



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### **Contribution à l'étude de l'athérogenèse. 6: Influence d'un stress oxydant sur les cellules endothéliales humaines en culture: étude de l'homéostasie calcique**

Verhoeve, Francis

*Award date:*  
1989

*Awarding institution:*  
Universite de Namur

[Link to publication](#)

#### **General rights**

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

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

#### **Take down policy**

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

220889

Secretariat

**Unité de cytologie**

**Promoteur**: Professeur M-F. Ronveaux-Dupal.

Contribution à l'étude de l'athérogenèse:

VI. Influence d'un stress oxydant sur les cellules  
endothéliales humaines en culture. Etude de  
l'homéostasie calcique.

**Verhoeye**

**Francis**

**Année 1988-1989**

## Liste des abréviations usuelles:

ATP: adénosine triphosphate

ATPase: adénosine triphosphatase

RE: réticulum endoplasmique

PMN: polymorphonucléaire

X: xanthine

XO: xanthine oxydase

$[Ca^{2+}]_i$ : concentration de  $Ca^{2+}$  cytosolique

$PGI_2$ : prostacycline

LDL: low density lipoprotein

KRH: Krebs-Ringer HEPES

DMSO: diméthylsulfoxyde

CE: cellule endothéliale

AM: acétoxyméthylester

PBS: phosphate buffer saline

PM: poids moléculaire

SOD: superoxyde dismutase

CAT: catalase

NIF: nifédipine

PAF: platelet activating factor

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix  
FACULTE DES SCIENCES  
Rue de Bruxelles 61- 5000 NAMUR  
Tél. 081/22.90.61 - Telex 59222 facnam-b - Telefax 081/23.03.91

## Titre du mémoire

**Contribution à l'étude de l'athérogenèse: influence d'un stress oxydant sur les cellules endothéliales humaines en culture. Etude de l'homéostasie calcique.**

VERHOEVE Francis

### Resume

Une débalance de l'homéostasie calcique des cellules endothéliales pourrait constituer une étape précoce dans l'initiation des lésions atheroscléreuses. Notre étude vise à détecter les modulations induites par les derives actifs de l'oxygene de la  $[Ca^{2+}]_i$  de cellules endotheliales de veine ombilicale humaine cultivées sur couvre-objet et chargées en sonde fluorescente Fura-2. La  $[Ca^{2+}]_i$  basale des cellules endothéliales ainsi mesurée est de  $69 \pm 39$  nMoles avec des variations allant de 19 à 181 nMoles. L'action du système xanthine-xanthine oxydase generateur de derives actifs de l'oxygene provoque une élévation de la  $[Ca^{2+}]_i$  en deux phases d'amplitude et de durée différentes distinguées grâce à des mesures effectuées à court- et long-terme. L'élévation de la  $[Ca^{2+}]_i$  consécutive à l'ajout de xanthine oxydase seule au milieu d'incubation ainsi que la protection partielle offerte par les systèmes enzymatiques antioxydants considérés (catalase et superoxyde dismutase) semblent montrer que les modulations de la  $[Ca^{2+}]_i$  résultent d'une action des derives actifs de l'oxygene à laquelle se superpose une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  induite par des agents contenus dans la préparation commerciale de xanthine oxydase.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Septembre 1989

Promoteur: Professeur M-F. Ronveaux-Dupal

Alors que la rédaction de ce mémoire touche à sa fin, je songe que je n'aurais jamais pu réaliser celui-ci sans la collaboration de toute l'équipe dynamique et dévouée du laboratoire de cytologie. De cette équipe, je remercie tout particulièrement:

-Madame M.-F. Ronveaux-Dupal, promoteur de ce mémoire, dont la gentillesse, l'expérience et les conseils éclairés m'ont permis de progresser non seulement dans le mémoire mais dans bien d'autres domaines.

-Monsieur Y. Poumay sans qui ce travail n'aurait jamais vu le jour et dont la patience et la disponibilité ont permis de venir à bout de bien des tracasseries.

-Mesdames et Messieurs R. Thibaut-Vercruyssen, M. Martin-Van Steenbrugge, N. Paulus-Ninane, M.-T. Hennin, M. Dominguez, Christine, Jackie et Isabelle pour leur sympathie et aide qui se sont toujours révélées salutaires.

-Au département de pharmacologie du professeur De Schrijver pour son soutien logistique et spécialement à Madame J. Mertens-Strijhagen pour ses conseils et sa compréhension.

Een zeer hartelijke dank aan mijn ouders voor hun zedelijke steun het heel jaar door.

Je remercie enfin tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à l'aboutissement de ce mémoire.

# Table des matières

## Introduction.

### I. L'athérosclérose.

|   |   |
|---|---|
| A) Définition.  | 1 |
| B) Les Facteurs de risque.                              | 1 |
| 1) Les facteurs de risque majeurs.                      | 1 |
| 2) Les facteurs de risque mineurs.                      | 2 |
| C) Histologie de la paroi artérielle normale.           | 2 |
| D) Les lésions de l'athérosclérose.                     | 2 |
| 1) La strie lipidique.                                  | 2 |
| 2) La plaque athéroscléreuse.                           | 2 |
| 3) La lésion compliquée.                                | 3 |
| E) Les hypothèses de l'athérogenèse.                    | 3 |
| 1) L'hypothèse monoclonale.                             | 3 |
| 2) L'hypothèse de la réponse à une lésion.              | 3 |
| 3) L'hypothèse de l'infiltration lipidique.             | 4 |
| 4) Hypothèse de la perméabilité membranaire au calcium. | 4 |

### II. L'endothélium au centre de la biologie et de la pathologie de la paroi vasculaire.

|   |    |
|---|----|
| A) L'endothélium.   | 7  |
| B) Cellule endothéliale et stress oxydant .                 | 8  |
| 1) Les dérivés actifs de l'O <sub>2</sub> .                 | 9  |
| 2) Les systèmes producteurs de stress oxydants.             | 10 |
| a) Cellulaires.   | 10 |
| b) Acellulaires : le système xanthine-xanthine oxydase.     | 10 |
| 3) Effets du stress oxydant sur les cellules endothéliales. | 11 |

### III. L'homéostasie calcique.

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| A) En conditions normales . | 13 |
| 1) L'importance du calcium. | 13 |

|   |    |
|---|----|
| 2) La perméabilité membranaire au $Ca^{++}$ .   | 13 |
| a) Les mécanismes contrôlant l'entrée de $Ca^{2+}$ .  | 14 |
| b) les mécanismes contrôlant la sortie du $Ca^{2+}$ .   | 14 |
| c) Le réticulum endoplasmique (RE) et la mitochondrie.  | 15 |
| d) Les systèmes- tampons intracytoplasmiques.   | 15 |
| B) L'altération de l'homéostasie calcique par les dérivés actifs de l' $O_2$ et ses conséquences. | 16 |

#### **IV. La mesure du calcium intracellulaire libre.**

|   |    |
|---|----|
| A) Avant-propos.  | 18 |
| B) Historique des méthodes de détection de la $[Ca^{2+}]_i$ . | 18 |
| 1) Précipitation de sels de calcium.                          | 18 |
| 2) Photoprotéines activées par le $Ca^{2+}$ .                 | 18 |
| 3) Les indicateurs métallochromiques.                         | 18 |
| 4) Les indicateurs fluorescents.                              | 19 |
| C) Etude des indicateurs fluorescents.                        | 19 |
| 1) Principe de la fluorescence.                               | 19 |
| 2) Exigences d'une sonde fluorescente.                        | 19 |
| 3) Inventaire des indicateurs fluorescents.                   | 20 |
| a) Un prototype: le Quin-2.                                   | 20 |
| b) Le Fura-2.   | 21 |
| c) L'Indo-1.  | 23 |
| d) Le Fluo-3.   | 24 |

#### **V. Objectif du mémoire.** 25

### **Matériel & méthodes.**

#### **I. Culture de cellules endothéliales.**

|  |    |
|--|----|
| A) Mise en culture des cellules endothéliales. | 26 |
| B) Repiquage des cellules endothéliales.       | 27 |
| C) Changements de milieu.                      | 27 |

## II. Chargement du Fura-2 dans les cellules endothéliales.

- A) Stockage du Fura-2 AM. 28
- B) Chargement des cellules endothéliales avec le Fura-2 AM. 28

## III. Mesures spectrofluorimétriques de la $[Ca^{2+}]_i$ des cellules endothéliales.

- A) Mesure spectrofluorimétrique de la  $[Ca^{2+}]_i$  avec le Fura-2 AM. 29
  - 1) Principe de la sonde fluorescente. 29
  - 2) Principe de la mesure spectrofluorimétrique de la  $[Ca^{2+}]_i$ . 29
  - 3) Effet du couvre-objet et de l'orientation de la monocouche cellulaire sur l'autofluorescence et le signal du Fura-2. 31
  - 4) Expériences de calibrage. 32
    - a) Calibrage en milieu acellulaire. 32
    - b) Calibrage en milieu cellulaire. 33
- B) Mesures spectrofluorimétriques de la  $[Ca^{2+}]_i$  dans les cellules endothéliales humaines lors de différents traitements. 34
  - 1) Mesure en présence de calcium extracellulaire. 34
    - a) Procédure. 34
    - b) Les milieux testés. 34
  - 2) Mesure en absence de calcium extracellulaire. 35

## Résultats.

### I. Adaptation de la méthode de mesure spectrofluorimétrique de la $[Ca^{2+}]_i$ aux cellules endothéliales cultivées sur couvre-objet.

- 1) Culture de cellules endothéliales sur couvre-objet. 36
- 2) Chargement des cellules endothéliales en Fura-2 AM. 36
- 3) Sélection d'une méthode de calcul de la  $[Ca^{2+}]_i$ . 37
- 4) Effet de l'orientation de la monocouche cellulaire sur l'intensité fluorescente. 38
- 5) Expériences de calibrage. 39
  - a) Calibrage en milieu acellulaire. 39

|  |    |
|--|----|
| b) Calibrage en milieu cellulaire.   | 40 |
| 6) Le système xanthine- xanthine oxydase et l'endocytose spécifique dans les cellules endothéliales. | 42 |

## **II. Mesure spectrofluorimétrique de la $[Ca^{2+}]_i$ au cours de l'incubation des cellules endothéliales humaines en culture avec le système xanthine - xanthine oxydase.**

|  |    |
|--|----|
| 1) Mesure de la $[Ca^{2+}]_i$ dans les cellules endothéliales humaines.              | 43 |
| 2) Effet du système xanthine-xanthine oxydase sur les cellules endothéliales.        | 43 |
| a) Observations à court-terme.   | 43 |
| b) Observations à long-terme.  | 43 |
| 3) Effet de la xanthine oxydase seule sur les cellules endothéliales.                | 44 |
| 4) Effets du stress oxydant en milieu extracellulaire sans calcium.                  | 44 |
| 5) Effet protecteur des enzymes antioxydants.  | 45 |
| 6) Effet protecteur des enzymes antioxydants en milieu extracellulaire sans calcium. | 46 |
| 7) Bloquage de l'entrée de $Ca^{2+}$ par les canaux voltage-dépendant.s.             | 47 |
| 8) Utilisation d'inhibiteurs de protéases.   | 48 |
| 9) Analyse statistique.  | 48 |

## **Discussion.**

|  |    |
|--|----|
| I. Calcium, cellules endothéliales et stress oxydant.  | 49 |
| II. Cellules endothéliales en culture sur couvre-objet.  | 49 |
| III. La sonde fluorescente Fura-2 et son chargement dans les cellules endothéliales.                       | 50 |
| IV. Effets du stress oxydant sur la $[Ca^{2+}]_i$ de cellules endothéliales soumises à divers traitements. | 53 |
| V. Conclusion.   | 59 |

|                              |    |
|------------------------------|----|
| <b><u>Bibliographie.</u></b> | 60 |
|------------------------------|----|

## **CHAP. I : INTRODUCTION**

### **I. L'athérosclérose.**

#### **A) Définition.**

L'athérosclérose est une affection vasculaire chronique touchant les artères élastiques et les artères musculaires de gros et moyen calibre. Elle se caractérise par des lésions de l'intima (associées à des modifications de la média) consistant en une accumulation focale de lipides, de glucides complexes, de produits sanguins, de tissus fibreux et de dépôts calcaires (World Health Organization Study Group, 1958).

#### **B) Les Facteurs de risque.**

L'athérosclérose constitue la cause essentielle de la mortalité cardiovasculaire (infarctus, thrombose) mais elle peut être prévenue. Son développement est précoce (certaines lésions sont déjà présentes chez le nourrisson) mais d'une évolution très lente. Une prévention efficace de la maladie se révèle primordiale car il est trop tard quand les signes cliniques se manifestent. C'est pourquoi la détermination des facteurs de risque revêt une importance capitale dans la thérapie de la maladie. Outre l'âge et le sexe qui ne sont pas des facteurs modifiables, on distingue :

##### **1) Les facteurs de risque majeurs.**

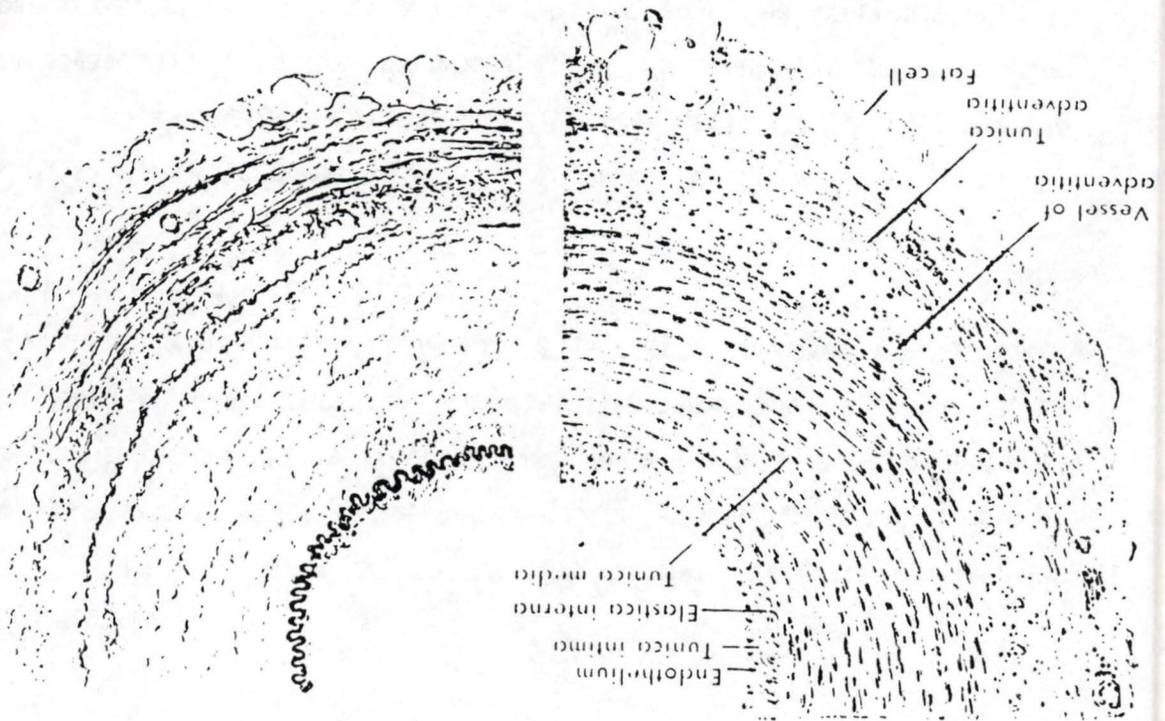
**-Hypercholestérolémie :** Une élévation de la cholestérolémie peut provoquer une infiltration des LDL (transporteur principal du cholestérol dans la circulation) dans l'intima, ce qui peut entraîner une accumulation du cholestérol et l'apparition consécutive de cellules spumeuses qui participeront au développement des premières lésions athéroscléreuses (Brown & Goldstein, 1983).

**-Hypertension :** Une pression artérielle élevée peut occasionner des contraintes mécaniques sur l'endothélium (Wilhelmsen, 1983).

**-Tabagisme :** Par l'effet vasoconstricteur de la nicotine et par la

(Junqueira & Carneiro, 1987)

Figure 1-1 Structure de la paroi artérielle normale



modification de l'interaction des plaquettes avec la paroi artérielle qu'il entraîne, c'est un important facteur de risque des complications athéroscléreuses (Mulcahy, 1983).

## **2) Les facteurs de risque mineurs.**

On observe l'existence d'une série de facteurs à incidence moindre mais dont l'effet cumulatif accélère les processus athéroscléreux. Citons des facteurs tels que l'obésité, la consommation excessive de café, le stress, la sédentarité, l'hérédité et les facteurs alimentaires (ex.: les graisses saturées) (Epstein, 1982).

## **C) Histologie de la paroi artérielle normale.**

La paroi artérielle se compose de plusieurs tuniques (figure 1-1):

- **L'intima**: c'est la tunique la plus interne. On y observe successivement un endothélium, un espace sous-endothélial et une limitante élastique interne.
- **La média**: elle est principalement constituée de cellules musculaires lisses et de fibres (élastiques, collagènes).
- **L'adventice**: elle se trouve séparée de la média par une limitante élastique externe. L'adventice constitue un tissu de soutien riche en fibres et parcouru par des petits vaisseaux nourriciers et par des nerfs. Elle ancre l'artère aux tissus voisins.

## **D) Les lésions de l'athérosclérose.**

Elles se localisent préférentiellement aux endroits de turbulence (c'est-à-dire aux embranchements) du système vasculaire. On y distingue (figure 1-2):

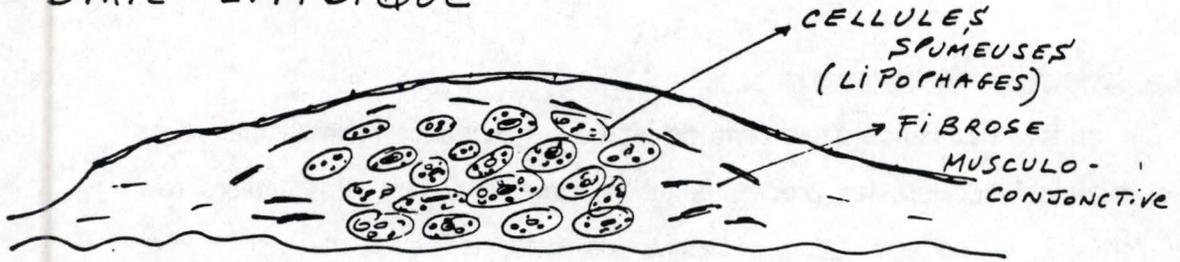
### **1) La strie lipidique.**

C'est une infiltration lipidique (principalement du cholestérol) précoce sous-endothéliale qui se trouve strictement limitée à l'intima. Il faut cependant remarquer que toutes les stries lipidiques ne se transforment pas en plaques athéroscléreuses (Capron, 1983).

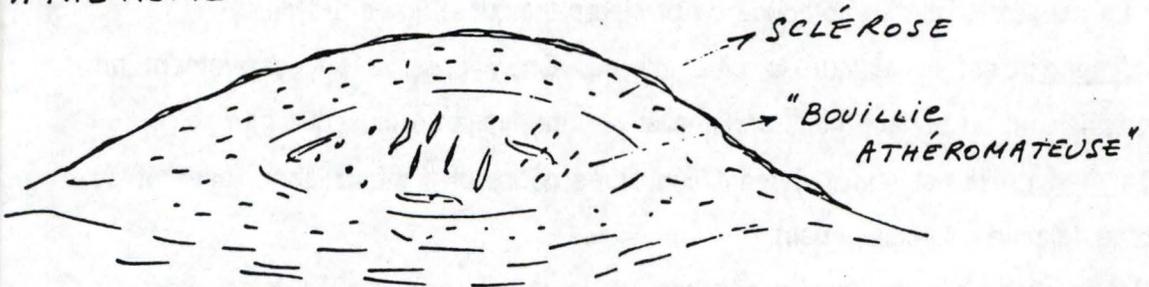
### **2) La plaque athéroscléreuse.**

Elle constitue un épaississement de l'intima formé d'un centre athéromateux surmonté d'un cap fibreux. On y trouve des GAGs (glycosaminoglycans) et un protéoglycans différent de ceux d'une artère normale

STRIE LIPIDIQUE



PLAQUE FIBRO-LIPIDIQUE  
= ATHÉROME



PLAQUE FIBRO-SCLÉREUSE  
CALCIFIÉE

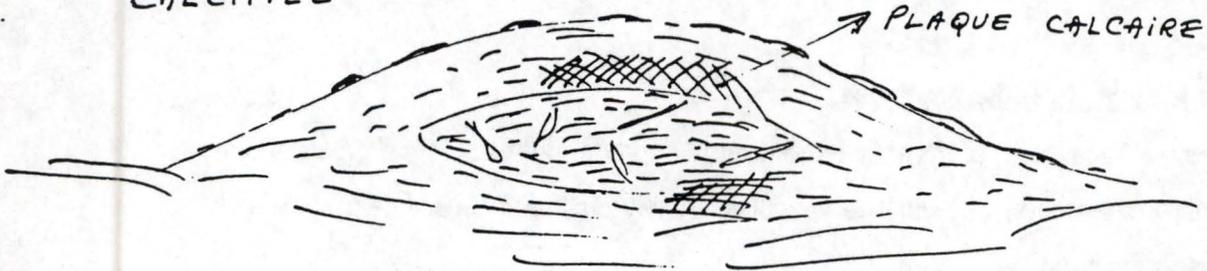


Figure 1-2. Evolution de la lésion athéroscléreuse

(Capron, 1983).

### **3) La lésion compliquée.**

L'athérome peut évoluer vers une calcification concentrée surtout dans la portion fibreuse de la plaque athéroscléreuse. Dans un stade encore plus avancé, sous la pression de la plaque calcoathéroscléreuse, l'endothélium peut se rompre et peut conduire à des complications (thrombose, infarctus, sténose,...) (Capron, 1983).

Certains auteurs émettent donc l'idée que la plaque athéroscléreuse n'est pas une lésion figée mais qu'elle dispose d'une vie propre rendant compte de profondes modifications au cours du temps. Les lignes de recherche actuelles tentent de cerner les principaux facteurs impliqués dans le processus de l'athérogenèse, bien qu'aucun consensus concernant ce mécanisme n'existe actuellement.

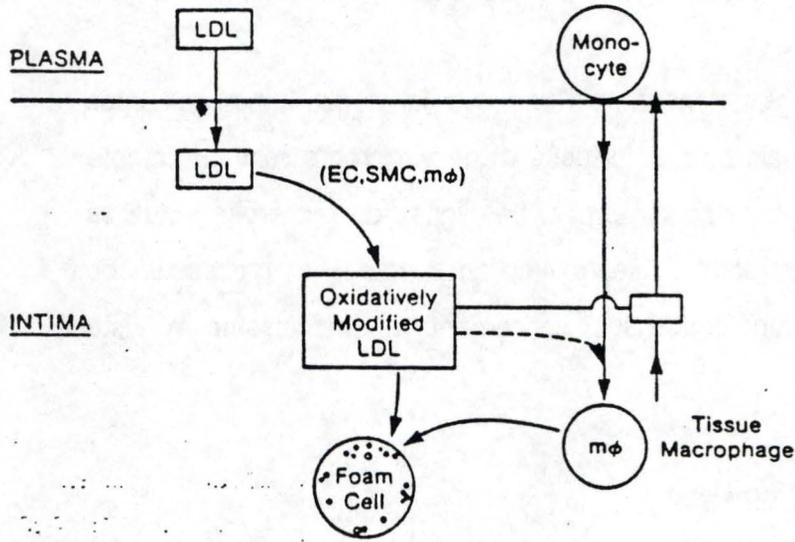
## **E) Les hypothèses de l'athérogenèse.**

### **1) L'hypothèse monoclonale.**

Selon cette hypothèse toutes les cellules de la lésion athéroscléreuse proviennent d'une cellule musculaire lisse initiale ayant migré de la média vers l'intima. Chaque lésion serait un néoplasme bénin dérivant d'une cellule musculaire transformée probablement par des agents infectieux (Benditt & Benditt, 1973). Cette hypothèse semble de nos jours avoir perdu une bonne partie de sa popularité.

### **2) L'hypothèse de la réponse à une lésion.**

Cette hypothèse, d'abord proposée par Virchow au siècle passé, fut étudiée par Ross et Glomset (1976). Ceux-ci postulèrent que la lésion se produisait de façon spécifique au niveau de l'endothélium. Suite à la destruction locale des cellules endothéliales, il s'ensuit alors une agrégation plaquettaire suivie d'une prolifération de cellules musculaires lisses dans l'intima suite à la libération de facteurs de croissance par les plaquettes (Ross & Glomset, 1976). Mais Faggioto *et al.* (1984) constatèrent que l'endothélium était intact à l'endroit du développement de la lésion athéroscléreuse. Aussi Ross a-t-il revu son hypothèse en retenant alors une lésion plus "fonctionnelle" de l'endothélium puisque les cellules endothéliales jouaient un rôle actif dans l'athérosclérose (ex: elles



**Figure 1-3** Schéma hypothétique suggérant que les LDL oxydées peuvent augmenter l'accumulation de macrophages par attraction de monocytes circulants tout en inhibant la motilité des macrophages tissulaires (Steinberg, 1987)

peuvent libérer des dérivés actifs de l'O<sub>2</sub> qui interviendront entre autres dans l'oxydation des LDL (Steinberg, 1987) .

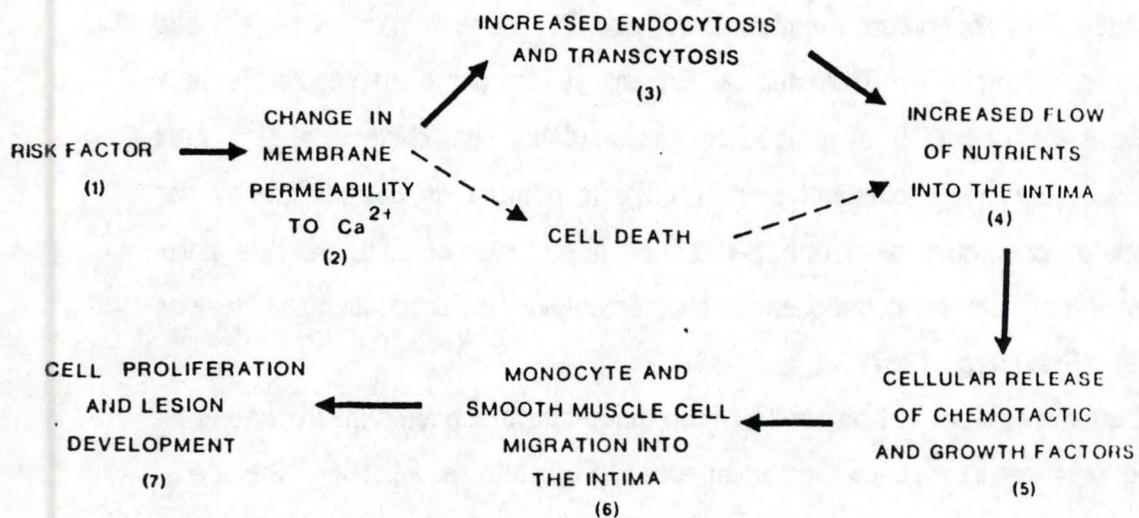
### **3) L'hypothèse de l'infiltration lipidique.**

Cette hypothèse évoque le rôle essentiel du cholestérol dans l'athérogenèse. Les LDL (Low Density Lipoprotein) constituent la classe des lipoprotéines les plus athérogènes. Des récepteurs membranaires, que l'on retrouve dans la plupart des cellules des mammifères (Goldstein & Brown, 1977), semblent réguler le taux plasmatique de ces LDL et empêcher l'accumulation de cholestérol. Un taux plasmatique élevé de cholestérol peut réduire le nombre de ces récepteurs par feed-back et provoquer ainsi une pénétration importante de LDL dans la paroi artérielle avec comme conséquence supplémentaire la production de lésions cellulaires (Steinberg, 1987).

Certains auteurs ont démontré l'importance des monocytes/macrophages en tant que précurseurs des cellules spumeuses (Faggitto *et al.*, 1984; Steinberg, 1987). Ils suggèrent que les monocytes circulants adhèrent d'abord à l'endothélium puis arrivent dans l'espace sous-endothélial où ils captent alors les lipoprotéines pour ainsi devenir des cellules spumeuses (Faggitto *et al.*, 1984). Brown et Goldstein (1983) observèrent au cours de leurs travaux que le monocyte/macrophage ne manifestait que peu d'avidité pour les LDL mais qu'il possédait un récepteur "scavenger" capable de lier avec une grande affinité les LDL modifiées (par ex: les LDL oxydées par la malonaldéhyde produite au cours de la peroxydation lipidique). Le processus semblait montrer que des LDL oxydées après leur passage dans l'intima pouvaient jouer le rôle de chémoattractants pour les monocytes circulants (Quinn *et al.*, 1987). Ceux-ci, une fois dans l'espace sous-endothélial, voyaient leurs mouvements inhibés par ces mêmes LDL modifiées et devenaient alors des cellules spumeuses (fig.1-3) (Steinberg, 1987).

### **4) Hypothèse de la perméabilité membranaire au calcium.**

A l'origine on retrouve des expériences réalisées avec des antagonistes du Ca<sup>2+</sup> et des bloqueurs de canaux calciques dont l'action anti-athérogène témoignait du rôle du calcium dans le développement des lésions athéroscléreuses (Henry, 1985). La réduction de l'influx de calcium dans la cellule



**Figure 1-4** Schema hypothétique soulignant la séquence des événements associés à l'initiation et la progression de l'athérosclérose.

(Holmes & Kummerow 1985)

dans des conditions athérogènes diminuait la formation des lésions athéroscléreuses. On ne constatait pas l'accumulation de cholestérol et de  $\text{Ca}^{2+}$  ainsi que la synthèse importante d'élastine et de collagène dans les parois artérielles traitées avec des agents bloqueurs, alors que ces événements se produisaient dans les contrôles athérogènes (Kramsch et al. , 1981).

Holmes et Kummerow (1985) développèrent l'idée selon laquelle une modification de la perméabilité membranaire au  $\text{Ca}^{2+}$  consécutive à l'action d'agents stressants autres que le cholestérol (ex: les peroxydes lipidiques) pourrait provoquer un afflux de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule ou une diminution de l'efflux de  $\text{Ca}^{2+}$  (médié par une pompe au  $\text{Ca}^{2+}$ ) comme lors de l'hypertension. Cette débalance de l'homéostasie calcique pourrait constituer une étape précoce dans l'initiation des lésions athéroscléreuses et pourrait avoir pour conséquence une augmentation de la transcytose, celle-ci amenant dès lors trop de nutriments plasmatiques dans l'intima (fig.1-4) (Holmes & Kummerow, 1985). Ils supposèrent dès lors que la cellule endothéliale serait particulièrement sensible à ce phénomène .

D'autres expériences (Mazière *et al.*, 1984; Paoletti et al., 1988) montrent qu'une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique (obtenue grâce à l'ionophore A23187) réduit l'endocytose spécifique des LDL. Par contre l'utilisation d'antagonistes du calcium peut augmenter cette endocytose (Stein *et al.*, 1985). On peut dès lors supposer que le  $\text{Ca}^{2+}$  aurait un effet régulateur sur l'endocytose médiée par récepteur de certaines molécules.

Récemment, Block et al. (1988) ont montré que les LDL déjà en concentration assez faible induisaient une activation du système des phosphatidylinositides ainsi qu'une augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , non seulement dans les plaquettes sanguines, mais aussi dans d'autres types cellulaires dont les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales. Ils ont donc proposé le fait que les LDL à concentration normale pouvaient induire une activation cellulaire générale.

S'inscrivant dans l'hypothèse d'un rôle important joué par la cellule endothéliale dans l'athérosclérose, Hirosumi et al. (1988) ont montré que l'action des dérivés actifs de l'  $\text{O}_2$  sur les cellules endothéliales augmentait la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ :

Leurs observations ont été réalisées sur des cellules endothéliales aortiques de porc soumises à un stress oxydant par addition du système xanthine-xanthine oxydase ou d'hydroperoxydes lipidiques. C'est donc autour du contrôle de la  $[Ca^{2+}]_i$  dans la cellule endothéliale au cours de l'athérosclérose que va s'articuler notre travail.

## II. L'endothélium au centre de la biologie et de la pathologie de la paroi vasculaire.

### A) L'endothélium.

C'est un épithélium simple formé de cellules aplaties et pavimenteuses couvrant la lumière de tous les vaisseaux sanguins. Celui-ci s'organise en une monocouche cellulaire dont la surface totale correspond à 1000 m<sup>2</sup> chez l'homme. Il constitue une interface entre le sang circulant et les tissus interstitiels (Thorgeirsson, 1983).

Il remplit trois fonctions majeures (Cryer, 1983):

-Il constitue une barrière physique séparant les cellules artérielles des constituants plasmatiques et possède une perméabilité sélective, contrôlant ainsi le flux des nutriments requis pour alimenter les cellules musculaires lisses de la média (Capron, 1983).

-Il peut sécréter divers constituants de la membrane basale et synthétiser des facteurs régulateurs (EDRF (Endothelium Derived Relaxing Factor), endothéline, prostacycline, ...).

-Il dispose de la propriété de thromborésistance qui évite l'adhésion des plaquettes à l'endothélium.

Ces propriétés de perméabilité sélective et de thromborésistance constituent des propriétés uniformes dans tout le réseau endothélial qui existent déjà au stade embryonnaire.

Les cellules endothéliales qui le composent ont une épaisseur de 3 µm au niveau du noyau et de moins d'un µm en périphérie. En culture, les cellules endothéliales confluentes montrent également un aspect polygonal. Leur cytoplasme est riche en vésicules d'endocytose (témoins d'une activité intense d'échanges transcellulaires) et contient aussi des corps de Weibel Palade qui sont des organites de stockage du facteur de Von Willebrand (facteur VIII de la coagulation) répartis au hasard (Thorgeirsson, 1983).

Les principales propriétés des cellules endothéliales sont:

-La thromborésistance, avec l'élaboration de prostacycline (PGI<sub>2</sub>). Il faut remarquer

que des études comportant des inhibiteurs de prostaglandines constatent que la thromborésistance pourrait aussi être un phénomène intrinsèque aux cellules endothéliales (Striker *et al.*, 1980). Cependant, la rupture de la barrière endothéliale provoque une coagulation sanguine à laquelle les cellules endothéliales participent par la synthèse du facteur de Von Willebrand.

-Activité synthétique : on retiendra la synthèse de fibronectine, de laminine, de thrombospondine, d'élastine et de collagènes de types III et IV. Outre la synthèse de "l'angiotensin-converting enzyme" et du facteur de Von Willebrand (Jaffe, 1984) la cellule endothéliale produit aussi "l'endothelium-derived relaxing factor "(EDRF) qui provoque la relaxation des cellules musculaires lisses (action vasodilatatrice) (Ryan, 1989) et l'endothéline qui montre une puissante action vasoconstrictrice.

-Propriétés métaboliques: les cellules endothéliales accrochent via l'héparan sulfate de leur glycocalix la lipoprotéine lipase responsable de l'hydrolyse des triglycérides, des VLDL et des chylomicrons. La lipoprotéine lipase n'y est cependant pas synthétisée mais semblerait plutôt venir des cellules musculaires lisses et des macrophages (Wang-Iverson, 1984).

