



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Etude de la réponse des cellules endothéliales à l'hypoxie comme modèle in vitro de néo-angiogenèse

Mbusu Ombeya, Nadine

Award date:
2003

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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



FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

**Etude de la réponse des cellules endothéliales à l'hypoxie comme modèle
in vitro de néo-angiogenèse**

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

Nadine Mbusu Ombeya

Juin 2003

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 – 5000 NAMUR
Téléphone : + 32(0)81.72.44.18. – Téléfax : + 32(0)81.72.44.20.
E-mail : joelle.jonet@fundp.ac.be – <http://www.fundp.ac.b/fundp.html>

Etude de la réponse des cellules endothéliales à l'hypoxie comme modèle in vitro de néo-angiogénèse

Mbusu Ombeya Nadine

Résumé

Le processus d'angiogénèse, permettant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir des vaisseaux préexistants, est un mécanisme nécessaire à la croissance tumorale. Ce processus est initié par différents médiateurs libérés à partir des cellules tumorales situées au centre de la tumeur où des conditions hypoxiques se développent. Ces cellules répondent à l'hypoxie en activant le facteur de transcription HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor-1) augmentant ainsi l'expression de gènes cibles dont le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Le VEGF active alors les cellules endothéliales des capillaires adjacents, induisant leur prolifération, leur migration et la formation de nouveaux capillaires qui viendront irriguer la tumeur.

Si la réponse des cellules tumorales à l'hypoxie commence à être bien connue, celle des cellules endothéliales l'est beaucoup moins. Le but de ce mémoire était donc d'étudier comment l'hypoxie peut moduler la réponse angiogénique des cellules endothéliales au VEGF.

Dans la première partie, nous avons montré que les cellules HUVEC-C (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) répondent à l'hypoxie en activant HIF-1 : on observe bien une accumulation de la sous-unité HIF-1 α en hypoxie dès 4heures d'incubation.

Dans la seconde partie, l'effet de l'hypoxie sur différents processus angiogéniques suite à l'activation des cellules endothéliales a été étudié. Nous avons ainsi montré que les cellules HUVEC-C expriment bien le récepteur au VEGF, KDR et que l'hypoxie ne modifie pas cette expression. Par contre, l'hypoxie semble potentialiser l'effet pro-prolifératif du VEGF : on observe une augmentation en hypoxie de l'incorporation de thymidine tritiée et de l'activation du facteur de transcription AP-1 induites par le VEGF par rapport à des cellules maintenues en normoxie. L'hypoxie peut également augmenter l'expression des intégrines α_v et β_3 à la surface des HUVEC-C.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'hypoxie peut effectivement jouer un rôle dans la mise en place du phénotype pro-angiogénique des cellules endothéliales.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2003

Promoteur : C. Michiels

Liste des abréviations

[³ H]-thymidine	Thymidine tritiée
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADP	Adénosine Diphosphate
aFGF	acid Fibroblast Growth Factor
Ahr	Aryl hydrocarbon receptor
Ang	Angiopoïétine
AP-1	Activated Protein-1
ARNT	Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adénosine Triphosphate
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
bHLH	basic Helix Loop Helix
BSA	Bovine Serum Albumine
Ca ²⁺	Calcium
CML	Cellule Musculaire Lisse
CO ₂	gaz carbonique
cpm	coup par minute
CTL	Contrôle
EDTA	acide éthylènediaminetétraacétique
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay
eNOS	endothelial Nitric Oxide Synthase
EPO	Erythropoïétine
ERK	Extracellular Regulated Kinase
ET-1	Endothéline-1
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
flt-1	fms-like tyrosine kinase
FMN	Flavine Monucléotide
GLUT	Glucose Transporter
Hepes	Hydroxyethyl piperazine-ethane sulfonic acid
HIF-1	Hypoxia-Inducible Factor 1
HIF-PH	HIF- α Propylhydroxylase
HLH	Helix Loop Helix
hMEC-1	Human Microvascular Endothelial Cells-1
HPTF	HIF-1 α Proteasome Targeting Factor
HRE	Hypoxia-Responsive Element
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IL	Interleukine
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase
kDa	kiloDalton
KDR	Kinase Containing Receptor
LDH	Lactate Déshydrogénase
LDL	Low Density Lipoprotein
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEC	Matrice Extracellulaire
MMP	Matrix Metalloprotéinase
MOPS	acide 3-morpholino-propanesulfonique

NAD ⁺	Nicotinamide Adénosine (forme oxydée)
NADPH	Nicotinamide Adénine Diphosphate
NOS	Nitric Oxide Synthase
O ₂	Oxygène
ODD	Oxygen-Dependent Degradation Domain
PAI	Plasminogen Activator Inhibitor
PAS	Per-ARNT-Sim
PBS	Phosphate Buffer Saline
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PECAM	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
PFA	Paraformaldéhyde
PGI ₂	prostacycline
pH	potentiel hydrogène
PKB	protéine kinase B
PIGF	placental growth factor
PNPP	phospho-nitrophényl phosphate
PVDF	difluorure de poly vinylidène
pVHL	Protéine de Von Hippel Lindau
rpm	rotation par minute
RT	température ambiante
TAD-C	domaine de transactivation C-terminal
TAD-N	domaine de transactivation N-terminal
TBS	Tris Buffer Saline
TCA	acide trichloroacétique
TEMED	N, N, N'-tétra-méthyl-éthylène diamine
TGF	Transforming Growth Factor
TIMPs	Tissue Inhibitor of MMPs
TNF	Tumor Necrosis Factor
t-PA	Tissue Plasminogen Activator
TSP	Thrombospondin
u-PA	urokinase Plasminogen Activator
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
vWF	Facteur de von Willebrand

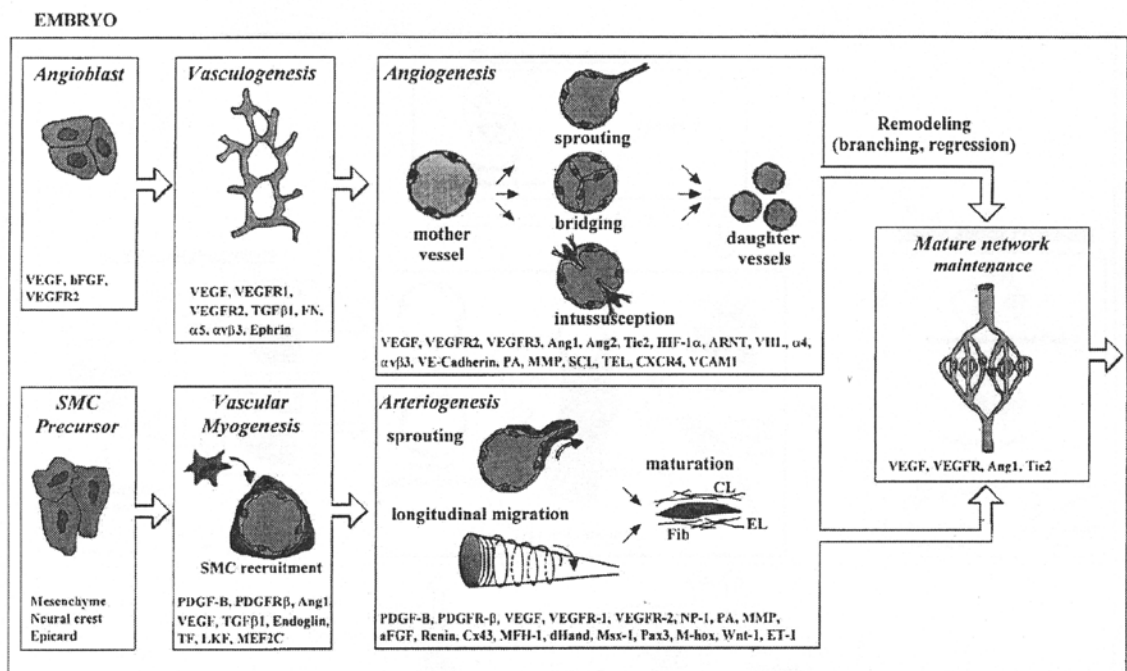


Figure I.1 : Schéma général de la vasculogénèse et de l'angiogénèse.

Dans l'embryon, les angioblastes s'assemblent en un réseau primitif (vasculogénèse) qui s'étend et subit un remodelage (angiogénèse). Les cellules musculaires lisses recouvrent les cellules endothéliales durant la myogénèse vasculaire et stabilisent les vaisseaux durant l'artériogénèse.

CL : collagène ; El : élastine ; Fib : fibrilline .

(d'après(Conway et al., 2001).

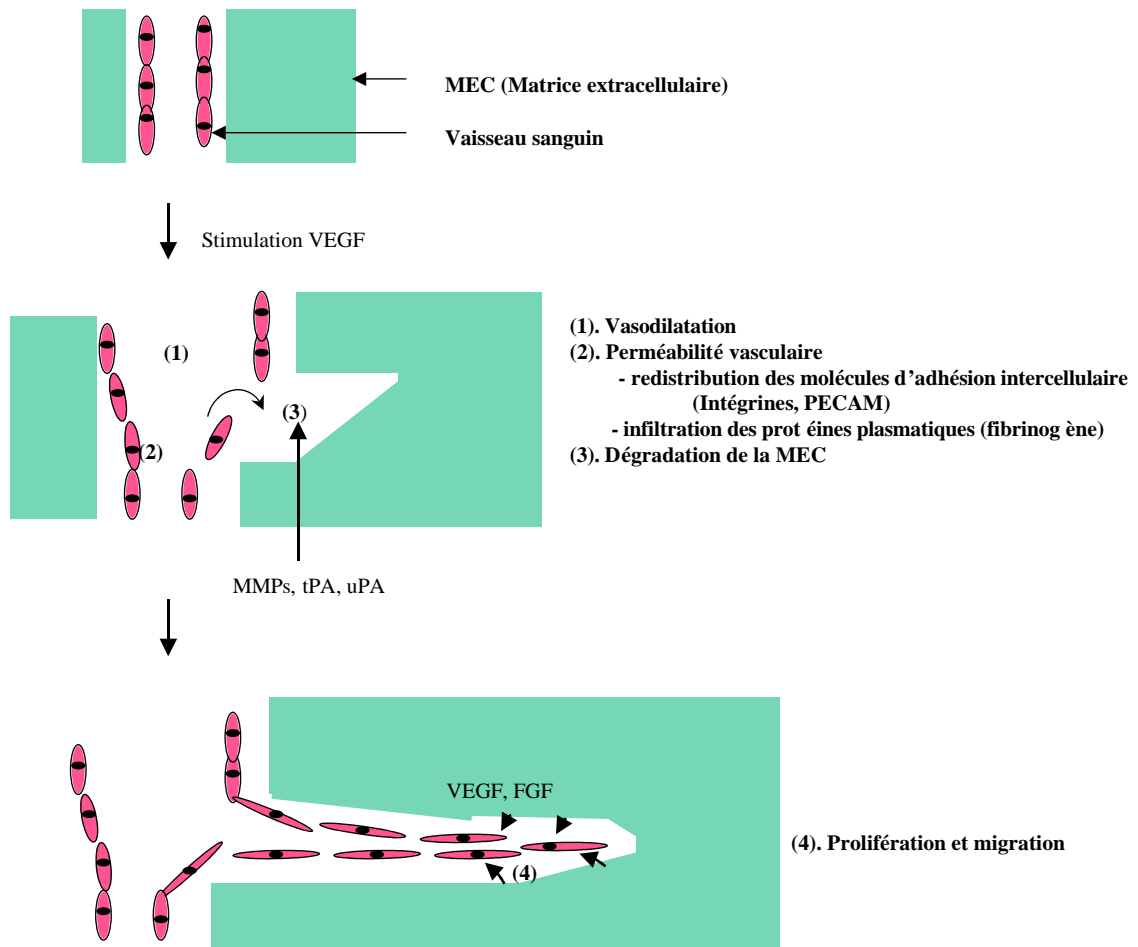


Figure I.2 : Représentation schématique de la physiologie de l'angiogenèse. Différentes étapes successives de l'angiogenèse.

- 1 : Vasodilatation
- 2 : Perméabilité vasculaire avec redistribution des molécules d'adhésion cellulaire et infiltration des protéines plasmatiques.
- 3 : Dégradation de la MEC par les MMP, tPA, uPA et préparation d'une "chambre d'accueil" pour les cellules migrantes.
- 4 : Prolifération et migration des cellules, libération de la MEC, des facteurs de croissance comme le VEGF, le FGF.

MMPs : métalloprotéases matricielles; tPA: activateur tissulaire du plasminogène; uPA : activateur urokinase de plasminogène.

QuickTime™ et un décompresseur TIFF (non compressé) sont requis pour visionner cette image.

Figure I.3 : Représentation schématique de la synthèse du NO.
Oxydation du L-Arginine -> N-hydroxylarginine -> citrulline + NO.
CAM : calmoduline ; FMN : Flavine Mononucléotide ; FAD : Flavine Adénine Dinucléotide.

Activateurs	Fonctions	Inhibiteurs	Fonctions
Membres de la famille du VEGF	stimuler l'angiogenèse, la vasculogenèse, la perméabilité	VEGFR-1, VEGFR-1 soluble	lien pour VEGF
VEGFR, NRP-1	intégrer les signaux de survie et les signaux angiogéniques	Ang2	antagoniste de A
Ang1 et Tie2	stabiliser les vaisseaux et inhiber la perméabilité	TIMP, inhibiteurs des MMPS	supprimer l'angi
PDGF-BB et récepteurs	recruter les CML	Angiostatine	supprimer l'angi
TGF-β1, récepteurs au TGF-β1	stimuler la production de la MEC		
FGF, MCP-1, HGF	stimuler l'angiogenèse, l'artériogenèse		
Intégrines av β3	récepteurs pour les macromolécules matricielles et les protéases		
VE-cadhérine, PECAM	molécules de jonction		
Ephrines	réguler la spécification artérielle/ veineuse		
MMP, Activateur du plasminogène	remodeler la MEC, libérer et activer les facteurs de croissance		
PAI-1	stabiliser les vaisseaux naissant		
NOS	stimuler l'angiogenèse et la vasodilatation		

Tableau I.1: Exemples d'activateurs et d'inhibiteurs de l'angiogenèse .

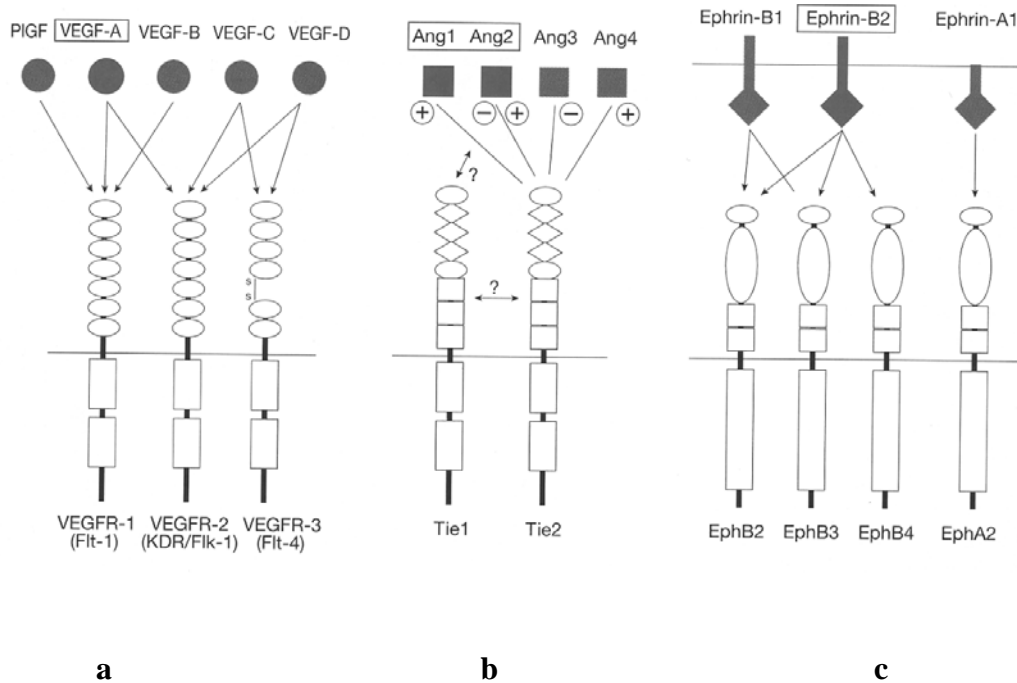


Figure I.4 : Représentation schématique des trois familles de facteurs de croissance impliqués dans l'angiogenèse et de leurs récepteurs.

a VEGF

b Angiopoïétines

c Ephrines

En **b**, les signes + et - indiquent respectivement si l'angiopoïétine particulière active ou inhibe le signaling intracellulaire du récepteur Tie2. Le ? indique une interaction potentielle qui n'a pas encore été confirmée expérimentalement (d'après (Yancopoulos et al., 2000)).

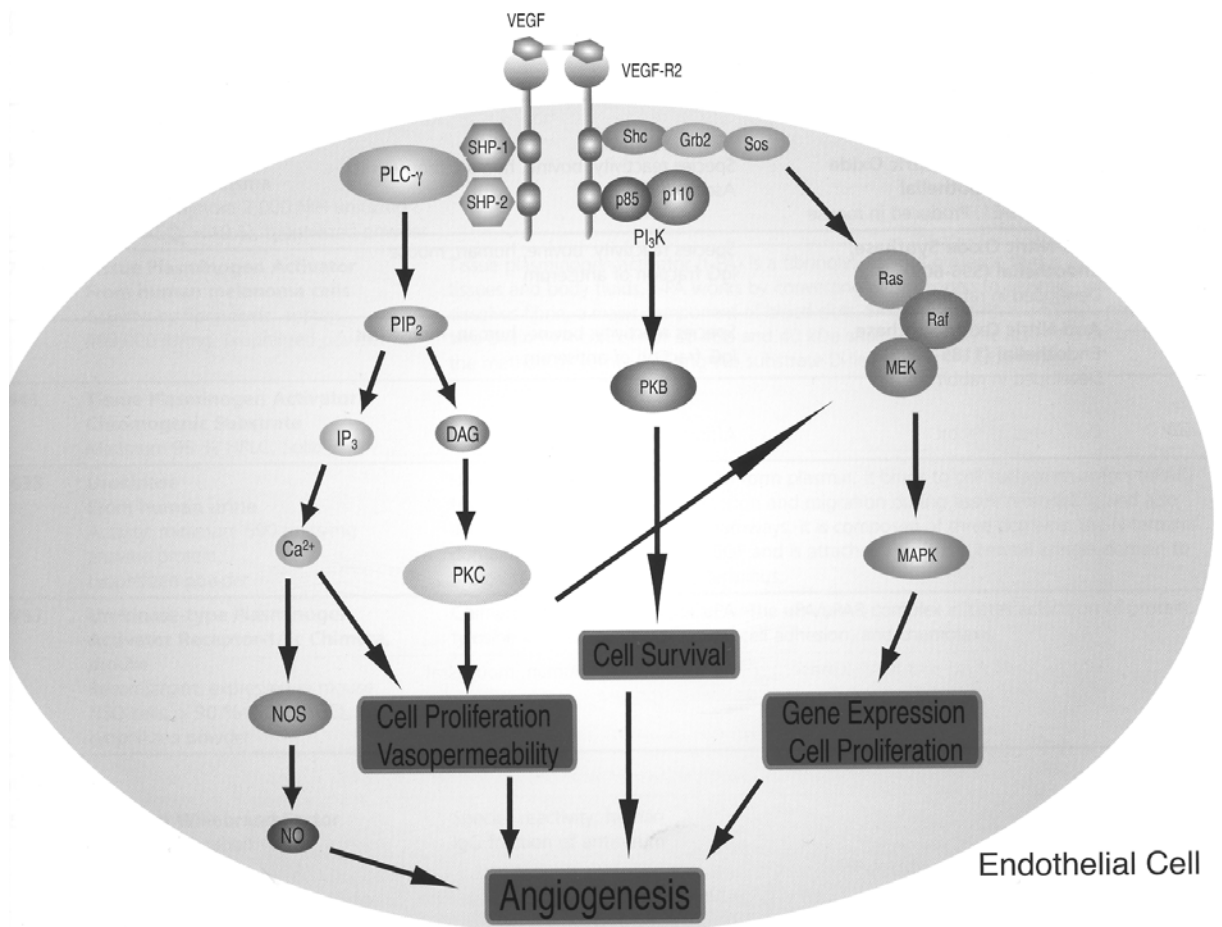


Figure I.5 : Les voies de transduction du signal activées par le VEGF.

Le VEGF régule plusieurs fonctions des cellules endothéliales incluant la prolifération, la survie cellulaire, la différenciation, la perméabilité et la production des molécules vasoactives.

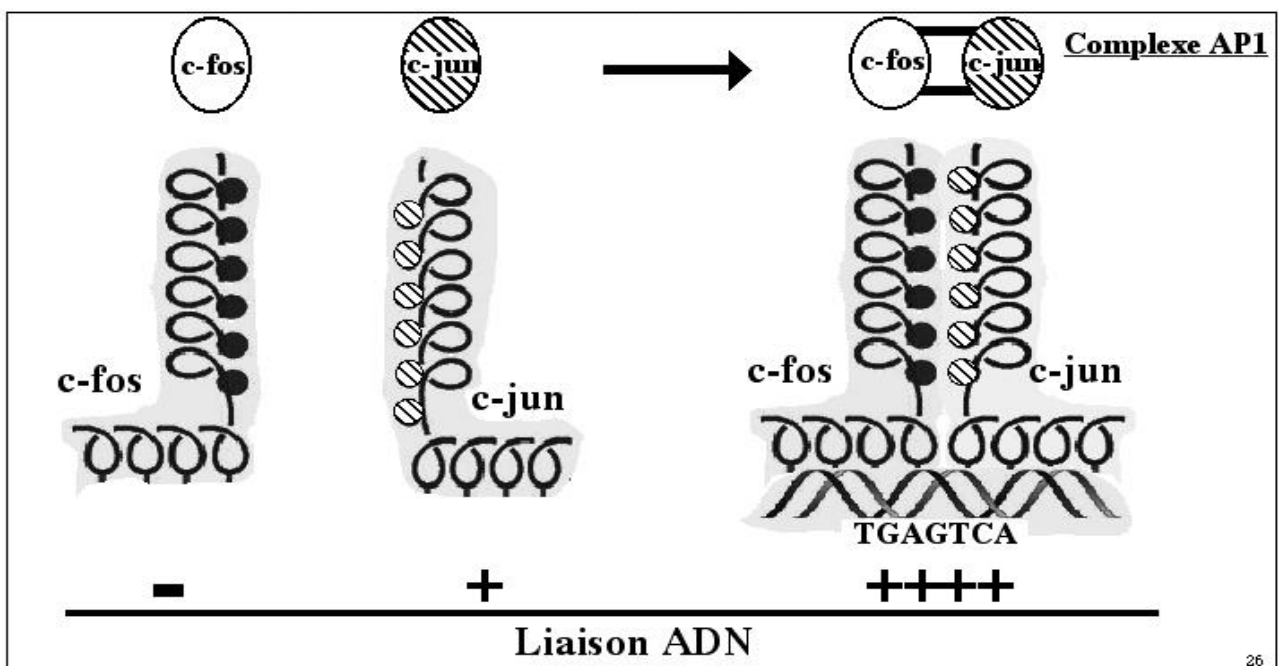


Figure I.6 : Formation du complexe AP-1.

L'association des deux domaines leucine Zipper de c-fos et c-jun produit un domaine de liaison à l'ADN de forte affinité.

Overview of the different MMPs and their substrates

Enzyme	MMP No.	Main substrates
Group I		
Matrilysin	MMP-7	Non-fibrillar collagen, gelatin, laminin, fibronectin, proteoglycans, proMMP-1, -9
Group II		
Interstitial collagenase	MMP-1	Fibrillar collagens (types I, II, III, VII, and X), proMMP-2, -9
Neutrophil collagenase	MMP-8	Fibrillar collagens
Collagenase-3	MMP-13	Fibrillar collagens
Stromelysin-1	MMP-3	Non-fibrillar collagen, gelatin, laminin, fibronectin, proteoglycans, proMMP-1, -9, -13
Stromelysin-2	MMP-10	Non-fibrillar collagen, gelatin, laminin, fibronectin, proteoglycans, proMMP-1
Stromelysin-3	MMP-11	Weak activity against non-fibrillar collagen, laminin, fibronectin
Metalloelastase	MMP-12	Elastin
(Unnamed)	MMP-19	Not known
Enamelysin	MMP-20	Amelogenin
Group III		
Gelatinase A	MMP-2	Gelatin, types IV, V, and I collagen, laminin, fibronectin, proMMP-9, -13
Gelatinase B	MMP-9	Gelatin, types IV and V collagen
Group IV		
MT1-MMP	MMP-14	proMMP-2, -13, gelatin, fibrillar collagens, laminin, fibronectin
MT2-MMP	MMP-15	proMMP-2, gelatin, fibrillar collagens, laminin, fibronectin
MT3-MMP	MMP-16	proMMP-2
MT4-MMP	MMP-17	Not known

Tableau I.2 : Les différents MMPs et leurs substrats (Liekens et al., 2001).

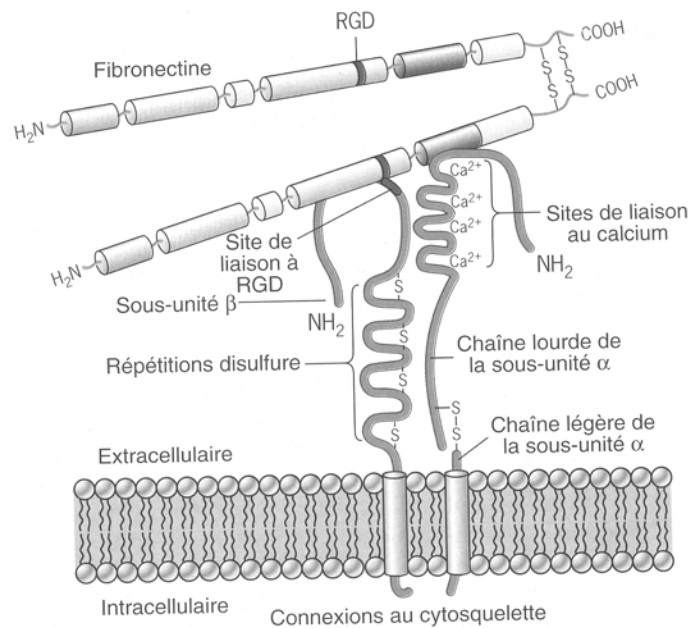


Figure 1.7 : Structure et fonctions des intégrines.

Représentation schématique d'un hétérodimère d'intégrine à la surface de la cellule. La plus grande partie de chaque sous-unité est localisée du côté extracellulaire de la membrane. La sous-unité β représentée ici possède le site de liaison RGD qui reconnaît la fibronectine et d'autres composants extracellulaires. Les ions calcium, nécessaires à l'activité de liaison des intégrines, s'unissent aux quatre motifs de liaison aux cations de la sous-unité α. Les deux sous-unités traversent la bicouche lipidique de la membrane via une seule hélice α (Karp, 1998).

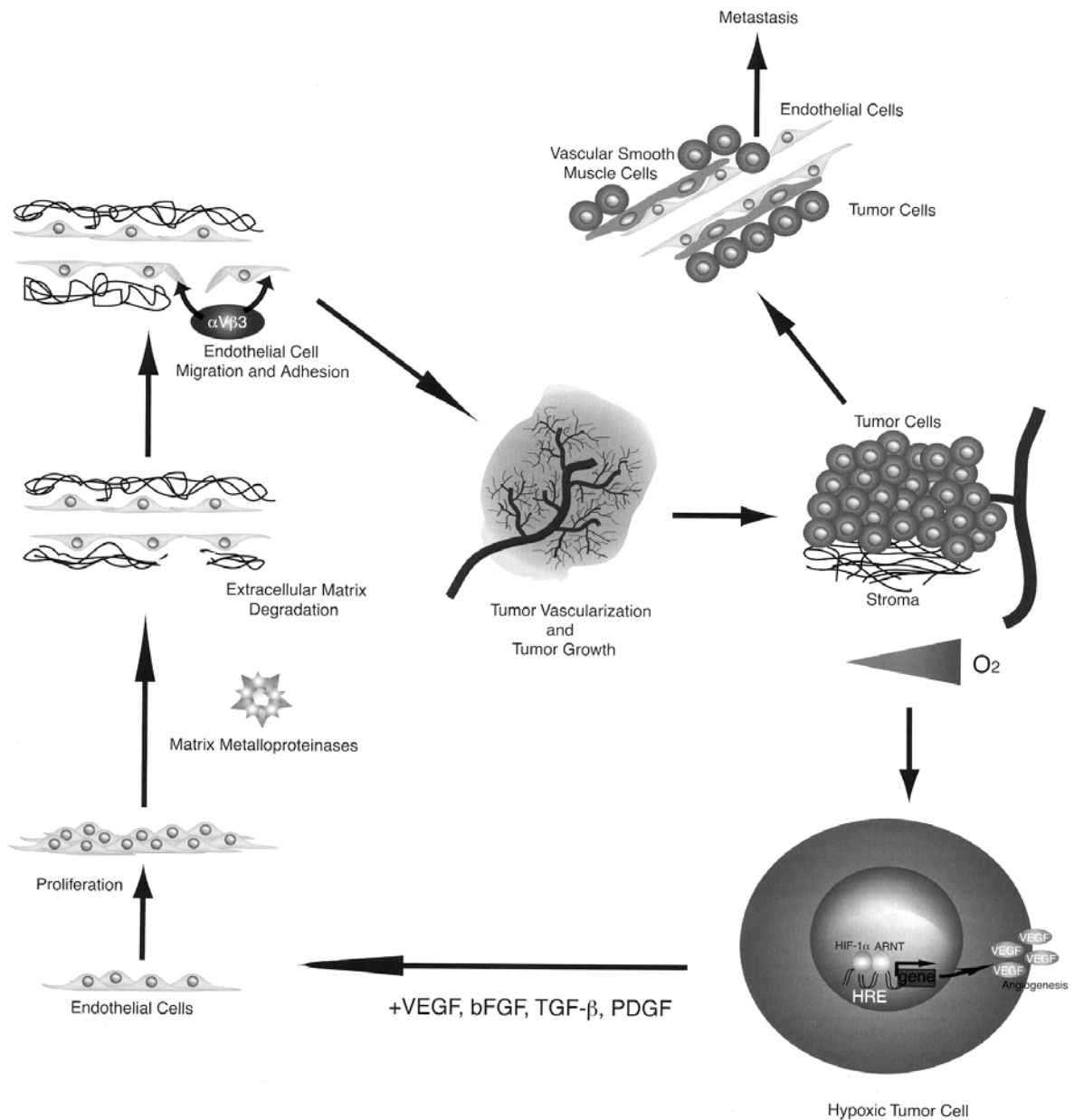


Figure I.8 : Événements conduisant à l'angiogenèse et au développement d'une tumeur.

