

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Caractérisation phénotypique des cellules musculaires lisses et modulation par les cellules endothéliales de la synthèse de collagène

Berna, Nancy

*Award date:*  
1993

*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.

UNITE DE BIOCHIMIE CELLULAIRE

Année académique 1993-1994

Promoteur : J.REMACLE

CARACTERISATION PHENOTYPIQUE  
DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES ET  
MODULATION PAR LES CELLULES ENDOTHELIALES  
DE LA SYNTHESE DU COLLAGENE

NANCY  
BERNA

## Caractérisation phénotypique des cellules musculaires lisses et modulation phénotypique par les cellules endothéliales de la synthèse de collagène.

BERNA Nancy

### Résumé

Lors de pathologies veineuses telles que les varices, la paroi vasculaire subit un réarrangement global : les cellules musculaires lisses (CML) passent d'un état contractile (CMLc) à un état synthétique (CMLs) leur permettant de proliférer. Ceci constitue l'altération la plus importante observée dans ces pathologies. Cependant, le mécanisme responsable de cette modulation phénotypique reste encore inconnu.

Afin d'étudier ce mécanisme, nous avons caractérisé *in vitro* morphologiquement et biochimiquement des CMLc et des CMLs. Nous avons ainsi montré que les CMLc possédaient un cytosquelette bien développé et répondent fortement à la vasopressine au contraire des CMLs qui ont, par contre, un réticulum endoplasmique abondant.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons étudié en détail la synthèse de collagène par ces cellules. Nous avons mis en évidence une synthèse de collagène plus importante chez les CMLs par rapport aux CMLc. D'autre part, le milieu conditionné par des cellules endothéliales hypoxiques ainsi que la  $PGF_{2\alpha}$  induisent une augmentation de la synthèse de collagène par les CMLc. Comme ce milieu conditionné contient des prostaglandines en grande quantité, ces résultats indiqueraient que la  $PGF_{2\alpha}$  serait capable d'induire un changement du phénotype des CMLc.

Il est évident que ce travail possède des implications physiologiques très importantes puisqu'il a montré que l'ischémie pouvait, via une activation des cellules endothéliales induire la modulation phénotypique des CML.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques (Zoologiques)

Décembre 1993

Promoteur : Professeur J. Remacle

A l'issue de ces deux dernières semaines de course folle, je tiens à remercier les nombreuses (et le mal est faible) personnes qui m'ont aidée à mener à bien ce travail.

Je commencerai tout d'abord par le Professeur Remade, en le remerciant de m'avoir accueillie dans son équipe durant ces quelques mois. Son expérience et son savoir furent à plusieurs reprises très précieux.

Je remercie ensuite Carine, pour m'avoir montré la voie à suivre au cours de ce travail et m'avoir permis d'approfondir de nombreuses techniques, mais surtout pour son aide et sa grande disponibilité de ces derniers jours.

Un grand merci aussi à Thierry, qui fut toujours là quand il le fallait. Son savoir et sa complicité ont énormément compté.

Merci à Andrée qui m'a initiée aux cultures cellulaires ainsi qu'à François et à Edouard, le spécialiste des gels d'électrophorèse.  
Merci à Khalid pour "les boîtes de secours".

Les mots ne seront jamais assez forts pour exprimer ma gratitude aux "ex-mémorants" qui se sont plongés dans le stress des derniers jours : Marie-Christine, Barbara, Patsy, Frédéric, mais surtout Nunu pour son immense gentillesse. Thank you à Isabelle. Toutes ces personnes ont effectué un travail prodigieux.

Je n'oublierai pas Maguy pour le travail de nuit lors des premiers essais de nos premiers B&B.

Enfin, un énorme merci à tout le reste de l'équipe pour la super ambiance qui régnait au labo. Cette ambiance a beaucoup compté à mes yeux et me manquera certainement.

Je pense également à remercier le personnel du laboratoire d'immunologie et de physiologie humaine pour tous les conseils et les explications qui ils m'ont donnés.

Et pour terminer, je tiens à remercier toute ma famille pour le soutien et la confiance qui elle a eue à mon égard.

Enfin, un tendre merci à Christophe pour la patience et la gentillesse qui il a toujours eus envers moi, même dans les moments les plus difficiles. Sans toi, je n'y serais jamais arrivée.

A tous, un énorme merci!

Nancy

## ABBREVIATIONS

- ADN : Acide déoxyribonucléique.  
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique.  
ARN : Acide ribonucléique.  
APS : Persulfate d'ammonium.  
ATP : Adénosine triphosphate.  
 $\beta$ -APN :  $\beta$ - aminopropionitrile  
Ca<sup>++</sup> : Calcium  
CE : Cellules endothéliales.  
CML : Cellules musculaires lisses.  
DAG : Diacylglycérol.  
DEPC : Diéthylpirocarbonate.  
DMSO : Diméthylsulfoxyde.  
DO : Densité optique.  
dpm : Désintégration par minute.  
DTT : Dithiothréitol.  
FACITs : Fibril-associated collagens with interrupted triple helix.  
Gly : Glycine  
HBSS : Hank's balanced salt solution.  
IgG : Immunoglobuline.  
IP<sub>3</sub> : Inositol triphosphate.  
Kd : Constante de dissociation.  
kV : Kilovolts.  
MEC : Matrice extracellulaire.  
NEM : N-éthylmaléimide.  
PAF : Platelet activating factor.  
PBS : Phosphate buffer saline.  
PCR : Polymerase chain reaction.  
PDGF : Platelet-derived growth factor.  
PFA : Paraformaldéhyde.  
PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  : Prostaglandine F<sub>2 $\alpha$</sub> .  
PGE<sub>2</sub> : Prostaglandine E<sub>2</sub>.  
PM : Poids moléculaire.  
PMN : Polymorphonucléaire neutrophile.  
PMSF : Phénylméthane sulfonyl fluoride.

PO<sub>2</sub> : Pression partielle en oxygène.

RER : Réticulum endoplasmique rugueux.

rpm : Révolution par minute.

SAB : Sérum albumine bovine.

SDS : Dodécyl sulfate de sodium.

TGFβ : Transforming growth factor β.

<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>I. Description des veines</b>	<b>2</b>
A. Morphologie et structure de la paroi veineuse	<b>3</b>
B. Morphologie et structure de la cellule endothéliale	<b>5</b>
C. Morphologie et structure de la cellule musculaire lisse	<b>8</b>
C1. Caractéristiques cytologiques de la cellule musculaire lisse <i>in vivo</i>	<b>8</b>
C2. Synthèse de la matrice extracellulaire par les cellule musculaires lisses	<b>10</b>
C3. La lignée cellulaire A7r5	<b>11</b>
C4. La modulation phénotypique	<b>12</b>
<b>II. Description des veines variqueuses</b>	<b>14</b>
A. L'hypoxie	<b>14</b>
A1. Altérations d'ordre énergétique	<b>15</b>
A2. Altérations d'ordre synthétique	<b>17</b>
B. Hypothèse expliquant le développement des varices	<b>18</b>
<b>III. Le collagène</b>	<b>22</b>
A. Structure moléculaire des collagènes	<b>22</b>
B. Biosynthèse	<b>24</b>
C. Assemblage des différents types de collagènes	<b>26</b>
C1. Collagènes fibrillaires	<b>26</b>
C2. Collagènes non-fibrillaires	<b>27</b>
D. Organisation génique des collagènes fibrillaires	<b>28</b>
<b>BUT DU MEMOIRE</b>	<b>31</b>



## **MATERIELS ET METHODES** **32**

### **I. Techniques de biologie cellulaire** **32**

#### **A. Mise en culture des cellules endothéliales** **32**

**A1. Matériel et solutions** **32**

**A2. Mise en culture** **33**

**A3. Repiquage et sous-culture** **34**

**A4. Récolte des surnageants** **34**

#### **B. Culture des cellules musculaires lisses** **35**

**B1. Matériel et solutions** **35**

**B2. Décongélation et mise en culture** **35**

**B3. Repiquage** **36**

#### **C. Immunofluorescence** **37**

**C1. Principe** **38**

**C2. Matériel et solutions** **38**

**C3. Méthode** **38**

#### **D. Microscopie électronique à transmission et à balayage** **39**

**D1. Principe** **40**

**D2. Solutions** **40**

**D3. Méthode** **40**

#### **E. Dosage de la concentration en calcium intracellulaire** **41**

**E1. Principe** **41**

**E2. Solutions** **42**

**E3. Méthode** **42**

**E4. Calcul de la concentration en  $Ca^{++}$**  **43**

*E4.1. Facteurs correctifs* **43**

*E4.2. Calcul de la concentration en calcium [ $Ca^{++}$ ]  
par la méthode des rapports* **44**

<b>F. Dosage de protéines</b>	<b>45</b>
<b>F1. Principe</b>	<b>45</b>
<b>F2. Solutions</b>	<b>45</b>
<b>F3. Méthode</b>	<b>45</b>
<b>G. Marquage et purification des collagènes</b>	<b>47</b>
<b>G1. Principe</b>	<b>47</b>
<b>G2. Solutions</b>	<b>47</b>
<b>G3. Méthode</b>	<b>48</b>
<b>H. Analyse des collagènes par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE) et fluorogramme</b>	<b>49</b>
<b>H1. Principe</b>	<b>49</b>
<b>H2. Solutions</b>	<b>49</b>
<b>H3. Préparation du gel</b>	<b>50</b>
<b>H4. Préparation des échantillons et migration</b>	<b>51</b>
<b>H5. Fluorogramme</b>	<b>51</b>
 <b>II. Techniques de biologie moléculaire</b>	 <b>52</b>
<b>A. Transformation bactérienne</b>	<b>52</b>
<b>A1. Principe</b>	<b>52</b>
<b>A2. Solutions</b>	<b>52</b>
<b>A3. Préparation des cellules compétentes</b>	<b>53</b>
<b>A4. Transformation bactérienne proprement-dite</b>	<b>54</b>
<b>B. Extraction d'ADN sur colonne Qiagen (Midiprep)</b>	<b>54</b>
<b>B1. Principe</b>	<b>54</b>
<b>B2. Solutions</b>	<b>55</b>
<b>B3. Méthode</b>	<b>55</b>
<b>C. Restriction de l'ADN</b>	<b>56</b>
<b>C1. Principe</b>	<b>56</b>
<b>C2. Solutions</b>	<b>57</b>
<b>C3. Méthode</b>	<b>57</b>

<b>D. Analyse de l'ADN sur gel d'agarose</b>	<b>58</b>
<b>D1. Principe</b>	<b>58</b>
<b>D2. Solutions</b>	<b>59</b>
<b>D3. Méthode</b>	<b>59</b>
<i>D3.1. Préparation du gel</i>	<b>59</b>
<i>D3.2. Préparation des échantillons et migration</i>	<b>60</b>
<b>E. Extraction de l'ADN à partir d'un gel d'agarose</b>	<b>60</b>
<b>E1. Principe du kit Geneclean II (Bio 101 Inc)</b>	<b>60</b>
<b>E2. Solutions</b>	<b>60</b>
<b>E3. Méthode</b>	<b>61</b>
<b>F. Marquage de sonde d'ADN par PCR</b>	<b>61</b>
<b>F1. Principe</b>	<b>61</b>
<b>F2. Composants d'une PCR</b>	<b>62</b>
<i>F2.1. Les amorces</i>	<b>62</b>
<i>F2.2. L'ADN-cible</i>	<b>62</b>
<i>F2.3. L'ADN polymérase</i>	<b>62</b>
<i>F2.4. Le tampon de PCR</i>	<b>63</b>
<i>F2.5. Les désoxyribonucléosides (dNTPs)</i>	<b>63</b>
<b>F3. Mise en oeuvre</b>	<b>63</b>
<i>F3.1. Conditions de cycle</i>	<b>63</b>
<i>F3.2. Nombre de cycles</i>	<b>64</b>
<b>F4. Solutions</b>	<b>64</b>
<b>F5. Méthode</b>	<b>64</b>
<b>G. Marquage de sonde par random priming</b>	<b>65</b>
<b>G1. Principe</b>	<b>65</b>
<b>G2. Solutions</b>	<b>66</b>
<b>G3. Méthode</b>	<b>66</b>
<b>H. Purification d'ADN sur spin-colonne</b>	<b>67</b>
<b>H1. Principe</b>	<b>67</b>
<b>H2. Solutions</b>	<b>67</b>
<b>H3. Méthode</b>	<b>68</b>

<b>J. Northern blot</b>	<b>69</b>
<b>J1. Principe général</b>	<b>69</b>
<b>J2. Gel d'électrophorèse</b>	<b>69</b>
<i>J2.1. Principe</i>	<i>69</i>
<i>J2.2. Solutions</i>	<i>69</i>
<i>J2.3. Méthode</i>	<i>69</i>
<b>J3. Transfert d'ARN sur membrane de nylon</b>	<b>70</b>
<i>J3.1. Principe</i>	<i>70</i>
<i>J3.2. Solutions</i>	<i>71</i>
<i>J3.3. Méthode</i>	<i>71</i>
<b>J4. Hybridation sur membrane</b>	<b>71</b>
<i>J4.1. Principe</i>	<i>71</i>
<i>J4.2. Solutions</i>	<i>71</i>
<i>J4.3. Méthode</i>	<i>72</i>

## **RESULTATS** **73**

### **I. Caracterisation des deux phénotypes des cellules musculaires lisses** **73**

#### **A. Morphologie des CML dans l'état contractile et dans l'état syntétique** **73**

**A1. Microscopie optique** **74**

**A2. Microscopie électronique à balayage** **74**

**A3. Microscopie électronique à transmission** **75**

**A4. Immunofluorescence** **76**

### **II. Reponse à une stimulation à la vasopressine des CML à l'état contractile et à l'état synthétique** **77**

**A. Concentration cytosolique basal** **78**

**B. Concentration cytosolique après stimulation  
par la vasopressine** **79**

### **III. Synthèse de collagène par les CML et modulation par les milieux conditionnés par les CE** **80**

**A. Vérification de la "non-toxicité" du  $\beta$ APN  
et de l'acide ascorbique** **81**

**B. Synthèse de collagène des deux phénotypes** **82**

**C. Effet des prostaglandines en présence de sérum** **83**

**D. Effet des milieux conditionnés  
par les CE en présence de sérum** **86**

**E. Effet des milieux conditionnés et des prostaglandines  
sur la synthèse de collagène des CML incubées sans sérum** **87**

**IV. Synthèse d'ARNm des collagènes par les CMLc  
et les CMLs et modulation  
par les milieux conditionnés par les CE 88**

**A. Préparation des différentes sondes de collagènes 89**

**B. L'extraction d'ARN à partir de cultures cellulaires 91**

**DISCUSSION ET CONCLUSION 94**

**BIBLIOGRAPHIE 99**

# INTRODUCTION

De nombreuses pathologies veineuses constituent une cause importante de mortalité et de morbidité dans nos pays industrialisés. L'ischémie résultant d'une occlusion, d'un traumatisme ou d'un simple rétrécissement de la lumière d'un vaisseau et les processus qui en découlent interfèrent avec les fonctions des différents types cellulaires au niveau des vaisseaux sanguins. La paroi vasculaire n'est pas simplement une barrière mécanique mais joue aussi son propre rôle. Deux types cellulaires y sont importants. Tout d'abord, les cellules endothéliales qui forment une monocouche, l'endothélium, à l'interface sang-tissu. Elles sont en contact direct avec les éléments du sang et constituent une barrière à perméabilité sélective indispensable à l'intégrité des tissus. Les cellules musculaires lisses constituent quant à elles le principal constituant cellulaire de la média située sous l'endothélium. Si un phénomène comme l'ischémie se déroule dans une veine, un arrêt ou une diminution de la circulation sanguine provoque le déclenchement de modifications structurelles et fonctionnelles indésirables au niveau de la paroi vasculaire et du tissu affecté. On comprend mieux pourquoi une étude plus approfondie de ces modifications cellulaires et moléculaires, grâce à un modèle *in vitro*, devient nécessaire pour une meilleure compréhension des maladies veineuses telles que les varices.

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

- Dans un premier temps, on se familiarisera avec les vaisseaux sanguins en tant qu'unités structurelles et fonctionnelles. Nous nous focaliserons sur une analyse approfondie des cellules musculaires lisses, principaux constituants de la média.

- Après cette étude du fonctionnement normal de la paroi vasculaire, nous caractériserons les pathologies veineuses, en particulier les varices. Un modèle *in vitro* sera aussi développé en mettant en évidence les modifications cellulaires observées suite à une hypoxie.

- Enfin, nous développerons les caractéristiques biochimiques des collagènes, synthétisés en abondance par les cellules musculaires lisses et constituant le sujet principal de notre travail.

## I. DESCRIPTION DES VEINES

Le système vasculaire comporte différents éléments (Junqueira *et al*, 1989) :

- le coeur dont la fonction est de pomper le sang
- une série de vaisseaux efférents, les artères, qui conduisent le sang contenant les éléments nutritifs et l'oxygène aux tissus
- un réseau diffus de fins capillaires qui irriguent les tissus et permettent les échanges avec le sang
- les veines, qui représentent la convergence des capillaires en un système de tubules plus larges, et dont le rôle est de ramener au coeur le sang appauvri en oxygène et riche en CO<sub>2</sub> et autres métabolites (Junqueira *et al*, 1989).

Comme notre travail concerne l'étude d'une pathologie veineuse, nous nous limiterons uniquement à la description de la paroi de la veine.



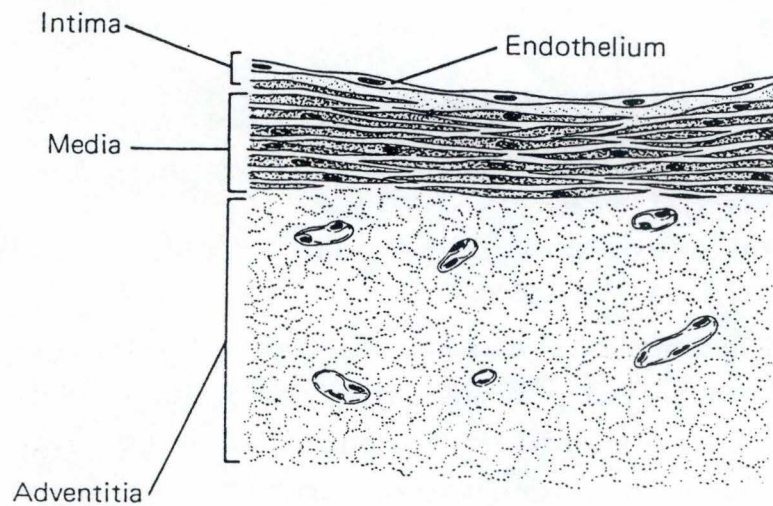


Figure I.1 : Schématisation de la paroi veineuse. Celle-ci est formée de trois tuniques : la media, l'intima et l'adventice (Junqueira *et al.*, 1989).

## A. MORPHOLOGIE ET STRUCTURE DE LA PAROI VEINEUSE

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

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

La paroi veineuse est constituée de trois tuniques (Fig. I.1). De la lumière du vaisseau vers sa périphérie, nous trouvons (Ramelet *et al*, 1990; Junqueira *et al*, 1989) :

- *la tunique interne ou intima*, composée d'une fine couche de cellules endothéliales, reposant sur une membrane basale. L'intima comprend également une couche sous-endothéliale formée de tissu conjonctif libre lâche, de glycoprotéines et parfois de cellules musculaires lisses (CML).

- *la tunique moyenne ou média*, constituée de couches concentriques de CML, à l'origine d'un abondant tissu conjonctif (surtout composé de fibres de collagène). On y distingue deux types de CML : d'une part, celles qui contiennent en abondance des protéines contractiles responsables de la vasoconstriction (cellules contractiles) et, d'autre part, quelques rares cellules dont les organites métaboliques sont prépondérants (cellules synthétiques). Nous reviendrons longuement sur ces deux phénotypes au point C4 de cette même introduction. La

disposition et l'importance de la musculature de la média varient selon le type de veine.

- la tunique externe ou adventice enserme dans un tissu conjonctif lâche des *vasa vasorum* (vaisseaux de vaisseaux), des lymphatiques et des terminaisons nerveuses sympathiques qui assurent la contraction de la musculature de la média et donc la vasoconstriction veineuse. Le tissu conjonctif lâche, composé de fibres de collagène orientées longitudinalement, permet au vaisseau de s'adapter aux variations de flux sanguin.

Les *vasa vasorum*, vaisseaux nourriciers des larges veines, fournissent les métabolites à l'adventice et à la média, trop épaisses pour être nourries par diffusion à partir de la lumière. Ces vaisseaux sont plus nombreux dans les veines que dans les artères, probablement à cause de la pauvreté en oxygène et en substances nutritives du sang veineux (Junqueira *et al*, 1989).

L'*adventice* est la couche la plus épaisse des veines et augmente au fur et à mesure que la veine s'élargit. Vu sa localisation, elle est difficile à différencier des tissus environnants avec lesquels elle fusionne progressivement (Junqueira *et al*, 1989).

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

Les valvules sont formées de deux replis endothéliaux, avec la concavité dirigée vers le cœur, dans lesquels se glisse une lame fibroélastique qui assure leur étanchéité. Elles sont propres aux veines et particulièrement nombreuses dans celles des membres inférieurs. Leur

rôle principal est de s'opposer au reflux sanguin et donc de faciliter le retour du sang vers le coeur.

Dans les veines qui se trouvent sous le niveau du coeur, l'adventice contient d'importants faisceaux de fibres musculaires lisses, disposées longitudinalement. Cette musculature sert à renforcer la paroi veineuse et à propulser le sang vers le coeur (Junqueira *et al*, 1989).

Après cette brève introduction sur la paroi veineuse, nous allons approfondir l'étude des deux principaux types cellulaires de la paroi vasculaire : les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. Nous insisterons plus particulièrement sur ces dernières ainsi que sur leur phénotype, sujet même de ce travail.

## **B. MORPHOLOGIE ET STRUCTURE DE LA CELLULE ENDOTHELIALE (CE) (Thorgeirsson, 1983).**

*In vivo*, la forme, la taille et l'arrangement des CE varient fortement suivant la localisation dans l'organisme du vaisseau étudié. Cependant, dans tout le système vasculaire, les CE habituellement allongées se disposent toujours en une seule couche dans la direction du flux sanguin.

En culture, les cellules endothéliales ont un aspect polygonal, avec un noyau oval localisé centralement et protubérant (Fig. I.2 ). Elles contiennent en grande quantité tous les organites de synthèse : appareils de Golgi, important réseau de réticulum endoplasmique lisse et rugueux, ribosomes, ainsi que nombreuses vésicules cytoplasmiques et mitochondries. En plus de ces constituants, les CE possèdent des

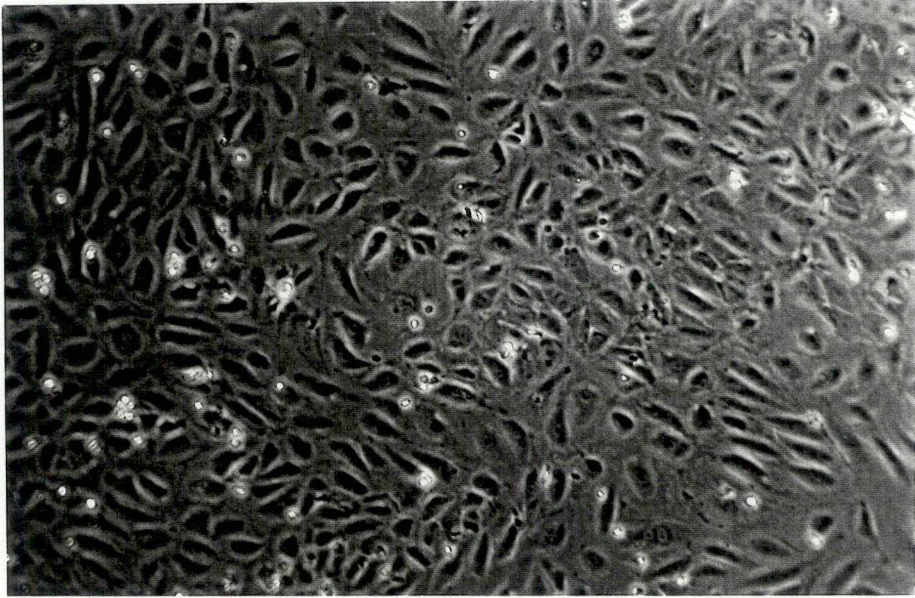


Figure I.2 : Morphologie de cellules endothéliales provenant de cordons ombilicaux humains et mises en culture dans du milieu M199 + serum. Elles sont observées en microscopie optique à contraste de phase (grossissement 115X).

faisceaux de filaments, mais surtout des inclusions qui leur sont spécifiques : les corps de Weibel-Palade qui seront décrits ci-dessous (Chamley-Campbell *et al*, 1979).

Les cellules endothéliales *in vitro* répondent au phénomène d'inhibition de contact, c'est-à-dire qu'une fois arrivées à confluence, elles cessent de se diviser et ne forment donc qu'une monocouche de cellules jointives.

Voyons, à présent, les autres caractéristiques morphologiques de ces cellules :

### 1. *Le glycocalyx :*

Comme beaucoup de cellules, l'endothélium est recouvert d'une couche de glycocalyx, riche en carbohydrates (polysaccharides). Celui-ci apporte un ensemble de charges négatives qui limite l'adhésion des plaquettes et des leucocytes chargés similairement et empêche l'activation de la cascade de la coagulation dans les vaisseaux intacts. Néanmoins, cette couche de glycocalyx serait structurellement et chimiquement différente au pôle luminal et au pôle basal de la cellule, lui conférant ainsi une certaine polarité.

### 2. *Le cytosquelette :*

En plus des organites habituels, le cytoplasme contient trois types de filaments : les microfilaments (actine), les filaments intermédiaires (vimentine) et les filaments épais (myosine). Les cellules endothéliales possèdent donc les outils nécessaires pour se contracter. Ce phénomène pourrait affecter ou réguler la perméabilité endothéliale.

### 3. Les corps de Weibel-Palade :

Ces corps sont des inclusions ovoïdes intracytoplasmiques, caractéristiques des cellules endothéliales. Cet organite est composé de petits tubules parallèles au grand axe du corps. Le tout est entouré d'une matrice dense et d'une membrane.

Ces corps seraient impliqués dans le stockage du facteur de von Willebrand (facteur VIII), responsable de l'adhésion plaquettaire.

### 4. Les vésicules transendothéliales :

Vu leur localisation, les CE ont un rôle prépondérant dans les échanges de substances du sang vers les tissus. Dès lors, de nombreuses invaginations et vésicules d'endocytose se forment au pôle luminal.

Les jonctions interendothéliales, "tight junction" et "gap junction", sont également impliquées dans le transport de molécules solubles à travers l'endothélium.

Comme nous venons de le voir, l'endothélium est loin d'être une limite cellulaire purement passive. Au contraire, il apparaît fortement organisé et contribue activement au maintien de divers aspects de l'homéostasie. Il agit à différents niveaux : comme réservoir compatible avec le sang, comme barrière à perméabilité sélective et comme tissu à activité sécrétoire. En effet, l'endothélium synthétise de nombreuses substances : les protéines de la matrice extracellulaire (MEC), des facteurs de coagulation, des facteurs de vasoconstriction et des facteurs de croissance (Gibbons *et al*, 1990).

Cet aspect, sortant du cadre de ce travail, ne sera pas étudié dans sa globalité. Néanmoins, nous nous y référerons pour la suite de cette introduction.

## C. MORPHOLOGIE ET STRUCTURE DE LA CELLULE MUSCULAIRE LISSE

Les cellules musculaires lisses sont les cellules qui forment la média des vaisseaux, se contractent en réponse à des stimuli chimiques et mécaniques et prennent part au contrôle du flux et de la pression sanguine (Yamamoto *et al*, 1992).

Ces cellules peuvent subir, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, une modulation phénotypique passant d'un état contractile vers un état synthétique. Cette modulation phénotypique s'observe essentiellement lors de pathologies vasculaires avec épaissement de la paroi. Nous décrirons plus loin les caractéristiques de ces deux phénotypes ainsi que les conditions de passage d'un état à l'autre.

### C1. Caractéristiques cytologiques de la CML *in vivo*

La principale fonction de la CML étant la contraction, le cytoplasme contient en abondance des filaments (Chamley-Campbell *et al*, 1979). Cette caractéristique permettra à l'ensemble des cellules de la média de se contracter et de propulser le sang vers le coeur. Ces filaments sont de trois types.

Les filaments les plus nombreux sont des fins filaments de 50 à 80 Å de diamètre, constitués d' $\alpha$ -actine et de tropomyosine.

Le second type de filaments est composé de filaments épais de myosine, de 120 à 180 Å de diamètre. Ils sont disposés parallèlement au



grand axe de la cellule et sont entourés de fins filaments, insérés dans des corps denses.

Il existe également des filaments intermédiaires ou filaments cytoplasmiques de 100 Å, associés aux corps denses, et qui forment le cytosquelette distinct de l'appareil contractile.

La cellule musculaire lisse possède le long de sa membrane deux types de vésicules. Les plus abondantes sont des vésicules de micropinocytose qui, contrairement à leur nom, sont impliquées uniquement dans le stockage du calcium. Par contre, l'autre type de vésicules, beaucoup plus rares et recouvertes d'une couche de clathrine, est impliqué dans l'absorption des protéines.

La distribution du calcium dans le cytoplasme est assurée par le réticulum sarcoplasmique, en continuité avec le réticulum endoplasmique. Ce réseau tubulaire fermé est localisé à la périphérie de la cellule et souvent associé aux vésicules de micropinocytose. L'énergie nécessaire à la contraction est fournie par des mitochondries, situées dans la même zone.

Les organites de synthèse tels que les ribosomes, le réticulum endoplasmique rugueux et les complexes de Golgi sont habituellement localisés au pôle nucléaire. La quantité de ces organites varie selon l'origine des cellules, mais surtout selon le phénotype exprimé (Mosse *et al*, 1985).

## C2. Synthèse de la MEC par les CML

Les CML sont capables de synthétiser les protéines de la MEC (Ross *et al*, 1971), ainsi que les protéoglycanes (Hamati *et al*, 1989) présents dans la paroi veineuse.

Les différents types de collagène produits par les CML sont les types I, III, IV, V et VI (Okada *et al*, 1990).

Dans la paroi vasculaire, les principaux types sont le I (environ 70%), le III (environ 30%) et le V (1 à 2%) (Chamley-Campbell *et al*, 1979; Sjölund *et al*, 1986). Ces rapports varient selon le phénotype des cellules, comme nous le verrons plus loin.

Les CML libèrent également des fibres élastiques constituées de deux composants structuraux distincts : l'élastine et une glycoprotéine microfibrillaire. L'élastine se dispose au centre de cette microfibrille et donne un aspect amorphe à la matrice (Chamley-Campbell *et al*, 1979). La synthèse d'élastine est plus élevée lors du phénotype synthétique (Sjölund *et al*, 1986).

Les conditions de culture peuvent modifier la composition de la matrice extracellulaire. Ainsi, en présence d'ascorbate, le collagène devient la protéine dominante de cette matrice, alors que la sécrétion d'élastine est quasi nulle (Schwartz *et al*, 1982; Sjölund *et al*, 1986; Graham *et al*, 1987).

Les protéoglycanes (polysaccharides anioniques) formés par les CML sont le dermatan-sulfate (60 à 80 %), la chondroïtine sulfate (10 à 20 %) et l'acide hyaluronique (0 à 5 %) (Chamley-Campbell *et al*, 1979). On trouve également en très faible quantité de l'héparan sulfate.

Les protéoglycanes jouent un rôle important dans la prolifération cellulaire, dans l'adhésion des cellules à la matrice et dans l'architecture globale de la matrice extracellulaire. En effet, grâce à leurs multiples chaînes latérales, ils ont la capacité de former des complexes avec d'autres molécules de la matrice. Ils sont aussi présents à la surface de cellules et pourraient agir comme des récepteurs pour le collagène et la fibronectine.

*In vitro*, l'inhibition de la synthèse de protéoglycanes réduit l'accumulation de la matrice extracellulaire, inhibe la croissance en multicouches de CML confluentes et entraîne des variations morphologiques de ces cellules. De plus, on observe une réduction du nombre de filaments cytosquelettiques contenant de l' $\alpha$ -actine (Hamati *et al*, 1989).

### **C3. La lignée cellulaire A7r5**

La souche cellulaire A7r5 représente la lignée de CML que nous avons utilisée pour nos expériences. Elle a été isolée par Kimes et Brandt (1976) à partir de l'aorte thoracique d'embryons de rats âgés de 14 à 17 jours.

Lorsqu'elles prolifèrent, ces cellules sont plutôt grosses et deviennent de plus en plus fines au fur et à mesure qu'elles atteignent la confluence. Quand la croissance est terminée, elles sont disposées parallèlement les unes aux autres. Ces cellules sont soit tétraploïdes, soit hypertétraploïdes.

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

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

Les cellules musculaires lisses A7r5 constituent donc un bon modèle expérimental pour étudier dans le cadre des pathologies vasculaires l'influence des cellules endothéliales et de l'hypoxie sur la modulation phénotypique des cellules musculaires lisses.

#### **C4. La modulation phénotypique**

Dans certaines conditions, la cellule musculaire lisse peut subir une dédifférenciation ou plutôt une modulation de son état contractile vers un état synthétique. Le terme "modulation phénotypique" sera préféré au terme "dédifférenciation", puisque le phénotype est souvent considéré comme réversible selon les conditions (Chamley-Campbell *et al*, 1979).

Cette modulation fut confirmée grâce à la microscopie électronique à transmission (Mosse *et al*, 1985; Thyberg *et al*, 1985) et par immunocytochimie (Sjölund *et al*; 1986), mais aussi par cytométrie de flux (Yamamoto *et al*; 1992).

Le changement de phénotype se fait progressivement. On observe d'abord une régression des myofilaments ( $\alpha$ -actine et myosine) et une augmentation des lysosomes, sans qu'il n'y aie de traces d'autophagie. Les filaments commencent à se désassembler périnucléairement ou dans la périphérie cellulaire, puis dans le cytoplasme.

La seconde étape se caractérise par un noyau euchromatique et une forte augmentation des organites de synthèse près du noyau : réticulum endoplasmique rugueux (RER), appareils de Golgi, ribosomes (Thyberg *et al*, 1985). Cela se traduit par une synthèse accrue de protéines, principalement celles de la matrice extracellulaire (collagène).

Lors du passage au phénotype synthétique, une diminution marquée dans le contenu en  $\alpha$ -actine et la formation de filaments intermédiaires composés de vimentine ont été également mises en évidence au laboratoire par Khalid Bajou (résultats non publiés).

Le développement des techniques de cytométrie de flux a permis de quantifier les contenus cellulaires en ADN et en ARN. Le phénotype contractile est caractérisé par une population de cellules en phase  $G_0$  du cycle cellulaire, contenant de faibles quantités d'ADN et d'ARN par rapport au phénotype synthétique, caractérisé par des cellules en phase  $G_1$  (Yamamoto *et al*; 1992). La modulation vers l'état synthétique est, de plus accompagnée d'un phénomène de prolifération en présence de sérum. En effet, la modulation phénotypique est une condition nécessaire, mais pas suffisante à elle seule, pour induire la prolifération cellulaire. Les cellules musculaires lisses synthétiques ne se diviseront qu'en présence de facteurs mitogènes, tels que le sérum ou le PDGF (platelet-derived growth factor). Cependant, ni le PDGF, ni les facteurs dérivés du plasma ne sont impliqués dans le processus de modulation. Les cellules contractiles stimulées par le PDGF seul ne se divisent pas (Thyberg *et al*, 1986; Yamamoto *et al*, 1992).

On peut donc résumer en disant que les cellules musculaires lisses dans l'état contractile possèdent des myofilaments abondants mais peu de réticulum endoplasmique et ne répondent pas aux mitogènes alors que ces cellules dans l'état synthétique possèdent un compartiment microsomal important, répriment leur expression d' $\alpha$ -actine et secrètent une matrice extracellulaire abondante.

En pratique, le phénotype synthétique est obtenu en cultivant les CML à faible densité, c'est-à-dire dans un état prolifératif. Lorsqu'elles arrivent à confluence, les cellules sont dites en "état stationnaire" et se

différencient en cellules contractiles. Dans ce cas, la modulation se fait du phénotype synthétique vers le phénotype contractile.

La modulation phénotypique des CML fut également observée *in vivo*, dans le cadre de pathologie vasculaire, entraînant une prolifération et une migration des cellules de la média vers l'intima (Mosse *et al*, 1985; Martin *et al*, 1990).

## II. DESCRIPTION DES VEINES VARIQUEUSES

De nombreux facteurs tels que la grossesse, l'obésité, les modes de vie sédentaire, constituent des facteurs défavorables au retour veineux et favorisent l'installation des varices. En effet, celles-ci sont principalement dues à un ralentissement de la circulation sanguine, entraînant une diminution de la disponibilité en oxygène dans les tissus.

Comme nous allons le voir dans ce chapitre, ce phénomène d'hypoxie est responsable de toute une série de modifications du métabolisme de l'endothélium. L'étude de ces modifications nous conduira au développement d'une hypothèse concernant le développement des varices.

### A. L'HYPOXIE

Un phénomène d'ischémie se caractérise par une diminution ou une suppression de l'apport d'oxygène et de nutriments aux tissus. Lors d'un ralentissement du flux sanguin, la réserve en oxygène du sang veineux s'épuise rapidement et des changements dans le métabolisme et la fonction de l'endothélium s'observent immédiatement. Vu leur localisation entre le sang et les tissus, les cellules endothéliales sont les

premières cibles touchées par la diminution de la pression partielle en oxygène.

Afin de mimer ce qui se passe *in vivo* lors d'une ischémie, nous avons développé un modèle expérimental *in vitro* où les cellules endothéliales isolées à partir de la veine ombilicale humaine sont exposées à une hypoxie sévère. Dans les conditions expérimentales de ce modèle, la pression partielle en oxygène atteint 40 mm Hg dans le milieu après 15 minutes (Michiels *et al*, 1992). Dans ces conditions, on n'observe pas de mort cellulaire pendant les deux premières heures d'hypoxie.

### **A1. Alterations d'ordre énergétique**

La première altération métabolique observée dans les cellules endothéliales soumises à une hypoxie est une forte diminution de la concentration en ATP (jusqu'à 43 % après deux heures d'hypoxie dans les conditions de notre modèle expérimental) (Arnould *et al*, 1992).

Dans la cellule, l'ATP est principalement produit par les mitochondries lors des phosphorylations oxydatives, utilisant une molécule d'oxygène comme accepteur final des électrons. Au cours de l'hypoxie, cette production d'énergie est fortement diminuée et quelque peu compensée par la glycolyse anaérobie. Au cours de la glycolyse, il y a production de deux molécules d'ATP, soit 18 fois moins que pour les chaînes de phosphorylations oxydatives, et d'acide lactique (Rawn, 1990). Cette réduction de la concentration en ATP se répercute sur l'activité d'une série de fonctions cellulaires. Il faut cependant noter que cette diminution dans la production d'ATP est un phénomène réversible lorsqu'on remet les cellules en conditions normales.

Durant l'hypoxie, la faible quantité d'ATP cytoplasmique entraîne une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire, provoquée par une déficience des pompes à calcium dépendantes de l'ATP ou pompes ATPasiques (Arnould *et al*, 1992).

En conditions normales, ces pompes membranaires ont pour rôle de maintenir une concentration calcique intracellulaire inférieure à celle du milieu extérieur. Pour chaque molécule d'ATP hydrolysée, deux ions calcium sont expulsés.

L'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire entraîne une modification de l'activité d'une série d'enzymes. En effet, l'ion calcium est un messenger secondaire important de la cellules et peut activer divers systèmes enzymatiques tels que la phospholipase A<sub>2</sub> et la protéine kinase C.

Michiels *et al* (1993) ont mis en évidence une activation de la phospholipase A<sub>2</sub> dans les cellules endothéliales soumises à une hypoxie. La phospholipase A<sub>2</sub> libère l'acide arachidonique des phospholipides membranaires. Cet acide arachidonique est ensuite transformé en prostaglandines. D'autre part, la phospholipase A<sub>2</sub> libère aussi du lyso-PAF qui est ensuite acétylé en PAF (platelet activating factor). Lorsque les cellules endothéliales sont mises sous hypoxie, leur synthèse de prostaglandines est augmentée et la production de PAF est induite (Arnould *et al*, 1993). Le PAF reste associé à la membrane plasmique. Présent à la surface des cellules endothéliales, il peut agir comme un signal pour induire l'adhérence intracellulaire entre les cellules endothéliales et les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN), via les intégrines de la famille CD18/CD11. Ces intégrines sont disposées à la surface des leucocytes. Ces cellules jouent un rôle important dans la transformation d'un phénomène hypoxique en réponse inflammatoire. En effet, dans des conditions normales, les PMN n'adhèrent pas à l'endothélium. On observe également que l'augmentation de l'adhérence



des PMN aux cellules endothéliales hypoxiques entraîne une activation de ces PMN. Ils produisent, en effet, des anions superoxydes et du leucotriène B<sub>4</sub> en grande quantité. Ils sont de plus cytotoxiques pour les cellules endothéliales auxquelles ils adhèrent (Arnould *et al*, soumis).

Notons également qu'une hypoxie sévère augmente la concentration en calcium cytosolique des myocytes (Salvalera *et al*, 1993). Ce flux de calcium provoque la phosphorylation des chaînes légères de myosines et donc la contraction des cellules. En cas d'ischémie plus longue, c'est-à-dire provoquant l'inhibition de la synthèse d'ATP mitochondrial et glycolytique, on observe chez les cellules endothéliales un désappariement et un raccourcissement des microfilaments, en parallèle avec une baisse d'ATP (Hinshaw *et al*, 1989).

Enfin, pour terminer, signalons que l'hypoxie augmente la perméabilité des cellules endothéliales aux solutés de petit poids moléculaire. Ce phénomène est associé à une diminution de la quantité d'AMPc (Ogawa *et al.*, 1992) et à une diminution de l'activité de l'adénylate cyclase. Cette diminution pourrait être liée à la réduction de la concentration en ATP, puisque celui-ci sert à produire l'AMPc.