En conclusion, nous pouvons donc considérer que l'endothélium est central dans la fonction artérielle. Des altérations de celui-ci entraîneront des modifications de l'équilibre existant dans l'intima et la média et qui pourront être impliquées dans la pathologie de l'athérosclérose (Ross, 1981). Parmi ces altérations nous trouvons le stress oxydant qui est soupçonné de se trouver à l'origine de nombreuses pathologies des cellules endothéliales.

### **B) Cellule endothéliale et stress oxydant .**

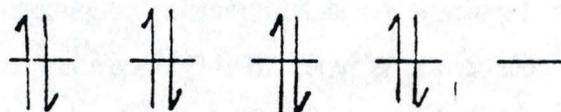
Le stress oxydant se caractérise généralement par la formation de radicaux libres qui sont des espèces chimiques possédant un électron non apparié sur une orbitale externe. Ils peuvent être chargés positivement, négativement ou être neutres (Pryor, 1976). Cette présence d'électrons non appariés sur leur orbitale externe rend ces molécules très réactionnelles. Les radicaux libres sont notamment l'atome d'hydrogène, mais aussi la plupart des métaux de transition ainsi que l'oxygène et ses dérivés. Au niveau biologique, ces derniers se révèlent être d'importants médiateurs des dommages tissulaires (Halliwell & Gutteridge, 1984).

30



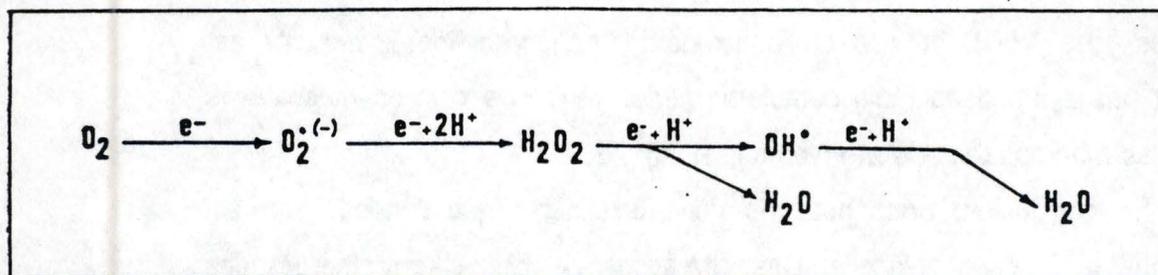
1 S<sup>2</sup> 2 S<sup>2</sup> 2 P<sup>6</sup> (orbitales)

10

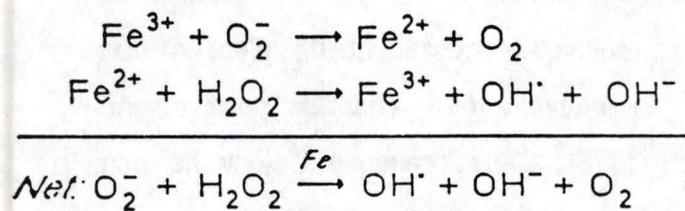


**Figure 2-1** Oxygène triplet (<sup>3</sup>O) et oxygène singulet (<sup>1</sup>O).

(Pryor 1976)



**Figure 2-2** Réduction monovalente de l'oxygène.

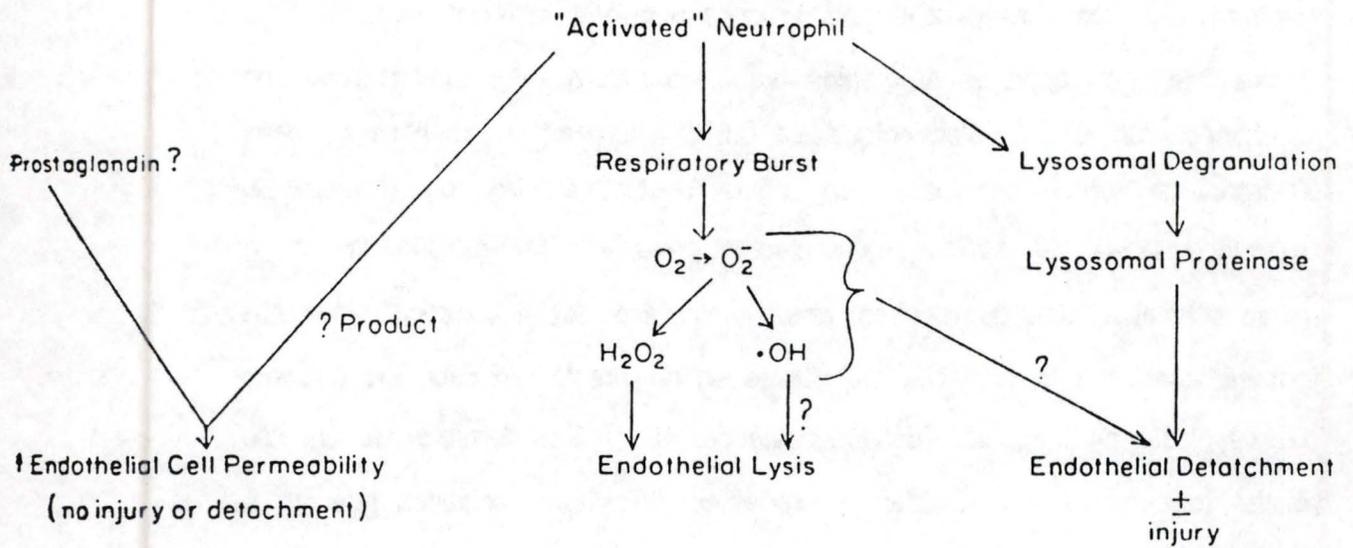


**Figure 2-3** Réaction de Fenton (réaction de Haber-Weiss modifiée).

### 1) Les dérivés actifs de l'O<sub>2</sub>.

La plupart des composés organiques susceptibles de réagir avec l'oxygène (O<sub>2</sub>) possèdent des doublets électroniques dont les deux électrons montrent des spins antiparallèles. L'O<sub>2</sub> dans son état triplet fondamental, qui montre 2 e<sup>-</sup> non appariés aux spins parallèles (figure 2-1), interdit l'insertion simultanée d'un doublet électronique, ce qui provoquerait la présence de deux électrons de même spin dans un même doublet électronique (Halliwell & Gutteridge, 1984). L'O<sub>2</sub> est donc généralement peu réactionnel mais les 2 e<sup>-</sup> d'un même doublet électronique peuvent être transférés de façon consécutive sur l'O<sub>2</sub> formant ainsi les intermédiaires radicalaires ou non de la réduction monovalente de l'O<sub>2</sub>, autrement appelés "dérivés actifs de l'O<sub>2</sub>". Ces derniers peuvent se révéler toxiques et responsables de certaines altérations cellulaires (Hennig & Chow, 1988).

La réduction monovalente de l'O<sub>2</sub> produit d'abord l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>) qui, bien que nécessaire aux systèmes biologiques, peut aussi être réactionnel vis-à-vis des constituants membranaires (Halliwell & Gutteridge, 1984). Ce radical peut être produit naturellement dans l'organisme vivant et peut altérer la fluidité membranaire (Freeman *et al.*, 1986). Ensuite on assiste à la formation du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) considéré comme l'intermédiaire le plus stable de la réduction monovalente de l'O<sub>2</sub> bien que n'étant pas à proprement parler un radical, ses électrons étant tous appariés. La réduction du peroxyde d'hydrogène peut conduire au radical hydroxyl (OH·) et elle s'achève finalement par la formation d'eau. Cette succession d'événements peut être globalement exprimée par la figure 2-2. Il faut remarquer que le radical hydroxyl semble être essentiellement produit par la réaction de Fenton dans les systèmes biologiques (Freeman & Crapo, 1982) en utilisant des métaux de transition tels que le Fe<sup>2+</sup> (figure 2-3). La réactivité élevée du radical hydroxyl semble telle qu'il réagit avec les molécules biologiques proches de son site de formation tandis que l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène peuvent diffuser et agir à distance (Halliwell & Gutteridge, 1984) en signalant toutefois une action plus brève pour l'anion superoxyde, celui-ci étant rapidement dismuté.



**Figure 2-4** Réponse métabolique du neutrophile activé et ses conséquences possibles sur la fonction de l'endothélium (Moldow 1984)

Ayant établi l'importance de ces dérivés actifs de l'O<sub>2</sub> en tant qu'agents réactionnels, nous allons nous pencher sur les systèmes qui produisent ces dérivés actifs de l'oxygène.

## **2) Les systèmes producteurs de stress oxydants.**

**a) Cellulaires:** Outre certains organites cellulaires tels que les mitochondries et le réticulum endoplasmique, les PMN neutrophiles, les monocytes circulants et les macrophages tissulaires peuvent produire un stress oxydant. Dans certaines conditions, ce stress peut être produit à proximité des cellules endothéliales. On constate notamment que lors des processus inflammatoires les leucocytes vont adhérer à l'endothélium et que l'un des facteurs importants intervenant dans la migration et l'adhérence des PMN est le facteur chimotactique C<sub>5a</sub> (Sacks *et al.* 1978). Ce facteur va activer les neutrophiles qui libéreront alors des dérivés actifs de l'O<sub>2</sub> tels que l'O<sub>2</sub><sup>·-</sup> et l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suite à une flambée respiratoire de ces cellules (figure 2-4) (Moldow, 1984). La libération de ces dérivés actifs de l'O<sub>2</sub> pourrait provoquer un afflux de phagocytes et surtout endommager les cellules endothéliales (Wickham *et al.*, 1988). De plus, le PAF (Platelet Activating Factor) semble augmenter la réponse oxydative du neutrophile soumis à divers stimuli et pourrait dès lors intervenir dans la lésion des cellules endothéliales (Wickham *et al.*, 1988).

Récemment des études ont démontré que la cellule endothéliale activée est capable de produire elle-même un stress oxydant (Rosen & Freeman, 1984; Matsubasa & Ziff, 1986; Ryan & Vann, 1988). En effet de par le rôle d'interface que joue la cellule endothéliale, celle-ci reçoit de nombreux signaux et pourrait être activée par des mécanismes oxygène-dépendant ou autres déclenchant la libération de l'O<sub>2</sub><sup>·-</sup>. Ce processus impliquerait une élévation de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> et l'activation de la protéine kinase C (Matsubasa & Ziff, 1986). Ceci appuie davantage l'idée d'une cellule endothéliale dynamique, pourvue d'une activité régulatrice et susceptible de répondre à de nombreux stimuli (Ryan, 1989).

## **b) Acellulaires : le système xanthine-xanthine oxydase.**

En 1969, on est parvenu à transformer in vitro une xanthine déshydrogénase en une xanthine oxydase. Celle-ci transfère les électrons de son substrat (la

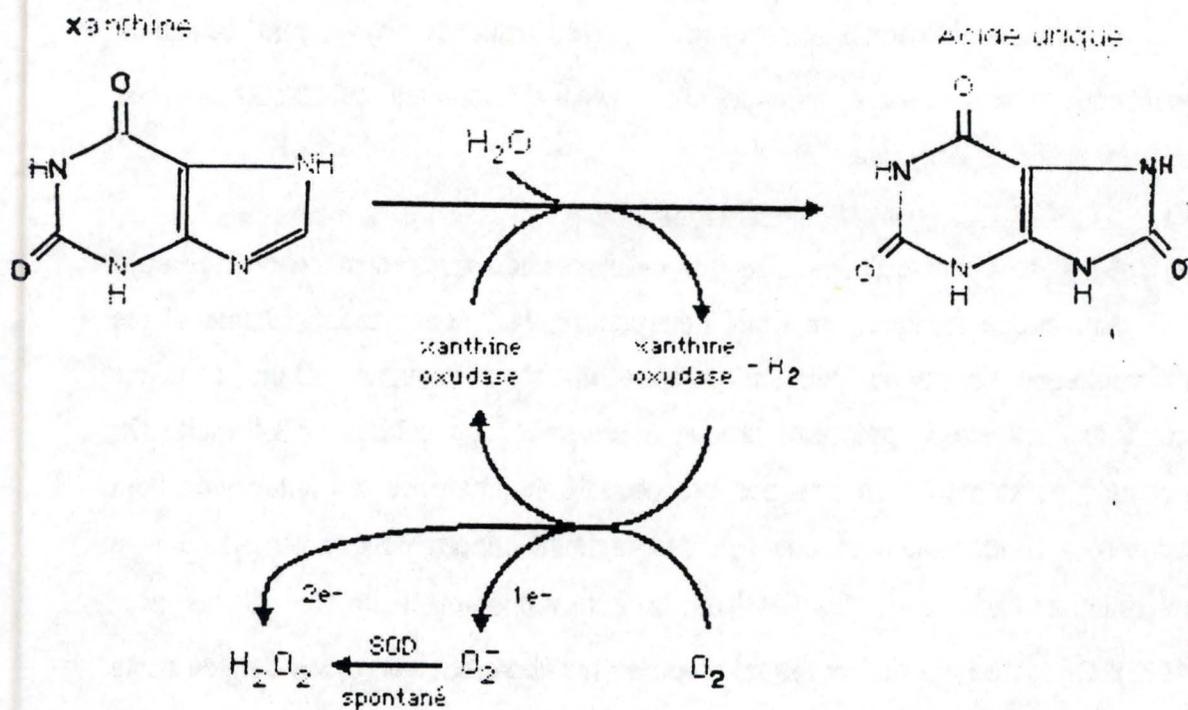


Figure 2-5 Oxydation de la xanthine en acide urique par la xanthine oxydase.

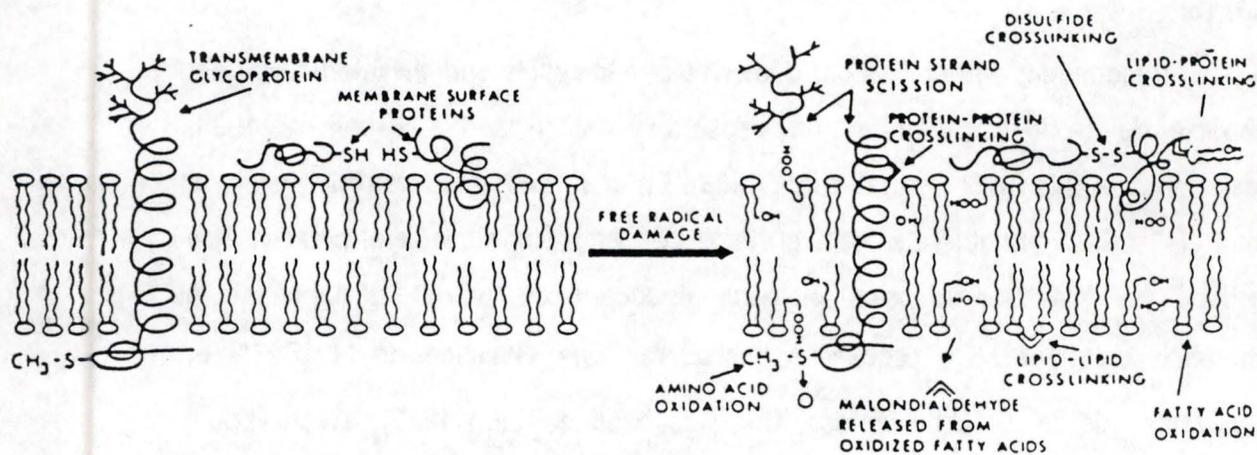


Figure 2-6 Structure des membranes biologiques et conséquences des lésions induites par les radicaux libres sur les composants membranaires (Freeman & Crapo, 1982)

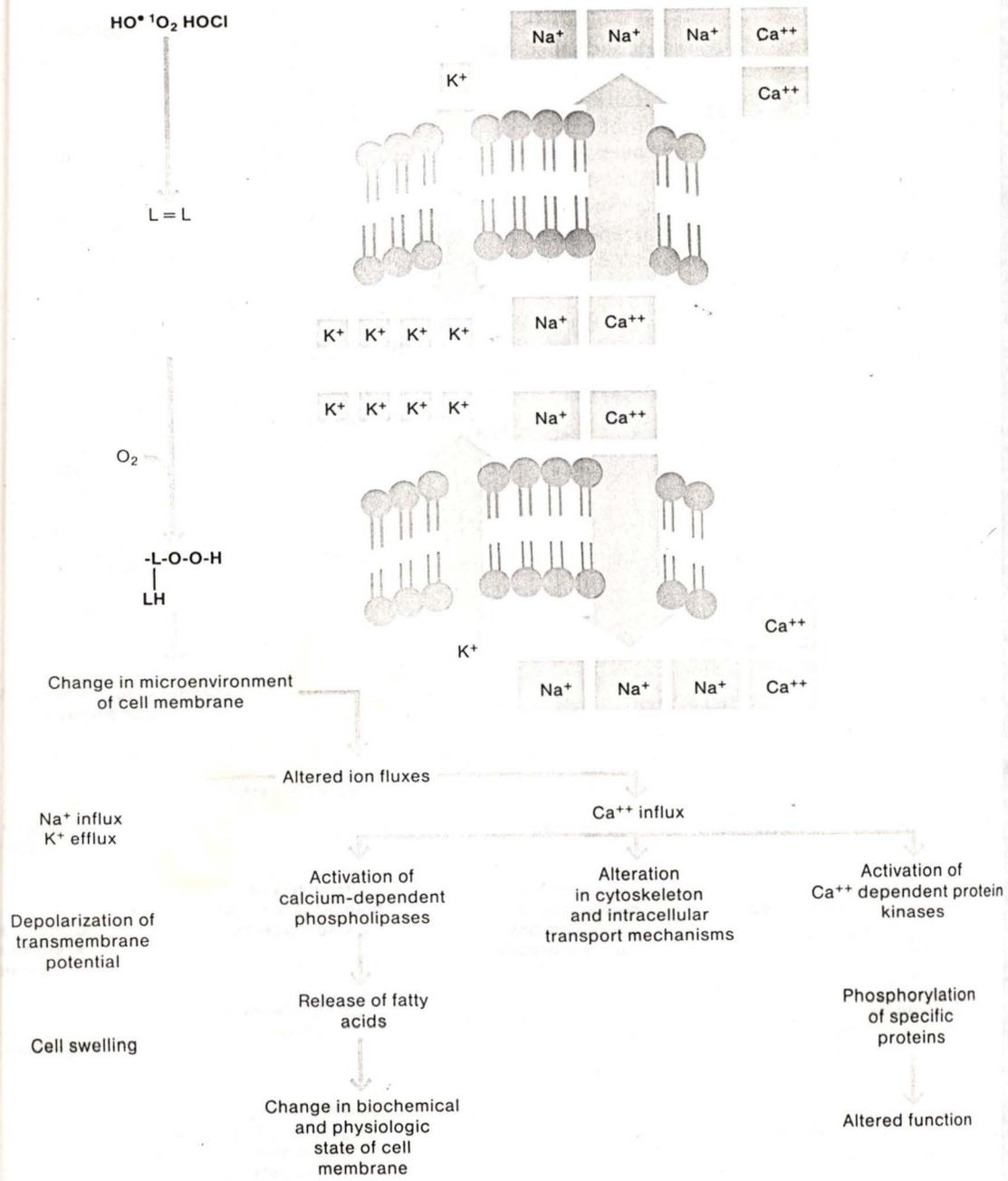
xanthine) vers l'O<sub>2</sub> et produit ainsi les dérivés actifs O<sub>2</sub><sup>-</sup> et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Bindoli *et al.*, 1988) (fig. 2-5).

Il faut remarquer que l'ischémie peut aussi in vivo produire la xanthine oxydase. Le manque d'oxygène va provoquer une accumulation d'AMP qui sera transformée en hypoxanthine alors que simultanément la xanthine déshydrogénase sera clivée par une protéase en xanthine oxydase amenant ainsi l'élaboration de ces mêmes dérivés actifs (Mc Cord, 1985).

### **3) Effets du stress oxydant sur les cellules endothéliales.**

Les dérivés actifs de l'O<sub>2</sub> peuvent réagir avec les constituants membranaires, protéiques et chromosomiques des cellules et y provoquer de graves lésions fonctionnelles et structurelles. En effet le stress oxydant peut scinder les brins de DNA ou modifier la composition des nucléotides ainsi que former des ponts disulfures au sein des protéines. Les résidus proline y apparaissent comme étant un lieu privilégié de l'attaque des dérivés actifs. Les lipides constituent une autre cible importante. La peroxydation lipidique résulte de l'action du stress oxydant sur les structures membranaires qui, au niveau des acides gras polyinsaturés des phospholipides forment des cibles privilégiées pour les radicaux libres (Blakes *et al.*, 1987). Cela aboutira à la formation de peroxydes lipidiques (L-O-O·) qui se décomposeront finalement en aldéhydes (ex: la malondialdéhyde) qui pourront provoquer d'autres dommages ailleurs dans la cellule (figure 2-6) (Slater, 1984). De plus, on observe des réactions de propagation avec formation de nouveaux radicaux, ce qui aura pour conséquence l'altération de grandes portions membranaires (Burton, 1988). Rappelons que les lipides polyinsaturés (ex: l'acide arachidonique) sont particulièrement sensibles à la peroxydation lipidique (Blakes *et al.*, 1987). Le radical hydroxyl peut aussi inactiver les enzymes et les protéines de transport membranaires provoquant ainsi l'incapacité de la membrane à maintenir ses gradients ioniques et permettront une accumulation de calcium intracellulaire (Burton, 1988).

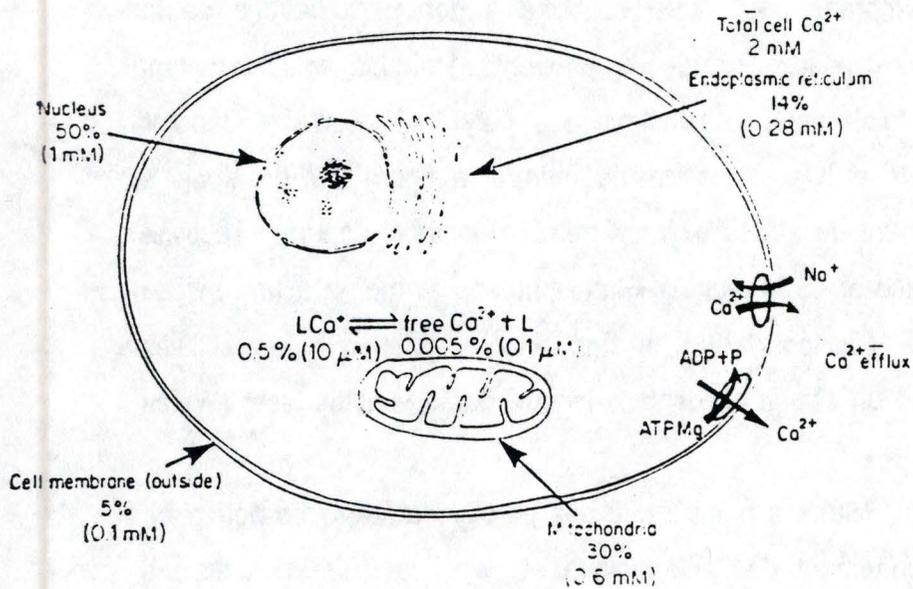
Les cellules endothéliales sont des cellules métaboliquement très actives et le maintien de l'intégrité fonctionnelle et structurelle de leur membrane semble essentielle à leur fonctionnement (Patel & Block, 1988). Cependant ces cellules sont certainement particulièrement exposées aux effets du stress oxydant et elles



**Figure 2-7** Effets de la peroxydation lipidique sur les fonctions membranaires  
(Fantone & Ward, 1985)

peuvent voir leurs fonctions régulatrices compromises. Certaines études montrent que la fluidité et la perméabilité des membranes des cellules endothéliales soumises à un stress oxydant sont modifiées (Freeman *et al.*, 1986). L'altération de la fluidité membranaire peut perturber les fonctions enzymatiques, de transport et d'internalisation dépendant de la membrane et interférer avec l'activité normale des pompes ioniques (Patel & Block, 1988). Une action oxydative sur les protéines de transport de la membrane peut aussi conduire à des perturbations de la perméabilité membranaire altérant ainsi les gradients ioniques et provoquant l'influx d'un excès de calcium intracytoplasmique libre qui pourra engendrer d'autres bouleversements cellulaires comme le montre la figure 2-7 (Fantone & Ward, 1985). Parallèlement, le stress oxydant semblerait aussi déprimer l'activité de la cytochrome oxydase et de la glucose-6-phosphatase et mener à une baisse de la production d'ATP (Burton, 1988). Il faut encore noter que les cellules endothéliales soumises à un stress oxydant de longue durée vont se lyser (Weiss *et al.*, 1981).

Hennig et Chow (1988) ont montré que des peroxydes lipidiques pouvaient provoquer un disfonctionnement de l'endothélium et dès lors initier des lésions athéroscléreuses. En effet les lésions produites par les peroxydes lipidiques semblent favoriser l'entrée des LDL dans la paroi artérielle, augmenter l'adhésion des neutrophiles et des plaquettes par inactivation de la prostacycline synthétase des cellules endothéliales et accélérer la formation de facteurs chémotactiques plaquettaires nécessaires à la migration des cellules musculaires lisses. Ces travaux appuient l'idée que le stress oxydant serait un facteur responsable des lésions athéroscléreuses agissant via des altérations fonctionnelles de l'endothélium et pouvant aussi produire des changements dans d'autres constituants de la paroi artérielle. Par ailleurs, dans le même ordre d'idée, Poumay et Ronveaux-Dupal (1988) ont démontré qu'un stress oxydant inhibait l'endocytose spécifique des LDL dans les cellules endothéliales.



**Figure 3-1.** Répartition du  $\text{Ca}^{2+}$  dans une cellule eucaryote typique.

(Campbell, 1983)

### III. L'homéostasie calcique.

#### A) En conditions normales .

##### 1) L'importance du calcium.

Il est admis depuis longtemps que le  $\text{Ca}^{2+}$  constitue un élément primordial du squelette de la majorité des êtres vivants. Cependant il semble également jouer un rôle biologique important en tant que messenger secondaire intracellulaire . En effet, nombreux sont les signaux qui déclenchent les réponses physiologiques de la cellule via une modulation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Exton, 1988).

La  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  libre élevée dans le milieu extracellulaire (mM) par rapport à celle du milieu intracytoplasmique ( $0,1 \mu\text{M}$ ) et la force électrochimique qui en résulte aident à expliquer son rôle de régulateur intracellulaire puisque de petites modifications dans la perméabilité membranaire au  $\text{Ca}^{2+}$  , induites par divers stimuli, auront pour conséquences de significatives fluctuations de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Carafoli, 1987).

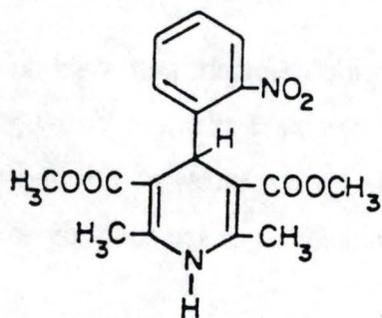
En résumé on considère que le  $\text{Ca}^{2+}$  remplit les rôles biologiques suivants (Campbell, 1983):

- Un rôle structurel: c'est un élément de base du squelette de la plupart des animaux et le  $\text{Ca}^{2+}$  joue aussi dans le maintien de la structure des cellules eucaryotes.
- Un rôle électrique: le  $\text{Ca}^{2+}$  peut effectivement transporter une quantité de courant durant un potentiel d'action dans les cellules des vertébrés et des invertébrés .
- Un rôle de cofacteur pour les protéines et les enzymes extracellulaires: afin de stabiliser ou de leur conférer une activité maximale.
- Un rôle de régulateur intracellulaire: un stimulus provoque l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire ou la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  des réserves ( principalement le réticulum endoplasmique et les mitochondries ) dont résultera une modification dans le comportement cellulaire.

La répartition du  $\text{Ca}^{2+}$  dans une cellule dite " typique " peut être schématisée selon la figure 3-1 (Campbell, 1983).

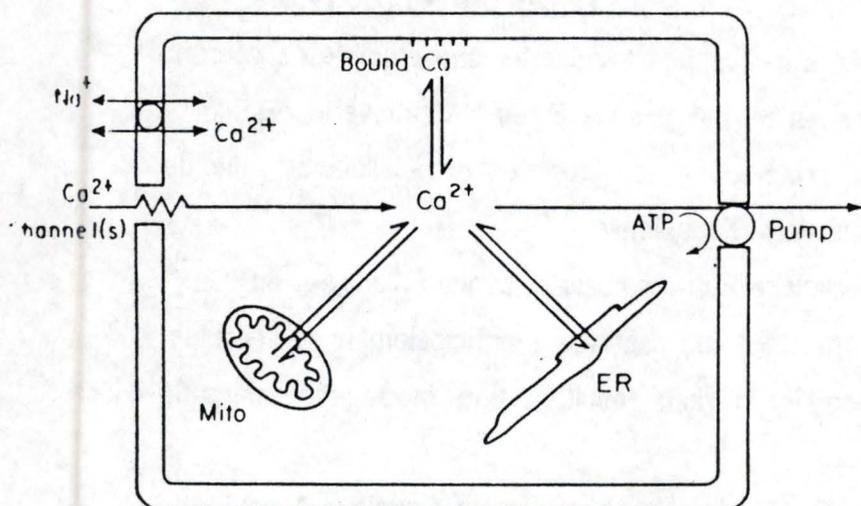
##### 2) La perméabilité membranaire au $\text{Ca}^{++}$ .

Résultant du gradient qui s'établit de part et d'autre de la membrane, la cellule limite les échanges de  $\text{Ca}^{2+}$  avec le milieu extracellulaire et les contrôle avec soin.



Nifedipine (Adalat, Bay a1040)

**Figure 3-2** Structure de la nifedipine.  
(Campbell, 1983)



**Figure 3-3** Mécanismes contrôlant la  $[Ca^{2+}]_i$  dans une cellule de mammifère.  
(Exton, 1988)

Dans ces conditions, des modifications de la perméabilité membranaire ( mêmes mineures ) pourraient perturber assez fortement la  $[Ca^{2+}]_i$  et donc ultérieurement les fonctions cellulaires. Ceci permettrait d'expliquer l'importance des systèmes de transport du  $Ca^{2+}$  (Carafoli, 1987).

Parmi les systèmes membranaires qui contrôlent la  $[Ca^{2+}]_i$  dans la plupart des cellules des mammifères, on distingue:

**a) Les mécanismes contrôlant l'entrée de  $Ca^{2+}$ .**

La majorité des cellules semblent contenir des canaux calciques dans leurs membranes. Ceux-ci peuvent être voltage-dépendants et s'ouvrir suite à une dépolarisation induite par des agonistes ou des antagonistes. Les canaux voltage-dépendants sont de trois types qui possèdent des conductances et des caractéristiques temporelles spécifiques (Exton, 1988). La sélectivité du  $Ca^{2+}$  semblerait ne pas être absolue car le  $Ba^{2+}$  et le  $Sr^{2+}$  pourraient également être transportés. Cependant on a postulé l'idée d'un filtre sélectif qui empêcherait l'entrée des cations monovalents (Carafoli, 1987). Ces canaux peuvent être bloqués par des composés organiques tels que le Vérapamil ou la Nifédipine (figure 3-2) qui entrent par le canal et le bloquent de l'intérieur (Carafoli, 1987).

Certains auteurs proposent aussi des canaux voltage-indépendants qui sont insensibles aux bloqueurs de canaux que nous avons cités précédemment. Ces canaux seraient régulés par des protéines G couplées à des récepteurs (eux-mêmes dépendants du  $Ca^{2+}$ ) et qui activent la phospholipase C. Alors que s'initiera l'hydrolyse des phosphoinositides en Inositol triphosphate et en diacylglycérol, simultanément on observera une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  mobilisée via ces canaux (figure 3-3) (Exton, 1988 ; Westwick & Poll, 1983).

**b) les mécanismes contrôlant la sortie du  $Ca^{2+}$ .**

Puisqu'une entrée excessive de  $Ca^{2+}$  peut provoquer la mort cellulaire, entre autre par une trop forte activation des protéases, toutes les cellules possèdent des systèmes d'extrusion du  $Ca^{2+}$  (Exton, 1988). En effet, le maintien d'une  $[Ca^{2+}]_i$  faible est assuré par des pompes à calcium. On distingue une enzyme ATPase membranaire qui couple l'extrusion de  $Ca^{2+}$  à l'hydrolyse de l'ATP, fournissant l'énergie nécessaire à ce processus de transport actif. Cette pompe a une forte affinité pour le  $Ca^{2+}$  ( $K_M Ca^{2+} < 1\mu M$ ) mais une faible capacité. La membrane

possède aussi un système d'antiport  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  qui, lui, montre une plus forte capacité avec une affinité réduite pour exclure le  $\text{Ca}^{2+}$  (Exton, 1988 ; Campbell, 1983). Ce dernier système trouve sa principale source d'énergie dans le gradient de  $\text{Na}^+$ . Il avait d'abord été proposé que l'énergie de deux  $\text{Na}^+$  pouvait fournir l'énergie nécessaire à la sortie d'un  $\text{Ca}^{2+}$  mais cela se révéla trop peu pour un système opérant avec neutralité ( $2^+$  échangés de part et d'autre de la membrane). Un second système qui échangeait trois  $\text{Na}^+$  pour un  $\text{Ca}^{2+}$  fut alors proposé (Carafoli, 1987).

### **c) Le réticulum endoplasmique (RE) et la mitochondrie.**

Ces organites jouent un rôle fort important dans la régulation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Le réticulum endoplasmique dispose d'une ATPase calcique possédant une forte affinité ( $K_M \text{Ca}^{2+} = 0,5 - 1 \mu\text{M}$ ) pour ce cation. Cette dernière capte le calcium cytosolique excédentaire aussitôt que celui-ci se manifeste. On attribue au RE le rôle majeur dans le contrôle de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Le RE posséderait aussi un mécanisme distinct d'efflux du  $\text{Ca}^{2+}$  (pouvant intervenir lors de la stimulation par l'inositol triphosphate). Ces systèmes ont été bien examinés dans les cellules musculaires mais peu d'études ont été réalisées sur des cellules non-excitables (Campbell, 1983 ; Carafoli, 1987).

La mitochondrie peut capter le  $\text{Ca}^{2+}$  sous contrôle du gradient d' $\text{H}^+$  issu de la respiration mais la faible affinité du système pour le  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_M \text{Ca}^{2+} = 10 \mu\text{M}$ ) est telle que la mitochondrie ne joue un rôle régulateur que pour des  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  très élevées (10 fois la concentration normale). De plus, le taux de  $\text{Ca}^{2+}$  capté par la mitochondrie est d'un ordre moins élevé que celui du RE (Campbell, 1983 ; Exton, 1988). Comme le RE, la mitochondrie possède des systèmes distincts pour libérer son  $\text{Ca}^{2+}$  et parmi ceux-ci on trouve un échangeur (antiport)  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (Exton, 1988). On a récemment suggéré que les granules de phosphate de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{CaP}$ ) stockés dans la mitochondrie ne contiendraient pas en réalité de  $\text{Ca}^{2+}$  mais seraient des granules composés de phosphates liés à des phospholipides et que le  $\text{Ca}^{2+}$  ne s'associerait à ceux-ci que lors d'une perte de l'imperméabilité membranaire (Carafoli, 1987).