Lorsque la tumeur atteint un volume de 1 mm^3 , les cellules éloignées de la limite de diffusion de l'oxygène deviennent hypoxiques. En réponse à cet environnement hypoxique, le facteur de transcription HIF-1 est activé. HIF-1 α s'accumule et est transloqué au niveau du noyau où il dimérise avec ARNT et permet la transcription des gènes cibles de HIF-1 parmi lesquels on retrouve le VEGF. La sécrétion de ce facteur de croissance permet l'initiation de l'angiogenèse, l'irrigation de la tumeur et donc le développement de celle-ci.

Fonctions des cellules endothéliales		
Maintenance de la perméabilité de la barrière endothéliale		
Sécrétion des molécules	anti-coagulantes	prostacycline thrombomoduline
	anti-thrombogènes	activateurs du plasminogène molécules héparine-like
Sécrétion de molécules thrombogènes	facteur de von Willebrand facteur tissulaire	
Production de la MEC	collagène protéoglycanes	
Régulation du flux sanguin et de la réactivité vasculaire	vasoconstricteurs	endothéline
	vasodilatateurs	NO
Régulation de l'inflammation et de l'immunité	IL-6, IL-8, IL-1 molécules d'adhésion	
Régulation de la croissance cellulaire	stimulateurs de croissance	FGF FGDF
	inhibiteurs de croissance	héparine TGF- β
Oxydation des LDL		

Tableau I.3 : Résumé des propriétés et fonctions des cellules endothéliales.

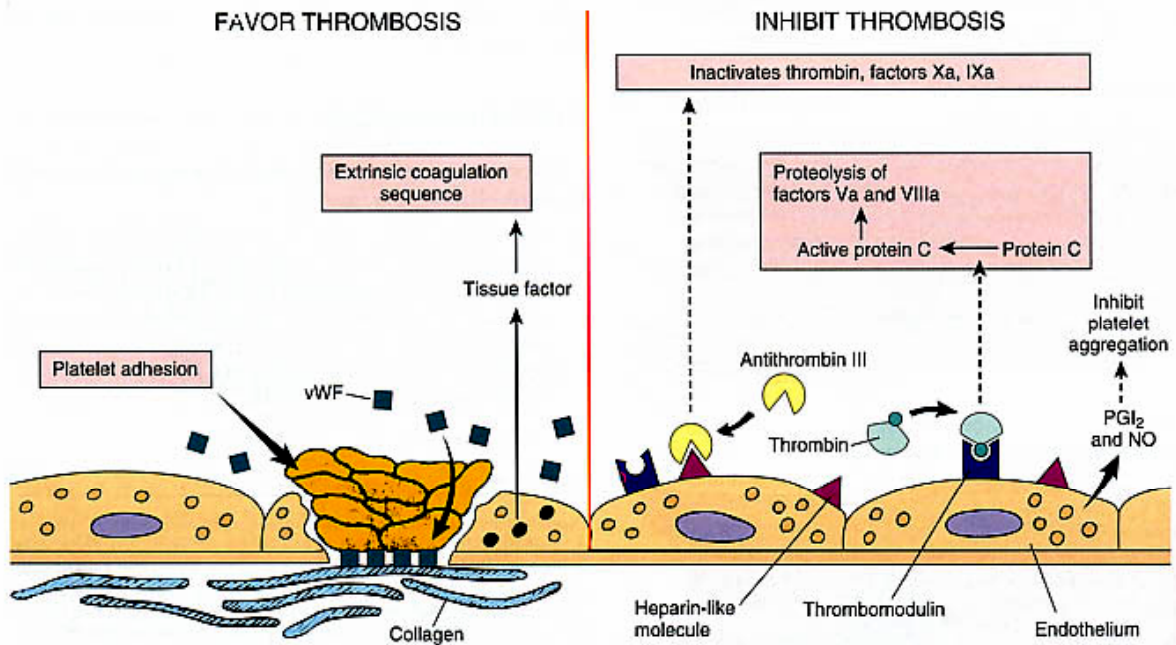


Figure 1.9 : Représentation de la participation des cellules endothéliales à la régulation de la thrombose.

A gauche sont représentés les mécanismes pro-thrombotiques et à droite, les mécanismes anti-thrombotiques.

vWF : facteur de von Willebrand ; PGI₂ : prostacycline ; NO : oxyde nitrique.

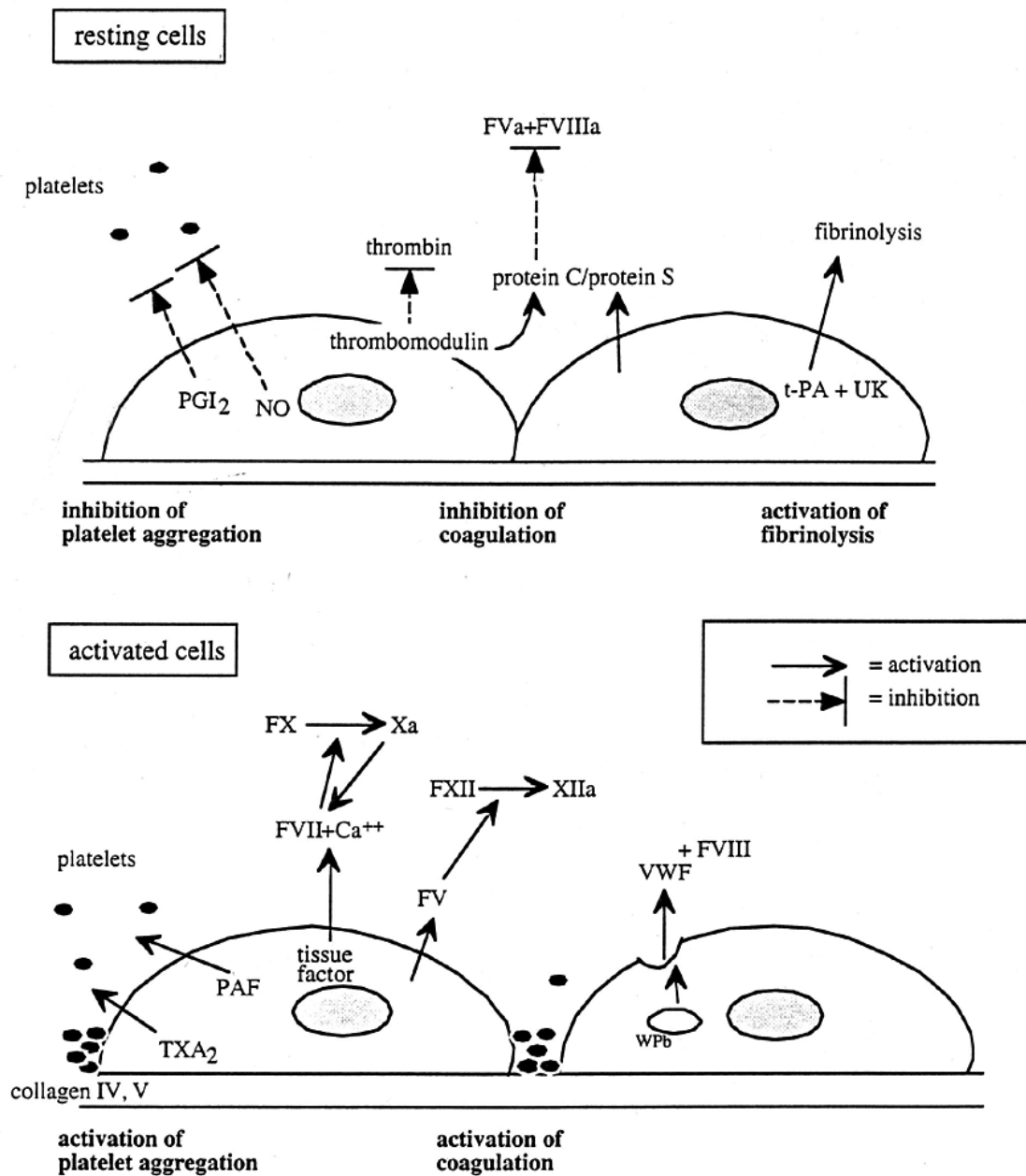


Figure I.10 : Représentation schématique du rôle joué par les cellules endothéliales dans les voies de coagulation et de fibrinolyse.

NO: oxyde nitrique, PAF: facteur activateur des plaquettes, PGI₂ : prostacycline, t-PA: activateur tissulaire du plasminogène, TXA₂ : thromboxane A₂, UK: urokinase, vWF : facteur de von Willebrand, WPb : corps de Weibel-Palade.
(Michiels, 2002).

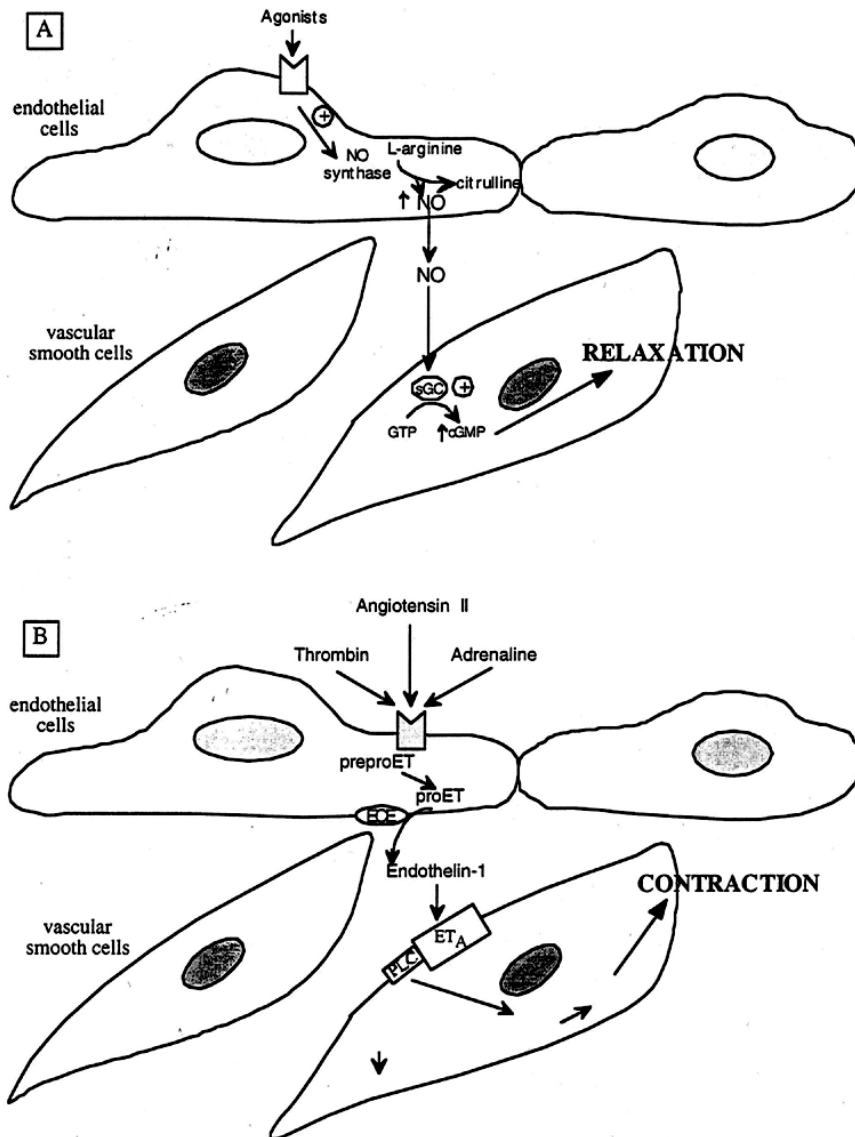


Figure I.11 : Représentation schématique de la libération du NO et de l'endothéline par les cellules endothéliales et leurs effets sur les cellules musculaires lisses.

En A, la cellule est au repos et en B, elle est activée

cGMP : GMP cyclique, ECE: enzyme de conversion de l'endothéline, ETA: récepteur A de l'endothéline, NO : oxyde nitrique, PKC : protéine kinase C, PLC : phospholipase C, sGC : guanylate cyclase soluble (d'après Michiels, 2002).

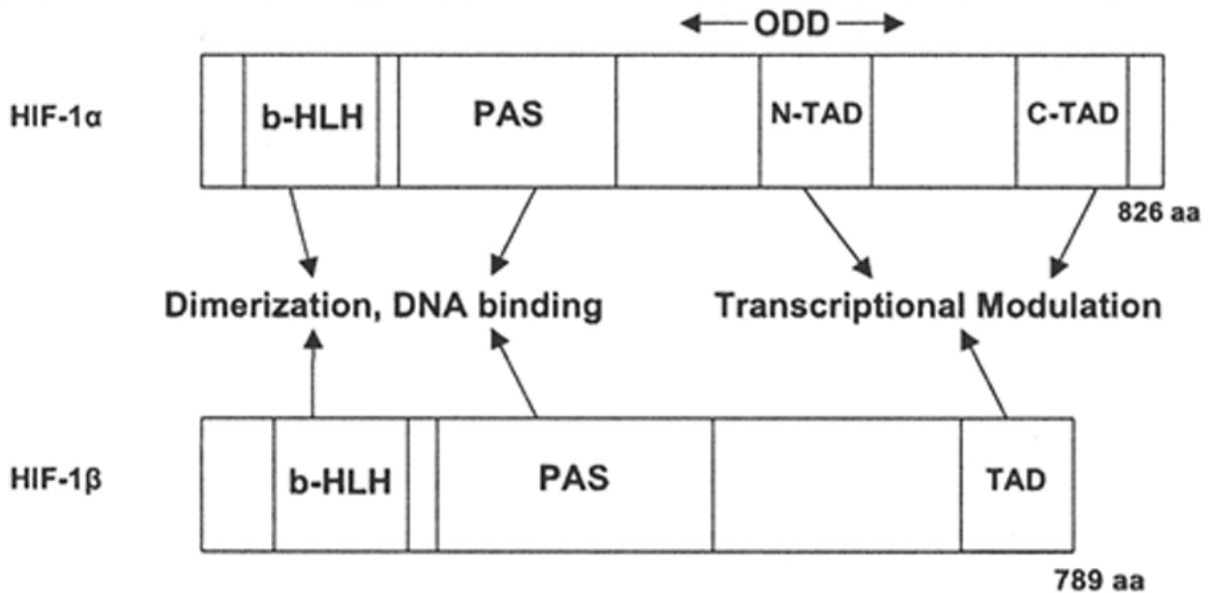


Figure I.12 : Structure du complexe HIF-1.

Le complexe HIF-1 est une molécule dimérique composée de deux protéines impliquées dans la transactivation des gènes en hypoxie, HIF-1 α et HIF-1 β (ARNT). La dimérisation de ces deux protéines est médiée par les domaines helix-loop-helix (HLH) et Per-ARNT-Sim et la liaison à l'ADN implique la région basique du domaine b-HLH. HIF-1 module la transcription grâce à son domaine de transactivation. Entre les acides aminés 401 et 603, HIF-1 α contient un domaine de dégradation dépendant de l'oxygène (ODD) qui contrôle la dégradation de HIF-1 α en normoxie (d'après(Duffy et al., 2003).

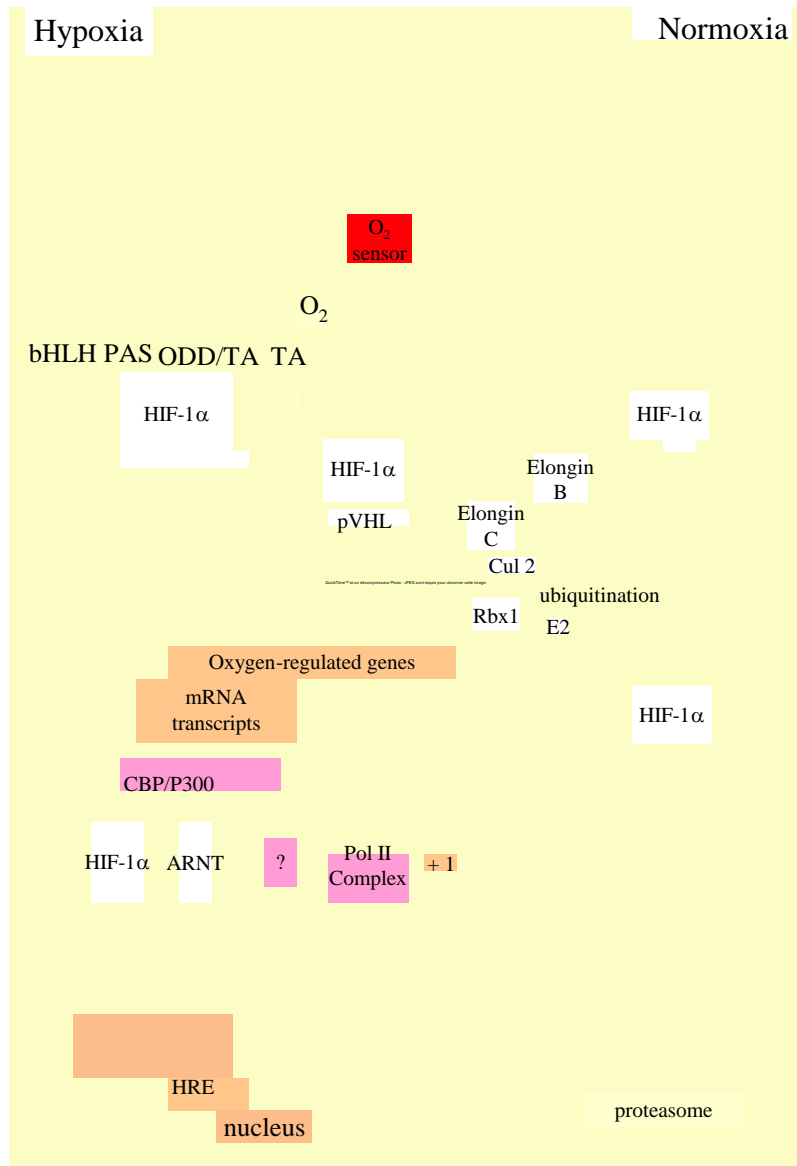


Figure I.13 : Représentation schématique et régulation de HIF-1 α .

En normoxie, la propyl hydroxylase modifie HIF-1 α de manière post-transcriptionnelle, le rendant ainsi capable d'interagir avec le complexe VHL. Le complexe VHL médie l'ubiquitinylation de HIF-1 α permettant ainsi sa dégradation par le protéasome. Suite à une diminution de l'apport en oxygène (hypoxie), la propyl hydroxylase ne peut pas modifier HIF-1 α . HIF-1 α stabilisé, est transloqué dans le noyau où il interagit avec HIF-1 β (ARNT), se lie à l'ADN et induit la transcription des gènes cibles.

CBP : Creb binding protein ; Ub : ubiquitine .

Erythropoïèse	Erythropoïétine
Distribution du fer	Transferrine ; récepteur à la transferrine ; Ceruloplasmine
Angiogenèse	VEGF (Vascular endothelial growth factor) ; flt-1 ; TGF- β 3 ; PAI-1 (inhibiteur des activateurs du plasminogène)
Tonus vasomoteur	Endothéline-1 ; Nitric Oxide Synthase 2 ; Hème oxygénase 1 ; récepteur adrénergique α 1b
Métabolisme de l'ATP	Transporteurs 1 et 3 de glucose, Hexokinase 1 et 2 ; Enolase 1 ; Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, Phosphoglycérate kinase M, Aldolase A et C ; Triosephosphate isomérase ; Lactate déshydrogénase A
Autre métabolisme	Anhydrase Carbonique 9 ; Adénylate kinase 3 ; Propyl-hydroxylase α 1
Prolifération et survie cellulaire	IGF-2 (insulin growth factor) ; IGF-binding protein 1,2 et 3 ; p21 ; Cyclin G2.

Tableau I.4 : Liste des gènes cibles de HIF-1 et de leur fonction.

Activateurs	Cellule endothéliale		
	Prolifération	Migration	Différentiation
Facteurs de croissance liant l'héparine			
VEGF	oui	oui	oui
PIGF	faible	oui	?
FGF-1, FGF-2	oui	oui	oui
PDGF	oui	oui	oui
Facteurs de croissance ne liant pas l'héparine			
TGF- α	oui	oui	oui
TGF- β	oui	oui	oui
EGF	oui	oui	oui
Autres			
Oxyde nitrique (NO)	oui	?	?
Ang-1	non	oui	oui

Tableau I.5 : Activateurs endogènes de l'angiogenèse et leur impact sur ses différentes étapes.

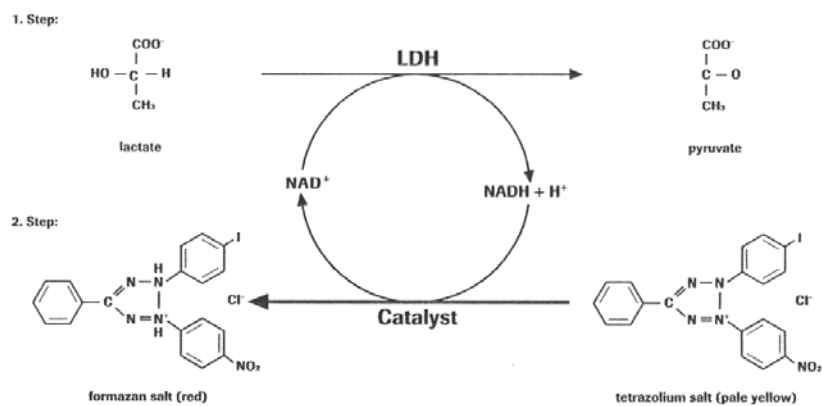


Figure II.1 : Principe de la détection de la LDH.

Première étape : réduction du NAD^+ en $\text{NADH} + \text{H}^+$ par la LDH qui oxyde le lactate en pyruvate.

Deuxième étape : les protons du $\text{NADH} + \text{H}^+$ sont transférés sur le sel de tétrazolium qui est alors transformé en sel de formazan.

D'après la fiche technique « Cytotoxicity Detection Kit » (LDH) Roche, Manheim, Allemagne.

	Un gel	Deux gels
20 x NuPage Transfer Buffer	10 ml	10 ml
Antioxydant Nupage	200 µl	200 µl
Méthanol	10 % 20 ml	20 % 20 ml

Tableau II.1 : Composition du tampon de transfert selon qu'il y a un ou deux gels à transférer.

	HIF-1α (souris)	flt-1 (chèvre)	intgrine αv (souris)	intgrine β3 (souris)	Total ERK (souris)	P- ERK (lapin)	α-tubuline (souris)
Blocking	O/N ^ 4;C TBS-T 0,1 % 5 % Gloria	O/N ^ 4;C TBS-T 0,1 % 5 % Gloria	O/N ^ 4;C TBS-T 0,1 % 5 % Gloria	O/N ^ 4;C TBS-T 0,1 % 5 % Gloria	O/N ^ 4;C TBS-T 0,1 % 5 % Gloria	O/N ^ 4;C TBS-T 0,1 % 5 % Gloria + 5 % BSA	1 heure ^ RT TBS-T 0,1 % 5 % Gloria
Anticorps primaire	2 hrs ^ RT TBS-T 0,1 % + 5 % Gloria	2 hrs ^ RT TBS-T 0,1 % + 5 % Gloria	2 hrs ^ RT TBS-T 0,1 % + 5 % Gloria	2 hrs ^ RT TBS-T 0,1 % + 5 % Gloria	2 hrs ^ RT TBS-T 0,1 % + 5 % Gloria	2 hrs ^ RT TBS-T 0,07 % 5 % Gloria + 5 % BSA	2 hrs ^ RT TBS-T 0,1 % + 5 % Gloria
Lavage	3 x 15' TBS-T 0,1 % + 5 % Gloria	3 x 15' TBS-T 0,1 % + 5 % Gloria	3 x 15' TBS-T 0,1 % + 5 % Gloria	3 x 15' TBS-T 0,1 % + 5 % Gloria	3 x 15' TBS-T 0,1 % + 5 % Gloria	3 x 15' TBS-T 0,07 %	3 x 15' TBS-T 0,1 % + 5 % Gloria
Anticorps secondaire	45' ^ RT TBS-T 0,1 % + 5 % Gloria	45' ^ RT TBS-T 0,1 % + 5 % Gloria	45' ^ RT TBS-T 0,1 % + 5 % Gloria	45' ^ RT TBS-T 0,1 % + 5 % Gloria	45' ^ RT TBS-T 0,1 % + 5 % Gloria	1 heure ^ RT TBS-T 0,1 % + 5 % Gloria	45' ^ RT TBS-T 0,1 % + 5 % Gloria
Lavage	1 x 5' TBS-T 0,1 % + 5 % Gloria 2 x 5' TBS-T 0,1 %	1 x 5' TBS-T 0,1 % + 5 % Gloria 2 x 5' TBS-T 0,1 %	1 x 5' TBS-T 0,1 % + 5 % Gloria 2 x 5' TBS-T 0,1 %	1 x 5' TBS-T 0,1 % + 5 % Gloria 2 x 5' TBS-T 0,1 %	1 x 5' TBS-T 0,1 % + 5 % Gloria 2 x 5' TBS-T 0,1 %	3 x 15' TBS-T 0,07 %	1 x 5' TBS-T 0,1 % + 5 % Gloria 2 x 5' TBS-T 0,1 %

Tableau II.2 : Protocole du traitement de la membrane selon la protéine d'intérêt à détecter.

RT : température ambiante

O/N : toute la nuit

QuickTime™ et un décompresseur BMP sont requis pour visionner cette image.

Figure II.2 : Système sandwich. Cas de deux gels à transférer.
Représentation schématique du système « sandwich » utilisé pour le transfert des protéines du gel sur une membrane de PVDF lors d'un western blot.

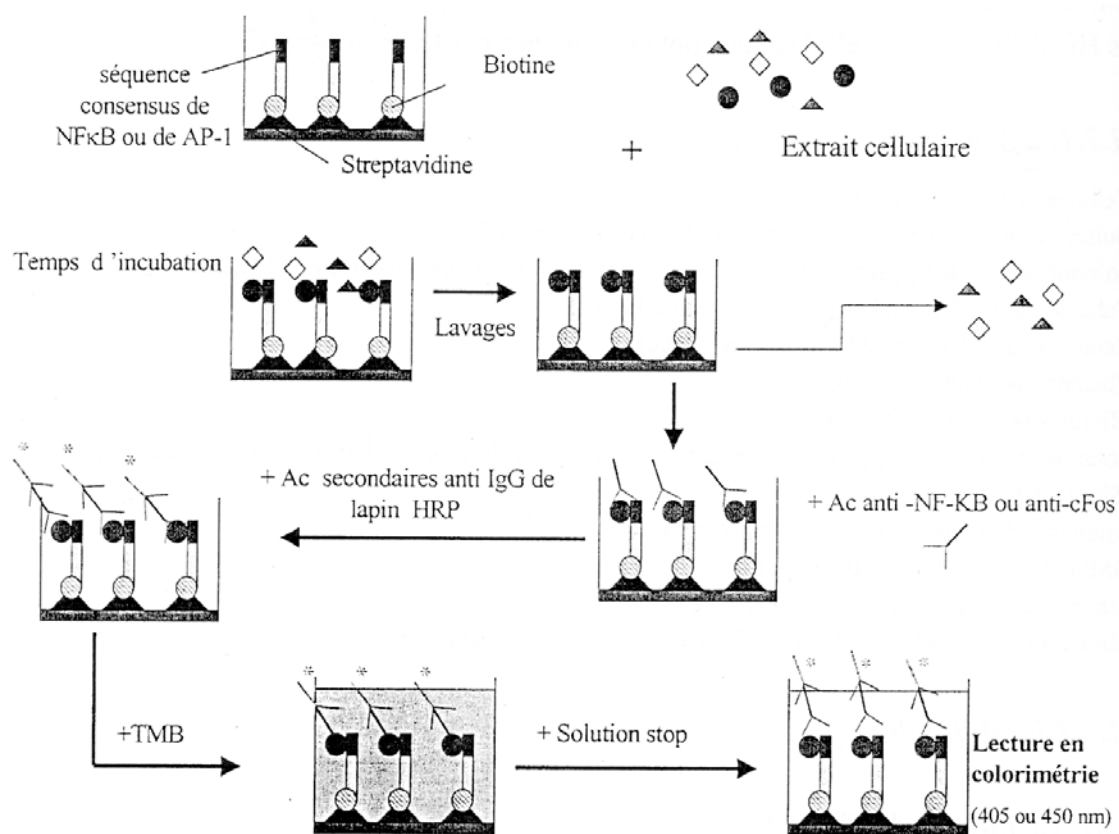


Figure II.3 : Dosage colorimétrique du facteur de transcription AP-1.

