



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

NANCY UNIVERSITE – UNIVERSITE HENRI POINCARÉ NANCY 1

Faculté de Médecine

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE – SANTÉ – ENVIRONNEMENT

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE NANCY-UNIVERSITE, UNIVERSITE HENRI POINCARÉ NANCY 1

Spécialité : Ingénierie Cellulaire et Tissulaire

Présentée et soutenue publiquement

Par

Mariama TRAORÉ

Le 21 mai 2008

**INTERACTIONS DES LIPOPROTEINES DE FAIBLE DENSITÉ AVEC LES CELLULES
ENDOTHELIALES VASCULAIRES HUMAINES : INFLUENCE DES CONTRAINTES DE CISAILLEMENT
– ETUDE *IN VITRO* PAR MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE CONFOCALE**

Directeur de thèse : Dr Sylvaine MULLER (HDR)

Co-Directeur de thèse : Dr Dominique DUMAS

JURY

M.	R. SANTUS	Professeur des Universités	MNHN, Paris
M.	D. ISABEY	Directeur de Recherche/CNRS	INSERM Paris 12, Créteil
M.	D. DUMAS	Ingénieur de Recherche/UHP	UHP, Nancy
Mme	N. JESSEL	Chargée de Recherche/INSERM	ULP, Strasbourg
Mme	S. MULLER	Chargée de Recherche/INSERM	UHP, Nancy
M.	J-F. STOLTZ	Professeur des Universités –Praticien Hospitalier	UHP, Nancy

AVANT-PROPOS ET REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein du Groupe Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, LEMTA, UMR 7563 CNRS-UHP-INPL et IFR 111 CNRS-UHP – Faculté de Médecine 54505 Vandoeuvre-Lès-Nancy (France).

A mes parents et à toute ma famille

Je souhaite dédier le présent manuscrit à ma mère et à la mémoire de mon père.

Pendant plus de 40 ans, ils ont travaillé sans relâche pour mettre leur Famille à l'abri du besoin et assurer la meilleure éducation pour leurs enfants. Ils nous ont inculqué l'amour du travail bien fait, la gentillesse et le respect des autres.

Ils resteront toujours, un exemple pour mes frères, mes sœurs et moi.

Au terme de ce travail, je tiens avant tout à adresser mes remerciements les plus chaleureux à tous ceux qui m'ont aidée au cours de sa réalisation.

*Je remercie tout particulièrement Monsieur le **Professeur Jean-François STOLTZ**, mon Directeur de laboratoire, qui m'a permis de réaliser ce travail. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance pour sa confiance, ses remarques et son soutien scientifique. J'ai beaucoup apprécié en lui ses grandes compétences scientifiques et son souci de la réussite de ses collaborateurs.*

*J'exprime également ma reconnaissance à Madame le **Docteur Sylvaine MULLER**, mon directeur de thèse, pour ses conseils et les discussions que nous avons eues. Qu'elle trouve ici l'expression de ma gratitude.*

*Je remercie très sincèrement Monsieur le **Docteur Dominique DUMAS**, mon co-directeur de thèse, pour son aide et ses suggestions scientifiques dans les travaux réalisés en microscopie confocale ainsi que de leurs interprétations. Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude.*

*J'exprime toute ma gratitude et mon profond respect à Madame le **Docteur Nadia JESSEL**, aux Messieurs les **Professeurs René SANTUS et Daniel ISABEY**, pour avoir accepté de juger mon travail et d'être rapporteurs de ma thèse.*

*Je remercie également Madame le **Docteur Marie-Laure VIRIOT**, Directeur de recherche au CNRS, pour le temps qu'elle a consacré à la relecture de ce manuscrit. J'ai beaucoup apprécié ses suggestions et remarques.*

*Je remercie très sincèrement Monsieur le **Professeur J-C MAZIERE** et Monsieur le **Docteur P. MORLIERE** du Service de Biochimie du C.H.U. d'Amiens (France) pour la mise à notre disposition des LDL natives.*

*J'exprime ma sincère reconnaissance aux **Professeurs HONG Jialing, XU Chunling, YU Hong, YUAN Xianhou, WU Hansheng, Docteur WANG Binghua, Docteur WU Junzhu et tous les membres et amis** du Département de Biochimie de la Faculté de Médecine de l'Université de Wuhan en Chine, pour leurs soutiens scientifiques et leurs encouragements lors de ma préparation de master recherche à Wuhan.*

*Je remercie également **Naceur CHARIF**, pour sa disponibilité et son assistance pour la culture cellulaire, **Luc MARCHAL**, malheureusement disparu, pour son aide, ses conseils en microscopie, ainsi que les autres membre de l'équipe, pour leur assistance au cours de ce travail : **Natalia, Céline, Cédryck, Assia, Cyril, Elisabeth, Monique, Brigitte, Ghislaine, Colette et Karine.***

*Je remercie mes **collègues de la Présidence de l'Université Henri Poincaré** pour leur sympathie et leur gentillesse.*

*Je n'oublie pas également **MORIZOT Damien, Renée, Thibaut, Marielle, Laurine** ainsi que **VINCENT Emile et Aline** pour leur affection, leurs soutiens et leurs encouragements.*

*Enfin, je remercie Monsieur le **Professeur Farid GASMI** pour ses conseils. **J'ai également une pensée particulière pour les familles CONTE, SYLLA, CAMARA et KEITA** de Tanènè-Kéla (Kindia, Guinée) pour leur affection, leurs soutiens et encouragements permanents.*

*Mes remerciements vont également à **tous mes amis** pour leur affection et leurs soutiens qui m'ont permis de garder mon enthousiasme pour réaliser ce travail.*

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

Avant-propos et remerciements.....	1
Liste des publications et communications.....	11
Liste des abréviations.....	14
 INTRODUCTION	 19
 PARTIE I : ETUDES BIBLIOGRAPHIQUES.....	 22
 I.1 – RAPPEL CONCERNANT LE SYSTEME VASCULAIRE : LES VAISSEAUX SANGUINS.....	 23
I.1.1 – Les artères.....	24
I.1.2 – Les veines.....	25
I.1.3 – Les capillaires.....	25
 I.2 – LES CELLULES VASCULAIRES.....	 25
I.2.1 – L’endothélium – Les cellules endothéliales.....	25
I.2.1.a – Anatomie de l’endothélium vasculaire.....	25
I.2.1.b – Structure et propriétés de la cellule endothéliale.....	25
I.2.1.c – Fonctions de la cellule endothéliale.....	27
I.2.2 – La cellule musculaire lisse	30
I.2.2.a – Structure de la cellule musculaire lisse.....	30
I.2.2.b – Fonctions de la cellule musculaire lisse.....	30
 I.3 – HEMODYNAMIQUE ET HEMOMECHANIQUE.....	 31
I.3.1 – Forces hémodynamiques.....	31
I.3.1.a – Contraintes de cisaillement.....	32
I.3.1.b – Pression hydrostatique.....	32
I.3.1.c – Déformation périodique.....	33
I.3.2 – Influence des contraintes mécaniques sur les cellules endothéliales.....	33

I.3.2.a – Réponses des CE aux contraintes de cisaillement	33
I.3.2.b – Régulation génique	34
I.3.2.c – Distribution des contraintes mécaniques sur les modifications morphologiques	36
I.3.2.d – Mécano-récepteurs.....	37
I.4 – DONNEES CONCERNANT LES MALADIES CARDIOVASCULAIRES.....	39
I.4.1 – Athérosclérose – Athérogenèse	40
I.4.1.a – Cellules impliquées dans l’athérogenèse	42
I.4.1.b – Facteurs biochimiques.....	43
I.4.1.c – Facteurs biomécaniques.....	45
I.4.2 – Thrombose.....	46
I.5 – LES LIPOPROTEINES.....	46
I.5.1 – Structure générale de la lipoprotéine.....	46
I.5.1.a – Partie lipidique.....	47
I.5.1.b – Partie protéique : apoprotéines.....	48
I.5.2 – Classification des lipoprotéines.....	48
I.5.2.a – Chylomicron.....	49
I.5.2.b – Lipoprotéines de très basse densité – VLDL.....	49
I.5.2.c – Lipoprotéines de densité intermédiaire – IDL.....	49
I.5.2.d – Lipoprotéines de basse densité – LDL	50
I.5.2.e – Lipoprotéines de haute densité – HDL	50
I.5.2.f – Lipoprotéine(a) – Lp(a)	50
I.5.3 – Métabolisme des lipoprotéines.....	50
I.5.3.a – Rôle des enzymes.....	51
I.5.3.b – Rôle des protéines de transfert	52
I.5.3.c – Rôles des récepteurs.....	53
I.5.4 – Oxydation et rôles des lipoprotéines de basse densité (LDL) - Interactions lipoprotéines/cellules.....	53
I.5.4.a – Oxydation des lipoprotéines de basse densité.....	53
I.5.4.b – Rôles des LDL – Interactions lipoprotéines/ Cellules.....	54

PARTIE II : MATERIELS ET METHODES	56
II.1 – CULTURE CELLULAIRE	57
II.1.1 – Réactifs et matériels	57
II.1.1.a – Milieux de culture	57
II.1.1.b – Additifs au milieu de culture de base	57
II.1.1.c – Tampon HBSS (<i>Hank's Balanced Salts Modified</i>)	58
II.1.1.d – Tampon PBS (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)	58
II.1.1.e – Solution de digestion (Solution trypsine-EDTA)	59
II.1.1.f – Support de cellules en culture	59
II.1.1.g – Autres matériels	59
II.1.2 – Méthodes	59
II.1.2.a – Culture des ECV304	59
II.1.2.b – Culture des HUVEC	60
II.1.2.c – Préparation des échantillons (culture sur lamelles)	62
II.1.2.d – Identification des cellules	63
II.2 – PREPARATION ET CONSERVATION DES SONDES FLUORESCENTES	66
II.3 – PREPARATION DES LIPOPROTEINES DE FAIBLE DENSITE (LDL)	66
II.3.1 – Séparation des LDL natives	66
II.3.2 – Oxydation des LDL	67
II.3.3 – Marquage des LDL avec du DiI et DiO	67
II.4 – STIMULATIONS ET TRAITEMENTS DES CELLULES	68
II.4.1 – Traitements avec du TNF- α	68
II.4.2 – Application des contraintes mécaniques	68
II.4.3 – Incubation des cellules avec des lipoprotéines (DiI-LDL, DiO-LDL, DiI-DiO-LDL, DiI-ox-LDL)	71
II.5 – TECHNIQUES D'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE	73
II.5.1 – Marquage de la cavéoline	73
II.5.2 – Marquage du cytosquelette	74

II.6 – MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE	75
II.6.1 – La fluorescence	75
II.6.2 – Les microscopies	78
II.6.2.a – Scanner Cellulaire	78
II.6.2.b – Microscopie confocale à Balayage Laser.....	80
II.6.2.c – Dynamique des interactions moléculaires.....	80
II.6.2.c.1 – Le FRET (Förster resonance energy transfer)	81
II.6.2.c.2 – Efficacité du FRET.....	83
II.6.2.c.3 – Méthodes de visualisation du FRET.....	83
II.6.2.c.4 – FRET et FLIM (fluorescence life-time imaging microscopy)	84
II.6.2.c.5 – Calcul de l’efficacité du FRET en intensité du donneur et accepteur.....	88
II.6.2.c.6 – Calcul de l’efficacité du FRET en durée de vie du donneur	89
II.6.2.d – Spectroscopie à Corrélation de Fluorescence (FCS- Fluorescence Correlation Spectroscopy)	90
II.6.2.d.1 – Méthodologie liée à la Microscopie de Fluctuations	91
II.6.2.d.2 – Analyse des données.....	99
II.6.2.d.3 – Autres méthodes d’analyse de fluctuation.....	99
 PARTIE III : RESULTATS	103
III.1 – CONTROLE DES SPECTRES DE DiI ET DiO	104
 III.2 – DUREE DE VIE DES MOLECULES (PAR LA TECHNIQUE DE FLIM)	106
 III.3 – RENDEMENT DE MARQUAGE DES LDL PAR DiI ET DiO (PAR LA TECHNIQUE DE FCS)	111
III.3.1 – Quelques rappels sur la technique	111
III.3.2 – Calcul de la fraction doublement marquée DiO/DiI	111
 III.4 – INTERACTIONS MOLECULAIRES DiI-DiO-LDL EN SOLUTION (MESURE DU FRET)	113

III.5 – FIXATION ET INTERNALISATION DES LDL (DiI-LDL, DiO-LDL) DANS LES ECV304.....	116
III.6 – CINETIQUE D'INTERNALISATION ET DE DEGRADATION DES LDL (DiI-DiO-LDL) DANS LES HUVECS – ETUDE DU FRET PAR LA TECHNIQUE DE FCS.....	117
III.6.1 – Internalisation et dégradation de DiI-DiO-LDL dans les HUVECs sous conditions statiques.....	118
III.6.2 – Internalisation et dégradation de DiI-DiO-LDL dans les HUVECs sous conditions mécaniques.....	121
III.6.3 – Effet du Triton (TX100) sur la dégradation des LDL dans les HUVECs fixées en statique.....	135
III.6.4 – Effet du TNF-alpha sur l'internalisation des LDL dans les cellules	138
III.6.5 – Internalisation et dégradation des ox-LDL.....	138
PARTIE IV : DISCUSSION – CONCLUSIONS – PERSPECTIVES.....	139
PARTIE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	144
PARTIE VI : PUBLICATIONS	154

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Liste des publications dans des revues internationales à comité de lecture : (*: auteur principal)

- 1- **M. Traoré***, RJ. Sun, S.F-Grancher, D. Dumas, X Qing, R. Santus, J-F. Stoltz and S. Muller. Kinetics of the endocytotic pathway of Low Density Lipoprotein (LDL) in human endothelial cell line under shear stress: an *in vitro* confocal microscopy study. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 2005, 33: 243-251.
- 2- S. F-Grancher*, RJ. Sun, **M. Traoré**, J-F. Stoltz and S. Muller. Role of Ca^{2+} in the effects of shear stress and TNF-alpha on caveolin-1 expression. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 2005, 33: 253-261
- 3- S. Muller*, V. Labrador, N. Da Isla, D. Dumas, R. Sun, X. Wang, L. Wei, S. F-Grancher, W. Yung, **M. Traoré**, C. Boura, C. Besoussan, A. Eljaafari, J-F. Stoltz. From hemorheology to vascular mechanobiology: An review. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 2004, 30: 185-200.
- 4- **M. Traoré***, X. Chunling, H. Jialing. Influence of *Angelicae sinensis* extract on lipid accumulation in rabbit aortic smooth muscle cells induced by oxidized LDL. *Biorheology*. 2003, 40: 389-394.
- 5- D. Dumas*, L. Grossin, RJ. Sun, **M. Traoré**, J. Didelon, J-F. Stoltz. Confocal and wide-field deconvolution microscopy: interest of multiphoton excitation in optical bioengineering. *Actas de Bioq*. 2003, 6: 81-90.
- 6- J-F. Stoltz*, M. Singh, P. Riha, V. Labrador, RJ. Sun, **M. Traoré**, H. Zhao, J. Yang, S. Muller, X. Wang. Hemorheology : A Survey. *Actas de Bioq*. 2003, 6: 33-48.

Liste des communications à des congrès ou symposia:

(*: auteur principal)

1. **M. Traoré***, A. Kadi, S.F-Grancher, D. Dumas, L. Marchal, J-F. Stoltz and S. Muller. Endocytosis and degradation of LDL-Cholesterol in human endothelial cells under shear stress. (5th World Congress of Biomechanics, Munich, Allemagne 2006).
2. S. Muller*, R. Sun, L. Wei, S. Fawzi-Grandcher, **M. Traoré**, C. Boura, J-F. Stoltz. Effect of shear stress on related cytoskeleton molecules in endothelial cells. (First International Symposium on Cardiovascular Biology “Endothelial Cell in Health and Hypertension”. Prague, République Tchèque, 2006).
3. **M. Traoré***, RJ. Sun, S.F-Grancher, D. Dumas, X Qing, R. Santus, J-F. Stoltz and S. Muller. Kinetics of the endocytotic pathway of Low Density Lipoprotein (LDL) in human endothelial cell line under shear stress: an *in vitro* confocal microscopy study. (12th European Conference on Clinical Hemorheology, Sofia, Bulgarie, 2003).