### **d) Les systèmes- tampons intracytoplasmiques.**

Les cellules possèdent une variété de protéines capables de fixer le  $\text{Ca}^{2+}$  et d'assurer ainsi un milieu intracellulaire bien tamponné envers le  $\text{Ca}^{2+}$ . Parmi ces protéines on connaît surtout la calmoduline et la troponine. Elles ont une grande affinité de même qu'une forte sélectivité. Bien que complexant une importante portion du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique, ces protéines semblent interagir avec le  $\text{Ca}^{2+}$  pour une raison autre que de tamponner le milieu intracellulaire. Elles sembleraient par leur grande affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  jouer le rôle de médiateurs dans la transduction de l'information de la membrane plasmique vers les régions-cibles (Carafoli, 1987).

### **B) L'altération de l'homéostasie calcique par les dérivés actifs de l' $\text{O}_2$ et ses conséquences.**

Le maintien de l'homéostasie calcique est vital pour l'intégrité de la cellule et pour le contrôle des mécanismes d'activation cellulaire. Ce maintien nécessite la mise en oeuvre de toute une série de mécanismes membranaires (pompes et canaux au  $\text{Ca}^{2+}$ ) et cytoplasmiques (protéines liant le  $\text{Ca}^{2+}$  comme par exemple les calmodulines). Le maintien de l'homéostasie calcique passe donc par celui de la perméabilité membranaire.

Il a été montré que le stress oxydant pouvait perturber la perméabilité membranaire des cellules entraînant ainsi une modification des gradients ioniques (Burton *et al.*, 1988). Il en résultait un influx de  $\text{Ca}^{2+}$  et de  $\text{Na}^+$  alors qu'on assistait à un efflux de  $\text{K}^+$  (Holmes & Kummerow, 1985). Différents types cellulaires furent étudiés dont les hépatocytes et les cellules endothéliales.

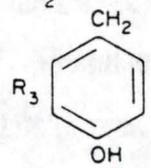
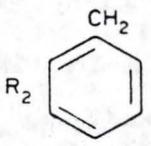
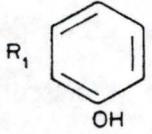
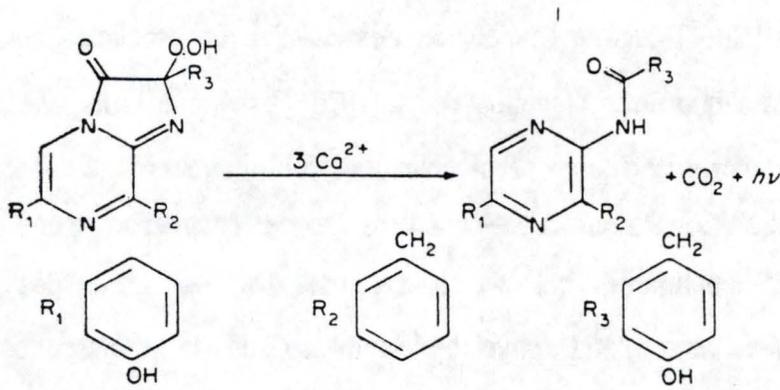
On observe dans les hépatocytes soumis à un stress oxydant une débillance précoce de l'homéostasie calcique accompagnée d'une déplétion du glutathion (Starke *et al.*, 1986). Il semble alors s'ensuivre des phénomènes de blebbing résultant probablement de l'activation de protéases  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendantes, ce qui nous montre le rôle important du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la structure du cytosquelette (Nicotera *et al.*, 1986). D'autres observations marquent aussi des altérations fonctionnelles au niveau des mitochondries entraînant l'irréversibilité des lésions (Starke *et al.*, 1986). Tout cela aboutit finalement à la mort cellulaire.

Des études concernant la débillance de l'homéostasie calcique suite à un stress oxydant ont aussi été réalisées sur des cellules P388D<sub>1</sub> et des cellules endothéliales (Hyslop *et al.*, 1986; Hirosumi *et al.*, 1988). Elles semblent attester

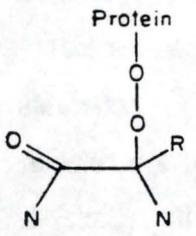
une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  suite à l'exposition des cellules endothéliales au stress oxydant. On constate que cette élévation de la  $[Ca^{2+}]_i$  mène à toute une série de transformations morphologiques et biochimiques qui conduiront à une perte de la viabilité cellulaire. Parmi celles-ci on remarque l'activation d'une phospholipase  $A_2$   $Ca^{2+}$ -dépendante qui va libérer des acides gras des phospholipides et modifier ainsi l'état physico-biochimique de la membrane plasmique (Hyslop *et al.*, 1986) augmentant la perméabilité. On trouve de même des altérations morphologiques telles que l'interruption du pattern des stress fibres et l'accumulation d'actine-F en périphérie de la cellule (Stolz & Bereiter-Hahn, 1988). Des phénomènes de blebbing ont également été constatés (Thibaut-Vercruyssen *et al.*, 1988). On pourrait dès lors supposer qu'une relation étroite unit l'homéostasie calcique à l'organisation du cytosquelette (Stolz & Bereiter-Hahn, 1988).

Un éventail des altérations occasionnées par l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  dans les cellules est proposé par la figure 2-7.

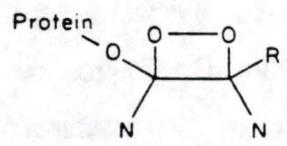
Par ailleurs, Hennig & Chow (1988) ont précisé que tout phénomène intervenant lors de l'atteinte à l'intégrité des cellules endothéliales pouvait s'insérer dans les événements précoces menant aux lésions athéroscléreuses. La forte sensibilité de l'endothélium au stress oxydant et l'augmentation de la  $Ca^{2+}$  qui peut en résulter laissent supposer une implication de la perturbation de l'homéostasie calcique dans le processus de l'athérogenèse.



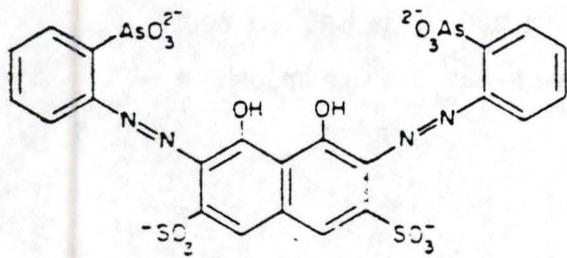
Chromophore  
bound as



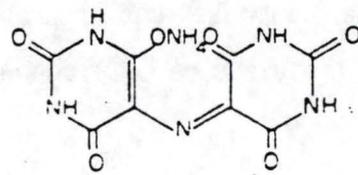
or



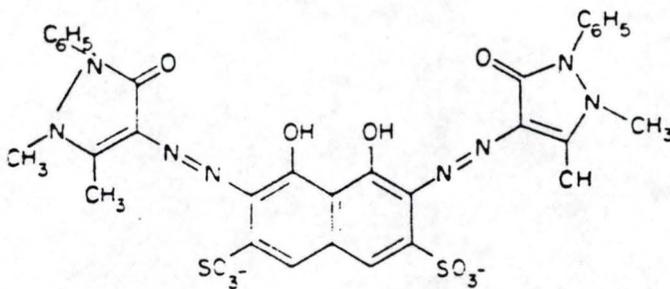
**Figure 4-1** Réaction des photoprotéines activées par le  $\text{Ca}^{2+}$ . Le chromophore est lié de façon covalente à la protéine (Campbell, 1983)



Arsenazo III



Murexide (ammonium purpurate)



Antipyrilazo III

**Figure 4-2** Indicateurs métallochromiques.

## IV. La mesure du calcium intracellulaire libre.

### A) Avant-propos.

Le calcium libre cytoplasmique apparaît comme étant le messager secondaire le plus dynamique actuellement connu dans la cellule (Tsien & Poenie, 1986). L'évaluation de son rôle en tant que messager intracellulaire nécessite des techniques capables d'effectuer la mesure quantitative de la concentration de calcium cytosolique libre ( $[Ca^{2+}]_i$ ) de manière très précise dans une zone de concentration allant de 10 à 100 nMoles en présence d'excès d'autres cations tels que le  $Mg^{2+}$  ainsi que la détection des modulations de la  $[Ca^{2+}]_i$  après stimulation (Campbell, 1983). Au cours de ces dernières décennies diverses techniques d'estimation ont été exploitées, pour déterminer la  $[Ca^{2+}]_i$  sans pour autant altérer les propriétés fonctionnelles des cellules.

### B) Historique des méthodes de détection de la $[Ca^{2+}]_i$ .

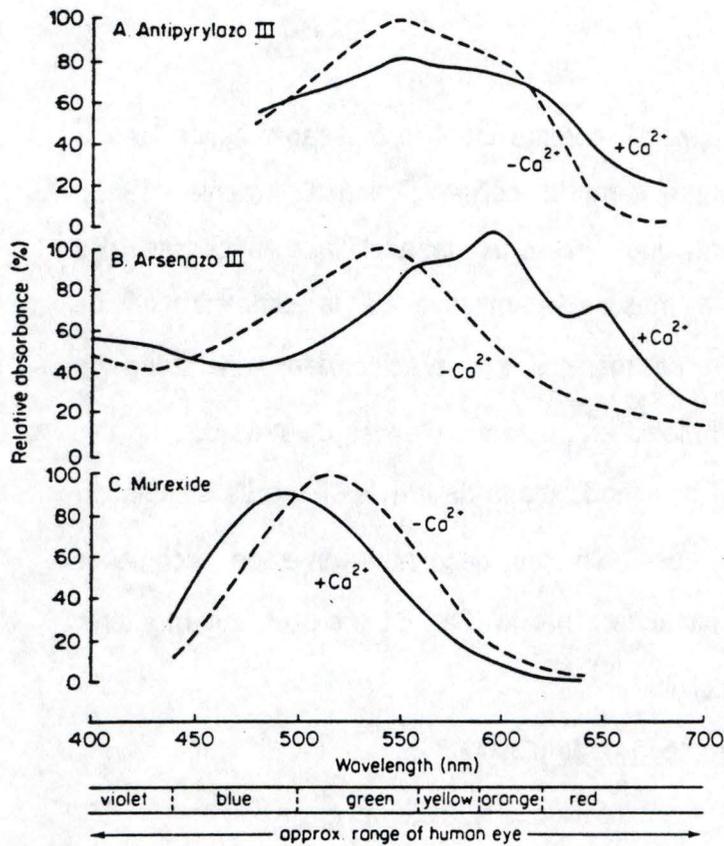
#### 1) Précipitation de sels de calcium.

En 1928, Pollack injecta (par microinjection) la sonde sulfonate de sodium d'alizarine dans une amibe afin d'y mesurer la  $[Ca^{2+}]_i$ . Malheureusement cette sonde n'était pas spécifique du calcium et de plus, on ne parvint pas à obtenir une mesure quantitative fiable de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Campbell, 1983).

#### 2) Photoprotéines activées par le $Ca^{2+}$ (figure 4-1).

Des études réalisées sur *Aequorea forskalea* et *Obelia geniculata* amenèrent la découverte de protéines qui émettaient de la lumière lors de la fixation du  $Ca^{2+}$ . L'énergie émise provenait non pas de la liaison du  $Ca^{2+}$  à la protéine mais d'une réaction chimique au sein du groupement prosthétique de la protéine. L'Aequorine et l'Obéline constituent les photoprotéines les plus couramment utilisées. En conditions physiologiques, les photoprotéines sont adéquates pour la mesure de la  $[Ca^{2+}]_i$  dans un intervalle de concentration de 0,1-10  $\mu M$  (Campbell, 1983) et ne couvrent donc pas la zone la plus intéressante (énoncée dans l'avant-propos).

#### 3) Les indicateurs métallochromiques (figure 4-2).



**Figure 4-3** Spectres d'absorbance de trois indicateurs métallochromiques

Antipyrilazo III  $\xrightarrow{Ca^{++}}$  un peu plus rouge

Arsenazo III pourpre  $\xrightarrow{Ca^{++}}$  bleu

Murexide pourpre  $\xrightarrow{Ca^{++}}$  rose

(Campbell, 1983)

Ce sont des composés qui changent de couleur lorsqu'ils lient le calcium. La mesure se fonde sur le déplacement du pic d'absorbance lors de la liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  à la sonde (figure 4-3). La sonde Arsenazo 3 est la plus fréquemment utilisée pour les mesures à basse concentration en calcium (Campbell, 1983).

#### 4) Les indicateurs fluorescents.

L'apparition des esters de chélateurs fluorescents du  $\text{Ca}^{2+}$  a permis l'étude de cellules trop petites ou trop fragiles pour être examinées par microinjection (ex.: les cellules endothéliales). Ces esters fluorescents sont devenus les outils de prédilection pour la mesure de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ; et une vaste gamme de sondes a été développée au cours de ces dernières années: **Quin 2**, **Fura 2**, **Indo 1**,... (Grynkiewicz *et al.*, 1985).

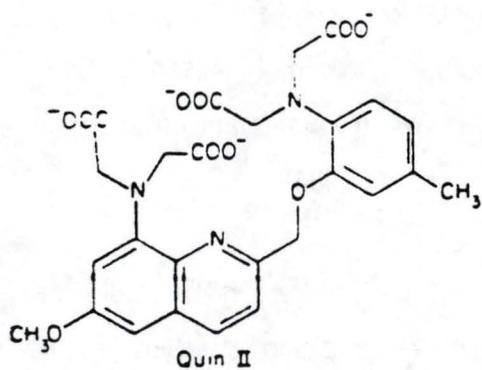
### C) Etude des indicateurs fluorescents.

#### 1) Principe de la fluorescence.

En bref, l'absorption d'un photon par une molécule peut provoquer le passage de l'électron d'un niveau vibrationnel de son état fondamental à l'un des niveaux vibrationnels d'un état excité. L'électron peut revenir à son état fondamental en dissipant spontanément son énergie sous forme de photon provoquant ainsi un phénomène de fluorescence à une longueur d'onde caractéristique de l'élément considéré. Ce processus radiatif possède une durée de vie très courte ( $10^{-8}$  sec) et l'intensité de la fluorescence est directement proportionnelle à la concentration du composé fluorescent.

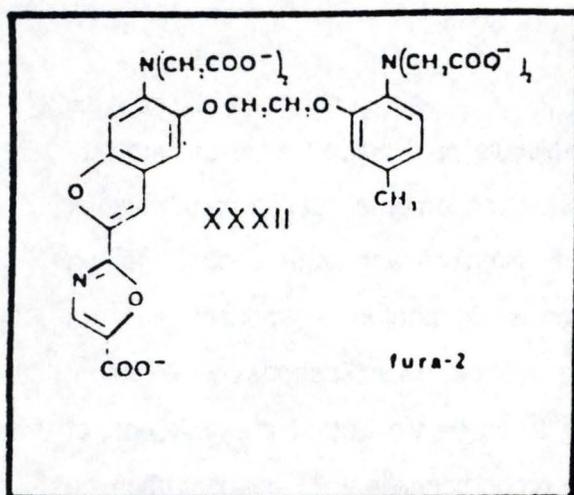
#### 2) Exigences d'une sonde fluorescente.

-Une sonde fluorescente doit pouvoir traverser la membrane cellulaire. Cependant les indicateurs fluorescents montrent un caractère hydrophile car ce sont des anions polycarboxyliques sous leur forme non estérifiée (Grynkiewicz *et al.*, 1985) et ils ne peuvent dès lors traverser la membrane lipidique hydrophobe. Le passage transmembranaire sera rendu possible grâce à la présence d'un ester (un acétoxyméthylester dans le cas des sondes que nous allons considérer) qui, une fois incorporé dans le cytoplasme de la cellule, va se retrouver clivé par des estérases cytosoliques non spécifiques en formaldéhyde et en acide formique (Haugland, 1989). La sonde déestérifiée devient alors active et pourra ainsi complexer le  $\text{Ca}^{2+}$ . De plus, la perte de l'ester l'empêchera de ressortir de la cellule



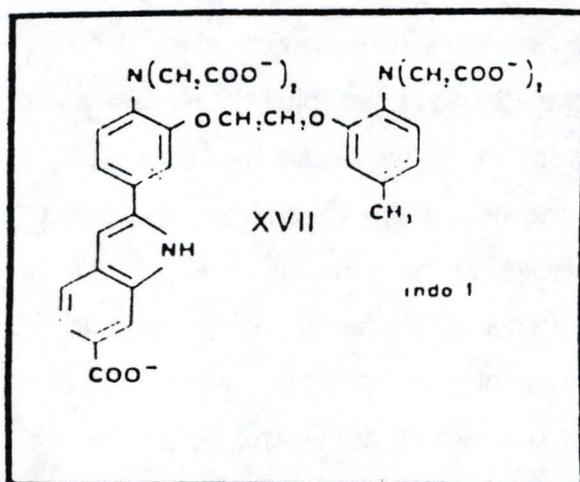
**Figure 4-4:** Structure du Quin-2.

(Campbell 1983)



**Figure 4-5:** Structure du Fura-2

(Grynkiewicz *et al.* 1985)



**Figure 4-6:** Structure de l'Indo-1.

(Grynkiewicz *et al.* 1985)

et d'entrer dans les organites limitant ainsi la mesure au  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique (Tsien *et al.*, 1984). Certaines réserves sont toutefois émises à ce propos : ainsi, certains auteurs ont constaté, pour le Fura-2 AM, une localisation essentiellement mitochondriale dans des cellules endothéliales (Steinberg *et al.*, 1987). Cette localisation est probablement le résultat d'une hydrolyse incomplète au niveau du cytosol, ce qui permet à la sonde d'entrer dans les mitochondries et d'y être hydrolysée par les estérases qu'elle y rencontre. Ceci semble confirmé par Tsien mais avec une localisation subcellulaire qui ne serait pas uniquement mitochondriale.

-La sonde devra émettre une fluorescence significative afin de discriminer l'autofluorescence cellulaire tout en restant efficace pour des concentrations de l'ordre du nMolaire (Grynkiewicz *et al.*, 1985).

-La constante de dissociation des sondes devra être la plus élevée possible pour empêcher tout effet de tampon qui pourrait résulter de la présence de la sonde.

### 3) Inventaire des indicateurs fluorescents.

#### a) Un prototype: le Quin-2.

Ce fut la première sonde fluorescente pourvue de groupements acétoxyméthylesters (Quin-2 AM) à être commercialisée (fig 4-4). Elle préparait en effet le terrain pour une nouvelle génération d'indicateurs fluorescents (détaillés ci-après). Elle possédait sur les autres sondes de l'époque l'avantage de pouvoir pénétrer dans des cellules intactes. On observait que le pic d'excitation de la fluorescence du Quin-2 lié au  $\text{Ca}^{2+}$  ne marquait qu'un très léger déplacement comparativement à celui de la sonde libre et que le pic se manifestait à 339nm pour une émission récoltée à 490 nm (Rink & Pozzan, 1985). Cette propriété allait déterminer l'utilisation de l'équation suivante:

$$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cytosolique}} = K_d * \frac{[\text{Ca}^{2+} \text{ complexé}]}{[\text{sonde libre}]}$$

Ceci avec une constante de dissociation de 115nM pour le Quin-2 (à 37°C).

Le rapport  $\frac{[\text{Ca}^{2+} \text{ complexé}]}{[\text{sonde libre}]}$  est donné par  $\frac{[F - F_{\text{min}}]}{[F_{\text{max}} - F]}$

où  $F$ ,  $F_{\text{max}}$ ,  $F_{\text{min}}$  sont respectivement les intensités fluorescentes observées dans

le test, en présence d'un excès de  $\text{Ca}^{2+}$  et dans un milieu libre en  $\text{Ca}^{2+}$  (ex: si celui-ci a été chélaté par de l' EGTA). Ces fluorescences sont mesurées par spectrofluorimétrie (Rink & Pozzan, 1985).

Cependant, certains problèmes se manifestent lors de l'utilisation du Quin-2. La sonde complexée au  $\text{Ca}^{2+}$  montre un pic d'excitation à une longueur d'onde où se manifeste également l'autofluorescence forçant ainsi l'utilisateur à employer de fortes quantités de sonde afin de surmonter cette autofluorescence. L'utilisation de concentrations importantes est aussi exigée de par la faible fluorescence qu'émet la sonde. De telles concentrations tamponnent le  $\text{Ca}^{2+}$  intracytoplasmique et peuvent conduire à une sous-estimation des modifications de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . De plus, suite à une trop forte affinité du Quin-2 pour le  $\text{Ca}^{2+}$ , la fixation du Quin-2 au  $\text{Ca}^{2+}$  ne se réalise pas avec une stoechiométrie 1:1. Le Quin-2 se lie aussi avec d'autres ions tels que le  $\text{Mg}^{2+}$  (Grynkiewicz *et al.*, 1985). Par ailleurs, l'utilisation directe des intensités de fluorescence dans le calcul de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  rend la méthode sensible à des facteurs tels que l'intensité d'illumination, l'efficacité de la fluorescence collectée à l'émission, la concentration de la sonde et l'épaisseur des cellules mesurées dans le faisceau lumineux (Grynkiewicz *et al.*, 1985).

Il apparaît dès lors que si la sonde a la capacité de mettre en évidence la modulation du  $\text{Ca}^{2+}$  en réponse à divers stimuli tout en restant dans la zone de concentration  $\mu\text{Molaire}$  elle est cependant impuissante à fournir une mesure quantitative satisfaisante.

#### **b) Le Fura-2** (fig.4-5).

Elle constitue la sonde fluorescente estérifiée la plus en vogue actuellement et nos propres expériences utiliseront cette molécule. Elle possède de nombreux avantages vis-à-vis de son prédécesseur le Quin-2 parmi lesquels on distingue:

-Une fluorescence qui est approximativement 30 fois supérieure à celle du Quin-2. On constate en effet une absorbance augmentée 6X ainsi qu'un quantum d'énergie 5X supérieur. Cette fluorescence accrue permet des mesures aussi précises avec des concentrations en sonde nettement inférieures (Grynkiewicz *et al.*, 1985).

-L'influence tampon de la sonde sur des changements dans les flux calciques transmembranaires est moindre suite à cette fluorescence accrue mais aussi parce que le Fura-2 lie moins le  $\text{Ca}^{2+}$  ( sa constante de dissociation vaut 224 nM à 37°C).

-On remarque une meilleure sélectivité pour le  $\text{Ca}^{2+}$ . Effectivement le Fura-2 discrimine mieux les  $\text{Mg}^{2+}$  et les autres métaux qui amortissent la fluorescence de la sonde. Ceci pourrait être causé par les liens éthers qui relient les hétérocycles et l'absence de groupements quinolines (comme le montre la structure du Fura-2 à la figure 4-5) (Grynkiewicz *et al.*, 1985).

-L'affinité de la sonde Fura-2 étant plus faible que celle du Quin-2, la stoechiométrie 1:1 est mieux respectée et cela permet une estimation plus exacte de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Haugland, 1989).

-Il y a un déplacement du pic d'excitation lors de la liaison de la sonde au  $\text{Ca}^{2+}$ . Ce déplacement permettra une comparaison des intensités à 380 nm (sonde libre) et à 340 nm (sonde liée au  $\text{Ca}^{2+}$ ) ainsi que le calcul de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  par la méthode des ratios. La méthode des ratios peut être décrite comme suit (Grynkiewicz *et al.*, 1985):

-Si nous estimons avoir deux longueurs d'onde d'excitation ( $L_1$  et  $L_2$ ) et deux espèces de sondes (la sonde libre:  $S_f$  et la sonde liée:  $S_b$ ), il y aura dès lors 4 coefficients à considérer:  $-S_{f1}$ : la sonde libre mesurée à  $L_1$ .

$-S_{f2}$ : la sonde libre mesurée à  $L_2$ .

$-S_{b1}$ : la sonde liée mesurée à  $L_1$ .

$-S_{b2}$ : la sonde liée mesurée à  $L_2$ .

et ces coefficients  $S$  sont mesurés depuis les fluorescences émises. Pour un mélange de sondes libres et liées à des concentrations respectives  $C_f$  et  $C_b$ , l'intensité totale de fluorescence à  $L_1$  et à  $L_2$  sera exprimée comme suit:

$$-F_1 = S_{f1} \cdot C_f + S_{b1} \cdot C_b$$

$$-F_2 = S_{f2} \cdot C_f + S_{b2} \cdot C_b$$

Si la complexation respecte la stoechiométrie 1:1, alors on peut relier  $C_b$  et  $C_f$  à la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ :

$$C_b = C_f \cdot [\text{Ca}^{2+}]_i / K_d$$

De plus, comme le ratio vaut:  $R = F_1 / F_2$ ,

Dès lors:  $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \cdot ((R - (S_{f1}/S_{f2})) / ((S_{b1}/S_{b2}) - R)) \cdot (S_{f2} / S_{b2})$ .

Noter que  $(S_{f1}/S_{f2})$  est la valeur que peut avoir R à une  $[Ca^{2+}]$  valant zéro ( $R_{min}$ ) et que  $(S_{b1}/S_{b2})$  est le R à une  $[Ca^{2+}]$  qui sature la sonde ( $R_{max}$ ). On peut dès lors écrire l'équation de la façon suivante:

$$[Ca^{2+}] = K_d ((R - R_{min}) / (R_{max} - R)) * (S_{f2} / S_{b2}).$$

La méthode des ratios montre cependant certains désavantages. Il faut considérer l'autofluorescence des cellules à soustraire des intensités fluorescentes obtenues et on constate que le système permettant le passage immédiat d'une longueur d'onde à une autre est difficile à obtenir et coûteux.

Puisque le ratio évite l'utilisation de l'intensité fluorescente absolue, cela rendra la mesure de la  $[Ca^{2+}]_i$  indépendante du chargement, de la concentration de sonde (tant que le signal se maintient au-dessus de l'autofluorescence des cellules), de l'épaisseur des cellules et de la perte d'intensité fluorescente (photobleaching) (Haugland, 1989).

Outre le problème de l'autofluorescence cité précédemment, il existe aussi un risque d'interférence de la fluorescence de sondes qui ne sont pas désestérifiées dans certains types cellulaires qui manquent d'estérases (cela a surtout été constaté dans des cellules végétales) (Haugland, 1989). Il semblerait donc y avoir une tendance à la compartimentalisation. La constante de dissociation du Fura-2 est dépendante du pH, de la viscosité, de la température et de la force ionique ce qui la rend difficilement transposable d'un type cellulaire à l'autre (Haugland, 1989).

Malgré un problème de sensibilité pour une bonne interprétation quantitative, des estimations qualitatives et semi-quantitatives précises ont pu être obtenues faisant néanmoins de cette sonde un outil de choix pour l'étude de la  $[Ca^{2+}]_i$  et de ses modifications.

### c) L'Indo-1. (figure 4-6)

Cette sonde possède la plupart des propriétés du Fura-2. Cependant, lorsqu'elle se lie au  $Ca^{2+}$ , sa longueur d'onde d'émission se déplace de 480 nm (sonde libre) vers 405 nm (Lückhoff, 1986). On a aussi constaté une hydrolyse incomplète de son ester amenant ainsi le risque de voir la fluorescence émise par

l'Indo-1 AM interférer avec la fluorescence de l'Indo-1 clivé. En outre, cette interférence ne peut être quantifiée et la présence de sondes dont les esters n'ont pas été hydrolysés provoquerait la formation de stocks dans les organites faussant donc la mesure de la  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique (Lückhoff, 1986).

Alors que le Fura-2 semble plus approprié pour les examens en microscopie, la marge des longueurs d'onde étant plus importantes, l'Indo-1 est davantage conseillé pour la cytométrie de flux à cause de ses longueurs d'onde plus limitées facilitant le monitoring du cytomètre de flux (Haugland, 1989).

#### **d) Le Fluo-3.**

Récemment découverte par Tsien, cette sonde permet l'usage de longueurs d'onde plus larges pour déterminer la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Elle admet ainsi l'emploi des traditionnels filtres de fluorescéine. Comme le Quin-2, le Fluo-3 ne subit qu'un très faible déplacement de son pic (d'excitation ou d'émission) lors de sa complexation avec le  $\text{Ca}^{2+}$  mais ce dernier augmente de 40 fois l'intensité de sa fluorescence, ce qui en fait une sonde très sensible pour la mesure des flux calciques. De plus, contrairement aux autres sondes esterifiées, le Fluo-3 AM n'est pas fluorescent lorsqu'il n'est pas hydrolysé dans la cellule (Haugland, 1989).

En conclusion, on observe que l'importance des indicateurs fluorescents pourvus d'esters ne cesse de croître et que ceux-ci sont devenus indispensables à une bonne détermination des modulations cellulaires du calcium.

## V. Objectif du mémoire.

Certaines études récentes témoignent de l'implication de plus en plus nette des dérivés actifs de l'oxygène dans les processus athérogéniques et ces radicaux libres auraient comme principale cible les cellules endothéliales. On a déjà montré que des cellules endothéliales incubées dans un milieu oxydant marquaient une diminution du processing des LDL (Poumay & Ronveaux-Dupal, 1988). La modification de la  $[Ca^{2+}]_i$  pourrait être l'un des phénomènes précoces impliqués dans les modifications fonctionnelles de la cellule endothéliale (Mazière *et al.*, 1984). Bien que quelques travaux montrent cette augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  consécutive à l'action des dérivés actifs de l'oxygène (Hirosumi *et al.*, 1988) ou d'agents divers tels que la thrombine (Jaffe *et al.*, 1987; Wickham *et al.*, 1988), peu d'informations sont actuellement disponibles sur l'évolution des modulations du  $Ca^{2+}$ . Dans les conditions examinées précédemment, nous nous proposons d'étudier l'effet d'un stress oxydant sur l'homéostasie calcique de cellules endothéliales humaines.

## **CHAP. II : MATERIEL & METHODES**

### **I. Culture de cellules endothéliales.**

La culture des cellules endothéliales humaines de veine ombilicale a été réalisée selon une méthode établie par Jaffe et al. (1973) et adaptée par Poumay (1988).

#### **A) Mise en culture des cellules endothéliales.**

Lors de leur prélèvement, les cordons ombilicaux sont placés dans un tampon nommé "Cord Buffer" (140 mM NaCl - 4 mM KCl - 11 mM D-Glucose - 1 mM tampon phosphate; pH 7.4). Ils y sont maintenus à une température de 4°C en attendant l'isolement et la mise en culture des cellules endothéliales, au plus tôt 4 heures après l'accouchement.

La mise en culture débute par la perfusion de la veine ombilicale par 20 ml de Cord Buffer au moyen d'un système seringue - trocard enfoncé dans la veine ombilicale. La perfusion va débarasser cette dernière du sang obstruant. On remplit ensuite la veine avec 10 ml de collagénase (0.1 % dans du tampon PBS de Dulbecco à pH 7.4), ce qui aura pour effet de détacher les cellules endothéliales de la paroi veineuse après 20 minutes d'incubation à 37°C. dans du Cord Buffer.

On récolte le contenu de la veine dans un tube à fond cône tout en reperfusant avec 20 ml de Cord Buffer froid. Le tout est centrifugé à 1000 tours/minute durant 5 minutes. Le surnageant est ensuite aspiré au moyen d'une pipette pasteur et le culot contenant les cellules endothéliales est suspendu dans 5 ml de milieu de culture. Celui-ci se compose de 80 % de milieu 199 (GIBCO en poudre contenant : L-Glutamine (2 mM) - HEPES (15 mM) ainsi que des antibiotiques (Streptomycine (100 µg/ml) - Pénicilline (100 U/ml) - Nystatin (25 U/ml)); pH 7.2) ainsi que de 20 % de sérum de veau nouveau-né (GIBCO).

Le milieu de culture contenant les cellules endothéliales est placé dans une boîte de Pétri de 60 mm de diamètre (Nunc), traitée au préalable par une solution d'eau gélatineuse stérile (Gélatine Type III 0.2 %, Sigma) et aspirée juste avant d'y déposer les cellules. Ce traitement favorise l'adhésion des cellules endothéliales

de veine ombilicale à la vaisselle de culture (Jaffe, 1984). Les boîtes de Pétri sont finalement incubées à 37°C en atmosphère humide contenant 5 % de CO<sub>2</sub>.

### **B) Repiquage des cellules endothéliales.**

Lorsque les boîtes de Pétri montrent des monocouches cellulaires confluentes, on peut repiquer les cellules dans un rapport de 1 à 3. Une boîte de 60 mm de diamètre fournit les cellules endothéliales pour 9 boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre (Nunc), dans lesquelles on aura déposé au préalable un couvre-objet stérile en verre (13 x 27 mm) (Belgolabo) recouvert par un film gélatineux selon la technique utilisée lors de la mise en culture.

On aspire d'abord le milieu 199 et on ajoute de l'HEPES Buffer stérile (137 mM NaCl - 4 mM KCl - 12 mM glucose - 10 mM HEPES; pH 7.5) afin d'éliminer les constituants sériques qui pourraient inhiber l'action de la collagénase.

On ajoute ensuite une solution de 2 ml de collagénase (0.2 % dans de l' HEPES buffer) et de 2 ml de BSA (0.5 %)/EDTA (0.02 %) pour détacher les cellules de la monocouche. Dès lors, après une incubation de 20 minutes à 37°C dans cette solution, on retrouve les cellules endothéliales flottant dans la solution. La vérification d'un bon détachement se réalise au microscope optique à contraste de phase. Puis on aspire lentement la solution où flottent les cellules endothéliales afin de ne pas les lyser et on les place dans un tube à centrifuger à fond cône. Ce tube subit alors une centrifugation de 1000 tours/minute durant 4 minutes. On aspire le surnageant qui contient la collagénase et le culot est remis en suspension dans un volume adéquat du milieu de culture décrit précédemment. Cette solution finale est déposée dans les boîtes de Pétri (35 mm de diamètre) contenant les couvre-objets, à raison de 1,5 ml de milieu de culture par boîte de Pétri et celles-ci sont replacées dans l'incubateur à 37°C.

### **C) Changements de milieu.**

Les changements de milieu sont réalisés tous les 2-3 jours afin de maintenir les cellules dans les conditions optimales de croissance.

## **II. Chargement du Fura-2 dans les cellules endothéliales.**

Pour mesurer les concentrations de calcium libre cytosolique, nous avons utilisé la sonde fluorescente Fura-2 (Grynkiewicz et al., 1985). Comme décrit dans l'introduction du présent travail, un ester acétoxyméthyl du Fura-2 a servi pour introduire la sonde dans nos cellules endothéliales.

### **A) Stockage du Fura-2 AM.**

Cet ester est fourni par la firme Molecular Probes (Eugene, OR) dans un récipient scellé, à la concentration 1 mM dans du DMSO (Diméthylsulfoxyde) sec. Pour échantillonner la sonde sous une forme facilement utilisable sans humidifier le contenu du récipient scellé, un petit volume est prélevé au moyen d'une seringue au travers du bouchon puis fractionné dans des cupules "ependorf" à raison de 20  $\mu$ l de Fura-2 AM 1 mM pour 180  $\mu$ l de DMSO sec. Le DMSO sec est utilisé afin de maintenir le Fura-2 AM à l'abri de l'humidité de l'air et de préserver ainsi sa structure (Haugland, 1989). On obtient finalement une solution stock 0.1 mM, conservée à -20°C et à l'obscurité.