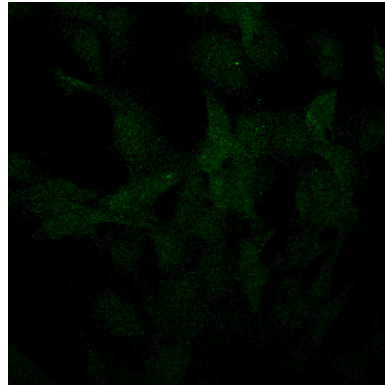
HIF-1α

Normoxie 4 heures

Normoxie 8 heures

Normoxie 16 heures

QuickTime™ et un décompresseur
TIFF (non compressé) sont requis pour visualiser
cette image.



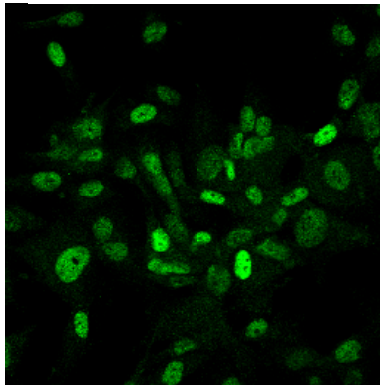
QuickTime™ et un décompresseur
TIFF (non compressé) sont requis pour visualiser
cette image.

Hypoxie 4 heures

Hypoxie 8 heures

Hypoxie 16 heures

QuickTime™ et un décompresseur
TIFF (non compressé) sont requis pour visualiser
cette image.



QuickTime™ et un décompresseur
TIFF (non compressé) sont requis pour visualiser
cette image.

Figure III.1 : Visualisation en immunofluorescence de l'accumulation de la protéine HIF-1 α .
Les cellules endothéliales HUVEC-C sont incubées en normoxie ou hypoxie pendant 4 heures, 8 heures et 16 heures dans du milieu CO₂ indépendant sans sérum. Après cette incubation, les cellules sont fixées, perméabilisées et la présence de HIF-1 α est révélée par immunofluorescence. L'observation est réalisée en microscopie confocale (grossissement 40 x).

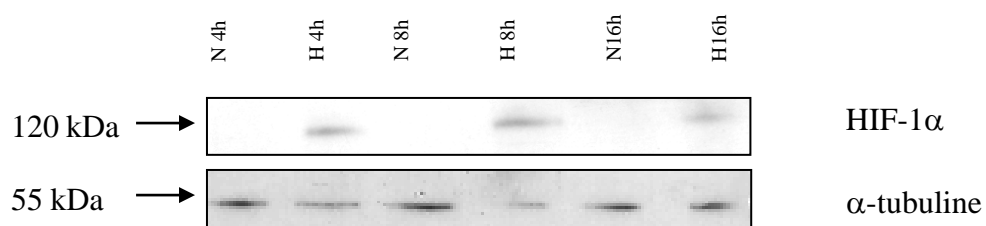


Figure III.2 : Effet de l'hypoxie et du temps d'incubation sur l'expression de HIF-1 α .

Les cellules HUVEC-C ont été incubées 4 heures, 8 heures et 16 heures dans du milieu CO₂ indépendant sans sérum en normoxie (N) ou en hypoxie (H). Elles ont ensuite été lysées et l'abondance de la protéine HIF-1 α a été détectée dans les extraits protéiques par western blot.

Un contrôle de charge a été réalisé grâce à la révélation de l' α -tubuline.

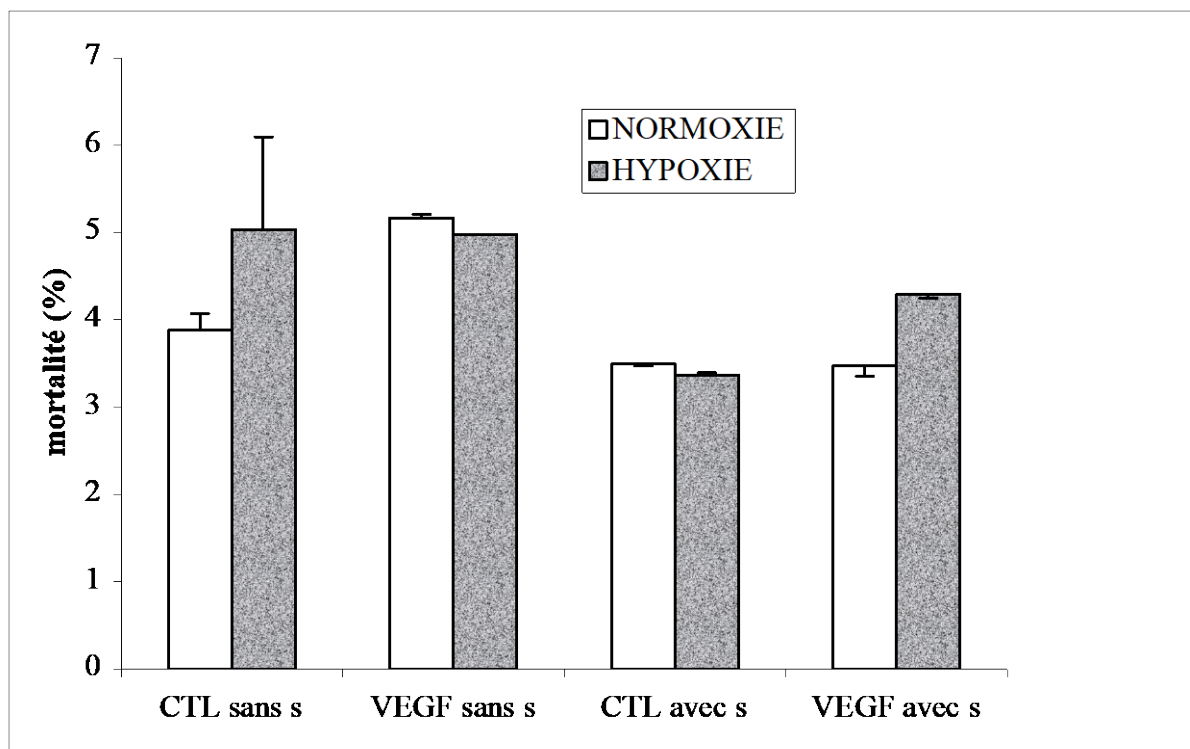


Figure III.3 : Effet de l'incubation sous hypoxie sur la libération de la lactate déshydrogénase chez les cellules HUVEC-C .

La mesure de la libération de la LDH est réalisée après une incubation de 24 heures des cellules en présence (avec s) ou en absence (sans s) de 2 % de sérum et en présence ou en absence de VEGF à une concentration de 25 ng/ml dans du milieu CO₂ indépendant. Les résultats sont exprimés en pourcentage de mortalité en tant que moyennes \pm un écart-type (n=3).

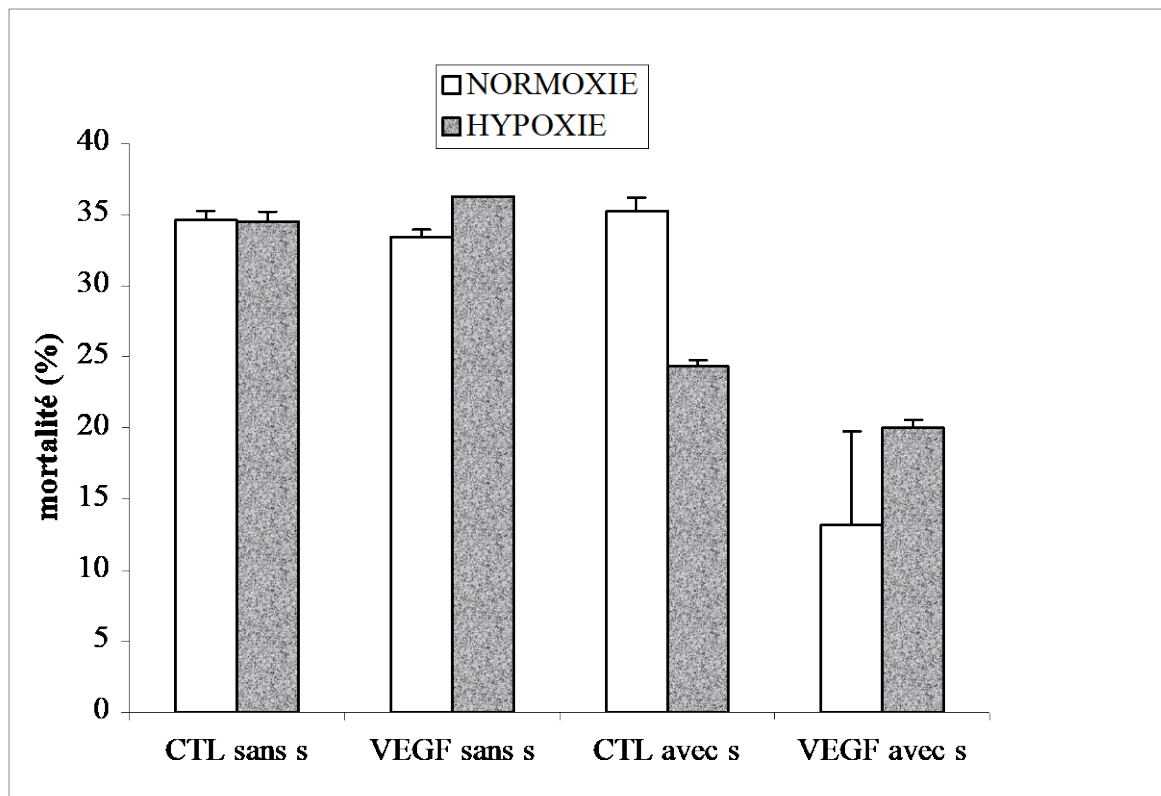


Figure III.4 : Effet de l'incubation sous hypoxie sur la libération de la lactate déshydrogénase chez les cellules HUVEC-C .

La mesure de la libération de la LDH est réalisée après une incubation de 48 heures des cellules en présence (avec s) ou en absence (sans s) de 2 % de sérum et en présence ou en absence de VEGF à une concentration de 25 ng/ml de milieu CO₂ indépendant. Les résultats sont exprimés en pourcentage de mortalité en tant que moyennes \pm un écart-type (n=3).

Flt-1

Normoxie 4 heures

Normoxie 8 heures

Normoxie 16 heures

QuickTime™ et un décompresseur
TIFF (non compressé) sont requis pour visualiser
cette image.

QuickTime™ et un décompresseur
TIFF (non compressé) sont requis pour visualiser
cette image.

QuickTime™ et un décompresseur
TIFF (non compressé) sont requis pour visualiser
cette image.

Hypoxie 4 heures

Hypoxie 8 heures

Hypoxie 16 heures

QuickTime™ et un décompresseur
TIFF (non compressé) sont requis pour visualiser
cette image.

QuickTime™ et un décompresseur
TIFF (non compressé) sont requis pour visualiser
cette image.

QuickTime™ et un décompresseur
TIFF (non compressé) sont requis pour visualiser
cette image.

Normoxie 4 heures

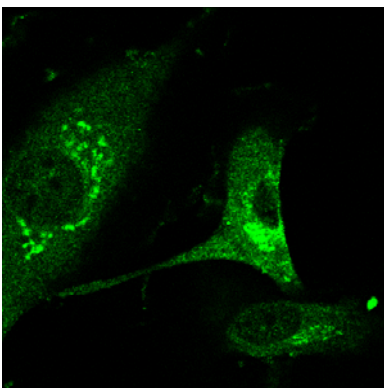


Figure III.5 : Visualisation en immunofluorescence de l'expression du récepteur au VEGF, *flt-1*.

Les cellules endothéliales HUVEC-C sont incubées en normoxie ou en hypoxie pendant 4 heures, 8 heures et 16 heures dans du milieu CO₂ indépendant sans sérum. Après cette incubation, les cellules sont fixées et la présence du récepteur *flt-1* est révélée par immunofluorescence.

L'observation est réalisée en microscopie confocale (grossissement 40 x pour les 6 micrographies supérieures et 100 x pour la dernière).

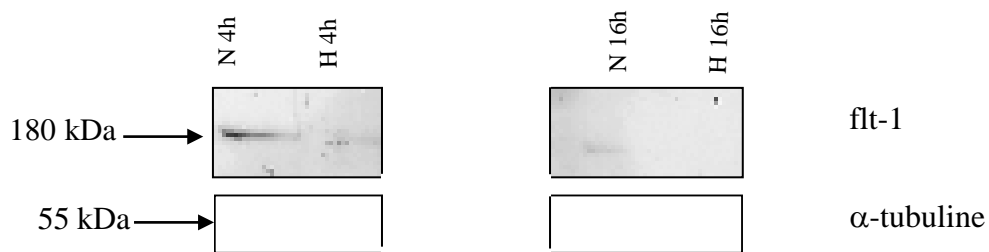


Figure III.6 : Effet de l'hypoxie et du temps d'incubation sur l'expression de flt-1.

Les cellules HUVEC-C ont été incubées 4 heures ou 16 heures dans du CO₂ indépendant sans sérum en normoxie (N) ou en hypoxie (H). Elles ont ensuite été lysées et l'abondance du récepteur flt-1 a été détectée dans les extraits protéiques par western blot.

Un contrôle de charge a été réalisé grâce à la révélation de l' α -tubuline.

KDR

Normoxie 4 heures

Normoxie 8 heures

Normoxie 16 heures

QuickTime™ et un décompresseur
TIFF (non compressé) sont requis pour visualiser
cette image.

QuickTime™ et un décompresseur
TIFF (non compressé) sont requis pour visualiser
cette image.

QuickTime™ et un décompresseur
TIFF (non compressé) sont requis pour visualiser
cette image.

Hypoxie 4 heures

Hypoxie 8 heures

Hypoxie 16 heures

QuickTime™ et un décompresseur
TIFF (non compressé) sont requis pour visualiser
cette image.

QuickTime™ et un décompresseur
TIFF (non compressé) sont requis pour visualiser
cette image.

QuickTime™ et un décompresseur
TIFF (non compressé) sont requis pour visualiser
cette image.

Normoxie 4 heures

QuickTime™ et un décompresseur
TIFF (non compressé) sont requis pour visualiser
cette image.

Figure III.7 : Visualisation en immunofluorescence de l'expression du récepteur au VEGF, KDR.

Les cellules endothéliales HUVEC-C sont incubées en normoxie ou en hypoxie pendant 4 heures, 8 heures et 16 heures dans du milieu CO₂ indépendant sans sérum. Après cette incubation, les cellules sont fixées et la présence du récepteur KDR est révélée par immunofluorescence.

L'observation est réalisée en microscopie confocale (grossissement 40 x pour les 6 micrographies supérieures et 100x pour la dernière).

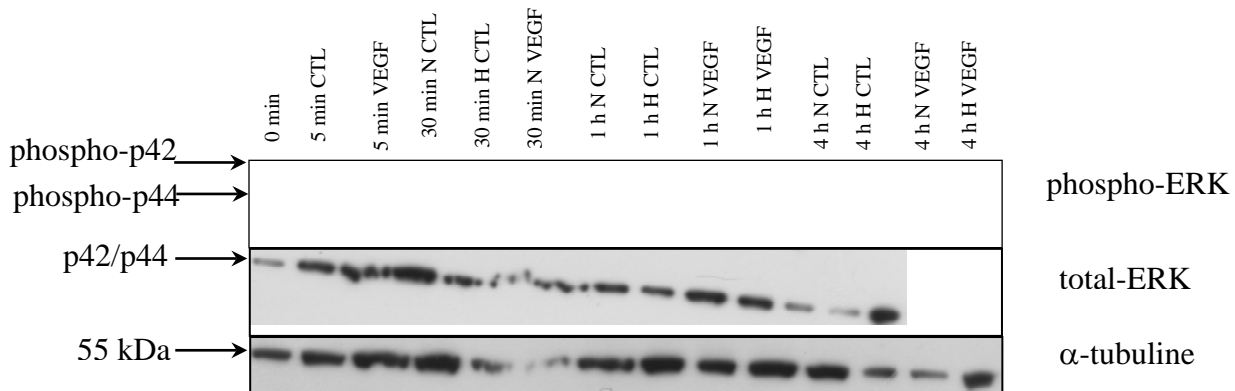


Figure III.8: Effet de l'hypoxie et du VEGF sur la phosphorylation des MAPK ERK.

Les cellules HUVEC-C ont été incubées 0 minute, 5 minutes, 30 minutes, 1 heure, 4 heures dans du milieu CO₂ indépendant sans sérum en normoxie (N) ou en hypoxie (H) en absence (CTL) ou en présence (VEGF) de VEGF en concentration 25 ng/ml. Elles ont au préalable été mises au repos dans du milieu sans sérum pendant 2 heures. Elles ont ensuite été lysées et la phosphorylation des MAPK ERK a été détectée dans les extraits protéiques par western blot en utilisant un anticorps spécifique des formes phosphorylées.

Un contrôle de la quantité totale de ERK a été réalisée en utilisant un anticorps reconnaissant toutes les formes de ERK et un contrôle de charge a été réalisé grâce à la révélation de l'α-tubuline.

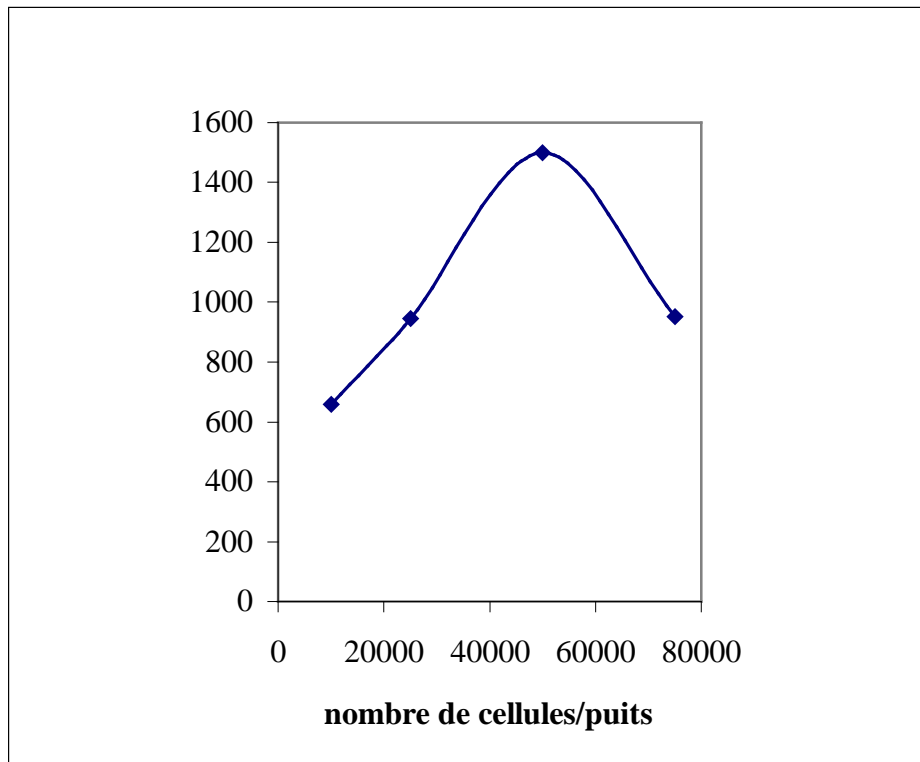


Figure III.9: Suivi de la prolifération des cellules endothéliales grâce à la mesure de l'incorporation de thymidine tritiée .

Les cellules HUVEC-C sontensemencées à différentes densités dans du milieu complet dans des puits de boîtes à 24 puits. Le lendemain, le milieu est changé et 1 ml de milieu contenant 2 % de sérum et la thymidine tritiée est rajouté. Après 24 heures d'incubation, l'incorporation de la [³H]-thymidine est mesurée comme décrit dans « matériel et méthodes ».

Les résultats sont présentés en coups par minute (cpm) en tant que moyennes (n=2).

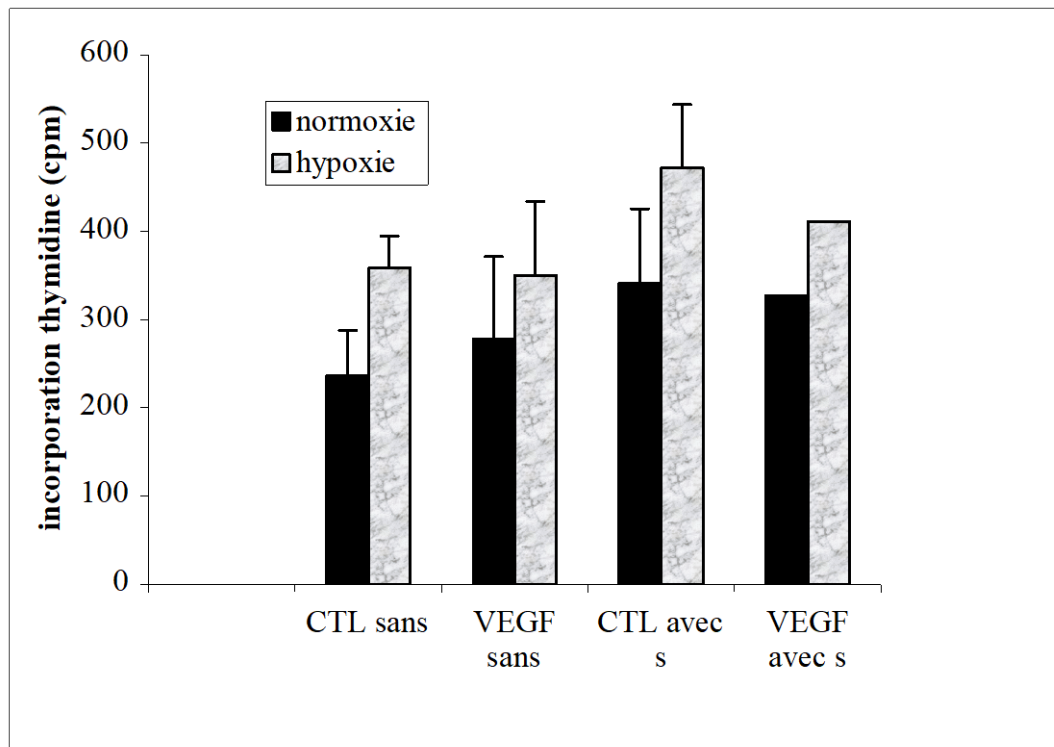


Figure III.10 : Suivi de la prolifération des cellules endothéliales grâce à la mesure de l'incorporation de $[^3H]$ -thymidine.

Les cellules HUVEC-C sont ensemencées à 30.000 cellules/puits dans du milieu F12k complet. Le lendemain, elles sont incubées 24 heures dans du milieu CO_2 indépendant contenant de la $[^3H]$ -thymidine $\pm 2\%$ de sérum ± 25 ng/ml de VEGF. Après cette incubation, l'incorporation de la $[^3H]$ -thymidine est mesurée comme décrit dans « matériel et méthodes ».

Les résultats sont présentés en coups par minute (cpm) en tant que moyennes \pm un écart-type (n=3).

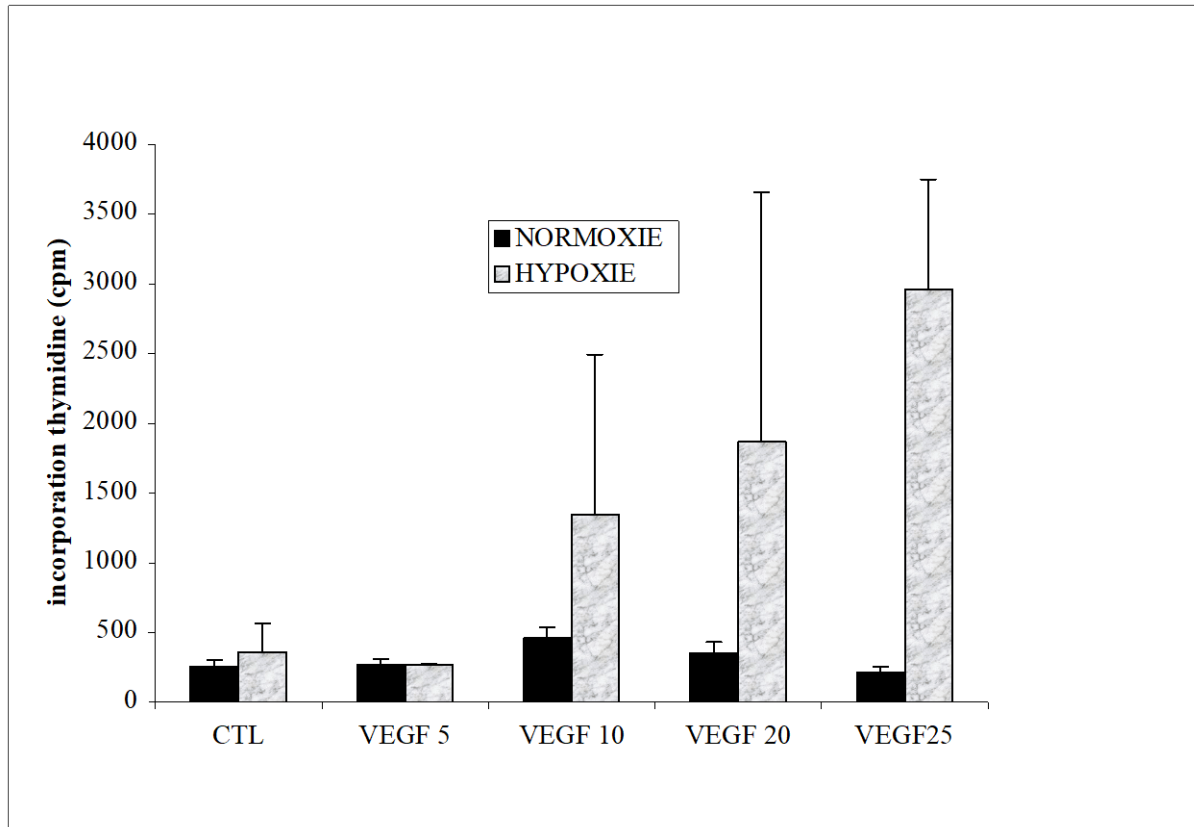


Figure III.11: Suivi de la prolifération des cellules endothéliales grâce à la mesure de l'incorporation de $[^3H]$ -thymidine.

Les cellules HUVEC-C sont ensemencées à 30.000 cellules par puits dans du milieu F12k complet. Le lendemain, elles sont incubées 24 heures dans du milieu CO_2 indépendant contenant de la $[^3H]$ -thymidine $\pm 2\%$ de sérum avec des concentrations croissantes en VEGF allant de 5 à 25 ng/ml. Après cette incubation, l'incorporation de la $[^3H]$ -thymidine est mesurée comme décrit dans « matériel et méthodes ».

Les résultats sont présentés en coups par minute (cpm) en tant que moyennes \pm un écart-type (n=3).