## **A2. Alterations d'ordre synthétique**

Comme les cellules endothéliales sont associées dans la paroi veineuse aux cellules musculaires, leur métabolisme doit certainement influencer celui des cellules musculaires lisses, à la fois dans des conditions normales et dans des conditions pathologiques (Vijayagopal *et al.*, 1992).

En conditions normales, les milieux conditionnés par des cellules endothéliales stimulent la synthèse *de novo* de protéoglycanes par les cellules musculaires lisses. Cette stimulation est principalement due au

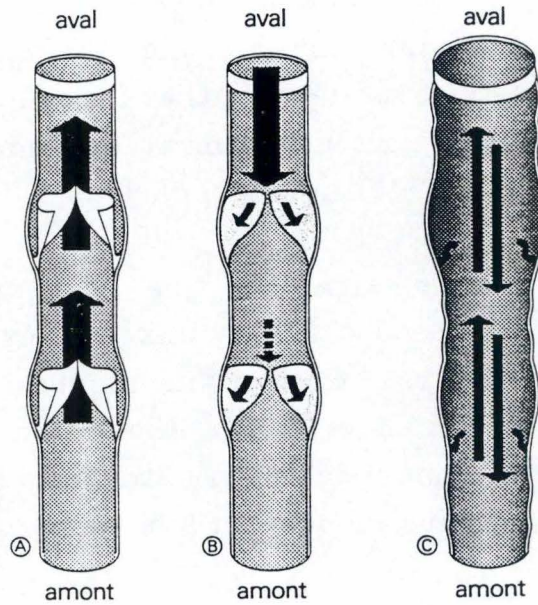


Figure I.3 : Représentation schématique des valvules et de leur fonctionnement. A : Flux veineux en direction du coeur : les valvules sont ouvertes. B : Fermeture des valvules lorsque la pression en aval devient plus importante qu'en amont (reflux). C : Syndrome variqueux : la destruction valvulaire permet un reflux veineux. La direction de la colonne sanguine est alors influencée par le seul jeu des gradients de pression.

TGF $\beta$  présent dans les milieux conditionnés, mais également au PDGF (Vijayagopal *et al*, 1992).

Sous hypoxie, la libération par les cellules endothéliales de facteurs de croissance pour les cellules musculaires lisses est plus élevée par rapport aux conditions de normoxie (Venda, 1992). Le PDGF serait le facteur responsable de cette stimulation. Par ailleurs, dans le modèle expérimental décrit ci-dessous, les cellules endothéliales libèrent également des facteurs de croissance pour les cellules musculaires lisses. Dans ce cas, la PGF $_{2\alpha}$  et le bFGF (basic fibroblast growth factor) seraient impliqués alors que le PDGF ne jouerait aucun rôle (Michiels *et al*, soumis).

## **B. HYPOTHESE EXPLIQUANT LE DEVELOPPEMENT DES VARICES**

Les varices sont caractérisées par une dilatation irrégulière et permanente d'une veine. Les veines variqueuses sont anormalement dilatées, tordues et très fragiles. De plus, une altération au niveau des valvules est souvent observée (Fig. I.3). Les différents phénomènes se déroulant lors de pathologies telles que les varices impliquent des interactions cellulaires à tous niveaux. Nous proposons l'hypothèse suivante pour expliquer l'apparition d'une situation pathologique conduisant au développement des varices : ce seraient les modifications du métabolisme des cellules de la paroi veineuse induites par l'ischémie résultant de la stase veineuse qui initieraient une cascade d'évènements conduisant finalement à cette situation pathologique.

L'adhérence des PMN aux cellules endothéliales n'est seulement que la première étape du processus de diapédèse qui conduit à

l'infiltration des PMN dans l'intima et dans la média des veines (Montefort et Holgat, 1991). Ces PMN sont aussi stimulés et peuvent donc relarguer diverses molécules actives telles que des radicaux libres, des protéases ainsi que des éicosanoïdes. Ces médiateurs en conjonction avec ceux libérés par les cellules endothéliales elles-mêmes se retrouvent dans la paroi veineuse où ils peuvent induire différents processus qui pourraient expliquer les différentes altérations tissulaires observées dans les veines variqueuses.

Au moins cinq principales caractéristiques des parois des veines variqueuses peuvent être analysées à la lumière de cette hypothèse (Niebes, 1977) :

1- Dans la paroi des veines variqueuses, la barrière endothéliale est toujours présente alors que d'autres cellules comme les CML subissent de profonds changements. Il a été expérimentalement montré qu'*in vitro*, l'hypoxie, qui mime l'ischémie résultant de la stase du sang, induit effectivement des changements métaboliques importants au sein des cellules endothéliales tout en les maintenant vivantes. Les cellules endothéliales sont activées par l'hypoxie et relarguent différents médiateurs mais elles peuvent toujours retrouver leur homéostasie par après (Arnould *et al*, 1992). Ces résultats sont compatibles avec la préservation de l'endothélium dans les veines variqueuses.

2- Une grande quantité d'enzymes lysosomales est retrouvée au sein des couches cellulaires sous-jacentes aux cellules endothéliales. Ces enzymes sont connues pour être relarguées par les PMN activés. Leur présence dans le tissu veineux peut donc être facilement expliquée puisque nous avons montré expérimentalement que les PMN adhèrent aux cellules endothéliales activées par l'hypoxie et en sont subséquemment activés. On peut également penser que leur infiltration dans le tissu sous-jacent est aussi une conséquence de cette adhérence, ce

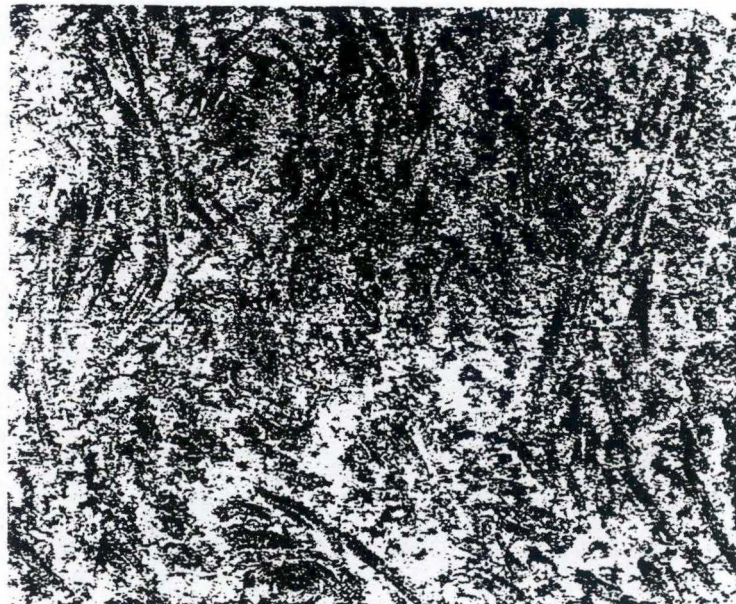
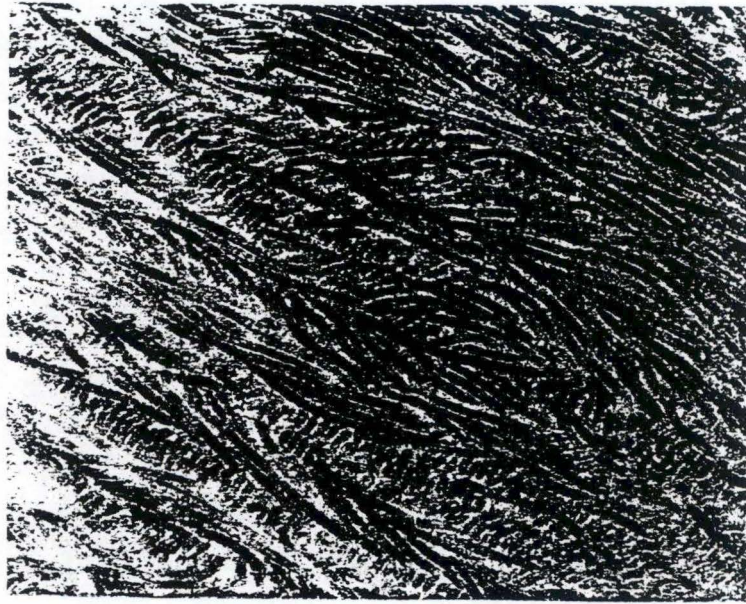
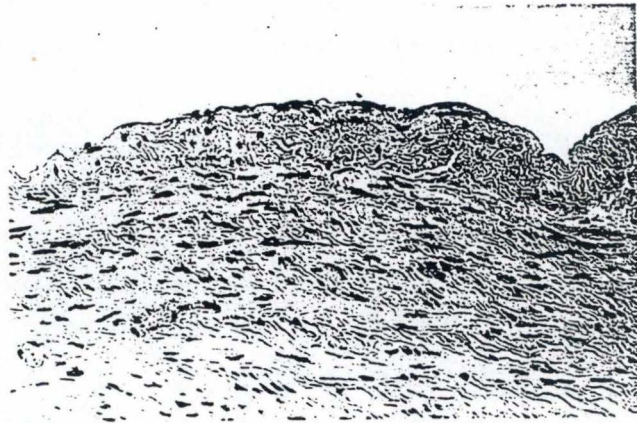


Figure I.4 : Ultrastructure de la paroi veineuse (grossissement 17500X). A : Veine normale, faisceaux conjonctifs intacts et réguliers. B : Veine variqueuse, faisceaux conjonctifs fragmentés (Ramelet *et al*, 1990).

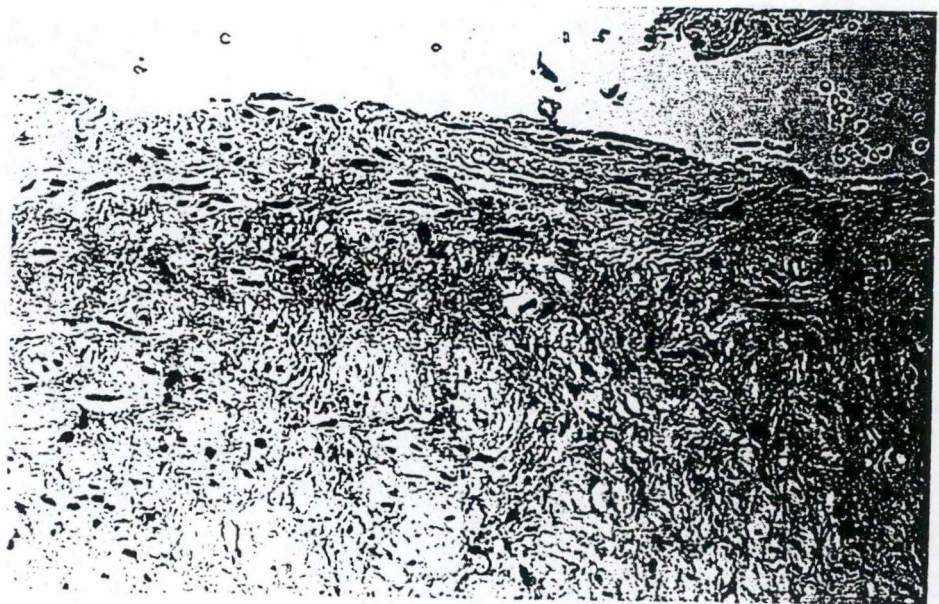
qui a d'ailleurs été montré dans d'autres modèles expérimentaux. Une fois dans la média, ils y relargueraient par dégranulation leurs protéases. Thierry Arnould a démontré au laboratoire en utilisant un cordon entier et perfusé sous hypoxie, que les PMN pénétraient effectivement dans le tissu sous-endothélial (résultats non publiés).

3- Le collagène et les protéoglycans sont altérés dans la paroi des veines variqueuses : on y retrouve, en effet, une proportion augmentée de collagène soluble (Fig. I.4). Les radicaux libres sont connus pour être capables de fragmenter ces deux types de constituants de la matrice extracellulaire (Borel *et al*, 1988) et ils ont été mis en évidence dans la paroi des veines variqueuses en plus des protéases. Ces deux types de molécules sont relargués par les PMN activés, agissent en synergie et pourraient donc être responsables de l'hydrolyse partielle du collagène observée dans ces veines pathologiques.

4- Un épaissement de la paroi veineuse est aussi typique des veines variqueuses. Cela est facilement explicable par la prolifération des CML effectivement observée *in vivo*; celles-ci constituent alors le type cellulaire majeur de l'intima. Il a été démontré au laboratoire que cette prolifération pouvait être induite par diverses molécules relarguées par les cellules endothéliales activées par l'hypoxie. De plus, dans les veines pathologiques les CML passent d'un état contractile, caractérisé par une abondance de filaments du cytosquelette et une faible proportion de réticulum endoplasmique, à un état synthétique. Dans celui-ci, les CML possèdent un compartiment microsomal important, secrètent plus de matrice extracellulaire et notamment de collagène, sont prolifératives et perdent l'expression de myosine de l' $\alpha$ -actine (Ross, 1981; Yamamoto *et al*, 1992). Cette modulation phénotypique pourrait également être le résultat de l'action de médiateurs relargués par les cellules endothéliales activées par l'hypoxie. La prolifération des CML (Michiels *et al*, soumis)



A



B

Figure I.5 : Micrographie d'une coupe histologique d'une veine normale (A) ou variqueuse (B) colorée au bleu de toluidine (grossissement 200X) (Niebes, 1987).



A

B



Figure I.6 : Micrographie électronique d'une veine normale (A) et d'une veine variqueuse (B) (Grossissement 6000X) (Niebes, 1987).



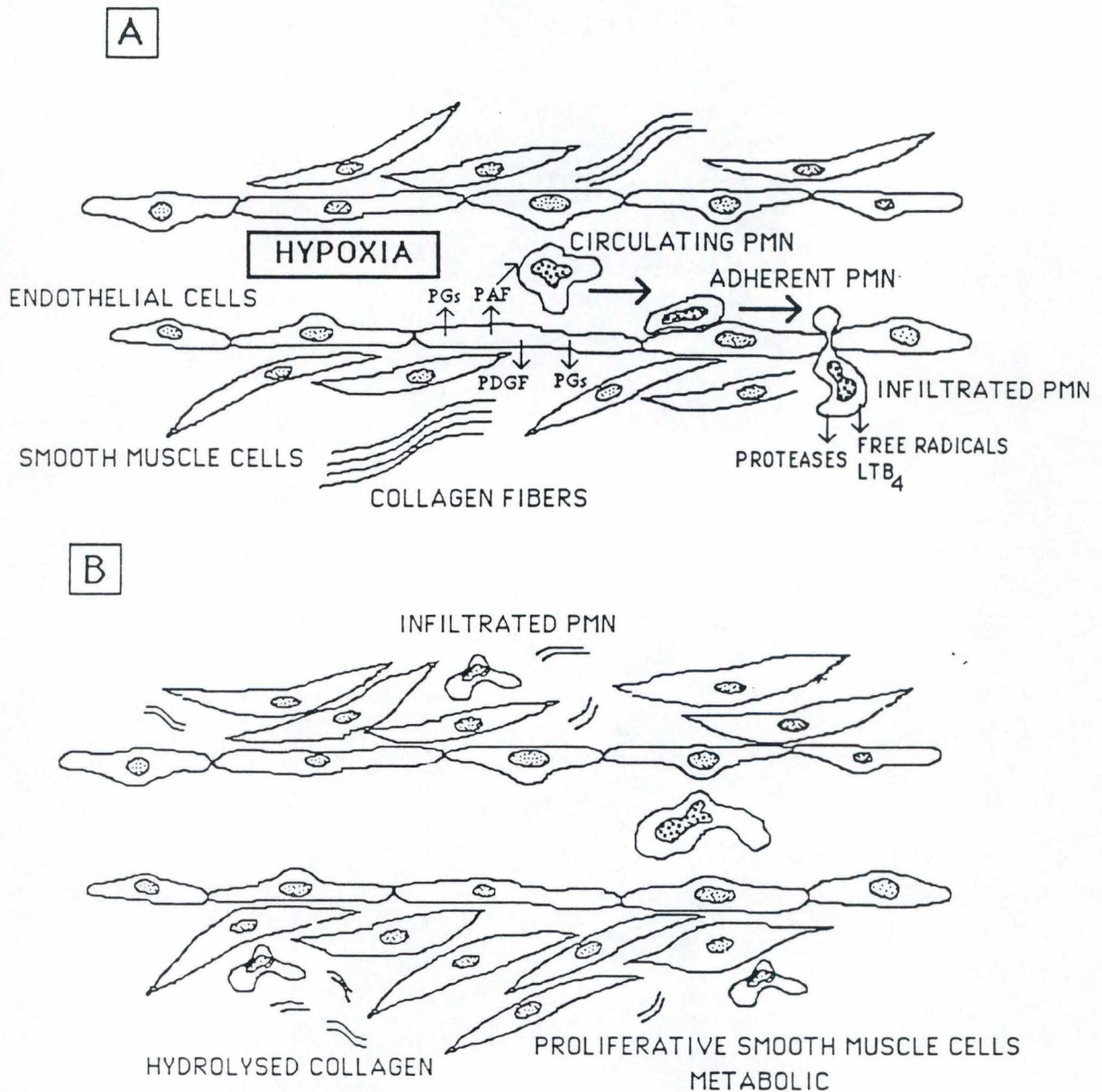


Figure I.7 : Présentation schématique des modifications apparaissant dans les cellules endothéliales mises sous hypoxie et influence de celles-ci sur les PMN et les cellules musculaires lisses. Ceci peut expliquer les altérations des parois des vaisseaux sanguins observés dans les veines variqueuses. PMN = polymorphonucléaire neutrophile, CML = cellule musculaire lisse, PAF = platelet activating factor, PGs = prostaglandines, PDGF = platelet derived growth factor, LTB<sub>4</sub> = leukotriène B<sub>4</sub>. A. Effet de l'hypoxie sur le métabolisme des cellules endothéliales et interactions avec les PMN dans un capillaire. Le même capillaire après l'infiltration des PMN, prolifération des cellules musculaires lisses et hydrolyse du collagène (Michiels *et al.*, 1993).

ainsi que leur capacité accrue de synthèse des composés de la matrice extracellulaire (Okada *et al*, 1990) peuvent donc facilement rendre compte de l'épaississement de la paroi veineuse pathologique.

5- Finalement, la prolifération des CML, les changements qualitatifs et quantitatifs de leur synthèse des protéines de la matrice extracellulaire ainsi que l'hydrolyse partielle de ces protéines par les molécules relarguées par les PMN infiltrés expliquent la désorganisation totale de la paroi vasculaire observée dans les veines variqueuses (Fig. I.5 et I.6). Cette désorganisation, en plus de la perte de la contractibilité des CML, conduit à des altérations du tonus vasculaire.

Nous n'avons cependant pas tenu compte dans ce processus de l'effet direct de l'hypoxie sur les PMN eux-mêmes. Certains résultats préliminaires suggèrent que l'hypoxie pourrait activer directement les PMN. Par contre, les CML semblent très résistantes aux effets de l'hypoxie (De Leener, 1992). De plus, d'autres cellules sanguines, telles que les plaquettes, les monocytes ou les lymphocytes, connues pour pouvoir aussi répondre au PAF et aux autres médiateurs relargués par les CE activées par l'hypoxie peuvent aussi être impliquées dans ce processus et amplifier les altérations tissulaires.

Cette cascade d'interactions représentée à la figure I.7 peut bien sûr être arrêtée et les altérations réparées mais si elle se répète, elle pourrait conduire à des changements irréversibles dans la paroi vasculaire.

Type	Subunit(s)	Gene	Chromosome	Distribution
I	$\alpha 1(I)$	COL1A1	17	Ubiquitous
	$\alpha 2(I)$	COL1A2	7	
II	$\alpha 1(II)$	COL2A1	12	Cartilage, vitreous humor
III	$\alpha 1(III)$	COL3A1	2	Like type I
IV	$\alpha 1(IV)$	COL4A1	13	Basement membranes
	$\alpha 2(IV)$	COL4A2	13	
V	$\alpha 1(V)$	COL5A1	?	Interstitial tissues
	$\alpha 2(V)$	COL5A2	2	
	$\alpha 3(V)$	COL5A3	?	
VI	$\alpha 1(VI)$	COL6A1	21	Soft tissues
	$\alpha 2(VI)$	COL6A2	21	
	$\alpha 3(VI)$	COL6A3	2	
VII	$\alpha(VII)$	COL7A1	?	Subbasal laminae
VIII	$\alpha 1(VIII)^a$	COL8A1	?	Endothelial cells
IX	$\alpha 1(IX)$	COL9A1	6	Like type II
	$\alpha 2(IX)$	COL9A2	?	
	$\alpha 3(IX)$	COL9A3	?	
X	$\alpha 1(X)$	COL10A1	?	Hypertrophic cartilage
XI	$\alpha 1(XI)$	COL11A1	1	Like type II
	$\alpha 2(XI)$	COL11A2	6	
	$\alpha 3(XI)^b$	COL2A1	12	
XII	$\alpha 1(XII)^a$	COL12A1	?	Like type I
XIII	$\alpha 1(XIII)^a$	COL13A1	10	Ubiquitous

<sup>a</sup> Unknown whether there are additional subunits.

<sup>b</sup> A posttranslational variation of  $\alpha 1(II)$ .

Tableau I.1 : Tableau reprenant les différents types de collagènes connus dans les différents tissus de l'organisme.

### III. LE COLLAGÈNE

Les collagènes (du grec *kolla*, colle) forment une classe de protéines importantes par leur abondance (elles constituent jusqu'à environ 30 % des protéines des vertébrés) et par leur rôle prépondérant dans les matrices conjonctives. Van der Rest et Garrone (1991) les définissent comme des protéines structurales de la matrice extracellulaire qui contiennent un ou plusieurs domaines ayant une conformation en triple hélice. Cette définition exclut donc plusieurs protéines possédant des domaines en triple hélice, mais qui ne participent pas à l'assemblage de la matrice extracellulaire.

A ce jour, 14 types différents de collagène sont recensés et distribués de manière spécifique dans tous les tissus de l'organisme (Tableau I.1).

#### A. STRUCTURE MOLECULAIRE DES COLLAGENES

Malgré leur grande diversité, tous les collagènes présentent une structure de base identique. Les trois chaînes polypeptidiques ou chaînes  $\alpha$ , qui constituent les molécules de collagène, sont caractérisées par la répétition du triplet Glycine-X-Y. Environ 30 % des positions X et Y sont occupées respectivement par la proline et l'hydroxyproline (Van der Rest *et al*, 1991). Bien qu'une grande proportion des résidus du collagène soit composée de glycine (30 %), de proline (10 %) et d'hydroxyproline (10 %), chacun des autres acides aminés (a.a.) apporte une diversité structurale et donc des propriétés différentes aux divers types de collagène (Rawn, 1990). L'hydroxyproline, ainsi que l'hydrolysine, sont deux acides aminés

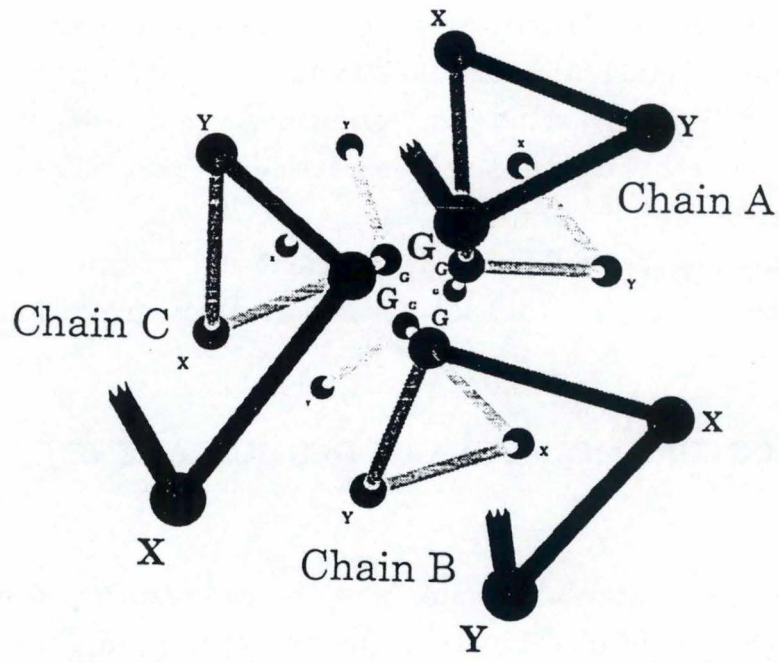


Figure I.8 : Représentation schématique de la triple hélice de collagène (Van der Rest *et al.*, 1991).

secondaires spécifiques des collagènes et ne sont pas incorporés tels quels, comme nous le verrons plus loin.

Chaque polypeptide forme une hélice gauche et s'assemblent avec les deux autres chaînes dans une superhélice droite. Un tour d'hélice gauche comprend trois résidus d'acides aminés, dont la glycine, le plus petit de tous les acides aminés. Sa chaîne latérale, formée d'un seul atome d'hydrogène, est la seule à pouvoir s'ajuster stériquement au centre d'une superhélice de ce type, tandis que les résidus de proline et d'hydroxyproline impriment un tournant à la chaîne et stabilisent l'interaction entre les trois chaînes (Fig. I.8). Les volumineux cycles pentacarbonés de ces deux résidus sont tournés vers l'extérieur et se repoussent l'un l'autre par encombrement stérique, favorisant ainsi l'étirement de la chaîne polypeptidique.

Les trois chaînes polypeptidiques sont étroitement associées par des liaisons hydrogène entre les -NH des liaisons peptidiques principalement au niveau de la glycine et les groupes carbonyles peptidiques C=O (en particulier de la proline) d'une des deux chaînes adjacentes (Darnell *et al*, 1993).

Comme les acides aminés en position X et Y ont leurs chaînes latérales pointant vers l'extérieur de la triple hélice, celle-ci possède à sa surface de nombreux groupements latéraux prêts à interagir avec d'autres triples hélices.

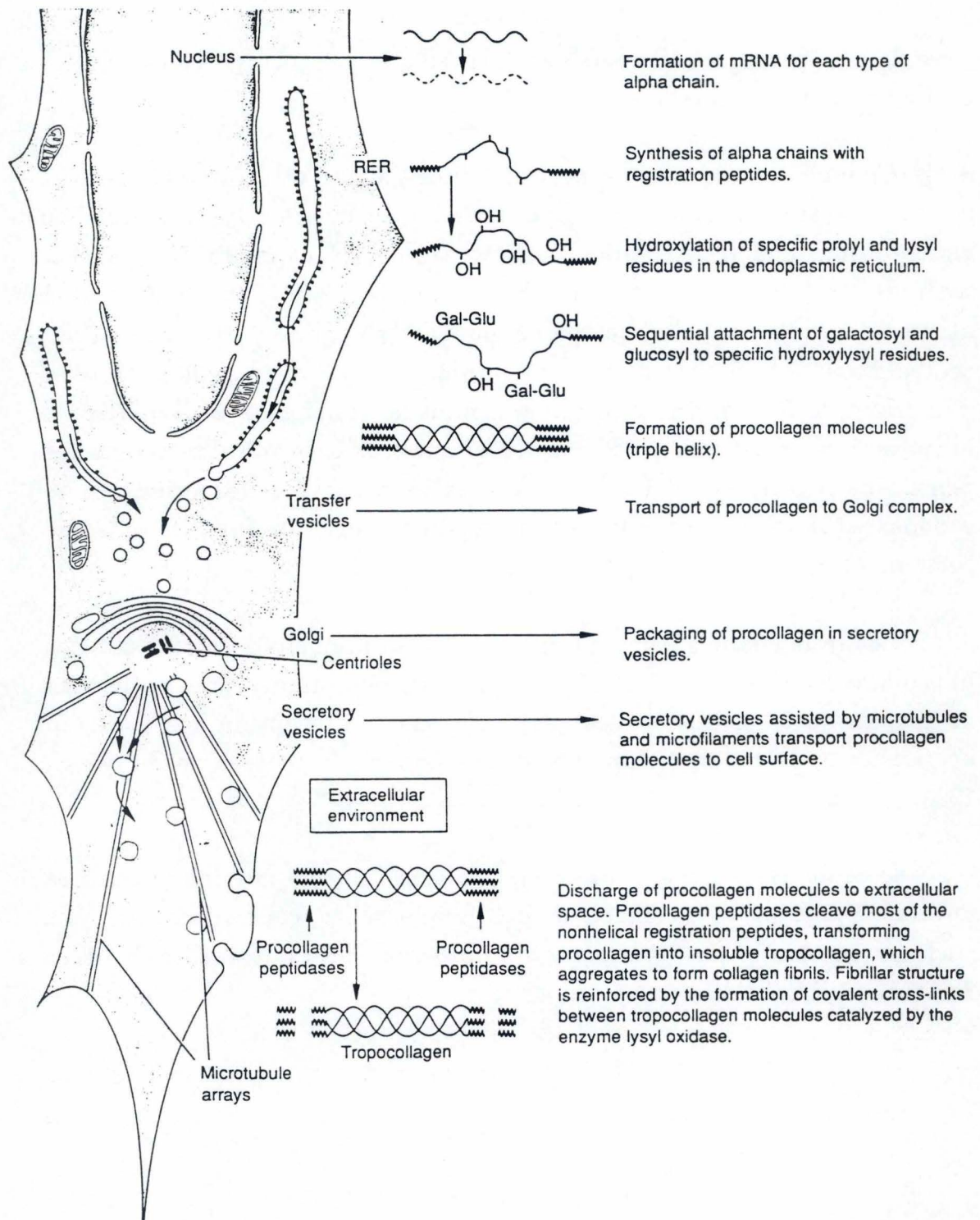


Figure I.9 : Représentation schématique des différentes étapes de la synthèse du collagène (Ramirez et Di Liberto, 1980), (Junqueira *et al*, 1989).

## B. BIOSYNTHESE (Junqueira *et al*, 1989)

Contrairement à ce qui fut longtemps pensé, la synthèse du collagène n'est pas uniquement limitée aux fibroblastes, chondroblastes, ostéoblastes et odontoblastes, mais est largement répandue dans de nombreux types cellulaires.

La synthèse de collagène mature et fonctionnel requiert la présence de plusieurs enzymes et cofacteurs, nécessaires aux modifications posttraductionnelles de la chaîne polypeptidique originale. Elle se passe en plusieurs étapes, résumées à la Fig. I.9 :

1. A partir de molécules d'ARN-m spécifiques pour chaque type de chaîne, les chaînes polypeptidiques  $\alpha$ , appelées procollagène  $\alpha$ , sont traduites et passent dans la lumière du réticulum endoplasmique rugueux.

2. Lorsque les chaînes ont atteint une longueur minimale, une partie des prolines et des lysines incorporées est hydroxylée en hydroxyprolines et hydroxylysines. Les enzymes impliquées dans ces deux réactions sont respectivement la prolyl hydroxylase et la lysyl hydroxylase. Elles nécessitent la présence d' $\alpha$ -cétoglutarate et d'un cofacteur : l'acide ascorbique ou vitamine C. Comme les hydroxyprolines et les hydroxylysines participent aux liaisons hydrogène entre les molécules des triples hélices, un manque en vitamine C (scorbut) entraîne une instabilité du collagène et donc une fragilisation des vaisseaux sanguins, des tendons et de la peau (Darnell *et al*, 1993).



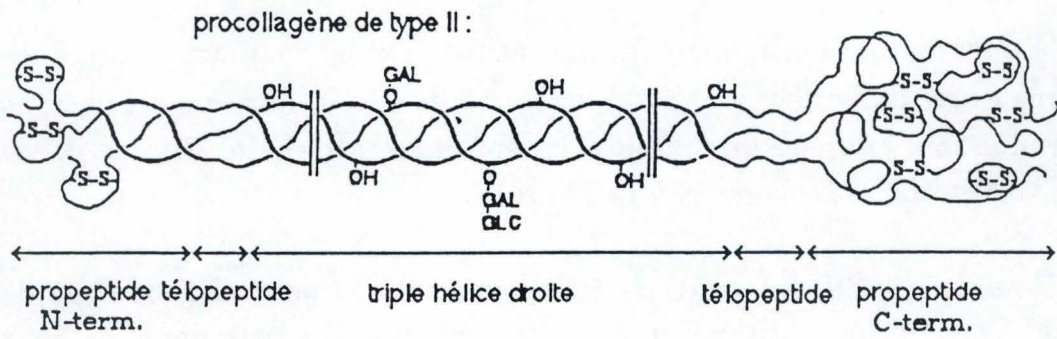


Figure I.10 : Représentation d'une triple hélice de procollagène.

3. Après hydroxylation, certaines hydroxylysines deviennent les sites de greffage de groupements galactosylés et glycosylés. Le motif oligosaccharidique (le plus souvent un disaccharide glucose-galactose) est ajouté grâce à la galactosyl transférase. Le degré de glycosylation varie selon les types de collagène.

4. Lors du transfert vers l'appareil de Golgi, les chaînes de procollagène  $\alpha$  s'associent en triple hélice, comportant à chaque extrémité un domaine globulaire. Ces portions non-hélicoïdales portent le nom de propeptide C-terminal (environ 300 acides aminés) et propeptide N-terminal (environ 100 acides aminés). Les propeptides C-terminaux forment des ponts disulfures entre leurs résidus cystéines, ce qui assure l'assemblage correct des chaînes  $\alpha$ . Ces peptides supplémentaires préviennent aussi la formation prématurée et la précipitation dans la cellule de fibres de collagène (Rawn, 1990).

5. Les triples hélices de procollagène (Fig. I.10) sont transportées dans des vésicules sécrétoires vers la membrane cellulaire, puis sécrétées dans la matrice extracellulaire. Deux enzymes particulières de la MEC, les procollagène N-peptidase et C-peptidase, clivent les propeptides en laissant à chaque extrémité 15 à 20 acides aminés appelés télépeptides (Fig. I.10). La triple hélice ainsi obtenue porte le nom de tropocollagène ou collagène et peut s'assembler avec d'autres pour former des fibrilles de collagène, comme décrit au point suivant.

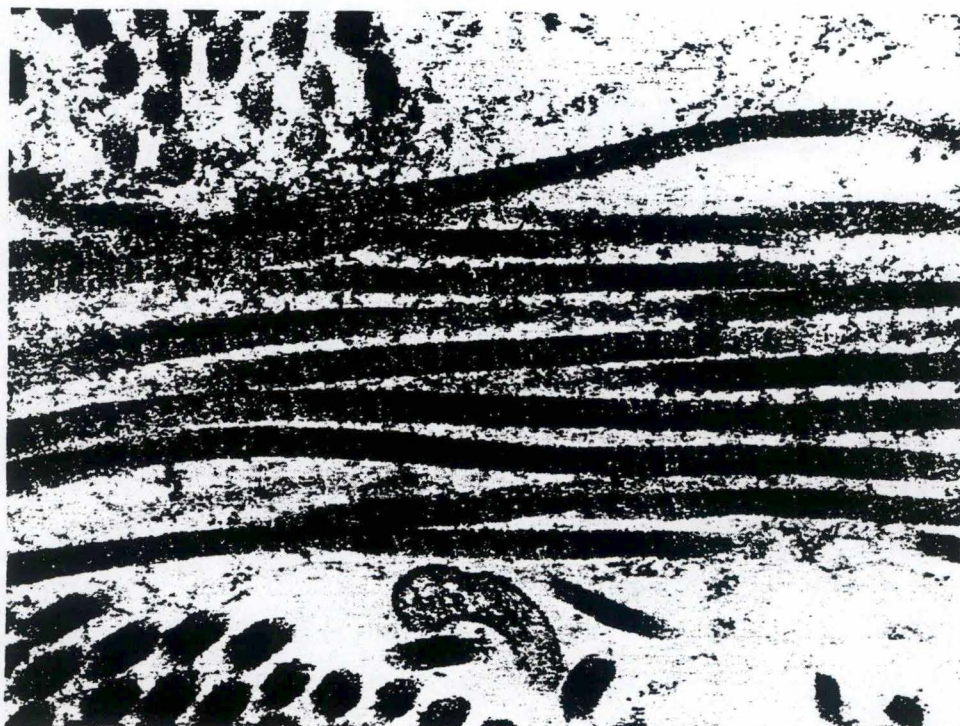


Figure I.11 : Micrographie électronique de fibrilles de collagène humain en coupes transversales et longitudinales. Le grossissement est de 100.000X (Junqueira *et al.*, 1989).

## C. ASSEMBLAGE DES DIFFERENTS TYPES DE COLLAGENES

(Van der Rest *et al*, 1991; Miller *et al*, 1987).

Actuellement, il existe 14 types de collagène différents, numérotés de I à XIV et répartis en deux grands groupes. Les types I, II, III, V et XI sont appelés collagènes fibrillaires, par opposition aux autres types, non-fibrillaires. Chaque chaîne  $\alpha$  est identifiée par un chiffre arabe, suivi du chiffre romain correspondant au type entre parenthèses. Selon les types de collagènes, les trois chaînes  $\alpha$  sont identiques ( $\alpha_1$ ) ou différentes ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et parfois  $\alpha_3$ ) et, dans le second cas, forment une ou plusieurs combinaisons moléculaires (Tableau I.1).

Dans cette introduction, nous détaillerons principalement les collagènes fibrillaires, présents en majorité dans le tissu conjonctif des veines.

### C1. Collagènes fibrillaires

Après sécrétion dans la MEC, les molécules de tropocollagènes d'environ 300 nm, s'orientent de la même manière et s'associent latéralement avec un décalage de 67 nm (soit environ un quart de leur longueur) par rapport à leurs voisines. Les têtes C- et N-terminales de deux molécules successives se distancent d'environ 35 nm. Cet empilement régulier génère une microfibrille. Plusieurs microfibrilles s'agglomèrent pour former une fibrille, dont la structure apparaît en microscopie électronique comme une succession de bandes sombres et claires de 35 nm (Fig. I.11).

L'assemblage de fibrilles en fibres de collagène compactes fournit un support structural pour le squelette, la peau, les vaisseaux sanguins, les intestins, les capsules d'organes, ... Les collagènes de types I, II et III représentent jusqu'à 95 % des espaces interstitiels.

Les fibrilles sont souvent hétérotypiques et donc de diamètre variable. En effet, les types III et IV sont souvent associés au type I et le type IX au type II.

## **C2. Collagènes non-fibrillaires**

Ces types de collagènes ont des structures moléculaires et des tailles très différentes. La plupart possède plusieurs domaines globulaires et présente des structures macromoléculaires variées. Les types IX, XII et XIV se lient aux collagènes fibrillaires (FACITs : fibril-associated collagens with interrupted triple helix), alors que le type VII s'agrège en fibrilles d'ancrage et interagit avec les membranes basales. D'autres types (IV, X et VIII) sont impliqués dans la formation de feuilletts ou de membranes protéiques entourant des tissus ou organismes (éponges, vers, ...). Un dernier type (VI), enfin, s'associe pour former des "filaments de perles" qui pourraient jouer un rôle dans l'interaction entre les constituants de la matrice.

Dans tous les types de collagène, les interactions ioniques et hydrophobes qui stabilisent les assemblages moléculaires et macromoléculaires, sont renforcées par des liens covalents, caractéristiques des collagènes. En effet, ces liaisons covalentes relient des résidus de lysine ou allysine (lysine modifiée en résidu aldéhydique) à des résidus d'hydroxyproline ou hydroxyallysine d'une même hélice ou d'une hélice voisine. Ces réticulations covalentes sont catalysées par l'action d'une enzyme, la lysil oxydase, présente dans la MEC. Ces

pontages, responsables du haut degré d'insolubilité des collagènes, peuvent être inhibés par le  $\beta$ -aminopropionitrile fumarate (Eyre, 1987).

#### **D. ORGANISATION GENIQUE DES COLLAGENES FIBRILLAIRES** (Vurio *et al*, 1990)

Les trois chaînes  $\alpha$ , qui constituent les molécules de collagène, sont génétiquement différentes pour chaque type, à l'exception de la chaîne  $\alpha_1$  du collagène de type II et de la chaîne  $\alpha_3$  du collagène de type XI. Ces deux dernières ne se différencieraient que par des modifications posttraductionnelles. Par conséquent, au moins 26 gènes sont nécessaires pour coder les chaînes constitutives des 14 types de collagène. Ces locus géniques, nommés COL, sont dispersés dans tout le génome (Tableau I.1).

L'organisation génique des collagènes fibrillaires présente de grandes similitudes au niveau de la taille et de la structure des exons. Ces gènes, contenant 51 à 54 exons, ont des tailles variant de 16 à 44 kilobases et codent trois domaines différents : le domaine hélicoïdal, le domaine propeptide-C et le domaine propeptide-N.

Le domaine hélicoïdal (1014 à 1029 acides aminés) consiste en 44 exons :

- 23 exons de 54 bp
- 8 exons de 108 bp
- 1 exon de 162 bp
- 5 exons de 45 bp
- 5 exons de 99 bp

et 2 exons "charnières" qui codent le début et la fin de la triple hélice. Ces 2 exons sont responsables de la légère variation de longueur de la triple hélice.

La taille de chaque exon est un multiple de 9 bp et donc correspond à un nombre entier de triplets Gly-X-Y (respectivement 6, 12, 18, 5 et 11 triplets). Dans tous les gènes des collagènes fibrillaires, ces exons commencent exactement avec un codon complet Gly et se terminent avec un codon complet pour l'acide aminé en position Y.

Bien que les acides aminés en position X et Y divergent dans une même chaîne et entre les différentes chaînes, le remarquable degré de conservation de la structure et de la taille des exons supposent une origine commune des gènes (Van der Rest, 1991). En effet, comme la plupart des exons ont une taille de 54 bp ou multiple de 54 bp, le gène ancestral des collagènes fibrillaires proviendrait d'une amplification d'une unité d'ADN de 54 bp. Les exons de 45 bp et de 99 bp, quant à eux, pourraient résulter d'une recombinaison entre deux unités de 54 bp.

Il existe également pour le domaine propeptide-C un grand degré de conservation d'un type de collagène fibrillaire à l'autre. Le domaine propeptide-C est codé par 4 exons (exons 49 à 52). L'exon 49 code la fin de la triple hélice (45 à 63 acides aminés), le petit télépeptide et le début du propeptide-C. Comme nous l'avons vu précédemment, le propeptide-C joue un rôle important dans l'assemblage des trois chaînes  $\alpha$ .

Enfin, le domaine propeptide-N des collagènes fibrillaires présente un degré de divergence plus élevé, à la fois dans la longueur et dans la structure de ses 6 exons. On peut même observer une variation de taille dans une même chaîne pour des espèces différentes.

