



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Mise au point de l'organoculture de veine saphène humaine

Gille, Isabelle

Award date:
1996

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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

Reçu le 02 DEC. 1996

FACULTES UNIVERSITAIRES
NOTRE-DAME DE LA PAIX



NAMUR

FACULTE DES SCIENCES

SECRETARIAT BIOLOGIE

F. U. N. D. P.

Rue de Bruxelles, 61
B - 5000 NAMUR

Mise au point de l'organoculture de veine saphène humaine

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

biologiques

Gille Isabelle

Décembre 1996

Mise au point de l'organoculture de veine saphène humaine

GILLE Isabelle

Résumé

Les pathologies veineuses sont connues depuis longtemps, leur étiologie reste cependant peu connue. On sait que lors de ces pathologies, il se produit souvent une stase veineuse. L'ischémie résultant de cette stase pourrait être à l'origine des modifications de la paroi lors de la pathologie variqueuse. Dans le but d'analyser et de comprendre la cascade d'événements biochimiques et morphologiques responsables de ces altérations pariétales, nous avons mis au point un modèle expérimental : l'organoculture de veine saphène humaine. Ce modèle présente deux avantages importants : premièrement, il utilise la veine saphène humaine ce qui lui permet de travailler dans des conditions expérimentales proches des conditions réelles; deuxièmement, il permet de suivre durant quatorze jours les événements biochimiques et altérations morphologiques de la paroi veineuse dus à l'hypoxie.

Les résultats de ce travail montrent que les organocultures se maintiennent au cours des quatorze jours de culture que dure l'expérience. La quantité d'ATP reste en effet constante. La microscopie électronique à balayage montre, elle aussi, un endothélium intact. L'effet de la prostaglandine $F_{2\alpha}$ et du basic fibroblast growth factor : mitogènes connus pour avoir un effet pro-prolifératif sur les cellules musculaires a également été étudié dans ce travail. De plus l'influence d'une incubation sous hypoxie sur l'organoculture a été envisagée.

Ce modèle constitue donc une nouvelle approche pour l'étude du rôle de la stase veineuse dans le développement des processus biochimiques et des altérations morphologiques de la paroi veineuse observés dans les veines variqueuses.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Décembre 1996

Promoteur: C. Michiels

Copromoteur : J. Remacle

Au terme de ces 10 mois de travail, je tiens à remercier toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont aidées et soutenues tout au long de mon cheminement.

Merci au producteur J. Remacle de m'avoir ouvert les portes de sa maison de production et de m'avoir offert un rôle dans l'un de ses films. Ses connaissances scientifiques et ses conseils judicieux ont véritablement dynamisé mon travail d'acteur scientifique.

Merci à Carine Michiels, scénariste en "chef" sans qui l'histoire qui se termine n'aurait jamais pu commencer. Comme lors du tournage d'un film, tu as suivi et guidé mon travail au jour le jour. Ta rigueur scientifique, ton ouverture d'esprit ainsi que ton oreille attentive m'ont permis de prendre place dans un des plus beaux films de ma vie.

Merci à Rose Thibaut et à Noëlle Paulus. Votre expérience et votre grande disponibilité m'ont permis de prendre mes premières vues du monde ardu de la morphologie. Grâce à vous, j'ai pu mener à bien la partie histologique de ce travail.

Merci à toi Andrée, tu m'as aidée à mettre en place le décor dans lequel j'ai évolué durant toute l'année : hottes, pipettes, boîtes de Pétri, tous ces ustensiles ça te connaît et mes veines saphènes ne l'oublieront jamais.

Responsable de l'éclairage, tu as toujours été là pour illuminer mes soirées lorsque les hypoxies je devais commencer. Ton savoir-faire a métamorphosé mes hypoxies par un véritable tour de magie. Merci à toi, Nancy, sans qui hypoxie rimerait toujours avec utopie.

Ingénieur du son, le bureau te servait de diapason. Ton nom résonnait sur tous les tons quand tu entamais une chanson. Avec toi, pas question de monter le son, tu auras toujours raison. Merci Michel pour ta compréhension sans laquelle je n'aurais pas eu pleine satisfaction.

Merci Berthe pour tes talents en photographie, normoxie et hypoxie, toutes les deux en boîtes tu les as mises.

Merci à Chandelle, Fred, Mumu, Alex, Sandrine et les autres. Acteurs de ce film, vous lui avez permis de prendre place dans un tout autre univers que celui de la tension et de l'incompréhension.

Janette et Jean-Charles, merci à vous deux d'avoir égayé les scènes noires inscrites dans le scénario de mon histoire. Votre présence et votre écoute ont agi comme un miroir qui renvoyait vers moi les rayons du soleil. Cette clarté dans les moments difficiles m'a été d'un grand secours. Vous avez, durant ces 5 années d'études, été un réconfort sans lequel je n'aurais pas pu traverser les différents orages et tempêtes de ma vie.

Mon film ne pourrait pas être parfait sans la présence de mon partenaire du passé, du présent et du futur. David, je te tire un coup de chapeau, tu as supporté mes sauts d'humeur tout au long de ces 10 mois. Ta patience et ta gentillesse ont été sans limite même dans les moments les plus difficiles. Ton humour m'a souvent sorti des moments cafardeux et les paroles réconfortantes ont pansé mes plaies ouvertes. Merci de n'avoir jamais laissé tomber les bras.

Ce film, je le dédie à mes parents et à ma soeur sans lesquels je n'aurais jamais eu la force de terminer ce scénario. Spectateurs, ils m'ont toujours permis de rectifier le tir en cas de problèmes importants. Merci à vous en qui j'ai toujours puisé la force de persévérer.

Merci à toutes les personnes agissant dans l'ombre mais sans qui un film ne pourrait jamais voir le jour. Merci à Monsieur Leloup, directeur du département d'histologie de la faculté de médecine et de l'unité de microscopie électronique pour l'utilisation du matériel de son département.

Merci à Monsieur Yves Houbion pour ces conseils précieux de mes passages en microscopie électronique.

Enfin, je voudrais remercier le Docteur Guillaume et le Docteur Cuisinier de la clinique Sainte Elizabeth de Namur pour les prélèvements de veines saphènes sans lesquels mon film n'aurait jamais pu exister.

ABREVIATIONS

ADN	: Acide DésoxyriboNucléique
AMP	: Adénosine MonoPhosphate
APpS	: 3-AminoPropyltriethoxy-Silane
ATP	: Adénosine TriPhosphate
bFGF	: basic Fibroblast Growth Factor
CE	: Cellule Endothéliale
CML	: Cellule Musculaire Lisse
DABA	: DiAminoBenzoic Acid
DTT	: DiThioTreitol
EDRF	: Endothelium-Derived Relaxing Factor
EDTA	: Ethylène Diamine Tétra Acétate de sodium
EGF	: Epidermal Growth Factor
ELAM-1	: Endothelium Leukocyte Adhesion Molecule-1
FGF	: Fibroblast Growth Factor
FMC	: Faisceaux Musculaires Circulaires
FML	: Faisceaux Musculaires Longitudinaux
fMLP	: formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine
HBSS	: Hank's Balanced Salt Solution
ICAM-1	: InterCellular Adhesion Molecule-1
ICAM-2	: InterCellular Adhesion Molecule-2
PAF	: Platelet-Activating Factor
PCA	: PerChloric Acid
PDGF	: Platelet-Derived Growth Factor
PGD₂	: ProstaGlandine D ₂
PGE₂	: ProstaGlandine E ₂
PGF_{2α}	: ProstaGlandine F _{2α}
PGI₂	: ProstaGlandine I ₂
PMN	: PolyMorphonucléaires Neutrophiles
PO₂	: Pression partielle en Oxygène dissous
PPi	: PhosPhate inorganique



RLU
rpm

: Relative Light Unit
: rotation par minutes

CHAPITRE I : INTRODUCTION.....	3
I. LE SYSTEME VASCULAIRE.....	5
I.1. Organisation générale :	5
I.2. Les veines.....	7
I.2.1. Morphologie et structure de la paroi veineuse :	7
I.2.2. Les veines saphènes.....	11
I.3. L'endothélium.....	13
I.3.1. Morphologie et structure des cellules endothéliales :	14
I.3.1.1. Structure de l'endothélium :	14
I.3.1.2. Morphologie de l'endothélium :	15
I.3.2. Les rôles de l'endothélium :	17
I.3.2.1. L'endothélium en tant que barrière à perméabilité sélective :	17
I.3.2.2. L'endothélium vasculaire et le contrôle de la thromborésistance :	17
I.3.2.3. L'endothélium vasculaire et la vasomotricité :	19
I.3.2.4. L'endothélium et les molécules d'adhésion :	20
I.3.2.5. L'endothélium et les facteurs de croissance :	23
I.4. Les cellules musculaires lisses.....	24
I.4.1. Morphologie et structure :	24
I.4.2. Modulation phénotypique :	27
I.4.3. Synthèse de la matrice extracellulaire :	28
I.5. Les facteurs de croissance bFGF et PGF _{2α}	29
II. LE SYSTEME VASCULAIRE DANS LES PATHOLOGIES VEINEUSES	33
II.1. Les veines variqueuses	33
II.2. Les facteurs de risques	34
II.3. Altérations des cellules endothéliales lors d'une ischémie et modèles expérimentaux.....	37
II.3.1. Altérations du métabolisme énergétique.....	38
II.3.2. Altérations membranaires.....	39
II.3.3. Les conséquences de l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire.....	40
II.4. Modèles expérimentaux et hypothèse expliquant l'apparition des varices.....	45
III. BUT DU MEMOIRE.....	49
CHAPITRE II MATERIEL ET METHODES	50
I. ORGANOCULTURE DE VEINES SAPHENES HUMAINES.....	50
I.1. Mise en culture	50
I.1.1. Matériel et solutions	50
I.1.2. Mode opératoire.....	51
a) Principe.....	52
b) Méthode	52
I.1.3. Mise en culture proprement dite	54
II. ETUDES BIOCHIMIQUES	57
II.1. Préparation de la poudre de veine	57
II.1.1. Principe	57
II.1.2. Matériel et solutions	57
II.1.3. Mode opératoire.....	57
II.2. Dosage de l'adénosine triphosphate (ATP)	59
II.2.1. Principe	59
II.2.2. Matériel et solutions	59
II.2.3. Mode opératoire.....	60
II.3. Dosage de l'acide désoxyribonucléique (ADN)	61
II.3.1. Principe	61
II.3.2. Matériel et solutions	61
II.3.3. Mode opératoire.....	62
II.3.4. Le comptage en radioactivité	63
II.4. Incubation sous hypoxie	64

II.4.1. Mesure de la concentration en oxygène dissous dans les solutions.....	64
II.4.2. Mise sous hypoxie.....	66
II.4.3. Adhérence des HL60 sur l'endothélium veineux activé par l'hypoxie	67
II.4.4. Mise en culture après hypoxie.....	69
III. ETUDES MORPHOLOGIQUES	72
III.1. <i>Microscopie optique (ou photonique)</i>	72
III.1.1. Matériel et solutions	72
III.1.2. Mode opératoire.....	73
III.2. <i>Microscopie électronique à balayage</i>	76
III.2.1. Principe	76
III.2.2. Solutions.....	76
III.2.3. Mode opératoire.....	76
III.3. <i>Autoradiographies</i>	77
III.3.1. Principe	77
III.3.2. Matériel et solutions	77
III.3.3. Mode opératoire.....	78
CHAPITRE 3 RESULTATS ET DISCUSSION.....	79
I. MISE AU POINT DE L'ORGANOCULTURE	80
I.1. <i>Histologie : microscopie électronique à balayage et microscopie optique des organocultures</i>	80
I.1.1. Observations en microscopie électronique à balayage.....	81
I.1.2. Observations en microscopie optique	82
I.1.3. Discussion.....	84
I.2. <i>Biochimie : étude de la viabilité (ATP) et de la prolifération cellulaire</i>	86
I.2.1. Dosage de l'adénosine triphosphate (ATP).....	87
I.2.2. Dosage de l'acide désoxyribonucléique (ADN).....	89
I.2.3. Discussion.....	91
II. UTILISATION DU MODELE EXPERIMENTAL	93
II.1. <i>Effets des mitogènes</i>	93
II.1.1. Effets de la PGF _{2α}	94
II.1.2. Effets du bFGF.....	97
II.2. <i>Mise au point de l'hypoxie</i>	101
II.2.1. Pression partielle en oxygène	102
II.2.3. Adhérence des HL60 marquées au chrome-51	103
II.3. <i>Effet de l'hypoxie</i>	105
II.3.1. <i>Dosage de l'ATP</i>	106
II.3.2. Dosage de l'ADN.....	106
II.3.3. Observations en microscopie électronique à balayage.....	106
II.3.4. Discussion.....	107
BIBLIOGRAPHIE	114

Chapitre I : Introduction

Les pathologies veineuses et, plus particulièrement les veines variqueuses, sont encore une cause importante de morbidité et de mortalité dans nos pays industrialisés. Pour cette raison, ces maladies veineuses constituent un problème de santé majeur pour les pays occidentaux. En effet, environ une personne sur trois souffre de tels maux. C'est pourquoi, au vu de cette prévalence élevée, il est grand temps de mettre en oeuvre tous les moyens disponibles sur le marché de la science pour étudier de manière approfondie ces pathologies.

L'étiologie de ces pathologies n'est pas encore très claire mais tout le monde s'accorde à dire que le développement des varices est à la fois dû à des facteurs environnementaux (orthostatisme, régime alimentaire, grossesses, etc.) ainsi qu'à des déterminants génétiques.

La paroi vasculaire n'est pas seulement une simple barrière physique entre le sang et les tissus environnants mais elle est surtout une machinerie biochimique où chaque constituant a son propre rôle à jouer. Tout d'abord, les cellules endothéliales constituent une monocouche, l'endothélium, à l'interface entre le sang d'une part et les tissus sous-jacents d'autre part. On ne peut pas dire que l'endothélium soit biologiquement inerte. Au contraire, il constitue une véritable barrière à perméabilité sélective, indispensable à l'intégrité tissulaire. Vu cette position stratégique, on comprend aisément que des altérations structurales ou fonctionnelles de l'endothélium soient à l'origine des désordres physiopathologiques s'étendant à l'ensemble de la paroi veineuse lors du développement des varices.

Le second type cellulaire présent dans la paroi vasculaire est représenté par les cellules musculaires lisses. Elles constituent l'élément cellulaire principal de la média qui se situe juste sous l'endothélium.

Lors d'une diminution ou d'un arrêt de la circulation sanguine, suite à une occlusion, à un traumatisme ou à un simple rétrécissement de la lumière du vaisseau sanguin, une stase veineuse se met en place. Cette dernière entraîne une diminution de l'irrigation des tissus se trouvant en aval. Le résultat final est l'installation d'une ischémie, c'est-à-dire une diminution de l'apport en oxygène (ou hypoxie).

Cette ischémie provoque le déclenchement de modifications fonctionnelles et structurelles indésirables au niveau de la paroi vasculaire des vaisseaux sanguins qui en sont affectés. Là encore, ce sont les cellules endothéliales qui sont les premières activées. Elles relarguent des facteurs de croissance agissant sur les cellules musculaires lisses ainsi que des médiateurs de l'inflammation responsables du recrutement, de l'adhérence et de l'activation des leucocytes (polymorphonucléaires neutrophiles principalement).

On comprend donc pourquoi une étude plus approfondie des mécanismes expliquant les modifications cellulaires, biochimiques et morphologiques survenant dans le développement des varices devient nécessaire. Cette étude sera réalisée sur base d'un modèle expérimental *in vitro*.

Dans cette introduction, nous aborderons les points suivants :

- Nous décrirons, tout d'abord, le système vasculaire dans des conditions physiologiques normales. Pour ce faire, nous aborderons la structure générale des vaisseaux sanguins : cellules endothéliales et musculaires lisses. Cette approche nous permettra de nous familiariser avec la veine en tant qu'unité structurelle et fonctionnelle.

- Ensuite, puisque cet organe est susceptible d'être perturbé lors d'une ischémie, nous détaillerons le comportement du système vasculaire dans les pathologies veineuses. Dans cette partie, après avoir parlé de la veine variqueuse, nous aborderons les perturbations qui affectent l'endothélium lors de l'hypoxie.

Ces éléments devraient nous permettre de comprendre et de développer des modèles expérimentaux mimant la stase veineuse ainsi que des hypothèses expliquant l'apparition des varices.

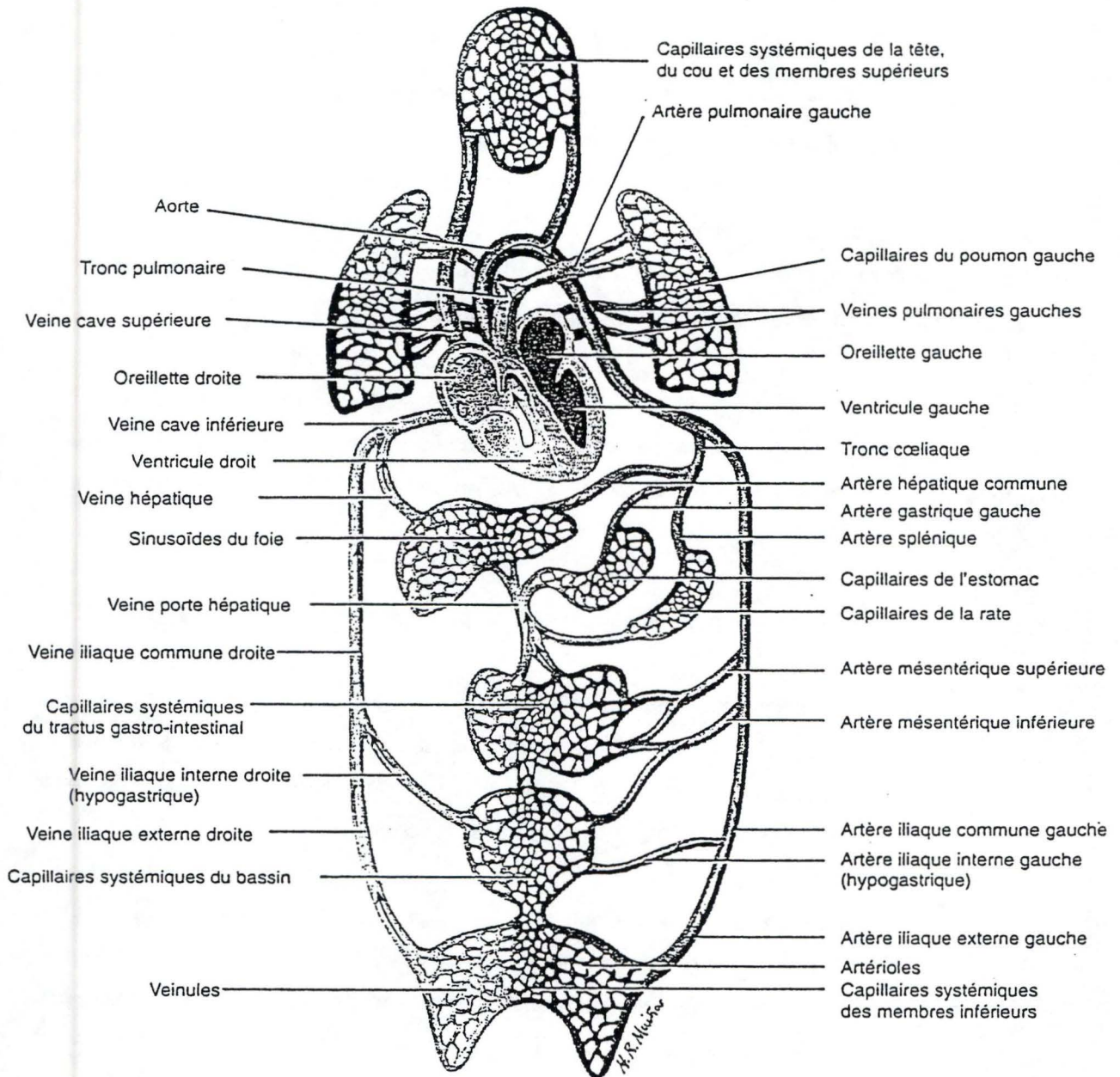


Figure I.1 : Schéma général de la circulation sanguine (D'après Tortora et Grabowski, 1994).

I. Le système vasculaire

I.1. Organisation générale :

Le système vasculaire sanguin est un ensemble très vaste de tubes, disposés en circuit fermé dans lequel circule le sang (figure I.1). Il se compose d'une série d'éléments nécessaires (Junqueira *et al.*, 1989) à assurer ses fonctions vitales, c'est-à-dire l'oxygénation et la nutrition des différents organes, tissus et cellules ainsi que l'élimination des déchets produits par le métabolisme.

Les différents constituants sont les suivants :

- Le coeur est une véritable pompe permettant d'envoyer le sang vers les différentes régions du corps.

- Les artères sont des vaisseaux efférents qui assurent le transport du sang chargé en oxygène et en substances nutritives du coeur vers les différents tissus. C'est ce que l'on nomme plus communément *la circulation artérielle*.

- Les capillaires sanguins, disposés en réseau, irriguent les tissus et permettent les échanges avec le milieu interstitiel. Ils constituent la jonction entre le système artériel et le système veineux.

- Les veines sont des vaisseaux afférents qui résultent de la convergence des capillaires en un système de tubules plus larges. Leur rôle est de ramener le sang chargé en gaz carbonique et en autres déchets du métabolisme des tissus vers le coeur (Junqueira *et al.*, 1989). Elles sont aidées dans cette tâche par le système lymphatique. Ce trajet du sang vicié est appelé *circulation veineuse*.

Ce transport du sang, depuis le coeur vers les tissus et inversement, constitue *la circulation systémique*.

Cependant, c'est grâce à la circulation pulmonaire que le sang, en passant au niveau des poumons, peut se réenrichir en oxygène et se débarrasser du gaz carbonique.

Le sang joue donc un rôle clef dans ce système, il apporte à tous les tissus de l'organisme, depuis leur lieu d'absorption ou de diffusion, tous les éléments nutritifs dont ils ont besoin et il recueille et emporte vers les émonctoires (reins, poumons, peau, ...) les déchets inutiles ou nuisibles du métabolisme. Le sang, en outre, transporte d'un organe à un autre les produits de sécrétion des glandes endocrines : *les hormones*.

Il intervient également, dans le transport des sels et ions vers leurs lieux d'utilisation ainsi que dans les processus inflammatoires où sa fonction est de transporter, vers les sites infectés, les médiateurs de l'inflammation et les cellules responsables de la défense immunitaire.

Néanmoins, le rôle majeur du sang reste le transport de l'oxygène fixé à l'hémoglobine des érythrocytes depuis les poumons vers les tissus et celui du gaz carbonique des tissus vers les poumons.

Ces échanges entre les tissus et le sang sont possibles et optimisés grâce à une structure particulière de la paroi des vaisseaux sanguins.

L'endothélium vasculaire présente, en effet, une certaine perméabilité qui permet à de nombreuses substances de transiter, selon leur taille et leur solubilité dans l'eau et les lipides, au travers de "fenêtres" : parties amincies de l'endothélium ou par pinocytose ou encore, via des canaux transitoires correspondant à la réunion de plusieurs vésicules ou simplement par diffusion.

Pour mieux comprendre le rôle des vaisseaux sanguins, nous analyserons leurs fonctions et leur morphologie.

Comme notre travail s'inscrit dans l'étude des maladies veineuses, nous ne rentrerons pas dans une description détaillée de tous les vaisseaux sanguins mais nous prendrons plutôt soin de décrire précisément la paroi veineuse.

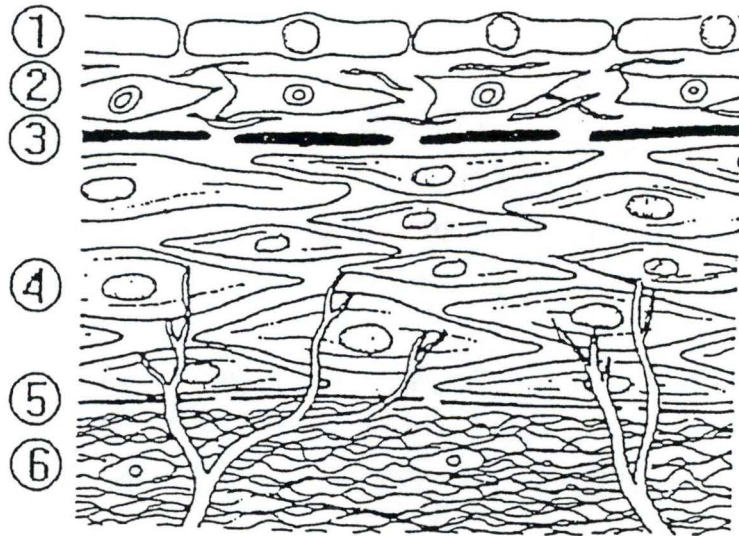


Figure I.2 : Représentation schématique de l'histologie de la paroi veineuse. Celle-ci est composée de différentes couches : 1 : endothélium, 2 : sous-endothélium, 3 : limitante élastique interne, 4 : média, 5 : limitante élastique externe, 6 : adventice (D'après P. Carpentier, 1994).

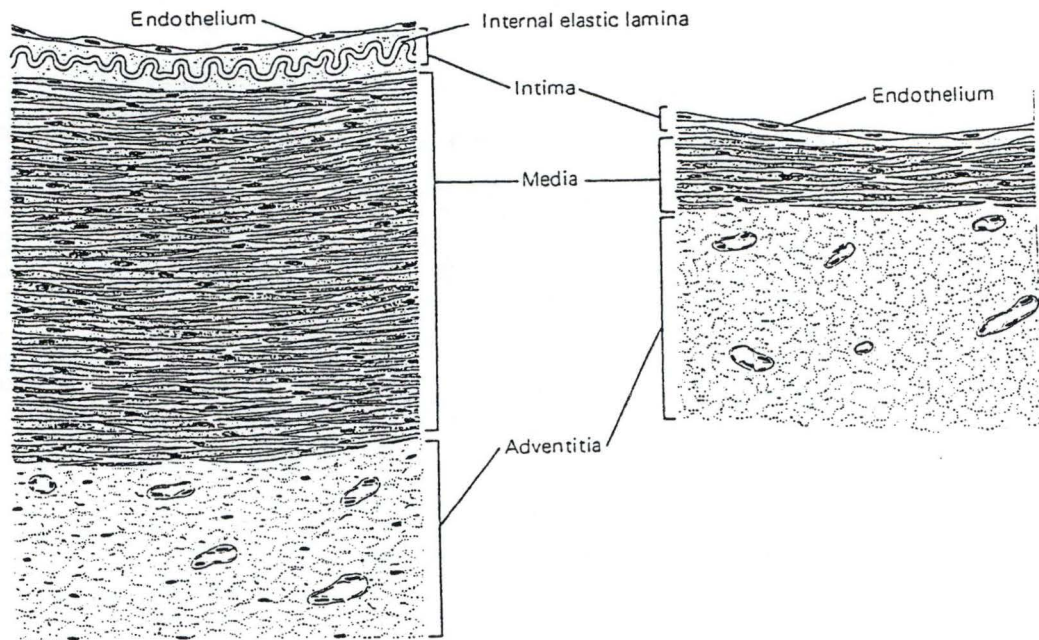


Figure I.3 : Schéma comparant les proportions relatives des trois tuniques qui composent une artère de moyen calibre (à gauche) et une veine (à droite) (D'après L. C. Junqueira et J. Carneiro, 1980).

I.2. Les veines

Le système veineux comprend des éléments de calibre aussi variable que les capillaires, les veinules et les veines de diamètre important telles que les veines caves, fémorales ou saphènes. Cependant, toutes différentes qu'elles puissent apparaître, les veines ont toutes une structure histologique commune.

I.2.1. Morphologie et structure de la paroi veineuse :

(figures I.2 et I.3)

Chez l'Homme, grâce à leur élasticité, les veines constituent le réservoir principal de sang; la répartition de celui-ci est très variable en fonction de l'espèce ainsi que de l'activité de l'individu, mais on peut estimer que 5 à 15 % du sang se trouve dans le coeur, 8 à 15 % dans la circulation pulmonaire et 70 à 85 % dans la circulation systémique. Dans cette dernière, 80 % du sang est stocké dans les veines, soit plus de 50 % du sang total de l'organisme.

Les veines sont les vaisseaux sanguins par lesquels le sang chargé en gaz carbonique et en déchets remonte des organes vers le coeur. Cette fonction physiologique leur demande un certain nombre d'adaptations structurelles.

La plus marquante de ces adaptations est l'existence de valvules dans les veines de petit et moyen calibre. Ces valvules sont particulièrement abondantes au niveau des veines des membres inférieurs comme les veines saphènes. Leur rôle est d'une extrême importance puisque la circulation dans les veines est relativement lente et la pression y est toujours très faible -légèrement supérieure à la pression atmosphérique- ce qui signifie que la paroi doit exercer des contractions-dilatations pour assurer le retour du sang de façon contrôlée.

Les valvules empêchent donc les reflux sanguins et propulsent le sang en direction du coeur. Elles sont aidées dans leur tâche par les contractions des muscles striés squelettiques qui entourent les vaisseaux, c'est ce qu'on appelle *la pompe musculaire*.

Les veines et veinules se composent comme les artérioles de trois tuniques. Nous trouvons, de la lumière du vaisseau vers l'extérieur : l'intima, la média et l'adventice (Ramelet *et al.*, 1990; Junqueira *et al.*, 1989).

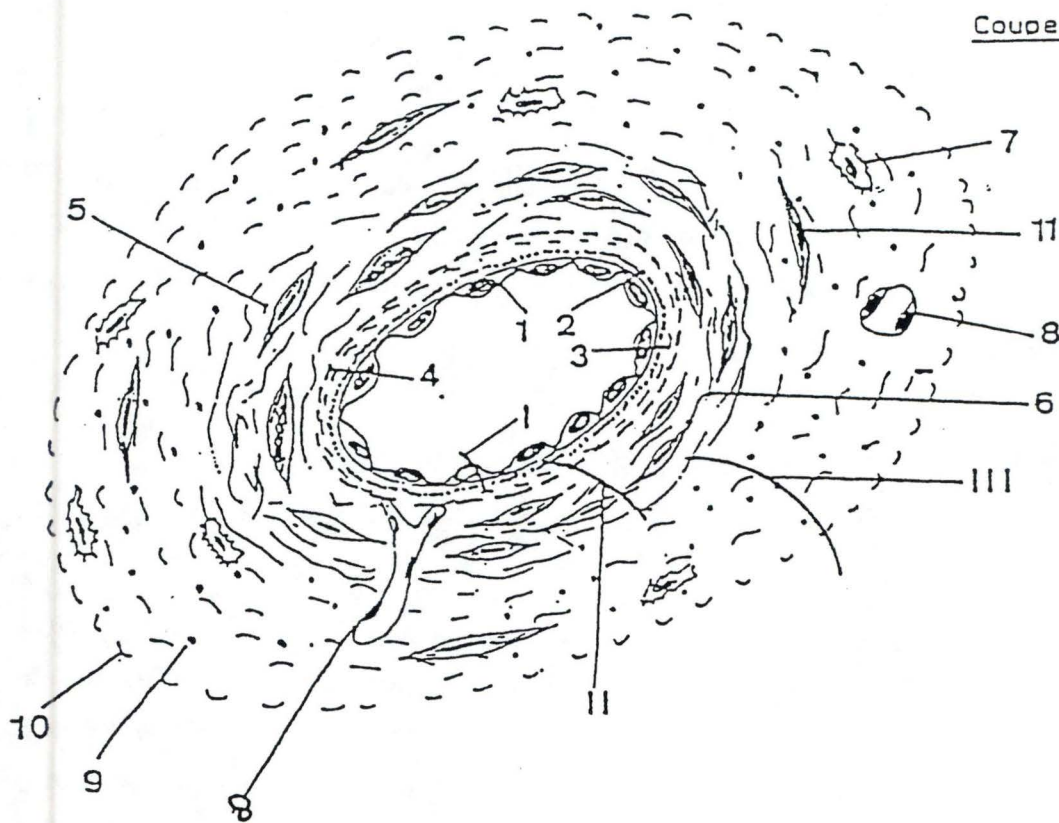


Figure I.4 : Représentation schématique en vue transversale de la paroi veineuse. Celle-ci est formée de trois tuniques : I = INTIMA, II = MEDIA, III = ADVENTICE. 1 : endothélium, 2 : membrane basale, 3 : couche sous-endothéliale, 4 : limitante élastique interne, 5 : cellules musculaires lisses de la média, 6 : tissu conjonctif de la média, 7 : fibroblaste, 8 : vasa vasorum, 9 : fibres élastiques, 10 : fibres conjonctives de l'adventice, 11 : cellules musculaires lisses de l'adventice (D'après R. Leloup, cours d'Histologie spéciale).

Décrivons dès à présent les trois tuniques de la paroi veineuse (figure I.4).

A) L'INTIMA (ou tunique interne) :

L'intima se compose d'une membrane basale sur laquelle repose une monocouche de cellules endothéliales. Ces cellules tapissent la lumière du vaisseau et de temps à autre, elles forment des replis que l'on nomme valvules.

Il est à noter que les cellules endothéliales ont une place très importante puisqu'elles se trouvent à l'interface entre le sang d'une part et la paroi vasculaire avec les tissus interstitiels d'autre part. Cette position stratégique leur fait donc prendre un rôle essentiel dans le bon fonctionnement des vaisseaux sanguins.

La membrane basale, quant à elle, est synthétisée par ces mêmes cellules. On y trouve principalement du collagène de type IV, des protéoglycanes comme l'héparan sulfate, de la fibronectine, de l'élastine, de la laminine, de la vitronectine et de l'acide hyaluronique.

On observe également dans cette intima, une couche sous-endothéliale composée de tissu conjonctif lâche, de glycoprotéines et parfois de cellules musculaires lisses. C'est le cas, notamment, dans la formation de la néointima mais cette notion sera abordée de façon plus détaillée dans les résultats histologiques de ce travail.

B) LA MEDIA (ou tunique moyenne) :

La média est constituée de fibres musculaires lisses disposées en couches concentriques.

Ces cellules musculaires lisses, d'une part, synthétisent la matrice extracellulaire qui se compose de fibres d'élastine incluses dans une substance riche en protéoglycanes et en glycoprotéines, séparées par des fibres de collagène essentiellement de type I et III. D'autre part, ces cellules sont responsables des propriétés mécaniques de la paroi vasculaire qui sont les phénomènes de contractions-dilatations nécessaires à faire remonter le sang vers le coeur.

On retrouve, dans la média, deux types de cellules musculaires lisses, distincts du point de vue fonctionnel : tout d'abord, on observe les cellules musculaires lisses contractiles. Ce sont les plus représentées et elles se caractérisent par un contenu abondant en

protéines contractiles. Elles sont responsables de la vasoconstriction des vaisseaux. Ensuite, viennent les cellules musculaires lisses synthétiques. Elles sont rares et contiennent de nombreux organites métaboliques. Elles interviennent dans la synthèse d'enzymes protéolytiques ainsi que pour la synthèse de dérivés de prostaglandines.

Ces deux types de cellules musculaires lisses, décrits ci-dessus de façon brève, sont impliqués dans la production de la matrice extracellulaire. Ainsi, dans des conditions physiologiques normales, ce sont les cellules musculaires lisses contractiles qui synthétisent la matrice extracellulaire mais, lorsque l'on se trouve dans des conditions physiopathologiques, la proportion de cellules musculaires lisses contractiles diminue alors que les cellules musculaires lisses synthétiques prolifèrent. La prolifération de ces cellules et leur synthèse d'une matrice extracellulaire légèrement différente de celle sécrétée par les cellules musculaires lisses contractiles engendrent un remodelage de la média.

Dans les veines de gros calibre, une limitante élastique interne permet de séparer l'intima de la média. Dans ce cas de figure, les cellules musculaires enfouies au plus profond de la média sont nourries par la diffusion des substances nutritives au travers des fenestrations de la lame élastique interne.

Selon le type de veine et leur localisation, l'importance de la musculature de la média va varier. C'est ainsi que pour les veines des membres inférieurs telles que les veines caves, fémorales ou saphènes, on observe une musculature plus développée chez les veines superficielles que chez les veines profondes.

C) L'ADVENTICE (ou tunique externe) :

L'adventice constitue la couche la plus externe de la paroi veineuse. Elle se compose de fibres de collagène essentiellement de type I, ordonnées longitudinalement ainsi que de fibres élastiques. Ces deux éléments sont synthétisés par les fibroblastes, cellules majoritaires de l'adventice et se trouvent emprisonnés dans un tissu conjonctif lâche tout comme les vaisseaux lymphatiques et terminaisons nerveuses sympathiques assurant la vasoconstriction veineuse.

Ce tissu conjonctif possède une capacité de soutien qui lui permet de résister à la pression hydrostatique. Sa propriété principale, le fait qu'il soit lâche, lui confère un triple rôle : pour commencer, il permet au calibre des vaisseaux de s'adapter de façon permanente

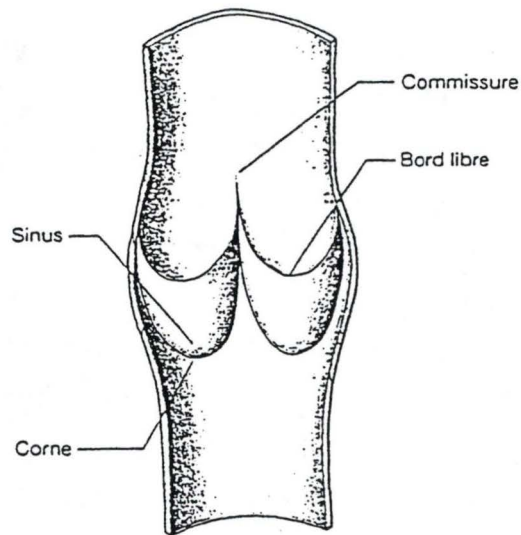


Figure I.5 : Schéma en vue "à plat" d'une valvule veineuse bicuspide (D'après M. Perrin, 1994).

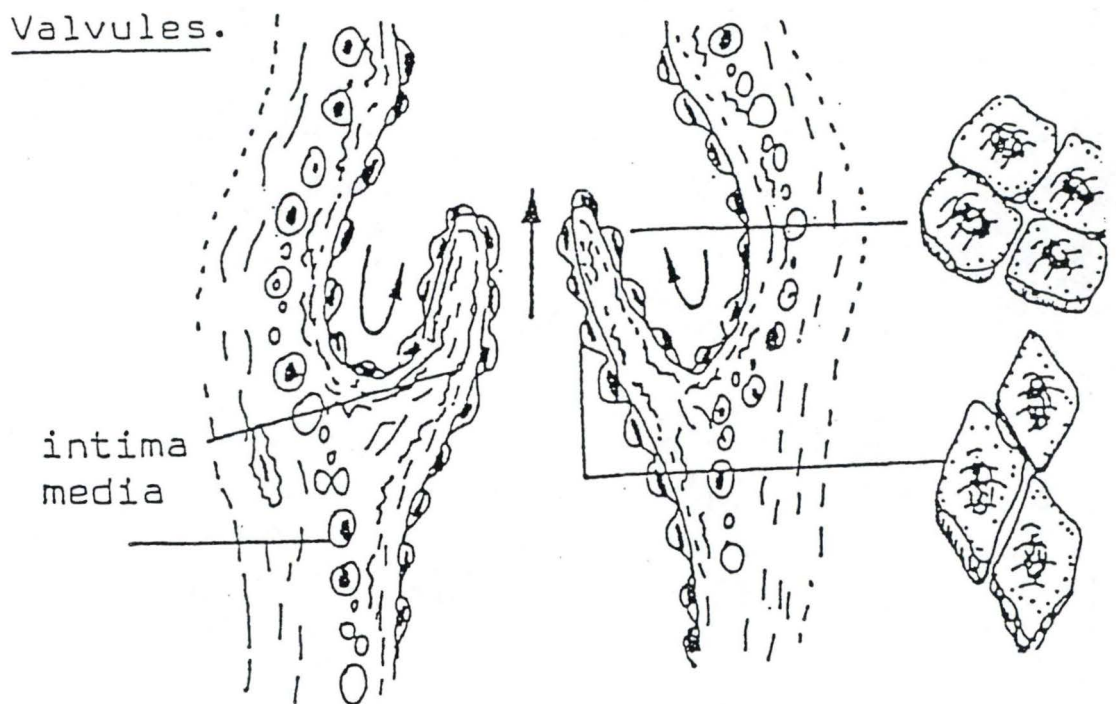


Figure I.6 : Localisation des valvules au sein de l'intima de la veine (D'après R. Leloup, cours d'Histologie spéciale).

aux variations du débit cardiaque. Ensuite, il limite les possibilités d'extension de l'ensemble de la paroi et finalement, il attache les vaisseaux aux tissus voisins.

L'adventice est d'épaisseur importante et celle-ci augmente au fur et à mesure que la veine s'élargit. De par sa localisation éloignée du sang circulant, l'adventice ne peut pas être nourrie par imbibition comme c'est le cas pour l'intima et pour la partie la plus profonde de la média. La nutrition est donc assurée par des *vasa vasorum* nourriciers se ramifiant abondamment dans la partie la plus externe de la média et de l'adventice (Junqueira *et al.*, 1989). Ces trois tuniques sont également celles rencontrées dans la paroi artérielle. Cependant, la taille et l'abondance relative de ces différentes structures diffèrent d'une artère à une veine. En effet, dans la paroi veineuse, l'intima et la média sont beaucoup moins développées et l'adventice est souvent mal individualisée par rapport à ce qu'on observe dans les artères et artérioles. De plus, les veines diffèrent des artères, d'une part par leur calibre plus large et d'autre part, par le fait que les constituants élastiques et musculaires sont beaucoup moins développés, ce qui veut dire que le tissu conjonctif y est plus abondant. Leur paroi est également plus mince, moins rigide et donc, douée d'une élasticité plus grande. Cette structure leur permet donc de s'adapter aux variations de volume et de pression du sang qui y circule (Tortora et Anagnostakos, 1988).

La pression sanguine au niveau des veines est beaucoup moins élevée que la pression originale à la sortie du coeur. Cette basse pression ne présente cependant pas que des avantages. Par exemple, lorsque nous nous tenons en position debout, la pression qui permet au sang de remonter des membres inférieurs vers le coeur est tout juste suffisante que pour contrecarrer la force de gravité qui le pousse vers le bas. C'est pourquoi, la plupart des veines et plus particulièrement celles des membres inférieurs, possèdent des valvules empêchant les reflux sanguins.

D) LES VALVULES :

L'appareil valvulaire, dont le rôle est fondamental dans l'hémodynamique veineuse au niveau des membres inférieurs, est en règle générale, bicupside (Perrin, 1994) (figures I.5 et I.6).

Les valvules qui le composent sont formées de deux replis endothéliaux dans lesquels se glisse une lame fibro-élastique qui assure leur étanchéité. Elles possèdent une concavité dirigée vers le coeur (Carpentier, 1994).

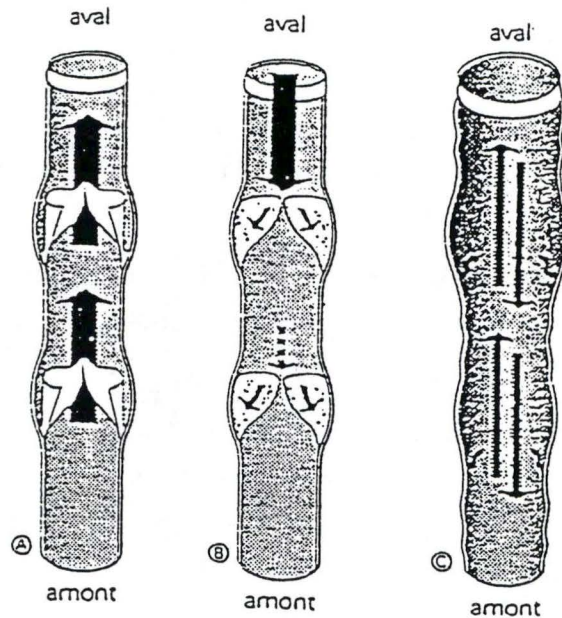


Figure I.7 : Représentation schématique des valvules et de leur fonctionnement. A : flux veineux en direction du coeur : les valvules sont ouvertes. B : fermeture des valvules lorsque la pression en aval devient plus importante qu'en amont (reflux). C : syndrome variqueux : la destruction valvulaire permet un reflux veineux, la direction de la colonne sanguine est alors influencée par la seul jeu des gradients de pression (D'après Ramelet et Monti, 1994).

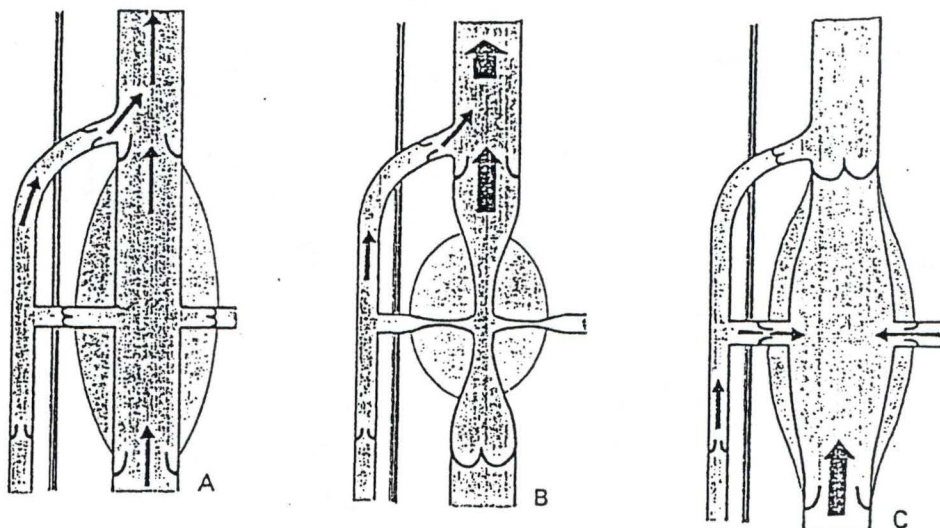


Figure I.8 : Représentation schématique du fonctionnement veineux chez un sujet normal. A : sujet au repos en position verticale (orthostatisme); faible flux veineux ascendant et fermeture des valves communicantes. B : Systole musculaire : chasse veineuse ascendante; fermeture des valves profondes d'amont et des valves communicantes. C : Diastole musculaire : remplissage du compartiment profond; ouverture des valves profondes d'amont et d'aval (D'après Sumner).

A l'oeil nu, les valvules ont un aspect translucide et fragile mais elles peuvent résister à des pressions élevées (Perrin, 1994). Il est cependant intéressant de noter qu'au niveau du siège valvulaire, la paroi veineuse est amincie et de ce fait, en cas de trop forte pression ou d'altérations pariétales, ce site sera plus gravement atteint.

Lors de la circulation sanguine, les bords libres des valvules flottent dans l'axe longitudinal de la lumière veineuse (Perrin, 1994) mais lorsque la pression veineuse en aval devient plus importante qu'en amont, les valvules se ferment pour empêcher le reflux sanguin, ce qui facilite le retour du sang vers le coeur (figure I.7).

Ces valvules sont propres aux veines. Elles sont particulièrement nombreuses dans les veines des membres inférieurs. Leur rôle principal est de protéger les veines et les capillaires des variations brutales de la pression veineuse qu'engendre l'exercice musculaire.

C'est ainsi que l'on constate qu'il existe une corrélation entre l'ouverture ou la fermeture des valvules et la contraction ou la relaxation des muscles squelettiques. Cette combinaison est importante pour le retour du sang veineux au coeur. A la phase systolique, les effets de la contraction musculaire s'exercent sur la paroi veineuse. C'est le moment où le flux sanguin est maximal en direction du coeur. Tandis qu'à la phase diastolique, le jeu valvulaire s'inverse, ce qui engendre la fermeture des valvules afin d'empêcher le sang de refluer loin du coeur (Perrin, 1994; Barbier *et al.*, 1994) (figure I.8).

I.2.2. Les veines saphènes

L'étude des veines saphènes et de leur comportement en culture et sous hypoxie constitue l'objet principal de ce mémoire. C'est pourquoi, une description de ces vaisseaux sanguins est requise pour une meilleure compréhension du travail.