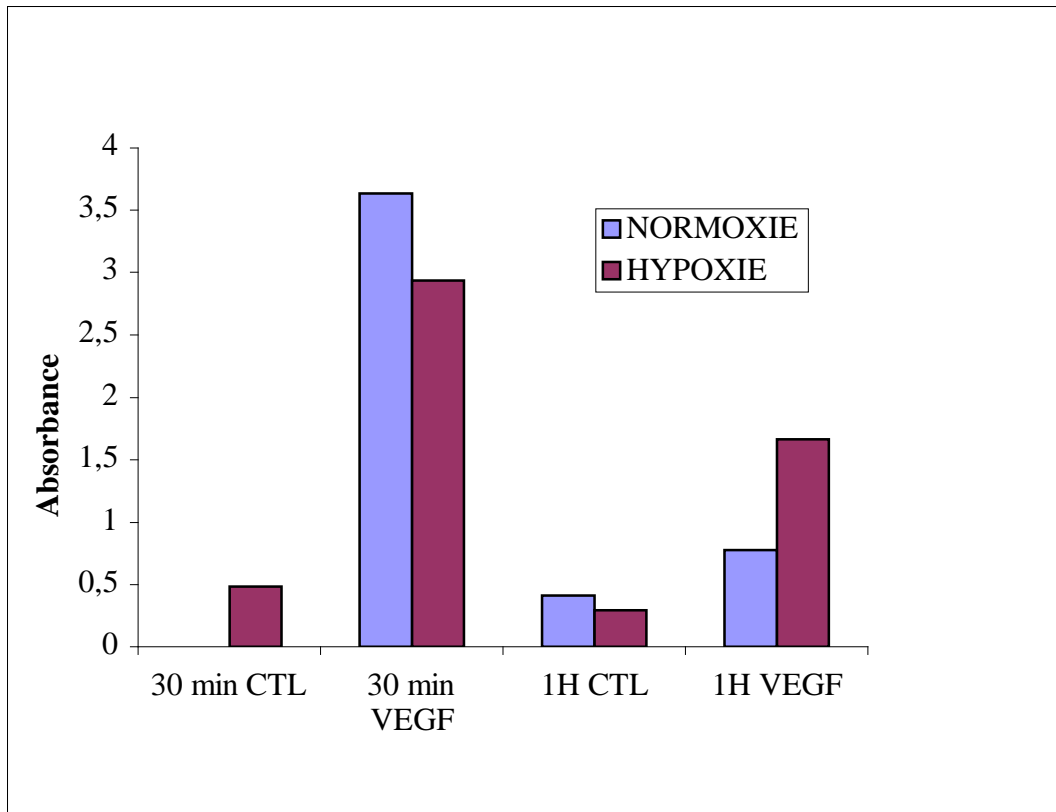
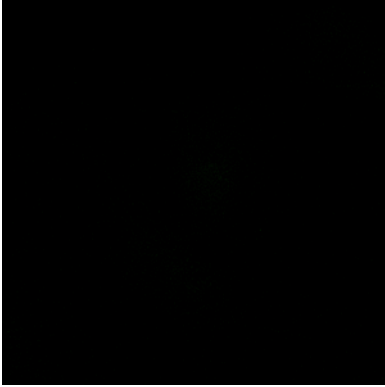


Figure III.12 : Effet de l'hypoxie et du VEGF sur l'activation du facteur de transcription AP-1.

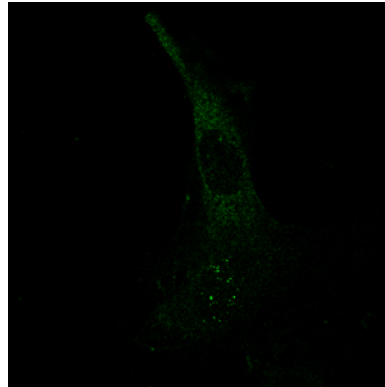
Les cellules HUVEC-C ont été incubées dans du milieu CO₂ indépendant sans sérum pendant 30 minutes et 1 heure en présence ou en absence de VEGF à une concentration de 25 ng/ml. Elles ont ensuite été lysées et l'activation de AP-1 a été détectée dans les extraits nucléaires par dosage colorimétrique.

Intégrines

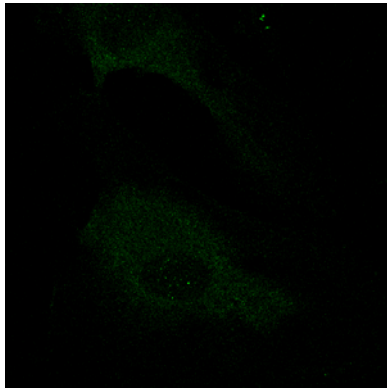
Normoxie 16 heures α_v CTL



Hypoxie 16 heures α_v CTL



Normoxie 16 heures β_3 CTL



Normoxie 16 heures β_3 VEGF

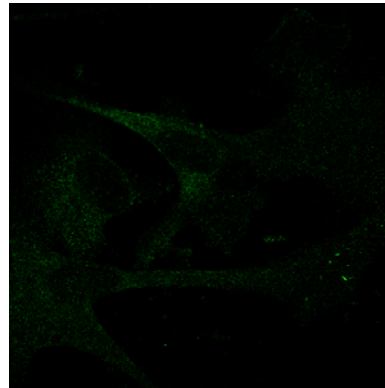


Figure III.13 : Visualisation en immunofluorescence de l'expression des intégrines α_v et β_3 chez les cellules endothéliales HUVEC-C.

Les cellules HUVEC-C ont été incubées 16 heures dans du milieu CO₂ indépendant sans sérum en normoxie ou en hypoxie en présence ou en absence de VEGF à une concentration de 25 ng/ml. Les cellules ont ensuite été fixées et les intégrines ont été révélées par un marquage en immunofluorescence (vert). L'observation est réalisée en microscopie confocale.

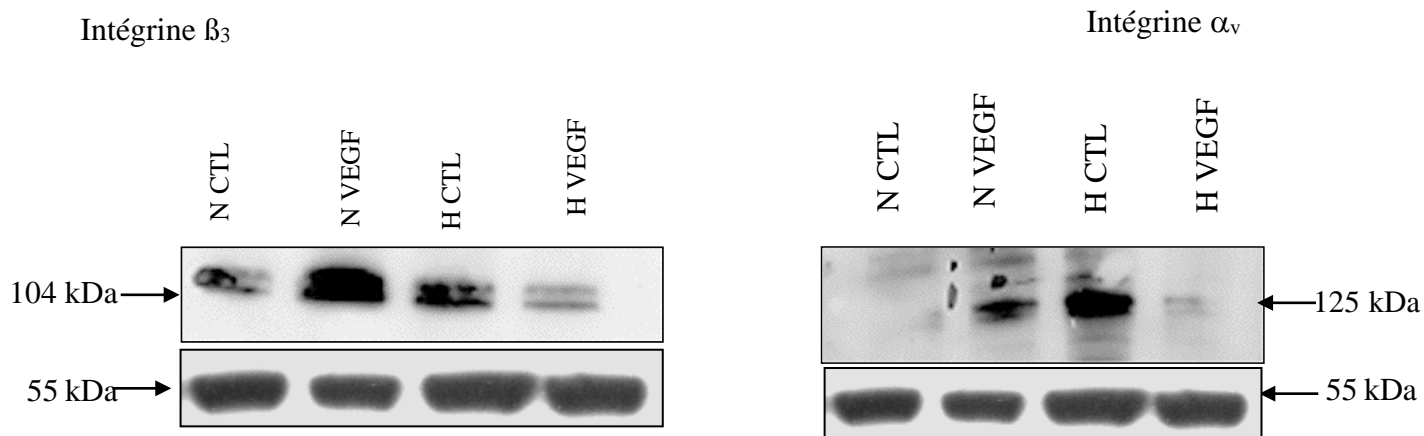


Figure III.14 : Effet de l'hypoxie ou du VEGF sur l'expression des intégrines.

Les cellules HUVEC-C ont été incubées 24 heures dans du milieu CO_2 indépendant sans sérum en absence de VEGF (CTL) ou en présence de VEGF à une concentration de 25 ng/ml en normoxie (N) ou en hypoxie (H). Elles ont ensuite été lysées et l'abondance des intégrines a été détectée dans les extraits totaux par Western blot.

Un contrôle de charge a été réalisé grâce à la révélation de l' α -tubuline.

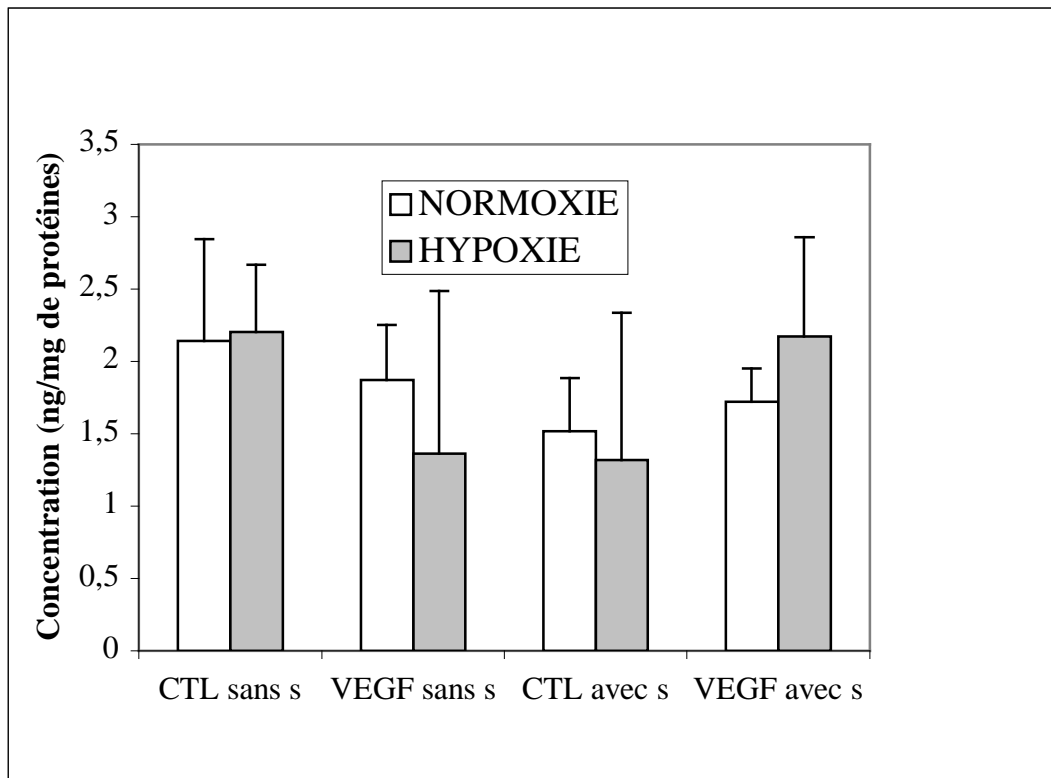


Figure III.15 : Quantification de la métalloprotéinase matricielle MMP-2 par un ELISA.

Les cellules HUVEC-C ont été incubées 24 heures en normoxie ou hypoxie dans du milieu CO₂ indépendant avec (avec s) ou sans (sans s) sérum et en présence (VEGF) ou en absence (CTL) de VEGF à une concentration de 25 ng/ml. Après l'incubation, le milieu est récolté pour la quantification de la MMP-2 par ELISA alors que le tapis cellulaire est lysé afin de doser les protéines.

Les résultats sont exprimés en ng de MMP-2 /mg de protéines en tant que moyennes \pm un écart-type (n=3).

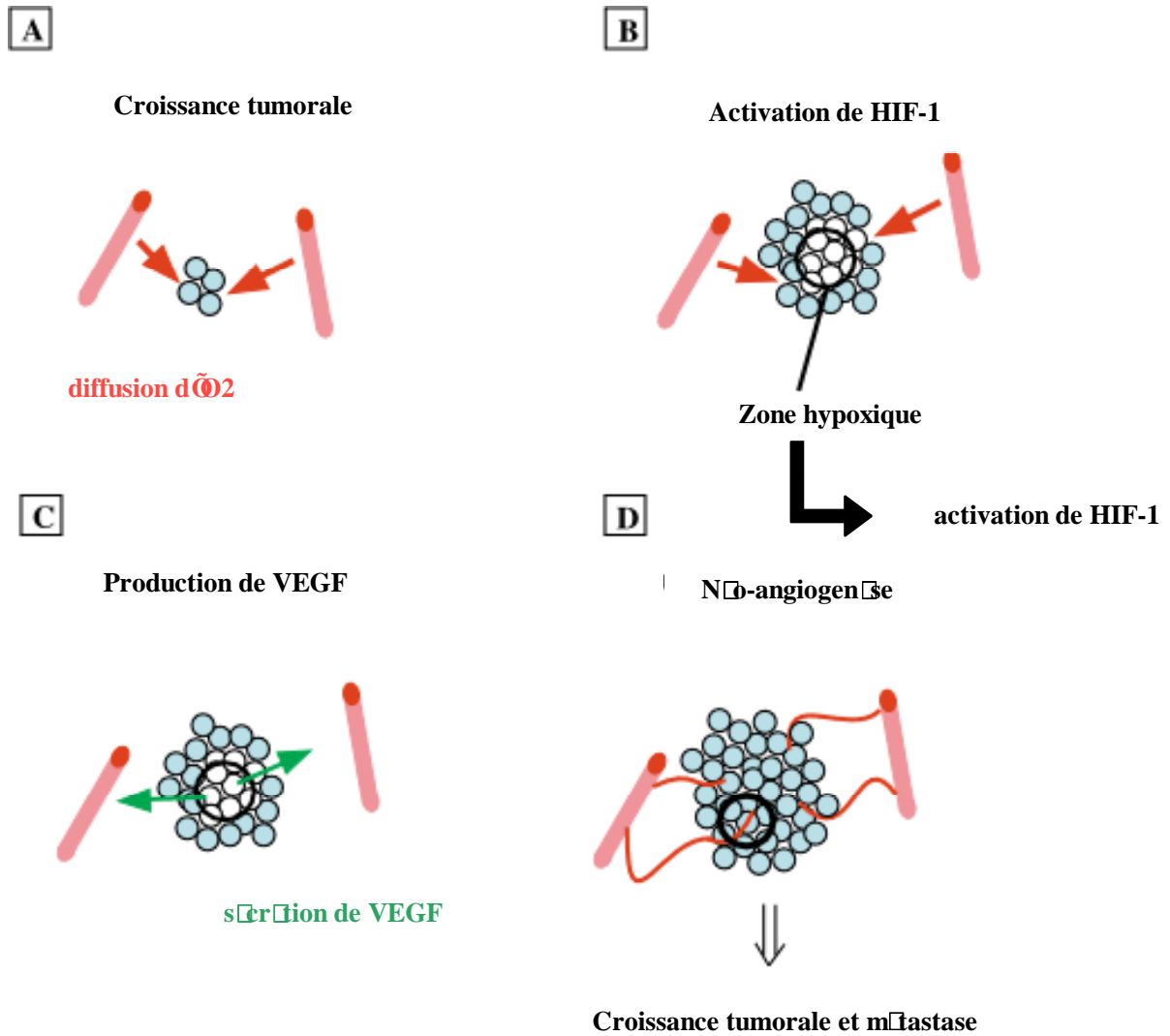


Figure IV.1 : Représentation schématique du rôle de l'hypoxie dans la croissance tumorale.

Effet de l'hypoxie et du VEGF.

HIF-1 : hypoxia inducible factor-1 ; VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire.

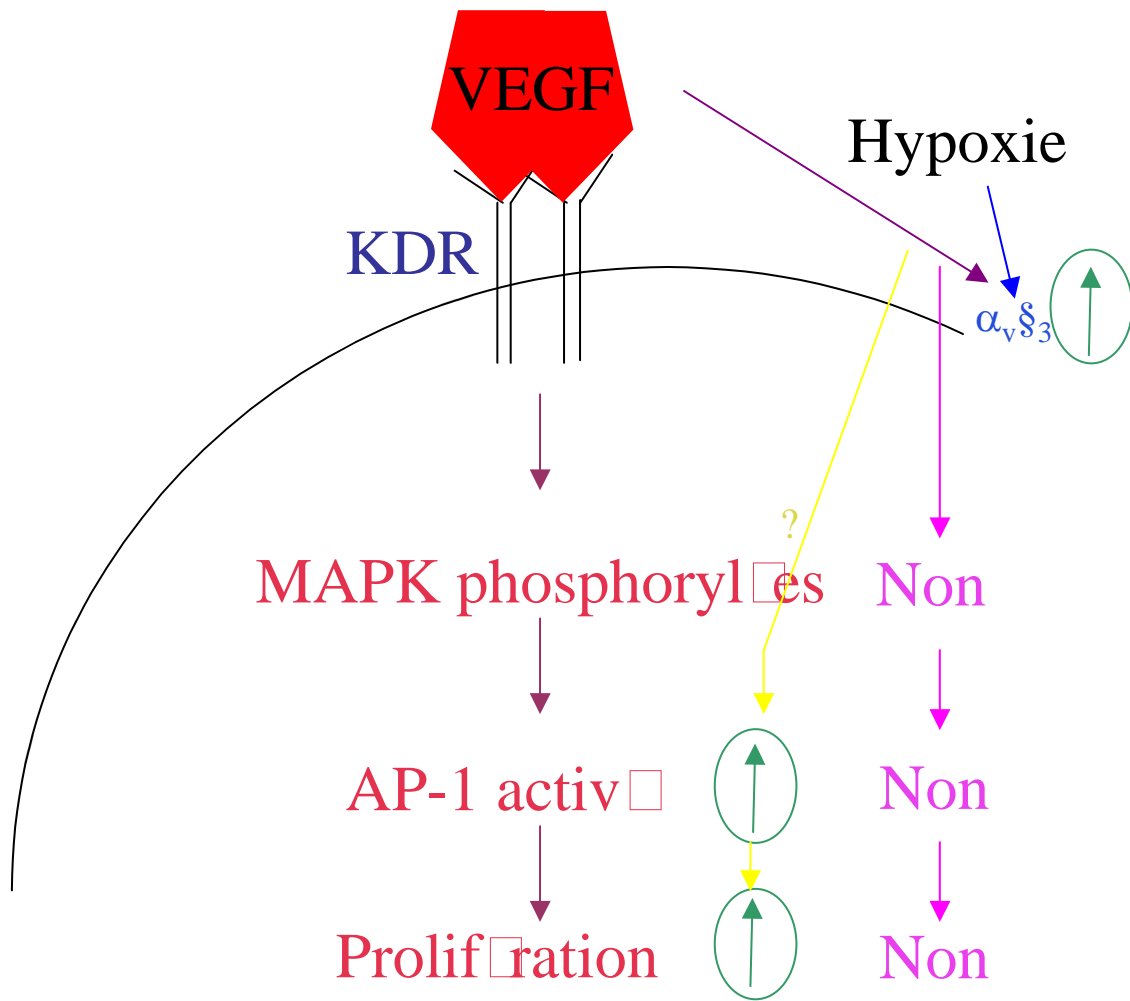


Figure IV.2: Schéma récapitulatif des effets de l'hypoxie et du VEGF sur les cellules endothéliales HUVEC-C.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
1. Angiogenèse	1
1.1 Physiologie	2
a) Vasodilatation	2
b) Perméabilité vasculaire	2
c) Dégradation de la matrice extracellulaire	3
d) Prolifération et migration des cellules dans la matrice extracellulaire	3
1.2 Mécanismes moléculaires impliqués	3
a) Le VEGF et ses récepteurs	4
b) D'autres facteurs de croissance	5
c) Les métalloprotéinases matricielles	6
d) Les intégrines	7
1.3 Néoangiogenèse tumorale	8
2. Cellules endothéliales	9
2.1 Fonctions des cellules endothéliales	10
a) Propriétés anti- et pro-thrombotiques	10
b) Propriétés anti-coagulantes	11
c) Régulation du tonus vasculaire	11
d) Régulation des réactions inflammatoires	12
e) Modification du métabolisme des lipoprotéines	12
2.2 Réponse des cellules endothéliales au stress hypoxique	12
3. Hypoxie	13
3.1 HIF-1	13
3.2 Régulation de HIF-1	14
3.3 Gènes cibles de HIF-1	15
4. CONCLUSION	15
But du mémoire	16
MATERIEL ET METHODES	17
CULTURE CELLULAIRE	17
2.1 Culture des cellules HUVEC-C	17
a) Caractéristiques de la souche HUVEC-C	17
b) Milieux de culture et solutions	17
c) Repiquage des cellules HUVEC-C	17
2.2 Incubation sous hypoxie	18
2.3 Libération de la LDH	18
2.4 Dosage de MMP-2	19
2.5 Western Blot	19
2.5.1 Lyse des cellules	19
2.5.2 Quantification des protéines par la méthode inverse	20
2.5.3 Quantification des protéines par la méthode de Bradford	20
2.5.4 Préparation des échantillons pour le gel d'électrophorèse	21
2.5.5 Électrophorèse	21
a) Migration	21

b) Transfert _____	21
2.5.6 Traitement de la membrane _____	22
2.6 Immunofluorescence _____	22
2.7 Incorporation de la thymidine tritiée _____	24
2.8 Mise en évidence de l'activation du facteur de transcription AP-1 par _____	25
dosage colorimétrique _____	25
2.8.1 Extraction nucléaire _____	25
2.8.2 Dosage colorimétrique d'AP-1 _____	26
RESULTATS ET DISCUSSION _____	29
3.1 Mise en évidence de la protéine HIF-1 α dans les cellules endothéliales _____	29
HUVEC-C _____	29
3.1.1 Marquage de HIF-1α en immunofluorescence _____	29
3.1.2 Etude de la stabilisation de HIF-1α par Western blot _____	29
3.2 Mise en évidence de la réponse des cellules endothéliales à l'hypoxie vis-à-vis de la _____	30
problématique de l'angiogénèse _____	30
3.2.1 Expérience préliminaire : détermination de la cytotoxicité de _____	30
l'incubation sous hypoxie des cellules HUVEC-C _____	30
3.2.2 Mise en évidence de la présence des récepteurs au VEGF en surface des _____	31
cellules HUVEC-C _____	31
a) Mise en évidence de l'expression du récepteur flt-1 _____	31
Marquage du récepteur flt-1 en immunofluorescence _____	31
Mise en évidence du récepteur flt-1 par Western blot _____	32
b) Mise en évidence de la présence du récepteur KDR _____	32
Marquage du récepteur KDR en immunofluorescence _____	32
3.2.3 Mise en évidence de l'activation des MAPK ERK _____	33
Etude de l'activation des MAPK ERK par Western blot _____	33
3.2.4 Mesure du potentiel prolifératif _____	33
• Etape préliminaire _____	34
• Effet de l'hypoxie et du VEGF sur la prolifération cellulaire _____	34
• Effet de la concentration en VEGF sur la prolifération cellulaire _____	34
34	
3.2.5 Effet de l'hypoxie sur l'activation du facteur de transcription AP-1 _____	35
induit par le VEGF _____	35
Dosage colorimétrique d'AP-1 _____	35
3.2.6 Effet de l'hypoxie sur l'expression des intégrines _____	35
Marquage des intégrines α_v et β_3 en immunofluorescence _____	36
Quantification de l'expression des intégrines α_v et β_3 par Western blot _____	36
3.2.7 Effet de l'hypoxie sur la sécrétion de la MMP-2 _____	37
Dosage de MMP-2 _____	37
CONCLUSION ET PERSPECTIVES _____	39
BIBLIOGRAPHIE _____	45

Introduction

INTRODUCTION

Pour maintenir leur métabolisme et assurer leur survie, les cellules de mammifères ont besoin de nutriments et d'oxygène. Cependant, il existe une limite de diffusion de l'oxygène à partir des capillaires sanguins. Au cours du développement embryonnaire, un réseau de capillaires sanguins suffisamment dense s'organise. Un réseau primitif se met d'abord en place au cours du processus de vasculogenèse, dans lequel les cellules précurseurs, les angioblastes, sont recrutés et se différencient en cellules endothéliales. Ce réseau primitif s'étale ensuite par bourgeonnement et intussusception, c'est le processus d'angiogenèse. En parallèle, les cellules musculaires lisses recouvrent les cellules endothéliales durant la myogenèse vasculaire, stabilisant ainsi les vaisseaux formés (*figure 1.1*).

1. Angiogenèse

L'angiogenèse est le processus de formation de nouveaux vaisseaux à partir des vaisseaux préexistants (Bagnato and Spinella, 2002). Elle est régulée par un équilibre entre les molécules pro-angiogéniques et anti-angiogéniques. Ces molécules pro-angiogéniques et anti-angiogéniques peuvent émaner de cellules cancéreuses, des cellules endothéliales, du sang ou de la matrice extracellulaire. L'angiogenèse joue un rôle dans les processus physiologiques comme le développement embryonnaire, le cycle menstruel, mais est aussi impliquée dans des circonstances pathologiques comme lors de la cicatrisation, de l'athérosclérose ou du développement d'une tumeur. Elle peut également contribuer à une accumulation de graisses corporelles chez les individus obèses. Le tissu adipeux est dans ce cas hautement angiogénique et les préadipocytes migrent au niveau des sites de néovascularisation. Les facteurs de croissance induits par l'insuline et la leptine (médiateur central de l'obésité) ont été identifiés comme médiateurs de l'angiogenèse dans le tissu adipeux (Carmeliet and Jain, 2000).

Il existe en fait deux types d'angiogenèse : l'angiogenèse par bourgeonnement, qui a lieu dans l'embryon durant l'organogenèse et est prédominante dans le cerveau, et l'angiogenèse par intussusception.

Ces deux types d'angiogenèse sont impliqués dans la vascularisation des organes. Cependant, le type d'angiogenèse dans un organe ou un tissu donné peut dépendre du nombre de vaisseaux sanguins déjà présents quand l'organe commence à croître rapidement (Risau, 1997).

L'angiogenèse est initiée par l'activation des cellules endothéliales au repos en réponse à des facteurs angiogéniques comme le VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire) (Bagnato and Spinella, 2002). Le VEGF est une cytokine d'importance capitale pour l'angiogenèse normale mais aussi pour celle associée au cancer et à d'autres pathologies (Senger et al., 1997).

En condition normale, il existe un équilibre entre les molécules pro-angiogéniques et les molécules anti-angiogéniques. Lorsque cet équilibre bascule en faveur des facteurs pro-angiogéniques, l'initiation de l'angiogenèse (switch angiogénique) est enclenchée.

Parmi les causes du switch angiogénique, on retrouve le stress métabolique incluant une basse pression en oxygène, un pH bas ou l'hypoglycémie; le stress mécanique comme la pression engendrée par les cellules qui prolifèrent ; la réponse immune ou inflammatoire des cellules immunes qui infiltrent un tissu ; la mutation génétique comme l'activation des oncogènes ou la délétion des gènes suppresseurs de tumeurs qui contrôlent la production des régulateurs angiogéniques (Carmeliet and Jain, 2000).

1.1 Physiologie

L'angiogenèse est un processus complexe qui implique le remodelage de la matrice extracellulaire, la migration des cellules endothéliales, leur prolifération et la maturation des vaisseaux sanguins (Senger et al., 1997).

Plusieurs étapes sont ainsi nécessaires : vasodilatation, libération de protéines plasmatiques, dégradation de la matrice extracellulaire, migration et prolifération des cellules endothéliales ainsi que la différenciation de ces cellules en vaisseaux sanguins (*figure I.2*). Dans la suite du chapitre, nous allons décrire brièvement ces différentes étapes.

a) Vasodilatation

Lors du switch angiogénique, l'oxyde nitrique (NO) est libéré par les cellules et initie la vasodilatation. Le NO est généré par des enzymes appelées NOS (nitric oxide synthase) qui convertissent la forme L de l'arginine en citrulline et en NO. Les NOS sont des enzymes homodimériques qui nécessitent le L-arginine et le NADPH (Xu et al., 2002) et des cofacteurs tels que FMN (Flavine Mononucléotide), FAD (Flavine Adénine Dinucléotide), des ions zinc, le système calmoduline/calcium (Michiels, 2002) (*figure I.3*). La eNOS (endothelial NO synthase) est exprimée constitutivement et est activée par le système calmoduline/calcium.

Le NO agit sur le tonus vasculaire en augmentant le taux de GMP cyclique dans la cellule :

- il inhibe la croissance des cellules musculaires lisses vasculaires,
- il antagonise les effets de l'angiotensine II et diminue la production d'endothéline-1 (ET-1) par les cellules endothéliales,
- il exerce un effet vasodilatateur en agissant sur les cellules musculaires lisses.

Lors de la vasodilatation, les cellules endothéliales, polygonales au repos, prennent une forme allongée, ce qui diminue la résistance afin de s'adapter aux forces de cisaillement.

La vasodilatation est le préliminaire à la retraction des cellules endothéliales et à l'augmentation de la perméabilité vasculaire.

b) Perméabilité vasculaire

La perméabilité vasculaire augmente en réponse au VEGF et de ce fait permet le relargage des protéines plasmatiques vers les tissus. Cette augmentation est causée par la formation des fenestrations au niveau des vaisseaux sanguins et la redistribution des molécules d'adhésion intercellulaires comme la VE-cadhérine et PECAM-1 (Conway et

al., 2001). Une extravasation des protéines plasmatiques est nécessaire à la création d'une "chambre d'accueil" pour les cellules endothéliales migrantes. Si la perméabilité est nécessaire à l'angiogenèse, une perméabilité excessive peut cependant conduire à des conditions pathologiques. Par conséquent, les changements au niveau de la perméabilité vasculaire doivent être fortement régulés (Carmeliet, 2000).

c) Dégradation de la matrice extracellulaire

La dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) est un processus important dans le développement de l'angiogenèse. La MEC sert de charpente aux cellules et est le lieu où s'accumulent les produits de sécrétion des cellules musculaires lisses et des cellules endothéliales ainsi que des débris cellulaires.