Ce domaine code plusieurs sous-unités : un peptide signal, un domaine riche en cystéines dont on ignore la fonction, une courte séquence hélicoïdale (de 39 à 79 acides aminés) et un petit domaine globulaire se terminant dans le télépeptide. Le propeptide-N jouerait un rôle dans la régulation du diamètre des fibrilles de collagène (Van der Rest, 1991).

En conclusion, le haut degré de conservation de l'organisation génique est expliquée par les rôles importants du propeptide-C et du domaine hélicoïdal au niveau supramoléculaire (assemblage des fibrilles). Ces deux domaines subissent donc une pression sélective importante, contrairement au domaine propeptide-N.



## BUT DU MEMOIRE

Comme nous venons de le décrire, le phénomène d'ischémie vasculaire répété conduit à un remaniement complet de la paroi des vaisseaux sanguins et en particulier des veines. Si l'endothélium reste intact, les cellules musculaires lisses passent d'un état contractile à un état synthétique caractérisé par une prolifération accrue. Ces altérations sont morphologiquement bien décrites mais les mécanismes biochimiques responsables de ce processus restent inconnus. Il était donc intéressant de développer un modèle *in vitro* qui reproduise ces altérations. Un modèle *in vitro* permet en effet de cibler un type cellulaire bien précis en éliminant les autres composants qui sont toujours présents lors d'expérimentations sur des organes isolés et perfusés ou sur des organismes entiers.

Le but du mémoire était d'essayer de mettre en évidence les mécanismes biochimiques responsables de la modulation phénotypique des cellules musculaires lisses observée dans la paroi de veines variqueuses.

Dans un premier temps, il fallait tout d'abord développer un modèle expérimental où l'on pouvait obtenir des cellules musculaires lisses dans un état contractile et dans un état synthétique. Ensuite, il fallait disposer de critères précis permettant de reconnaître le phénotype des cellules incubées dans différentes conditions. Nous avons donc caractérisé morphologiquement et biochimiquement des cellules musculaires lisses présentant l'un ou l'autre phénotype.

Dans la deuxième partie et ayant en main des outils pour reconnaître le phénotype des cellules, nous avons voulu voir si les cellules endothéliales soumises à une hypoxie pouvait induire la modulation phénotypique, c'est-à-dire transformer des cellules musculaires lisses contractiles en cellules musculaires lisses synthétiques. Pour cela, nous avons choisi la synthèse de collagène comme outil permettant de différencier les deux phénotypes.

Cette approche nous a permis de mieux comprendre les phénomènes qui se déroulent *in vivo* au niveau de la paroi vasculaire lors d'une ischémie.

# MATERIELS ET METHODES

## I. TECHNIQUES DE BIOLOGIE CELLULAIRE

### A. MISE EN CULTURE DES CELLULES ENDOTHELIALES

Toutes les mises en culture de cellules se font sous hotte à flux laminaire. Le matériel utilisé est soit stérilisé (6h à 180°C, stérilisateur) soit autoclavé (20 min. à 120°C). Les solutions, stérilisées sur filtre 0,22 µm, (Millipore, France) sont préalablement chauffées à 37°C.

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

#### A1. Matériel et solutions

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

- KCl 4 mM (Merck, Darmstad, Allemagne)
- NaCl 140 mM (Merck)
- Hépes 10 mM (Janssen)
- D-glucose 11 mM (Merck)
- streptomycine 100 µg/ml (Sigma, St Louis, USA)
- penicilline 100 U/ml (Sigma)
- fungizone (amphotéricine B) 0,25 µg/ml (Sigma).

Cette solution est stérilisée par filtration (pompe péristaltique et filtre Stérivex GV, 0,22 µm, Millipore, France) et stockée à 4 °C dans des pots stérilisés à l'alcool dénaturé.

2. Solution saline de rinçage (0,15 M en NaCl) tamponnée par du phosphate 10 mM (PBS) et stérilisée sur filtre Stérivex GV 0,22 µm (Millipore). Cette solution contient les antibiotiques et la fungizone aux mêmes concentrations que la solution de récolte.

3. Collagénase type II (Sigma) 0,05% dans du PBS à pH 7,4, filtrée.

4. Milieu de culture M 199 composé de sels de Hanks, Hépes 10 mM,  $\text{NaHCO}_3$  1,75 g/l, L-glutamine 100mg/l (Gibco, Grande-Bretagne) et porté à pH 7,2 avec NaOH. Ce milieu est additionné de 20% de sérum de veau foetal (Gibco) (= M + S).

5. Gélatine stérile 0,20% (Merck).

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

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

-NaCl 140 mM

-Glucose 5,5 mM

-KCl 5 mM

- $\text{MgSO}_4$  0,4 mM

- $\text{MgCl}_2$  0,5mM

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  4,3 mM

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,4 mM, pH 7,3.

Le  $\text{CaCl}_2$  à la concentration de 1 mM final est ajouté juste avant chaque expérience. Tous ces sels proviennent de la firme Merck (RFA).

## A2. Mise en culture

Juste après l'accouchement, les cordons sont stockés à 4°C dans la solution de récolte équilibrée et tamponnée, contenant les antibiotiques. La mise en culture débute par la perfusion de la veine ombilicale par 50 ml de solution de rinçage saline, au moyen d'un système seringue-cathéter. La veine est ensuite cannulée avec 2 cathéters et incubée avec 3 à 4 ml de collagénase type II (0,05%) pendant 35 minutes à 37°C, dans une boîte de Pétri. Les cellules endothéliales détachées de la paroi veineuse sont alors récoltées dans du milieu de culture M 199 + S, ce dernier inhibant l'action de la collagénase.

Les cellules endothéliales ainsi récoltées sont centrifugées à 1000 rpm pendant 10 minutes et resuspendues dans 6 ml de milieu de culture. Cette suspension est placée dans une boîte de culture T 25 (Cel-Cult, 25 cm<sup>2</sup>, Sterilin, Grande-Bretagne) préalablement recouverte de gélatine, facilitant ainsi l'adhérence et la multiplication des cellules endothéliales.

Le lendemain, les CE attachées sont rincées afin d'éliminer les globules rouges, les cellules mortes ou d'autres cellules sanguines.

4. Milieu de culture M 199 composé de sels de Hanks, Hépes 10 mM,  $\text{NaHCO}_3$  1,75 g/l, L-glutamine 100mg/l (Gibco, Grande-Bretagne) et porté à pH 7,2 avec NaOH. Ce milieu est additionné de 20% de sérum de veau foetal (Gibco) (= M + S).

5. Gélatine stérile 0,20% (Merck).

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

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

-NaCl 140 mM

-Glucose 5,5 mM

-KCl 5 mM

- $\text{MgSO}_4$  0,4 mM

- $\text{MgCl}_2$  0,5mM

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  4,3 mM

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,4 mM, pH 7,3.

Le  $\text{CaCl}_2$  à la concentration de 1 mM final est ajouté juste avant chaque expérience. Tous ces sels proviennent de la firme Merck (RFA).

## A2. Mise en culture

Juste après l'accouchement, les cordons sont stockés à 4°C dans la solution de récolte équilibrée et tamponnée, contenant les antibiotiques. La mise en culture débute par la perfusion de la veine ombilicale par 50 ml de solution de rinçage saline, au moyen d'un système seringue-cathéter. La veine est ensuite cannulée avec 2 cathéters et incubée avec 3 à 4 ml de collagénase type II (0,05%) pendant 35 minutes à 37°C, dans une boîte de Pétri. Les cellules endothéliales détachées de la paroi veineuse sont alors récoltées dans du milieu de culture M 199 + S, ce dernier inhibant l'action de la collagénase.

Les cellules endothéliales ainsi récoltées sont centrifugées à 1000 rpm pendant 10 minutes et resuspendues dans 6 ml de milieu de culture. Cette suspension est placée dans une boîte de culture T 25 (Cel-Cult, 25 cm<sup>2</sup>, Sterilin, Grande-Bretagne) préalablement recouverte de gélatine, facilitant ainsi l'adhérence et la multiplication des cellules endothéliales.

Le lendemain, les CE attachées sont rincées afin d'éliminer les globules rouges, les cellules mortes ou d'autres cellules sanguines.

L'évolution de la culture est suivie au microscope à contraste de phase (Zeiss). Le milieu de culture doit être renouvelé régulièrement afin de maintenir les cellules dans des conditions optimales de croissance.

Pour toutes les expériences, les cellules sont utilisées après le premier repiquage. La confirmation de leur identité en tant que CE repose sur la détection de l'antigène du facteur VIII de la coagulation par un marquage en immunofluorescence (Jaffe *et al*, 1973b).

### **A3. Repiquage et sous-culture**

Lorsque les cellules sont arrivées à confluence et forment une monocouche, elles sont rincées 2 fois pendant 2 minutes avec 5 ml de milieu M 199 sans sérum. Le milieu est décanté et remplacé par 2 ml de trypsine + EDTA (qui chélate les ions  $Ca^{++}$  et accélère le détachement des cellules du substrat).

La trypsinisation s'effectue durant 3 à 4 minutes à 37°C et est suivie au microscope optique à contraste de phase.

Les cellules détachées sont ensuite resuspendues au moyen d'une pipette Pasteur, dans 5 ml de milieu M 199 auquel a été ajouté 20% de sérum et cela afin d'inhiber la trypsine. La suspension est alors centrifugée dans un tube stérile (Stérilin, Grande-Bretagne) pendant 10 minutes à 1000 rpm.

Le surnageant contenant la trypsine est décanté, tandis que le culot cellulaire est resuspendu dans du M 199 + S. La quantité de milieu et le choix du type de boîte sont déterminés par l'utilisation ultérieure des cellules repiquées. En général, les cellules sont repiquées dans un rapport de 1 à 2 ou 1 à 3 et le milieu est changé tous les 2-3 jours.

### **A4. Récolte des surnageants**

Pour les incubations sous hypoxie, les CE sont repiquées comme décrit au point I.A3 dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre (Falcon, New Jersey, USA). Lorsque les cellules sont arrivées à confluence, les boîtes sont rincées 2 fois avec 2 ml d'HBSS (pH 7,3, 37°C).

Après décantation complète des boîtes, on ajoute 0,7 ml d'HBSS par boîte. Les CE sont alors incubées sous hypoxie en les exposant à une atmosphère de 100% d'azote ( $N_2$ ). La  $PO_2$  du milieu chute alors rapidement

et passe de 130 mmHg à 10 mmHg (hypoxie). Des contrôles sont réalisés en exposant les CE à l'air (normoxie). Pendant les 2 heures d'incubation, les CE sont placées sur un agitateur mécanique à 37°C.

Au terme de ces incubations, les surnageants de CE, encore appelés milieux conditionnés, sont récoltés et congelés à -20°C jusqu'à leur utilisation. Les cellules ayant subi l'hypoxie sont observées au microscope à contraste de phase afin de vérifier leur morphologie.

## **B. CULTURE DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES**

Les cellules musculaires lisses (CML) proviennent d'une lignée cellulaire (A7 r5) isolée à partir d'une aorte de rat (Kimes and Brandt, 1976) et sont disponibles à l'ATCC (American Tissue Culture Collection). Les caractéristiques de cette lignée immortelle sont décrites dans l'introduction au point I.C3.

### **B1. Matériel et solutions**

1. Milieu de rinçage sans sérum.
2. Milieu de culture Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) pH 7,2, filtré et contenant 10% de sérum de veau foetal (=D+S).
3. Trypsine (Gibco).

### **B2. Décongélation et mise en culture**

Les cellules sont stockées dans une ampoule stérile contenant 0,4 ml de D + 40% S et 0,4 ml DMSO (Diméthylsulfoxyde, Merck, RFA) et congelées dans de l'azote liquide (-180°C).

La décongélation se fait, en moins d'une minute, en plongeant l'ampoule dans un bain à 40°C. Celle-ci est alors centrifugée durant 10 minutes à 500 rpm. Le surnageant est décanté au maximum et les cellules sont placées dans 20 ml D + 10% S, dans une boîte T 75. Le milieu doit être changé le lendemain si les cellules ne sont pas arrivées à confluence.

### B3. Repiquage

Le repiquage a lieu lorsque les cellules sont confluentes et forment une monocouche.

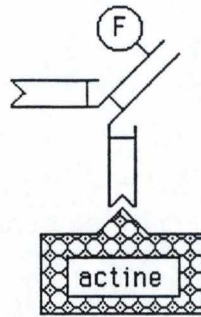
La boîte est rincée pendant 2 minutes avec 10 ml de milieu de rinçage, puis décantée complètement à la pipette Pasteur. On ajoute 2 ml de trypsine durant 2 minutes. On décante la boîte en laissant un peu de trypsine et on laisse incuber les cellules pendant une dizaine de minutes à 37°C.

Lorsque la trypsinisation est terminée, on ajoute 10 ml de D+S afin d'inhiber la trypsine et on resuspend les cellules.

Les boîtes utilisées pour le repiquage dépendent uniquement de l'utilisation ultérieure des cellules. Pour les sous-cultures, les cellules resuspendues sont réparties dans deux boîtes hermétiques de 75 cm<sup>2</sup> (Cel-Cult, Sterilin, Grande-Bretagne : T 75), dans lesquelles on ajoute du milieu D + S (la quantité finale du milieu doit être de 20 ml) et une atmosphère contenant 8% de CO<sub>2</sub>- 92% d'air, afin de maintenir le pH du milieu de culture.

Pour certaines expériences, les cellules seront déposées dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre (Falcon, New Jersey) à raison d'un volume de 2 ml par boîte. Dans ce cas, les boîtes sont placées dans étuve à 37°C contenant une atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub>- 95% air.

### Méthode directe



### Méthode indirecte

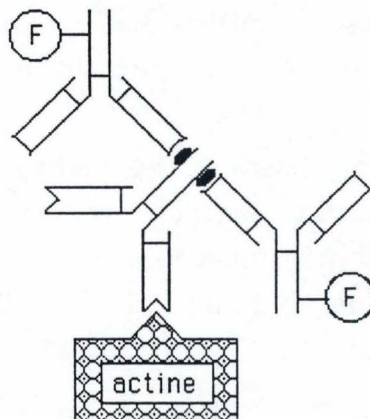


Figure II.1 : Schéma de détection d'un antigène (en l'occurrence l'actine) par reconnaissance spécifique d'anticorps. Le système A montre la reconnaissance directe entre l'antigène et l'anticorps marqué à la fluorescéine (F). Le système B montre une reconnaissance en deux étapes. La première se faisant entre l'antigène et un anticorps non marqué qui lui est spécifique, la deuxième étant la reconnaissance de ce dit-anticorps avec d'autres anticorps qui lui sont spécifiques et qui sont marqués à la fluorescéine. L'avantage de ce système B est l'amplification du signal fluorescent.



## C. IMMUNOFLUORESCENCE

### C1. Principe

Cette méthode permet de localiser des protéines spécifiques de la cellule en se basant sur la réaction antigène-anticorps.

Les immunoglobulines sont couplées à un composé fluorescent qui les rend visibles en microscopie à fluorescence sans altérer leur reconnaissance spécifique pour l'antigène. Les composés fluorescents sont excités par la lumière ultraviolette, de façon à émettre dans la partie visible du spectre.

Le marquage peut se faire par méthode directe ou indirecte. Pour marquer l' $\alpha$ -actine des CML, nous utiliserons, pour notre part, la méthode indirecte (Twort et Van Breemen, 1988) : l'anticorps primaire contre l' $\alpha$ -actine se lie, dans un premier temps, à son antigène et est ensuite reconnu par un anti-anticorps couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine.

Cette méthode a l'avantage d'augmenter fortement la sensibilité de la technique (Fig. II.1).

### C2. Matériel et solutions

1. PBS (Phosphate Buffer Saline) pH 7,4 : NaCl 0,15M, tampon phosphate 10mM.

2. Paraformaldéhyde (PFA) 3% (Merck) dans PBS, à dissoudre à 80°C et à porter à pH 7,4 lorsqu'il est refroidi.

3. Acétone (Merck).

4. Mélange de SAB (Serum Albumine Bovine, Boserol, Organon, Tecknika, Belgique) à 1% dans le PBS.

5. Anticorps primaires monoclonaux de souris (clone TA4) dirigés contre l' $\alpha$ -actine des muscles lisses (Sigma).

6. Anticorps secondaires GAM-FITC (Goat Anti-Mouse-Fluorescéine Iso ThioCyanate), anticorps de chèvre marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine à 10 mg/ml et dirigés contre des IgG de souris. Ces anticorps doivent être conservés à l'obscurité.

7. Solution de glycérol-PBS (10/1) à pH 9-10, contenant 1 mg de paraphénylènediamine/ml de PBS. Cette solution doit être faite extemporanément.

### C3. Méthode

Les CML sont repiquées sur des couvre-objets de 15 mm de côté, dans des cases de 4 cm<sup>2</sup> d'une multi-dish (Cel-Cult, Stérilin, Grande-Bretagne). Le milieu est décanté et les cellules sont rincées 2 fois avec du PBS, puis fixées par 1 ml de paraformaldéhyde (3% dans PBS) pendant 5 minutes.

On rince de nouveau 3 fois avec du PBS avant d'ajouter 1 ml d'acétone froid (-20°C) pendant 2 minutes afin de perméabiliser les cellules. Deux nouveaux rinçages au PBS sont alors effectués ainsi qu'un troisième au PBS + SAB. On décante ensuite complètement.

Par la suite, les cellules sont recouvertes de 150 µl d'anticorps primaires dirigés contre l' $\alpha$ -actine, dilués à 1/200 dans le mélange PBS-SAB. L'incubation a lieu pendant 90 minutes dans une atmosphère humide à 20°C. Les anticorps dilués doivent être préalablement microfugés pendant 2 minutes, afin d'éliminer les anticorps dénaturés qui précipitent et gardés à 4°C.

Après incubation, les anticorps non fixés sont éliminés à l'aide de 3 rinçages au PBS-SAB, puis les cellules sont couvertes par 150 µl d'anticorps secondaires GAM-FITC dilués 1/80 et centrifugés. L'incubation se fait également dans une atmosphère humide à 20°C et à l'obscurité pendant 1 heure.

L'excès d'anticorps est éliminé par 3 lavages au PBS-SAB. Les cellules sont ensuite montées en retournant le couvre-objet sur une goutte de paraphénylènediamine/PBS/glycérol. Les bords du couvre-objet sont scellés à l'aide d'un vernis incolore. Les lames doivent être gardées à l'obscurité.

L'observation se fait au moyen d'un microscope à fluorescence avec source de lumière ultraviolette. Les composés fluorescents apparaissent comme des particules brillantes vertes sur fond noir. Les photos sont réalisées avec un film dia Fuji 400 ASA.

## D. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION ET A BALAYAGE

### D1. Principe

Dans un microscope électronique, ce sont des électrons et non des photons qui constituent la "source lumineuse". Un filament de tungstène chauffé, agissant comme une cathode, constitue la source d'électrons. Ceux-ci sont accélérés grâce à une haute tension de 60 à 100 kV. Ils aboutissent à un cylindre de Wehlnet percé pour pouvoir absorber le flux d'électrons. Le flux d'électrons est concentré sur la préparation grâce à un condenseur électromagnétique. D'autres déviations électromagnétiques permettent de projeter l'image sur un écran fluorescent.

En microscopie électronique à transmission, l'image est donc formée sur un écran fluorescent par le faisceau d'électrons qui traverse l'objet à étudier. Par contre en microscopie électronique à balayage, ce sont les électrons réfractés secondaires qui forment l'image en trois dimensions.

### D2. Solutions

1. Tampon de cacodylate de sodium 0,1 M (Merck)
2. Solution de glutaraldéhyde 2 % (Fluka, Suisse)
3. Tétraoxyde d'osmium (BDH, Poole, Grande-Bretagne)
4. Ethanol (Merck)
5. Anhydre dodécényl succinique (DDSA, Ladd)
6. Epon 812 (TAAB)
7. Anhydride méthyl nadique (NMA, Ladd)
8. N,N - diméthylbenzylamide ou DMP (Kodak, USA)
9. Solution d'acétate d'uranyle 0,4 % (Merck, RFA)

### D3. Méthode

En pratique, les cellules sont traitées de la même façon pour l'observation en microscopie à transmission ou à balayage jusqu'à l'étape d'enrobage. Les cellules sont repiquées dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre. Lorsqu'elles sont confluentes, le milieu de culture est décanté et

les cellules sont rincées deux fois avec un tampon de cacodylate de sodium 0,1 M (pH 7,4). Les cellules sont alors fixées dans une solution de glutaraldéhyde 2 % dans le tampon cacodylate pendant 10 minutes à température ambiante, puis à 4°C durant 20 minutes. Les cellules sont ensuite rincées trois fois durant cinq minutes dans une solution de cacodylate de sodium 0,1 M pH 7,4. Une solution contenant 1 % de tétraoxyde d'osmium dans le même tampon cacodylate est ensuite ajouté aux cellules pendant 30 minutes à 4°C, avant d'être rincées avec le tampon cacodylate de sodium 0,1 M. Les cellules sont ensuite rapidement déshydratées dans des solutions aqueuses d'éthanol à 25, 50, 75, 95 et 100 % à température ambiante.

A partir de l'étape d'enrobage, le protocole diffère suivant que l'on désire observer les échantillons en microscopie à balayage ou en microscopie à transmission.

En ce qui concerne la microscopie à transmission, nous avons suivi la technique d'enrobage mise au point par M. Raes (Raes, 1983 ; Raes et Remacle, 1983). Après une incubation de deux heures dans un mélange d'enrobage éthanol-épon 50/50, les cellules subissent 4 rinçages de 5 minutes dans de l'épon 100 %. L'étape de polymérisation s'effectue successivement à trois températures croissantes : une nuit à 37°C, 24 heures à 45°C, et 72 heures à 60°C. Le mélange d'enrobage se constitue de 6,25 g d'anhydride dodécényl succinique, 14,75 g d'Epon 812, 8,55 g d'anhydride méthyl nadique et 0,65 ml d'accélérateur (N,N - diméthylbenzylamide ou DMP).

Lorsque la polymérisation est terminée, on choisit des blocs d'épon que l'on découpe à la scie sauteuse. Les blocs d'épon, dépourvus de leur substrat plastique, sont alors montés sur un ultramicrotome LKB III (LKB, Suède) afin de tailler une pyramide dans le bloc. Des coupes ultrafines de 500Å sont effectuées dans la pyramide, puis déposées sur une plaque de cuivre. Les coupes subissent ensuite deux colorations successives : tout d'abord dans une solution d'acétate d'uranyle 0,4 % dans de l'éthanol 50 % durant 30 minutes, et la seconde dans une solution au Reynolds (Lewis et Knight, 1977). Les coupes alors être observées au microscope électronique à transmission. sous une tension de 60 kV.

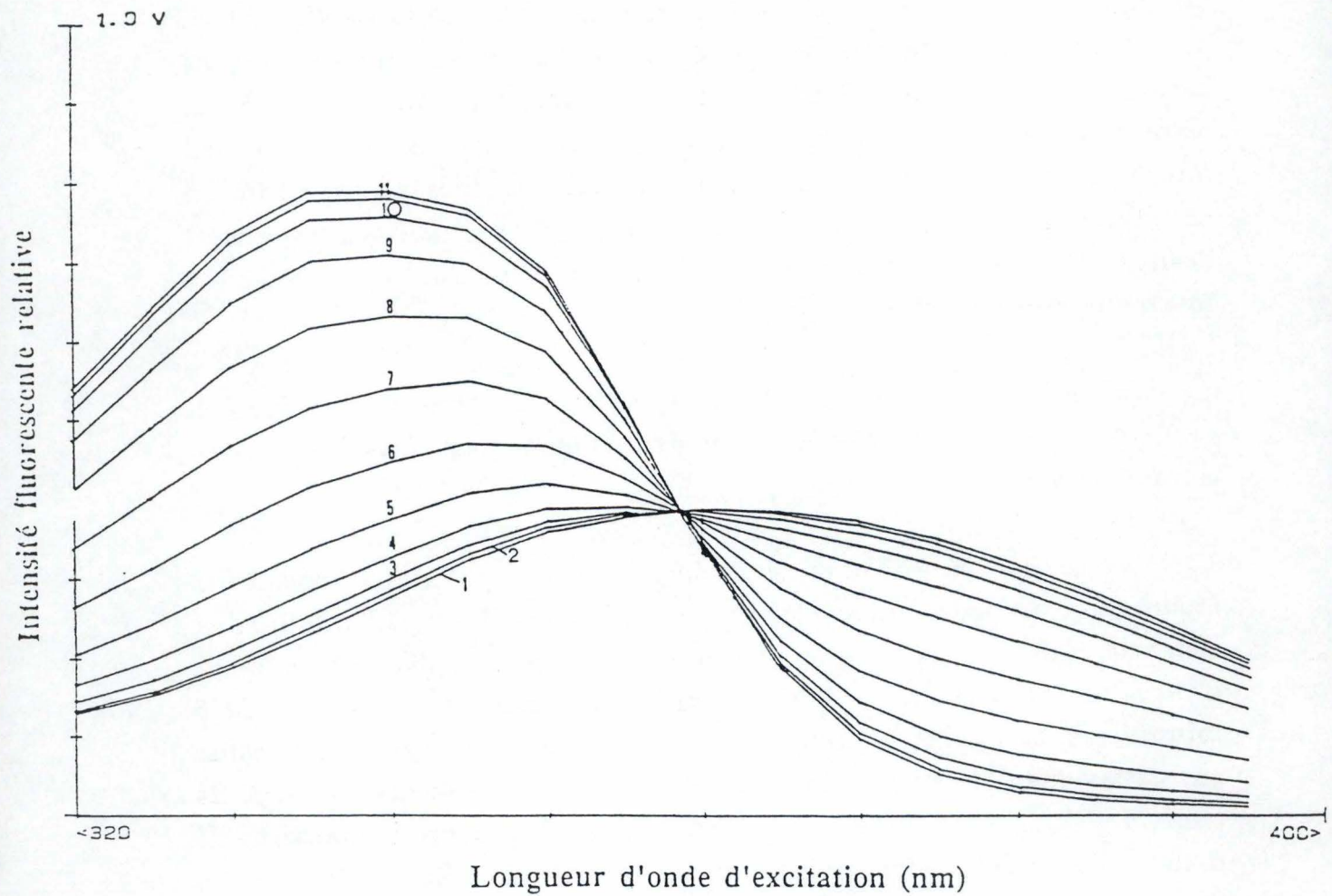


Figure II.2 : Spectres d'excitation du Fura-2 ( $1\mu\text{M}$ ) à  $20^{\circ}\text{C}$  pour différentes concentrations en calcium libre dans une solution physiologique contenant de l'EGTA à  $10\text{mM}$  (allant de  $<1\text{ nM}$  à  $1,5\mu\text{M}$ ). Le spectre d'excitation est mesuré entre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

Pour la microscopie à balayage, les boîtes sont d'abord cassée à l'aide d'une pince. Les différentes étapes de la déshydratation sont identiques à celles décrites pour la microscopie à transmission. On réalise la dessiccation des cellules par le passage au "point critique". L'éthanol est alors remplacé par du CO<sub>2</sub> liquide (sous pression). Les fragments de boîtes sont enfin montés sur des supports en aluminium et les cellules sont couvertes par une couche d'or (20-30 nm). Cette couche doit être fine et continue. Les échantillons sont ensuite observés et photographiés à l'aide d'un microscope (Philips XL-20, Pays-Bas).

## E. DOSAGE DE LA CONCENTRATION EN CALCIUM INTRACELLULAIRE

### E1. Principe

Afin de mesurer la concentration en calcium (Ca<sup>++</sup>) libre dans le cytoplasme, nous avons utilisé la sonde fluorescente Fura-2, selon la méthode décrite par Grynkiewicz *et al* (1985).

L'intérêt de cette sonde est son ester d'acétoxyméthyl (Fura-2 AM) qui permet son passage à travers la membrane cellulaire hydrophobe. Arrivée dans le cytoplasme, elle est hydrolysée par des estérases cytosoliques, rendant la sonde active et hydrophile. Dès lors, elle ne complexera que le Ca<sup>++</sup> cytosolique (avec une stoechiométrie 1 : 1), puisqu'elle a perdu sa capacité à traverser les bicouches lipidiques des organites ou de la cellule.

La molécule Fura-2, lorsqu'elle est excitée par une longueur d'onde ( $\lambda$ ) de 380 nm, tend à retourner à son état fondamental en émettant un signal fluorescent à une longueur d'onde plus élevée (510 nm). Lors de la liaison de la sonde au Ca<sup>++</sup>, on observe un déplacement du pic d'excitation de 380 nm vers 340 nm. Le pic d'émission, quant à lui, ne bouge pas.

La mesure de la fluorescence au moyen d'un spectrofluorimètre nous renseignera sur la concentration en Ca<sup>++</sup> : en effet, plus il y aura de calcium et plus l'intensité fluorescente de la sonde excitée à 340 nm (sonde complexée) augmentera, comme on peut le voir sur la figure II.2.

## E2. Solutions

1. Sonde estérifiée Fura-2 AM (Molecular Probe, Eugene, USA). La sonde fournie sous forme lyophilisée est aliquotée par fractions de 50 µg. Chaque aliquot est resuspendu dans 50 µl de DMSO (diméthylsulfoxyde, Merck, RFA) avant l'emploi, ce qui constitue une solution stock de 0,1 mM. La sonde doit être gardée à l'obscurité et à - 20°C.

2. Milieu Dulbecco + 10% sérum (voir point B1) = D + S.

3. Tampon HBSS pH 7,4, porté à 37°C : NaCl 140 mM, glucose 5,5 mM, KCl 5 mM, MgSO<sub>4</sub> 0,4 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4,3 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 mM, CaCl<sub>2</sub> 1mM.

4. Digitonine 2,5 mM dans HBSS (Sigma, USA).

5. Tampon Tris 1 M (Merck) - EDTA 50 mM (Merck) pH 8,3.

6. MnCl<sub>2</sub> 1 M (Merck).

7. [8-arginine] vasopressine 1 mM (UCB Bioproducts, Braine L'Alleud, Belgique).

## E3. Méthode

Les CML sont repiquées dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre, à raison de 2 ml par boîte. Dans chacune de celle-ci, un couvre-objet en verre (13 mm X 27 mm) stérilisé à l'alcool a été préalablement déposé.

La quantité de milieu par boîte est ramenée à 1 ml de D + S, auquel on ajoute 2,5 µl de Fura-2 AM stock 0,1 mM. La concentration finale de la sonde est donc de 0,25 µM. Les cellules sont ensuite incubées à l'obscurité et à 37°C, durant 60 minutes, dans une atmosphère contenant 5% de CO<sub>2</sub>.

Le milieu d'incubation est ensuite décanté et les cellules sont rincées 3 fois avec 2 ml d'HBSS, afin d'éliminer l'excès de sonde. Les couvre-objets portant les cellules chargées sont transportées délicatement dans une cuvette en quartz à 4 faces polies et remplie avec 3 ml de HBSS (contenant du Ca<sup>++</sup> à 1 mM). Le couvre-objet est disposé sur la diagonale de la cuvette de façon à former dans le spectrofluorimètre (Konton SFM-25) un angle de 45° avec les sources d'excitation et d'émission.

Après une minute de stabilisation de la température, le monochromateur est placé successivement à 340, 358 et 380 nm pour les longueurs d'onde d'excitation. Le passage d'une longueur d'onde à l'autre doit se faire rapidement. Un second monochromateur à 90° du premier sélectionne le signal émis à 510 nm par Fura-2. La sensibilité utilisée est de 430 V. Les intensités de fluorescence correspondantes sont alors mesurées par un photodétecteur (F340, F358, F380).

La monocouche cellulaire est ensuite stimulée par 3 µl de vasopressine 1 mM ce qui provoque une libération du Ca<sup>++</sup> stocké dans le réticulum endoplasmique. On note la valeur maximale mesurée à 340 nm et la valeur minimale à 380 nm, avant de mesurer la valeur à 358 nm.

Lorsque la fluorescence est revenue à sa valeur basale, on ajoute 30 µl de digitonine 2,5 mM afin de perméabiliser la membrane cellulaire et de conduire à une fluorescence maximale par une exposition à un excès de Ca<sup>++</sup>. Ces valeurs sont nommées F340 max., F358 max. et F380 max.

Pour doser la quantité de sonde libre, on ajoute 300 µl d'EDTA dans un tampon Tris. L'EDTA à la concentration finale de 5 mM suffit pour chélater tout le Ca<sup>++</sup> présent et maintenir toutes les molécules de sonde libres. Les valeurs obtenues sont F340 min., F358 min. et F380 min.

Enfin, l'ajout de 3 ml de MnCl<sub>2</sub> neutralise la fluorescence de Fura-2 et nous donne les valeurs AF340 et AF380, correspondant à la valeur d'autofluorescence des cellules et du couvre-objet à 340 nm et à 380 nm.

#### **E4. Calcul de la concentration en Ca<sup>++</sup>**

##### ***E4.1. 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 nm et 380 nm sont corrigées en ajustant les valeurs de F358 à un plateau fixe de 500 et en soustrayant les valeurs d'autofluorescence respectives selon la formule :

$$F_x(\text{nm}) \text{ ajustée} = F_x(\text{nm}) + (500 - F_{358}) - AF_x(\text{nm})$$



**E4.2. Calcul de la concentration en calcium  $[Ca^{++}]$  par la méthode des rapports (Grynkiewicz et al, 1985)**

La démonstration de la méthode de calcul permettant de déterminer la concentration en calcium cytosolique libre est longue et complexe. Elle se base sur les rapports entre les valeurs de fluorescence obtenues à 340 nm et à 380 nm et nécessite la correction du plateau à 358 nm. Elle peut se résumer par la formule suivante :

$$[Ca^{++}]_i \text{ (en nanomole/litre)} = K_d (20^\circ C) \cdot \frac{(R-R_{min}) \cdot F_{380min}}{(R-R_{max}) \cdot F_{380max}}$$

$$\text{où } R = \frac{F_{340} + (500-F_{358}) - AF_{340}}{F_{380} + (500-F_{358}) - AF_{380}} = \frac{F_{340} \text{ ajouté}}{F_{380} \text{ ajouté}},$$

$$R_{min} = \frac{F_{340min}}{F_{380min}}, \quad R_{max} = \frac{F_{340max}}{F_{380max}}$$

$K_d (20^\circ)$  est la constante de dissociation du calcium avec la sonde et vaut 135 nanomoles à  $20^\circ C$ . Comme cette méthode des rapports évite l'utilisation de l'intensité fluorescente absolue, la mesure de la concentration en  $Ca^{++}$  est indépendante de l'efficacité du chargement, de la concentration de la sonde, de l'épaisseur cellulaire et de la perte d'intensité fluorescente.

## F. DOSAGE DE PROTEINES

Les protéines du tapis cellulaire seront dosées par la méthode de Lowry *et al* (1951).

### F1. Principe

Les protéines sont dénaturées par le NaOH et exposent leur groupements aux réactifs. Les ions cuivriques de la solution alcaline utilisée pour le dosage, forment un complexe bleu avec les liaisons peptidiques, tandis que le complexe phosphomolybdique-phosphotungstique du réactif de Folin est réduit par les résidus tyrosine et tryptophane des protéines.

### F2. Solutions

1. Solution d'étalon protéique (sérum albumine bovine) à 200  $\mu\text{g/ml}$ .
2. NaOH 0,5 N et NaOH 1 N (Merck).
3. Mixture alcaline, préparée juste avant usage :
  - 100 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,19 M (Merck)
  - 1 ml  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,04 M (Merck)
  - 1 ml  $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$  0,07 M (Merck)
4. Réactif de Folin (tartrate de sodium) à diluer 2 fois (Merck).

### F3. Méthode

Les cellules sont rincées 2 fois pendant 2 minutes avec du PBS. Les protéines sont dénaturées en ajoutant 2 ml de NaOH 0,5 N pendant 30 minutes, en plaçant les boîtes sur un agitateur afin d'homogénéiser le milieu.

Les protéines cellulaires sont resuspendues et récoltées par fraction de 0,4 ml. Parallèlement, on prépare l'étalon et le blanc :

- étalon : 0,2 ml d'étalon + 0,2 ml NaOH 1 N pendant 30 minutes
- blanc : 0,2 ml d'eau + 0,2 ml NaOH 1 N pendant 30 minutes.

Pour tous les tubes, on ajoute toutes les 30 secondes 2 ml de mixture alcaline qui doit réagir pendant 5 à 15 minutes. Ensuite, on ajoute 0,2 ml de

réactif de Folin, en respectant l'ordre des tubes et le temps, puis on vortexe immédiatement.

La densité optique (D.O.) à 660 nm est lue au spectrophotomètre après 30 minutes : l'intensité de la coloration bleue est proportionnelle à la quantité de protéines. La concentration en protéines se calcule comme suit :

$$\text{Concentration en } \mu\text{g/ml} = 200 \cdot \frac{(\text{D.O.éch.} - \text{D.O.bl.})}{(\text{D.O.ét.} - \text{D.O.bl.})}$$

## G. MARQUAGE ET PURIFICATION DES COLLAGENES

### G1. Principe

Le collagène est composé de 3 hélices polypeptidiques, présentant un motif répété de 3 acides aminés (Gly-X-Y) dans lesquels les X et les Y sont souvent respectivement la proline (25% de la chaîne) et l'hydroxyproline ( $\pm$  15% de la chaîne) (Rawn, 1990 ; Van der Rest *et al*, 1991).

Le marquage des collagènes se fait par incorporation de [ $^3\text{H}$ ]-proline, plus spécifique que la glycine bien que moins représentée.

La synthèse de collagène sera favorisée au détriment de l'élastine par addition d'acide ascorbique, qui est également un cofacteur important pour l'hydroxylation de la proline. La solubilité du collagène sera augmentée par l'ajout de  $\beta$ -aminopropionitrile fumarate qui empêche les "cross-linkings" entre les différentes molécules de collagène et donc la précipitation.

Enfin, le collagène sera purifié par précipitation au sulfate d'ammonium à 240 mg/ml, resuspendu dans l'acide acétique et pepsinisé pour l'analyse des différentes chaînes par électrophorèse. La purification se fait en présence d'inhibiteurs de protéases et à l'aide de matériel autoclavé.

### G2. Solutions

1. L-[2,3- $^3\text{H}$ ] proline 1 mCi/ml (Amersham, Grande-Bretagne).
2. Acide ascorbique à 2,5 mg/ml dans PBS (Merck).
3.  $\beta$ -aminopropionitrile ( $\beta$ -APN, Sigma) à 8 mg/ml dans PBS.
4. Phénylméthanesulfonyl fluoride (PMSF, Sigma) 200 mM dans l'éthanol absolu (solution extemporanée).
5. EDTA (Merck) 2 M dans PBS.
6. N-éthylmaléimide (NEM, Janssen Chemica, Belgique) 1 M dans l'éthanol absolu, à dissoudre dans un tube en verre.
7. Benzamidine (Sigma) 500 mM dans PBS.
8. Sulfate d'ammonium (Merck) à 240 mg/ml d'eau.
9. Acide acétique (Merck) 0,5 M.
10. Pepsine (Sigma) à 10 mg/ml d'acide acétique.
11. NaOH (Merck, RFA) 10 N.

### G3. Méthode

Celle-ci a été mise au point à l'Institut de Biologie et de Chimie des Protéines de Villeurbanne (France), par l'équipe du Professeur D.Herbage.

Les CML sont repiquées dans des boîtes T25. Pour une boîte T25 contenant 3 ml de milieu de culture, on ajoute stérilement 30  $\mu$ l d'acide ascorbique (25  $\mu$ g/ml final) filtré, 30  $\mu$ l de  $\beta$ -APN (80  $\mu$ g/ml final) filtré, 50  $\mu$ l de [ $^3$ H]-proline (50  $\mu$ Ci final) et une atmosphère contenant 8% de CO<sub>2</sub>.

Après 24 heures d'incubation à 37°C, le milieu est prélevé et centrifugé à 1000 rpm pendant 10 minutes, afin d'éliminer les cellules mortes. Parallèlement, le tapis cellulaire est lysé en vue d'un dosage de protéines (voir point F).

La totalité du surnageant est récolté dans un tube (Sterilin, Grande-Bretagne) et additionné de 30  $\mu$ l de chaque inhibiteur de protéases : PMSF (2 mM final), EDTA (20 mM final), NEM (10 mM final), benzamidine (5 mM final). Il est alors placé 5 minutes dans la glace.

Les échantillons sont ensuite transférés dans des petits pots contenant 720 mg de sulfate d'ammonium, puis agités pendant 3-4 heures à 4°C. On laisse reposer et précipiter toute la nuit.

Le lendemain, le précipité est récupéré et le pot rincé avec 1 ml d'une solution de sulfate d'ammonium à 240 mg/ml d'eau. On centrifuge le tout à 11500 rpm à 4°C pendant 30 minutes. Une seconde précipitation a lieu en lavant le culot avec 3 ml de la solution de sulfate d'ammonium, puis en centrifugeant de la même façon.

Le culot de collagène est alors resuspendu dans 400  $\mu$ l d'acide acétique 0,5 M et pepsinisé pendant 10 heures à 4°C sous forte agitation par l'ajout de 40  $\mu$ l de pepsine (1 mg/ml final).

La pepsine, qui agit en milieu acide, est neutralisée par 40  $\mu$ l de NaOH 10 N. Après homogénéisation, on prélève 25  $\mu$ l d'échantillon auxquels on ajoute 5 ml d'Aqualuma (Lumac, Landgraaf, Pays-Bas) et la quantité de radioactivité est mesurée pendant 3 minutes au moyen d'un compteur à scintillation (Beckman).

Les échantillons de collagène purifiés sont congelés à -20°C en attendant l'électrophorèse analytique.



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

### H1. Principe

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

En présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS), chargé négativement, les protéines sont dénaturées et acquièrent toutes une charge négative. De ce fait, la migration des protéines se fait uniquement en fonction de leur poids moléculaire.

Les gels de polyacrylamide résultent de la polymérisation du monomère d'acrylamide en présence d'un agent bifonctionnel (le N,N' méthylène bisacrylamide) qui relie les chaînes polymériques entre elles. La réaction est initiée par des catalyseurs produisant des radicaux libres : le persulfate d'ammonium (APS) et le N,N,N',N' tétraméthyléthylamine ou TEMED. (Fig. II.3). La taille des pores du réseau tridimensionnel des gels de polyacrylamide est fonction du pourcentage d'acrylamide et inversement proportionnelle à la quantité d'agent réticulant.