Les veines saphènes font partie du réseau veineux superficiel des membres inférieurs (figure I.9). Ces veines appartiennent à la catégorie des veines musculaires (Maillet et Chiarasini, 1985). C'est ce type de vaisseaux qui est le plus souvent atteint dans les pathologies variqueuses. Leur diamètre varie de 1 à 9 mm. On y reconnaît, en général, les trois tuniques. L'intima se compose d'une monocouche de cellules endothéliales et d'une couche conjonctivo-élastique sous-endothéliale. La limitante élastique interne présente dans les artères, est souvent inexistante et quant elle existe, elle apparaît formée par des

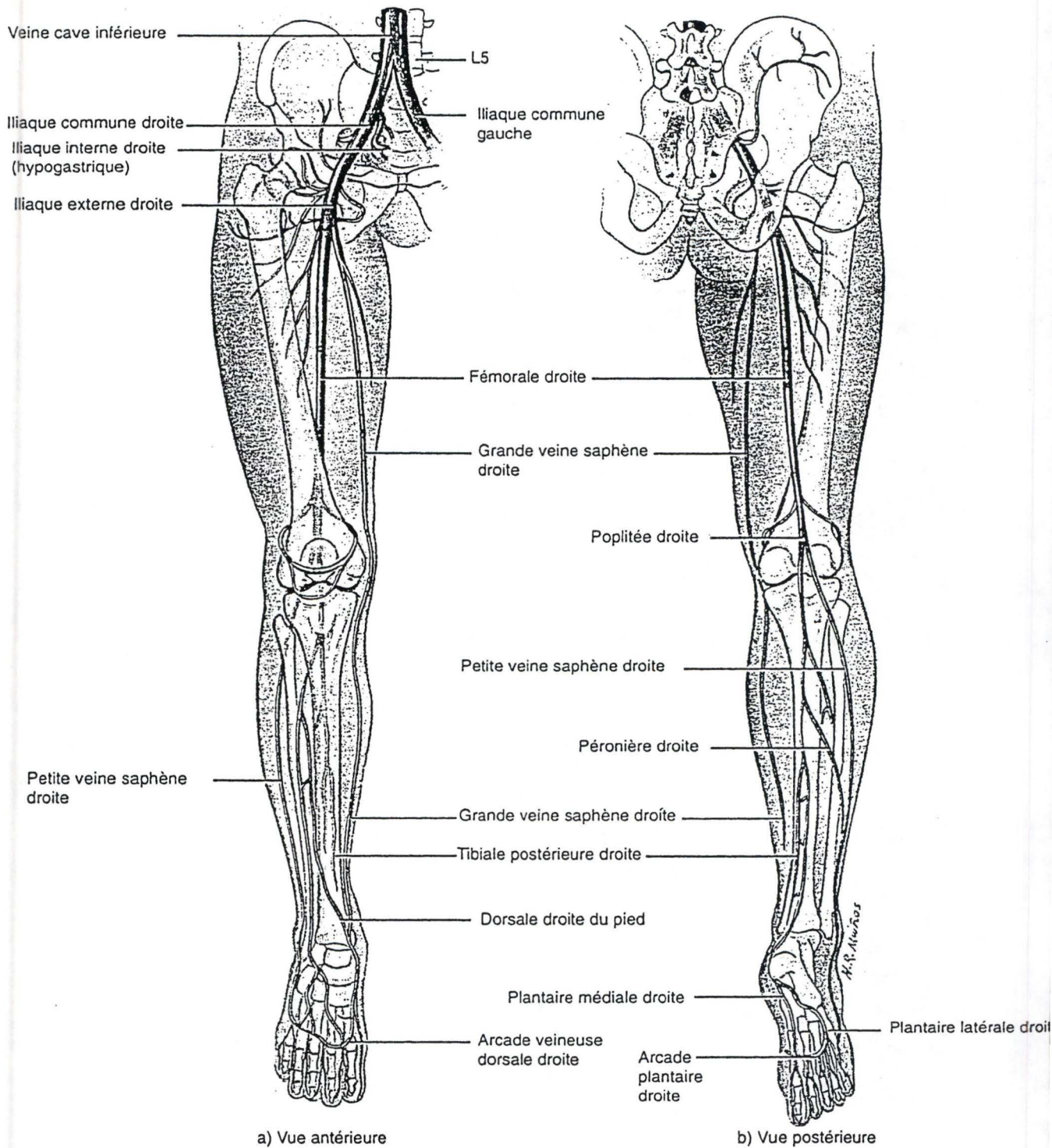


Figure I.9 : Principales veines du bassin et des membres inférieurs. (a) : vue antérieure, (b) : vue postérieure (D'après Tortora et Grabowski, 1994).

renforcements irréguliers des éléments élastiques de la couche sous-endothéliale. La média, quant à elle, est caractérisée par une nette dominance du tissu conjonctif au sein du tissu conjonctivo-élastique. Enfin, l'adventice est généralement bien développée. Des *vasa vasorum* nourriciers ainsi que des *nervi vasorum* pour la sensibilité nerveuse sont présents.

Les veines saphènes sont de deux types (Carpentier, 1994) :

-LA VEINE SAPHENE INTERNE (ou grande saphène) est la veine la plus longue du corps humain. Elle naît en avant de la malléole interne, c'est-à-dire à l'extrémité médiane de l'arcade veineuse dorsale du pied. Elle monte verticalement sur la surface médiale de la jambe, du genou et de la cuisse. Durant tout son trajet, elle est au contact de la face superficielle de l'aponévrose musculaire. Elle se termine au niveau du triangle de Scarpa par une crosse constante qui s'abouche dans la veine fémorale. Son diamètre est de 4 à 7 mm. Elle possède une tunique musculaire bien développée. La saphène interne est pourvue de 6 à 14 valvules distantes de 6 à 9 cm. Elle peut être dédoublée dans son segment fémoral. Cette duplication explique un certain nombre d'échecs après stripping des varices, non seulement parce qu'une veine saphène interne incompétente a été oubliée, mais aussi parce qu'elle peut être directement alimentée par une veine perforante.

-LA VEINE SAPHENE EXTERNE (ou petite saphène) débute derrière la malléole péronière, c'est-à-dire à l'extrémité latérale de l'arcade veineuse du pied. Elle gagne ensuite la ligne médiane postérieure de la jambe par un trajet sous-cutané. A la partie moyenne de la jambe, elle devient sous-aponévrotique et chemine toujours sur la ligne médiane avant d'entrer dans la fosse poplitée. Mais ce n'est que dans environ 70 % des cas qu'elle s'abouche par une crosse unique dans la veine poplitée. Son diamètre est de 4 mm. La saphène externe possède quatre valvules et une valvule ostiale. Sa tunique musculaire est moins développée que celle de la saphène interne. Il est important de signaler que la saphène externe est étroitement accolée au niveau de sa moitié inférieure au nerf sensitif homonyme et que ce dernier est menacé si on ne prend pas des précautions techniques lors du stripping.

Au cours de la description de la morphologie et de la structure de la paroi veineuse, nous avons cité deux types cellulaires essentiels dans la mise en place de la cascade d'événements aboutissant à la naissance des pathologies veineuses. Ces cellules sont les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses.

Dans le but d'essayer de comprendre le développement des varices, il est intéressant de consacrer une partie importante de cette introduction à décrire la structure et la morphologie de l'endothélium ainsi que ses fonctions puisqu'il est le premier touché lors de problèmes de la circulation sanguine. Cependant, les cellules endothéliales ne sont pas les seules intervenantes dans ces mécanismes complexes. Les cellules musculaires lisses avec lesquelles elles sont en interaction permanente sont, elles aussi, impliquées dans l'apparition des varices. C'est pourquoi, dans le point II.4. de cette introduction, leur structure et leur morphologie seront définies ainsi que la modulation phénotypique : propriété qui leur est propre.

I.3. L'endothélium

L'endothélium, de nature mésenchymateuse, tapisse la surface interne des vaisseaux (artères, veines, lymphatiques) ainsi que celle des cavités séreuses (plèvre, péricarde, péritoine) en épousant de façon parfaite leur moindre anfractuosités ou replis. La surface qu'il couvre atteint ainsi une superficie supérieure à 1000 m² soit 10¹² cellules environ.

Il constitue un véritable interface entre le flux sanguin d'une part et la paroi vasculaire et les tissus interstitiels d'autre part. Cette position stratégique lui confère donc le rôle de barrière biologique. Cependant, durant de nombreuses années, aucune fonction ne lui a été attribuée si bien qu'on le disait biologiquement inactif et qu'on pensait qu'à son niveau les échanges se faisaient grâce à un système de transport passif.

Toutefois, en mettant les cellules endothéliales en culture, on s'est rendu compte qu'elles exerçaient un rôle essentiel dans plusieurs fonctions physiologiques fondamentales telles que l'hémostase ou la modulation immunologique et qu'elles intervenaient également dans les phénomènes tels que l'inflammation, la coagulation, l'athérosclérose, l'infection ou l'ischémie qui correspondent tous à des altérations pathophysiologiques.

Au vu ces nombreux rôles, on comprend aisément que des altérations structurales ou fonctionnelles de l'endothélium peuvent être à l'origine de pathologies, comme les pathologies veineuses, ainsi que du remaniement de la paroi veineuse qui les accompagne (Ross, 1981).

L'endothélium vasculaire n'est donc pas une simple barrière biologiquement inerte mais, bien au contraire, une couche cellulaire active capable d'intégrer des signaux, d'en émettre, puis de réagir avec les nombreux moyens dont il dispose (interactions avec les cellules musculaires lisses, production de médiateurs inflammatoires, ...) aux situations extérieures et aux altérations physiopathologiques auxquelles il doit faire face.

Dans ce chapitre, nous aborderons donc la structure et les rôles de la cellule endothéliale dans des conditions physiologiques normales.

I.3.1. Morphologie et structure des cellules endothéliales :

I.3.1.1. Structure de l'endothélium :

L'endothélium se compose d'une monocouche, aplatie et uniforme, de cellules endothéliales; elle représente une véritable mosaïque de cellules polygonales, allongées et orientées parallèlement à la direction du flux sanguin (Herman et Castellot, 1987). Dans le jargon morphologique, cette structure est appelée épithélium pavimenteux simple (Jaffe, 1985). Il est à noter que la forme, la taille et l'arrangement des cellules endothéliales varient fortement suivant la localisation, dans l'organisme, du vaisseau étudié.

L'épaisseur d'une cellule endothéliale varie de 1 à 3 μm en fonction de la proximité du noyau alors que ses dimensions vont de 25 à 50 μm pour la longueur et de 10 à 15 μm pour la largeur.

Ces cellules présentent une particularité très originale : elles sont polarisées à la fois au niveau morphologique et fonctionnel (Ross, 1981). Ceci signifie qu'elles sont caractérisées par l'existence d'un pôle luminal, en contact avec les cellules du sang, et d'un pôle sous-endothélial par lequel elles sont attachées aux constituants de la matrice subendothéliale. Cette polarité reflète leur spécialisation dans les interactions avec les cellules sanguines et celles de la paroi vasculaire.

Lorsqu'on les met en culture, les cellules endothéliales prennent un aspect polygonal. Elles sont aplaties et possèdent un noyau ovoïde, protubérant, occupant une position centrale dans la cellule. Comme toutes cellules eucaryotes, elles contiennent une grande quantité d'organites cytoplasmiques de synthèse : appareil de Golgi, important réseau

de réticulum endoplasmique lisse et rugueux, ribosomes et mitochondries, ce qui reflète l'intensité du métabolisme cellulaire. En plus de ces constituants, les cellules endothéliales présentent une spécificité : ce sont les corps de Weibel-Palade qui seront décrits dans la suite de ce chapitre.

In vitro, les cellules endothéliales répondent au phénomène d'inhibition de contact, c'est-à-dire que lorsqu'elles arrivent à confluence, plutôt que de se chevaucher, les cellules arrêtent de se diviser. Il en résulte l'existence d'une monocouche de cellules jointives (Ross, 1981). Les études faites sur les capacités de prolifération et le vieillissement des cellules endothéliales ont montré qu'elles avaient une durée de vie limitée. Un processus de dédifférenciation apparaît rapidement, faisant perdre à ces cellules une partie de leurs caractéristiques propres.

I.3.1.2. Morphologie de l'endothélium :

Lorsque l'on regarde le phénotype des cellules endothéliales, on constate que celui-ci est assez diversifié. En effet, on observe que la taille et la forme des cellules varient en fonction de leur localisation dans le système vasculaire (Thorgeirsson, 1983). Mais malgré ces différences, on peut énumérer chez les cellules endothéliales au moins quatre caractéristiques cytologiques communes. Les voici détaillées une par une.

A) Le glycocalyx :

La surface des cellules endothéliales est entourée d'une enveloppe qui constitue le glycocalyx, riche en carbohydrates présents sous forme de protéoglycanes (héparan-sulfate en particulier), d'où émergent de nombreuses microvillosités. L'héparan-sulfate apporte à la cellule un ensemble de charges négatives qui limitent l'adhésion des plaquettes et des leucocytes chargés similairement et empêchent, dès lors, l'activation de la cascade de la coagulation dans les vaisseaux sanguins intacts (propriété de thromborésistance abordée plus loin dans ce point de l'introduction). 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.

B) Le cytosquelette :

Le cytoplasme des cellules endothéliales contient tous les organites nécessaires au bon fonctionnement du métabolisme cellulaire. En plus de ces éléments, on y trouve également trois types de filaments constituant le cytosquelette : les microfilaments d'actine, les filaments intermédiaires comme la vimentine et les filaments épais de myosine. Les cellules endothéliales possèdent donc tous les outils nécessaires à réguler leur rétraction, l'adhérence, les interactions cellulaires, la perméabilité vasculaire ainsi que leur prolifération et leur migration.

C) Les corps de Weibel-Palade :

La grande caractéristique des cellules endothéliales est la présence d'inclusions intracytoplasmiques spécifiques appelées corps de Weibel-Palade. Ce sont des granules ovoïdes constituant un véritable critère d'identification des cellules endothéliales (Jaffe *et al.*, 1973). Cet organite est composé d'un faisceau de tubules parallèles à l'axe du corps. L'ensemble est entouré d'une matrice dense et d'une membrane. Ils sont probablement formés à partir du complexe de Golgi (Herman et Castellot, 1987).

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

D) Les vésicules transendothéliales :

Vu leur localisation à l'interface entre le sang et la paroi vasculaire, les cellules endothéliales ont un rôle prépondérant à tenir dans les échanges de substances du sang vers les tissus. Dès lors, de nombreuses invaginations se forment à partir de la membrane, témoignant d'une intense activité pouvant conduire à la formation de vésicules de pinocytose. De tels phénomènes permettent l'internalisation des substances d'échange entre le sang et les tissus. Certains de ces phénomènes se font de manière passive alors que la plupart des échanges se réalisent grâce à des mécanismes actifs d'endocytose et de pinocytose.

Tous ces mécanismes définissent la propriété de perméabilité sélective de l'endothélium. Les jonctions interendothéliales, "tigh junctions" et "gap junctions", jouent aussi un rôle important dans le transport des molécules solubles à travers l'endothélium.

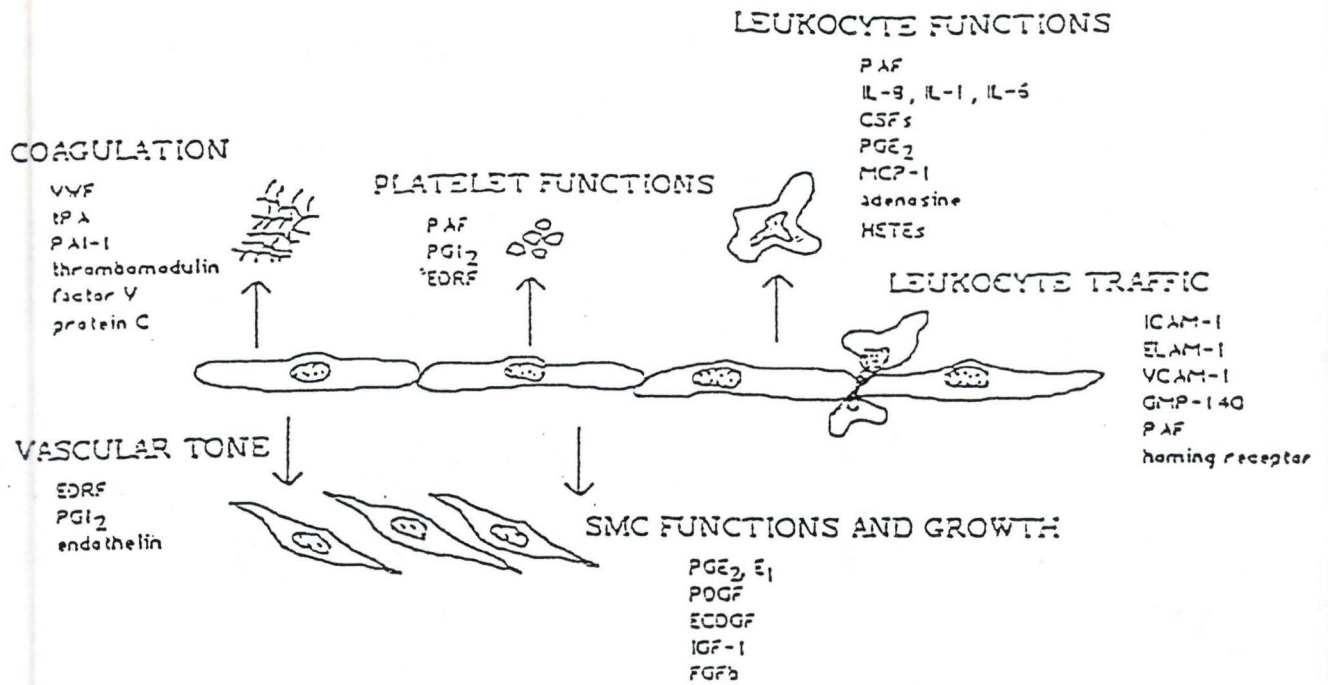


FIG. 1. Schematic presentation of the different functions of the endothelium. VWF = Von Willebrand factor, tPA = tissue plasminogen activator, PAI-1 = plasminogen activator inhibitor-1, PAF = platelet-activating factor, PG = prostaglandin, EDRF = endothelium-derived relaxing factor, IL = interleukin, TNF α = tumor necrosis factor α , CSFs = colony-stimulating factors, MCP-1 = monocyte chemotactic factor-1, PDGF = platelet-derived growth factor, ECDGF = endothelial-cell-derived growth factor, IGF-1 = insulin-like growth factor-1, FGFb = basic fibroblast growth factor, ICAM-1 = intercellular adhesion molecule-1, ELAM-1 = endothelial-leukocyte adhesion molecule-1, VCAM-1 = vascular cell adhesion molecule-1, GMP-140 = granular membrane protein-140; HETEs = hydroxyeicosatetraenoic acid.

Figure I.10 : Représentation schématique des différentes fonctions de l'endothélium (D'après Michiels et al, 1993).

Grâce à ces différentes caractéristiques, on peut aisément identifier les cellules endothéliales parmi d'autres types cellulaires.

I.3.2. Les rôles de l'endothélium :

Voici décrites une par une les fonctions principales remplies par l'endothélium dans des conditions physiologiques normales (figure I.10) :

I.3.2.1. L'endothélium en tant que barrière à perméabilité sélective :

Les cellules endothéliales forment une véritable barrière physique à l'interface entre le sang et les tissus et ce, du fait qu'elles sont en contact étroit les unes avec les autres (tight junctions). Néanmoins, étant donné la capacité de perméabilité sélective des cellules endothéliales, les solutés sont capables de traverser ce barrage. Ce passage est rendu possible grâce aux phénomènes de pinocytose fluide et absorptive (endocytose).

Les liquides et les éléments formés dans le compartiment extravasculaire vont quant à eux rencontrer une seconde barrière : la membrane basale sur laquelle repose les cellules endothéliales.

I.3.2.2. L'endothélium vasculaire et le contrôle de la thromborésistance :

L'endothélium vasculaire de la veine offre, sur sa face luminale, une surface thromborésistante et hémocompatible qui prévient et s'oppose à une activation exagérée du système de la coagulation (Braquet *et al.*, 1994).

Les propriétés des cellules endothéliales veineuses inhibitrices de la coagulation et inductrices de la fibrinolyse sont particulièrement importantes dans des conditions de stase qui facilitent la stimulation des enzymes de la coagulation.

L'interaction sang circulant-paroi vasculaire fait intervenir toute une cascade de mécanismes où il faut prendre en compte l'effet de l'endothélium sur le contenu sanguin, mais aussi l'effet du contenu sanguin activé sur la réactivité pariétale (Braquet *et al.*, 1994).

Tout d'abord, l'endothélium participe à l'équilibre du système thrombolytique par ses propriétés anticoagulantes qu'il doit notamment à la synthèse de l'activateur tissulaire du plasminogène et à l'expression à sa surface de thrombomoduline (Braquet *et al.*, 1994; Palombo, 1991). Cette protéine fixe la thrombine et lui fait perdre sa fonction pro-coagulante par une diminution de son affinité pour le fibrinogène. Cette protéine joue donc un rôle majeur dans les mécanismes de défense vasculaire antithrombotique.

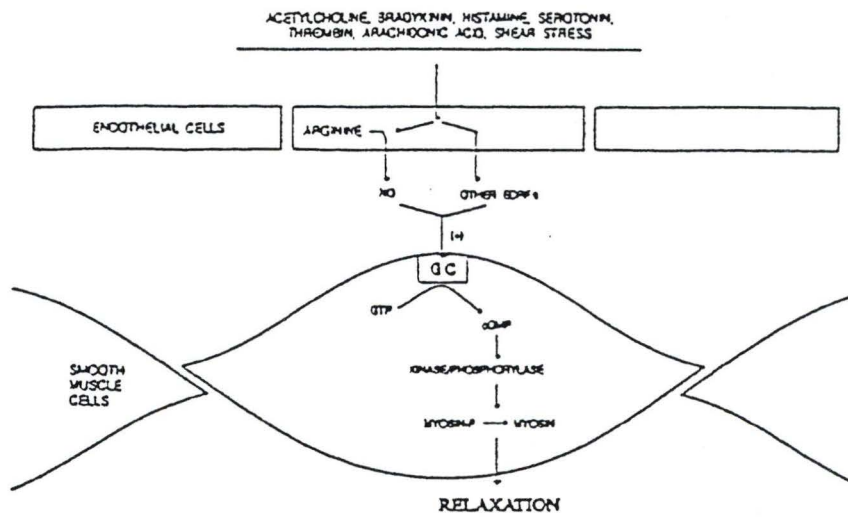
Par ailleurs, polarisé et chargé négativement par un véritable réseau de glycosaminoglycanes, l'endothélium concentre et stimule l'antithrombine III qui inhibe toutes les sérines protéases de la coagulation et, en particulier, inactive la thrombine (facteur IIa) (Braquet *et al.*, 1994).

Inversement, l'endothélium vasculaire peut aussi sécréter de façon constitutive des facteurs pro-coagulants tels que le facteur de Von Willebrand. C'est une glycoprotéine dont la sous-unité de base a un poids moléculaire de 225 000. Une fois libéré dans la circulation sanguine, ce facteur s'associe rapidement au facteur VII (facteur anti-hémophilique intervenant dans la coagulation sanguine), autre cofacteur important de l'agrégation plaquettaire. Mais l'adhésion des plaquettes est surtout favorisée par les collagènes sous-endothéliaux de type IV et V ainsi que par les microfibrilles et par la synthèse par les cellules endothéliales du thromboxane A₂ (vasoconstricteur stimulant l'agrégation plaquettaire).

Il est à noter à ce niveau que, dans des conditions physiologiques normales, la matrice extracellulaire sous-endothéliale est couverte de cellules, ce qui a pour conséquence que les plaquettes non stimulées ne peuvent pas y adhérer. Au contraire, en réponse à des stimuli tels que les lipopolysaccharides bactériens, les cytokines, ..., l'endothélium peut se transformer en une surface pro-coagulante, rapidement recouverte par une couche de plaquettes. Celles-ci, une fois activées, vont dégranuler et déclencher tout le processus de la coagulation.

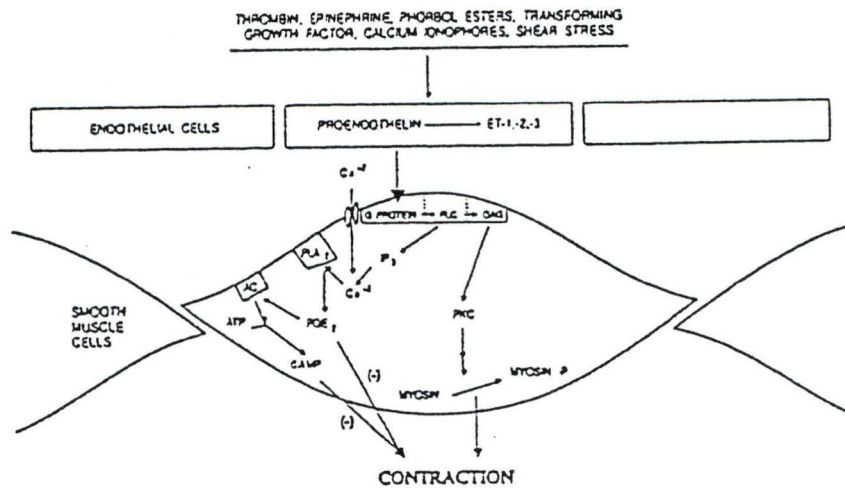
Ainsi s'établit au niveau de l'endothélium, un véritable équilibre des facteurs pro- et anticoagulants qui peut se déplacer dans un sens négatif pendant l'hypoxie veineuse.

a



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

b



Proposed mechanism for the contraction of smooth muscle mediated through the endothelial cell. Stimulation of endothelial cells by vasoconstrictants or shear stress induces genetic expression of pro-endothelin. Endothelin-1 (ET-1) is formed by the action of an endopeptidase and diffuses to the smooth muscle cell. Receptor-mediated activation of a G protein after the binding of ET-1 leads to formation of inositol-1,4,5 trisphosphate (IP₃) by phospholipase C (PLC) and release of intracellular calcium (Ca²⁺). Concomitant formation of diacylglycerol (DAG) activates protein kinase C (PKC), resulting in the phosphorylation of myosin light chains (myosin-P) and initiation of the contractile response. Increases in intracellular calcium from endogenous and exogenous sources (through calcium channels) activates phospholipase A₂ (PLA₂), leading to formation of prostaglandin E₂ (PGE₂). PGE₂ can stimulate cyclic adenosine monophosphate (cAMP) formation by adenylate cyclase (AC). PGE₂ has vasorelaxant properties, while cAMP acts as a negative feedback signal on the contractile response.

Figure I.11 : Représentation des mécanismes de la relaxation (a) et de la contraction (b) chez les cellules musculaires lisses induits par l'activation des cellules endothéliales (D'après Palombo et al., 1991).

I.3.2.3. L'endothélium vasculaire et la vasomotricité (figure I.11) :

Aux fonctions luminales anti-thrombotiques et anticoagulantes de l'endothélium correspond une fonction ab-luminale de régulation du tonus vasculaire.

La participation de l'endothélium dans le contrôle du tonus vasculaire a été établie à partir des découvertes successives de substances vasoactives synthétisées par l'endothélium qui vont diffuser et agir directement sur les cellules musculaires lisses (Braquet *et al.*, 1994). Les cellules endothéliales génèrent donc à la fois des facteurs de relaxation et de contraction (Palombo, 1991).

C'est la prostacycline, produit du métabolisme de l'acide arachidonique par la cyclooxygénase, qui fut le premier facteur décrit. C'est une prostaglandine produite par les cellules endothéliales. Ces lipides acides ont pour précurseur l'acide arachidonique, transformable par la cyclooxygénase en métabolites intermédiaires : les endoperoxydes. Ces derniers donnent principalement naissance dans les cellules endothéliales à la prostacycline grâce à l'intervention d'une enzyme : la prostacycline synthétase. La prostacycline libérée dans le milieu extracellulaire possède deux propriétés importantes : une action vasodilatatrice et un puissant effet antiagrégant à l'égard des plaquettes (Moncada, 1979). Par cette double action, la prostacycline module le tonus vasculaire et s'oppose à la thromboformation.

Les cellules endothéliales synthétisent également d'autres facteurs endogènes contrôlant le tonus vasculaire. Parmi ceux-ci, nous pouvons citer l'endothelium-derived relaxing factor (EDRF) qui a été identifié comme étant l'oxyde nitrique (Braquet *et al.*, 1994; Palombo, 1991). Celui-ci est libéré des cellules endothéliales par l'acétylcholine et par de nombreuses substances comme l'histamine, la bradykinine, la sérotonine, la thrombine ou par les forces de cisaillement (Palombo, 1991). Cet oxyde est à la fois un puissant agent dilatateur et un inhibiteur de la thrombose, de l'adhésion et de la prolifération cellulaire. Il est reconnu comme messenger intracellulaire et intercellulaire ubiquitaire et il est produit à partir de la L-arginine (Palmer, 1988) (Figure I.12). Les cellules endothéliales s'en servent comme un nitrate endogène pouvant, à la fois relaxer les cellules musculaires sous-jacentes à l'endothélium et agir sur les cellules circulantes.

Dans certaines conditions pathologiques, l'endothélium va perdre une partie de sa capacité à former de l'oxyde nitrique et de la prostacycline.

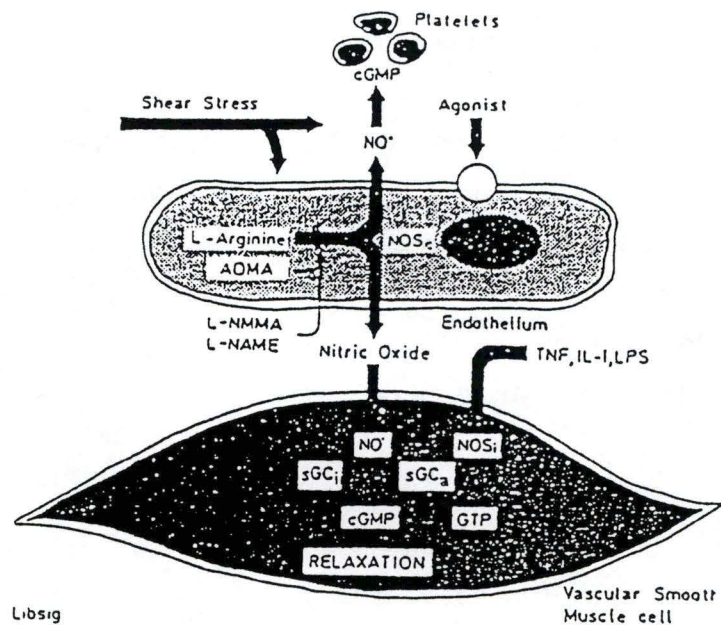


Figure I.12 : Métabolisme de la L-arginine dans la paroi veineuse (D'après T. F. Lüscher, 1993).

A côté des facteurs relaxants, les cellules endothéliales produisent des facteurs constricteurs et, notamment l'endothéline qui est un peptide de 21 acides aminés (Braquet *et al.*, 1994; Palombo, 1991). Ce peptide, qui existe sous forme de traces dans le sang, est le plus puissant agent vasoconstricteur connu à ce jour.

Ce peptide stimule la contraction des cellules musculaires lisses et la synthèse de l'ADN dans ces mêmes cellules; c'est-à-dire que l'endothéline favorise la croissance de ces cellules en agissant en synergie avec les autres facteurs de croissance.

Un rôle physiopathologique de l'endothélium a été envisagé dans l'insuffisance veineuse chronique où les taux d'endothéline sont plus élevés. Cependant, sa fonction reste encore à préciser mais il est remarquable de noter qu'à l'inverse de nombreux autres vasoconstricteurs, l'endothéline est beaucoup plus puissante à contracter les veines que les artères.

I.3.2.4. L'endothélium et les molécules d'adhésion :

Les molécules d'adhérence sont des molécules membranaires qui permettent à deux cellules voisines d'interagir entre elles. Ce sont souvent des glycoprotéines transmembranaires, liées au cytosquelette, que la cellule va utiliser comme point d'ancrage sur d'autres cellules ou sur la matrice extracellulaire pour pouvoir adhérer ou se déplacer.

L'augmentation du nombre des molécules d'adhérence sur la surface cellulaire peut être réalisée, selon le type de molécules, dans les minutes suivant l'activation de la cellule, par mobilisation d'un pool intracellulaire de molécules préformées et stockées dans des vésicules, ou bien, en quelques heures, par la synthèse *de novo* de molécules d'adhérence et leur transport à la surface cellulaire (Springer, 1990).

L'adhérence est un phénomène très important chez les neutrophiles. Dans les conditions physiologiques, il existe une interaction continue entre les neutrophiles et les cellules endothéliales de la paroi des vaisseaux sanguins. En moyenne, chaque heure, un dixième de la réserve totale du sang en neutrophiles migre de la circulation au travers de l'endothélium par diapédèse.

Lors d'une réponse inflammatoire, cette adhérence augmente fortement et le premier contact des leucocytes avec l'endothélium est médié par les interactions entre les molécules

d'adhérence exprimées à la surface de ceux-ci et les contre-récepteurs exprimés par les cellules endothéliales. Nous nous limiterons à détailler les molécules présentes sur les polymorphonucléaires neutrophiles ainsi que sur les cellules endothéliales.

A) Mécanisme d'adhérence des neutrophiles :

Les neutrophiles au repos, comme les autres cellules, présentent des charges négatives à leur surface, ce qui provoque une répulsion électrostatique entre cellules. Toute réduction de cette charge négative de surface engendrerait une réduction des forces répulsives électrostatiques (Harlan, 1985). Les neutrophiles adhèrent donc à l'endothélium quand l'interaction entre les paires de molécules d'adhérence est suffisante pour s'opposer à ces forces de répulsion.

Le premier mécanisme d'adhésion qui a été caractérisé est induit par des facteurs chimiotactiques et d'autres médiateurs de l'inflammation (fragment C5a du complément, platelet activating factor, leucotriène B₄). Ces molécules provoqueraient une altération concomitante dans l'expression de glycoprotéines spécifiques (CD11/CD18) à la surface de la membrane plasmique des neutrophiles.

Les CD11/CD18 sont des intégrines spécifiques des leucocytes. Elles sont constituées chacune d'une chaîne α variable de 177, 165 et 160 kDa désignées respectivement par CD11a, CD11b et CD11c liées de manière non covalente à une sous-unité β_2 commune de 95 kDa (CD18). L'association de ces molécules donne : CD11a/CD18 (ou LFA-1), CD11b/CD18 (ou Mac-1) et CD11c/CD18 (ou gp 150,95).

L'activation des polymorphonucléaires neutrophiles avec du fMLP augmente fortement l'expression des CD11b/CD18 ainsi que des CD11c/CD18 sans augmenter le nombre de CD11a/CD18. CD11b/CD18 semble être la molécule dominante associée à l'augmentation de l'adhérence des neutrophiles. Elle serait préformée et stockée dans des granules spécifiques intracellulaires. Lors d'une stimulation des polymorphonucléaires neutrophiles par les agonistes chimiotactiques, les molécules CD11b/CD18 sont rapidement redistribuées dans la membrane plasmique par translocation et/ou subissent un changement de conformation (Carlos et Harlan, 1990).

B) Molécules exprimées par les cellules endothéliales :

Parallèlement aux CD11/CD18 des neutrophiles, il existe des contre-récepteurs exprimés par les cellules endothéliales.

- ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule-1) est une molécule d'adhérence exprimée à la surface de nombreuses cellules. C'est une glycoprotéine de 90 kDa appartenant à la superfamille des immunoglobulines et qui sert de contre-récepteur pour les intégrines CD11a/CD18 et CD11b/CD18 exprimées par les leucocytes (Scozaec et Lesech, 1993).

L'expression d'ICAM-1 peut également être induite par stimulation des cellules endothéliales par des cytokines comme l'interleukine-1, mais nécessite plusieurs heures pour la synthèse de protéines *de novo*. Toutefois, ICAM-1 n'est pas la seule cible du CD11/CD18. Une autre molécule apparentée et nommée ICAM-2 (InterCellular Adhesion Molecule-2), dont l'expression est constitutive et non inductible par les cytokines, jouerait également un rôle important dans la liaison polymorphonucléaires neutrophiles-cellules endothéliales.

- ELAM-1 (Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1) est une glycoprotéine monomérique transmembranaire appartenant à la famille des sélectines. Elle n'est pas exprimée de façon constitutive, mais son expression est induite transitoirement suite à la stimulation par des cytokines comme l'interleukine-1 ou les lipopolysaccharides bactériens. L'expression d'ELAM-1 requiert une synthèse de protéines *de novo* qui passe par un optimum entre 4 et 6 heures de stimulation. Enfin, cette molécule pourrait lorsqu'elle se lie à son ligand, agir comme un stimulus activateur des polymorphonucléaires neutrophiles et induire l'expression des intégrines CD11/CD18.

En conclusion, l'adhérence des neutrophiles aux cellules endothéliales peut être induite soit par l'activation des neutrophiles soit par l'activation des cellules endothéliales ou par les deux (Arnould *et al.*, 1994a).

I.3.2.5. L'endothélium et les facteurs de croissance :

L'endothélium possède aussi un rôle vasotrophique. Il synthétise ou active des facteurs de croissance qui vont agir sur son propre renouvellement et sur la prolifération des tissus sous-jacents (Braquet, 1994).

A côté des substances vasoconstrictrices, comme l'endothéline qui module la croissance des cellules musculaires lisses, il existe des facteurs de croissance dont le rôle principal semble être le contrôle de l'expansion et du phénotype des cellules de la paroi vasculaire.

Parmi eux, on trouve le platelet-derived growth factor (PDGF). Il s'agit d'une glycoprotéine cationique de poids moléculaire 28 à 33 000. Bien que d'origine surtout plaquettaire, ce polypeptide composé de deux chaînes homologues reliées par des ponts disulfures est aussi synthétisé par les cellules endothéliales et ce, en faible quantité. La synthèse endothéliale peut néanmoins être augmentée par les activateurs du système de la coagulation.

Une seconde famille de facteurs de croissance à aborder est celle des fibroblast growth factor (FGF). Ceux-ci existent sous forme acide et basique et ils contrôlent la croissance des cellules endothéliales mais aussi celle des cellules musculaires lisses. Les FGF se caractérisent par leur forte affinité pour l'héparine et les glycosaminoglycanes avec lesquels ils se lient, ce qui les protègent de la dégradation. Contrairement aux autres facteurs de croissance, les FGF ne sont pas sécrétés de manière constitutive mais restent liés aux cellules ou à la matrice extracellulaire.

L'epidermal growth factor (EGF) est quant à lui un polypeptide de plus petite taille dont la structure en feuillet rappelle celle des protéines d'adhésion avec lesquelles il ne présente, cependant, aucune activité biologique en commun. Connu surtout comme facteur de cicatrisation épidermique, il stimule aussi la prolifération des cellules musculaires lisses.

En fait, l'ensemble de ces facteurs de croissance agit le plus souvent de manière concomitante après agression de l'endothélium. Ces facteurs pourraient intervenir dans la pathologie veineuse en stimulant la prolifération des cellules musculaires lisses et en les faisant passer d'un phénotype contractile à un état prolifératif, synthétique. Ainsi,

apparaissent les premières modifications structurales de la paroi veineuse qui va s'épaissir et perdre ses propriétés élastiques.

En conclusion, au vu de l'ensemble des caractéristiques décrites ci-dessus, les cellules endothéliales sont indispensables au bon fonctionnement du système vasculaire. Ces cellules, à l'interface sang-tissu, agissent sur toute l'écologie vasculaire. Elles sont multifonctionnelles.

L'endothélium est en interaction permanente avec les cellules circulant dans le sang d'une part, et d'autre part avec celles de la paroi du vaisseau sanguin, en particulier avec les cellules musculaires lisses. Celles-ci sont, en effet, sensibles à différents facteurs sécrétés par les cellules endothéliales qui agissent sur leur croissance, leur migration et leur état contractile, influençant ainsi la vasomotricité.

Comme nous pouvons donc le constater, les cellules endothéliales et musculaires lisses sont en contact constant les unes avec les autres. C'est pourquoi, après avoir décrit la morphologie et les fonctions des cellules endothéliales, nous allons, dans le paragraphe qui suit, aborder la description des cellules musculaires lisses : morphologie et structure, modulation phénotypique et finalement, leur rôle dans la synthèse de la matrice extracellulaire.

I.4. Les cellules musculaires lisses

I.4.1. Morphologie et structure :

Les cellules musculaires lisses sont des cellules allongées qui forment la tunique musculaire ou média des vaisseaux sanguins, des viscères et assurent les mouvements de certains organes de la sphère végétative.

Leur contraction est involontaire et causée par de nombreux stimuli chimiques ou mécaniques. Dans le cas des veines, elle est responsable de la régulation du flux et de la pression sanguine (Yamamoto *et al.*, 1992).

Les cellules musculaires lisses sont de fort petite taille mais leurs dimensions varient selon leur localisation : 15 μm dans les parois des vaisseaux sanguins et 500 μm dans les myomètres utérins. Elles sont fusiformes, très allongées avec des extrémités effilées.

Elles possèdent un noyau unique, central qui présente souvent des invaginations ainsi qu'un aspect en tire-bouchon lorsque la cellule est contractée. De chaque côté de ce noyau se trouvent des organites cellulaires, de très nombreuses mitochondries, des inclusions de glycogène, l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique rugueux. On constate que la quantité des organites de synthèse varie selon l'origine des cellules mais surtout selon qu'elles expriment le phénotype synthétique ou contractile.

Les muscles lisses possèdent des éléments contractiles sous forme de structures filamenteuses homogènes non striées : les myofilaments. Ceux-ci sont dispersés dans toute la cellule sauf dans les cônes sarcoplasmiques.

Il existe trois types de filaments (Chamley-Campbell *et al.*, 1979) :

- Les filaments intermédiaires ou filaments cytoplasmiques (ou β -filaments) sont nombreux. Ils se croisent au niveau des corps denses et sont distribués irrégulièrement dans la cellule. Ces derniers ne constituent pas comme on l'a longtemps pensé, des points d'ancrage pour les filaments d'actine et ne sont pas non plus en rapport avec les filaments de myosine. Ils forment le cytosquelette distinct de l'appareil contractile. Leur diamètre est de 10 nm.

- Les fins filaments sont 15 fois plus nombreux que ceux de myosine. Ils se composent d' α -actine et de tropomyosine. Leur diamètre varie de 50 à 80 Å. Ils s'attachent à la face interne du sarcolemme par des plaques d'ancrage.

L'actine est une protéine de 42 kDa existant dans pratiquement toutes les cellules. Il existe au moins six isotypes d'actine différents chez les mammifères. Les trois classes d'isotypes sont l'alpha, la bêta et la gamma actine. Ces deux dernières sont aussi appelées isoformes cytoplasmiques. L'actine alpha des muscles lisses ne se retrouve que dans les cellules musculaires lisses et pas dans les autres types cellulaires. Son taux est inversement proportionnel à l'état prolifératif de la cellule. L'actine alpha est présente quand la cellule est dans son état contractile.

- Les filaments épais de myosine sont disposés parallèlement au grand axe de la cellule et sont entourés de fins filaments insérés dans les corps denses. Leur diamètre est de 120 à 180 Å.

La membrane plasmique présente de nombreuses invaginations formant de longues indentations dans lesquelles viennent s'ancrer les fibres de collagène du tissu conjonctif sous-jacent. Elle forme aussi de nombreux et long replis irréguliers ainsi que de petites invaginations sphériques (vésicules superficielles) qui augmentent considérablement la surface cellulaire.

Ces vésicules superficielles sont de deux types. Les plus abondantes sont les vésicules de micropinocytose dont le seul rôle est le stockage du calcium. Ensuite, de façon plus rare, on trouve des vésicules recouvertes de clathrine qui sont impliquées dans l'absorption de protéines, médiée par des récepteurs.

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

La contraction du muscle lisse est due au glissement des filaments fins et épais les uns par rapport aux autres. Lors de la contraction, l'ensemble des myofilaments peut se contracter d'un seul coup ou bien réaliser une onde de contraction qui s'étend sur toute la cellule. Le calcium nécessaire à la contraction provient de l'espace extracellulaire grâce à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique à cet ion. Il diffuse, alors seulement dans toute la cellule, après "capture" par les vésicules de pinocytose.

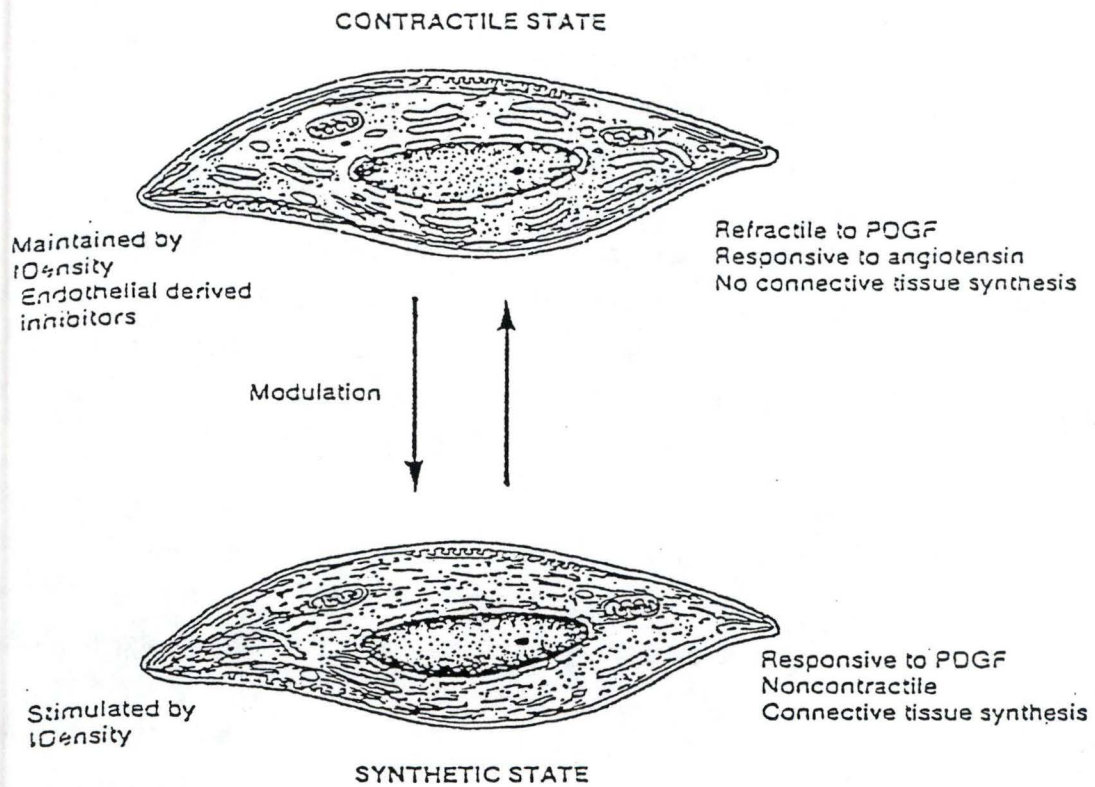


Figure I.13 : Représentation de la modulation de l'état contractile et de l'état synthétique chez les cellules musculaires lisses (D'après R. Ross, 1981).

I.4.2. Modulation phénotypique :

La différenciation cellulaire est définie comme étant un changement de morphologie et de fonction de la cellule (Chamley-Campbell, 1981). Elle apparaît durant le développement et implique une transition cellulaire d'un état initial multipotentiel à une forme spécialisée de l'état adulte.

Dans le passé, le terme de "dédifférenciation" était utilisé pour décrire une cellule musculaire lisse adulte ressemblant à une cellule musculaire lisse impliquée dans la synthèse de la matrice extracellulaire.

Actuellement, on préfère l'expression de "modulation phénotypique" au vocable ancien de "dédifférenciation" et ceci parce que l'on ne possède aucune preuve que la cellule retourne à un état initial multipotent. De plus, le phénotype est souvent considéré comme réversible en fonction des conditions sous lesquelles on travaille.

La modulation phénotypique correspond au passage des cellules musculaires lisses d'un état principalement contractile à un état synthétique et/ou mitotique (Thyberg *et al.*, 1990; Chamley-Campbell, 1981) (figure I.13).

Ce changement de phénotype s'opère de façon progressive. Tout d'abord, nous observons une régression des myofilaments (α -actine et myosine) ainsi qu'un switch de l'expression de l'actine alpha du muscle lisse en actine bêta cytoplasmique et une augmentation des lysosomes sans pour autant constater de traces d'autophagie (Thyberg *et al.*, 1990).

Par la suite, le noyau devient euchromatique et les organites de synthèse (réticulum endoplasmique rugueux, complexe de Golgi, ribosomes) se trouvant à proximité augmentent de manière considérable. En parallèle, on observe une synthèse accrue de protéines et particulièrement celles de la matrice extracellulaire (collagène, élastine) (Thyberg *et al.*, 1990).

Enfin, lors de cette modulation, on note également des changements quantitatifs et qualitatifs dans l'expression des canaux calcium voltage-dépendants ainsi que des variations dans les composantes du cytosquelette.

En résumé, les cellules musculaires lisses dans l'état contractile se trouvent en phase G₀ du cycle cellulaire. Elles possèdent des myofilaments abondants mais peu de réticulum endoplasmique et ne répondent pas aux facteurs mitogènes (sérum, platelet-derived growth factor). Tandis que les cellules dans l'état synthétique se trouvent en phase G₁ du cycle cellulaire. Elles possèdent un compartiment microsomal important, répriment leur expression d' α -actine et sécrètent une matrice extracellulaire abondante.

En pratique, à faible densité, les cellules musculaires lisses en culture se trouvent dans un état synthétique. Elles prolifèrent et se divisent. Lorsqu'elles arrivent à confluence, elles arrêtent de croître, on se retrouve alors dans un état stationnaire, les cellules vont alors se redifférencier en cellules contractiles (Chamley-Campbell, 1981).

Lors de pathologies vasculaires, il s'exerce un remodelage de la paroi veineuse. Ceci est dû à plusieurs phénomènes impliquant des changements dans les interactions cellulaires. Ces modifications entraînent notamment la modulation phénotypique des cellules musculaires lisses ce qui a pour conséquence la prolifération et la migration de ces cellules vers l'intima.

I.4.3. Synthèse de la matrice extracellulaire :

Les cellules musculaires lisses sont capables de synthétiser des constituants de la matrice extracellulaire (élastine, collagène, laminine) (Thyberg *et al.*, 1990) ainsi que les protéoglycanes; elles sont aidées dans leur tâche par les cellules endothéliales qui sécrètent notamment les glycoprotéines des glycosaminoglycanes, la laminine et le collagène de type IV.

Les cellules musculaires lisses produisent quant à elles les collagènes I, III, IV, V et VI. Notons qu'au stade synthétique, elles forment 25 à 30 fois plus de collagène qu'à l'état contractile.

Les cellules musculaires lisses libèrent également les fibres élastiques du tissu conjonctif. Celles-ci se composent de deux éléments structuraux distincts : l'élastine et une glycoprotéine microfibrillaire. L'élastine se dispose au centre de cette microfibrille et c'est cela qui donne un aspect amorphe à la matrice.

Les protéoglycanes (polysaccharides polyanioniques) formés par les cellules musculaires lisses 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).

Cette matrice extracellulaire joue deux rôles importants : tout d'abord, elle a une fonction de soutien mais elle permet aussi de réguler la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses.

La prolifération des cellules musculaires lisses est également due à d'autres facteurs tels que les prostaglandines et facteurs de croissance. Ces derniers font l'objet du point suivant.