Différentes familles de métalloprotéinases, héparanases et chymases sont sécrétées par les cellules et sont impliquées dans la dégradation de la MEC. Cela va permettre de libérer les facteurs de croissance séquestrés dans la MEC ainsi que de fournir des sites de liaisons aux cellules endothéliales migrantes. Ces facteurs de croissance sont nécessaires à la survie, à la prolifération et à la migration des cellules endothéliales. La dégradation de la MEC permet aussi aux cellules endothéliales de se désolidariser de la lame basale afin de migrer.

Nous décrivons les métalloprotéinases au point 1.2.c.

d) Prolifération et migration des cellules dans la matrice extracellulaire

Plusieurs facteurs de croissance stimulent la prolifération et la migration des cellules dans la MEC. Après dissolution des barrières physiques, les cellules endothéliales prolifèrent et sont libres de migrer à des sites plus éloignés (Conway et al., 2001). Les inhibiteurs de l'angiogenèse : l'endostatine (un fragment du collagène XVIII), l'angiotensine (un fragment interne du plasminogène), l'antithrombine, l'interféron β et le facteur 4 des plaquettes empêchent la prolifération et la migration des cellules endothéliales.

Le processus de migration cellulaire est induit entre autres, par l'activation du récepteur au VEGF, le VEGFR-2. Les cellules migrent en fonction du gradient de concentration de ce dernier. Ces facteurs de croissance sont synthétisés par les cellules soumises par exemple à un stress métabolique et peuvent également être libérés à partir de la MEC (Carmeliet and Jain, 2000).

1.2 Mécanismes moléculaires impliqués

Le processus d'angiogenèse nécessite plusieurs acteurs régulés dans le temps et dans l'espace. Ces acteurs sont notamment les facteurs de croissance, les métalloprotéases et les intégrines (*tableau 1.1*). Nous allons présenter ci-dessous certaines des caractéristiques de ces acteurs.

a) Le VEGF et ses récepteurs

Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire ou VEGF, protéine dimérique, est le régulateur principal de l'angiogenèse et un mitogène spécifique des cellules endothéliales (Neufeld et al., 1999). Son expression est régulée par de multiples facteurs externes comme des cytokines, des facteurs de croissance et des hormones qui n'affectent pas directement l'angiogenèse mais peuvent l'inhiber ou l'activer en jouant sur l'expression du VEGF. L'expression du VEGF peut également être induite par l'hypoxie.

Il existe cinq isoformes de VEGF (A, B, C, D et E) qui se distinguent par leur masse moléculaire et leurs propriétés biologiques, notamment leur capacité à lier des protéoglycanes de surface cellulaire.

Pour l'isoforme VEGF-A, il existe 5 isoformes constituées de 121, 145, 165, 189 et 206 acides aminés qui sont produites par splicing alternatif de l'ARN messager du gène codant pour le VEGF-A.

Le VEGF 121 ne se lie pas à l'héparine de la matrice extracellulaire alors que le VEGF 165 est capable de s'y lier. Le VEGF 145 possède un deuxième domaine héparine indépendant. Le VEGF 189 est séquestré par les protéoglycanes de la surface cellulaire et par la matrice extracellulaire, mais il est moins actif que le VEGF 121 ou le 165 *in vivo*.

Les isoformes prédominantes sont le 121 et le 165. Les trois isoformes 121, 165 et 145 induisent la prolifération des cellules endothéliales et l'angiogenèse *in vivo* (Neufeld et al., 1999).

Le VEGF 165, le plus abondant et le plus actif, est produit par les cellules tumorales et les cellules du stroma. Cette isoforme est capable de lier deux des récepteurs au VEGF, ainsi que d'accroître la perméabilité des cellules endothéliales aux protéines circulantes du plasma, ce qui entraîne l'extravasation du fibrinogène et d'autres protéines plasmatiques. Le VEGF stimule également la prolifération des cellules endothéliales (Chou et al., 2002).

Les récepteurs au VEGF, VEGFR-1 (flt-1, fms-like tyrosine kinase), VEGFR-2 (flk-1 ou KDR, kinase containing receptor) et VEGFR-3, font partie de la famille des récepteurs tyrosines kinases (*figure 1.4*). VEGFR-3 est spécifique aux vaisseaux lymphatiques alors que les deux autres bien que prédominants dans les cellules endothéliales, sont également exprimés à la surface d'autres cellules (Yancopoulos et al., 2000).

Il semblerait que seul KDR soit responsable du signaling intracellulaire suite à la liaison du VEGF au récepteur. Flt-1 jouerait plutôt le rôle de régulateur négatif de l'angiogenèse en séquestrant le VEGF.

L'expression du VEGF est strictement régulée aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel. Berra et al. (2000) ont notamment montré l'implication de la voie de transduction du signal des MAP kinases et de l'hypoxie dans le contrôle de l'angiogenèse et en particulier dans la régulation de l'expression du VEGF. L'hypoxie et l'hypoglycémie sont deux des principaux activateurs de l'expression du VEGF (Neufeld et al., 1999). De plus,

l'hypoxie affecte les récepteurs flt-1 au niveau transcriptionnel et KDR à un niveau post-transcriptionnel, en augmentant respectivement leur niveau d'expression et leur activité.

La voie de transduction initiée par le VEGF est similaire à celle initiée par les autres facteurs de croissance. Une fois que le VEGF se lie à son récepteur, il y a dimérisation et autophosphorylation du récepteur. Une série de molécules signal comme la PI3K, Shc, Grb2 ainsi que les phosphatases SHP-1 et SHP-2 sont alors recrutées au niveau des tyrosines phosphorylées. L'activation du récepteur au VEGF induit l'activation de la cascade des MAPK via la stimulation de Raf ce qui conduit à la prolifération cellulaire. L'activation de la PI3K entraîne l'activation de PKB et la survie cellulaire. L'activation de la PLC- γ entraîne la prolifération cellulaire, la vasoperméabilité et l'angiogenèse (*figure I.5*). La voie d'activation des MAPK conduit à l'activation du facteur de transcription AP-1 (Activating Protein-1) nécessaire à l'induction de la mitose. Il existe dans la cellule des gènes dits "de réponse immédiate" comme les sous-unités c-fos et c-jun qui constituent AP-1. Ces facteurs de transcription sont présents de manière constante dans la cellule mais peuvent être activés de manière très rapide. Ils permettent une réponse immédiate de la cellule. AP-1 joue un rôle essentiel dans l'activation de la prolifération cellulaire.

La dénomination AP-1 est une dénomination collective attribuée aux facteurs de transcription comprenant des partenaires de la famille des facteurs *trans* de type bZIP (basic leucine zipper) jun, fos et ATF (Activating Transcription Factor). AP-1 peut être un homodimère composé de deux sous-unités identiques d'un membre de la famille de jun ou un hétérodimère formé des sous-unités fos et jun (Karin et al., 1997) (*figure I.6*). La régulation de ce facteur est complexe et ne repose pas simplement sur la mise en place de l'association de c-jun avec c-fos.

Les MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) sont une famille de sérine/thréonine kinases activées dans la voie de transduction du signal déclenchée par plusieurs agonistes comme les facteurs de croissance VEGF ou FGF (Fibroblast Growth Factor), les hormones, les composants de la matrice extracellulaire, les facteurs de stress. Cette activation est obtenue après une double phosphorylation des résidus thréonine et tyrosine de ces kinases. Les MAPK sont activées par des MAP Kinases Kinases, elles-mêmes activées par des MAP Kinases Kinases Kinases. Les isoformes des MAPK ERK 1 et ERK2 sont celles qui sont impliquées dans l'induction de la prolifération cellulaire.

b) D'autres facteurs de croissance

Le VEGF agit de concert avec d'autres facteurs, les angiopoïétines étant les plus importantes (Yancopoulos et al., 2000).

L'angiopoïétine1 (Ang1) ligand du récepteur Tie2 (*figure I.4*), est chémoattractif pour les cellules endothéliales, est capable d'induire la tubulogénèse et de potentialiser l'effet du VEGF (Carmeliet, 2000). Contrairement au VEGF, Ang1 seule n'active pas l'organisation du réseau endothélial, mais stabilise le réseau initié par le VEGF probablement en stimulant l'interaction entre les cellules endothéliales et périendothéliales. Ang1 agit physiologiquement pour permettre l'angiogenèse en induisant la maturation et la stabilisation des vaisseaux.

De plus, elle inhibe naturellement la perméabilité vasculaire. Ang1 agit à des stades plus tardifs par rapport au VEGF.

Ang2, en présence de VEGF, est angiogénique. En absence de VEGF, Ang2 inhibe l'angiogenèse, car il agit comme antagoniste de Ang1 et donc comme inhibiteur de Tie2. Il induit ainsi la régression des vaisseaux sanguins (Conway et al., 2001). Ang 2 est présent au niveau des sites de remodelage vasculaire. Les récepteurs aux angiopoiétines, Tie2 et Tie1, sont des récepteurs de type tyrosine kinase.

Plusieurs autres facteurs de croissance sont également impliqués comme le facteur de croissance des fibroblastes (FGF) qui stimule la croissance des cellules endothéliales et qui recrute les cellules inflammatoires produisant des facteurs angiogéniques. On distingue un aFGF (acide) et un bFGF (basique), polypeptides d'environ 150 acides aminés, qui sont synthétisés par les fibroblastes, les cellules endothéliales et les muscles lisses, et qui agissent sur des récepteurs spécifiques.

Le facteur dérivant des plaquettes (PDGF), protéine de 30 kDa, est angiogénique pour les cellules endothéliales bourgeonnantes et recrute les péricytes et les cellules musculaires lisses entourant le vaisseau naissant. Le PDGF est sécrété essentiellement par les plaquettes et accessoirement par l'endothélium, les monocytes et les cellules musculaires lisses. Il est formé de deux chaînes polypeptidiques A et B reliées par des ponts disulfures formant des homodimères, PDGF-AA, PDGF-BB ou des hétérodimères, PDGF-AB.

Le PDGF active des récepteurs spécifiques de type tyrosine kinase augmentant ainsi la synthèse de certaines protéines dont celles induisant la prolifération cellulaire, celles de la matrice extracellulaire et la synthèse de l'inhibiteur des métalloprotéinases.

Une autre famille de récepteur tyrosine kinase, les Eph, dont les ligands sont les éphrines, sont également impliqués dans l'angiogenèse (*figure I.4*). L'éphrine A, l'éphrine B et le récepteur EphB4 sont exprimés par les cellules endothéliales et des études récentes ont mis en évidence un rôle clé de l'éphrine B et du récepteur EphB4 durant le développement vasculaire, en particulier dans le remodelage angiogénique (Michiels, 2002).

c) Les métalloprotéinases matricielles

Une vingtaine de métalloprotéinases matricielles, ou MMP, sont impliquées dans la régulation de la prolifération cellulaire, l'angiogenèse et le développement des tumeurs (Conway et al., 2001). Ces protéases sont exprimées par plusieurs types cellulaires et jouent un rôle central dans la dégradation de la matrice extracellulaire et des structures de la membrane basale ainsi que dans la libération des facteurs de croissance séquestrés à l'intérieur de la matrice extracellulaire. Dans le cadre de l'angiogenèse, elle vont ainsi permettre la migration et la survie des cellules endothéliales ainsi que la croissance des cellules musculaires lisses.

Les MMP sont classées en différentes catégories en fonction de leur spécificité de substrat : matrilysines, collagénases interstitielles, gélatinases, stromélysines, MMP de

type membranaire et autres (Vieillard-Baron et al., 2000), (Chantrain and Declerck, 2002) (*tableau I.2*).

Les matrilysines (MMP-7 et MMP-26) sont les MMP les plus simples et sont exprimées par les cellules cancéreuses d'origine épithéliale.

Les collagénases interstitielles dégradant le collagène fibrillaire, sont exprimées dans des zones nécessitant une dégradation rapide de la MEC.

Les stromélysines (MMP-3 et MMP-10) sont synthétisées par des cellules épithéliales normales et dans certains carcinomes.

La collagénase IV (MMP-9) est une enzyme capable de dégrader le collagène de type IV et d'autres protéines matricielles et est requise dans le processus de cicatrisation. Les collagénases (MMP-2 et MMP-9) sont exprimées par les cellules du stroma de la plupart des tissus.

L'action des MMP est inhibée par des inhibiteurs endogènes comme les inhibiteurs tissulaires des MMP (TIMPS). Cette inhibition se fait par le TIMP-1 qui est synthétisé par la plupart des cellules et inhibe les collagénases, stromélysine et gélatinases (Vieillard-Baron et al., 2000).

La MMP-9 est un activateur de l'angiogenèse et est capable de libérer le VEGF séquestré au niveau de la MEC. Le VEGF peut ainsi se lier à ces récepteurs sur les cellules endothéliales (Hynes, 2002). La MMP-2 est spécifiquement sécrétée par les cellules endothéliales activées.

D'autres protéases sont impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire au cours de l'angiogenèse. C'est le cas notamment de la plasmine qui est activée suite au clivage du plasminogène par l'u-PA (activateur urokinase du plasminogène) ou le t-PA (activateur tissulaire du plasminogène), des sérines protéases de type chymotrypsine. La plasmine dégrade différents composants de la MEC dont la fibrine, la fibronectine, etc. Elle peut également activer différentes MMP et l'u-PA.

Les cellules endothéliales sécrètent aussi l'inhibiteur de l'u-PA et du t-PA, le PAI-1, glycoprotéine de 50 kDa appartenant à la famille des inhibiteurs des sérines protéases. L'équilibre entre le t-PA et le PAI-1, normalement en faveur du PAI-1, est perturbé par les cytokines mais également lors du processus d'angiogenèse.

d) Les intégrines

Les intégrines sont des récepteurs de surface comprenant deux domaines, un large domaine extracellulaire et un court domaine intracellulaire, dont la fonction est de médier l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire ou d'agencer les cellules les unes par rapport aux autres (Hynes, 2002).

Les intégrines sont organisées sous forme d'hétérodimères ayant une sous-unité α (de poids moléculaire allant de 120 à 180 kDa) et une sous-unité β (de poids moléculaire allant de 90 à 110 kDa). Il existe environ dix-huit sous-unités α et huit sous-unités β qui

peuvent former une vingtaine d'intégrines différentes. Ces intégrines reconnaissent souvent une séquence tripeptidique RGD (arginine-glycine-aspartate) (*figure I.7*).

Les intégrines sont des médiateurs de la liaison des cellules à la MEC et de la migration cellulaire. L'interaction des cellules avec la MEC via les intégrines fournit un signal de survie cellulaire qui facilite la prolifération cellulaire.

L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ qui est celle exprimée préférentiellement par les cellules endothéliales est le récepteur de plusieurs ligands : vitronectine, fibronectine, fibrine et ostéopontine.

Selon Hynes, il existe une controverse selon laquelle, bien que les intégrines soient en général proangiogéniques car elles sont nécessaires pour soutenir la migration des cellules endothéliales, les intégrines α_v agiraient également comme des inhibiteurs de l'angiogenèse. Son hypothèse se base sur plusieurs observations :

- L'un des ligands des intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$ est la thrombospondine (TSP-1) (glycoprotéine multimérique qui inhibe l'angiogenèse) (Chavakis and Dimmeler, 2002). La TSP-1 est un inhibiteur de l'angiogenèse. Elle peut activer le TGF- β et inhiber la MMP-9. Le TGF- β peut à son tour augmenter la quantité des TIMPs. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est aussi le récepteur de la TSP-2, elle peut donc médier les effets antiangiogéniques de la TSP-1 et de la TSP-2. $\alpha_v\beta_3$ peut être considérée comme le récepteur des fragments protéolytiques des protéines matricielles. Ces fragments peuvent agir comme facteur antiangiogénique exemple: la tumstatine, fragment de la chaîne α_3 du collagène IV. La tumstatine agit via la PI3K, la PKB, $\alpha_v\beta_3$ pour inhiber la synthèse des protéines dans les cellules endothéliales et inhiber l'angiogenèse. $\alpha_v\beta_3$ participe aussi à la régénération des fragments de la MEC car elle active la MMP-2. La MMP-2 peut s'autocliner et générer le fragment PEX antiangiogénique agissant lui aussi via $\alpha_v\beta_3$. En fait, le fragment PEX empêche la liaison de MMP-2 à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Brower, 1999).
- Il existe une interaction entre les intégrines et le VEGF. $\alpha_v\beta_3$ inhibe le récepteur au VEGF, KDR, dans les cellules endothéliales, inhibant ainsi leur prolifération.
- Un autre exemple de régulation négative par $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$ implique l'inhibition des intégrines proangiogéniques ($\alpha_5\beta_1$, $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$) dans les cellules endothéliales. L'interaction entre les intégrines pro- et antiangiogéniques serait bien établie bien que le mécanisme ne soit pas connu.

1.3 Néoangiogenèse tumorale

Le lien entre l'angiogenèse et le développement d'une tumeur puis son expansion a été établi il y a plus d'une trentaine d'années par Folkman. Selon Folkman, sans formation de nouveaux vaisseaux, la taille des tumeurs n'augmente que de quelques millimètres. La croissance d'une tumeur et la formation de métastases sont dépendantes de l'angiogenèse. Par conséquent, bloquer l'angiogenèse serait un moyen d'arrêter le développement des tumeurs.

Les vaisseaux tumoraux peuvent croître par tubulogenèse, intussusception ou par incorporation des précurseurs des cellules endothéliales. Comparativement aux vaisseaux normaux, les vaisseaux tumoraux sont structurellement et fonctionnellement anormaux. Ils sont discontinus, fenestrés, dilatés, tortueux (Conway et al., 2001) et la membrane basale est parfois absente (Carmeliet and Jain, 2000). Ceci peut être dû à un déséquilibre des régulateurs de l'angiogenèse (Conway et al., 2001).

Les conditions hypoxiques s'établissent dans des tumeurs ayant un diamètre de 0,5 millimètre (Duffy et al., 2003). Afin d'augmenter la disponibilité de l'oxygène ou d'en diminuer la consommation, les cellules tumorales altèrent la transcription d'un grand nombre de gènes dont ceux encodant des protéines servant à stimuler la croissance des vaisseaux (voir point 3).

Les cellules au centre d'une tumeur ayant un volume de 1 mm³ sont privées de l'apport en oxygène et deviennent hypoxiques. En réponse à ces conditions, un facteur de transcription, HIF-1 (hypoxia inducible factor-1), est spécifiquement activé. Il régule l'expression de plusieurs gènes dont celui codant pour le VEGF. Ce dernier est sécrété ce qui va entraîner un basculement de l'équilibre angiogénique en faveur des activateurs de l'angiogenèse. D'autres facteurs de croissance sont également sécrétés par les cellules tumorales, à savoir le bFGF, le TGF- β (Transforming Growth Factor) et le PDGF. Il faut de plus noter que les vaisseaux sanguins qui sont dans le tissu tumoral permettent l'invasion des cellules tumorales dans le réseau sanguin qui transporte ces cellules au niveau d'autres sites dans le corps où elles pourraient causer de nouvelles tumeurs ou métastases (*figure I.8*).

2. Cellules endothéliales

Les cellules endothéliales sont les principaux régulateurs de l'homéostasie vasculaire et interagissent d'une part avec les cellules circulantes et d'autre part avec les cellules musculaires lisses. La couche de cellules endothéliales forme une barrière sélective perméable pour le transport des molécules entre les cellules sanguines circulantes et les tissus sous-jacents (Faller, 1999).

Ces cellules sont les premières à répondre à tout changement survenant dans le milieu sanguin et sont les acteurs principaux dans le développement des maladies vasculaires.

Les cellules endothéliales sont polygonales et forment des complexes fonctionnels avec leurs voisines. Ce sont les seules cellules à contenir les corps de Weibel-Palade, organite de stockage du facteur de von Willebrand. L'endothélium est une monocouche continue formée des cellules qui se lient par des structures d'adhésion ou des jonctions cellulaires. Trois types de jonctions y sont impliquées : les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les jonctions communicantes. Les principaux composants des jonctions serrées sont les occludines associées à plusieurs protéines cytosoliques, mais les détails de ce complexe restent encore indéterminés. Les jonctions adhérentes sont formées par les cadhérines. En surface des cellules endothéliales, les cadhérines présentes sont les VE-cadhérines.

2.1 Fonctions des cellules endothéliales

Les cellules endothéliales constituent une membrane sélective contrôlant le transfert des molécules entre le sang et le tissu (chez l'humain, cette interface atteint une surface totale de 350 m²), elles peuvent régulariser la thrombose, moduler le tonus vasculaire, métaboliser les hormones, réguler les réactions inflammatoires et influencer la croissance d'autres types cellulaires essentiellement les cellules musculaires lisses (Michiels, 2002). Ces cellules modifient également les lipoprotéines de la paroi vasculaire (*tableau I.3*).

Nous allons détailler ci-dessous certaines de ces fonctions.

a) Propriétés anti- et pro-thrombotiques (*figure I.9*)

Les cellules endothéliales s'opposent à l'activation et à l'agrégation des plaquettes en :

- empêchant l'adhésion des plaquettes à l'endothélium intact à cause du recouvrement de la membrane de l'endothélium par des protéoglycanes de type héparane sulfate ;
- sécrétant la PGI₂ qui inhibe l'adhésion des plaquettes ;
- sécrétant du NO qui agit de concert avec la PGI₂ ;
- limitant la taille des agrégats plaquettaire à la surface de l'endothélium grâce à l'activité ADPase de celui-ci (Demuth et al., 1995).

Le NO et la PGI₂ augmentent le contenu en ATP des plaquettes, ce qui empêche leur agrégation. Ces deux molécules sont sécrétées de manière constitutive par les cellules endothéliales. En outre, l'endothélium expose en surface des ectonucléosidases. Ces enzymes hydrolysent l'ATP et l'ADP, deux inducteurs de l'agrégation des plaquettes, en AMP et adénosine.

Après activation des cellules endothéliales induite par des cytokines ou suite à une agression des vaisseaux sanguins, les cellules endothéliales peuvent favoriser l'agrégation des plaquettes en induisant des molécules pro-thrombotiques et en supprimant les mécanismes anti-thrombotiques (Michiels, 2002).

Les cellules endothéliales activées participent à l'activation et à l'agrégation des plaquettes en :

- retirant l'agent vasodilatateur et anti-agrégant, l'adénosine circulante ;
- sécrétant le facteur von Willebrand qui interagit avec une glycoprotéine de la membrane permettant ainsi l'adhésion des plaquettes à l'endothélium ;
- sécrétant le thromboxane A₂ favorisant l'agrégation plaquettaire en diminuant le taux d'AMP cyclique de ces cellules.

b) Propriétés anti-coagulantes (*figure I.10*)

Les cellules endothéliales s'opposent à la coagulation en :

- exprimant la thrombomoduline (récepteur de la thrombine) à leur surface. Le complexe thrombine-thrombomoduline permet l'activation de la protéine C qui inhibe les facteurs Va et VIIIa de la coagulation par protéolyse ;
- synthétisant la protéine S qui active la protéine C ;
- présentant à leur surface des héparanes sulfate qui accélèrent l'inactivation de la thrombine par l'antithrombine III ;
- permettant l'endocytose médiée par le récepteur et la dégradation du facteur Xa de la coagulation (Demuth et al., 1995).

Au repos, les cellules endothéliales maintiennent la fluidité du sang par plusieurs voies qui empêchent la coagulation. La plus importante de toutes est la voie des protéines C et S. Cette voie est initiée quand la thrombine interagit avec le récepteur à la thrombomoduline en surface des cellules endothéliales, facilitant ainsi l'activation de la protéine C. La protéine C activée, inactive deux cofacteurs nécessaires à la coagulation : les facteurs VIIIa et Va. Pour être pleinement active, la protéine C doit former un complexe avec la protéine S synthétisée par les cellules endothéliales. En plus, la surface des cellules endothéliales est riche en glycosaminoglycans de type héparine fournissant le principal site pour l'inactivation de la thrombine par la présence de l'antithrombine liée à ces glycosaminoglycans (Michiels, 2002).

De plus, les cellules endothéliales participe à la fibrinolyse par :

- la libération des activateurs du plasminogène de type urokinase et tissulaire (u-PA et t-PA), permettant ainsi la transformation du plasminogène en plasmine (assure la dégradation du thrombus par attaque enzymatique du réseau de fibrine) ;
- la sécrétion de la PGI₂ (amplifie l'activité fibrinolytique du t-PA) (Demuth et al., 1995).

Le t-PA est sécrété constitutivement alors que l'urokinase est seulement synthétisée par les cellules endothéliales activées. L'inhibiteur naturel des activateurs du plasminogène, le PAI-1 est lui aussi constitutivement sécrété par les cellules endothéliales.

c) Régulation du tonus vasculaire

Les cellules endothéliales régulent la contraction des cellules musculaires lisses par la production de substances vasorelaxantes comme le NO et des substances vasocontracturantes comme l'ET-1 (*figure I.11*). Elles sont notamment sensibles aux forces de cisaillement induites par une augmentation de la pression sanguine, libérant alors du NO qui favorisera la vasodilatation.

De plus, elles influencent la structure de la paroi artérielle en produisant des facteurs qui stimulent ou inhibent la croissance des cellules musculaires lisses vasculaires (Demuth et al., 1995).

d) Régulation des réactions inflammatoires

L'inflammation est une réponse de protection localisée due à une infection ou à une altération tissulaire. Elle est caractérisée par quatre termes : douleur, chaleur, rougeur et gonflement. L'inflammation implique toute une série d'événements : dilatation des artérioles, capillaires et veinules, exudation des fluides, migration des leucocytes au lieu d'inflammation. Les leucocytes et les cellules endothéliales sont les principaux acteurs cellulaires des réactions inflammatoires (Michiels, 2002).

Les cellules endothéliales régulent les réactions inflammatoires en :

- modifiant l'expression de leurs antigènes de surface, notamment les molécules d'adhésion qui soutiennent la liaison des globules blancs à l'endothélium ;
- synthétisant et sécrétant des facteurs de croissance et des cytokines ;
- produisant des médiateurs lipidiques qui de manière générale modulent les effets des facteurs de croissance et les cytokines (Demuth et al., 1995).

Les cytokines sont des protéines de faible poids moléculaire participant à la réponse immune. Elles induisent le phénotype pro-inflammatoire des cellules endothéliales. Une fois que ces cellules sont activées par le TNF- α ou l'IL-1, le PAF est sécrété et active l'agrégation des plaquettes. En outre, il y a augmentation de l'expression de nombreux gènes pro-inflammatoires codant pour des cytokines, chémokines et molécules d'adhésion. Ce sont des signaux pour le recrutement et l'extravasation des leucocytes au niveau des sites endommagés (Michiels, 2002).

e) Modification du métabolisme des lipoprotéines

Les cellules endothéliales peuvent modifier le métabolisme des lipoprotéines de la paroi vasculaire de trois façons :

- en participant à leur métabolisme plasmatique ;
- en régulant leur transport entre le sang et l'espace sous-endothélial ;
- en modifiant les LDL (Demuth et al., 1995).

2.2 Réponse des cellules endothéliales au stress hypoxique

En réponse à une hypoxie, les cellules ont développé des mécanismes leur permettant de survivre notamment via une réorganisation du métabolisme énergétique et l'activation de la néoangiogenèse.

L'hypoxie affecte la physiologie des cellules endothéliales de différentes façons et régule la synthèse des protéines ainsi que la libération des substances vasoactives impliquées dans le remodelage vasculaire et du tissu environnant (Faller, 1999). Les cellules endothéliales sont capables de ressentir la pression en oxygène ainsi que de discriminer et de répondre à des petites différences en pression d'oxygène. Ainsi, les cellules endothéliales peuvent répondre à l'hypoxie en sécrétant des protéines vasoactives comme l'endothéline-1 (ET-1) et le PDGF-BB, peptide mitogénique produit par les cellules endothéliales causant la prolifération des cellules musculaires lisses et puissant vasoconstricteur paracrine de ces cellules. Il s'ensuit un épaississement de la paroi vasculaire.

Les conditions hypoxiques augmentent fortement l'ARNm du PDGF-B dans les cellules endothéliales humaines en augmentant le taux de transcription de ce gène. Par contre le taux de transcription ainsi que les niveaux d'ARN d'un certain nombre d'autres gènes encodant des facteurs de croissance comme le TGF- β , le PDGF-A, le bFGF, ne sont pas affectés.

Par ailleurs, les basses pressions en oxygène augmentent l'expression du gène encodant la protéine iNOS. L'inflammation est l'une des premières réponses des cellules endothéliales à l'hypoxie, l'équilibre entre les activateurs et les inhibiteurs de la réponse inflammatoire est un indicateur de l'adaptation de ces cellules à l'hypoxie (Akman et al., 2001). La réponse induite par l'hypoxie augmente la production par les cellules endothéliales de cytokines et chémokines, du facteur tissulaire et du PAI-1.

Les réponses d'adaptation à l'hypoxie sont régulées au niveau transcriptionnel. L'activation du facteur de transcription HIF-1 (hypoxia inducible factor-1, facteur activé en hypoxie) est le reflet de cette adaptation. HIF-1 active l'expression de gènes spécifiques, ce qui entraîne l'augmentation du transport du glucose, la production d'enzyme glycolytique et l'angiogenèse (voir ci-dessous).

