sup>++</sup> dans le cytoplasme est assurée par le réticulum sarcoplasmique, en continuité avec le réticulum endoplasmique.

Ce réseau tubulaire fermé est localisé à la périphérie de la cellule et fut associé aux vésicules de micropinocytose. L'énergie nécessaire à la contraction est fournie par des mitochondries, situées dans la même zone.

Reversible and nonreversible modulation of enzyme-isolated smooth muscle cells in primary culture

Day I through day 5, 6, or 7 Contractile, spontaneous or induced Cytopiasm full of thin (and thick) myofilaments Cytoplasm stains intensely with antibodies to myosin Day 5, 7, or 8: modulation first evident Noncontractile No thick filaments Increase in organelles associated with secretory protein synthesis, e.g., rough ER, ribosomes Myosin stain reduced Cell nuclei incorporate (3H)thymidine into DNA Day 8, 9, or 10: further modulation Noncontractile No thick filaments Further in. case in rough ER, ribosomes, Days 11-16: confluence if culture seeded Days 20-10: confluence if culture seeded above 10° cells/mi 10<sup>3</sup> cellsiml Regain contractility Noncontractile (Regain thick filaments) No thick filaments Large amounts rough ER, ribosomes Reduction in rough ER, ribosomes Regain myosin stain Minimal myosin stain Figure 14: (D'après Chamley-Campbell et al, 1979)

#### IV.3. CML SYNTHETIQUES:ASPECT MORPHOLOGIQUE

La notion que les CML sont capables aussi de synthèse tient son origine dans le fait qu'elles sont le seul type cellulaire présent au niveau de la média des vaisseaux sanguins et dès lors doivent être responsables de la synthèse de l'élastine, du collagène, des glycosaminoglycans, ... (Karrer, 1961; Paule, 1963; Pease et al, 1960)

Leur activité synthétique a bien été confirmée plus tard grâce aux techniques d'autoradiographie.

Etant donné qu'elles sont donc impliquées dans la synthèse des différents éléments de la matrice extracellulaire, leur cytoplasme contient une grande quantité d'appareil de synthèse: RER, complexe de Golgi, ribosomes libres, mitochondries,...)

Par contre, on observe que l' $\alpha$ -actine et la desmine disparaissent presque complètement du cytoplasme.

La différenciation-dédifférenciation des CML a été étudiée en utilisant des cellules A7R5 cultivées à différentes densités.

Cette souche cellulaire a été isolée par Kimes et Brandt (1976) à partir de l'aorte thoracique d'embryons de rats âgés de 14 à 17 jours.

Ces cellules présentent les caractéristiques propres aux CML: de fins filaments orientés parallèlement à l'axe cellulaire et des filaments épais orientés au hasard dans le cytoplasme. Elles sont capables de générer spontanément des potentiels d'action et de se contracter.

De plus, elles présentent une modulation phénotypique selon les conditions de culture.

Les CML A7R5 constituent donc un bon modèle expérimental pour étudier les pathologies veineuses.

# **V. MATRICE EXTRACELLULAIRE**

### V.1. SYNTHESE DE MATRICE EXTRACELLULAIRE PAR LES CML

Depuis plusieurs années, on a montré que les CML étaient impliquées dans la formation de la matrice extracellulaire et ce, de par l'association morphologique intime de ces cellules avec les différents composants de la matrice extracellulaire.

Les CML ont donc la capacité, in vivo, de synthétiser et de sécréter les différentes protéines mais également les fibres élastiques.

# V.1.1.Les différents composants de la matrice extracellulaire.

Nous allons étudier plus en détail ces différentes macromolécules qui sont sécrétées et déposées de telle manière à former un réseau organisé connu sous le nom de matrice extracellulaire.

Celle-ci est principalement constituée de collagène, glycoprotéines adhésives (fibronectine, laminine,...) de protéoglycans et de certaines autres protéines (élastine).

Beaucoup de ces molécules se lient entre elles et à la surface cellulaire via des récepteurs spécifiques. On en retrouve même dans le plasma où elles jouent un rôle important dans différents processus comme la coagulation et le "wound healing".

Notre étude s'étant portée spécifiquement sur la synthèse et la dégradation du collagène, nous détaillerons cette dernière protéine sans aborder de manière plus précise les autres qui appartiennent aussi à la matrice.

#### \* Fibronectine

La fibronectine est une grande glycoprotéine formée de deux sous-unités liées via des ponts disulfures.

Elle est présente dans le plasma, dans la matrice extracellulaire, dans la lame basale et à la surface des cellules.



Figure 15: Détail de la

structure d'un monomère de protéoglycane. A son extrémité aminée, la protéine-charpente (2.124 acides aminés) porte un site qui se lie avec une affinité élevée à un décasaccharide (5 modules disaccharidiques) de la région médiane de l'hyaluronate, aidée en cela par une protéine de liaison. Chaque molécule de protéinecharpente contient 117 séquences Sér-Gly substituées chacune par une chaîne oligosaccharidique ; 30 sont de courtes chacune par kératane sulfate et 87 sont des chaînes de chondroïtine sulfate. Partie (a) aimablement transmise par Dr. L. Rosenberg. D'après J. A. Buckwalter & L. Rosenberg, 1983, Coll. Rel. Res. 3:489. Partie (b) d'après D. Heinegard & A. Oldberg, 1989, FASEB J. 3:2042.

(D'après Darnell et al, 1993)

Identifiée chez de nombreuses espèces tels que les mammifères, (Heasman et al, 1981; Mosesson et Umfleet, 1970) elle est impliquée dans divers processus de contact cellulaire : attachement cellulaire, migration, opsonisation, et "wound healing".

Son expression est régulée et modulée par la transformation cellulaire (Owens et al, 1986)

Elle a été identifiée sous deux formes:

- plasma: elle correspond à un hétérodimère soluble
- surface cellulaire : dimère ou multimère, elle est insoluble.
- \* Laminine

La laminine est une protéine découverte et caractérisée par Temyl et Rhode (1979) isolée à partir des cellules EHS (Engelbreth Holm Schwarm). Elle constitue la protéine majeure de la lame basale.

#### \* Les protéoglycans

Les protéoglycans sont des chaînes de glycosaminoglycans liées de manière covalente aux protéines que l'on appelle les "core proteins". (cfr figure 15)

Ces molécules sont caractérisées par leur grande variation de structure, leur fonction et leur large distribution dans différents tissus (Hassell et al; 1986)

Ces glycosaminoglycans importants en nombre, en longueur et en type de chaîne de carbohydrate, peuvent porter des groupements d'héparan sulfate, de dermatan sulfate, de chondroïtine sulfate ou encore de kératan sulfate.

#### V.1.2. Le collagène

Le mot collagène venant du grec " $\kappa o \lambda \lambda \alpha$ " qui signifie colle : le collagène joue en effet un rôle important dans les matrices conjonctives.

Les molécules de collagène constituent jusqu'à environ 30 % des protéines des vertébrés.

Ce sont des macromolécules structurales de la matrice extracellulaire ayant une conformation caractéristique en triple hélice.

TABLE 1. Fibrillar collagens

Type	Chains	Molecules	Representative tissues
		Associated with type I	
I	α1(I), α2(I)	$[\alpha_{1}(I)]_{2} \alpha_{2}(I)$ $[\alpha_{1}(I)]_{3}$	Skin, bone, tendon, dentin Dentin, skin (minor form)
III	αl(III)	[\alla1(III)]3	Skin, vessels
v	$\alpha 1(\nabla)$ , $\alpha 2(\nabla)$ , $\alpha 3(\nabla)$	$ \begin{array}{l} [\alpha 1(V)]_{3} \\ [\alpha 1(V)]_{2} \ \alpha 2(V) \\ \alpha 1(V) \ \alpha 2(V) \ \alpha 3(V) \end{array} $	Hamster lung cell cultures Fetal membranes, skin, bor Placenta, synovial membran
		Associated with type II	
11	α1(II)	[\aller 1 (II)]3	Hyaline cartilage, vitreous l
XI	$\alpha 1(XI), \alpha 2(XI), \alpha 3(XI)^{c}$	α1(XI) α2(XI) α3(XI)	Hyaline cartilage

#### TABLE 2. Nonfibrillar collagens

Туре	ype Chains Molec		iles Representative tissues	
IV	α1(IV), α2(IV) α3(IV), α4(IV), α5(IV)	$[\alpha_1([V)]_2 \ \alpha_2([V))$ (?)	Basement membranes Glomerular basement membra	
VI	$\alpha 1(VI), \alpha 2(VI), \alpha 3(VI)$	α1(VI) α2(VI) α3(VI)	Vessels, skin, intervertebral di	
VII	al(VII)	[\alfa1(\VII)]3	Dermoepidermal junction	
VIII	α1(VIII), α2(VIII)	(?)	Descemer's membrane, endothelial cells	
LX	α1(IX), α2(IX), α3(IX)	α1(IX) α2(IX) α3(IX)	Hyaline cartilage, vitreous humour	
x	α1(X)	[α1(X)]]	Growth place	
ХП	αl(XII)	$[\alpha I(XII)]_3$	Embryonic tendon and skin, periodontal ligament	
XIII	α1(XIII)	(?)	Endothelial cells	
VIX	al(XIV)	[ <i>a</i> 1(XIV)] <sub>3</sub>	Fetal skin and tendon	

Figure 16: Tableaux reprenant les différents types de collagènes connus dans les différents tissus de l'organisme.

(D'après Van Der Rest et al, 1991)

14 types de collagène ont été définis depuis peu (cfr figure 16)

La plupart des collagènes forment des fibrilles d'où l'appellation de collagènes fibrillaires: I, II, III, V et VI. Ils sont présents principalement au niveau des matrices extracellulaires ou des membranes basales. Par opposition, il y a aussi les collagènes non fibrillaires.

Il existe, en quantité beaucoup plus petite au niveau des tissus. D'autres molécules de collagène, jouent également un rôle de "connecting elements" entre les structures majeures et autres composants du tissu: les collagènes "fibril-associated".

A) Structure moléculaire du collagène

Malgré leur grande diversité, toutes les molécules de collagène présentent une structure de base identique.

La triple hélice est caractérisée par trois chaînes polypeptiques assemblées avec une conformation "coiled coil". La structure primaire de ces chaînes est faite de la répétition d'un triplet d'acides aminés : glycine XY. (cfr. figure 17)

Environ 30 % des positions X et Y sont occupées respectivement par la proline et l'hydroxyproline.

Les autres acides aminés apportent une diversité structurelle et des propriétés différentes aux différents types de collagène (Rawn, 1990).

Chaque polypeptide forme une hélice gauche comprenant trois résidus d'acides aminés dont la glycine qui est le plus petit de tous les acides aminés. Sa chaîne latérale formée d'un seul atome d'hydrogène est la seule à pouvoir s'ajuster stériquement au niveau de la superhélice droite qui constitue l'assemblage des 3 chaînes polypeptiques hélices gauches. Quant aux résidus de proline et d'hydroxyproline, sous forme de cycles penta-carbonés, ils se repoussent l'un l'autre par encombrement stérique, favorisant donc l'étirement de la chaîne polypeptique.

B) Nomenclature:

La nomenclature du collagène est basée sur les règles suivantes:

Les chaînes polypeptiques individuelles sont appelées  $\alpha$  et sont numérotées d'un chiffre arabe pour un collagène type, suivi du chiffre romain correspondant au type entre parenthèses.



Figure 17: Représentation schématique de la triple hélice de collagène.

(D'après Van Der Rest et al, 1991)

Sclon les types de collagène, les trois chaînes  $\alpha$  sont soit identiques ( $\alpha$ 1) ou différentes ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2...). Cette numérotation est arbitraire et reflète souvent la séquence historique de leur caractérisation biochimique.

Des études ont montré que la transition des CML d'un état contractile à synthétique est associée avec une activation et une augmentation de la synthèse et de la sécrétion des protéines de la matrice extracellulaire. (Thyberg et al, 1986).

En effet, les résultats ont montré que après modulation, les CML synthétisaient 20 à 30 fois plus de collagène que les cellules sous le phénotype contractile.

Au même moment, la synthèse de protéines autres que le collagène augmente seulement de 5 à 6 fois, ce qui indique une stimulation spécifique de la synthèse de collagène. Les niveaux d'ARNm sont aussi élevés, avec un niveau des collagènes  $\alpha 2$  (I) et  $\alpha 1$  (III) 30 et 20 fois plus hauts respectivement, probablement reflétant une augmentation de l'activité de transcription.

Cette modulation est également associée à une altération dans la proportion relative des types de collagène I et III synthétisés.

Les CML contractiles synthétisent 78,1  $\pm$  3,6 type I et 17,5  $\pm$  4,7 type III; les CML synthétisent 90,3  $\pm$  2 type I et 5,8  $\pm$  1,8 type III

A confluence, les CML retournent à l'état contractile et il y a diminution de la production de collagène et le pourcentage de collagène de type I réaugmente.

Il y a donc bien une relation entre la synthèse de collagène et la densité cellulaire ou prolifération cellulaire dispersées et en division rapide, elles sécrètent dans le milieu des quantités plus importantes de collagène comparé aux cellules postconfluentes. (Holderbaum et al, 1984)

#### C) Métalloprotéinases matricielles (MMP)

En conditions normales, l'intima des vaisseaux sanguins n'est pas occupée par des CML (Reidy et Schwartz, 1981; Tada et al, 1987)

Cependant, dans des conditions pathologiques, les CML acquièrent la capacité de migrer de la média vers l'intima. Il y a en fait une prolifération et une migration des CML vers l'intima qui va entraîner progressivement un épaississement de la paroi; ce sont donc des événements qui caractérisent le remodelage du tissu veineux.

Cet épaississement est la conséquence à la fois de l'augmentation du nombre de CML et de la synthèse d'une nouvelle matrice extracellulaire.

La migration des cellules musculaires lisses requiert la dégradation de la matrice extracellulaire.

Cette dernière est contrôlée par différents mécanismes qui impliquent d'une part des facteurs de croissance tels que bFGF, PDGF, ...

Le bFGF étant important dans le contrôle de la prolifération des CML (Lindner et al, 1991). Le PDGF, quant à lui, semblerait réguler la migration cellulaire et n'aurait que des effets minimum sur la réplication (Ferns et al, 1991; Jawien et al, 1992)

D'autre part, cette réplication et cette migration exigent l'expression d'enzymes. En effet, il doit aussi y avoir une régulation de la dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire qui entourent les cellules.

On ne connaît encore que peu de choses sur les propriétés protéolytiques des cellules. Il semblerait que des protéinases seraient responsables de cette dégradation; elles incluent des MMPs, des activateurs du plasminogène, ...)