LISTE DES ABREVIATIONS

ABREVIATIONS

Ac	Anticorps
ADC	<i>Analogic to Digital Converter</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
APD1, ADP2	Bandes passantes pour la collection de la fluorescence
AMP	Adénosine monophosphate
Apo	Apolipoprotéines
AP-1	Activator protein-1
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BAEC	Cellules endothéliales aortiques bovines
BSA	Bovine serum albumin
CE	Cellule(s) endothéliale(s)
CELL scan	Scaner cellulaire
c-fos et c-jun	members of proto-oncogen family
CETP	<i>Cholesterol Ester-Transfer Protein</i>
CFD	Constante de discrimination du bruit de fond électronique
CLSM	Microscope confocal à balayage laser
CM	Chylomicrons
CML	Cellule musculaire lisse
DiI	perchlorate de 1,1'-dioctadécyl-3,3,3',3'-tétraméthylindocarbocyanine
DiI-LDL,	Lipoprotéines de faible densité (LDL) marquées avec du DiI et DiO
DiO-LDL et	
DiI-DiO-LDL	
DiO	Perchlorate de 3,3'-dioctadécyloxacarbocyanine
DMSO	Diméthyl sulfoxide
ECV304	Lignée de cellules endothéliales permanente de veine ombilicale humaine
EDTA	Acide éthylènedinitrilotétraacétique
Egr-1	Early growth response factor-1
eNOS	NO synthèse endothéliale
EPR	<i>Exhaustive Photon Reassignment</i>
ET-1	Endothéline-1
FCCS	Spectroscopie à corrélation croisée de fluorescence

FCS	Spectroscopie à corrélation de fluorescence
FDPM	<i>Frequency domain phase modulation</i>
FLIM	<i>Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy</i>
FRAP	<i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i>
FRET	Transfert d'énergie par résonance
GMP	Guanosine mono-Phosphate
GMP140	Granule membrane protein-140
GTP	Guanosine tri-Phosphate
Gx(s)	Courbe de corrélation croisée
G _{0,x}	Amplitude de la courbe de corrélation croisée
G(τ)	Fonction d'autocorrélation
h	Heure
HBSS	Solution saline de Hank
HDL	Lipoprotéines de haute densité
HSV	Herpès Virus Simplex
HUVEC	Cellule(s) endothéliale(s) de la veine ombilicale humaine
ICAM	Molécule d'adhésion intercellulaire
IDL	Lipoprotéines de densité intermédiaire
IF	Intensité de fluorescence
IG	Immunoglobuline
IL-1	Interleukine-1
INF-γ	Interféron- γ
JNK	c-jun N-terminal kinase
K_{nr}	Vitesse de désexcitation non radiative
K_r	Vitesse de désexcitation radiative
k_T	Vitesse de transfert d'énergie dans un processus de FRET
LCAT	Lecithin cholesterol acyltransferase
LDL	Lipoprotéines de faible densité du plasma
LDL-C	Lipoprotéines de basse densité riches en cholestérol
LOX-1	Lectin-like oxidized LDL receptor
Lp(a)	Lipoprotéine(a)
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein</i>
M-CSF	<i>Monocyte-colony stimulating factor</i>
MIF	Intensité moyenne de fluorescence
MTP	<i>Microsomal Triglyceride Transfer Protein</i>

M199	Milieu de culture référence M199
NO	Oxyde nitrique
NOS	NO synthase
NF-κB	nuclear factor kappa B
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ON	Ouverture numérique de l'objectif
Ox-LDL	Lipoprotéines de faible densité oxydées
Pa	Pascal
PAF	Paraformaldéhyde
PAI-1	Inhibiteur de l'activateur du plasminogène d'origine endothéliale
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF α et β	<i>Platelet Derived Growth Factor α et β</i>
PECAM-1	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i>
PGI₂	Prostacycline
PKC	Protéine kinase C
PLTP	Phospholipid Transfer Protein
PSF	<i>Point spread function</i>
Q	Rendement quantique
RAEC	Cellules endothéliales de l'aorte de lapin
RCPGs	Récepteurs couplés aux protéines G
RPMI-1640	Milieu de culture RPMI-1640
sLe^x, ^a	Sialyl lewis ^x ou ^a
SSRE	Eléments de réponse aux contraintes de cisaillement
SVF	Sérum de veau fœtal
SYNC	Synchronisation
S0	Etat fondamental d'une molécule
S1, S2	Etat excité d'une molécule
TAC	<i>Time to Amplitude Converter</i>
TCSPC	Résolution temporelle en microscopie
TGF-beta	<i>Transforming growth factor-β</i>
TNF-α	Facteur- α nécrosant des tumeurs
t-PA	Activateur du plasminogène de type tissulaire
TR-FRET	<i>Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
U	Unité
Ultroser G	Substitut du sérum

u-PA	Activateur du plasminogène de type urokinase
VCAM	Molécule d'adhésion cellulaire vasculaire
VLDL	Lipoprotéines de très basse densité
VLA-4	Very late antigen-4
vWF	Facteur von Willebrand
WP	Corps de Weibel-Palade
2D	Deux dimensionnelle
3D	Trois dimensionnelle
τ_D	Durée de vie du donneur dans un processus de FRET
τ_{DA}	Durée de vie de l'accepteur dans un processus de FRET

INTRODUCTION

Les pathologies cardiovasculaires (hypertension, athérosclérose, thrombose, ...) sont une des toutes premières causes de morbidité et de mortalité dans les pays développés. Elles sont souvent liées à des complications attribuables aux **dyslipoprotéïnémies**, associées à l'obésité, au diabète, à l'hypertension et à l'hypercholestérolémie. Il a été démontré qu'un élément clé de la genèse de la plaque d'athérome est l'accumulation pré-lésionnelle de **lipoprotéines de basse densité riches en cholestérol** (Low Density Lipoprotein-Cholesterol, ou **LDL-C**), au niveau des sites de prédilection de la formation des plaques d'athérome (Schwenke et Carew (1989).

De plus, leur athérogénicité peut être potentialisée par leur oxydation. L'ensemble de ces données, associés aux observations anatomopathologiques faites sur des plaques d'athérome humaines, permet d'affirmer aujourd'hui que l'athérosclérose est principalement une maladie inflammatoire chronique des grosses artères à localisation intinale (Ross, 1999 ; Shi *et al.*, 2000), et que l'agent d'agression entraînant la réaction inflammatoire est très probablement le LDL-cholestérol oxydé (Steinberg *et al.*, 1989). De plus, l'athérosclérose se développe particulièrement dans les régions où les contraintes mécaniques sont les plus importantes et où le flux sanguin est perturbé (embranchements vasculaires, bifurcations, courbures artérielles) (Caro *et al.*, 1969, Ku *et al.*, 1985, Glagov *et al.*, 1988). En effet, il est bien connu que les fonctions de l'endothélium vasculaire sont soumises aux forces mécaniques s'exerçant à la paroi des vaisseaux (Pression hydrostatique induisant une déformation périodique et surtout **contraintes de cisaillement** (Charara, 1993 ; Gooch et Tennant 1997, Stoltz *et al.*, 1999, 2004)).

Il est donc particulièrement intéressant d'approfondir l'influence des contraintes mécaniques sur le mécanisme d'entrée et le devenir des LDLs dans les cellules endothéliales, pour mieux comprendre le mécanisme de la genèse de la maladie athéromateuse.

L'objectif de notre travail concerne une approche originale en microscopie confocale, couplée à des techniques spectroscopiques pour suivre, en fonction du temps, l'internalisation et la dégradation des LDL dans les cellules endothéliales vasculaires humaines soumises ou non à des contraintes de cisaillement.

Pour ce faire, nous avons utilisé et développé une combinaison de différentes techniques spectroscopiques utilisées dans notre équipe. Le but était d'étudier, par imagerie et par mesures de transfert d'énergie par résonance (FRET – *Förster Resonance Energy Transfer*) en microscopie confocale à balayage laser et en spectroscopie à corrélation de fluorescence (FCS – *Fluorescence Correlation Spectroscopy*), l'effet des contraintes de cisaillement sur

des cellules endothéliales vasculaires au cours des processus métaboliques d'internalisation et la dégradation des LDL. Ces travaux devaient permettre une approche dynamique nouvelle de certains phénomènes pathologiques vasculaires.

Le manuscrit est organisé de la manière suivante :

Dans une première partie, nous rappellerons des notions sur les vaisseaux sanguins, les cellules vasculaires (cellule endothéliale, cellule musculaire lisse), les maladies cardiovasculaires, ainsi que les principaux paramètres impliqués dans les pathologies vasculaires (hémodynamique, lipoprotéines, interactions lipoprotéines-cellules).

La deuxième partie est consacrée aux matériels, aux méthodes et aux grandes techniques d'approches utilisées pour réaliser les travaux de cette thèse (culture cellulaire, système en flux, préparation des lipoprotéines de faible densité (LDL), microscopie de fluorescence, spectroscopie de corrélation de fluorescence...).

Dans la troisième partie, nous développons dans un premier temps les résultats des études de mise au point et de faisabilité des différentes méthodes utilisées, en particulier, la détermination du rendement de marquage des lipoprotéines par les sondes. Dans un deuxième temps, nous exposons les résultats des études cinétiques de l'interférence des LDL avec les cellules endothéliales.

Enfin, dans la quatrième partie nous envisagerons la discussion et les perspectives de notre travail.

.

PARTIE I

ETUDES BIBLIOGRAPHIQUES

I.1 – RAPPEL CONCERNANT LE SYSTEME VASCULAIRE : Les vaisseaux sanguins

Les vaisseaux sanguins forment un réseau dense de transport du sang dans le corps humain. Ils sont classés en artères, veines et capillaires. Schématiquement (*Figure-I.1*), ils sont constitués de trois tuniques morphologiquement distinctes, de l'intérieur vers l'extérieur du vaisseau : l'intima, la média et l'adventice. Ils diffèrent dans la composition, mais possèdent tous une monocouche de cellules endothéliales (endothélium) qui est directement soumise aux contraintes mécaniques de l'écoulement. Les réponses biologiques sous l'influence de ces contraintes mécaniques, constituent un objet de recherche qui a fait l'objet de nombreuses études au cours des 25 dernières années.

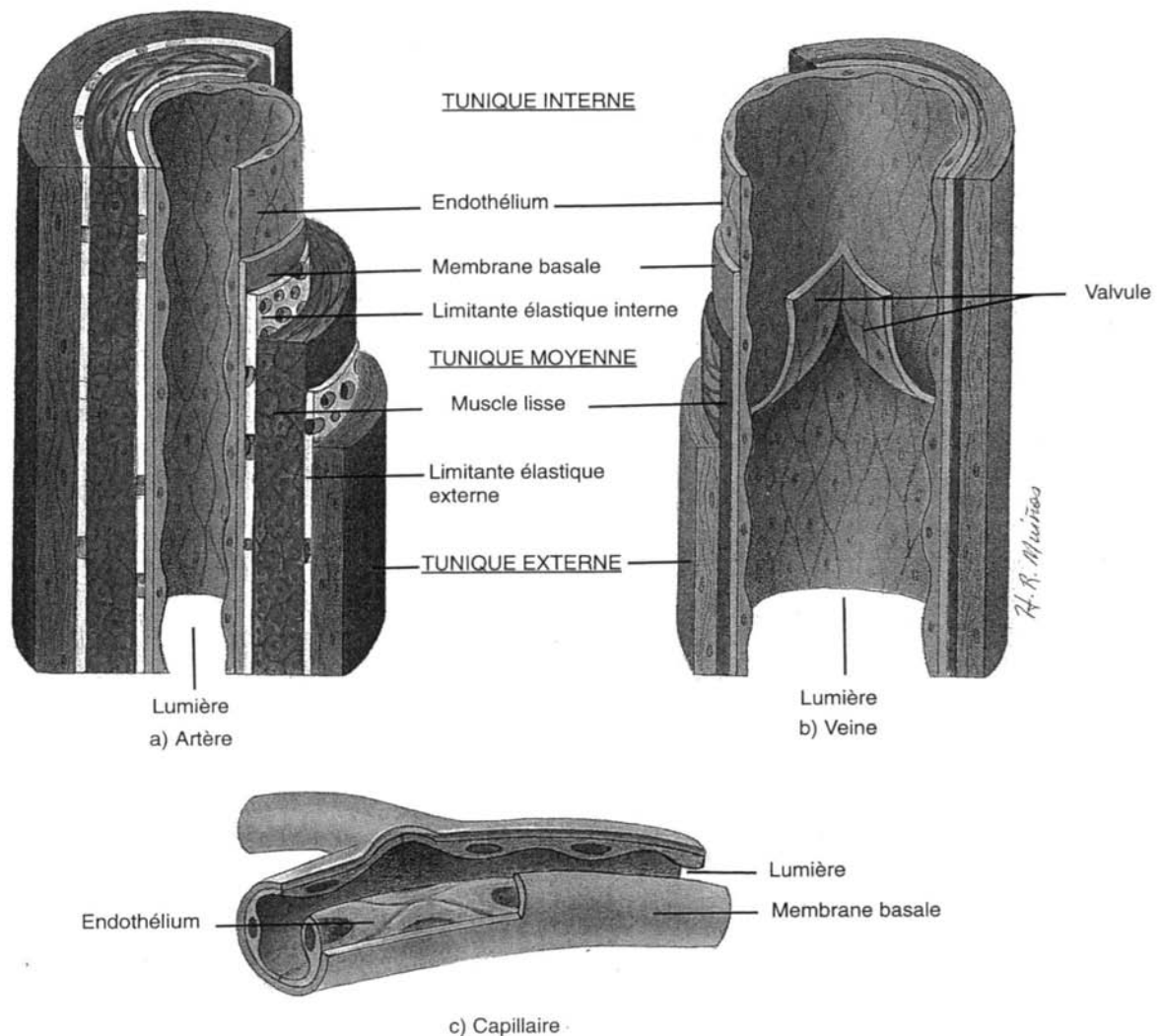


Figure-I.1 : Structure comparée des vaisseaux sanguins. Dans « Principes d'anatomie », Toratora, De Boeck Université (1994).

Le *Tableau-I.1* resume les caractéristiques structurales des vaisseaux sanguins, la composition à la fois en cellules musculaires lisses et en matrice extracellulaire chez l'homme.

Tableau-I.1 : Caractéristiques structurales des différents vaisseaux sanguins chez l'homme. (D'après Frayon et al., 2005).

Vaisseaux	Diamètre de la lumière	Epaisseur de la paroi	Cellules musculaires lisses	Composition de la média		Innervation
				Elastine	Collagène	
Artères élastiques	1 à 2 cm	2 mm	+++	+++	I, III	+
Artères musculaires	1 mm à 1 cm	1 mm	+++	+	I, III	++
Artérioles	30 μ m	20 μ m	+	+/-	I, III	+++
Capillaires	5 à 8 μ m	1 μ m	0	0	IV, V	+/-
Veinules post-capillaires	20 μ m	2 μ m	0	+/-		+/-
Veinules	0,5 cm	0,5 mm	+	+/-		+
Veines	1 à 3 cm	1,5 mm	+	+/-		+

I.1.1 – Les artères

Les artères sont des vaisseaux qui se ramifient depuis le cœur jusqu'aux capillaires. L'épaisseur et la composition des trois couches (intima, média et adventice) qui les constituent dépendent du type d'artère envisagé. Les trois couches sont en général séparées par deux lames élastiques : lame élastique interne entre l'intima et la média, lame élastique externe entre la média et l'adventice.

La couche interne ou intima est composée d'une monochouche de cellules endothéliales orientées longitudinalement dans le sens du courant sanguin et adossée au sous-endothélium composé de tissu conjonctif qui se réduit à une membrane basale.

La média est composée de plusieurs lames élastiques concentriques entre lesquelles on trouve une à plusieurs couches de cellules musculaires lisses selon le calibre du vaisseau (une seule couche dans le capillaire ou plusieurs couches dans une grosse artère).

L'adventice est une couche de tissu conjonctif lâche qui fixe le vaisseau au tissu conjonctif environnant. Son organisation est à peu près la même quel que soit le type de vaisseau, elle est en général, constituée de fibres de collagène et contient également quelques fibres élastiques.

I.1.2 – Les veines

Les veines et les veinules ont des parois plus minces, et la pression à l'intérieur y est plus faible. Il est très souvent difficile de distinguer la média de l'adventice. La lumière des veines est plus grande que celles des artères correspondantes. Elles se dilatent facilement, ce qui leur permet de contenir un volume de sang important. De ce fait, leurs parois permettent des mouvements péristaltiques, qui assurent de façon contrôlée le retour du sang.

I.1.3 – Les capillaires

Le rôle principal des capillaires est d'assurer les échanges entre le sang et les tissus. La paroi des capillaires est composée des trois couches : l'endothélium, la membrane basale et les tissus conjonctifs péri-capillaires. Sur la membrane basale, les cellules caractéristiques connues sous le nom de péricytes, dérivées des cellules musculaires lisses jouent probablement un rôle important dans la régulation du flux sanguin. Enfin l'espace périvasculaire est un tissu conjonctif réticulaire renfermant des fibres de collagène qui assurent la liaison du capillaire avec les tissus avoisinants.

I.2 – LES CELLULES VASCULAIRES

I.2.1 – L'endothélium : Les cellules endothéliales

I.2.1.a – Anatomie de l'endothélium vasculaire

L'endothélium vasculaire est la monocouche de cellules endothéliales tapissant l'intérieur de l'ensemble des vaisseaux sanguins. Il représente l'interface entre le sang et les tissus. C'est aussi une membrane semi-perméable qui régule les échanges (eau, ions, protéines, etc.) entre le sang et les tissus.

I.2.1.b – Structure et propriétés de la cellule endothéliale

Les cellules endothéliales vasculaires sont des cellules polarisées. Leur paroi basale est ancrée sur la matrice extracellulaire composée de macromolécules de nature collagénique et de protéines adhésives (collagène, fibronectine, facteur von Willebrand). Leur face vasculaire est

en contact avec le sang circulant et représente une surface non thrombogène du fait de son organisation et de la production par les cellules des substances anticoagulantes et antiagrégantes plaquettaires. Elles ont une forme aplatie (0,1-1 μm) polygonale de quelques micromètres d'épaisseur, 10-15 μm de largeur et 20-50 μm de longueur orientées dans la direction du flux sanguin (Legrand 1987, Williams *et al.*, 1995 ; Chappey *et al.*, 1997). L'intégrité endothéliale est assurée par des systèmes d'adhérence cellule/cellule et cellule/matrice. Les protéines de la matrice extracellulaire interagissent avec des récepteurs de la famille des intégrines présents sur la surface endothéliale. L'adhérence entre cellules est contrôlée par des molécules d'adhésion (intégrines, cadhérines, PECAM-1-*Platelet endothelial cell adhesive molecule-1*).

Il existe également à la surface des cellules endothéliales des canaux, des pores et des vésicules trans-cellulaires. Leur membrane est recouverte de charges négatives riches en carbohydrates (protéoglycanes). Parmi les constituants intracellulaires, on remarque la présence de corps de Weibel-Palade (WP), des organelles cytoplasmiques contenant le facteur von Willebrand (vWF) molécules spécifiques des cellules endothéliales (*Figure-I.2*) (Ruggeri et Ware, 1993). Les corps de Weibel-Palade se présentent sous la forme de bâtonnets résultant de la juxtaposition de petits tubules orientés parallèlement à l'axe longitudinal et entourés d'une structure membranaire. Ces tubules représentent probablement les multimères de vWF (Legrand, 1987 ; Ruggeri et Ware, 1993 ; Williams *et al.*, 1995 ; Chappey *et al.*, 1997).