3.Hypoxie

La survie des espèces animales dépend totalement de l'oxygène. Sans un apport suffisant en oxygène, ces espèces sont appelées à mourir. Elles ont alors développé des mécanismes pour palier à une éventuelle diminution d'oxygène, ou hypoxie, comme l'augmentation du métabolisme anaérobie, l'augmentation du nombre de globules rouges et l'initiation de l'angiogenèse. L'hypoxie induit entre autres l'activation du facteur de transcription HIF-1 qui régule l'expression des protéines impliquées dans ces réponses adaptatives.

3.1 HIF-1

HIF-1 est un facteur de transcription constitué des sous-unités HIF-1 α de poids moléculaire de 120 kDa et ayant une longueur de 826 aminés, et HIF-1 β ou ARNT, de 94 kDa avec 789 acides aminés (Berra et al., 2000). Ces deux sous-unités appartiennent à la famille des facteurs de transcription contenant les domaines bHLH (basic helix-loop-helix) et PAS (Per-ARNT-Sim) dans la partie amino-terminale (*figure 1.12*). HIF-1 β est constitutivement exprimé, et constitue la sous-unité de plusieurs protéines hétérodimériques contenant les

domaines bHLH et PAS. ARNT peut notamment interagir avec Ahr tandis que HIF-1 α est spécifique de la réponse à l'hypoxie.

A l'intérieur du complexe HIF-1, les domaines HLH et PAS interviennent dans la dimérisation du facteur tandis que les domaines basiques lient l'ADN au niveau des HRE (hypoxia responsive element) caractérisés par la séquence consensus 5' RGGTG3' (Semenza, 2000).

HIF-1 α contient deux domaines de transactivation dans sa partie carboxy-terminale, le premier, TAD-N, comprend les acides aminés allant de la position 531 à la position 575, le second, TAD comprend les acides aminés 813-826. Ces deux domaines sont séparés par un domaine inhibiteur de la transcription. Il existe en outre un domaine responsable de la dégradation (ODD) de la protéine HIF-1 α en normoxie, compris entre les acides aminés 401 et 603.

3.2 Régulation de HIF-1

En normoxie, HIF-1 α est une protéine cytosolique dont la demi-vie est d'environ cinq minutes et HIF-1 α est rapidement dégradé par le système ubiquitine-protéasome. Cette dégradation est médiée par le domaine ODD. En normoxie, HIF-1 α est hydroxylé au niveau de la proline située en position 564 par une enzyme nommée HIF-PH (HIF-Propyl hydroxylase) dont l'activité dépend de l'oxygène. Cette proline hydroxylée fournit le site de reconnaissance pour la pVHL (protéine de Von Hippel-Lindau). En hypoxie, HIF-1 α est stabilisé par l'absence d'hydroxylation post-transcriptionnelle au niveau de la proline 564. HIF-1 α stabilisé, est transloqué vers le noyau par un processus dans lequel interviennent des signaux de localisation spécifiques, et dimérise avec ARNT (*figure 1.13*).

L'hypoxie est le principal activateur qui stabilise et régule HIF-1 α . Cette régulation nécessite certains constituants cellulaires. La protéine de Von Hippel-Lindau, composée de 213 acides aminés, est produite par le gène VHL, gène suppresseur des tumeurs. Elle forme un complexe stable avec quatre autres protéines : les élongines B et C, la culline-2 et rbx-1 (de Paulsen et al., 2001). La pVHL est une sous-unité du complexe multimérique E3 ubiquitine ligase. Elle contient un site de liaison au niveau du domaine ODD de HIF-1 α quand celui-ci est hydroxylé sur la proline 564. Sa liaison à la région ODD de HIF-1 α , en normoxie, entraîne la dégradation de HIF-1 α par le système ubiquitine-protéasome.

ERK 1 et ERK2 sont aussi impliquées dans l'activation de HIF-1 en hypoxie dans les cellules endothéliales. (Minet et al., 2000) ont montré que ces kinases étaient activées en hypoxie. En effet, l'inhibition de ces deux kinases engendre une inhibition de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 en condition d'hypoxie mais n'exerce aucun effet ni sur la stabilité de HIF-1 α ni sur la capacité de liaison de HIF-1 à l'ADN. ERK 1 activée par hypoxie est capable de phosphoryler directement le domaine carboxy-terminal de HIF-1 α et ainsi de réguler son activité transactivatrice.

3.3 Gènes cibles de HIF-1

L'expression d'un grand nombre de gènes est régulée par l'hypoxie. HIF-1 active la transcription des gènes encodant des protéines qui contribuent à l'augmentation de la disponibilité en oxygène ou facilitant l'adaptation métabolique à l'hypoxie (*tableau I.4*).

Outre le VEGF, l'hypoxie stimule, entre autres, l'expression de l'érythropoïétine, glycoprotéine hautement glycosylée de 34 kDa qui est une hormone synthétisée au niveau du rein et acheminée jusqu'à la moelle osseuse pour y activer les précurseurs des globules rouges augmentant ainsi le nombre de ces cellules et facilitant le captage d'oxygène. Une séquence enhancer en position 3' (5'-TACGTGCT-3') du promoteur de l'EPO sensible à l'hypoxie est la séquence HRE à laquelle se fixe HIF-1.

D'autres gènes sont régulés par HIF-1 comme les enzymes glycolytiques : aldolase A, hexokinase, fructokinase L, pyruvate kinase, énoïase. Les gènes de transporteurs de glucose, Glut-1 et Glut-3, sont aussi régulés par HIF-1. L'induction de ces gènes permet une entrée accrue du glucose dans la cellule et son utilisation pour la production de l'ATP de manière indépendante de l'oxygène via la glycolyse.

4.CONCLUSION

L'angiogenèse a lieu dans différentes conditions pathologiques et en particulier lors du développement des tumeurs.

La transition vers une vascularisation active est à ce jour mal comprise, mais le processus est souvent déclenché en condition d'hypoxie, ce qui conduit à l'augmentation de l'expression de certaines protéines comme le VEGF. Ce VEGF stimule la croissance des cellules endothéliales qui produisent alors plusieurs activateurs angiogéniques entraînant le phénomène d'invasion du tissu hypoxique par les cellules endothéliales (*tableau I.5*).

But du mémoire

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la néo-angiogenèse est un processus nécessaire à la croissance tumorale. Elle permet en effet un apport de nutriments et d'oxygène aux zones centrales de la tumeur. De plus, elle apporte une voie de sortie aux cellules métastatiques.

La néo-angiogenèse tumorale est principalement initiée par le VEGF libéré par les cellules tumorales. En effet, lorsque la tumeur grossit, ces cellules deviennent hypoxiques car situées au-delà de la limite de diffusion de l'oxygène. Ces conditions hypoxiques résultent en l'activation du facteur de transcription HIF-1 dont l'un des gènes cibles est le VEGF. Ce facteur de croissance diffuse alors vers les capillaires adjacents où il active les cellules endothéliales, induisant leur migration et leur prolifération conduisant ainsi à la formation de nouveaux capillaires. Les cellules endothéliales sont donc les acteurs cellulaires principaux du processus d'angiogenèse.

Si la réponse des cellules tumorales à l'hypoxie commence à être bien décrite, celle des cellules endothéliales reste peu étudiée. Bien que la présence du VEGF constitue certainement un facteur majeur de l'initiation de l'angiogenèse, la réponse directe à l'hypoxie des cellules endothéliales migrantes joue probablement également un rôle.

Le but de ce mémoire était donc de comprendre comment l'hypoxie peut moduler le processus d'angiogenèse c'est-à-dire d'étudier si l'hypoxie à elle seule peut induire la prolifération des cellules endothéliales et /ou si elle peut influencer celle induite par le VEGF.

Afin de réaliser ce travail, nous avons choisi d'utiliser les HUVEC-C, cellules endothéliales dérivées de la veine ombilicale humaine, disponibles à l'ATCC. Ces cellules présentent l'avantage de rester des cellules endothéliales bien différenciées tout en ayant un potentiel prolifératif élevé.

Le travail s'est divisé en deux parties. La première a consisté en une caractérisation simple de la réponse transcriptionnelle de ces cellules à l'hypoxie en vérifiant l'activabilité du facteur de transcription HIF-1. A ce dessein, nous avons suivi l'accumulation de la sous-unité HIF-1 α en hypoxie.

La deuxième partie a été de déterminer dans quelle mesure l'hypoxie pourrait influencer le comportement de type « pro-angiogénique » des cellules endothéliales induit par le VEGF mais aussi par elle-même. Nous avons ainsi suivi l'expression et la fonctionnalité des récepteurs au VEGF, la prolifération des cellules, l'expression des intégrines α_v et β_3 ainsi que la sécrétion de la MMP-2.

Matériel

et

Méthodes

MATERIEL ET METHODES

CULTURE CELLULAIRE

2.1 Culture des cellules HUVEC-C

a) Caractéristiques de la souche HUVEC-C

Souche des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine.

b) Milieux de culture et solutions

- Milieu F12k + sérum : milieu F12k (Nutrient Mixture (Kaighn's Modification), Gibco, Paisley, Grande-Bretagne) enrichi de 10 % de sérum de veau foetal (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne).
- Antibiotiques (optionnel) :
 - Pénicilline G : 50 U/ml (BioWhittaker Europe, Verviers, Belgique).
 - Streptomycine : 50 µg/ml (BioWhittaker Europe, Verviers, Belgique).
- Hepes 10 mM
- Facteurs de croissance :
 - Héparine (Sigma H 3149) 0,1 mg/ml
 - Supplément de croissance des cellules endothéliales (Sigma E-0760) 40 µg/ml
- Trypsine-EDTA : solution de trypsine à 0,5 g/l et EDTA à 0,2 g/l préparée dans une solution de Puck (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne)

c) Repiquage des cellules HUVEC-C

Les milieux et solutions utilisés doivent être préchauffés à 37°C. Les cellules HUVEC-C sont cultivées dans des boîtes de cultures de 75 cm² (T75, Costar, Corning, New York, USA). Le milieu de culture est décanté et les cellules sont rincées avec 5 ml de milieu de rinçage.

Ensuite, les cellules sont détachées au moyen de 2 ml de trypsine +EDTA (chélateur d'ions calcium) que l'on laisse agir environ deux min. La trypsine a pour but de détacher les cellules de la boîte. Son action est inhibée par l'ajout de 5 ml de milieu F12k enrichi de 10 % de sérum sans facteurs de croissance. La suspension cellulaire est ensuite transvasée dans un tube stérile de 10 ml et centrifugée pendant 5 min à 1000 rpm.

Après centrifugation, le surnageant est décanté et le culot resuspendu dans 5 ml de milieu F12k complet et les cellules sont réparties, après comptage à l'aide de la cellule de Neubauer, selon la densité voulue, dans des boîtes de culture (T75 ou T25) ou dans des plaques multipuits. Les boîtes sont ensuite placées dans une étuve (5 % de CO₂). Quand les cellules sont à nouveau confluentes, elles sont repiquées selon la même procédure.

2.2 Incubation sous hypoxie

2.2.1 Matériel

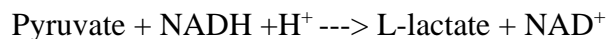
- Milieu : le milieu utilisé pour les incubations sous hypoxie est le milieu CO₂ indépendant (Gibco, Paisley, GB) auquel on ajoute des antibiotiques (Pénicilline : 50 U/ml ; Streptomycine : 50 µg/ml) et de la L-glutamine 36,1mg/500ml (Sigma, St Louis , USA). Selon les incubations, 2 ou 10 % de sérum lui sont ajoutés.

2.2.2 Méthode

Le milieu des cellules est décanté et remplacé par du milieu CO₂ indépendant. Le volume de milieu est de 2 ml/ puits pour les plaques 24 puits, 5 ml pour les boîtes T25 et 10 ml pour les boîtes T75. Les boîtes sont ensuite ouvertes et placées dans un incubateur contenant de l'azote et placé à 37°C. Des boîtes contrôles sont incubées dans les mêmes conditions mais en normoxie (atmosphère normale).

2.3 Libération de la LDH

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme cytoplasmique présente dans tout type cellulaire. Cette enzyme est libérée dans le surnageant quand la membrane plasmique est endommagée. Cette libération sert d'indicateur de la perte de viabilité. Le dosage est fondé sur la réaction suivante :



La première étape est la réduction du NAD⁺ en NADH + H⁺ par la LDH. La seconde étape est le transfert des protons du NADH + H⁺ vers le sel de tétrazolium qui pourra être détecté en spectrophotométrie (*figure II.1*).

2.3.1 Matériel

- Kit utilisé : Cytotoxicity Detection Kit (LDH) (Roche, Manheim, Allemagne)
- Milieu CO₂ indépendant (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne) auquel on a ajouté :
 - 10 % ou 2 % de sérum de veau foetal
 - 10 % de Triton X-100 (Sigma, St-Louis, USA)
- Milieu CO₂ indépendant sans sérum

2.3.2 Méthode

Les cellules sont ensemencées dans des plaques 24 puits à une densité de 40.000 cellules par puits (Costar, Corning, New York, USA). Le lendemain, le milieu de culture est remplacé par du milieu CO₂ indépendant pour incubation en hypoxie. D'autres boîtes sont incubées de la même façon mais en normoxie. Ensuite, le surnageant est décanté et transvasé dans des eppendorfs. Dans les puits sont ajoutés 200 µl de milieu CO₂ indépendant contenant 10 % de Triton X-100 afin de lyser les cellules restées dans le fond du puits. Une incubation de 30 minutes à température ambiante est réalisée. Dans une plaque 96 puits (Costar, Corning, New York, USA), on récolte 100 µl de surnageant (prévoir des doubles de blanc pour le milieu avec ou sans sérum) ou 10 µl de lysat cellulaire dilué dans 90 µl de milieu CO₂ indépendant avec ou sans sérum (prévoir des doubles de blancs correspondant). On ajoute ensuite dans chaque puits 100 µl de la mixture réactionnelle. Puis, on incube pendant 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière et l'on mesure l'absorbance des puits à 490 nm (Ultramark, Biorad).

Le pourcentage de libération de la LDH est calculé suivant la formule :

$$\text{Libération de LDH (\%)} = \frac{(\text{LDH surnageant-blanc}) \times 100}{(\text{LDH surnageant-blanc}) + (10 \times (\text{LDH lysat-blanc}))}$$

2.4 Dosage de MMP-2

Ce dosage est réalisé à l'aide d'un ELISA.

2.4.1 Matériel

- Kit utilisé : Quantikine (R&D System, Minneapolis, USA).

2.4.2 Méthode

Suivant les indications du protocole fourni par R&D System.

2.5 Western Blot

Le western blot est une technique qui permet la mise en évidence, à partir d'un extrait cellulaire, du niveau d'expression de protéines d'intérêt en fonction des différentes conditions d'incubation. Pour la préparation des échantillons, il faut au préalable, lyser les cellules, doser les protéines et préparer les échantillons pour les déposer sur le gel d'électrophorèse.

2.5.1 Lyse des cellules

La lyse des cellules se réalise de façon différente selon la nature de la protéine à détecter. Ainsi, dans le cas où l'on veut détecter une protéine de membrane plasmique, on prendra un tampon de lyse solubilisant également les protéines membranaires (voir point 2.5.1.1/2). Dans le cas d'une protéine intracellulaire, les membranes sont éliminées par centrifugation (voir point 2.5.1.3/4).

2.5.1.1 Matériel

- Bleu de charge : composition :
 - 10 ml spacer buffer
 - 10 ml SDS 20 % (Merck, Darmstadt, Allemagne).
 - 5 ml β -mercaptoéthanol (Flukachemie AG, Buchs, Suisse).
 - 10 ml glycérol (Merck, Darmstadt, Allemagne).
 - 17,5 mg bleu de bromophénol (Janssen Chimica, Belgique).

2.5.1.2 Méthode

Le milieu dans lequel baignent les cellules doit être décanté. 100 μ l de bleu de charge sont ajoutés et les cellules sont raclées. On transvase ensuite dans des eppendorfs en ayant au préalable prélevé un certain volume pour réaliser un dosage de protéines par la méthode inverse. Ces eppendorfs peuvent être conservés à -20°C .

2.5.1.3 Matériel (autre)

- Tampon de lyse : composition :

- Tris 20 mM pH 7,5 (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- KCl 150 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- EDTA 1 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- Triton X-100 1% (Sigma, St Louis ,USA)
- Inhibiteurs de protéases 1 x (Complete protease inhibitor cocktail tablets 25 x, Roche, Manheim, Allemagne)
- Inhibiteurs de phosphatases 1 x à partir d'un stock 25 x :
 - NaVO₃ 25 mM (Sigma, St Louis, USA)
 - PNPP (phospho-nitrophényl phosphate)250 mM (Sigma, St Louis, USA)
 - α-glycérophosphate 250 mM (Sigma, St Louis, USA)
 - NaF 125 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)

2.5.1.4 Méthode

Les cellules sont lysées avec 100 µl de tampon de lyse pour une boîte de culture T25. Le lysat est collecté dans des eppendorfs sur glace et homogénéiser par pipettages successifs. Les échantillons sont ensuite centrifugés 5 minutes à 13000 rpm à 4°C (Heraeus Sepatech, Biofuge 17 RS, rotor 1379). Le surnageant est alors récupéré et placé dans de nouveaux eppendorfs. Les échantillons sont conservés à -20° C. 15 µl sont prélevés pour la quantification des protéines par la méthode de Bradford.

2.5.2 Quantification des protéines par la méthode inverse

2.5.2.1 Matériel

- Kit utilisé : Plus One 2-D Quant Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Grande-Bretagne)

2.5.2.2 Méthode

Selon les indications du protocole fourni par Amersham.

2.5.3 Quantification des protéines par la méthode de Bradford

2.5.3.1 Matériel

- Colorant Bradford (Bio-Rad Laboratories, Munich, Allemagne) : le colorant est dilué 5 x dans de l'eau et la solution filtrée
- Étalon albumine (sigma, St Louis, USA) stock 2,5 µl pour 5 mg
- Blanc étalon (2,5 µl d'eau)
- Blanc échantillon (= tampon de lyse)

2.5.3.2 Méthode

Pour chaque test, à 1 ml de la solution de colorant, est ajoutée de 30 secondes en 30 secondes une quantité donnée de protéines à doser (par exemple 5 µl). La réaction se fait pendant 5 minutes et l'absorbance est ensuite lue (de 30 secondes en 30 secondes) au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm.

La concentration en protéines de l'échantillon est calculée selon la formule suivante :

$$\frac{(\text{moyenne test-moyenne blanc}) \times \text{volume d'échantillon } (\mu\text{g}/\mu\text{l})}{(\text{moyenne étalon-moyenne blanc étalon})}$$

2.5.4 Préparation des échantillons pour le gel d'électrophorèse

2.5.4.1 Matériel

- Bleu de charge : composition voir 2.5.1.1

2.5.4.2 Méthode

On prélève la quantité nécessaire d'extraits cellulaires pour obtenir 20 µg de protéines à laquelle on ajoute un volume correspondant d'eau pour faire un volume total de 20 µl. Les échantillons sont chauffés pendant 3 min à 100°C, puis centrifugés à 13000 rpm pendant une minute.

2.5.5 Électrophorèse

2.5.5.1 Matériel

- Gel NuPage 10 % Bis-Tris Gel (Invitrogen, Carlsbad, USA).
- Cuve (Invitrogen, Carlsbad, USA).
- Étalon SeeBlue (Invitrogen, Carlsbad, USA)
- Membrane PVDF Transfer Membrane (Amersham Pharmacia Biotech, UK)
- Papier Wattman (Macherey-Nagel, Allemagne)
- Tampon Mops (Invitrogen Carlsbad, USA) dilué 20 x
- Antioxydant NuPage (Invitrogen)
- Tampon Mops + Antioxydant NuPage composition pour 1 l :
 - 200 ml de tampon MPOS dilué 20 x
 - 500 µl Antioxydant NuPage
- Tampon de transfert 200 ml (composition voir *tableau II.1*)
- Méthanol (Merck, Damstadt, Allemagne).

2.5.5.2 Méthode

a) Migration

Au préalable, le peigne et la languette du gel sont retirés. Le gel est monté dans la cuve, la plus petite plaque vers l'intérieur. Le tampon Mops dilué 20 x est ajouté à l'extérieur du gel et le tampon Mops + antioxydant NuPage à l'intérieur. Les échantillons sont chargés dans les puits et on fait migrer pendant 50 minutes à 200 V. A la fin de la migration, les gels sont prélevés.

b) Transfert

Pour un gel, on découpe une membrane de transfert de dimensions 7 cm sur 8,5 cm et 4 papiers Wattman de même dimension. La membrane est trempée 30 secondes dans du méthanol puis dans le tampon de transfert dont la composition est reprise dans le *tableau II.2*. Le gel et la membrane sont assemblés dans la cuve de transfert selon le schéma présenté à la *figure II.2*.

On ajoute le tampon avec 10 % de méthanol à l'intérieur du système sandwich et de l'eau distillée autour. Le transfert se fait à 30 V pendant 2h30.

2.5.6 Traitement de la membrane

2.5.6.1 Matériel

- Solution stock de TBS 10 x composition pour 1 l :
 - 24,22 g TRIS (ICN Biomedicals, Ohio, USA)
 - 80,06 g NaCl (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - (pH 7,6).
- Solution TBS + Tween 20 (0.1%) (Sigma, St Louis,USA)
- Solution TBS-Tween 20 (0.1 %) + Gloria (Nestlé, Bruxelles, Belgique) (5 %)
- Solution TBS-Tween 20 (0.07 %)
- Solution TBS-Tween 20 (0.07 %) + 5 % Gloria + 5 % BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma, St Louis, USA).
- Anticorps primaire :
 - Anticorps de souris anti-HIF-1 α (BD Biosciences Transduction Laboratories, USA) dilué 1000x
 - Anticorps de souris anti-intégrine α_v (BD Biosciences Transduction Laboratories,USA) dilué 1000x
 - Anticorps de souris anti-intégrine β_3 (BD Biosciences Transduction Laboratories,USA) dilué 1000 x
 - Anticorps de souris anti-ERK total (BD Biosciences Transduction Laboratories, USA) dilué 1000 x
 - Anticorps de lapin anti-Phospho-ERK (Cell Signaling) dilué 1000 x
 - Anticorps de chèvre anti-flt-1 (R&D Systems, Grande-Bretagne) dilué 2000 x
 - Anticorps de souris anti- α -tubuline (InnoGenex, San Ramon, USA) dilué 1000 x
- Anticorps secondaire :
 - Anticorps anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Grande-Bretagne) dilué 2000 x
 - Anticorps anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Grande-Bretagne) dilué 2000 x
 - Anticorps anti-Ig G de chèvre couplé à la peroxydase (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Grande-Bretagne) dilué 2000 x
- Kit ECL Amersham pour la révélation

2.5.6.2 Méthode

Le traitement de la membrane permet la diminution des liaisons non spécifiques des anticorps par saturation de la membrane avec des protéines du lait ou de la BSA. La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps spécifique dirigée contre la protéine d'intérêt. La détection se fait de manière indirecte avec un anticorps secondaire couplé à une Horseradish peroxidase.

Au préalable, le sandwich doit être démoulé et les excès de membrane découpés. La membrane va être placée dans un biberon, le côté portant les protéines vers l'intérieur. Les différentes étapes de révélation sont effectuées selon la protéine d'intérêt à détecter (voir *tableau II.2*). La révélation se réalise enfin grâce à la lumière émise par la peroxydase en présence de son substrat.

2.6 Immunofluorescence

Cette technique permet la localisation des protéines dans une cellule, suite à l'utilisation d'anticorps primaires spécifiques dirigés contre la protéine d'intérêt.

Ces anticorps primaires sont eux-mêmes détectés grâce à des anticorps secondaires anti-immunoglobuline couplés à des fluorochromes. L'observation se réalise à l'aide d'un microscope confocal.

2.6.1 Matériel

- Plaques 24 puits (Costar, Corning, New York, USA)
- Lamelles couvre-objet de 13mm de diamètre (Vel, Knittel Glaser, Allemagne).
- Lames porte-objet de 2.6x7.6 cm (Vel, Knittel Glaser, Allemagne).
- PBS (Phosphate Buffer Saline) préparation pour 1 l :
 - 20 ml de tampon phosphate pH 7,4 (concentration stock 0,5 M)
 - 9 g de NaCl
 - Porter à volume avec de l'eau distillée
- PBS-BSA : peser 2g de BSA à dissoudre dans 100 ml de PBS
- PBS + Triton X-100 1 % : diluer 500 µl de Triton X-100 (Merck, Darmstadt, Germany) dans 50 ml de PBS et mélanger sur agitateur magnétique
- PBS -PFA 4 % (Paraformaldéhyde Merck, Darmstadt, Allemagne) : faire chauffer 2 g de PFA par 50ml de PBS à 80°C sous hotte puis rajuster le volume avec de l'eau distillée.
- Anticorps primaire centrifugé puis dilué dans du PBS-BSA 2 % :
 - HIF-1 α (BD Transduction Laboratories, Lexington, USA) dilué 100 x
 - Flt-1 (R&D Systems, Grande-Bretagne) dilué 40 x
 - KDR (R&D Systems, Grande-Bretagne) dilué 20 x
 - Glut-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) dilué 100 x
 - Intégrine α_v (BD Biosciences, USA) dilué 125 x
 - Intégrine β_3 (BD Biosciences, USA) dilué 125 x
- Anticorps secondaire : Anticorps anti-Ig G de souris ou de chèvre couplé à l'Alexa 488 dilué 500 x dans du PBS-BSA 2% (Molecular Probes, USA).
- TOPRO-3 : diluer 80 x l'aliquot de TOPRO-3 dans de la RNase 2 mg/ml de PBS. La RNase va favoriser le marquage uniquement du noyau et éviter ainsi que toute la cellule ne soit marquée en digérant les ARN présents dans la cellule.
- Mowiol (Calbiochem) : milieu de montage.

2.6.2 Méthode

Les cellules sont repiquées dans des boîtes 24 puits, dont les puits contiennent des lamelles couvre-objet, pendant 24 heures dans du milieu F12k complet et ensuite incubées sous hypoxie / normoxie pendant 4, 8 ou 16 heures. Après incubation, les cellules sont fixées avec du PBS-PFA 4 % et ce pendant 10 minutes. Ensuite, elles sont rincées 3 x avec du PBS et perméabilisées avec du PBS-Triton 1 % (seulement pour HIF-1 α qui est nucléaire) pendant 5 minutes. De nouveau les cellules sont rincées du PBS-BSA 3 fois 5 minutes. Ensuite, les puits sont décantés et les cellules marquées spécifiquement en les incubant en présence de l'anticorps primaire durant toute une nuit à 4°C en chambre humide (grande boîte de Pétri au fond de laquelle on met du papier buvard et l'on mouille avec de l'eau distillée et l'on y place du parafilm sur lequel sera déposée la goutte d'anticorps). 30 µl de la solution d'anticorps sont déposés, la lamelle couvre-objet est délicatement retournée sur la goutte de façon que les cellules sont face à l'anticorps. Après cette incubation, les lamelles couvre-objet sont replacées dans la plaque 24 puits en les retournant de sorte que les cellules se retrouvent vers le haut. Les lamelles sont rincées 3 x au PBS-BSA 2 % on réalise ensuite l'incubation avec l'anticorps secondaire approprié pendant une heure à température ambiante en chambre humide et à l'abri de la lumière afin de conserver le fluorochrome. Après cette heure d'incubation, 3 rinçages au PBS-BSA sont effectués. A la fin du troisième rinçage, les noyaux

sont marqués au ToPro 3 par une incubation pendant 30 minutes à température ambiante, à l'abri de la lumière. Les lamelles couvre-objet sont rincées 3 fois au PBS et finalement montées sur des lames porte-objet sur lesquelles une goutte de mowiol a été déposée. Les lames peuvent ensuite être observées au microscope confocal (Leica, Heidelberg, Allemagne).

2.7 Incorporation de la thymidine tritiée

Cette technique permet de déterminer le nombre de cellules qui entrent en mitose. Pendant la division cellulaire, l'incorporation de nouveaux nucléotides est nécessaire à la synthèse de l'ADN. Ainsi, en incubant des cellules avec de la thymidine tritiée, la quantité de radioactivité associée à la population des cellules sera d'autant plus importante que l'activité mitotique des cellules n'est intense. Le comptage de la radioactivité est réalisé après rinçages et précipitation des protéines à l'acide trichloroacétique.

2.7.1 Matériel

- Milieu : milieu CO₂ indépendant (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne) auquel on a rajouté de la L-Glutamine (Sigma) et des antibiotiques et contenant ou non 2 % de sérum.
- Thymidine tritiée (Amersham Life Science ; 1 mCi/ml)
- VEGF (R&D Systems, USA)
- Plaque 24 puits (Costar, Corning, New York, USA).
- NaOH 0,5 N (Merck, Allemagne)
- HCl 0,5 N (Merck, Allemagne)
- Acide trichloroacétique (TCA) 10 % (VWR, Darmstadt, Allemagne)
- Ethanol 70 % (Merck, Darmstadt, Allemagne)

2.7.2 Méthode

Les cellules sontensemencées dans des boîtes 24 puits selon la densité voulue. 24 heures après, les cellules sont incubées en hypoxie ou en normoxie dans du milieu CO₂ indépendant contenant de la thymidine (6 µl/puits correspondant à 1µCi/ml) pendant 24 heures.