### **B) Chargement des cellules endothéliales avec le Fura-2 AM.**

La solution stock est décongelée et 40  $\mu$ l de Fura-2 AM 0.1 mM sont ajoutés aux 2 ml de milieu de culture. La concentration finale du Fura-2 AM en présence des cellules est donc environ 2  $\mu$ M. Les cellules sont alors réincubées avec ce milieu pendant 60 minutes à 37°C dans les conditions de culture.

D'après la littérature, les limites conseillées pour le chargement s'étendent de 1 à 5  $\mu$ M pour la concentration finale du Fura-2 AM. Au-delà on observe des artéfacts consécutifs à une hydrolyse imparfaite des acétoxyméthylesters de la sonde et ainsi à une accumulation d'esters lipophiles dans les membranes lipidiques, biaisant ainsi la mesure de  $[Ca^{2+}]_i$  (Haugland, 1989). Un autre problème peut également survenir à la suite d'une accumulation de formaldéhyde dans la cellule, suite à l'action des estérases sur la sonde.

Lorsque le temps d'incubation est écoulé, on élimine le milieu de culture contenant l'excès de sonde fluorescente et on réalise trois lavages successifs afin de débarrasser le milieu extracellulaire des dernières traces de Fura-2 AM. Les lavages sont effectués avec le milieu physiologique Krebs-Ringer-HEPES (KRH)

(125 mM NaCl - 5 mM KCl - 1.2 mM MgSO<sub>4</sub> - 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 2 mM CaCl<sub>2</sub> - 6 mM D-glucose - 25 mM HEPES.NaOH; pH 7.4) (Malgaroli et al., 1987). La monocouche cellulaire repose finalement dans le milieu KRH en attendant la mesure spectrofluorimétrique de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>.

Remarque : Le DMSO ayant tendance à absorber l'humidité ambiante, la solution stock de Fura-2 AM (0.1 mM), une fois mise en contact avec l'air, devra rapidement être utilisée.

### III. Mesures spectrofluorimétriques de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> des cellules endothéliales.

#### A) Mesure spectrofluorimétrique de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> avec le Fura-2 AM.

##### 1) Principe de la sonde fluorescente.

On utilise l'indicateur fluorescent Fura-2 AM qui, ayant traversé la membrane plasmique et perdu son ester acétoxyméthyl par l'action des estérases cytosoliques, se transforme en Fura-2 capable de complexer le calcium avec une stoechiométrie 1:1. La constante de dissociation du Fura-2 et du Ca<sup>2+</sup> vaut 224 nmoles à 37°C et 135 nmoles à 20°C. Lors de la liaison au Ca<sup>2+</sup>, on observe un déplacement du pic de la longueur d'onde d'excitation de 380 nm vers 340 nm, ainsi qu'une augmentation importante de l'intensité fluorescente (Grynkiewicz et al., 1985).

##### 2) Principe de la mesure spectrofluorimétrique de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>.

La fluorescence émise par la sonde est mesurée au moyen d'un spectrofluorimètre Aminco SPF-500. Le monochromateur est placé à 340, 358 ou 380 nm pour la longueur d'onde d'excitation. Ces longueurs d'onde sont absorbées par la sonde qui devient à son tour une source secondaire d'émission fluorescente pour un second monochromateur placé à un angle de 90° par rapport à la direction de la lumière d'excitation et qui va sélectionner le signal émis à 510 nm (puisque la sonde excitée va émettre une fluorescence à une longueur d'onde supérieure à la longueur d'onde d'excitation et avec un maximum aux alentours de 510 nm). La fluorescence est alors mesurée par un photodétecteur. Les mesures spectrofluorimétriques sont réalisées à 20°C (température ambiante) avec les

bandes passantes d'excitation et d'émission réglée respectivement à 2.5 nm et 7.5 nm.

On transfère le couvre-objet portant les cellules endothéliales confluentes chargées dans une cuvette en plastique pourvue de 4 faces polies et remplie au préalable avec 3 ml du milieu réactionnel désiré (voir point b). Le couvre-objet est disposé en diagonale de façon à former un angle de 45° avec la source d'excitation du spectrofluorimètre, ainsi qu'avec la direction de mesure d'émission.

La détermination de la  $[Ca^{2+}]_i$  se réalise selon le processus suivant :

- On expose successivement la monocouche chargée aux longueurs d'onde d'excitation de 340, 358 et 380 nm et on mesure les intensités fluorescentes correspondantes. On obtient ainsi 3 valeurs qui seront respectivement nommées  $F_{340}$ ,  $F_{358}$  et  $F_{380}$ .

- On ajoute ensuite 30  $\mu$ l de triton X-100 (10 % dans du milieu KRH, pH 7.4) qui aura pour effet de lyser les cellules et de provoquer ainsi une fluorescence maximale par exposition de la sonde à un excès de  $Ca^{2+}$ . On mesurera alors les valeurs  $F_{340 \text{ max}}$ ,  $F_{358 \text{ max}}$  et  $F_{380 \text{ max}}$ .

- On ajoute alors 300  $\mu$ l d'EGTA (Ethylèneglycoltétracétate) dans un tampon TRIS (EGTA 50 mM - TRIS 1 M, pH 8.3). L'EGTA est ainsi 5 mM en concentration finale, concentration suffisante pour chélater tout le  $Ca^{2+}$  présent et pour maintenir ainsi toutes les molécules sondes libres (à pH 8.5., le  $K_d$  du complexe  $Ca^{2+}$ -EGTA est inférieur à  $10^{-9}$  M). On collecte dès lors les valeurs  $F_{340 \text{ min}}$ ,  $F_{358 \text{ min}}$  et  $F_{380 \text{ min}}$ .

- On supprime enfin la fluorescence du Fura-2 en ajoutant du  $MnCl_2$  à raison de 3  $\mu$ l (Brock et al., 1989). Cette étape nous permet d'obtenir les valeurs d'autofluorescence à 340 et 380 nm:  $AF_{340}$  et  $AF_{380}$ .

#### Facteurs correctifs:

Afin de contourner la variation importante du bruit de fond obtenue entre plusieurs mesures d'un même échantillon et produite par la présence du couvre-objet dans la cuvette, toutes les intensités fluorescentes obtenues à 340 et 380 nm sont corrigées en ajustant les valeurs de  $F_{358}$  à un plateau fixe de 500 et en discriminant les valeurs d'autofluorescence respectives, selon la formule:

$$F_{x(nm)} \text{ajustée} = F_{x(nm)} + (500 - F_{358}) - AF_{x(nm)}$$

$$\text{Ex: } F_{340 \text{ max}} \text{ajustée} = F_{340 \text{ max}} + (500 - F_{358 \text{ max}}) - AF_{340 \text{ max}}$$

### Méthodes de calcul de la $[Ca^{2+}]_i$ :

La  $[Ca^{2+}]_i$  pourra être calculée selon 2 méthodes.

a) Mesure directe au moyen des intensités fluorescentes à 340 nm d'excitation. (Tsien et al., 1982)

$$[Ca^{2+}]_i = Kd_{20^\circ C} \cdot \frac{(F - F_{\min})}{(F_{\max} - F)} \quad (\text{nM})$$

Cette méthode ne permet pas l'utilisation des facteurs correctifs en ne considérant qu'une seule longueur d'onde pour obtenir la  $[Ca^{2+}]_i$ . De ce fait, les variations du bruit de fond vont directement influencer les mesures de F et donc de la  $[Ca^{2+}]_i$ . De plus, elle rend cette mesure dépendante de l'efficacité du chargement, de la concentration de la sonde, de l'épaisseur cellulaire et de la perte en sonde (Haughland, 1989).

b) Mesure par la méthode des rapports de fluorescence (Grynkiewicz et al., 1985).

$R = F_{340} / F_{380}$  (rapport des intensités fluorescentes mesurées à 340 et 380 nm d'excitation).

$$[Ca^{2+}]_i = Kd_{20^\circ C} \cdot \frac{(R - R_{\min})}{(R_{\max} - R)} \cdot \frac{F_{380 \text{ min}}}{F_{380 \text{ max}}} \quad (\text{nM})$$

Cette méthode nécessite la correction du plateau à 358 nm et de l'autofluorescence de la préparation, mais elle est indépendante des exigences citées pour la méthode précédente. Si un passage rapide de 340 à 380 nm peut être réalisé, cette méthode apparaît dès lors la plus appropriée à l'estimation de la  $[Ca^{2+}]_i$  dans une monocouche de cellules disposées sur couvre-objet.

### 3) Effet du couvre-objet et de l'orientation de la monocouche cellulaire sur l'autofluorescence et le signal du Fura-2

Pour estimer l'influence de l'orientation du couvre-objet sur l'intensité de la fluorescence émise, on prend une cuvette contenant une monocouche de cellules endothéliales chargées baignant dans une solution de KRH à pH 7.4 et on fait

pivoter la cuvette de 90° après chaque mesure (à 340 et 380 nm). On réalise la même expérience avec des cellules non chargées et on soustrait l'autofluorescence des intensités fluorescentes mesurées précédemment. On peut ainsi comparer les rapports de fluorescence obtenus avant et après soustraction de l'autofluorescence.

#### 4) Expériences de calibrage.

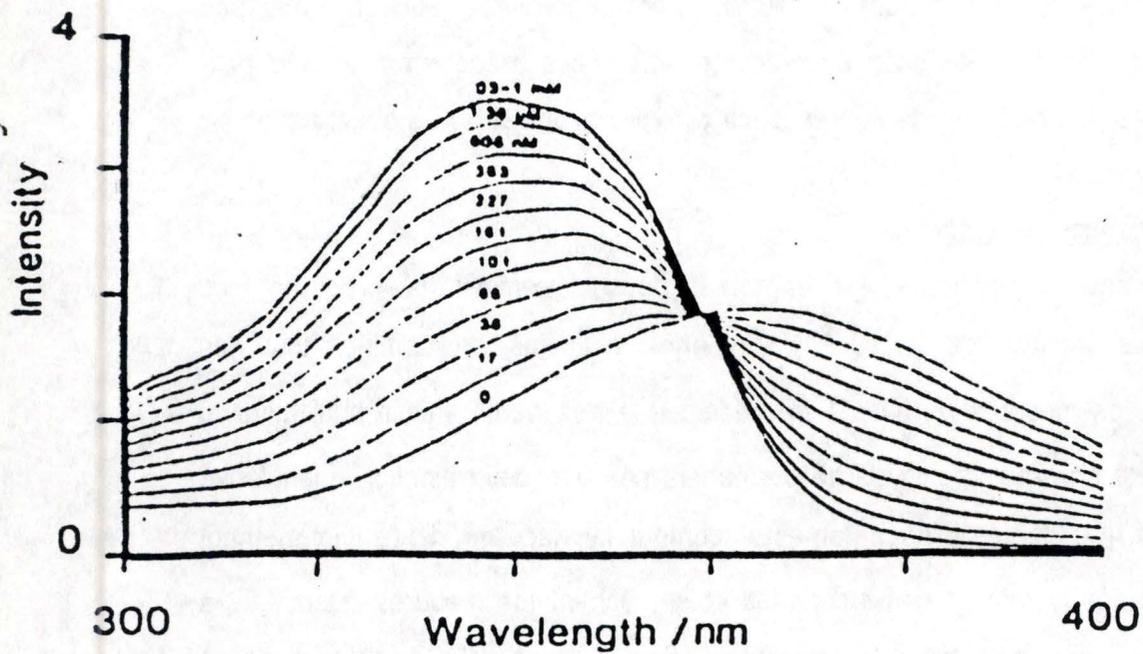
Le calibrage du système est important pour déterminer la précision des méthodes de mesure de la  $[Ca^{2+}]_i$ . En effet, à moins de dominer tous les paramètres, les mesures de  $[Ca^{2+}]_i$  possèdent une très haute valeur qualitative et une sensibilité non moindre, mais ne permettent pas une détermination quantitative exacte de la  $[Ca^{2+}]_i$  (certains paramètres comme la viscosité de l'environnement entourant la sonde restent des inconnues et empêchent les mesures quantitatives précises). Le calibrage permet toutefois d'essayer de corréler la  $[Ca^{2+}]_i$  calculée à partir des intensités de fluorescence et la  $[Ca^{2+}]_i$  véritable du système étudié (Haugland, 1989).

##### a) Calibrage en milieu acellulaire.

On veut exposer le Fura-2 à des  $[Ca^{2+}]$  libres connues. Pour ce faire, on peut moduler de façon relativement précise des concentrations de calcium de l'ordre du nanomolaire en utilisant des "tampons" Ca-EGTA (Grynkiewicz et al., 1985) tout en maintenant la [Fura-2] constante.

Pour ce faire, on utilise du Fura-2 non estérifié (Molecular Probes). Cette sonde est dissoute dans une solution particulière de KRH dépourvue de calcium et à laquelle on a ajouté de l'EGTA (10 mM), pour former ensuite un tampon Ca-EGTA avec un pH final de 7.2. Le Fura-2 dilué se retrouve à une concentration de 0.1 mM et forme une solution stock conservée à - 20°C.

On dépose initialement dans la cuvette en plastique 3 ml de KRH (tampon Ca-EGTA) et 30 µl de Fura-2 stock 0.1 mM (1 µmolaire en finale). Les concentrations initiales en EGTA et en  $CaCl_2$  vaudront respectivement 10 mM et 0 mM. On réalise un spectre d'excitation (320 à 400 nm) et on obtient ainsi une courbe à l'allure spécifique d'un milieu dépourvu de calcium. L'émission est mesurée à 510 nm.



[EGTA] = 151

| No | Volume | [CaCl <sub>2</sub> ] | [EGTA] | [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>libre</sub> |
|----|--------|----------------------|--------|--------------------------------------|
| 1  | 3.000  | 0.000                | 10.000 | 0.0                                  |
| 2  | 3.003  | 0.999                | 9.990  | 16.8                                 |
| 3  | 3.006  | 1.996                | 9.980  | 37.8                                 |
| 4  | 3.009  | 2.991                | 9.970  | 64.7                                 |
| 5  | 3.012  | 3.984                | 9.960  | 100.7                                |
| 6  | 3.015  | 4.975                | 9.950  | 151.0                                |
| 7  | 3.018  | 5.964                | 9.940  | 226.5                                |
| 8  | 3.021  | 6.951                | 9.930  | 352.3                                |
| 9  | 3.024  | 7.937                | 9.921  | 604.0                                |
| 10 | 3.027  | 8.920                | 9.911  | 1359.0                               |
| 11 | 3.030  | 9.901                | 9.901  | 1936.0                               |

**Figure 1:** Courbe de calibration en milieu acellulaire

Spectres d'excitation du Fura-2 (1  $\mu$ Molaire) à 37°C en milieu Krebs-Ringer HEPES (PH 7.4) contenant du Ca<sup>2+</sup> à des concentrations allant de <1 nMole à >10  $\mu$ Mole (Grynkiewicz *et al.*, 1985).

On ajoute alors une série d'aliqots de 3  $\mu$ l de  $\text{CaCl}_2$  (1 M). La  $[\text{Ca}^{2+}]$  libre présente dans le milieu est rapportée dans le tableau I et déterminée selon la technique du tampon Ca-EGTA décrite notamment par Grynkiewicz et al. (1985). Chaque ajout de  $\text{CaCl}_2$  molaire est suivi de l'enregistrement d'un spectre d'excitation correspondant. On obtient finalement des spectres d'excitation du Fura-2 1  $\mu$ M dans des tampons Ca-EGTA pour des valeurs de  $[\text{Ca}^{2+}]$  libre variant de 0 à >2  $\mu$ molaire (fig. 1). La  $[\text{Ca}^{2+}]$  libre d'une solution inconnue qui inclut un indicateur fluorescent pourra dès lors être déduite de la forme du spectre d'excitation (Grynkiewicz et al., 1985).

#### b) Calibrage en milieu cellulaire.

Une expérience similaire à la précédente est réalisée en incorporant dans la cuvette en plastique un couvre-objet portant une monocouche de cellules endothéliales confluentes et chargées par une incubation avec du Fura-2 AM (2  $\mu$ molaire). Comme précédemment, la solution physiologique utilisée est le milieu KRH sans  $\text{Ca}^{2+}$  et additionné d'EGTA. On enregistre un premier spectre d'excitation.

On additionne ensuite 25  $\mu$ l de digitonine 20 mmolaire, ce qui aura pour effet de placer le Fura-2 en contact avec le calcium extracellulaire. On prend alors un second spectre d'excitation.

Comme décrit précédemment, on ajoute alors des aliqots de 3  $\mu$ l de  $\text{CaCl}_2$  molaire et on observe l'évolution des spectres d'excitation selon la quantité de  $\text{CaCl}_2$  ajoutée, ceci jusqu'à la saturation de la sonde.

L'estimation de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  sera réalisée selon la méthode des ratios en considérant les mesures de  $F$ ,  $F_{\min}$  et  $F_{\max}$ .

\*  $F_{\min}$  sera obtenue par la mesure de l'intensité fluorescente avant ajout de  $\text{CaCl}_2$  molaire (milieu extracellulaire sans calcium).

\*  $F_{\max}$  sera obtenue par la mesure de l'intensité fluorescente dans un milieu saturé en calcium.

\* On discrimine l'autofluorescence par ajout final de 9  $\mu$ l de  $\text{MnCl}_2$  molaire.

Ceci nous permet de comparer les  $[Ca^{2+}]_i$  obtenues avec les  $[Ca^{2+}]_i$  mesurées en conditions acellulaires et d'estimer la relation avec les valeurs théoriques calculées.

## B. Mesures spectrofluorimétriques de la $[Ca^{2+}]_i$ dans les cellules endothéliales humaines lors de différents traitements.

### 1) Mesure en présence de calcium extracellulaire.

#### a) Procédure.

Le substrat xanthine est dissout dans le milieu KRH (500  $\mu$ M).

Les mesures spectrofluorimétriques de la  $[Ca^{2+}]_i$  sur des cellules en conditions normales se fait en plaçant le couvre-objet portant les cellules dans une cuvette contenant 3 ml du milieu KRH (avec ou sans xanthine) et plusieurs mesures des intensités fluorescentes sont alors réalisées.

L'addition de xanthine-oxydase (Boehringer Mannheim) va déclencher la production de dérivés actifs de l'oxygène suite à la réaction de cet enzyme avec son substrat. On ajoute l'enzyme (10 mU/ml) à la solution de KRH présente dans la cuvette du spectrofluorimètre pour déclencher la réaction et on suit ensuite, pendant un temps variable suivant les différentes expériences, l'évolution de l'intensité fluorescente à 340, 358 et 380 nm.

Les mesures de  $F_{max}$ ,  $F_{min}$  et d'autofluorescence sont réalisées comme décrit précédemment.

#### b) Les milieux testés (présents dans la cuvette avant l'ajout de l'enzyme).

\*Milieu contrôle: KRH sans xanthine

\*Milieu test : KRH contenant de la xanthine

\*Milieu test contenant des enzymes antioxydantes:

- Catalase (3250 U/ml).

- Superoxyde dismutase (600 U/ml).

\*Milieu test contenant un bloqueur des canaux à calcium.

Nous avons utilisé la nifédipine (Calbiochem) diluée dans le KRH à une concentration finale de 2  $\mu$ M.

Rem.: Ces mesures ont été effectuées soit durant un laps de temps assez court (à ce moment le passage 340>358>380 est réalisé dans un intervalle de temps de 10 à 20 secondes), soit durant un temps de 2 heures (dans ces conditions, les mesures de fluorescence aux trois longueurs d'onde sont réalisées dans un intervalle de temps de 20-30 secondes avec une fréquence moins grande.

## 2) Mesure en absence de calcium extracellulaire.

a) La procédure est identique à celle décrite ci-dessus pour un milieu extracellulaire contenant du calcium, à deux exceptions près:

- Le milieu KRH utilisé est dépourvu de calcium et contient de l'EGTA 2 mM,

- Après l'addition de la xanthine oxydase et la mesure des intensités fluorescentes lors des modifications de la  $[Ca^{2+}]_i$ , on ajoute 9  $\mu$ l de  $CaCl_2$  molaire (3 mM en finale) et on observe à nouveau l'évolution de la fluorescence émise résultant des modifications de la  $[Ca^{2+}]_i$ .

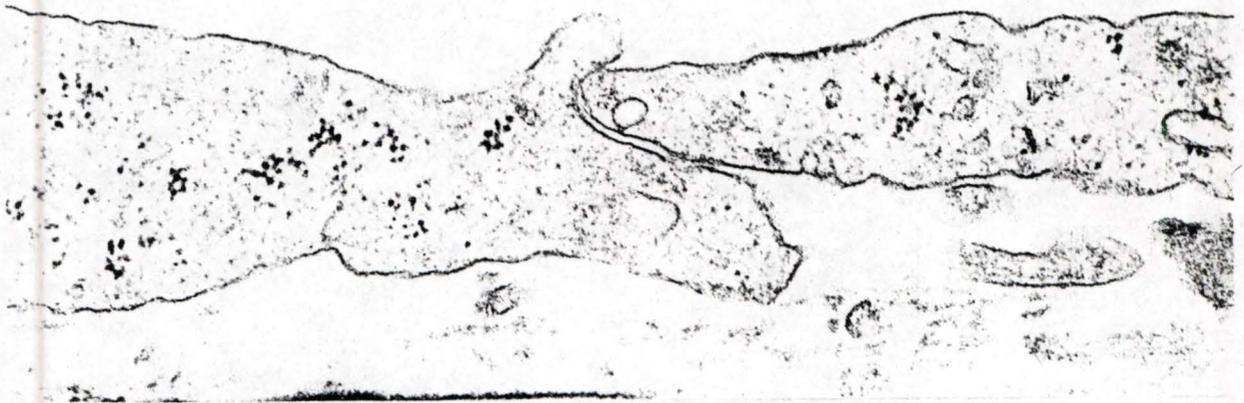
b) Les milieux d'incubations testés:

- Milieux contrôles: KRH sans calcium contenant de l'EGTA et sans xanthine.

- Milieux tests: KRH sans calcium contenant de l'EGTA et de la xanthine.

- Milieu KRH sans  $Ca^{2+}$  avec EGTA + xanthine + catalase (3250 U/ml) + superoxyde dismutase (600 U/ml).

Rem.: Seules des msures durant des incubations courtes ont été réalisées avec un milieu extracellulaire dépourvu de calcium. De plus, dans ce cas, les cellules chargées avec le Fura-2 sont lavées avec du KRH complet afin d'éviter une perturbation de l'homéostasie calcique antérieure à la mesure du  $[Ca^{2+}]_i$ .



**Figure 1-1.**

Micrographie électronique de cellules endothéliales humaines en culture en coupe transversale. On constate la présence de jonctions intercellulaires et l'accumulation de produits de sécrétion formant une membrane basale entre les cellules et la boîte de culture.

## **CHAP. III : RESULTATS**

### **I. Adaptation de la méthode de mesure spectrofluorimétrique de la $[Ca^{2+}]_i$ aux cellules endothéliales cultivées sur couvre-objet.**

#### **1) Culture de cellules endothéliales sur couvre-objet.**

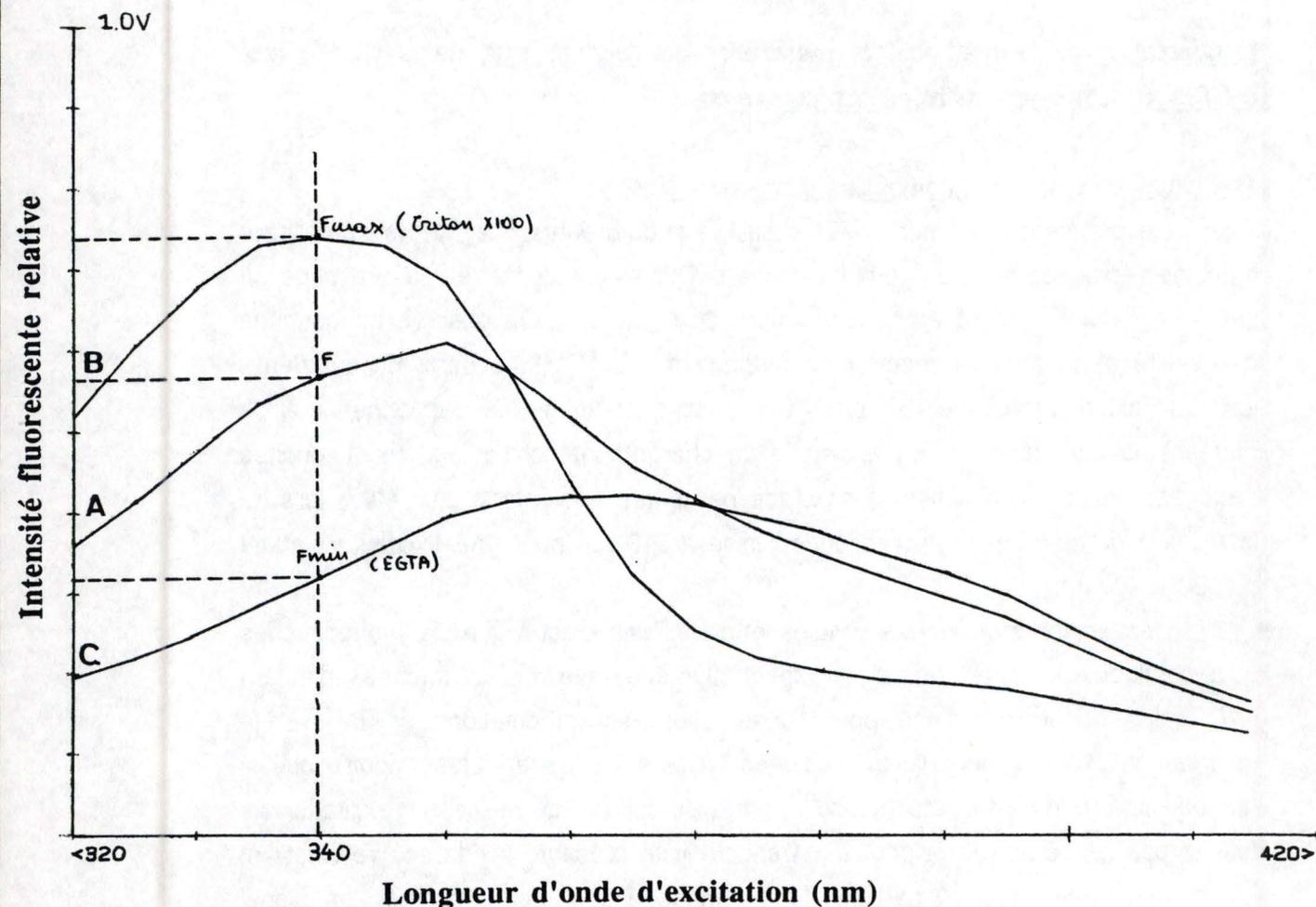
L'expérimentation sur des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine repiquées sur couvre-objet couvert de gélatine doit être réalisée dans un intervalle de 3 à 6 jours après le moment du repiquage. On observe un optimum d'efficacité de la mesure spectrofluorimétrique de la  $[Ca^{2+}]_i$  à partir du quatrième jour qui suit le repiquage. En effet, les cellules endothéliales parviennent à ce moment à confluence et on assiste à un chargement correct des monocouches cellulaires puisque l'on obtient à ce stade de culture le signal le plus élevé lors de la mesure du spectre de fluorescence émise à 510 nm pour une excitation variant de 320 à 400 nm.

L'emploi prématuré des cellules endothéliales c'est-à-dire de monocouches sous-confluentes fournit un signal spectrofluorimétrique moins intense, donnant une moins bonne sensibilité pour l'observation des modulations de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Inversement, l'usage de cellules repiquées depuis 7 jours et plus montre que la monocouche tend à se détacher du substrat de culture. Le faisceau d'excitation ne touche pas l'entièreté de la population endothéliale présente sur le couvre-objet et un détachement, même partiel, de la monocouche peut modifier le signal fluorescent et fausser ainsi l'estimation de la  $[Ca^{2+}]_i$  par exemple, par manque de cellules dans la région balayée par le faisceau d'excitation.

L'observation en microscopie électronique d'une coupe transversale réalisée dans une monocouche de cellules endothéliales à confluence (fig.1-1) montre l'existence de jonctions intercellulaires. Un dépôt de constituants sécrétés par les cellules endothéliales et ressemblant à une membrane basale s'accumule entre la monocouche cellulaire et le support de culture. Cette accumulation pourrait peut-être expliquer la tendance au détachement que manifestent les cellules avec l'âge.

#### **2) Chargement des cellules endothéliales en Fura-2 AM.**

Initialement, la technique du chargement des cellules endothéliales s'opérait par le retrait du milieu de culture (80% de M199 et 20% de Newborn Bovine Serum) suivi rapidement par des lavages réguliers au Krebs-Ringer HEPES et se poursuivait par l'ajout de Krebs-Ringer HEPES contenant la sonde fluorescente Fura-2 AM avant incubation à 37°C (Malgaroli *et al.*, 1987). Outre le risque de voir



**Figure 1-2**

Description des paramètres nécessaires à l'estimation de la  $[Ca^{2+}]_i$  de cellules endothéliales humaines en culture depuis les intensités fluorescentes mesurées à une seule longueur d'onde d'excitation (340 nm). Spectres d'excitation enregistrés à partir de:

- A: la monocouche de cellules endothéliales chargées en Fura-2.
- B: l'action du Triton X100 sur les cellules de cette monocouche.
- C: l'addition d'EGTA-TRIS basique (PH 8,5).

Les valeurs correspondant à F,  $F_{max}$  et  $F_{min}$  sont illustrées sur le graphe.

les cellules endothéliales se détacher du couvre-objet suite aux lavages successifs, on observait également un signal fluorescent de faible intensité alors que les cultures de cellules endothéliales étaient confluentes et incubées avec une concentration en sonde se situant dans la gamme des concentrations conseillées par la littérature et le fabricant (2  $\mu\text{M}$ ) (Haugland, 1989).

Le chargement a dès lors été effectué par ajout de la sonde (en solution stock dans le DMSO) au milieu de culture complet. On évite ainsi des altérations cellulaires susceptibles d'intervenir à 37°C en absence de ce milieu et on constate un signal fluorescent beaucoup plus élevé qui permet de réduire la sensibilité du photodétecteur. Ce signal accru permet donc d'effectuer des mesures beaucoup plus sensibles aux modifications de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . En conséquence, toutes les mesures de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  par spectrofluorimétrie seront réalisées sur des cellules endothéliales chargées selon cette dernière méthode.

### 3) Sélection d'une méthode de calcul de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

On dispose de deux méthodes de calcul de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  à partir des valeurs des intensités fluorescentes mesurées au spectrofluorimètre:

-Une première méthode repose sur la mesure des intensités fluorescentes à une seule longueur d'onde d'excitation et est exprimée par l'équation:

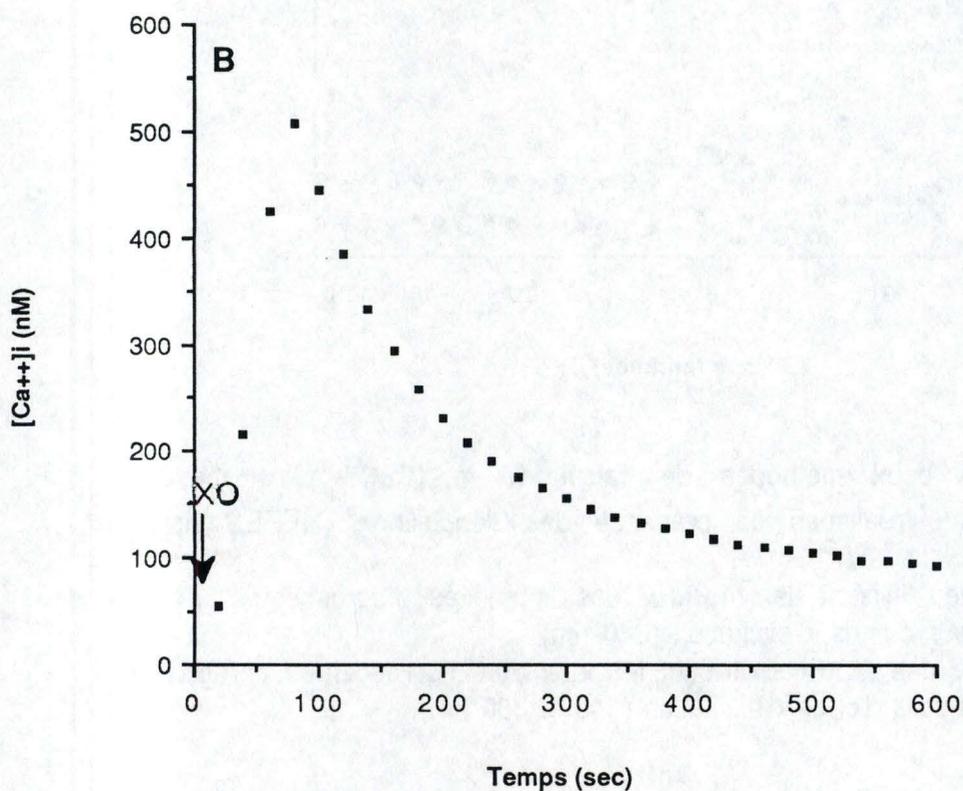
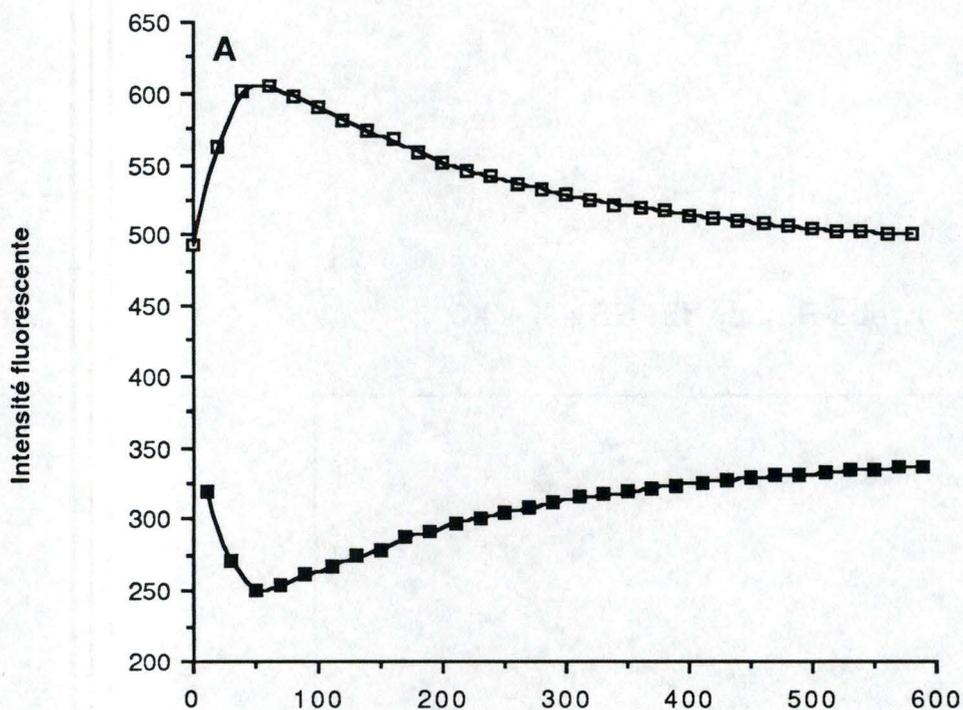
$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_D * (F - F_{\min}) / (F_{\max} - F) \quad (\text{Tsien } et al., 1982)$$

-Une seconde méthode considère simultanément les intensités fluorescentes mesurées à deux longueurs d'onde d'excitation (caractéristiques de la sonde utilisée) et au moyen des rapports qui en résultent, détermine la valeur de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  selon l'expression suivante:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_D * ((R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)) * \beta \quad (\text{Grynkiewicz } et al., 1985).$$

Ne disposant pas d'un spectrofluorimètre doté d'un système capable d'effectuer le passage automatique rapide de 340 à 380 nm, les analyses furent dans un premier temps réalisées avec une seule longueur d'onde, en l'occurrence 340 nm où se concentre la fluorescence émise lors de sa complexation au  $\text{Ca}^{2+}$  et dont l'intensité fluctue en fonction de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  et dans le même sens. La  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  était obtenue, par cette première méthode, à partir des différences mesurées sur une même verticale tracée au niveau de la longueur d'onde considérée (fig.1-2). Bien qu'indépendante de l'autofluorescence des cellules endothéliales et quoique réalisée avec une sonde plus sensible que le Quin-2, cette technique montrait une importante variabilité de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  pour des mesures effectuées dans des conditions identiques.