Il a été montré que les CML expriment des ARNm pour l'UPA (urokinase plasminogène activateur) et le TPA (tissue plasminogen activator)

Les activateurs du plasminogène catalysent la conversion du plasminogène en plasmine. Ce dernier peut alors dégrader plusieurs molécules de la matrice extracellulaire et activer les métalloprotéinases matricielles.

Ces dernières font partie d'une famille de molécules impliquées dans la dégradation et la reconstitution du tissu conjonctif. (Matrisian et al, 1992)

Donc, l'activation d'une cascade protéolytique fournit la potentialité de dégrader tous les composants de la matrice extracellulaire. (élastine, collagène I, III, protéoglycans,...) ainsi que la membrane basale entourant les cellules.

Des études ont caractérisé l'activité des MMP, une corrélation avec leur expression a été montrée qui médierait à la migration cellulaire et le remodelage tissulaire dans les différentes pathologies. (Moscatelli, 1988; Pepper et al, 1990)

L'inhibition de l'activation des MMP, par différents peptides ou par un antisérum neutralisant, entraîne une inhibition complète de la migration des cellules au niveau de l'intima.

On peut alors suggérer que les MMPs soient des médiateurs importants dans la régulation de la matrice après toute lésion vasculaire.

Choops	Enzyme names	Molecula	ar mass, kDa	Matrix substrates
I	Interstitial collagenase MMP-1 (EC 3.4.24.7) Vertebrate collagenase Fibroblast collagenase	52 (57)/5 (48)/4	Deduced 2 Latent 2 Active	Collagen types I, II, III, VII, X Gelatins
	Neutrophil collagenase MMP-8	53 85 65	Deduced Latent Active	Collagens I, II, III
u	72-kDa gelatinase MMP-2 Type IV collagenase	72 72 66	Deduced Latent Active	Gelatin type I Collagens, IV, V, VII, X Fibronectin, elastin
	92-kDa gelatinase MMP-9 Type V collagenase	80 92 84	Deduced Secreted Active	Gelatins I, V Collagens IV, V
ш	Stromelysin MNIP-3 (EC 3.4.24.17) Transin Proteoglycanase Procollagenase activator Coll'ase activator protein	52 (60)/57 (50)/48 28	Deduced Secreted Active Active	Proteoglycan, link protein Fibronectin, laminin Gelatins I, III, IV, V Collagens III, IV, V, IX Procollagen peptides Activates procollagenase Weak clastin digestion
	Stromelysin-2 MMP-10 Transin-2	53 53 47 28	Deduced Secreted Active Active	Gelatins I, III, IV, V Weak on collagens III, IV, and V
	Uterine metalloproteinase MMP-7 Pump-1	28 28 (21)/19	Deduced Secreted Active	Fibronectin Gelatins I, III, IV, V Protenglycan Fibronectin Activates procollagenase

figure 18 : Tableau reprenant les différents types de métallo-protéinases. (d'après woesner, 1991) Trois MMP sont importantes dans la paroi vasculaire. (Zempo et al, 1994) (cfr figure 18)

- collagénase interstitielle qui dégrade les collagènes de type I et III (= MMP1)
- collagénase IV ou gelatinase A digère les collagènes de type I (gelatine), type IV, V et l'élastine (MMP2)
- stromélysine qui est très spécifique: elle dégrade la laminine, la fibronectine et les protéoglycanes (MMP3) (Woessner et al, 1991)

Des études ont montré qu'à la fois les macrophages et les CML sont des sources potentielles des métalloprotéinases matricielles. (Henney et al, 1991 ; Welgus et al, 1990)

On a montré que les CML in vitro produisent différents types de MMP mais que la MMP2 serait la MMP principale sécrétée par les CML. (Pauly et al ; 1994)

La MMP2 est une MMP de 72 kd qui dégrade spécifiquement les collagènes IV, V, VII, X et les collagènes dénaturés. (Sawaya et al , 1994)

Dégradant la matrice extracellulaire, cette MMP faciliterait la migration et la prolifération des CML, elle jouerait un rôle important dans la pathophysiologie des maladies vasculaires. (Haurt et al, 1960; Benditt et al, 1973)

On peut conclure que les CML prolifèrent au niveau de la média et plus tard migrent et prolifèrent vers l'intima, formant alors une nouvelle intima plus épaisse, en réponse à une lésion vasculaire (Ross, 1993 ; Moore et al, 1979).

On suggère que ces MMP sont les enzymes ayant leur propre rôle dans la formation d'une néointima dans les cas pathologiques. (Jenkins et al, 1994; Bendeck, 1994)

## **BUT DU MEMOIRE**

Comme nous l'avons décrit, la dédifférenciation des CML d'un état contractile à un état synthétique semble être un précurseur obligatoire à la migration, la prolifération et la synthèse de la matrice extracellulaire par les CML.

Ces processus entraînent une hyperplasie de l'intima et sont impliqués dans le développement des pathologies variqueuses.

Les mécanismes régulateurs contrôlant ce phénomène ne sont pas encore très bien connus mais une hypothèse propose que des facteurs multiples probablement libérés par les cellules endothéliales pourraient influencer cette modulation phénotypique.

C'est pourquoi il était intéressant de développer un modèle in vitro utilisant le type cellulaire impliqué dans ce processus qui permettrait d'étudier plus finement ces processus.

Le but du mémoire était donc d'essayer de mettre en évidence certains des mécanismes biochimiques responsables de la modulation phénotypique des CML observée dans la paroi des veines variqueuses.

Tout d'abord, il fallait développer un modèle expérimental où l'on pouvait obtenir des CML dans un état contractile et dans un état synthétique.

Celles-ci ont alors été incubées avec différents facteurs mitogènes libérés par la CE pour analyser ensuite l'effet sur la prolifération des CML et leur synthèse de la matrice extracellulaire.

Dans la deuxième partie, nous nous sommes focalisés sur un des composants de la matrice extracellulaire : le collagène. Nous avons à la fois mesuré la synthèse et la dégradation du collagène, dans le but de voir si la modulation phénotypique régulait effectivement ces deux processus.

# MATERIELS et METHODES

: :



Figure B1: Micrographie (en microscopie à contraste de phase) de cellules musculaires lisses A7R5 à confluence. (Grossissement: 115 X)

## **B. MATERIEL ET METHODES**

#### I. CULTURE DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES

Les cellules musculaires lisses proviennent d'une lignée cellulaire (A7r5) isolée d'une aorte de rat (Kimes and Brandt, 1976). Elles sont disponibles à l'ATCC (American Tissue Culture Collection) (Figure B1).

#### I.1. Matériel et solutions

1. Milieu de rinçage sans sérum

2. Milieu de culture: Dulbecco (Dulbecco's modified eagle Medium, Gibco, Paisley, Grande-Bretagne)
pH: 7,2. On y ajoute 10 % de sérum de veau foetal.

3. Trypsine (Gibco)

#### I.2. Décongélation et mise en culture

Les cellules sont stockées dans une ampoule stérile contenant 0,4 ml de D et 40 % de S et 0,4 ml de DMSO (Diméthylsulfoxyde, Merck, Darmstadt, Allemagne) et congelées dans de l'azote liquide.

La décongélation se fait en moins d'une minute: on plonge l'ampoule dans un bain à 40 °C. Ensuite, les cellules sont centrifugées pendant dix minutes à 1000 rpm. Le surnageant est décanté au maximum et les cellules sont placées dans 20 ml D + 10 % S dans une boîte T75.

Si le lendemain les cellules ne sont pas à confluence, il faut changer le milieu.

#### I.3. Repiquage

Lorsque les cellules sont arrivées à confluence et qu'elles forment une monocouche, on peut les repiquer.

La boîte T75 est rincée pendant deux minutes avec du milieu de rinçage (5 ml); on le décante ensuite complètement avant d'ajouter 3 ml de trypsine. Après une incubation de deux minutes, la trypsine est décantée et les cellules incubées à 37°C. Lorsque les cellules se sont détachées du substrat, on ajoute 5 ml de D + S afin d'inhiber la trypsine et on resuspend les cellules.

Dans le cas de sous-cultures, les cellules resuspendues sont réparties dans quatre boîtes de 75 cm<sup>2</sup> (Celcult, Sterilin, Grande-Bretagne, T75) dans lesquelles on ajoute du milieu D + S pour atteindre une quantité finale de 20 ml. On y ajoute également une atmosphère contenant 8 % de CO<sub>2</sub>-92 % d'air, dans le but de maintenir le pH du milieu de culture.

Toutes les expériences sont réalisées dans des boîtes à 24 puits dans lesquelles les cellules sont ensemencées à 4 densités différentes: 1600-8000-20 000 et 30 000 cellules/cm<sup>2</sup>. Les cellules sont alors incubées trois jours dans du D + 10 % de sérum. Dans ces conditions, les cellules à 20 000 et à 30 000 cellules/cm<sup>2</sup> atteignent rapidement la confluence et se redifférencient en leur phénotype contractile. Par contre, à plus faible densité, les cellules prolifèrent pendant les trois jours.

On ajoute ensuite les différents médiateurs aux cellules soit la prostaglandine F2 $\alpha$  (à 3,64 10<sup>-9</sup>M) soit le bFGF à 5 ng/ml ou les deux molécules ensemble. Les molécules sont ajoutées aux cellules dans du D + 0,2 % de sérum. La quantité de sérum est réduite au minimum afin d'éviter les interférences éventuelles avec les médiateurs ajoutés et afin de ne pas masquer leurs effets par celui des facteurs de croissance présents dans le sérum.

Après trois jours d'incubation, les différents dosages sont réalisés.

#### II. CULTURE DES CELLULES ENDOTHÉLIALES

Toutes les mises en culture se font sous hotte à flux laminaire.

Le matériel utilisé est soit stérilisé (6 h à 180 °C, stérilisateur) soit autoclavé (20 minutes à 120 °C).

Les cellules endothéliales sont isolées à partir de la veine des cordons ombilicaux humains selon la méthode décrite par Jaffe et al (1973).

#### II.1. Matériel et solutions

1. Solution stérile de récolte et de conservation des cordons à pH 7,3 est composée de:

- KCl 4 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- NaCl 140 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- Hépes 10 mM (Janssen Chimica, Geel, Belgique)
- D-glucose 11 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- Streptomycine 100 µg/ml (Sigma, Saint-Louis, USA)
- Penicilline 100 µg/ml (Sigma, Saint-Louis, USA)
- Fungizone (amphotéricine B) 0,25 μg/ml (Sigma, Saint-Louis, USA)

Cette solution est stérilisée par filtration (pompe péristaltique et filtre stérivex (GV, 0,22  $\mu$ m, Millipore, France) et stockée à 4°C.

2. Solution saline de rincage (0,15 M en NaCl) tamponnée par du phosphate 10 mM (PBS) à pH 7,4 et stérilisée sur filtre stérivex GV 0,22  $\mu$ m (Millipore). Elle contient également des antibiotiques et la fungizone aux mêmes concentrations que la solution de récolte.

3. Collagénase Type II (Sigma): 0,05 % dans du milieu M 199 et stérilisée par filtration (filtre minisant NML, 0,22  $\mu$ m, Startorius, Githingen, Allemagne)

4. Milieu de culture M199: composé de - sels de Hanks
- Hépes 10 mM
- NaHCO3 1,75 g/l
- L-glutamine 100 mg/l

(Gibco, Grande-Bretagne) porté à pH 7,2 avec du NaOH. Ce milieu est additionné de 20 % de sérum de veau foetal (Gibco) : (M + S).

5. Gélatine : stérile à 0,20 % (Merck)

6. Trypsine + EDTA : 0,25%(Gibco)

7. Tampon HBSS modifié (Hanks Balanced Salt Solution) composé de:

NaCl 140 mM
Glucose 5,5 mM
Mg SO4 0,4 mM
Mg Cl<sub>2</sub> 0,5 mM
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4,3 mM
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 mM, pH 7,3

Le CaCl<sub>2</sub> est ajouté juste avant chaque expérience à une concentration finale de 1 mM.



Figure B2: Micrographie (en microscopie à contraste de phase) de cellules endothéliales de la veine ombilicale à confluence. (Grossissement: 115 X)

#### 11.2. Mise en culture

Juste après l'accouchement, les cordons sont stockés à 4°C dans la solution de récolte contenant les antibiotiques. La mise en culture débute par la perfusion de la veine ombilicale avec 50 ml de solution saline de rinçage, au moyen d'un système seringue-cathéter. La veine est ensuite cannulée avec deux cathéters et incubée avec 3 à 4 ml de collagénase type II (0,05 %) pendant 35 minutes à 37 °C dans une boîte de Pétri.

Les cellules endothéliales détachées de la paroi veineuse sont alors récoltées dans du milieu de culture M 199 + S, ce dernier inhibant l'action de la collagénase.

Les cellules endothéliales ainsi récoltées sont centrifugées à 1000 rpm pendant 10 minutes et resuspendues dans 6 ml de milieu de culture (M + S).

Cette suspension est placée dans une boîte de culture T25 (Cel-Cult, 25 cm<sup>2</sup>, Sterilin, Grande-Bretagne) préalablement recouverte de gélatine. La gélatine facilite l'adhérence et la multiplication cellulaire.

Le lendemain, les cellules endothéliales sont rincées afin d'éliminer les globules rouges, les cellules mortes ou les autres cellules sanguines. Le milieu de culture doit être renouvelé régulièrement afin de maintenir les cellules dans des conditions optimales de croissance.

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

#### II.3. Repiquage et sous-culture

Lorsque les cellules sont arrivées à confluence (Fig. B2) et forment une monocouche, elles sont rincées deux fois pendant deux minutes avec 5 ml de M199 sans sérum. Le milieu est décanté et remplacé par 2 ml de trypsine + EDTA (qui chélate les ions Ca<sup>++</sup> et accélère le détachement des cellules du substrat).

La trypsinisation s'effectue durant trois à quatre minutes à 37 °C, elle est suivie au microscope optique à contraste de phase.

Les cellules endothéliales détachées sont resuspendues au moyen d'une pipette pasteur dans 5 ml de M199 + 20 % S pour inhiber la trypsine. La suspension est alors centrifugée dans un tube stérile (Sterilin, Grande-Bretagne) pendant 10 minutes à 1000 rpm.

Le surnageant contenant la trypsine est décantée, tandis que le culot cellulaire est resuspendu dans du M199 + S.

Les cellules sont alors ensemencées à confluence dans des boîtes de Pétri de 3,5 cm de diamètre préalablement gélatinisées.