Quatre conditions sont étudiées :

- milieu sans sérum.
- milieu sans sérum contenant du VEGF.
- milieu contenant du sérum.
- milieu contenant du sérum et du VEGF.

Des puits doivent être prévus pour les blancs c'est-à-dire les cellules incubées dans un milieu ne contenant pas de thymidine.

Précipitation et mesure de la radioactivité associée à l'ADN

Après incubation, les cellules sont rincées deux fois avec 1 ml de PBS, une fois avec du TCA 10 % puis avec 1 ml d'éthanol 70 %. Les lavages au PBS permettent d'éliminer la thymidine absorbée à la surface des cellules. Les lavages avec le TCA et l'éthanol permettent de précipiter les protéines dont celles qui sont associées à l'ADN. Les protéines sont ensuite hydrolysées dans 175 µl de NaOH (0,5 N) pendant 45 minutes. On homogénéise ensuite l'hydrolysate et l'on rajoute un équivalent de HCl 0,5 N afin de neutraliser l'hydrolysate. Après homogénéisation, 300 µl sont récoltés dans une fiole de comptage et dilués dans 5 ml de liquide scintillant (Aqualuma, Lumac, Pays-Bas). Le comptage de la radioactivité est réalisé

dans un compteur à scintillations (Modèle 2100 TR Packard Instrument Company, Meriden, USA) et les résultats sont exprimés en cpm (coups par minute). Un blanc est également réalisé en mesurant la quantité de [³H]-thymidine contaminante, c'est-à-dire associée à la surface cellulaire mais non incorporée. Ceci se fait en ajoutant 0,5 ml de milieu contenant [³H]-thymidine (1 µCi/ml) sur des cellules, avant de les rincer et de les lyser immédiatement. Ces valeurs sont soustraites des valeurs de cpm obtenues pour les tests.

2.8 Mise en évidence de l'activation du facteur de transcription AP-1 par dosage colorimétrique

Pour suivre l'activation de AP-1, un dosage colorimétrique a été utilisé. Le test se base sur la capacité du facteur de transcription AP-1 activé, à se fixer sur sa séquence consensus d'ADN (*figure II.3*). Le facteur lié est ensuite détecté à l'aide d'un anticorps qui lui est spécifique.

2.8.1 Extraction nucléaire

2.8.1.1 Matériel

- HB 10 x composition pour 100 ml :
 - 200 mM HEPES (Janssen Chimica, Belgique) à pH 7,9 (238,3 g/mol) :47,5 g
 - 50 mM NaF (Merck, Darmstadt, Allemagne) (41,99 g/mol) : 2,42 g
 - 10 mM Na₂MoO₄ (Sigma, USA) (241,9 g/mol) : 0,37 g
 - mettre à volume avec de l'eau
- HB 1 x : diluer 10 fois le HB 10 x dans de l'eau
- Tampon de lyse (0,5 %) composition pour 100 ml :
 - 10 ml HB 10 x
 - 500 µl NP-40 (Nonidet P-40) (Sigma, USA)
 - 89,5 ml eau
- Solution RE composition pour 100 ml :
 - 10 ml HB 10 x
 - 20 ml Glycérol 87 % (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - 70 ml eau
- Solution SA (0,8M NaCl) composition pour 100 ml :
 - 10 ml HB 10 x
 - 20 ml glycérol 87 % (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - 20 ml NaCl 4 M (Merck, Darmstadt, Allemagne) (7,01 g/30 ml eau)
 - 50 ml eau

A préparer fraîchement :

- PBS (à 4°C) composition pour 1 l :
 - NaCl(Merck, Darmstadt, Allemagne) 9 g
 - Tampon phosphate 20 ml pH 7,4
 - Mettre à volume avec de l'eau
- RE complet pour 1 ml, on ajoute au RE stock :
 - 40 µl de PIC (Roche, Allemagne)
 - 40 µl de PIB (Roche, Allemagne) composition pour 10 ml :
 - 1,25 ml de NaF 1 M
 - 250 µl de NaVO₃ 1 M

- 2,5 ml de PNPP 1M
- 2,5 ml de α -glycérophosphate 1 M
- 3,5 ml d'eau
- SA complet pour 1 ml, on ajoute au SA stock :
 - 40 μ l de PIC
 - 40 μ l de PIB
- PBS +NaF 5 mM +Na₂MoO₄ 1 mM composition pour 100 ml :
 - 24 mg Na₂MoO₄
 - 21 mg NaF

2.8.1.2 Méthode

Les cellules Huvec-c sont repiquées dans des boîtes de culture T25. Une fois à confluence, le milieu contenu dans ces boîtes de culture est décanté et remplacé par du milieu CO₂ indépendant et il s'ensuit une incubation en hypoxie (temps : 30 minutes et une heure avec ou sans VEGF). Après cette incubation, les boîtes sont rincées une fois avec 3 ml de PBS froid (par T25). Ensuite, un second rinçage est effectué avec 3 ml de PBS + NaF+ Na₂MoO₄ froid. Les cellules sont ensuite incubées pendant 10 minutes sur glace dans 3 ml de HB 1 x. Cette solution est hypotonique et permet le gonflement des cellules. Après ce temps d'incubation, le HB est décanté jusqu'à la dernière goutte et l'on ajoute 200 μ l de tampon de lyse dans le but de claquer les membranes cellulaires. Les cellules sont alors raclées dans ce tampon de lyse et le lysat est récupéré avec pipette dans des eppendorfs sur glace. Ces eppendorfs sont alors centrifugés 30 secondes à 13000 rpm. Le culot contenant les noyaux est resuspendu dans 15 μ l de tampon RE complet et un équivalent de tampon SA complet est ajouté. Cette solution est hypertonique et permet l'extraction des protéines nucléaires vers le tampon. Il s'ensuit une incubation sur roue durant 1 heure en chambre froide. Cette incubation est nécessaire pour éliminer les membranes nucléaires. Une centrifugation de 15 minutes à 13000rpm à 4°C a lieu. A la suite de laquelle, le surnageant est récupéré, aliquoté, dosé par Bradford et peut alors être stocké à -70°C.

2.8.2 Dosage colorimétrique d'AP-1

2.8.2.1 Matériel

- Tampon de binding 3 x composition pour 20 ml :
 - Hepes (Janssen Chimica, Belgique) 6 Mm : 0,0285 g
 - NaCl (Merck, Darmstadt, Allemagne) 24 mM : 0,0281 g
 - EDTA 0,6 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - Glycérol 36 % (Merck, Darmstadt, Allemagne) : 8,28 ml (Stock 87 %)
 - Mettre à pH 7,9
- Tampon de binding complet :
 - 800 μ l de tampon de binding 3 x
 - 8 μ l de Poly dI-dC (Roche, Manheim, Allemagne)
 - 24 μ l de Gloria 10 % (Nestlé, Bruxelles, Belgique)
 - 2,4 μ l de DTT 1 M (Sigma, USA)
 - 1590 μ l d'eau autoclavée
- Tampon de lyse :
 - 500 μ l SA
 - 500 μ l RE
 - 40 μ l PIC
 - 40 μ l PIB

- 1 µl DTT 1M
- PBS bis composition pour 500 ml :
 - 1,5 g de NaCl
 - 10 ml de tampon phosphate
 - mettre à volume avec de l'eau distillée
- PBS bis + Tween 20 0,1 % :
 - 100 ml de PBS bis
 - 100 µl de Tween 20
- PBS bis + BSA 1 % :
 - 100 ml de PBS bis
 - 1g de BSA (Sigma, USA)
- Anticorps primaire polyclonal (Ig G) de lapin anti c-Fos (Santa Cruz, USA)
- Anticorps secondaire de chèvre anti-Ig G de lapin conjugué à la HRP (Roche, Allemagne)
- Solution de coloration TMB (Bio Source, Belgique)
- Solution stop (Bio Source, Belgique)
- Lecteur multi-plaque (Ultramark, Bio-Rad, USA)

2.8.2.2 Méthode

Fixation des lysats cellulaires

Les extraits nucléaires sont dilués dans du tampon de lyse de façon à obtenir 10 µg de protéines par puits et pour un volume final de 20 µl. Ces 20 µl sont déposés dans chaque puits et 30 µl de tampon de binding complet (par puits) est ajouté. L'incubation dure 1 heure sous légère agitation. Les puits sont ensuite lavés 3 x 2 minutes avec 200 µl de PBS bis à Tween 0,1 %. Ces lavages permettent l'élimination des protéines non liées à la séquence ADN d'AP-1.

Fixation de l'anticorps primaire anti c-fos

L'anticorps primaire est dilué 1000 x dans du PBS bis + BSA 1 %. 100 µl d'anticorps (par puits sont déposés). L'incubation se fait pendant une heure à température ambiante. Ensuite, les puits sont rincés 3 x 2 minutes avec 200 µl de PBS bis à Tween 0,1 %.

Fixation de L'anticorps secondaire couplé à la peroxydase

Le conjugué est dilué 1000 x dans du PBS bis à BSA 1 %. 100 µl d'anticorps secondaire (par puits sont déposés). L'incubation se fait pendant une heure à température ambiante. Ensuite, les puits sont rincés 4 x 2 minutes avec 200 µl de PBS bis + Tween 0,1 %.

Réaction colorimétrique

100 µl de solution de coloration TMB sont déposés dans chaque puits. Après une incubation de 10 minutes dans le noir total, 100 µl de solution stop sont ajoutés dans chaque puits. La lecture de l'absorbance se fait à 450 nm.

Résultats
et
Discussion

RESULTATS ET DISCUSSION

Dans la littérature, le facteur de transcription HIF-1 est décrit comme le principal facteur de transcription activé par l'hypoxie. Cette activation est due principalement à la régulation post-traductionnelle de l'expression de la sous-unité HIF-1 α . Il est aussi décrit que les cellules endothéliales répondent à l'hypoxie. La première partie de ce mémoire vise à déterminer si les cellules endothéliales HUVEC-C, modèle cellulaire que nous avons choisi pour notre travail, répondent à l'hypoxie dans les conditions expérimentales utilisées.

3.1 Mise en évidence de la protéine HIF-1 α dans les cellules endothéliales HUVEC-C

Afin de suivre la réponse des cellules endothéliales à l'hypoxie, nous avons évalué la quantité de la protéine HIF-1 α , dans les cellules endothéliales HUVEC-C incubées en normoxie et en hypoxie, par deux techniques : l'immunofluorescence et le western blot. Différents temps d'incubation ont été testés afin de suivre la cinétique de la réponse.

3.1.1 Marquage de HIF-1 α en immunofluorescence

Afin de mettre en évidence l'accumulation de HIF-1 α résultant de l'inhibition de sa dégradation en hypoxie dans nos conditions expérimentales, un marquage de HIF-1 α en immunofluorescence couplé à une observation en microscopie confocale a été réalisé sur des cellules endothéliales HUVEC-C ayant été incubées 4 heures, 8 heures et 16 heures en normoxie ou en hypoxie. Les résultats sont présentés à la *figure III.1*.

Discussion

Les résultats révèlent que la sous-unité HIF-1 α n'est pas présente en normoxie tandis qu'en hypoxie, HIF-1 α stabilisé, s'accumule et est transloqué au niveau du noyau. On remarque que le marquage est plus intense à 4 heures et à 8 heures d'incubation sous hypoxie par rapport à 16 heures. Il semblerait donc que HIF-1 α soit moins abondant après des longs temps d'hypoxie. Ce phénomène a déjà été observé dans les cellules HepG2 (Mottet et al., 2003).

Ces résultats montrent que nous avons donc bien pu mettre en évidence la présence de la protéine HIF-1 α dans les cellules endothéliales HUVEC-C incubées en hypoxie dans nos conditions expérimentales.

3.1.2 Etude de la stabilisation de HIF-1 α par Western blot

Les résultats du marquage en immunofluorescence montrent que HIF-1 α est présent dans les noyaux des cellules HUVEC-C incubées 4 heures, 8 heures et 16 heures en hypoxie. Nous avons voulu confirmer ces résultats en utilisant la technique du Western blot. Des extraits totaux de cellules HUVEC-C incubées pendant 4 heures, 8 heures et 16 heures en normoxie ou en hypoxie ont été préparés et l'abondance de la protéine HIF-1 α a été détectée par Western blot. Les résultats sont présentés à la *figure III.2*.

Discussion

Les résultats révèlent que HIF-1 α n'est pas présent en normoxie quel que soit le temps d'incubation. Cependant, en hypoxie, HIF-1 α s'accumule dès 4 heures d'incubation. Sa quantité ne semble plus augmenter après pour les temps 8 heures et 16 heures. Les résultats du Western blot sont cohérents avec ceux obtenus dans l'expérience précédente. Les cellules HUVEC-C répondent donc bien à l'hypoxie en induisant rapidement la stabilisation de HIF-1. De plus, en comparant la quantité totale de protéines chargées, il semblerait que la quantité de HIF-1 diminue après 16 heures d'incubation sous hypoxie.

3.2 Mise en évidence de la réponse des cellules endothéliales à l'hypoxie vis-à-vis de la problématique de l'angiogénèse

Comme décrit dans l'introduction, l'hypoxie est l'un des stress métaboliques qui est à la base de l'initiation de l'angiogénèse (Carmeliet and Jain, 2000). Dans ce mémoire, la deuxième partie vise à déterminer la réponse des cellules HUVEC-C à l'hypoxie dans le cadre des processus impliqués dans l'initiation de l'angiogénèse. Nous avons ainsi étudié l'effet de l'hypoxie sur la prolifération cellulaire, la présence des récepteurs au VEGF en surface des cellules HUVEC-C, l'expression des intégrines et la sécrétion de la MMP-2.

3.2.1 Expérience préliminaire : détermination de la cytotoxicité de l'incubation sous hypoxie des cellules HUVEC-C

Afin de déterminer si les conditions de temps et de milieu choisies pour l'incubation sous hypoxie des cellules HUVEC-C n'induisaient pas de mortalité de ces cellules, nous avons mesuré la libération de la LDH (lactate déshydrogénase). La libération de la LDH à partir des cellules est une indication de la mortalité cellulaire. En effet, lorsque les conditions sont toxiques pour la cellule, la perméabilité de sa membrane plasmique augmente et il y a libération des constituants cytoplasmiques dans le milieu de culture. Un des constituants est la lactate déshydrogénase (LDH). Plus la libération de la LDH est élevée, plus le taux de mortalité cellulaire est grand.

Les figures III.3 et III.4 présentent l'effet de l'hypoxie en présence ou en absence de 2 % de sérum et/ou de 25 ng/ml de VEGF sur la libération de la LDH par les cellules HUVEC-C. Après 24 heures d'incubation en normoxie ou en hypoxie, les cellules HUVEC-C présentent une mortalité très faible de l'ordre de 5 % quelles que soient les conditions. Par contre, cette mortalité est de l'ordre de 40 % en absence de sérum après 48 heures d'incubation que ce soit en normoxie ou en hypoxie. Ce sont donc probablement les conditions de culture (sans sérum) et/ou la nature du milieu (CO₂ indépendant) qui ne conviennent pas aux cellules. Il n'y a donc pas d'effet proprement dit de l'hypoxie. La présence de 2 % de sérum surtout en présence de 25 ng/ml de VEGF semble protéger les cellules de la perte de viabilité induite dans ces conditions.

Ces résultats montrent que les conditions expérimentales que nous utilisons ne sont pas toxiques pour les cellules durant une fourchette de temps, inférieure à 24 heures, que nous avons maintenue pour le reste du mémoire.

3.2.2 Mise en évidence de la présence des récepteurs au VEGF en surface des cellules HUVEC-C

Nous avons montré que les cellules HUVEC-C répondent à l'hypoxie en induisant l'accumulation de HIF-1 α . L'hypoxie active ainsi HIF-1 et l'un des gènes cibles de HIF-1 est le VEGF, puissant agent mitogène pour les cellules endothéliales. Dans la suite du travail, nous avons donc voulu étudier l'effet de l'hypoxie sur les cellules HUVEC-C en absence mais aussi en présence de ce facteur de croissance. Au préalable, la présence des récepteurs au VEGF en surface de ces cellules a été étudiée. Pour ce faire, deux techniques ont été utilisées, l'immunofluorescence et le Western blot.

a) Mise en évidence de l'expression du récepteur flt-1

Flt-1 peut agir comme inhibiteur de la prolifération de l'ensemble des cellules de l'endothélium, nous avons donc évalué l'expression de ce récepteur à la surface des cellules HUVEC-C, incubées en normoxie ou en hypoxie, en fonction du temps d'incubation dans nos conditions expérimentales.

Marquage du récepteur flt-1 en immunofluorescence

Afin de mettre en évidence la présence du récepteur flt-1 en surface des cellules HUVEC-C dans nos conditions expérimentales, un marquage en immunofluorescence a été réalisé sur des cellules HUVEC-C non perméabilisées, préalablement incubées 4 heures, 8 heures et 16 heures en normoxie ou en hypoxie. Les résultats sont présentés à la *figure III.5*.

Discussion

Les résultats du marquage en immunofluorescence révèlent la présence du récepteur flt-1 dans les cellules HUVEC-C. Il faut cependant noter que lorsqu'on observe les cellules à plus fort grossissement le marquage du récepteur flt-1 ne se présente pas en surface des cellules (voir photo du bas de la *figure III.5*) mais plutôt sous forme de vésicules périnucléaires et /ou de manière diffuse dans le cytoplasme. Cette observation reste inexplicée.

En ce qui concerne l'évolution de l'expression de flt-1 au cours du temps, on remarque que cette expression diminue après 16 heures d'incubation que ce soit en normoxie ou en hypoxie.

L'hypoxie par elle-même ne semble pas avoir d'influence sur cette expression. Le retrait du sérum du milieu de culture pour les incubations en hypoxie ou en normoxie pourrait être une cause possible de cette diminution d'expression.

Mise en évidence du récepteur flt-1 par Western blot

Les résultats obtenus en immunofluorescence mettent en évidence une expression de flt-1 par les cellules endothéliales. Cependant, comme la localisation subcellulaire observée n'est pas celle attendue, nous avons voulu vérifier la présence de ce récepteur dans les HUVEC-C par une autre approche.

Nous avons réalisé un western blot sur des extraits totaux de cellules HUVEC-C incubées 4 heures ou 16 heures en normoxie ou en hypoxie. Les résultats sont présentés à la *figure III.6*.

Discussion

Les résultats obtenus montrent qu'on détecte bien une protéine de 180 kDa avec les anticorps anti-flt-1 dans les extraits totaux de cellules HUVEC-C. Cette protéine est présente à 4 heures, surtout dans les cellules maintenues en normoxie mais son abondance diminue pour les temps plus longs. On ne détecte presque plus de flt-1 après 16 heures d'incubation. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus lorsque flt-1 est révélé par marquage en immunofluorescence.

b) Mise en évidence de la présence du récepteur KDR

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, le récepteur KDR est essentiel pour la prolifération des cellules endothéliales car c'est en agissant sur ce récepteur que le VEGF initie la cascade de transduction du signal aboutissant à l'activation des cellules. Nous avons donc voulu étudier si ce récepteur était présent à la surface du type de cellules endothéliales utilisé dans ce travail.

Marquage du récepteur KDR en immunofluorescence

Afin de mettre en évidence la présence du récepteur KDR en surface des cellules HUVEC-C, un marquage en immunofluorescence a été réalisé sur des cellules non perméabilisées, préalablement incubées 4 heures, 8 heures et 16 heures en normoxie ou hypoxie dans du milieu CO₂ indépendant sans sérum. Les résultats sont présentés à la *figure III.7*.

Discussion

Les résultats du marquage en immunofluorescence révèlent la présence du récepteur KDR en surface des cellules car nous remarquons un liseré (au moins en partie) autour de la membrane des cellules HUVEC-C (voir photo au bas de la *figure III.7*) en normoxie et en hypoxie. Le temps ne semble pas influencer la quantité du récepteur KDR, qui reste la même au cours du temps d'incubation que ce soit en normoxie ou en hypoxie.

Nous avons également réalisé un western blot sur des extraits totaux de cellules incubées dans les mêmes conditions. Cependant, aucune bande n'a été détectée, probablement parce que l'anticorps, bien que indiqué comme adéquat par la firme qui le commercialise, ne fonctionne pas pour détecter KDR dans nos conditions de Western blot.

3.2.3 Mise en évidence de l'activation des MAPK ERK

Les MAP kinases sont une famille de sérine/thréonine kinases activées dans la voie du signal déclenchée par les facteurs de croissance et notamment par le facteur de croissance VEGF. Nous avons précédemment mis en évidence la présence des récepteurs au VEGF à la surface des cellules HUVEC-C. Par la suite, nous avons voulu voir ce qui se passe en aval dans la voie du signal déclenchée par le VEGF. Nous avons donc évalué par un western blot le degré de phosphorylation des MAPK ERK dans les cellules HUVEC-C incubées en normoxie ou en hypoxie en présence et en absence de VEGF.

Etude de l'activation des MAPK ERK par Western blot

Afin de mettre en évidence l'activation des ERK dans nos conditions expérimentales, un western blot a été réalisé sur des extraits de cellules HUVEC-C incubées 0 minute, 5 minutes, 30 minutes, 1 heure et 4 heures en normoxie et en hypoxie, en présence de VEGF. Un contrôle négatif (sans VEGF) a été prévu pour chaque temps afin de mettre en évidence un éventuel effet du milieu. Les cellules ont au préalable été mises au repos pendant 2 heures dans du milieu sans sérum afin d'éteindre la signalisation induite par celui-ci. Afin de détecter l'activation des ERK, un anticorps reconnaissant spécifiquement les formes phosphorylées de ERK1 et ERK2 a été utilisé. Les résultats sont représentés à la *figure III.8*.

Discussion

La quantité de phospho-ERK est faible au temps 0 minute, ce qui indique que les cellules ont bien été mises au repos. La quantité de phospho-ERK augmente de manière importante lorsque les cellules ont été incubées en présence du VEGF au temps 5 minutes et diminue avec des temps de plus en plus longs. Nous n'avons pas pu étudier l'effet de l'hypoxie sur cet effet du VEGF à 5 minutes car une incubation de 5 minutes en hypoxie n'est pas techniquement réalisable. On n'observe pas l'effet de l'hypoxie seule sur la phosphorylation des ERK quel que soit le temps d'incubation.

La quantité de totale des protéines varie de la même façon que celle de l' α -tubuline, ce qui reflète une charge en protéines qui n'est pas tout à fait égale de puits à puits.

Conclusion

Les résultats montrent une activation de la voie de transduction du signal par le VEGF dans les cellules HUVEC-C. Cette activation révélée par la phosphorylation des MAP Kinases est très transitoire.

3.2.4 Mesure du potentiel prolifératif

L'angiogenèse nécessite la prolifération des cellules endothéliales. Un des acteurs initiant cette prolifération est le VEGF. Nos cellules répondent au VEGF (cfr résultats ci-dessus avec phospho-ERK). Dans la suite du travail, nous avons voulu voir si l'hypoxie peut à elle seule induire la prolifération des cellules HUVEC-C et/ou si elle peut augmenter ou diminuer la prolifération induite par le VEGF.

Nous avons déterminé le pouvoir prolifératif des cellules HUVEC-C, dans différentes situations, par mesure de l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN.

- Etape préliminaire

Nous avons voulu au préalable déterminer la densité de cellules qui conviendrait le mieux au suivi de la prolifération cellulaire dans nos conditions expérimentales. Nous avons doncensemencé différentes densités de cellules HUVEC-C dans des puits de boîtes 24 puits dans du milieu avec sérum. Le lendemain, le milieu a été changé et du milieu contenant 2 % de sérum et de la [³H]-thymidine a été rajouté pendant 24 heures. Les résultats sont représentés à la *figure III.9*.

Discussion

Les résultats montrent que pour une densité de 10.000 cellules par puit, la prolifération est faible. Plus le nombre de cellules augmentent, plus l'incorporation est importante, reflétant un nombre plus grand de cellules en mitose. Pour une densité supérieure à 60.000 cellules, nous observons une incorporation plus faible, peut-être parce que les cellules atteignent une densité trop importante et subissent une inhibition de contact. Par conséquent, nous avons choisi la densité de 30.000 cellules par puits pour la suite de nos expériences car cette densité, étant intermédiaire, nous permettra de suivre correctement la prolifération cellulaire.

- Effet de l'hypoxie et du VEGF sur la prolifération cellulaire

Après avoir déterminé la densité de cellules qui convient pour le suivi de la prolifération des cellules HUVEC-C, nous avons étudié l'influence de l'hypoxie sur la prolifération cellulaire. De plus, nous avons voulu voir si l'hypoxie pourrait moduler celle induite par le VEGF. Nous avonsensemencé 30.000 cellules par puits dans des plaques 24 puits. Après 24 heures dans le milieu de culture complet milieu F12k + 10 % de sérum, les cellules HUVEC-C ont été incubées en normoxie et en hypoxie, en présence ou en absence de VEGF en concentration 25 ng/ml dans deux conditions différentes en présence ou en absence de 2 % de sérum. Les résultats sont présentés à la *figure III.10*.

Discussion

Les résultats montrent qu'en conditions de base, c'est-à-dire en normoxie sans sérum et sans VEGF, l'incorporation de thymidine tritiée est faible. La présence de 2% de sérum augmente très légèrement cette incorporation. Par contre, le VEGF à 25 ng/ml n'a pas d'effet. L'hypoxie par elle-même semble également favoriser l'incorporation de thymidine tritiée ainsi que de potentialiser l'effet du sérum. Il conviendrait de refaire cette expérience afin de confirmer les effets observés.

- Effet de la concentration en VEGF sur la prolifération cellulaire

Les résultats précédents suggèrent que l'hypoxie pourrait favoriser la prolifération des cellules HUVEC-C par contre, le VEGF à 25 ng/ml n'a pas d'effet. Nous nous sommes alors demandés si la concentration en VEGF utilisée était suffisante et nous avons réalisé une

expérience similaire avec des concentrations croissantes en VEGF (sans sérum) sans obtenir d'effet pro-prolifératif (résultats non montrés). Des concentrations plus basses ont alors été testées. Les résultats sont représentés à la *figure III.11*.

Discussion

En conditions de normoxie et en absence de sérum, le VEGF augmente légèrement la prolifération des cellules à 10 ng/ml, cet effet s'estompe aux concentrations plus élevées. Dans cette expérience, l'hypoxie à elle seule ne semble pas influencer la prolifération. Par contre, elle augmente de manière marquée la prolifération induite par le VEGF. Cet effet s'observe pour les concentrations de 10, 20 et 25 ng/ml en VEGF.

3.2.5 Effet de l'hypoxie sur l'activation du facteur de transcription AP-1 induit par le VEGF

Les résultats précédents montrent que le VEGF est capable d'activer la voie de transduction du signal impliquant les MAP Kinases et aboutit à une augmentation de la prolifération cellulaire. Un des facteurs de transcription activé par les MAP Kinases et jouant un rôle essentiel dans l'initiation de la mitose est AP-1. Nous avons donc vérifié si AP-1 était activé dans les HUVEC-C par le VEGF et étudié l'influence de l'hypoxie sur cette activation.

Dosage colorimétrique d'AP-1

Afin de mettre en évidence l'activation du facteur de transcription AP-1 dans nos conditions expérimentales, un dosage colorimétrique a été réalisé sur des extraits nucléaires de cellules HUVEC-C ayant été incubées 30 minutes ou une heure en normoxie et hypoxie, en présence ou en absence de VEGF à une concentration de 10 ng/ml. Les résultats sont représentés à la *figure III.12*.

Discussion

Les résultats montrent que le VEGF active de manière très importante la liaison du facteur de transcription AP-1 à l'ADN dès 30 minutes d'incubation. Cet effet diminue après 1 heure. Cette cinétique est cohérente avec celle observée pour l'induction de la phosphorylation des ERK puisque cette phosphorylation était très rapide et transitoire. AP-1 étant en aval des ERK, on observe un décalage dans la cinétique mais l'aspect transitoire est toujours observé.

L'hypoxie semble prolonger l'activation de AP-1 dans le temps puisqu'on observe une liaison à l'ADN de AP-1 plus importante pour des cellules incubées en présence de VEGF et en hypoxie par rapport à celles incubées en présence de VEGF mais maintenues en normoxie. Il est à noter que l'hypoxie par elle-même n'induit pas d'activation de AP-1.

3.2.6 Effet de l'hypoxie sur l'expression des intégrines

Les intégrines sont des récepteurs de surface à deux domaines, un large domaine extracellulaire et un court domaine intracellulaire, dont la fonction est de médier l'adhésion à la matrice extracellulaire ou d'agencer les cellules les unes par rapport aux autres. Elles sont

des médiateurs de la liaison de la cellule endothéliale à la MEC et sont impliquées dans la migration cellulaire. De plus, l'interaction des cellules avec la MEC via les intégrines fournit un signal de survie cellulaire qui facilite la prolifération.