I.5. Les facteurs de croissance bFGF et $\text{PGF}_{2\alpha}$

Le basic fibroblast growth factor appartient à la famille des fibroblast growth factor (FGF). Ces facteurs de croissance sont capables de se lier à l'héparine (Gospodarowicz *et al.*, 1987). Cette liaison est extrêmement importante puisqu'elle permet la dimérisation du bFGF, ce qui promeut la liaison à son récepteur.

Le bFGF est une molécule d'un poids moléculaire de 18 000 qui représente un mitogène et un morphogène puissant pour de nombreux types de cellules. Cette molécule produite par de nombreuses cellules telles que les cellules endothéliales et les cellules de la granulosa intervient dans la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire (Rifkin et Moscatelli, 1989). Cependant, le bFGF agit également sur les cellules endothéliales qui le relarguent. En effet, à la surface de ces cellules, le récepteur au bFGF est présent. La migration des cellules endothéliales *in vitro* est dépendante de la libération du bFGF endogène, ce qui suggère une fonction autocrine pour le basic fibroblast growth factor.

Les cellules qui produisent le bFGF, telles que les cellules endothéliales, ne le sécrètent pas dans le milieu de culture quand elles sont en culture cellulaire (Schweigerer *et al.*, 1987). Ce comportement peut être expliqué par l'absence d'une séquence-signal conventionnelle dans le gène codant pour cette protéine.

Le bFGF ne contient en effet pas de peptide-signal dans sa séquence et ne peut donc être exporté à l'extérieur de la cellule via le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi.

Cependant, il est reconnu que ce facteur de croissance agit extracellulairement. Il possède deux modes d'action : il peut agir de façon paracrine sur les cellules avoisinantes de celles qui le libèrent mais il peut également agir de manière autocrine sur les cellules dont il provient.

En effet, de nombreuses formes de récepteurs pour le bFGF sont présentes sur la membrane plasmique de nombreuses cellules. Le nombre de récepteurs pour le bFGF par cellule semble être inversement proportionnel à son contenu en facteur de croissance. De plus, des quantités significatives sont trouvées extracellulairement associées aux protéoglycanes de type héparan-sulfate de la matrice extracellulaire *in vitro*. Enfin, il a été démontré au laboratoire que le milieu conditionné par les cellules endothéliales hypoxiques induisait la prolifération des cellules musculaires lisses, ce qui signifie que ce surnageant contient des éléments mitogéniques. Cependant, si des anticorps neutralisant contre le bFGF sont utilisés en présence de ce milieu pour la culture des cellules musculaires lisses, l'effet prolifératif du surnageant est annulé (Michiels *et al.*, 1994b). Ces résultats suggèrent que le bFGF agit extracellulairement via un mécanisme paracrine.

Malgré le fait qu'aucun mécanisme pour la libération du bFGF n'ait été décrit, la mort ou des dommages à la membrane plasmique ont été proposés en tant que mécanisme possible pour l'externalisation de ce facteur.

Les lésions au sein de la membrane plasmique peuvent donc être à l'origine d'un trafic moléculaire hors et vers le cytoplasme. Cependant, il reste à déterminer si la lésion cellulaire est physiologiquement responsable du mode de libération du bFGF *in vitro*.

La localisation du bFGF dans les cellules endothéliales n'est pas non plus bien définie. Plusieurs études sur la localisation subcellulaire de ce facteur ont montré une localisation prédominante d'une forme du bFGF dans le noyau alors que le bFGF de 18 kDa serait localisé dans le cytoplasme (Renko *et al.*, 1990). D'autres chercheurs ont montré la présence du bFGF dans le noyau, les nucléoles et le cytoplasme périnucléaire. Aucune présence de bFGF n'est observée au niveau des vésicules de pinocytose, du complexe de Golgi, du réticulum endoplasmique, des corps de Weibel-Palade ou de la membrane nucléaire.

En 1994, une étude a été réalisée au sein du laboratoire dans le but d'obtenir de plus amples informations quant au processus de libération du bFGF et à sa localisation dans la

cellule (Géron, 1994). Cette étude a montré que la perméabilité de la membrane plasmique des cellules endothéliales soumises à une incubation sous hypoxie n'était pas altérée. On n'a donc pas pu conclure à une sortie du bFGF par des pores formés pendant l'hypoxie au niveau de la membrane plasmique.

Il semblerait donc que l'hypothèse première que le groupe avait proposée ne soit pas correcte: la perméabilité de la membrane plasmique n'est pas altérée. De plus, le bFGF ne se retrouve pas dans le cytoplasme : en effet, les recherches de l'équipe montrent une localisation nucléaire du bFGF mais également dans de petites vésicules du cytoplasme.

Géron *et al.* (1994) ont donc proposé un autre mécanisme pour expliquer la libération du bFGF par les cellules endothéliales sous hypoxie. Leur explication se base sur les travaux de Mignatti (1992). Ce dernier a montré que l'inhibition de la libération du bFGF par la méthylamine, par des conditions de culture dans un milieu sans sérum ou à faible température est probablement due à une inhibition de l'exocytose. Mignatti a donc conclu que le bFGF pouvait être externalisé via un mécanisme d'exocytose indépendant de la voie du réticulum endoplasmique-appareil de Golgi. De plus, l'absence d'inhibition de la libération du bFGF par la bréfeldine (molécule inhibant le transport protéique via la voie du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi) renforce cette hypothèse.

Comme nous l'avons signalé ci-dessus, les cellules endothéliales incubées sous hypoxie libèrent divers facteurs mitogènes. Outre le bFGF, un autre facteur mitotique a été identifié.

L'utilisation d'indométhacine, un inhibiteur de la synthèse des prostaglandines, lors de la culture des cellules endothéliales entraîne également une chute de l'activité mitogénique du milieu conditionné par les cellules endothéliales hypoxiques sur les cellules musculaires lisses. Les prostaglandines interviennent donc aussi dans ce processus de prolifération. Afin d'étudier la prolifération des cellules musculaires lisses, des concentrations croissantes des quatre prostaglandines par les cellules endothéliales ont été ajoutées à ces cellules. Il a ainsi pu être montré que la $\text{PGF}_{2\alpha}$, la PGD_2 et la PGE_2 stimulent la prolifération des cellules musculaires lisses (Michiels *et al.*, 1994a). En comparant la concentration à laquelle ces trois prostaglandines étaient présentes dans le milieu conditionné par les cellules endothéliales hypoxiques avec la concentration à laquelle ces molécules montraient un effet pro-prolifératif, il a pu être montré que seule la $\text{PGF}_{2\alpha}$ pouvait intervenir dans la prolifération des

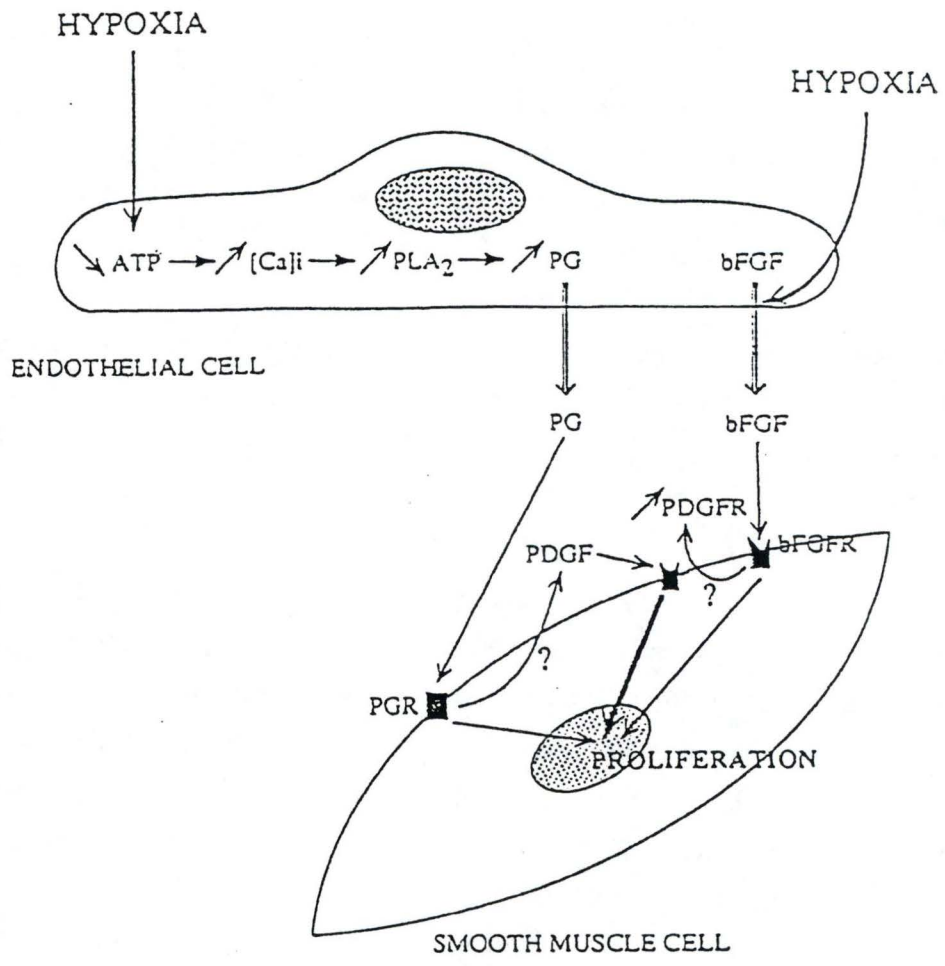


Figure I.14 : Hypothèse pour l'intervention simultanée de la $PGF_{2\alpha}$ et du bFGF dans la prolifération des cellules musculaires lisses (D'après Michiels et al., 1994).

cellules musculaires lisses, les deux autres prostaglandines sont à des concentrations trop faibles dans le milieu conditionné.

La $PGF_{2\alpha}$ intervient donc dans la prolifération des cellules musculaires lisses en plus du bFGF.

L'utilisation simultanée du bFGF pur et de $PGF_{2\alpha}$ pure pour la culture des cellules musculaires lisses montre un effet plus qu'additif de ces molécules, ce qui signifie que ces deux molécules agissent en synergie (Michiels *et al.*, 1994b) (figure I.14).

Dans ce chapitre, nous avons examiné la morphologie, la structure et le fonctionnement du système vasculaire dans des conditions physiologiques normales. Lors de cette étude, nous avons pu prendre conscience de l'importance du rôle joué par l'endothélium (de par sa position à l'interface entre le sang et la paroi vasculaire). Il nous a également été permis de constater l'importance des interactions cellules endothéliales et cellules musculaires lisses.

Cependant, il arrive que des occlusions, des traumatismes ou autres mécanismes similaires au niveau de la paroi veineuse, engendrent une diminution locale de l'apport en oxygène et nutriments. Celle-ci a pour conséquence des modifications dans la structure, les fonctions et les interactions entre cellules endothéliales et cellules musculaires lisses. Ces modifications sont probablement responsables de l'apparition des maladies veineuses.

Afin de pouvoir avancer des hypothèses expliquant l'apparition des varices, il est important d'avoir quelques notions sur ce qu'est une veine variqueuse et quels en sont les facteurs de risque. Enfin, puisque les modifications structurales et fonctionnelles de l'endothélium semblent être le facteur déclenchant du mécanisme, il est important d'aborder de façon plus précise les altérations qu'il subit sous hypoxie.

Le chapitre suivant a donc pour but d'expliquer le comportement du système vasculaire dans une situation physiopathologique.

II. Le système vasculaire dans les pathologies veineuses

II.1. Les veines variqueuses

Les insuffisances veineuses sont une des causes importantes de morbidité dans les pays industrialisés. En effet, environ une personne sur trois souffre de telles maladies. Cette prévalence élevée rend donc compte du poids économique considérable que ces pathologies font peser sur les systèmes de santé (Carpentier et Priollet, 1994). C'est pourquoi, les varices et insuffisances veineuses chroniques sont un problème de santé publique primordial dans nos pays occidentalisés.

De nombreux facteurs tels que l'obésité, l'âge, le sexe, le régime alimentaire, la station assise prolongée, l'orthostatisme ou encore les grossesses répétées et le mode de vie sont défavorables au retour du sang veineux vers le coeur (Beaglehole, 1986; Carpentier et Priollet, 1994). Ils privilégient donc l'apparition des varices qui sont des dilatations irrégulières et permanentes de la veine. Les plus courantes sont celles rencontrées au niveau des veines superficielles des membres inférieurs. Elles enlaidissent les jambes de par leur localisation sur le trajet des veines saphènes. Mais on peut également en retrouver dans d'autres parties du corps humain ainsi par exemple, les hémorroïdes correspondent à des vaisseaux dilatés de l'anus.

De plus, les insuffisances valvulaires ainsi que la perte de la capacité du tissu veineux à s'adapter aux variations de flux et de pression, suite à un affaiblissement du tissu conjonctif et musculaire et à une hyperpression, sont également incriminés dans l'étiologie des veines variqueuses. Ces veines sont anormalement dilatées, tordues et très fragiles.

L'ensemble de ces éléments provoque une stase veineuse qui a pour conséquence l'apparition d'une ischémie. Celle-ci correspond à un arrêt temporaire et localisé de la circulation sanguine. Cet arrêt peut être aigu et total ou chronique et incomplet.

Le résultat de l'ischémie est l'apparition d'importants dommages cellulaires (figure II.1). Ils sont la conséquence d'une diminution ou d'une suppression de l'apport en éléments nutritifs ainsi que d'un manque d'oxygène conduisant à une déplétion de l'adénosine triphosphate (ATP). Cette hypoxie est due à un ralentissement du flux sanguin. Ce dernier se

se caractérise par un épuisement rapide des réserves en oxygène du sang veineux ainsi que par des changements métaboliques et fonctionnels de l'endothélium. Ces altérations d'ordre énergétique et synthétique seront abordées de façon plus détaillée dans le point II.3. de cette introduction. Leur étude a été rendue possible grâce au modèle expérimental mis au point au laboratoire dans l'espoir de mimer *in vitro* ce qui se passe *in vivo* dans une ischémie.

Finalement, de façon tout à fait paradoxale alors qu'on s'attendait à ce que la réadmission de l'oxygène minimise les effets de l'hypoxie en permettant la récupération de l'énergie dans la chaîne respiratoire, on constate que la réintroduction soudaine d'oxygène s'accompagne de perturbations dans l'intégrité cellulaire. C'est ce que l'on nomme « *reperfusion-injury* » (Flaherty et Weisfeld, 1988; Piper, 1989). Il existe un certain nombre d'évidences directes et indirectes impliquant les radicaux libres dans la reperfusion-injury. Il faut cependant noter, que dans les veines, la recirculation n'apporte que du sang pauvre en oxygène et donc, on ne peut parler vraiment de reperfusion-injury dans ces veines.

II.2. Les facteurs de risques

Les pathologies veineuses et en particulier les veines variqueuses ont une prévalence élevée dans nos pays occidentalisés et industrialisés. Cependant, l'étiologie de cette pathologie n'est pas encore totalement élucidée mais on sait qu'elle fait intervenir des déterminants génétiques et des facteurs environnementaux.

Des études épidémiologiques ont permis de mieux cibler les paramètres influençant l'apparition de la maladie veineuse.

Analysons certains de ces paramètres de façon individuelle :

a) L'âge.

C'est un facteur de risque excessivement important. L'étude de Coon (1973), à ce sujet, nous montre que la présence des varices est exceptionnelle avant l'adolescence alors qu'elle devient presque la règle générale après 65 ans. Toujours selon cette même étude, on peut voir qu'à 70 ans, 60 à 70% des hommes et des femmes présentent des varices tandis que moins de 10% sont porteurs avant 25 ans.

En ce qui concerne les altérations liées au vieillissement, la sénescence de la paroi veineuse survient à tout âge, chez les deux sexes. La paroi s'épaissit; la masse de collagène augmente; les tuniques, principalement l'intima, se fibrosent; la densité des fibres élastiques diminue; les couches musculaires de l'intima et de la média s'atrophient.

Néanmoins, à mesure que l'on vieillit, le soutien conjonctif et musculaire s'affaiblit et la capacité d'adaptation du tissu veineux s'amointrit; une atrophie marquée des muscles de la jambe est généralement observée car leur utilisation est de moins en moins fréquente. Tout ceci a pour conséquence une diminution du travail musculaire, ce qui entraîne la stagnation du sang dans les veines plutôt que son expulsion vers le coeur. Une hyperpression et des stases veineuses s'installent donc. Elles sont d'abord provisoires mais deviennent rapidement définitives.

Les valvules, elles, sont rarement touchées par le vieillissement et leur nombre ne paraît pas diminuer avec l'âge.

b) L'hérédité

L'existence d'un ou plusieurs facteurs familiaux ne fait guère de doute. C'est depuis fort longtemps le sentiment de tous les cliniciens qui retrouvent des antécédents familiaux chez 70 à 80% des patients porteurs de varices. Certains travaux confortent l'hypothèse que le trait génétique concerne la transmission d'un tissu veineux de qualité médiocre.

Selon une étude récente, le risque de présenter des varices augmente avec le nombre de parents variqueux. Ainsi, si l'on prend comme référence les sujets dont les deux parents ne présentent pas de varices, le risque relatif est estimé à 2,0 quand l'un des parents est variqueux, et à 3,1 si les deux parents le sont. En d'autres termes, le risque d'un enfant de développer des varices est de 60% si les deux parents sont variqueux, de 47% si un seul des parents est atteint et de 25% si les deux parents ne présentent pas de signes d'insuffisance veineuse.

Tout le problème est de savoir si ce lien familial est d'ordre génétique ou lié à une "hérédité d'habitude". Cette question n'est pas encore définitivement tranchée, en particulier du fait qu'il n'a pas été possible de démontrer une transmission simple de type mendélienne.

Il paraît cependant raisonnable d'admettre une participation génétique, probablement multigénique.

c) Les grossesses et les facteurs hormonaux

Si une femme présente des tendances variqueuses, celles-ci sont aggravées par des grossesses multiples. En effet, les varicosités de la grossesse sont favorisées par la progestérone mais elles peuvent disparaître après la naissance.

Une intervention des hormones sexuelles a longtemps été suspectée chez la femme mais, il a été montré que les hormones ne semblent pas exercer un rôle direct sur la paroi veineuse car il n'y a pas de récepteurs aux hormones sexuelles dans la paroi veineuse des membres inférieurs.

d) La surcharge pondérale

Elle représente un facteur défavorable au retour du sang veineux vers le coeur et de ce fait, elle favorise la stase veineuse. Elle explique en partie mais pas en totalité l'apparition des varices.

Cette obésité semble jouer un rôle plus défavorable chez les femmes que chez les hommes.

e) La sédentarité et le mode de vie

L'orthostatisme (station debout prolongée) est bien connue comme facteur de risque pour le syndrome des jambes lourdes (Carpentier et Priollet, 1994). Mais la station assise sur une chaise n'est pas la meilleure position à adopter pour les personnes à tendances variqueuses car elle favorise également la stase veineuse (Beaglehole, 1986).

C'est ainsi que les sociétés occidentales ou à moeurs occidentales sont beaucoup plus touchées par les problèmes de pathologies veineuses que les civilisations traditionnelles telles que l'Afrique, l'Asie ou l'Océanie. Cette différence peut facilement s'expliquer par le fait que dans nos sociétés, les gens passent le plus clair de leur temps debout pour leur profession (professeur, dentiste...) ou assis devant un ordinateur, un bureau, la télévision,

f) Le régime alimentaire

L'évolution de ce régime entraîne une diminution de l'ingestion de fibres alimentaires et une surcharge en graisse et en sucre. Cela favorise, outre l'obésité, la constipation et le ballonnement intestinal qui n'est pas non plus favorable au retour veineux.

Une hypothèse alternative réside dans une hypovitaminose E relative qui accompagne le régime pauvre en fibres. Celle-ci reste à démontrer.

g) L'insuffisance valvulaire

Elle correspond à une perturbation d'ordre mécanique. Rappelons qu'au niveau des valvules, la paroi veineuse est amincie ce qui augmente sa vulnérabilité lors d'une trop forte pression. De plus, lors de la mise en place de la pathologie variqueuse, la paroi se dilate, ce qui écarte les valvules les unes des autres. Leur étanchéité est donc compromise.

Ces dysfonctionnements de l'appareil valvulaire pourraient être associés à l'apparition des varices.

II.3. Altérations des cellules endothéliales lors d'une ischémie et modèles expérimentaux

L'endothélium, à l'interface entre le sang et les tissus, représente une véritable barrière à perméabilité sélective. Cette position le place en première ligne sur la liste des tissus de la paroi vasculaire touchés en cas d'ischémie.

Partant donc de l'hypothèse que les cellules endothéliales sont les premières cellules à souffrir lors d'un épisode d'ischémie, Michiels *et al.* (1992) ont développé un modèle permettant d'étudier les effets de l'hypoxie *in vitro* sur des primo-cultures de cellules endothéliales isolées à partir de la veine ombilicale humaine (Michiels *et al.*, 1992).

Dans ce modèle, les cellules endothéliales sont incubées en absence d'oxygène dans une enceinte où règne une atmosphère saturée en azote (100% d'azote). Ces incubations se déroulent à 37°C sur un agitateur mécanique. Le milieu qui baigne les cellules pendant ces

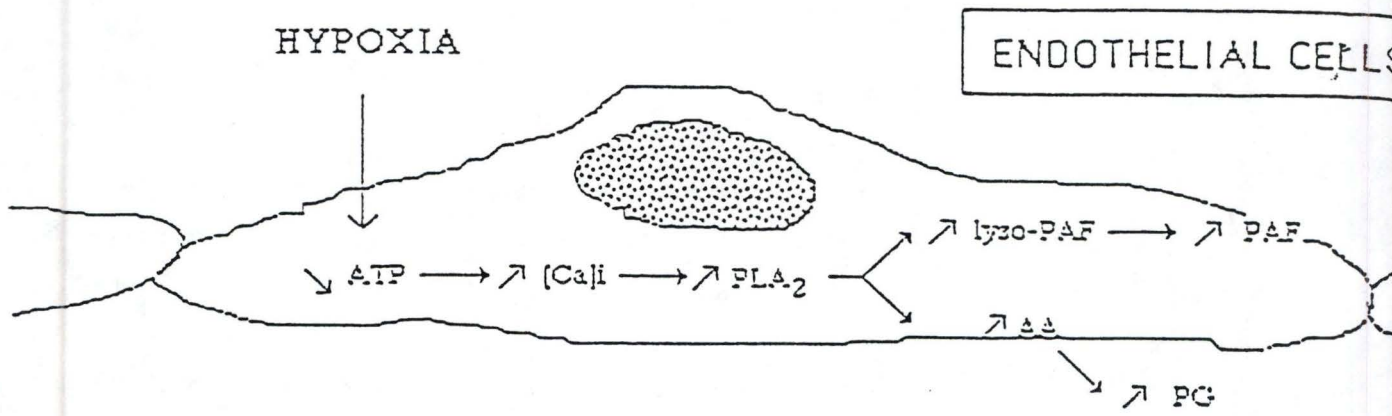


Figure II.2 : Effet de l'hypoxie sur la cellule endothéliale. ATP : adénosine triphosphate, [Ca²⁺] : concentration en calcium cytosolique, PAF : platelet-activating factor, AA : acide arachidonique, PG : prostaglandines.

incubations est une solution physiologique saline et tamponnée (Hank's Balanced Salt Solution : HBSS).

Les effets de la diminution de la pression partielle en oxygène sur le métabolisme des cellules endothéliales et ses répercussions sur la synthèse de certains médiateurs de l'inflammation ont été étudiés. C'est ainsi, qu'il a été montré que la première modification métabolique résultant de l'hypoxie était la diminution de la concentration en adénosine triphosphate (ATP) (Arnould *et al.*, 1992), conséquence de la diminution des phosphorylations oxydatives mitochondriales. Cette déplétion de l'adénosine triphosphate pourrait être responsable de l'augmentation de la concentration en calcium observée sous hypoxie.

Le calcium est un messager secondaire bien connu pour activer de nombreuses enzymes. Parmi celle-ci, on rencontre la phospholipase A₂. Elle est activée par l'hypoxie, ce qui a pour conséquence la formation du lyso platelet-activating factor et le relarguage de l'acide arachidonique. Ce dernier sert de substrat à la cyclooxygénase ce qui conduit à la synthèse de prostaglandines. (Figure II.2)

Ce modèle expérimental est cependant réductionniste puisque l'ischémie qui se produit *in vivo* dans les vaisseaux sanguins durant la stase veineuse occasionne une diminution de l'apport en oxygène et en nutriments aux tissus normalement irrigués et prévient l'élimination des déchets métaboliques et du gaz carbonique, alors que l'hypoxie réalisée *in vitro* n'entraîne qu'une diminution de la pression partielle en oxygène. Néanmoins, il reste intéressant puisqu'il va nous permettre d'explicitier la séquence des événements intracellulaires qui a lieu lors d'une ischémie.

II.3.1. Altérations du métabolisme énergétique

Il existe dans tous les tissus un équilibre finement régulé entre la production d'énergie et son utilisation. La première conséquence d'une ischémie est justement le déséquilibre de cette balance énergétique. Cela entraîne une diminution dramatique de la concentration en ATP.

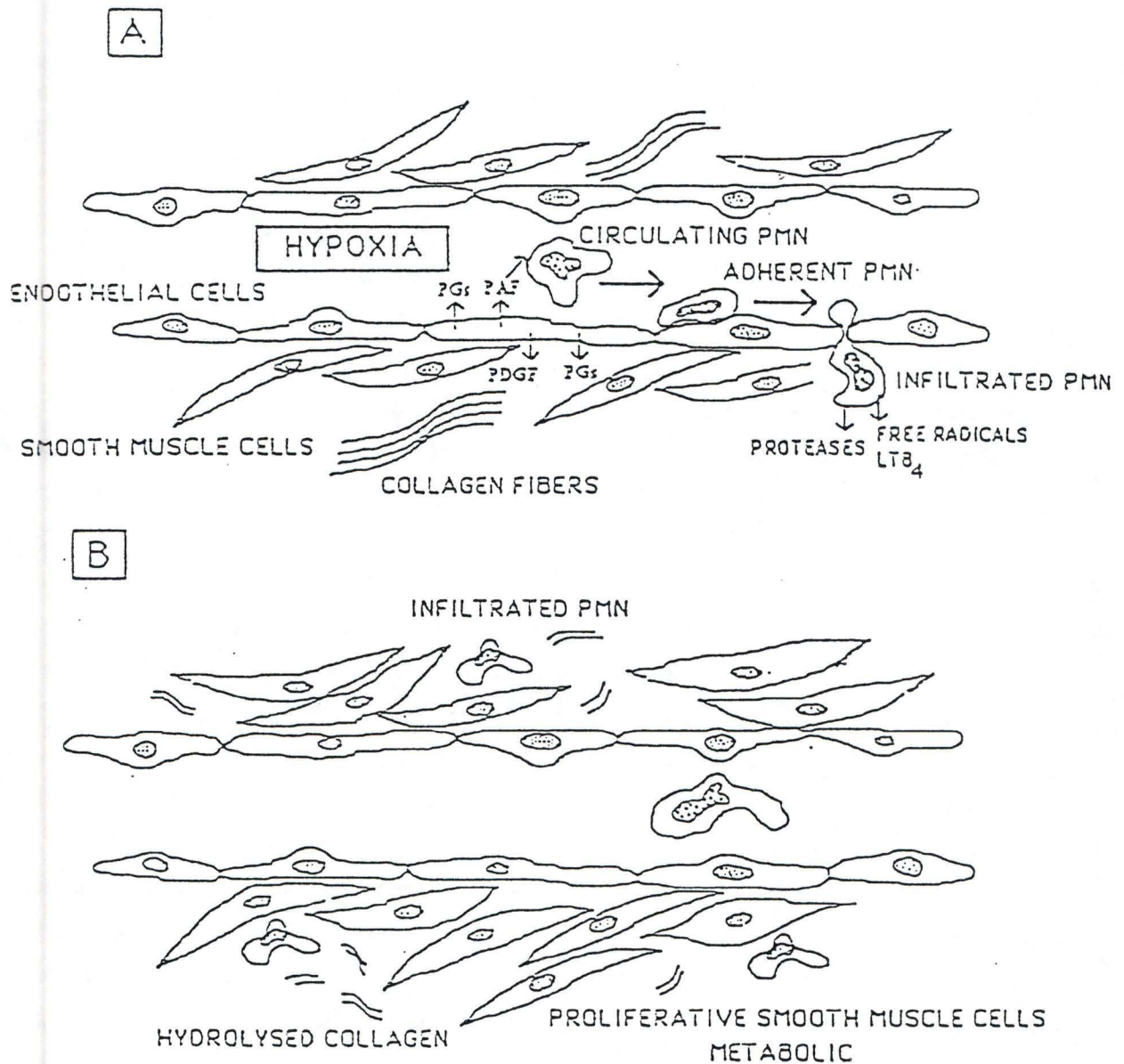


Figure II.3 : Présentation schématique des modifications apparaissant dans les cellules endothéliales mises sous hypoxie et influence de celles-ci sur les PMN et les cellules musculaires lisses. Ceci peut expliquer les altérations des parois des vaisseaux sanguins observées dans les veines variqueuses. PMN : polymorphonucléaire neutrophile, PAF : platelet-activating factor, LTB_4 : leucotriène B_4 , PDGF : platelet-derived growth factor, PGs : prostaglandines. A : effet de l'hypoxie sur le métabolisme des cellules endothéliales et interactions avec les PMN dans un capillaire. B : le même capillaire après l'infiltration des PMN, prolifération des cellules musculaires lisses et hydrolyse du collagène (D'après Michiels et al., 1993).

Les mitochondries sont au centre du métabolisme énergétique. C'est grâce à leurs chaînes respiratoires que la cellule peut récupérer autant d'énergie à partir d'une molécule de glucose.

L'effet de l'ischémie sur les mitochondries provoque des modifications structurales. La matrice mitochondriale se gonfle (Hill et La Via, 1980) probablement consécutivement à la perméabilisation de la membrane plasmique. Ces modifications sont réversibles au début de l'ischémie.

En effet, l'arrêt de la circulation sanguine provoque une diminution de l'apport en oxygène. Cette molécule étant utilisée comme accepteur final des électrons dans les phosphorylations oxydatives mitochondriales, elle est indispensable au métabolisme cellulaire. Trente-six molécules d'ATP, molécule énergétique utilisée par les cellules, sont obtenues en oxydant le glucose. Sans oxygène, les mitochondries subissent donc une baisse de régime.

Les cellules tentent alors de compenser ce manque d'énergie en augmentant la glycolyse, seul mécanisme énergétique fonctionnant sans apport d'oxygène. Cependant, celle-ci ne peut fournir que deux molécules d'ATP par molécule de glucose, soit dix-huit fois moins que pour les chaînes de phosphorylations oxydatives. Dans de telles conditions, la cellule ne peut générer suffisamment d'ATP pour une survie à long terme. Il faut cependant noter que cette diminution dans la production d'ATP est un phénomène réversible si la période d'hypoxie reste limitée dans le temps.

De plus, l'accélération de la glycolyse mène à l'accumulation de produits terminaux, et notamment du lactate (Janssens *et al.*, 1995). Cette accumulation concomitante à celle du phosphore inorganique et d'ions hydrogène, provoque une acidification du pH intra- et extracellulaire. Il faut noter que cette acidification semble bénéfique pour la cellule car elle semble inhiber les processus de dégradation activés par l'hypoxie.

II.3.2. Altérations membranaires (figure II.3)

En conditions normales, la membrane plasmique est modérément perméable à divers ions, tels que le Na^+ , le K^+ , le Ca^{++} , le Mg^{++} qui peuvent la traverser grâce à des canaux ioniques spécifiques. La cellule est capable, malgré ces flux constants, de maintenir

des concentrations intracellulaires en Na^+ et Ca^{++} inférieures à celle du milieu extérieur. Ceci est obtenu grâce à des pompes ATPasiques spécifiques à chaque ion (Piper, 1989; La Via, 1980). Ainsi par exemple, pour chaque molécule d'ATP hydrolysée, deux ions calcium sont expulsés.

En cas d'ischémie, l'ATP vient à manquer, le fonctionnement de ces pompes est alors perturbé, ce qui a pour conséquence des modifications de la concentration cytosolique de ces différents ions et notamment la concentration intracellulaire en calcium. L'accumulation des ions sodium et calcium à l'intérieur du cytoplasme entraîne une accumulation de Cl^- et de l'eau par osmose, conduisant à un gonflement des cellules. Ce phénomène leur donne un aspect de souffrance.

II.3.3. Les conséquences de l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire

L'ion calcium est un second messenger intracellulaire important. Il est un activateur potentiel de nombreuses enzymes, telles que la protéine kinase C et la phospholipase A_2 impliquée dans la réponse des cellules à une stimulation induite par un agoniste.

Le calcium présent en grande quantité dans les cellules suite à l'hypoxie peut donc aussi servir de second messenger pour induire différentes réponses telles que la synthèse de médiateurs de l'inflammation.

En effet, suite à l'augmentation de la concentration en calcium induite par l'hypoxie dans les cellules endothéliales, il a été observé que la phospholipase A_2 était fortement activée (Michiels *et al.*, 1993b) ce qui amène à la libération d'acide arachidonique clivé de la position sn-2 des phospholipides de la membrane plasmique. Cet acide arachidonique libéré peut être métabolisé dans les cellules endothéliales par la cyclooxygénase qui génère différents types de prostaglandines. Les prostaglandines synthétisées par les cellules endothéliales sont les PGE_2 , PGD_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ et PGI_2 .

Ces prostaglandines sont des molécules pléiotropiques qui exercent de nombreuses fonctions physiologiques dans l'organisme et dont les effets sont antagonistes en fonction de la localisation tissulaire, de leur production, du type de prostaglandines et de leur concentration. Rappelons simplement les effets anti-thrombogènes et vasodilatateurs de la

PGI₂ (Stern *et al.*, 1991), les effets vasodilatateurs des PGE₂ et PGD₂ qui augmentent la perméabilité vasculaire, ce qui mène à un oedème et provoque la souffrance. La PGF_{2α} et la PGH₂ ont quant à elles des effets vasoconstricteurs (Muramatsu *et al.*, 1992). Les effets antagonistes des prostaglandines concernent surtout la contraction vasculaire et la relaxation. Elles interagissent en effet avec différents types cellulaires et entre autre avec les cellules musculaires lisses de la média.

L'activation importante de la phospholipase A₂ suite à l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire conduit également à la synthèse de lyso-platelet-activating factor qui peut être transformé en platelet activating factor (PAF) via l'influence d'une acétyl transférase et de l'acétyl coenzyme A.

Arnould *et al.* (1993) ont observé que l'adhérence des polymorphonucléaires neutrophiles humains non stimulés aux cellules endothéliales, bien que très faible en conditions normales, augmente si les cellules endothéliales ont été préalablement incubées en hypoxie, et ce, d'autant plus que l'incubation sous hypoxie est longue. Les expériences réalisées pour tenter d'inhiber l'augmentation de l'adhérence à l'aide d'antagonistes du PAF, d'un inhibiteur de sa synthèse et de différents anticorps monoclonaux dirigés contre les molécules d'adhérence, ont permis aux chercheurs de montrer que des mécanismes différents sont engagés après 90 et 120 minutes d'hypoxie en fonction ou non de la présence de PAF à la surface des cellules endothéliales. Après une incubation de 90 minutes sous hypoxie, cette adhérence apparaît médiée directement par le PAF présent à la surface des cellules par une interaction avec son récepteur exprimé par les polymorphonucléaires neutrophiles. L'activation s'ensuit se traduisant par une augmentation fonctionnelle des intégrines CD11b/CD18 capables d'interagir avec les molécules ICAM-1 exprimées constitutivement par les cellules endothéliales.

Après 120 minutes d'hypoxie, le PAF, qui n'est plus présent, pourrait s'être comporté comme un messenger secondaire pour initier un autre mécanisme ou, comme médiateur ayant les mêmes effets que celui-ci sur l'adhérence des polymorphonucléaires neutrophiles. En effet, l'acide oléique qui inhibe la synthèse de PAF et les anticorps anti-CD11b, CD18 et anti-ICAM-1 inhibent encore l'adhérence après 120 minutes. L'équipe n'est cependant pas parvenue à préciser le mécanisme impliqué dans ce cas.

En effet donc, les tissus ischémiés et reperfusés présentent un certain nombre de caractéristiques typiques d'une réaction inflammatoire où les granulocytes et plus

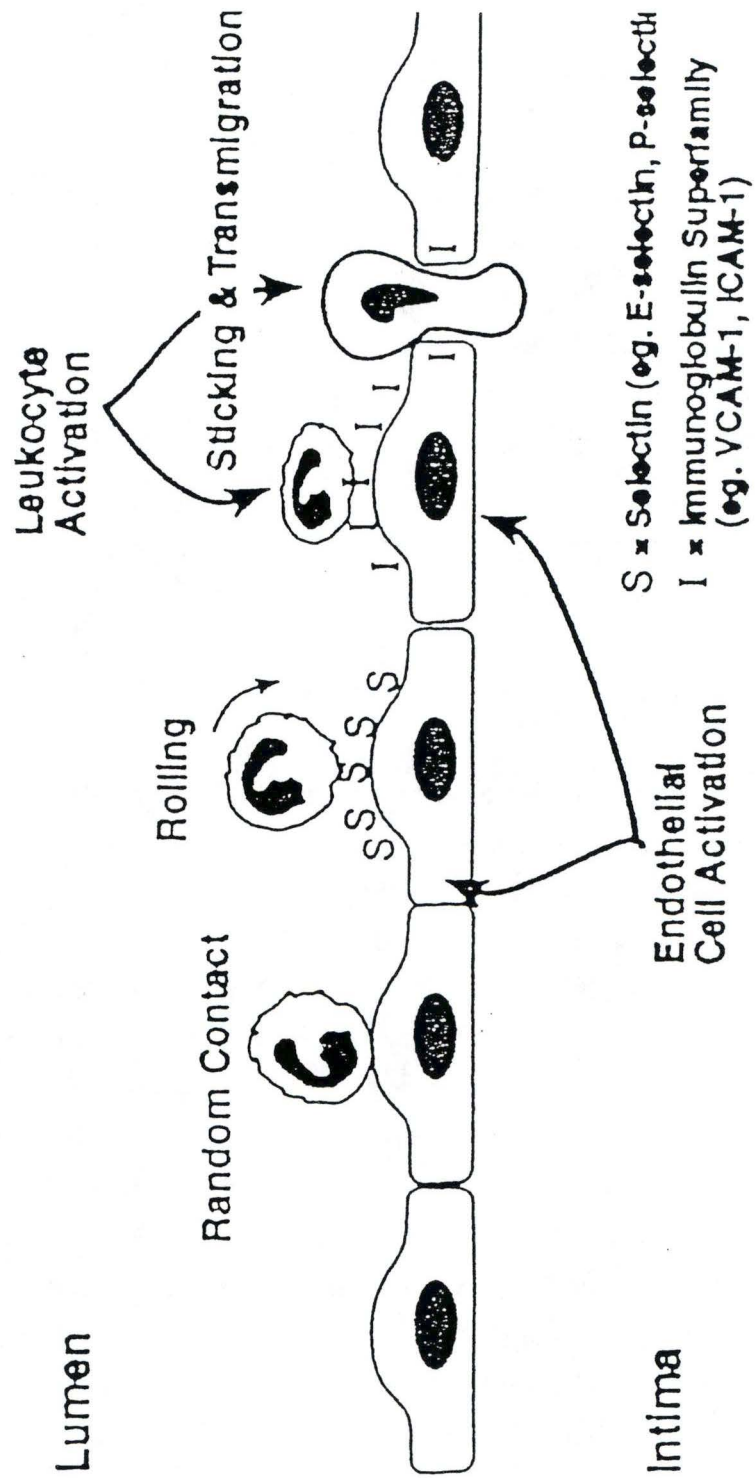


Figure II.4 : Mécanisme d'adhérence et d'infiltration des polymorphonucléaires neutrophiles (D'après O'Brien, 1994).

particulièrement les polymorphonucléaires neutrophiles sont les premières cellules à être recrutées.

Dans une réaction inflammatoire la présence de nombreux effecteurs moléculaires comme les cytokines et les médiateurs lipidiques conduit à l'infiltration des leucocytes par un processus dynamique qui nécessite plusieurs phases (Butche, 1991) (figure II.4).

La première étape de ce phénomène est la marginalisation des neutrophiles (adhérence des neutrophiles à l'endothélium) qui quittent le courant central des cellules circulantes et roulent le long de l'endothélium des veines via le jeu des récepteurs-contre-récepteurs. Cette adhérence initiale est transitoire et réversible, permettant aux leucocytes de retourner dans la circulation. Cette étape est capitale car elle est indispensable à l'activation et l'infiltration subséquente des polymorphonucléaires neutrophiles.

Le second événement consiste en l'activation des neutrophiles par les facteurs chimotactiques.

La diapédèse est le processus qui assure le transfert des neutrophiles séquestrés du compartiment vasculaire au tissu interstitiel par un passage transendothélial. Suite à l'adhérence, les granulocytes émettent des pseudopodes, s'aplatissent et s'infiltrant dans l'interstice au niveau des jonctions interendothéliales. Ce processus est dirigé par un gradient de facteurs chimotactiques (Anderson *et al.*, 1991). Les neutrophiles sont particulièrement sensibles à ces signaux puisqu'une différence de concentration en facteurs chimotactiques aussi faible que 0,1% entre les 2 pôles cellulaires est suffisante pour induire la migration.

La transmigraton se poursuit par l'allongement et la ramification du pseudopode jusqu'à ce que le corps cellulaire en entier soit infiltré (Lawrence et Springer, 1991). Le passage est rapide et résulte de changements dans l'expression des molécules d'adhérence des granulocytes qui réduisent leur adhérence à l'endothélium et se lient aux composants de la membrane basale. De plus, la libération de protéases dégradant les constituants de la membrane faciliterait l'infiltration dans les tissus.

Lors de ce processus, les polymorphonucléaires neutrophiles sont stimulés et peuvent relarguer diverses molécules activées telles que les radicaux libres, les protéases et des éicosanoïdes (Arnould *et al.* 1994b). Ces médiateurs, en conjonction avec ceux libérés par les cellules endothéliales, se retrouvent dans la paroi veineuse où ils peuvent induire

différents mécanismes qui pourraient expliquer les différentes altérations tissulaires observées dans les veines variqueuses.

En conclusion, les cellules endothéliales en réponse à un événement ischémique sont à l'origine de tout un processus, depuis l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire jusqu'au recrutement des neutrophiles et leur adhérence à l'endothélium vasculaire ainsi que leur migration transendothéliale. La perturbation initiale de l'endothélium pourrait donc contribuer à amplifier les altérations tissulaires résultant d'une période d'ischémie.

En plus de ces altérations, il nous faut aborder les modifications histologiques de la paroi veineuse qui surviennent lors du développement des varices.

A) Les modifications de l'intima :

Les modifications de la forme des cellules endothéliales associées aux modifications du noyau et aux altérations ultrastructurales des organites intracellulaires conduisent à penser qu'au cours du processus variqueux se produit un changement complexe de la structure intime et de la fonction de la cellule endothéliale. La physiologie endothéliale se révèle affectée : augmentation de l'activité procoagulante, réduction de l'activité anticoagulante et fibrinolytique. Les modifications de la vasomotricité pourraient présenter une origine endothéliale par altération de la libération des facteurs relaxants ou constricteurs (Barbier *et al.*, 1994).

Un épaissement intimal est observé par accentuation progressive du collagène de type I, accumulation de fibronectine et de myocytes. Des facteurs de croissance d'origine endothéliale interviendraient dans la constitution de cet épaissement (Barbier *et al.*, 1994).

B) Les modifications de la média :

Les modifications sont nombreuses à ce niveau et concernent d'abord les cellules musculaires lisses et, consécutivement, la matrice extracellulaire. Deux phénomènes majeurs sont observés : une hypertrophie des cellules musculaires lisses vraisemblablement consécutive à l'hyperpression et une modification du phénotype de certaines cellules dont la cause est discutée : hyperpression, stase, hypoxie ou turbulence du flux sanguin. Ces

cellules se transforment de myocytes contractiles en myocytes sécrétoires (Barbier *et al.*, 1994).

Dans l'insuffisance veineuse chronique, même si certains myocytes sont lésés, il persiste toujours des cellules musculaires lisses susceptibles de contracter la veine. Les altérations métaboliques du tissu conjonctif vont de pair avec la modification sécrétoire des myocytes.

En 1963, Svejcar décrivait une diminution du contenu collagénique de la paroi variqueuse par rapport à la paroi normale. Depuis, de nombreux travaux ont confirmé l'atteinte du collagène. D'importantes variations du calibre des fibres et une diminution ou une absence de périodicité caractéristique sont couramment observées dans la pathologie variqueuse (Barbier *et al.*, 1994).

Le tissu élastique variqueux présente des dystrophies : finesse et/ou épaissement continu ou discontinu; fragmentation des fibres et fibrilles. Ces modifications sont à rapprocher d'une augmentation de l'activité enzymatique de type élastase (Lengyel *et al.*, 1990).

Différents auteurs ont également observé une augmentation importante de protéoglycanes et des glycoprotéines de structure et de leurs métabolites dans l'insuffisance veineuse chronique, ce qui, à nouveau, témoigne de l'hyperactivité métabolique des myocytes sécrétoires.

C) Les modifications de l'adventice :

Lengyel et Acsady (1990) ont décrit un léger enrichissement en fibres de collagène dans l'adventice de tissus provenant de patients variqueux. Comme dans la média, les fibres élastiques de l'adventice des tissus pathologiques apparaissent fragmentées (Barbier *et al.*, 1994).

D) Conséquences de ces modifications :

Les myocytes jouent un rôle primordial dans le développement des altérations pariétales. L'hyperdistensibilité veineuse qui s'ensuit évolue vers une fibrose ou une sclérose localisée au niveau des varices. La perte d'élasticité tissulaire peut être aggravée par le dépôt

de calcium. L'hyperdistensibilité quant à elle paraît plus généralisée, se manifestant même aux endroits non variqueux (Barbier *et al.*, 1994).

Ces altérations pariétales retentissent directement ou indirectement sur l'insuffisance valvulaire en la majorant. Il s'ensuit une augmentation du reflux, de l'hyperpression veineuse et de la stase. Ces facteurs s'autoentretiennent dans une boucle d'amplification.

A partir des résultats expérimentaux décrits ci-dessus, une hypothèse concernant l'apparition des varices a été proposée. Cette hypothèse, bien que nécessitant confirmation, permet d'expliquer à partir des données expérimentales, les altérations de la paroi veineuse effectivement observées chez les patients.

II.4. Modèles expérimentaux et hypothèse expliquant l'apparition des varices

L'hypothèse proposée est la suivante : ce sont les modifications du métabolisme des cellules de la paroi veineuse, induites par l'ischémie résultant de la stase veineuse dans les membres inférieurs, qui initieraient une cascade d'événements conduisant finalement à la situation pathologique, c'est-à-dire à l'apparition des varices. Un mécanisme biochimique a été proposé par Michiels *et al.* (1994a et b) pour relier cette stase veineuse aux modifications tissulaires observées dans ces maladies. Ce lien a pour acteur principal la réaction de l'endothélium à l'hypoxie.

En 1995, après de nombreux autres travaux réalisés sur la veine ombilicale humaine (Arnould *et al.*, 1995), la même équipe a mis sur pied un autre modèle expérimental qui se rapproche plus de la situation physiopathologique réelle (Bouaziz, 1995). Ce modèle a tout son intérêt ici, puisqu'il utilise des fragments de veine saphène humaine.

Cette recherche a montré qu'en incubant ces fragments pendant des temps croissants sous hypoxie, l'adhérence des polymorphonucléaires neutrophiles non activés à l'endothélium des veines saphènes augmente considérablement, et ce, d'autant plus que le temps d'incubation en hypoxie est long. Quantitativement, l'adhérence induite par l'hypoxie est du même ordre de grandeur que celle induite par les cytokines telles que l'interleukine 1 β . Ce qui indique l'importance de l'activation des cellules endothéliales induite par l'hypoxie.

L'équipe a également montré que, l'adhérence des polymorphonucléaires neutrophiles à l'endothélium des veines saphènes pré-incubées en hypoxie est considérablement inhibée par les antagonistes du récepteur au PAF, par l'acide oléique inhibiteur de la synthèse de ce médiateur et par l'anticorps monoclonal anti-ICAM-1.

En comparaison avec les travaux réalisés au laboratoire sur la veine ombilicale complète et sur les cellules endothéliales isolées, ces résultats montrent que le même mécanisme biochimique est mis en jeu dans les trois modèles expérimentaux, c'est-à-dire que le PAF joue un rôle important dans l'initiation de l'adhérence des polymorphonucléaires neutrophiles aux cellules endothéliales qui se renforce alors via la liaison de leurs intégrines CD11b/CD18 aux molécules d'ICAM-1 exprimées à la surface des cellules endothéliales.

Grâce à des études morphologiques, Bouaziz (1995) a constaté que les neutrophiles adhérents à l'endothélium des veines saphènes préalablement incubées en hypoxie, montrent une surface rugueuse caractérisée par la présence de nombreux replis membranaires qui témoignent de leur état activé.

L'adhérence des neutrophiles à l'endothélium de veines saphènes hypoxiques, leur activation avec libération de radicaux libres et de médiateurs de l'inflammation, leur éventuelle infiltration subséquente miment probablement très bien ce qui se passe *in vivo* lors de la stase veineuse conduisant ainsi aux agressions pariétales qui à force d'être répétées, vont conduire à la destruction de certains constituants de la matrice extracellulaire comme le collagène et à l'épaississement de la paroi des veines variqueuses.

Au vu de ces informations, on peut conclure que d'un point de vue tissulaire et cellulaire, tous les éléments de la paroi vasculaire subissent des modifications. Ces dernières sont dues à une suite d'événements provenant d'interactions entre les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses.

On peut donc observer quatre grandes modifications dans les veines variqueuses, les voici décrites une par une :

a) L'endothélium est conservé

Dans la paroi des veines variqueuses, l'endothélium est toujours présent même si d'autres types cellulaires comme les cellules musculaires lisses subissent de profonds changements.