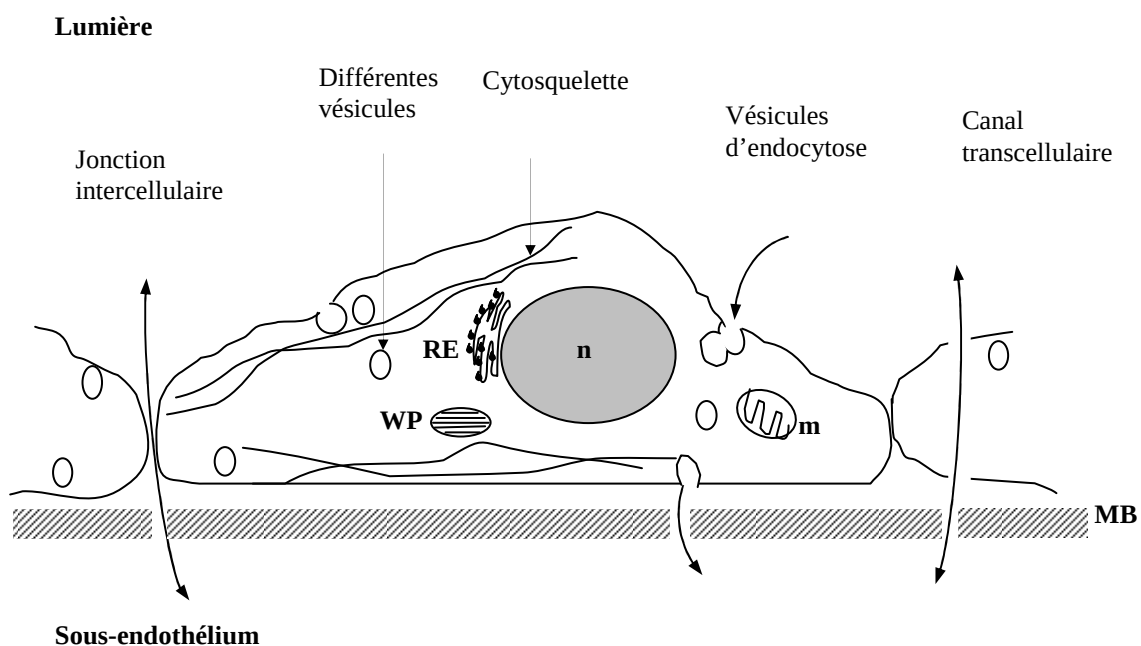


Figure-I.2 : Représentation schématique des cellules endothéliales. [D'après Legrand 1987 ; Drenckhahn et Ness, 1997], **m** : mitochondrie ; **n** : noyau ; **MB** : membrane basale ; **RE** : réticulum endoplasmique ; **WP** : corps de Weibel Palade.

I.2.1.c – Fonctions de la cellule endothéliale

Les cellules endothéliales, interviennent dans la défense immunitaire par leurs fonctions biologiques, en particulier dans la recirculation lymphocytaire et le recrutement des leucocytes circulant lors des états inflammatoires (Springer, 1994). Cependant, quatre aspects de la physiologie endothéliale sont importants à considérer (Stoltz *et al.*, 1999).

- ***Barrière de perméabilité sélective***

La cellule endothéliale est une barrière de perméabilité sélective qui permet et régule les échanges de molécules de tailles variables (eau, sels, protéines, molécules pharmacologiques) entre le sang et les tissus. Les voies de transport au travers de la barrière endothéliale varient selon leur localisation artérielle, veineuse ou microcirculatoire. Les jonctions cellules/cellules et les vésicules de transport sont principalement empruntées.

Les échanges avec la lumière du vaisseau peuvent se faire de nombreuses façons :

- par diffusion passive (gaz, ions, etc.),
- par transport intracellulaire par pinocytose (protéines, lipides),
- par le biais de transporteurs membranaires (facteurs de croissance
- au travers de l'espace intercellulaire permettant le passage des cellules du sang lors de phénomènes inflammatoires par exemple (diapédèse).

Le passage des macromolécules se fait soit par transcytose grâce à des récepteurs spécifiques ou soit au travers de pores de grands diamètres.

En particulier, *il existe au niveau de la surface vasculaire des récepteurs membranaires glycoprotéiniques qui vont permettre la fixation des lipoprotéines de faible densité (LDL) du plasma et leur passage dans la cellule par un mécanisme d'endocytose spécifique.* Le facteur de croissance vasculaire endothélial possède des récepteurs membranaires spécifiques au niveau de l'endothélium et régule ainsi la perméabilité vasculaire, la prolifération endothéliale et l'angiogenèse (Boneu et Cazenave, 1997).

- ***Action anti-thrombosante et thrombosante***

La surface luminale de la cellule endothéliale est thromborésistante, alors que la surface abluminale adhère fortement aux macromolécules thrombogènes du sous-endothélium qu'elle synthétise. Les cellules endothéliales expriment à leur surface des protéoglycanes (glycoaminoglycanes sulfatés) à charges négatives. Elles secrètent aussi l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) et l'inhibiteur du facteur tissulaire. La thromborésistance de l'endothélium est le résultat de propriétés actives et passives des cellules endothéliales qui

empêchent l'activation du système de la coagulation permettant la génération de thrombine ainsi que l'adhésion et l'activation des plaquettes à l'interface.

Une propriété fondamentale de l'endothélium est la production et l'expression d'une glycoprotéine transmembranaire : la thrombomoduline, récepteur de la thrombine. Cette protéine constitue alors un complexe qui active la protéine C. Cette action anticoagulante maîtrise la génération constante de thrombine à l'interface du sous-endothélium et des cellules sanguines. La thromborésistance endothéliale dépend donc principalement de la modulation de la thrombine, des fonctions plaquettaires et de l'induction de propriétés biologiques de l'endothélium. L'endothélium exerce des activités anticoagulantes par d'autres voies telles que la captation et la dégradation de substances thrombogènes (ADP, 5-HTP) et par l'effet des produits vasomoteurs (Prostacycline, PGI₂ et oxyde nitrique, NO, etc.) sur les plaquettes.

La cellule endothéliale intervient également dans la fibrinolyse en sécrétant, sous l'influence de divers stimuli, les activateurs du plasminogène de type tissulaire (t-PA) et de type urokinase (u-PA) ainsi que l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1) d'origine endothéliale. A leur surface, ces substances s'associent en complexes macromoléculaires qui ne se libéreront qu'au contact de la fibrine.

Sous l'effet de molécules impliquées dans les processus de la coagulation (thrombine) ou les processus inflammatoires (endotoxines, cytokines, etc.), des propriétés thrombogènes de l'endothélium peuvent être également induites. Le système de la coagulation est activé à la suite de l'exposition des phospholipides anioniques de la membrane, de la synthèse de facteur tissulaire et de facteur V, de l'expression de récepteurs membranaires pour le facteur Xa (Boneu et Cazenave, 1997).

L'émersion des corps de Weibel-Palade est un phénomène précoce et rapide au cours de l'activation endothéliale. Les corps de WP fusionnés aux membranes superficielles de l'endothélium secrètent le facteur von Willebrand, adhésine majeure des plaquettes sanguines et expriment la P-sélectine disponible pour l'adhésion leucocytaire, polynucléaire et monocyttaire. Succédant à cette réaction rapide, la thrombomoduline est clivée en surface, au niveau de 5 ou 6 sites de la partie extramembranaire, clivage auquel contribuent les leucocytes adhérents. L'endothélium perd ainsi sa fonction principale de régulation de la thrombine.

L'endothélium activé sécrète de grandes quantités de complexes t-PA-PAI-1 au profit de l'inhibiteur en excès, ce qui va dans le sens d'un ralentissement de la fibrinolyse.

La cellule endothéliale exprime également la thrombomoduline qui fixe spécifiquement la thrombine. Elle synthétise également d'autres facteurs de la coagulation (facteur V, récepteur du facteur IX/IXa, récepteur du facteur Xa, protéine S et son récepteur, α_2 -macroglobuline).

- **Action vasomotrice**

La cellule endothéliale synthétise des agents vasoactifs tels que l'endothéline-1 (ET-1), la prostacycline (PGI₂) ou l'oxyde nitrique (NO) (Stoltz *et al.*, 1999). Enfin la cellule endothéliale possède des enzymes qui inactivent la bradykinine et transforment l'angiotensine I en angiotensine II vasoactif et est également la source de certains facteurs de croissance.

- **Propriétés anti-adhésive et adhésive**

La cellule endothéliale exprime à sa surface vasculaire de façon constitutive ou après induction biochimique ou mécanique, des récepteurs d'adhésion pour les leucocytes polynucléaires neutrophiles, les lymphocytes, les monocytes et les plaquettes.

Les trois familles de molécules d'adhésion qui interviennent principalement dans les processus d'adhésion leucocytaire sont : les sélectines, les intégrines et les membres de la superfamille des immunoglobulines (Carlos et Harlan, 1994 ; Springer, 1994 ; Tedder *et al.*, 1995 ; Aplin *et al.*, 1998).

- **Les sélectines** interviennent principalement dans les interactions entre les leucocytes circulants et les cellules endothéliales durant la capture et l'étape de roulement du mécanisme d'adhésion lors des processus inflammatoires. Elles reconnaissent les carbohydrates fucosylés notamment des groupements sialyl-Lewis^x (sLe^x). Ces interactions labiles permettent ainsi aux leucocytes de rouler le long de l'endothélium vasculaire dans la direction du flux sanguin. Il existe trois différents types de sélectines qui sont respectivement : *L-sélectines* (leucocyte), *P-sélectines* (platelet) et *E-sélectines* (endothelial). Chacune comprend un domaine N-terminal de reconnaissance des carbohydrates (c-type lectin domain)

- *E-sélectines* (ELAM-1, CD62E) sont exprimées dans les cellules endothéliales activées par les cytokines (interleukine-1, IL-1 ; tumor necrosis factor TNF-alpha).
- *L-sélectines* (LECAM-1, Mel-14 ou CD62L), sont exprimées par des lymphocytes circulants, des monocytes et par tous les granulocytes.
- *P-sélectines* (GMP140, CD62P) sont exprimées par les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales et dans les granules α des plaquettes.

- **Les intégrines** sont des glycoprotéines transmembranaires qui se trouvent de manière prédominante à la surface des leucocytes, des cellules endothéliales et sont liées au cytosquelette auquel elles communiquent les signaux extracellulaires. Elles sont impliquées dans les phénomènes de mécanotransduction.

- **La superfamille des immunoglobulines** représente la famille la plus abondante des molécules de la surface cellulaire. Leur structure est caractérisée par des domaines répétitifs

semblables à ceux trouvés sur les immunoglobulines. Bien que « le roulement » (phénomène dit de *Rolling*) des leucocytes sur les cellules endothéliales soit un pré-requis pour une adhérence ferme sur la paroi vasculaire, l'adhésion des leucocytes *via* les sélectines ne permet pas une adhésion réelle à moins que des molécules de la superfamille des immunoglobulines n'interagissent. Pour les interactions cellules endothéliales/leucocytes, les membres les plus importants de cette famille sont : ICAM-1, ICAM-2 et VCAM-1, qui servent de ligand pour les intégrines LFA-1 et VLA-4. ICAM-1 et 2 sont des ligands pour l'intégrine de la sous-unité $\beta 2$, LFA-1 (CD11a/CD18). Elles diffèrent cependant par leur répartition et leur fonction. Parmi les autres molécules de cette famille, il faut également signaler : ICAM-3, est exprimée constitutivement par les leucocytes et jouant un rôle important dans la stimulation des lymphocytes T ; PECAM-1(CD31, platelet endothelial cell adhesion molecule 1), exprimée de manière prédominante dans les cellules endothéliales et les plaquettes, et qui est nécessaire pour la migration transendothéliale des leucocytes.

I.2.2 – La cellule musculaire lisse

I.2.2.a – Structure de la cellule musculaire lisse

Les cellules musculaires lisses (CML) sont des cellules peu différenciées issues du mésoderme. Ce sont des cellules allongées de 2-5 μm de diamètre pour une longueur très variable selon le tissu (de 15 μm pour les plus petites à 500 μm pour les CML utérines). *In vivo* les cellules sont organisées en feuillet et sont parallèles. Elles sont associées entre elles par un tissu conjonctif renfermant essentiellement du collagène et de l'élastine. Tout comme les cellules musculaires squelettiques et cardiaques, les CML contiennent des myofilaments fins d'actine et des myofilaments épais de myosine. Toutefois, ces filaments ne sont pas organisés et ne forment pas de myofibrilles bien individualisées (Somlyo, 1980), ils sont groupés en faisceaux irréguliers orientés selon le grand axe de la cellule. La membrane plasmique des CML présente des jonctions qui permettent la diffusion rapide de messages, et notamment de l'excitation d'une cellule à l'autre.

I.2.2.b – Fonctions de la cellule musculaire lisse

Les cellules musculaires lisses ont un rôle essentiel dans le système vasculaire. Ce sont les principaux éléments contractiles des parois des vaisseaux sanguins. Elles ont la propriété de produire et de sécréter diverses protéines comme le collagène et l'élastine qui vont s'insérer dans leur membrane basale ou être excrétées dans la matrice extracellulaire. Leur fonction contractile assure la vasomotricité et le tonus artériel. La vasomotricité est régulée par les messagers agissant sur l'endothélium qui transmet l'ordre aux cellules musculaires lisses par

l'intermédiaire d'un second messenger. En outre, les cellules musculaires lisses assurent des fonctions métaboliques en particulier le catabolisme des lipoprotéines LDL.

I.3 – HEMODYNAMIQUE ET HEMOMECANIQUE

L'hémodynamique est un concept primordial en physiologie cardiovasculaire, elle rassemble l'étude des lois régissant le fonctionnement du système cardiovasculaire, à savoir l'écoulement du sang dans les vaisseaux, en prenant en compte des paramètres physiques tels que le débit sanguin, la pression, la vasomotricité et la résistance des vaisseaux.

I.3.1 – Forces hémodynamiques

Les endothélium vasculaire est soumis *in vivo* en permanence à trois types contraintes mécaniques (*Figure-I.3*) dont l'intensité est variable en fonction du lit vasculaire : la contrainte de cisaillement (τ), la pression hydrostatique (p) et la déformation périodique (ϵ) (Charara, 1993 ; Gooch et Tennant, 1997). Le *Tableau-I.2* résume les principales données hémodynamiques du système vasculaire humain tels que les diamètres des vaisseaux et les caractéristiques de l'écoulement sanguin. Les cellules situées à la paroi ressentent beaucoup plus de force et cela est dû aux forces de frottement qui sont beaucoup plus importantes au niveau de la paroi.

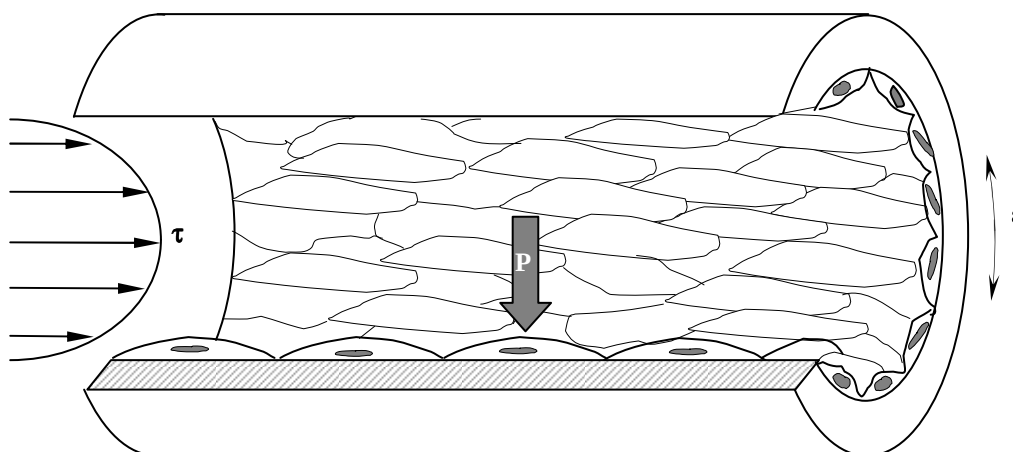


Figure-I.3 : Contraintes mécaniques agissant sur les cellules endothéliales τ : contrainte de cisaillement ; p : pression ; ϵ : déformation périodique.

Tableau-I.2 : Données hémodynamiques du système vasculaire humain (D'après Charara, 1993 ; Michael *et al.*, 1996).

Type de vaisseaux	Diamètre (cm)	Vitesse locale (cm/s)	Vitesse de cisaillement à la paroi (sec ⁻¹)	Contrainte de cisaillement à la paroi (Pa)
Aorte ascendante	2,0-3,2	60	180	0,7
Aorte descendante	1,6-2,0	30	130	0,5
Larges artères	0,2-0,6	20-50	300-800	1,1-3,0
Artérioles	0,004	0.5	500-1,600	1,9-6,0
Capillaires	0,0005-0,001	0,5-0,1	800	3,2
Veinules	0,005-0,01	0,2-0,4	320	
Veines	0,5-1,0	15-20	20-200	0,076-0,76
Veine cave	2,0	10-15	50	0,2
Vaisseaux sténotiques			800-10 000	3,0-3,8

I.3.1.a – Contraintes de cisaillement

La contrainte de cisaillement correspond aux forces tangentielles (par unité de surface) qui agissent sur la paroi vasculaire. Elle est déterminée par le débit sanguin, la viscosité et par le diamètre du vaisseau. La valeur moyenne de cette contrainte, calculée à partir de la loi de Poiseuille, est normalement comprise entre 0,2 à 2 Pa, mais peut atteindre des valeurs plus élevées dans certains cas (pathologies vasculaires).

I.3.1.b – Pression hydrostatique

La pression hydrostatique agit perpendiculairement à la surface des vaisseaux. Elle agit aussi bien sur la matrice extracellulaire que sur l'endothélium. Les études démontrent que la distribution de la contrainte de cisaillement et la pression à la surface de chaque cellule endothéliale est variable selon le territoire mais aussi selon la topographie de la surface cellulaire (Satcher *et al.*, 1992; Barbee *et al.*, 1995; Davies *et al.*, 1997a ; Davies *et al.*, 1997b).

I.3.1.c – Déformation périodique

L'endothélium est exposé à une déformation périodique liée aux pulsations cardiaques. Les effets de déformation peuvent être étudiés *in vitro* en culture cellulaire grâce à des cultures de CE sur des membranes élastiques (Gooch *et* Tennant, 1997).

I.3.2 – Influence des contraintes mécaniques sur les cellules endothéliales

Etant donné la situation interfaciale des cellules endothéliales, la connaissance de leurs propriétés mécaniques est particulièrement importante. En 1968, Fry décrit des modifications de l'endothélium vasculaire en relation avec le gradient de vitesse à la paroi (Fry, 1968). En 1981, Dewey *et al.*, parlent d'une réponse dynamique des cellules endothéliales vis-à-vis des forces de cisaillement (Dewey Jr. *et al.*, 1981) et Nerem suggèrent que la morphologie des cellules endothéliales peut être un indicateur de la condition hémodynamique locale (Nerem *et al.*, 1981). Au cours des vingt dernières années, l'influence des conditions hémodynamiques locales sur les cellules endothéliales a suscité un intérêt croissant. Des travaux récents ont souligné le rôle déterminant des conditions locales d'écoulement sur leurs propriétés (Reinhart, 1994 ; Stoltz *et al.*, 2004). Pour expliquer ces réponses, il est maintenant admis de parler de mécanotransduction.