Nous avons voulu étudier l'influence de l'hypoxie et/ou du VEGF sur l'expression des intégrines α_v et β_3 chez les cellules HUVEC-C. Nous avons choisi d'étudier ces deux intégrines car ce sont les principales intégrines endothéliales impliquées dans l'angiogenèse. Deux techniques ont été utilisées afin de suivre l'expression de ces intégrines : l'immunofluorescence et le Western blot.

Marquage des intégrines α_v et β_3 en immunofluorescence

Afin de mettre en évidence l'expression des intégrines α_v et β_3 chez des cellules HUVEC-C dans nos conditions expérimentales, un marquage en immunofluorescence a été réalisé sur des cellules HUVEC-C incubées 16 heures en normoxie ou en hypoxie, en absence ou en présence de VEGF à 25 ng/ml. Les résultats sont présentés à la *figure III.13*.

Discussion

Les résultats montrent que les intégrines α_v et β_3 sont peu exprimées à la surface des cellules HUVEC-C incubées 16 heures en normoxie. Elles sont également peu exprimées à la surface des cellules incubées seulement 4 heures en normoxie (résultats non montrés), ce qui indique que ce ne sont probablement pas les conditions d'incubation sans sérum et/ou dans du milieu CO₂ indépendant qui diminuent une expression basale de ces intégrines, comme nous l'avons observé pour le récepteur flt-1. L'expression des intégrines α_v et β_3 augmente en présence de VEGF ou sous hypoxie. Cependant, après 16 heures d'incubation, l'expression de ces intégrines est diminuée si les deux conditions hypoxie et VEGF sont réunies. Des marquages similaires ont été réalisés sur des cellules incubées 4 ou 8 heures en hypoxie et/ou en présence de VEGF mais aucune augmentation de l'expression des intégrines α_v et β_3 n'a été détectée (résultats non montrés).

Quantification de l'expression des intégrines α_v et β_3 par Western blot

Les résultats décrits en immunofluorescence montrent une expression des intégrines α_v et β_3 chez les cellules endothéliales HUVEC-C qui augmente en hypoxie ou en présence du VEGF. Cette augmentation n'est détectable qu'après 16 heures d'incubation. Nous avons ensuite réalisé un western blot sur des extraits totaux de cellules HUVEC-C incubées pendant 24 heures dans ces mêmes conditions, afin de confirmer les résultats obtenus avec la technique précédente. Les résultats sont représentés à la *figure III.14*.

Discussion

Les résultats révèlent pour l'intégrine β_3 , une faible expression en normoxie. Cette expression augmente en présence du VEGF ou après incubation sous hypoxie mais elle diminue lorsque ces deux conditions sont réunies. Pour α_v , on n'observe pas de marquage pour les extraits des cellules incubées en normoxie. Son expression augmente en présence de VEGF ou en hypoxie mais pas lorsque l'on combine hypoxie et VEGF.

Conclusion

Les résultats du Western blot sont tout à fait similaires à ceux obtenus en immunofluorescence. Ils montrent une faible expression des intégrines α_v et β_3 à la surface des HUVEC-C. Cette expression est cependant augmentée si les cellules sont incubées au moins 16 heures en hypoxie ou en présence de VEGF à 25 ng/ml. Cette augmentation n'est pas observée si les cellules sont incubées avec du VEGF en hypoxie.

3.2.7 Effet de l'hypoxie sur la sécrétion de la MMP-2

Afin de pouvoir migrer vers des zones hypoxiques, les cellules endothéliales doivent se détacher de la membrane basale et dégrader la MEC. La principale métalloprotéinase sécrétée par les cellules endothéliales est la MMP-2.

Dosage de MMP-2

Nous avons voulu quantifier la MMP-2 sécrétée par les HUVEC-C dans nos conditions expérimentales et étudier l'influence de l'hypoxie et/ou du VEGF sur cette sécrétion. Les cellules HUVEC-C ont été incubées en normoxie ou en hypoxie et en présence ou en absence de VEGF à une concentration de 25 ng/ml pendant 24 heures. La MMP-2 a été quantifiée dans le milieu de culture par ELISA. Les résultats sont présentés à la *figure III.15*.

Discussion

Les résultats obtenus montrent que les HUVEC-C secrètent de la de MMP-2 mais en faible quantité. Nous n'avons pas observé d'effet du VEGF, ni de l'hypoxie, ni de la présence du sérum sur cette sécrétion.

Conclusion
et
Perspectives

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le cancer est l'une des maladies qui causent le plus de décès dans les pays développés. Le développement d'une tumeur dépend fortement des conditions environnementales des cellules qui la composent. La compréhension des mécanismes et facteurs conduisant à l'expansion d'une tumeur constitue certainement un des moyens d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques plus efficaces.

Comme vu dans l'introduction, l'angiogenèse est nécessaire lors des processus physiologiques comme l'embryogenèse, mais elle joue également un rôle dans certains processus pathologiques comme le développement d'une tumeur. Lors du développement d'une tumeur, les cellules au centre, privées d'apport en oxygène, deviennent hypoxiques. En réponse à cette hypoxie, le facteur de transcription HIF-1 est spécifiquement activé. Il augmente l'expression de plusieurs gènes dont celui codant pour le VEGF. Le VEGF sécrété ce qui entraîne alors un basculement de l'équilibre angiogénique en faveur des activateurs de l'angiogenèse et induit la migration et la prolifération des cellules endothéliales des capillaires adjacents. Ces cellules endothéliales vont ainsi envahir le tissu tumoral pour y former de nouveaux capillaires. Elles sont donc l'acteur principal de ce processus de néo-angiogenèse (*figure IV.1*). Si la réponse des cellules tumorales à l'hypoxie commence à être bien décrite, celle de la cellule endothéliale reste peu étudiée.

Le but de ce mémoire était donc de comprendre comment l'hypoxie peut moduler la réponse angiogénique des cellules endothéliales. Nous avons tout d'abord vérifié que les cellules endothéliales choisies pour ce travail, les cellules HUVEC-C étaient bien capables de percevoir l'hypoxie. Nous avons pour cela étudié l'accumulation de la sous-unité HIF-1 α , spécifique à l'hypoxie, du facteur de transcription HIF-1 dans nos conditions expérimentales. Les résultats obtenus montrent que la sous-unité HIF-1 α est dégradée en normoxie. Par contre, en hypoxie, HIF-1 α est stabilisé et transloqué dans le noyau.

D'autres travaux publiés dans la littérature montrent également une activation du facteur HIF-1 dans les cellules endothéliales.

Ainsi, l'équipe de Gaddipati (Gaddipati et al., 1999), a montré une augmentation de l'expression de l'ARNm codant pour HIF-1 α en hypoxie dans les cellules endothéliales HUVEC par la technique de PCR en temps réel ainsi qu'une augmentation de l'expression du VEGF.

Les résultats présentés par l'équipe de Jung (Jung et al., 2002) montrent une stabilisation de HIF-1 α maximale déjà après 3 heures d'incubation en hypoxie. Les résultats ont été obtenus par western blot sur des extraits de cellules HUVEC.

Enfin, l'équipe de Weisner (Wiesener et al., 1998) a montré par Western blot une accumulation de HIF-1 α dans les cellules endothéliales hMEC-1 (human Microvascular Endothelial Cells). Des incubations plus longues avaient été utilisées dans ce travail. Par ailleurs, Minet et al. (2000) ont mis en évidence une stabilisation de HIF-1 α dans ces mêmes cellules hMEC-1 dès 2 heures d'incubation sous hypoxie.

Nos résultats sont donc en corrélation avec ceux obtenus par ces différentes équipes. Ces résultats, comme les nôtres, montrent une accumulation précoce de la sous-unité HIF-1 α dans les cellules endothéliales.

Ces premiers résultats montrent que les cellules HUVEC-C sont capables de percevoir l'hypoxie et d'y répondre. Nous avons ensuite étudié l'influence que pourrait avoir l'hypoxie sur différents paramètres impliqués dans l'angiogenèse. Nous avons ainsi étudié l'effet de l'hypoxie sur l'expression des intégrines $\alpha_v\beta_3$, et sur la sécrétion de MMP-2. Ces deux familles de molécules sont impliquées dans la migration des cellules endothéliales. Ensuite, le VEGF étant un stimulus de l'angiogenèse, nous avons suivi l'expression et la fonctionnalité des deux récepteurs au VEGF, flt-1 et KDR dans nos conditions expérimentales.

Nous avons vu dans l'introduction que les intégrines sont des médiateurs de la liaison des cellules à la MEC. L'interaction des cellules avec la MEC via les intégrines fournit d'une part un signal de survie cellulaire qui facilite la prolifération cellulaire mais d'autre part elles servent également de support à la migration des cellules. Nous avons suivi l'expression des intégrines α_v et β_3 car ce sont les principales intégrines exprimées par les cellules endothéliales de manière générale. Nos résultats ont montré une absence de l'expression de α_v en normoxie et une augmentation de son expression en hypoxie après des temps d'incubation relativement longs. Quant à l'intégrine β_3 , elle est déjà exprimée en normoxie même si l'hypoxie augmente son expression. De même, le VEGF augmente l'expression de ces deux intégrines. Il faut cependant noter que quand l'hypoxie et le VEGF sont présents en même temps, cette induction n'est plus observée.

Un effet de l'hypoxie sur l'expression de ces deux intégrines a déjà été décrit dans la littérature.

L'équipe de Kroon (Kroon et al., 2000) a montré par Northern blot en utilisant les cellules hMEC-1 que l'hypoxie augmentait l'expression de l'intégrine α_v par rapport à la normoxie. L'expression de l'intégrine β_3 n'était quant à elle pas modifiée par l'hypoxie.

Les travaux menés par l'équipe de Suzuma (Suzuma et al., 1998) sur les cellules endothéliales microvasculaires de la rétine chez les bovins, montrent un effet positif du VEGF (à concentration de 25 ng/ml) sur l'expression des intégrines α_v et β_3 après que les cellules aient été mises en présence du VEGF pendant 24 heures. Leurs résultats ont aussi montré que l'hypoxie augmentait l'expression de ces protéines après 24 heures d'incubation. Cette augmentation d'expression par le VEGF ou l'hypoxie se marque à la fois aux niveaux de l'ARNm et des protéines.

De la même manière, l'équipe de Walton (Walton et al., 2000) a mis en évidence, dans une expérience menée sur les cellules HUVEC, une augmentation de l'expression des intégrines α_v et β_3 en hypoxie comparativement à la normoxie et que le niveau d'ARNm de l' α_v était à son maximum après 24 heures d'incubation. Une augmentation du niveau d'expression des protéines est observée en parallèle. Par contre, l'expression de β_5 reste inchangée en normoxie ou en hypoxie.

L'ensemble de ces résultats de la littérature mettent donc en évidence une augmentation dans les cellules endothéliales de l'expression des intégrines α_v et β_3 en hypoxie ou lorsque les cellules sont incubées en présence de VEGF. Nos résultats sont tout à fait en accord avec ceux-ci. La régulation par l'hypoxie de l'expression de ces intégrines pourrait être un moyen par lequel l'hypoxie interviendrait dans la régulation de l'angiogenèse.

Un autre acteur impliqué dans cette régulation est la famille des métalloprotéinases. Ces enzymes sont des enzymes de dégradation de la MEC. La MMP-2 est une métalloprotéinase sécrétée par les cellules tumorales mais également par les cellules endothéliales. Nous avons évalué la sécrétion de MMP-2 par les cellules HUVEC-C dans nos conditions expérimentales à l'aide d'un ELISA. Nos résultats montrent que les cellules endothéliales HUVEC-C sécrètent de la MMP-2 mais en faible quantité. Nous n'avons cependant pas observé d'effet ni du VEGF, ni de l'hypoxie, ni même de la présence de sérum.

Les travaux de l'équipe de Ben-Yosef (Ben-Yosef et al., 2002) sur l'effet de l'hypoxie sur des cellules endothéliales macrovasculaires humaines *in vitro*, ont montré que l'hypoxie diminuait la quantité d'ARNm et la sécrétion de MMP-2 après 6 heures d'incubation. Après 24 et 48 heures d'incubation, l'hypoxie réaugmente la quantité d'ARNm encodant la MMP-2 alors qu'elle diminue la synthèse des inhibiteurs de métalloprotéinases, avec pour conséquence, une augmentation de la MMP-2 active dans le milieu de culture. Il y a donc une réponse biphasique de ces cellules endothéliales à l'hypoxie. Des expériences complémentaires en prolongeant le temps d'incubation sous hypoxie dans des conditions qui maintiennent la survie des cellules HUVEC-C pourraient peut-être permettre de mettre en évidence un effet de l'hypoxie sur la sécrétion et l'activité de la MMP-2 dans les cellules HUVEC-C.

Un des processus majeurs initiant l'angiogenèse est la réponse pro-proliférative des cellules endothéliales au VEGF. Nous avons donc dans la suite du travail, étudié si l'hypoxie pouvait influencer ce processus. La première chose à vérifier était de voir si les cellules HUVEC-C possédaient bien les récepteurs au VEGF flt-1 et KDR et si ces récepteurs étaient fonctionnels. Les résultats montrent une diminution au cours du temps d'incubation de l'expression du récepteur flt-1. Cette diminution est observée à la fois en normoxie et en hypoxie. Elle est donc due aux conditions de culture des cellules pendant ces incubations c'est-à-dire dans du milieu CO₂ indépendant sans sérum. L'absence de sérum est vraisemblablement le facteur important. Par contre, l'expression du récepteur KDR reste inchangée au cours du temps et l'hypoxie n'affecte pas cette expression.

Différentes expériences rapportées dans la littérature ont déjà révélé des effets de l'hypoxie sur l'expression de ces récepteurs à la surface de différents types cellulaires.

Ainsi, l'équipe de Sandner (Sandner et al., 1997) en utilisant des hépatocytes de rat, ont montré que *in vitro*, l'hypoxie n'avait aucun effet sur l'expression des deux récepteurs au VEGF, flt-1 et KDR au niveau de l'ARNm. L'hypoxie n'influence pas non plus l'expression du récepteur KDR dans les cellules HUVEC (Gerber et al., 1997). Par contre, cette équipe a mis en évidence un effet positif de l'hypoxie sur l'expression de l'ARNm du récepteur flt-1. Ils ont pour ce faire utilisé une PCR en temps réel. De plus, en disséquant le promoteur du gène codant pour le récepteur flt-1, ils ont découvert un site HRE fonctionnel ce qui indique que HIF-1 pourrait être responsable de l'augmentation de l'expression de flt-1 en hypoxie dans les cellules.

Finalement, Waltenberger et al. (1996) ont confirmé que l'hypoxie n'augmente pas l'expression du récepteur KDR à la surface des cellules HUVEC. Ils ont cependant montré que sa fonctionnalité était activée, avec un maximum après 24 heures d'incubation. Cette augmentation de fonctionnalité résulte d'une modification post-traductionnelle non encore identifiée et est révélée par une augmentation de sa phosphorylation en réponse au VEGF en hypoxie par rapport à la normoxie.

En conclusion, nos résultats ne montrent pas d'effet de l'hypoxie sur l'expression du récepteur KDR sont en accord avec ceux décrits dans la littérature. Quant à flt-1, il faudrait refaire les expériences en présence de sérum pour soutenir son expression au cours du temps et incuber les cellules sous hypoxie afin de vérifier si dans ces conditions, une augmentation de son expression pourrait être observée comme décrit par Gerber et al (1997).

Le VEGF active la voie de transcription du signal impliquant les MAPK ERK. Comme nous avons montré la présence du récepteur KDR, récepteur induisant les effets du VEGF, à la surface des cellules HUVEC-C, nous avons ensuite vérifié si le VEGF allumait bien la transduction du signal. De plus, nous avons en parallèle étudié l'effet de l'hypoxie seule et l'effet de l'hypoxie sur celui du VEGF.

Nos résultats ont montré une activation de la voie des MAPK ERK visualisée par la phosphorylation des ERK lorsque les cellules sont incubées en présence de VEGF. Cet effet est très transitoire puisqu'il est observé à 5 minutes mais plus après 30 minutes d'incubation.

Comme cette activation des ERK est très courte, il n'a pas été possible d'étudier l'effet de l'hypoxie sur cette activation car la mise en place des conditions hypoxiques au niveau du milieu de culture nécessite au moins 15 minutes. Par ailleurs, nous n'avons pas observé d'effet de l'hypoxie par elle-même sur la phosphorylation des ERK.

Ceci ne correspond pas aux résultats obtenus par Minet et al. (2000) qui ont mis en évidence une augmentation de la phosphorylation basale (c'est-à-dire sans ajout de facteur de croissance) des ERK après une incubation de 2 heures en hypoxie. Une explication possible serait que dans ce cas, il s'agissait de cellules hMEC-1 au lieu des HUVEC-C.

La voie de transduction du signal allumée par le VEGF et conduisant à l'activation des ERK conduit à l'activation de AP-1, facteur de transcription essentiel à l'induction de la mitose. Lorsque les cellules HUVEC-C sont incubées en présence de VEGF, on observe effectivement une activation de AP-1. Cette observation s'observe après 30 minutes et diminue au-delà, ce qui correspond bien à l'activation transitoire observée pour les MAPKinasés. Les résultats préliminaires que nous avons obtenus semblent indiquer que l'hypoxie pourrait prolonger cette activation.

Une des réponses finales induite par le VEGF est l'induction de la division cellulaire. Nous avons donc suivi la prolifération cellulaire grâce à l'incorporation de la [³H]-thymidine et nos résultats ont montré que le VEGF a bien un effet pro-prolifératif. Cet effet dépend de la concentration en VEGF avec un optimum à 10 ng/ml, au-delà duquel son effet semble diminuer.

De plus, l'hypoxie semble potentialiser l'effet pro-prolifératif du VEGF puisqu'on observe une incorporation de thymidine tritiée accrue en hypoxie par rapport à la normoxie. Il faut cependant noter que ces résultats restent préliminaires car les expériences n'ont pu être réalisées qu'une seule fois. En effet, l'ATCC, fournisseur des HUVEC-C, n'a plus été en mesure de nous livrer ces cellules après le mois d'avril.

En tenant compte de ces réserves, nous avons comparé les résultats obtenus au cours de ce travail à ceux publiés dans la littérature. L'hypoxie sévère et prolongée peut induire un

arrêt du cycle cellulaire (Iida et al., 2002) et induire l'apoptose des cellules endothéliales (Hall et al., 2001; Matsushita et al., 2000).

Cependant, à un degré moins sévère, l'hypoxie peut augmenter la prolifération des cellules endothéliales induite par différents facteurs de croissance. Ainsi, Humar et al. (2002) ont montré que l'incorporation de thymidine tritiée induite par le PDGF était augmentée en hypoxie dans des cellules endothéliales d'aorte de rat. De même, l'incorporation de thymidine tritiée induite par le VEGF dans les HUVEC est également favorisée par l'hypoxie (Waltenberger et al., 1996). Ils interprètent ces résultats en montrant, comme nous l'avons mentionné précédemment, que la fonctionnalité du récepteur KDR est accrue en hypoxie conduisant ainsi à une voie de transduction du signal amplifiée, ce que nous observons également, en tout cas au niveau d'AP-1 (résultats à confirmer par des expériences complémentaires).

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus ont été résumés sur le schéma présenté à la *figure IV.2*. Ils suggèrent que l'hypoxie pourrait potentialiser l'effet du VEGF au niveau de l'induction de la mitose et favoriser la migration de cellules en augmentant l'expression des intégrines α_v et β_3 .

Dans leurs études, Humar et al., (2002) ont effectivement montré que l'hypoxie augmentait le « sprouting » des cellules endothéliales induit par le PDGF à partir d'anneaux d'aorte de souris ou de rat. Ce phénomène implique une induction de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales. De manière similaire, l'hypoxie semble favoriser la tubulogenèse *in vitro* lorsque les cellules hMEC-1 sontensemencées dans une matrice de fibrine. L'hypoxie semble donc être un modulateur majeur de l'angiogenèse.

Les résultats présentés dans ce mémoire restent préliminaires. Ils doivent tout d'abord être confirmés mais ils ouvrent cependant de nombreuses perspectives. A court terme, on pourrait étudier l'implication de ERK dans la prolifération induite par le VEGF en normoxie ou en hypoxie, par exemple en utilisant un inhibiteur spécifique de cette voie, le PD98059. Il faudra ensuite essayer de comprendre comment l'hypoxie amplifie la réponse induite par le VEGF. En se basant sur les études de Waltenberger et al. (1996), il conviendrait d'évaluer le degré de phosphorylation du récepteur KDR, ce qui peut se faire par western blot en utilisant un anticorps dirigé contre la forme tyrosine-phosphorylée. Finalement, l'effet de l'hypoxie par elle-même ou en présence du VEGF pourrait être investiguée dans un modèle d'angiogenèse *in vitro* dans lequel les cellules endothéliales sont cultivées en Matrigel.

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

- Akman, H.O., Zhang, H., Siddiqui, M.A., Solomon, W., Smith, E.L. and Batuman, O.A. (2001) Response to hypoxia involves transforming growth factor-beta2 and Smad proteins in human endothelial cells. *Blood*, **98**, 3324-3331.
- Bagnato, A. and Spinella, F. (2002) Emerging role of endothelin-1 in tumor angiogenesis. *Trends Endocrinol Metab*, **14**, 44-50.
- Ben-Yosef, Y., Lahat, N., Shapiro, S., Bitterman, H. and Miller, A. (2002) Regulation of endothelial matrix metalloproteinase-2 by hypoxia/reoxygenation. *Circ Res*, **90**, 784-791.
- Berra, E., Milanini, J., Richard, D.E., Le Gall, M., Vinals, F., Gothie, E., Roux, D., Pages, G. and Pouyssegur, J. (2000) Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase and hypoxia. *Biochem Pharmacol*, **60**, 1171-1178.
- Brower, V. (1999) Tumor angiogenesis--new drugs on the block. *Nat Biotechnol*, **17**, 963-968.
- Carmeliet, P. (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*, **6**, 389-395.
- Carmeliet, P. and Jain, R.K. (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, **407**, 249-257.
- Chantrain, C. and Declerck, Y.A. (2002) Les métalloprotéases matricielles et leurs inhibiteurs dans la progression tumorale. *MEDECINE/SCIENCES*.
- Chavakis, E. and Dimmeler, S. (2002) Regulation of endothelial cell survival and apoptosis during angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **22**, 887-893.
- Chou, M.T., Wang, J. and Fujita, D.J. (2002) Src kinase becomes preferentially associated with the VEGFR, KDR/Flk-1, following VEGF stimulation of vascular endothelial cells. *BMC Biochem*, **3**, 32.
- Conway, E.M., Collen, D. and Carmeliet, P. (2001) Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res*, **49**, 507-521.
- de Paulsen, N., Brychzy, A., Fournier, M.C., Klausner, R.D., Gnarr, J.R., Pause, A. and Lee, S. (2001) Role of transforming growth factor-alpha in von Hippel-Lindau (VHL)(-/-) clear cell renal carcinoma cell proliferation: a possible mechanism coupling VHL tumor suppressor inactivation and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 1387-1392.
- Demuth, K., Myara, I. and Moatti, N. (1995) [Biology of the endothelial cell and atherogenesis]. *Ann Biol Clin (Paris)*, **53**, 171-191.
- Duffy, J.P., Eibl, G., Reber, H.A. and Hines, O.J. (2003) Influence of hypoxia and neoangiogenesis on the growth of pancreatic cancer. *Mol Cancer*, **2**, 12.
- Faller, D.V. (1999) Endothelial cell responses to hypoxic stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **26**, 74-84.
- Gaddipati, J.P., Madhavan, S., Sidhu, G.S., Singh, A.K., Seth, P. and Maheshwari, R.K. (1999) Picroliv -- a natural product protects cells and regulates the gene expression during hypoxia/reoxygenation. *Mol Cell Biochem*, **194**, 271-281.
- Gerber, H.P., Condorelli, F., Park, J. and Ferrara, N. (1997) Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem*, **272**, 23659-23667.
- Hall, J.L., Wang, X., Van, A., Zhao, Y. and Gibbons, G.H. (2001) Overexpression of Ref-1 inhibits hypoxia and tumor necrosis factor-induced endothelial cell apoptosis through nuclear factor-kappaB-independent and -dependent pathways. *Circ Res*, **88**, 1247-1253.

- Humar, R., Kiefer, F.N., Berns, H., Resink, T.J. and Battegay, E.J. (2002) Hypoxia enhances vascular cell proliferation and angiogenesis in vitro via rapamycin (mTOR)-dependent signaling. *Faseb J*, **16**, 771-780.
- Hynes, R.O. (2002) A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nat Med*, **8**, 918-921.
- Iida, T., Mine, S., Fujimoto, H., Suzuki, K., Minami, Y. and Tanaka, Y. (2002) Hypoxia-inducible factor-1alpha induces cell cycle arrest of endothelial cells. *Genes Cells*, **7**, 143-149.
- Jung, F., Haendeler, J., Hoffmann, J., Reissner, A., Dernbach, E., Zeiher, A.M. and Dimmeler, S. (2002) Hypoxic induction of the hypoxia-inducible factor is mediated via the adaptor protein Shc in endothelial cells. *Circ Res*, **91**, 38-45.
- Karin, M., Zheng-gang, L. and Ebrahim, Z. (1997) AP-1 function and regulation.
- Karp, G. (1998) *Biologie Cellulaire et Moléculaire*. De Boeck Université.
- Kroon, M.E., Koolwijk, P., van der Vecht, B. and van Hinsbergh, V.W. (2000) Urokinase receptor expression on human microvascular endothelial cells is increased by hypoxia: implications for capillary-like tube formation in a fibrin matrix. *Blood*, **96**, 2775-2783.
- Liekens, S., De Clercq, E. and Neyts, J. (2001) Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol*, **61**, 253-270.
- Matsushita, H., Morishita, R., Nata, T., Aoki, M., Nakagami, H., Taniyama, Y., Yamamoto, K., Higaki, J., Yasufumi, K. and Ogihara, T. (2000) Hypoxia-induced endothelial apoptosis through nuclear factor-kappaB (NF-kappaB)-mediated bcl-2 suppression: in vivo evidence of the importance of NF-kappaB in endothelial cell regulation. *Circ Res*, **86**, 974-981.
- Michiels, C. (2002) Endothelial cell functions *J Cell Physiologie* (sous presse).
- Minet, E., Arnould, T., Michel, G., Roland, I., Mottet, D., Raes, M., Remacle, J. and Michiels, C. (2000) ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation. *FEBS Lett*, **468**, 53-58.
- Mottet, D., Dumont, V., Deccache, Y., Demazy, C., Ninane, N., Raes, M. and Michiels, C. (2003) Regulation of HIF-1alpha protein level during hypoxic conditions by the PI3K/AKT/GSK3beta pathway in HepG2 cells. *J Biol Chem* (sous presse).
- Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S. and Poltorak, Z. (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J*, **13**, 9-22.
- Risau, W. (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, **386**, 671-674.
- Sandner, P., Wolf, K., Bergmaier, U., Gess, B. and Kurtz, A. (1997) Induction of VEGF and VEGF receptor gene expression by hypoxia: divergent regulation in vivo and in vitro. *Kidney Int*, **51**, 448-453.
- Semenza, G.L. (2000) HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol*, **88**, 1474-1480.
- Senger, D.R., Claffey, K.P., Benes, J.E., Perruzzi, C.A., Sergiou, A.P. and Detmar, M. (1997) Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 13612-13617.
- Suzuma, K., Takagi, H., Otani, A. and Honda, Y. (1998) Hypoxia and vascular endothelial growth factor stimulate angiogenic integrin expression in bovine retinal microvascular endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **39**, 1028-1035.
- Vieillard-Baron, A., Frisdal, E., Eddahibi, S., Deprez, I., Baker, A.H., Newby, A.C., Berger, P., Levame, M., Raffestin, B., Adnot, S. and d'Ortho, M.P. (2000) Inhibition of matrix metalloproteinases by lung TIMP-1 gene transfer or doxycycline aggravates pulmonary hypertension in rats. *Circ Res*, **87**, 418-425.

- Waltenberger, J., Mayr, U., Pentz, S. and Hombach, V. (1996) Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia. *Circulation*, **94**, 1647-1654.
- Walton, H.L., Corjay, M.H., Mohamed, S.N., Mousa, S.A., Santomena, L.D. and Reilly, T.M. (2000) Hypoxia induces differential expression of the integrin receptors alpha(vbeta3) and alpha(vbeta5) in cultured human endothelial cells. *J Cell Biochem*, **78**, 674-680.
- Wiesener, M.S., Turley, H., Allen, W.E., Willam, C., Eckardt, K.U., Talks, K.L., Wood, S.M., Gatter, K.C., Harris, A.L., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. and Maxwell, P.H. (1998) Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *Blood*, **92**, 2260-2268.
- Xu, W., Liu, L.Z., Loizidou, M., Ahmed, M. and Charles, I.G. (2002) The role of nitric oxide in cancer. *Cell Res*, **12**, 311-320.
- Yancopoulos, G.D., Davis, S., Gale, N.W., Rudge, J.S., Wiegand, S.J. and Holash, J. (2000) Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, **407**, 242-248.