C'est pourquoi nous avons essayé de passer, avec un intervalle de temps de 10 secondes, de 340 à 380 nm, pour adopter finalement la seconde méthode d'estimation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  par utilisation des ratios en considérant le rapport  $F_{340} /$



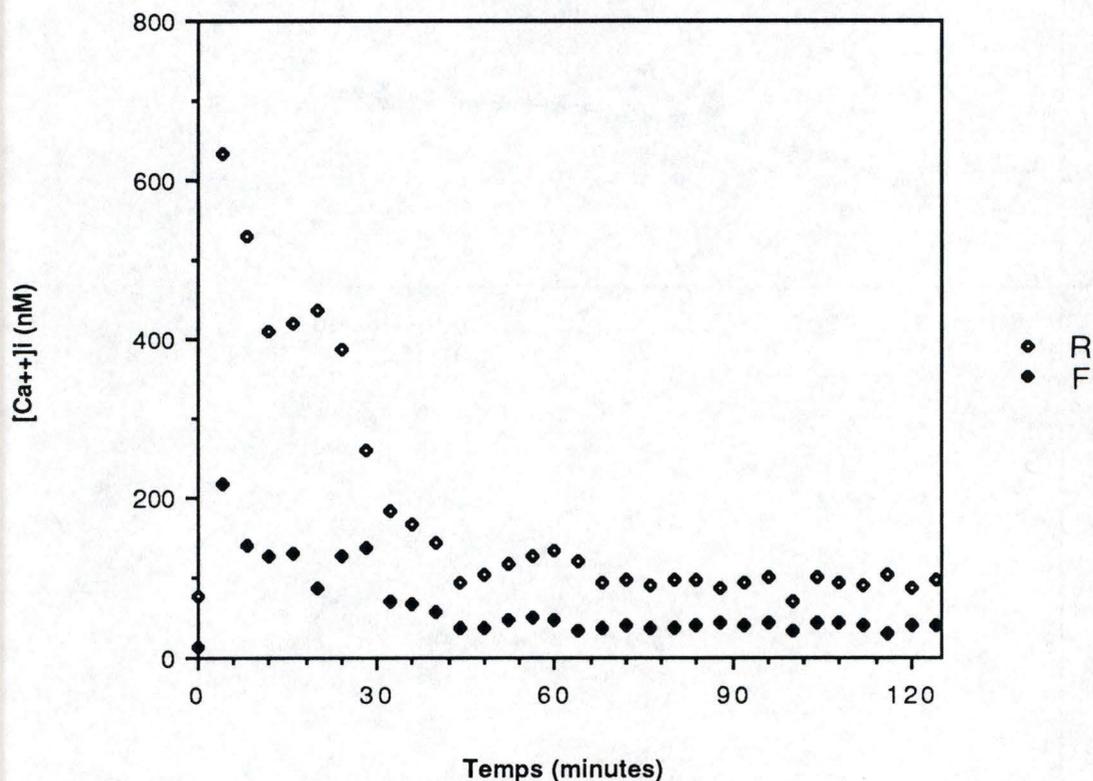
**Figure 1-3.**

-A: Effet d'une stimulation des cellules endothéliales sur l'évolution des intensités fluorescentes à 340 et 380 nm de longueur d'onde d'excitation. La fluorescence est collectée à 510 nm d'émission.

Le passage 340-380 nm est réalisé à des intervalles de temps de 10 secondes.

-B: Calcul de la  $[Ca^{2+}]_i$  correspondant aux intensités fluorescentes décrites en A. Le calcul est effectué selon la méthode des rapports d'intensité de fluorescence.

### Krebs-Ringer HEPES + X + XO



**Figure 1-4.**

Comparaison de deux méthodes de calcul de la  $[Ca^{2+}]_i$  par mesures spectrofluorimétriques réalisées en présence de Krebs-Ringer HEPES normal (avec  $Ca^{2+}$ ).

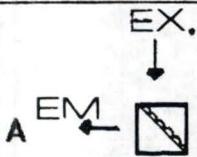
-F: méthode utilisant la mesure des intensités fluorescentes à une seule longueur d'onde d'excitation (340 nm).

-R: méthode des rapports utilisant les intensités fluorescentes enregistrées à deux longueurs d'onde d'excitation (340 et 380 nm).

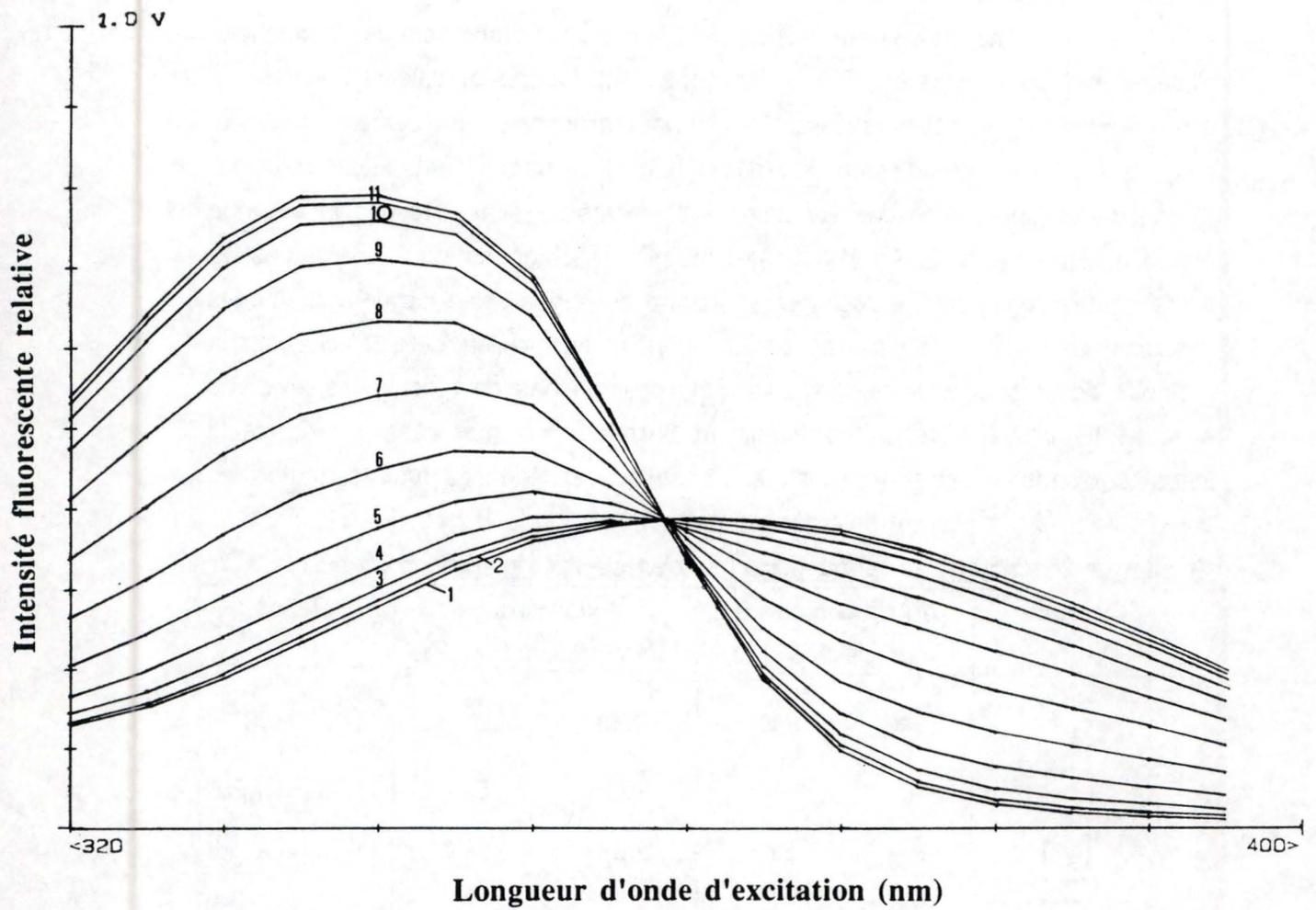
F<sub>380</sub>. Bien qu'il faille prendre l'autofluorescence des cellules en compte, cette technique permet une meilleure estimation des modulations de la  $[Ca^{2+}]_i$  beaucoup plus fiable d'une mesure à l'autre.

On remarque en effet que le Fura-2 montre simultanément des fluctuations d'intensités fluorescentes à 340 et 380 nm (fig. 1-3). Quand les valeurs mesurées à 340 nm augmentent, celles mesurées à 380 nm diminuent et inversement. Il semble aussi que la méthode d'estimation de la  $[Ca^{2+}]_i$  à partir d'une seule longueur d'onde d'excitation reflète des variations avec moins de sensibilité que la seconde méthode. En effet, la figure 1-4 montre les  $[Ca^{2+}]_i$  obtenues pour des intensités fluorescentes semblables enregistrées au cours du temps selon les deux méthodes de calcul envisagées. Il s'avère que le pic de concentration détecté ici selon la méthode des rapports de fluorescence ne s'observe pas de façon aussi évidente avec la technique utilisant les intensités fluorescentes mesurées à une seule longueur d'onde. C'est pourquoi au cours de nos expériences futures, toutes les valeurs de la  $[Ca^{2+}]_i$  seront déterminées par cette méthode.

**4) Effet de l'orientation de la monocouche cellulaire sur l'intensité fluorescente.**

| Cuvette   | Autofluorescence des cellules |      | Fluorescence des cellules chargées |      | Ratios |      |
|---|-------------------------------|------|------------------------------------|------|--------|------|
|   | F340                          | F380 | F340                               | F380 | R      | R-AF |
| A  | 78                            | 59   | 708                                | 546  | 1,29   | 1,29 |
| B  | 120                           | 81   | 923                                | 742  | 1,24   | 1,22 |
| C  | 57                            | 45   | 826                                | 657  | 1,26   | 1,25 |
| D  | 67                            | 40   | 422                                | 336  | 1,26   | 1,20 |

F340 et F380, produites par stimulation aux longueurs d'onde d'excitation respectives de 340 et 380 nm, sont exprimées en unités relatives de fluorescence. Les intensités fluorescentes sont mesurées sur des cellules endothéliales chargées en Fura-2 et sur des cellules endothéliales dont la fluorescence du Fura-2 a été éliminée par du MnCl<sub>2</sub> ne laissant subsister que l'autofluorescence des cellules considérées. R constitue le rapport F340 / F380 sans la correction de l'autofluorescence et R-AF est le rapport F340 / F380 dont l'autofluorescence a été corrigée (comme décrit dans Matériel & méthodes). La fluorescence est collectée à une émission de 510 nm.



**Figure 1-5.**

Spectres d'excitation du Fura-2 ( $1 \mu\text{M}$ ) à  $20^\circ\text{C}$  pour différentes concentrations en calcium libre dans du KRH-EGTA  $10 \text{ mM}$  (allant de  $< 1 \text{ nM}$  à  $> 1,5 \mu\text{M}$ ). Le spectre d'excitation est mesuré entre  $320$  et  $400 \text{ nm}$ .

L'examen du tableau montre que l'autofluorescence varie faiblement avec l'orientation du couvre-objet et que la soustraction de l'autofluorescence aux ratios ne produit que des modifications mineures dans les valeurs de ces derniers. Comme nous le verrons plus loin, l'autofluorescence est essentiellement due aux cellules endothéliales. On choisira la position A pour toutes nos mesures spectrofluorimétriques.

### **5) Expériences de calibrage.**

Sachant que l'intensité du signal fluorescent varie avec la  $[Ca^{2+}]$  présente dans le milieu, on va calibrer ce signal en exposant le milieu contenant la sonde à des  $[Ca^{2+}]$  connues.

#### **a) Calibrage en milieu acellulaire.**

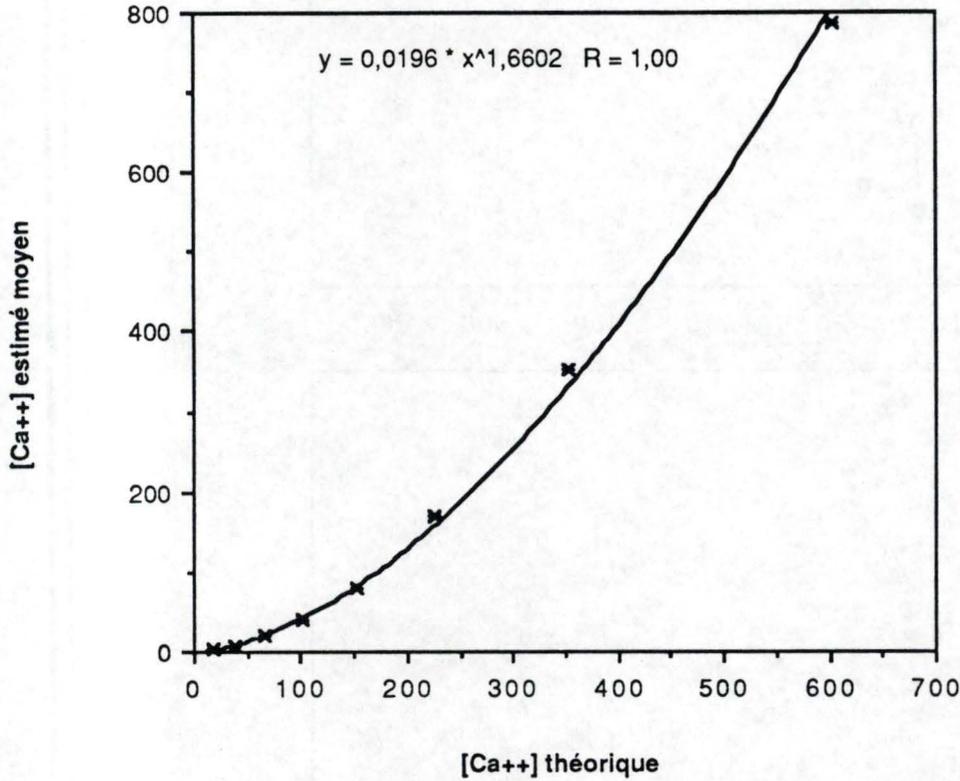
Par le passage progressif de la longueur d'onde de 320 à 400 nm en excitation, on obtient un spectre des intensités fluorescentes pour les différentes longueurs d'onde considérées. Un spectre visualise l'évolution de l'intensité fluorescente suivant la longueur d'onde d'excitation que l'on fait passer dans la préparation (maintenue dans les mêmes conditions expérimentales pour toute la durée de la prise du spectre). Cette courbe est caractéristique de la préparation examinée.

L'observation des graphes de la figure 1-5 amène à la constatation que l'ajout régulier de  $Ca^{2+}$  provoque le déplacement du maximum de fluorescence de 380 nm vers 340 nm à mesure que le taux de fixation du  $Ca^{2+}$  au Fura-2 augmente. Il y a donc une évolution dans la physionomie du spectre dépendante de la  $[Ca^{2+}]$  présente dans le milieu avec une élévation de l'intensité fluorescente à 340 nm et une réduction de celle-ci à 380 nm à mesure que la  $[Ca^{2+}]$  du milieu s'accroît. Notons que nous obtenons un maximum de fluorescence vers 360 nm pour une  $[Ca^{2+}]$  de 100 nMoles (qui correspond approximativement à la  $[Ca^{2+}]_i$  des cellules endothéliales au repos (Hamilton & Sims, 1987; Hirosumi *et al.*, 1988)).

On remarque une saturation dans la réponse de l'indicateur fluorescent pour une  $[Ca^{2+}]$  équivalent à 1,5  $\mu$ Molaire c'est-à-dire qu'on obtient une intensité fluorescente maximale.

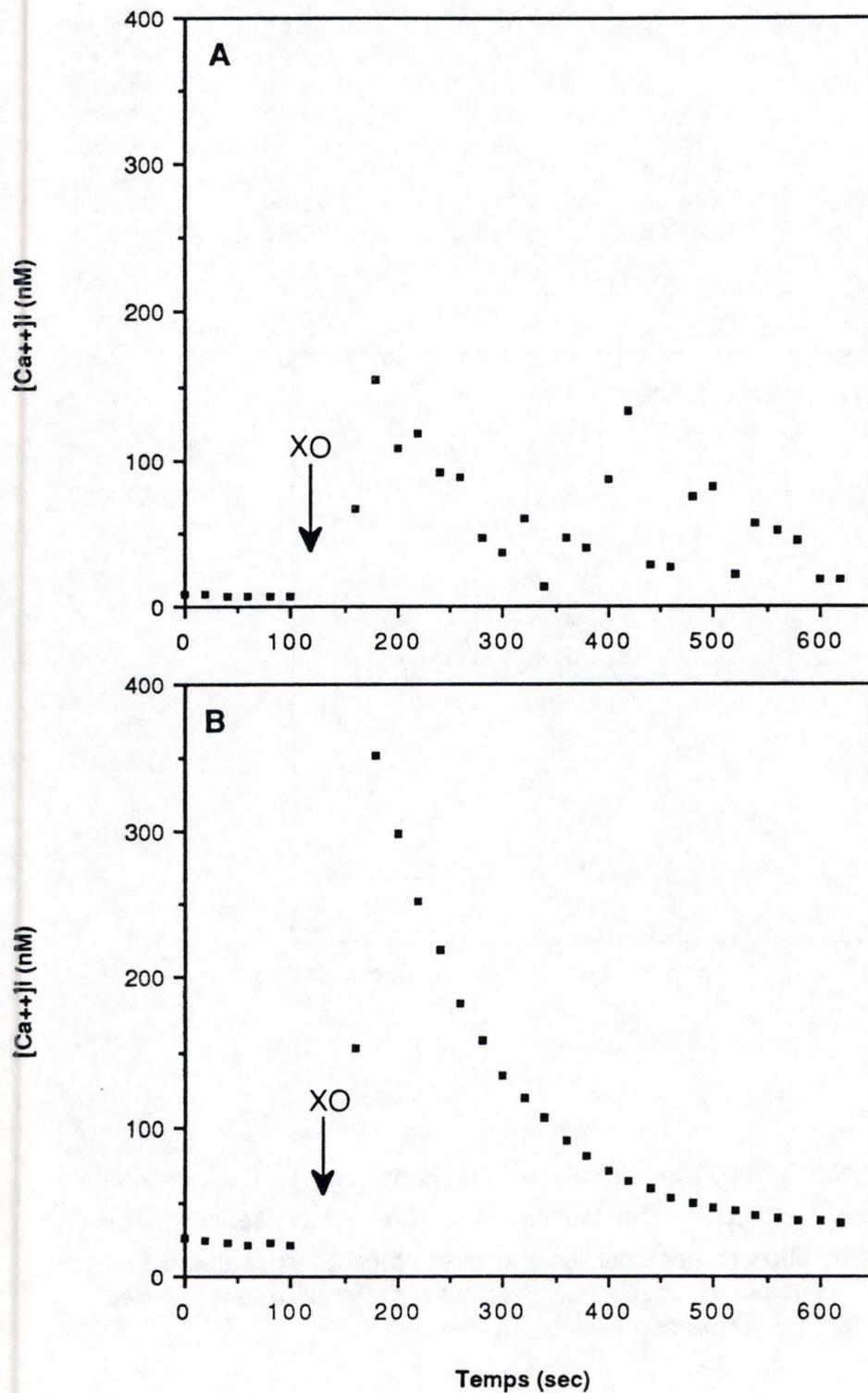
Malgré les fluctuations des intensités fluorescentes observées en fonction de

|   | [Ca <sup>++</sup> ] théo. | [Ca <sup>++</sup> ] 1 | [Ca <sup>++</sup> ]2 | [Ca <sup>++</sup> ]3 | [Ca <sup>++</sup> ]4 | [Ca <sup>++</sup> ] moy. |
|---|---------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------------------|
| 1 | 16.8                      | 2.39                  | 3.76                 | 0.95                 | 2.07                 | 2.29                     |
| 2 | 37.8                      | 6.85                  | 13.10                | 4.79                 | 6.51                 | 7.81                     |
| 3 | 64.7                      | 15.06                 | 31.20                | 12.32                | 15.16                | 18.44                    |
| 4 | 100.7                     | 31.60                 | 65.83                | 27.11                | 32.33                | 39.22                    |
| 5 | 151.0                     | 63.03                 | 134.23               | 58.91                | 66.14                | 80.58                    |
| 6 | 226.5                     | 132.62                | 275.96               | 124.47               | 144.30               | 169.34                   |
| 7 | 352.3                     | 283.61                | 584.50               | 231.19               | 301.89               | 350.30                   |
| 8 | 604.0                     | 636.25                | 1279.05              | 530.26               | 700.62               | 786.55                   |



**Figure 1-6.**

Corrélation entre la  $[Ca^{2+}]_i$  théorique calculée selon la technique des tampons Ca-EGTA (décrite dans le matériel & méthodes) et la  $[Ca^{2+}]_i$  estimée depuis la méthode des rapports de fluorescence pour les intensités obtenues suite aux ajouts successifs de  $Ca^{2+}$ . Les mesures spectrofluorimétriques sont réalisées en milieu KRH acellulaire contenant du Fura-2 non AM (1  $\mu$ M).



**Figure 1-7.**

Estimation de la  $[Ca^{2+}]_i$  de cellules endothéliales humaines en culture stimulées.

La méthode des rapports de fluorescence est appliquée:

- A : en ne considérant que les mesures spectrofluorimétriques prises à 340 et 380 nm d'excitation.
- B : en considérant également les intensités fluorescentes enregistrées à 358 nm d'excitation ramenées ensuite à un plateau arbitraire de 500 (unités relatives de fluorescence).

l'ajout de  $\text{Ca}^{2+}$ , il est un point par lequel passent toutes les courbes. Ce point se localise à une longueur d'onde d'excitation de 358 nm et constitue une intensité fluorescente qui demeure constante malgré la modification de la  $[\text{Ca}^{2+}]$ .

La comparaison des valeurs de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  libre calculées par la méthode des rapports depuis les intensités fluorescentes mesurées au cours du calibrage avec les valeurs théoriques calculées par la technique des tampons Ca-EGTA (voir Matériel & méthodes) (fig. 1-6) ne donne pas une relation linéaire comme on s'y attend mais elle s'exprime par une fonction exponentielle qui risque de provoquer une sous-estimation de la  $[\text{Ca}^{2+}]$ .

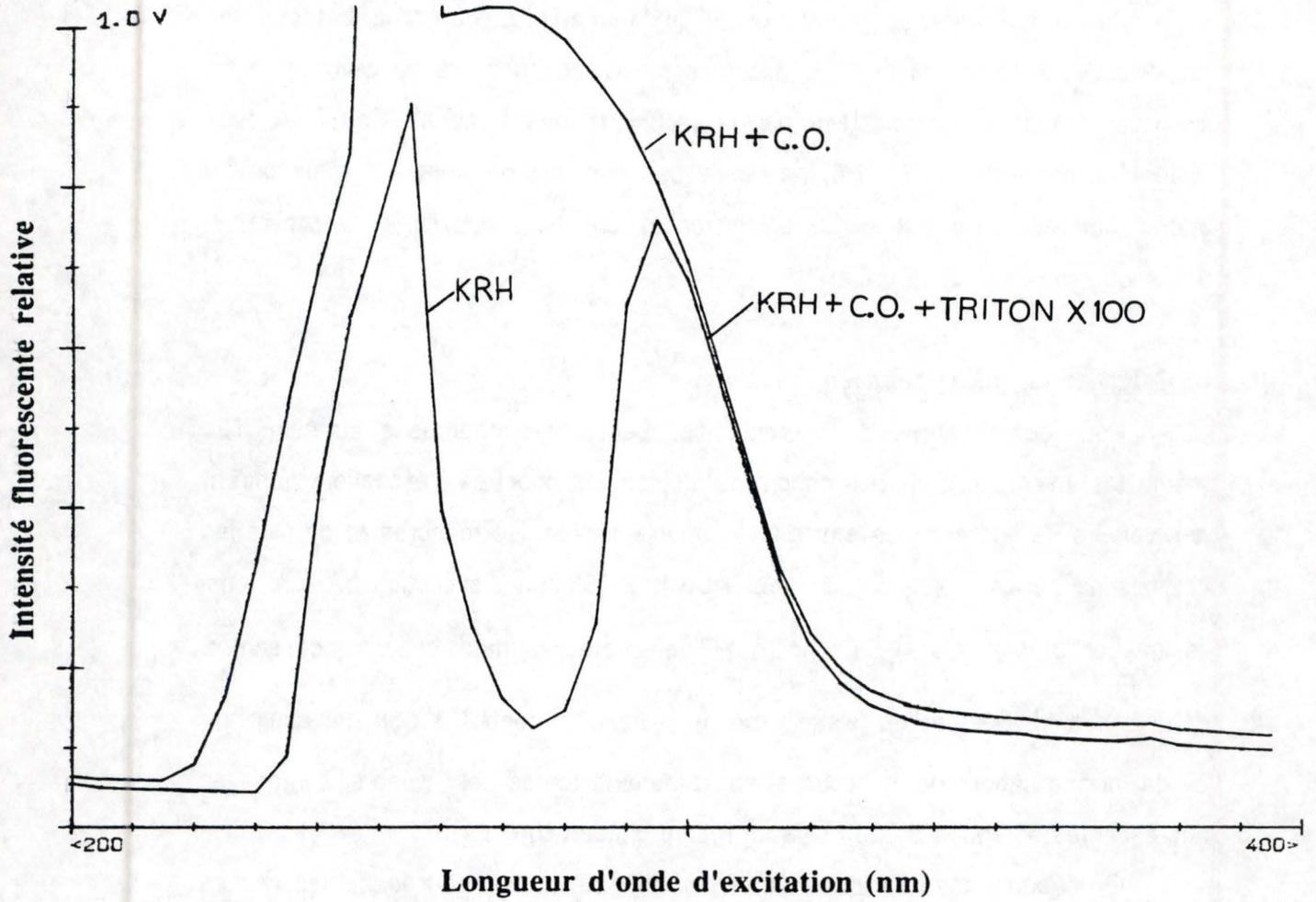
### **b) Calibrage en milieu cellulaire.**

Pour des mesures de fluorescence successives effectuées au sein d'un même test maintenu dans des conditions stables, les spectres d'excitation montrent des valeurs de fluorescence émise très variable suivant les mesures et de plus les courbes ne passent plus par un même point à 358 nm d'excitation biaisant ainsi l'estimation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . La figure 1-7 témoigne des modifications incessantes dans la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  lorsque l'on laisse varier le plateau d'intensité à 358 nm ainsi que de la normalisation de la courbe en ramenant toutes les valeurs d'intensités fluorescentes obtenues à 358 nm à un même plateau d'intensité.

On choisira dès lors un plateau à 358 nm d'excitation pour lequel les valeurs extrêmes ne sortiront pas de l'échelle afin d'éviter toute perte de sensibilité ainsi que des rapports faussés. Toutes les mesures sont menées en stabilisant le plateau d'intensité à une valeur de 0.5 pour 358 nm d'excitation, choisie arbitrairement mais respectant les conditions signalées précédemment.

Une première série d'expériences a permis de discriminer les autofluorescences résultant respectivement de la cuvette en plastique seule, du couvre-objet seul, du Krebs-Ringer HEPES seul et du KRH -Triton X100 - EGTA (fig.1-8). Leurs pics fluorescents se manifestent pour des longueurs d'onde d'excitation inférieures à 300 nm et ceux-ci n'interfèrent donc pas avec la fluorescence émise par le Fura-2, cette dernière s'inscrivant dans une gamme de longueurs d'onde d'excitation allant de 300 à 400 nm.

La fluorescence cellulaire est très variable d'une monocouche cellulaire à



**Figure 1-8.**

Discrimination des autofluorescences respectives du milieu Krebs-Ringer HEPES seul, du milieu Krebs-Ringer HEPES contenant un couvre-objet sans cellules adhérentes et du milieu Krebs-Ringer HEPES ( avec couvre-objet sans cellules ) auquel on a ajouté du Triton X100 et de l'EGTA-TRIS (PH 8,5).

Spectres d'excitation correspondants.

l'autre. Cette constatation nous décida à abandonner la technique choisie initialement qui consistait à prendre une série de boîtes repiquées simultanément parmi lesquelles on choisissait quelques boîtes "contrôles" non chargées pour déterminer l'autofluorescence des cellules, car cette méthode induisait de grandes variations dans l'estimation de la  $[Ca^{2+}]_i$ . En effet, le signal résultant de l'autofluorescence, ajoutée à la dispersion de la lumière provoquée par la présence du couvre-objet dans la cuvette, était parfois beaucoup plus grand que le signal obtenu pour les cellules chargées avec le Fura-2. Après correction, ce phénomène conduisait à une forte sous-estimation de la  $[Ca^{2+}]_i$ .

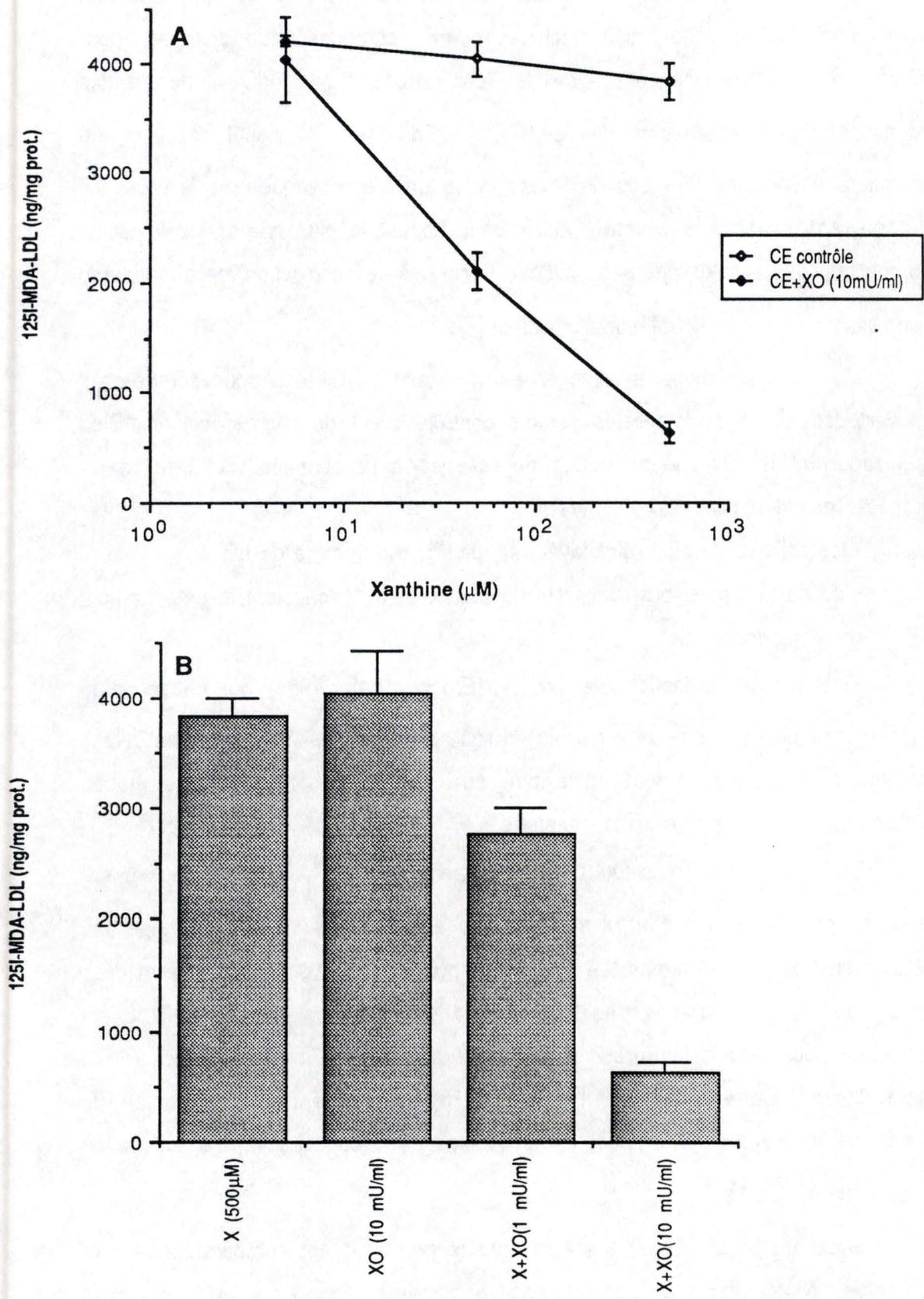
Une seconde méthode mise en oeuvre visait à utiliser chaque couvre-objet couvert de cellules endothéliales comme contrôle avant de charger celui-ci. Bien que réduisant le nombre de boîtes nécessaires à l'expérience, cette façon de procéder posait plusieurs problèmes:

- les cellules devaient être lavées un plus grand nombre de fois,
- de ce fait, plusieurs transferts du couvre-objet favorisaient le détachement de la monocouche.

Finalement, l'utilisation de  $MnCl_2$  (Brock et al., 1989) qui neutralise la fluorescence du Fura-2 nous a permis de réaliser toutes les mesures sans utiliser davantage de boîtes et tout en évitant aux cellules endothéliales des étapes supplémentaires de lavage et de transferts.

L'utilisation du Triton X-100 pour déterminer le  $F_{max}$  pose également quelques problèmes. En effet, il s'agit là d'un agent qui lyse les membranes des cellules en très peu de temps. La sonde incorporée se trouve ainsi libérée et mise en contact avec le milieu extracellulaire où la concentration en calcium libre est suffisante pour saturer le Fura-2, mais la sonde est aussi diluée dans ce milieu extracellulaire. Cette dilution peut entraîner des variations dans la quantité de sonde se trouvant dans le passage du faisceau et conduire à une estimation erronée de la  $[Ca^{2+}]_i$ .

Wickham et al. (1988) signalent que le problème est comparable avec la digitonine. Nous avons également essayé d'utiliser l'ionophore A23187, mais celui-ci émet une fluorescence intense dans les conditions de mesure du Fura-2.



**Figure 1-9.**

Endocytose des 125MDA-LDL dans des cellules endothéliales après une incubation de 120 minutes dans le système xanthine-xanthine oxydase ou en présence de xanthine (500 $\mu\text{M}$ ) ou de xanthine oxydase (10mU/ml) seules. Il s'agit d'une expérience réalisée sur des triplicats  $\pm$  écart-type.