Les différents travaux publiés dans ce domaine ont tenté de mieux comprendre le rôle des CE dans la physiologie et la pathologie vasculaire et plus particulièrement dans le processus de l'athérosclérose. La réponse des CE à la contrainte de cisaillement peut réguler la vasodilatation et la fonctionnalité de la paroi vasculaire (Davies *et al.*, 1997b ; Stoltz *et al.*, 1999).

I.3.2.a – Réponses des cellules endothéliales aux contraintes de cisaillement

La réponse des cellules endothéliales à des contraintes mécaniques a été largement étudiée et les variations d'un grand nombre de fonctions cellulaires ont été rapportées (électrophysiologique, biochimique, récepteurs, régulation de gènes, etc.). (Reinhart, 1994 ; Davies *et al.*, 1997a). Les effets de cisaillement brutal ou chronique ont été extensivement étudiés *in vitro* (Ballermann *et al.*, 1998 ; Braddock *et al.*, 1998). Les diverses réponses endothéliales aux contraintes mécaniques peuvent être classées en fonction du temps de réaction, bien qu'elles soient souvent simultanées. Par exemple, les changements rapides du potentiel membranaire (secondes) et l'activation des cascades biochimiques montrent un temps caractéristique similaire. Pour la partie plus tardive, on constate l'activation de protéine

G, la libération de NO, la mobilisation des dérivés phosphoinositides, la libération de Ca^{2+} intercellulaire, la phosphorylation de nucléotides cycliques, etc. Les modifications structurales, comme la réorganisation de filaments d'actine et la morphologie cellulaire apparaissent beaucoup plus tard dans la séquence des événements de mécanotransduction.

Le Tableau-I.3 résume les principales réponses des cellules endothéliales aux contraintes de cisaillement pour les différents temps caractéristiques.

I.3.2.b – Régulation génique

La régulation de l'expression génique de molécules produites par les cellules endothéliales et intervenant dans ses fonctions, comme l'endothéline-1 (Morita *et al.*, 1993a; Morita *et al.*, 1993b; Morita *et al.*, 1994), l'activateur tissulaire du plasminogène (Diamond *et al.*, 1990), le PDGF α et β (Hsieh *et al.*, 1991), la MCP-1 (Shyy *et al.*, 1994), les molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1) (Ando *et al.*, 1994; Nagel *et al.*, 1994; Sampath *et al.*, 1995), est influencée par l'écoulement. Différents types de réponses aux contraintes mécaniques ont été décrits. Ils se résument à des séquences spécifiques de la chaîne d'ADN. Par exemple, la séquence de 6-bp de GAGACC des SSRE (*shear stress response element*), qui est le premier élément proposé répondant à la contrainte de cisaillement (Resnick *et al.*, 1993), gère la réponse de PDGF, ICAM-1, eNOS, etc.

D'autres facteurs de transcription participent à l'activation de promoteur par la contrainte de cisaillement : NF- κ B, AP-1, Egr-1 c-fos, c-jun, c-myc et Sp-1 (Resnick et Gimbrone Jr., 1995 ; Gimbrone, Jr. *et al.*, 1997). Les variations observées dans la régulation génique suggèrent qu'il y a peut-être deux types d'éléments géniques sensibles aux contraintes de cisaillement (positif et négatif) et en plus, des régulations multiples en compagnie des autres facteurs transcriptionnels. Les régulations de la transcription (niveau de ARNm) des molécules par la contrainte de cisaillement sont présentées dans le Tableau-I.4.

La réponse génique des cellules endothéliales aux contraintes de cisaillement peut être classée en trois types :

- augmentation précoce transitoire (c-fos, c-jun, c-myc, etc.),
- augmentation continue de l'expression des ARNm (t-PA, eNOS, etc.),
- régulation biphasique : augmentation dans les premières heures, suivie d'une décroissance rapide et continue jusqu'à la 12^{ème} heure (ET- 1, PDGF, etc.).

Tableau-I.3 : Principales réponses des cellules endothéliales à des contraintes de cisaillement pour les différents temps d'application (D'après Stoltz et al.)

Temps	Réponses	Signification physiologique	Références
secondes	Activation du canal K ⁺ Activation des messagers secondaires (IP ₃ , DAG, Ca ²⁺ , PKC, G protéine, etc.) Libération de NO	- ouverture des canaux K ⁺ sélectifs - favoriser l'entrée du calcium - activation de la voie de transduction du signal (e.g. : activation de la voie Ca ²⁺ -dépendante) - vasorelaxation flux-dépendant	(Olesen <i>et al.</i> , 1988) (Prasad <i>et al.</i> , 1993) (Bhagyalakshmi <i>et al.</i> , 1992) (Shen <i>et al.</i> , 1992) (Helmlinger <i>et al.</i> , 1995) (Hsieh <i>et al.</i> , 1992) (Berthiaume et Frangos, 1992) (Kuchan <i>et al.</i> , 1994) (Kuchan et Frangos, 1994) (Gooch et Tennant, 1997)
minutes	Libération de PG Activation de MAP kinase Activation de NFκB Régulation de PDGF-B SSRE-dépendant	- vasodilatation et anti-thrombose - transduction du signal - activation de transcription - régulation de la croissance cellulaire	(Frangos <i>et al.</i> , 1985) (Tseng <i>et al.</i> , 1995) (Mohan <i>et al.</i> , 1997) (Hsieh <i>et al.</i> , 1991)
1 h ~ 6 h	Régulation SSRE-dépendante (PDGF, NOS, tPA, TGFβ1, ICAM-1, c-fos, MCP-1, etc.) ET-1: augmentation VCAM-1: diminution Réarrangement du Cytosquelette Alignement des sites d'adhésion Focale Augmentation de la connexine 43 Réarrangement des organelles cellulaire (MTOC, Golgi, etc.) Prolifération cellulaire Augmentation : écoulement turbulent ou perturbé Non changement ou diminution : écoulement laminaire	- régulation de la croissance cellulaire -vasorelaxation flux – dépendante - augmentation de l'activité fibrinolytique - adhésion cellulaire - transduction du signal - recrutement de monocytes - vasoconstriction - adhésion cellulaire - mécanisme dans les variations de la morphologie - prolifération de CE	(Hsieh <i>et al.</i> , 1991) (Xiao <i>et al.</i> , 1997) (Diamond <i>et al.</i> , 1989) (Diamond <i>et al.</i> , 1990) (Ohno <i>et al.</i> , 1995) (Nagel <i>et al.</i> , 1994) (Sampath <i>et al.</i> , 1995) (Hsieh <i>et al.</i> , 1993) (Shyy <i>et al.</i> , 1994) (Kuchan et Frangos, 1993) (Ando <i>et al.</i> , 1994) (Galbraith <i>et al.</i> , 1998) (Davies, 1995) (Davies <i>et al.</i> , 1997b) (Davies <i>et al.</i> , 1986) (Gooch et Tennant, 1997)
> 6 h	Changement de la morphologie (> 12 h) Réarrangement de Fn Régulation négative de Tm	- adaptation au flux - anti-thrombose	(Davies <i>et al.</i> , 1997b) (Barbee <i>et al.</i> , 1995) (Wechezak <i>et al.</i> , 1985) (Malek <i>et al.</i> , 1999)
> 24 h	Augmentation de la rigidité de la surface cellulaire Alignement et élongation des CE	- diminution de la déformabilité de la surface cellulaire - morphologie adaptée au flux	(Sato <i>et al.</i> , 1987) (Girard et Nerem, 1995) (Galbraith <i>et al.</i> , 1998)

IP₃ : inositol triphosphate ; DAG : diacylglycerol ; PKC : protein kinase C ; NFκB : nuclear factor kappa B ; MAP : mitogen-activated protein ; SSRE : shear stress response element ; PDGF-B : platelet derived growth factor B chain ; βFGF : basic fibroblast growth factor beta ; NO : nitro oxide ; PG : prostaglandins ; NOS : nitro oxide synthase ; tPA : tissue plasminogen activator ; TGFβ : transforming growth factor beta ; ICAM-1 : intercellular adhesion molecule-1 ; MCP-1 : monocyte chemoattractant protein-1 ; ET-1 : endothelin-1 ; VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule-1 ; Tm : thrombomodulin ; Fn : fibronectin.

Tableau-I.4 : Régulation de la transcription (niveau d'ARNm) des molécules par la contrainte de cisaillement (D'après Braddock et al., 1998 ; Stoltz et al., 1999).

Gène	Cellules utilisées	Réponse de l'ARN	SSRE	Autres facteurs
ET-1	HUVEC/BAEC	biphasique	-	AP-1
VCAM-1	HUVEC	diminue (τ forte) augmente (τ faible)	-	AP-1, NF- κ B
ACE	RAEC	diminue	+	SSRE, AP-1, Egr-1
TF	RAEC	augmente	-	Sp-1
TF	RAEC/HUVEC	augmente	-	Egr-1
Tm	HUVEC	biphasique	-	AP-1
PDGF-A	BAEC	biphasique	+	Egr-1
PDGF-B	BAEC	biphasique	+	
ICAM-1	HUVEC	augmente (ou biphasique)	+	AP-1, NF- κ B
TGF- β	BAEC	augmente	+	AP-1, NF- κ B
c-fos	HUVEC	augmente	+	
c-jun	HUVEC	augmente	+	AP-1
eNOS	HUVEC	augmente	+	AP-1, NF- κ B
MCP-1	HUVEC	biphasique	+	AP-1, NF- κ B

HUVEC : humain umbilical vein endothelial cell ; HAEC/BAEC/RAEC: human/bovine/rabbit aortic endothelial cell ; ACE : angiotensin-converting enzyme ; TF : tissue factor ; c-fos and c-jun : members of protooncogen family ; eNOS : endothelial nitric oxide synthase ; AP-1 : activator protein-1 ; NF- κ B : nuclear factor κ B ; Egr-1 : early growth response factor-1 ; SSRE : shear stress response element.

I.3.2.c – Distribution des contraintes mécaniques sur les modifications morphologiques

Les changements morphologiques correspondant à l'allongement et à l'orientation des cellules endothéliales parallèlement à la direction de l'écoulement et la réorganisation du cytosquelette (filaments d'actine et autres) sont responsables de la motilité et de l'adhésion cellulaire (Dewey, Jr. et al., 1981 ; Nerem et al., 1981 ; Ookawa et al., 1993 ; Cucina et al., 1995 ; Thummine et al., 1995). A faible contrainte de cisaillement, aussi bien *in vivo* que *in vitro*, les cellules endothéliales montrent une forme polygonale et sont moins allongées en comparaison avec des cellules endothéliales soumises à une forte contrainte de cisaillement (Franke et al., 1984 ; Walpola et al., 1993 ; Drenckhahn et Ness, 1997) (Figure-I.4). Par ailleurs, les changements morphologiques des CE sont variables selon leur localisation dans les vaisseaux (branchements, bifurcations) et les conditions d'écoulements (laminaire,

perturbé, présence de vortex, etc.) (Davies *et al.*, 1986 ; Helmlinger *et al.*, 1991 ; Sato et Ohshima, 1994 ; Truskey *et al.*, 1995 ; Chiu *et al.*, 1998).

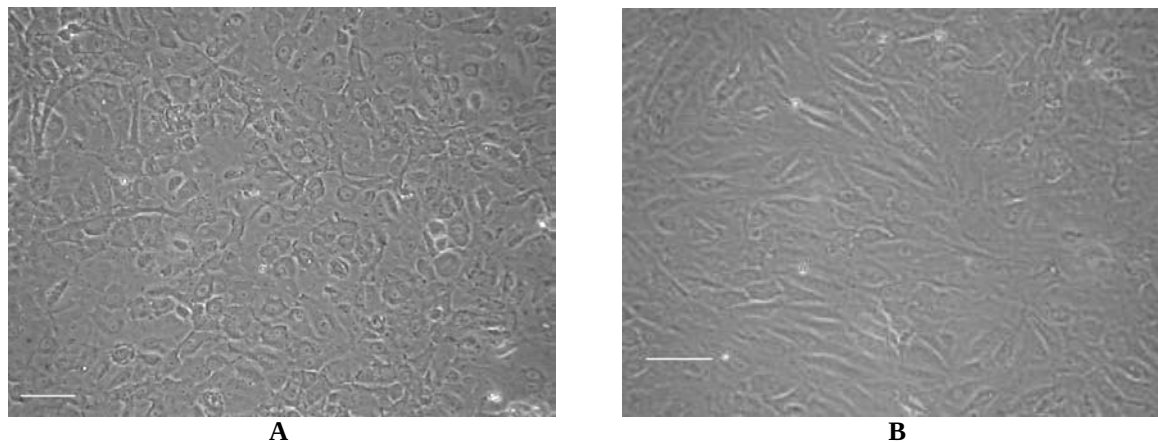


Figure-I.4 : Influence des contraintes mécaniques sur la morphologie des cellules endothéliales (D'après Lei *et al.*, 2004) ; A : HUVEC en condition statique ; B : HUVEC exposées à une contrainte de cisaillement de 1,0 Pa pendant 24 h, Microscope optique inversé à contraste de phase, $\times 20$, Bar : 50 μm .

I.3.2.d – Mécano-récepteurs

La réponse des cellules endothéliales aux stimuli mécaniques concerne pratiquement tous les mécanismes liés à la croissance et au métabolisme cellulaire. Tous les produits synthétisés de l'endothélium sont également régulés par les contraintes mécaniques développées par l'écoulement sanguin, *via* un phénomène de "mécanotransduction". Mais les mécanismes de cette mécanotransduction restent hypothétiques : comment et par quels "capteurs" les cellules endothéliales reçoivent-elles les stimuli mécaniques et les convertissent-elles en des signaux électro-physiologiques et biochimiques ?

– Distribution de contraintes mécaniques et localisation potentielle des mécano-senseurs à la surface

La distribution des contraintes hémodynamiques à la surface cellulaire et dans la cellule est fonction de la géométrie des cellules (Davies et Tripathi, 1993 ; Barbee *et al.*, 1995 ; Davies *et al.*, 1997b). La monocouche endothéliale étant hétérogène, la sensibilité d'une cellule peut être déterminée par la fraction de surface exposée à une contrainte au-dessus d'un certain seuil critique. La distribution des forces subcellulaires est spatialement variable. Dans ce cas, la localisation des éléments mécano-sensibles est un facteur clé si le nombre de ces éléments

est limité. De ce point de vue, on peut penser que la sensibilité d'une cellule est déterminée par sa forme ainsi que par la localisation et l'activation de ses éléments mécano-sensibles.

– Existence de molécules mécano-sensibles à la surface cellulaire

Les contraintes mécaniques activeraient des capteurs mécano-sensibles, tels que les récepteurs de surface, les canaux ioniques, les points focaux d'adhésion et le cytosquelette. Cette étape initiale se poursuivrait ensuite au niveau des seconds messagers tels que le Ca^{++} intracellulaire, la protéine kinase C (PKC), des protéines G, l'AMP cyclique, la GMP cyclique etc., qui subissent à leur tour des perturbations. Ces modifications profondes de l'équilibre des seconds messagers entraîneront alors un changement de l'état d'activation des "DNA binding factors" (Hsieh *et al.*, 1992 ; Kuchan et Frangos, 1994 ; Morita *et al.*, 1994).

L'étape finale se résume alors dans une altération de l'activité de transcription de nombreux gènes *via* des éléments de réponse aux contraintes de cisaillement locales (SSRE) positifs ou négatifs ou à une combinaison des deux, agissant à des temps différents.

i. Canaux ioniques

Les canaux ioniques K^+ , sensibles à l'étirement de la membrane, ont une activité modifiée en réponse à une contrainte mécanique. Olesen *et al.*, ont identifié un courant ionique, K^+ sélective, activé par la contrainte de cisaillement. Ce courant membranaire hyperpolarisant se développe en fonction de la contrainte de cisaillement, atteignant la moitié du maximum d'activation à 0,07 Pa et la saturation à 1,5~2,0 Pa. Ce courant est rapidement activé par la contrainte de cisaillement (quelques secondes), augmente lentement (quelques minutes), et un retour complet à la normale est observé quand l'écoulement est arrêté (Olesen *et al.*, 1988). Néanmoins, il n'est pas sûr que l'activation des canaux soit considérée comme une réponse primaire à la contrainte de cisaillement ou une réponse secondaire à l'activation des mécano-récepteurs en amont.

ii. Intégrines

Selon certains travaux (Wang *et al.*, 1993 ; Barbee *et al.*, 1995 ; Chen *et al.*, 2006), il existerait des mécanorécepteurs liés au cytosquelette, en particulier, les intégrines. Le déplacement d'une intégrine transmembranaire pourrait communiquer la contrainte au cytosquelette à travers des liens protéine/protéine du côté cytoplasmique de la membrane. Par exemple, l'intégrine $\beta 1$ se liant à la matrice extracellulaire, peut induire une adhésion focale. La rigidité cytosquelettique augmenterait avec la contrainte, ce qui nécessiterait des microtubules intacts ainsi que des filaments intermédiaires et des microfilaments. De plus,

certaines intégrines ($\alpha_v\beta_3$, β_1 et β_5) sont des récepteurs cellulaires sensibles aux contraintes de cisaillement et induisent une transduction du signal. L'application d'un flux induit l'association intégrine-shc (Chen *et al.*, 1999) l'assemblage de complexe de signalisation cellulaire et l'activation de la JNK (Li *et al.*, 1997 ; Labrador *et al.*, 2003).

Ainsi l'ensemble des protéines cytosquelettiques (filaments d'actine, microtubules, filaments intermédiaires) semble participer au mécanisme de mécano-transduction.

iii. Protéines G

La stimulation de nombreux récepteurs membranaires est retransmise par une classe de protéines spécifiques liant la GTP (Guanosine Tri-Phosphate) appelées les protéines G. Elles opèrent le couplage des récepteurs avec les effecteurs intracellulaires, et à ce titre exercent un contrôle important sur la transmission du signal. Il existe environ 200 types de récepteurs couplés aux protéines G (les RCPGs). Les RCPGs sont des protéines monomères, à sept domaines transmembranaires (I à VII) possédant une structure en hélice, reliés par trois boucles externes (e1, e2, e3) et trois boucles internes (i1, i2, i3) (Schertler *et al.*, 1993). Les parties transmembranaires constituent le "corps central" de ces récepteurs et le changement de conformation est sans doute responsable de l'activation des RCPGs (Bockaert et Pin, 1999).