Un gel d'empilement (stacking gel) placé au sommet du gel de séparation (running gel) a pour rôle de concentrer les protéines avant la séparation.

Le fluorogramme, quant à lui, représente en fait une amplification des rayonnements  $\beta$  du tritium amplifiés par formation de photons par une solution adéquate ("enhancer").

### H2. Solutions

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

2. Tampon "lower gel stock" : Tris 1,5 M, SDS 0,4 %, dans 100 ml d'eau distillée, pH 8,8 (Merck, RFA).
3. Tampon "upper gel stock" : Tris 0,5 M, SDS 0,4 %, dans 100 ml d'eau distillée, pH 6,8.
4. Tampon échantillon : Tris 0,065 M, SDS 3 %, bleu de bromophénol (Janssen Beerse) 0,002 %, glycérol (Merck, RFA) 10 %, dans 100 ml d'eau distillée, pH 6,8.
5. Tampon d'électrophorèse : Tris 0,025 M, glycine (Merck, RFA) 0,192 M, SDS 0,1 %, dans 2 litres d'eau distillée, pH 8,3.
6. TEMED (Gibco BRL Gaithersburg, USA).
7. Persulfate d'ammonium (APS, Bio-Rad, Richmond, USA) 10 % dans 1 ml d'eau distillée, préparé extemporanément.
8. Dithiothréitol (DTT, Sigma, St Louis, USA) 1 M.
9. Etalon de protéines de haut poids moléculaire (Bio-Rad, Richmond, USA).
10. Solution de bleu de coomasie : 45,4 % d'eau distillée, 45,4 % d'éthanol (Merck, RFA), 9,2 % d'acide acétique glacial (Merck, RFA), 0,25 % de bleu de coomasie en poudre (Janssens Chemica, Beerse, Belgique).
11. Solution de décoloration : 30 % éthanol (Merck, RFA), 10 % acide acétique glacial (Merck, RFA), 60 % eau distillée.
12. En<sup>3</sup>hancer (Dupont NEN, ...).

### H3. Préparation du gel

Les gels sont coulés entre 2 plaques de verre propres, adaptables dans une cuve à électrophorèse BRL (Gaithersburg, USA).

Pour le "running gel" (51 ml, gel à 6,5 % d'acrylamide), on mélange dans un erlenmeyer :

- 11 ml d'acrylamide stock
- 12,8 ml de "lower gel stock"
- 27,2 ml d'eau distillée.

Cette solution est dégazée pour éliminer l'oxygène qui peut interférer avec la polymérisation. Puis, on ajoute :

- 272 µl d'APS
- 27,2 µl de TEMED.



La polymérisation se fait pendant environ 1 heure, en recouvrant le gel par une couche d'isobutanol saturé en eau, afin d'obtenir une surface plane et éviter le contact avec l'O<sub>2</sub>.

Pour le "stacking gel" (10 ml, gel à 3 % d'acrylamide), on mélange :

- 1 ml d'acrylamide stock
- 2,5 ml d'"upper gel stock"
- 7 ml d'eau distillée
- 30 µl d'APS
- 10 µl de TEMED.

Dès que ce gel est coulé, on y place le peigne et on laisse polymériser pendant 1 heure. Les plaques sont ensuite montées dans la cuve qui sera remplie par le tampon d'électrophorèse.

#### **H4. Préparation des échantillons et migration**

Pour les différents échantillons de collagène purifié, la même quantité de DPM doit être déposée par puits. Chaque fraction déposée contient 2/3 d'échantillon, 1/3 de tampon-échantillon et est dénaturée pendant 3 minutes à 80°C. Pour les fractions devant être réduites, on ajoute 1/100 en volume de DTT (10 mM final) avant le tampon-échantillon.

L'étalon de poids moléculaire est dilué 20 fois dans le tampon-échantillon et dénaturé.

La migration se fait pendant 30 minutes à 20 mA et pendant plusieurs heures à 30 mA, jusqu'à ce que le bleu de bromophénol ait parcouru l'entièreté du gel.

Après migration, le gel est démoulé et coloré pendant 30 minutes dans le bleu de coomassie, puis décoloré dans la solution de décoloration.

#### **H5. Fluorogramme**

Le gel est ensuite trempé pendant 1 heure dans la solution d'En<sup>3</sup>hancer et rincé à l'eau distillée pendant 30 minutes (le gel devient alors blanc). Après rinçage, il est séché entre 2 feuilles de Cellophane et placé dans une cassette Kodak X-Omatic (Kodak, USA) contenant un film Hyperfilm M-P (Amersham, Danemark) préflashé. le préflashage permet une analyse quantitative de l'intensité des différentes bandes du gel.

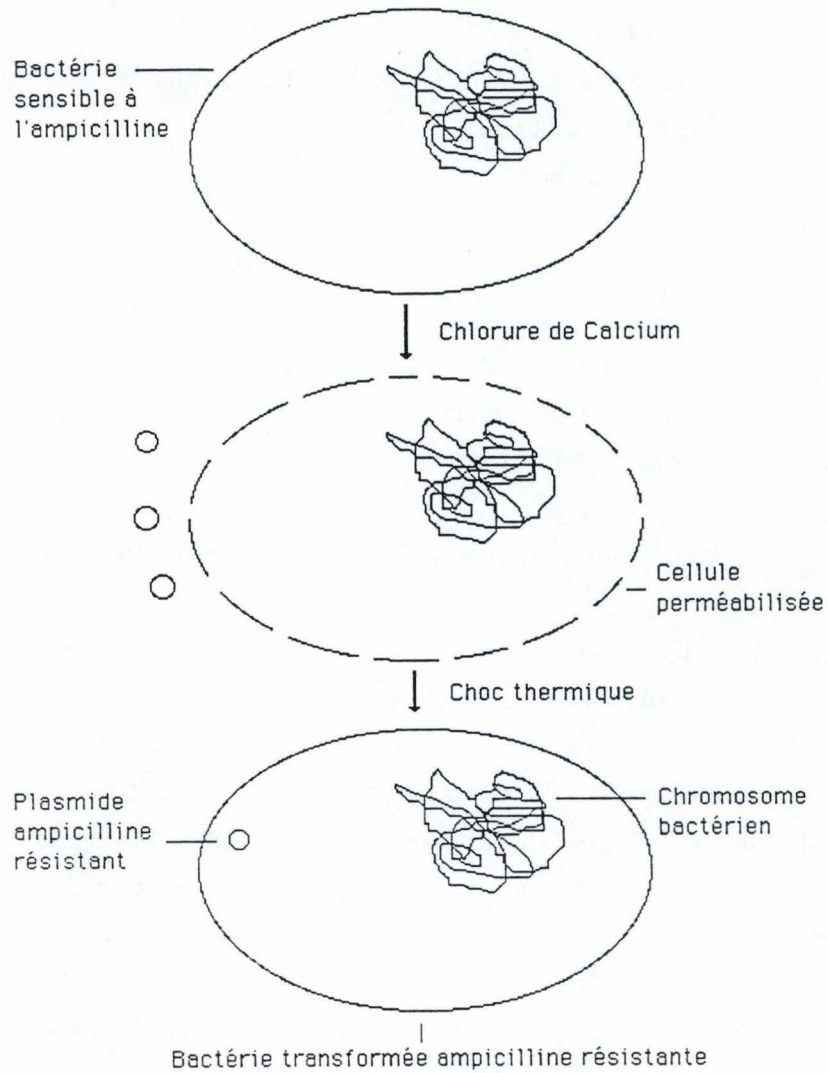


Figure II.4 : Principe général de la transformation bactérienne par un ou plusieurs plasmides contenant un gène de résistance à l'ampicilline.

Le film autoradiographique est révélé quelques jours après, suivant la quantité de DPM déposée dans les puits. Ces 2 dernières étapes doivent se dérouler en chambre noire.

Le fluorogramme sera analysé par le logiciel BioImage (SUN).

## **II. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE**

Toutes ces techniques ont été utilisées en vue de la réalisation de northern blot pour la mise en évidence des ARN messagers des différentes chaînes de collagène.

### **A. TRANSFORMATION BACTERIENNE**

#### **A1. Principe**

La transformation bactérienne consiste à introduire de l'ADN exogène (plasmide) dans une bactérie (Fig. II.4). Pour ce faire, la bactérie est perméabilisée par passage dans une solution hypotonique de chlorure de calcium, qui déstabilise la paroi et la membrane. La bactérie gonfle et prend l'aspect d'un sphéroplaste. Elle est alors dite compétente.

Lors d'un choc thermique, l'ADN pénètre dans la bactérie. Suite à cela, une incubation d'au moins 30 minutes à 37°C en milieu LB est nécessaire à la bactérie pour régénérer sa paroi et commencer à exprimer le gène de résistance apporté par le plasmide.

Enfin, les bactéries sont étalées sur un milieu sélectif où seules les bactéries transformées, c'est-à-dire celles ayant reçu le plasmide portant le gène de résistance à un antibiotique (= l'agent sélectif), pourront croître.

#### **A2. Solutions**

1. Milieu de culture bactérien LB liquide : pour 1 litre d'eau distillée :  
-10 gr de Bactotryptone (Difco, Michigan, USA)

-5 gr de Yeast Extract (Difco, Michigan, USA)

-10 gr de NaCl (Merck, RFA), porté à pH 7-7,4 avec NaOH 1N, puis autoclavé. Les antibiotiques seront toujours ajoutés après autoclavage :

-ampicilline : 50 µg/ml

-tétracycline : 10 µg/ml.

2. Milieu LB solide : milieu LB liquide comme ci-dessus, solidifié par adjonction de Bactoagar (Difco, Michigan, USA) 2% et coulé dans des boîtes de Pétri (de 65 mm de diamètre). Celles-ci sont séchées pendant 2 ou 3 heures sous la hotte à flux laminaire et entourées par du parafilm, puis conservées à 4°C (couvercle vers le bas).

3. Tris 10 mM pH 7,0 - NaCl 100 mM (Merck, RFA), autoclavé.

4. Tris 10 mM pH 7,0 - CaCl<sub>2</sub> 100 mM (Merck, RFA), autoclavé.

5. Bactéries congelées dans du glycérol 15%.

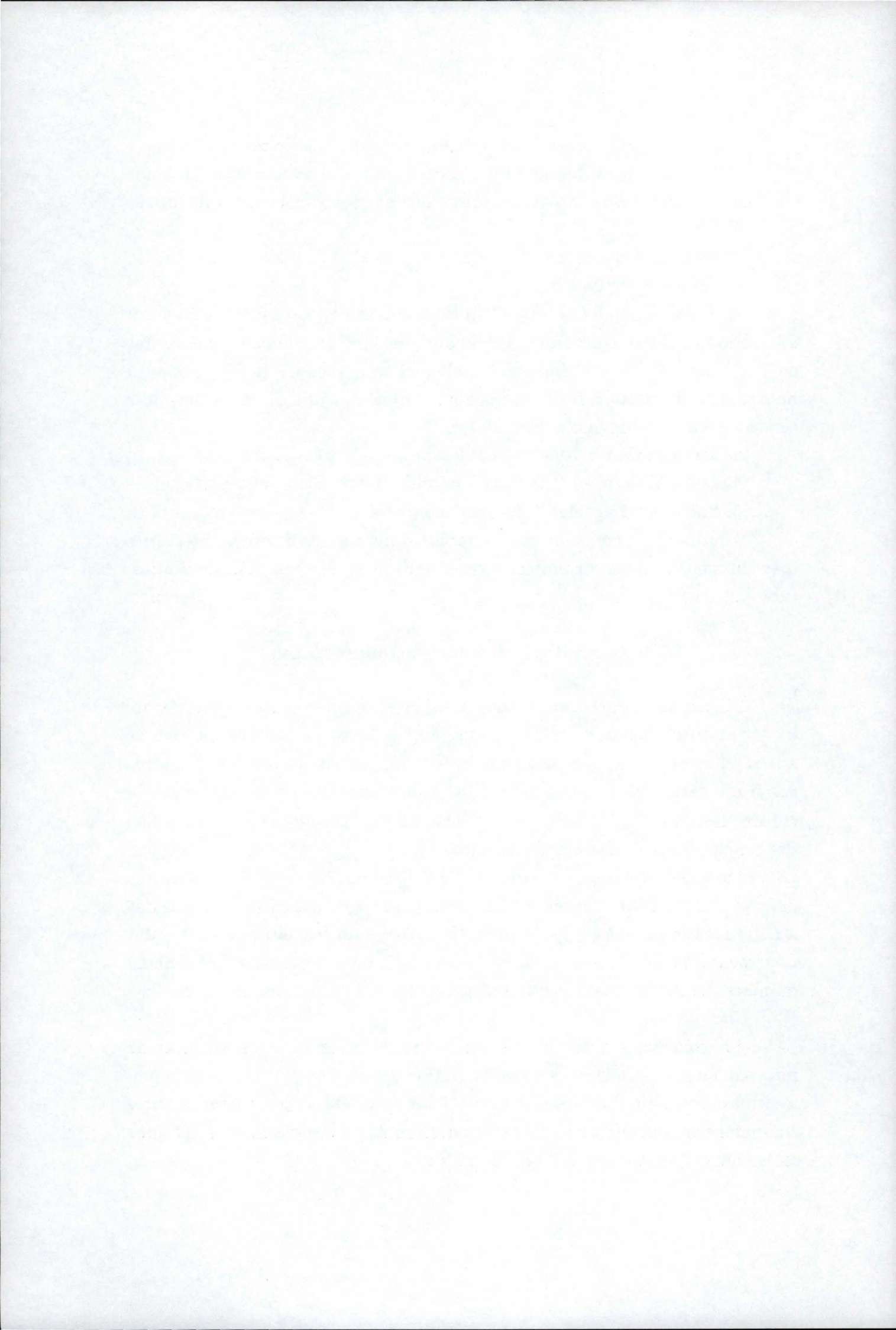
Toutes les manipulations se feront dans un environnement stérile (bec Bunsen) et avec du matériel stérile (Eppendorfs, spatule, bouteilles, tubes, ...).

### **A3. Préparation des cellules compétentes**

Au moyen d'une spatule stérile, on prélève une certaine quantité de bactéries qu'on dépose dans 5 ml de milieu LB. Cette préculture sera agitée à 37°C durant quelques heures. Lorsque le milieu est trouble, on transfère ces 5 ml dans 100 ml de milieu LB. Il faut ensuite agiter fortement la culture pendant 1 à 4 heures à 37°C jusqu'à obtenir une absorbance à 650 nm de 0,3 (phase de croissance logarithmique).

On prélève 20 ml de la culture, stoppée par un passage de 10 minutes dans la glace. Le tube contenant les 20 ml est ensuite centrifugé 10 minutes à 5000 rpm (rotor JA20, Beckman). Le surnageant est éliminé et le culot resuspendu dans 20 ml de Tris-NaCl 100 mM, puis centrifugé de la même manière. Le surnageant est décanté et le culot redissous dans 10 ml de Tris-CaCl<sub>2</sub> 100 mM.

La solution est laissée au moins 20 minutes dans la glace et de nouveau centrifugée 10 minutes à 5000 rpm à 4°C. Le culot est resuspendu délicatement dans 2 ml de CaCl<sub>2</sub> à 4°C. A cette étape, les bactéries dites compétentes peuvent être réparties en aliquots et congelées à -70°C dans cette solution contenant du glycérol à 15%.



#### **A4. Transformation bactérienne proprement-dite**

A 200  $\mu\text{l}$  de cellules compétentes, il ne faut pas ajouter plus d'1  $\mu\text{g}$  d'ADN.

On incube 30 à 40 minutes sur la glace, puis on provoque un choc thermique (2 minutes à 42°C). Pour permettre la régénération de la membrane, on ajoute 500  $\mu\text{l}$  de LB et on laisse incuber 30 à 60 minutes à 37°C, avant d'étaler sur des boîtes de milieu LB contenant de l'ampicilline.

Parallèlement, des contrôles sont réalisés :

- contrôle négatif (témoin de résistance à l'ampicilline) : des cellules compétentes sans ADN subissent les conditions de transformation sont étalées sur milieu avec ampicilline pour vérifier la validité du test de sélection et le taux de mutants spontanés.
- contrôle positif : des cellules compétentes sans ADN ayant subi les mêmes conditions de traitement sont étalées sur un milieu sans ampicilline (non sélectif) pour vérifier la viabilité des cellules compétentes.

### **B. EXTRACTION D'ADN SUR COLONNE QIAGEN (Midiprep)**

#### **B1. Principe**

Le kit QIAGEN, commercialisé par Westburg, comporte, comme toute extraction d'ADN, 4 étapes :

- la lyse cellulaire
- la précipitation des protéines
- l'extraction de l'ADN
- la concentration de l'ADN par précipitation.

Après avoir lysé les bactéries dans des conditions alcalines, le lysat est déposé dans un milieu à concentration saline particulière, au sommet d'une colonne QIAGEN.

Ces colonnes sont des échangeuses d'anions. Par un processus spécial, un silicagel macroporeux, avec des particules de taille voisine de 100  $\mu\text{m}$ , est recouvert avec une substance hydrophile qui empêche les fixations non

spécifiques. La résine est traitée de telle sorte que la densité de charges positives est maximale en surface. Il en résulte une capacité de séparation très large, allant jusqu'à 1,4 M en NaCl, concentration qui représente le point d'éluion de l'ADN double brin. Les autres molécules comme l'ARN, les protéines et les divers contaminants cellulaires sont élués à des molarités plus faibles, car elles sont moins spécifiques pour la colonne.

Les quantités récoltées par cette méthode approximent les 100 µg, à partir de 30 à 150 ml de culture.

## B2. Solutions

1. Milieu de culture LB liquide avec antibiotiques (voir point II.A.2.).
2. Tampon P1 : 100 µg de RNase A, 50 mM Tris (Merck, RFA), 10 mM EDTA (Merck, RFA), pH 8,0.
3. Tampon P2 : 200 mM NaOH (Merck, RFA), 1 % SDS (Merck, RFA), à faire juste avant usage.
4. Tampon P3 : 3 M acétate de potassium (Merck, RFA), pH 5,5.
5. Tampon QBT : 750 mM NaCl, 50 mM MOPS (Sigma, St Louis, USA), 15 % éthanol (Merck, RFA), pH 7,0, 0,15 % Triton X-100 (Merck, RFA).
6. Tampon QC : 1 M NaCl, 50 mM MOPS, 15 % éthanol, pH 7,0.
7. Tampon QF : 1,25 M NaCl, 50 mM Tris, 15 % éthanol, pH 8,5.
8. Eau distillée stérile (autoclavée).
9. Isopropanol (Merck, RFA).
10. Ethanol 70 % gardé à -20°C (Merck, RFA).

## B3. Méthode

Les bactéries transformées sont mises en préculture dans 5 ml de milieu LB contenant l'antibiotique (ampicilline ou tétracycline selon le plasmide à purifier), à 37°C pendant 2-3 heures. Elles sont ensuite transférées dans 100 ml de milieu LB sélectif, pour toute la nuit, à 37°C sous forte agitation.

Les bactéries sont récoltées par centrifugation à 4000 rpm pendant 20 minutes (rotor JA 20, Beckman). Le culot des bactéries est resuspendu dans 4 ml de tampon P1 contenant des RNases, afin d'éviter une compétition de l'ARN pour la colonne.

La lyse cellulaire se fait pendant 5 minutes maximum par ajout de 4 ml de P2, homogénéisé avec précaution. Le NaOH dénature l'ADN chromosomique et plasmidique. Le lysat est neutralisé par 4 ml de P3 froid, ce qui provoque une précipitation des protéines et du chromosome bactérien, et une renaturation du plasmide.

On laisse 15 minutes sur glace, après avoir délicatement retourné le tube plusieurs fois. L'ADN plasmidique (plus court) en solution est récupéré par une centrifugation de 30 minutes à 12000 rpm à 4°C.

Entre-temps, on équilibre une colonne QIAGEN-Tip 100 avec 4 ml de QBT, puis on y dépose le surnageant récolté après centrifugation. La colonne ne doit jamais être séchée.

Quand tout le surnageant est passé, la colonne est rincée 2 fois avec 10 ml de QC (NaCl 1M) qui enlève l'entièreté des contaminants sans affecter la liaison du DNA plasmique. Celui-ci est élué par 5 ml de QF (NaCl 1,25 M) et récolté dans des eppendorfs.

L'ADN est précipité en ajoutant 0,7 volume d'isopropanol. Après homogénéisation, on centrifuge pendant 30 minutes à 12000 rpm et à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot lavé dans 1 ml d'éthanol 70 % glacé, puis centrifugé 5 minutes à 13000 rpm. L'éthanol est décanté et le culot séché est resuspendu dans 20 µl d'eau stérile.

Le contrôle de la purification se fera par électrophorèse sur gel d'agarose.

## **C. RESTRICTION DE L'ADN**

### **C1. Principe**

Les endonucléases de restriction sont des endodéoxyribonucléases qui coupent l'ADN double brin au niveau de séquences nucléotidiques spécifiques (appelées sites de restriction), en clivant un lien phosphodiester sur chaque brin. Ces enzymes de restriction font partie du système de défense bactérien contre les invasions d'ADN exogène.

La majorité des sites spécifiques reconnus par ces enzymes sont des séquences palyndromiques, comprenant de 4 à 8 paires de bases.



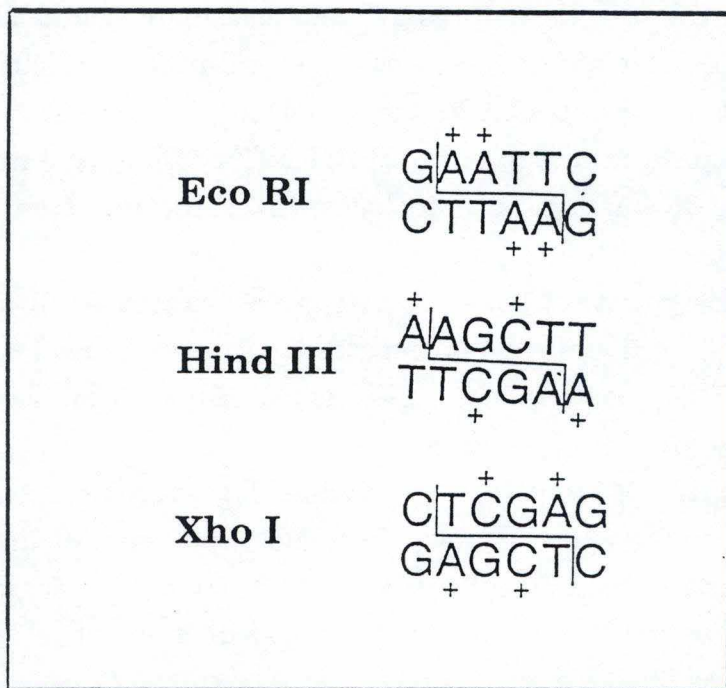


Figure II.5 : Représentation des trois sites de restriction des enzymes que nous avons utilisées : Eco RI, Hind III, Xho I.

On distingue 2 types d'enzymes : celles qui clivent en générant des bouts collants (extrémités protrudantes) et celles qui clivent en générant des bouts francs (extrémités droites). Après restriction, les fragments d'ADN ont un groupement phosphate côté 5' et un groupement hydroxyle côté 3'.

## C2. Solutions

Toutes les enzymes utilisées ici (voir Fig. II.5), de même que leur tampon adéquat, proviennent de la firme Boehringer (RFA). Ils sont conservés à -20°C.

1. Tampon B : 10 mM TrisHCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaCl, 1 mM β-mercaptoéthanol, pH 8,0.

2. Tampon H : 50 mM TrisHCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 1 mM DTE, pH 7,5.

Enzyme :	Tampon (10X concentré) :	Concentration (U/μl) :
Eco RI	H	10
Hind III	B	10
Xho 1	H	10

La double restriction Hind III/Xho 1 se fait dans du tampon B.

3. Eau stérile.

## C3. Méthode

Les enzymes doivent être utilisées dans des conditions de température et de tampon optimales, définies par la firme.

Dans un eppendorf stérile, on dépose :

- l'ADN à restreindre (1 μl d'ADN obtenu à partir de la midi-prep)
- le tampon de digestion adéquat (1/10 du volume final)
- l'enzyme de restriction (10 U/μg d'ADN).

Le volume est amené à 20 μl avec de l'eau stérile.

La restriction se fait à 37°C.

L'ADN est analysé par électrophorèse sur gel d'agarose.

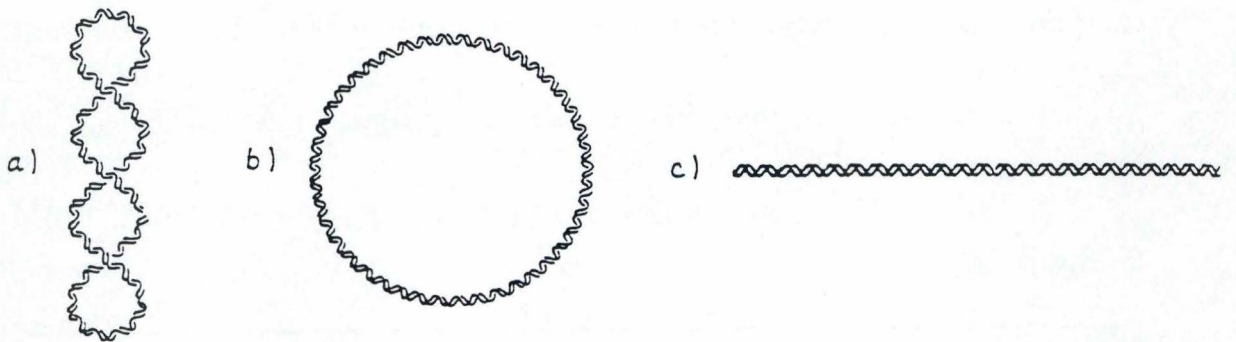


Figure II.6 : L'ADN plasmidique se trouve sous trois configurations différentes. En (a), la forme CCC (covalently closed circular) : forme superenroulée, en (b) la forme OC (open circular) : plasmide circulaire sans superenroulement et en (c) la forme L (linear) : plasmide linéarisé par restriction.

## D. ANALYSE DE L'ADN SUR GEL D'AGAROSE

### D1. Principe

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet de séparer, de visualiser et d'estimer la taille et la quantité de fragments d'ADN.

A pH neutre, les acides nucléiques sont chargés négativement au niveau de leurs groupes phosphates. Dans un champs électrique, l'ADN migrera donc vers la borne positive. Contrairement aux protéines, le rapport charge nette électrique et taille est toujours identique, quels que soient les brins d'ADN.

La vitesse de migration peut dépendre de plusieurs facteurs :

-la conformation de l'ADN. En effet, celui-ci peut se retrouver sous différentes formes : forme circulaire ouverte (OC : Open Circular) qui migre plus vite que la forme linéaire ouverte (OL : Open Linear) mais moins vite que la forme superenroulée (CCC : Covalently Closed Circular), plus compacte (voir fig. II.6).

-la taille du fragment : la vitesse de migration étant inversement proportionnelle à celle-ci.

-le voltage : la vitesse de migration est proportionnelle au voltage appliqué.

-la concentration en agarose (de 0,8 à 2 %) : plus les fragments d'ADN sont grands, plus la taille des pores doit être grande et donc le pourcentage en agarose faible.

Pour visualiser les fragments d'ADN, le bromure d'éthidium est ajouté dans le gel d'agarose. Il a la particularité de s'intercaler entre les bases de l'ADN et sa fluorescence aux U.V. permet la visualisation de l'ADN (voir Fig. II.7).

Grâce à cette technique, nous pouvons déduire :

-la taille des fragments : dans un puits voisin, on fait migrer un marqueur de taille (molécule d'ADN clivée par une enzyme de restriction générant des fragments de taille connue). Grâce à ce marqueur, on peut établir une courbe d'étalonnage donnant le logarithme du PM en fonction de la distance de migration. Connaissant la distance de migration des échantillons, on peut ainsi estimer leur taille.

-la quantité d'ADN par bande : la quantité de bromure d'éthidium étant proportionnelle à la quantité d'ADN, plus la bande sera fluorescente et plus

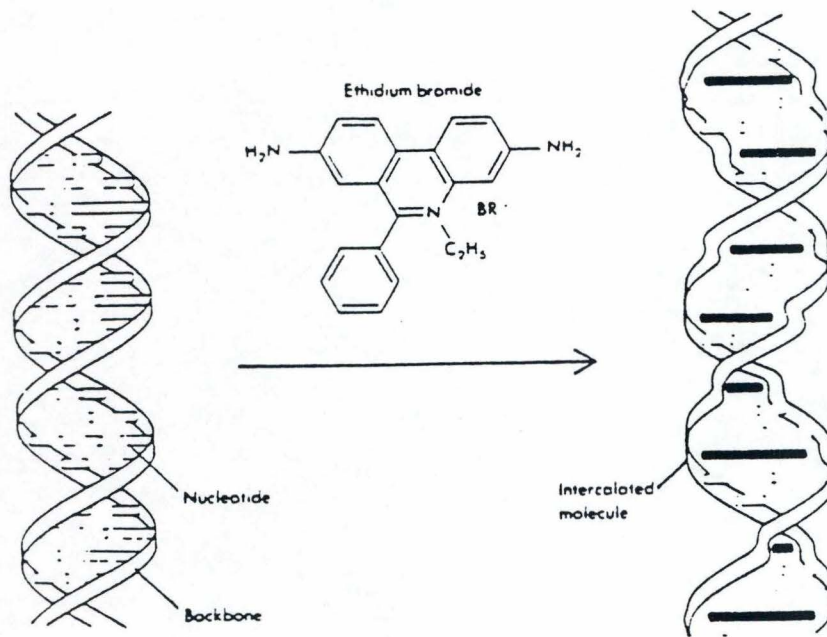


Figure II.7 : Visualisation de l'ADN au bromure d'éthidium. Les molécules de bromure d'éthidium s'intercalent entre les bases azotées de la double hélice.

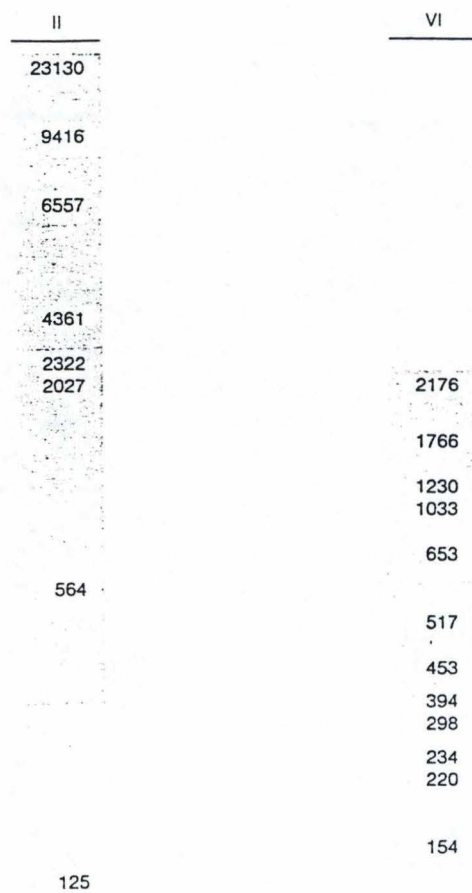


Figure II.8 : Etalons de taille pour gel d'agarose II et VI (Boehringer). Les valeurs sont données en paires de bases.

il y aura d'ADN. En connaissant la quantité d'ADN de chaque bande du marqueur, nous pouvons estimer la quantité d'ADN de notre échantillon.

## D2. Solutions

1. Tampon de migration TBE. Pour 1 litre d'eau :

-10,8 gr de Tris

-5,5 gr d'acide borique

-0,93 gr d'EDTA (Merck, RFA)

2. Tampon porteur. Pour 10 ml :

-25 mg de bleu de bromophénol (Sigma, USA)

-5 ml de glycérol (Merck, RFA)

-0,5 ml d'EDTA 1 M (0,05 M final), on porte à volume avec de l'eau distillée.

3. Agarose High Strength Analytical Grade (Bio-Rad, Richmond, USA)

4. Solution stock de bromure d'éthidium à 10 mg/ml, à conserver à 4°C et à l'obscurité.

5. Marqueur de taille (Boehringer, RFA) : ADN du phage  $\lambda$  restreint par Hind III, marqueur II ou VI selon la taille des échantillons (voir Fig. II.8).

## D3. Méthode

### *D3.1. Préparation du gel*

On prépare 80 ml d'agarose (0,8 à 2 %, suivant la taille des échantillons) dans le tampon de migration TBE. L'agarose sera dissous en faisant bouillir la solution dans un four à micro-ondes. Lorsqu'elle est refroidie à environ 50°C, on y ajoute 3  $\mu$ l de solution stock de bromure d'éthidium (0,03  $\mu$ g/ml final).

Le gel est alors coulé dans une cuve horizontale BRL contenant un moule en plexiglas et un peigne. Les bulles d'air doivent être éliminées.

Lorsque le gel est solidifié, le peigne est enlevé et le tampon d'électrophorèse est versé dans la cuve, de manière à recouvrir le gel.

### *D3.2. Préparation des échantillons et migration*

Avant d'être déposés dans les puits, les échantillons sont additionnés de tampon porteur (1/10 en volume). Le glycérol augmente la densité de l'échantillon et l'entraîne au fond du puits, tandis que le bleu de bromophénol permet de suivre le front de migration.

Les électrodes sont connectées au générateur, la cathode (pôle +) étant la plus éloignée des puits. Sous une différence de potentiel de 80 à 100 V, l'électrophorèse dure environ 2 heures.

Le gel est ensuite observé aux U.V. sur un transilluminateur et photographié grâce à un système Polaroid.

## **E. EXTRACTION DE L'ADN A PARTIR D'UN GEL D'AGAROSE**

### **E1. Principe du kit Geneclean II (Bio 101 Inc)**

Ce kit permet d'extraire du gel d'agarose un fragment d'ADN après que celui-ci ait été restreint par une enzyme et séparé par électrophorèse. Un cube d'agarose contenant la bande d'ADN d'intérêt est découpé hors du gel, l'ADN en est extrait et purifié grâce à une matrice de silice. A concentrations salines élevées, l'ADN s'absorbe sur les billes de silice et est élué en diminuant la concentration en sels.

### **E2. Solutions**

1. Tampon TE : Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0, autoclavé.

2. Le kit contient les solutions suivantes :

-NaI 6 M

-TBE Modifier<sup>TM</sup>

-NEW Concentrate (solution concentrée de Tris, NaCl, EDTA) qui permet de faire la solution "NEW Wash" en mélangeant :

-14 ml de NEW Concentrate

-280 ml d'eau distillée

-310 ml d'éthanol 100 %, stockée à -20°C.

-GLASSMILK : suspension d'une matrice de silice dans de l'eau, stockée à 4°C.



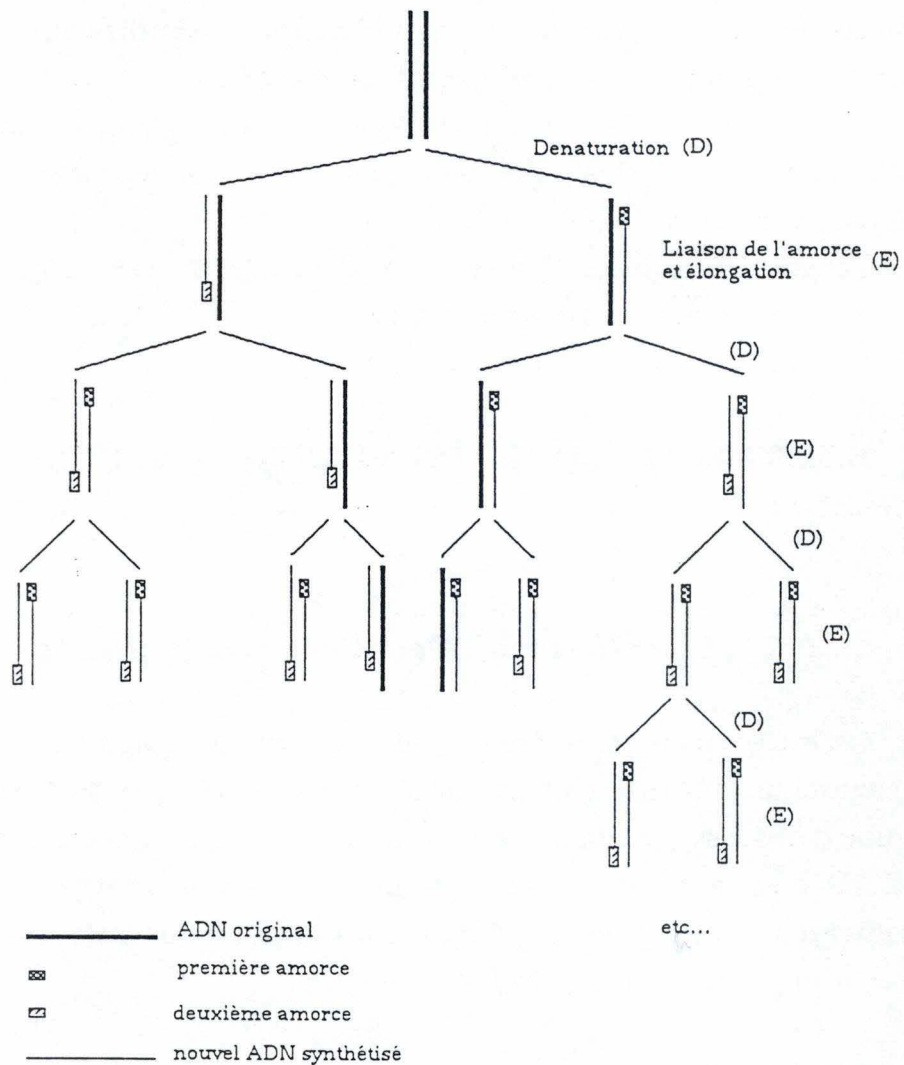


Figure II.9 : Principe général d'une amplification d'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction). L'ADN original est mis en présence de deux amorces qui lui sont spécifiques, de dNTPs et de *Taq* Polymerase. A chaque étape de dénaturation et d'élongation, la quantité de brins d'ADN produits est multipliée par deux.

### E3. Méthode

Les fragments d'ADN sont séparés après restriction par électrophorèse sur gel d'agarose. La bande d'intérêt est visualisée sous U.V. et découpée hors du gel. Le morceau d'agarose est pesé et réduit en petits cubes de 2 mm dans un tube. On ajoute 4,5 volumes de NaI et 0,5 volume de TBE Modifier<sup>TM</sup>. Le tube est incubé à 50°C jusqu'à dissolution complète de l'agarose (l'ADN est alors libéré).

Pendant ce temps, les billes de silice (GLASSMILK) sont resuspendues en les vortexant. On ajoute dans le tube 5 µl de la solution de GLASSMILK pour 5 µg au moins de DNA. Après homogénéisation, le tube est placé sur la glace pendant 5 minutes, en agitant régulièrement.

Le complexe ADN/silice est précipité en centrifugeant pendant 5 secondes (Janetsky). Le surnageant est éliminé, tandis que le culot est lavé 3 fois dans 700 µl de "NEW Wash" à 0°C, puis centrifugé pendant quelques secondes.

Après le troisième lavage, le dernier culot est resuspendu dans 10 µl de TE et incubé à 50°C pendant 3 minutes, afin de dissocier l'ADN des billes de silice. On centrifuge pendant 30 secondes et on transvase le surnageant contenant l'ADN élué. Cette opération est répétée une seconde fois de façon à obtenir un volume final de 20 µl.

L'efficacité de la purification est vérifiée en déposant quelques µl sur gel.

## F. MARQUAGE DE SONDE D'ADN PAR PCR

### F1. Principe

L'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique rapide permettant, in vitro, l'amplification par voie enzymatique (ADN polymérase) d'un fragment d'ADN se trouvant entre 2 régions de séquences connues, servant d'amorces (Fig.II.9).

Cette méthode met en jeu la répétition (souvent de 20 à 50 fois) d'un cycle de 3 étapes (voir Fig. II.10) :

-la dénaturation de l'ADN matrice à 95°C.

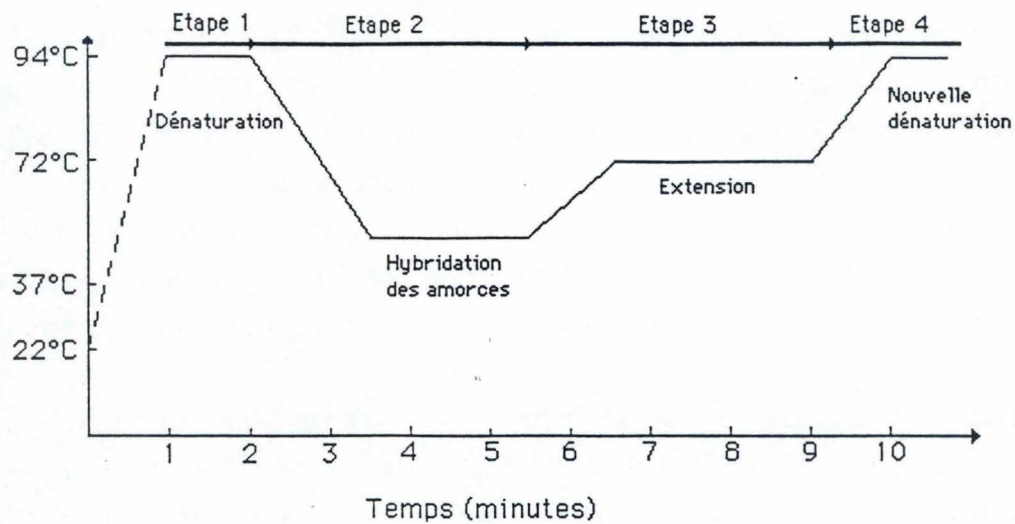


Figure II.10 : Graphe reprenant les différentes étapes nécessaires à l'amplification d'un morceau d'ADN par PCR. Chaque étape (dénaturation, hybridation des amorces, et élongation) se fait à une température bien précise. Un cycle de PCR consiste en la somme des trois étapes (dénaturation, hybridation et élongation).

-l'appariement : au cours de cette étape, chaque amorce s'hybride au brin complémentaire de la séquence matrice.