#### II.4. Incubation sous hypoxie

Pour les incubations sous hypoxie, les cellules endothéliales sont repiquées dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre (Falcon, New Jersey, USA).

Lorsque les cellules sont arrivées à confluence, les boîtes sont rincées deux fois avec 2 ml d'HBSS (pH 7,35, 37 °C).

Après décantation complète des boîtes, on ajoute 0,7 ml d'HBSS par boîte.

Les cellules endothéliales sont alors incubées sous hypoxie en les exposant à une atmosphère de 100 % d'azote.

La PO<sub>2</sub> du milieu chute alors rapidement et passe de 130 mmHg à 10 mmHg (hypoxie).

Pendant les deux heures d'incubation, les cellules endothéliales sont placées sur un agitateur mécanique à 37 °C.

Au terme de ces incubations, les milieux conditionnés des cellules endothéliales sont récoltés et conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation. Afin d'étudier l'effet des milieux conditionnés sur le métabolisme des cellules musculaires lisses, ces milieux sont dilués 10 fois dans du D + 0,2 % de sérum et stérilisés par filtration sur filtre  $0,2 \mu$ m. Les cellules musculaires lisses sont incubées pendant trois jours en présence de ces milieux.

#### **III. DOSAGE DE LA SYNTHESE TOTALE DES PROTEINES**

#### III.1. Principe

Ce test est basé sur l'incorporation d'un acide aminé marqué, la leucine tritiée, pendant un temps déterminé.

#### III.2. Solutions

1.  $(^{3}H)$ -Leucine

2. Leucine froide à  $10^{-2}$  M (Merck)

#### 3. HBSS (Hanks Balanced Salt Solution) composée de:

- NaCl 140 mM
- glucose 5,5mM
- MgSO4 0,4 mM
- MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4.3 mM
- KH2PO4 4,3 mM pH 7,3

Le CaCl<sub>2</sub> est ajouté avant chaque expérience à une concentration finale de 1 mM.

4. TCA (acide trichloracétique) 10 %

5. Un mélange Ethanol/Ether (3/1, v/v)

6. NaOH 1N (Merck)

7. Réactif de Folin (dilué deux fois)

8. Mixture alcaline: - Na2 CO3 2% (Merck)
- Tartrate 2% (Merck)
- CuSO4 1% (Merck)

dans une proportion respective de 100/1/1.

10. Etalon sérum albumine bovine à 200  $\mu$ g/ml (SAB)

#### III.3. Méthode

Au terme des incubations en présence des facteurs de croissance, les cellules sont rincées deux fois avec de l'HBSS.

Les cellules sont ensuite incubées pendant quatre heures avec 1 ml d'HBSS contenant 5  $\mu$ Ci/ml de (<sup>3</sup>H)-Leucine à 37°C.

Au terme de l'incubation, le surnageant est décanté et les cellules sont lavées deux fois avec du PBS à 4°C contenant de la leucine non marquée à une concentration de 10<sup>-2</sup> M. On incube à nouveau les cellules pendant deux heures à 4°C avec du TCA 10 % contenant également de la leucine non marquée à la même concentration que dans le PBS. Les protéines précipitent sous l'action du TCA.

Ensuite, on lave une fois avec du TCA 10 % contenant de la leucine froide à  $10^{-2}$  M et deux fois avec un mélange ethanol / éther.

Les boîtes sont séchées à l'air. Les protéines sont alors solubilisées dans 1 ml de NaOH (1 N) à 37°C pendant une nuit. On reprend 100  $\mu$ l de ces fractions solubles auxquels on ajoute 5 ml de liquide scintillant Aqualuma. La radioactivité est comptée dans un compteur à scintillation pendant trois minutes.

On prélève également 100  $\mu$ l pour doser ultérieurement les protéines (méthode de Folin).

#### III.4. Dosage des protéines

Chaque tube contient 100  $\mu$ l de lysat et 100  $\mu$ l d'H<sub>2</sub>O. On fait également un étalon (100  $\mu$ l de SAB et 100  $\mu$ l d'H<sub>2</sub>O) et un blanc (100  $\mu$ l NaOH et 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O). De minute en minute, on ajoute dans chaque tube 2 ml de la mixture alcaline. On attend de 5 à 15 minutes maximum et on ajoute alors 100  $\mu$ l de folin en agitant fortement et immédiatement. A la trentième minute, on peut lire la densité optique (DO) à 660 nm au spectrophotomètre.

Quantité prot =  $\mu g/ml$  = (DO - DO) x 200 (éch blc) DO - DO SAB blc

La synthèse protéique est alors exprimée en : <u>cpm</u> µg prot

#### IV. DOSAGE DE L'ADN

#### IV.1. Principe

L'iodure de propidium s'intercale entre les bases de l'ADN des cellules; celles-ci étant préalablement perméabilisées par de l'éthanol et il devient ainsi fluorescent.

#### IV.2. Solutions

- 1. PBS: NaCl 0, 15 M; tampon phosphate 10 mM; pH 7, 4
- 2. Ethanol absolu (Merck)
- 3. Iodure de propidium (10  $\mu$ g / ml PBS) (IP) (Sigma)



f(x) = 2,021745E-2\*x + -7,212956E+1 R^2 = 9,581162E-1

Figure B3:

Droite d'étalonnage de la quantité d'ADN en fonction de la quantité de cellules par puits. Les résultats sont exprimés en RFU (Relative Fluorescence Units) pour des moyennes  $\pm 1$  écart-type (n = 3).

#### IV.3. Méthode

Les cellules sont rincées deux fois avec 1 ml de PBS. 1 ml d'éthanol absolu est ensuite ajouté pendant 30 minutes afin de perméabiliser les cellules. Après avoir décanté, 1 ml de IP est ajouté pendant 30 minutes dans le noir. La fluorescence est lue avec une longueur d'onde d'excitation = 530 nm et d'émission = 620 nm.

La figure B3 illustre une droite d'échelonnage effectuée sur des quantités croissantes de cellules. La fluorescence (RFU) est linéairement proportionnelle à la quantité de cellules présentes par puits.

#### V. DOSAGE DE LA SYNTHESE TOTALE DE COLLAGENE

#### V.1. Principe

Le collagène et les protéines synthétisés par les cellules sont marqués par incorporation de ( ${}^{3}$ H)-proline. La quantité de collagène sera ensuite estimée par la différence de la radioactivité dans le matériel précipitable au TCA après digestion à la collagénase. 24 heures avant l'expérience, sont ajoutés de l'acide ascorbique qui va favoriser la synthèse du collagène et du  $\beta$ -aminopropionitrile qui empêche les "cross-linkings" entre les molécules de collagène et donc leur précipitation. On pourra alors quantifier les molécules directement dans le milieu de culture.

#### V.2. Solution

- 1. L-2,3- $(^{3}H)$ -proline
- 2. Acide ascorbique 5 mg/ml dans PBS (Merck)
- 3. β-aminoproprionitrite 8 mg/ml dans PBS (Sigma)
- 4. TCA 5% contenant de la proline froide à 0,01%
- 5. HCl 0,2N

6. NaOH 0,2 N

- Tampon: Tris 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, NEM (N-éthyl maléimide) 5,2 mM pH7,6
- 8. Acide tannique à 10 % dans H<sub>2</sub>O
- Collagénase dépourvue d'activité protéase (type VII) à 3000 U/ml (Sigma)

#### V.3. Marquage des protéines

24 heures avant la fin de l'incubation en présence des médiateurs, on retire 600  $\mu$ l du milieu, il reste donc 400  $\mu$ l auxquels on ajoute 4  $\mu$ l de  $\beta$ -APN et de vitamine C. On ajoute également 4  $\mu$ l de proline tritiée, ce qui donne une concentration finale de 1  $\mu$ Ci/ml.

#### V.4. Dosage proprement dit

On précipite toutes les protéines, à savoir le collagène et les autres protéines, avec du TCA pur (100%) pendant une nuit à 4°C (37  $\mu$ l pour des échantillons de 150  $\mu$ l).

Le lendemain, on centrifuge 10 minutes à 4600 rpm, on décante le surnageant, ce dernier contenant alors de la (3H)-proline libre non incorporée. On rince le culot deux fois avec 500  $\mu$ l de TCA 5% qui contient de la proline froide. Après ces rinçages, on resuspend le culot, qui contient du collagène radioactif et d'autres protéines radioactives avec du NaOH 0,2 N (200  $\mu$ l).

Le NaOH est ensuite neutralisé par du HCl 0,2 N (190  $\mu$ l).

On prélève alors deux fois 100  $\mu$ l : on a donc deux séries d'épendorfs qui vont subir deux traitements différents. 100  $\mu$ l de tampon collagénase est ajouté aux deux séries, une série seulement sera mise en présence de la collagénase (6  $\mu$ l) qui digère le collagène. Après une incubation de deux heures à 37°C, on ajoute 20  $\mu$ l de TCA pur et 10  $\mu$ l d'acide tannique et on incube une heure à 4° C afin de précipiter les protéines non digérées par la collagénase. On centrifuge cinq minutes à 13000 rpm et on récupère les surnageants dans des fioles afin d'en compter la radioactivité.

Quant aux culots, ils sont resuspendus dans du NaOH 0,2 N (100  $\mu$ l) et on les récupère également dans des fioles contenant de l'HCl 0,2 N

(100  $\mu$ l). On compte alors la radioactivité dans un compteur à scintillation. La différence de radioactivité entre les culots des deux séries nous donnera alors la quantité de collagène totale.

#### VI. MARQUAGE ET PURIFICATION DES COLLAGENES

#### VI.1. Solutions

1. L-2,3-(<sup>3</sup>H) proline (Amersham, Grande-Bretagne)

2. Acide ascorbique 5 mg/ml PBS (Merck)

3.  $\beta$ -aminopropionitrile ( $\beta$ -APN) 8 mg/ml PBS (Sigma)

4. Phénylméthanesulfonyl fluoride (PMSF) 200 mM dans de l'éthanol absolu, solution fraîche (Sigma)

5. EDTA 2 M dans PBS (Merck)

6. N-éthylmaléimide (NEM) 1 M dans de l'éthanol absolu (Janssen Chemica, Belgium)

7. Benzamidine 500 mM dans PBS (Sigma)

8. Sulfate d'ammonium 240 mg/ml d'H<sub>2</sub>O (Merck)

9. Acide acétique 0,5 M (Merck)

10. Pepsine 10 mg/ml d'acide acétique 0,5 M (Sigma)

11. NaOH 10 N (Merck, RFA)

#### VI.2. Méthode.

Après marquage durant les dernières 24 heures de l'incubation des cellules en présence des facteurs de croissance comme décrit au point V.3, la totalité du surnageant est récolté dans un tube de 10 ml et on ajoute les différents inhibiteurs de protéases:

- 20  $\mu$ l de PMSF (2 mM final)
- 200 µl d'EDTA (20 mM final)
- 20  $\mu$ l de NEM (10 mM final)
- 20  $\mu$ l de benzamidine (5 mM final)

Ces tubes sont placés dans de la glace pendant cinq minutes. Ensuite, les échantillons (2 ml) sont transférés dans des tubes contenant 528 mg de sulfate d'ammonium et vortexés. On laisse reposer et précipiter toute la nuit à 4°C. D'autre part, les puits correspondants contenant les cellules sont rincés deux fois avec du PBS avant d'en doser l'ADN.(cf. point IV). Le lendemain, les milieux sont récupérés dans des épendorfs et centrifugés à 13 000 pm pendant cinq minutes. Une seconde centrifugation a lieu en lavant le culot avec 1ml de sulfate d'ammonium. Le culot de collagène est resuspendu dans 100  $\mu$ l d'acide acétique auxquels on rajoute ensuite 10  $\mu$ l de pepsine. La pepsine dégrade toutes les protéines excepté le collagène. Après 16 heures de digestion à 4°C, on ajoute 10  $\mu$ l de NaOH (10 N) qui va neutraliser la solution et donc inhiber l'activité de la pepsine.

Après avoir vortexé, on prélève  $3 \ge 2 \mu l$  d'échantillons auxquels on ajoute 4 ml d'aqualuma (Luma, Landgraaf, Pays-Bas) et on mesure la radioactivité pendant trois minutes au moyen d'un compteur à scintillation (Beckman). Les échantillons de collagène purifiés sont alors congelés à -20 °C en attendant l'électrophorèse.

#### VII. ANALYSE DES COLLAGENES PAR ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE - SDS (SDS-PAGE, ET FLUOROGRAMME

#### VII.1. Principe

L'électrophorèse, la migration de particules chargées dans un champ électrique, est utilisée pour séparer différentes protéines en fonction de leur charge, leur taille et leur forme.

En présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS) chargé négativement, les protéines sont dénaturées et acquièrent toutes une charge négative. De ce fait, la migration des protéines se fait uniquement en fonction de leur poids moléculaire. Les gels de polyacrylamide résultent de la polymérisation du monomère d'acrylamide en présence d'un agent bifonctionnel (le N, N<sup>2</sup> méthylène bisacrylamide) qui relie les molécules polymérisées entre elles.

La réaction est initiée par des catalyseurs produisant des radicaux libres: le persulfate d'ammonium (APS) et le N, N, N', N' tétraméthyléthylènediamine ou TEMED.

La taille des pores du réseau tridimentionnel des gels de polyacrylamide est fonction du pourcentage d'acrylamide et inversément proportionnelle à la quantité d'agent réticulant.

Le gel d'empilement (stacking gel) placé au sommet du gel de séparation (running gel) a pour rôle de concentrer les protéines avant la séparation. Le fluorogramme, quant à lui, représente une amplification des rayonnements  $\beta$  du tritium des échantillons par formation de protons par une solution adéquate ("enhancer"). Les protons sont alors révélés par un film photographique.

#### VII.2. Solutions

1. Solution acrylamide stock: 30 % acrylamide (Gibco BRL. Gaithersburg, USA) et 0,8 % de bisacrylamide (Gibco BRL. Gaithersburg, USA) dans 100 ml d'H2O distillée. Cette solution doit être conservée à 4°C et dans l'obscurité.