I.4 – DONNEES CONCERNANT LES MALADIES CARDIOVASCULAIRES

I.4.1 – Athérosclérose

Le terme *athérome*, du grec *athera* (« bouillie de farine ou de gruau »), est proposé pour la première fois par von Haller en 1755. L'OMS (1954) définit l'athérosclérose comme une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyen calibre consistant en une accumulation locale de lipides, de glucides, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôts calcaires, le tout s'accompagnant de modifications de la média (Giral, 1998). L'athérosclérose est loin d'être une maladie des temps modernes, puisque des plaques d'athérome ont été identifiées sur des corps momifiés égyptiens (Ruffer, 1911). La description anatomopathologique moderne de l'athérosclérose retient trois stades évolutifs : strie lipidique, lésion fibro-lipidique et lésion compliquée.

L'athérosclérose est une maladie complexe et l'hypercholestérolémie est un des nombreux facteurs impliqués dans sa pathogenèse. Le stress oxydatif et l'inflammation sont également impliqués.

– Athérogenèse

Rudolf Virchow, dès 1856, a développé une théorie sur la pathogenèse et l'étiologie de l'athérosclérose. Selon lui, les lipides plasmatiques sont absorbés directement à travers l'endothélium par l'intima et, lorsque les conditions le permettent, certains d'entre eux, en particulier les esters de cholestérol, s'y déposent. C'est l'hypothèse de l'infiltration lipidique comme facteur déclenchant la formation de la plaque d'athérome, confortée au début du siècle dernier par les travaux d'Anitschkow et Chalutow (1913) qui mirent en évidence le rôle du cholestérol dans l'athérosclérose expérimentale chez le lapin (Goldman, 1989).

Selon Cohen 1997 et Turpin G *et al.*, on peut classer les différentes étapes de l'évolution de la plaque athéromateuse de la manière suivante :

- Pénétration des Lipoprotéines de faible densité (LDL) au niveau de l'intima,
- oxydation de ces LDL,
- activation des cellules endothéliales; adhésion des monocytes à l'endothélium et pénétration au niveau de l'intima,
- formation des cellules spumeuses à partir des macrophages et des cellules musculaires lisses (CML) (Mallat et Tedgui, 2001),
- prolifération des CML et migration de ces CML de la média vers l'intima,
- sécrétion de collagène, de fibres élastiques et de protéoglycanes par les CML,
- accumulation de tissu conjonctif, de lipides, de CML et de cellules spumeuses,
- formation du noyau lipidique à partir des éléments lipidiques accumulés,
- ulcération de la paroi vasculaire et mise à nu du sous-endothélium,
- adhésion et activation plaquettaire provoquant une thrombose.

Il est important de signaler que, bien que les étapes ci-dessus décrivent une certaine dynamique de l'évolution de la plaque, elles ne suivent pas, en réalité, rigoureusement cet ordre et plusieurs d'entre elles se chevauchent. Stary *et al.*, en 1995, ont proposé une classification plus détaillée, reposant sur l'observation d'un grand nombre d'artères d'enfants et d'adultes jeunes, qui divise les événements pathologiques en sept stades de gravité croissante (*Tableau-I.5*).

Tableau-I.5 : Classification des lésions de l'athérosclérose (Stary et al.,1995).

Type de lésions	Terme proposé	Description
I	Macrophages spumeux isolés	Macrophages spumeux isolés dans l'intima. Absence de lipides extracellulaires.
II	Strie lipidique	Couches de macrophages spumeux. Cellules musculaires lisses dans l'intima chargées de lipides. Fines particules lipidiques extracellulaires disséminées.
III	Préathérome	Modifications de type II associées à de multiples dépôts lipidiques extracellulaires formant de petits agrégats.
IV	Athérome	Modifications de type II associées à de multiples dépôts lipidiques extracellulaires massifs et confluents (noyau lipidique).
V	Plaque athéroscléreuse	Modifications de type IV associées à des dépôts massifs de collagène (chape fibreuse) recouvrant le noyau lipidique avec calcification.
VI	Plaque athéroscléreuse compliquée	Modifications de type V avec rupture de la chape fibreuse, hémorragie intraplaque ou thrombose.
VII	Plaque fibreuse	Epaississement massif de l'intima par sclérose collagène ; lipides intra- et extracellulaires absents ou présents en quantité négligeable.

Cette classification suggère que les lésions évoluent avec l'âge du sujet en passant successivement d'un type lésionnel au type immédiatement supérieur. Un élément clé des événements précoces a été apporté par les études de Schwenke et Carew, 1989. Ils ont mis en évidence une accumulation pré-lésionnelle de lipoprotéines de basse densité riches en cholestérol athérogènes, telles que les LDL, liées aux protéoglycanes de la matrice, au niveau des sites de prédilection de la formation des plaques d'athérome.

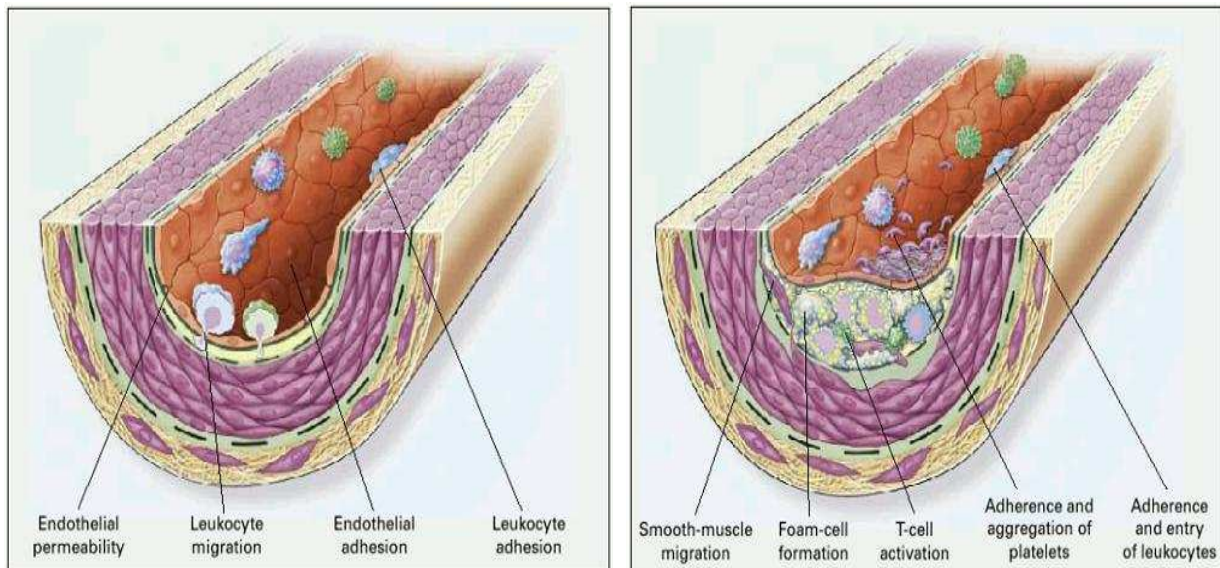
Par ailleurs, les cellules spumeuses de la strie lipidique, caractéristiques de la plaque au stade précoce de son développement, sont d'origine essentiellement macrophagique. En fait, c'est la modification de la structure des LDL retenues dans la matrice extracellulaire (par oxydation, par exemple) qui conduit à leur internalisation par les monocytes-macrophages. Ceux-ci se transforment en cellules spumeuses suite à l'accumulation intracellulaire de gouttelettes d'ester de cholestérol (Steinberg et al., 1989). A une étape plus avancée du processus

athéromateux, une chape fibreuse constituée principalement de cellules musculaires lisses (CML) vient entourer la masse lipidique, donnant naissance à la plaque fibro-lipidique. De plus, des lymphocytes T sont également présents en quantité assez abondante, en bordure de la plaque et dans la chape fibreuse (Hansson *et al.*, 1989).

Les études expérimentales, associées aux observations anatomopathologiques faites sur des plaques humaines, permettent d'affirmer aujourd'hui que l'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique des grosses artères à localisation intinale (Ross, 1999 ; Shi *et al.*, 2000), et que l'agent d'agression entraînant la réaction inflammatoire est très probablement le cholestérol-LDL modifié, notamment par oxydation (Steinberg *et al.*, 1989).

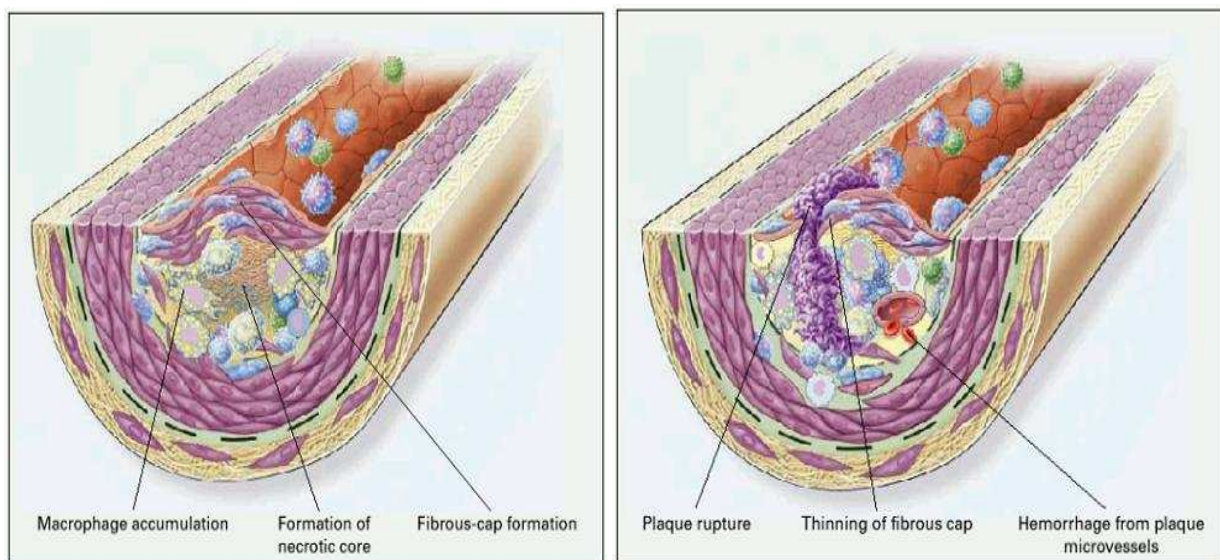
I.4.1.a – Cellules impliquées dans l'athérogénèse

De nombreux types de cellules sont impliqués dans le processus de développement de l'athérosclérose (*Figure-I.5A-B-C-D*). Les cellules sanguines : leucocytes (leucocytes/macrophages et lymphocytes) et plaquettes ; et les cellules vasculaires : cellules endothéliales et les cellules immunitaires qui agissent de concert pour faire augmenter la taille des lésions. L'ulcération de la plaque correspond à l'érosion du tissu endothélial au niveau de la plaque et entraîne l'adhésion plaquettaire et l'initiation d'une thrombose pariétale.



A- La première étape du processus inflammatoire de l'athérosclérose est le dysfonctionnement endothélial

B- Les conséquences de l'inflammation sont l'accumulation de lymphocytes T et macrophages dans la paroi artérielle, la formation de cellules spumeuses, des modifications de la perméabilité endothéliale et des modifications de l'adhésivité plaquettaire



C- Les cellules spumeuses forment un centre nécrotique recouvert par la chape fibreuse, riche en cellules musculaires lisses.

D- Le centre nécrotique est la conséquence de l'accumulation de lipides, macrophages, de l'activité protéolytique et de l'apoptose (mort cellulaire programmée). Ce type de lésion est susceptible de transformer en plaque instable.

Figure-I.5 A-B-C-D: Processus de développement de l'athérosclérose (D'après Ross, 1999).

I.4.1.b – Facteurs biochimiques

- **Les lipoprotéines de faible densité (LDL)**

Les LDL dont le rôle dans la pathogénie de l'athérosclérose est maintenant reconnu, ont des effets majeurs sur les fonctions des cellules endothéliales. Lorsqu'elles sont

modérément oxydées, elles stimulent l'adhérence des monocytes aux CE en induisant l'expression des molécules d'adhésion, VCAM-1 et ICAM-1 (Smalley *et al.*, 1996 ; Tsao *et al.*, 1996 ; Haller, 1997). Elles stimulent en outre la libération par les CE du facteur chimiotactique MCP-1 et du facteur hématopoïétique M-CSF (*monocyte-colony stimulating factor*), qui sont de puissants activateurs des monocytes. De plus, les LDL oxydées deviennent cytotoxiques pour les CE, participant à la destruction de l'endothélium vasculaire et initiant le processus d'athérosclérose (Tedgui, 1997 ; Berliner *et al.*, 1997).

- ***Facteurs d'inflammation***

L'activation endothéliale, générée par les facteurs biochimiques, est principalement due à des médiateurs humoraux tels que les cytokines (*Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α), l'Interleukine-1 ou l'Interféron- γ (INF- γ)), les hormones ou les facteurs de croissance. Ces substances sont apportées par le sang ou produites localement par les cellules endothéliales elles-mêmes ou par des cellules du compartiment vasculaire. Le TNF- α et INF- γ sont retrouvés dans le tissu athéromateux, alors qu'ils ne sont pas présents dans la paroi artérielle normale (Barath *et al.*, 1990). Par ailleurs, ces protéines p Présentes dans les plaques humaines peuvent pérenniser le processus athéromateux en agissant directement sur l'endothélium par altération de sa perméabilité, et ses propriétés antiadhésives et anticoagulantes.

- ***Stress oxydatif***

Les cellules endothéliales sont ainsi sensibles au stress oxydatif provoqué par la présence accrue de dérivés oxygénés, tels que les ions superoxydes, les peroxydes d'hydrogène et les radicaux hydroxyle, débordant le système anti-oxydant (superoxyde dismutase). Ce stress aboutit à l'acquisition par la cellule d'un phénotype pro-inflammatoire et à une modification des interactions entre l'endothélium, les leucocytes et les plaquettes.

- ***Diabète***

La concentration élevée du glucose (diabète) ou du fibrinogène dans le sang sont aussi des facteurs de risque de l'athérogenèse.

- ***Pathologies***

Les infections virales, dues à la présence des herpès virus simplex (HSV) de type 1 et 2, du cytomégalovirus et de chlamydia pneumoniae, représentent elles aussi un facteur déclenchant de l'athérogenèse. Ces infections virales augmentent l'adhérence

leucocytaire, en partie relayée par l'expression membranaire d'une néoglycoprotéine d'origine virale : la glycoprotéine C (Tedgui, 1999).

I.4.1.c – Facteurs biomécaniques

Les contraintes mécaniques, en particulier les forces de cisaillement sur la paroi vasculaire agissant sur l'endothélium, représentent certainement des facteurs de première importance pour expliquer l'implication de l'endothélium dans l'athérogenèse.

La nature et l'amplitude du cisaillement jouent un rôle important dans l'entretien de la structure des vaisseaux sanguins. Dans les régions "linéaires" des artères, le sang s'écoule suivant un régime laminaire pulsé ordonné, induisant une contrainte de cisaillement. Bien que la plupart des études sur la réponse des CE aux contraintes mécaniques aient été réalisées, *in vitro*, dans des écoulements laminaires stationnaires, des différences qualitatives et quantitatives ont été trouvées avec des cellules exposées à des écoulements complexes (Bao *et al.*, 1999). Ainsi, il est important d'étudier les réponses des CEs aux écoulements laminaires et complexes.

- **Localisation des plaques d'athérosclérose**

L'athérosclérose se développe particulièrement au niveau des régions où les contraintes mécaniques sont les plus importantes et où le flux est perturbé, c'est-à-dire les embranchements vasculaires, les bifurcations, les courbures artérielles. Elle se développe également particulièrement au niveau des artères soumises à une contrainte mécanique externe, comme les artères coronaires épicaudiques soumises aux mouvements de la systole ventriculaire, ainsi que l'ont montré nombre d'études (Caro *et al.*, 1969, Ku *et al.*, 1985, Glagov *et al.*, 1988).

Dans les régions de courbures prononcées comme la bifurcation carotidienne, l'écoulement laminaire est perturbé et un écoulement secondaire apparaît. Par exemple, dans la bifurcation carotidienne humaine : les parois médianes subissent des contraintes de cisaillement plus fortes que les parois latérales qui sont exposées à une zone de re-circulation variant avec le cycle cardiaque. Cette zone coïncide avec l'épaississement le plus important de l'intima. La contrainte de cisaillement moyenne (en temps) est plus faible, et entraîne une non-orientation des CE. Mais il est à noter également que, malgré la faible contrainte, le gradient de contrainte spatial risque d'être élevé (Davies *et al.*, 1997, Traub et Berk, 1998).

Le fait que ce gradient soit plus critique dans la régulation de la fonction cellulaire est encore incertain, mais il est évident que la formation de plaques est bien corrélée avec une faible contrainte de cisaillement et une oscillation dans la direction du cisaillement. Dans les régions

de cisaillement laminaire fort et unidirectionnel, les parois ne présentent pas d'irrégularité ou de lésions.

Des études de la dernière décennie suggèrent que la faible contrainte de cisaillement, l'écoulement oscillatoire ou/et de séparation jouent un rôle important dans le processus pathogène (Chappell *et al.*, 1998 ; Chiu *et al.*, 1998 ; Traub et Berk 1998 ; Ziegler *et al.*, 1998 ; Bao *et al.*, 1999).

I.4.2 – Thrombose

La thrombose est une des complications majeures de la plaque d'athérome. La rupture de plaque met des substances thrombogènes en contact avec le sang, responsable d'une thrombose par agrégation plaquettaire et activation de la coagulation. La formation du thrombus repose donc sur deux systèmes : la mise en route du système de la coagulation d'une part, l'activation plaquettaire d'autre part. L'activation de l'un ou l'autre des systèmes se fait selon des conditions environnementales différentes. Les flux sanguins lents favorisent la coagulation plasmatique, alors que les flux rapides favorisent la participation des plaquettes et leur activation. Au cours de l'athérombose, c'est l'activation du système plaquettaire qui prédomine ; la coagulation vient ensuite renforcer le thrombus formé.