In vitro, expérimentalement, il a été montré que l'hypoxie, mimant l'ischémie résultant d'une stase veineuse, induit effectivement des changements métaboliques importants au sein des cellules endothéliales sans induire de mortalité. Suite à l'hypoxie, les cellules endothéliales sont activées et relarguent des médiateurs de l'inflammation et des facteurs de croissance influençant les cellules musculaires lisses. Cependant, la viabilité cellulaire est conservée. Ainsi, l'hypoxie permet d'expliquer le recrutement des neutrophiles et la prolifération des cellules musculaires lisses alors que la barrière endothéliale reste intacte. Tout ceci provoquera un remaniement de la paroi vasculaire.

b) Présence d'enzymes lysosomales et de radicaux libres

Une grande quantité d'enzymes lysosomales (Niebes, 1990) est retrouvée dans les couches cellulaires sous-endothéliales de la paroi vasculaire. Elles sont relarguées par les neutrophiles activés.

Le modèle expérimental du laboratoire montre que les neutrophiles adhèrent à l'endothélium activé par l'hypoxie. Lors de ce processus, les neutrophiles sont activés, comme nous l'avons déjà vu précédemment, et relarguent différents médiateurs de l'inflammation tels que des radicaux libres et des protéases. Ceci peut donc expliquer la présence d'enzymes lysosomales dans la paroi vasculaire.

c) Modification du collagène

Les molécules de collagène et les protéoglycanes sont altérés dans la paroi des veines variqueuses. On constate notamment une augmentation de la quantité de collagène soluble.

Les radicaux libres sont connus pour être capables de fragmenter le collagène et les protéoglycanes. Ils sont, comme diverses protéases, relargués par les neutrophiles activés.

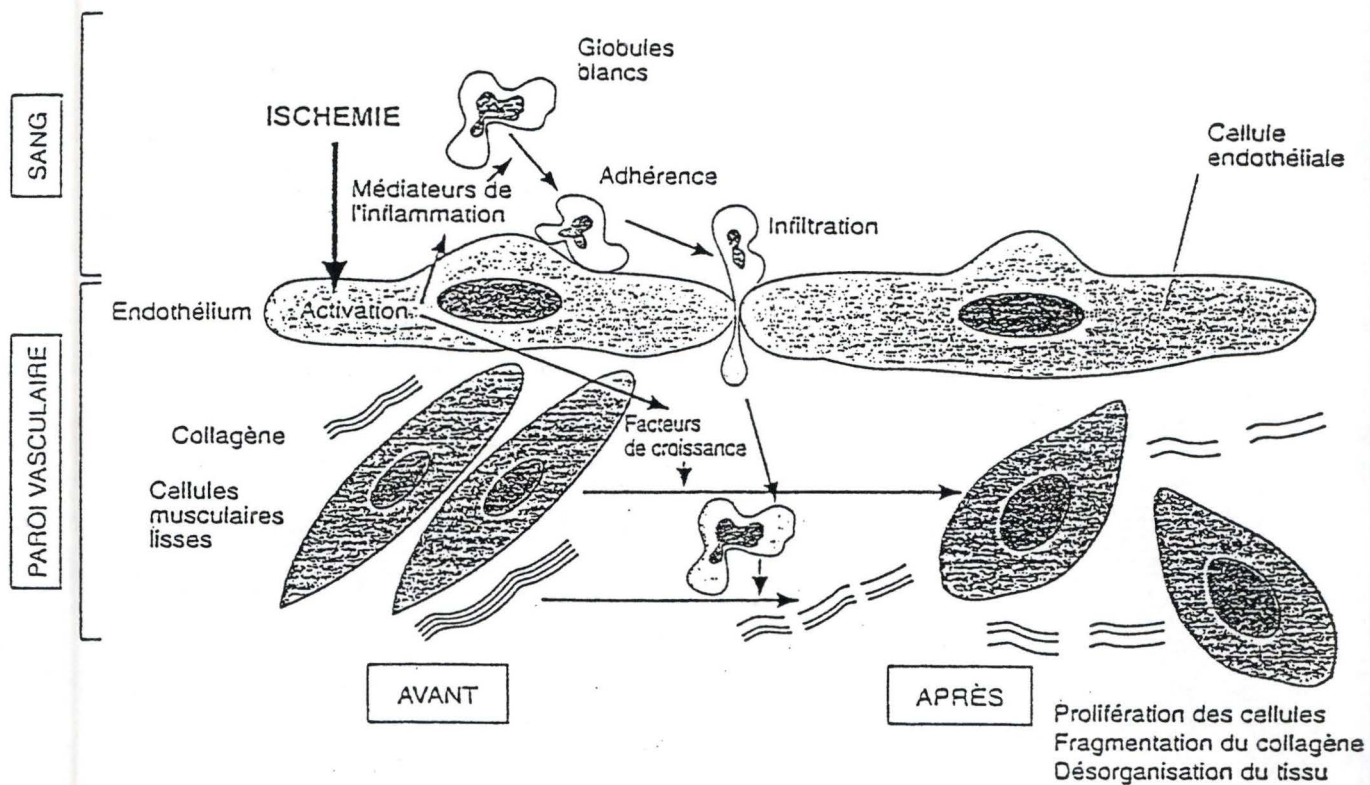


Figure II.5 : Désorganisation d'une veine soumise à l'ischémie. L'activation des cellules endothéliales et leurs interactions avec les PMN entraîne une désorganisation et une altération de la paroi vasculaire caractérisée par une prolifération des cellules musculaires lisses qui perdent leur propriétés contractiles et par des altérations de la matrice extracellulaire (collagène et protéoglycanes) sous l'effet des anions superoxydes et des protéases (D'après Michiels et al., 1994).

Ces deux types de molécules peuvent agir de façon synergique et pourraient donc être responsables de l'hydrolyse partielle du collagène observée dans les veines pathologiques.

d) Désorganisation de la paroi vasculaire

Un épaissement et une désorganisation de la paroi veineuse sont aussi les caractéristiques typiques des veines variqueuses. Elles sont explicables par la prolifération des cellules musculaires lisses observée *in vitro*. Ces cellules constituent alors le type cellulaire majeur de l'intima. Il a été montré, *in vitro*, que cette prolifération peut être induite par diverses molécules relarguées par les cellules endothéliales activées par l'hypoxie. De plus, dans les veines malades, les cellules musculaires lisses passent d'un état contractile caractérisé par une abondance de filaments du cytosquelette et une faible proportion de réticulum endoplasmique, à un état synthétique dans lequel les cellules musculaires lisses possèdent un réticulum endoplasmique bien développé, sécrètent plus de matrice extracellulaire et notamment plus de collagène, sont prolifératives et perdent l'expression de la myosine et de l' α -actine. Cette modulation phénotypique pourrait également être le résultat de l'action des médiateurs relargués par les cellules endothéliales activées par l'hypoxie.

Ces changements fonctionnels chez les cellules musculaires lisses entraînent des modifications quantitatives et qualitatives dans la synthèse des protéines du tissu conjonctif. L'épaississement de l'intima est dû à une accumulation de matrice extracellulaire ainsi qu'à une migration et une prolifération des cellules musculaires lisses (Ross, 1981).

La prolifération des cellules musculaires lisses, ainsi que leur capacité accrue de synthèse des composés de la matrice extracellulaire peuvent donc facilement rendre compte de l'épaississement de la paroi veineuse pathologique.

Tout ceci explique la désorganisation observée dans les veines variqueuses. Cette désorganisation du tissu conjonctif et la perte de la contractibilité des cellules musculaires lisses conduisent également à des altérations du tonus vasculaire.

En conclusion, on remarque que l'activation des cellules endothéliales après ischémie est le facteur initial de la maladie veineuse. L'endothélium paraît jouer un rôle important dans le remaniement vasculaire, en produisant des médiateurs qui modifient la structure des veines en interagissant avec les cellules musculaires lisses. (figure II.5).

III. But du mémoire

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 de la paroi veineuse. Si lors d'une hypoxie, l'endothélium reste intact, de nombreuses altérations de leur métabolisme ont lieu. Ces altérations conduisent ces cellules à libérer différents médiateurs. Ces médiateurs initient une cascade d'événements faisant intervenir plusieurs types cellulaires et qui conduit finalement à des modifications profondes de la paroi veineuse.

La modélisation de tels phénomènes paraît des plus importantes afin d'étudier l'évolution exacte des perturbations endothéliales dues à l'hypoxie et des modifications structurelles et fonctionnelles subséquentes de la paroi veineuse. Dans une telle approche, il est indispensable d'étudier le comportement des territoires directement concernés dans la pathologie variqueuse, car les cellules endothéliales ont des sensibilités variables vis-à-vis de l'hypoxie selon leur territoire d'origine.

Le but de ce mémoire est donc la mise au point d'un modèle expérimental permettant de suivre à long terme l'évolution de la structure des constituants de la paroi vasculaire. Ce modèle est celui de l'organoculture de veines saphènes humaines. Il permet de simuler des conditions très proches de la réalité puisque la veine saphène est la plus impliquée dans la pathologie des veines variqueuses. De plus, on travaille avec l'entièreté de l'organe et sur une période de quatorze jours. Ce qui signifie que l'on va pouvoir suivre l'évolution des différents types tissulaires les uns par rapport aux autres et ce pendant deux semaines.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons utilisé ce modèle expérimental afin d'étudier l'effet d'une incubation brève sous hypoxie, incubation qui mime la stase veineuse observée *in vivo*.

Chapitre II Matériel et Méthode

I. Organoculture de veines saphènes humaines.

I.1. Mise en culture (Soyombo *et al.*, 1990; Pederson *et al.*, 1985)

La mise en culture des morceaux de veines saphènes se fait sous hotte à flux laminaire. Le matériel utilisé est soit stérilisé (6 heures à 180 °C, stérilisateur) soit autoclavé (20 minutes à 120 °C).

Les milieux de culture utilisés sont quant à eux stérilisés par filtration sur filtre Sartorius Minisart 0,20 µm (Sartorius AG, Göttingen, Allemagne).

Toutes les solutions utilisées sont stériles et préalablement chauffées à 37 °C.

Les veines saphènes proviennent de la clinique Sainte Elisabeth ou du Centre Hospitalier Régional. Nous les récupérons suite à un stripping des varices.

I.1.1. Matériel et solutions

1- Solution de récolte des veines saphènes : milieu de culture RPMI 1640 (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne) à pH 7,36 auquel sont ajoutés des antibiotiques et de la fungizone.

Ce milieu se compose :

- de sels inorganiques
- de D-glucose : 200 mg par litre
- de glutathion : 1 mg par litre
- d'acides aminés
- streptomycine : 100 µg par millilitre (Sigma, Saint Louis, U.S.A.)
- pénicilline : 100 unités par millilitre (Sigma, Saint Louis, U.S.A.)

- fungizone (amphotéricine B) : 0,25 µg par millilitre (Sigma, Saint Louis, U.S.A.)

2- Solution de rinçage et de dissection des veines saphènes : milieu de culture RPMI 1640 (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne) à pH 7,36 et tamponné avec de l'Hépes 10 mM (Janssen Chimica, Beerse, Belgique). Ce milieu est également supplémenté avec des antibiotiques et de la fungizone. Leur concentration est identique à celle de la solution de récolte. On additionne à ce milieu de rinçage de la glutamine (Sigma, Saint Louis, U.S.A.) qui constitue un substrat énergétique pour les cellules. Sa concentration finale est de 200 mM.

3- Milieu de culture des veines saphènes : milieu RPMI 1640 (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne) à pH 7,36 dans lequel on retrouve également des antibiotiques, de la fungizone et de la glutamine dans des concentrations identiques à celles du milieu de dissection. Il contient cependant 30 % de sérum de veau fœtal.

4- Pots en plastique stérilisés à l'alcool dénaturé. Ces pots vont servir à récolter et transporter les veines saphènes.

5- Boîtes de Pétri en verre pouvant être autoclavées. Le fond de ces boîtes est recouvert d'un à deux millilitres de Silicone Elastomer. Ce silicone est lui aussi autoclavable et il permet de piquer des aiguilles dans la boîte de Pétri. Ce silicone provient d'un kit Syligard 182, Silicone Elastomer (Dow Corning GmbH, Wiesbaden, Allemagne).

6- Matériel de dissection : pinces, ciseaux, lames de scalpel.

7- Gaze en laine de polyester et micro aiguilles en acier inoxydable.

I.1.2. Mode opératoire

◆ Récolte des prélèvements

Les veines saphènes que nous utilisons proviennent du stripping des varices. Cette opération est pratiquée pour soulager les patients atteints d'insuffisance veineuse chronique ou de peau ulcérée.



Figure 1 : Photo représentant un morceau de veine saphène tel qu'on la reçoit c'est-à-dire non disséquée et possédant encore son adventice. Sur la photo, on observe très bien l'adventice. Elle correspond au voile qui entoure la veine.

L'intervention débute par une incision au niveau de l'aîne. La veine saphène interne est alors pincée et sectionnée, les deux bouts sont ligaturés et les quatre collatérales sont elles aussi coupées et ligaturées.

Un trou pratiqué dans le haut de la veine permet ensuite d'y enfoncer un fil flexible jusqu'au mollet ou à la cheville où il ressort par une petite incision. L'extrémité supérieure du fil est munie d'une tête de métal au-dessous de laquelle la veine se trouve solidement ligaturée. Lorsque cette étape est réalisée, l'incision de l'aîne est suturée et la veine est enlevée par l'incision inférieure. Le vaisseau sort enfin en se retournant en doigt de gant, ses branches sont arrachées mais le saignement est peu important.

Immédiatement après son retrait du milieu physiologique, la veine est placée dans un pot en plastique stérile contenant 60 ml de milieu de récolte. A partir de là, le prélèvement est maintenu à température ambiante.

Notons que les pots ont été portés à la clinique antérieurement à l'opération et qu'il a été demandé aux infirmières du bloc opératoire de les maintenir à 4 °C jusqu'au moment de l'intervention chirurgicale.

◆ Dissection

a) Principe

Le but de la dissection est de limiter l'épaisseur de la paroi veineuse car cette épaisseur représente le facteur limitant pour l'organoculture. En effet, si la paroi vasculaire est trop épaisse, les cellules qui y sont présentes ne seront ni oxygénées, ni nourries de façon correcte. Elles auront donc tendance à se nécroser.

b) Méthode

Au maximum une heure après son prélèvement, la veine est retirée du milieu de récolte et placée dans une boîte de Pétri autoclavée, contenant du milieu de rinçage stérile et préalablement chauffé à 37° C (figure 1). C'est dans ce milieu que la dissection va être réalisée. Elle comprend trois étapes :



Figure 2 : Photo représentant la veine saphène après le retrait de l'adventice.



Figure 3 : Photo représentant la veine ouverte longitudinalement.



Figure 4 : Photo représentant les morceaux de veines saphènes d'environ 1 cm^2 . Ces morceaux sont prêts pour la mise en culture ou les incubations sous hypoxie.

1- Retrait de la graisse et de l'adventice (figure 2)

Cette étape est primordiale afin de limiter au maximum l'épaisseur de la paroi veineuse.

Il est important de ne pas abîmer la média afin de préserver au maximum l'intégrité de cette couche de la paroi veineuse et d'éviter les mécanismes de cicatrisation qui interféreraient avec les phénomènes que l'on désire observer.

2- Ouverture longitudinale de la veine (figure 3)

Cette étape consiste à ouvrir la veine en la coupant longitudinalement avec une paire de ciseaux. Pendant cette étape, il faut éviter d'erafler, avec la pointe des ciseaux, l'endothélium qui se trouve en face de l'incision.

De plus, il faut faire extrêmement attention à ne pas tirer de façon trop brutale sur la paroi veineuse car les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales peuvent être stimulées par les forces d'extension ou même être endommagées (rupture des jonctions cellulaires, distension des cellules musculaires, ...).

Au terme de cette manipulation, nous nous retrouvons avec un rectangle qui correspond à la veine ouverte.

3- Découpe de carrés de veine d'environ 1 cm² (figure 4)

La veine est ensuite transférée dans une seconde boîte de Pétri contenant du milieu de rinçage propre.

Il faut veiller à garder l'endothélium dirigé vers le haut lorsqu'on transfère la veine d'une boîte à l'autre.

On coupe alors, avec une lame de scalpel, des morceaux de veine d'environ 0,8 cm de côté. La coupure est réalisée perpendiculairement au trajet du flux sanguin et de façon nette.

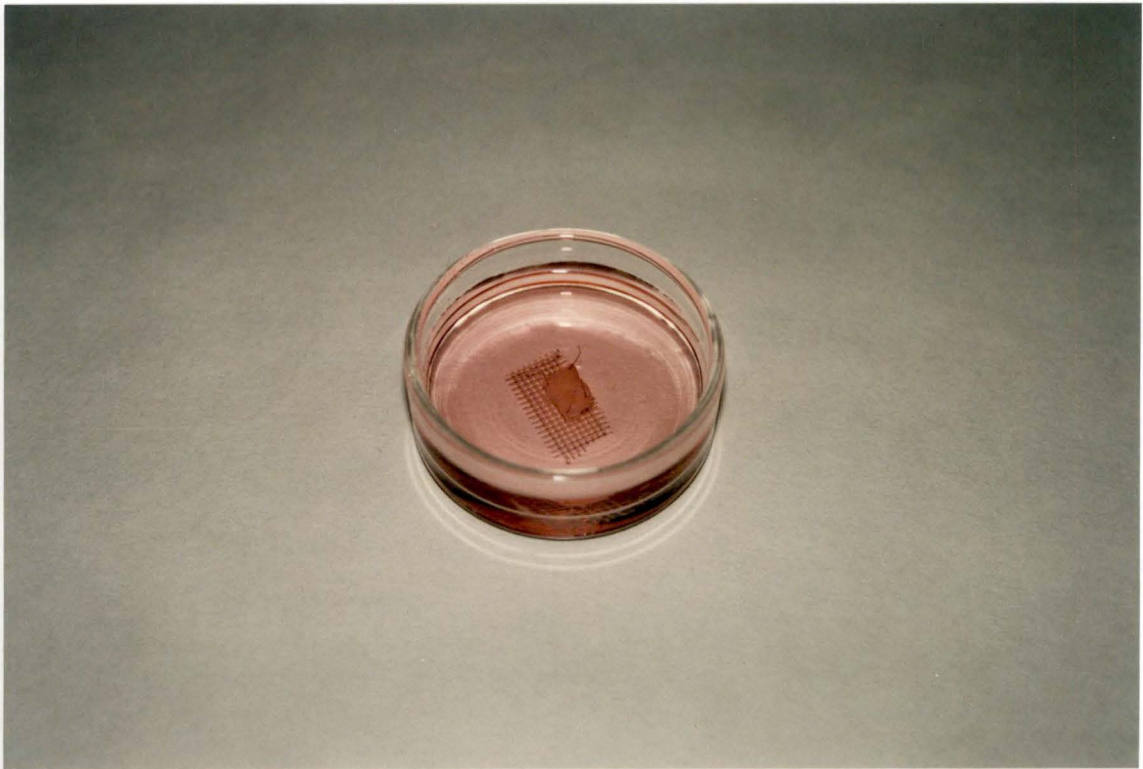


Figure 5 : Cette photo permet de visualiser la boîte de Pétri en verre dans laquelle l'organoculture se déroule.

Sur cette photo, on peut voir les micro aiguilles en acier inoxydable ainsi que le morceau de gaze en laine de polyester.

I.1.3. Mise en culture proprement dite (figure 5)

Grâce à la mise en culture des morceaux de veine saphène, nous allons pouvoir suivre le comportement de l'endothélium et des cellules musculaires lisses durant quatorze jours de culture. Cette évolution sera étudiée au niveau histologique via la microscopie électronique à balayage, la microscopie optique et les autoradiographies.

L'aspect biochimique sera lui aussi abordé dans le but de vérifier la viabilité de l'organoculture ainsi que la prolifération cellulaire. Pour ce faire des dosages d'ATP et d'ADN seront respectivement réalisés

◆ Mode opératoire

A la fin de la dissection, nous nous retrouvons avec des morceaux de veine dont la surface est approximativement d'1 cm². Ces morceaux vont délicatement être placés dans une boîte de Pétri en verre contenant 6 à 8 ml de milieu de culture (RPMI 1640 plus antibiotiques, fungizone, glutamine et 30% de sérum de veau foetal). Le fond de ces boîtes est recouvert de silicone.

L'échantillon n'est cependant pas directement posé sur le silicone. En effet, si c'était le cas, la partie en contact étroit avec le fond de la boîte de Pétri ne serait ni oxygénée, ni nourrie ce qui engendrerait une nécrose tissulaire. Pour éviter ce problème, nous plaçons entre le morceau de veine et le silicone, un petit bout de gaze en laine de polyester. Ce dernier permet au milieu de culture d'oxygéner et de nourrir les cellules musculaires lisses de la face inférieure du morceau de veine.

Pour éviter que le morceau de veine ne flotte à la surface du milieu de culture, il faut le maintenir dans le fond de la boîte de Pétri. A cette fin, nous utilisons quatre micro aiguilles que nous plantons au travers des quatre coins du morceau de veine, dans le silicone de la boîte de Pétri.

L'organoculture est maintenue pendant quatorze jours de culture et le milieu de culture est changé toutes les 48 à 72 heures.

Au cours de ces manipulations, trois précautions sont à prendre afin d'obtenir un échantillon correct :

- Tout d'abord, lors du transfert depuis le milieu de rinçage (dissection) vers le milieu de culture; il faut, avec la pince, prendre le morceau de veine le plus près possible du bord afin de ne pas endommager l'endothélium central.

- Ensuite, il faut s'assurer, lorsqu'on pose le morceau de veine sur la gaze que l'endothélium est bien dirigé vers le haut.

- Finalement, à aucun moment, le morceau ne doit sécher. C'est pourquoi, il est préférable de mettre d'abord le milieu de culture dans la boîte de Pétri avant d'y placer le morceau de veine.

La mise en culture se fait selon un schéma d'expérience bien précis. Ceci permet d'observer de façon régulière l'endothélium, les cellules musculaires lisses, la viabilité et la prolifération cellulaire de l'organoculture.

Voici, expliqué de façon plus détaillée, le planning expérimental :

Une expérience nécessite 8 morceaux de veine :

Deux morceaux sont récupérés, après dissection, au jour 0 de la culture. Ce jour correspond au jour de réception de la veine. Un de ces morceaux est placé dans une fiole préalablement refroidie dans l'azote liquide. Il sera ensuite conservé à - 70 °C en vue de réaliser les dosages biochimiques cités ci-dessus.

L'autre morceau sera placé soit dans la glutaraldéhyde 2% (glutaraldéhyde (Fluka Chemie AG CH, 9470 Buchs) à 25% diluée dans du tampon cacodylate 0,1 M à pH 7,4) ou soit dans le liquide de Bouin selon que l'on désire réaliser de la microscopie électronique à balayage ou de la microscopie optique.

Les six autres morceaux sont, après dissection, mis en culture comme expliqué précédemment.

- Au jour 3 de la culture, un morceau est arrêté, placé dans une fiole refroidie dans l'azote liquide et conservé à - 70 °C pour les dosages biochimiques.

- Au septième jour de culture, deux autres morceaux sont arrêtés. Un de ceux-ci est utilisé pour les tests biochimiques, c'est pourquoi il est conservé à - 70 °C. Tandis que le second sera placé dans le liquide fixateur pour la microscopie optique ou électronique.

- Au dixième jour, on arrête encore un morceau. Il se verra attribuer le même traitement que celui subit par le morceau du jour 3.

- Au dernier jour de culture, c'est-à-dire le quatorzième, les deux morceaux restant subissent le même sort que celui réservé aux morceaux du jour 7.

Ce schéma expérimental est repris pour étudier l'effet de deux facteurs de croissance sur la prolifération des cellules musculaires lisses et cellules endothéliales. Ces deux facteurs de croissance sont la $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Sigma, Saint Louis, U.S.A.) et le b FGF (R & D Systems, Grande Bretagne).

Leur effet va être étudié individuellement, c'est pourquoi, ils sont ajoutés de façon séparée au milieu de culture à des concentrations finales qui sont respectivement de $3,63 \cdot 10^{-9}$ M et de 5 ng/ml. Ceci a été réalisé au cours de deux expériences différentes.

En plus de ces facteurs de croissance, le milieu de culture est supplémenté, pendant les quatorze jours de mise en culture, avec de la méthyl-thymidine tritiée (Du pont NEN products, Boston, U.S.A.). Cette dernière se trouve à une concentration finale de 1 μ Ci/ml. La thymidine est incorporée par les cellules en prolifération, ce qui permet via les autoradiographies de localiser les foyers de prolifération cellulaire. De plus, un comptage en radioactivité sera également effectué afin de quantifier l'incorporation totale de méthyl-thymidine tritiée.

II. Etudes biochimiques

II.1. Préparation de la poudre de veine

II.1.1. Principe

Le but de cette manipulation est d'homogénéiser les morceaux de veines saphènes. Cependant cette homogénéisation ne peut pas être réalisée par les techniques courantes telles que le Dounce ou les tampons de lyse car les morceaux de veines sont trop fibreux. Ils sont donc congelés à - 70 °C avant d'être pillés et réduits en poudre à cette température.

II.1.2. Matériel et solutions

- 1- Acide perchlorique à 5% : cet acide est préparé par dilution, dans l'eau, de l'acide perchlorique à 70-72% (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- 2- Trichloro-1,1,2-trifluoroéthane (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- 3- Tri-n-octylamine (Sigma Chemical Co, Saint Louis, U.S.A.)
- 4- Dounce
- 5- Pinces, spatule et microtubes
- 6- Centrifugeuse Biofuge 17RS (Heraeus Sepatech)

II.1.3. Mode opératoire

La fiole contenant le premier morceau de veine est sortie de l'azote liquide. Elle est pesée de suite. Le morceau qu'elle contient est ensuite placé dans un Dounce préalablement refroidi à l'azote liquide et la fiole est enfin repesée. Cette pesée nous permettra de connaître le poids initial du morceau de veine.

L'échantillon qui se trouve dans le Dounce est alors homogénéisé en une poudre très fine. L'obtention de cette poudre est possible du fait que le Dounce est continuellement refroidi dans l'azote liquide durant la période d'homogénéisation.

Une fois cette étape réalisée, la poudre de veine est récupérée avec une spatule qui est aussi refroidie dans l'azote liquide avant d'être placée dans un microtube pré-pesé contenant 1,2 ml d'acide perchlorique 5%.

Le microtube est alors repesé pour connaître la quantité de poudre réellement récupérée. Les microtubes sont maintenus sur glace tout au long de l'expérience afin de limiter au maximum la dégradation de l'ATP.

Les microtubes contenant la poudre de veine sont vortexés avant d'être centrifugés à 4 °C et 600g pendant 10 minutes.

Après la centrifugation, on récupère deux fois 500 µl de surnageant par microtube. Ce surnageant est placé dans deux nouveaux microtubes. On y ajoute 1 ml d'un mélange tri-n-octylamine-trichloro-1,1,2-trifluoroéthane (1,71 gr dans 6 ml). Le tout se fait sur glace.

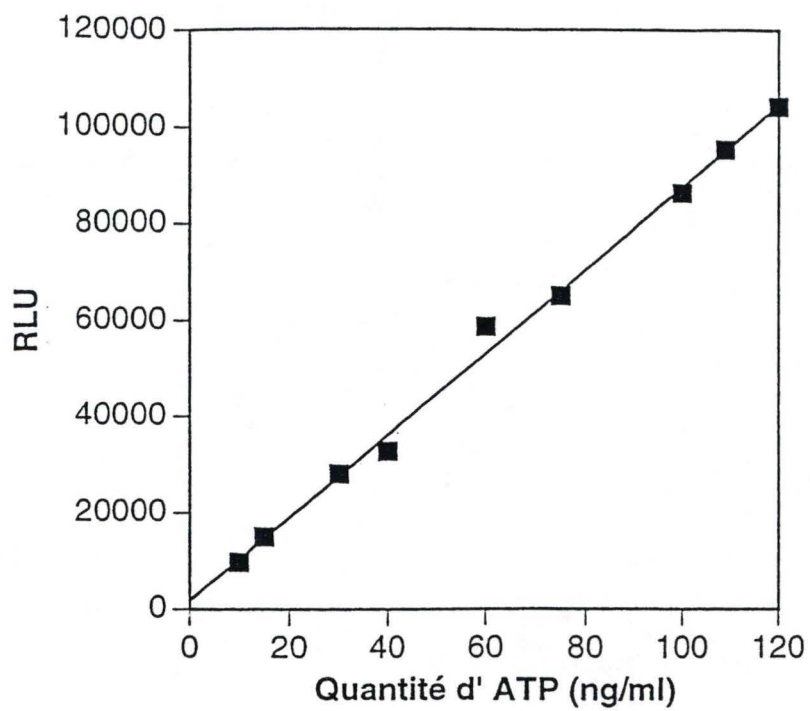
Les culots, quant à eux, sont conservés à - 20 °C dans 1 ml de PCA 5%. Ils seront utilisés pour doser l'ADN.

Les microtubes contenant le surnageant et le mélange cité ci-dessus sont vortexés deux fois 15 secondes avant de subir une seconde centrifugation (4°C, 600 g et 5 minutes).

Suite à la centrifugation, trois phases sont visibles dans le microtube. La phase supérieure contient l'ATP.

Deux fois 100 µl de cette phase sont prélevés par microtube et placés dans de nouveaux microtubes qui seront conservés à - 70 °C en attendant le dosage de l'ATP.

Notons que pour chaque expérience, un blanc est réalisé. Ici, il correspond à un microtube contenant uniquement 1,2 ml de PCA et qui subit la même chose qu'un microtube contenant la poudre de veine.



$$f(x) = 8,557993E+2 \cdot x + 1,882382E+3$$
$$R^2 = 9,953803E-1$$

Figure 6 : Droite d'étalonnage établie pour le dosage de l'ATP. Les résultats sont exprimés en RLU (Relative Light Unit).

- DTT : 75 μM (Sigma Chemical Co, Saint Louis, U.S.A.)
 - EDTA : 125 μM (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - MgCl_2 : 6,25 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - Luciférine : 43 μg par millilitre de mixture (Sigma Chemical Co, Saint Louis, U.S.A.)
 - Luciférase : 21,5 μg par millilitre de mixture (Sigma Chemical Co, Saint Louis, U.S.A.)
 - Sucre Candi : 0,1 gr par millilitre de mixture
- 2- Lumac biocounter M 2010 (Lumac, Landgraaf, Hollande)
- 3- Eau distillée filtrée sur filtre Sartorius Minisart 0,20 μm (Sartorius AG, Göttingen, Allemagne) dans une bouteille stérile
- 4- Cuvettes pour le Lumac (Lumac, Landgraaf, Hollande)

II.2.3. Mode opératoire

Les surnageants qui se trouvent à - 70 °C sont décongelés à température ambiante. Directement après leur décongélation, ils sont placés sur glace afin de limiter au maximum la dégradation de l'ATP.

Lors du dosage, on place dans une cuvette Lumac, 100 μl de mixture réactionnelle. Celle-ci a été dégelée à température ambiante et à l'abri de la lumière, au moins une heure avant le dosage.

Ensuite, on ajoute 10 μl d'échantillon que l'on resuspend dans les 100 μl de mixture.

La cuvette est alors placée dans le luminomètre. La valeur du pic d'émission de lumière est alors enregistrée. Cette valeur est exprimée en RLU (Relative Light Unit).

Pour chaque expérience, une droite d'étalonnage est réalisée (figure 6). Pour ce faire, on effectue, dans l'eau, une série de dilutions connues d'ATP stock se trouvant à une

concentration de 0,6 mg/ml dans du tampon $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 10 mM à pH 7,4. La conservation de l'ATP standard se fait à une température de - 20 °C.

II.3. Dosage de l'acide désoxyribonucléique (ADN)

II.3.1. Principe

Le dosage de l'ADN est réalisé dans le but de suivre la prolifération cellulaire dans l'organoculture. Cette prolifération cellulaire est principalement celle des cellules musculaires lisses.

L'ADN est d'abord hydrolysé. Ensuite, on lui ajoute de l'acide diaminobenzoïque. Cette molécule se fixe sur les aldéhydes, formées par l'hydrolyse, dans des conditions de température élevée et dans des acides minéraux concentrés. Cette liaison génère alors des composés fortement fluorescents (Kissane et Robins, 1958). Cette fluorescence est lue sur un fluorimètre à une longueur d'onde d'excitation de 406 nm et à une longueur d'onde d'émission de 520 nm.

II.3.2. Matériel et solutions

- 1- Acide perchlorique à 5 % dans l'eau (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- 2- Acétate de potassium 0,1 M (Vel, Leuven, Belgique)
- 3- Ethanol absolu (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- 4- Acide chlorhydrique fumant (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- 5- 3,4-acide diaminobenzoïque (Sigma, Saint Louis, U.S.A.)
- 6- Soluène 350 (Packard B.V Chemical operations, Groningen, Hollande)
- 7- Aqualuma : liquide scintillant (Lumac-LSC B.V, Groningen, Hollande)
- 8- Fluorimètre SFM 25 (Kontron Instruments)
- 9- Centrifugeuse biofuge pico (Heraeus Instruments)
- 10- Sonicateur "Virsonic cell disrupter" modèle numéro 150 (The Virtis CO., Inc., New-York, U.S.A.)
- 11- Compteur de radioactivité Beckman LS 1801 (LKB Instruments Ltd., Selsdon, U.S.A.)

II.3.3. Mode opératoire

Les microtubes que l'on conserve à - 20 °C sont décongelés avant d'être soniqués deux fois 15 secondes à une puissance de 60. Entre chaque passage au sonicateur, les échantillons sont placés 5 minutes sur glace.

Ensuite, chaque microtube est équitablement divisé en 5. Chacun de ces 5 nouveaux microtubes contient 200 µl de PCA et environ un cinquième du culot initial.

Notons à ce niveau que si la mise en culture a été réalisée en présence de méthyl-thymidine tritiée, les 5 microtubes ne seront pas tous utilisés pour le dosage de l'ADN. Deux d'entre eux serviront à réaliser le comptage des radiations bêta émises par la thymidine tritiée. Ce comptage sera décrit au terme de ce paragraphe.

Aux microtubes contenant l'ADN et les 200 µl de PCA, on ajoute 1 ml d'acétate de potassium 0,1 M avant de centrifuger 5 min à 13000 rpm.

Cette centrifugation terminée, le surnageant est éliminé et remplacé par 1 ml d'éthanol absolu. Les microtubes sont ensuite clipsés et placés dans un bain à 60 °C pendant 15 min.

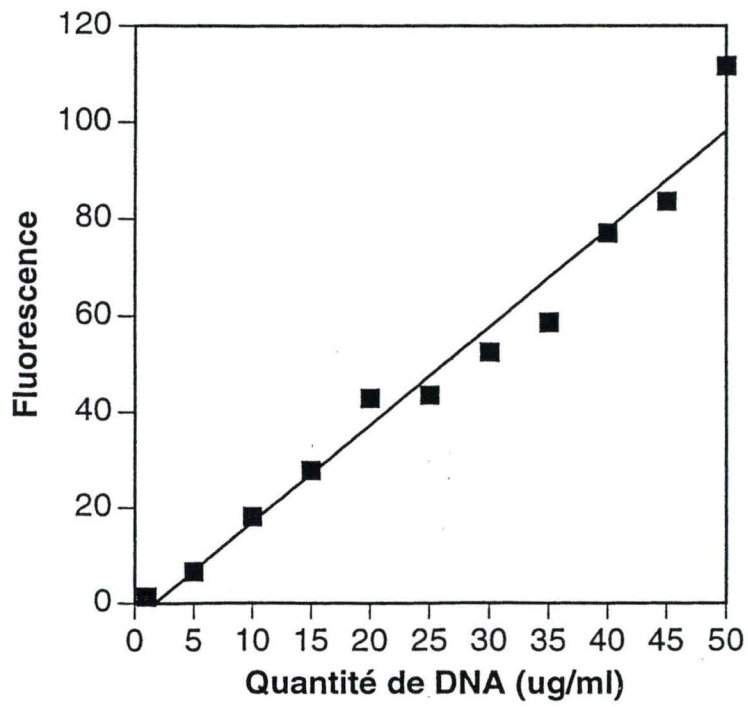
Au terme de l'incubation, ils sont à nouveau centrifugés 5 min à 13000 rpm. Cette centrifugation est suivie par 2 lavages du culot à l'éthanol absolu.

Un lavage se déroule de la manière suivante : le surnageant est d'abord éliminé avant d'être remplacé par 1 ml d'éthanol absolu. Ensuite l'échantillon est vortexé et centrifugé 5 min à 13000 rpm.

Ces lavages sont indispensables car ils permettent, en grande majorité, d'éliminer les constituants lipidiques présents dans le culot.

Ces lavages sont suivis d'un séchage des culots à 50 °C pendant 25 min.

Durant ce laps de temps, une solution d'acide diaminobenzoïque (DABA) dans l'HCl est réalisée. Cette solution permet dans un premier temps d'hydrolyser l'ADN et ensuite le DABA forme avec les aldéhydes générées des composés fortement fluorescents.



$$f(x) = 2,030909E+0*x + -3,357348E+0$$
$$R^2 = 9,679153E-1$$

Figure 7 : Droite d'étalonnage établie pour le dosage de l'ADN. Les résultats sont exprimés en unités de fluorescence.

La composition de cette solution est la suivante : 6,92 gr d'HCl fumant sont pesés dans un cylindre de 20 ml. Ensuite, on porte avec de l'eau distillée jusqu'à 20 ml. Pour terminer, on dissout 0,006 gr de DABA dans la solution d'HCl.

Lorsque les culots sont secs, on leur ajoute 80 µl de la solution décrite ci-dessus. Les microtubes sont à nouveau placés dans un bain à 60 °C pendant 30 min. Ce temps est nécessaire pour permettre l'hydrolyse totale de l'ADN.

L'hydrolyse terminée, on ajoute 800 µl de PCA 0,1 M à chaque microtube. On centrifuge 5 min à 13000 rpm avant de lire la fluorescence du surnageant.

Cette lecture est réalisée à une longueur d'onde d'excitation de 406 nm et à une longueur d'onde d'émission de 520 nm.

Pour chaque expérience, une droite d'étalonnage est réalisée (figure 7). Pour ce faire, on effectue une série de dilutions connues de l'ADN stock. Cet ADN est de l'ADN de sperme de saumon soniqué (Sigma, Saint Louis, U.S.A.). Sa concentration est de 2,5 mg/ml et il est conservé dans de l'eau à - 20 °C.

II.3.4. Le comptage en radioactivité

Comme signalé précédemment, lorsque la culture a été réalisée en présence de thymidine tritiée, deux des cinq microtubes destinés au dosage de l'ADN sont utilisés pour compter la radioactivité associée à l'incorporation de cette thymidine.

A ces deux microtubes contenant 200 µl de PCA et environ un cinquième du culot initial, nous ajoutons 1 ml de Soluène 350. Ensuite, on clipse les microtubes et on les place pendant une heure dans un bain à 60 °C. Au terme de cette période, on prélève 2 fois 500 µl pour chaque microtube et on les place dans des fioles auxquelles on ajoute 5 ml d'Aqualuma. La radioactivité est finalement lue par le compteur Beckman L S 1801.

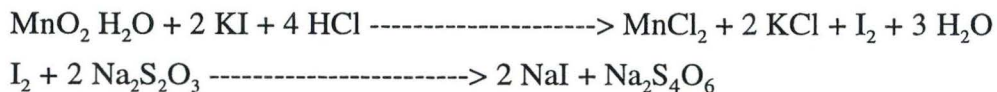
II.4. Incubation sous hypoxie

II.4.1. Mesure de la concentration en oxygène dissous dans les solutions

La sévérité de l'hypoxie à laquelle les morceaux de veine sont exposés est fonction de la pression partielle en oxygène du milieu qui les baigne pendant l'incubation. Même en présence d'une atmosphère de 100 % d'azote, la PO_2 du milieu n'est pas nulle en raison de la résistance du milieu aux échanges gazeux. Il est donc important de préciser le degré d'hypoxie atteint dans ces conditions expérimentales. La mesure de la concentration en oxygène dissous a été réalisées par un titrage colorimétrique selon la méthode de Winkler (Rodier, 1975).

◆ Principe

L'hydroxyde manganéux se formant lors de l'addition du réactif alcalin (NaOH + KI) et de la solution de chlorure de manganèse absorbe complètement l'oxygène présent dans la solution pour former de l'oxyde manganique qui en milieu acide oxyde l'iodure de potassium préalablement introduit. L'iode est titré par le thiosulfate de sodium :



◆ Matériel et solutions

1- HBSS (Hank's balanced salt solution)

Ce milieu se compose de :

- NaCl : 8 g/l (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- Glucose : 1 g/l (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- KCl : 0,4 g/l (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$: 0,1 g/l (Merck, Darmstadt, Allemagne)

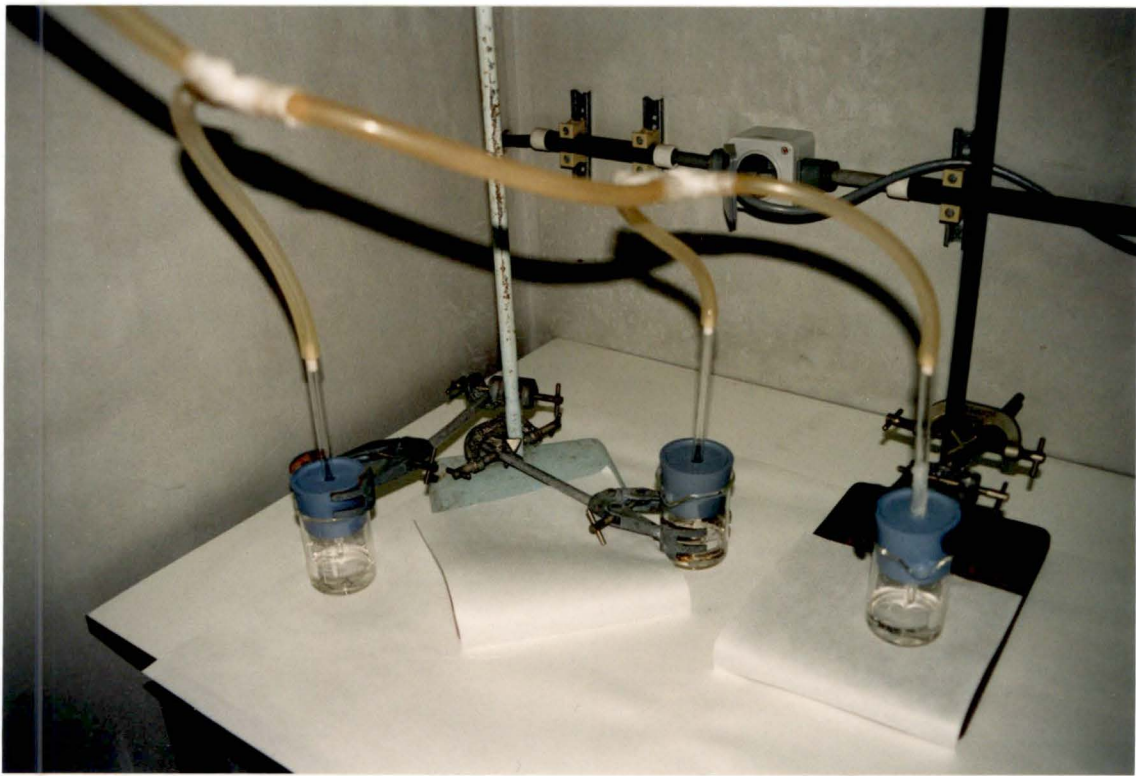


Figure 8 : Cette photo présente le montage qui est réalisé en chambre chaude pour effectuer l'hypoxie. On observe les arrivées d'azote, les berlins siliconés dans lesquels sont piqués les morceaux de veine ainsi que les bouchons en caoutchouc et les pipettes.

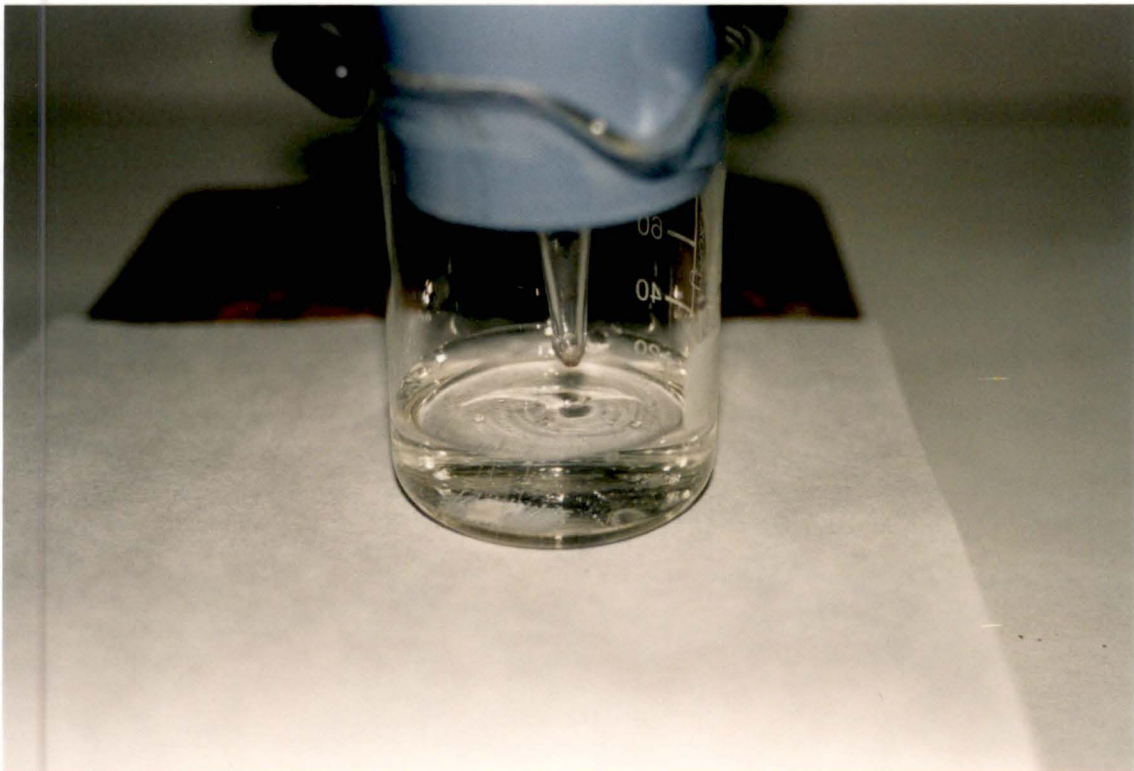


Figure 9 : Cette photo illustre l'étape où l'on chasse l'air grâce à un flux d'azote.

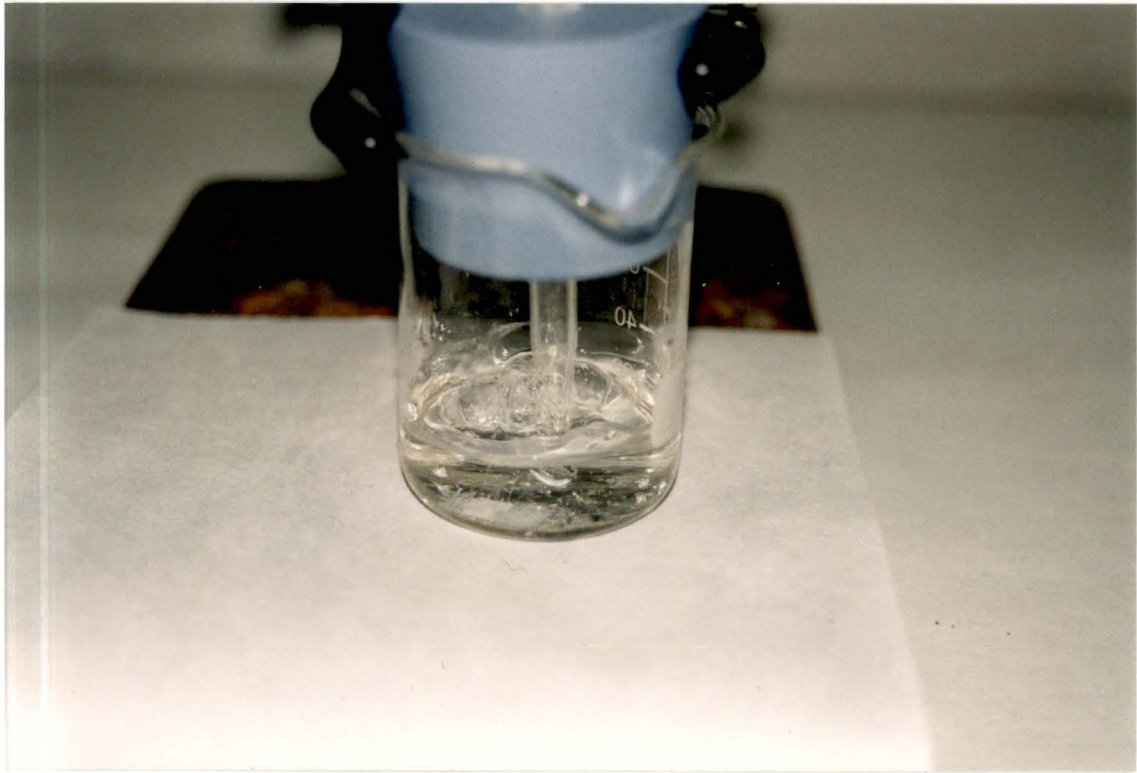


Figure 10 : Cette photo représente l'azote qui barbote dans l'HBSS. Ceci permet de chasser l'air et d'instaurer l'hypoxie dans l'HBSS.