2. Tampon "lower gel stock" : Tris 1,5 M, SDS 0,4 % dans 100 ml d'eau distillée pH 8,8 (Merck, RFA)

3. Tampon "upper gel stock" Tris 0,5 M, SDS 0,4% dans 100 ml d'eau distillée pH 6,8

4. Tampon échantillon: Tris 0,065 M, SDS 3%, bleu de bromophénol (Janssen Beerse) 0,002%, glycérol (Merck, RFA) 10% dans 100 ml d'H<sub>2</sub>O distillée pH 6,8

5. Tampon d'électrophorèse: Tris 0,025 M, glycine (Merck, RFA) 0,192 M, SDS 0,1% dans 2 litres d'eau distillée pH 8,3

6. TEMED (Gibco BRL, Gaithersburg, USA)

7. Persulfate d'ammonium (APS, Bio Rad, Richmond, USA) 10 % dans 1 ml d'H<sub>2</sub>O distillée (préparé fraîchement)

8. Mercaptoéthanol 20 % (Fluka, Biochemika, Buchs, Switzerland)

9. Solution de fixation: 10 % acide acétique, 30 % de méthanol et 60 % d'H<sub>2</sub>O.

10. Enhancer (Biorad, Hercules, Californie)

#### VII.2. Préparation du gel

Les gels sont coulés entre deux plaques de verre propres, adaptables dans une cuve à électrophorèse. Pour le running gel:

- 43 ml d'acrylamide stock
- 5 ml de tampon "lower gel"
- 10,7 ml d'eau distillée
- 10,7 µ1 TEMED
- 107 µl APS

La polymérisation se fait pendant environ une heure, en recouvrant le gel par une couche d'isobutanol saturé en eau afin d'obtenir une surface plane et éviter le contact avec l' $O_2$  de l'air.

Le stacking gel: - 1 ml d'acrylamide stock

- 2,5 ml de tampon "upper gel"
- 7 ml d'H<sub>2</sub>O
- 30 µl APS
- 10 µl TEMED

Dès que le gel est coulé, on y place le peigne et on laisse polymériser pendant une heure. Les plaques sont ensuite montées dans la cuve qui sera remplie de tampon d'électrophorèse.

Préparation des échantillons et migration: La quantité d'échantillons déposée sur le gel est corrigée en fonction de la quantité de cellules correspondant. On utilise pour cela les résultats du dosage d'ADN effectué en parallèle. A 40  $\mu$ l d'échantillon, on ajoute 20  $\mu$ l de tampon échantillon et 5  $\mu$ l de mercaptoéthanol.

Ces échantillons sont dénaturés pendant deux minutes à 85°C. On peut alors charger ceux-ci à savoir 60  $\mu$ l/puits.

La migration se fait pendant trois à quatre heures à 26 mA jusqu'à ce que le bleu de bromophénol ait parcouru l'entièreté du gel. Après migration, le gel est mis toute la nuit dans la solution de fixation.

#### VII.3. Fluorogramme

Le gel est ensuite trempé pendant une heure dans la solution d'enhancer et rincé à l'eau distillée pendant trente minutes. Après rinçage, il est séché sur un papier filtre et placé dans une cassette Kodak X-omatic (Kodak, USA) contenant un film hyper film M-P (Amersham, Danemark).

Après développement du film, l'intensité des différentes bandes du fluorogramme est quantifiée grâce au logiciel Bio Image (voir plus loin).

#### VIII. ZYMOGRAMME

#### VIII.1. Principe

La mise en évidence des métallo-protéases matricielles (MMP) se fait à l'aide du zymogramme. Ces protéases sont sécrétées par les cellules et se retrouvent donc dans le milieu de culture. Ces protéases contenues dans le milieu sont séparées en fonction de leur poids moléculaire par électrophorèse SDS-PAGE dans un gel qui contient de la gélatine.

Après migration, les gels sont incubés à 37°C dans un tampon d'activation qui permet l'activation des MMP; ces protéases vont alors digérer la gélatine à l'endroit où elles ont migré.

Après coloration au bleu de Coomassie, le gel apparaît bleu puisqu'il contient de la gélatine et des bandes blanches sont visibles là où la gélatine a été digérée, c'est-à-dire là où les MMP ont migré.

L'intensité des bandes est directement proportionnelle à l'activité MMP présente.

#### VIII.2. Solutions

\* gel de séparation: "running gel"

- H<sub>2</sub>O 4,75 ml

- gélatine (100 mg/ml) 100  $\mu$ l : celle-ci est à faire bouillir et à préparer fraîchement
- 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 2,5 ml

- acryl/bisacryl amide (30% / 0,8%) 2,5 ml

- SDS 10% 100 µl
- APS 10% 50  $\mu$ l : ce dernier est à préparer fraîchement
- TEMED: 10 µl

NB: il faut ajouter l'APS et le TEMED juste avant de couler le gel.

\* gel de concentration:

H2O 6,1 ml
0,5 M Tris-HCl pH6,8 2,5 ml
acryl / bisacrylamide (30 % / 0,8%) 1,3 ml
SDS 10% 100 μl
APS 10% 50μl
TEMED 10μl

\* tampon de migration:
51: - Tris 15 g
- Glycine 72 g
- SDS 5 g

\* tampon échantillon Solution A: - 0,1 g de bleu de bromophénol
 - 8,6 g de sucrose
 - 10 ml de H2O

- 1,5 g Tris
- 4 g SDS
- 4 ml de solution A porté à 100 ml avec H<sub>2</sub>O pH 6,8

\* tampon d'activation:

- 11 : Tris 6,06 g
  - CaCl<sub>2</sub> 1,47 g
  - NaCl 2,92 g
  - brij 0,5 g (Sigma)
- \* bleu de Coomassie :
  - 50 % H<sub>2</sub>O
  - 10 % acide acétique
  - 40 % méthanol
  - 0,1 % bleu de Coomassie

\* tampon de décoloration

- acide acétique 7,5 %
- méthanol 5 %
- H<sub>2</sub>O 87,5 %

\* triton 100 2,5 % dans H<sub>2</sub>O

#### VIII.3. Méthode

Celle-ci est décrite pour deux mini-gels BioRad:

\* Polymérisation du running gel :

Après avoir ajouté les deux catalyseurs, on coule immédiatement, à l'aide d'une pipette pasteur, les gels de séparation entre les plaques. Afin que le gel soit plat, on le recouvre d'un peu d'isobutanol et on laisse alors polymériser pendant 45 minutes.

\* Polymérisation du stacking gel:

Avant de couler le deuxième gel, on élimine l'alcool, on rince à l' $H_2O$  et on séche légèrement au moyen d'un papier absorbant la surface du running gel, on coule ensuite le stacking gel, on place les peignes et on laisse polymériser pendant 45 minutes.

\* Préparation et migration des échantillons:

La préparation des échantillons se fait à 4°C: 15  $\mu$ l d'échantillon pour 15  $\mu$ l de tampon échantillon. La quantité d'échantillon déposée est calculée en fonction de la quantité de cellules correspondante (cf. dosage ADN).

Lorsque les gels sont insérés dans la cuve d'électrophorèse et que le tampon de migration est versé dans les deux compartiments de la cuve afin que les électrodes soient complètement immergées et que cette dernière soit placée dans la glace, on peut alors, à l'aide d'une seringue Hamilton, remplir chaque puits avec 20  $\mu$ l d'échantillon, et un puit avec 8  $\mu$ l d'étalon.

Ensuite, on place le couvercle et on met sous tension (20 mA) pendant deux heures.

Après la migration, on démoule délicatement les gels et on les plonge dans du triton 100 x. Après une heure à 20°C sous agitation, on incube le gel dans le tampon d'activation toute une nuit à 37°C et sous agitation.

Pendant ce temps, les MMP présentes dans le gel vont digérer la gélatine, là où elles ont migré. Le lendemain, le gel est coloré dans du bleu de Coomassie pendant une à deux heures et décoloré pendant deux à trois heures.

Le résultat est photographié et quantifié à l'analyseur d'image puis le gel est séché sous vide pendant une heure entre un papier Whatman d'un côté et un papier cellophane de l'autre. \* Quantification:

Une image du gel est enregistrée à l'aide d'un système d'analyse d'images, le Visage 101 (Millipore, USA).

Ce système est composé principalement d'une caméra haute résolution 1024 x 1024 (Videk) et d'un ordinateur doté entre autres du logiciel Bio Image (Millipore, USA).

L'image est ensuite traitée par ce logiciel qui transforme les différents niveaux de gris en densité optique et ce, en utilisant une échelle de calibration.

Après avoir repéré et délimité les bandes sur le gel, l'ordinateur quantifie ces bandes en calculant l'intégrale des intensités optiques de la surface de chaque bande.

D'autre part, on détermine le poids moléculaire correspondant aux bandes en utilisant 5 étalons: - myosine 200 000

- β-galactosidase 116 250

- phosphorylase b 97 400

- serum albumine bovine 66 200

- ovalbumine 45 000

L'intensité des bandes est directement proportionnelle à l'activité MMP présente à cet endroit du gel.
# RESULTATS et DISCUSSIONS

: :

### C. RESULTATS

#### I. MODULATION PHÉNOTYPIQUE DES CML

#### I.1. Caractérisation des deux phénotypes

Les cellules musculaires lisses semblent jouer un rôle important dans le développement des maladies vasculaires comme l'athérosclérose, l'hypertension ou les veines variqueuses (Ross, 1981).

Elles subissent dans ces pathologies, une transition d'un état contractile à un état synthétique caractérisé par une prolifération active, peu de filaments contractiles ( $\alpha$ -actine et myosine) et la sécrétion des composants de la matrice extracellulaire dont le collagène (Chamley-Campbell, 1979). On parle de modulation phénotypique.

Afin d'étudier in vitro cette différenciation-dédifférenciation, nous avons tout d'abord développé un modèle expérimental qui permet d'obtenir les deux phénotypes des cellules musculaires lisses in vitro et qui est hautement reproductible. Pour induire les deux phénotypes des cellules musculaires lisses in vitro, les CML (A7r5) ont été ensemencées à différentes densités.

Les quatre densités qui furent choisies tout au long de ce travail sont:

1 600 cellules/cm<sup>2</sup>
8 000 cellules/cm<sup>2</sup>
20 000 cellules/cm<sup>2</sup>
30 000 cellules/cm<sup>2</sup>

Elles sont ensuite incubées pendant trois jours en présence de 10 % de sérum. Nous savons qu'à faible densité (1600 et 8000 cellules/cm<sup>2</sup>), les cellules prolifèrent pendant cette période et sont dans un état synthétique alors qu'à forte densité (20 000 et 30 000 cellules/cm<sup>2</sup>) elles arrivent à confluence après un ou deux jours, ne se divisent plus et se redifférencient dans le phénotype contractile. Elles sont ensuite incubées trois jours dans du milieu contenant 0,2 % de sérum afin d'étudier l'effet des mitogènes (voir plus loin).

La caractérisation des deux phénotypes s'est faite en mesurant leur taux de synthèse protéique par incorporation de leucine tritiée.

Figure C1:

Micrographies en microscopie optique à contraste de phase de CML A7r5 ensemencées à 1600 (A), 8000 (B), 20 000 (C) et 30 000 (D) cellules/cm<sup>2</sup>. Les cellules ont été incubées trois jours dans du D + 10 % S puis trois jours dans du D + 0,2 % S (grossissement 115 X).







С



D



Figure C2:

Evolution de la quantité d'ADN pour les 4 densités cellulaires différentes (1600, 8000, 20 000 et  $30\ 000\ cellules/cm^2$ ). Les résultats sont exprimés en unité de fluorescence en tant que moyennes  $\pm 1$ écart-type pour n = 3.



Figure C3:

Evolution de la synthèse protéique par les cellules musculaires lisses en fonction de la densité cellulaire (1600, 8000, 20 000, 30 000 cellules/cm<sup>2</sup>). Les résultats sont exprimés en dpm/ $\mu$ g protéines en tant que moyennes <u>+</u> 1 écart-type pour n = 3.



Figure C4:

Evolution de la synthèse protéique par cellule, en fonction de la densité cellulaire (1600, 8000, 20 000 et 30 000 cellules/cm<sup>2</sup>). Les résultats sont exprimés en dpm/quantité d'ADN en tant que moyennes  $\pm$  1 écarttype pour n = 3.

#### I.1.1 Résultats

Les photos de la figure C1 illustrent la morphologie des cellules (A7r5) ensemencées aux différentes densités choisies et après les six jours d'incubation. La différence de densité s'observe toujours après lessix jours d'incubation. De plus, il semblerait que les cellules ensemencées à faible densité soient plus grosses alors que celles ensemencées à forte densité sont plus petites et s'arrangent parallèlement les unes aux autres.

Les résultats présentés à la figure C2 illustrent le contenu en ADN des cellules à différentes densités et après six jours d'incubation: nous observons une augmentation du nombre de cellules en fonction de la densité.

Parallèlement à ce dosage, nous avons réalisé une mesure de la synthèse protéique en fonction des différentes densités cellulaires. L'analyse quantitative de la synthèse protéique nous a permis de mettre en évidence d'un point de vue biochimique les deux phénotypes qui sont obtenus in vitro.

Les résultats de la figure C3 montrent l'évolution de la synthèse protéique totale exprimée en dpm/ $\mu$ g de protéines en fonction de la densité.

Nous observons une diminution importante de la synthèse protéique en fonction d'une augmentation de la densité. Les cellules musculaires lisses à la plus faible densité synthétisent  $6490 \pm 750$  dpm/µg de protéines; alors que seulement  $838 \pm 21$  dpm/µg de protéines sont synthétisés par les cellules musculaires lisses à haute densité.

Pour ce qui est des densités 8 000 et 20 000, on obtient un phénotype intermédiaire: la synthèse protéique est plus faible qu'à 1600 cellules/cm<sup>2</sup> mais plus élevée qu'à haute densité. Ces résultats mettent donc en évidence une synthèse environ 7 fois plus grande pour les cellules ensemencées à faible densité par rapport aux cellules à confluence.

Quant à la figure C4, la synthèse protéique est exprimée en dpm par quantité d'ADN et ce pour les quatre densités. De cette manière, nous exprimons la synthèse protéique par cellule ce qui permet de corriger les valeurs de la figure précédente si une cellule ne contient pas la même quantité de protéines selon la densité à laquelle elle est mise en culture.

Dans ce cas également, on observe que les cellules mises à une densité la plus basse synthétisent  $\pm$  30,6 dpm/quantité d'ADN alors qu'à la plus importante densité, les cellules synthétisent 0,51 dpm/quantité d'ADN. Les résultats sont donc concordants avec ceux de la figure précédente.

#### I.1.2 Discussion

Il était intéressant de caractériser un modèle expérimental permettant d'obtenir les deux phénotypes des cellules musculaires lisses in vitro, afin d'étudier la prolifération et la différenciation des cellules musculaires lisses en relation avec les conditions observées dans les différentes pathologies vasculaires (cf. plus loin).

Parallèlement à la mesure de la prolifération cellulaire, la synthèse de protéines fut mesurée par incorporation de leucine tritiée.