I.5 – LES LIPOPROTEINES

Les graisses alimentaires et les lipides endogènes synthétisés par le foie sont transportés entre les tissus et les organes pour y être métabolisés. Ce transport plasmatique est assuré par des macromolécules hydrosolubles, appelées lipoprotéines. Les anomalies du métabolisme de ces lipoprotéines sont des causes importantes de l'athérosclérose.

I.5.1 – Structure générale des lipoprotéines

Les lipoprotéines sont des macromolécules sphériques de taille et composition variables. Leur structure générale est identique. Elles sont formées d'un corps lipidique hydrophobe contenant essentiellement des triglycérides et des esters de cholestérol, enrobés d'une monocouche de lipides polaires constituée de phospholipides et de cholestérol libre. Des protéines spécifiques, nommées apolipoprotéines (apo), à la surface des lipoprotéines assurent la stabilité de la macromolécule et en contrôlent le devenir métabolique. (*Figure-I.6*).

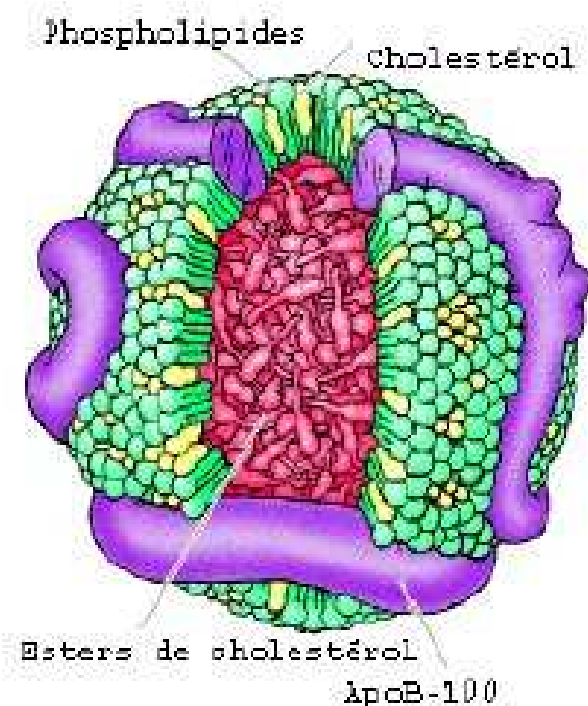


Figure-I.6 : Structure des LDL (D'après Geoffrey, 2000) ; chaque particule de LDL contient approximativement 1500 molécules d'esters de cholestérol dans le corps lipidique. Le corps est enrobé d'une couche contenant 500 molécules de cholestérol, 800 molécules de phospholipides, et une molécule d'apolipoprotéine B100 (Apo B100).

I.5.1.a – Partie lipidique

Comme nous pouvons le voir dans la Figure-I.6, la partie lipidique des lipoprotéines comprend :

- des **phospholipides**, situés à la périphérie de la lipoprotéine, qui sont d'importants éléments structuraux de la membrane cellulaire ; leur partie hydrophobe est tournée vers l'intérieur,
- des **triglycérides**, qui sont apolaires et se trouvent au centre de la lipoprotéine,
- du **cholestérol non estérifié**, situé à la surface de la lipoprotéine, est faiblement hydrophile à cause de sa fonction alcool ; le cholestérol, en tant que précurseur des hormones stéroïdes (progestérone, aldostérone, cortisol et cortisone, testostérone, oestradiol et œstrone), est le stérol le plus abondant et le plus important au plan métabolique (Vance et Van den Bosch, 2000),
- du **cholestérol estérifié**, situé au centre de la lipoprotéine, sa fonction OH est liée à un acide gras supprimant ainsi tout caractère hydrophile,

- des **acides gras non estérifiés**.

I.5.1.b – Partie protéique : les apolipoprotéines

Les apolipoprotéines sont situées à la surface des lipoprotéines grâce à leurs acides aminés hydrophiles. Outre, leur fonction structurale importante, certaines de ces apolipoprotéines jouent un rôle de ligands, d'autres d'activateurs ou d'inhibiteurs enzymatiques.

Il existe cinq classes d'apolipoprotéines majeures : A, B, C, D, E avec des sous-classes, et parfois avec des isomorphes pour certaines, par exemple E2, E3, E4.

- Les **apolipoprotéines A (AI et AII)**, constituants majeurs des HDL. L'apo AI joue un rôle majeur dans le transport de retour du cholestérol. L'apo AII, également synthétisée dans le foie et l'intestin, a essentiellement un rôle structural.
- L'**apolipoprotéine B (ou apo B100)**, synthétisée au niveau du foie, joue d'une part, un rôle structural pour les LDL et les VLDL, et d'autre part, un rôle métabolique majeur puisqu'elle permet l'interaction de ces lipoprotéines avec les récepteurs B, E. Constituant protéique majeur (95%) des LDL, elle est présente à des taux importants (40%) dans les VLDL. Les chylomicrons comportent une forme différente d'origine intestinale, désignée sous le terme d'apo **B 48**.
- Les **apolipoprotéines C (CI, CII, CIII)**, principaux constituants des VLDL et des chylomicrons. L'apolipoprotéine CII est le cofacteur d'une enzyme intervenant dans le métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides, la lipoprotéine lipase. L'apolipoprotéine CIII a au contraire une action inhibitrice sur la lipoprotéine lipase activée.
- L'**apolipoprotéine E** a un rôle métabolique, permettant la captation des remnants des chylomicrons par les récepteurs B, E des hépatocytes.

I.5.2 – Classification des lipoprotéines

Les lipoprotéines sont classées selon leurs origines, leurs compositions chimiques (quantité et nature des lipides et des protéines) et leurs propriétés physiques (dimension, mobilité électrophorétique, densité) (*Tableau-I.6*).

Tableau-I.6 : Caractéristiques physiques et chimiques des lipoprotéines du plasma humain, EC : esters de cholestérol ; TG : triglycérides.

Type de lipoprotéines	Densité (g/mL)	Taille (nm)	Proportion EC/TG	Principales apolipoprotéines (apo)
Chylomicron	<0,94	75-1200	1/19	B48, C-II, CIII, A-I, A-IV
VLDL	0,94 à 1,006	30-80	1/3,3	B100, C-II, E
IDL	1,006 à 1,019	27-35	1/3,5	B100, E
LDL	1,019 à 1,063	18-27	1/0,23	B100
HDL2	1,063 à 1,125	9-12	1/0,22	A-I, A-II, C
HDL3	1,125 à 1,21	7-9	1/0,19	A-I, A-II, C
Lp(a)	1,040 à 1,115	25		B100, (a)

On distingue ainsi :

I.5.2.a – Chylomicrons – CM

Les chylomicrons sont les plus grands (75 à 1200 nm) et les moins denses ($d < 0,94$). Ils sont constitués de lipides alimentaires d'origine intestinale. Les triglycérides représentent plus de 86% de leur masse, les protéines 2%, le cholestérol et les phospholipides formant le reste. L'apo B48 est leur principale apolipoprotéine.

I.5.2.b – Lipoprotéines de très basse densité – VLDL

Les VLDL (*Very Low Density Lipoprotein* – lipoprotéines de très basse densité, ou lipoprotéine pré- β à l'électrophorèse) transportent les triglycérides hépatiques. Elles sont plus petites (30 à 80 nm) que les chylomicrons et un peu plus dense (0,93 à 1,006). Elles contiennent 92% de lipides répartis en 55% de triglycérides, 18% de phospholipides et 19% de cholestérol. Les protéines représentent 8% de leur masse.

I.5.2.c – Lipoprotéines de densité intermédiaire – IDL

Les IDL (*Intermediary Density Lipoprotein*) sont des lipoprotéines intermédiaires en taille et en densité aux VLDL et aux LDL. Elles sont plus petites (25 à 35 nm) et plus denses (1,006 à 1,019) que les VLDL. Elles sont riches en apo B et E. Les protéines représentent 20% de leur masse totale, le cholestérol représente 40% de la masse des lipides.

I.5.2.d – Lipoprotéines de basse densité – LDL

Les LDL (*Low Density Lipoprotein* ou lipoprotéine β à l'électrophorèse) sont plus petites (18 à 25 nm) et plus denses (1,019 à 1,063) que les VLDL. Les protéines représentent 22 à 25% de leur masse totale. Le cholestérol représente 50% de la masse des lipides. L'apo B100 est la principale protéine des LDL.

I.5.2.e – Lipoprotéines de haute densité – HDL

Les HDL (*High Density Lipoprotein*, ou lipoprotéine alpha à l'électrophorèse) sont les plus petites (5 à 12 nm) et les plus denses (1,063 à 1,21). Les protéines constituent 40 à 55% de leur masse totale. Les phospholipides (30 à 35%) et le cholestérol (17 à 22%) sont les principaux lipides. Les apolipoprotéines A-I et A-II ont un rôle important dans la structuration des HDL.

I.5.2.f – Lipoprotéine(a) – Lp(a)

La lipoprotéine Lp(a) représente une classe particulière composée d'une molécule d'apo(a) reliée par un pont disulfure à l'apo B d'une molécule LDL (Angelin, 1997). Cette lipoprotéine connaît un intérêt grandissant depuis que plusieurs études épidémiologiques ont montré qu'elle est associée à un athérome prématuré et qu'elle constitue un facteur de risque indépendant.

I.5.3 – Métabolisme des lipoprotéines

Le métabolisme des lipoprotéines est complexe et fait intervenir de nombreux récepteurs et enzymes. Schématiquement, il peut être divisé en trois grandes parties : la voie exogène (à partir de l'intestin vers les autres tissus), la voie endogène (du foie aux autres tissus périphériques) et le transport inverse du cholestérol (des tissus au foie) (*Figure-I.7*). La voie exogène des lipides consiste à amener les lipides alimentaires (de provenance exogène) aux tissus pour la production d'énergie, le stockage ou la synthèse de molécules.

Les apolipoprotéines ont une double fonction : structurale et jouent également un rôle dans la régulation métabolique. Elles assurent non seulement la cohésion du complexe lipidique et sa solubilisation, mais elles agissent comme cofacteur et/ou activateur de nombreuses enzymes plasmatiques et elles servent de ligands pour les interactions avec les protéoglycanes endothéliaux et des récepteurs cellulaires des lipoprotéines.

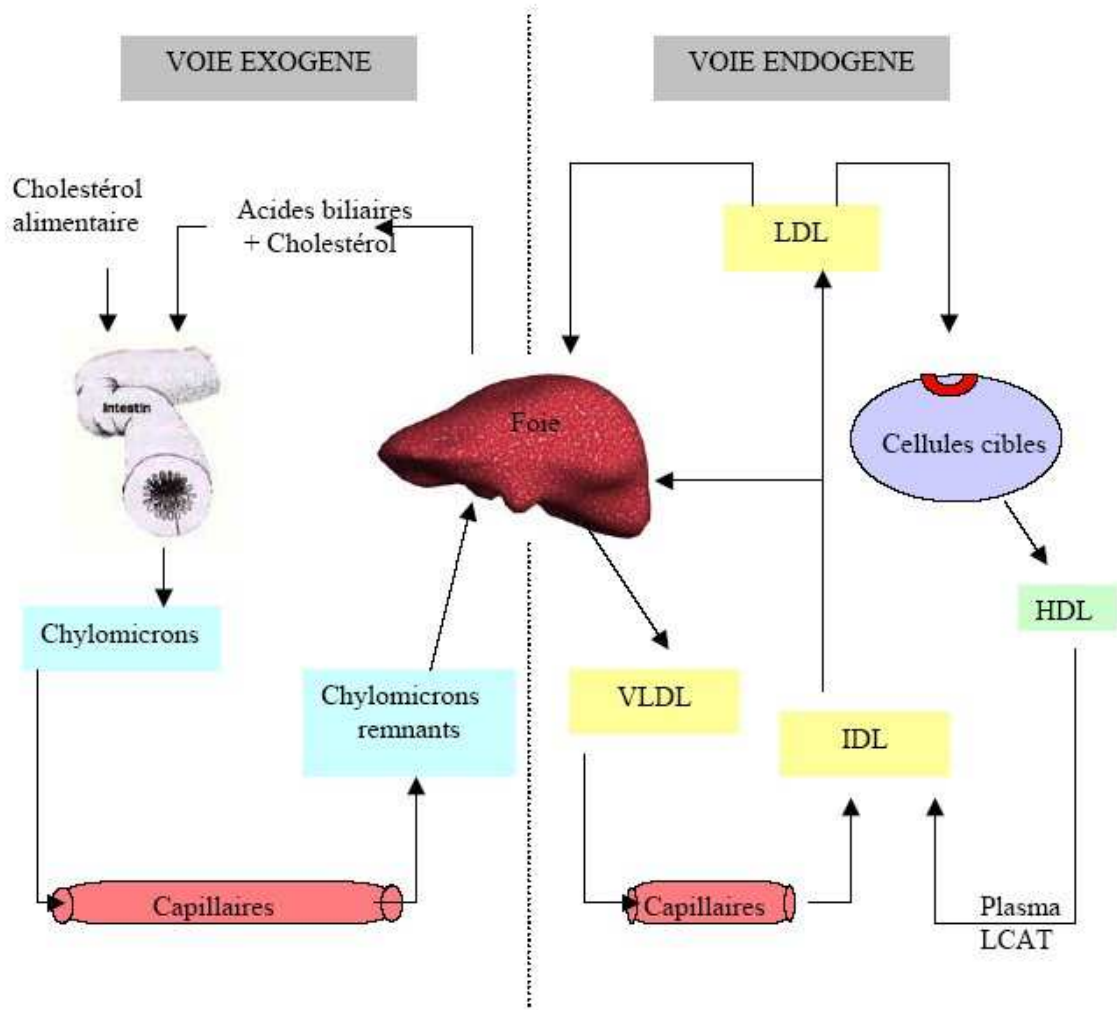


Figure-I.7 : Métabolisme des lipoprotéines (D'après Kwiterovich, 2000). LDL – low density lipoprotein, HDL- high density lipoprotein, VLDL- very low density lipoprotein, LCAT- lecithin cholesterol acyltransferase.

Nous pouvons distinguer trois facteurs qui interviennent dans le métabolisme des lipoprotéines : **les enzymes, les protéines de transfert et les récepteurs.**

I.5.3.a – Rôle des enzymes

Les enzymes jouant un rôle central dans le métabolisme des lipoprotéines plasmatiques sont la lipoprotéine lipase, la lipase hépatique et la lécithine-cholestérol-acyl-transférase.

- La *lipoprotéine lipase*, synthétisée dans de nombreux tissus mais plus particulièrement dans le tissu adipeux et les muscles striés, se fixe à la surface des cellules endothéliales d'où elle exerce ces effets métaboliques. Sa principale fonction est d'hydrolyser des triglycérides des VLDL et des chylomicrons. Les acides gras libérés

au cours de ce processus sont captés par les tissus pour leur besoin métabolique. L'apolipoprotéine CII est un cofacteur indispensable à cette réaction. Inversement, l'apolipoprotéine C-III aurait une action inhibitrice. Dans le tissu adipeux, la synthèse de la lipoprotéine lipase est stimulée par l'insuline. Des mutations ou invalidations de son gène sont responsables d'une accumulation massive de chylomicrons dans le compartiment sanguin (dyslipidémie de Type I).

- La *lipase hépatique* dont la structure est proche de celle de la lipoprotéine lipase, est synthétisée par le foie et reste localisée dans cet organe à la surface des cellules endothéliales des capillaires. Elle assure l'hydrolyse des IDL en LDL et celles HDL2 en HDL3 ou pré- β 1 de taille plus réduite. Dans les très rares déficits de la lipase hépatique, des IDL et des HDL2 enrichis en triglycérides s'accumulent dans le compartiment sanguin.
- La *lécithine-cholestérol-acyl-transférase (LCAT)* synthétisée par le foie, s'associe aux HDL dans le compartiment sanguin où elle catalyse l'estérification du cholestérol libre, capté à la surface des cellules, avec les acides gras de la phosphatidyl choline (lécithine). Le cholestérol ester formé au cours de cette réaction est incorporé dans le corps de la lipoprotéine. Cette réaction est activée par les apolipoprotéines A-I, A-IV et C-I.

I.5.3.b – Rôle des protéines de transfert

Elles assurent les échanges des lipides des lipoprotéines entre les différentes lipoprotéines dans le compartiment sanguin :

- La *CETP (Cholesterol Ester-Transfer Protein)* catalyse le transfert des molécules des triglycérides et d'esters de cholestérol entre les HDL et les chylomicrons ou les VLDL. Les esters de cholestérol sont transférés des HDL vers les VLDL et les triglycérides dans le sens inverse. Elle est surtout associée aux HDL dont elle modifie la composition en réduisant le ratio cholestérol/triglycérides. Au cours de ce processus certaines HDL peuvent être déstabilisées et perdre une molécule d'apo A-I qui forme une HDL naissante.
- La *PLTP (Phospholipid Transfer Protein)* assure le transfert rapide et spécifique des phospholipides entre les lipoprotéines. Son expression est ubiquitaire suggérant des fonctions dans de nombreuses voies métaboliques.

- La *MTP (Microsomal Triglyceride Transfer Protein)* qui, contrairement à la CETP et à la PLTP, est une protéine intracellulaire qui assure dans les tissus de synthèse des lipoprotéines (foie et intestin) la formation intracellulaire des lipoprotéines. Elle catalyse la formation des VLDL en réunissant l'apo B sécrétée par le réticulum endoplasmique, les triglycérides endogènes et des esters de cholestérol. Les concentrations de VLDL, LDL et d'apolipoprotéine B plasmatiques sont effondrées dans les déficits congénitaux de cette protéine (abetalipoprotéinémie).

I.5.3.c – Rôles des récepteurs

Plusieurs récepteurs membranaires présents dans les cellules endothéliales interviennent dans le métabolisme des lipoprotéines, et il est important de noter cependant que l'expression des récepteurs « scavengers » est régulée par certaines cytokines (Daugherty et Roselaar, 1995). Parmi ces cytokines, les lymphokines, le TNF-alpha, le TGF-beta et l'interféron-gama ont un effet rétrocontrôle négatif, tandis que le M-CSF et le PDGF ont un effet rétrocontrôle positif.