- $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$: 0,1 g/l (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 0,76 g/l (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- KH_2PO_4 : 0,06 g/l (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- CaCl_2 : 1mM final

2- MnCl_2 50 % dans de l'eau

3- NaOH 40 % : 4 grammes de NaOH dissous dans 2,5 grammes d'eau. A cela est ajouté du KI 15 % dans de l'eau : 1,5 grammes de KI dissous dans 2 grammes d'eau

4- HCl 6 N

5- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 12,5 mM

6- Berlins dont le fond est recouvert de silicone pour permettre d'y planter des aiguilles

7- Capuchons en caoutchouc, pipettes, statif

◆ Mode opératoire

L'HBSS est préchauffé à 37 °C avant de lui ajouter du calcium à une concentration finale de 1 mM et de le mettre à pH 7,35 avec de l'HCl dilué.

On place 20 ml d'HBSS à 37 °C et pH 7,35 par berlin siliconé. Certains berlins seront utilisés pour les incubations sous hypoxie et d'autres serviront pour les normoxies.

Les berlins "hypoxie" sont obturés de façon hermétique, avec un bouchon en caoutchouc dont le centre est percé d'un trou. Ce dernier va permettre d'introduire une pipette dans le berlin. Cette pipette est, elle-même, reliée à une bombonne d'azote via un tuyau en plastique. (Figure 8)

La pipette est d'abord placée juste au-dessus du liquide et pendant 4 minutes, on insuffle de l'azote à l'intérieur des berlins (figure 9). Ceci a pour but de chasser l'air et surtout l'oxygène qui se trouve emprisonné dans le berlin. Une fois ce temps écoulé, la pipette est descendue dans le tampon HBSS. Ceci permet de faire buller l'azote dans l'HBSS ce qui engendre l'hypoxie (figure 10).

Les berlins "normoxie" sont quant à eux placés sur la table en vis-à-vis de leur correspondant "hypoxique".

L'ensemble du montage se trouve en chambre chaude. C'est une pièce continuellement chauffée à 37 °C.

Après les incubations sous hypoxie ou normoxie de 0, 15, 30, 45 et 60 minutes, 0,7 ml d'HBSS sont recueillis dans un microtube contenant 2,8 µl de la solution de $MnCl_2$ et 2,8 µl de la solution alcaline. Le microtube est rapidement bouché pour éviter au maximum l'introduction d'oxygène atmosphérique. On observe alors la formation d'un précipité qui correspond à l'hydroxyde manganeux. Celui-ci piège tout l'oxygène présent dans le tampon. Au moment du dosage, le précipité d'oxyde manganique est dissous par l'addition de 7 µl d'HCl 6N. On titre alors les échantillons avec du $Na_2S_2O_3$ (12,5 mM) jusqu'à ce que la solution jaune de départ devienne incolore.

La concentration en oxygène dissous est calculée par la formule suivante :

$$O_2 \text{ (mg/l)} = \frac{v \cdot N \cdot 8 \cdot 1000}{V}$$

avec v : volume de $Na_2S_2O_3$ nécessaire au titrage

N : normalité de $Na_2S_2O_3$

8 : $32/4$ où 32 est le PM de l'oxygène et 4 le nombre d'électrons échangés dans l'équation d'oxydo-réduction pour une molécule d'oxygène

V : volume de l'échantillon au moment du dosage

II.4.2. Mise sous hypoxie

◆ Matériel et solutions

- 1- Milieu de rinçage : RPMI 1640 (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne)
- 2- HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)
- 3- Berlins siliconés, statif, pinces et cisceaux
- 4- Bouchons en caoutchouc et pipettes

◆ Mode opératoire

Toutes les manipulations se déroulent à 37 °C avec des solutions préchauffées à 37°C.

Au maximum une heure après leur réception, les veines sont disséquées dans du milieu de rinçage (milieu de dissection). La technique utilisée pour ce faire est identique à celle décrite dans le paragraphe "dissection" de ce "matériel et méthode".

Les morceaux de veine, d'environ 1 cm², obtenus au terme de cette dissection sont soigneusement piqués, à l'aide de micro aiguilles, dans le fond de berlins siliconés contenant 20 ml d'HBSS préchauffé à 37 °C. Pour les mêmes raisons que dans l'organoculture, ils sont déposés sur des petits bouts de gaze en laine de polyester.

Les berlins destinés à subir une hypoxie sont fermés hermétiquement à l'aide d'un bouchon en caoutchouc. Au centre de ce bouchon, on place une pipette. C'est elle qui va permettre d'amener l'azote dans le berlin.

La pipette est d'abord placée juste au-dessus du liquide et pendant 4 minutes, on va insuffler une atmosphère à 100 % d'azote. Ensuite, la pipette est descendue dans l'HBSS et l'azote est insufflé dans le milieu. Ce barbotage permet d'éliminer l'oxygène présent dans le berlin, ce qui crée l'hypoxie.

Les temps d'incubation sous hypoxie sont de 80, 100 et 120 minutes.

II.4.3. Adhérence des HL60 sur l'endothélium veineux activé par l'hypoxie

◆ Matériel et solutions

1- Milieu de rinçage : milieu de culture RPMI 1640 auquel on a ajouté des antibiotiques et de la fungizone

2- HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)

3- HL60, cellules de lignée promyelocytaire (ECACC)

4- Chrome-51 (^{51}Cr) (Dupont Products, Boston, U.S.A.) possédant une activité spécifique de 250-500 mCi/mg de chrome

5- Boîte en plastique à 24 puits (Corning, U.S.A.)

6- Berlins siliconés, statifs, pinces et cisceaux

7- Tubes Falcon de 50 ml (Falcon, Plymouth, Angleterre)

8- Compteur à radiations gamma 1275 minigamma (LKB Wallac)

◆ Marquage des HL60

Afin de pouvoir quantifier l'adhérence des HL60 à l'endothélium veineux activé par l'hypoxie, ces cellules sont préalablement marquées au chrome-51.

Les HL60 sont des cellules promyélocytaires provenant d'une leucémie humaine. Elles sont mises en culture à raison de 300 000 cellules/ml de RPMI 1640 supplémenté avec 10 % de sérum de veau foetal. Le milieu de culture est changé tous les deux jours et la culture a lieu dans une étuve à 37 °C avec une atmosphère de 5 % de CO_2 .

Les HL60 se trouvent dans 100 ml de milieu de culture. Ces 100 ml sont répartis dans deux tubes de 50 ml (Falcon, Plymouth, Angleterre) qui vont être centrifugés pendant 10 min à 1000 rpm. Ensuite, les cellules sont lavées deux fois dans de l'HBSS avec calcium.

Après le deuxième lavage, l'HBSS est décanté et les cellules sont toutes resuspendues dans 10 ml d'HBSS et comptées dans une cellule de Neubower.

Les HL60 à $5 \cdot 10^6$ cellules/ml sont marquées dans de l'HBSS avec 200 μCi de ^{51}Cr /10 ml pendant 1 heure à 37 °C.

Après le marquage, les HL60 sont lavées trois fois dans de l'HBSS plus calcium par des centrifugations de 10 minutes à 1000 rpm.

Ces lavages terminés, on resuspend les HL60 marquées dans de l'HBSS à raison de $5 \cdot 10^6$ cellules/ml d'HBSS.

◆ Adhérence des HL60

Antérieurement à cette expérience, des incubations de 80, 100 et 120 minutes sous hypoxie et normoxie sont réalisées. La technique de mise sous hypoxie est identique à celle décrite au point II.4.2 de ce "matériel et méthode".

Lorsqu'une hypoxie est terminée, le morceau de veine est rapidement transféré du berlin dans une boîte de 24 puits. Dans chacun des puits se trouve 1 ml d'HBSS contenant 5.10^6 HL60 marquées au chrome-51.

Le morceau de veine restera 5 minutes au contact de cette solution. Ce temps permet l'adhérence des HL60 à l'endothélium. On rince ensuite le morceau dans trois bains successifs d'HBSS. Ces trois bains permettent d'éliminer les HL60 qui n'adhèrent pas à l'endothélium activé par l'hypoxie. Enfin, les morceaux sont placés dans des tubes en plastique contenant 1 ml d'HBSS avec calcium. Ces tubes vont passer dans un compteur de radiations gamma. On pourra ainsi connaître la quantité de radioactivité associée aux morceaux de veine.

Des contrôles positifs et négatifs sont également réalisés pour cette expérience. Ils correspondent respectivement à des tubes contenant 1 ml d'HL60 marqués au chrome ainsi qu'à des tubes contenant 1 ml d'HBSS avec calcium.

II.4.4. Mise en culture après hypoxie

◆ Principe

Le but de cette manipulation est de pouvoir suivre, à long terme, les effets de l'hypoxie sur la viabilité des cellules et sur la structure des tissus de la paroi veineuse.

Pour ce faire des morceaux de veine sont soumis à une incubation sous hypoxie de 90 minutes. Au terme de cette incubation, les morceaux sont mis en culture dans du RPMI 1640 auquel on a ajouté des antibiotiques, de la fungizone et 30 % de sérum de veau foetal.

Ces organocultures sont maintenues durant 14 jours et comme précédemment des dosages d'ATP et d'ADN ainsi que de la microscopie électronique à balayage sont réalisés

dans le but d'observer ce qui se passe au niveau de la paroi veineuse après une hypoxie de 90 minutes.

◆ **Matériels et solutions**

- 1- Milieu de dissection : RPMI 1640 plus antibiotiques
- 2- Milieu de culture : RPMI 1640 supplémenté avec 30 % de sérum de veau foetal ainsi que de la glutamine et des antibiotiques
- 3- HBSS avec calcium à pH 7,35
- 4- Pincés, ciseaux, lames de scalpel
- 5- Berlins siliconés, micro aiguilles, gaze en laine de polyester
- 6- Boîtes de Pétri en verre dont le fond est recouvert de silicone

◆ **Mode opératoire**

Tout le matériel utilisé est autoclavé quant aux solutions, elles sont filtrées sur filtre Sartorius Minisart 0,20 µm m (Sartorius AG, Göttingen, Allemagne).

La dissection ainsi que la préparation des berlins pour l'hypoxie ont lieu sous hotte à flux laminaire. Ensuite, les berlins destinés à l'hypoxie sont placés en chambre chaude tandis que les berlins pour la normoxie sont maintenus dans un bain à 37 °C. Ce bain se trouve également sous hotte.

La veine est disséquée et coupée en morceaux d'environ 1 cm². Ces morceaux sont, de suite, piqués dans le fond de berlins siliconés et comme expliqué ci-avant, on place 20 ml d'HBSS avec calcium et à pH 7,35 dans chacun des berlins. Ensuite, les morceaux de veines subissent des incubations de 90 minutes sous hypoxie ou normoxie.

L'hypoxie terminée, les berlins qui se trouvent en chambre chaude sont, le plus rapidement possible, ramenés sous la hotte à flux laminaire. Là, les morceaux hypoxiques et normoxiques sont remis en culture dans les boîtes de Pétri en verre contenant 6 à 8 ml de milieu de culture. En plus de ces morceaux, on ajoute, pour chaque boîte, un morceau contrôle c'est-à-dire qui n'a subi aucune incubation.

La mise en culture s'étale sur 14 jours et les milieux de culture sont changés tous les deux ou trois jours. Les organocultures sont arrêtées aux jours 0, 7 et 14 de la culture comme décrit ci-avant.

III. Etudes morphologiques

Les études morphologiques ont été réalisées dans le but d'obtenir un certain nombre de documents (coupes histologiques et photos en microscopie électronique à balayage) qui permettront de vérifier l'état des organocultures au cours du temps. Ces documents permettront également, dans la mesure du possible, de compléter les résultats obtenus au cours des études biochimiques.

Il n'est pas possible de décrire tous les détails techniques relatifs à la préparation des échantillons, toutefois, il est possible de citer les étapes primordiales pour l'obtention d'une bonne coupe histologique ou d'une micrographie en microscopie électronique.

III.1. Microscopie optique (ou photonique)

III.1.1. Matériel et solutions

1- Bouin : liquide fixateur à pH 1,5

Sa composition est la suivante :

- Solution aqueuse saturée en acide picrique (75%)
- Formol de commerce (formaline) (20%)
- Acide acétique glacial (5%)

2- Méthanol

3- Toluène

4- Paraffine liquide à 60 °C

5- Mollifex (BDH Laboratory Supplies, Poole, Angleterre)

6- Eau gélatineuse : utilisée comme colle. Elle sert à faire adhérer la coupe à la lame de verre

Sa composition est la suivante :

- Eau distillée : 250 ml

- Gélatine : grandeur d'un timbre poste
 - Une ou deux gouttes de formol pour la conservation
- 7- D.P.X. Mountant (BDH Chemicals Ltd, Poole, Angleterre)

III.1.2. Mode opératoire

1- Fixation

Les morceaux de veine sont immédiatement plongés, après l'arrêt de l'organoculture, dans un récipient contenant du liquide de Bouin. Ils y resteront pendant une nuit avant de subir les autres étapes de préparation de la coupe.

Le but de la fixation est de maintenir les structures tissulaires aussi proches que possible de l'état vivant. Cette fixation doit être rapide afin d'éviter l'autolyse des tissus sortis de leur milieu physiologique.

2- Déshydratation

Les morceaux sont placés dans trois bains successifs de méthanol (durée : 1 heure par bain).

Cette déshydratation est réalisée afin d'enlever l'eau des tissus et de la remplacer par un solvant miscible au milieu d'inclusion utilisé ultérieurement.

3- Inclusion et enrobage

On place les morceaux de veines dans 3 bains successifs de toluène. Ici aussi la durée est de 1 heure par bain. Cette étape est nécessaire car elle permet d'imprégner les tissus avec un solvant miscible avec la paraffine (milieu d'enrobage). Par la suite, les morceaux seront placés dans quatre bains successifs de paraffine fondue à 60°C. La durée est de 1 heure pour les trois premiers bains et de minimum 12 heures pour le dernier bain.

La paraffine pénètre dans tout le tissu et même à l'intérieur des cellules, rendant ainsi le tissu plus résistant à la coupe.

4- Coupe

Le bloc de paraffine solide emprisonnant le morceau de veine est tout d'abord dégrossi avant d'être rendu moins dur pour la coupe grâce à un passage dans le mollifex pendant au moins 1 heure. Après ces deux étapes, le bloc est prêt pour la coupe.

A l'aide d'un microtome (American Optical Corporation) équipé d'un couteau, on réalise des coupes de 5 à 6 μm d'épaisseur. Ces coupes sont ensuite étalées sur des lames en verre passées à la flamme et recouvertes d'eau gélatineuse. Cette eau permet à la coupe d'adhérer à la lame, ce qui permet les colorations ultérieures.

5- Coloration

Les coupes sont enfin colorées afin de mettre en évidence les différents composants tissulaires. Cette coloration permet également l'observation au microscope photonique.

Deux types de colorations ont été utilisés dans ce travail. Les voici décrites de façon détaillée :

1. Trichrome à froid de Masson. Dans le cas de notre travail c'est un trichrome au vert lumière.

Le but de cette coloration est d'observer l'état de la structure tissulaire.

Dans cette coloration :

- L'hémalun colore toutes les substances basophiles et principalement les noyaux en bleu-violacé.
- La solution rouge colore les composants cytoplasmiques non basophiles en rouge.
- Le vert lumière colore les fibres du tissu conjonctif en vert.

Les coupes sont tout d'abord déparaffinées. Ensuite, elles sont blanchies pendant 10 minutes à l'eau courante et finalement, elles peuvent subir la coloration.

Cette coloration comprend les différentes étapes suivantes :

- Passage 5 minutes dans le bleu Célestin

- Rinçage à l'eau courante
- Passage 5 à 6 minutes dans l'hémalum
- Différenciation 1 à 3 minutes dans l'éthanol-HCl
- Passage dans l'eau courante pendant 10 minutes
- 5 minutes dans la solution de rouge
- Rinçage dans trois bains d'eau acétifiée à 1 %
- Différencier 2 à 4 minutes dans l'acide phosphotungstique
- Colorer directement dans le vert lumière durant 3 à 5 minutes
- Rinçage dans trois bains d'eau acétifiée à 1 %
- Déshydrater dans trois bains d'isopropanol
- Passage dans trois bains de toluène

2. Coloration à l'Orcéine. La veille de la coloration, l'orcéine est filtrée et les coupes sont déparaffinées puis blanchies. Suite à ce blanchiment, les coupes sont rincées à l'alcool 70° avant d'être placées toute la nuit dans l'orcéine.

Cette coloration met principalement en évidence les fibres élastiques. Ces dernières sont colorées en brun acajou.

Le lendemain, les coupes sont sorties de l'orcéine et rincées à l'alcool 70°. Suite à cela, elles sont rincées à l'eau. Elles sont enfin prêtes à subir le reste de la coloration. La voici détaillée :

- Passage 10 minutes dans l'hémalum
- Rinçage à l'eau courante
- Différencier
- Passage dans l'eau courante durant 10 minutes
- Rinçage dans l'alcool isopropylique
- Coloration dans le Safran durant 5 minutes
- Rinçage dans trois bains successifs d'isopropanol
- Passage dans trois bains de toluol

6- Montages des lames

Les lames sont ensuite montées dans du DPX.

III.2. Microscopie électronique à balayage

III.2.1. 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. Ce sont les électrons réfractés secondaires qui, dans ce cas, vont former l'image en trois dimensions.

III.2.2. Solutions

1- Glutaraldéhyde 2 % dans du tampon cacodylate 0,1 M sans saccharose (Fluka Chemies AG CH, Buchs) à pH 7,4; 4°C

2- Tampon cacodylate de sodium 0,1 M (BDH Chemicals Co, Saint Louis, U.S.A.) à pH 7,4; 4 °C. Ce tampon contient 7,5 % de saccharose

3- Acétone (Merck, Darmstadt, Allemagne)

III.2.3. Mode opératoire

Afin de fixer les morceaux de veine saphène, on les plonge durant toute une nuit dans de la glutaraldéhyde 2 %.

Au terme de la fixation, les échantillons sont rincés trois fois 15 minutes dans du tampon cacodylate 0,1 M à pH 7,4 contenant 7,5 % de saccharose. Ce rinçage se fait à 4 °C. Ensuite, ils sont déshydratés par des passages successifs dans des solutions d'acétone à 30, 50, 70 et 90 % une fois 10 minutes puis une fois cinq minutes pour chaque concentration. Finalement les échantillons passent dans deux bains d'acétone à 100 %, une fois 10 minutes à 4 °C et ensuite, 10 minutes à température ambiante.

On réalise ensuite la dessiccation des échantillons par le passage au "point critique" (appareil Balzers CPD 030 Critical Point Dryer). Au cours de cette étape, l'acétone est d'abord remplacé sous forte pression par du CO₂ liquide qui passera en phase gazeuse à son point critique.

Les échantillons sont ensuite collés sur des supports en aluminium à l'aide d'une colle à l'argent qui permet un contact électrique entre l'échantillon et le support. Puis, ils sont recouverts d'une fine couche d'or (environ 200 angström) qui rend les échantillons réfractaires aux électrons.

Les morceaux de veine ainsi traités sont finalement observés et photographiés à l'aide du microscope électronique à balayage (Philips XL-20).

III.3. Autoradiographies

III.3.1. Principe

Pour réaliser des autoradiographies, le milieu de culture des organocultures est supplémenté avec de la méthyl-thymidine tritiée durant les quatorze jours de culture. Cette thymidine est incorporée dans l'ADN des cellules en prolifération.

De ce fait, si on coule une émulsion photographique sur des coupes de tissu provenant de ces organocultures, elle sera impressionnée et les foyers de prolifération cellulaire pourront donc être localisés.

III.3.2. Matériel et solutions

- 1- Emulsion EM-1 (Amersham International plc, Angleterre)
- 2- Développeur D-19 (Kodak)
- 3- Fixateur Unifix Kodak
- 4- Lame superfrost
- 5- 3-aminopropyltriethoxy-silane (Sigma, Saint Louis, U.S.A.) à 2 % dans l'acétone
- 6- Glycergel : il permet de monter les lames

III.3.3. Mode opératoire

Les coupes sont déparaffinées, déshydratées et montées sur des lames Superfrost. Ces lames sont spécialement traitées pour que les tissus y adhèrent correctement. Le traitement consiste en un passage dans l'acétone pur, ceci afin de mouiller les lames. Ensuite les lames sont plongées 4 minutes dans un bain de 3-aminopropyltriethoxy-silane (APpS) à 2 % dans l'acétone. Les lames sont finalement rincées à l'eau distillée.

Une fois le montage terminé, les lames sont amenées en chambre noire afin de préserver l'émulsion de la lumière.

Lorsque l'émulsion, chauffée dans un bain à 45 °C, devient liquide, elle est coulée, à l'aide d'une pipette sur les lames. Les lames sont ensuite placées verticalement durant environ 5 minutes, ce qui permet d'éliminer le surplus d'émulsion.

Les lames sont ensuite placées dans une boîte contenant du silicagel à l'abri de la lumière. Cette boîte est finalement placée à 4 °C pour une période de deux mois.

Après ce laps de temps, l'émulsion est développée. Pour ce faire, on place les lames dans du développeur D-19 dilué 5 fois pendant 5 minutes. Ensuite, elles sont rincées dans une solution d'acide acétique à 0,5 % durant 30 secondes. Leur fixation est enfin réalisée, durant 10 minutes, dans un bain de fixateur dilué 5 fois. Au terme de ces trois bains successifs, les lames sont placées sous l'eau courante durant 15 minutes.

Suite à cela, les coupes sont montées au glycergel et observées en microscopie optique.

Chapitre 3 Résultats et Discussion

Les pathologies veineuses et plus particulièrement les veines variqueuses sévissent d'une manière importante dans nos sociétés industrialisées; si bien qu'elles constituent un sérieux problème de santé publique.

De plus, l'étiologie de ces maladies est peu connue mais tout le monde s'accorde à dire que de nombreux facteurs sont impliqués dans l'installation de telles pathologies. Parmi ceux-ci, on peut citer les hormones, la génétique ou même encore les anomalies mécaniques (insuffisance valvulaire, stase veineuse).

En 1993, une hypothèse a été proposée pour tenter d'expliquer la mise en place des pathologies veineuses (Michiels *et al.* 1993b). Dans cette hypothèse, l'hypoxie pourrait jouer un rôle clef dans la désorganisation pariétale et donc, dans l'instauration de la pathologie veineuse.

Dans le but de pouvoir suivre à long terme les modifications se produisant dans la paroi vasculaire lors d'une hypoxie mimant la stase veineuse, nous avons développé un nouveau modèle expérimental : l'organoculture de veine saphène humaine.

Dans la mise au point de ce modèle, une série de vérifications ont été réalisées : l'état de conservation de l'endothélium et de la structure de la paroi veineuse (microscope électronique à balayage et microscope optique) ainsi que la viabilité de l'organoculture (dosage de l'ATP) et une éventuelle prolifération cellulaire (dosage de l'ADN et autoradiographies) ont donc été suivis.

Suite aux résultats de ces différentes vérifications, le modèle a pu ensuite être utilisé pour étudier l'effet de certains mitogènes, mettre au point l'incubation sous hypoxie et étudier les effets de cette hypoxie sur la structure de la paroi vasculaire.

Les résultats de ce travail seront donc présentés en deux temps. Dans un premier temps, nous décrirons la mise au point de l'organoculture. Cette dernière sera abordée sous deux aspects différents, celui de l'histologie ainsi que celui de la biochimie. Ensuite, le modèle sera utilisé pour tester l'effet de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ et du bFGF ainsi que pour la mise au point

de l'incubation sous hypoxie et l'étude des effets de cette hypoxie sur la structure pariétale à long terme.

I. Mise au point de l'organoculture

Le modèle de l'organoculture de veine saphène humaine présente deux avantages majeurs par rapport aux modèles expérimentaux utilisés jusqu'à présent.

Dans un premier temps, il a l'intérêt de travailler sur du matériel humain et qui plus est, sur la veine saphène qui, comme nous le savons, constitue le lieu privilégié d'apparition des varices. Ce modèle permet donc de se retrouver dans des conditions de travail proches de la réalité.

Deuxièmement, il autorise une analyse à long terme de la structure et des fonctions de l'endothélium et des cellules musculaires lisses de la média. On peut également suivre les interactions entre ces différentes couches tissulaires l'une par rapport à l'autre et ce, durant les quatorze jours que dure l'organoculture.

Pour ces deux raisons, il était donc très intéressant de développer un tel modèle expérimental.

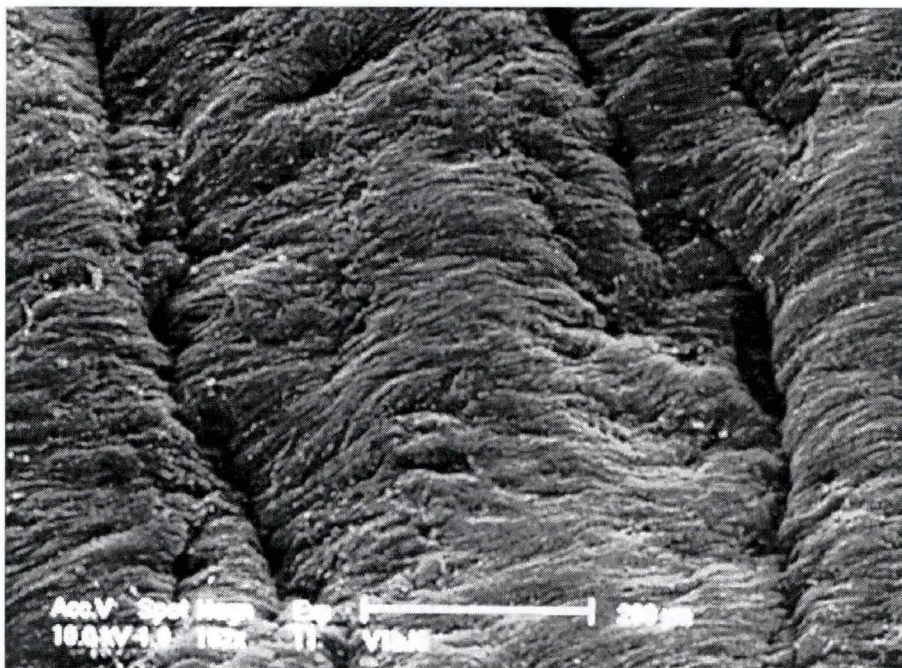
I.1. Histologie : microscopie électronique à balayage et microscopie optique des organocultures

Les études histologiques ont été utilisées afin de suivre le comportement des cellules et l'arrangement de la paroi veineuse au cours de l'organoculture.

Les études en microscopie électronique à balayage ont été réalisées dans le but de répondre aux questions suivantes : les cellules endothéliales sont-elles toujours présentes au quatorzième jour de la culture? Comment se portent-elles? Sont-elles encore vivantes?

Quant aux études histologiques en microscopie optique, elles sont destinées à suivre l'évolution des trois tuniques veineuses les unes par rapport aux autres au cours des quatorze

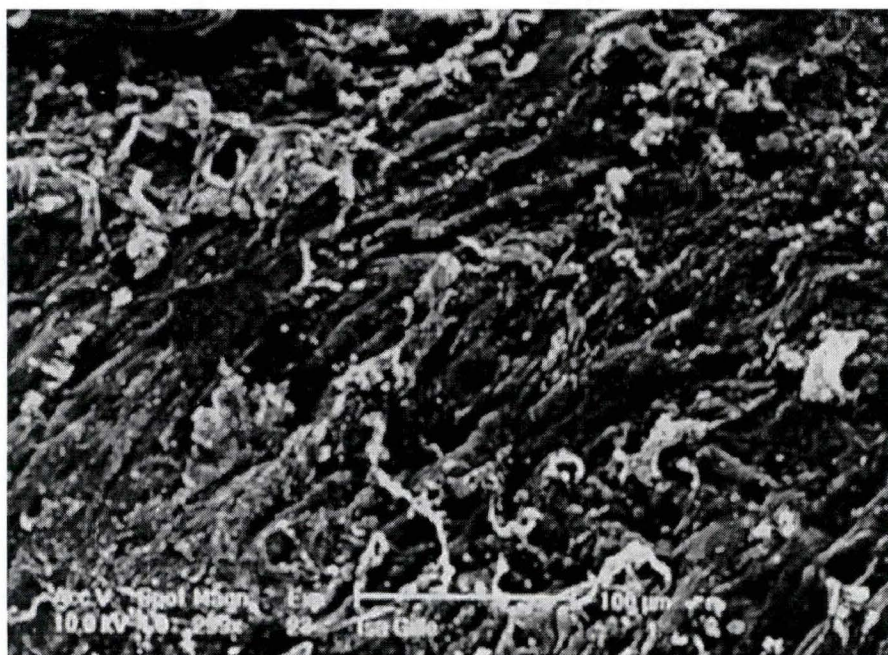
A



C



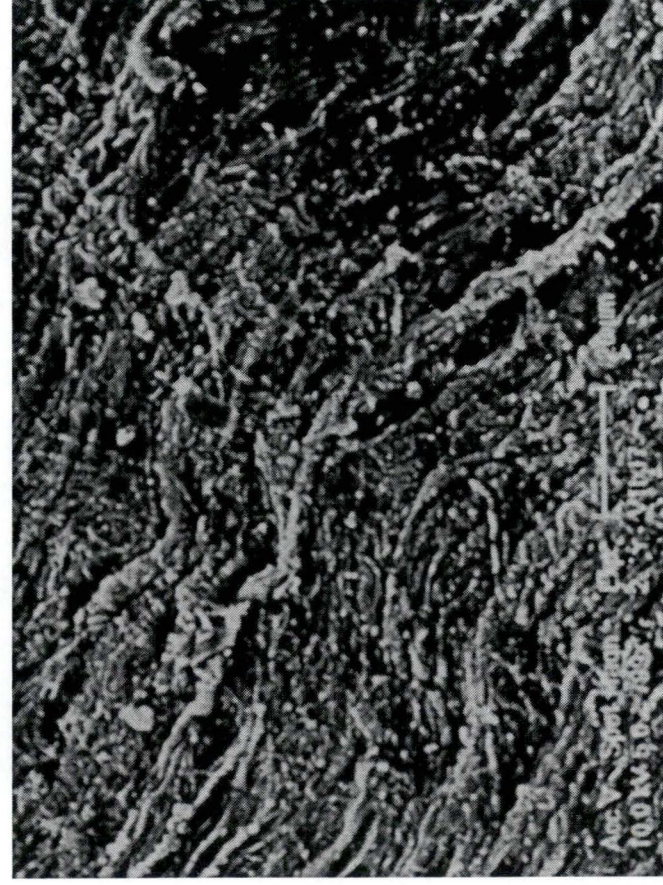
E



B



D



F

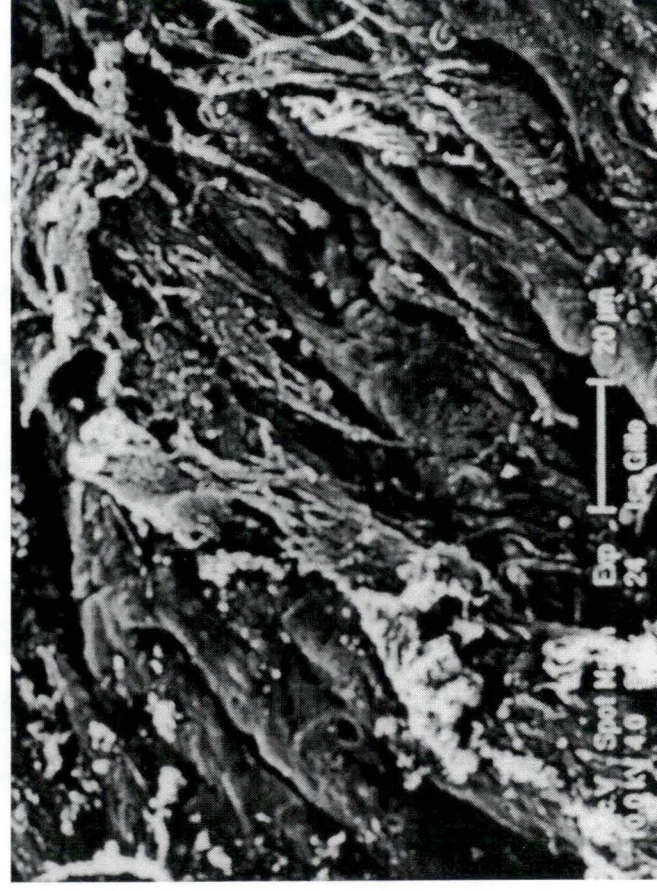


Figure III.1 : Micrographies en microscopie électronique à balayage de l'endothélium de morceaux de veine saphène humaine maintenus en organoculture. Les morceaux ont été fixés juste après le prélèvement et la dissection de la veine : jour 0 (A et B) ou après 7 (C, D) et 14 jours (E, F) d'organoculture (grossissement = 1131x pour A, C, E, = 2245x pour B, = 2994x pour D et F).

jours de culture ainsi que les modifications de l'organisation des différentes couches cellulaires au sein de la paroi veineuse durant l'organoculture.

I.1.1. Observations en microscopie électronique à balayage

Afin de suivre l'évolution de la morphologie de l'endothélium, des morceaux de veines maintenus en organoculture pendant 7 et 14 jours ainsi qu'un morceau de la même veine provenant du jour 0 ont été fixés et préparés pour la microscopie électronique à balayage.

Ce type de microscopie présente plusieurs avantages tels que l'obtention d'une information tridimensionnelle et une grande profondeur de champ ce qui permet l'observation des échantillons sous des angles et des directions divers.

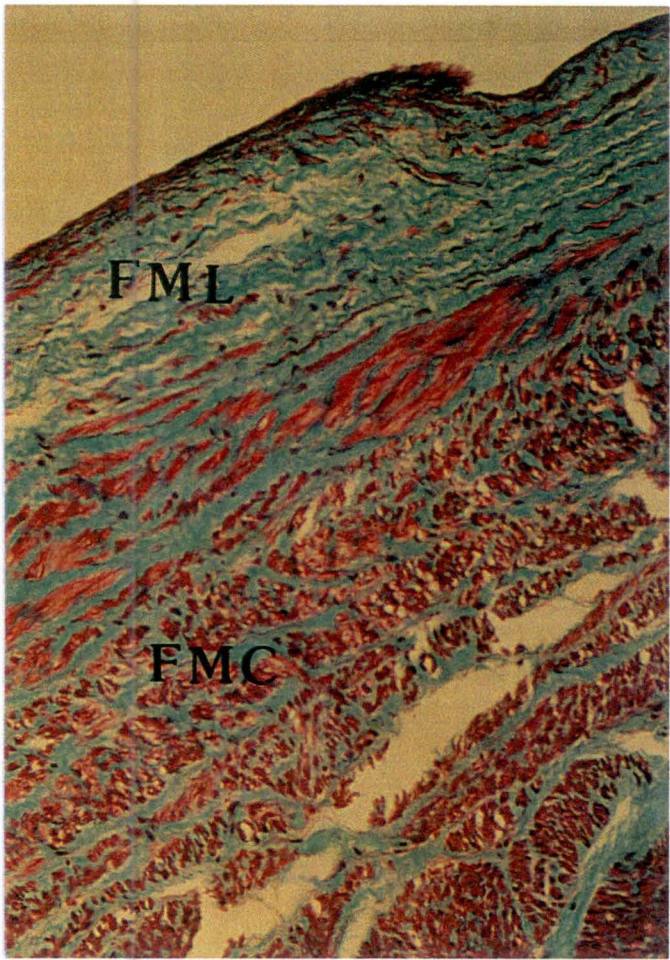
Les micrographies de la face luminale des morceaux de veine saphène sont présentées à la figure III.1.

Les photos A et B montrent qu'au jour 0 de l'organoculture, la veine saphène montre une surface lisse de l'endothélium, avec des cellules endothéliales en monocouche (noyaux non visibles). Cependant, à plus gros grossissement, on observe que les cellules endothéliales ne sont plus vraiment jointives (photo B). Cet aspect pourrait indiquer une souffrance endothéliale résultant de l'opération (stripping) proprement dite. Il est à noter que les études réalisées précédemment en microscopie électronique à balayage sur des veines saphènes humaines obtenues après stripping indiquent que l'endothélium est généralement bien conservé (Bouaziz, 1995). Nous verrons d'ailleurs plus loin au cours de ce travail que c'est effectivement le cas (Point II.3.3.).

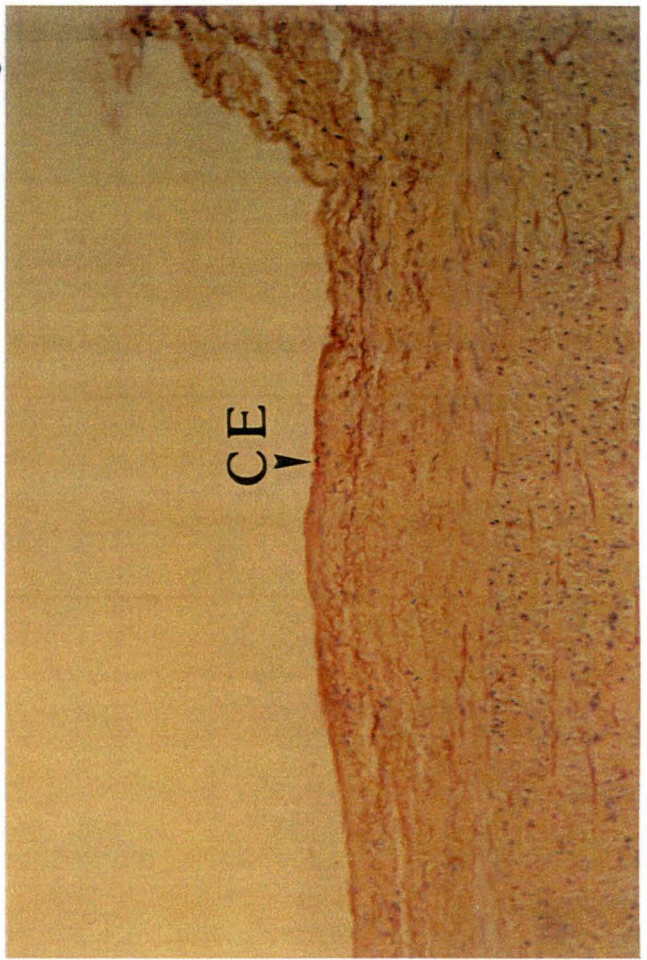
Au septième jour de culture, l'endothélium est toujours bien présent et on n'observe pas de dénudation, c'est-à-dire qu'il n'y a pas de perte de certaines cellules endothéliales (photos C et D).

Enfin, les micrographies prises le dernier jour de l'organoculture (jour 14) montrent que l'endothélium est toujours présent (photos E et F). On commence cependant à observer des déchets cellulaires à la surface des cellules endothéliales, ce qui pourrait indiquer le

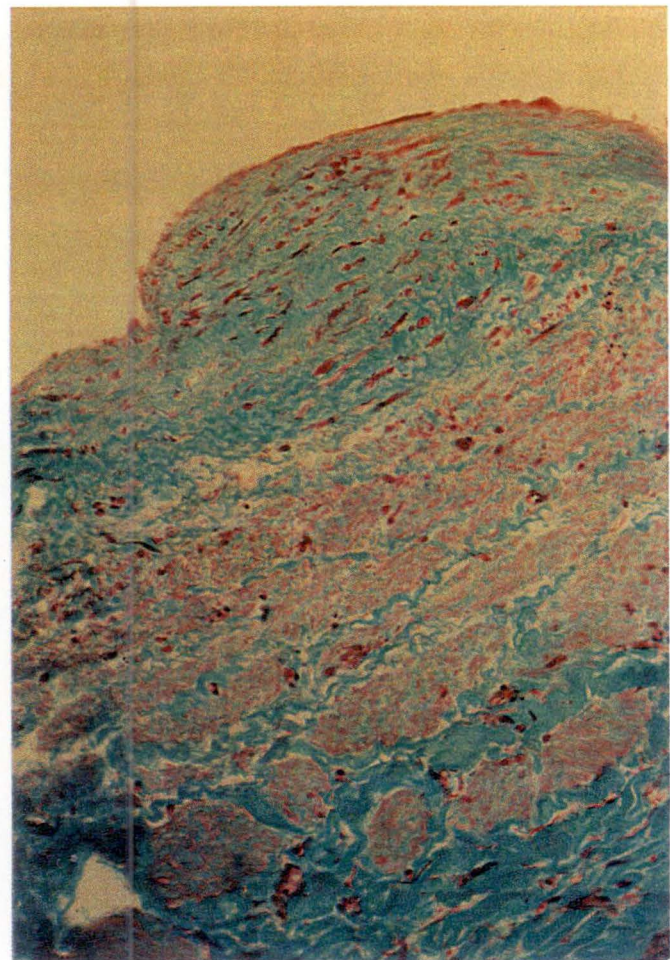
A



B



C



D

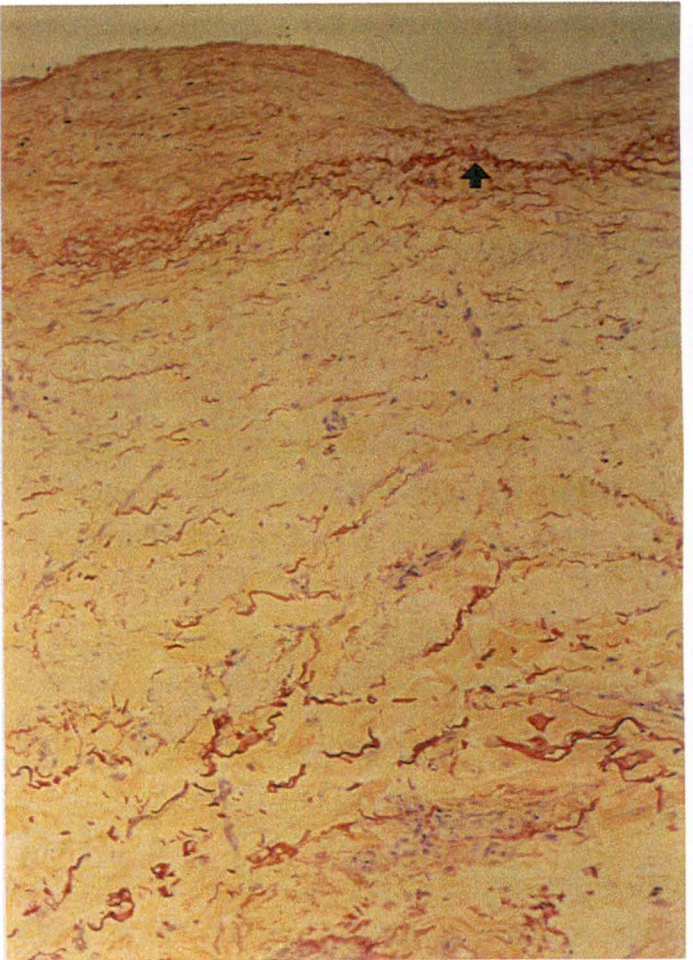


Figure III.2 : Photos de coupes histologiques transversales réalisées sur des morceaux de veine saphène humaine maintenus en organoculture. Les morceaux ont été fixés juste après le prélèvement et la dissection de la veine : jour 0 (A et B) ou après 13 jours (C, D) d'organoculture. Ces coupes ont été colorées soit au trichrome vert de Masson (A, C) ou à l'orcéine (B, D) (grossissement = 211x).

FML : Faisceaux musculaires longitudinaux, FMC : Faisceaux musculaires circulaires, CE : Cellules endothéliales, ↑: limitante élastique interne.

vieillessement de l'organoculture. Le jour 14 est d'ailleurs la limite qu'on peut atteindre dans ce modèle d'organoculture.

Cette étude morphologique montre donc que l'endothélium reste intact tout au long de l'organoculture et on peut donc espérer suivre son comportement lors des incubations sous hypoxie dans la suite de ce travail.

I.1.2. Observations en microscopie optique

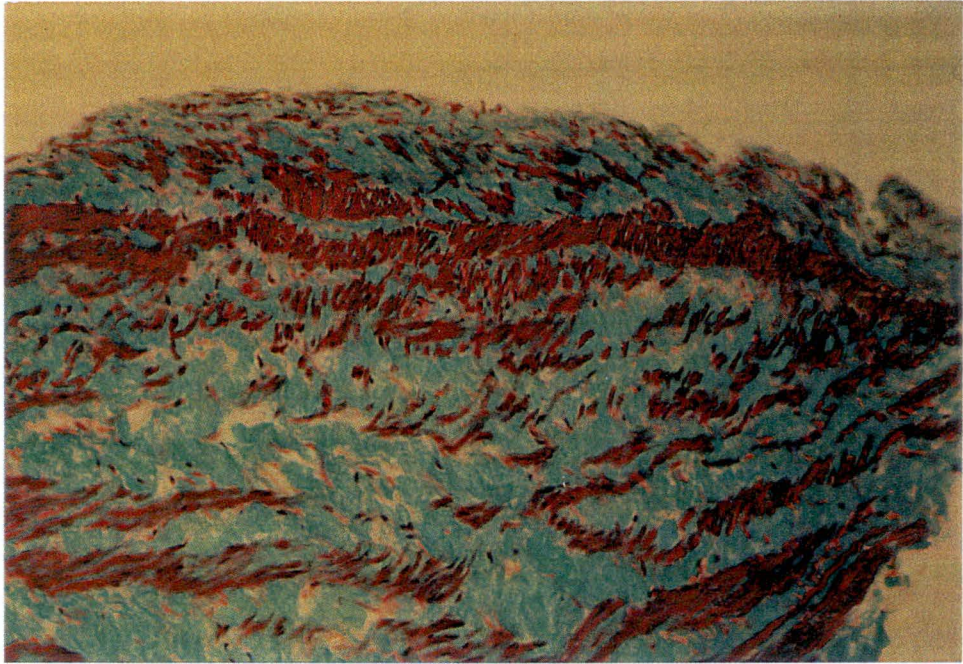
Afin de suivre précisément l'organisation de la paroi veineuse, des coupes histologiques transversales de la veine saphène ont été réalisées après 0, 7 et 13 jours d'organoculture. Nous avons utilisé deux types de coloration afin de mettre en évidence des structures différentes de la paroi veineuse: l'orcéine nous permet de visualiser les fibres élastiques (brun-acajou) tandis que le trichrome vert de Masson colore en bleu violacé les substances basophiles et particulièrement les noyaux, en rouge les composants cytoplasmiques non basophiles et en vert les fibres du tissu conjonctif.

On peut visualiser à la figure III.2 les trois tuniques classiques d'une veine. L'intima : constituée d'une membrane basale (qui n'a pas été mis en évidence ici) sur laquelle repose une monocouche de cellules endothéliales (dont les noyaux sont colorés en mauve par l'orcéine (photo B)). Sous l'endothélium, on observe la couche sous-endothéliale. La média : elle est constituée de faisceaux de fibres musculaires lisses à orientation principalement circulaire (FMC) et dans une moindre mesure à orientation longitudinale (FML) du côté de l'intima (photo A). La composante conjonctive de la média est caractérisée par une dominance de fibres de collagène. La limite entre l'intima et la média est mise en évidence par la coloration à l'orcéine qui colore en brun les fibres élastiques de la limitante élastique interne (photo D). L'adventice : c'est la couche la plus externe, elle comprend d'épaisses couches de collagène ainsi que quelques faisceaux de fibres musculaires à disposition longitudinale et des vaisseaux sanguins (photo C).

Nous avons suivi au cours de l'organoculture l'évolution de l'organisation des différentes couches de la paroi veineuse. Si on compare les photos C et D de la figure III.2 qui ont été prises au jour 13 par rapport aux photos A et B qui représentent l'état de cette même veine au jour 0, deux observations importantes peuvent être faites.

Figure III.3 : Photos de coupes histologiques transversales réalisées sur des morceaux de veine saphène humaine maintenus en organoculture. Les morceaux ont été fixés juste après le prélèvement et la dissection de la veine : jour 0 (A et B) ou après 7 (C, D, E et F) ou 13 jours (G, H, I et J) d'organoculture. Certaines de ces organocultures ont été incubées continuellement en présence de 5 ng/ml en bFGF (E, F, I et J). Ces coupes ont été colorées soit au trichrome vert de Masson (A, C, E, G et I) ou à l'orcéine (B, D, F, H et J) (grossissement = 211x).