-l'extension : l'ADN polymérase va, à partir de l'extrémité 3' libre de chaque amorce, synthétiser un nouveau brin complémentaire de la matrice.

Comme les produits d'un cycle d'amplification servent de matrice pour le cycle suivant, la quantité de matériel produit double au cours de chaque cycle, conduisant à une accumulation exponentielle de la séquence cible.

## **F2. Composants d'une PCR**

### ***F2.1. Les amorces***

Le choix des amorces détermine le succès ou l'échec d'une PCR. Les amorces ont préférentiellement de 20 à 24 nucléotides de longueur et une composition de 50 à 60 % en G + C. Les 2 oligonucléotides ne doivent pas être complémentaires l'un de l'autre. Habituellement, la concentration utilisée est de 1  $\mu$ M.

### ***F2.2. L'ADN-cible***

L'ADN contenant la séquence cible peut être ajouté sous forme bicaténaire. Puisque la capacité d'amplification est énorme, la technique requiert de très faibles quantités d'ADN. Pour éviter une amplification d'ADN contaminant, il est nécessaire d'utiliser du matériel et des solutions autoclavés.

### ***F2.3. L'ADN polymérase***

L'utilisation d'une ADN polymérase thermostable, la Taq polymérase, isolée à partir de la souche bactérienne thermophile *Thermus aquaticus*, a grandement facilité la technique PCR, grâce à son optimum de température se situant aux environs de 72°C. Comme la Taq polymérase n'est pas inactivée durant l'étape de dénaturation à 95°C, les cycles successifs peuvent se faire sans addition de nouvelle enzyme.

La concentration en enzyme est en général de 2,5 U/100 µl de solution réactionnelle.

#### ***F2.4. Le tampon de PCR***

Celui-ci doit contenir du  $Mg^{++}$  qui a un effet important sur la spécificité et le rendement de la réaction. En effet, la Taq polymérase nécessite des ions  $Mg^{++}$ .

Des concentrations de 1,5 mM sont en général adéquates pour une concentration en dNTPs de 200 µM.

#### ***F2.5. Les désoxyribonucléosides (dNTPs)***

Les 4 dNTPs doivent être ajoutés à concentrations égales pour éviter les erreurs d'incorporation et à concentration saturante (200 µM pour chaque). Les dCTPs seront marqués au  $^{32}P$ , en position  $\alpha$ .

### **F3. Mise en oeuvre**

#### ***F3.1. Conditions de cycle***

La PCR est réalisée à 3 températures successives différentes correspondant aux 3 étapes du cycle : dénaturation, appariement et extension (FigII.10). Les réactions sont réalisées dans un cycleur automatique (Techne PMC 3).

La dénaturation : lors du premier cycle, une incubation de 5 à 10 minutes à 95°C est recommandée afin de dénaturer tout le matériel pour l'étape d'hybridation des amorces. Pour les cycles suivants, une incubation d'une minute à 95°C est suffisante.

L'appariement : la température d'hybridation d'un couple d'amorces donné est à adapter en fonction de la composition en bases. Cette température se calcule comme suit : on additionne 2°C par base A ou T et 4°C par base G ou C. Les amorces étant ajoutées en très large excès, l'hybridation se fait de manière quasi-instantanée : une minute suffit.

L'extension : elle se fait à une température de 72°C, proche de l'optimum de température de la Taq polymérase. On compte, en général, une minute pour 2000bp, ce laps de temps étant largement suffisant. Au

cours des derniers cycles de PCR, la quantité de Taq polymérase peut devenir limitante. Lors du dernier cycle, une incubation de 10 minutes à 72°C est réalisée de manière à assurer la terminaison de toutes les séquences commencées.

### ***F3.2. Nombre de cycles***

Le nombre de cycles dépend de la concentration initiale de la séquence à amplifier et de la quantité désirée. Un nombre de cycles trop important ne peut conduire qu'à une amplification de produits non spécifiques.

### **F4. Solutions**

1. Taq polymérase (Promega, Pays-Bas) fournie dans un tampon contenant des agents stabilisants pour les hautes températures (solution stock : 50 % glycérol, 50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 200 µg/ml gélatine, 1 % Triton X-100).

2. Tampon de PCR 10 X (Promega, Pays-Bas) : 5 mM KCl, 100 mM TrisHCl pH 9, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 % gélatine, 1 % Triton X-100).

3. Amorces d'ADN (Eurogentec, Liège, Belgique).

4. ADN matrice.

5. dATP, dGTP, dTTP (Boehringer, RFA) dilués à une concentration stock de 100 mM.

6. [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (Amersham, Grande-Bretagne).

7. Huile minérale (Sigma, USA).

### **F5. Méthode**

La technique de la PCR a été utilisée pour amplifier des fragments des gènes de collagène  $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2. Ces fragments d'une longueur de 300 paires de bases environ sont contenus dans des plasmides.

Le protocole suivi pour l'amplification est identique pour les deux fragments  $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2, excepté les amorces d'ADN utilisées et le DNA plasmidique servant de matrice. Pour chacun des deux fragments d'ADN à amplifier, le mélange réactionnel contenait :

1. Tampon Taq polymérase : 5 µl

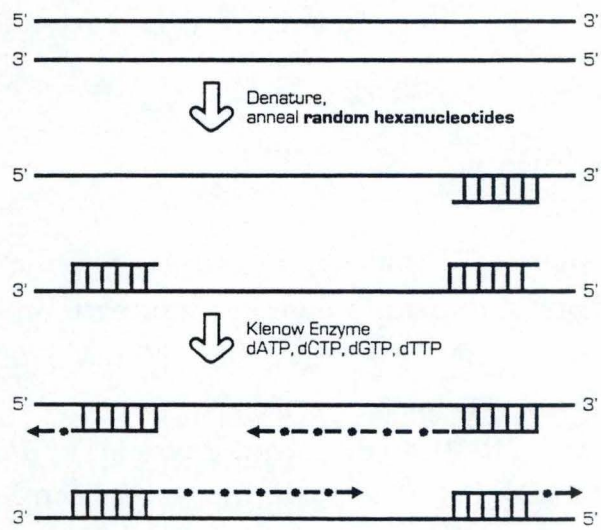


Figure II 11 : Principe général du marquage d'ADN par "random priming".

2. Taq polymérase : 0,5  $\mu$ l
3. Mélange de dATP, dGTP, dTTP, dCTP dilué 20 fois dans de l'eau : 8  $\mu$ l
4. [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP : 5  $\mu$ l
5. H<sub>2</sub>O stérile : 21,5  $\mu$ l
6. ADN plasmidique de collagène  $\alpha$ 1 ou  $\alpha$ 2 dilué dans du tampon de PCR (1 ng/ml final) : 5  $\mu$ l
7. Amorces d'ADN (primers) : 2,5  $\mu$ l d'amorce 29063 et 2,5  $\mu$ l d'amorce 2964 ont été ajoutés au mélange contenant l'ADN plasmidique de collagène  $\alpha$ 1, tandis que 2,5  $\mu$ l d'amorce 29061 et 2,5  $\mu$ l d'amorce 2962 ont été ajoutés au mélange contenant l'ADN plasmidique de collagène  $\alpha$ 2.

A chaque eppendorf contenant le mélange réactionnel, on ajoute 30  $\mu$ l d'huile minérale avant de lancer le programme de PCR. Les fragments de collagène  $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2 amplifiés par PCR sont ensuite purifiés sur spin colonne.

## G. MARQUAGE DE SONDE PAR RANDOM PRIMING

### G1. Principe

La méthode de marquage d'ADN par "random priming" est basée sur l'hybridation de tous les hexanucléotides possibles avec l'ADN que l'on veut marquer. Le brin complémentaire est synthétisé à partir de l'extrémité 3'-OH de l'hexanucléotide grâce à l'enzyme de Klenow. Des deoxynucléotides phosphates modifiés (radioactifs par exemple) présents dans la réaction sont incorporés dans le nouveau brin d'ADN formé. La longueur du fragment d'ADN à marquer n'a pas d'importance. Le principe général est repris à la figure II.11.



## G2. Solutions

La manipulation est réalisée grâce au kit "random priming DNA labeling kit" (Boehringer, Mannheim Allemagne) contenant :

- dATP 0,5mM
- dCTP 0,5mM
- dGTP 0,5mM
- dTTP 0,5mM
- Mixture d'hexanucléotides dans le tampon de réaction 10X concentré.
- Enzyme de Klenow à 2 unités/ $\mu$ l
- Le marquage se faisant en radioactivité, du dCTP radioactif ( $[\alpha^{32}P]$  dCTP 3000Ci (110TBq)/mmole de chez Amersham Grande Bretagne) est ajouté aux autres dNTPs.
- EDTA 0,2M pH 8

## G3. Méthode

La procédure suivie pour marquer des sondes par random priming est la suivante :

1. On dénature l'ADN à partir duquel on veut produire les sondes en le chauffant 10 minutes à 100°C et en le refroidissant directement dans la glace.
2. On met alors la mixture suivante dans un tube microfuge dans la glace et on ajuste le volume à 20 $\mu$ l :
  - 25ng d'ADN dénaturé
  - 3 $\mu$ l de dATP, dGTP, dTTP
  - 2 $\mu$ l de tampon de réaction
  - 5 $\mu$ l de dCTP radioactif
  - 1 $\mu$ l d'enzyme de Klenow.
3. On incube 30 minutes à 37°C.
4. On stoppe la réaction en ajoutant 2  $\mu$ l d'EDTA.
5. On élimine les dNTPs n'ayant pas réagi par spin colonne (voir paragraphe H)

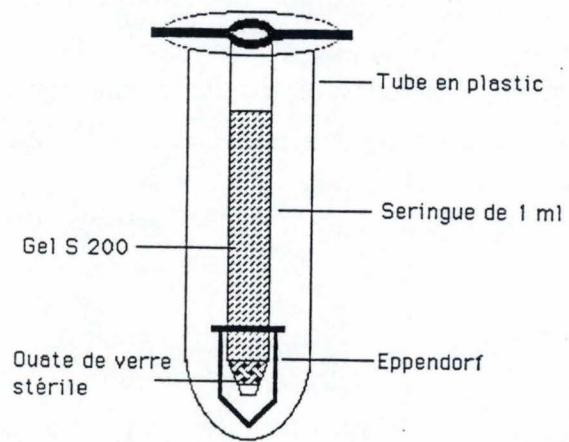


Figure II.12 : Schéma général d'une spin-colonne permettant la séparation de molécules de poids moléculaire différent.

## H. PURIFICATION D'ADN SUR SPIN COLONNE

### H1. Principe

Cette technique est utilisée pour purifier le produit d'une PCR, c'est-à-dire séparer le fragment amplifié des dNTPs non incorporés, des amorces, de l'huile et autres molécules contenues dans le tampon. Elle sera également utilisée pour purifier l'ADN synthétisé par "random priming".

Le principe est le même que pour une purification sur tamis moléculaire et donc basé sur une séparation selon le poids moléculaire (PM). Les molécules de PM supérieur à la porosité du gel (les fragments d'ADN) s'éluent en premier lieu, alors que les molécules de faible PM (nucléotides non incorporés) passant dans le volume total de la colonne, s'éluent ensuite.

### H2. Solutions

1. Tampon TE (voir point II.E2.).
2. Gel sephacryl S-200 (Pharmacia LKB, Uppsala, Suède), équilibré dans du tampon TE.

### H3. Méthode

Au moyen d'une pipette Pasteur stérile, le gel est coulé dans une seringue de 1 ml, bouchée préalablement par un peu d'ouate de verre stérile. La seringue est alors placée dans un tube en plastique et centrifugée 2 minutes à 2400 rpm pour tasser le gel. On centrifuge une seconde fois après avoir recoulé le gel jusqu'à remplir la seringue.

Le liquide récupéré dans le fond du tube est éliminé. Le montage final de la figure II.12 est réalisé en plaçant un eppendorf sans capuchon dans le fond du tube.

L'échantillon à purifier ( $\pm 50 \mu\text{l}$  pour la PCR,  $22 \mu\text{l} + 40 \mu\text{l}$  de TE pour le "random priming") est déposé au centre de la seringue et centrifugé pendant 2 minutes à 2400 rpm. On centrifuge une deuxième fois en déposant  $50 \mu\text{l}$  d'eau ou de TE sur le gel.

Après purification, la radioactivité dans l'eppendorf doit être supérieure à celle de la colonne. Dans le cas contraire, un nouveau rinçage peut être effectué.

## **I. EXTRACTION D'ARN**

### **I1. Principe**

La méthode employée pour extraire les ARN à partir d'une culture cellulaire est celle au guanidium de thiocyanate (Chomczynski et Sacchi, 1987). Ce dernier est connu pour son action déprotéinisante et son rôle d'inhibiteur de ribonucléases.

La méthode se déroule en une seule étape et permet de récupérer de l'ARN non dégradé et libre de toute protéines et d'ADN.

### **I2. Solutions**

1. Chloroforme (Merck)
2. Isopropanol
3. Ethanol 75%
4. Eau DEPC
5. Ultraspec<sup>TM</sup> RNA (Biotex, Houston, USA)

### **I3. Méthode**

Les cellules sont tout d'abord rincées 2 fois avec du PBS. Elles sont ensuite raclées à deux reprises en présence de 0,5 ml d'Ultraspec<sup>TM</sup> RNA et récupérées dans un eppendorf. On homogénise le tout avec une seringue, on ajoute 0,1 ml de chloroforme, on agite violemment et enfin, on centrifuge à 12000 rpm pendant 18 minutes.

On ajoute alors de l'isopropanol à la phase aqueuse et on laisse précipiter l'ARN 1 heure à -20°C. On centrifuge à 12000 rpm pendant 18 minutes. On sèche alors le culot et on ajoute 40 µl d'eau DEPC par eppendorf.

## **J. NORTHERN BLOT**

### **J1. Principe général**

Le Northern blot se compose de trois grandes étapes que nous allons détailler ci-dessous; la première étant une séparation des ARN suivant leur taille grâce à une électrophorèse sur gel d'agarose, le deuxième étant le transfert de ces ARN sur une membrane de nylon et la troisième étant la reconnaissance spécifique de l'ARN que l'on cherche à détecter par une sonde à ADN marquée.

### **J.2 Gel d'électrophorèse**

#### ***J2.1. Principe***

Le gel d'agarose formaldéhyde est un système simple qui permet une bonne séparation d'ARN simple brin lors d'une électrophorèse. En effet, le gel d'agarose joue le rôle de tamis moléculaire et donc les différents ARN sont répartis dans le gel suivant leur poids moléculaire.

#### ***J2.2. Solutions***

1. SDS 1%
2. Agarose (Bio-Rad)
3. Tampon MOPS 10 X concentré : MOPS 0,2 M, acétate de sodium 0,05 M, EDTA 0,01 M.
4. Solution de formaldéhyde à 37%
5. Bromure d'éthidium 10 mg/ml
6. Tampon porteur : glycérol 50%, xylène cyanole 0,4%, EDTA 1 mM, eau DEPC
7. Tampon de migration : 225 ml d'eau DEPC + 25 ml de MOPS 10X
8. Tampon SSC 10X.

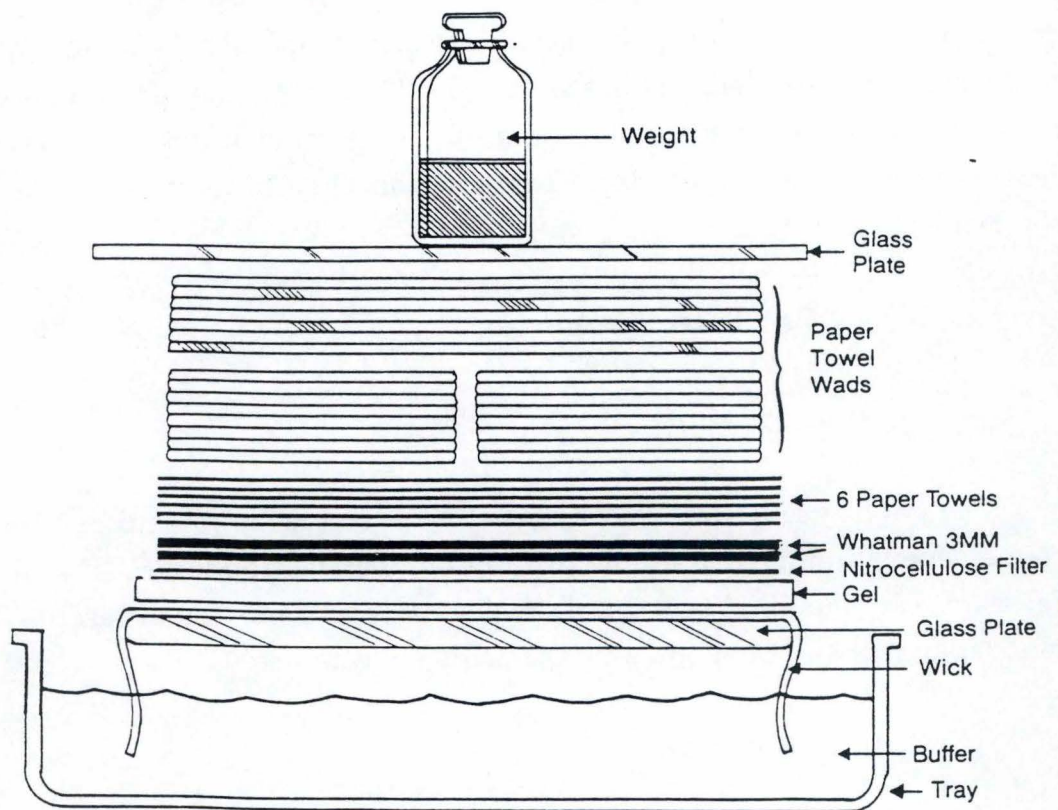


Figure II.13 : Schéma général du montage pour un transfert d'ARN sur membrane après électrophorèse sur gel d'agarose.

### ***J2.3. Méthode***

Avant toute manipulation, on s'assure que le matériel à utiliser (cuve d'électrophorèse, peigne) de toute trace de RNase.

La préparation du gel se fait de la façon suivante : on prend 1,22 gr d'agarose que l'on ajoute à 58,54 ml d'eau DEPC; 8,13 ml de MOPS 10X et 13,33 ml de formaldéhyde. On chauffe cette solution au microonde, et lorsqu'elle bout, on la refroidit. On coule le gel à une température de  $\pm 60^{\circ}\text{C}$ .

On additionne, alors, 15  $\mu\text{g}$  d'ARN (échantillon) à 3,2  $\mu\text{l}$  de formaldéhyde 40%, 10  $\mu\text{l}$  de formamide, 2  $\mu\text{l}$  de MOPS 10X et d'eau DEPC pour avoir un volume final de 20  $\mu\text{l}$  par échantillon. On dépose ensuite la totalité de l'échantillon dans les puits du gel. L'électrophorèse se passe pendant 2 heures à 60 volts. Après électrophorèse, les ARN sont séparés et donc prêts à être transférés sur membrane.

### **J3. Transfert d'ARN sur membrane de nylon**

#### ***J3.1. Principe***

L'ARN une fois séparé par électrophorèse est immédiatement transféré sur membrane par capillarité (ou par electroblotting). Les gels contenant de la formaldéhyde doivent être préalablement rincés plusieurs fois à l'eau DEPC afin d'éliminer la formaldéhyde. Le montage de transfert est représenté à la figure II.13.

Le transfert peut se faire via un tampon alcalin ou neutre. En transfert alcalin, les charges de la membrane de nylon retient les acides nucléiques. De plus, cela entraîne une hydrolyse partielle des ARN et donc une augmentation de la vitesse et de l'efficacité de transfert des grands ARN (>2,3 kb). Si le transfert se fait en milieu neutre, l'ARN restera fixé à la membrane à condition que celle-ci soit soumise à une source d'UV ou séchée à température élevée ( $80^{\circ}\text{C}$ ).

Le seul problème de la membrane de nylon est la tendance qu'elle a à présenter un niveau basal (hybridation non spécifique) élevé lors de toute hybridation.

### ***J3.2. Solutions***

1. Solution SSC 10X
2. Eau DEPC
3. Papier Wattman
4. Papier absorbant
5. Membrane de nylon (N + Hybard Amersham, GB)

### ***J3.3. Méthode***

Comme l'ARN est dans le fond du gel, on retourne ce dernier avant le transfert. On le rince trois fois à l'eau DEPC avant de le déposer sur un wattman tranpant dans du SSC 10X.

Sur le gel, on dépose la membrane de nylon découpée selon la taille du gel et préalablement inhibée de SSC 10X. Au dessus de la membrane, on met 4 couches de papier wattman, 3 couches de papier absorbant (serviette en papier) et enfin un poids de  $\pm 180$  gr en plomb. Ces différentes couches permettront l'effet de capillarité et donc le transfert de l'ARN du gel vers la membrane. Le schéma de la figure X explicite ce montage. Le transfert se fait pendant 20 heures à température ambiante.

Une fois le transfert terminé, on rince la membrane de nylon dans du SSC 2X et on la sèche entre deux papiers wattman 2 heures à 80°C.

## **J4. Hybridation sur membrane**

### ***J4.1. Principe***

Il s'agit de mettre en évidence un ARN particulier présent sur la membrane de nylon grâce à une sonde à ADN marquée radioactivement, dans le cas qui nous interesse, et qui est spécifique de la séquence recherchée.

### ***J4.2. Solutions***

1. Denhardt 5X (Ficoll 0,5 gr, polyvinylpyrolidone 0,1 gr, BSA (fraction V) 0,1 gr, SSC 10X 15 ml, eau pour ajuster à 100 ml)



## RESULTATS

Ce mémoire se compose de deux parties. Dans un premier temps, nous nous sommes penchés sur la caractérisation des deux phénotypes de cellules musculaires lisses au niveau morphologique et biochimique. En second lieu, nous avons voulu étudier l'effet de milieux conditionnés par des cellules endothéliales et de la prostaglandine FGF $2\alpha$  sur ces deux phénotypes, dans le but de voir si les cellules endothéliales pouvaient induire une modulation phénotypique notamment lorsqu'elles ont été activées par une incubation sous hypoxie.

### I. CARACTERISATION DES DEUX PHENOTYPES DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES

La première partie de ce travail concerne la caractérisation des deux phénotypes de cellules musculaire lisses. Cette caractérisation s'est faite à deux niveaux : d'abord au niveau morphologique, puis au niveau biochimique. Morphologiquement, les cellules furent étudiées au moyen de plusieurs techniques : la microscopie optique, la microscopie électronique à transmission et à balayage et l'immunofluorescence.

Biochimiquement, la caractérisation s'est faite en comparant leur réponse à une stimulation à la vasopressine et en mesurant leur taux de synthèse de collagène.

#### A. MORPHOLOGIE DES CML DANS L'ETAT CONTRACTILE ET DANS L'ETAT SYNTHETIQUE

Pour obtenir les deux phénotypes distincts, les CML sont repiquées à deux densités différentes dans du milieu D + sérum, à partir de cultures confluentes.

Nous savons qu'à faible densité, les CML prolifèrent et se trouvent dans un état synthétique. Laissées à confluence, les CML ne se divisent plus et développent le phénotype contractile. Les deux densités choisies tout au long de ce travail sont :

- 8000 cellules par  $\text{cm}^2$  pour obtenir un phénotype synthétique.
- 40000 cellules par  $\text{cm}^2$  pour obtenir un phénotype contractile.

Les cellules sont cultivées pendant cinq jours dans du D + S.

Dans ces conditions, les cellulesensemencées à 40000 cellules par  $\text{cm}^2$  atteignent rapidement un état stationnaire, alors que les cellulesensemencées à 8000 cellules par  $\text{cm}^2$  prolifèrent pendant plusieurs jours avant d'atteindre la confluence. Les observations morphologiques ont été réalisées sur les cellules après 5 jours en culture alors que les cellules repiquées à faible densité commencent à atteindre la confluence.

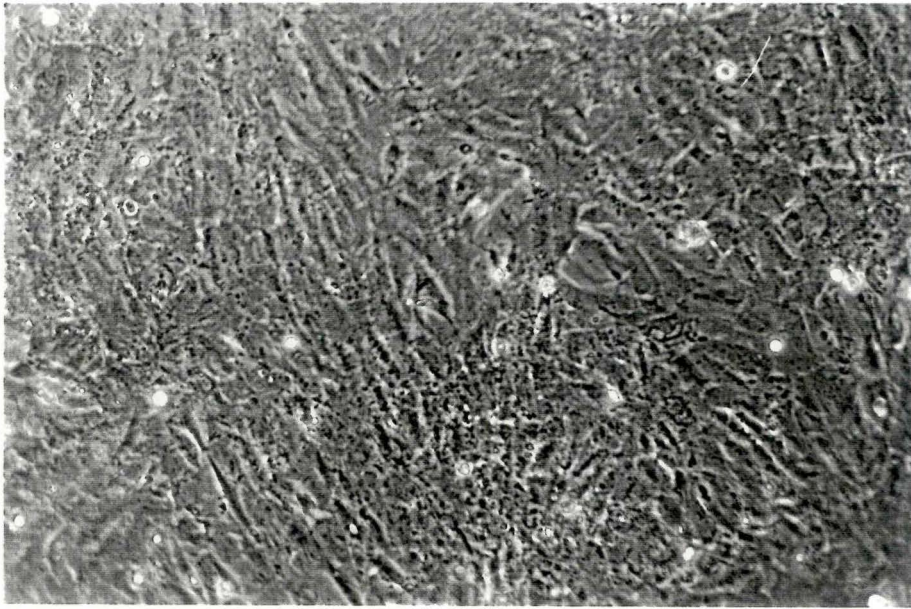
### **A1. Microscopie optique**

Les figures III.1(A et B) représentent ces deux états observés en microscopie optique à contraste de phase. Comme nous pouvons le voir, les CML contractiles sont plus petites, plus allongées et disposées en faisceaux. Ces caractéristiques sont précisément celles des cellules A7r5 contractiles, comme décrit dans l'introduction (Kimes *et al*, 1976).

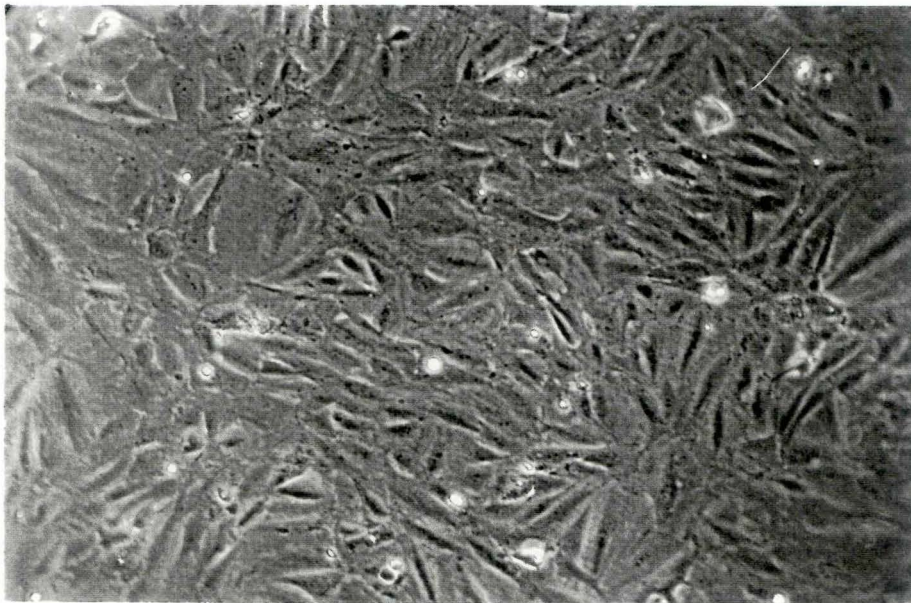
Le phénotype synthétique est caractérisé par des cellules plus larges disposées sans orientation précise.

### **A2. Microscopie électronique à balayage**

Cette technique fut utilisée pour voir la surface extérieure et l'arrangement des cellules en trois dimensions à fort grossissement. Les CML synthétiques semblent plus étendues et présentent une surface externe plus rugueuse (figure III.2) par rapport aux CML contractiles (figure III.3). Cette "rugosité" pourrait s'expliquer par la présence plus nombreuse d'organites cytoplasmiques.

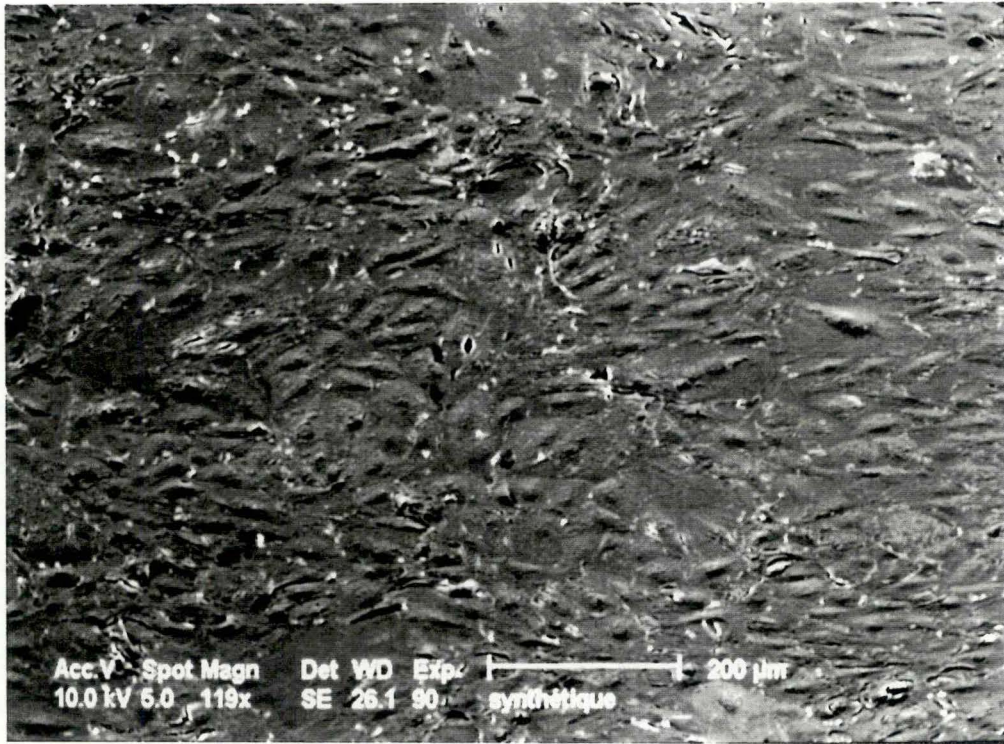


A

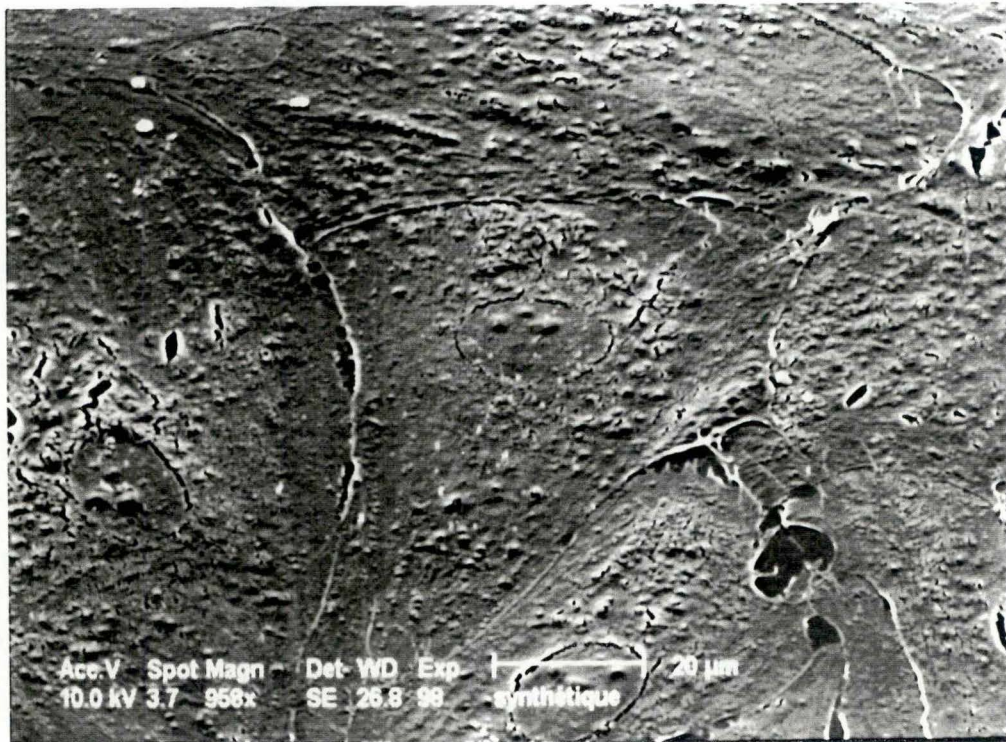


B

Figure III.1 : Photographies représentant les cellules musculaires lisses (A7MS) dans l'état contractile (A) et dans l'état synthétique (B) observées en microscopie optique à contraste de phase (grossissement 115X).

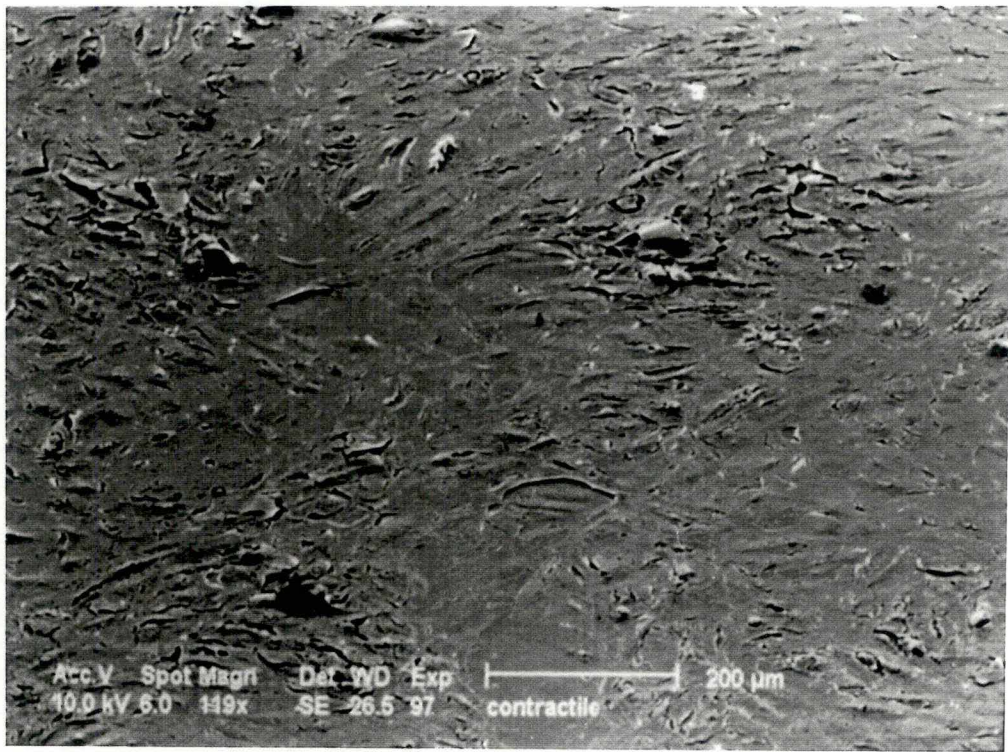


A

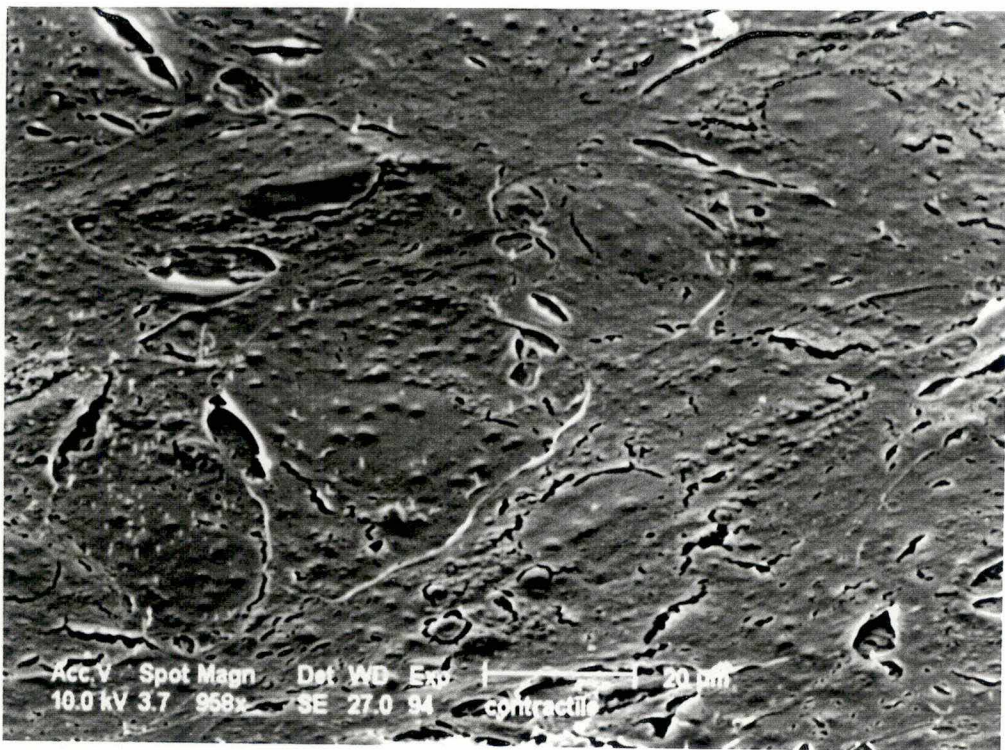


B

Figure III.2 : Photographies représentant les cellules musculaires lisses dans l'état synthétique observées en microscopie électronique à balayage (grossissement 119X (A) et 958X (B)).



A



B

Figure III.3 : Photographies représentant les cellules musculaires lisses dans l'état contractile observées en microscopie électronique à balayage (grossissement 119X (A) et 958X (B)).

Cependant, la microscopie électronique à balayage ne nous permet pas de différencier nettement les deux types cellulaires et celle-ci ne sera donc pas considérée par la suite comme un critère de caractérisation phénotypique.

### **A3. Microscopie électronique à transmission**

Cette méthode permet d'observer les structures cytoplasmiques des cellules à très fort grossissement.

Les figures III.4 correspondent au phénotype contractile. Cet état est caractérisé par la présence de nombreux microfilaments et par une faible quantité d'organites cytoplasmiques. Ces filaments sont principalement observés à la périphérie de la cellule.

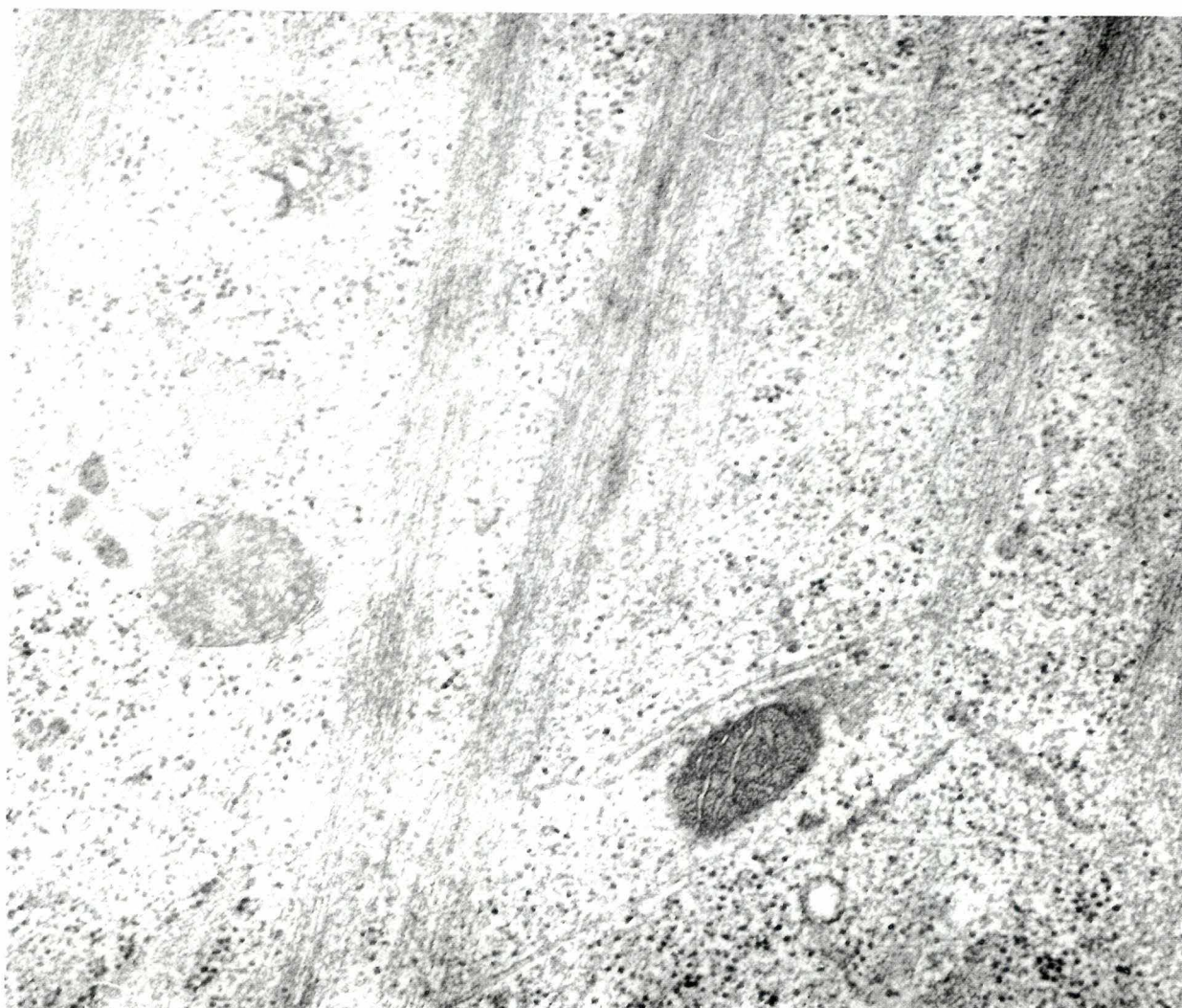
Vu leur abondance, il est évident que nous nous trouvons face à des cellules contractiles. En effet, les microfilaments (actine et myosine) sont les principaux éléments nécessaires à la contraction.