I.5.4 – Oxydation et rôles des lipoprotéines de basse densité (LDL) – Interactions lipoprotéines/cellules

I.5.4.a – Oxydation des lipoprotéines de basse densité

Brown et Goldstein ont démontré que les LDL devaient subir des modifications entraînant un changement de conformation de l'apo B, la perte de reconnaissance par le récepteur des LDL et leur captation par d'autres récepteurs (Brown *et al.*, 1979).

Les processus d'oxydation des composantes lipidiques et protéiques des LDL sont des phénomènes excessivement complexes, et cette oxydation est une étape importante dans le processus d'athérogenèse. Elle se produit majoritairement *in situ*, dans la paroi (Steinberg, 1997). Cette oxydation peut être soit enzymatique, soit radicalaire. Elle se déroule en quatre étapes (James, 1993 ; Picard, 1998).

1. – L'initiation du mécanisme par les radicaux libres oxygénés (ROS) qui se traduit par une peroxydation des lipides, surtout aux acides gras polyinsaturés des LDL. Il est probable que la source des radicaux libres responsables soit intracellulaire. Mais les enzymes responsables ne sont pas encore précisément connues, même si certaines, comme la 15-lipoxygénase, apparaissent comme des candidats potentiels.

2. – La propagation de ces modifications chimiques aux autres lipides s'effectue selon une réaction en chaîne avec attaque des acides gras dans un ordre aléatoire. Cette propagation du phénomène dépend en partie de l'enzyme PAF-AH (*Platelet Activating Factor-Acetylhydrolase* ou *lipoprotein-associated phospholipase A2*) (Navab *et al.*, 1996). Cette enzyme, principalement associée aux LDL, possède une activité phospholipase A2. Après peroxydation d'une double liaison (C=C) au sein d'un acide gras polyinsaturé, composé d'une molécule d'ester de cholestérol, de phospholipide ou de triglycéride, cette activité peut provoquer une amplification de la peroxydation lipidique, conduisant à une fragmentation d'acides gras polyinsaturés avec génération d'aldéhydes et de cétones. Les cétones sont éliminées, mais les aldéhydes se lient aux résidus lysine de l'apo B100, ligand clé du récepteur cellulaire des LDL. Il s'ensuit une modification covalente de l'apoB100 avec augmentation de sa charge négative, entraînant une perte de la reconnaissance par le récepteur des LDL natives, mais lui conférant la capacité de se lier au récepteur *scavenger* (Palinski *et al.*, 1989 ; Steinberg *et al.*, 1989 ; Witztum et Steinberg, 1991 ; Steinberg, 1997 ; Chisolm *et al.*, 1999 ; Chisolm et Steinberg, 2000). Les détails précis de ces réactions sont, en grande partie, inconnus.
3. – Dans une troisième phase, ceci entraîne la dégradation et la libération de fragments lipidiques. Il y a formation de peroxydes lipidiques dont l'accumulation peut être directement cytotoxique. Cependant, la toxicité est surtout due aux produits de dégradation, en particulier les aldéhydes.
4. – Ces aldéhydes ainsi formés peuvent alors se lier à la partie protéinique des LDL (l'Apo B100), modifiant dans un premier temps son activité physiologique puis ses propriétés de dégradation.

I.5.4.b – Rôles des LDL – Interactions lipoprotéines/ Cellules

Des études expérimentales ont permis d'établir de façon claire un lien entre hypercholestérolémie et présence d'une réaction inflammatoire dans le tissu vasculaire (Liao *et al.*, 1994 ; Young et Parthasarathy, 1994).

L'importance du cholestérol et plus particulièrement des LDL dans l'athérogenèse n'est plus contestée. D'après Gorog et Born, 1982, le passage des LDL du plasma aux parois vasculaires *in vivo* est accéléré par l'élimination sélective de l'acide sialique (qui est à l'origine de la charge négative des vaisseaux) de l'endothélium artériel. Chez les rats dont le diabète a été

provoqué expérimentalement, la charge de surface de l'endothélium artériel est significativement réduite (Raz *et al.*, 1988), données également observées chez des patients diabétiques (Frenneaux et Born). Suite à leur pénétration et leur rétention préférentielles, ces lipoprotéines athérogènes s'accumulent dans l'espace sous-endothélial, déclenchant le recrutement et l'infiltration de monocytes circulants dans l'intima, conduisant à la constitution de stries graisseuses, dites stries lipidiques, à la surface luminale (Vasile *et al.*, 1983 ; Nordestgaard et Nielson, 1994 ; Williams et Tabas, 1995 ; Ross, 1999 ; Boren *et al.*, 2000).

De nombreuses études ont également été réalisées afin d'évaluer l'effet des LDL oxydées comme agent inflammatoire. Celles-ci ont un pouvoir chimioattractant sur les monocytes, favorisent leur différenciation en macrophages résidents, et, en revanche, inhibent la motilité de ces derniers (Steinberg *et al.*, 1989 ; Young et Parthasarathy, 1994). Les LDL oxydées de façon minime induisent une adhérence, un recrutement de leucocytes, monocytes et lymphocytes par l'expression des molécules spécifiques de la surface de l'endothélium (ICAM-1, VCAM-1). Elles stimulent la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses en augmentant la synthèse de PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*) et de son récepteur et la synthèse de l'IL-1. Lorsque les LDL sont oxydées de façon intense, elles sont cytotoxiques. Elles activent les lymphocytes d'où une réaction inflammatoire, et altèrent les propriétés vasomotrices de l'endothélium en inhibant la synthèse du NO et de PGI₂.

PARTIE II

MATERIELS ET METHODES

II.1- CULTURE CELLULAIRE

Pour réaliser notre étude, deux types de cellules ont été utilisés :

- Une lignée de cellules endothéliales immortalisées, dite ECV304 (ECACC No.92091712) nous a permis de réaliser les premiers travaux de la mise au point des techniques utilisées dans ce travail.
- Des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVECs, *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) récoltées selon la méthode décrite par Jaffe et *al.*, 1973, Marin et *al.*, 2001 (voir technique décrite dans la partie II.I.2 -b), ont été utilisées par la suite pour les études.

II.1.1- Réactifs et matériels

II.1.1.a – Milieu de culture

Les deux milieux de base utilisés pour la culture cellulaire sont :

- le M199 (réf. 31150-022, Invitrogen/Gibco)
- le RPMI-1640 (réf. 21875-091, Sigma-Aldrich)

Les milieux de base contiennent des acides aminés, des bases puriques et pyrimidiques, des sels d'Earle, des vitamines, du bicarbonate de sodium et du glucose. Le milieu complet est constitué d'un mélange de 40% de M199, 40% de RPMI 1640, plus 20% de sérum humain et d'autres additifs pour la culture des HUVECs. Pour la culture des ECV304, un seul milieu de base (RPMI 1640) est utilisé contenant des additifs et 10% de sérum de veau fœtal.

II.1.1.b – Additifs au milieu de culture de base

Les additifs ci-dessous sont au préalable filtrés à l'aide d'un filtre de 0,22 µm (Millex®-GP, réf. SLGP033RS, Millipore France) et additionnés au milieu de base pour former le milieu complet.

Acide aminé :

- L-Glutamine (réf. 25030, CGLUT01 Gibco, France) 2 mM/L

Antibiotiques :

- Pénicilline à 5000 UI/mL (réf. 15070, Gibco BRL, France) 1%
- Streptomycine à 5000 µg/mL (réf. 15070, Gibco BRL, France) 1%

Antifongiques :

- Fungizone à 250 µg/mL – Amphotéricine B (réf. 15220026, Gibco, France) 0,06%

Sérum :

- Sérum humain du groupe AB 20%
- Sérum de veau fœtal (SVF) (réf. 10270 – 098, Gibco, France) 10%

Le sérum est décomplémenté au bain-marie à 56°C pendant 30 minutes.

II.1.1.c – Tampon HBSS (*Hank's Balanced Salts Modified*)

Le tampon HBSS sans Ca^{2+} , ni Mg^{2+} conditionné en bouteille stérile (réf. H2387-1L, Sigma-Aldrich, Allemagne) contient :

- | | |
|-----------------------------|-------------|
| – KCl | 0,4 g/L |
| – NaCl | 8,0 g/L |
| – KH_2PO_4 | 0,06 g/L |
| – Na_2HPO_4 | 0,04778 g/L |
| – D-Glucose | 1,0 g/L |
| – Rouge de phénol | 0,011 g/L |

Pour la préparation, la poudre de HBSS (9,5 g) a été dissoute dans 900 mL d'H₂O distillée à température ambiante, le pH a été ajusté en ajoutant 0,35 g de NaHCO₃ dans la solution. La solution est ensuite complétée avec de l'eau distillée qsp 1L (pH 7,2), et enfin filtrée sur le filtre 0,22 µm

II.1.1.d – Tampon PBS (*Phosphate Buffered Saline*)

Le tampon PBS préparé au laboratoire, contient :

- | | |
|---|--------|
| – NaCl (réf. 10241AP, AnalarBDH, France) | 137 mM |
| – KCl (réf. 4933, Merck, France) | 2,7 mM |
| – Na_2HPO_4 (réf. 28027.262, Prolabo, France) | 10 mM |
| – KH_2PO_4 (réf. 26 925.295, Prolabo, France) | 1,4 mM |
| – D-Glucose | 0 g/L |

Pour la préparation, l'ensemble des produits ci-dessus est dissout dans 900 mL d'H₂O distillée à température ambiante, ensuite complété avec de l'eau distillée qsp 1 L (pH 7,2-7,4), et enfin la solution finale a été filtrée à l'aide d'un filtre de 0,22 µm.

II.1.1.e – Solution de digestion (Solution trypsine-EDTA)

La solution de trypsine-EDTA à 0,5% (réf. 25300-054 Gibco BRL, France) est préparée dans une solution de HBSS, mise en aliquots à un volume de 10 à 14 mL par tube et conservée à -20°C.

Pour la préparation des HUVECs, la solution de digestion est utilisée à une concentration finale de trypsine 0,25% et d'EDTA 0,2% (acide éthylène diamine-tétraacétique) qui permet le détachement des HUVECs de la veine ombilicale.

Pour le détachement des cellules des différents supports de culture, la solution est diluée à 0,125% dans du HBSS.

II.1.1.f – Support de cellules en culture

Pour l'entretien, les cellules sont cultivées dans des boîtes de culture en polypropylène de types suivants :

- T25 cm² (réf. 353109, Dutscher, France)
- T75 cm² (réf. 353136, Dutscher, France)

Les cellules préparées pour les différents traitements sont cultivées sur lamelles de verre rectangulaires de 70x44 mm #1,5 (réf. Menzel, Germany) placées dans des boîtes de Pétri (Ø 90 mm en polypropylène, réf. 391-0877, VWR France).

II.1.1.g – Autres matériels

Pour le recueil des cordons ombilicaux et la récolte des HUVECs, l'ensemble du matériel cité ci-dessous doit être stérile.

- Pinces et ciseaux de chirurgien,
- Fil chirurgical,
- Gants stériles,
- Béchers de 250 mL,
- Erlen Meyer de 250 mL,
- Boîtes de Pétri,
- Seringues stériles de 10 mL,
- Robinets stériles (réf. 30600-03, Polylabo, France).

II.1.2- Méthodes

II.1.2.a – Culture des ECV304

La lignée de cellules endothéliales dite ECV304 (10⁶ cellules/mL/tube) est conservée dans un milieu de cryoconservation constitué de 70% de milieu complet supplémenté de 20% de

sérum AB humain et de 10% de DMSO (diméthyl sulfoxide, réf. D-5879, Sigma, France) dans des tubes cryogéniques (réf. C23954, Fischer, France) placés dans l'azote liquide. La décongélation est rapide au bain-marie à 37°C. 5 mL de milieu complet sont ajoutés aux cellules. Les cellules sont ensuite centrifugées (1000 à 1200 tours/min pendant 5 min). Cette opération de centrifugation est répétée deux fois pour un lavage complet des cellules. La numération et le test de viabilité cellulaire sont alors réalisés. Le culot cellulaire est resuspendu dans du RPMI-1640 complet puis déposé dans des boîtes de culture. Après 24 h, les cellules non adhérentes sont éliminées par un lavage doux dans la boîte de culture. Les cellules sont lavées deux fois avec du milieu complet. 5 mL de milieu complet sont enfin ajoutés aux cellules et l'ensemble est mis dans l'incubateur (réf. *Water-Jacketed Incubator*, modèle 3548 S/N 26814-1294, *Forma Scientific*, USA). L'aspect pavimenteux des ECV304 est observé en microscopie à contraste de phase (*Figure-II.1*).

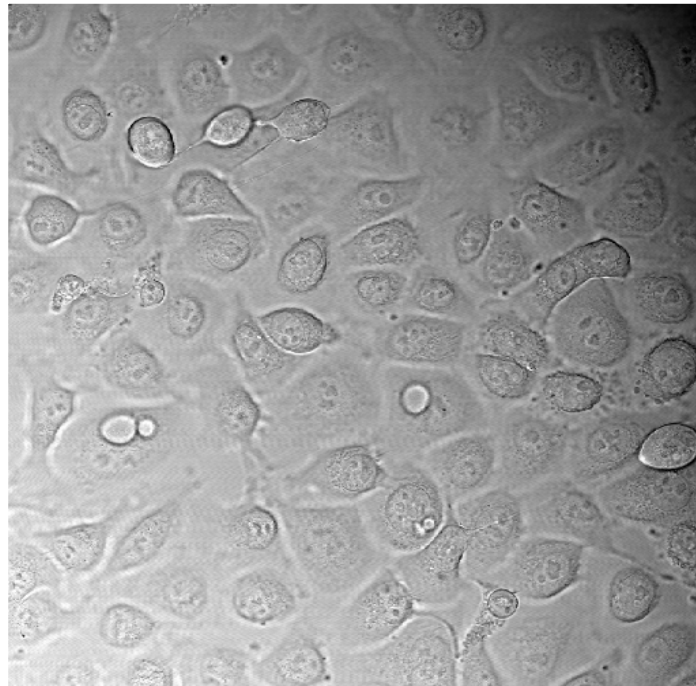


Figure-II.1 : ECV304 en culture (aspect morphologique au microscope à contraste de phase en lumière transmise (*Leica SP2-AOBS*, x40)).

II.1.2.b – Culture des HUVECs

Récolte des cellules endothéliales

- Recueil du cordon ombilical

Les cordons ombilicaux humains ont été prélevés par la Maternité Régionale de Nancy et sont obtenus dès l'expulsion placentaire. Chaque cordon est ensuite découpé en bouts de 15 à 20

cm et immédiatement mis dans une boîte de culture de 75 cm² contenant 100 à 150 mL de HBSS stérile qui sera placé au réfrigérateur à 4°C jusqu'à l'utilisation dans les heures qui suivent le prélèvement (durée maximale de conservation de 4 à 6 heures).

- Lavage de la veine ombilicale

Le matériel stérile est installé dans les conditions stériles sous une hotte à flux laminaire vertical (réf. MSC9, EN-NF, Jouan, France). La préparation est effectuée selon le protocole décrit ci-dessous :

- Nettoyer l'extérieur du cordon à l'aide de l'éthanol 75%.
- Fixer le robinet en contact avec une seringue dans l'orifice de la veine en le ligaturant fortement à l'aide du fil chirurgical autour du cordon par une des extrémités du cordon.
- A l'aide d'une seringue reliée au robinet, rincer la veine trois fois avec du tampon HBSS (préchauffé à 37°C) pour éliminer tout le sang.
- Fermer l'autre extrémité du cordon avec une pince de chirurgien.

- Détachement des cellules endothéliales

- A l'aide de la seringue, remplir la veine avec 15 à 20 mL de la solution de digestion préchauffée à 37°C, jusqu'à ce que celle-ci soit gonflée.
- Fermer ensuite le robinet. Le cordon immergé dans du tampon HBSS est placé au bain-marie à 37°C pendant 10 min.
- Le cordon est alors retiré, posé sur une boîte de Pétri et massé doucement quelques secondes. Couper l'extrémité fermée par la pince et recueillir la solution de digestion dans un tube plastique de 50 mL contenant 1 mL de sérum humain pour arrêter l'action de la trypsine. – Ouvrir le robinet et laver la veine trois fois avec 10 mL de tampon HBSS.
- Centrifuger la suspension cellulaire à 400g pendant 6 minutes, à température ambiante.
- Après centrifugation, un petit culot de cellules est visible. Jeter le surnageant et laver les cellules par centrifugation dans 10 mL de milieu complet.
- Remettre les cellules en suspension dans 5 ou 10 mL de milieu complet après la deuxième centrifugation. Le nombre de cellules varie selon la longueur du cordon. Les cellules sontensemencées à $2-3 \times 10^5$ par boîte de culture de 25 cm² avec 5 mL de milieu complet, puis sont placées à 37°C dans l'incubateur (5% de CO₂, 95% d'air, saturation en humidité).

Entretien et passages

Lorsque les cellules arrivent à confluence, le milieu de culture de la boîte est enlevé et les cellules sont lavées 2 fois en ajoutant 5 mL de milieu tampon (HBSS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+}). Ce lavage permet d'une part, d'éliminer le sérum qui inhibe l'activité enzymatique de la trypsine, et d'autre part, de libérer des ions Ca^{2+} qui secondairement faciliteront l'adhésion des cellules. La solution de digestion (trypsine-EDTA à 0,125%) est filtrée à 0,22 μm et ajoutée à la boîte. Le détachement du tapis cellulaire est contrôlé sous microscope. L'action enzymatique de la trypsine est stoppée par effet de protéine en ajoutant 5 mL de milieu de culture complet. Cette suspension cellulaire est transvasée dans un tube en plastique stérile de 15 mL. Une centrifugation à 200g pendant 6 min permet d'éliminer le surnageant. Le culot est ensuite remis en suspension dans 5 mL de milieu de culture complet.

Contrôle de viabilité et numération cellulaire

Un comptage des cellules et une estimation de la viabilité cellulaire sont ensuite effectués dans une cellule de Thoma (réf. N4500T, Bioblock, France). La viabilité est évaluée selon le test d'exclusion au bleu de trypan, et la suspension cellulaire est ajustée à une concentration de 1×10^5 cellules/mL avec le milieu complet.

Cette suspension cellulaire servira à ensemercer les différents supports de culture utilisés.