La relation inversément proportionnelle de la synthèse protéique en fonction de la densité reflète bien l'existence de deux phénotypes. Cependant, il faut remarquer qu'on observe une gradation dans les niveaux de synthèse protéique, ce qui indiquerait l'existence de phénotypes intermédiaires.

Thyberg et al (1985) ont étudié les cellules musculaires lisses mises en culture à partir d'artères humaines. Leurs travaux mettent en évidence la différence morphologique qu'il y a entre les deux phénotypes des cellules musculaires lisses.

Les cellules sous le phénotype contractile ont un noyau d'hétérochromatine: leur cytoplasme est constitué de manière majoritaire par des paquets de myofilaments. Le RER est fait quant à lui de quelques citernes associées à l'enveloppe nucléaire et à un petit complexe de Golgi. Occasionnellement, les citernes du RER sont aussi trouvées en périphérie.

Après un ou deux jours en culture, les cellules subissent une fine modification structurale et passent dans un état synthétique. D'une part, on observe une régression des myofilaments, cette baisse de myofilaments serait associée à une augmentation du nombre de lysosomes même s'il n'y a pourtant pas de signes d'autophagie. Ce désassemblage des filaments commence de manière périnucléaire, puis s'étend au cytoplasme, pour ne laisser qu'un réseau diffus de filaments.

D'autre part, on observe le développement d'un RER et de complexes de Golgi. Un grand nombre de ribosomes apparaissent également libres dans le cytoplasme, principalement organisés en polysomes.

Ce passage d'un état différencié à un état dédifférencié a également été observé morphologiquement par Sjolund et al (1986) sur des cellules musculaires lisses d'aorte de rat.

Le modèle expérimental développé dans ce travail présente l'avantage par rapport à ces études de pouvoir obtenir de manière réversible et reproductible puisqu'il s'agit d'une lignée cellulaire, les deux phénotypes extrêmes (Berna, 1994) mais également certains états intermédiaires. Nous avons voulu caractériser biochimiquement ces différents phénotypes et avons montré que plus les cellules sont différenciées, moins elles synthétisent de protéines. ADN (unités de fluorescence)





Figure C5:

Evolution de la quantité d'ADN en fonction de la densité cellulaire (1600, 8000, 20 000 et 30 000 cellules/cm<sup>2</sup>) et effet de la PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , du bFGF et du mélange des deux molécules sur la prolifération cellulaire. Les résultat sont exprimés en unités de fluorescence en tant que moyennes  $\pm$  1 écart-type pour n = 3. Holderbaum et Ehrhast (1984) avaient également observé que les cellules musculaires lisses d'artère de lapin mises en culture se dédifférencient et en parallèle, augmentent leur synthèse totale de protéines. Ces résultats précédemment qui montrent dans les cellules dans l'état synthétique un réticulum endoplasmique bien développé ainsi qu'un appareil de Golgi abondant.

#### I.2. Effet des PG et bFGF sur la synthèse protéique

On observe dans les différentes pathologies vasculaires et plus spécialement dans les pathologies variqueuses, de nombreuses altérations et modifications au niveau de la paroi vasculaire. Dans ce cadre, la modulation phénotypique des cellules musculaires lisses joue un rôle important.

Les travaux réalisés au laboratoire sur l'hypoxie sur les cellules endothéliales suggèrent que l'activation serait le point de départ de la désorganisation typiquement observée dans la paroi des veines malades. En effet, Michiels et al (1994) ont montré que les cellules endothéliales incubées pendant deux heures sous hypoxie libéraient des facteurs mitogènes pour les cellules musculaires lisses. Leurs expériences ont montré qu'à une concentration de 3,6 x  $10^{-9}$  M, la PGF<sub>2</sub> $\alpha$  était déjà capable d'augmenter la synthèse d'ADN des cellules musculaires lisses et ce en synergie avec le bFGF.

Nous avons donc voulu étudier le rôle potentiel de ces deux molécules dans la modulation phénotypique dans le but de pouvoir expliquer les modifications observées in vivo.

A cette fin, nous avons analysé l'effet de ces deux molécules sur la prolifération des cellules musculaires lisses d'une part et sur la synthèse protéique d'autre part en les ajoutant directement au milieu d'incubation.

Nous avons choisi la mesure de la synthèse protéique comme paramètre pour suivre la modulation phénotypique puisque nous avons montré dans le chapitre précédent qu'elle permettait une bonne caractérisation du phénotype des cellules musculaires lisses.

#### I.2.1 Résultats

La figure C5 montre l'effet de la PGF $_2\alpha$  et du bFGF ainsi que du mélange des deux sur la prolifération des cellules musculaires lisses en fonction des différentes densités.

Les concentrations des deux molécules testées correspondent à celles que les cellules endothéliales secrètent lors d'une incubation de deux heures



20000

30000

ctl

PGF2a

**bFGF** 

PGF2a+bF0

Figure C6:

Evolution de la synthèse protéique en fonction de la densité cellulaire (1600, 8000, 20 000 et 30 000 cellules/cm<sup>2</sup>) et effet de la PGF<sub>2</sub> $\alpha$  et du bFGF et du mélange des deux molécules sur la synthèse protéique. Les résultats sont exprimés en dpm/ $\mu$ g de protéines en tant que moyennes + 1 écart-type pour n = 3.



Evolution de la synthèse protéique par cellule en fonction de la densité cellulaire (1600, 8000, 20 000 et 30 000 cellules/cm<sup>2</sup>) et effet de la PGF<sub>2</sub>α, du bFGF et du mélange des deux molécules sur la synthèse protéique. Les résultats sont exprimés en dpm/quantité d'ADN en tant que moyennes + 1 écart-type pour n = 3.

d'hypoxie. Les résultats de la figure C5 sont exprimés en tant que moyennes de triplicats.

Ces résultats montrent que la  $PGF_2\alpha$  augmente légèrement la prolifération des cellules musculaires lisses par rapport aux cellules contrôles.

Le bFGF et le mélange des deux molécules ont également un effet activateur de la croissance cellulaire, qui est plus prononcé pour les densités les plus importantes.

Pour ce qui est de l'effet du mélange des deux molécules, il est difficile de tirer des conclusions, l'écart-type étant trop important mais il semblerait que ce mélange ait le même effet que le bFGF seul.

Les résultats représentés à la figure C6 montrent l'action de la PGF $_2\alpha$ , du bFGF ainsi que du mélange des deux molécules sur la synthèse protéique pour les différentes densités.

Aussi bien pour les cellules musculaires lisses n'ayant été mises en présence d'aucun des médiateurs que pour celles incubées avec chacun d'entre eux, nous observons le même profil: la synthèse de protéines, exprimée en dmp par  $\mu$ g de protéines, est très élevée pour le phénotype synthétique et diminue pour les cellules qui arrivent à confluence, ayant alors le phénotype contractile.

La PGF<sub>2</sub> $\alpha$  semble avoir un effet inhibiteur sur la synthèse par les cellules musculaires lisses (57 % d'inhibition sont observés pour les cellules ensemencées à 1600 cellules/cm<sup>2</sup>).

Le bFGF semble quant à lui abaisser très fortement la synthèse protéique (74 % d'inhibition). Cet effet n'est pas significatif pour les plus fortes densités cellulaires.

Comme au point I.1., à la figure C7 nous avons également exprimé les résultats en dpm/quantité d'ADN. On observe également une diminution de la synthèse protéique par rapport aux contrôles sous l'effet des deux molécules.

#### I.2.2 Discussion

L'hypothèse développée au laboratoire concernant l'origine des varices propose d'expliquer la prolifération des cellules musculaires lisses dans la paroi des veines variqueuses par le fait que les cellules endothéliales, activées par une hypoxie qui mime l'ischémie résultant de la stase

veineuse in vivo, relarguent des facteurs de croissance tels que la  $PGF_2\alpha$ , le bFGF. Ces facteurs ont effectivement un effet pro-prolifératif

in vitro. Ceci avait déjà été montré précédemment au laboratoire (De Leener, 1992; Michiels et al, 1994).

Il nous a paru alors intéressant d'étudier l'effet des ces molécules sur la modulation phénotypique des cellules musculaires lisses en culture.

Les expériences décrites ci-dessus montrent que ces molécules auraient un effet inhibiteur sur la synthèse protéique qu'elle soit exprimée par quantité de protéines ou par cellule.

Ces résultats sont en contradiction avec les résultats de Holderbaum et Ehrhast (1984) qui suggèrent que la synthèse protéique des cellules musculaires lisses est quantitativement dépendante du stade de croissance des cellules in vitro: plus celles-ci prolifèrent, plus leur synthèse protéique est importante.

Si nous avons montré que la PGF2 $\alpha$  et le bFGF induisent effectivement une prolifération, ces médiateurs diminuent cependant la synthèse protéique. Si on ne se base que sur ce paramètre biochimique, la PGF2 $\alpha$ et le bFGF n'induiraient donc pas de modulation phénotypique en tant que telle, c'est-à-dire le passage d'un état différencié où la synthèse protéique est faible vers un état dédifférencié avec synthèse accrue.

Des études supplémentaires concernant l'effet de ces facteurs de croissance sur d'autres caractéristiques des deux phénotypes doivent être envisagées afin de mieux comprendre leur action au niveau des cellules musculaires lisses.

#### I.3. Effet direct des milieux conditionnés de cellules endothéliales incubées sous hypoxie

Ayant montré un effet direct de la  $PGF_2\alpha$  et du bFGF, il était intéressant de vérifier si les milieux conditionnés par les cellules endothéliales incubées sous hypoxie pouvaient également avoir un effet sur le phénotype des cellules musculaires lisses.

En utilisant les mêmes conditions expérimentales d'hypoxie sur les cellules endothéliales que celles décrites par Michiels et al (1994), nous avons testé l'influence des milieux conditionnés de cellules endothéliales en les ajoutant au milieu de culture des cellules musculaires lisses pendant trois jours. Ces milieux conditionnés sont récoltés après incubation de

cellules endothéliales sous normoxie et sous hypoxie pendant deux heures.

Nous avons alors comparé l'effet des milieux conditionnés de cellules endothéliales ayant subi deux heures d'hypoxie à l'effet des témoins milieux conditionnés par des cellules endothéliales contrôles c'est-à-dire maintenues en normoxie de manière à vérifier si l'hypoxie stimule bien la



Figure C8:

Evolution de la synthèse protéique par cellule en fonction de la densité cellulaire (1600, 8000, 20 000 et 30 000 cellules/cm<sup>2</sup>) et effet des milieux conditionnés par des cellules endothéliales normoxiques ou hypoxie ou un milieu contrôle (HBSS). Les résultats sont exprimés en dpm/quantité d'ADN en tant que moyennes + 1 écarttype pour n = 2. libération de facteurs provoquant la modulation phénotypique et ce en suivant la synthèse protéique totale.

#### I.3.1 Résultats

La figure C8 illustre la synthèse protéique exprimée en dpm/par quantité d'ADN en fonction de la densité cellulaire. Lorsque les cellules musculaires lisses ont été incubées en présence de milieux conditionnés par les cellules endothéliales. Aucune différence n'est observée entre la synthèse protéique par les cellules musculaires lisses mises en présence d'HBSS et les cellules musculaires lisses incubées avec les milieux conditionnés des cellules endothéliales sous normoxie. Les cellules endothéliales maintenues en conditions normales ne synthétisent donc pas ou pas en concentration suffisante de facteurs capables de moduler la synthèse protéique des cellules musculaires lisses.

Par contre, le milieu conditionné de cellules endothéliales incubées sous hypoxie diminue la synthèse protéique des cellules musculaires lisses lorsque celles-ci ont été ensemencées à 1600 cellules/cm<sup>2</sup>. Nous n'avons pas tenu compte des résultats de la densité 8000 cellules/cm<sup>2</sup> car aucune interprétation de l'effet observé n'est possible. Pour les densités les plus fortes, aucun effet des milieux conditionnés par les cellules endothéliales sous hypoxie n'est observé. Il faudrait pouvoir répéter cette expérience plusieurs fois afin de vérifier les effets observés ici.

#### I.3.2 Discussion

La prolifération excessive des cellules musculaires lisses observée dans les différentes maladies vasculaires mène à un épaississement de la paroi veineuse (Weissberg, 1991).

Le mécanisme responsable de ce changement n'est pas encore bien connu; c'est pourquoi des études sur la régulation du phénotype et de la croissance des cellules musculaires lisses devraient en fournir une meilleure compréhension.

L'ischémie résultant d'une stase veineuse est un facteur épidémiologique important dans l'apparition des veines variqueuses. Afin de comprendre le comportement des cellules musculaires lisses dans ces conditions, nous avons utilisé un modèle in vitro où les cellules endothéliales sont exposées à une hypoxie qui mime l'ischémie in vivo. Nous avons alors testé l'effet du milieu conditionné de ces cellules endothéliales incubées sous hypoxie sur la synthèse protéique des CML afin de le comparer à celui de la PFG2 $\alpha$  et du bFGF ajoutés de façon exogène. Les résultats ne montrent aucune différence en présence d'HBSS ou du milieu conditionné de cellules endothéliales incubées sous normoxie.

Des expériences au laboratoire avaient en effet montré que les cellules endothéliales ne libéraient pas de facteurs mitogènes dans les conditions basales. Par contre, dans le cas ces cellules musculaires lisses auxquelles on a ajouté le milieu conditionné de cellules endothéliales incubées sous hypoxie, on observe une diminution de la synthèse protéique lorsque celles-ci ont été ensemencées à une densité de 1600 cellules/cm<sup>2</sup>.

Dans le chapitre précédent où l'on testait directement la prostaglandine  $F_{2\alpha}$  et le bFGF, nous avions également mis en évidence un effet inhibiteur de ces molécules sur la synthèse protéique; principalement pour les faibles densités. On observe donc des effets similaires que ce soit avec les mitogènes seuls ou en présence du mélange de mitogènes libérés par les cellules endothéliales incubées sous hypoxie.

Ceci montre que l'hypoxie est capable d'activer fortement les cellules endothéliales, conduisant à la libération de différents facteurs, et principalement la PGF2 $\alpha$  en grande quantité qui pourrait en conjonction avec d'autres facteurs, alors agir sur d'autres types cellulaires telles que les cellules musculaires lisses.