(Rem.: La firme Molecular Probes commercialise actuellement un ionophore dérivé du A23187 mais qui est non fluorescent).

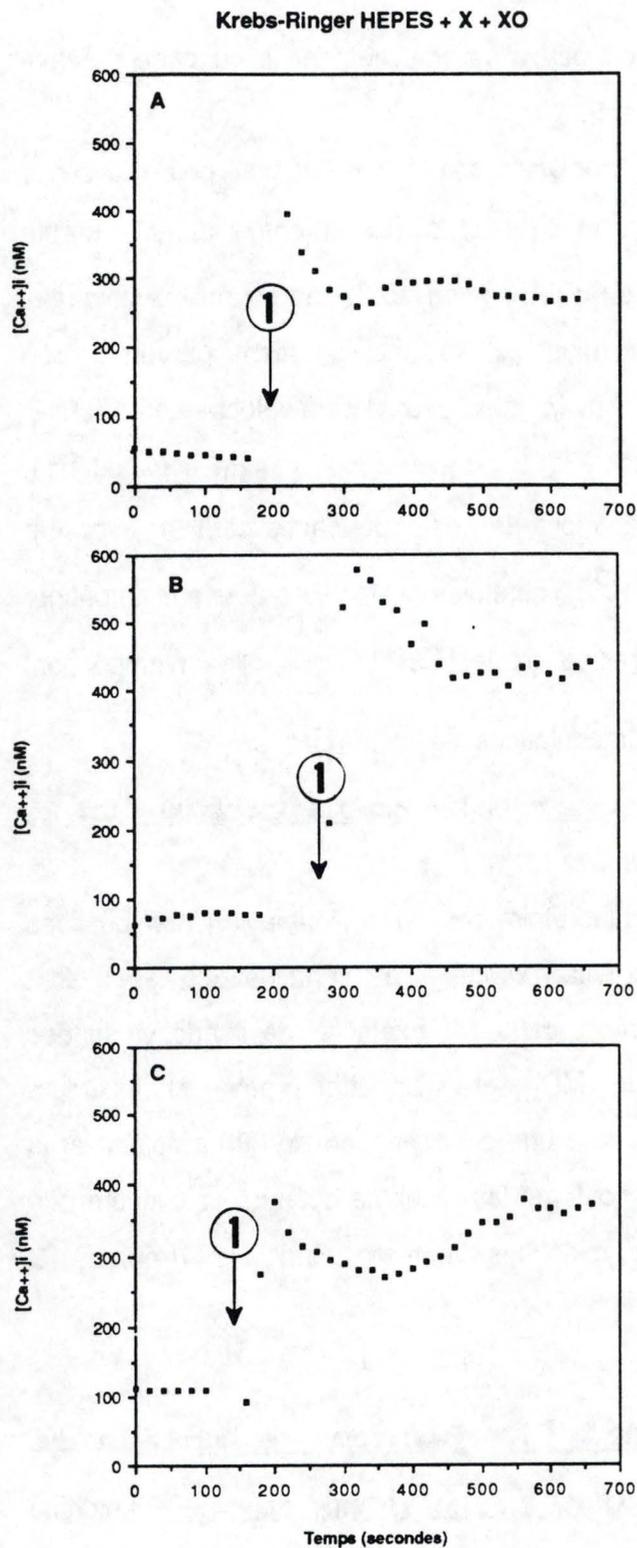
Actuellement, il semble que l'ionomycine soit le meilleur outil pour réaliser la mesure de  $F_{\max}$ . Cet ionophore permet en effet de laisser entrer dans la cellule suffisamment de calcium pour saturer le Fura-2, sans lyser la membrane plasmique ni libérer la sonde. Cette information nous est malheureusement parvenue trop tardivement pour la réalisation de ce travail, mais pour des développements futurs, il faut certainement remplacer le Triton X-100 par cet ionophore. En conséquence, les mesures d'intensités  $F_{\max}$  réalisées lors de nos expériences peuvent avoir été faussées par l'utilisation du Triton X-100. Toutefois, ces erreurs peuvent empêcher une quantification plus ou moins précise de la  $[Ca^{2+}]_i$  mais elles n'empêchent nullement l'observation qualitative de modulations de cette  $[Ca^{2+}]_i$ .

#### **6) Le système xanthine- xanthine oxydase et l'endocytose spécifique dans les cellules endothéliales.**

Les expériences réalisées au laboratoire par Yves Poumay et non publiées (fig.1-9) montrent que les deux agents (xanthine et xanthine oxydase) sont nécessaires pour produire une réduction, dans cet exemple, de l'endocytose des LDL modifiées par la malondialdéhyde (MDA) et qu'un effet proche du maximum est obtenu lorsque la xanthine se trouve à une concentration de 500  $\mu$ Molaire et la xanthine oxydase à 10mU / ml. Ceci confirme les résultats obtenus en mesurant la liaison et l'internalisation des LDL dans les mêmes conditions (Poumay & Ronveaux-Dupal, 1988).

#### **II. Mesure spectrofluorimétrique de la $[Ca^{2+}]_i$ au cours de l'incubation des cellules endothéliales humaines en culture avec le système xanthine - xanthine oxydase.**

Au cours de paragraphes suivants, deux types d'expériences seront décrites: le premier illustrera les mesures de la  $[Ca^{2+}]_i$  effectuées pendant 120 minutes après un traitement particulier (les intervalles de temps entre les mesures seront de l'ordre de quelques minutes), nous parlerons alors d'expériences à long terme, le

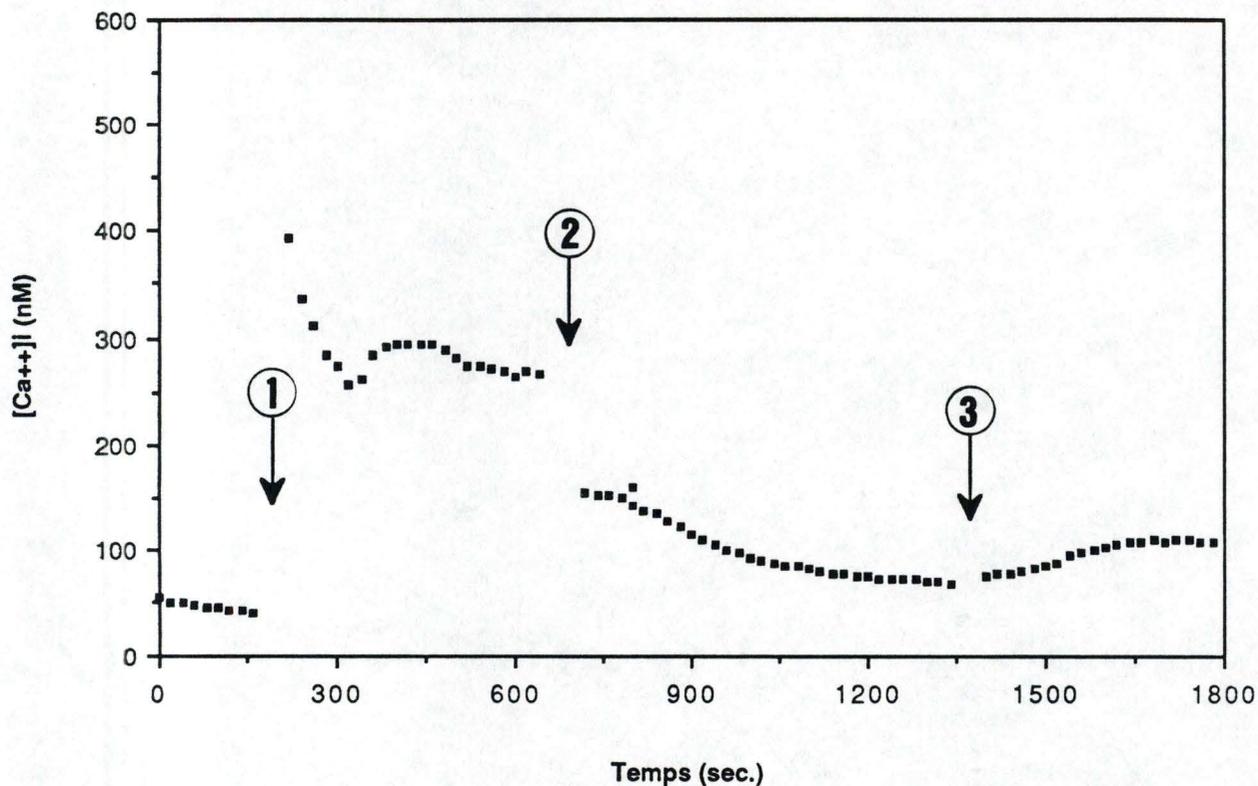


**Figure 2-1-1.**

Estimation de la  $[Ca^{2+}]_i$  de cellules endothéliales humaines en culture avant et après l'action du stress oxydant dans un milieu extracellulaire contenant du  $Ca^{2+}$  (2 mM)

-**A-B-C**: Profils représentatifs de l'évolution de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Les mesures spectrofluorimétriques ont été réalisées à court-terme (le passage de 340 à 380 nm de longueur d'onde d'excitation est effectué avec des intervalles de temps de 10 secondes) pour des cellules endothéliales incubées avec le milieu Krebs-Ringer HEPES normal puis avec le système xanthine (500 $\mu$ M)-xanthine oxydase producteur de dérivés actifs de l' $O_2$ .

① Addition de xanthine oxydase (10 mU / ml).



**Figure 2-1-2**

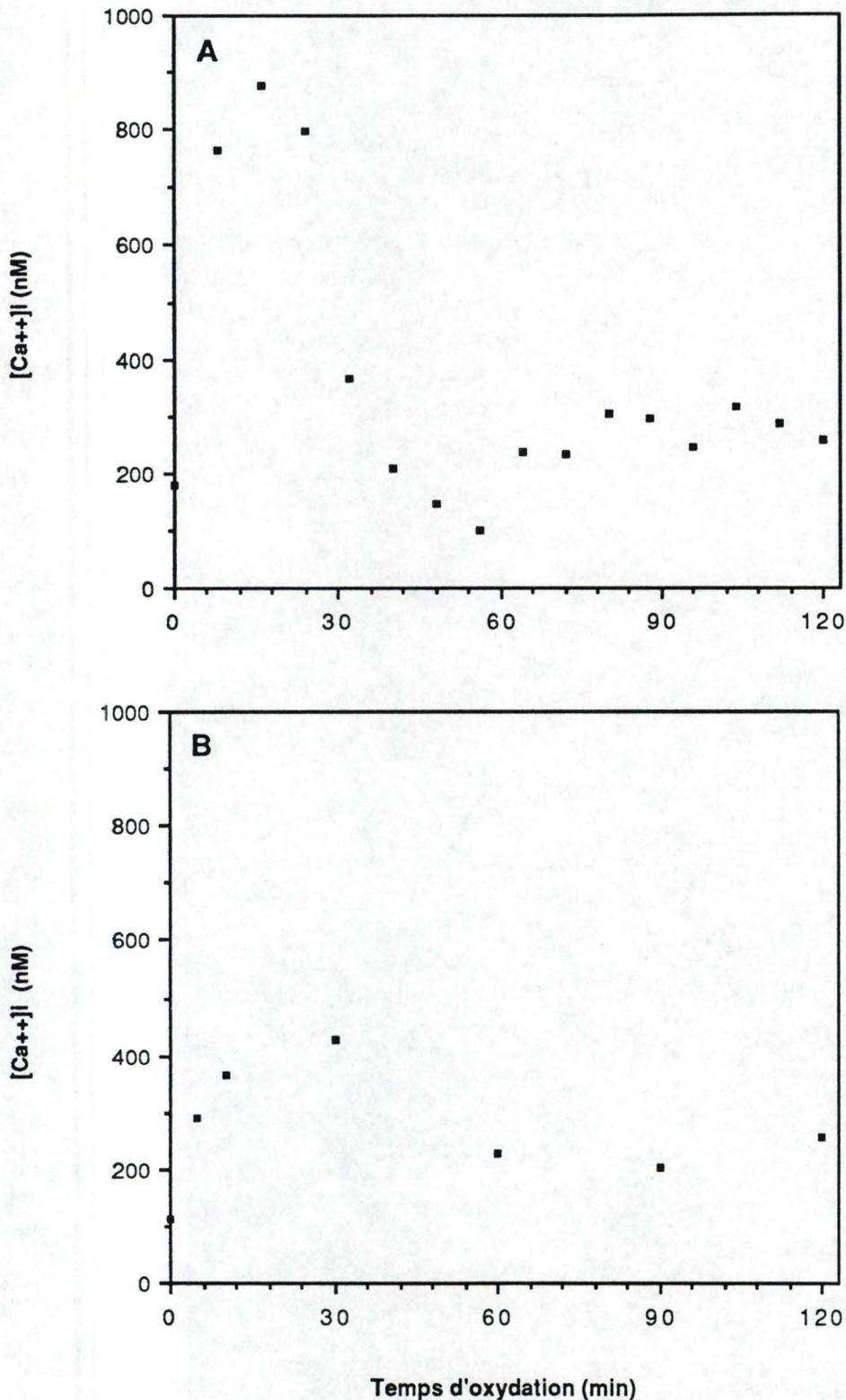
Estimation de la  $[Ca^{2+}]_i$  de cellules endothéliales humaines en culture incubées avec un système producteur de radicaux dérivés de l'oxygène dans un milieu extracellulaire contenant du  $Ca^{2+}$  (2 mM), replacées ensuite dans un milieu KRH-xanthine avant d'être réincubées avec le système X-XO pour observer l'influence d'une seconde stimulation.

Profil représentatif de l'évolution de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Les mesures spectrofluorimétriques ont été réalisées à court-terme (le passage de 340 à 380 nm de longueur d'onde d'excitation est effectué avec des intervalles de temps de 10 secondes).

① et ③ Addition de xanthine oxydase (10 mU / ml).

② Monocouche placée dans un nouveau milieu KRH-Xanthine.

## Krebs-Ringer HEPES+X+XO



**Figure 2-2**

Effet du temps d'oxydation sur la  $[Ca^{2+}]_i$  de cellules endothéliales humaines en culture incubées dans un milieu extracellulaire contenant du  $Ca^{2+}$  (2 mM).

-A-B: Profils représentatifs de l'évolution de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Les mesures spectrofluorimétriques ont été réalisées à long-terme (le passage de 340 à 380 nm de longueur d'onde d'excitation est effectué avec des intervalles de temps de 4 ou 8 minutes pour une durée totale de 120 minutes) pour des cellules endothéliales incubées avec le milieu Krebs-Ringer HEPES normal puis avec le système xanthine (500  $\mu$ M)-xanthine oxydase producteur de dérivés actifs de l' $O_2$ .

second illustrera le détail des modifications de la  $[Ca^{2+}]_i$  pendant les quelques premières minutes qui suivent ce traitement, nous parlerons dans ce cas d'expériences à court terme.

### **1) Mesure de la $[Ca^{2+}]_i$ dans les cellules endothéliales humaines.**

Réalisée sur 32 monocouches de cellules endothéliales non stimulées confluentes et adhérant à un couvre-objet placé en diagonale dans une cuvette contenant un milieu KRH normal ( $CaCl_2$  2 mM), la comparaison des mesures montre une valeur moyenne correspondant à  $69 \pm 39$  nanomoles, avec cependant des variations extrêmes importantes s'étendant de 19 à 181 nanomoles.

### **2) Effet du système xanthine-xanthine oxydase sur les cellules endothéliales.**

#### **a) Observations à court-terme.**

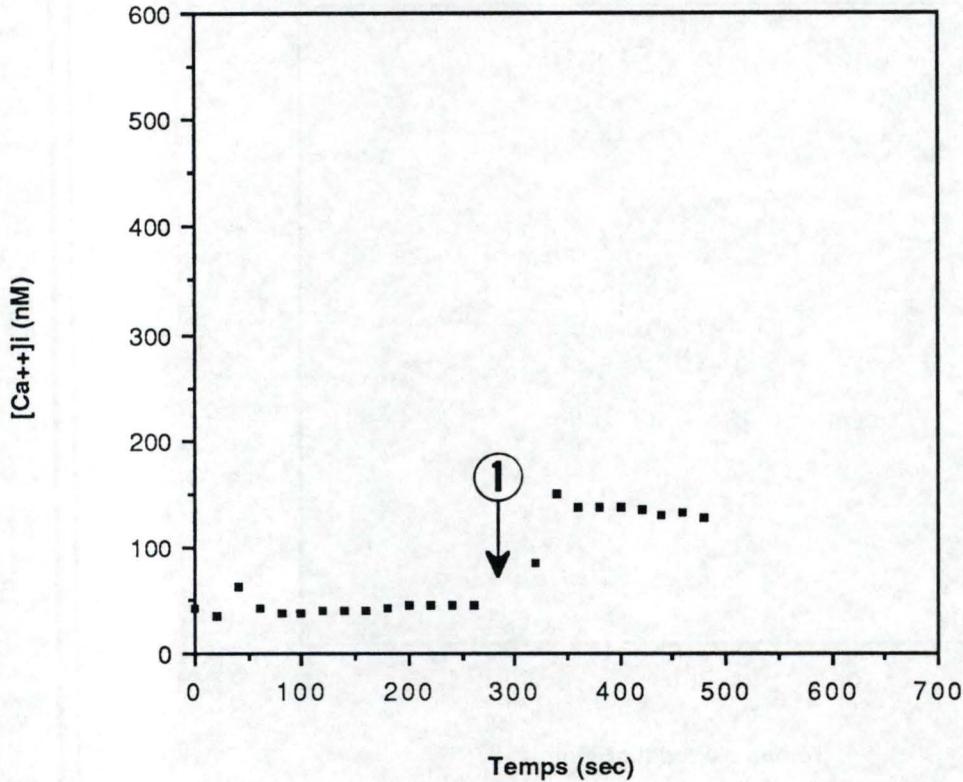
Les mesures réalisées à court-terme révèlent une élévation brutale de la  $[Ca^{2+}]_i$  dans les premiers instants qui suivent l'ajout de la xanthine oxydase, pour atteindre un pic de  $[Ca^{2+}]_i$  après 2 minutes environ. Il se produit ensuite une baisse rapide de la  $[Ca^{2+}]_i$  qui se stabilise finalement à des valeurs supérieures aux valeurs basales mesurées initialement. Le niveau auquel se stabilise la  $[Ca^{2+}]_i$  après le stress oxydant varie de façon importante selon les monocouches examinées (fig. 2-1-1 a, b, c). Certaines populations de cellules endothéliales montrent une seconde augmentation de calcium qui semble se maintenir (fig. 2-1-1 c) bien qu'il n'y ait pas d'ajout supplémentaire de xanthine oxydase.

Si l'on replace la même monocouche dans un nouveau milieu KRH-xanthine, après avoir lavé celle-ci dans une solution KRH normale, on provoque le retour de la  $[Ca^{2+}]_i$  à des valeurs basales (Fig.2-1-2). De plus, l'addition de xanthine oxydase à ce milieu neuf amène une nouvelle augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  plus lente, qui ne forme pas de pic de concentration et qui atteint un plateau de concentration moindre que la concentration atteinte par le pic de la première stimulation se maintenant dans le temps.

#### **b) Observations à long-terme.**

Les expériences réalisées à long-terme (120 minutes) montrent une

### Krebs-Ringer HEPES + XO



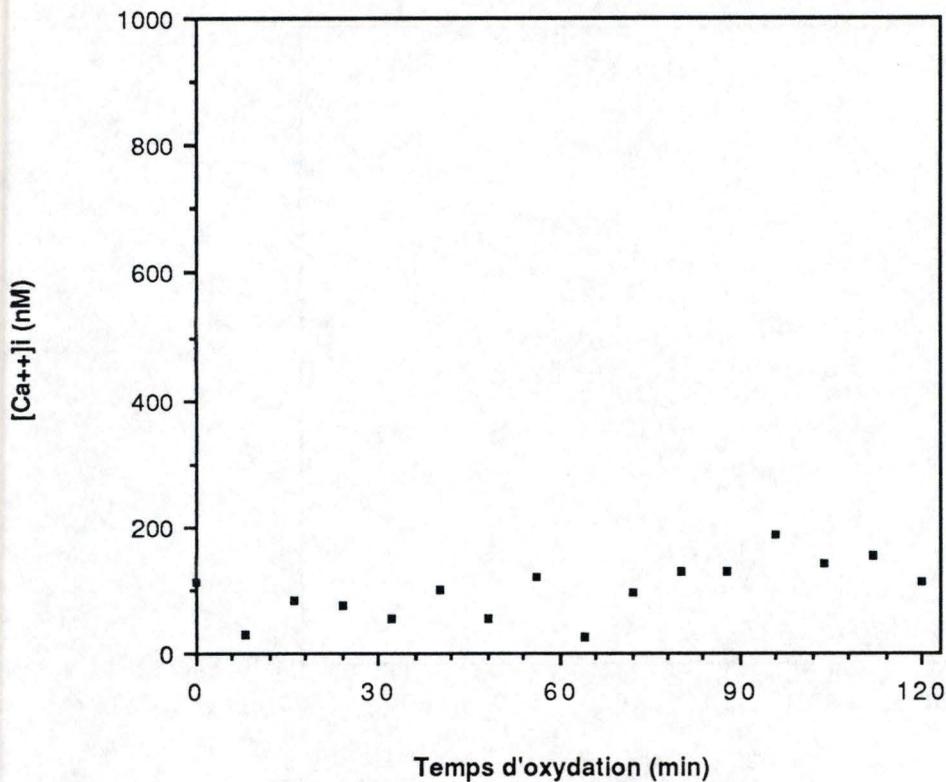
**Figure 2-3.**

Estimation de la  $[Ca^{2+}]_i$  de cellules endothéliales humaines en culture avant et après l'action de la xanthine oxydase dans un milieu extracellulaire contenant du  $Ca^{2+}$  mais dépourvu du substrat de l'enzyme oxydant.

- Profil représentatif de l'évolution de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Les mesures spectrofluorimétriques ont été réalisées à court-terme (le passage de 340 à 380 nm de longueur d'onde d'excitation est effectué avec des intervalles de temps de 10 secondes) pour des cellules endothéliales incubées avec le milieu Krebs-Ringer HEPES dépourvu de xanthine.

① Addition de xanthine oxydase (10 mU / ml).

### Krebs-Ringer HEPES+XO



**Figure 2-4.**

Effet de la xanthine oxydase sur la  $[Ca^{2+}]_i$  de cellules endothéliales humaines en culture dans un milieu extracellulaire contenant du  $Ca^{2+}$  mais dépourvu du substrat de l'enzyme oxydant.

- Profil représentatif de l'évolution de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Les mesures spectrofluorimétriques ont été réalisées à long-terme (le passage de 340 à 380 nm de longueur d'onde d'excitation est effectué avec des intervalles de temps de 4 minutes pour une durée totale de 120 minutes) pour des cellules endothéliales incubées avec le milieu Krebs-Ringer HEPES dépourvu de xanthine. L'ajout de la xanthine oxydase se réalise après 4 minutes d'incubation de la monocouche cellulaire dans le milieu KRH sans xanthine.

élévation de la  $[Ca^{2+}]_i$  qui atteint, hormis le pic initial dont nous venons de parler, une concentration maximale après 20 à 30 minutes de stress oxydant. La  $[Ca^{2+}]_i$  diminue ensuite à partir de 60 minutes pour réatteindre un plateau stable qui correspond à une  $[Ca^{2+}]_i$  supérieure à celle mesurée dans les cellules endothéliales non stimulées (fig. 2-2 a et b). On constate ici également que la  $[Ca^{2+}]_i$  au plateau montre des variations plus ou moins fortes selon les monocouches cellulaires analysées.

Après production du stress oxydant, l'élévation initiale atteint une valeur moyenne de  $556 \pm 59$  nanomoles, avec des variations extrêmes qui vont de 250 à 840 nanomoles. Quant aux valeurs de la  $[Ca^{2+}]_i$  au plateau, elles ont une moyenne de  $235 \pm 38$  nanomoles, avec des extrêmes à 104 et 360 nanomoles.

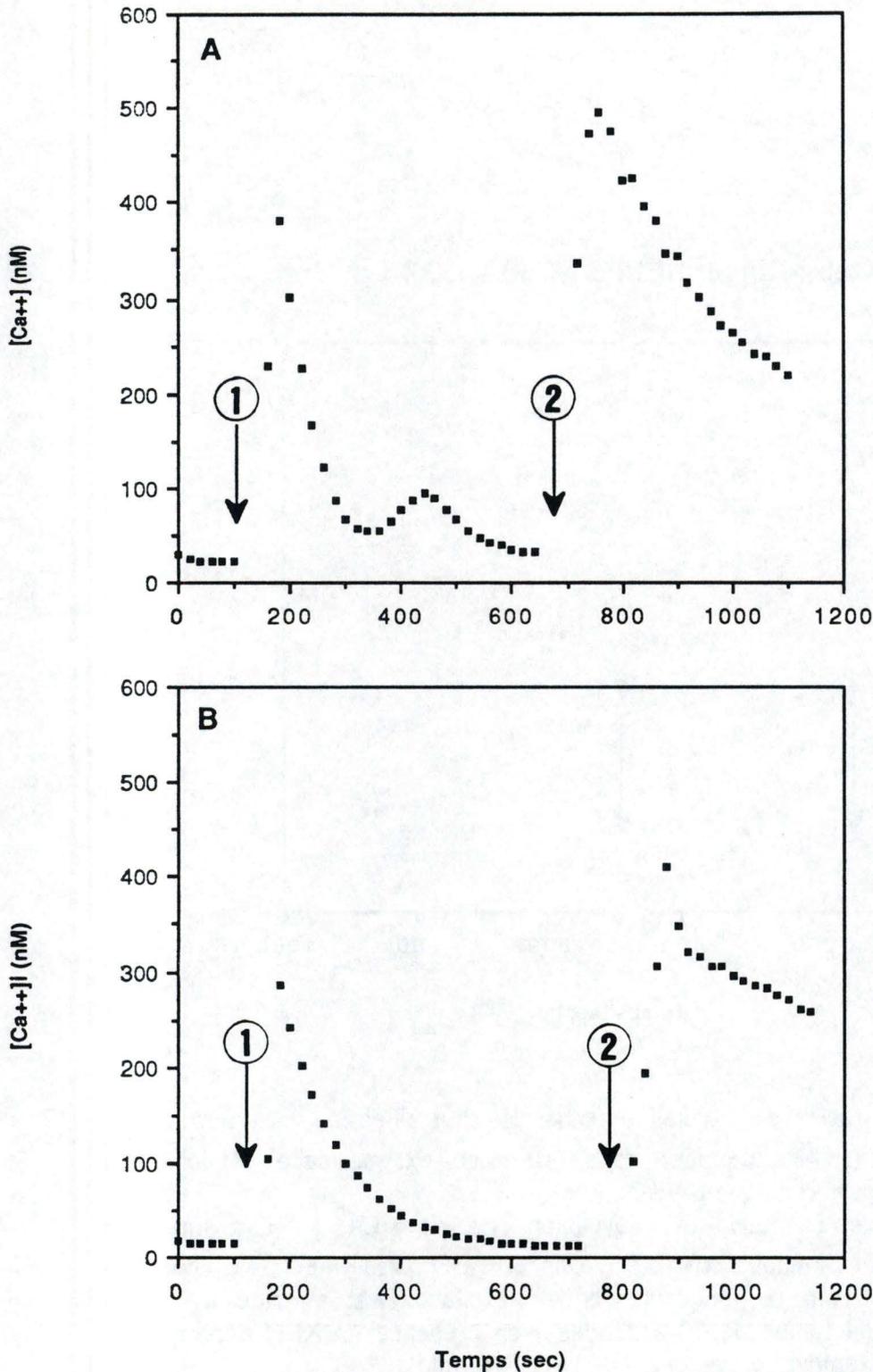
### **3) Effet de la xanthine oxydase seule sur les cellules endothéliales.**

Lorsqu'on effectue des mesures spectrofluorimétriques sur des cellules endothéliales adhérant à des couvre-objets plongés dans du KRH ne contenant pas le substrat de la xanthine oxydase, on s'attendrait à obtenir des  $[Ca^{2+}]_i$  voisines de la  $[Ca^{2+}]_i$  basale moyenne (les deux agents (xanthine et xanthine oxydase) étant indispensables à la production des dérivés actifs de l'oxygène producteurs du stress oxydant). Cependant, bien que les mesures à long terme (120 min.) ne montrent pas de variation significative (fig. 2-4), les  $[Ca^{2+}]_i$  observées à court-terme (fig. 2-3) manifestent une augmentation rapide pouvant atteindre jusqu'à 4 fois la  $[Ca^{2+}]_i$  basale avant de redescendre vers des  $[Ca^{2+}]_i$  proches de celles observées dans des cellules au repos.

### **4) Effets du stress oxydant en milieu extracellulaire sans calcium.**

Pour observer la part jouée par les deux sources de calcium capables d'augmenter la  $[Ca^{2+}]_i$  lors de l'ajout de la xanthine oxydase (mobilisation de  $Ca^{2+}$  depuis les réserves intracellulaires ou influx de  $Ca^{2+}$  extracellulaire) nous avons travaillé avec un milieu extracellulaire contenant de la xanthine mais dépourvu de  $Ca^{2+}$ . Si on ajoute la xanthine oxydase dans un tel milieu, on constate l'apparition

Krebs-Ringer HEPES(-Ca) + X + XO



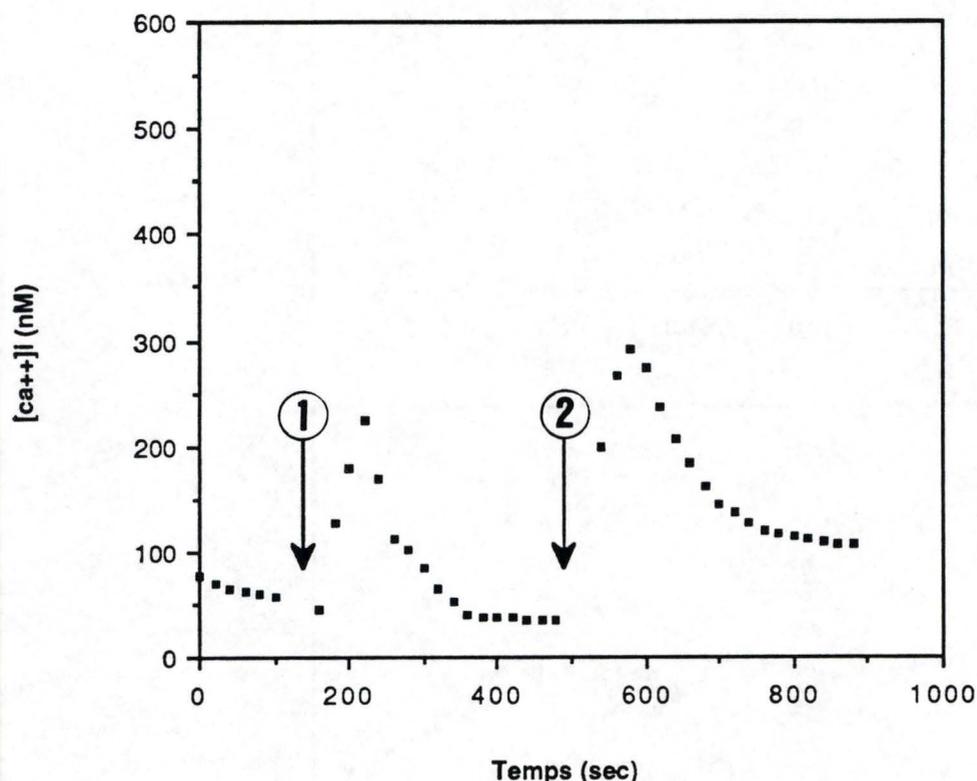
**Figure 2-5.**

Estimation de la  $[Ca^{2+}]_i$  de cellules endothéliales humaines en culture avant et après l'action du stress oxydant dans un milieu extracellulaire dépourvu de  $Ca^{2+}$ .

-**A-B**: Profils représentatifs de l'évolution de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Les mesures spectrofluorimétriques ont été réalisées à court-terme ( le passage 340-358-380 nm de longueur d'onde d'excitation est effectué avec des intervalles de temps de 10 secondes ) en présence de KRH dépourvu de  $Ca^{2+}$  mais contenant de l'EGTA (10 mMolaire) et du système xanthine(500  $\mu$ M)-xanthine oxydase producteur de dérivés actifs de l' $O_2$ .

- ① addition de xanthine oxydase (10 mU / ml).
- ② addition de  $CaCl_2$  (3 mMolaire).

Krebs-Ringer HEPES (-Ca) + XO + Ca



**Figure 2-6.**

Estimation de la  $[Ca^{2+}]_i$  de cellules endothéliales humaines en culture avant et après l'ajout de xanthine oxydase dans un milieu extracellulaire dépourvu de  $Ca^{2+}$  et du substrat de l'enzyme oxydant.

- Profil représentatif de l'évolution de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Les mesures spectrofluorimétriques ont été réalisées à court-terme ( le passage 340-358-380 nm de longueur d'onde d'excitation est effectué avec des intervalles de temps de 10 secondes ) en présence de KRH dépourvu de  $Ca^{2+}$  et de xanthine et contenant de l'EGTA (2 mM).

① addition de xanthine oxydase (10 mU/ml).

② addition de  $CaCl_2$  (3 mM).

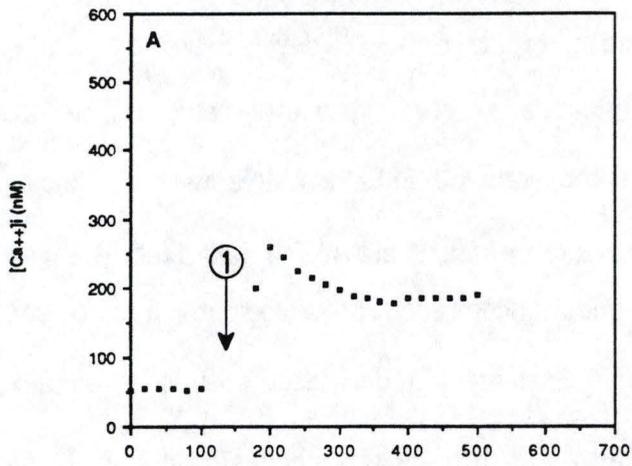
d'un pic brutal et éphémère suivi d'un rapide retour à des valeurs de  $[Ca^{2+}]_i$  basales, suggérant une libération à partir des réserves intracellulaires (fig. 2-5 a-b). Le maximum de  $[Ca^{2+}]_i$  montre une moyenne de  $295 \pm 12$  nMole avec de faibles variations individuelles. L'ajout ultérieur de  $Ca^{2+}$  au milieu extracellulaire en quantité telle qu'il se retrouve à une concentration physiologique, montre une élévation de la  $[Ca^{2+}]_i$  qui se stabilise finalement à des valeurs supérieures aux valeurs de  $[Ca^{2+}]_i$  basales (fig.2-1-1a-b). De plus, ce pic manifeste une amplitude supérieure à celle du pic obtenu avant l'ajout de  $Ca^{2+}$  et suggère une entrée de  $Ca^{2+}$  extracellulaire. On peut supposer que ces deux pics distincts obtenus avant et après l'ajout de  $Ca^{2+}$  dans le milieu extracellulaire se chevauchent plus ou moins lors des différentes expériences réalisées avec un milieu extracellulaire KRH-xanthine normal. Ce chevauchement pourrait expliquer les différents types de profils observés pour des expériences réalisées dans des conditions identiques (fig 2-1-1a-b-c).