Par contre, les cellules synthétiques possèdent dans leur cytoplasme un important réseau de citernes de réticulum endoplasmique rugueux, preuve d'une activité synthétique accrue. Comme le montre la figure III.5, le réseau de réticulum endoplasmique rugueux se trouve dans la région périnucléaire. Nous pouvons également noter la présence d'autres organites (ribosomes, mitochondries, vésicules sécrétoires).

Contrairement à la microscopie électronique à balayage, la microscopie électronique à transmission fournit de bons critères pour reconnaître et caractériser les deux phénotypes des CML. Cette technique a d'ailleurs été largement utilisée dans la littérature avec des résultats similaires (Thyberg *et al*, 1985; Sjölund *et al*, 1986; Okada *et al*, 1990)

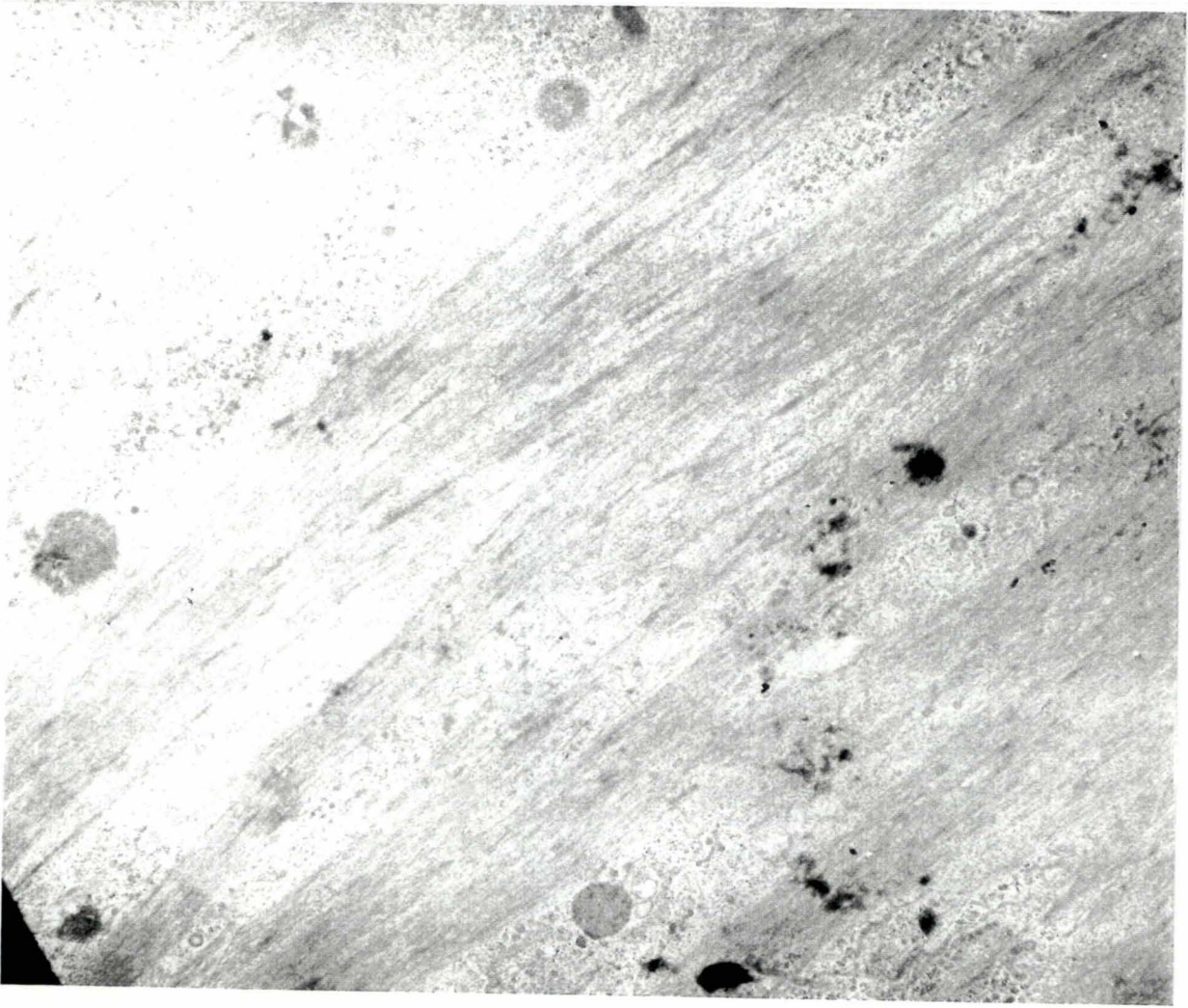


A



B

Figure III.4 : Photographies représentant les cellules musculaires lisses dans l'état contractile observées en microscopie électronique à transmission (grossissement 1600X (A), 4200X (B) et 7200X (C)).



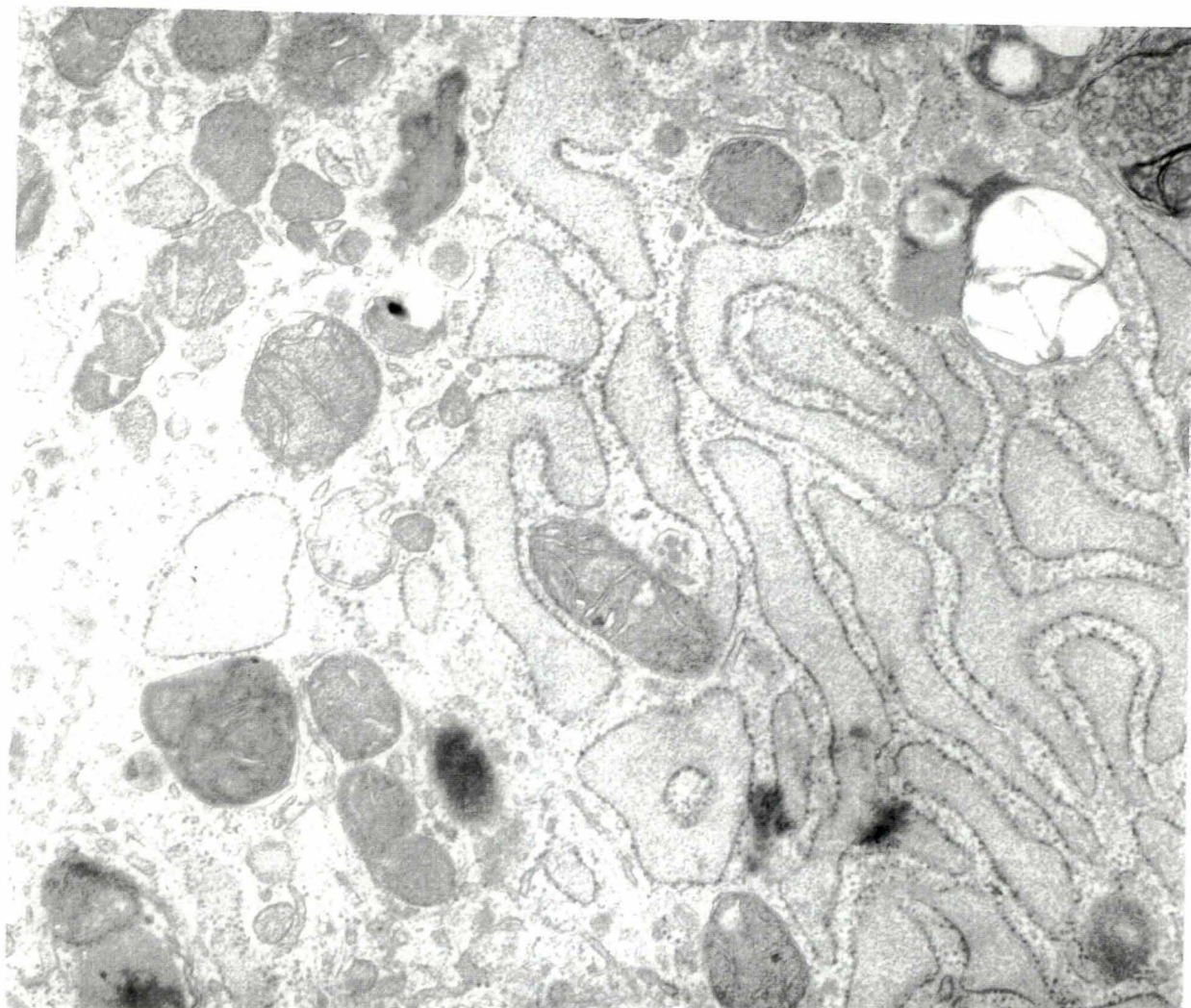
C





A

Figure III.5 : Photographies représentant les cellules musculaires lisses dans l'état synthétique observées en microscopie électronique à transmission (grossissement 2000X (A) et 5500X (B)).



B

#### A4. Immunofluorescence

Nous avons réalisé un marquage de l' $\alpha$ -actine, composant des filaments contractiles, en immunofluorescence. Ce marquage s'est fait par la méthode indirecte, au moyen d'anticorps secondaires marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine. La méthode indirecte permet d'augmenter la sensibilité de la technique.

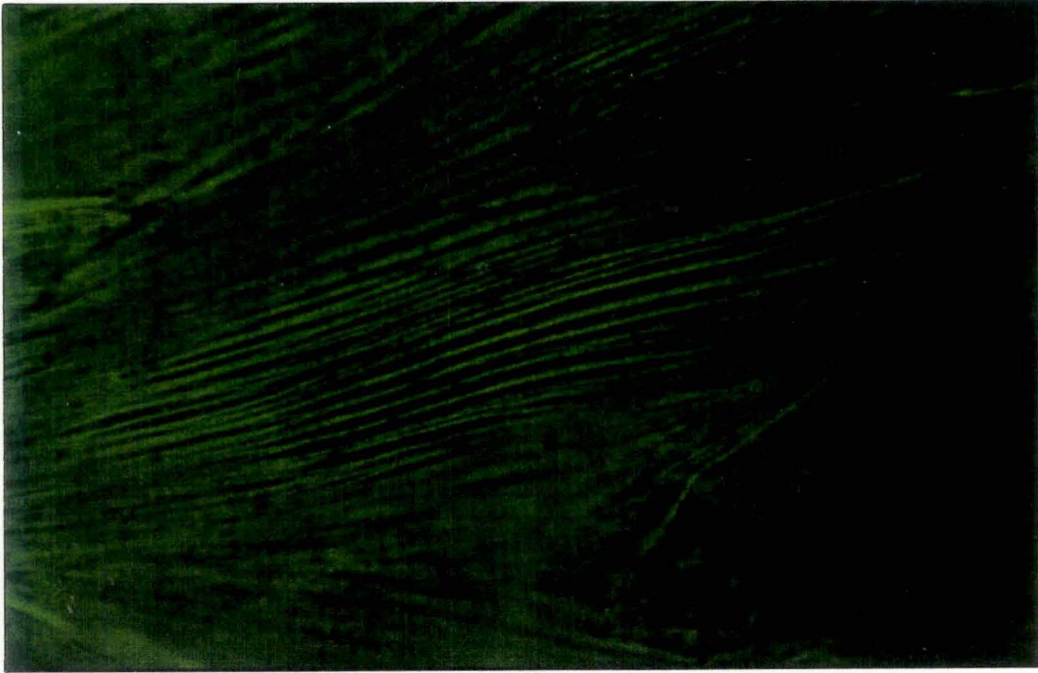
La figure III.6A présente les cellules contractiles. Les microfilaments d' $\alpha$ -actine sont arrangés en faisceaux de fins filaments droits et parallèles, principalement alignés selon l'axe longitudinal de la cellule. Cet arrangement régulier des filaments nécessaires à la contraction confirme le phénotype contractile de ces cellules.

Par contre, les filaments d'actine des CML synthétiques (figure III.6B) sont nettement moins bien organisés et l'intensité de la fluorescence qui y est associée est plus faible. Par endroits, on observe des agrégats d'actine (petits granules fluorescents) qui résulteraient de la dépolymérisation de l'actine fibrillaire. Cette dépolymérisation importante indique que la cellule n'est pas dans un état contractile.

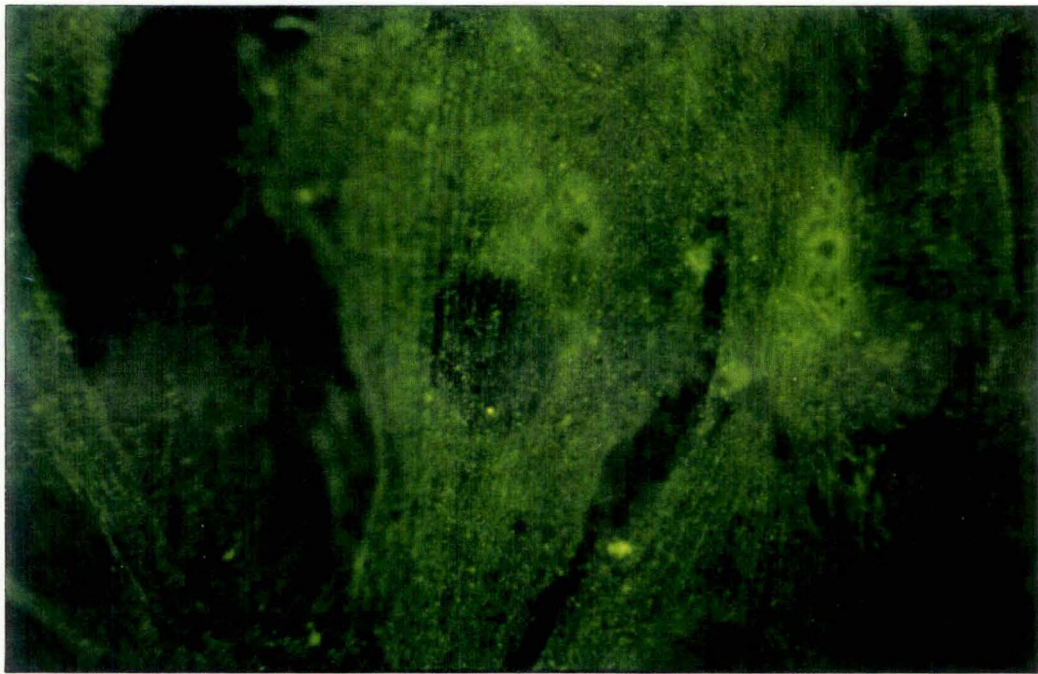
En outre, nous pouvons également remarquer la forme plus allongée des cellules contractiles, déjà observée au microscope à contraste de phase. A un même grossissement et pour un même champ de vision, les cellules contractiles n'apparaissent pas complètement sur la photographie, alors que plusieurs cellules synthétiques, d'aspect plus large, sont visibles.

L'immunofluorescence nous permet donc de distinguer les deux phénotypes des CML par comparaison de l'organisation de leur cytosquelette. Cette méthode fut également utilisée dans la littérature (Yamamoto *et al*, 1992).

En conclusion, nous pouvons penser que les cellules musculaires lisses incubées dans les conditions de culture décrites ci-dessus présentent bien un phénotype, soit contractile, soit synthétique, bien défini, comme le démontrent principalement les études en microscopie



A



B

Figure III.6 : Photographies représentant un marquage en immunofluorescence de l'actine de cellules musculaires lisses. L'actine est mise en évidence par un anticorps secondaire marqué à l'isothiocyanate de fluoresceine. Les cellules musculaires lisses sont dans un état contractile (A) ou synthétique (B) (grossissement 1150X).

électronique à transmission et les préparations en immunofluorescence. Les cellules musculaires lisses dans l'état contractile possèdent des filaments contractiles bien développés au contraire des cellules dans l'état synthétique qui, par contre, possèdent un réticulum endoplasmique abondant, soulignant une activité de synthèse protéique importante.

Nous sommes donc parvenus à caractériser morphologiquement les deux phénotypes des CML, au moyen de diverses techniques. Cependant, pour une caractérisation rapide, l'observation au microscope à contraste de phase sera utilisée. Les conditions de culture choisies, 8000 cellules/cm<sup>2</sup> et 40000 cellules/cm<sup>2</sup> pendant 5 jours, sont donc des conditions adéquates pour l'obtention des deux phénotypes. Ces conclusions seront confirmées par la caractérisation biochimique que nous allons décrire ci-dessous.

## **II. REPONSE A UNE STIMULATION A LA VASOPRESSINE DES CML A L'ETAT CONTRACTILE ET A L'ETAT SYNTHETIQUE**

Le calcium joue un rôle important comme messenger secondaire dans les cellules, notamment dans la régulation de la contraction des CML. Il nous paraissait donc intéressant de doser la concentration calcique cytosolique des deux phénotypes de CML, avant (concentration basale) et après stimulation par la vasopressine. Celle-ci constitue un stimulus induisant la contraction des cellules musculaires lisses.

Les cellules sontensemencées pendant 5 jours dans du D + S aux deux densités cellulaires différentes. Le dosage s'effectue au moyen de la sonde fluorescente FURA-2, qui complexe le Ca<sup>++</sup> cytosolique.

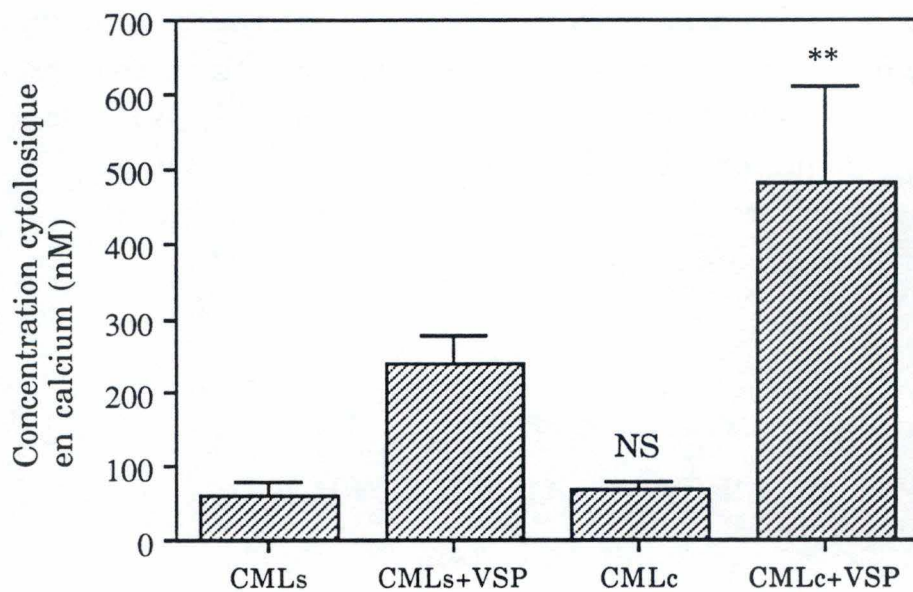


Figure III.7 : Concentration calcique cytosolique dans les cellules musculaires lisses dans l'état synthétique ou contractile à l'état basal et lors d'une stimulation par  $1\mu\text{M}$  en vasopressine.

NS : statistiquement non significatif des CML synthétiques

\*\* : différence significative avec les cellules musculaires lisses synthétiques avec  $P > 0,999$  (t de student).

## A. CONCENTRATION CYTOSOLIQUE BASALE

Une série d'expériences préliminaires furent réalisées afin de mettre au point la méthode de dosage et de mesurer la concentration basale en  $\text{Ca}^{++}$  cytoplasmique. Pour ce faire les cellules furent perméabilisées en ajoutant 30 $\mu\text{l}$  de triton X100 à 10% dans 3 ml de milieu de culture HBSS.

Nous avons obtenu comme valeurs de la concentration basale en calcium :

Moyenne pour les CMLs	47,0 $\pm$ 17,9 (n=7)
Moyenne pour les CMLc	40,0 $\pm$ 19,6 (n=8)

La différence est statistiquement non significative par un test de Student.

Cependant, l'utilisation du Triton X-100 pour déterminer le  $F_{\text{max}}$  pose 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, ce qui peut entraîner des variations dans la quantité de sonde se trouvant dans le passage du faisceau d'excitation et conduire à une estimation erronée de la concentration en calcium.

Comme à plusieurs reprises, nous n'avons pas obtenu de pic après perméabilisation au Triton X-100, nous avons décidé de le remplacer par la digitonine (25  $\mu\text{M}$  final). La digitonine est, en effet, un détergent plus doux.

Les valeurs de la concentration basale obtenues pour les deux phénotypes sont représentées à la figure III.7. Celles-ci s'avèrent être plus élevées que celles obtenues avec le Triton X-100, ce qui signifie qu'on évite effectivement la dilution de la sonde dans le milieu extracellulaire.

Nous n'observons pas de différence significative au niveau de la concentration calcique basale entre les deux phénotypes.

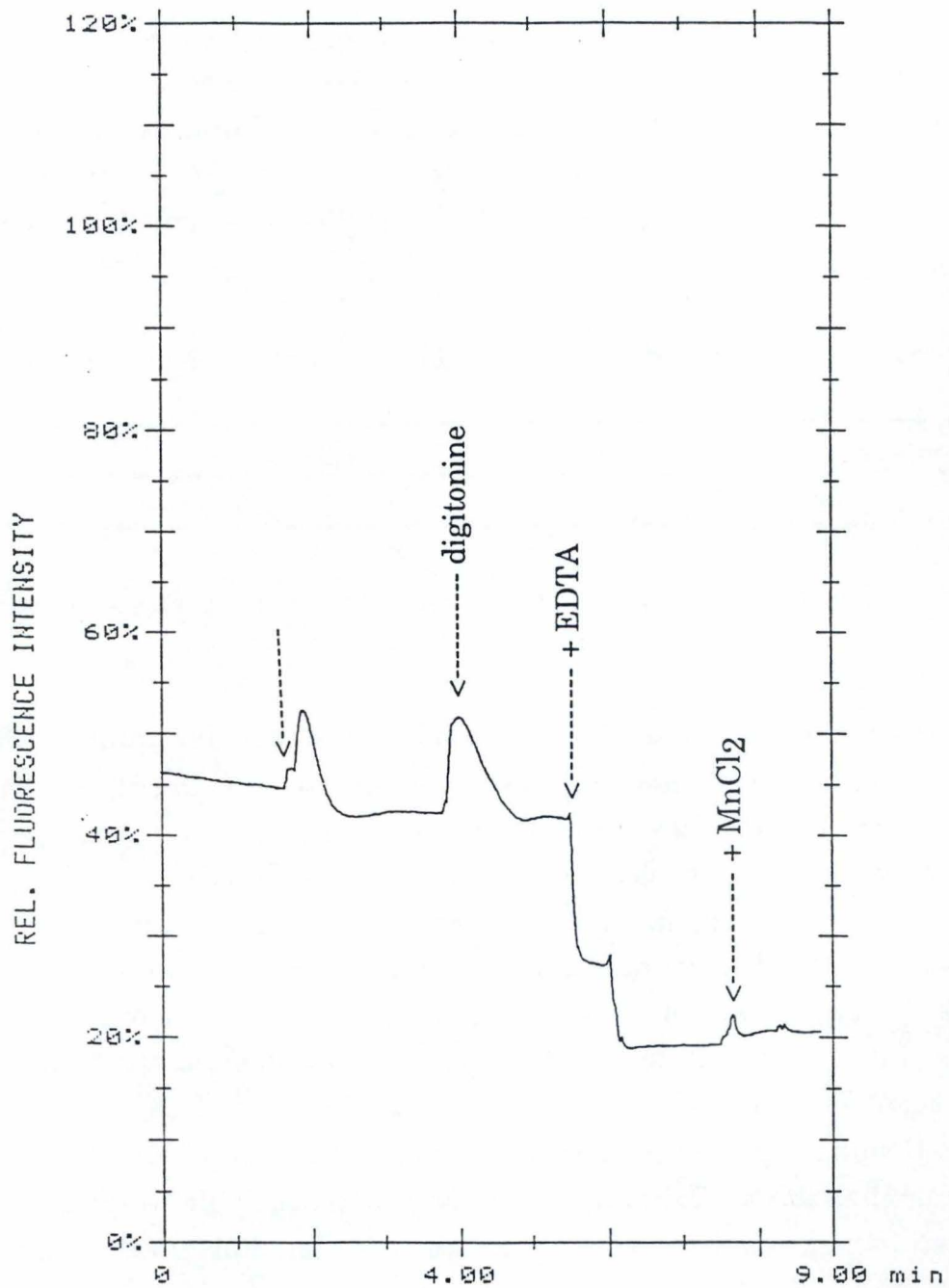


Figure III.8 : Evolution de l'intensité de fluorescence du FURA-2 lors de la mesure de la concentration en calcium intracellulaire dans des cellules musculaires lisses dans l'état contractile avant et pendant une stimulation par  $1\mu\text{M}$  final en vasopressine (le moment de l'ajout de la vasopressine est indiqué par la première flèche ).



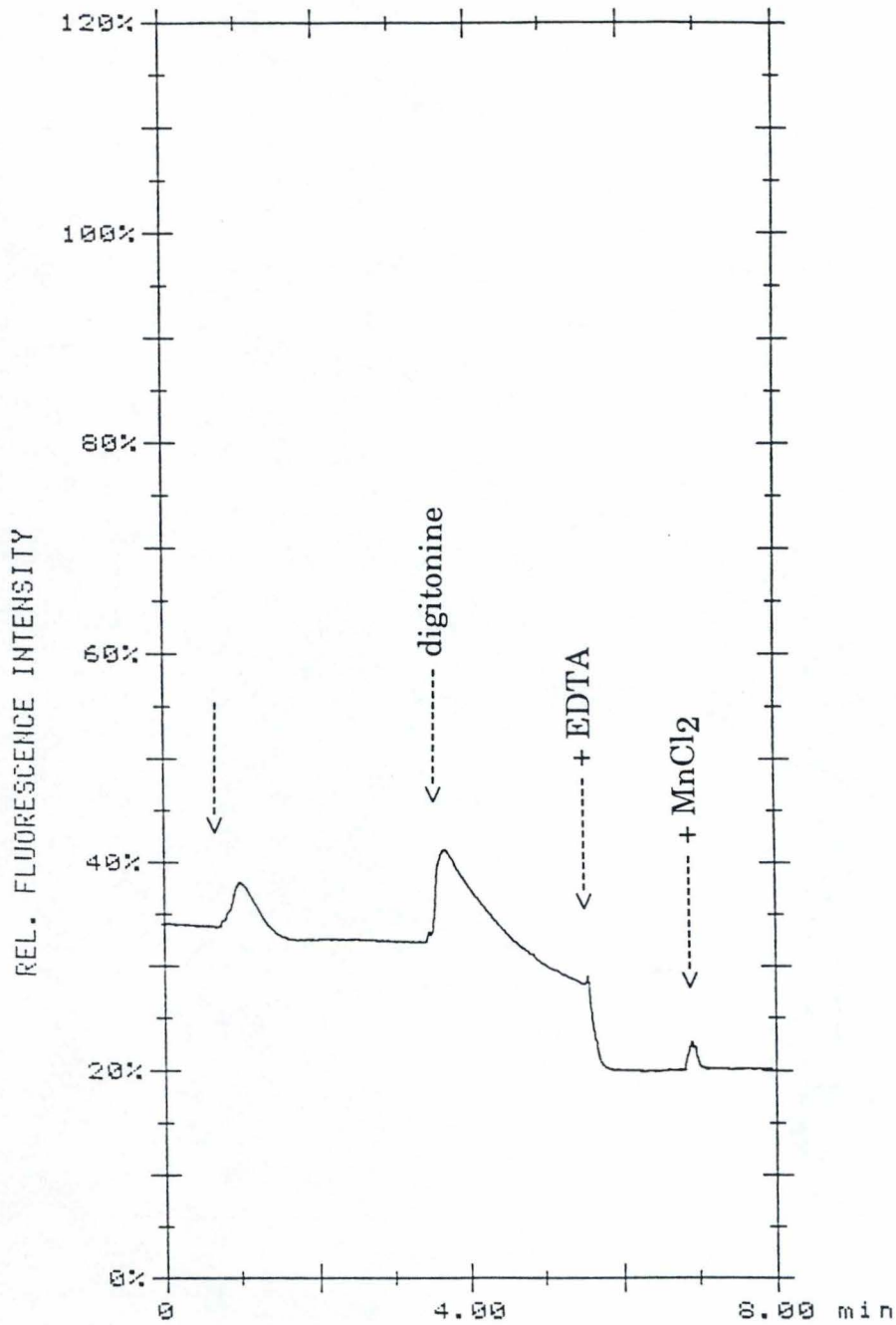


Figure III.9 : Evolution de l'intensité de fluorescence du FURA-2 lors de la mesure de la concentration en calcium intracellulaire dans des cellules musculaires lisses dans l'état synthétique avant et pendant une stimulation par  $1\mu\text{M}$  final en vasopressine (le moment de l'ajout de la vasopressine est indiqué par la première flèche ).

## B. CONCENTRATION CYTOSOLIQUE APRES STIMULATION PAR LA VASOPRESSINE

La mesure de la concentration en calcium cytosolique basale ne permet pas de différencier les deux phénotypes des CML. Cependant, il reste possible que ces cellules répondent différemment à un stimulus qui induit la contraction. Nous avons tenté de vérifier cette hypothèse en utilisant la vasopressine comme stimulateur.

La vasopressine est une hormone qui se lie à des récepteurs spécifiques de la membrane des CML A7r5 et qui active une série de messagers secondaires (Sill *et al*, 1991; Thibonnier *et al*, 1991). Dès l'attachement de l'hormone à son récepteur, ce complexe hormone-récepteur interagit avec une protéine, ce qui active la phospholipase C. Cette dernière hydrolyse le phosphatidyl inositol biphosphate (PIP<sub>2</sub>) de la membrane pour libérer du diacylglycérol (DAG) et de l'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>). L'IP<sub>3</sub> va alors se fixer à une protéine d'un canal à calcium des organites de stockage provoquant une décharge de calcium dans le cytosol.

Le pic de l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire induit par la vasopressine (1  $\mu$ M final) est très rapide et donc difficile à mesurer. Après mise au point de la technique, nous avons pu obtenir un tracé représentant l'évolution de la fluorescence au cours de l'expérience. Ces tracés sont représentés aux figures III.8 et III.9.

Comme nous pouvons le voir sur ces tracés, le pic est plus élevé pour les CML contractiles par rapport aux CML synthétiques. Les résultats quantitatifs pour une série d'expériences similaires sont présentés à la figure III.7. Ils montrent que le pic de l'augmentation de la concentration calcique cytosolique induit chez les CMLc est statistiquement plus élevé que celui obtenu chez les CMLs. On obtient des valeurs moyennes respectives de 418 nM et 237 nM.

Diverses hypothèses peuvent être émises pour expliquer cette différence. La première serait qu'en fonction de leur phénotype, les CML régulent l'expression des récepteurs à la vasopressine au niveau de la

membrane plasmique. Les résultats décrits ci-dessus indiqueraient alors que le nombre des récepteurs à la vasopressine serait plus petit chez les CML synthétiques que chez les CML contractiles. Une seconde hypothèse serait que les capacités de stockage intracellulaires pour le calcium seraient différentes. On peut, en effet, penser que parallèlement au développement des microfilaments, les CMLc développent également de plus grandes réserves de calcium. Ce calcium libéré dans le cytoplasme lors de la stimulation à la vasopressine induirait un pic plus élevé.

Des expériences supplémentaires sont nécessaires afin de discriminer laquelle des deux hypothèses serait la bonne. On peut, par exemple, libérer le calcium stocké intracellulairement par la thapsigargine et mesurer ainsi directement ce stock sans interférence avec des récepteurs.

En conclusion et quelque soit l'hypothèse explicative, les cellules musculaires lisses contractiles répondent plus fortement à la stimulation par la vasopressine que les cellules musculaires lisses synthétiques. Nous avons donc maintenant un critère biochimique permettant de différencier les deux phénotypes.

### **III. SYNTHÈSE DE COLLAGÈNE PAR LES CML ET MODULATION PAR LES MILIEUX CONDITIONNÉS PAR LES CELLULES ENDOTHELIALES**

L'observation des tissus variqueux indiquent de nombreuses altérations tissulaires et des modifications au niveau de la paroi vasculaire. On peut notamment observer notamment la présence de CML se trouvant dans un état synthétique. Les travaux réalisés au laboratoire sur l'hypoxie des cellules endothéliales suggèrent que leur activation serait le point de départ qui pourrait expliquer les diverses modifications observées dans la veine. On pourrait donc se demander si ces cellules endothéliales pourraient induire cette modulation phénotypique des CML.

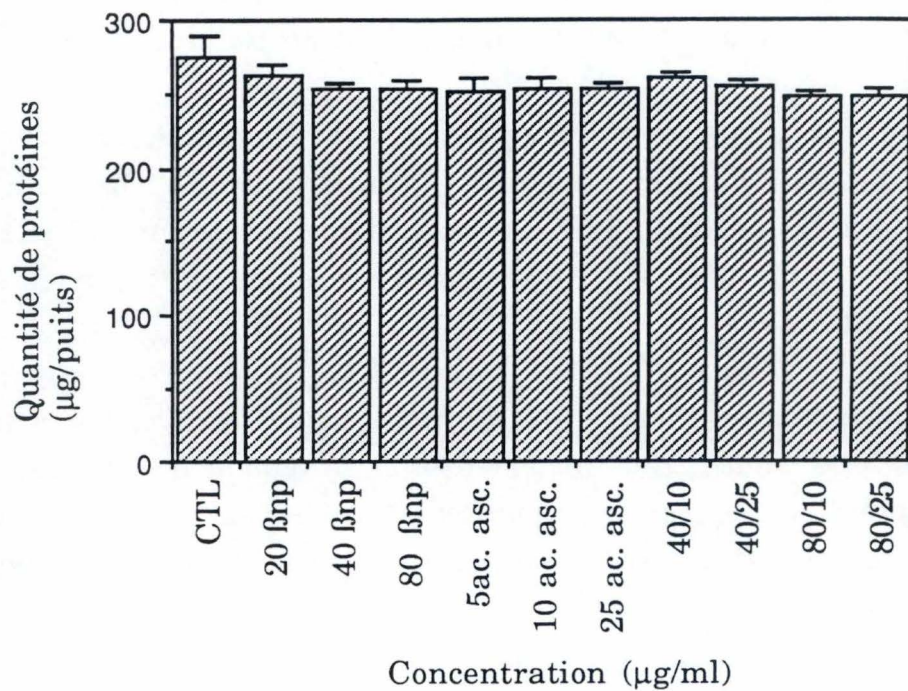


Figure III.10 : Evolution du nombre de cellules musculaires lisses en fonction de la concentration en βaminopropionitrile (βnp), en acide ascorbique (ac. asc.) ou d'un mélange des 2 molécules. Les résultats sont exprimés en µg de protéines par puits en tant que moyennes ± un écart-type (n=4).

Dans ce but, nous avons donc tenté de créer un modèle représentatif de la situation *in vivo* et d'étudier ainsi dans quelles mesures les cellules pouvaient interagir entre elles. Nous avons alors étudié l'effet sur la synthèse des collagènes de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  et de milieux conditionnés par des cellules endothéliales sous hypoxie.

L'analyse des collagènes se fera par électrophorèse et fluorographie, selon la méthode décrite au point H du "Matériel et méthodes".

#### **A. VERIFICATION DE LA "NON-TOXICITE" DU $\beta$ APN ET DE L'ACIDE ASCORBIQUE**

Le  $\beta$ APN et l'acide ascorbique sont deux molécules utilisées pour la purification du collagène. L'acide ascorbique est ajouté au milieu afin de favoriser la synthèse du collagène au détriment des autres protéines de la matrice extracellulaire. Le  $\beta$ APN, quant à lui, empêche la précipitation des différentes molécules de collagène.

Afin de tester l'éventuelle toxicité de ces deux molécules, elles furent ajoutées à diverses concentrations dans une boîte multipuits contenant des cellules repiquées à la même densité. Après une incubation de 24 heures, la quantité de cellules a été estimée via un dosage de protéines.

Les résultats sont présentés à la figure III.10. On n'observe pas de mortalité cellulaire en présence de ces molécules quelle que soit la concentration en  $\beta$ APN et/ou acide ascorbique. Ces molécules ne semblent donc pas toxiques pour les cellules.

Dans nos conditions expérimentales, les concentrations utilisées pour la purification sont : 80  $\mu\text{g/ml}$  pour le  $\beta$ APN et 25  $\mu\text{g/ml}$  d'acide ascorbique.

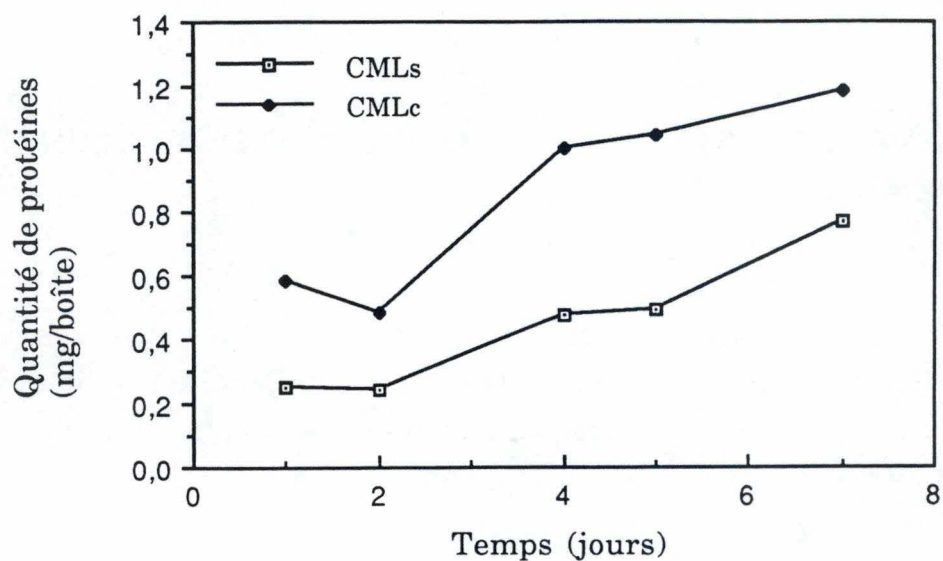


Figure II.11 : Evolution en fonction du temps de la quantité de protéines dans des cultures de cellules musculaires lisses dans l'état contractile (CMLc) ou synthétiques (CMLs). Les résultats sont exprimés en mg de protéines et représentent la moyenne de deux boîtes.

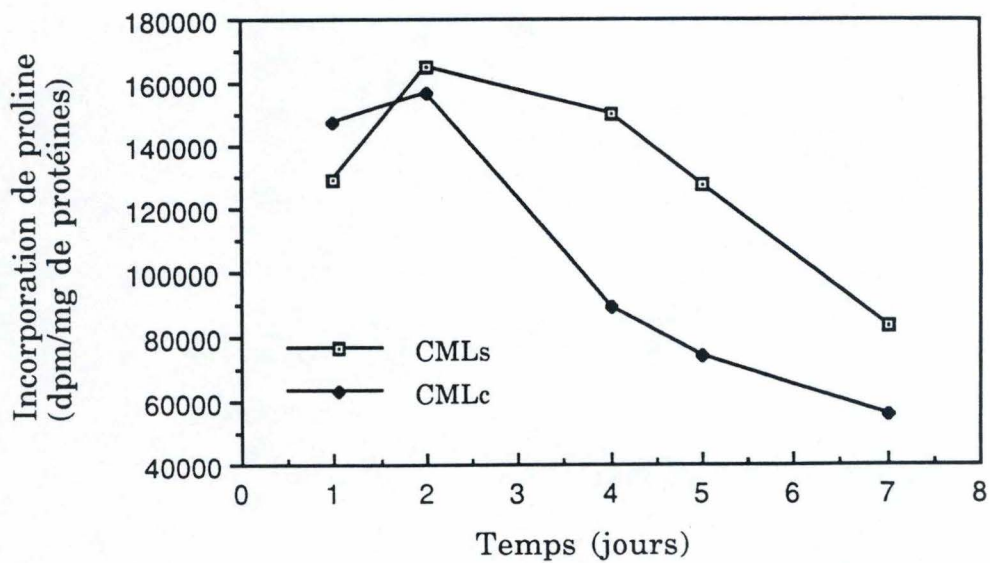


Figure III.12 : Evolution au cours du temps de la synthèse de collagène par des cellules musculaires lisses dans l'état contractile (CMLc) ou synthétique (CMLs). La synthèse de collagène est estimée par la mesure de l'incorporation de proline radioactive présente dans les échantillons après précipitation des milieux au  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Les résultats sont exprimés en dpm/mg de protéines et représentent la moyenne de 2 boîtes de culture.

## B. SYNTHÈSE DE COLLAGÈNE DES DEUX PHÉNOTYPES

Étant donné l'influence possible de la croissance cellulaire sur la synthèse de collagène des deux phénotypes, il nous a paru important de suivre la synthèse de protéines et de collagène au cours du temps, pour les deux phénotypes des CML.

La mesure de la synthèse de collagène fut réalisée selon la méthode de purification mise au point par l'équipe du Professeur D.Herbage (voir "Matériel et méthodes"). Les cellules sont repiquées aux deux densités cellulaires (contractiles et synthétiques) dans du milieu D + S.

Après les différents jours de culture (J1, 2, 4, 5 et 7), les cellules sont incubées pendant 24 heures avec de la proline tritiée. Le collagène marqué est ensuite purifié à partir du milieu de culture, tandis que la quantité de protéines est dosée à partir du tapis cellulaire de ces mêmes boîtes.

Pour chaque phénotype, nous disposons donc de deux résultats :  
-l'évolution de la quantité de protéines au cours du temps (figure III.11)  
-l'évolution de l'incorporation de proline et donc de la synthèse de collagène au cours du temps (figure III.12).

Pour les deux phénotypes, nous observons en valeur absolue une augmentation de la quantité de proline incorporée au cours du temps par boîte de culture. Celle-ci est triplée pour les CMLs et doublée pour les CMLc. Toutefois, elle reste toujours plus élevée pour les CMLc, ceci étant dû au nombre plus important de cellules. Cette augmentation traduit la prolifération des cellules, mais aussi le dépôt de la matrice extracellulaire.