Ces résultats permettent d'expliquer la prolifération des cellules musculaires lisses in vivo dans les veines variqueuses: ce serait les mitogènes libérés par les cellules endothéliales activées par la stase veineuse qui induiraient cette prolifération. Par contre, ces mitogènes ne semblent pas induire de modulation phénotypique proprement dite puisqu'ils n'augmentent pas la synthèse protéique, ce qui exprimerait une dédifférenciation de cellules contractiles en cellules synthétiques. La modulation phénotypique serait induite dans un premier temps par d'autres molécules dont l'origine reste encore à définir et ensuite les facteurs libérés par les cellules endothéliales induisent la prolifération des cellules musculaires lisses.



ctl

ΠΠ

PGF2a

**bFGF** 

PGF2a+bFGF

Densité cellulaire (cellules/cm<sup>2</sup>)

Figure C9:

Synthèse de collagène (dpm/quantité d'ADN)

Evolution de la synthèse totale de collagène en fonction de la densité cellulaire (1600, 8000, 20 000 et 30 000 cellules/cm<sup>2</sup>) et effet de la PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , du bFGF et du mélange des deux molécules sur cette synthèse. Les résultats sont exprimés en dpm/quantité d'ADN en tant que moyennes  $\pm$  1 écart-type pour n = 3.

#### **II.B. MATRICE EXTRACELLULAIRE**

Dans la deuxième partie de ce travail, nous nous sommes intéressés à la synthèse des différents composants de la matrice extracellulaire par les cellules musculaires lisses.

Nous avons plus particulièrement étudié le collagène car ce dernier est le composant majeur de la matrice extracellulaire de la média de la veine. Nous avons réalisé une analyse quantitative de sa synthèse et de la synthèse de certaines enzymes qui le dégradent, et observé l'effet des différents mitogènes utilisés précédemment et ce, en fonction des différentes densités cellulaires.

#### II.1. Effet des mitogènes sur la synthèse de collagène

Afin d'examiner l'effet des mitogènes sur la synthèse totale du collagène, nous avons suivi l'incorporation de proline triciée dans les protéines sécrétées par les cellules musculaires lisses. De plus, l'effet de la PGF2 $\alpha$  et du bFGF a été étudié sur cette synthèse.

#### II.1.1. Synthèse totale

La synthèse totale de collagène a été quantifiée par l'incorporation de proline tritiée. En présence de  $\beta$ -aminoproprionitrite (voir point B.V.4.), le collagène secrété par les cellules reste soluble dans le milieu de culture. On peut donc en estimer la quantité par comptage de la radioactivité associée au matériel précipitable par le TCA et ce en comparant les valeurs obtenues avant et après digestion à la collagénase.

La figure C9 montre que la synthèse totale de collagène par les CML diminue en fonction de la densité cellulaire et ce, de façon tout à fait parallèle à la diminution de la synthèse totale de protéines observée précédemment (voir figure C4).

Par contre, en ce qui concerne la synthèse du collagène, les effets de la PGF2 $\alpha$  et du bFGF semblent différents. En effet, on observe sur la figure C9 que la PGF2 $\alpha$  augmente la synthèse de collagène à toutes les densités cellulaires. D'autre part, le bFGF semble par contre diminuer systématiquement cette synthèse. L'effet du mélange des deux mitogènes est difficilement interprétable puisque changeant selon la densité envisagée.



Figure C10: Fluorogramme des différents types de collagène synthétisés par les cellules musculaires lisses en fonction de la densité cellulaire (1600(A), 8000(B),20 000 (C)et 30 000(D) cellules/cm<sup>2</sup>). Les cellules ont été incubées en absence(1) ou en présence de la PGF<sub>2 $\alpha$ (2), du bFGF(3) ou du mélange des deux molécules(4).</sub>

#### II. 1.2. Analyse des différents types de collagène

Afin de confirmer les résultats obtenus précédemment, nous avons voulu vérifier l'effet de la densité cellulaire ainsi que celui des facteurs mitogènes sur la synthèse des différents types de collagène. Cette analyse se réalise après séparation des différentes chaînes de collagène par électrophorèse après marquage métabolique à la proline triciée, précipitation au sulfate d'ammonium et digestion à la pepsine (voir point B.VI.2.).

Par manque de temps, une seule expérience a pu être réalisée. Les résultats de cette expérience sont présentés à la figure C10. Malgré un problème lors de l'électrophorèse, on peut tout de même constater que les cellules musculaires lisses synthétisent majoritairement du collagène de type I. On ne retrouve sur le gel la bande correspondant à la chaîne  $\alpha$ 1 du collagène de type III que dans une seule piste On ne peut cependant interpréter quantitativement les effets des densités cellulaires ou les facteurs mitogènes.

#### II.1.3. Discussion

La synthèse de la matrice extracellulaire est une fonction importante des cellules musculaires lisses. Cette propriété acquiert une importance encore plus grande quand on considère les pathologies vasculaires en général ou veineuses en particulier. En effet, dans ces conditions, les CML prolifèrent mais également augmentent leur synthèse de protéines dans la matrice extracellulaire. Ces deux événements conduisent en parallèle à un épaississement de la paroi veineuse. Ils sont tous deux le résultat d'une dédifférenciation des CML du phénotype contractile au phénotype synthétique.

In vitro, dans notre modèle expérimental, on observe effectivement que les CML repiquées à faible densité et donc dans l'état synthétique synthétisent beaucoup plus de collagène que les CML dans l'état contractile. Ces résultats sont tout à fait en concordance avec ceux obtenus sur les cellules musculaires lisses d'artère de lapin (Holderbaum et Ehrhart, 1984), sur des cellules musculaires lisses d'aorte de rat (Sjolund et al, 1986) ou sur des cellules musculaires lisses d'aorte de lapin (Okada et al, 1990). Ces trois équipes montrent en effet une augmentation de la synthèse de collagène lors de la dédifférenciation des cellules musculaires lisses et ce en parallèle avec leur état prolifératif. Que les cellules musculaires lisses synthétisent majoritairement du collagène de type I est également en accord avec des différents états relevés dans la littérature. Par ailleurs, une augmentation de la synthèse de protéines de la matrice extracellulaire et plus particulièrement de collagène a également été observée in vivo lors de blessure artérielle dans laquelle une néointima se développe (Nikkari et al, 1994), dans l'aorte en développement (Ross et Klebanoff, 1971) et dans les plaques d'athérosclérose (McLeod et al, 1994). La modulation phénotypique et son corollaire l'augmentation de la synthèse des composants de la matrice extracellulaire n'est donc pas seulement observée in vitro mais également in vivo.

Finalement, les résultats obtenus en présence des deux facteurs mitogènes indiquent que ces deux facteurs pourraient jouer des rôles différents dans la régulation fine des fonctions des cellules musculaires lisses. En effet, si le bFGF diminue et la synthèse totale de protéines et la synthèse de collagène, par contre la PGF2 $\alpha$  aurait un effet différenciel à ce niveau. Elle diminue en effet la synthèse protéique totale mais semble augmenter la sécrétion de collagène. Si ces résultats se vérifient, ils acquièreraient une signification physiologique importante car ils indiquent que la PGF2 $\alpha$ libérée par les cellules endothéliales stimulées par la stase veineuse pourrait induire non seulement la prolifération des cellules musculaires lisses mais aussi le dépôt de la matrice extracellulaire.

#### II.2. Métalloprotéinases matricielles

Une des principales modifications observées dans la paroi des veines variqueuses est la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses de la média vers l'intima avec pour conséquence l'épaississement de la paroi vasculaire et particulièrement une hyperplasie intimale.

La migration des cellules musculaires lisses vers l'intima requiert probablement la dégradation de la matrice extracellulaire et par conséquent, la synthèse d'enzymes capables de la dégrader.

Parmi ces enzymes, on retrouve les métalloprotéinases matricielles ou MMP.

Dans la dernière partie de notre travail, nous avons étudié la synthèse de ces enzymes par les cellules musculaires lisses.

Tout d'abord, il nous fallait vérifier que les cellules musculaires lisses libéraient bien ce type de protéases. Ensuite, nous avons quantitativement étudié l'effet de la densité cellulaire sur leur synthèse. Enfin, nous avons suivi l'effet des différents médiateurs et des milieux conditionnés de cellules endothéliales ayant subi une hypoxie sur la synthèse de ces enzymes.



Figure C11:

Zymogramme: effet de trois inhibiteurs : CTL (A) le phényl-méthanesulfonyl (PMSF) (B), et le Néthylmaléimide (NEM) (C) et l'acide éthylinediamine tétraacétique (EDTA) (D) sur l'activité des métalloprotéinases synthétisées par les CML et révélées par zymographie.



Figure C12:

3

Evolution de la synthèse des métallo-protéinases (en fonction de 4 densités cellulaires: 1600, 8000, 20 000 et 30 000 cellules/cm<sup>2</sup>) (zymographie).

#### II.2.1. Libération des MMP par les CML

Nous avons étudié la libération des métalloprotéinases matricielles par les cellules musculaires lisses en réalisant des zymogrammes (cf Matériel et Méthodes).

Le milieu des cellules contient les métalloprotéinases matricielles qui sont sécrétées par les cellules musculaires lisses. Les protéines qu'il contient sont séparées en fonction de leur poids moléculaire dans un gel contenant de la gelatine. L'activité des métalloprotéinases matricielles est ensuite révélée par une nuit de digestion en présence de calcium. Après coloration au bleu de Coomassie, l'activité de ces protéases est indiquée par des bandes blanches visibles à l'endroit où celles-ci digèrent la gélatine.

Afin de vérifier que l'activité mise en évidence est bien due à une métalloprotéinase matricielle, différentes parties du gel ont été incubées avec les inhibiteurs suivants: le phénylméthanesulfonyl (PMSF) qui inhibe les sérine-protéases, l'acide éthylènediamine tétraacétique (EDTA) qui bloque l'action des métalloprotéinases et du N-éthylmaléimide (NEM) qui inhibe les cystéine-protéinases.

#### **Résultats:**

Le zymogramme présenté à la figure C11 montre que seul l'EDTA est capable d'inhiber l'activité enzymatique. Les inhibiteurs des sérine et cystéine protéinases n'ont pas d'effet sur l'activité des protéases.

Ces observations indiquent que ces protéinases synthétisées par les cellules musculaires lisses et révélées par le zymogramme sont bien des métalloprotéinases capables de dégrader la gélatine.

#### II.2.2. Effet de la densité cellulaire sur la synthèse des métalloprotéinases

Le zymogramme de la figure C12 montre l'effet des quatre densités cellulaires auxquelles sont ensemensées les cellules musculaires lisses sur la synthèse des métalloprotéinases matricielles. Chaque densité est représentée par un duplicat.

Pour la densité la plus faible (1600 cellules/cm<sup>2</sup>), nous n'observons qu'une seule bande. En se référant aux étalons, nous avons déterminé son poids moléculaire: il est d'environ 58 kd.

A 8 000 cellules/cm<sup>2</sup>, trois bandes sont visibles: elles correspondent respectivement à un poids moléculaire de 96 kd, 79 kd et 58 kd.

A 20 000 cellules/cm<sup>2</sup> et 30 000 cellules/cm<sup>2</sup>, trois bandes sont également visibles, ayant les mêmes poids moléculaires.



Figure C13: Quantification par analyse d'image de la synthèse de la MMP9 sous sa forme latente correspondant au zymogramme de la figure C11. Les résultats sont exprimés en IOD (intégrale de la densité optique)



Figure C14: Quantification par analyse d'image de la synthèse de la MMP2 sous ses formes latente et active, correspondant au zymogramme de la figure C12. Les résultats sont exprimés en IOD (intégrale de la densité optique).



latente

Figure C15: Evolution de la synthèse des métallo-protéinases en fonction de la densité cellulaire (1600, 8000, 20 000 et 30 000 cellules/cm<sup>2</sup>) et effet de la PGF<sub>2</sub>α. (Zymographie).



Figure C16:

Quantification de la synthèse de la MMP9 sous sa forme latente correspondant au zymogramme de la figure C15 et effet de la PGF $_2\alpha$ . Les résultats sont exprimés en IOD (intégrale de la densité optique).



active

latente





igure C18:

Evolution de la synthèse des métallo-protéinases en fonction de la densité cellulaire (1600, 8000, 20 000 et 30 000 cellules/cm<sup>2</sup>) et effet du bFGF. (Zymographie) En fonction des données de la littérature, nous avons identifié les enzymes responsables des activités observées. La bande à 95 kd correspond à la forme latente de la MMP9 ou gélatinase B alors que les bandes à 79 kd et 57 kd correspondent respectivement aux formes latente et active de la MMP2 ou gélatinase A.

Nous avons ensuite quantifié l'activité présente dans chaque bande par analyse d'image et porté en graphique l'activité de la MMP9 et de la MMP2 en fonction de la densité cellulaire.

La figure C13 illustre la variation de la MMP9 en fonction de la densité cellulaire. Cette MMP n'est pas détectée à une densité de 1600 cellules/cm<sup>2</sup>. Par contre, l'activité de cette protéinase semble constante aux trois densités les plus élevées.

La figure C14 montre l'activité des formes latente et active de la MMP2. La somme des deux correspond alors à la synthèse totale de cette MMP. La forme active est prédominante dans tous les cas.

#### II.2.3. Effet de la PFG2α sur la synthèse des métalloprotéinases matricielles

La figure C15 montre l'effet de la  $PGF2\alpha$  sur la synthèse des métalloprotéinases matricielles à chacune des densités cellulaires et révélée par zymographie. Comme précédemment, ce zymogramme a été analysé et l'intensité des bandes quantifiée.

La figure C16 montre l'effet de la  $PGF_{2\alpha}$  sur la sécrétion de la MMP9 par les cellules musculaires lisses selon la densité cellulaire. Il est difficile de tirer des conclusions quant à l'effet de la  $PGF_{2\alpha}$  car aucune tendance n'est observée sur cette figure.

Pour ce qui est de l'effet de la densité d'une part et de la PGF<sub>2</sub> $\alpha$  sur la synthèse de la MMP2, aucune tendance claire n'est observée (Fig. C16).

## II.2.4. Effet du bFGF sur la synthèse des métalloprotéinases matricielles.

La figure C18 montre plusieurs bandes d'activité protéolytique des cellules mises en présence du bFGF et révélée par un zymogramme. Comme précédemment, l'effet du bFGF a été testé sur les cellules musculaires lisses ensemencées à différentes densités. La présence de trois bandes d'activité MMP de poids moléculaire égal à 96 kd, 79 kd et

57 kd est observée

56



latente

Figure C19:

Quantification par analyse d'image de la synthèse de la MMP9 sous sa forme latente correspondant au zymogramme de la Figure C18 et effet du bFGF. Les résultats sont exprimés en IOD (intégrale de la densité optique)



Figure C20:

Quantification par analyse d'image de la synthèse de la MMP2 sous ses formes latente et active et effet du bFGF correspondant au zymogramme de la Figure C18. Les résultats sont exprimés en IOD (intégrale de la densité optique.)