A



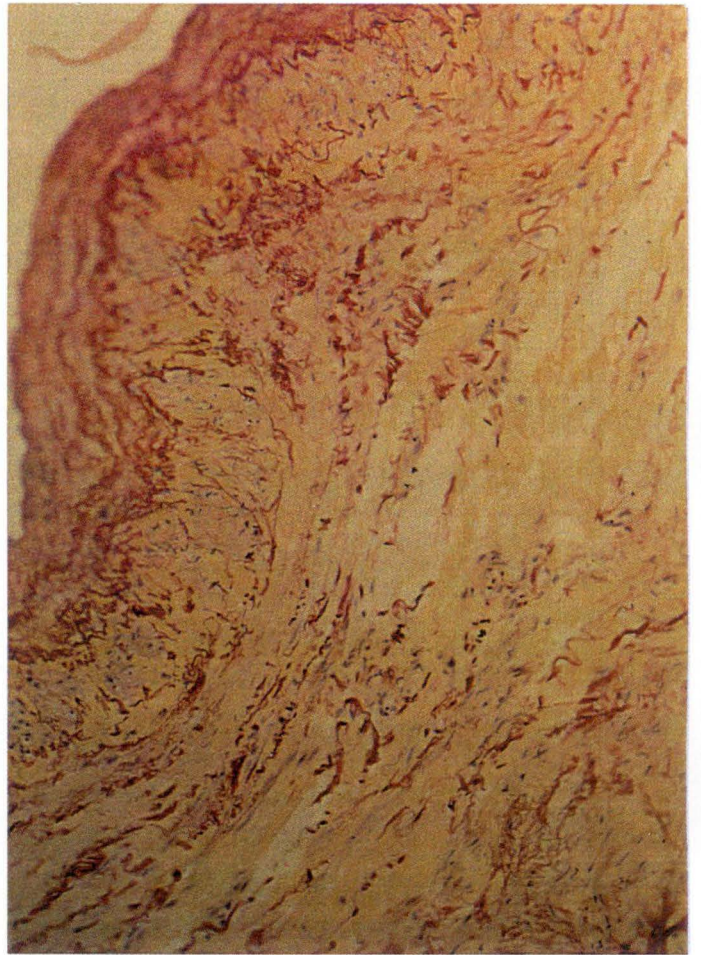
B



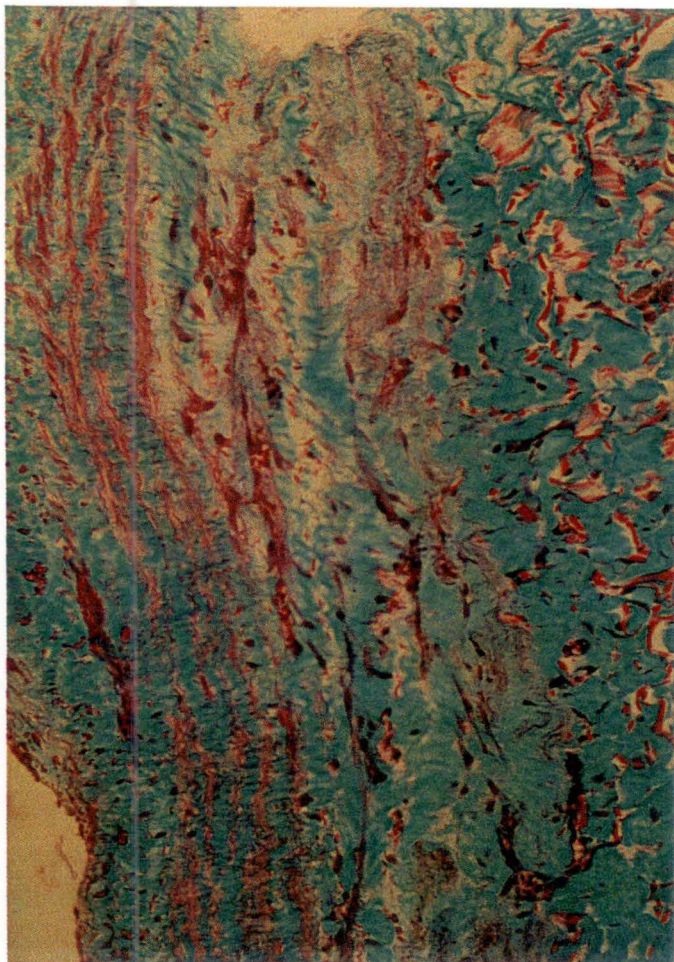
C



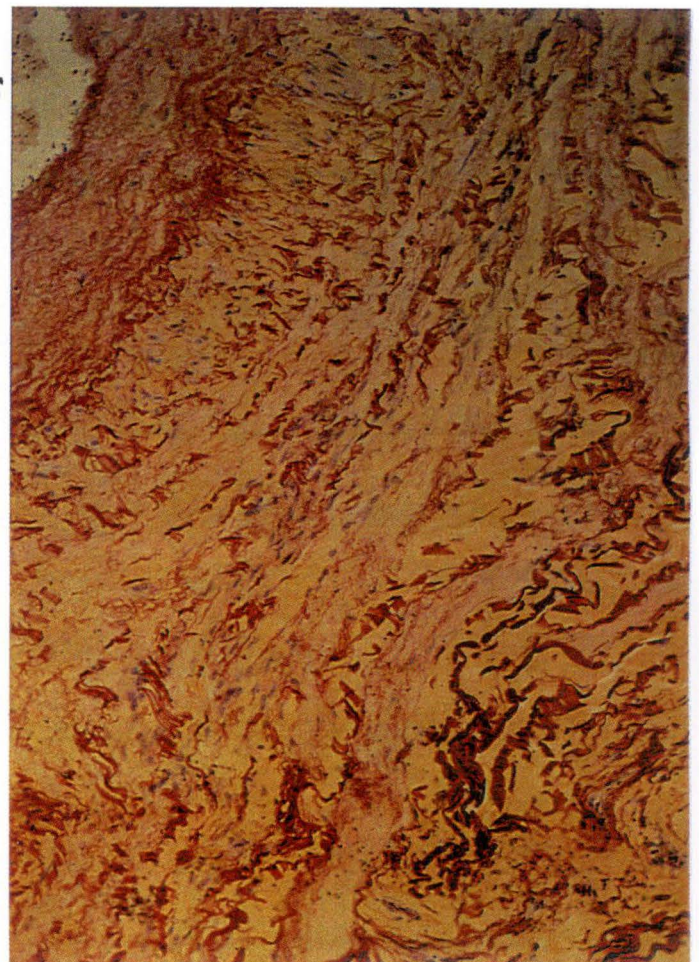
D



E

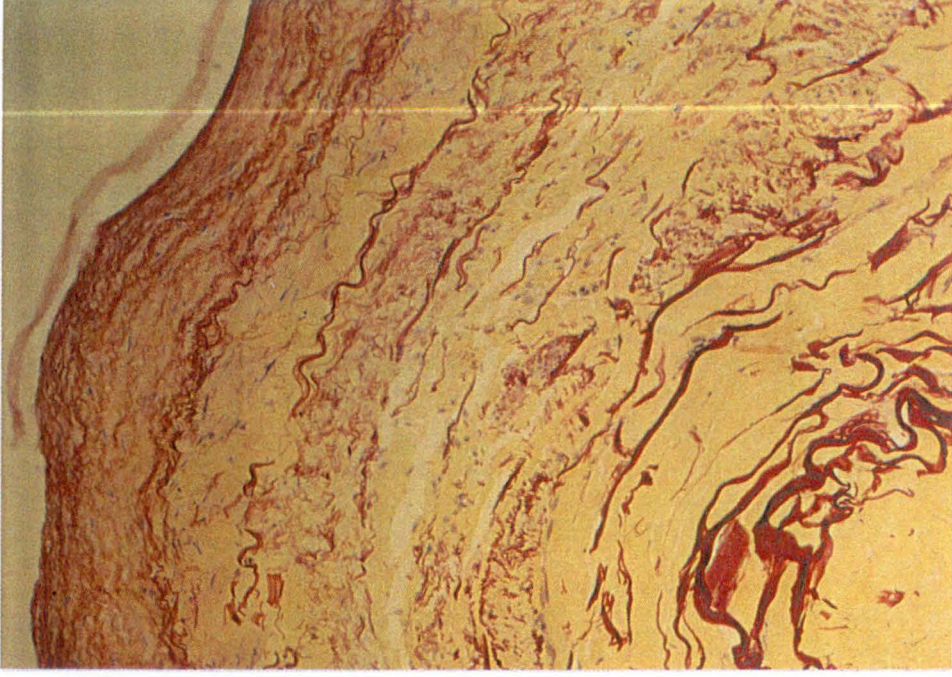


F

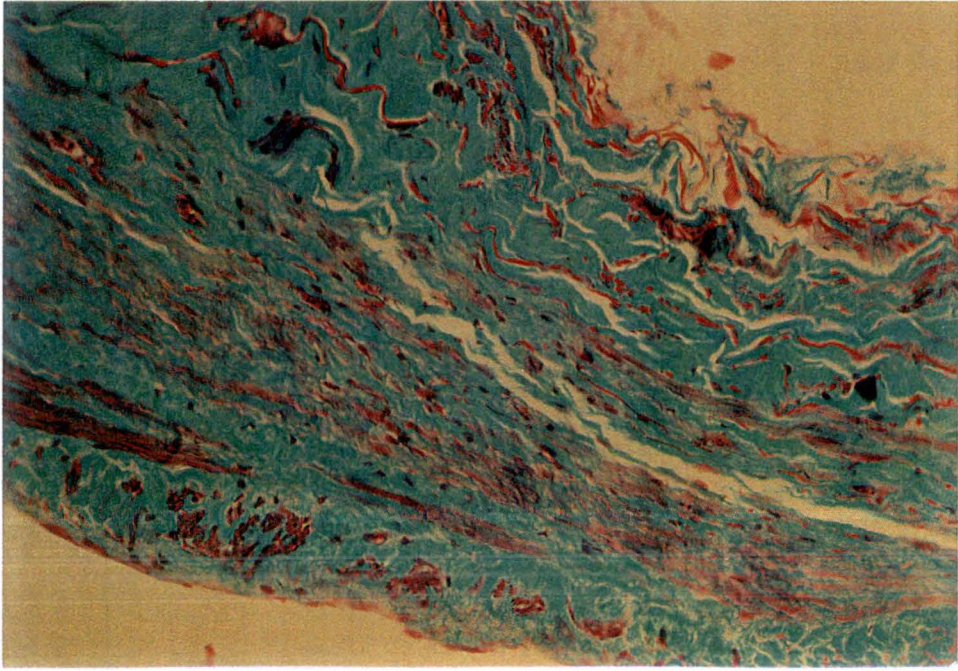




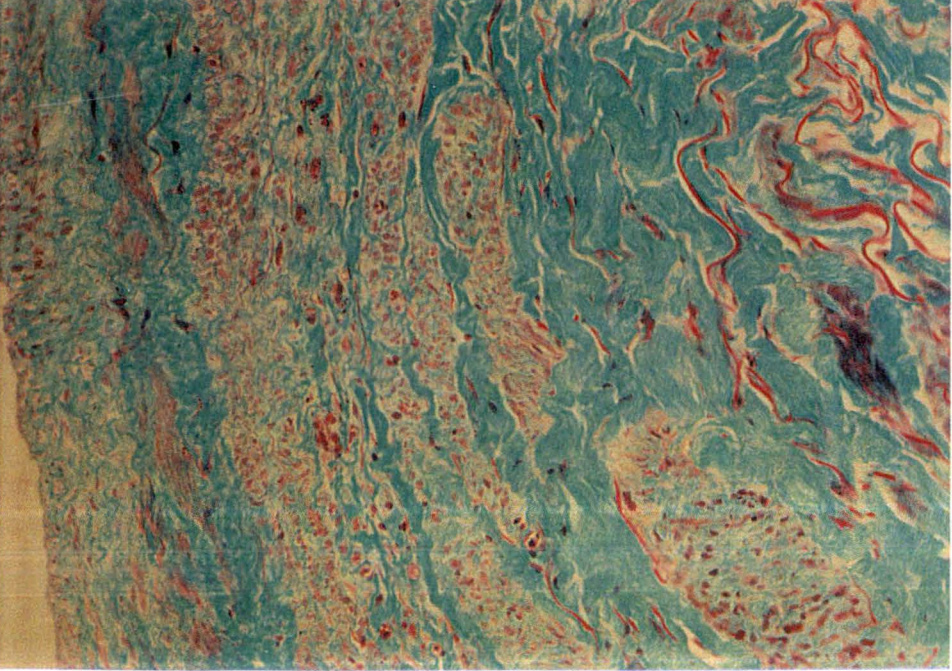
H



J



G



I

Premièrement, le trichrome vert de Masson nous permet de constater qu'il n'y a pas de dommages tissulaires au niveau de la paroi veineuse durant les 13 jours d'organoculture : les différentes couches cellulaires restent bien individualisées et on n'observe pas de nécrose cellulaire.

La coloration à l'orcéine met en évidence un épaississement important de l'intima au jour 13 de l'organoculture. Cet épaississement est le seul que nous avons observé de manière si marquée pour les différentes organocultures que nous avons suivies morphologiquement.

Soyombo *et al.* (1995) ainsi que Bai *et al.* (1994) ont montré qu'un simple étirement des couches musculaires lisses lors du prélèvement de la veine pouvait être un stimulus pour la prolifération des CML et le développement d'une néointima comme celle observée sur la photo D. Selon Soyombo *et al.* (1990, 1993b), la néointima est probablement la cause d'une migration des cellules musculaires lisses de la média vers l'intima où elles prolifèrent et déposent leur matrice extracellulaire.

Nous avons ensuite étudié l'influence du bFGF et de la $PGF_{2\alpha}$ sur la morphologie de la paroi veineuse lors des organocultures de veine saphène humaine et ce, après 7 et 14 jours de culture. Ces études ont été réalisées en parallèle avec des études biochimiques qui seront expliquées dans la suite de ce travail.

La figure III.3 présente les résultats obtenus en présence de bFGF. Les photos A et B illustrent la morphologie de la paroi veineuse au jour 0. On y observe que l'intima et la média présentent un aspect normal.

Les photos C, D, G et H présentent l'évolution de l'organoculture en conditions contrôles après 7 et 13 jours. On peut voir que l'intima reste d'épaisseur relativement constante au cours de la culture. On observe également un certain nombre de fibres élastiques réparties dans la média et l'adventice.

Les photos E, F, I et J représentent quant à elles des morceaux de la même veine mis en culture en présence de 5ng/ml de bFGF. Elles ont été prises respectivement au septième et treizième jour de l'organoculture. On y observe une intima d'épaisseur nettement plus importante que sur les contrôles. Cependant, la paroi veineuse ne semble pas s'épaissir

beaucoup plus entre le septième et le treizième jour de culture. On constate également une densité en fibres élastiques plus élevée en présence de bFGF au niveau de la média, lorsque les coupes ont été colorées à l'orcéine (photos F et J).

Une étude similaire réalisée sur des morceaux de veine maintenus en organoculture en présence ou en absence de $\text{PGF}_{2\alpha}$ n'a pas montré de différences liées à la présence de cette molécule. Nous n'avons donc pas illustré ces résultats dans ce chapitre.

I.1.3. Discussion

Les résultats histologiques de ce travail montrent que l'endothélium du morceau de veine saphène ne s'abîme pas au cours de l'organoculture.

En effet, si on regarde les micrographies réalisées en microscopie électronique à balayage, on observe des cellules endothéliales en monocouche tout au long de l'organoculture. Cette constatation est identique à celle réalisée par Holt *et al.* en 1992 dans son étude sur la comparaison de la réponse à une blessure pour une organoculture de veine saphène et pour une organoculture d'artère mammaire.

Cette même observation avait déjà été faite par Soyombo et son équipe en 1990. Cet auteur a remarqué en faisant lui aussi de la microscopie électronique à balayage, que l'endothélium de la veine saphène humaine se maintient en culture. Cependant, l'aspect de l'endothélium change légèrement au cours du temps : les cellules ont tendance à s'aplatir et dans le pire des cas, elles sont obligées d'émettre des lamellipodes pour combler les trous et communiquer à nouveau avec leurs voisines. Cet état est très rare et il s'observe le plus souvent sur les bords du prélèvement c'est-à-dire là où l'endothélium a été le plus endommagé par la dissection. On peut d'ailleurs, au niveau de ces bords, observer, comme l'a fait Soyombo, une gradation dans l'état de l'endothélium du centre vers les bords de l'organoculture.

C'est ainsi que du centre de l'échantillon vers l'extrémité du bord, on rencontre d'abord un endothélium tout à fait intact puis cet endothélium présente de nombreux trous et lamellipodes pour finir sur les bords de l'échantillon avec la matrice sub-endothéliale à nu (absence de l'endothélium).

Le centre du prélèvement est quant à lui tout à fait intact avec de temps à autre une cellule manquante suite à une mort cellulaire ou à un mauvais traitement de l'endothélium lors des manipulations avant et pendant l'organoculture (dissection, changement de milieu, ...).

La formation d'une néointima (épaississement de la couche intimale) semble être une caractéristique typique des organocultures.

En effet, comme l'ont montré Holt *et al.* en 1992 et Soyombo *et al.* en 1990 et 1995, cette néointima se forme tant dans les organocultures d'artères (Holt *et al.* 1992) que dans les organocultures de veines (Soyombo *et al.* 1993). La formation de cette néointima peut même être induite par une blessure de l'endothélium ou être la conséquence d'un pontage coronarien par exemple. Ces deux auteurs ont principalement étudié le cas de la veine saphène humaine.

Tout comme ces études relevées dans la littérature, les résultats histologiques de ce travail montrent dans certains cas un épaississement de la couche intimale.

Selon ces auteurs, il existe un facteur dérivé de l'endothélium qui agirait comme facteur de croissance sur les cellules musculaires lisses. Soyombo (1993b) a d'ailleurs proposé comme candidat, le bFGF mais aucune preuve n'a été mise en évidence.

Le fait qu'un facteur de croissance dépendant de l'endothélium soit impliqué dans la formation de la néointima a été découvert en dénudant l'endothélium et en observant les effets de cette manipulation sur l'épaisseur de la néointima. Ainsi par exemple, en 1993, Soyombo affirme que la dénudation de l'endothélium réduit l'épaisseur de la néointima de 75%.

Le facteur soupçonné doit sans doute avoir un effet chémoattractant sur les cellules musculaires lisses. De ce fait, elles migrent suivant le gradient de concentration de ce facteur et elles se retrouvent dans l'intima où elles vont proliférer.

Cette prolifération n'explique cependant pas totalement l'apparition de la néointima. En effet, Holt *et al.* en 1992 ont montré par la microscopie électronique à transmission que les cellules musculaires lisses de la néointima montrent une quantité accrue de réticulum endoplasmique rugueux ainsi qu'une diminution de la quantité de filaments d' α -actine. Ceci est dû à la modulation phénotypique des cellules musculaires lisses. Puisque les cellules

musculaires lisses de la néointima se trouvent dans un état synthétique plutôt que contractile, elles vont synthétiser de manière accrue les composants de la matrice extracellulaire.

C'est donc la migration des cellules musculaires lisses dans l'intima ainsi que leur modulation phénotypique qui seraient responsables de l'apparition de la néointima. N'oublions cependant pas que cette cascade d'événements semble être dirigée par un facteur dépendant de l'endothélium et qui joue le rôle de facteur de croissance.

Les résultats obtenus dans ce travail lors de l'incubation des morceaux de veine saphène en présence de bFGF montrent une néointima plus importante en présence de ce facteur de croissance par rapport aux morceaux issus de la même veine mais incubée sans ce facteur. Ils indiquent également que le bFGF, ajouté de façon exogène, est capable d'induire la formation d'une néointima. On pourrait donc penser qu'une stimulation de l'endothélium qui lui ferait synthétiser du bFGF, comme c'est le cas dans l'hypoxie, pourrait jouer un rôle important dans l'induction de l'épaississement de la paroi veineuse.

I.2. Biochimie : étude de la viabilité (ATP) et de la prolifération cellulaire

Ces études biochimiques servent à compléter et/ou vérifier les études histologiques préalablement réalisées.

Deux types de dosages ont principalement été utilisés. le dosage de l'ATP et le dosage de l'ADN.

En effet, le dosage de l'ATP permet de vérifier la viabilité cellulaire : on mesure principalement l'ATP contenu dans les CML. D'autre part, le dosage de l'ADN nous informe d'une éventuelle prolifération cellulaire. Ces données sont essentielles afin de suivre l'état de l'organoculture au cours du temps.

I.2.1. Dosage de l'adénosine triphosphate (ATP)

Ce dosage permet de contrôler la viabilité globale du morceau maintenu en organoculture. En effet, l'ATP est une molécule essentielle à la survie des cellules et est rapidement dégradée en cas de mort cellulaire. Si une nécrose cellulaire se passe dans l'organoculture, la quantité d'ATP associée au morceau de veine diminuera.

Dans un premier temps, le dosage a été réalisé selon le protocole existant au laboratoire. Ce mode opératoire utilise "l'ATP releasing agent" (Sigma) pour perméabiliser les cellules. Cette perméabilisation a pour conséquence la libération de l'ATP dans le milieu extracellulaire. On dose ensuite l'ATP directement dans ce milieu.

La poudre de veine, résultant de l'homogénéisation réalisée à - 70 °C, est mise en présence de ce réactif et les microtubes sont centrifugés le plus rapidement possible. Suite à cela, le surnageant est récupéré pour doser l'ATP alors que le culot est conservé pour doser l'ADN.

Le dosage de l'ATP s'effectue grâce au système luciférine-luciférase. Le dosage effectué dans ce cas est identique à celui décrit dans le matériel et méthode de ce travail (point II.2).

A la suite de différents essais réalisés sur différents morceaux de veine, nous avons remarqué que la quantité d'ATP mesurée dans ces conditions expérimentales n'est pas reproductible. En effet, nous avons obtenu une fois 90 nmoles d'ATP/gr de poudre de veine et la fois suivante, la valeur n'est plus que de 4,2 nmoles d'ATP/gr de poudre de veine. Ces chiffres correspondent respectivement à la moitié et au cinquantième de la valeur de référence, citée dans la littérature, qui est de 200 nmoles d'ATP/gr de poudre de veine.

Au vu de ces résultats, le temps d'exposition de l'homogénat de veine à "l'ATP releasing agent" a été mis en cause. En effet, la notice de ce réactif stipule qu'il doit rester au contact de l'échantillon quelques secondes seulement. Or, lors de nos expériences, le temps de contact entre "l'ATP releasing agent" et la poudre de veine est de l'ordre de 3 à 7 minutes car le milieu contenant l'ATP ne peut être récupéré que grâce à une centrifugation.

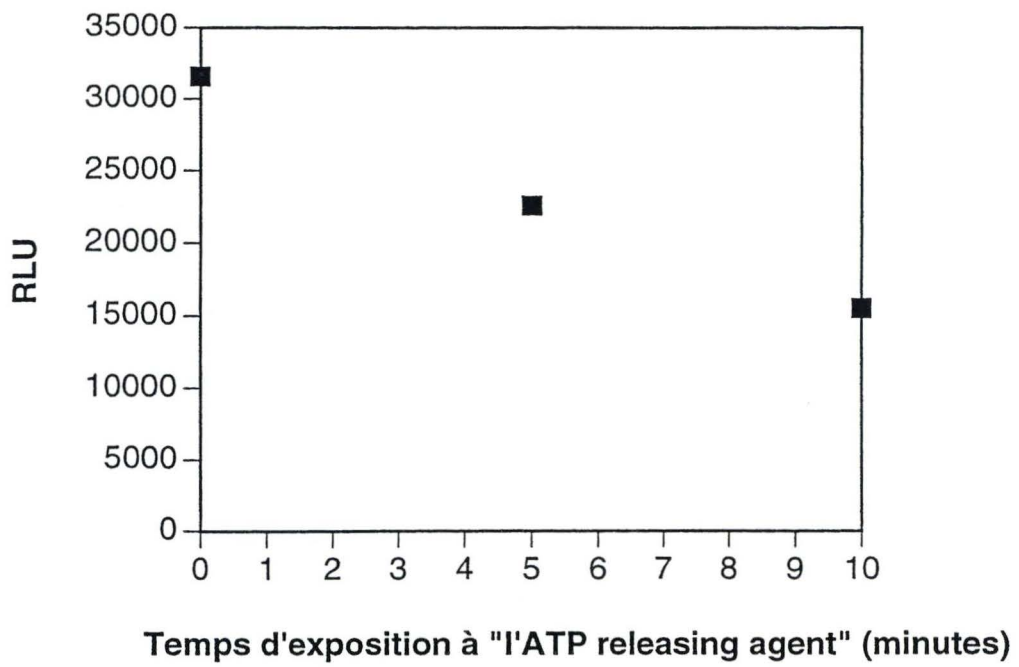


Figure III.4 : Evolution de la quantité d'ATP en fonction du temps d'exposition à "l'ATP releasing agent".

Des monocouches de cellules endothéliales sont placées en présence de ce réactif durant 0, 5 et 10 minutes. Au terme de ces incubations, le milieu est récupéré et l'ATP est dosé.

Les résultats sont exprimés en RLU (Relative Light Unit).

Afin de vérifier l'influence de ce temps sur la quantité d'ATP mesuré, des monocouches de cellules endothéliales ont été placées durant 0, 5 et 10 minutes au contact du réactif. En effet, jusqu'à présent, "l'ATP releasing agent" avait été utilisé sur des monocouches cellulaires et de ce fait, ce réactif ne restait qu'une trentaine de secondes au contact des cellules car on pouvait directement récupérer le milieu extracellulaire contenant l'ATP.

La figure III.4 montre que la quantité d'ATP mesurée diminue au fur et à mesure que le temps de contact des cellules avec "l'ATP releasing agent" augmente.

Après 10 minutes d'exposition en présence de "l'ATP releasing agent", la quantité d'ATP que l'on détecte ne correspond plus qu'à la moitié de la quantité d'ATP que l'on trouve au temps 0. Pour ce temps, les cellules n'ont été en contact de "l'ATP releasing agent" que 20 à 30 secondes. On ne peut donc pas utiliser ce réactif dans le cas des morceaux de veine saphène.

Nous avons donc choisi un autre réactif capable de perméabiliser les cellules et donc de libérer l'ATP dans le milieu extracellulaire sans que ce réactif ne dégrade rapidement l'ATP : nous avons utilisé l'acide perchlorique à 4 °C.

On resuspend donc la poudre de veine, obtenue après homogénéisation du morceau de veine, dans de l'acide perchlorique. On centrifuge ensuite. Au terme de cette centrifugation, le culot est conservé pour doser l'ADN tandis que le surnageant est récolté et mis en présence d'un mélange trioctylamine-fréon. La trioctylamine neutralise l'acide perchlorique tandis que le fréon sert à extraire l'ATP du mélange. Après centrifugation, on retrouve trois phases et la phase supérieure contenant l'ATP est récupérée.

On dose ensuite l'ATP par la méthode classiquement utilisée au laboratoire : le système luciférine-luciférase. Les mesures d'ATP dans ces conditions semblent plus reproductibles qu'avec la méthode utilisant "l'ATP releasing agent". Nous l'avons donc appliquée aux morceaux de veines issus de deux organocultures différentes.

Les résultats de la figure III.5 montrent que la quantité d'ATP mesurée dans les différents morceaux de veine d'une même organoculture reste constante durant toute la durée de l'organoculture et ce pour les deux expériences réalisées.

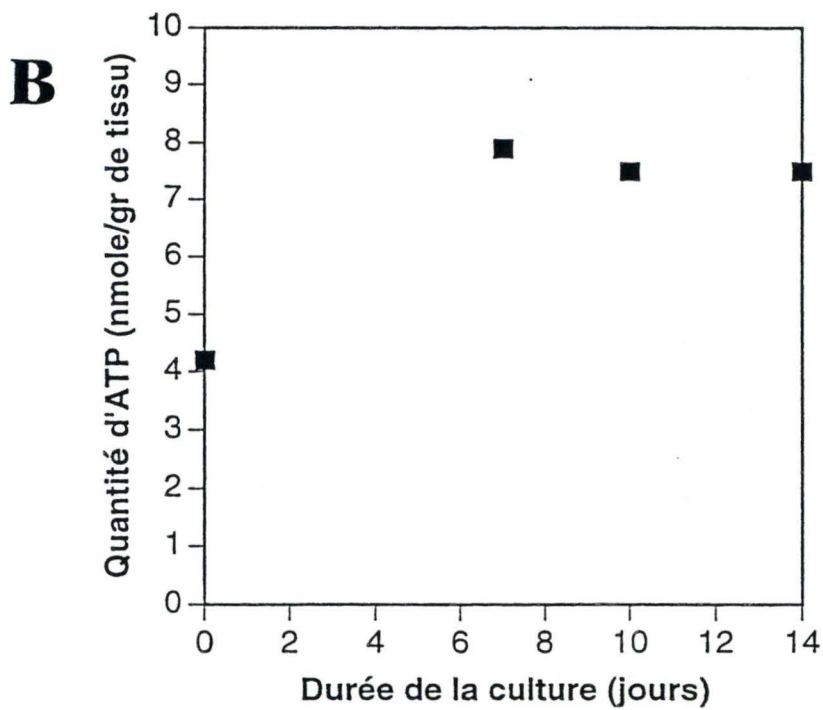
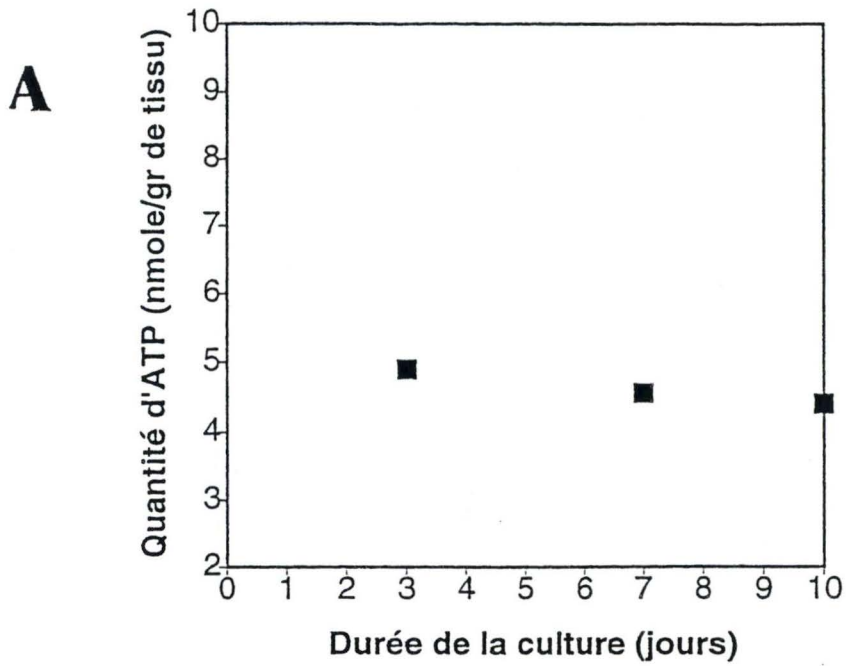


Figure III.5 : Evolution de la quantité d'ATP en fonction de la durée de la culture. Les morceaux d'une même veine sont maintenus en organoculture pendant 3, 7, 10 et 14 jours. Ces morceaux de veine sont ensuite conservés à -70°C en attendant le dosage d'ATP. Les résultats sont présentés pour deux expériences (A et B) en nmoles d'ATP par gramme de tissu.

On observe que dans l'expérience présentée à la figure III.5B, la quantité d'ATP/gr de veine, après 7, 10 et 14 jours de culture est supérieure à celle mesurée au jour 0. Cela pourrait indiquer une augmentation du contenu cellulaire ou une récupération des cellules qui auraient été légèrement endommagées soit lors du prélèvement soit lors de la dissection.

Les mesures d'ATP au cours de l'organoculture indiquent que la viabilité globale des cellules présentes dans le morceau de veine se maintient au cours de cette culture. Ces résultats sont en accord avec les résultats des études morphologiques qui montrent une structure intacte des différentes couches de la paroi veineuse et ne mettent pas en évidence de zones nécrosées à la fin de la culture.

Il faut cependant remarquer que les valeurs d'ATP ne sont que de 4 à 5 nmoles d'ATP/gr de poudre de veine. Elles sont donc 40 à 50 fois plus faibles que la valeur de référence qui est de 200 nmoles d'ATP/gr de poudre de veine.

Il convient de signaler que les morceaux de veine, ayant subi l'organoculture, ont été conservés à - 70 °C pendant plusieurs mois, le temps que le dosage soit tout à fait mis au point. En comparant ces valeurs à celles obtenues sur des morceaux qui n'ont été conservés que quelques jours, on peut dire que la conservation à - 70 °C entraîne une dégradation de l'ATP au cours du temps. Ceci expliquerait ces valeurs relativement basses présentées à la figure III.5.

I.2.2. Dosage de l'acide désoxyribonucléique (ADN)

Ce dosage a été réalisé dans le but de suivre quantitativement une éventuelle prolifération cellulaire. Cette prolifération a déjà été mise en évidence de manière indirecte par les études morphologiques : nous avons en effet observé dans certains cas un développement d'une néointima.

Comme pour l'ATP, il existe, au laboratoire, un protocole pour le dosage de l'ADN. Nous avons donc commencé par utiliser ce protocole.

Dans ce mode opératoire, le culot (ce qui reste lorsqu'on a récupéré "l'ATP releasing agent" ou l'acide perchlorique) est placé 1/2 heure en présence de l'éthanol absolu.

Ce traitement permet la perméabilisation des cellules, la dissolution dans l'éthanol d'une partie des lipides présentes dans le culot et la précipitation de l'ADN.

Ensuite, après centrifugation, le surnageant est décanté et le culot est resuspendu dans NaCl dans le but de resuspendre l'ADN. Au terme de cette étape, l'ADN est précipité à l'éthanol absolu et le culot est finalement resuspendu dans une solution saline contenant de l'iodure de propidium. Cette molécule s'intercale entre les bases de l'ADN et devient fluorescente.

Cette méthode nous a permis de récupérer, au maximum, 28 à 82 ng d'ADN/mg de poudre de veine. Cette valeur reste 4 à 5 fois plus faible que la valeur de référence qui est de 400 ng d'ADN/mg de poudre de veine.

Cette différence peut s'expliquer par le fait qu'au laboratoire, cette méthode est appliquée pour doser l'ADN de monocouches cellulaires. Il n'y a donc pas "d'obstacles" sur le passage de l'éthanol et du NaCl vers l'ADN des cellules. Par contre, dans la poudre de veine, les cellules sont enrobées dans un amas de tissu conjonctif et ne sont pas nécessairement bien dissociées les unes des autres par l'homogénéisation. Dans ce cas, tout l'ADN n'est probablement pas récupéré.

Il faut donc utiliser un protocole qui permet de mieux récupérer l'ADN, c'est-à-dire qui utilise des méthodes plus drastiques.

Le culot résultant de la perméabilisation à l'acide perchlorique est resuspendu à nouveau dans cet acide et est ensuite soniqué. Cette sonication permet de casser les amas de cellules qui libèrent alors leur ADN. Après cela, le culot subit trois lavages à l'éthanol absolu ce qui permet d'éliminer une grande majorité des lipides qui y sont présents. Ces lavages terminés, le culot va subir une hydrolyse de 30 minutes en présence d'une solution d'acide diaminobenzoïque (DABA) dans l'HCl : l'HCl permet d'hydrolyser l'ADN tandis que le DABA réagit avec les nucléotides libérés par cette hydrolyse pour donner un produit fluorescent.

Les premiers résultats observés grâce à ce protocole montrent que la quantité d'ADN récupérée est largement supérieure à la valeur de référence. En effet, nous récupérons de 10 000 à 30 000 ng d'ADN/mg de poudre de veine alors que la valeur de

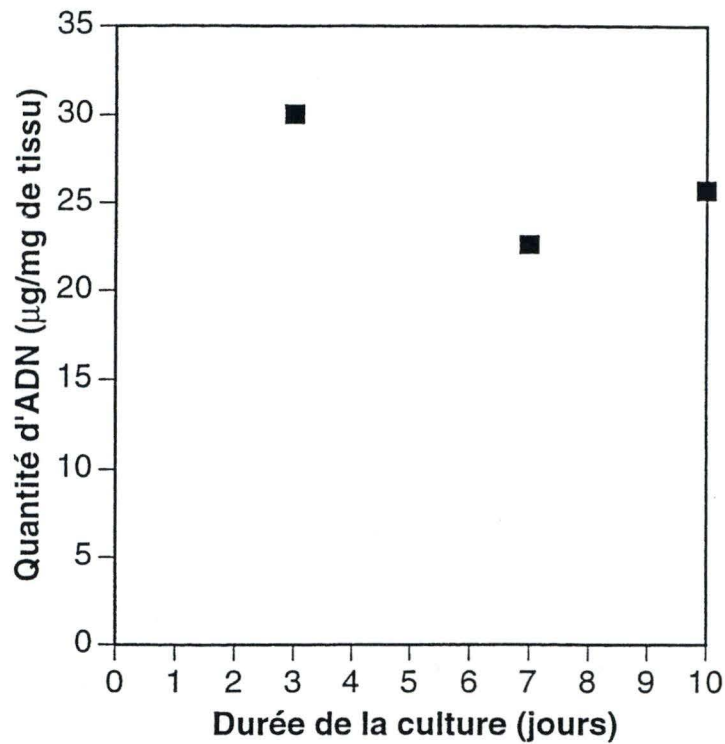
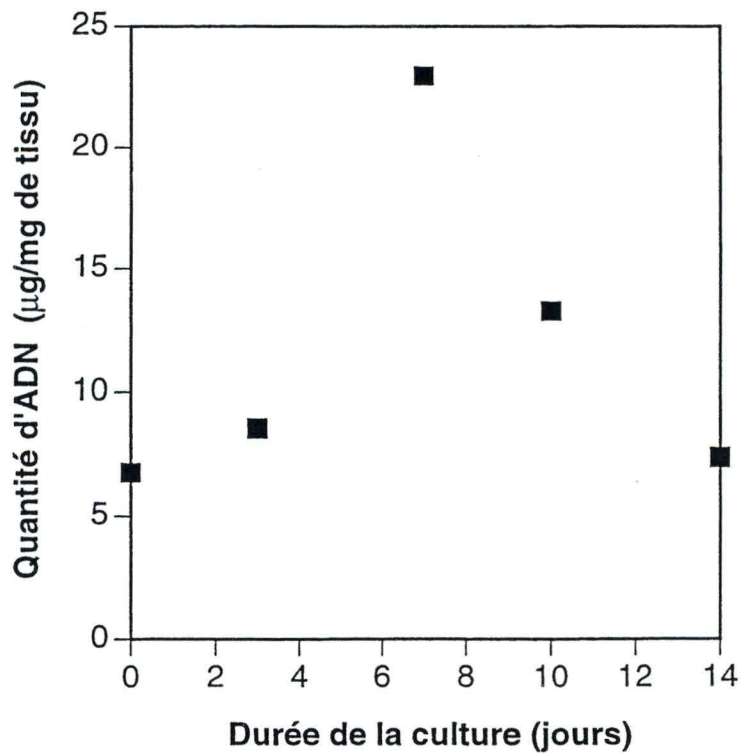
A**B**

Figure III.6 : Evolution de la quantité d'ADN en fonction de la durée de la culture. Les morceaux d'une même veine sont maintenus en organoculture pendant 3, 7, 10 et 14 jours. Ces morceaux de veine sont ensuite conservés à $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en attendant le dosage d'ADN. Les résultats sont présentés pour deux expériences (A et B) en μg d'ADN par milligramme de tissu.

référence est de 400 ng/mg de poudre de veine. Aucune explication satisfaisante ne peut être proposée jusqu'à présent pour expliquer cette discordance.

Nous avons ensuite utilisé cette méthode afin de suivre l'évolution du contenu en ADN des morceaux de veine, au cours de l'organoculture. La figure III.6 illustre les résultats des deux expériences complémentaires à la figure III.5.

Compte tenu de la variabilité inhérente au dosage, on n'observe pas d'augmentation claire de la quantité d'ADN au cours de l'organoculture. Ceci signifie qu'il n'y a pas de prolifération cellulaire importante durant les 14 jours de culture. S'il y a une prolifération faible, le dosage ne permet pas de la détecter.

Pour des raisons d'approvisionnement en veines saphènes humaines, l'expérience n'a pu être réalisée que deux fois.

I.2.3. Discussion

Pouvoir suivre la viabilité et la prolifération cellulaire d'une organoculture est essentiel non seulement afin d'en suivre l'évolution au cours du temps mais aussi afin de quantifier un effet éventuel de molécules mises en présence des organocultures.

Il est facile de suivre la prolifération de monocouches de cellules endothéliales, musculaires lisses ou encore de fibroblastes : on observe au microscope si les cellules sont jointives ou non. Un dosage d'ADN peut également être réalisé rapidement.

La viabilité cellulaire est également facilement quantifiée par l'utilisation de colorants vitaux tels que le trypan bleu.

Ces techniques ne sont cependant pas applicables au modèle de l'organoculture car celui-ci ne met pas en jeu une couche de cellules mais un organe dans sa totalité.

Il fallait donc mettre au point une méthode quantitative de dosage de l'ATP afin de suivre la viabilité des cellules du morceau de veine, et de l'ADN, indice de la quantité de cellules présentes.

De plus, pouvoir réaliser ces deux dosages sur le même morceau de veine présente l'avantage d'économiser les morceaux de veine, avantage énorme lorsque le matériel de départ est limitant.

Nous avons ainsi finalement établi un protocole qui commence par une homogénéisation par pilage du morceau de veine dans l'azote liquide, perméabilisation et libération de l'ATP par l'acide perchlorique et isolement de l'ADN par sonication, précipitation à l'éthanol et dosage par l'HCl/DABA.

Les résultats obtenus sur deux organocultures différentes montrent un profil constant. Ces résultats indiquent que la viabilité des cellules musculaires lisses est maintenue durant les 14 jours de culture. Ils concordent avec ceux observés par Holt *et al.* en 1992. D'autre part, les résultats suggèrent aussi qu'il n'y a pas de prolifération excessive des cellules.

Il est à noter cependant que cette situation est assez exceptionnelle. En effet, le stripping, la dissection et la mise en culture ne peuvent pas s'effectuer sans causer de légers dommages à la paroi cellulaire. Malheureusement, ceci signifie que d'une veine à l'autre, la sévérité des dégâts infligés à l'endothélium et aux cellules musculaires lisses va différer et induire une variabilité qui peut être différente d'organoculture à organoculture.

Les forces de tension exercées à ce moment au niveau des cellules musculaires lisses peuvent en induire la prolifération et le développement d'une néointima. Ce développement a effectivement été observé dans certains cas lors des études morphologiques (voir figure III.2). Le dosage d'ADN correspondant à cette organoculture ne montre cependant pas d'augmentation de la quantité d'ADN au cours du temps (voir figure III.7B).

II. Utilisation du modèle expérimental

II.1. Effets des mitogènes

L'effet de deux facteurs de croissance a été étudié dans ce travail. Ce sont la $\text{PGF}_{2\alpha}$ et le bFGF. Tous deux sont connus pour leur effet mitogène sur les cellules musculaires lisses. Ils sont notamment synthétisés par les cellules endothéliales. En effet, lorsque ces cellules sont activées par l'hypoxie, elles subissent des modifications métaboliques qui induisent la synthèse de prostaglandines, de facteurs de croissance ainsi que du platelet-activating factor (PAF) (Michiels *et al.*, 1994 a et b).

L'hypothèse concernant le développement des veines variqueuses propose que ces facteurs de croissance peuvent ensuite diffuser et induire la prolifération des cellules musculaires lisses et ainsi provoquer la désorganisation de la paroi variqueuse.

Comme le modèle expérimental de l'organoculture permet de garder intacte la structure de la paroi veineuse et de suivre l'évolution des différentes tuniques constituant la paroi veineuse les unes par rapport aux autres, nous avons dans un premier temps ajouté de manière exogène les facteurs de croissance cités ci-dessus et suivi la prolifération des cellules ainsi que l'aspect histologique de la paroi veineuse.

Dans un deuxième temps, les morceaux ont été soumis à une hypoxie sévère dans le but de répéter ce qui avait été fait sur les cultures de cellules endothéliales et de cellules musculaires lisses isolées et de voir, si dans le cas de morceaux intacts de paroi veineuse, l'hypoxie est effectivement capable d'induire des modifications.

Dans ce paragraphe, les aspects biochimiques et histologiques de la question seront de nouveau traités en parallèle. La biochimie nous permettra de contrôler la viabilité de la culture ainsi que l'existence d'une éventuelle prolifération cellulaire alors que l'histologie, nous apportera des informations sur l'effet des mitogènes sur la structure tissulaire veineuse. Des autoradiographies seront également réalisées dans le but de localiser les foyers de prolifération cellulaire.

Afin de réaliser ces expériences, des morceaux d'une même veine ont été mis en culture en présence soit de $\text{PGF}_{2\alpha}$ soit de bFGF et en présence de méthyl thymidine tritiée

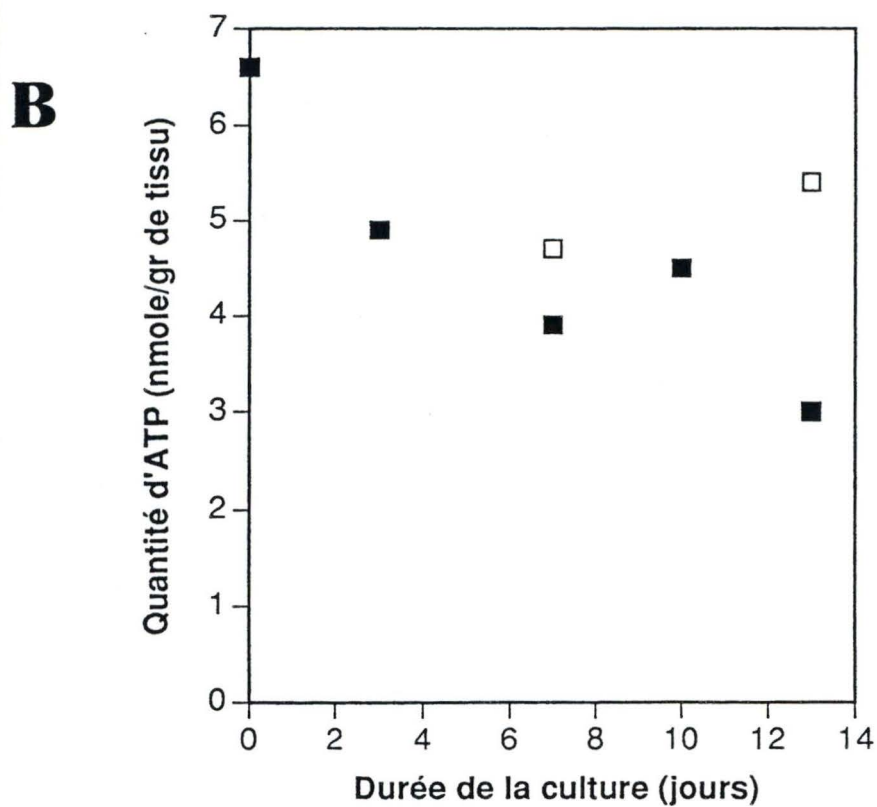
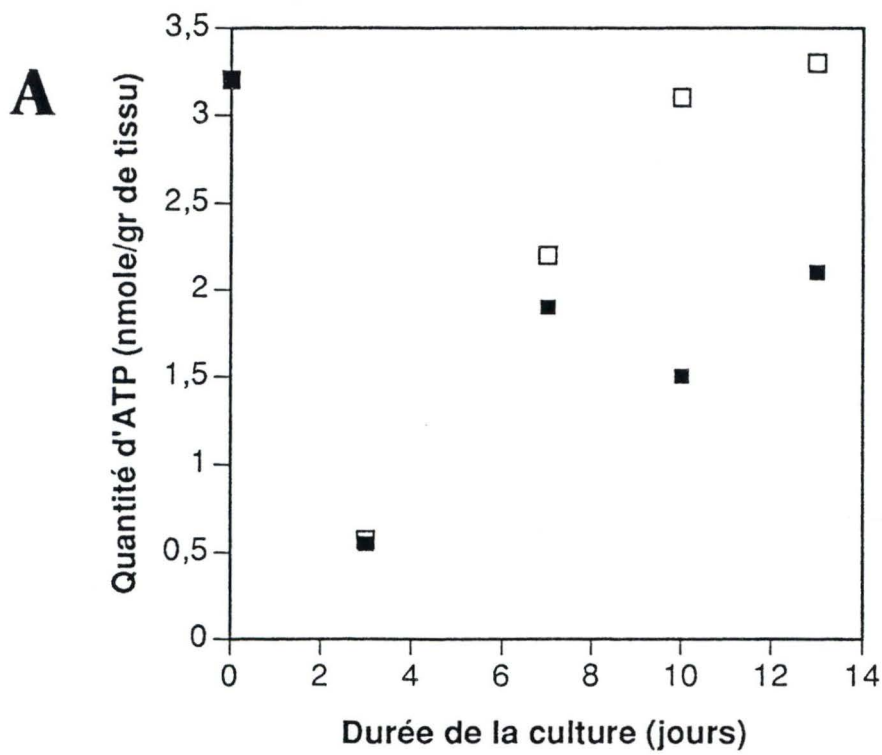


Figure III.7 : Evolution de la quantité d'ATP en fonction de la durée de la culture et effet de la PGF_{2α}. Les morceaux d'une même veine sont maintenus en organoculture pendant 3, 7, 10 et 14 jours en présence (□) ou en absence (■) d'une concentration de PGF_{2α} de $3,6 \cdot 10^{-9}$ M. Les résultats sont présentés pour deux expériences (A et B) en nmoles d'ATP par gramme de tissu.

pendant 14 jours de culture. Il est à noter que les veines sont différentes d'une expérience à l'autre. Au cours de la culture, des morceaux ont été fixés et puis préparés pour la microscopie optique et les autoradiographies, alors que d'autres ont été plongés dans l'azote liquide pour la quantification de l'incorporation de thymidine radioactive ainsi que les dosages d'ADN et d'ATP.

II.1.1. Effets de la $\text{PGF}_{2\alpha}$

Le premier mitogène que nous avons testé est la $\text{PGF}_{2\alpha}$. En effet, Michiels *et al.* (1994) ont montré que les cellules endothéliales stimulées par l'hypoxie synthétisent des prostaglandines en grande quantité et que la $\text{PGF}_{2\alpha}$ était directement responsable de l'activité pro-proliférative pour les cellules musculaires lisses présentes dans les milieux conditionnés par les cellules endothéliales hypoxiques.

Nous avons donc voulu vérifier si cette prostaglandine, ajoutée de façon exogène, était capable d'induire la prolifération des cellules musculaires lisses au sein de la paroi veineuse et/ou des altérations de l'organisation des différentes couches de la paroi veineuse.

La figure III.7 montre l'évolution de la quantité d'ATP en fonction du nombre de jours de l'organoculture pour des morceaux de veine incubées en présence de $3,6 \cdot 10^{-9}$ M de $\text{PGF}_{2\alpha}$ par rapport à des morceaux maintenus dans des conditions normales.

On constate au niveau du graphe que le profil est similaire dans les deux expériences réalisées : c'est un graphique en "V". Au jour 0 de l'organoculture, c'est-à-dire au jour de réception de la veine, la quantité d'ATP que l'on mesure est de l'ordre de 3 à 6,5 nmoles/gr de poudre de veine. Ensuite, au jour 3 de la culture, cette quantité chute de manière plus ou moins forte en fonction de la veine. La déplétion de la quantité d'ATP peut varier entre 1,5 et 6 nmoles d'ATP. Ceci peut probablement s'expliquer par le fait que les morceaux de veine doivent récupérer des légers dommages induits par le prélèvement et/ou la dissection.

Après le troisième jour de culture, on a l'impression que les morceaux ont récupéré et ceci est observable sur le graphe sous forme d'une augmentation de la quantité d'ATP au cours du temps. Cette observation est valable tant pour les morceaux contrôles que pour les morceaux traités à la $\text{PGF}_{2\alpha}$.