Lorsqu'on ajoute de la xanthine-oxydase à un milieu KRH dépourvu en  $Ca^{2+}$  et en xanthine (fig. 2-6), le stress oxydant ne se déclenche pas, cependant, on obtient le même premier pic que dans les expériences précédentes réalisées avec le substrat xanthine (fig.2-5) et l'addition de  $Ca^{2+}$  entraîne la formation d'un second pic de plus faible amplitude que celle du premier pic observé en milieu extracellulaire contenant du  $Ca^{2+}$  (fig.2-1-1). Il pourrait s'agir là d'un effet indépendant de la production de dérivés actifs de l'oxygène et dont l'action majeure s'effectuerait au niveau de la libération de  $Ca^{2+}$  depuis les réserves intracellulaires.

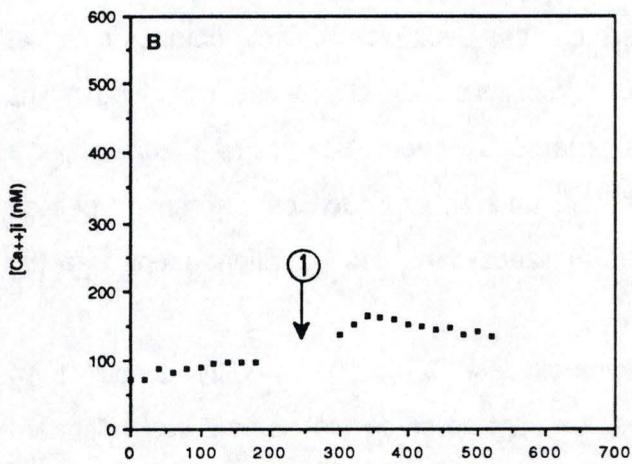
##### **5) Effet protecteur des enzymes antioxydants.**

Pour tenter de discerner une participation des dérivés actifs de l'oxygène dans les variations de la  $[Ca^{2+}]_i$ , nous avons ajouté au milieu des enzymes antioxydants. L'ajout de ces enzymes tels que la superoxyde dismutase, la catalase ou d'un mélange des deux agents au milieu KRH-xanthine montre une élévation de la  $[Ca^{2+}]_i$  réduite par rapport aux  $[Ca^{2+}]_i$  détectées dans un milieu de réaction non protégé (fig.2-7 a-b-c). On constate que l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  est plus

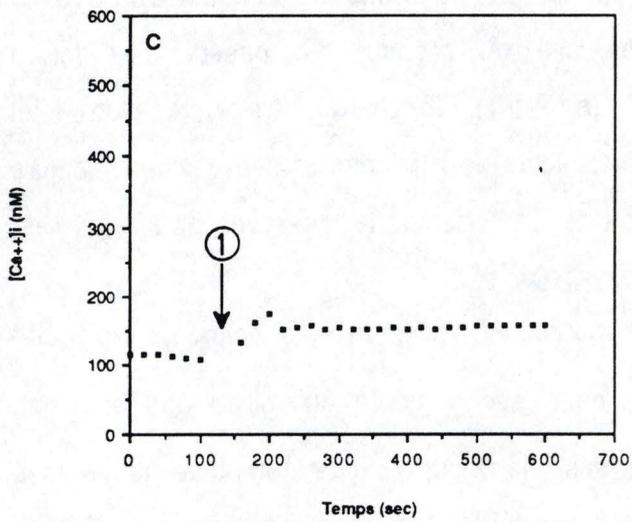
Krebs-Ringer HEPES + SOD + X + XO



Krebs-Ringer HEPES + CAT + X + XO



Krebs-Ringer HEPES + SOD + CAT + X + XO



**Figure 2-7.**

Estimation de la  $[Ca^{2+}]_i$  de cellules endothéliales humaines en culture avant et après l'action du stress oxydant dans un milieu extracellulaire contenant du  $Ca^{2+}$  et des enzymes antioxydants.

-**A-B-C**: Profils représentatifs de l'évolution de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Les mesures spectrofluorimétriques ont été réalisées à court-terme (le passage de 340 à 380 nm de longueur d'onde d'excitation est réalisé à des intervalles de temps de 10 secondes) en présence de milieu Krebs-Ringer HEPES normal, du système xanthine (500  $\mu$ M)-xanthine oxydase producteur de dérivés actifs de l' $O_2$  et de:

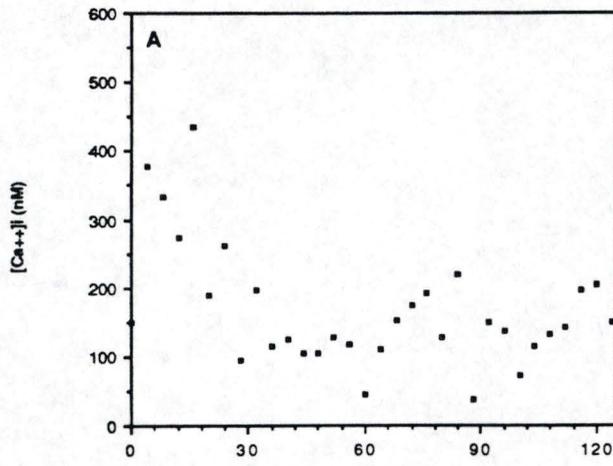
-**A**: superoxyde dismutase (3250 U/ml).

-**B**: catalase (600 U/ml).

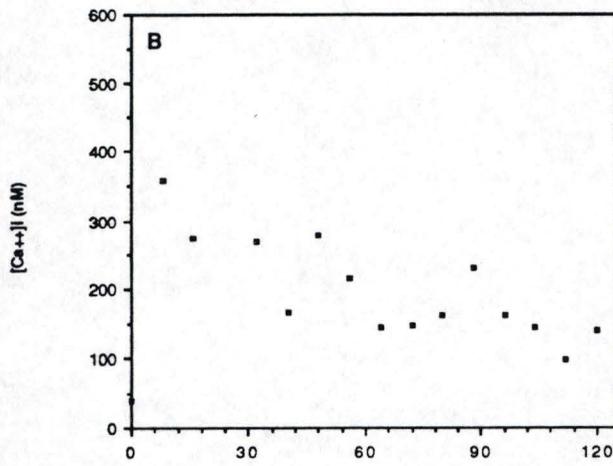
-**C**: catalase (600 U/ml) + superoxyde dismutase (3250 U/ml).

1 Addition de xanthine oxydase (10 mU / ml).

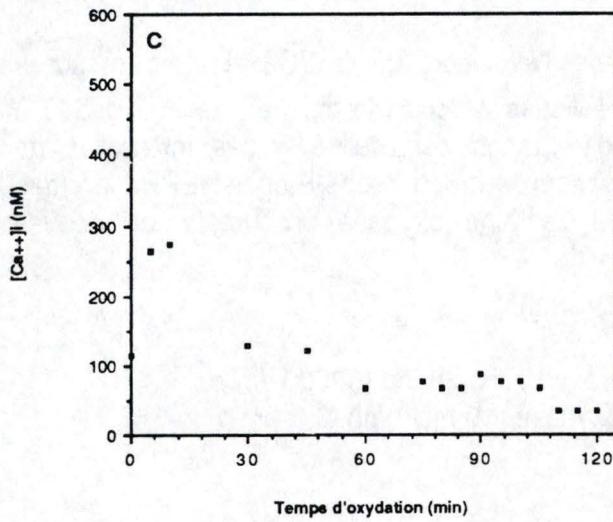
Krebs-Ringer HEPES +SOD+X+XO



Krebs-Ringer HEPES+CAT+X+XO



Krebs-Ringer HEPES + SOD + CAT + X + XO



**Figure 2-8.**

Effet du temps d'oxydation sur la  $[Ca^{2+}]_i$  de cellules endothéliales humaines en culture dans un milieu extracellulaire contenant du  $Ca^{2+}$  et des enzymes antioxydants.

-**A-B-C**: Profils représentatifs de l'évolution de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Les mesures spectrofluorimétriques ont été réalisées long-terme ( le passage 340-380 nm de longueur d'onde d'excitation est réalisé à des intervalles de temps de 4 ou 8 minutes pour une durée totale de 120 minutes) en présence de milieu Krebs-Ringer HEPES normal , du système xanthine (500 $\mu$ M)-xanthine oxydase (10 mU/ml) producteur de dérivés actifs de l' $O_2$  et de:

-**A**: superoxyde dismutase (3250 U/ml).

-**B**: catalase (600 U/ml).

-**C**: catalase (600 U/ml) + superoxyde dismutase (3250 U/ml).

brutale et plus importante dans un milieu uniquement protégé par la superoxyde dismutase. La  $[Ca^{2+}]_i$  peut après stabilisation se maintenir à des valeurs pouvant aller jusqu'à quatre fois la  $[Ca^{2+}]_i$  des cellules endothéliales au repos (fig. 2-7a et 2-8a). Le stress oxydant réalisé dans un milieu pourvu de catalase (fig. 2-7b) résulte en une élévation de la  $[Ca^{2+}]_i$  qui n'excède pas les augmentations décelées dans les milieux-contrôle (fig. 2-3 et 2-4). Il pourrait s'agir de l'effet précédemment postulé indépendant de la présence ou non du substrat de la xanthine oxydase dans le milieu d'incubation. Par ailleurs, il y aurait bien suppression de l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  provoquée par le stress oxydant lui-même.

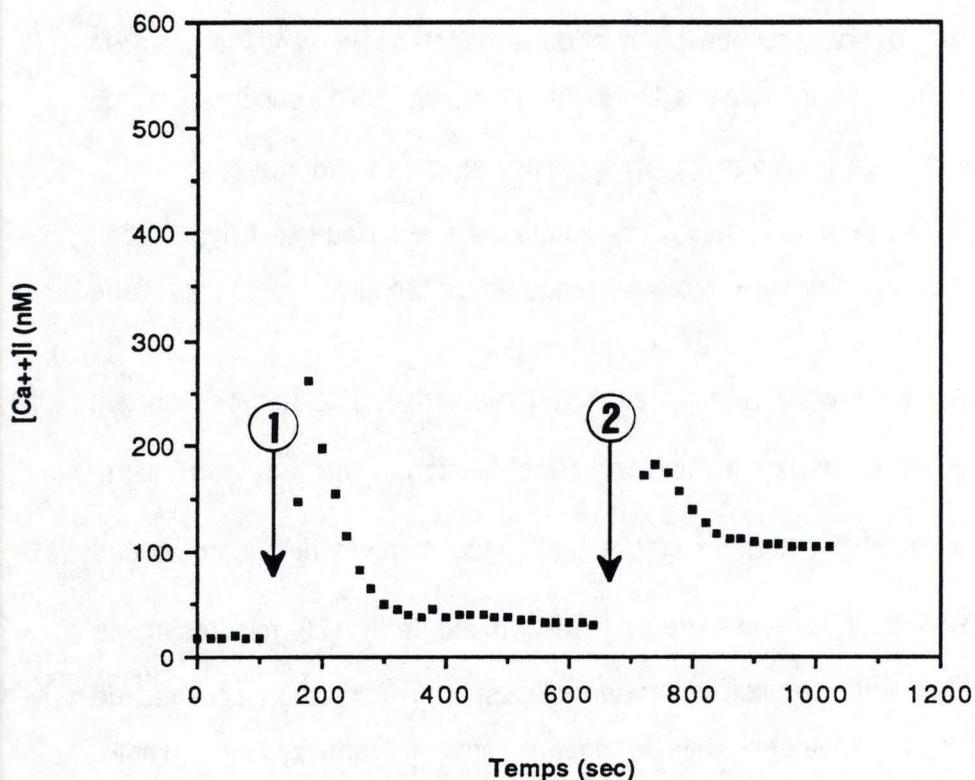
Le mélange des deux enzymes antioxydants dans le milieu initial (fig. 2-7c et 2-8c) n'apporte pas de meilleure protection que celle procurée par la catalase seule.

Les études à long-terme (effectuées à 120 minutes) (fig. 2-8a-b-c) montrent une élévation dans les premières minutes avec stabilisation à une  $[Ca^{2+}]_i$  similaire aux  $[Ca^{2+}]_i$  mesurées à court-terme (fig. 2-7a-b-c). Il faut cependant remarquer une importante variabilité pour la valeur de la  $[Ca^{2+}]_i$  mesurée à 120 minutes d'une observation à l'autre. Cette variabilité s'observe aussi bien entre monocouches de cellules endothéliales protégées par le même enzyme antioxydant qu'entre monocouches protégées par des enzymes antioxydants différents. Cela témoigne de la difficulté à établir une valeur quantitative fiable de l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  enregistrée dans les cellules endothéliales soumises au stress oxydant. De même, comme le montre la figure 2-8a, d'importantes fluctuations peuvent être enregistrées entre mesures voisines sur une même préparation rendant nécessaire la mesure de la  $[Ca^{2+}]_i$  à des intervalles de temps rapprochés. Des études réalisées avec des intervalles de temps de l'ordre de la minute peuvent dès lors très mal renseigner sur l'évolution réelle de la  $[Ca^{2+}]_i$ .

#### **6) Effet protecteur des enzymes antioxydants en milieu extracellulaire sans calcium.**

L'examen de la protection offerte par le mélange superoxyde

Krebs-Ringer HEPES(-Ca)+SOD+CAT+X +XO +Ca



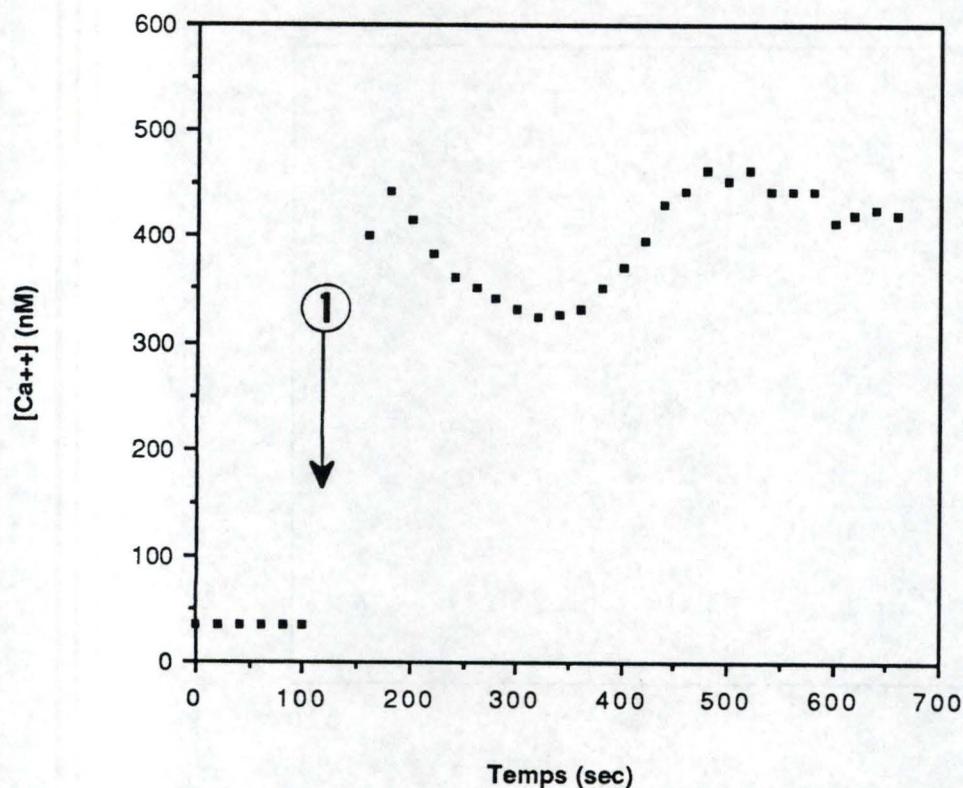
**Figure 2-9.**

Estimation de la  $[Ca^{2+}]_i$  de cellules endothéliales humaines en culture avant et après l'action du stress oxydant dans un milieu extracellulaire dépourvu de  $Ca^{2+}$  mais contenant des enzymes antioxydants.

- Profil représentatif de l'évolution de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Les mesures spectrofluorimétriques ont été réalisées à court-terme ( le passage 340-358-380 nm de longueur d'onde d'excitation est effectué avec des intervalles de temps de 10 secondes ) en présence de KRH dépourvu de  $Ca^{2+}$  et contenant de l'EGTA (2 mM), du système xanthine(500  $\mu$ M)-xanthine oxydase producteur de dérivés actifs de l' $O_2$  et du mélange superoxyde dismutase (3250 U/ml)- catalase (600 U/ml).

- ① addition de xanthine oxydase (10 mU/ml).
- ② addition de  $CaCl_2$  (3 mM).

### Krebs-Ringer HEPES +NIF+ X +XO



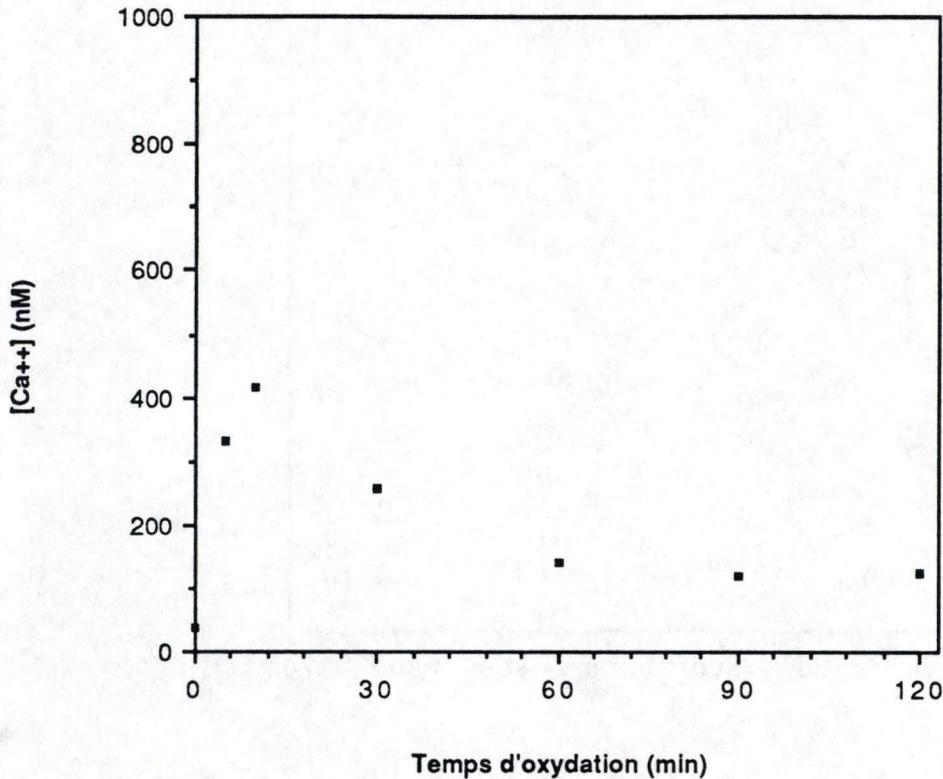
**Figure 2-10.**

Estimation de la  $[Ca^{2+}]_i$  de cellules endothéliales humaines en culture avant et après l'action du stress oxydant dans un milieu extracellulaire contenant du  $Ca^{2+}$  et un agent bloqueur des canaux calciques voltage-dépendants.

- Profil représentatif de l'évolution de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Les mesures spectrofluorimétriques ont été réalisées à court-terme (le passage de 340 à 380 nm de longueur d'onde d'excitation est effectué avec des intervalles de temps de 10 secondes) pour des cellules endothéliales incubées avec le milieu Krebs-Ringer HEPES contenant de la nifédipine ( $2\mu M$ ) puis avec le système xanthine ( $500\mu M$ )-xanthine oxydase producteur de dérivés actifs de l' $O_2$ .

① Addition de xanthine oxydase (10 mU / ml).

### Krebs-Ringer HEPES + NIF + X + XO



**Figure 2-11.**

Effet du temps d'oxydation sur la  $[Ca^{2+}]_i$  de cellules endothéliales humaines en culture dans un milieu extracellulaire contenant du  $Ca^{2+}$  et un bloqueur de canaux calciques voltage-dépendants.

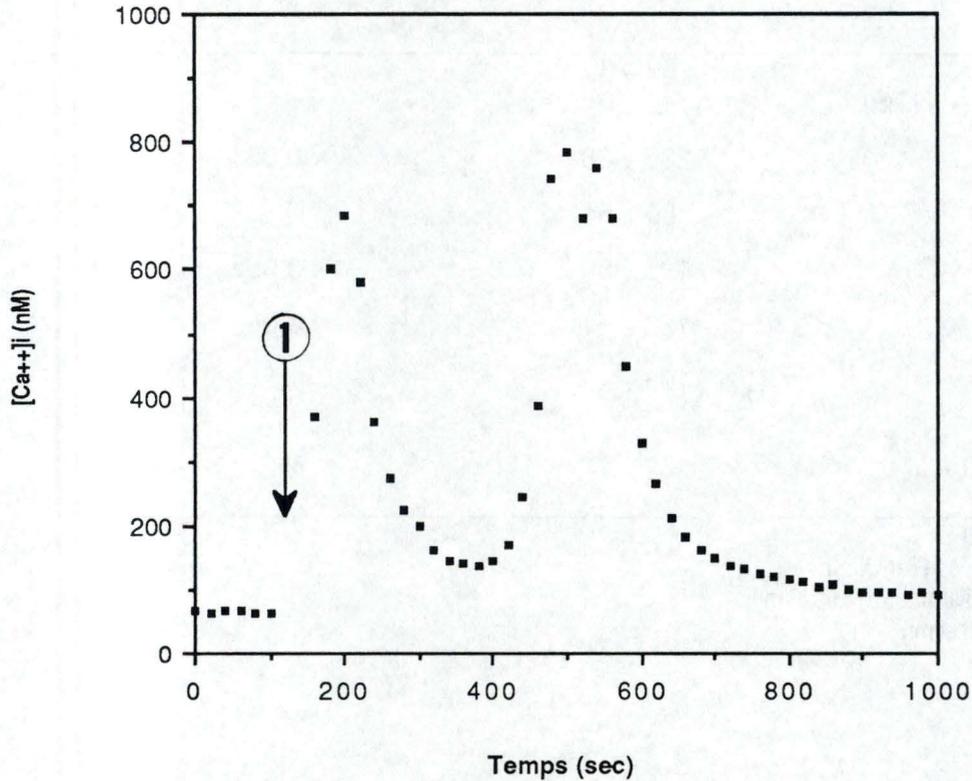
- Profil représentatif de l'évolution de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Les mesures spectrofluorimétriques ont été réalisées à long-terme (le passage de 340 à 380 nm de longueur d'onde d'excitation est effectué avec des intervalles de temps de 4 ou 8 minutes pour une durée totale de 120 minutes) pour des cellules endothéliales incubées avec le milieu Krebs-Ringer HEPES contenant de la nifédipine ( $2 \mu M$ ) puis avec le système xanthine ( $500 \mu M$ )-xanthine oxydase producteur de dérivés actifs de  $O_2$ .

dismutase-catalase dans un milieu extracellulaire sans  $\text{Ca}^{2+}$  (fig.2-9) permet de voir que le déclenchement du stress oxydant provoque un pic de concentration rapide et transitoire revenant à des valeurs en  $\text{Ca}^{2+}$  basales qui peut être attribué à la mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$  à partir des réserves intracellulaires et qui est similaire à ceux observés dans un milieu extracellulaire sans  $\text{Ca}^{2+}$  et sans agents antioxydants (fig.2-5a-b). Après addition de  $\text{Ca}^{2+}$  suit alors un second pic d'une amplitude moindre mais qui se maintient à des valeurs de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  supérieures à la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  basale de la population cellulaire considérée. Ce second pic montre un profil et un maximum de concentration identiques à ceux obtenus en milieu KRH-xanthine avec  $\text{Ca}^{2+}$  (fig. 2-7c).

### 7) Blocage de l'entrée de $\text{Ca}^{2+}$ par les canaux voltage-dépendants.

L'addition du bloqueur de canaux calciques voltage-dépendants nifédipine au milieu KRH- xanthine avant que l'on ne déclenche le stress oxydant, censé empêcher l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire via ces canaux, provoque en réalité une double élévation importante de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (fig. 2-10). La première augmentation est rapide, brutale et conduit à une  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  dix fois supérieure à la concentration basale des populations examinées. Ce pic de concentration montre cependant une chute rapide et après plus ou moins 5 minutes, on aperçoit une nouvelle hausse de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  plus lente que la première augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mais avec une décroissance très lente qui n'est visible que dans les expériences réalisées à long-terme (fig. 2-11). La stabilisation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  à long terme se manifeste aussi à une concentration supérieure à la valeur basale des monocouches observées. On constate que l'évolution de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  suite au stress oxydant en présence de nifédipine est relativement similaire aux  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  observées en milieu sans nifédipine (voir fig. 2-1-1c) et que les  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  se situent dans les mêmes limites de variations que ces dernières. On suppose dès lors, qu'en plus d'une mobilisation réalisée à partir des réserves intracellulaires, il y a une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  via des canaux

Krebs-Ringer HEPES + X + XO + STI



**Figure 2-12.**

Estimation de la  $[Ca^{2+}]_i$  de cellules endothéliales humaines en culture avant et après l'action du stress oxydant dans un milieu extracellulaire dépourvu de  $Ca^{2+}$  mais contenant un inhibiteur de trypsine.

- Profil représentatif de l'évolution de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Les mesures spectrofluorimétriques ont été réalisées à court-terme ( le passage 340-358-380 nm de longueur d'onde d'excitation est effectué avec des intervalles de temps de 10 secondes ) en présence de KRH dépourvu de  $Ca^{2+}$  et contenant de l'EGTA (2 mM), du système xanthine(500  $\mu$ M)-xanthine oxydase producteur de dérivés actifs de l' $O_2$  et du soybean trypsin inhibitor (0,2 mg/ml). (1) addition de xanthine oxydase (10 mU/ml).

**Tableau I.**

Analyse statistique de la  $[Ca^{2+}]_i$  de cellules endothéliales humaines en culture soumises à divers traitements. Exception faite des valeurs mesurées pour les cellules au repos, les mesures sont récoltées après 120 minutes d'incubation dans les différents milieux testés. Les différences entre les groupes de cellules sont comparées par un test-t de Student non pairé. Les différences sont considérées comme significatives lorsque  $P < 0.05$ .

| Milieux testés                              | $[Ca^{2+}]_i$ moyenne $\pm$ écarts-type | Valeurs de $P$ | n  |
|---|---|----------------|----|
| Contrôle<br>(cellules au repos dans le KRH) | 69 $\pm$ 39                             |                | 32 |
| KRH + X + XO                                | 235 $\pm$ 38                            | < 0.001        | 8  |
| KRH + XO                                    | 80 $\pm$ 54                             | N.S.           | 6  |
| KRH + X + SOD + XO                          | 195 $\pm$ 8                             | < 0.05         | 2  |
| KRH + X + CAT + XO                          | 138 $\pm$ 51                            | < 0.05         | 4  |
| KRH + X + SOD +<br>CAT + XO                 | 103 $\pm$ 48                            | N.S.           | 3  |
| KRH + X + Nif + XO                          | 142 $\pm$ 17                            | N.S.           | 2  |

X = xanthine (500  $\mu$ M)

XO = xanthine oxydase (10 mU/ml)

SOD = Superoxyde dismutase (600 U/ml)

CAT = Catalase (3250 U/ml)

Nif = Nifédipine (2  $\mu$ M)

voltage -indépendants.

### **8) Utilisation d'inhibiteurs de protéases.**

Malgré l'addition d'un inhibiteur de trypsine (STI (Soybean Trypsin Inhibitor)) afin de supprimer les activités enzymatiques de protéases "trypsin-like" au milieu extracellulaire dépourvu de  $\text{Ca}^{2+}$ , l'ajout de xanthine oxydase au milieu entraîne un double pic de concentration de forte amplitude indiquant une action néanmoins importante du système xanthine-xanthine oxydase sur la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ou l'action d'autres types de protéases (fig. 2-12).

### **9) Analyse statistique.**

Les données statistiques (Tableau I) obtenues après incubation des monocouches cellulaires considérées durant 120 minutes dans le système X-XO, montrent une élévation hautement significative de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  pour des cellules initialement immergées dans un milieu KRH-xanthine avec une probabilité de se tromper inférieure à 0,1 % ainsi qu'une augmentation à peine significative de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  lorsque les cellules sont protégées par de la SOD ou de la catalase seules.

On n'observe par ailleurs pas d'élévation significative de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  avec une protection des deux enzymes antioxydants combinés ou lorsque la nifédipine est présente dans le milieu extracellulaire. Il faut cependant noter que pour la SOD, la catalase et la nifédipine, le peu d'observations dont nous disposons nous oblige à rester prudents quant aux conclusions que l'on peut tirer de ces résultats. En outre, les données statistiques permettent de se rendre compte que l'ajout de XO à un milieu KRH dépourvu de son substrat provoque une hausse de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  à court-terme, mais qu'il n'y a pas d'élévation significative à long-terme. Ceci appuie l'idée de la nécessité de réaliser des expériences à long- et court-terme pour des populations cellulaires placées dans les mêmes conditions expérimentales.

## **CHAP. IV : DISCUSSION**

### **I. Calcium, cellules endothéliales et stress oxydant.**

Le calcium libre intracytoplasmique est probablement l'un des messagers secondaires les plus importants dans la régulation de la physiologie cellulaire. Diverses études ont montré que des agents stimulants (tels que le PAF, la bradykinine, la thrombine, la trypsine, etc...) et plus particulièrement le stress oxydant peuvent influencer les flux de  $Ca^{2+}$  dans les cellules endothéliales et provoquer une importante augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Hirosumi *et al.*, 1988). Cette élévation de la  $[Ca^{2+}]_i$  constitue l'un des principaux mécanismes par lesquels des agents stimulants extracellulaires peuvent activer ou inactiver certains processus cellulaires (Hamilton & Sims, 1987). Cette activation pourrait de plus être à l'origine de modifications morphologiques telles que l'apparition de blebs, de sécrétions et d'altérations de perméabilité membranaire (Wickham *et al.*, 1988). Certains ont proposé également que cette débalance de l'homéostasie calcique dans les cellules endothéliales serait une étape précoce dans l'initiation des lésions athéroscléreuses (Holmes & Kummerow, 1985). Désireux de vérifier l'influence du stress oxydant sur les cellules endothéliales, il nous fallait pouvoir suivre les modulations de la  $[Ca^{2+}]_i$  pendant ce stress et disposer donc d'une technique de détection très sensible.

### **II. Cellules endothéliales en culture sur couvre-objet.**

Les observations du présent travail ont été réalisées sur des monocouches de cellules endothéliales adhérant à des couvre-objets, ce qui reproduit mieux que les suspensions cellulaires l'état physiologique où les cellules se trouvent *in vivo*. En effet, les cellules endothéliales fixées sur couvre-objet se retrouvent avec une morphologie caractéristique proche de celle qui leur est propre *in vivo*. Les cellules endothéliales en monocouches sur couvre-objet sont polarisées avec un côté luminal en contact avec des substances

et structures variables et un côté abluminal adhérent sur un support comme dans les vaisseaux sanguins, tandis qu'elles manifestent un aspect arrondi lorsqu'elles se trouvent en suspension (Wickham *et al.*, 1988). Les techniques utilisant les suspensions de cellules endothéliales ont l'inconvénient de provoquer de multiples perturbations, notamment suite à l'utilisation de procédés de détachement qui stressent les cellules. Par exemple, l'emploi de trypsine (qui est une protéase très active), afin de détacher les cellules endothéliales aortiques bovines de leur site de fixation et de les mettre en suspension, provoque dans les cellules au repos des  $[Ca^{2+}]_i$  égales à  $168 \pm 15$  nM. Par contre, les mêmes cellules endothéliales adhérent sur couvre-objet présentent des valeurs de  $[Ca^{2+}]_i$  égales à 70-80 nM (Brock & Gimbrone, 1986).

On constate également un effet de l'âge sur les monocouches cellulaires en culture. En vieillissant les cellules endothéliales sécrètent divers produits qui sont destinés à la synthèse de la membrane basale (comme les collagènes de type II et IV ainsi que de la fibronectine, de l'élastine, ...). Ces produits vont s'accumuler entre la monocouche et le support de croissance. Ceci pourrait favoriser le détachement des cellules endothéliales en culture.

### III. La sonde fluorescente Fura-2 et son chargement dans les cellules endothéliales.

L'estimation de la  $[Ca^{2+}]_i$  est réalisée par une méthode spectrofluorimétrique qui se fonde sur l'emploi de sondes fluorescentes spécifiques du calcium. Des sondes fluorescentes telles que le Fura-2 offrent l'opportunité de détecter les modulations de la  $[Ca^{2+}]_i$ , même si celles-ci sont de très faible amplitude. L'acétoxyméthylester du Fura-2 possède la faculté de traverser les cellules intactes, puis d'être hydrolysé par des estérases cytosoliques rendant ainsi la sonde hydrophile et donc incapable de traverser les membranes plasmiques et subcellulaires (Haugland, 1989). Diverses études en microscopie à fluorescence montrent que le Fura-2 possède une distribution essentiellement cytosolique (Tsien & Poenie, 1986; Malgaroli *et al.*, 1987). Toutefois, d'autres analyses microscopiques semblent montrer, entre autres chez des cellules endothéliales aortiques bovines, que le Fura-2 se répartit non pas de façon

homogène dans le cytosol, mais qu'il existe une accumulation dans les mitochondries d'une fraction de la quantité totale de sonde ayant pénétré la membrane plasmique. Ceci pourrait résulter d'un clivage partiel de l'acétoxyméthylester. En effet, on observe que le  $R_{\max}$  montre une valeur équivalente à 84% du  $R_{\max}$  mesuré dans un milieu standard si l'on perméabilise les cellules endothéliales avec du Triton X-100 (Steinberg *et al.*, 1987). D'autres travaux montrent également une localisation mitochondriale dans des cellules comme les myocytes du coeur de rat (Davis *et al.*, 1987). Cependant nos propres mesures montrent des  $[Ca^{2+}]_i$  dans des cellules endothéliales au repos qui semblent totalement normales pour le cytosol. En effet des cellules qui manifestent des  $[Ca^{2+}]_i$  de  $\pm 100$  nM montreraient une  $[Ca^{2+}]$  mitochondriale de  $\pm 1500$  nM (McCormack *et al.*, 1989). Ceci est en accord avec les résultats plus anciens de Reinhart *et al.* (1984) qui approximaient la concentration du calcium libre dans la matrice mitochondriale à  $1 \mu\text{M}$ . En conséquence, si la majorité de la sonde se retrouvait dans la mitochondrie, on obtiendrait un profil d'intensités fluorescentes dans les cellules endothéliales au repos comparable à celui qui est enregistré lors d'une saturation de la sonde en  $Ca^{2+}$ .