Figure C21a: Evolution de la synthèse des métallo-protéinases en fonction de la densité cellulaire (1600 et 8000 cellules/ cm<sup>2</sup>) et effet d'un milieu contrôle (HBSS) et des milieux conditionnés par les cellules endothéliales normoxiques ou hypoxiques. Les résultats sont exprimés en IOD (intégrale de la densité optique).



Figure C21b: Evolution de la synthèse des métallo-protéinases en fonction de la densité cellulaire (20 000 et 30 000 cellules/cm<sup>2</sup>) et effet d'un milieu contrôle (HBSS) et des milieux conditionnés par les cellules endothéliales normoxiques ou hypoxiques. Les résultats sont exprimés en IOD (intégrale de la densité optique).



Densité cellulaire (cellules/cm<sup>2</sup>)

igure C22: Quantification de la synthèse de la MMP9 sous ses formes latente et active correspondant au zymogramme de la figure C21a et b et effet des milieux conditionnés par les cellules endothéliales ou hypoxie ou un milieu contrôle (HBSS).



Figure C23: Quantification de la synthèse de la MMP2 sous ses formes latente et active correspondant au zymogramme de la figure C22 et effet des milieux conditionnés par les cellules endothéliales ou hypoxie ou un milieu contrôle (HBSS). Les résultats de la figure C19 montrent l'effet du bFGF sur la synthèse de la MMP9.

Aux faibles densités, on observe une diminution de la synthèse de la forme latente de la MMP9. Quant à l'effet du bFGF sur la synthèse de la MMP2, ce dernier a un effet inhibiteur sur la synthèse totale de la MMP2 et principalement sur l'expression de la forme active (Figure C20).

En effet, à 1600 cellules/cm<sup>2</sup>, une inhibition de 70 % de la forme latente par le bFGF est observée. A 8000 cellules/cm<sup>2</sup>, cette forme est totalement inhibée. La forme active est inhibée à 50% et à 80% respectivement pour les deux densités.

#### II.2.5. Effet direct des milieux conditionnés de cellules endothéliales incubées sous hypoxie.

Ayant montré un effet direct de la  $PGF_{2\alpha}$  et du bFGF, il était intéressant de vérifier si les milieux conditionnés par les cellules endothéliales incubées sous hypoxie pouvaient également avoir un effet sur la synthèse des métalloprotéinases par les cellules musculaires lisses.

Nous avons donc comparé l'effet milieux conditionnés par les cellules endothéliales ayant subi deux heures d'hypoxie à l'effet des milieux conditionnés par des cellules endothéliales normoxiques de manière à vérifier si l'hypoxie stimule bien la libération de facteurs capables de moduler la synthèse des métalloprotéinases matricielles.

La figure C21 illustre les zymogrammes réalisés en prenant le milieu d'incubation des cellules musculaires lisses ensemencées aux quatre densités cellulaires et incubées en présence des différents milieux conditionnés par les cellules endothéliales.

Après analyse quantitative de la synthèse de la MMP9 (Figure C22) et de la MMP2 (Figure C23), il ne semble pas que les milieux conditionnés par les cellules endothéliales hypoxiques contiennent les facteurs capables de moduler l'expression des métalloprotéinases matricielles. Cette expérience reste bien sûr à être confirmée.

#### II.2.6 Discussion

Les différentes pathologies vasculaires mènent à une hyperplasie intimale et à un épaississement de la paroi veineuse.

La prolifération ainsi que la migration des cellules musculaires lisses et l'accumulation de la matrice joueraient un rôle majeur dans cette hyperplasie (Clowes et al, 1983).

La dégradation de la matrice est régulée par des protéinases incluant les métalloprotéinases matricielles, les activateurs plasminogènes et leurs inhibiteurs. Nous avons donc étudié en détail la synthèse de certaines de
ces enzymes par les cellules musculaires lisses dans différentes conditions afin d'établir une relation entre l'expression des métalloprotéinases matricielles et la prolifération des cellules musculaires lisses.

Nous avons tout d'abord montré que les cellules musculaires lisses synthétisent effectivement des métalloprotéinases; en effet les bandes d'activité révélées par le zymogramme étaient inhibées par des inhibiteurs des métallo-protéinases matricielles mais pas par les inhibiteurs des -sérine ou -cystéine protéinases.

Ensuite par une analyse quantitative, nous avons comparé ces bandes aux étalons de manière à connaître leur poids moléculaire et identifié ces bandes qui ont respectivement 96 kd, 79 kd et 57 kd de poids moléculaire.

Ceux-ci correspondraient respectivement avec une différence de quelques unités, à la MMP9 sous la forme latente, la MMP2 sous sa forme inactive et à la MMP2 active.

Zempo et al (1994) ont également identifié les gélatinases de 72 kd et 92 kd à partir d'expériences réalisées sur des explants d'aortes de rat in vitro. Ces deux enzymes sont sécrétées sous forme de proenzymes inactives et activées par la plasmine (Nagase et al, 1990; Murphy et al, 1992).

Les MMP semblent jouer un rôle prépondérant dans le développement des lésions d'athérosclérose ou de resténose au sein des artères. Leur expression est induite et dans les plaques d'athérosclérose (Li et al, 1996) et dans les modèles animaux de resténose (Zempo et al, 1994).

Ces MMP seraient synthétisées par les CML et permettraient à ces cellules de dégrader la matrice extracellulaire qui les environne afin de pouvoir ensuite migrer dans l'intima et y proliférer. Les résultats de Bendeck et al (1994) montrent qu'effectivement les gélatinases sont impliquées dans l'activation des cellules musculaires lisses et dans le développement de la néointima. De plus, l'inhibition des MMP par des inhibiteurs synthétiques est capable d'inhiber la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses (Southgate et al, 1992; Woessner, 1991).

Si le rôle des MMP est bien établi dans les lésions artérielles, aucune étude n'a été publiée à ce jour en ce qui concerne leur rôle dans le développement des veines variqueuses. Les résultats préliminaires obtenus dans ce travail suggèrent que le bFGF inhiberait la synthèse des MMP par les cellules musculaires lisses. Ils restent cependant à être confirmés.

# CONCLUSION et PERSPECTIVES

: :

Les pathologies veineuses constituent une cause importante de mortalité dans nos pays industrialisés.

La prévalence de ces affections ne peut malheureusement qu'augmenter dans notre société occidentale, suite à notre mode de vie de plus en plus sédentaire.

De plus, des perturbations mécaniques, comme des insuffisances de valvules dont le rôle est d'empêcher le reflux veineux, et une forte pression sanguine dans les veines sont également associées à leur apparition.

La station debout prolongée est un facteur épidémiologique important qui est corrélé à l'apparition de ces maladies et qui produit une stase veineuse. Celle-ci entraîne une diminution de l'apport en O<sub>2</sub> aux tissus ou ischémie. Il a été montré que suite à cette hypoxie, la paroi vasculaire subit un réarrangement global et principal au niveau de la média. En effet, si l'endothélium reste intact, les cellules musculaires lisses de la média passent d'un état synthétique à un état contractile, elles prolifèrent et se caractérisent par une synthèse accrue des constituants de la matrice extracellulaire. Cette prolifération suivie d'une migration de la média vers l'intima conduit à un épaississement et à une désorganisation de la synthèse cellulaire de la paroi veineuse.

Afin d'étudier les différents mécanismes qui sont responsables de telles pathologies, il était intéressant de développer un modèle où l'on pouvait suivre in vitro les caractéristiques métaboliques des deux phénotypes des cellules musculaires lisses.

Ces deux phénotypes furent obtenus expérimentalement en repiquant les cellules à quatre densités différentes: deux faibles densités de 1600 et 8000 cellules/cm<sup>2</sup> et deux densités élevées de 20 000 et 30 000 cellules/cm<sup>2</sup> pour les cellules contractiles.

Afin de caractériser biochimiquement ces deux phénotypes, nous avons suivi la prolifération cellulaire et la synthèse protéique en fonction des différentes densités et avons observé que plus les cellules sont différenciées, moins elles synthétisent de protéines.

Cette différence s'explique par le fait qu'à faible densité, les cellules prolifèrent et sont dans un état synthétique; on trouve dans leur cytoplasme des organites de synthèse en abondance, tels que les ribosomes, les RER, des complexes de Golgi.

Alors qu'à forte densité, les cellules atteignent rapidement la confluence, elles se différencient en cellules contractiles. Elles expriment alors de fins filaments d'actine et des filaments épais de myosine mais perdent par contre les organites de synthèse. Nous avons ensuite voulu vérifier qu'en plus de l'activité mitogénique, la PGF2 $\alpha$  et le bFGF pouvaient aussi induire la modulation phénotypique. Les expériences de Michiels et al (1994), ont montré qu'à une concentration de 3,6 x 10<sup>-9</sup>, la PGF2 $\alpha$  était capable d'augmenter la synthèse d'ADN des cellules musculaires lisses et ce en synergie avec le bFGF.

Nous avons alors suivi l'évolution de la synthèse protéique en présence de ces molécules. Nos résultats ont montré que ces facteurs étaient capables d'inhiber la synthèse protéique. En parallèle, l'influence des milieux conditionnés par les cellules endothéliales incubées sous hypoxie a également été étudiée: il semblerait que les milieux conditionnés par les cellules endothéliales incubées sous hypoxie contiennent un ou des facteurs capables d'inhiber la synthèse protéique par les CML .Par contre, il n'y avait pas de différence d'effet entre le milieu HBSS et les milieux conditionnés en normoxie.

Nos expériences indiquent donc que l'exposition sous hypoxie des cellules endothéliales pourrait induire la synthèse de facteurs mitogènes principalement la  $PGF_{2\alpha}$  et le bFGF, qui seraient responsables de la prolifération des cellules musculaires lisses in vivo dans les pathologies veineuses. Par contre, ces mitogènes ne semblent pas être capables d'induire la modulation phénotypique. Ils ont plutôt un effet inhibiteur sur la synthèse protéique. La modulation phénotypique serait donc induite dans un premier temps par d'autres molécules dont l'origine est encore inconnue et ensuite la  $PGF_{2\alpha}$ , le bFGF libérés par les cellules endothéliales seraient responsables de la prolifération des cellules musculaires lisses de la média entraînant un épaississement de la paroi.

Nous avons également montré quantitativement par incorporation de proline radioactive que les cellules musculaires lisses synthétiques synthétisaient plus de collagène que les cellules musculaires lisses contractiles.

Sous l'influence de la  $PGF_{2\alpha}$  et du bFGF, la synthèse de collagène est différemment modulée. La  $PGF_{2\alpha}$  augmente la synthèse de collagène par les cellules musculaires lisses tandis que le bFGF la diminue: il y a donc un effet différentiel de la  $PGF_{2\alpha}$  sur la synthèse de collagène par rapport à la synthèse totale de protéines.

D'autre part, nos expériences ont mis en évidence que les CML libéreraient des métallo-protéinases matricielles. Il s'agit de la MMP9 et de la MMP2. Ces protéines sont toutes deux des gélatinases ou collagénases IV qui sont capables de digérer la membrane basale qui entoure la cellule. Elles participeraient donc à la migration des CML de la média vers l'intima.

Cette migration est la première étape d'un processus pathologique qui, sous l'influence de facteurs de croissance par exemple libérés par les CE activées par la stase veineuse, conduit à la prolifération des CML.

Pour migrer et proliférer les CML doivent se dédifférencier d'un état contractile à un état synthétique. Nos résultats ont montré que dans cet état de synthèse, les CML sont capables de synthétiser des protéines et plus particulièrement du collagène en grande quantité. Leur prolifération en conjonction avec le dépôt de composants de la matrice extracellulaire conduit finalement.outre la désorganisation de la paroi veineuse.à un épaississement de cette paroi qui se situe selon les études histologiques réalisées par Bouaziz (1995) dans la couche supérieure de la média et L'identification des facteurs responsables de cette dans l'intima. modulation reste à découvrir même si les résultats de ce travail pourraient indiquer que la  $PGF_{2\alpha}$  reste un bon candidat. Des expériences complémentaires notamment concernant la synthèse d'autres composants de la matrice extracellulaire pourraient apporter les renseignements à cet égard.

Une connaissance approfondie des mécanismes régulant les fonctions des CML dans les maladies veineuses est non seulement intéressante si l'on veut comprendre comment les veines variqueuses se développent mais également essentielle dans le but de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques plus efficaces.

# TIHTIOERATHIE

: :

# **E. BIBLIOGRAPHIE**

\* Acher O., Rettori R. Phlébologie N° 2, Avril/Juin 1987.

#### \* Arnould T., Michiels C., Alexandre I., Remacle J. Effect of hypoxia upon intracellular calcium concentration of human endothelial cells. J.Cell. Physiol., 152: 215-21 (1992)

\* Arnould T., Michiels C., Janssens D., Delaive E., Remacle J. Hypoxia induces PMN adherence to umbilical vein endothelium. Cardiovasc. Res., 30:1009-1016(1995)

#### \* Bendeck M.P., Zempo N., Clowes AW., Galardy R.E, Reidy MA.

Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat. Circul. Res., 75: 539-545 (1994)

#### \* Benditt E.P., Benditt J.M.

Evidence for a monoclonal origin of human atherosclerotic plaques. Proc. Nat. Acad. Sci., 70: 1753-1756 (1973)

#### \* Berna N.

Caractérisation phénotypique des cellules musculaires lisses et modulation par les cellules endothéliales de la synthèse de collagène. Mémoire de licence, 1994

# \* Bonnel F., Claustre J.L.

Phlébologie n°2, 213-219, Avril/Juin 1987

#### \* Borel J.P., Monboisse J.P., Bellon G.

Inflammation, collagène et radicaux libres oxygénés. Médecine / Sciences, 4: 304-10 (1988)

#### \* Bouaziz N.

Effets de l'hypoxie sur l'adhérence des neutrophiles à l'endothélium des veines saphènes : rôle dans le développement des veines variqueuses. Mémoire de licence, 1995

#### \* Capron L.

Croissance normale et pathologique du muscle lisse artériel. Arch. Mal. Coeur, 84(1): 15-24 (1991)

- \* Carnes W.H., Abraham P.A., Buonassisi V. Biosynthesis of elastin by an endothelial cell culture. Biochem. Biophy. Res. Comm, 90: 1393-1399 (1979)
- \* Carpentier P., Priollet P. Etat de l'art sur l'insuffisance veineuse chronique. Presse Médicale, 1994, 23:203-205 (1994)
- Chabrier P.E., Gillard V., Roubert P., Braquet P. L'endothéline: une nouvelle famille de peptides vasoactifs. Sang Thrombose Vaisseaux, 3: 349-54 (1991)
- \* Chamley-Campbell J., Campbell G.R., Ross R. The smooth muscle cells in culture Physiol.rev. 59:1-61 (1979)
- \* Charles A., Gresham G.A.