Par contre, la synthèse de collagène, exprimée en dpm par mg de protéines présente une évolution différente (figure III.13). Elle diminue à partir du deuxième jour pour les deux phénotypes. Cependant, cette diminution est beaucoup plus rapide et importante pour les CMLc. Ce phénomène a également été décrit par plusieurs auteurs : Holderbaum *et al*, 1984; Sjölund *et al*, 1896; Okada *et al*, 1990; Majors *et al*, 1992.

Nous pouvons aussi remarquer que cette synthèse reste toujours plus élevée pour les CMLs. En effet, aux jours 5 et 7, celles-ci synthétisent



	Incorporation de proline par boîte en dpm (x 100).	Quantité de protéines par boîte en mg.	dpm/mg de protéines (x 100).
CMLc	20314	4,45	4565
CMLs	14363	2,28	6300
CMLc + PGE <sub>2</sub> (2j.)	8674	3,32	2613
CMLs + PGE <sub>2</sub> (2j.)	15981	2,00	7991
CMLc + PGF <sub>2</sub> $\alpha$ (1j.)	14423	4,79	3011
CMLs + PGF <sub>2</sub> $\alpha$ (1j.)	12320	1,73	7121
CMLc + PGF <sub>2</sub> (2j.)	7554	3,80	1988
CMLc + PGF <sub>2</sub> (2j.)	14391	2,06	6986

Tableau III.1 : Estimation de la synthèse de collagène par des cellules musculaires lisses dans l'état contractile (CMLc) ou synthétique (CMLs) et effet des prostaglandines. La PGE<sub>2</sub> à  $1,9 \cdot 10^{-9}$  M et la PGF<sub>2</sub> $\alpha$  à  $3,6 \cdot 10^{-9}$  M sont ajoutées aux CML pendant 1 ou 2 jours dans le milieu de culture avec sérum et la proline radioactive pendant les dernières 24 heures. Les résultats sont exprimés en dpm par mg de protéines après précipitation dans des milieux au (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et digestion à la pepsine.

respectivement 1,7 fois et 1,5 fois plus de collagène que les CMLc. Ceci est en accord avec les observations décrites par ces mêmes auteurs, à savoir une synthèse plus importante de collagène pour les CML dans un état prolifératif.

Durant les deux premiers jours, l'incorporation de proline est quasiment identique pour les deux phénotypes. Ce laps de temps est sans doute nécessaire aux cellules pour se différencier. Par contre, au 5<sup>ième</sup> jour, la différence d'incorporation de proline est nettement marquée. Ceci confirme que ce jour est adéquat pour étudier les deux phénotypes. On peut aussi remarquer qu'après 7 jours, la différence entre les deux phénotypes s'amenuise. Ceci peut être relié aux résultats sur la croissance cellulaire qui montrent que les CMLs entrent en confluence à partir du 5<sup>ième</sup> jour et pourraient alors adopter progressivement le phénotype contractile.

### C. EFFET DES PROSTAGLANDINES EN PRESENCE DE SERUM

Comme l'ont montré Michiels *et al.* (soumis pour publication), les cellules endothéliales incubées pendant 120 minutes sous hypoxie libèrent des facteurs mitogènes pour les CML. Il a été mis en évidence que les prostaglandines libérées par les CE participent à cet effet pro-prolifératif. Des expériences menées en présence de prostaglandines pures ont montré que les PGs les plus actives sont la  $\text{PGF}_2\alpha$  et la  $\text{PGE}_2$ .

Afin de vérifier l'effet potentiel des prostaglandines sur la synthèse de collagène dans les deux phénotypes, nous avons ajouté celles-ci dans le milieu de culture. Les concentrations des différentes prostaglandines ajoutées correspondent à celles que les cellules endothéliales secrètent après une incubation de deux heures sous hypoxie (Michiels *et al.*, 1993). Nous avons testé les deux prostaglandines les plus abondantes : la  $\text{PGE}_2$  à  $1,9 \cdot 10^{-9}\text{M}$  et la  $\text{PGF}_2\alpha$  à  $3,63 \cdot 10^{-9}\text{M}$  dans du milieu D+S. Ces prostaglandines pures (Sigma) furent ajoutées au quatrième jour, c'est à dire deux jours avant la mesure de la synthèse de collagène, puisque la proline est incorporée du 5<sup>ème</sup> au 6<sup>ème</sup> jour.

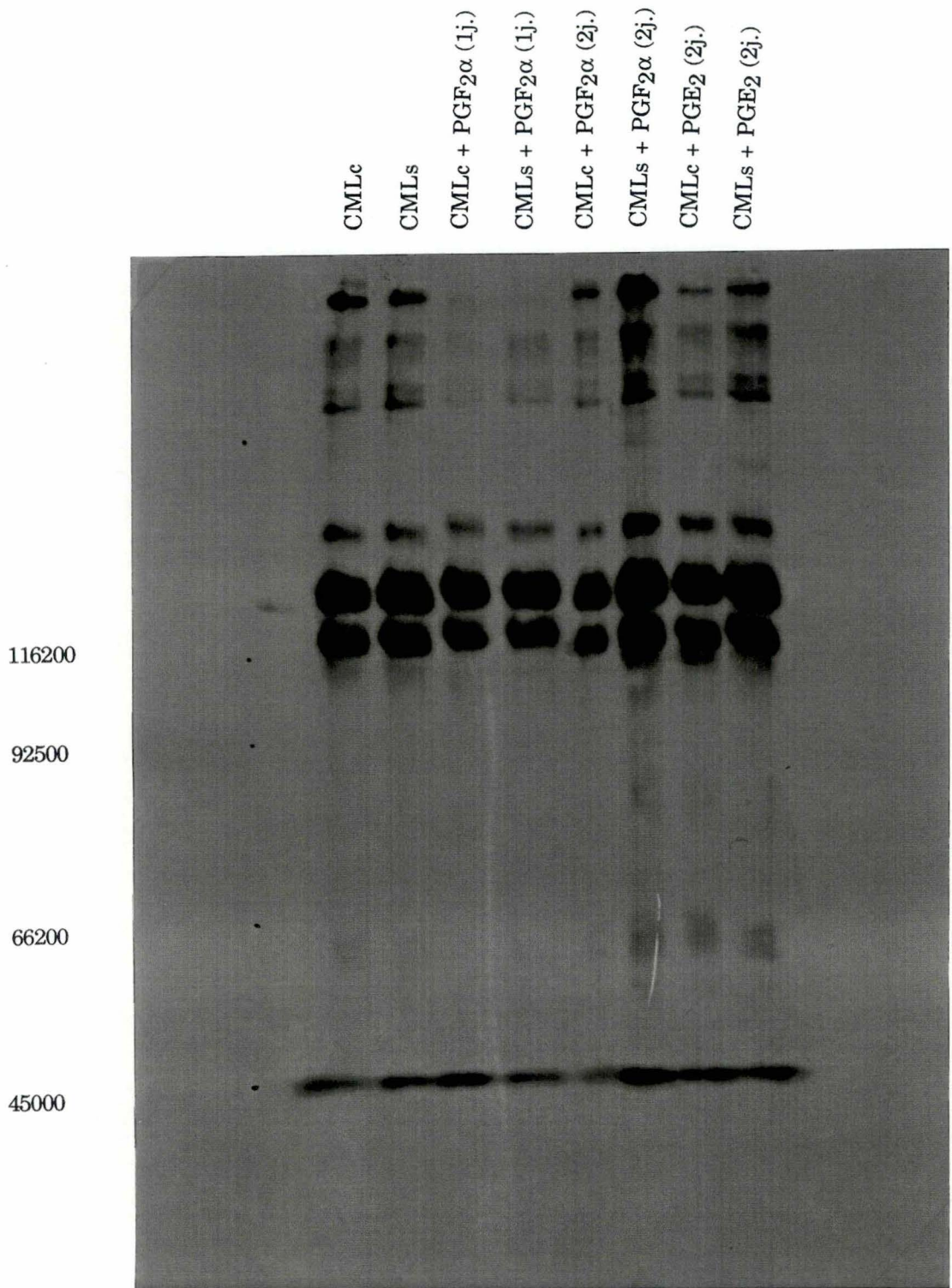
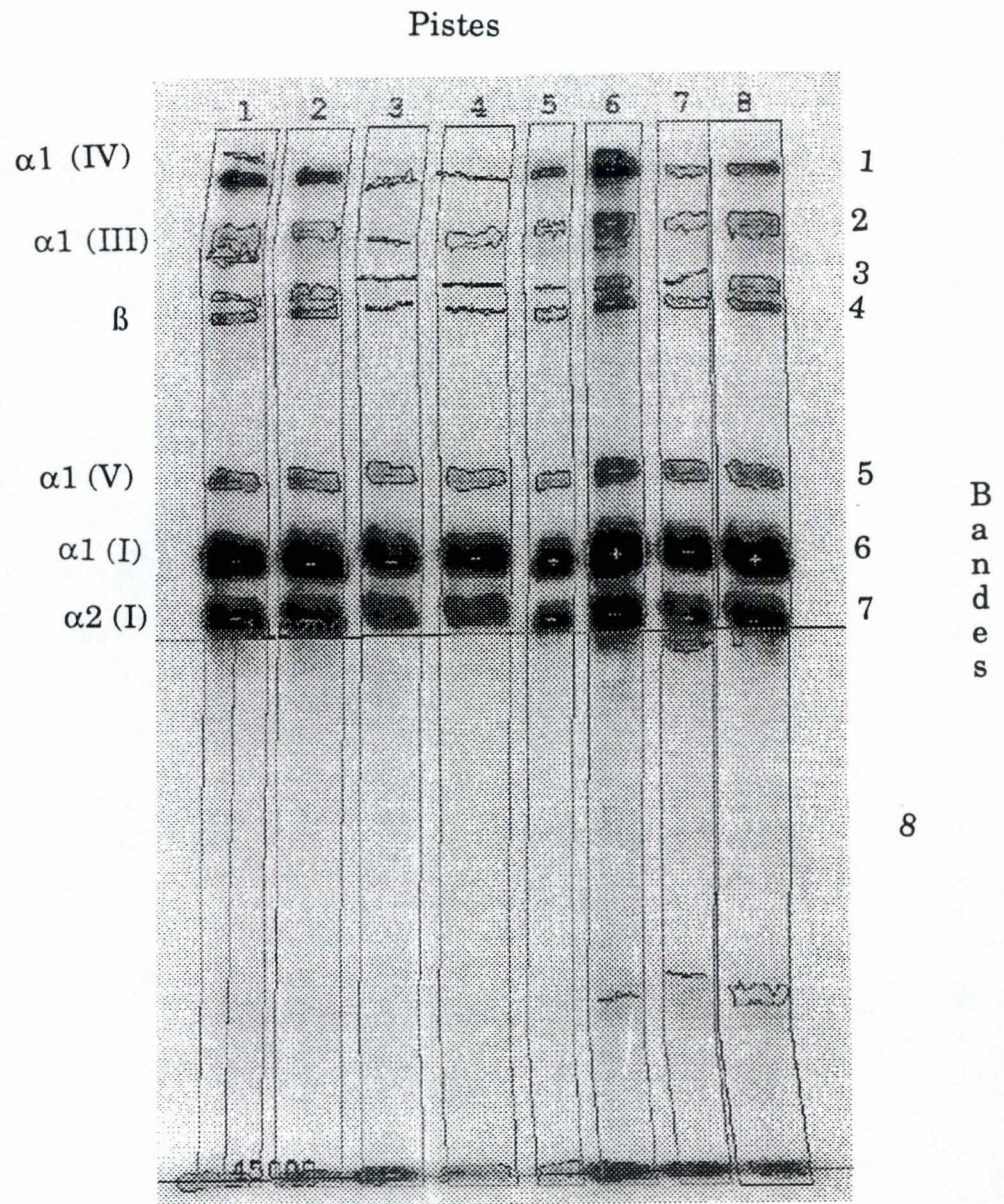


Figure III.13 : Fluorogramme obtenu après électrophorèse des collagènes synthétisés par des cellules musculaires lisses contractiles ou synthétiques incubés en présence ou en absence de PGE<sub>2</sub> à  $1,9 \cdot 10^{-9}$  M pendant 2 jours ou de PGF<sub>2</sub>α à  $3,6 \cdot 10^{-9}$  M pendant 1 ou 2 jours. L'électrophorèse a été effectuée en conditions non réductrices. La migration des marqueurs de poids moléculaire est indiquée sur le fluorogramme.



8

Figure III.14 : Analyse par le logiciel BioImage de l'intensité des bandes du fluorogramme présenté à la figure III.13.

Les résultats de cette expérience sont présentés dans le tableau III.1. L'incorporation de proline tritiée est exprimée en dpm/mg protéines.

Comme nous l'avons déjà mentionné auparavant, les CMLs synthétisent proportionnellement plus de collagène que les CMLc (1,38 fois plus).

Les prostaglandines dans ces conditions semblent avoir un effet inhibiteur sur la synthèse du collagène par les CMLc. Cet effet n'est pas mis en évidence pour les CMLs pour lesquelles l'incorporation de proline semble stimulée. Varga *et al* (1987) observèrent le même phénomène pour l'effet de la PGE<sub>2</sub> des fibroblastes humains et ils proposent que la régulation se fait à un niveau transcriptionnel.

Des électrophorèses furent réalisées sur ces échantillons afin d'analyser les diverses chaînes de collagène.

La figure III.13 montre le fluorogramme obtenu après électrophorèse.

L'analyse des gels permet de déterminer l'origine des diverses bandes en fonction des types de collagènes que les CML synthétisent. Nous nous basons principalement sur les standardisations faites au laboratoire avec des collagènes de type I et III et sur l'analyse des divers collagènes faite par Okada *et al*(1992). On peut de suite observer les deux bandes majoritaires qui correspondent aux chaînes  $\alpha 1$  (I) et  $\alpha 1$  (2) qui proviennent du collagène de type I qui est synthétisé en quantité très importantes par les CML. Elles correspondent à une masse moléculaire respectivement de 125 et 118 Kd dans nos conditions. Légèrement plus lourde, on trouve à 135 Kd la chaîne  $\alpha 1$  du collagène de type V. Ensuite viennent deux bandes dénommées  $\beta$ . Elles correspondent à des dimères des chaînes  $\alpha$  du collagène de type I. Elles migrent à un niveau de masse moléculaire de 150 à 155 Kd qui constitue pour elles une masse moléculaire apparente, étant donné leur structure en dimères. Plus lourdes encore on trouve les chaînes de collagène de type III et de type IV.

L'analyse de ces gels a été réalisée en digitalisant l'image de ces gels et en utilisant un programme BioImage qui intègre l'ensemble des points et leur intensité sur la surface correspondant à chacune de ces taches (figure III.14). Le périmètre des taches est indiqué sur la figure.

	1	2	3	4	5	6	7	8
CMLc	7,4	2,5	0,4	1,8	3,9	47,2	31,2	5,2
CMLs	4,3	1,9	1,3	1,9	3,6	51	30,3	5,2
CMLc + PGF2 $\alpha$ (1j.)	0,3	0,1	0,1	0,1	3,8	55,1	28,4	12,1
CMLs + PGF2 $\alpha$ (1j.)	0,1	1,1	0,1	0,1	4,2	61,3	26,3	6,5
CMLc + PGF2 $\alpha$ (2j.)	4,4	1,2	0,1	1,2	3,9	53,6	30,2	5,1
CMLs + PGF2 $\alpha$ (2j.)	12,8	5,4	1,3	2,4	5,4	39,1	26,6	6,9
CMLc + PGE2 (2j.)	1,3	1,3	0,1	1,1	5,1	53,1	25,5	11,7
CMLs + PGE2 (2j.)	2,9	3,6	1,9	2,1	4,6	49,3	29,2	6,1
Masse moléculaire (Kd)	175	167	160	150- 155	135	125	118	<

Tableau III.2 : Résultats quantitatifs de l'analyse de l'intensité des 8 bandes du fluorogramme présenté à la figure III.14 sur l'effet des prostaglandines sur la synthèse des collagènes. Ces valeurs sont exprimées en pourcentage de l'intégration de la densité optique et ont été estimées par le logiciel Bio Image.

On peut aussi obtenir une très bonne indication de l'importance de ces diverses bandes et exprimer celle-ci en % de l'ensemble des bandes d'une même électrophorèse. Ces valeurs sont présentées au tableau III.2. On a donné dans ces tableaux l'ensemble des valeurs correspondant aux bandes identiques à partir de leur masse moléculaire calculé.

La précision de cette analyse dépasse fortement la précision de l'électrophorèse et donc nous devons être prudents quant à la signification des chiffres. On peut cependant observer que la bande majoritaire est la chaîne  $\alpha 1(1)$  qui représente environ 50% de l'ensemble alors que la bande  $\alpha 2(I)$  ne représente que 25 à 30%. Ceci se comprend si l'on sait que le collagène de type I contient 2 chaînes  $\alpha 1$  et une chaîne  $\alpha 2$ . Au niveau de la bande correspondant à la chaîne  $\alpha 2(I)$ , on observe parfois une deuxième bande qui expliquerait le léger excès de cette chaîne dans les estimations données dans cette table.

La chaîne  $\alpha 1$  du collagène de type V est bien visible et représente environ 4 à 5% de l'ensemble. Les chaînes  $\beta$  représentent 2 à 3 % de l'ensemble. Les chaînes plus lourdes sont moins bien définies et leur importance varie d'une expérience à l'autre.

Lorsqu'on analyse l'effet des prostaglandines sur la distribution relative des divers collagènes, on n'aperçoit pas de tendances bien définies. Les chaînes  $\alpha 1(I)$  représentent une proportion variant de 49 à 61% excepté un test à 39%. Les chaînes  $\alpha 2(I)$  sont elles comprises entre 26 et 30%. Les chaînes  $\alpha 1(V)$  représentent 3,8 à 5,4% de l'ensemble.

Vu la mise au point nécessaire et la durée de la méthode (5 semaines pour avoir le résultat final), cette expérience n'a pu être réalisée qu'une seule fois. C'est la raison pour laquelle, nous restons prudent vis-à-vis de l'interprétation de ces données.

	Incorporation de proline par boîte en dpm (x 100).	Quantité de protéines par boîte en mg.	dpm/mg de protéines (x 100).
CMLc	13092	4,83	2711
CMLs	10440	2,57	4062
CMLc + CEA	11313	2,35	4814
CMLs + CEA	17576	1,79	9819
CMLc + CEH	9930	4,02	2470
CMLs + CEH	11219	1,21	9272

Tableau III.3 : Estimation de la synthèse de collagène par des cellules musculaires lisses dans l'état contractile (CMLc) ou synthétique (CMLs) et effet des milieux conditionnés par des cellules endothéliales exposées deux heures en normoxie (CEA) ou sous hypoxie (CEH) ajoutés dans le milieu de culture avec sérum. Les résultats sont exprimés en dpm/mg de protéines après précipitation des milieux au  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  et digestion à la pepsine.



#### D. EFFET DES MILIEUX CONDITIONNES PAR LES CELLULES ENDOTHELIALES EN PRESENCE DE SERUM

Le but de cette expérience est similaire au précédent : mettre en évidence un effet des facteurs mitogènes libérés par les cellules endothéliales sur la synthèse de collagène.

Dans ce cas-ci, ce sont les milieux conditionnés par les CE sont ajoutés dans le milieu de culture des CML. Les milieux conditionnés sont récoltés après incubation des CE sous normoxie et sous hypoxie pendant 2 heures. Ces milieux contiennent donc d'autres facteurs mitogènes que les prostaglandines pour les CML. Ils sont dilués 10X dans le milieu D + S et ajoutés au 4<sup>ème</sup> jour.

Les résultats obtenus sont repris au tableau III.3. La synthèse de collagène est 1,5 fois plus importante pour les CMLs que pour les CMLc, comme cela a déjà été démontré auparavant. La présence de milieux conditionnés par les CE semble avoir un effet activateur sur la synthèse de collagène, pour les CMLs. Les milieux conditionnés sous hypoxie n'ont pas un effet plus marqué que celui des milieux conditionnés sous normoxie.

Ce résultat peut sans doute être mis en relation avec le fait que les cellules endothéliales libèrent constitutivement une série de cytokines comme l'IL-1 et des facteurs de croissance comme le PDGF qui stimule la synthèse de collagène (Amento *et al*, 1991). En ce qui concerne l'effet sur les CMLc, le milieu conditionné sous hypoxie n'augmente pas la synthèse de collagène contrairement au milieu conditionné à l'air.

Nous avons voulu examiner s'il y avait des modifications dans les types de collagènes synthétisés en séparant les collagènes par électrophorèse. Les résultats sont présentés à la figure III.15 et leur analyse après digitalisation à la figure III.16 et au tableau III.4. L'ordre des bandes est semblables à celui déjà décrit pour l'effet des prostaglandines.

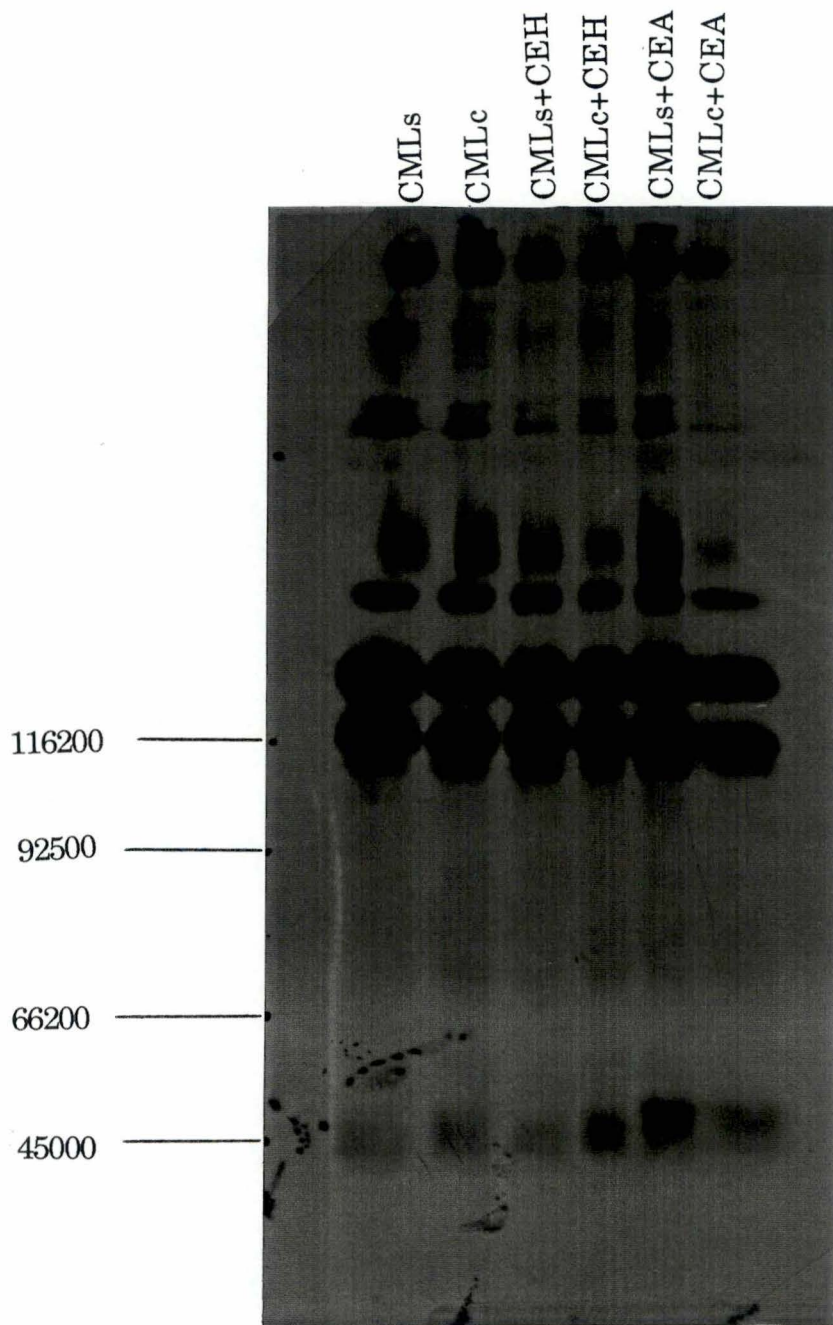


Figure III.15 : Fluorogramme obtenu après électrophorèse des collagènes synthétisés par des cellules musculaires lisses contractiles ou synthétiques incubées en présence ou en absence de milieux conditionnés par les cellules endothéliales normoxiques (CEA) ou hypoxiques (CEH). L'électrophorèse a été effectuée en conditions non réductrices. La migration des marqueurs de poids moléculaire est indiquée sur le fluorogramme.

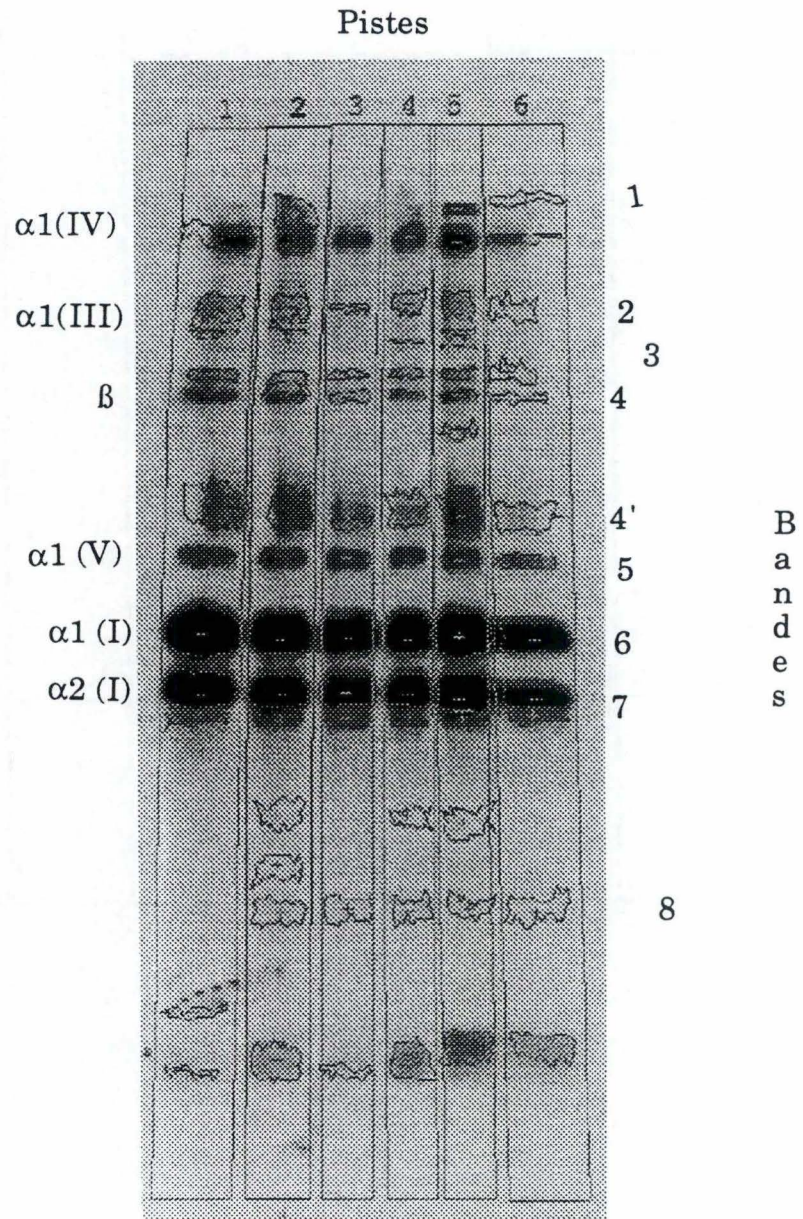


Figure III.16 : Analyse par le logiciel BioImage de l'intensité des bandes du fluorogramme présenté à la figure III.15.

	1	2	3	4	4'	5	6	7	8
CMLs	5,5	2,1	0,3	3,4	4,6	4,2	46,6	31,1	2,
CMLc	3,5	4,1	1,5	1,9	1,5	8,3	39,7	28,4	6,9
CMLs + CEH	4,5	0,2	-	1,2	1,1	5,4	51,4	32,6	3,8
CMLc + CEH	4,1	0,1	0,1	1,9	3,0	4,7	44,8	31,3	9,1
CMLs + CEA	9,2	1,3	0,3	1,7	8,4	4,0	37,2	27,4	10,2
CMLc + CEA	3,5	0,6	-	0,8	2,1	3,9	49,5	31,5	8,0
Masse moléc.  (Kd)	171	167	160	150- 155		135	125	118	<

Tableau III.4 : Résultats quantitatifs de l'analyse de l'intensité des bandes du fluorogramme présenté à la figure III.15 sur l'effet des milieux conditionnés sur la synthèse des divers collagènes. Ces valeurs sont exprimées en pourcentage de l'intégration de la densité optique et ont été estimées par le logiciel Bio Image.

L'analyse des données quantitatives ne permet pas non plus d'observer de changements importants dans la proportion de ces diverses bandes. La chaîne  $\alpha 1(I)$  représente 37 à 51% de l'ensemble alors que la chaîne  $\alpha 2(I)$  représente 27 à 31%. La chaîne  $\alpha 1(V)$  oscille entre 4 et 5% avec une valeur plus élevée. Quant aux chaînes  $\alpha 1(III)$  que l'on peut observer sur la première bande, elle représente une proportion de 3 à 5% avec une valeur plus élevée.

Il semble donc que, si les surnageants comme les prostaglandines peuvent influencer la quantité totale de collagènes synthétisés par les CML, ils ne semblent pas avoir d'effet important sur la proportion des divers types de collagènes du moins dans la limite de la précision des techniques électrophorétiques utilisées dans ce travail.

#### **E. EFFET DES MILIEUX CONDITIONNES ET DES PROSTAGLANDINES SUR LA SYNTHÈSE DE COLLAGÈNE DES CML INCUBÉES SANS SÉRUM**

Les expériences précédentes avaient été effectuées dans le milieu de culture des cellules. Or, ce milieu contenait 10% de sérum de veau foétal, contenant lui-même des facteurs de croissance qui peuvent influencer la synthèse de collagène.

Afin d'examiner l'effet des milieux conditionnés et des prostaglandines directement sur la synthèse de collagène, nous avons incubé les cellules dans du milieu D + HLA sans sérum en présence de la  $PGF_{2\alpha}$  ou des milieux des CE sous air ou sous hypoxie.

L'incorporation de proline marquée s'est faite comme précédemment. Les résultats sont présentés au tableau III.5 et à la figure III.17.

Les CMLs non traitées et soumises à des milieux conditionnés normoxiques synthétisent plus de collagène que les CMLc (1,3 fois plus que les contrôles). Par contre, cette différence disparaît pour les cellules incubées dans les autres conditions, à savoir en présence de  $PGF_{2\alpha}$ , ou de

	Incorporation de proline par boîte en dpm (x 100).	Quantité de protéines par boîte en mg.	dpm/mg de protéines (x 100).
CMLc	4441	1,252	3547
CMLs	2316	0,499	4641
CMLc + CEA	3791	1,150	3297
CMLs + CEA	2065	0,534	3867
CMLc + CEH	4539	1,131	4013
CMLs + CEH	2407	0,573	4201
CMLc + PGF <sub>2</sub> $\alpha$ (2j.)	5952	1,515	3929
CMLs + PGF <sub>2</sub> $\alpha$ (2j.)	2267	0,620	3656

Tableau III.5 : Estimation de la synthèse de collagène par des cellules musculaires lisses dans l'état contractile (CMLc) ou synthétique (CMLs) et effet des milieux conditionnés par des cellules endothéliales normoxiques (CEA) ou hypoxiques (CEH) ou de la PGF<sub>2</sub> $\alpha$  à 3,6 10<sup>-9</sup>M. Le milieu ne contenait pas de sérum. Les résultats sont exprimés en dpm par mg de protéines après précipitation des milieux au (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et digestion à la pepsine. Ils représentent la moyenne de deux boîtes de culture.

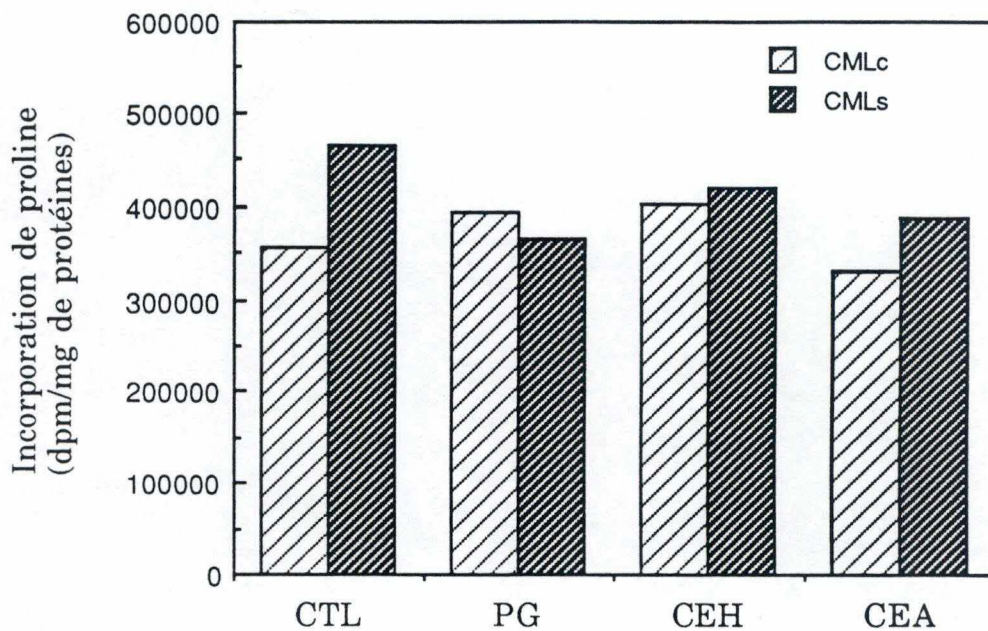


Figure III.17 : Effet de milieux conditionnés par des cellules endothéliales normoxiques (CEA) ou hypoxiques (CEH) ou de la PGF2 $\alpha$  à 3,6 10<sup>-9</sup>Mm. (PG) sur la synthèse de collagène de cellules musculaires lisses dans l'état contractile (CMLc) ou synthétique (CMLs). Les cellules non traitées sont également représentées (CTL). Les résultats sont exprimés en dpm par mg de protéines et représentent la moyenne de deux boîtes de culture.

milieux conditionnés par les CE sous hypoxie. Comme le milieu conditionné par les CE hypoxiques contient des prostaglandines en grande quantité et comme ce milieu fait disparaître la différence entre les deux états comme la PGF $2\alpha$  pure, celle-ci jouerait un rôle dans la modulation phénotypique de contractile vers synthétique.

La présence de PGF $2\alpha$ , en absence de sérum, semblerait donc avoir un effet inhibiteur sur la synthèse de collagène par les CMLs, contrairement à ce qui fut montré en présence de sérum. Il semble donc que le sérum ait un rôle important à jouer dans l'activation de la synthèse de collagène par les CMLs et que cet effet varie en fonction des molécules qu'il contient que ce soit les prostaglandines ou autres facteurs de croissance produits par les CE. Il est, par contre, plus difficile de tirer des conclusions en ce qui concerne l'effet du sérum sur la synthèse de collagène par les CMLc.

#### **IV. SYNTHÈSE D'ARN<sub>m</sub> DES COLLAGÈNES PAR LES CMLc et CMLs ET MODULATION PAR LES MILIEUX CONDITIONNÉS PAR LES CE**

Actuellement, la régulation de l'expression des gènes de collagène est très complexe et encore peu connue (Stepp *et al*, 1986; Ramirez *et al*, 1990; Majors *et al*, 1992). Pour des CML artérielles, Stepp *et al* (1986) ainsi que Majors *et al* (1992) ont montré que le taux d'ARN messager de collagène variait en fonction de la densité cellulaire. D'autres éléments, tels que les cytokines ou les facteurs de croissance, régulent également l'expression des ARNm de collagène des CML humaines (Amento *et al*, 1991).

Dès lors, après avoir étudié la synthèse de collagène au niveau protéique, il nous est apparu intéressant de l'étudier à un niveau antérieur, c'est-à-dire au niveau transcriptionnel. Cette étude se fera par Northern blot. La réalisation d'un Northern blot nécessite plusieurs étapes préliminaires, à savoir l'extraction d'ARN et le marquage de sondes spécifiques.



**Sequence**

TCT AGA AAG AAC CCA GCT CGC ACA TGC CGT GAC TTG AGA CTC AGC CAC CCA GAG TGG AGC	60
Ser Arg Lys Asn Pro Ala Arg Thr Cys Arg Asp Leu Arg Leu Ser His Pro Glu Trp Ser	
AGC GGT TAC TAC TGG ATT GAC CCC AAC CAA GGA TGC ACT ATG GAA GCC ATC AAA GTA TAC	120
Ser Gly Tyr Tyr Trp Ile Asp Pro Asn Gln Gly Cys Thr Met Glu Ala Ile Lys Val Tyr	
TGT GAT TTC CCT ACC GGC GAA ACC TGT ATC CGG GCC CAA CCT GAA AAC ATC CCA GCC AAG	180
Cys Asp Phe Pro Thr Gly Glu Thr Cys Ile Arg Ala Gln Pro Glu Asn Ile Pro Ala Lys	
AAC TGG TAT AGG AGC TCC AAG GAC AAG AAA CAC GTC TGG CTA GGA GAA ACT ATC AAT GCT	240
Asn Trp Tyr Arg Ser Ser Lys Asp Lys Lys His Val Trp Leu Gly Glu Thr Ile Asn Ala	
GGC AGC CAG TTT GAA TAT AAT GTT GAA GGA GTG ACT TCC AAG GAA ATG GCT ACC CAA CTT	300
Gly Ser Gln Phe Glu Tyr Asn Val Glu Gly Val Thr Ser Lys Glu Met Ala Thr Gln Leu	
GCC TTC ATG CGC CTG CTG G	319
Ala Phe Met Arg Leu Leu	

Figure III.18 : Séquence des 319 bases de cDNA humain COL1A2 incluse dans le plasmide PHCG1A2.

## A. PREPARATION DES DIFFERENTES SONDES DE COLLAGENE

Afin de détecter les différents ARNm codant les chaînes  $\alpha 1$  (I),  $\alpha 2$  (I) et  $\alpha 1$  (III) du collagène, nous utiliserons plusieurs sondes marquées radioactivement.

Les deux sondes spécifiques du collagène de type I ont été fabriquées à partir de plasmides comprenant ces séquences spécifiques :

-plasmides pGEM 3Z (2740 bp) contenant le fragment de cDNA **Human COL1A1** (360 bp) et nommés pHCG1;

-plasmides pGEM 4Z (2740 bp) contenant le fragment de cDNA **Human COL1A2** (319 bp) et nommés pHCG1A2.

Ces deux plasmides contenant des gènes de résistance, nous ont été fournis par l'Institut de Biologie et de Chimie des Protéines de Lyon à la concentration de 200  $\mu\text{g/ml}$  pour pHCG1 et 300  $\mu\text{g/ml}$  pour pHCG1A2.

Pour plus de facilité, les séquences des sondes contenues dans ces plasmides seront respectivement nommées  $\alpha 1$  (I) et  $\alpha 2$  (I). Elles sont décrites aux figures III.18 et III.19.

Dans le but d'amplifier et de purifier ces deux séquences, les plasmides ont été insérés dans des bactéries par choc thermique (transformation bactérienne). Les bactéries ayant reçu le plasmide furent sélectionnées sur milieu LB + ampicilline.

Les deux sondes spécifiques du collagène de type III, quant à elles, ont été synthétisées à partir de :

-plasmide PBR 322 (4363 bp) contenant une séquence codant une partie de la chaîne  $\alpha 1$  (III) **de souris** (1700 bp) et nommé pnc 1.7. (Metsäranta *et al*, 1991). Ce plasmide possède un gène de résistance à l'ampicilline.

-plasmide PBR 322 (4363 bp) contenant une séquence codant une partie de la chaîne  $\alpha 1$  (III) **humaine** (1800 bp) et nommé pH III-33 (Miskulin *et al*, 1986). Ce plasmide contient un gène de résistance à la tétracycline.

Nous nous sommes procurés ces plasmides au Laboratoire de Dermatologie Expérimentale du Professeur Lapière (Université de Liège, Belgique). Ceux-ci étaient déjà insérés dans des bactéries.

### Sequence:

TC	GAG	GTG	GAC	ACC	ACC	CTC	AAG	AGC	CTG	AGC	CAG	CAG	ATC	GAG	AAC	ATC	CGG	AGC	CCA	G	60
	Glu	Val	Asp	Thr	Thr	Leu	Lys	Ser	Leu	Ser	Gln	Gln	Ile	Glu	Asn	Ile	Arg	Ser	Pro		
AG	GGA	AGC	CGC	AAG	AAC	CCC	GCC	CGC	ACC	TGC	CGT	GAC	CTC	AAG	ATG	TGC	CAC	TCT	GAC	T	120
Glu	Gly	Ser	Arg	Lys	Asn	Pro	Ala	Arg	Thr	Cys	Arg	Asp	Leu	Lys	Met	Cys	His	Ser	Asp		
GG	AAG	AGT	GGA	GAG	TAC	TGG	ATT	GAC	CCC	AAC	CAA	GGC	TGC	AAC	CTG	GAT	GCC	ATC	AAA	G	180
Trp	Lys	Ser	Gly	Glu	Tyr	Trp	Ile	Asp	Pro	Asn	Gln	Gly	Cys	Asn	Leu	Asp	Ala	Ile	Lys		
TC	TTC	TGC	ACC	ATG	GAG	ACT	GGT	GAG	ACC	TGC	GTG	TAC	CCC	ACT	CAG	CCC	AGT	GTG	GCC	C	240
Val	Phe	Cys	Thr	Met	Glu	Thr	Gly	Glu	Thr	Cys	Val	Tyr	Pro	Thr	Gln	Pro	Ser	Val	Ala		
AG	AAG	AAC	TGG	TAC	ATC	AGC	AAG	AAC	CCC	AAG	GAC	AAG	AGG	CAT	GTC	TGG	TTC	GGC	GAG	A	300
Gln	Lys	Asn	Trp	Tyr	Ile	Ser	Lys	Asn	Pro	Lys	Asp	Lys	Arg	His	Val	Trp	Phe	Gly	Glu		
GC	ATG	ACC	GAT	GGA	TTC	CAG	TTC	GAG	TAT	GGC	GGC	CAG	GGC	TCC	GAC	CCT	GCC	GAT	GTG	G	360
Ser	Met	Thr	Asp	Gly	Phe	Gln	Phe	Glu	Tyr	Gly	Gly	Gln	Gly	Ser	Asp	Pro	Ala	Asp	Val		

Figure III.19 : Séquence des 360 bases de cDNA humain COL1A1 incluse dans le plasmide PHCG1.