Par ailleurs, nous avons observé que le chargement des cellules endothéliales par le Fura-2 AM se déroule mieux en incubant les cellules avec le milieu de culture contenant l'ester de la sonde, plutôt qu'avec une solution physiologique dans laquelle cet ester est ajouté. En effet, le milieu de culture contient des protéines transporteuses de substances peu hydrosolubles telles que l'albumine, qui facilite probablement le transfert de la sonde fluorescente dans les cellules endothéliales en l'adsorbant, prévenant les risques d'agrégation des esters de l'indicateur fluorescent peu à l'aise dans un milieu hydrophile. Une alternative est d'ajouter de la BSA (albumine de sérum bovin) à la solution physiologique, avant d'y ajouter le Fura-2 AM. Le Fura-2 activé, c'est-à-dire dont l'ester a été clivé pour libérer les fonctions acides, est un indicateur fluorescent très sensible aux variations de la  $[Ca^{2+}]_i$ , grâce à une intensité fluorescente (EX=340 nm) 30 fois accrue lors de sa complexation avec l'ion  $Ca^{2+}$ , ainsi qu'à une stoechiométrie 1:1 non respectée avec la sonde Quin-2 (Grynkiewicz *et al.*, 1985). L'observation simultanée des fluctuations d'intensité fluorescente à 340 et 380 nm de longueur d'onde d'excitation renseigne de façon indépendante de la

concentration de la sonde sur la  $[Ca^{2+}]_i$ . Cette méthode est donc de ce fait totalement adéquate pour effectuer des mesures au niveau de monocouches cellulaires, puisque tout se joue sur la différence entre la forme de la sonde complexée au calcium et la forme libre. Dans notre cas, il semble dès lors que l'emploi de la méthode des rapports de fluorescence est plus indiquée pour une estimation fiable de la  $[Ca^{2+}]_i$ , et nous considérons le rapport 340/380 étant donné que celui-ci évolue dans le même sens que la  $[Ca^{2+}]_i$ .

Les expériences de calibrage en milieu acellulaire montrent que pour des  $[Ca^{2+}]_i$  connues, la relation entre la  $[Ca^{2+}]_i$  calculée à partir de la méthode des rapports de fluorescence et la  $[Ca^{2+}]_i$  théorique n'est pas linéaire, mais montre plutôt une allure exponentielle. Certaines études montrent que la réponse ne reste linéaire que dans une zone de concentration allant de 70 à 175 nM (Hamilton & Sims, 1987). Une telle relation peut déboucher sur une sous-estimation de la  $[Ca^{2+}]_i$  lorsque celle-ci est évaluée selon la méthode développée par Grynkiewicz et al. (1985). Ceci appuie l'idée que le Fura-2, comme l'Indo-1 (Haugland, 1989) conviennent pour détecter des variations qualitatives même très faibles, mais montrent des lacunes pour une estimation quantitative précise. Dès lors, si les effets constatés sont fiables, les concentrations qui les accompagnent sont quant à elles sujettes à caution.

L'utilisation de cellules endothéliales fixées sur couvre-objet provoque des phénomènes de dispersion de la lumière d'excitation avec diffraction et réflexion des rayons lumineux. Il est dès lors important d'étudier une orientation adéquate pour le couvre-objet qui va rendre ces réflexions et diffractions minimales (Jacob & Liebermann, 1989). De minimes variations dans l'orientation du couvre-objet peuvent provoquer des modifications dans la diffraction et la réflexion des rayons incidents à ce niveau, ce qui aura pour effet de modifier l'intensité de fluorescence mesurée sur tout le spectre d'excitation, mais surtout d'influencer aussi la fluorescence mesurée avec une longueur d'onde d'excitation de 358 nm. La solution que nous avons choisie pour pallier à ce phénomène nécessite l'ajustement des valeurs de fluorescence pour obtenir une valeur à 358 nm qui reste constante (puisque pour le Fura-2, toutes les courbes se croisent en ce point). Cependant, cet ajustement suppose que l'orientation du couvre-objet joue de façon égale pour toutes les longueurs d'onde du spectre d'excitation. Il est

peu probable que ceci soit exact, mais nous avons toutefois démontré que cet ajustement arbitraire permet de suivre les variations de la  $[Ca^{2+}]_i$  et non pas les variations dues à l'orientation du couvre-objet.

Une solution à ce problème serait d'employer une cuvette à base rectangulaire de 1 cm sur 5 mm pour contenir un couvre-objet non orienté à 45° par rapport au faisceau d'excitation incident. Jacob & Liebermann (1989) proposent même d'utiliser une cuvette dans laquelle le couvre-objet est attaché à une tige dont l'orientation est réglable, ce qui permet de supprimer ces effets indésirables.

Notre valeur moyenne basale de la  $[Ca^{2+}]_i$  des cellules endothéliales examinées est relativement similaire à celles évaluées dans d'autres expériences (Hamilton & Sims, 1987; Wickham *et al.*, 1988; Hirafuji *et al.*, 1988). Toutes ces expériences montrent également de vastes variations individuelles qui ne semblent liées ni à l'âge ni à l'état de confluence des monocouches cellulaires (Wickham *et al.*, 1988).

#### **IV. Effets du stress oxydant sur la $[Ca^{2+}]_i$ de cellules endothéliales soumises à divers traitements.**

De même que dans d'autres expériences (Hirosumi *et al.*, 1988), si nous soumettons nos cellules endothéliales à l'action du système xanthine-xanthine oxydase producteur de dérivés actifs tels que l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène, on observe une élévation assez rapide de la  $[Ca^{2+}]_i$  (quelques secondes suffisent). L'augmentation brutale et transitoire dans la  $[Ca^{2+}]_i$  constatée dans des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine est immédiatement suivie d'une chute de concentration suivie d'une  $[Ca^{2+}]_i$  qui se maintient relativement longtemps à une valeur supérieure à la  $[Ca^{2+}]_i$  basale observée chez les mêmes cellules endothéliales au repos. On constate cependant, lorsqu'on soumet les cellules précédemment stimulées à une nouvelle action du système xanthine-xanthine oxydase, une petite élévation progressive de la  $[Ca^{2+}]_i$  qui atteint finalement un plateau inférieur à celui obtenu en fin de première stimulation. L'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  peut provenir d'une

entrée de calcium extracellulaire via des canaux spécifiques (voltage-dépendants ou non) ou d'une mobilisation des réserves internes (essentiellement à partir du reticulum endoplasmique) (Exton, 1988). Nos expériences en absence de calcium extracellulaire suggèrent que le pic observé résulte d'une mobilisation du calcium interne rapide dans le temps, suivi d'un influx de calcium extracellulaire, qui lui seul interviendrait pendant la seconde élévation de la  $[Ca^{2+}]_i$ . La rapidité variable avec laquelle l'influx de calcium suit la libération des réserves intracellulaires pourrait expliquer les différents profils obtenus pour différentes populations cellulaires dans des conditions expérimentales identiques. Au cours d'expériences réalisées en stimulant avec de l'acétylcholine des cellules endothéliales provenant d'aortes de lapins, Danthuluri *et al.* (1988) ont également remarqué des différences entre populations cellulaires dans les augmentations de la  $[Ca^{2+}]_i$  induites par leur traitement. L'explication proposée par ces auteurs met en cause un asynchronisme dans ce que l'on pourrait appeler la mise à feu de chaque cellule par l'agent stimulant. La mesure de la  $[Ca^{2+}]_i$  par le Fura-2 dans une cuvette de spectrofluorimètre est l'intégration des mécanismes se déroulant dans une population relativement large, c'est-à-dire les cellules frappées par le faisceau lumineux d'excitation. D'autres expériences réalisées en stimulant des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine avec du PAF-acéther montrent également un pic brutal et éphémère sans que toutefois une restimulation ne provoque une nouvelle élévation de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Hirafuji *et al.*, 1988). Au cours de ces mêmes travaux, la même augmentation étant observée avec un milieu extracellulaire dépourvu de calcium, on peut supposer que cet accroissement serait le résultat d'une libération des réserves intracellulaires : l'effet du PAF-acéther serait médié par une interaction avec des récepteurs membranaires spécifiques.

Pour déterminer l'importance relative des deux phénomènes dans nos observations, nous avons réalisé des expériences similaires à celles examinées précédemment mais avec un milieu extracellulaire dépourvu de calcium. De ces expériences, nous pouvons conclure que le premier pic observé dans la  $[Ca^{2+}]_i$  est dû à la libération de calcium intracellulaire, tandis que la seconde partie de l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$ , obtenue uniquement après ajout de calcium dans le milieu extracellulaire, représente la part jouée par l'influx de calcium

extracellulaire. D'autres expériences menées en stimulant des cellules endothéliales avec de la bradykinine notamment (Avdonin *et al.*, 1988) révèlent également ce double processus responsable des modulations de la  $[Ca^{2+}]_i$ . En conclusion, ces résultats suggèrent que dans les conditions de stimulation des cellules dans un milieu normal, ces deux phénomènes se chevauchent plus ou moins, donnant les différents profils de  $[Ca^{2+}]_i$  dont nous avons déjà parlé.

Les études effectuées avec le milieu-contrôle, c'est-à-dire le milieu KRH normal dépourvu du substrat de la xanthine oxydase, montrent qu'il existe une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  lors de l'addition de la xanthine oxydase seule. En conséquence, cette augmentation ne serait pas le résultat d'une action des dérivés actifs de l'oxygène produits par le système enzymatique.

Il faut cependant noter que certaines préparations commerciales de xanthine oxydase montrent une activité protéolytique ayant pour conséquence l'apparition d'effets "xanthine-indépendants", notamment sur les cellules endothéliales: un efflux de potassium et des altérations morphologiques provenant de cet effet ont entre autres été relevés et ces effets sont tous inhibés par l'addition conjointe de l'inhibiteur de trypsine de soja (Ager & Gordon, 1984). Cette présence de protéases pourrait être l'explication à la stimulation observée avec la xanthine oxydase seule dans nos expériences.

En effet, de nombreuses études réalisées en utilisant comme agent stimulant des protéases telles que thrombine ou trypsine ont été réalisées sur des cellules endothéliales de veine ombilicale et celles-ci montrent une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  concomitante avec une augmentation dépendante de la dose du turn-over des phosphatidylinositol et une augmentation de la production d' $IP_3$  (responsable probable de la libération de calcium à partir du réticulum) (Jaffe *et al.*, 1987; Wickham *et al.*, 1988). Ces effets sont également observés en absence de calcium extracellulaire et sont aussi suivis d'une synthèse de prostacycline par les cellules endothéliales stimulées (Jaffe *et al.*, 1987). Ces résultats sont à relier avec ceux de Savion *et al.* (1985) dans lesquels ces auteurs ont démontré l'existence d'une corrélation entre la liaison de faibles quantités de trypsine sur un récepteur spécifique et la production de prostacycline dans des cellules endothéliales aortiques bovines et que cette sécrétion de  $PGI_2$  est dépendante de

la concentration de trypsine ajoutée. Dans nos expériences, l'incorporation d'inhibiteurs de trypsine au milieu extracellulaire ne supprime pas l'élévation de la  $[Ca^{2+}]_i$ , suggérant par là que l'action des protéases contaminant la xanthine oxydase sur nos cellules n'est pas le résultat de leur activité protéasique, mais provient plus probablement d'une action plus spécifique, par exemple via l'interaction avec un récepteur capable d'activer le système des phosphatidylinositides. Rappelons ici qu'en présence d'un système semblable au nôtre, le bon fonctionnement de l'endocytose de LDL et LDL-modifiées était affecté uniquement par la production de dérivés actifs de l'oxygène.

Nous avons vu que la thrombine produit également une élévation de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Cet effet est dépendant de la dose administrée et ne semble pas pouvoir être reproduit par une seconde stimulation (Jaffe *et al.*, 1987). Dans nos expériences également, une restimulation ne donnait plus la même augmentation rapide de la  $[Ca^{2+}]_i$  que celle observée lors d'une première stimulation, mais une légère augmentation tout de même. A ce stade, on peut supposer qu'il existe un effet dû aux dérivés actifs de l'oxygène eux-mêmes et que cet effet se superpose à l'effet des protéases. Le premier pic observé serait toutefois le résultat de l'action des protéases principalement et l'augmentation plus lente et surtout plus durable de la  $[Ca^{2+}]_i$  qui suit ce pic pourrait être attribuée en grande partie aux dérivés actifs de l'oxygène et serait la traduction d'un influx de calcium extracellulaire.

Ces idées ont été testées en ajoutant des enzymes antioxydantes dans le milieu extracellulaire. Dans ce cas, en présence des deux enzymes SOD et CAT, nous constatons une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  qui doit être le résultat des protéases uniquement (l'addition d'acide urique n'a aucun effet sur la  $[Ca^{2+}]_i$ ). Si on ajoute une seule de ces enzymes, on peut rechercher les responsabilités respectives de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène dans les effets observés. L'addition de SOD semble protéger les cellules d'une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  avec moins d'efficacité que l'addition de la CAT. Ceci suggère, comme dans d'autres études (Weiss *et al.*, 1981; Halliwell & Gutteridge, 1986; Link & Riley, 1988; Poumay & Ronveaux-Dupal, 1988), que le peroxyde d'hydrogène joue un rôle prédominant dans les attaques radicalaires. Dans d'autres expériences recherchant l'effet des dérivés actifs de l'oxygène sur l'homéostasie calcique des

cellules endothéliales (Hirosumi *et al.*, 1988), une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  est également observée et partiellement protégée par les enzymes antioxydants.

D'autre part, Hirosumi *et al.* (1988) constatent de plus que la présence de nifédipine dans le milieu extracellulaire inhibe l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Ces auteurs proposent dès lors qu'il existe une mobilisation du calcium extracellulaire via des canaux calciques voltage-dépendants dans les cellules endothéliales lors d'une attaque radicalaire. Nous avons dès lors testé l'influence de cette molécule dans notre système. Si aucun effet n'est observé au cours des expériences à court terme comme éventuel protecteur empêchant l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$ , par contre l'ajout de nifédipine semble empêcher l'apparition durable d'une valeur plateau de la  $[Ca^{2+}]_i$  supérieur à la  $[Ca^{2+}]_i$  des cellules au repos. Cependant, cette apparente protection ne repose que sur deux séries de mesures et demande dès lors à être confirmée par d'autres expériences.

Notons encore que certains événements médiés par récepteur résultent de l'activation de courants ioniques à travers la membrane (activation par des agents tels que thrombine, PAF, bradykinine), ce qui peut permettre une activation de canaux sélectifs pour les ions positifs. De plus, cette génération de courant et activation de récepteurs sont associés à une libération de divers produits dans les cellules endothéliales (Bregestovsky & Ryan, 1989). Cependant, ces canaux n'ont pas encore pu être mis en évidence pour ces cellules.

Nos travaux ont été entrepris parce que des études réalisées au préalable au laboratoire avaient montré que l'incubation de cellules endothéliales dans un milieu oxydant provoquait une chute dans le processing des LDL (Poumay & Ronveaux-Dupal, 1988). D'autre part, des expériences utilisant des ionophores du calcium (A23187) montraient qu'une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  diminue le processing des LDL sans altérer la viabilité ni la morphologie cellulaire (Mazière *et al.*, 1984; Paoletti *et al.*, 1988). Inversement, l'utilisation d'antagonistes du calcium, capables probablement d'empêcher une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$ , stimule le processing des LDL, notamment dans des cellules endothéliales (Stein *et al.*, 1985). On pouvait dès lors suspecter une modification de la  $[Ca^{2+}]_i$  lors du stress oxydant d'intervenir pour inhiber le processing des LDL. Toujours d'après cette littérature, il semble toutefois que l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$ , que nous

observons après 120 minutes d'incubation, n'ait pas eu assez de temps pour affecter la synthèse du récepteur des LDL. Il nous faut donc rester prudent quant aux effets que la  $[Ca^{2+}]_i$  modifiée pourrait avoir induits. Il nous est également impossible à l'heure actuelle de discerner si l'augmentation obtenue à long terme est le résultat d'une activation cellulaire générale ou le résultat de la présence de cellules mortes ou moribondes (montrant une  $[Ca^{2+}]_i$  très élevée) dans la population cellulaire servant à la mesure. Cette seconde possibilité est toutefois peu probable puisque après 120 minutes d'incubation avec le système xanthine-xanthine oxydase la viabilité des cellules n'est pas altérée (déterminé par mesure de l'activité lactate déshydrogénase libérée) (Poumay, 1988).

## V. Conclusion.

Nous avons cherché par ce travail à analyser l'évolution de l'homéostasie calcique dans des cellules endothéliales soumises à un stress oxydant produit par le système X-XO générateur de dérivés actifs de l'oxygène. Nous espérons par l'observation de modifications dans la  $[Ca^{2+}]_i$  expliquer certains résultats obtenus précédemment au laboratoire. De plus, le développement des sondes fluorescentes estérifiées a permis une meilleure estimation des de la  $[Ca^{2+}]_i$  et nous avons effectué nos mesures en adaptant la technologie de ces indicateurs fluorescents aux cellules endothéliales cultivées sur couvre-objet.

Cette méthode spectrofluorimétrique permet donc de suivre les modulations de la  $[Ca^{2+}]_i$  et les résultats témoignent d'une élévation de la  $[Ca^{2+}]_i$  consécutive à l'action du système X-XO. Cette augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  s'inscrit en deux phases d'amplitudes et de durées différentes qui ont pu être distinguées grâce à des mesures réalisées à long- et court-terme. Nous avons également constaté que si la méthode de détection des variations de la  $[Ca^{2+}]_i$  reste valable pour une estimation qualitative ou semi-quantitative, elle présente cependant des lacunes pour une évaluation quantitative fiable des  $[Ca^{2+}]_i$ .

Les  $[Ca^{2+}]_i$  enregistrées semblent résulter en partie de l'action des dérivés actifs de l'oxygène (probablement sur les constituants membranaires) à laquelle se superpose une hausse de la  $[Ca^{2+}]_i$  certainement provoquée par des protéases contaminantes contenues dans la préparation de XO. Cette élévation de la  $[Ca^{2+}]_i$  par les dérivés actifs de l' $O_2$  pourrait induire à long-terme in vivo une débalance de l'homéostasie calcique qui pourrait constituer une étape précoce dans l'initiation des lésions athéroscléreuses. Les cellules endothéliales peuvent en effet être stimulées par diverses substances (telles que la thrombine, l'acétylcholine, les LDL, les radicaux libres, ...) produites par les principaux facteurs de risque de l'athérosclérose. La cellule endothéliale stimulée va libérer à son tour des substances (EDRF, endothéline, PGI<sub>2</sub>, ...) qui peuvent contribuer au dysfonctionnement de la paroi vasculaire mais elle pourrait elle-même, si elle est activée, produire des radicaux libres et auto-entretenir son activation.

**CHAP. VI : BIBLIOGRAPHIE.**

- Ager, A. & Gordon, J.L. (1984).  
Cellular effects of proteinase activity in commercial xanthine oxidase.  
Biochem. J., 222, 839.
- Avdonin, P.V., Hayes, B., Van Breeman, C. & Ryan, U.S. (1988).  
Two phase regulation of cytoplasmic free calcium in endothelial cell response  
to agonist.  
FASEB J., 2, A 810.
- Benditt, E.P. & Benditt, J.M. (1973).  
Evidence for a monoclonal origin of human atherosclerotic plaques.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 1753-1756.
- Bindoli, A., Cavallini, L., Rigobello, M.P., Coassin, M. & Di Lisa, F. (1988).  
Modification of the xanthine-converting enzyme of perfused rat heart during  
ischemia and oxidative stress.  
Free Rad. Biol. Med., 4, 163-167.
- Blake, D.R., Allen, R.E. & Lunec, J. (1987).  
Free radicals in biological systems. A review oriented to inflammatory  
processes.  
in Inflammation: mediators and mechanisms (British Medical Bulletin,  
Willoughby, D.A., ed.), Vol. 43, pp. 371-385, Churchill Livingstone, London.
- Block, L., Knorr, M., Vogt, E., Locker, R. & Vetter, W. (1988).  
Low density lipoprotein causes general cellular activation with increased  
phosphatidylinositol turnover and lipoprotein catabolism.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 885-889.
- Bregestovski, P. & Ryan, U.S. (1989).  
Voltage-gated and receptor-mediated ionic currents in the membrane of  
endothelial cells.  
J. Mol. Cell Cardiol., 21 (Suppl. 1), 103-108.
- Brock, T.A. & Gimbrone, M.A. (1986).  
Platelet activating factor alters calcium homeostasis in cultured vascular  
endothelial cells.  
Am. J. Physiol., 250, H1086-H1092.
- Brown, M.S. & Goldstein, J.L. (1985).  
The LDL receptor and the regulation of cellular  
cholesterol metabolism.  
J. Cell Sci., Suppl.3. 131-137.

- Brown, M.S. & Goldstein, J.L. (1983).  
Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis.  
*Ann. Rev. Biochem.*, 52, 223-261.
- Burton, K.P. (1988).  
Evidence of direct toxic effects of free radicals on the myocardium.  
*Free Rad. Biol. Med.*, 4, 15-24.
- Campbell, A.K. (1983).  
Intracellular calcium. Its universal role as regulator.  
John Wiley & Sons Ltd, 556 p.
- Capron, L. (1983).  
Athérosclérose.  
*Rev. Neurol.*, 139, 167-176.
- Carafoli, E. (1987).  
Intracellular calcium homeostasis.  
*Ann. Rev. Biochem.*, 56, 395-433.
- Cryer, A. (1983).  
Scale and diversity of interactions at the endothelium.  
in *Biochemical Interactions at the Endothelium* (Cryer, A., ed), pp 1-3, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Danthuluri, N.R., Cybulsky, M. & Brock, T. (1988).  
ACh-induced calcium transients in primary cultures of rabbit aortic endothelial cells.  
*Am. J. Physiol.*, 255, H1549-H1553.
- Davis, M.H., Altschuld, R.A., Jung, D.W. & Brierley, G.P. (1987)  
Estimation of intramitochondrial pCa and pH by Fura-2 and 2.7 Biscarboxyethyl-5(6)-carboxyfluorescein fluorescence.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 149, 40-45.
- Epstein, F.H. (1982).  
So-called "minor risk factors" in atherogenesis.  
in *Atherosclerosis-Clinical evaluation and therapy*, 23-28, MIP Press.
- Exton, J.H. (1988).  
Mechanisms of action of calcium-mobilizing agonists: some variations on a young theme.  
*FASEB J.*, 2, 2670-2676.
- Fagiotto, A., Ross, R. & Harker, L. (1984).  
Studies of hypercholesterolemia in the non-human primate.  
*Arteriosclerosis*, 4, 323-340 & 341-356.

- Freeman, B.A., Rosen, G.M. & Barber, M.J. (1986).  
Superoxide perturbation of the organization of vascular endothelial cell membranes.  
*J. Biol. Chem.*, 261, 6590-6593.
- Freeman, B.A. & Crapo, J.D. (1982).  
Free radicals and tissue injury.  
*Lab. Invest.*, 47, 412-426.
- Goldstein, J.L. & Brown, M.S. (1977).  
The low density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis.  
*Ann. Rev. Biochem.*, 46, 897-930.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R.Y. (1985).  
A new generation of  $Ca^{++}$  indicators with greatly improved fluorescence properties.  
*J. Biol. Chem.*, 260, 3440-3450.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (1984).  
Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease.  
*Biochem. J.*, 219, 1-14.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (1986).  
Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts.  
*Arch. Biochem. Biophys.*, 246, 501-514.
- Hamilton, K.K. & Sims, P.J. (1987).  
Changes in cytosolic  $Ca^{2+}$  associated with von Willebrand factor release in human endothelial cells exposed to histamine.  
*J. Clin. Invest.*, 79, 600-608.
- Haugland, R.P. (1989).  
Handbook of fluorescent probes and research chemicals.  
Molecular Probes.
- Hennig, B. & Chow, C.K. (1988).  
Lipid peroxidation and endothelial cell injury: implications in atherosclerosis.  
*Free Radic. Biol. Med.*, 4, 99-106.
- Henry, P.D. (1985).  
Atherosclerosis, calcium and calcium antagonists.  
*Circulation*, 72, 456-459.
- Hirafuji, M., Kazutaka, M., Takehiko, W. & Ogura, Y. (1988).  
Transient increase of cytosolic free calcium in cultured human vascular endothelial cells by platelet-activating factor.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 154, 910-917.

- Hirosumi, J., Ouchi, Y., Watanabe, M. & Orimo, H. (1988).  
Effect of superoxide and lipid peroxide on cytosolic free calcium concentration in cultured pig aortic endothelial cells.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 152, 301-307.
- Holmes, R.P. & Kummerow, F.A. (1985).  
Membrane perturbations in atherosclerosis.  
in *Membrane Fluidity in Biology*, Vol. 3, (Aloia, R.C. & Boggs, J.M., eds), 281-305, Academic Press, Orlando.
- Hyslop, P.A., Hinshaw, D.B., Schraufstatter, I.U., Sklar, L.A., Spragg, R.G. & Cochrane, C.G. (1986).  
Intracellular calcium homeostasis during hydrogen peroxide injury to cultured P388D1 cells.  
*J. Cell Physiol.*, 129, 356-366.
- Jacob, R. & Lieberman, M. (1989).  
Measurement of  $[Ca^{2+}]_i$  in a cultured monolayer of heart cells.  
Biomedical Application (SPEX Industries), Note B-1.
- Jaffe, E.A. (1984).  
Culture and identification of large vessel endothelial cells.  
in *Biology of endothelial cells* (Jaffe, E.A., ed), pp. 1-13, Martinus Nijhoff Publishers, Boston, MA.
- Jaffe, E.A., Nachman, R.L., Becker, C.G. & Minick, C.R. (1973).  
Culture of endothelial cells derived from umbilical veins.  
*J. Clin. Invest.*, 52, 2745-2756.
- Jaffe, E., Grulich, J., Weksler, B., Hampel, G. & Watanabe, K. (1987).  
Correlation between thrombin-induced prostacyclin production and inositol triphosphate and cytosolic free calcium levels in cultured human endothelial cells.  
*J. Biol. Chem.*, 262, 8557-8565.
- Kramsch, D.M., Aspen, A.J. & Rozler, L.J. (1981).  
Atherosclerosis: Prevention by agents not affecting abnormal levels of blood lipids.  
*Science*, 213, 1511-1512.
- Link, E.M. & Riley, P.A. (1988).  
Role of hydrogen peroxide in the cytotoxicity of the xanthine/xanthine oxidase system.  
*Biochem. J.*, 249, 391-399.
- Lückhoff, A. (1986).  
Measuring cytosolic free calcium concentration in endothelial cells with Indo-1: the pitfalls of using the ratio of two fluorescent intensities recorded at different wavelengths.  
*Cell Calcium*, 7, 233-248.

- Malgaroli, A., Milani, D., Meldolesi, J. & Pozzan, T. (1987).  
Fura-2 measurement of cytosolic free  $Ca^{++}$  in monolayers and suspensions of various types of animal cells.  
*J. Cell Biol.*, 105, 2145-2155.
- Matsubara, T. & Ziff, M. (1986).  
Superoxide anion release by human endothelial cells: synergism between a phorbol ester and a calcium ionophore.  
*J. Cell. Physiol.*, 127, 207-210.
- Mazière, J.C., Mazière, C., Mora, L., Gardette, J. & Polonovski, J. (1984).  
Effects of the calcium ionophore A 23187 on low density lipoprotein processing and lipid metabolism in cultured human fibroblasts.  
*FEBS Lett.*, 177, 76-80.
- Mc Cord, J.M. (1985).  
Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury.  
*N. Engl. J. Med.*, 312, 159-163.
- Mc Cormack, J.G., Browne, H.M. & Dawes, N.J. (1989).  
Studies on mitochondrial  $Ca^{2+}$ -transport and matrix  $Ca^{2+}$  using Fura-2-loaded rat heart mitochondria.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 973, 420-427.
- Mead, J.F. (1976).  
Free radical mechanisms of lipid damage and consequences for cellular membranes.  
in *Free Radicals in Biology* (Pryor, W.A., ed) vol I, pp 31-68, Academic Press, New York.
- Moldow, C.F. (1984).  
Neutrophil endothelial interactions.  
in *Biology of endothelial cells* (Jaffe, E.A., ed.), pp. 286-297, Martinus Nijhoff Publishers, Boston, MA.
- Mulcahy, R. (1983).  
Influence of cigarette smoking on morbidity and mortality after myocardial infarction.  
*Br. Heart J.*, 49, 410-415.
- Nicotera, P., Hartrell, P., Davis, G. & Orrenius, S. (1986).  
The formation of plasma membrane blebs in hepatocytes exposed to agents that increase cytosolic  $Ca^{++}$  is mediated by the activation of a non-lysosomal proteolytic system.  
*FEBS Lett.*, 209, 139-144.
- Paoletti, R., Bernini, F., Fumagalli, R., Allorio, M. & Corsini, A. (1988).  
Calcium antagonists and low density lipoprotein receptors.  
*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 522, 390-398.

- Patel, J.M. & Block, E.R. (1988).  
The effect of oxidant gases on membrane fluidity and function in pulmonary endothelial cells.  
*Free Rad. Biol. Med.*, 4, 121-134.
- Poumay, Y. (1988).  
Contribution à l'étude de l'athérogenèse. Effets des dérivés actifs de l'oxygène sur l'endocytose spécifique des lipoprotéines de faible densité par les cellules endothéliales humaines en culture.  
Thèse de Doctorat. Facultés Universitaires ND de la Paix, Namur.
- Poumay, Y. & Ronveaux-Dupal, M.F. (1988).  
Incubation of endothelial cells in a superoxide-generating system: impaired low density lipoprotein receptor-mediated endocytosis.  
*J. Cell Physiol.*, 136, 289-296.
- Pryor, W.A. (1976).  
The role of free radicals reactions in biological systems.  
in *Free radicals in biology* (Pryor, W.A., ed.), Vol. 1, pp. 1-49, Academic Press, New York.
- Putney, J.W. (1986).  
A model for receptor-regulated calcium entry.  
*Cell Calcium*, 7, 1-12.
- Quinn, M.T., Parthasarathy, S., Fong, L.G. & Steinberg, D. (1987).  
Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocytes/macrophages during atherogenesis.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 2995-2998.
- Reinhart, P.H., Taylor, W.M. & Bygrave, F.L. (1984)  
The role of calcium ions in the mechanism of action of alpha-adrenergic agonists in rat liver.  
*Biochem. J.*, 223, 1-13.
- Rink, T.J. & Pozzan, T. (1985).  
Using Quin 2 in cell suspensions.  
*Cell Calcium*, 6, 133-144.
- Rosen, G.M. & Freeman, B.A. (1984).  
Detection of superoxide generated by endothelial cells.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 7269-7263.
- Ross, R. (1981).  
Atherosclerosis: a problem of the biology of arterial wall cells and interactions with blood components.  
*Arteriosclerosis*, 1, 293-311.

- Ross, R. & Glomset, J.A. (1976).  
The pathogenesis of atherosclerosis.  
N. Engl. J. Med., 295, 369-377 & 420-425.
- Ryan, U. (1989).  
Endothelium as a transducing surface.  
J. Mol. Cell Cardiol., 21 (Suppl. 1), 85-90.
- Ryan, U.S. & Vann, J.M. (1988).  
Endothelial cells: a source and target of oxidant damage.  
in Oxygen radicals in biology and medicine, Basic life sciences, vol. 49 (Simic, M.G., Taylor, K.A., Ward, J.F. & von Sonntag, C., eds), pp. 963-968.
- Sacks, T., Moldow, C.F., Craddock, P.R., Bowers, T.K. & Jacob, H.S. (1978).  
Oxygen radicals mediate endothelial damage by complement-stimulated granulocytes: an in vitro model of immune vascular damage.  
J. Clin. Invest., 61, 1161-1167.
- Savion, N. & Naveh-Floman, N. (1985).  
Correlation between trypsin binding to a specific receptor and prostacyclin production in cultured vascular endothelial cells.  
J. Cell Physiol., 122, 142-148.
- Slater, T.F. (1984).  
Free radicals mechanisms in tissue injury.  
Biochem. J., 222, 1-15.
- Starke, P.E., Hark, J.B. & Farber, J. (1986).  
Calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of irreversible cell injury in cultured hepatocytes.  
J. Biol. Chem., 261, 3006-3012.
- Stein, O., Leitersdorf, E. & Stein, Y. (1985).  
Verapamil enhances receptor-mediated endocytosis of low density lipoproteins by aortic cells in culture.  
Arteriosclerosis, 5, 35-44.
- Steinberg, D. (1987).  
Lipoproteins and the pathogenesis of atherosclerosis.  
Circulation, 76, 508-514.
- Steinberg, S., Bilezikian, J.P. & Al-Awqati, Q. (1987).  
Fura-2 fluorescence is localized to mitochondria in endothelial cells.  
Am. J. Physiol., 253, C744-C747.
- Stolz, B. & Bereiter-Hahn, J. (1988).  
Increase of cytosolic calcium results in formation of F-actin aggregates in endothelial cells.  
Cell Biol. Intern. Rep., 12, 321-329.

- Striker, G.E., Harlan, J.M. & Schwartz, S.M. (1980).  
Human endothelial cells in vitro.  
Methods Cell Biol., 21A, 135-151.
- Thibaut-Vercruyssen, R., Poumay, Y. & Ronveaux-Dupal, M.-F. (1988).  
Ultrastructural study of the effects of incubation in an oxygen free radicals  
producing medium on the general morphology and on the endocytosis of low  
density lipoproteins by human endothelial cells in culture.  
in Biology of the arterial wall, p. 317, CIC Edizioni Internazionali, Roma.
- Thorgeirsson, G. (1983).  
Structure and morphological features of vascular endothelium.  
in Biochemical Interactions at the Endothelium (Cryer, A., ed), pp 5-39,  
Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Tsien, R.Y. & Poenie, M. (1986).  
Fluorescence ratio imaging : a new window into intracellular ionic signalling.  
Trends Biochem. Sci., 11, 450-455.
- Tsien, R.Y., Pozzan, T. & Rink, T.J. (1982).  
Calcium homeostasis in intact lymphocytes : cytoplasmic free calcium  
monitored with a new intracellularly trapped fluorescent indicator.  
J. Cell Biol., 94, 325-334.
- Tsien, R.Y., Pozzan, T. & Rink, T.J. (1984).  
Measuring and manipulating cytosolic  $Ca^{++}$  with trapped indicators.  
Trends Biochem. Sci., 9, 263-266.
- Wang-Iverson, P. (1984).  
Binding of lipoprotein lipase to cultured endothelial cells.  
in Biology of endothelial cells (Jaffe, E.A., ed.), pp. 350-355, Martinus Nijhoff  
Publishers, Boston, MA.
- Weiss, S.J., Young, J., Lobuglio, A.F., Slivka, A. & Nimeh, N.F. (1981).  
Role of hydrogen peroxide in neutrophil-mediated destruction of cultured  
endothelial cells.  
J. Clin. Invest., 68, 714-721.
- Westwick, J. & Poll, C. (1986).  
Mechanism of calcium homeostasis in the polymorphonuclear leukocyte.  
Agents and Actions, 19, 80-86.
- Wickham, N.W.R., Vercellotti, G.M., Moldow, C.F., Visser, M.R. & Jacob, H.S.  
(1988).  
Measurement of intracellular calcium concentration in intact monolayers of  
human endothelial cells.  
J. Lab. Clin. Med., 112, 157-167.

Wilhelmsen, L. (1983).

Hypertension.

in Secondary prevention of coronary heart disease (International Society and Federation of Cardiology) pp. 39-41, Titisee.

World Health Organization Study Group. (1958).

Classification of atherosclerotic lesions.

W.H.O. Technical Report series, N°143, W.H.O., Genève.