Histopathological changes in venous grafts and in varicose and non varicose veins. J. Clin. Pathol., 46: 603-6 (1993)

#### \* Clowes A.W., Reidy M.A., Clowes M.M.

Kinetics of cellular proliferation after arterial injury : smooth muscle growth in the absence of endothelium. Lab. Invest., 49: 327-333 (1983)

#### \* Coon W.W., et coll.

Health study circulation, 48: 839-846 (1973)

#### \* Darnell, Ladish, Baltimore.

Biologie moléculaire de la cellule. 2ème édition. De Boeck Unervisité (1993)

#### \* De Leener F.

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

Mémoire de licence, 1992

#### \* Fajardo L.F.

The complexity of endothelial cells. Am. J. Clin. Pathol., 92: 241-250 (1989)

#### \* Ferns GAA., Raines EW, Sprugel K.H., Montani AS., Reidy MA., Ross R.

Inhibition of neointimal smooth muscle cell accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF. Science, 253: 1129-1132 (1991)

\* Furchgott R.F., Zawadski J.V.

The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature, 288: 373-376 (1980)

\* Gibbons G., Dzan V.

Endothelial function in vascular remodeling. In:The endothelium.warren J.B London: Willey Liss: 81-93(1990)

\* Goldman R.D., Knipe D.M.

Functions of cytoplasmic fibers in non-muscle cell motility. Cold Spring Harbor Symp.Quant. Biol., 37: 523-534 (1973)

\* Griffith T. M., Edwards D. H., Lewis M. J., Newby A. C., Henderson A. H.

The nature of endothelium - derived vascular relaxant factor. Nature, 308: 645-7 (1984)

#### \* Hassel J.R., Kimura J.H., Hascall V.C.

Proteoglycan cure protein families. Ann. Rev.Biochem., 55: 539-567 (1986)

#### \* Haust M.D., More R.H.

The thrombotic basis of atherosclerosis. Heart Bull., 9: 90-92 (1960)

- \* Heasman J., Hynes R.O., Swan A.P., Thomas V., Wylie C.C. Primordial germ cells of xenopus embryos: the role of fibronectin in their adhesion during migration. Cell, 27: 437-447 (1981)
- \* Heinegard D., Oldberg A. Structure and biology of cartilage and bone matrix non collagenous macromolécules. FASEB J., 3: 2042-2045 (1989)
- \* Henderson A.H. Endothelium in control. Br. Heart J., 65: 116-125 (1991)
- \* Henney AM, Wakeley PR, Davies MJ., Foster K., Hembry R., Murphy G., Humphries S. Localization of stromelysin plaques by in situ hibridization. Proc. Nat. Acad. Sci., 88: 8154-8158 (1991)
- \* Hitchcock S.E. Regulation of motility in nonmuscle cells.

J.Cell.Biol., 74: 1-15 (1977)

\* Holderbaum D., Ehrhast L.A. Exp.Cell Res., 153: 16-24 (1984)

#### \* Hüttner I., Kocher O., Gabbiani V.

Les constituants cellulaires de la paroi artérielle. In: Camilleri J.P., Becy C.L., Fiessinger J.N., Bariéty J. Les maladies de la paroi artérielle, Paris: Médecine / Sciences Flammarion, 3-30 (1987)

#### \* Jawien A., Bowen-Pape DF., Lindner V., Schwartz SM., Clowes AA.

Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle cell migration and intimal thickening in a rat model of balloon angio-plasty.

J. Clin. Invest., 89: 507-511 (1992)

#### \* Jenkins G.M., Crow M.T., Bilato C., Li Z., Ryu W.S., Nater C., Froehlich J., Lahatta E.G., Cherg L.

The role of MMP-2 in neointima formation following balloon injury in the rat. FASEB J., 8-51 (1994)

\* Jaffe E.A., Nachman R.L., Bekcer C.G., Minich C.R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. J.clin. Invest., 52: 2745-2756 (1973)

#### \* Karrer H.E.

An electron microscope study of the aorta in young and aging mice. J.Ultrastruct. Res., 5: 1-27 (1961)

## \* Kimes B.W., Brandt B.L.

Characterization of two putative smooth muscle cell lines from rat thoracic aorta. Exp. Cell Res., 98: 349-366 (1976)

#### \* Lee E., Grodzinsky A.J., Libby P., Ckinton S.K., Lark M.W., Lee R.T.

Human vascular smooth muscle-cell-monocyte interactions and metalloproteinase secretion in culture.

Arteriosclerosis Thromb. Vasc. Biol., 15: 2284-2289 (1995)

#### \* Leloup R.

Cours d'histologie médicale. FUNDP Namur \* Lindner V., Lappi D.A., Baird A., Majack R.A., Reidy M.A. The role of basic fibroblast growth factor in vascular lesion formation. Circ.Res., 68: 106-113 (1991)

#### \* Luft J.H.

Fine structure of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium.

Fed. Proc., 25: 1173-1183 (1966)

#### \* Madir J.A., Williams S.K.

Capillary endothelial cells cultures. Phenotypic modulation by matric components. J.Cell. Biol., 97: 153-165 (1983)

\* Madir A.

La pathologie veineuse. VASA 15(2): 126-134 (1986)

#### \* Matrisian L.M.

The matrix-degrading metalloproteinases. Bio Essays, 14: 455-463 (1992)

#### \* Mc Nutt N.S., Culp L.A., Black P.H.

Contact-inhibited vertebrate cell lines isolated from SV-40 transformed cells. J. Cell Biol., 50: 691-708 (1971)

#### \* Michiels C., Arnould T., Houbion A. Remacle J.

Human endothelial cells submitted to hypoxia reoxygenation: implication of free radicals, xanthine oxidase and energy deficiency. J.Cell.Physiol., 153: 53-61 (1992)

- \* Michiels C., Arnould T., Knott I., Dieu M. and Remacle J. Stimulation of prostaglandin synthesis by human endothelial cells exposed to hypoxia. Am. J. Physiol., 264: 866-874 (1993)
- \* Michiels C., De Leener F., Arnould I., Dieu M. and Remacle J. Hypoxia stimulates human endothelial cells to release smooth muscle cell mitogens: role of prostaglandins and bFGF. Exp. Cell Res., 13: 43-54 (1994)

#### Michiels C., Arnould T., Remacle J.. Rôle-clé de l'hypoxie et des cellules endothéliales dans le développement des veines variqueuses. Médecine/Sciences, 10: 845-853 (1994)

- Michiels C., Arnould T., Knott I., Dieu M., Remacle J. Stimulation of prostaglandin synthesis by human endothelial cells exposed to hypoxia. Am. J. Physiol., 264: 866-874 (1993)
- \* Moncada W.H., Vane J.

Pharmacology and endogenous role of prostaglandin, endoperoxides, thromboxane A<sub>2</sub> and prostacyclin. Pharmacol Rev., 30: 293-331 (1979)

#### \* Montefort S., Holgate S.T.

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

#### \* Moore S.

Endothelial injury and atherosclerosis. Exp. Mol. Pathol., 31: 182-190 (1979)

#### \* Moscatelli D., Rifkin D.B.

Membrane and matrix localization of proteinase : a common theme in tumour cell invasion and angiogenesis. Biochim. Biophys. Acta., 948: 67-85 (1988)

#### \* Mosesson M.W., Umfleet R.A.

The cold-insoluble globulin of human plasma: purification, primary characterisation and relationship to fibrinogen and other coldinsoluble fraction components. J. Biol. Chem., 245: 5728-5736 (1970)

#### \* Murphy G., Atkinson S., Ward R., Gavrilovic J, Reynolds J.J.

teynolas J.J.

The role of plasminogen activators in the regulation of connective tissue metalloproteinases.

Ann. NY Acad. Sci., 667: 1-12 (1992)

#### \* Nagase H., Enghild J.J., Suzuki K., Salveson G.

Stepwise activation mechanisms of the precursor of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) by proteinases and (4-aminophenyl) mercurie acetate.

Biochemistry, 29: 5783-5789 (1990)

#### \* Niebes P.

In: New trends in venous diseases, vol I. Bern: Hens Hubert Publishers; 223 (1977) \* Nikkari S.T., Jarvelainem H.T., Wight T.N., Fergusson M., Clowes A.W.

Smooth muscle cell expression of extracellular matrix genes after arterial injury

Am J Pathol, 144: 1348-1356 (1994)

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

#### \* Owens R.J., Kornbliktt A.R., Baralle F.E.

Fibronectin, the generation of multiple polypeptides from a single gene.

In Oxford Surveys on Entraryotic genes, vol.3, p 141-160 (1986) Oxford University Press. Boston, Massachussetts.

### \* Palombo J.D., Blackburn G.L., Armour Forse R.,

Endothelial cell factors and response to injury. Surg., Gynecol. Obstetrics, 173: 505-518 (.1991)

#### \* Parsons D.F., Subjeck J.R.

The morphology of the polysaccharide coat of mammatian cells. Biochim.Biophys. Acta, 265: 85-113 (1972)

- \* Paule W.J.
  Electron microscopy of the newborn rat aorta.
  J. Ultrastruct. Res., 8: 219-235 (1963)
- \* Pauly R.R., Passaniti A., Bilato C., Monticone R., Cheng L, Papadopoulos N., Gluzband Y.A., Smith L., Weinsterin C., Lahatta E.G., Crow M.

Migration of cultured vascular smooth muscle cells through a basement membrane barrier requires type IV collagenase activity and is inhibited by cellular differenciation. Circ. Res., 75: 41-54 (1994)

#### \* Pease D.C., Paule W.J.

Electron microscopy of elastic arteries. The thoracic aorta of the rat. J. Ultrastruct. Res., 3: 469-483 (1960)

 \* Pepper M.S., Belin D, Montesano R., Orei I., Vassalli J.D. Transforming growth factor-α, modulates basic fibroblast growth factor-induced proteolytic and angiogenic properties of endothelial cells in vitro.

J. Cell Biol., 111: 743-755 (1990)

#### \* Piper H.M.

Energy deficiency, calcium overload or oxidative stress: possible causes of irreversible ischemic myocardial injury. Klin.Wochenschr., 67: 465-76 (1989)

#### \* Priollet P.

Insuffisance veineuse chronique. Aspects cliniques. La Presse Médicale, 23 (1994) Paris

#### \* Rawn D.J.

Traité de biochimie. De Boeck Université, Bruxelles, 1990

#### \* Reidy M.A., Schwartz S.M.

Endothelial regeneration, III: time course of intimal changes after small defined injury to the rat aortic endothelium. Lab.Invest., 44: 301-308 (1981)

#### \* Ross R.

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

#### \* Ross R.

The pathogenesis of atherosclerosis An update. N. Engl. J. Med., 314: 293-311 (1986)

#### \* Ross R.

The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. Nature, 362: 801-809 (1993)

#### \* Ross R., Klebanoff S.J.

The smooth muscle cell. In vivo synthesis of connective tissue proteins.

J; Cell. Biol., 50: 159-171 (1971)

#### \* Rubbia L, Gabbiani G.

Phénotype des cellules musculaires lisses artérielles et athérosclérose.

Médecine / Sciences, 5: 389-95 (1989)

#### \* Sawaya R.

Induction of tissue-type plasminogen activator and 72-k Da type IV collagenase by ionizing radiation in rat astrocytes. Int.J. Cancer, 56: 214-218 (1994)

#### \* Schwartz S.M., Campbell G.R., Campbell J.H.

Replication of smooth muscle cells in vascular disease. Circ.Res., 58: 427-44 (1986) \* Sjölund M., Madsen K., Von der Mark K., Thyberg J. Phenotype modulation in primary cultures of smooth muscle cells from rat aorta synthesis of collagen and elastin. Differenciation, 32: 173-180 (1986)

#### \* Small J.V.

The contractile apparatus of the smooth muscle cells. Structure and composition.

In: Biochemistry of smooth muscle, edited by N.L. Stephens. London: University Park Press, P. 379-411 (1977)

- \* Somlyo A.P., Devine R.E., Somlyo A.V., Rice R.V. Filament organization in vertebrate smooth muscle. Philos. Trans.R.Soc.London Ser. B265: 223-229 (1973)
- \* Southgate K.M., DaviesM., Booth R.F.G., Newby A.C Involvement of extracellular-matrix-degrading metalloproteinases in rabbit aortic smooth-muscle cell proliferation. Biochem J., 288: 93-99(1992)
- \* Tada T., Reidy M.A.

Endothelial regeneration, IX: arterial injury followed by rapid endothelial repair induces smooth-muscle-cells proliferation but not intimal thickening. Am. J. Pathol., 129: 429-433 (1987)

- \* Thomas M.L. Phlebology of the lower limb Churchill Livingstone. London (1982)
- \* Thyberg J., Nilsson J., Palmberg L., Sjölund M. Adult human arterial smooth muscle cells in primary culture: modulation from contractile to synthetic phenotype. Cell Tissue Res., 239: 69-74 (1985)
- \* Van der Rest M., Garrone R. Collagen family of proteins. FASEB J., 5: 2814-2823 (1991)
- \* Welgus H.G., Campbell E.J., Cury J.D., Eisen A.Z., Senior R.M., Wilhelm S.M., Goldberg G.I.

Neutral MP produced by human mononuclear phagocytes: enzyme profile, regulation, and expression during cellular development. J. Clin. Invest., 86: 1496-1502 (1990)

\* Woessner J.F.

Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. FASEB J., 5: 2145-2154 (1991) \* Yamamoto M., Fujita K., Shinkai T., Yamamoto K., Noumura T.

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

- \* Zempo N., Kenagy R.D., Tina Au Y.P., Bendeck M., Clowes M. M., Reidy M.A., Clowes A.W., Wash S. Matrix metalloproteinases of vascular wall cells are increased in balloon-injured rat carotid artery. J. Vasc. Surgery, 20: 209-217 (1994)
- \* Zhile L., Ling L., Zielke H.R., Cheng L., Ruiping Xiao, Crow M.T., William G., Stetler-Stevenson, Froehlich J., Lakatta E.G.

Increased expression of 72nd type IV collagenase (NMP-2) in human aortic atherosclerotic lesions. Am. J. Pathol., 148:121-128 (1996)

\* "La Pathologie Veineuse".
 Euthérapie Benelux