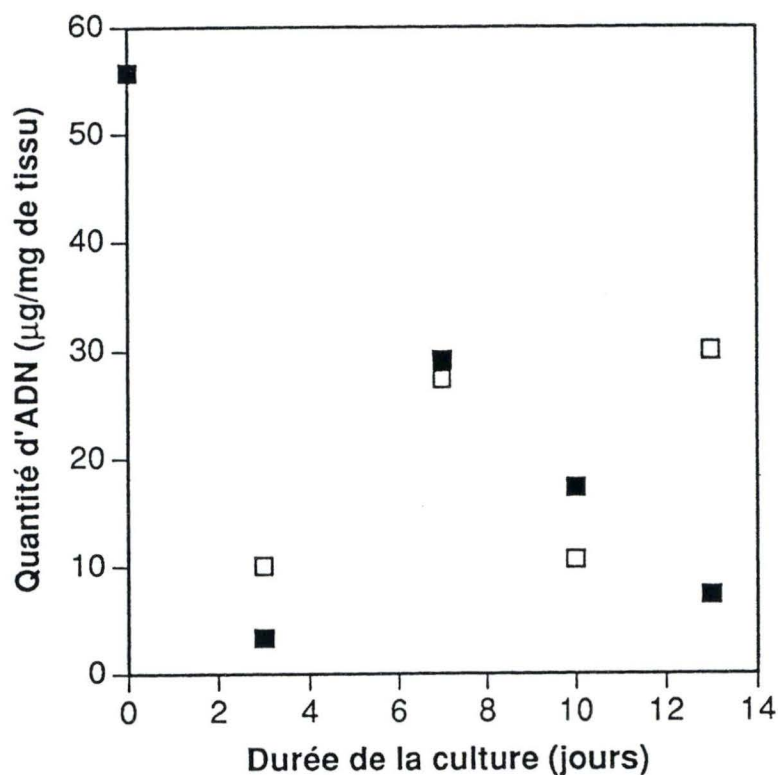
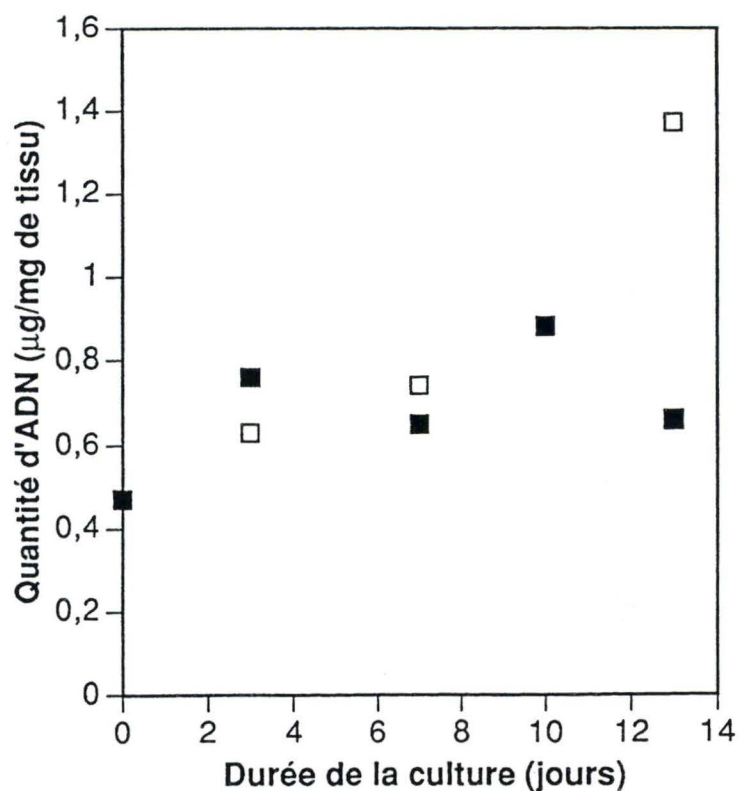
A**B**

Figure III.8 : Evolution de la quantité d'ADN en fonction de la durée de la culture et effet de la $\text{PGF}_{2\alpha}$. Les morceaux d'une même veine sont maintenus en organoculture pendant 3, 7, 10 et 14 jours en présence (□) ou en absence (■) d'une concentration de $\text{PGF}_{2\alpha}$ de $3,6 \cdot 10^{-9}$ M. Les résultats sont présentés pour deux expériences (A et B) en µg d'ADN par milligramme de tissu.

Ces résultats correspondent à ce qu'ont décrit Soyombo *et al.* en 1990. Dans leurs travaux, on peut voir que la quantité d'ATP diminue d'approximativement 30 % après 7 jours de culture. Ces auteurs associent cette baisse de l'ATP à une perte de quelques cellules musculaires lisses. D'après eux, cette perte n'est pas vitale pour l'organoculture et en effet, ils constatent, comme dans ce travail, que la chute d'ATP est suivie d'une réaugmentation de la quantité d'ATP. Ceci signe la présence de nouvelles cellules.

Il faut cependant remarquer que dans les deux expériences, il y a une différence entre les morceaux contrôles et ceux qui ont été mis en culture dans un milieu supplémenté par la $\text{PGF}_{2\alpha}$ au cours de la suite de l'organoculture.

En effet, entre les jours 7 et 13, la quantité d'ATP reste constante dans les organocultures incubées dans des conditions contrôles. Par contre, la quantité d'ATP présente dans les organocultures incubées en présence de $\text{PGF}_{2\alpha}$ augmente en fonction du temps.

Cette tendance à l'augmentation pour les échantillons traités à la $\text{PGF}_{2\alpha}$ montre un effet "récupérateur" de cette prostaglandine. Cette molécule induirait une prolifération accrue des cellules musculaires lisses.

Il est à noter que la prolifération induite par la $\text{PGF}_{2\alpha}$ sur les cellules musculaires lisses en culture ne se montre qu'après 3 jours d'incubation. On peut donc comprendre qu'un effet similaire ne soit observé qu'au jour 7 pour les organocultures.

Après avoir suivi la viabilité cellulaire, nous avons quantifié le contenu en ADN des organocultures incubées ou non en présence de $\text{PGF}_{2\alpha}$. La figure III.8 illustre les résultats du dosage de l'ADN dans les deux expériences correspondant à la figure III.7.

La quantité d'ADN reste plus ou moins constante au cours de l'organoculture et ce pour les deux expériences. Aucun effet de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ ne semble se dégager des graphiques présentés à la figure III.8.

Notons cependant que la quantité d'ADN des morceaux traités avec la prostaglandine $\text{F}_{2\alpha}$ au jour 13 semble supérieure à celle des morceaux contrôles.

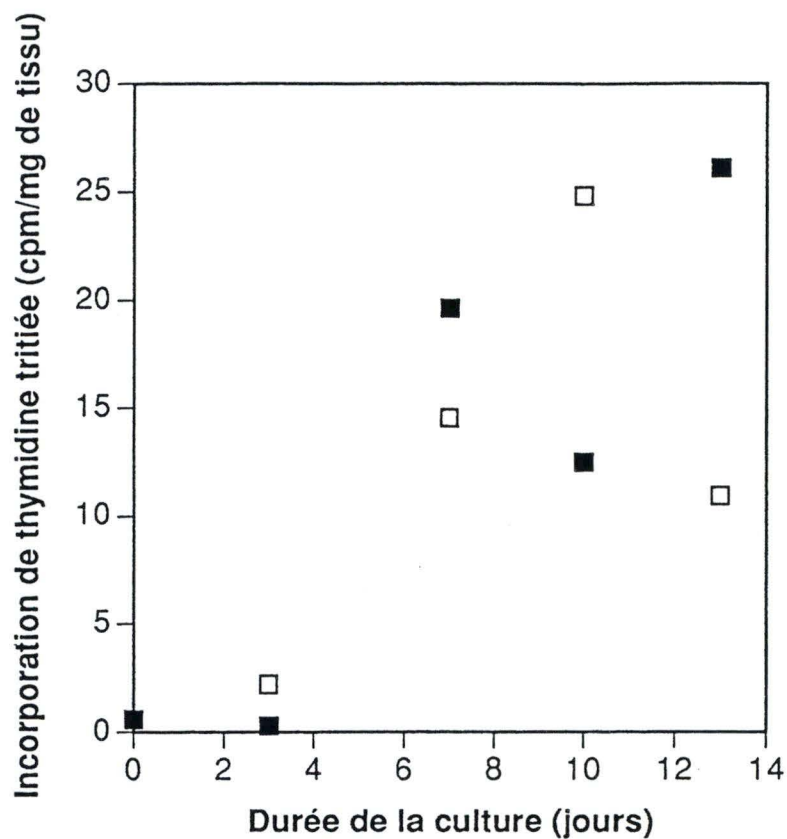
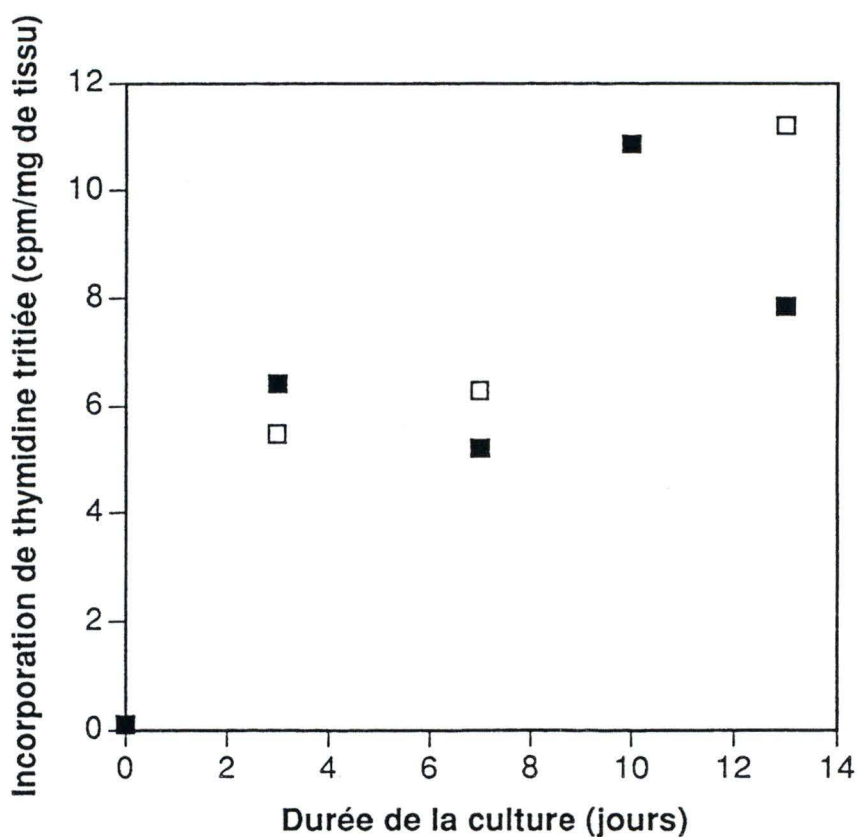
A**B**

Figure III.9 : Evolution de l'incorporation de la thymidine tritiée en fonction de la durée de la culture et effet de la PGF_{2α}. Les morceaux d'une même veine sont maintenus en organoculture pendant 3, 7, 10 et 14 jours en présence (□) ou en absence (■) d'une concentration de PGF_{2α} de $3,6 \cdot 10^{-9}$ M. Les résultats sont présentés pour deux expériences (A et B) en cpm par milligramme de tissu.

Cette augmentation de la quantité d'ADN pour les morceaux traités avec la $\text{PGF}_{2\alpha}$ pourrait indiquer un effet de ce facteur mitogène sur les cellules musculaires lisses de la média. Etant donné la grande variabilité des valeurs de quantité d'ADN observées dans ces deux expériences, l'effet pro-prolifératif de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ clairement observé dans les dosages d'ATP ne se marque vraiment qu'au jour 13 dans ce cas-ci.

Les résultats des deux dosages semblent toutefois indiquer une prolifération accrue des cellules musculaires lisses des morceaux de veine incubées en présence de $\text{PGF}_{2\alpha}$ par rapport aux morceaux maintenus dans des conditions contrôles.

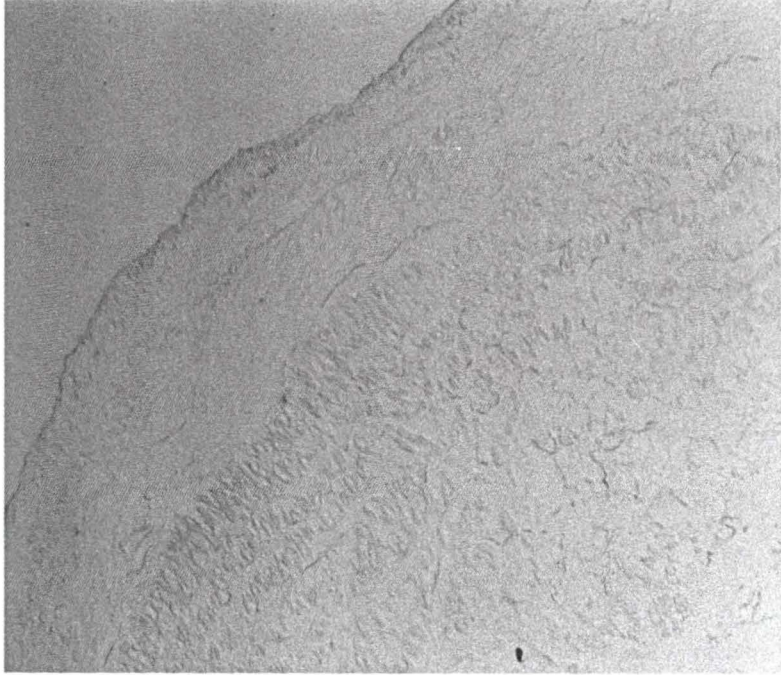
En parallèle avec les dosages d'ATP et d'ADN qui mesurent le contenu cellulaire global de l'organoculture, nous avons suivi, grâce à l'incorporation de thymidine tritiée, la prolifération cellulaire proprement dite. En effet, la thymidine n'est incorporée que lorsqu'il y a duplication de l'ADN et donc mitose.

Les graphiques présentés à la figure III.9 montrent une vague de prolifération cellulaire entre le jour 0 et le jour 3 ou 7 selon l'expérience. Cette observation est faite tant pour le contrôle que pour les échantillons traités avec de la $\text{PGF}_{2\alpha}$. On constate également qu'après cette vague, il n'y a plus de prolifération importante. Cette vague de prolifération ne semble cependant pas spécifique à la $\text{PGF}_{2\alpha}$.

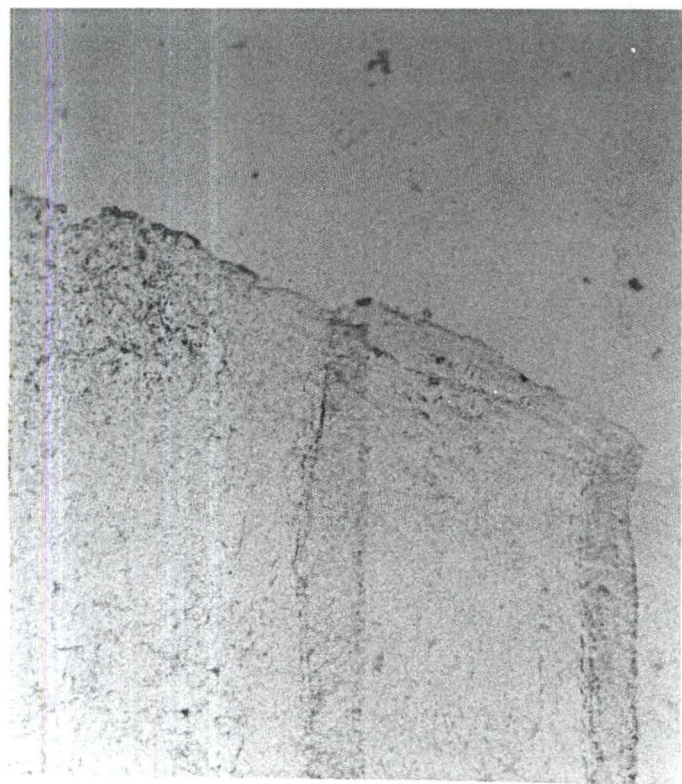
Outre les études biochimiques, deux types d'études morphologiques ont été réalisées : d'une part, une étude histologique en microscopie optique et d'autre part, des autoradiographies.

En ce qui concerne les coupes histologiques correspondant aux deux expériences décrites jusqu'à présent, les résultats ont été présentés au point I.1.2 de ce chapitre. Les résultats indiquent qu'il ne semble pas y avoir de différence dans le développement de la néointima dans les organocultures incubées en présence de $\text{PGF}_{2\alpha}$ par rapport à celles maintenues en conditions contrôles.

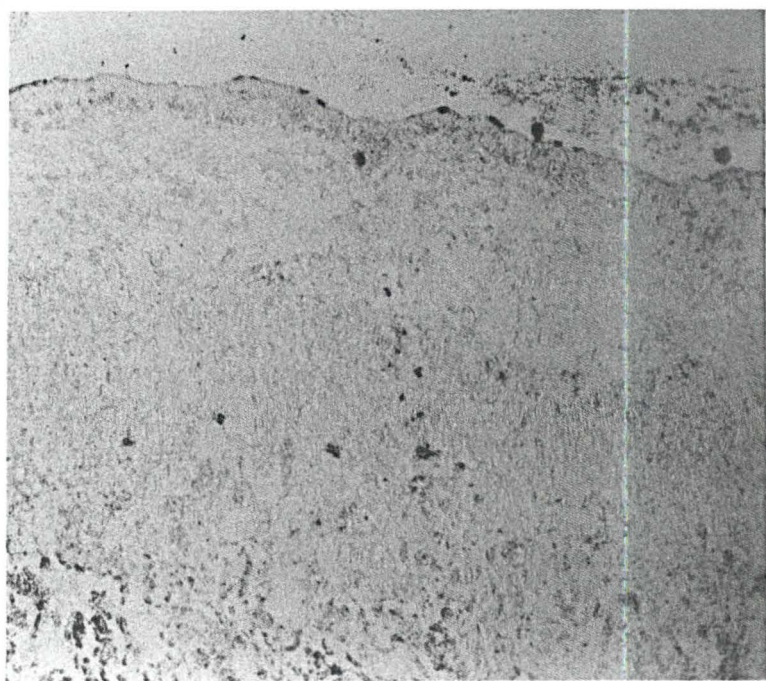
Pour ce qui est des autoradiographies, nous avons coulé une émulsion photographique sur les coupes provenant des morceaux de veines mis en culture en présence de thymidine tritiée. Après impression et révélation, on observe des noyaux marqués là où il y a eu mitose. Nous pouvons ainsi localiser précisément les foyers de prolifération cellulaire.



A



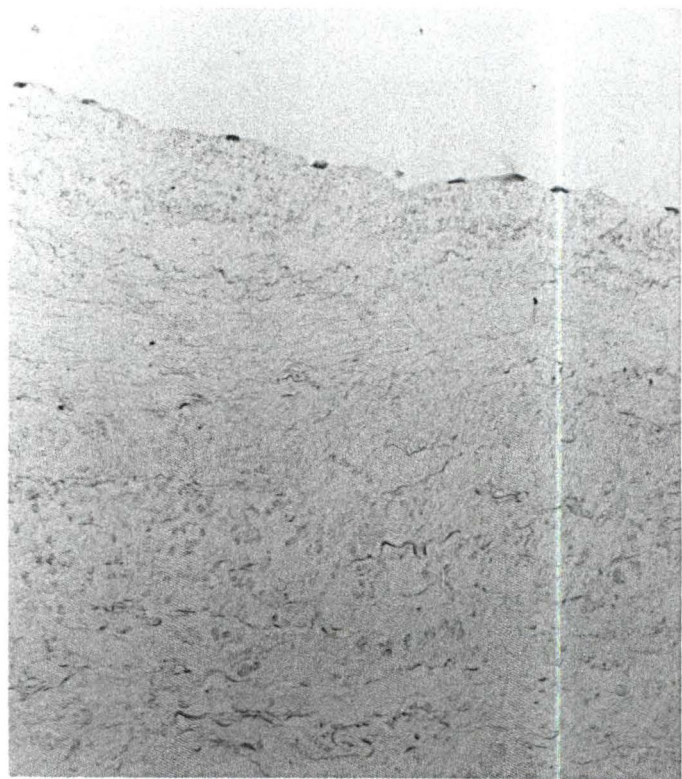
B



C



D



E

Figure III.10 : Autoradiographie réalisée sur les coupes histologiques transversales des morceaux de veine saphène humaine maintenus en organoculture. Les morceaux ont été fixés juste après le prélèvement et la dissection de la veine : jour 0 (A) ou après 7 (B, C) ou 14 jours (D, E) d'organoculture en présence (C, E) ou en absence (B, D) de $\text{PGF}_{2\alpha}$ à une concentration de $3,6 \cdot 10^{-9} \text{M}$ (grossissement = 220x)

Les résultats présentés à la figure III.10 montrent l'évolution du marquage au cours des 14 jours de la culture.

La photo A correspond au morceau du jour 0 de l'organoculture. Ce morceau n'a pas été en contact ni avec la thymidine ni avec la $\text{PGF}_{2\alpha}$. Il est donc tout à fait normal qu'aucun marquage ne soit observé.

Les photos B et C correspondent aux contrôles. Elles proviennent respectivement des jours 7 et 14 de l'organoculture. On y observe quelques cellules endothéliales marquées ainsi que l'une ou l'autre cellule musculaire lisse. Ceci peut probablement s'expliquer par le turn-over basal des cellules.

Les photos D et E montrent les morceaux de veine correspondant incubés en présence de $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Sur la photo D, on observe un marquage des cellules endothéliales ainsi que quelques granules d'émulsion dans la couche de cellules musculaires lisses. Ce marquage est cependant trop faible pour conclure à un effet -

La photo E ne montre qu'un marquage des cellules endothéliales. Celui-ci est probablement dû à un remaniement de l'endothélium au cours du temps. On n'observe pas de marquage au niveau des cellules musculaires lisses de la média.

Soyombo *et al.* en 1990 ont observé qu'après 14 jours de culture, il y avait une partie de l'intima marquée et ils ont suggéré que ces cellules devaient être des cellules musculaires lisses provenant de la média.

II.1.2. Effets du bFGF

Outre la $\text{PGF}_{2\alpha}$, les cellules endothéliales activées par l'hypoxie libèrent également du bFGF. Ce facteur de croissance est capable d'induire la prolifération des cellules musculaires lisses et ce, en synergie avec la $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Michiels *et al.* , 1994b).

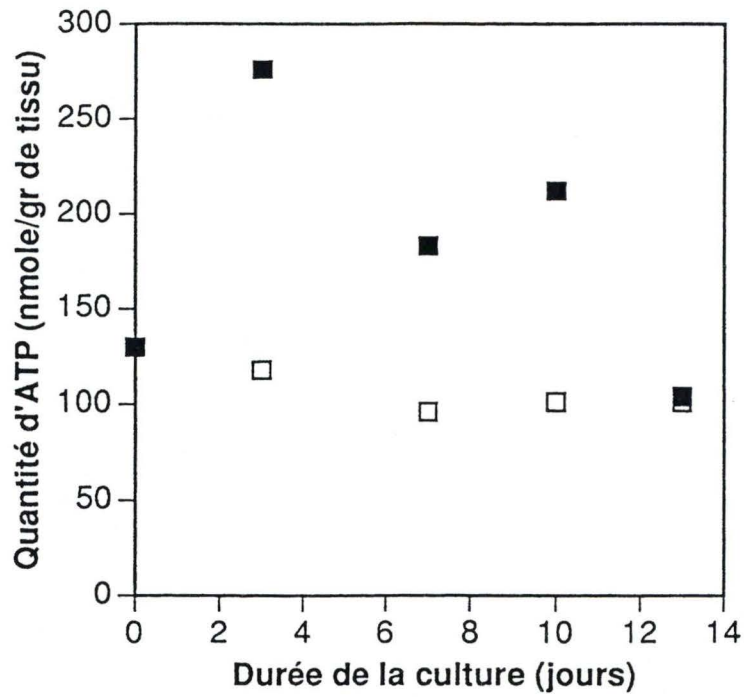


Figure III.11 : Evolution de la quantité d'ATP en fonction de la durée de la culture et effet du bFGF. Les morceaux d'une même veine sont maintenus en organoculture pendant 3, 7, 10 et 14 jours en présence (□) ou en absence (■) d'une concentration de bFGF de 5ng/ml . Les résultats sont présentés pour deux expériences (A et B) en nmoles d'ATP par gramme de tissu.

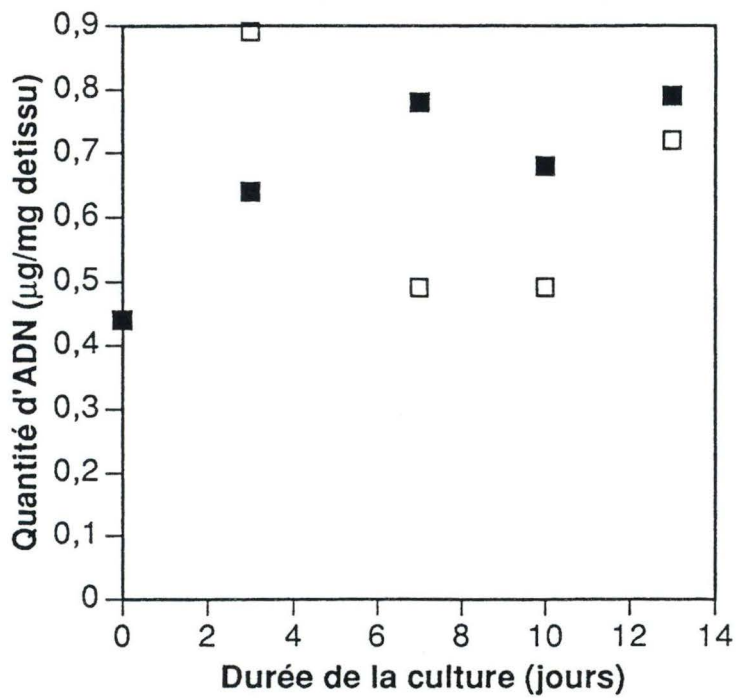


Figure III.12 : Evolution de la quantité d'ADN en fonction de la durée de la culture et effet du bFGF. Les morceaux d'une même veine sont maintenus en organoculture pendant 3, 7, 10 et 14 jours en présence (□) ou en absence (■) d'une concentration de bFGF de 5ng/ml. Les résultats sont présentés pour deux expériences (A et B) en µg d'ADN par milligramme de tissu.

Comme nous l'avons réalisé pour la $PGF_{2\alpha}$, nous avons également vérifié l'effet du bFGF, ajouté de façon exogène, sur la structure de la paroi veineuse et la prolifération cellulaire au sein des différentes couches de cette paroi.

La figure III.11 illustre l'évolution de la quantité d'ATP en fonction du nombre de jours de culture d'une organoculture de veine saphène humaine incubée en présence de 5 ng/ml de bFGF.

On constate que la quantité d'ATP des morceaux de veine contrôles varie fortement entre 130 et 280 nmoles d'ATP/gr de poudre de veine. On n'observe pas dans cette expérience de diminution transitoire de la quantité d'ATP aux alentours des jours 3 et 7. Par contre, pour les morceaux de veine traités au bFGF, on observe une valeur assez constante aux alentours de 110 nmoles d'ATP/gr de poudre de veine. Il n'y a donc pas dans cette expérience de prolifération induite par le bFGF.

Il faut noter que pour des raisons d'approvisionnement en veines saphènes humaines, cette étude n'a pu être réalisée qu'une seule fois.

La figure III.12 montre que la quantité d'ADN associée aux morceaux contrôles augmente au cours du temps.

Si on s'attarde sur le profil des échantillons traités au bFGF, on constate que durant les 10 premiers jours de l'organoculture, la quantité d'ADN reste constante. Par contre, durant les derniers jours de culture, la quantité d'ADN semble augmenter. La valeur au dernier jour de culture (0,72 μ g d'ADN/mg de poudre de veine) reste cependant équivalente à la valeur des contrôles qui est elle de 0,67 μ g d'ADN/mg de tissu.

Ces résultats suggèrent donc qu'il n'y a pas d'effet du bFGF sur la prolifération cellulaire. Tout au moins au niveau du dosage d'ADN, on ne constate pas d'augmentation de la quantité d'ADN et de ce fait, on ne peut pas conclure à une prolifération même légère des cellules musculaires lisses.

L'influence directe du bFGF sur la prolifération cellulaire a été suivie grâce à l'incorporation de thymidine tritiée.

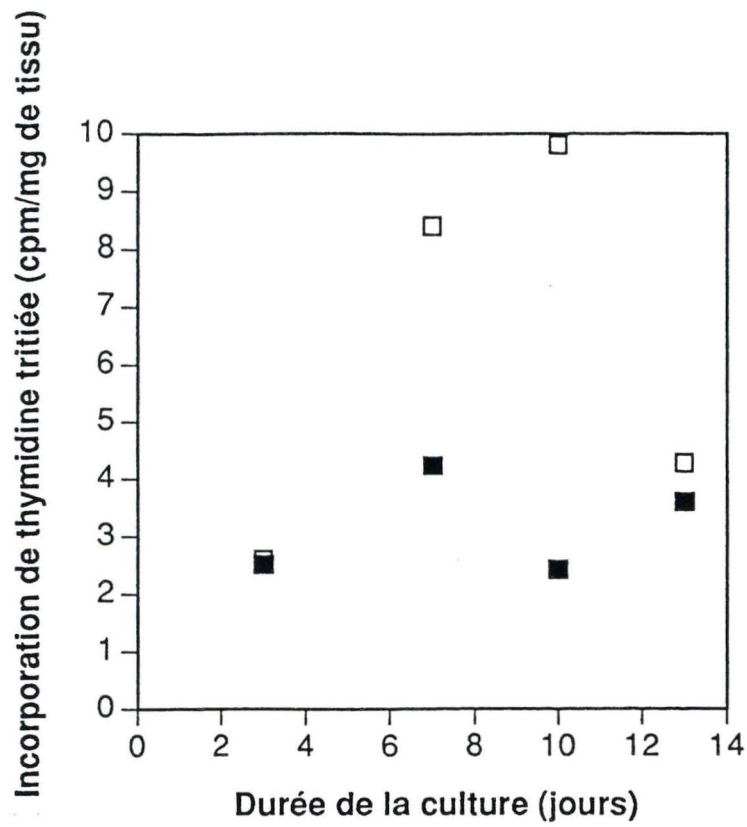
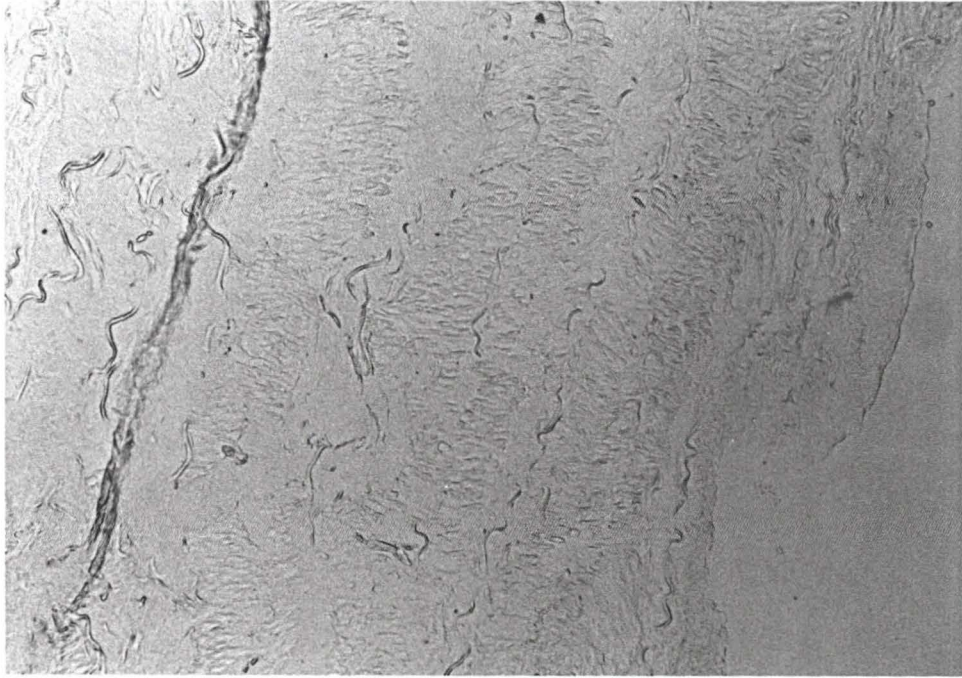
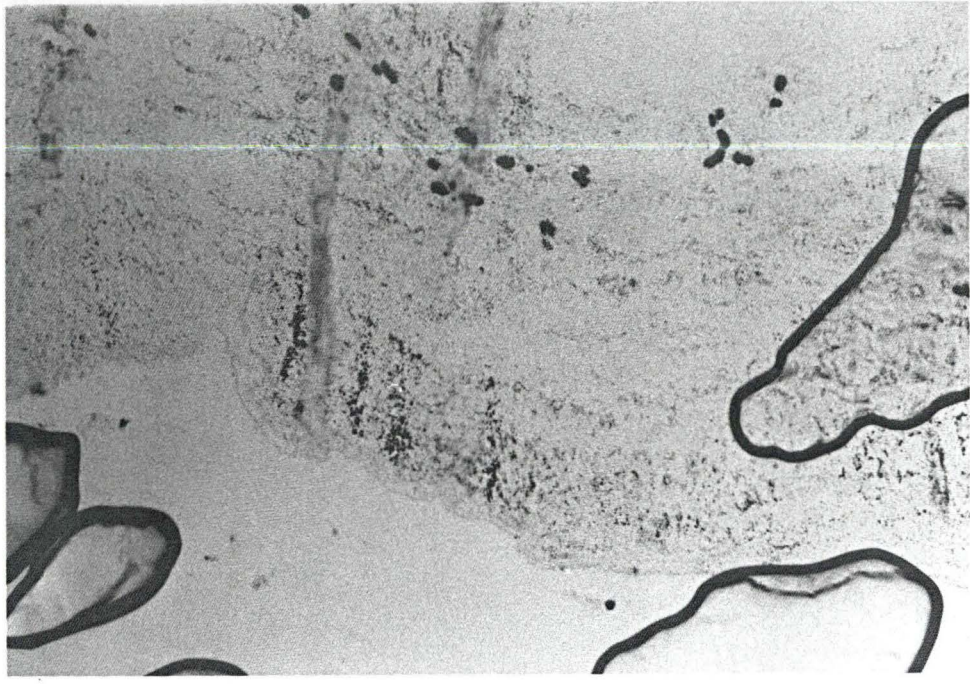
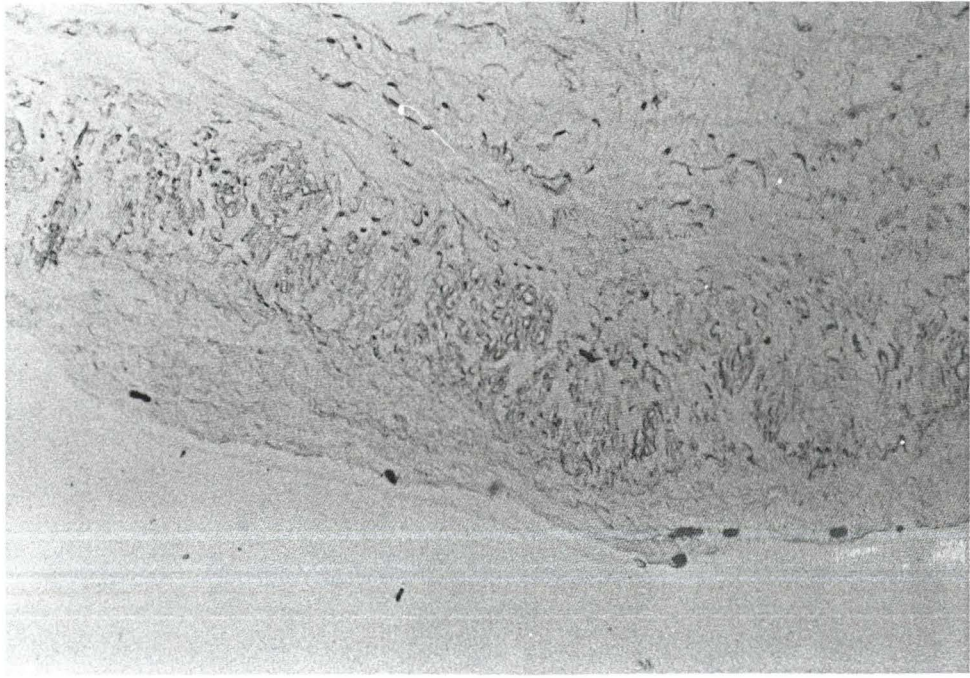


Figure III.13 : Evolution de l'incorporation de la thymidine tritiée en fonction de la durée de la culture et effet du bFGF. Les morceaux d'une même veine sont maintenus en organoculture pendant 3, 7, 10 et 14 jours en présence (□) ou en absence (■) d'une concentration de bFGF de 5ng/ml. Les résultats sont présentés pour deux expériences (A et B) en cpm par milligramme de tissu.

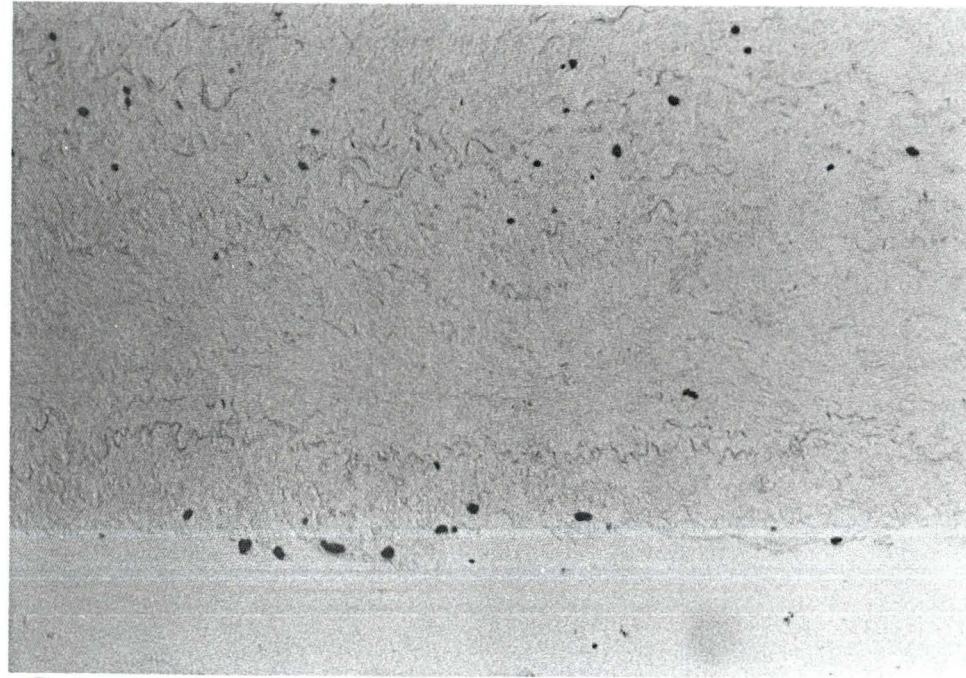
A





B

C



D

E

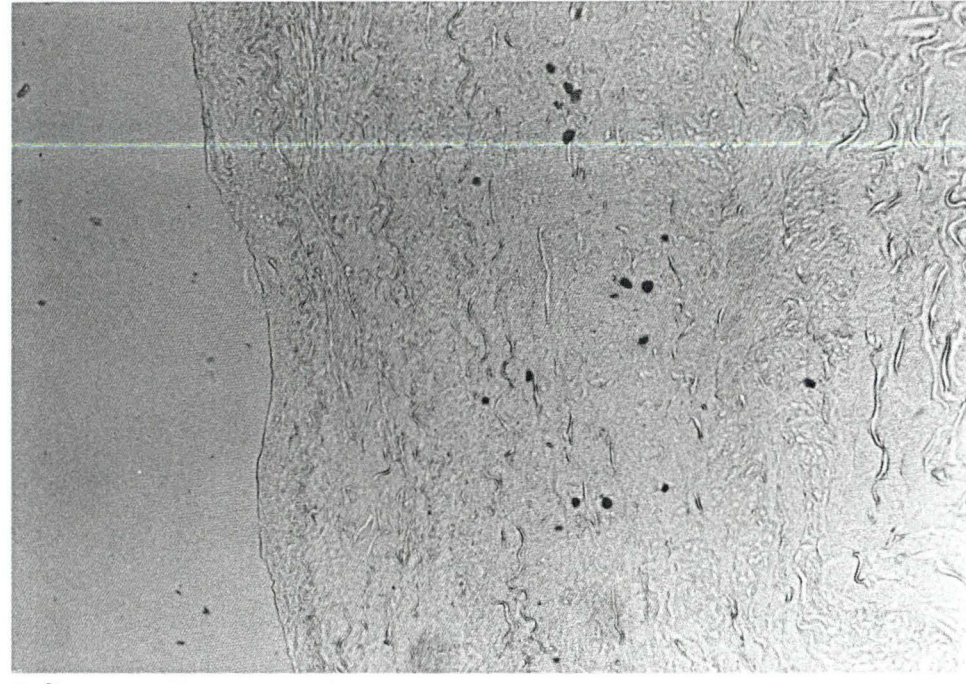


Figure III.14 : Autoradiographie réalisée sur les coupes histologiques transversales des morceaux de veine maintenus en organoculture. Les morceaux ont été fixés juste après le prélèvement et la dissection de la veine : jour 0 (A) ou après 7 (B, C) ou 14 jours (D, E) d'organoculture en présence (C, E) ou en absence (B, D) de bFGF à une concentration de 5ng/ml (grossissement = 220x)

La figure III.13 montre une vague de prolifération cellulaire entre le jour 3 et le jour 7 de l'organoculture pour les échantillons traités au bFGF. Une telle vague avait également été observée lors des deux expériences précédentes réalisées en présence de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Ensuite, il n'y a plus de prolifération importante pour les contrôles. Par contre, l'incorporation de thymidine tritiée semble continuer dans les morceaux incubés en présence de bFGF. Cette incorporation serait le signe d'une prolifération cellulaire induite spécifiquement par le bFGF.

Les études morphologiques en microscopie optique réalisées en parallèle montrent d'ailleurs une néointima plus importante au bout des 13 jours de l'organoculture si celle-ci a été incubée en présence de bFGF (voir figure III.3). Au vu du développement spontané d'une néointima, développement qui pourrait ne pas être homogène partout, il est cependant difficile de pouvoir tirer des conclusions sur un seul prélèvement. Il faudrait donc répéter cette expérience afin de confirmer l'effet pro-prolifératif du bFGF in situ.

Comme pour la $\text{PGF}_{2\alpha}$, des autoradiographies ont été réalisées pour le bFGF. Celles-ci nous permettent de localiser de façon précise les foyers de prolifération cellulaire. Ces autoradiographies sont réalisées sur des coupes de tissu provenant de morceaux de veine saphène incubés en présence de thymidine tritiée. Cette thymidine est incorporée lors de la mitose et impressionne l'émulsion photographique.

La figure III.14 présente les résultats obtenus lors de cette expérience. La photo A correspond au contrôle, on n'y observe aucun marquage. Les photos B et C sont les contrôles des jours 7 et 14 de l'organoculture. Ces contrôles se trouvent en présence de thymidine mais pas en présence de bFGF. On y observe donc le taux basal d'incorporation de thymidine. Le marquage semble plus important au jour 14 de l'organoculture (photo C).

Les photos D et E représentent les morceaux de veine du septième et quatorzième jour de culture en présence de bFGF. Le marquage est localisé dans la couche de cellules musculaires lisses présentes dans la média. Il semblerait que ce marquage soit plus important lorsque les morceaux de veine ont été incubés en présence du bFGF plutôt qu'en son absence et apparemment, les cellules musculaires lisses ne semblent pas avoir migré dans l'intima pour proliférer.

Il reste cependant à confirmer ces résultats par une analyse quantitative du nombre de cellules marquées. Pour ce faire, il faut compter le marquage sur plusieurs champs de plusieurs coupes.

◆ Discussion

Une prolifération excessive des cellules musculaires lisses est couramment observée dans différentes maladies vasculaires. Elle conduit à un épaissement de la paroi vasculaire. Ces processus cellulaires responsables de ce changement ne sont pas encore très bien connus. Cependant un certain nombre d'évidences suggèrent que les cellules endothéliales pourraient synthétiser des facteurs de croissance agissant sur les cellules musculaires lisses.

Dans le cadre de cette recherche, Michiels *et al.* (1994b) ont montré que les cellules endothéliales activées par l'hypoxie synthétisent des facteurs mitogènes tels que la prostaglandine $F_{2\alpha}$ et le bFGF.

Suite à ces résultats obtenus sur des monocouches pures de cellules endothéliales et de cellules musculaires lisses, il était intéressant de vérifier si les facteurs mitogènes pouvaient effectivement induire une prolifération cellulaire et un réarrangement des couches de la paroi vasculaire. Nous les avons donc ajoutés de façon exogène aux morceaux de veine saphène humaine maintenus en organoculture et nous avons suivi biochimiquement et morphologiquement la prolifération cellulaire.

Les concentrations de ces mitogènes ont été choisies en fonction des résultats des études précédentes réalisées sur les cultures de cellules pures. Respectivement deux et une expérience ont été réalisées en présence de $PGF_{2\alpha}$ et de bFGF.

Bien que conscients qu'il faudrait répéter plusieurs fois les expériences, nous voudrions résumer les résultats obtenus jusqu'à présent. Les résultats des dosages biochimiques (ADN et ATP) malgré leur grande variabilité suggèrent que la $PGF_{2\alpha}$ induirait une prolifération cellulaire dans la deuxième moitié de l'organoculture (entre le jour 7 et le jour 14). Ces résultats ne sont cependant pas confirmés ni par la mesure de l'incorporation de thymidine tritiée ni par les autoradiographies.

Par contre le bFGF ne semble pas avoir d'effet au niveau de l'ATP ni au niveau de l'ADN mais semble augmenter l'incorporation de thymidine tritiée et ce de manière

quantitative (cpm) et qualitative (autoradiographies). Pour ce qui est des études morphologiques, les coupes histologiques révèlent le développement d'une néointima dans certains cas. Cependant cette néointima ne se développe pas de façon homogène tout au long des différents morceaux même issus de la même veine. Il est donc très difficile de tirer des conclusions à ce niveau. Il faudrait pour cela refaire des expériences où l'on comparerait l'évolution de la morphologie de deux mêmes morceaux coupés bord à bord dont un serait incubé en présence du médiateur et l'autre servirait de contrôle.

Cet épaissement important de l'intima n'est pas dû à la seule présence des cellules musculaires lisses en prolifération; il s'explique également par le fait que les cellules musculaires lisses subissent une modulation phénotypique et deviennent alors synthétiques. Dans cet état, elles déposent de façon accrue des composants de la matrice extracellulaire, induisant ainsi un épaissement de la néointima.

Les autoradiographies réalisées dans le but de visualiser les foyers de prolifération cellulaire lorsque les morceaux de veine saphène sont incubés en présence des mitogènes, ne donnent que peu d'informations sur l'effet de ces mitogènes. On y observe principalement un marquage des cellules endothéliales. Ce marquage est probablement dû au turn-over basal des cellules endothéliales

II.2. Mise au point de l'hypoxie

Dans l'hypothèse émise par Michiels *et al.* en 1993 (a et b), l'hypoxie résultant de la stase veineuse semble jouer un rôle fondamental dans l'apparition des pathologies veineuses. D'après ce groupe de chercheurs, les cellules endothéliales incubées sous hypoxie sont activées. Ainsi par exemple, ils ont pu mettre en évidence une activation importante de la phospholipase A₂ chez les cellules incubées sous hypoxie. La conséquence de cette activation est une production massive de prostaglandines telles que la PGF_{2α} qui, comme nous l'avons vu précédemment, provoque une prolifération des cellules musculaires lisses de la média.

Cette prolifération ainsi que d'autres mécanismes tels que l'adhérence des PMN ou leur activation et leur infiltration provoque une désorganisation partielle ou totale de la structure pariétale. Cette déstructuration signe l'installation de la pathologie variqueuse.

Afin de pouvoir suivre les effets de l'hypoxie sur la structure pariétale dans le modèle de l'organoculture, il nous a fallu mettre au point l'incubation sous hypoxie des morceaux de veine saphène tout en réalisant cette incubation stérilement. Ce modèle présente un intérêt tout particulier à ce niveau puisqu'il permet d'observer, à long terme, les modifications qui surviennent au niveau de la paroi veineuse lors d'une exposition à une hypoxie. Deux termes semblent avoir toute leur importance dans cette phrase. Le premier : "à long terme" signifie que l'on tend vers des conditions réelles. En effet, les pathologies veineuses n'apparaissent pas du jour au lendemain. Elles sont le fruit d'un lent développement de mécanismes mis en route très tôt. Grâce à ce modèle, nous pouvons donc suivre la cascade d'événements qui conduit à l'apparition des varices sur plusieurs jours.

Le second terme important est "hypoxie". L'hypoxie réalisée expérimentalement est destinée à mimer les conditions d'ischémie qui se développent lors d'une stase veineuse. C'est pourquoi, il est important de bien comprendre les effets de l'hypoxie pour permettre, par la suite, un éventuel traitement des pathologies veineuses.

II.2.1. Pression partielle en oxygène

La pression partielle en oxygène indique directement le degré de sévérité de l'hypoxie appliquée aux échantillons.

Pour ce qui est des monocouches de cellules endothéliales, une hypoxie de 30 minutes était suffisante pour faire diminuer de manière significative la pression partielle en oxygène dans le milieu, de 130 mm Hg cette pression passe après l'hypoxie à 10 mm Hg.

En effet, les cellules sont recouvertes par une fine couche de milieu d'incubation, ce qui favorise largement les échanges gazeux lorsque les cellules sont incubées dans une atmosphère contenant 100 % d'azote.