Afin d'amplifier la production de ces différentes séquences plasmidiques, les souches bactériennes ont été cultivées dans du milieu LB + l'antibiotique adéquat. Les plasmides furent ensuite purifiés sur colonne QIAGEN (Midiprep) et analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%.

Les résultats de cette purification sont représentés à la figure III.20. Les plasmides pHCG1 et pHCG1A2 sont linéarisés par l'enzyme de restriction Eco RI, également utilisé pour séparer l'insert de 1700 bp de sa matrice (PBR 322). La séquence de 1800 bp est libérée par les enzymes Xho I et Hind III.

Grâce au marqueur de poids moléculaires, nous pourrions estimer à partir de la courbe d'étalonnage présentée à la figure III.21, la taille des fragments obtenus après restriction. :

- les lignes 1 et 2 contiennent un fragment de 3162 bp, correspondant aux plasmides PGEM (2740 bp) contenant les séquences  $\alpha 1$  (360 bp-ligne 1) et  $\alpha 2$  (319 bp-ligne 2).
- la ligne 5 montre une bande de 4360 bp (PBR 322) et une bande d'environ 1960 bp (pnc 1.7.).
- la ligne 6 montre une bande de 3900 bp (PBR 322) et de 1850 bp.

Nous disposons donc de plasmides purifiés qui serviront à synthétiser les sondes  $\alpha 1$  (I) et  $\alpha 2$  (I), par PCR.

Les sondes  $\alpha 1$  (III) souris et  $\alpha 1$  (III) humaine seront fabriquées par "random priming". Pour le marquage par "random priming", les brins d'ADN doivent être linéaires. Les fragments de 1700 et 1800 bp seront purifiés à partir du gel d'agarose grâce au kit Geneklean II. Les fragments obtenus sont purs puisqu'on n'observe plus qu'une seule bande aux environs de 1700-1800 bp (Figure III.22).

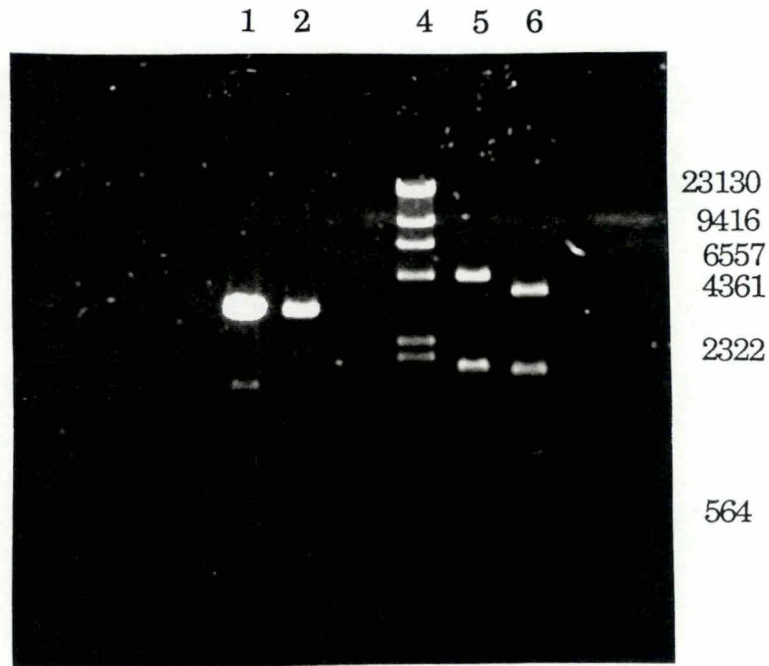


Figure III.20 : Photographie d'un gel d'agarose 0,8% permettant de visualiser les plasmides purifiés par la méthode de QIAGEN. Sur la piste 1 et 2 les plasmides entiers, la piste 4 contenant les étalons de poids moléculaire (marqueur II Boehringer). La piste 5 contient le plasmide pnc1.7 restreint par EcoRI libérant ainsi son insert. La piste 6 est occupée par le plasmide pHIII33 coupé par Hind III et Xho I libérant aussi son insert.

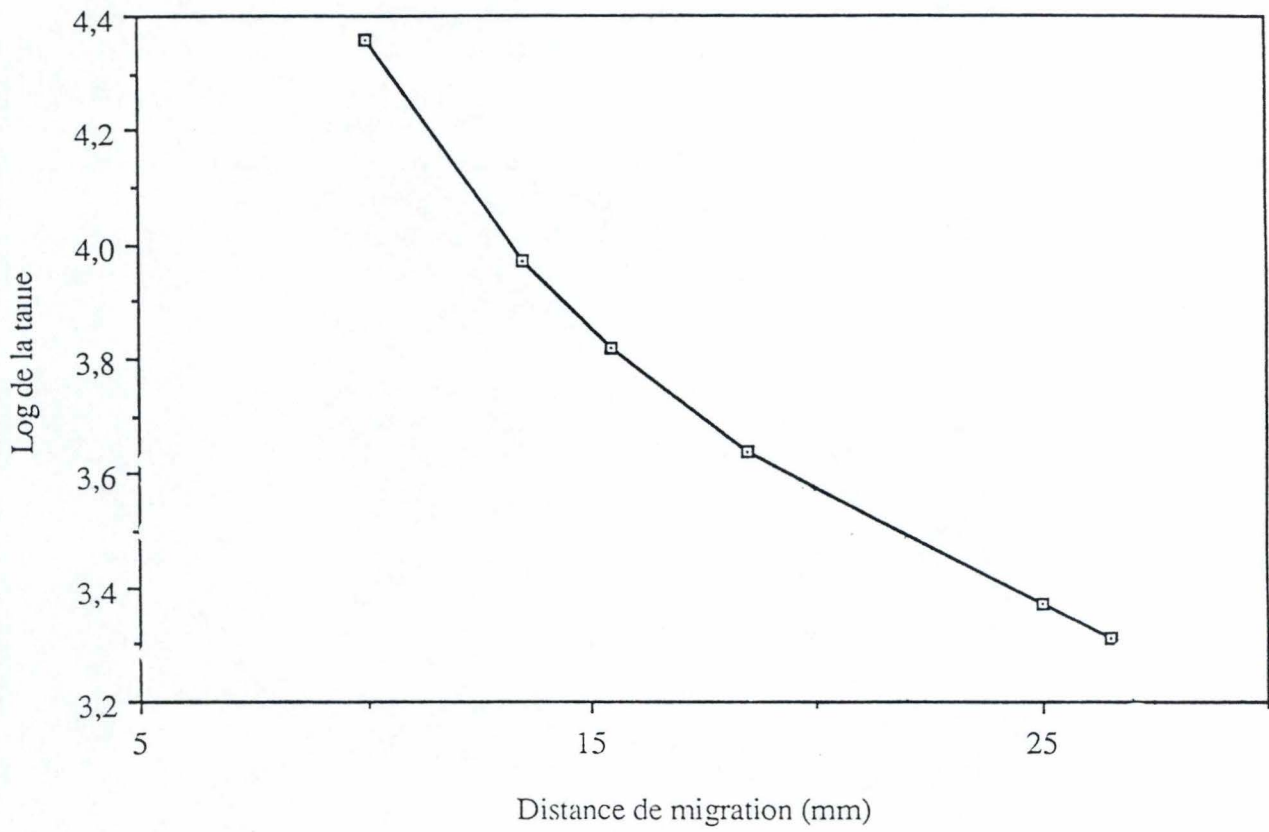


Figure III.21 : Droite d'étalonnage donnant la distance de migration de fragments d'ADN étalon de taille différente présentés à la figure III.20.

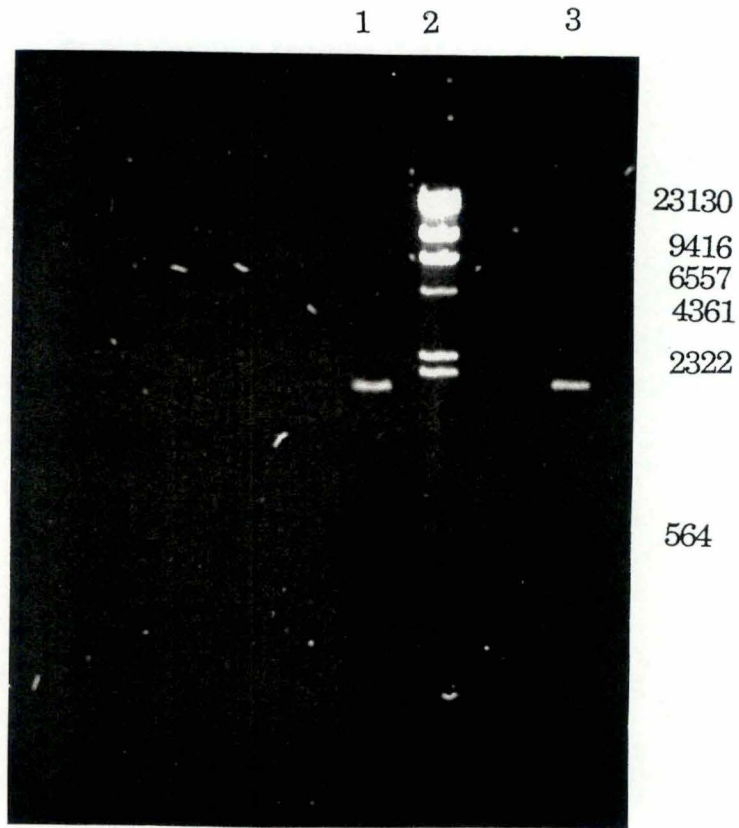


Figure III.22 : Gel d'agarose 0,8% montrant les deux inserts après purification par la méthode Gene Clean II. Les marqueurs de poids moléculaire sont de chez Boehringer (marqueur II).

Pour la mise en oeuvre de la PCR, les amorces choisies sont constituées d'une vingtaine de bp situées aux extrémités 3' des deux brins de chaque fragment :

- pour  $\alpha 1$  (I):     5'     TCG AGG TGG ACA CCA CCC TC     3'  
                               5'     CCA CAT CGG CAG GGT CGG AG     3'  
 - pour  $\alpha 2$  (I):     5'     TCT AGA AAG AAC CCA GCT CGC 3'  
                               5'     CCA GCA GGC GCA TGA AGG CAA 3'

Ces différentes amorces ne doivent pas être complémentaires l'une de l'autre. Leur température d'appariement est calculée en additionnant 2°C par base A ou T et 4°C par base G ou C. Dans ce cas, cette température est égale à  $\pm 62^\circ\text{C}$ .

L'amplification est de l'ordre du million. Tous les fragments amplifiés font 360 et 319 bp, puisque les amorces se trouvent aux extrémités.

Nous disposons donc maintenant des outils nécessaires à la révélation des ARN messagers de collagène lors d'un Northern blot.

## **B. L'EXTRACTION D'ARN A PARTIR DE CULTURES CELLULAIRES**

Cette extraction s'est faite selon la méthode décrite au point I du "Matériel et méthodes".

Les CMLs et les CMLc furent repiquées dans des boîtes T 75 dans les mêmes conditions que lors de la dernière purification du collagène, afin d'obtenir des valeurs pouvant être comparées.

Ces conditions sont, pour chaque phénotype :

- un couple de boîtes contrôle (phénotype synthétique/phénotype contractile)
- un couple de boîtes contenant la  $\text{PGF}_2\alpha$  à  $3,63 \cdot 10^{-9}$  M
- un couple de boîtes contenant des milieux conditionnés par des CE hypoxiques, dilués 10X



-un couple de boîtes contenant des milieux conditionnés par des CE normoxiques, dilués 10X.

Les CML sont repiquées dans du milieu D + S. Au troisième jour, les boîtes sont rincées et le milieu est remplacé par du milieu D + HLA contenant soit la  $\text{PGF}_2\alpha$ , soit les milieux conditionnés des CE.

Le sérum a été enlevé du milieu pour ne pas masquer l'effet de la  $\text{PGF}_2\alpha$  et des milieux conditionnés. L'extraction des ARN totaux se fait au 5<sup>ème</sup> jour.

La quantité d'ARN extraite est estimée par mesure de la densité optique à 260 nm. Pour  $2\mu\text{l}$  d'ARN dilués dans  $500\mu\text{l}$  d'eau, cette quantité est calculée comme suit :

$$\text{concentr. (en } \mu\text{g}/\mu\text{l}) = 1/25 \cdot \text{DO}_{260} \cdot 500 \cdot 2$$

Les valeurs obtenues pour les différents échantillons sont les suivantes :

	cc. d'ARN total (en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
CMLc	11,52
CMLc + CEA	9,96
CMLc + CEH	10
CMLs	2,2
CMLs + CEA	2,96
CMLs + CEH	5,04
CMLs + PG	5,76

Rem : la boîte de CMLc + PG a été contaminée

Nous déposerons la même quantité d'ARN dans tous les puits. Les ARN totaux sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose et observés aux rayons U.V. Nous distinguons 2 bandes bien nettes et différenciées qui correspondent aux ARN ribosomiaux 28S et 18S. Lorsque ces 2 bandes sont présentes, on peut considérer que l'extraction s'est faite sans

dégradation liées à la présence de RNases. La fig. III.23 montre notre gel après migration.

Vu l'intégrité des ARN, les échantillons peuvent être transférés sur membrane de nylon pendant toute une nuit. Après le transfert, la membrane et le gel sont observés sous U.V., afin de visualiser les bandes 18S et 28S. Celles-ci ont disparu du gel et se retrouvent sur la membrane. Nous pouvons donc en conclure que le transfert s'est bien effectué.

Après fixation des ARN à la membrane, celle-ci est préhybridée dans une solution contenant de l'ADN de sperme de hareng afin de bloquer les sites de fixation non spécifiques de la membrane. L'hybridation se fait dans la même solution en présence de la sonde radioactive reconnaissant les ARNm de collagène.

La fig.III.24 représente l'autoradiographie obtenue après "hybridation" de la sonde  $\alpha_1$  (I).

Comme nous pouvons le voir, cette dernière n'a reconnu aucun ARN messager de collagène. Seule la piste contenant l'étalon s'est "allumée". Les tests effectués avec la sonde pH III-33 se sont également révélés infructueux. A l'heure actuelle, nous en ignorons la cause. Cela semblerait dû à une mauvaise spécificité des sondes ou à des mauvaises conditions de lavage de la membrane après l'étape d'hybridation, puisque l'étape de transfert s'est bien déroulée comme nous avons pu le visualiser aux U.V. Une mise au point supplémentaire de la méthode sera donc nécessaire afin d'étudier au niveau transcriptionnel la régulation de la synthèse de collagène dans les CML par les milieux conditionnés par des cellules endothéliales hypoxiques.

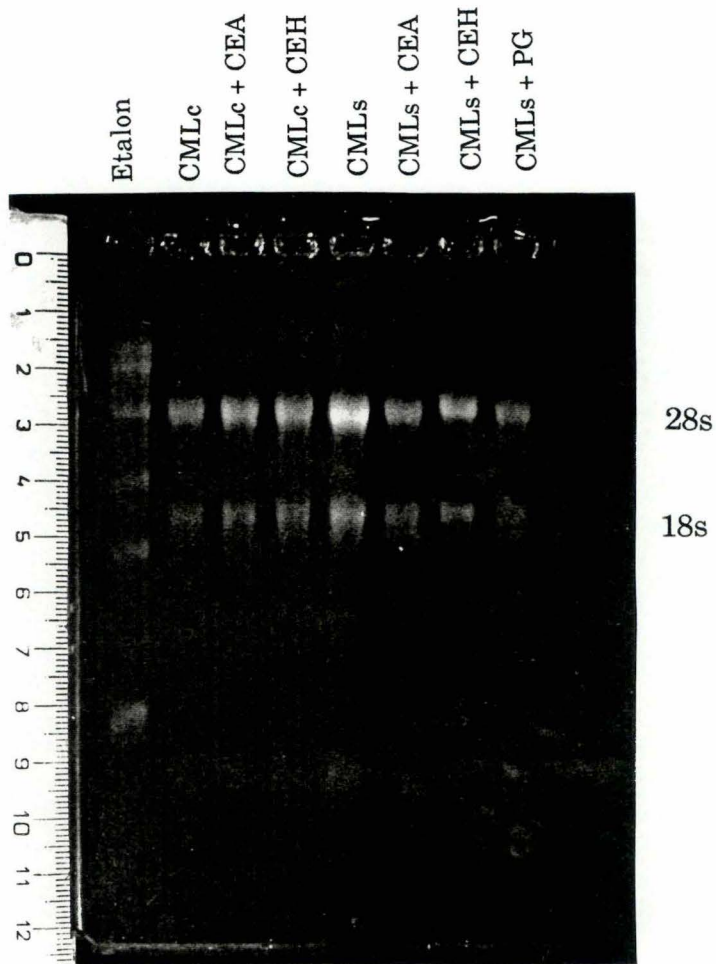


Figure III.23 : Gel d'électrophorèse où les ARN ont migré suivant leur poids moléculaire. La photo nous permet de contrôler l'intégrité des ARN après migration. Le transfert peut donc avoir lieu.

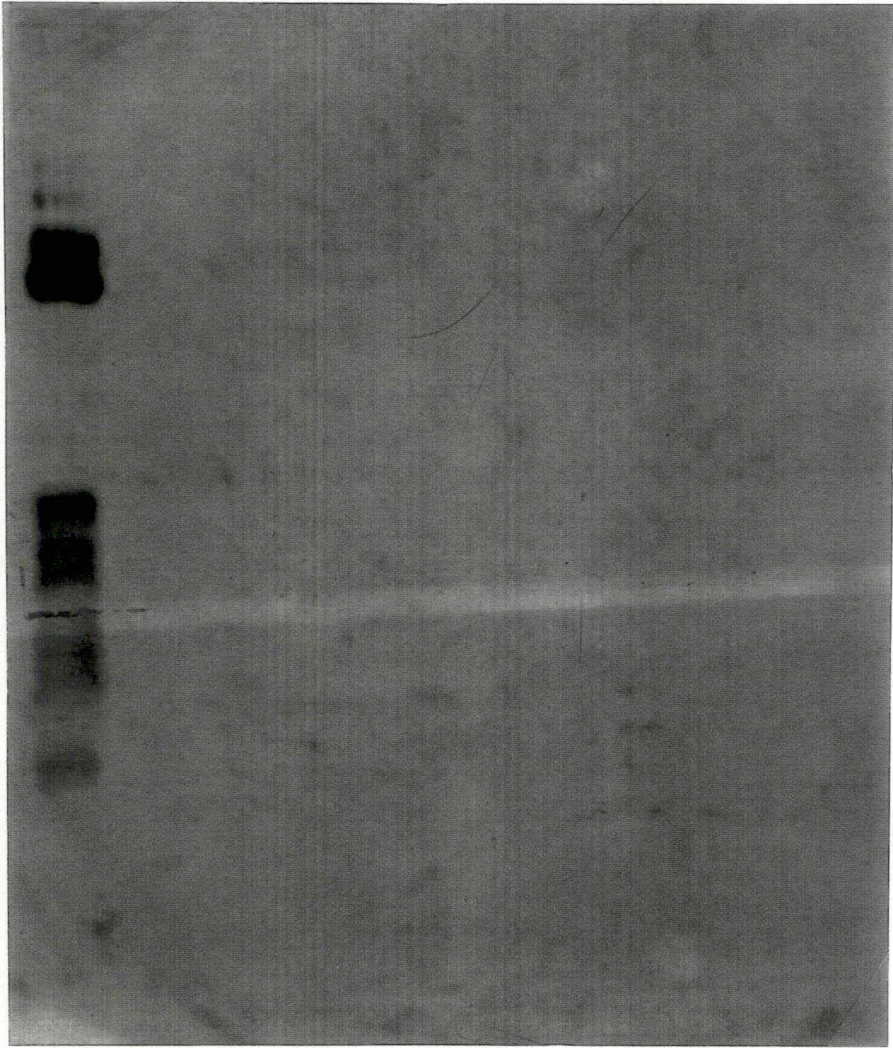


Figure III.24 : Autoradiographie obtenue après hybridation de la sonde  $\alpha 1(I)$ . La seule piste allumée est celle de l'étalon.

## DISCUSSION ET CONCLUSION

Les maladies veineuses des membres inférieurs sont lourdes de conséquences : souffrance, invalidité, mortalité. La prévalence des affections veineuses ne peut malheureusement qu'augmenter dans notre société occidentale, suite au vieillissement de la population et au mode de vie de plus en plus sédentaire. D'autres facteurs tels que l'hérédité, l'obésité, les grossesses multiples paraissent également être responsables qu'une fréquence plus accrue de ces pathologies (Ramelet *et al*, 1990).

Le principal facteur en cause est une stase veineuse, entraînant une diminution de l'apport d'oxygène au tissu. Lors de ce phénomène d'hypoxie, le principal remaniement subi par la paroi veineuse se situe au niveau de la média. Les CML passent en effet d'un phénotype contractile à un phénotype synthétique : elles prolifèrent et se caractérisent par une synthèse accrue des constituants de la matrice extracellulaire. Tout ceci conduit à un épaissement de la média et une désorganisation de la structure cellulaire de la paroi veineuse.

Afin d'étudier les différents mécanismes se produisant lors de telles pathologies, il était intéressant de développer un modèle où l'on pouvait reproduire *in vitro* ces deux phénotypes.

Expérimentalement, ces deux phénotypes furent obtenus en repiquant les CML à deux densités cellulaires : une densité élevée de 40000 cellules par  $\text{cm}^2$  pour les cellules contractiles et une densité cinq fois plus faible pour les cellules synthétiques (8000 cellules par  $\text{cm}^2$ ). Notre premier but était de vérifier que ces conditions de culture induisait bien l'une ou l'autre des deux phénotypes. Grâce à la microscopie électronique, nous avons pu mettre en évidence les caractéristiques spécifiques des deux phénotypes, décrites par Chamley-Campbell *et al* (1979) : de nombreux myofilaments dans le cytoplasme des cellules contractiles et un abondant réseau de réticulum endoplasmique rugueux pour les cellules synthétiques. Thyberg *et al* (1985) ont également mis ces caractéristiques en évidence à partir de cellules artérielles humaines, de même que Sjölund *et al* (1986) sur des cellules d'aorte de rat.

Le haut degré d'organisation des filaments d'actine détecté au moyen de l'immunofluorescence dans les cellules contractiles constitue un second critère important pour l'identification de ces deux phénotypes. Ils signent en effet la présence d'un appareil contractile bien développé, qu'on n'observe pas dans les cellules qui se différencient en CML synthétiques. Yamamoto *et al* (1992) ont également mis en évidence par la même technique un réseau de faisceaux contractiles parallèles bien organisés lorsqu'ils cultivent des CML d'aorte de lapin en primo-culture par rapport aux cellules prolifératives des cultures subséquentes.

Nous avons ensuite caractérisé biochimiquement les deux phénotypes des CML, phénotypes confirmés par les études morphologiques. Nous avons tout d'abord étudié l'évolution de la concentration calcique cytosolique en réponse à un stimulus qui induit normalement la contraction de segments d'artères ou de veines isolés. nous avons choisi la vasopressine car nous savions que les CML A7r5 possédaient un récepteur à la vasopressine (Thibonnier *et al*, 1991). Alors que la concentration calcique cytosolique des cellules au repos est la même pour les deux phénotypes, la réponse induite par la vasopressine mesurée par une augmentation rapide et transitoire de cette concentration calcique est plus importante dans les CMLc. On sait que la vasopressine induit majoritairement un relargage de calcium des stocks intracellulaires via la génération d'IP<sub>3</sub> plutôt que par un influx de calcium extracellulaire (Sill *et al*, 1991). Deux hypothèses ont été émises pour expliquer cette différence : soit le nombre des récepteurs à la vasopressine est plus élevé à la surface des CMLc, soit leur réserve intracellulaire en calcium est plus importante. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour discriminer quelle hypothèse est correcte mais nous pouvons déjà conclure en soulignant que ces résultats, qui montrent une réponse plus importante des CMLc à la vasopressine, confirment bien le phénotype contractile de ces cellules.

Dans un second temps, nous avons étudié la synthèse de collagène par les CML dans les deux phénotypes. Nous avons choisi d'étudier cette synthèse parce qu'il a été démontré *in vivo* dans les parois veineuses atteintes de pathologies variqueuses que cette synthèse était augmentée, lorsque les CML passaient d'un état contractile à un état synthétique et

que, par ailleurs, plusieurs auteurs ont montré *in vitro* que la modulation phénotypique entraînait une augmentation de cette synthèse. Nous pensions donc utiliser ce critère, une fois bien défini dans notre modèle expérimental, pour suivre la modulation phénotypique éventuelle induite par les cellules endothéliales soumises à une hypoxie. Nous avons en effet déjà montré précédemment (De Leener, 1992; Michiels *et al*, soumis) que les cellules endothéliales soumises à une hypoxie qui mime l'ischémie résultant de la stase veineuse *in vivo*, relarguaient des facteurs mitogènes pour les CML. Il était donc très intéressant de vérifier qu'en plus de cette activité mitogénique, ces facteurs pouvaient aussi induire la modulation phénotypique.

Nous avons montré quantitativement, en utilisant l'incorporation de proline tritiée, marqueur relativement spécifique des protéines collagéniques, que les CMLs synthétisaient en moyenne pour tous les résultats 1,5 fois plus de collagène que les CMLc. Il est important de remarquer que cette activité synthétique accrue est à mettre en relation avec l'abondance du réticulum endoplasmique rugueux dans ces mêmes cellules mise en évidence en microscopie électronique à transmission. Nous avons aussi étudié de manière plus qualitative l'expression des différentes chaînes des différents types de collagène à l'aide de la technique d'électrophorèse. Une analyse plus fine et plus quantitative des résultats de l'électrophorèse a également été réalisée à l'aide du logiciel BioImage. Cette analyse a permis de montrer que c'est la synthèse totale des collagènes qui est régulée mais qu'on n'observe pas de régulation plus spécifique des différents types de collagène.

Plusieurs auteurs ont étudié la synthèse de collagène par des CML en fonction de la densité cellulaire ou de leur état de croissance. Holderbaum *et al* (1984) et Majors *et al* (1992) ont montré une sécrétion plus faible de collagène dans des CML en état stationnaire, c'est-à-dire non prolifératif, alors qu'elle pouvait être jusqu'à 8 fois plus importante dans des CML cultivées à faible densité, c'est-à-dire, en phase de croissance exponentielle. Okada *et al* (1990) ont étudié la relation entre le phénotype des CML et leur synthèse de collagène : lors de la modulation phénotypique, la synthèse et la sécrétion des protéine de la matrice extracellulaire sont plus élevées. Ils ont également montré que lors du passage de l'état synthétique vers l'état contractile induit par le DMSO chez des CML d'aorte de lapin, ils observaient une diminution de la

synthèse des collagènes avec une diminution proportionnellement plus grande pour le type III et I par rapport aux types V et IV (Okada *et al*, (1989).

Puisque nous disposions d'un outil précis caractérisant les deux phénotypes des CML, nous pouvions étudier l'influence des prostaglandines et des milieux conditionnés par les cellules endothéliales sur ce paramètre. Comme la  $\text{PGF}_2\alpha$  est le constituant majeur de ces milieux responsable de la prolifération des CML (Michiels *et al*, soumis), nous voulions vérifier qu'elle était également responsable de la modulation phénotypique. Les résultats en présence de sérum montrent que les milieux conditionnés par les cellules endothéliales, qu'elles soient normoxiques ou hypoxiques, ainsi que la  $\text{PGF}_2\alpha$  modulent la synthèse de collagène par les CML. Cependant, ces résultats ne sont pas facilement interprétables en fonction des observations préalables. De plus, le sérum contient toutes une série de composés tels que des cytokines ou des facteurs de croissance qui sont connues pour moduler les fonctions notamment de synthèse des CML (Amento *et al*, 1991).

Nous avons donc refait les expériences en absence de sérum afin d'isoler l'effet des molécules et nous avons montré que les milieux conditionnés par les cellules endothéliales hypoxiques ainsi que la  $\text{PGF}_2\alpha$  pouvaient induire une augmentation de la synthèse totale de collagène par les CMLc. Ceci ne se produit pas avec le milieu conditionné en normoxie. On peut mettre en relation en rapport ces observations avec le fait que la prolifération des CML induite dans les mêmes conditions n'est également observable qu'en absence de sérum.

Ces résultats, même s'ils doivent être confirmés, indiquent cependant pour la première fois que l'exposition sous hypoxie de cellules endothéliales pourrait induire une synthèse de facteurs, dont la  $\text{PGF}_2\alpha$ , qui induiraient la modulation phénotypique des CML, c'est-à-dire leur dédifférenciation partielle en CML synthétiques. Ces CML synthétiques répondent aux facteurs mitogènes libérés dans les mêmes conditions, prolifèrent et synthétisent plus de protéines de la matrice extracellulaire, comme le montrent nos résultats. Ce pourrait donc être le point de départ de l'épaississement de la média observé dans les veines variqueuses *in vivo* ainsi que de la désorganisation de la structure de la paroi veineuse et de la perte de la contractibilité.



## PERSPECTIVES

Au cours de ce travail, nous sommes parvenus à caractériser les deux phénotypes des CML par différentes méthodes. A présent, il serait intéressant d'étudier directement l'effet des prostaglandines et des milieux conditionnés par les cellules endothéliales sur ces deux phénotypes de manière plus approfondie afin de vérifier les résultats obtenus. Nous voudrions aussi, pour compléter l'analyse biochimique au niveau des collagènes, mettre la technique de Northern blot tout à fait au point pour pouvoir réaliser les études au niveau transcriptionnel.

En utilisant d'autres techniques mettant en évidence d'autres caractéristiques de ces deux phénotypes, nous pourrions aussi confirmer cette modulation phénotypique, notamment en suivant l'évolution de la quantité d' $\alpha$ -actine au niveau de la protéine et de son ARNm.

Nous espérons au terme de ces études définir de manière précise les mécanismes biochimiques responsables des modifications observées dans les veines pathologiques *in vivo* au niveau cellulaire et structural et pouvoir ainsi développer une nouvelle stratégie thérapeutique plus efficace basée sur ces nouvelles connaissances.

**BIBLIOGRAPHIE**

**Amento E. P., Ehsani N., Palmer H., Libby P.**

Cytokines and growth factors positively and negatively regulate intestinal collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells.

*Arteriosclerosis and Thrombosis*, 11 (1991), 1123-1230.

**Arnould, T., Michiels, C., Alexandre, I., Remacle, J.**

Effect of hypoxia upon intracellular calcium concentration of human endothelial cells.

*Journal of Cellular Physiology*, 152 (1992), 215-221.

**Arnould, T., Michiels, C., Remacle, J.**

Activation of adherent PMN to hypoxic HUVEC leads to cytotoxicity. Blood (soumis pour publication).

**Arnould, T., Michiels, C., Remacle, J.**

Increased PMN adherence on endothelial cells after hypoxia : involvement of PAF, CD18/CD11b and ICAM-1.

*American Journal of Physiology*, 294 (1993), C1110-C1110.

**Borel, J.P., Monboisse, J.P. and Bellon, G.**

Inflammation, collagène et radicaux libres oxygénés.

*Respiratory Science*, 5 (1988) 304-310.

**Chamley-Campbell, J., Campbell, G.R. and Ross, R.**

The smooth muscle cell in culture.

*Physiological Reviews*, 59 (1979), 1-61.

**Chomczynski, P. and Sacchi, N.**

Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.

*Analytical Biochemistry*, 162 (1987), 156-159.

**Darnell, J., Lodish, H. and Baltimore, D.**

*Biologie moléculaire de la cellule - Deuxième édition.*

De Boeck Université, Bruxelles, 1993.

**De Leener, F.**

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

Mémoire de licence, 1992.

**Eyre D.**

Collagens cross-linking amino acids.

*in* : Methods in enzymology. Structural and contractile proteins (part D), ed. by W. Cunningham, Academic Press, Orlando, 1987, 115-119.

**Graham M.F., Drucker D.E.M., Diegelmann R.F. and Elson C.O.**

Collagen synthesis by human intestinal smooth muscle cells in culture

Gastroenterology, 92 (1987), 400-405.

**Gibbons, G.H. and Dzau, V.J.**

Endothelial function in vascular remodeling.

*in* : The Endothelium : an introduction to current research, ed. by John B. Warren, Wiley-Liss, New York, (1990), 81-93.

**Grynkiewicz, G., Poeni, M. and Tsien, R. Y.**

A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescent properties.

Journal of Biological Chemistry, 260 (1985), 3440-3450.

**Hamati, H.F., Britton, E.L. and Carey, D.J.**

Inhibition of proteoglycan synthesis alters extracellular matrix deposition, proliferation, and cytoskeletal organization of rat aortic smooth muscle cells in culture.

The Journal of Cell Biology, 108 (1989), 2495-2505.

**Hinshaw, D.B., Armstrong, B.C., Beals, T.F. and Hyslop P.A.**

A cellular model of endothelial cell ischemia.

Journal of Surgical Research, 44 (1988) 527-537.

**Holderbaum D. and Ehrhart A.L.**

Modulation of types I and III procollagen synthesis at various stages of arterial smooth muscle cell growth *in vitro*.

Experimental Cell Research, 153 (1984), 16-24.

- Jaffe, E.A., Nachman, R.L., Becker, C.G. and Minich, C.R.**  
Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins.  
*Journal of Clinical Investigation*, 52 (1973), 2745-2756.
- Junqueira, L.C. and Carneiro, J. and Kelley R.O.**  
Tissus musculaires.  
*in* : "Basic Histology - Sixth edition", Appleton and Lange,  
California, 1989.
- Kimes, B.W., Brandt, B.L.**  
Characterization of two putative smooth muscle cell lines from rat  
thoracic aorta.  
*Experimental Cell Research*, 98 (1976)349-366.
- Lewis, P.R. and Knight, D.P.**  
Cytological staining methods in electron microscopy.  
*in* : Practical methods in electron microscopy. Staining methods for  
sectioned material. ed. by Gauert, A.M., Amsterdam, North-  
Holland Publishing Company, 1977, 25-76.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.**  
Protein measurement with Folin phenol reagent.  
*Journal of Biological Chemistry*, 193 (1951) 265-275.
- Majors A.K. and Ehrart A.L.**  
Cell density and proliferation modulate collagen synthesis and  
procollagen mRNA levels in arterial smooth muscle cells.  
*Experimental Cell Research*, 200 (1992), 168-174.
- Martin, J.F. and Hassall, D.G.**  
The endothelium and atherosclerosis.  
*in* : The Endothelium : an introduction to current research, ed. by  
John B. Warren, Wiley-Liss, New York, 1990, 95-105.
- Michiels C., Arnould T. and Remacle J.**  
Hypoxia-induced activation of endothelial cells as a possible cause of  
venous disease: hypothesis.  
*Angiology* 534 (1993), 1-8.

- Michiels C., Arnould T., Knott I., Dieu M. and Remacle J.**  
Stimulation of prostaglandin synthesis by human endothelial cells exposed to hypoxia.  
*American Journal of Physiology* 264 (1193), C866-C874.
- Michiels, C., De Leener, F., Arnould, T., Dieu, M. and Remacle, J.**  
Hypoxia stimulated human endothelial cells to release smooth muscle cell mitogens : role of prostaglandins.  
*Experimental Cell Research* (soumis pour publication).
- Miller, E.J. and Gay S.**  
The collagens : an overview and update  
*in* : Methods in enzymology. Structural and contractile proteins (part D), ed. by W. Cunningham, Academic Press, Orlando, 1987, 3-41.
- Metsäranta M., Toman D., De Crombrughe B. and Vuorio E.**  
Specific hybridization probes for mouse type I, II, III and IX collagen mRNAs.  
*Biochimica and Biophysica Acta*, 1089 (1991), 241-243.
- Miskulin M., Dalglish R., Kluge-Beckerman B., Rennard S.I., Tolstoshev P., Brantly M. and Crystal R.G.**  
Human type III collagen gene expression is coordinately modulated with type I collagen genes during fibroblast growth.  
*Biochemistry*, 25 (1986), 1408-1413.
- Montefort, S. and Holgate, S.T.**  
Adhesion molecules and their role in inflammation.  
*Respiratory Medicine*, 85 (1991) 91-99.
- Mosse, P.R., Campbell, G.R., Wang, Z.L., Campbell, J.H.**  
Smooth muscle cells phenotypic expression in human carotide arteries.  
*Laboratory Investigation*, 5 (1985), 556-562.
- Niebes, P.**  
Physiopathologie de la veine variceuse.  
*Angiologie*, 1987, 1<sup>er</sup> trimestre 87.

**Niebes, P.**

*in* : New Trends in Venous Disease, ed. by Hans Hubert Publishers, Bern, 1977, 2231

**Ogawa, S., Koga, S., Kuwabara, K., Bett, J., Morrow, B., Morris, S.A., Bilezikian, J.P., Silverstein, S.C. and Stern, D.**

Hypoxia-induced increased permeability of endothelial monolayers occurs through lowering of cellular cAMP levels.  
*American Journal of Physiology*, 262 (1992), 546-550.

**Okada, Y., Katsuda, S., Malsui, Y., Watanabe, H. and Mikanishi, I.**

Collagen synthesis by culture arterial smooth muscle cells during spontaneous phenotypic modulation.  
*Acta Pathologica Japonica*, 40 (1990), 157-164.

**Okada, Y., Katsuda, S., Malsui, Y., Minamoto, T., and Nakanishi, I.**

Altered synthesis of collagen types in cultured during phenotypic modulation by dimethyl sulfoxide.

**Raes, M.**

Culture de fibroblastes de hamster doré comme nouveau modèle de vieillissement. Importance du cytosquelette dans ce modèle. (Thèse de doctorat, 1983, Namur : FUNDP).

**Raes, M. and Remacle, J.**

Ageing of hamster embryo fibroblasts as the result of both differentiation and stochastic mechanisms.  
*Experimental Gerontology*, 18 (1983), 223-240.

**Rawson D. J.**

Traité de biochimie.  
De Boeck Université, Bruxelles, 1990.

**Ramelet, A.A. and Monti, M.**

Phlébologie - Deuxième édition.  
Editions Masson, Fribourg, 1990.

**Ramirez, F. and Di Liberto, M.**

Complex and diversified regulatory programs control the expression of vertebrate collagen genes.  
*The FASEB Journal*, 4 (1990), 1616-1623.

**Ross, R.**

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

**Ross, R. and Klebanoff, S.J.**

The smooth muscle cell.  
*The Journal of Cell Biology*, 50 (1971), 159-171.

**Salvalerra, C.G. and Goldman, W.F.**

Acute hypoxia increases cytosolic calcium in cultured pulmonary arterial myocytes.  
*American Journal of Physiology*, 264 (1993), 323-328.

**Schwartz, E., Bienhowski, R.S., Coltoff-Schiller, B., Goldfisher, S. and Bluemenfeld, O.O.**

Changes in the components of extracellular matrix and in growth properties of cultured aortic smooth muscle cells upon ascorbate feeding.  
*The Journal of Cell Biology*, 92 (1982), 462-470.

**Sjölund, M., Madsen, K., van der Mark, K. and Thyberg, J.**

Phenotype modulation in primary cultures of smooth muscle cells from rat aorta. Synthesis of collagen and elastin.  
*Differentiation*, 32 (1986), 173-180.

**Sill, J.C., Eskuri, S., Van Dyke, R. and Tarara J.**

Halothane inhibits agonist-induced inositol phosphate and calcium signaling in A7R5 cultured vascular smooth muscle cells.  
*Molecular Pharmacology*, 40 (1991), 1006-1091.

**Stepp M.A., Kindy M.S., Franzblau C., Sonenshein G.E.**

Complex regulation of collagen gene expression in cultured bovine aortic smooth muscle cells.  
*Journal of Biological Chemistry*, 261 (1986), 6542-6547.

**Thibonnier, M., Bayer, A.L., Simonson, M. and Kester, M.**

Multiple signaling pathways of vascular vasopressin receptors of A7R5 cells.  
*Endocrinology*, 129 (1991), 2845-2856.

**Thorgeirsson, G.**

Structure and morphological features of vascular endothelium.  
*in* : Biochemical interactions at the endothelium, ed by Cryer,  
Elsevier, Amsterdam, (1983) 5-39.

**Thyberg, J., Nilsson, J., Palmberg L. and Sjölund, M.**

Adult human arterial smooth muscle cells in primary culture.  
Modulation from contractile to synthetic phenotype.  
*Cell and Tissue Research*, 239 (1985), 69-74.

**Twort, C., Van Breemen, C.**

Human airway smooth muscle in culture.  
*Tissue and Cell*, 20 (1988), 339-344.

**Van der Rest, M. and Garrone, R.**

Collagen family of proteins.  
*The FASEB Journal*, 5 (1991), 2814-2823.

**Varga J., Diaz-Perez A., Rosenbloom J. and Jimenez S.A.**

PGE<sub>2</sub> causes a coordinate decrease in the steady state levels of  
fibronectin and types I and III procollagen mRNAs in normal  
human dermal fibroblasts.  
*Biochemical and Biophysical Research Communications*, 147  
(1987), 1282-1288.

**Vender, R.L.**

Role of endothelial cells in the proliferative response of cultured  
pulmonary vascular smooth muscle cells to reduced oxygen  
tension.  
*In Vitro Cellular Development Biology*, 28A (1992), 403-409.

**Vijayagopal, P., Ciolino, H. P. and Berenson G.S.**

Endothelial cell conditioned medium modulates the synthesis and  
structure of proteoglycans in vascular smooth muscle cells.  
*Biochemica and Biophysica Acta* 1135 (1992), 129-140

**Vuorio E. and De Crombrughe J.**

The family of collagen genes  
*Annual Revue of Biochemistry*, 59 (1990), 837-872



**Yamamoto, M., Fujita, K., Shinkai, T.**

Identification of the phenotypic modulation of rabbit arterial smooth muscle cells in primary culture by flow cytometry.  
*Experiental Cell Research*, 198 (1992), 43-51.