Ce protocole expérimental n'est pas applicable aux morceaux de veine car l'épaisseur du morceau de veine est plus importante que celle de la monocouche cellulaire. Il faut donc les recouvrir d'une plus grande quantité de milieu, ce qui empêche les échanges gazeux de se réaliser entièrement. Nous avons donc épinglé les morceaux de veine dans un berlin dont le fond est recouvert d'une couche de silicone. Nous avons ensuite rempli le berlin avec 20 ml d'HBSS et nous faisons buller l'azote directement dans le milieu.

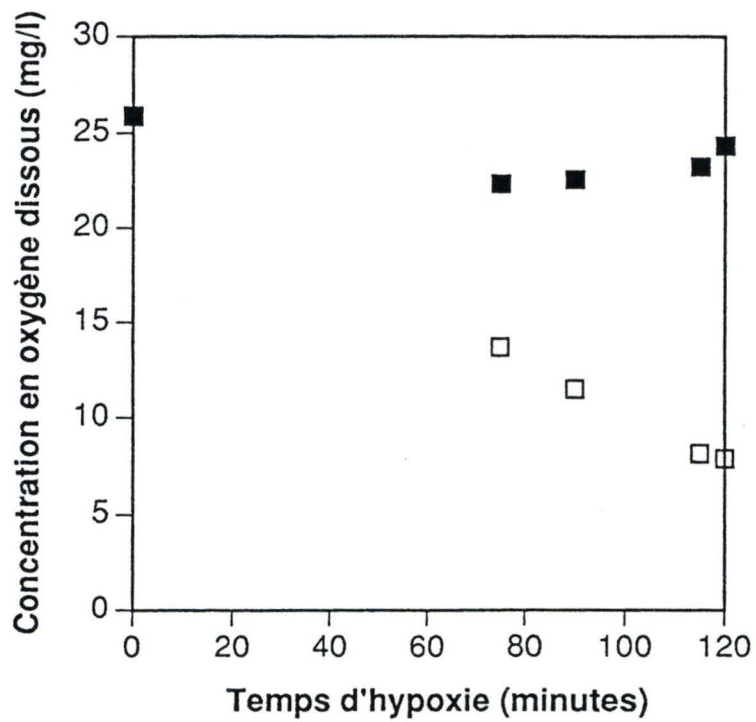


Figure III.15 : Evolution de la concentration en oxygène dissous lors de l'incubation en conditions normoxiques (■) ou hypoxiques (□) de morceaux de veine saphène humaine.

Suite aux modifications du schéma expérimental préexistant au laboratoire, une nouvelle courbe de pression partielle en oxygène a été réalisée afin de déterminer le temps d'incubation nécessaire à l'instauration d'une hypoxie sévère.

Des incubations de 75, 90, 105 et 120 minutes sous hypoxie ont été réalisées. Au terme des différents temps d'incubation, un aliquot du milieu est prélevé et la quantité d'oxygène dissous est mesurée par titrage colorimétrique. Le principe de ce titrage est décrit au point II.4.1. du matériel et méthode.

Sur le graphe présenté à la figure III.15, on constate que dans les berlins "normoxie", la quantité d'oxygène dissous reste constante au cours du temps. On retrouve en moyenne 24 mg d'oxygène dissous par litre d'HBSS.

D'autre part, on observe que la quantité d'oxygène dissous par litre d'HBSS lors de l'incubation sous hypoxie est d'autant plus faible que la période d'incubation sous hypoxie est longue. C'est ainsi qu'au temps 0, il y a 26 mg d'oxygène dissous par litre d'HBSS alors qu'après 120 minutes d'hypoxie, cette valeur est de 8 mg d'O₂ dissous/litre d'HBSS.

II.2.3. Adhérence des HL60 marquées au chrome-51

L'hypothèse proposée pour expliquer le développement des veines variqueuses suggère que ce serait l'activation de l'endothélium par l'hypoxie qui lui ferait d'une part relarguer des facteurs mitogènes pour les cellules musculaires lisses et d'autre part recruter, activer et induire l'infiltration des neutrophiles dans la paroi veineuse. La prolifération des cellules musculaires lisses et l'infiltration de neutrophiles activés seraient alors responsables de la désorganisation de la paroi veineuse.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous voudrions exposer des morceaux de veine saphène humaine à une hypoxie qui mime la stase veineuse. Ensuite, nous voudrions les maintenir en organoculture afin de suivre l'évolution de la paroi veineuse à long terme.

Pour cela, il faut choisir un temps optimal d'incubation sous hypoxie c'est-à-dire suffisant pour activer les cellules endothéliales *in situ* mais pas trop long pour ne pas induire de mortalité cellulaire.

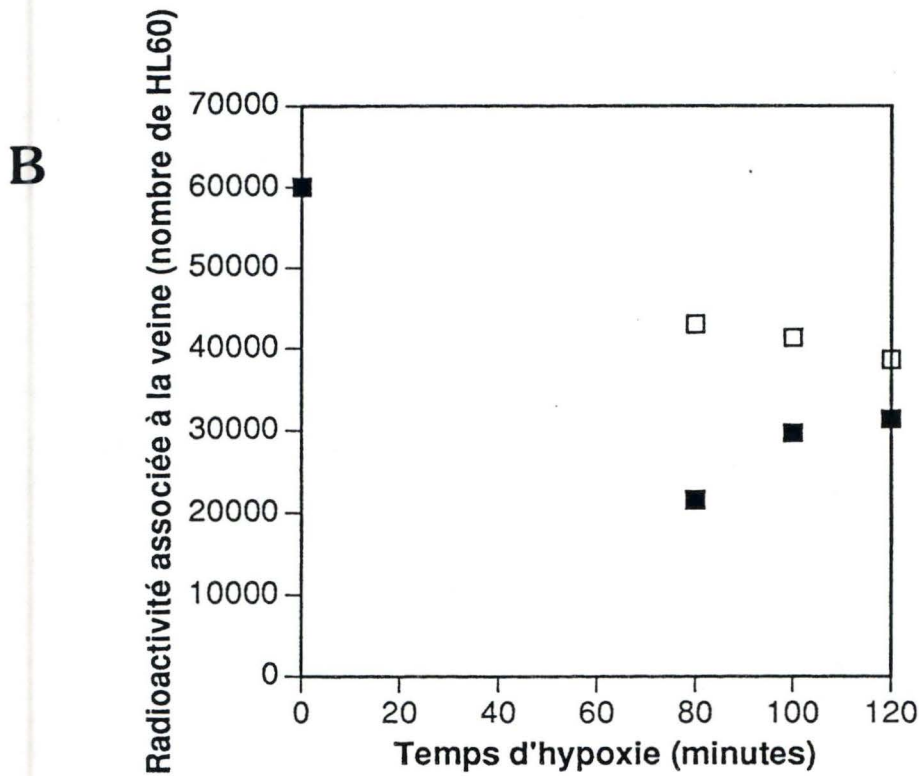
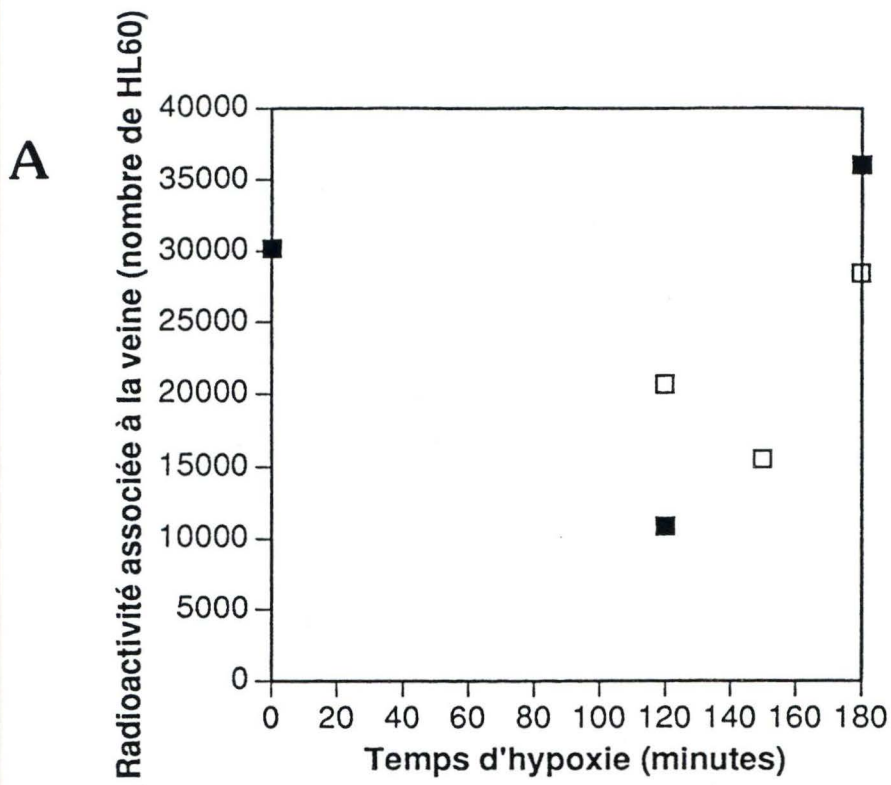


Figure III.16 : Evolution de l'adhérence des HL 60 à l'endothélium de morceaux de veines incubés dans des conditions normoxiques (■) ou hypoxiques (□) pendant des temps croissants. Les résultats sont exprimés en nombre d'HL 60/morceau pour deux expériences (A et B) différentes.

Il nous fallait ensuite un critère pour suivre cette activation : nous avons choisi de suivre l'adhérence des HL60, cellules d'une lignée promyélocytaire, possédant les mêmes propriétés que les neutrophiles.

En effet, dans le cadre d'une mise au point, leur utilisation est beaucoup plus aisée que celle des PMN : alors que l'emploi des PMN demande une purification préalable à partir du sang humain, les HL60 sont une lignée cellulaire qu'il suffit de maintenir en culture et qui, de ce fait, sont beaucoup plus disponibles que les PMN.

Pour l'expérience, des prélèvements de veine saphène fraîchement disséqués sont préparés et sont ensuite incubés sous hypoxie pendant 0, 80, 100 et 120 minutes.

Parallèlement à cela, les HL60 sont marqués au chrome-51.

Ces temps ont été choisis au vu des résultats précédents qui montrent qu'au-delà de 60 minutes, l'hypoxie s'installe et que les temps optimaux d'incubation sous hypoxie pour les cellules endothéliales en culture sont de 90 à 120 minutes.

Au terme des hypoxies, les morceaux de veine sont plongés dans une solution d'HL60 marqués au chrome-51 afin de permettre l'adhérence de ces cellules à l'endothélium des morceaux de veine. Finalement après trois lavages afin d'éliminer les cellules non adhérentes, la radioactivité associée aux morceaux de veine est comptée.

La figure III.16 met en graphique la quantité de radioactivité associée aux morceaux de veine saphène en fonction du temps d'incubation sous hypoxie ou en conditions normoxiques pour deux expériences différentes.

Les étapes précédentes réalisées sur des veines saphènes entières montraient que 120 minutes d'incubation sous hypoxie pouvaient activer l'endothélium et ainsi induire l'adhérence des neutrophiles. De plus, elles suggéraient que la veine saphène s'activerait moins vite que les cellules endothéliales en culture (Bouaziz, 1995).

Dans ces cultures, le temps optimal de stimulation pour l'hypoxie est de 90 à 120 minutes (Arnould *et al.*, 1993).

Nous avons donc dans un premier temps incubé les morceaux de la veine saphène pendant des temps de 120, 150 et 180 minutes sous hypoxie et suivi l'adhérence des HL60. La figure III.16A montre une différence plus grande de l'adhérence des HL60 au morceau incubé sous hypoxie par rapport au morceau incubé en normoxie après 120 minutes. Par contre, pour des temps d'incubation plus longs, on observe une augmentation de l'adhérence qui ne semble pas due à un effet différentiel de l'hypoxie mais qui serait plutôt lié à un effet toxique de l'incubation, à long terme, dans une solution saline.

Par la suite, nous avons donc testé des temps plus courts : 60, 90 et 120 minutes (figure III.16B). Les résultats montrent que l'adhérence des HL60 aux morceaux incubés sous hypoxie est supérieure à celle observée pour les morceaux "normoxie" et ce pour les trois temps étudiés. Cependant, cette différence s'atténue au cours du temps.

Cette expérience nous a donc permis de choisir un temps d'incubation sous hypoxie optimal qui sera utilisé dans la suite des expériences. Nous avons choisi un temps de 90 minutes car il correspond au moment où l'écart entre l'incubation sous hypoxie et sous normoxie est maximal pour les HL60.

II.3. Effet de l'hypoxie

Ayant choisi un temps optimal, nous avons ensuite voulu suivre les effets de l'hypoxie sur la viabilité et la prolifération des cellules musculaires lisses à long terme ainsi que sur la structure de la paroi veineuse.

Trois expériences identiques ont été réalisées :

- Une première dans le but de doser l'ATP et l'ADN.
- Une autre dans le but de suivre l'évolution de l'endothélium en microscopie électronique à balayage.
- Une troisième en présence de thymidine tritiée afin de pouvoir suivre l'incorporation de cette thymidine, indice de la prolifération cellulaire.

Pour chacune de ces expériences, 9 morceaux de veines sont disséqués : 3 subiront une hypoxie de 90 minutes, 3 une normoxie de 90 minutes et 3 serviront de contrôle. Pour

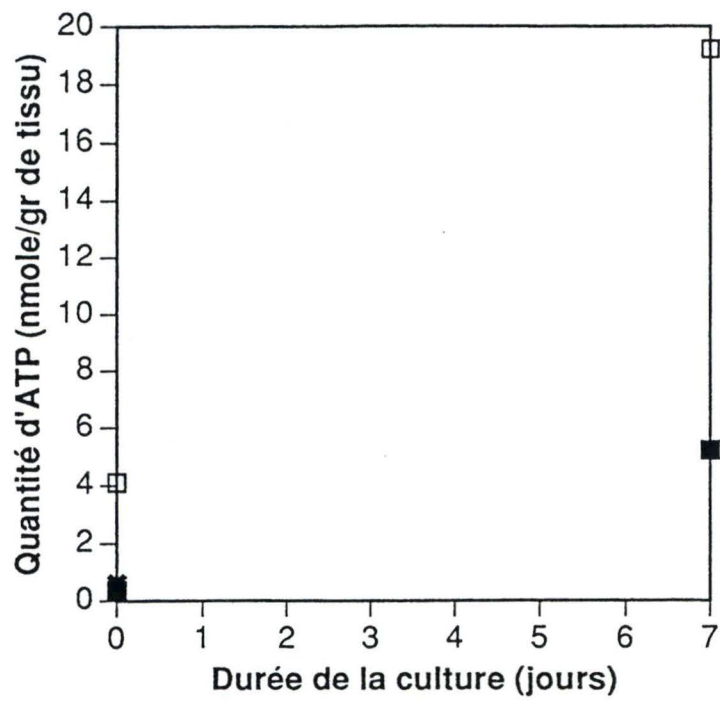


Figure III.17 : Evolution de la quantité d'ATP en fonction de la durée de l'organoculture pour des morceaux de veine ayant été incubés 90 minutes en conditions normoxiques (■) ou hypoxiques (□). Les résultats sont exprimés en nmoles d'ATP par gramme de tissu.

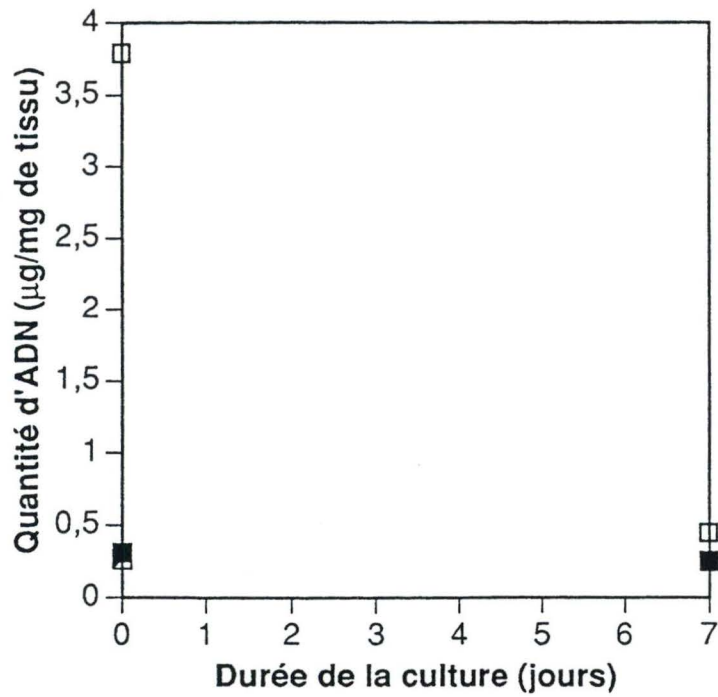


Figure III.18 : Evolution de la quantité d'ADN en fonction de la durée de l'organoculture pour des morceaux de veine ayant été incubés 90 minutes en conditions normoxiques (■) ou hypoxiques (□). Les résultats sont exprimés en µg d'ADN par milligramme de tissu.

chaque condition, un morceau est fixé de suite (jour 0), et les autres seront mis en organoculture 7 et 14 jours.

Malheureusement, certaines de ces organocultures ont été contaminées. En effet, les hypoxies se réalisent en chambre chaude non stérile et malgré les nombreuses précautions prises, nous n'avons pas pu éviter les contaminations. Nous n'avons ainsi observé des résultats partiels que pour les deux premières expériences.

II.3.1. Dosage de l'ATP

Ce dosage est réalisé dans le but d'observer si les cellules et principalement les cellules musculaires lisses restent vivantes au cours de l'organoculture.

Au vu du graphe présenté à la figure III.17, on constate une augmentation de la quantité d'ATP tant pour la normoxie que pour l'hypoxie au jour 7 par rapport au jour 0. Cette augmentation paraît plus marquée pour l'échantillon qui a subi l'hypoxie. Il faut cependant rester prudent face à ce résultat et répéter l'expérience plusieurs fois afin de les confirmer.

II.3.2. Dosage de l'ADN

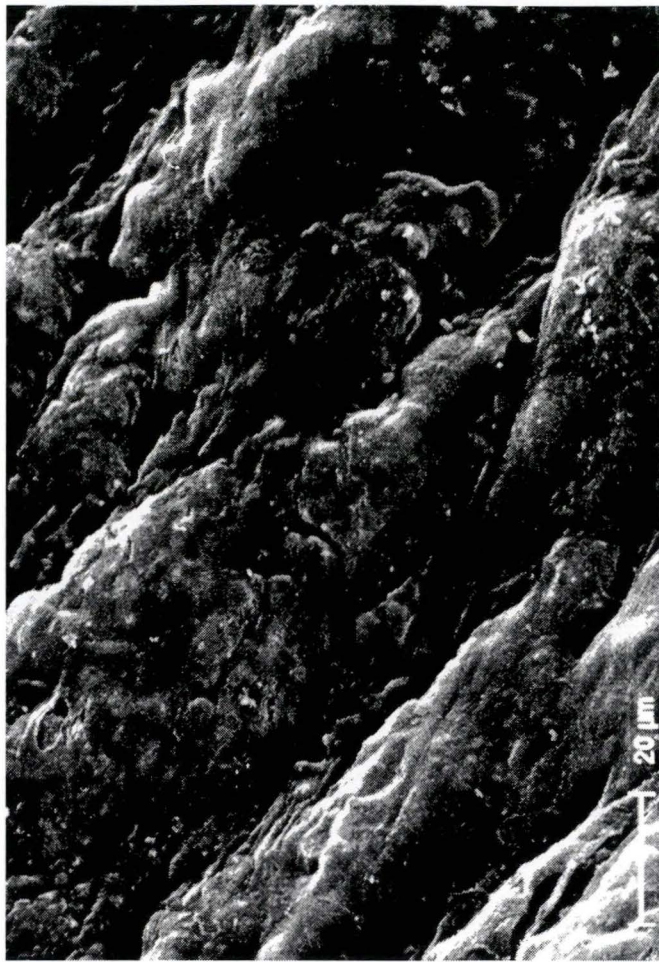
Le graphe de la figure III.18 montre l'évolution de la quantité d'ADN durant les sept premiers jours de l'organoculture.

Aucune différence significative n'apparaît entre les morceaux de veine incubés sous hypoxie par rapport à ceux incubés en normoxie.

II.3.3. Observations en microscopie électronique à balayage

Les études en microscopie électronique à balayage ont été réalisées afin de suivre la morphologie de l'endothélium au cours de l'organoculture.

La figure III.19 montre l'évolution de l'état de l'endothélium au cours des 7 jours qu'a duré la culture.



A

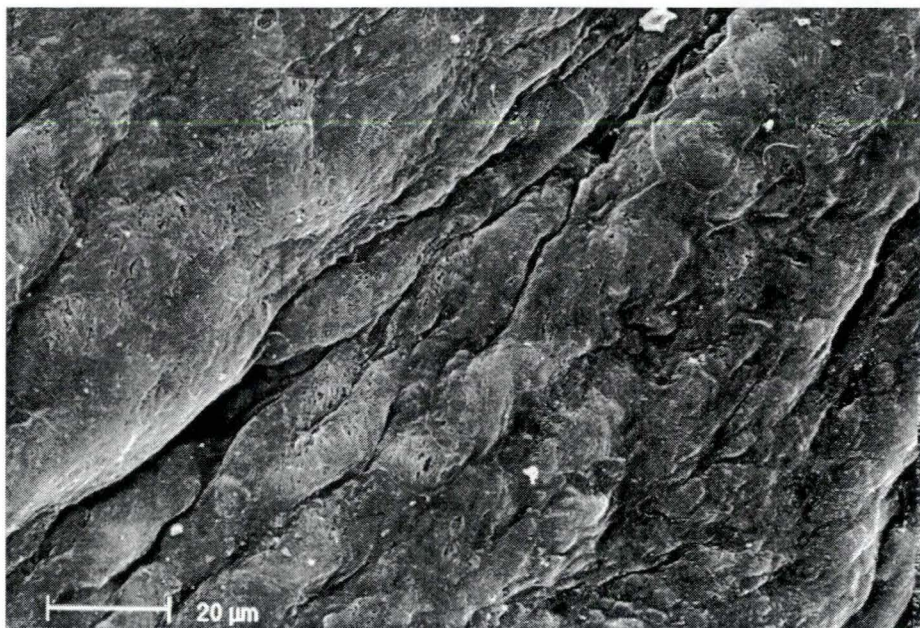
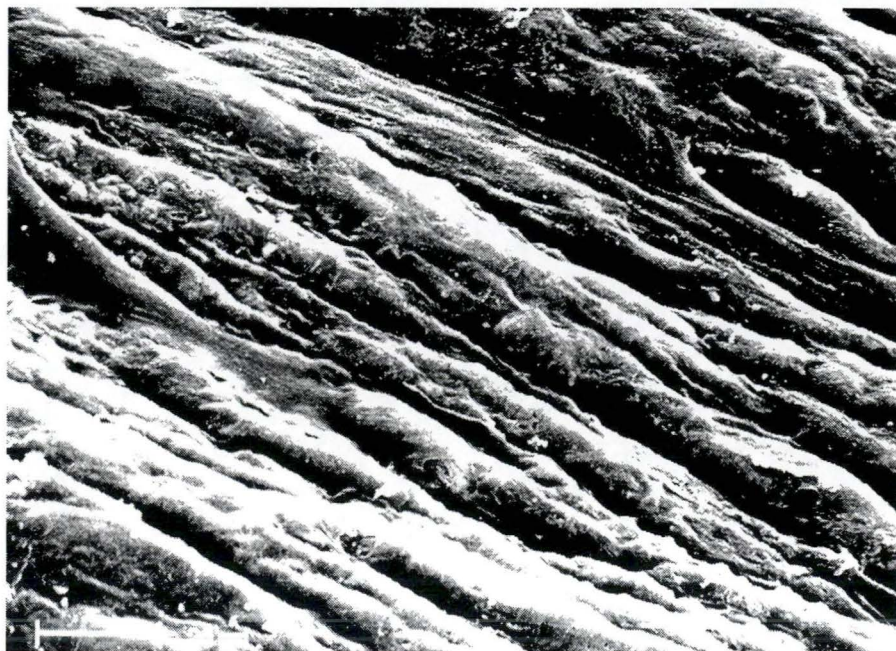
B**C****D****E**

Figure III.19 : Micrographies en microscopie électronique à balayage de l'endothélium de morceaux de veine ayant été incubés dans des conditions normoxiques (B,D) ou hypoxiques (C, E) par rapport à des morceaux n'ayant rien subi (A). Les morceaux ont été incubés 0 (A, B, C) ou 7 (D, E) jours en organoculture (grossissement = 2994x).

On observe au jour 0 que le contrôle qui n'a rien subi montre un endothélium intact (photo A). Les cellules endothéliales sont en monocouche et parfaitement imbriquées les unes dans les autres.

Les photos B et C représentent la morphologie de l'endothélium de morceaux de veine incubés sous hypoxie ou sous normoxie directement après cette incubation. Elles montrent que l'incubation sous hypoxie ou sous normoxie n'altère en rien la morphologie de l'endothélium : les cellules sont toujours bien jointives et ne présentent pas de boursouflures.

Lorsque les morceaux de veine qui ont subi une normoxie ou une hypoxie de 90 minutes sont maintenus en organoculture pendant 7 jours, l'endothélium reste tout à fait intact (photos D et E). Aucune différence entre ces deux conditions expérimentales n'est mise en évidence dans cette expérience. De plus, l'organoculture semble préserver parfaitement l'endothélium.

II.3.4. Discussion

L'endothélium de par sa localisation à l'interface entre le sang et les tissus est le premier touché en cas d'ischémie résultant d'une stase veineuse.

De nombreuses modifications métaboliques sont alors observées au niveau de cet endothélium. Parmi celles-ci, on peut citer la déplétion de l'ATP, l'activation de la phospholipase A₂, ce qui a pour conséquence une production de PAF et de prostaglandines : l'un étant responsable de l'adhérence des neutrophiles, l'autre agissant comme facteur de croissance pour cellules musculaires lisses. Ces événements conduisent à une désorganisation et à un épaissement de la paroi veineuse.

Cependant, jusqu'à présent aucune preuve expérimentale n'existe montrant un lien direct entre l'hypoxie et les altérations pariétales en tant que telles.

Afin de disséquer les mécanismes biochimiques et cytologiques impliqués dans ce processus, nous avons utilisé le modèle expérimental de l'organoculture mis au point dans la première partie de ce travail. Il permet en effet de suivre pendant une longue période la prolifération cellulaire ainsi que la structure de la paroi veineuse *in situ*.

Il fallait d'abord vérifier que l'hypoxie pouvait effectivement activer les cellules endothéliales du morceau de veine destiné à l'organoculture comme elle en est capable sur des cellules endothéliales en culture (Arnould *et al.*, 1993) ou dans des veines ombilicales (Arnould *et al.*, 1995) ou saphènes entières (Bouaziz, 1995). Cette activation se manifeste notamment par une augmentation de l'adhésivité des cellules endothéliales pour les neutrophiles.

Les résultats obtenus dans ce travail montrent qu'une incubation sous hypoxie de 90 minutes peut effectivement induire l'adhérence des HL60, cellules ayant les mêmes propriétés que les PMN. Cette adhérence est plus grande que lorsque les morceaux sont maintenus dans des conditions normoxiques. Ces dosages biochimiques doivent cependant être confirmés par des études morphologiques en microscopie électronique à balayage afin de montrer que les HL60 adhèrent bien aux cellules endothéliales et pas sur les faces latérales ou basale du morceau de veine.

Ces résultats indiquent que l'hypoxie est effectivement capable d'activer les cellules endothéliales d'un morceau de veine. Nous avons donc, dans la suite du travail, étudié l'évolution de la prolifération cellulaire et de la morphologie de l'endothélium lorsque ces morceaux incubés sous hypoxie ou normoxie sont ensuite maintenus en organoculture.

Les résultats en microscopie électronique à balayage montrent que l'endothélium reste intact tout au long de l'organoculture et ce, même si le morceau de veine a été incubé sous hypoxie. On peut donc penser que les effets observés sont bien dus à l'activation des cellules endothéliales et non pas à leur dénudation. Pour ce qui est des études biochimiques, aucune conclusion claire ne semble se dégager des résultats obtenus. Des expériences supplémentaires sont nécessaires afin de mettre en évidence un éventuel effet de l'hypoxie.

Chapitre IV : Discussion générale et Perspectives

La pathologie variqueuse constitue un problème de santé majeur dans les pays occidentalisés. En effet, sa prévalence est élevée puisqu'au cours de sa vie une personne sur trois sera confrontée à ce problème. De nombreuses études ont été effectuées sur ce sujet mais l'étiologie de la maladie veineuse n'est pas encore totalement connue.

Les auteurs s'accordent cependant à dire que lors de la mise en place d'une telle maladie, une stase veineuse apparaît. Cette stase entraîne des problèmes d'oxygénation et de nutrition au niveau cellulaire et tissulaire. Les cellules et tissus souffrent alors d'une diminution de la pression partielle en oxygène qui induit des modifications de métabolisme.

De par sa localisation à l'interface entre le sang et les tissus, l'endothélium est le premier touché par l'ischémie qui s'installe lors de la stase veineuse. Il faut cependant remarquer que si l'intégrité morphologique de l'endothélium est conservée, il est activé par l'ischémie et subi de nombreuses modifications de son métabolisme. C'est ainsi que Michiels *et al.* (1993) ont montré que les cellules endothéliales activées par l'hypoxie, mimant l'ischémie s'installant lors de la stase veineuse, synthétisent de nombreux médiateurs tels que le PAF, la $\text{PGF}_{2\alpha}$ et le bFGF. Le PAF présent à la surface des cellules endothéliales provoque l'adhérence des leucocytes (Arnould *et al.*, 1993). Les polymorphonucléaires neutrophiles ainsi fixés sur les cellules endothéliales sont activés et peuvent alors s'infiltrer au travers de la paroi veineuse. Ils vont alors provoquer la désorganisation de la paroi veineuse en produisant la destruction de certains constituants de la matrice extracellulaire. Ils ne sont cependant pas les seuls à intervenir au cours de ce processus.

En effet, la même équipe a travaillé sur les effets du bFGF et de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ sur des monocouches pures de cellules musculaires lisses (Michiels *et al.*, 1994). Ils ont constaté que ces facteurs induisaient la prolifération des cellules musculaires lisses en culture. Ils ont donc suggéré que la prolifération des cellules musculaires, induite par les cellules endothéliales activées par l'hypoxie, pouvait être responsable de la désorganisation et de l'épaississement pariétal observés dans la pathologie variqueuse.

L'hypothèse proposée est donc que les cellules endothéliales activées par l'hypoxie sont capables d'induire la prolifération des cellules musculaires lisses en synthétisant du bFGF et de la $\text{PGF}_{2\alpha}$. Ces cellules musculaires lisses vont migrer et venir proliférer dans l'intima où elles déposent des composants de la matrice extracellulaire. Cette prolifération des cellules musculaires lisses concomitante à l'infiltration des polymorphonucléaires neutrophiles entraînerait une désorganisation pariétale typique, observée dans la pathologie variqueuse.

Dans le but de vérifier cette hypothèse, il fallait pouvoir suivre cette cascade d'événements sur une veine complète au cours du temps. Nous avons mis au point, dans ce travail, un modèle expérimental qui a l'avantage de pouvoir suivre les différents processus cités ci-dessus durant 14 jours. Ce modèle expérimental est l'organoculture de veine saphène humaine. Il consiste à maintenir en culture des morceaux de veine saphène.

Un autre intérêt de ce modèle est qu'on peut suivre l'évolution des différents types cellulaires (cellules endothéliales, cellules musculaires lisses et tissu conjonctif) les uns par rapport aux autres. De plus, l'utilisation de veines saphènes humaines connues pour être un lieu de prédilection de l'apparition des varices donne à ce modèle la possibilité de travailler dans des conditions proches de la réalité.

Dans le but de pouvoir utiliser ce modèle expérimental pour étudier l'hypothèse concernant l'apparition des varices, des mises au point ont dû être réalisées. Nous avons commencé par suivre la viabilité cellulaire et principalement celle des cellules musculaires lisses au cours du temps. Nous avons donc dosé la quantité d'ATP présente dans les morceaux de veine maintenus en organoculture durant 0, 7 10 et 14 jours. Les résultats observés montrent une quantité d'ATP constante. Cette observation est également réalisée sur des coupes histologiques colorées au trichrome vert de Masson. On n'observe pas de mort cellulaire au niveau de ces coupes. L'organoculture, permet donc la viabilité des cellules pendant 14 jours.

Les dosages d'ADN réalisés en parallèle à ces dosages d'ATP n'ont pas montré de modifications de la quantité d'ADN au cours de l'organoculture. Ceci signifie qu'il n'y a pas ou peu de prolifération cellulaire au cours des 14 jours de culture. Ces vérifications terminées, le modèle a été utilisé pour étudier l'effet de mitogènes ajoutés de façon exogène au milieu de culture.

Sachant que la $\text{PGF}_{2\alpha}$ et le bFGF induisaient la prolifération des cellules musculaires lisses en monocouche, nous avons voulu vérifier cet effet sur les morceaux complets de veine saphène humaine maintenus en culture durant 14 jours et dont on a supplémenté les milieux avec de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ ou du bFGF exogènes. Cette étude a été réalisée à 5 niveaux différents. Les dosages d'ATP et d'ADN ont été réalisés et les résultats obtenus ont été complétés par des autoradiographies, de l'histologie et l'incorporation de thymidine tritiée.

Les résultats obtenus pour la $\text{PGF}_{2\alpha}$ suggèrent par les dosages d'ATP et d'ADN que cette molécule induirait une prolifération cellulaire dans la deuxième moitié de l'organoculture (entre le jour 7 et le jour 14). Ces résultats ne sont cependant pas confirmés par la mesure de l'incorporation de thymidine tritiée et par les autoradiographies.

Le bFGF, quant à lui ne semble pas avoir d'effet ni au niveau de l'ATP, ni au niveau de l'ADN mais semble augmenter l'incorporation de thymidine tritiée de manière quantitative (cpm) et qualitative (autoradiographies).

Une observation intéressante pour ces deux facteurs mitogènes est le développement d'une néointima dans certaines veines. Cependant, cette néointima ne se développe pas de façon homogène tout au long des différents morceaux mêmes issus de la même veine. Ces résultats indiquent une stimulation de la croissance des cellules musculaires lisses dans les veines traitées. La discordance entre les tests et l'hétérogénéité des effets sur les différentes veines devront être examinée par des expériences complémentaires.

Comme l'hypoxie est considérée comme le facteur clé dans l'hypothèse d'apparition des modifications de la veine, nous avons voulu tester son effet dans le modèle de l'organoculture. Il nous fallait mettre au point l'incubation sous hypoxie et ce de manière stérile. Dans ce cadre, nous avons d'abord réalisé une courbe de pression partielle en oxygène. Elle nous a permis de déterminer le temps d'incubation à appliquer aux échantillons pour qu'une hypoxie s'installe. Elle nous renseigne également sur l'intensité de l'hypoxie.

Enfin, il nous fallait un critère qui permette de suivre l'activation des cellules endothéliales lors de l'incubation sous hypoxie. Nous avons choisi de suivre l'adhérence des HL60, cellules qui ont les mêmes propriétés que les neutrophiles.

Les résultats montrent que l'adhérence des HL60 aux veines incubées sous hypoxie est plus grande que celle observée pour les veines normoxiques à condition que l'incubation sous hypoxie ne soit pas trop longue. Ces résultats indiquent également qu'il y effectivement une activation de l'endothélium due à l'hypoxie. Il ont aussi permis de choisir un temps d'incubation optimal sous hypoxie.

Nous avons finalement utilisé ce modèle expérimental dans le but d'étudier l'effet de l'hypoxie sur les différents types cellulaires présents dans la paroi veineuse, leur prolifération et la structure de la paroi vasculaire veineuse.

Des morceaux de veine ayant été maintenus en organoculture après avoir subi une incubation sous hypoxie, montrent que l'endothélium reste intact tout au long de l'organoculture. Ce modèle était essentiel car les effets observés ne seront donc pas attribuables à une dénudation de l'endothélium. Nous n'avons malheureusement pas pu suivre à long terme l'évolution de ces organoculture du fait de problèmes de contaminations.

Le modèle expérimental de l'organoculture apporte donc un élément essentiel par rapport aux modèles des monocouches décrits dans la littérature et utilisés jusqu'ici : il permet de suivre l'évolution de deux types cellulaires simultanément et dans un tissu d'origine.

Le modèle de l'organoculture semble donc offrir un moyen d'investigation intéressant pour étudier les événements cellulaires et les processus qui sont supposés conduire à l'apparition des veines variqueuses même si parfois, l'approvisionnement pose des problèmes.

Ce modèle peut également permettre d'étudier les bases moléculaires de cette cascade d'événements. Ainsi par exemple, il est possible en utilisant la méthode d'hybridation *in situ* de localiser l'expression d'une molécule d'intérêt. Ce modèle sera notamment utilisé au laboratoire pour essayer de localiser les endroits où sont exprimés le bFGF et le PDGF.

Ce modèle possède également des implications pharmacologiques importantes. En effet, si l'hypoxie que les médecins connaissent bien sous le terme de stase veineuse, est une raison suffisante pour déclencher la pathologie veineuse et que celle-ci passe d'abord par l'activation des cellules endothéliales de la veine puis se poursuit par l'augmentation de

l'adhésivité des cellules endothéliales pour les neutrophiles, on pourrait tester différents médicaments phlébotoniques sur l'inhibition de ces processus au cours d'organoculture de veine saphène ayant subi une incubation sous hypoxie.

En effet, de nombreuses études pharmacologiques ont été réalisées au laboratoire sur des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine à la fois en culture et sur la veine complète. Certains médicaments furent particulièrement étudiés : l'extrait de Ginkgo biloba, le Naftidrofuryl, le Réparil et le Venoruton qui ont des effets inhibiteurs *in vitro* aux concentrations mesurées dans le sang lors de leur usage thérapeutique. Ces préparations peuvent inhiber fortement et avec un effet dépendant de la dose, les différents événements de la cascade d'activation des cellules endothéliales.

Dans une telle approche pharmacologique, il serait plus intéressant d'utiliser le modèle de l'organoculture de veine saphène humaine car on travaille directement avec l'organe concerné dans les conditions pathologiques de la veine variqueuse et l'on peut suivre à long terme leur effet sur la structure de la paroi veineuse.

Anderson B.O., Brown J.M., Shanley P.F. and Bensard D.D. (1991).
"Marginating neutrophils are reversibly adherent to normal lung endothelium."
Surgery **109** , 51-61.

Arnould T. (1994b).
"Etude des effets de l'hypoxie-réoxygénation sur les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine conduisant à moduler les interactions avec les polymorphonucléaires neutrophiles."
Thèse de Doctorat FUNDP

Arnould T., Mchiels C., Alexandre I. and Remacle J. (1992).
"Effect of hypoxia upon intracellular calcium concentration of human endothelial cells."
J. Cell. Phphysiol. **152** , 215-221.

Arnould T., Michiels C., Janssens D., Delaive E. and Remacle J. (1995).
"Hypoxia induces PMN adherence to umbilical vein endothelium."
Cardiovascular Research **30** , 1009-1016.

Arnould T., Michiels C. and Remacle J. (1993).
"Increased PMN adherence on endothelial cells after hypoxia : involvement of PAF, CD18/CD11b and ICAM-1."

Arnould T., Michiels C. and Remacle J. (1994a).
"Hypoxic Human umbilical vein endothelium cells induce activation of adherent polymorphonuclear leukocytes."
Blood **83** , 3705-3716.

Bai H., Masuda J., Sawa V., Nakano S., Shirakura R., Shimazaki V., Ogata J. and Matsuda H. (1994).
"Neointima Formation After Vascular Stebt Implantation."
Arteriosclerosis and thrombosis **14** , 1846-1853.

Barbier A., Carpentier P. and Finet M. (1994).
"Hémodynamique veineuse des membres inférieurs."
La Presse Médicale **23** , 206-212.

Beaglehole R. (1986).

Beaglehole R. (1986).

"Epidemiology of varicose veins."

World J. Surg. **10** , 898-902.

Bouaziz N. (1995). "Effets de l'hypoxie sur l'adhérence des neutrophiles à l'endothélium des veines saphènes : rôle dans le développement des veines variqueuses".

Mémoire de licence FUnDP

Braquet P., Chabrier P.E. and Clostre F. (1994).

"Les fonctions de l' endothelium."

La Presse Médicale **23** , 225-227.

Butche E.C. (1991).

"Leukocyte-endothelial cell recognition : three (or) more steps to specificity and diversity."

Cell **67** , 1033-1036.

Carlos T.M. and Harlan J.M. (1990).

"Membrane proteins in phagocyte adherence to endothelium."

Immunol. Rev. **114** , 5-28.

Carpentier P. (1994).

"Anatomie fonctionnelle du réseau veineux des membres inférieurs."

La presse médicale **23** , 203-205.

Carpentier P. and Priollet P. (1994).

"Epidémiologie de l' insuffisance veineuse chronique."

La Presse Médicale **23** , 197-201.

Chamley-Campbell J., Campbell G.R. and Ross R. (1979).

"The smooth muscle cells in culture."

Physiological Reviews **59** , 1-61.

Chamley-Campbell J.H. and Campbell G.R. (1981).

"What controls smooth muscle phenotype?"

Artherosclerosis **40** , 347-357.

Coon W.W., Willis P.W., Keller J.B. (1973)

"Venous thromboembolism and other venous disease in the Tecumseh Community Health Study"

Circulation **48** , 839-846

Flaherty J.T. and Weisfeld M.L. (1988).

"Reperfusion injury."

Free Rad. Biol. Med. **5** , 409-419.

Géron I. (1994).

"Effets de l'hypoxie sur le métabolisme des cellules endothéliales de la veine ombilicale : étude de l'augmentation de la concentration en calcium cytosolique et de la libération du bFGF".

Mémoire de licence FUNDP

Gospodarowicz D., Neufeld G. and Schweigerer L. (1987).

"Fibroblast growth factor : structural and biological properties."

J. Cell Physiol. **5 (suppl)** , 15-26.

Harlan J.M. (1985).

"Leucocyte-endothelial interactions."

Blood **65** , 513-525.

Herman I.M. and Castellot Jr J.J. (1987).

"Regulation of vascular smooth muscle cells growth by endothelial-synthesized extracellular matrice."

Arteriosclerosis **7** , 463-469.

Hill R.B. and La Via M.F. (1980). "Principles of Pathobiology". *Principles of Pathobiology* . . London, Oxford University Press. 30-55.

Holt C.M., Francis S.E., Rogers S., Gadsdon P.A., Taylor T., Clelland C., Soyombo A., Newby A.C. and Angelini G.D. (1992).

"Intimal proliferation in an organ culture of human internal mammary artery."

Cardiovascular Research **26** , 1189-1194.

Jaffe E.A. (1985).

"Physiologic function of normal endothelial cells."

Ann. N. Y. Acad. Sci. **454** , 279-291.

Jaffe E.A., Nachman R.L., Becker C.G. and Minich C.R. (1973).

"Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins."

Journal of Clinical Investigation **52** , 2745-2756.

Janssens D., Michiels C., Delaive E., Eliaers F., Drieu K. and Remacle J. (1995).

"Protection of hypoxia-induced ATP decrease in endothelial cells by Ginkgo biloba extract and bilobalide."

Bioch. Pharmacol. **50** , 991-999.

Junqueira L.C., Carneiro J. and Kelley R.O. (1989). "Tissus musculaires". *Basic histology-sixth edition* . Ed. A. a. Lange. California,

Lawrence M.B. and Springer T.A. (1991).

"Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates : distinction from and prerequisite for adhesion through integrins."

Cell **65** , 859-873.

Lengyell I. and Acsady G. (1990).

"Histomorphological and pathobiochemical changes of varicose veins. A possible explanation of the development of varicosis."

Acta. Morphol. Hung. **38** , 259-267.

Lüscher T.F. (1993).

"The endothelium as a target and mediator of cardiovascular disease."

Eur. J. Clin. Invest **23** , 670-685.

Maillet M. and Chiarasini D. (1985). *Histologie spéciale humaine (2)* .

Ed. B. Medecin-deug. Montreuil, 51-75.

Michiels C., Arnould T., Houbion A. and Remacle J. (1992).

"Human endothelial cells submitted to hypoxia-reoxygenation : implication of free radicals, xanthine oxidase and energy deficiency."

J. cell Physiol. **153** , 53-61.

Michiels C., Arnould T., Knott I., Dieu M. and Remacle J. (1993a).

"Stimulation of prostaglandin synthesis by human endothelial cells exposed to hypoxia."
Am. J. Physiol. **264** , C866-C874.

Michiels C., Arnould T. and Remacle J. (1993b).

"Hypoxia-induced activation of endothelial cells as possible cause of venous diseases : hypothesis."
Angiology **44** , 643-646.

Michiels C., Arnould T. and Remacle J. (1994b).

"Rôle clé de l'hypoxie et des cellules endothéliales dans le développement des veines variqueuses."
Médecine/sciences **10** , 845-853.

Michiels C., De Leener F., Arnould T., Dieu M. and Remacle J. (1994b).

"Hypoxia stimulates human endothelial cells to release smooth muscle cell mitogens : role of prostaglandins and bFGF."
Exp. Cell Res. **213** , 43-54.

Mignatti P., Morimoto T. and Rifkin D.B. (1992)

"Basic Fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independant of the endoplasmic reticulum-Golgi complex"
J. Cell. Physiol. **151** , 81-93.

Moncada S. and Vane J. (1979).

"Pharmacology and endogenous role of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A2 and prostacyclin."
Pharmacol. Rev. **30** , 293-331.

Muramatsu M., Shimiza K., Asano H., Toki V., Miazaki V., Okumura K., Hashimoto H. and Tlto T. (1992).

"Hypoxia-elicited contraction of aorta and coronary artery via removal of endothelium-derived nitric oxide."
Am. J. Physiol. **263** , H1339-H1347.

Niebes P. (1990).

"Artères et veines."

Phlébologie **9** , 10-12.

O'Brien K.D. and Chait A. (1994).

"The biology of the artery wall in atherogenesis."

Medical Clinics of North America **78** , 41-67.

Palmer R.M.J., Ashton D.S. and Moncada S. (1988).

"Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine."

Nature **333** , 664-666.

Palombo J.D., Blackburn G.L. and Armour Forse R. (1991).

"Endothelial cell factors and response to injury."

Surgery, Gynecology and Obstetrics **173** , 505-518.

Pederson D.C. and Bowyer D.E. (1985).

"Endothelial Injury and Healing in Vitro

Studies Using an Organ Culture System."

AjP **119** , 264-272.

Perrin M. (1994).

"Anatomie et physiologie normales et pathologiques des veines des membres inférieurs."

La Revue du Patricien **44** , 717-725.

Piper H.M. (1989).

"Energy deficiency, calcium overload or oxidative stress : possible causes of irreversible ischemic myocardial injury."

Klinische Wochenschrift **67** , 749-759.

Ramelet A.A. and Monti M. (1990). *Phlébologie - deuxième édition* . Ed. Masson. Fribourg,

Renko M., Quarto N., Morimoto T. and Rifkin D.B. (1990).

"Nuclear and cytoplasm localization of different basic fibroblast growth factor species."

J. Cell Physiol. **144** , 108-114.

Rifkin D.B. and Moscatelli D. (1989).

"Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor."

J. Cell Biol. **109** , 1-6.

Ross R. (1981).

"Atherosclerosis : a problem of the biology of arterial wall cells and their interactions with blood components."

Atherosclerosis **1** , 293-311.

Schweigerer L., Neufeld G., Friedman J., Abraham J.A. and Fiddes J.C. (1987).

"Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth."

Nature **325** , 257-259.

Scozaec J. and Lèche G. (1993).

"Immunologie des cellules endothéliales et rejet de greffe."

Méd./Sci. **9** , 1094-1101.

Soyombo A.A., Angelini G.D., Bryan A.J., Jasani B. and Newby A.C. (1990).

"Intimal proliferation in an organ culture of human saphenous vein."

American Journal of pathology **137** ,

Soyombo A.A., Angelini G.D., Bryan A.J. and Newby A.C. (1993a).

"Surgical preparation induces injury and promotes smooth muscle cell proliferation in a culture of human saphenous vein."

Cardiovascular Research **27** , 1961-1967.

Soyombo A.A., Angelini G.D. and Newby A.C. (1995).

"Neointima formation is promoted by surgical preparation and inhibited by cyclic nucleotides in human saphenous vein organ cultures."

The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery **109** , 2-12.

Soyombo A.A., Thurston V.J. and Newby A.C. (1993b).

"Endothelial control of vascular smooth muscle proliferation in organ culture of human saphenous vein."

European Heart Journal **14** , 201-206.

Springer T.A. (1990).

"Adhesion receptors in the immune system."

Nature **346** , 425-434.

Stern D.M., Esposito C., Gerlach H., Gerlach M., Ryan J. and Handley D. (1991).

"Endothelium and regulation of coagulation."

Diabetes care **14** , 160-166.

Thorgeirsson G. (1983). "Structure and morphological features of vascular endothelium".

Biochemical interactions at the endothelium . Ed. Cryer. Elsevier, Amsterdam, 5-39.

Thyberg J., Hedin U., Sjölund M., Palmberg L. and Bottger B.A. (1990).

"Regulation of differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells."

Artherosclerosis **10** , 967-990.

Tortora G.J. and Anagnostacos N.P. (1988).

"Principes d'anatomie et de physiologie".

Montréal, Edition De Boeck.

Tortora G.J. and Grabowski (1994).

"Principes d'anatomie et de physiologie".

Anjou, De Boeck Université

Deuxième édition française.

Yamamoto M., Fujita K. and Shinkai T. (1992).

"Identification of the phenotypic modulation of rabbit arterial smooth muscle cells in primary culture by flow cytometry."

Experiental cell Research **198** , 43-51.