II.1.2.c – Préparation des échantillons (culture sur lamelles)

Préparation des lamelles

Les lamelles sont nettoyées et stérilisées selon le protocole ci-dessous :

- Imbiber les lamelles dans la solution suivante pendant 20 min pour les dégraisser

- KOH	24,0 g
- Eau distillée	25,0 mL
- Ethanol	135,0 mL

- Rincer avec de l'eau distillée.
- Essuyer les lamelles, les autoclaver pendant 30 min à 134°C dans l'autoclave (modèle 23, MELAG), ensuite laisser refroidir avant l'utilisation.

Après cette étape de stérilisation des lamelles, ces dernières sont revêtues avec une solution de gélatine préparée selon le protocole suivant :

- | | |
|-----------------|--------|
| - Gélatine | 1,0 g |
| - Eau distillée | 100 mL |
- Dissoudre 1,0 g de gélatine dans 100 mL d'eau distillée placée au bain-marie à 60°C.
 - Filtrer la solution à l'aide filtre à 0,22 µm et mettre 1 mL sur la lame déposée dans une boîte de Pétri Ø 90 mm.
 - Laisser la lame à 4°C pendant 1 h, puis à 37°C pendant 15-20 min.
 - Retirer la solution superflue et laisser la lame sous la hotte jusqu'à ce qu'elle sèche. Elle est ensuite prête pour la culture des cellules.

Préparation des échantillons cellulaires pour les études en microscopie de fluorescence confocale

Pour la culture des cellules sur lames/lamelles, 1 mL de suspension cellulaire, correspondant à 5×10^4 - 1×10^5 cellules/mL, estensemencé à la surface de la lame revêtue d'une solution de gélatine de 1%. La boîte de Pétri contenant cette lame est ensuite placée dans l'incubateur (37°C, 5% de CO₂). Après 2 h de sédimentation au repos, la majorité des cellules adhère sur la lame. 10 mL du milieu complet sont alors ajoutés aux cellules. Les cellules arrivent à confluence après 2 à 3 jours d'incubation.

II.1.2.d – Identification des cellules

Aspect morphologique

L'aspect morphologique typique des cellules et du tapis cellulaire à confluence est décrit dans le section I.2.1 de la partie « Etudes bibliographiques » de ce manuscrit.

L'examen morphologique au microscope optique inversé à contraste de phase en lumière transmise des cellules endothéliales à confluence présente l'aspect mosaïque homogène en « pavés de chaussée » caractéristiques des cellules endothéliales. Les cellules sont polygonales, jointives avec un noyau ovalaire contenant 2 ou 3 nucléoles (*Figure-II.2*). Cet aspect est tout à fait différent de celui des fibroblastes qui présentent une morphologie plus longue, mince et fusiforme.

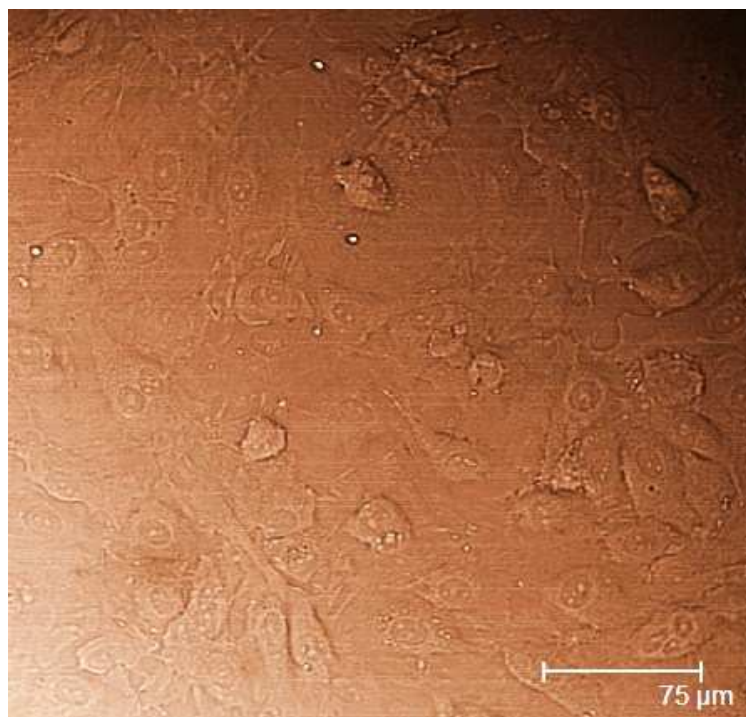


Figure-II.2 : HUVECs en culture (P2 : deuxième passage). Microscopie à contraste de phase en lumière transmise (Leica SP2-AOBS, x40, échelle 75μm).

Identification des HUVECs par le facteur von Willebrand

Le facteur von Willebrand (vWF) est un marqueur spécifique des cellules endothéliales. L'identification des HUVECs est donc effectuée par le contrôle de la présence de vWF à l'intérieur des cellules en utilisant une technique de marquage en immunofluorescence indirecte. Pour réaliser ces expériences, les cellules ont été fixées et perméabilisées :

- Solution de fixation : 1% v/v paraformaldéhyde (réf. P-6148, Sigma, France) dans du PBS.
- Solution de perméabilisation : 0,5% v/v de Triton-X100 (T8532 # 015K0039, Sigma, France) préparé dans du PBS.
- Milieu RPMI-1640 sans rouge de phénol (réf. 11880-028, Gibco, France).
- BSA (*Bovin Albumin Serum*, réf. A-9647, Sigma, France).
- Anticorps (Ac) primaire (monoclonal souris anti-vWF humain, clone F8/F86 réf. M0616, DakoCytomation).
- Anticorps secondaire (chèvre anti-IgG de souris conjugué avec l'Alexa Fluor®-488, réf. A11017, Invitrogen-Molecular Probes) dilué au 1:100^{ème}.

Après 3 lavages des cellules avec du milieu sans rouge de phénol supplémenté avec 0,5% de BSA à 37°C, les cellules sont traitées selon le protocole suivant :

- Fixer les cellules à l'aide du paraformaldéhyde à 1% (p/v), pendant 15 minutes à température ambiante.
- Rincer les cellules 3 fois avec le milieu sans rouge de phénol.
- Ajouter 0,5% (p/v) de Triton-X100 aux cellules pour la perméabilisation pendant 10 min à température ambiante. Après 3 rinçages avec le milieu sans rouge de phénol, les cellules sont prêtes pour le marquage du facteur vWF.
- Incuber les cellules à 37°C pendant 45 min avec l'anticorps primaire souris anti-vWF humain dilué au 1:50^{ème} dans le milieu sans rouge de phénol contenant 0,5% de BSA.
- Rincer 3 fois avec le milieu sans rouge de phénol pendant 5 minutes.
- Incuber les cellules à température ambiante pendant 30 min avec l'anticorps secondaire dilué au 1:100^{ème} dans du milieu sans rouge de phénol contenant 0,5% de BSA.

Après 3 rinçages, les cellules sont ensuite prêtes pour l'examen en microscopie de fluorescence. Les vWF présents autour du noyau dans les cellules au repos sont colorés en vert (*Figure-II.3*). En conclusion, nous constatons que les HUVECs en culture possèdent bien le phénotype des cellules endothéliales.

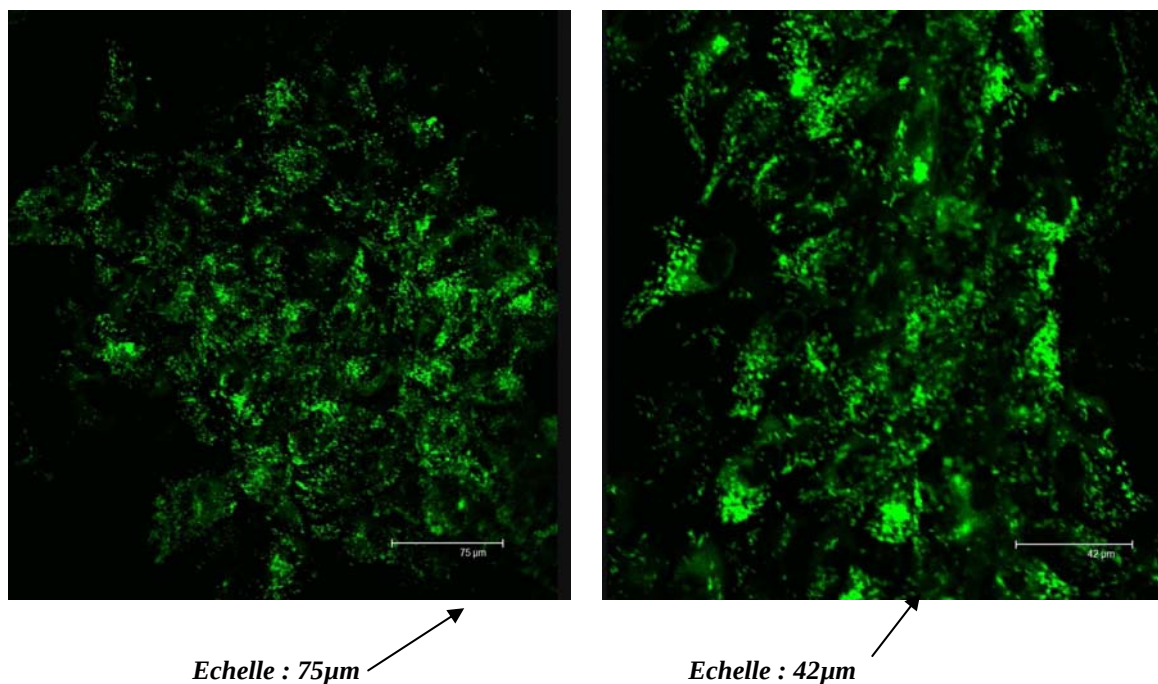


Figure-II.3 : Marquage en immunofluorescence indirecte du vWF dans les HUVECs. vW : couleur verte ; image obtenue par la microscopie de fluorescence confocale (Leica SP2-AOBS, objectif x40).

II.2 – PREPARATION ET CONSERVATION DES SONDES FLUORESCENTES

Deux marqueurs fluorescents liposolubles ont été utilisés dans cette étude :

- Le **DiO**, perchlorate de 3,3'-dioctadécyloxacarbocyanine (réf. D4292, Sigma-Aldrich, Germany),
- Le **DiI**, perchlorate de 1,1'-dioctadécyl-3,3,3',3'-tétraméthylindocarbocyanine (réf. 42364, Biochemica-Fluka, Sigma-Aldrich, Germany).

Les solutions de référence de DiI et DiO ont été préparées dans du DMSO (diméthyl sulfoxide, réf. D-5879, Sigma, France) à des concentrations finales de 2,15 mM pour le DiI et 5,75 mM pour le DiO. Toutes ces préparations ont été filtrées et conservées à l'abri de la lumière dans un environnement stérile à 4°C.

II.3 – PREPARATION DES LIPOPROTEINES DE FAIBLE DENSITE (LDL)

Origine des LDL : Les LDL natives obtenues à partir du sérum de donneurs sains, ont été préparées par le Service de Biochimie du C.H.U. d'Amiens (France) et mises à notre disposition par le Pr J-C MAZIERE, Chef du Service de Biochimie et le Dr P. MORLIERE DR INESRM

La séparation et la préparation des LDL sont décrites ci-dessous.

II.3.1 – Séparation des LDL natives

La méthode utilisée pour la séparation des LDL est la séparation des lipoprotéines par ultracentrifugation séquentielle.

Le principe est basé sur leurs différences de densité et donc de leur flottaison dans le plasma ou sérum où elles se trouvent. La densité du plasma est augmentée par ajout de bromure de potassium (KBr) afin de faire flotter les lipoprotéines d'intérêt. Suite à la centrifugation du plasma ou sérum à 900g pendant 12 min, le plasma pauvre en plaquettes est prélevé et 4 mM d'EDTA sont ajoutés. Il est ensuite centrifugé à 200 000g (45 000 rpm, rotor kontron tft-5380) pendant 18 h à 4°C. Les VLDL et les chylomicrons qui flottent en surface sont éliminés. Puis la densité du plasma est augmentée à l'aide de KBr de 1,006 à 1,063. Le plasma est ensuite centrifugé à 200 000g pendant 20 h à 4°C. A la fin de cette seconde étape de centrifugation, l'anneau orangé constitué de LDL flotte et est récupéré et dialysé dans un

tampon phosphate riche en EDTA (1 mM) pour éliminer l'excès de KBr tout en protégeant les LDL d'une éventuelle oxydation. Les LDL ainsi obtenues sont filtrées et conservées à 4°C jusqu'à utilisation (2 à 3 semaines maximum).

La caractérisation des LDL est réalisée par :

- le dosage des triglycérides par la méthode modifiée par McGowwan *et al.*, 1983,
- le dosage du cholestérol par la technique d'Allain *et al.*, 1974, modifiée par Roeschlau, 1974.

La concentration de LDL est déterminée par le dosage protéique selon la méthode de Bradford adaptée par Pierce, 1977.

II.3.2 – Oxydation des LDL

Avant utilisation, les LDL isolées par ultracentrifugation sont dialysées dans un tampon PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH_2PO_4 1,72 mM, Na_2HPO_4 20 mM) pendant 2 h à température ambiante suivi d'une seconde dialyse une nuit à 4°C. Ensuite l'oxydation des LDL est réalisée en présence de CuSO_4 (sulfate de cuivre). La suspension de LDL natives (1 mg de protéines/mL) préparée dans du tampon PBS est incubée dans un incubateur à 37°C pendant 24 h en présence de CuSO_4 (10 μM /mL, concentration finale). La réaction d'oxydation est arrêtée par addition de la solution de d'EDTA 1 mM/L. Avant l'utilisation dans les expérimentations, tous les échantillons sont dialysés dans un tampon PBS-EDTA (1 mM).

II.3.3 – Marquage des LDL avec du DiI et DiO

Afin de nous permettre d'observer et de suivre l'internalisation et la dégradation des molécules de LDL natives ou oxydées, nous avons réalisé un marquage de ces molécules par des sondes fluorescentes DiO et DiI décrites dans la partie II.2 de ce chapitre (Ouedraougo *et al.*, 2002).

Les solutions mères de DiI et DiO sont préparées dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO) pour obtenir des concentrations finales de 5,75 mM pour le DiO et 2,15 mM pour le DiI. Les deux marqueurs ont la propriété de réagir en couple, le premier en tant que donneur (DiO) et le second en tant qu'accepteur (DiI) dans un processus dit *Förster resonance energy transfer (FRET)*. Ils réagissent avec la partie lipidique des LDL.

Une solution de LDL natives ou oxydées (0,3 mg/mL) préparée dans du PBS stérile est incubée à 37°C pour 24 h soit avec la solution de DiI (6 μM , concentration finale) ou de DiO

(60 μ M, concentration finale), ou soit avec le mélange des deux marqueurs à concentrations identiques à celles décrites ci-dessus. Après 24 h d'incubation, les solutions sont filtrées à l'aide d'un filtre de 0,22 μ m, conservées à 4°C et utilisées dans les deux semaines qui suivent la préparation.

II.4 – STIMULATIONS ET TRAITEMENTS DES CELLULES

II.4.1 – Stimulation par TNF-alpha

Le TNF-alpha est utilisé pour simuler un processus inflammatoire.

La solution de TNF-alpha est préparée à partir d'une solution de 10 μ g de TNF-alpha dans 1 mL de tampon PBS plus 0,1% de BSA dilué avec du milieu M199 puis aliquoté à raison de 200 μ L par tube (concentration finale, 200 U/mL). La solution ainsi préparée est conservée à -80°C.

Pour les expérimentations, les cellules sont stimulées par incubation à 37°C avec du TNF-alpha à une concentration finale de 100 U/mL à des durées déterminées.

II.4.2 – Application des contraintes mécaniques

La contrainte de cisaillement à la paroi est approximée en utilisant l'équation pour un fluide Newtonien:

$$\tau = 6 Q \mu / H^2 W$$

où Q est le débit (mL/s), μ la viscosité du milieu (0,72 mPa.s), H la hauteur (0,024 cm), et W la longueur de la chambre (1,8 cm).

La viscosité du milieu a été mesurée avec un viscosimètre de type *Couette*. Les résultats sont exprimés en mPa.s. La mesure a été faite à 4 vitesses de cisaillement différentes en utilisant 1,5 mL de milieu de culture supplémenté de 20% de sérum, et la moyenne obtenue est = 0,87 – 10% (excès de mesure) = 0,78 mPa.s (0,75 mPa.s pour un milieu de culture complet supplémenté de 2% USG, équivalent de 10% de sérum).

Afin de simuler les conditions d'écoulements laminaires, la chambre d'écoulement rectangulaire représentée schématiquement dans la Figure-II.5 permettant de créer des écoulements laminaires est mise au point avec des conditions hydrodynamiques bien définies. Cette chambre est connectée à un circuit d'écoulement (*Figure-II.6*).

La chambre de flux est conçue pour obtenir un flux uniforme et laminaire. Elle consiste en un canal avec une section longitudinale rectangulaire qui a été vérifié expérimentalement avec

des billes de polystyrène (Wang *et al.*). L'assemblage de la chambre est effectué par un vide de -500 mbar grâce à une pompe à vide. La chambre est connectée à un circuit d'écoulement (Figure-II.6). La pompe péristaltique permet de créer une circulation du milieu de culture. Le débit est contrôlé par la vitesse de la pompe. Une seringue contenant de l'air est connectée au circuit en amont de la chambre afin d'amortir grâce à la compressivité de l'air, les fluctuations parasites de l'écoulement. Un mélange gazeux (5% de CO₂ et 95% d'air) est introduit dans le réservoir de milieu pour maintenir les conditions de culture. La température est maintenue à 37°C dans un bain-marie. La chambre est ensuite installée sur la platine à roulette du microscope confocal afin de visualiser les cellules en temps réel (cf. Figure-II.7) et de suivre la cinétique d'internalisation des LDL dans les cellules vivantes.

Le débit de la pompe péristaltique (Masterflex®, L/STM, model 7519-25, BioblockScientific, France) est étalonné par graduation à partir de la vitesse de rotation.

La variation du débit (Q) nous permet d'obtenir différentes valeurs de la contrainte de cisaillement (τ). La relation $y = 13,485x - 9,0212$ a été obtenue par régression linéaire (Figure-II.4). Dans nos expérimentations, nous avons soumis les cellules à un taux de cisaillement de 10 dynes/cm² soit 1 Pa.

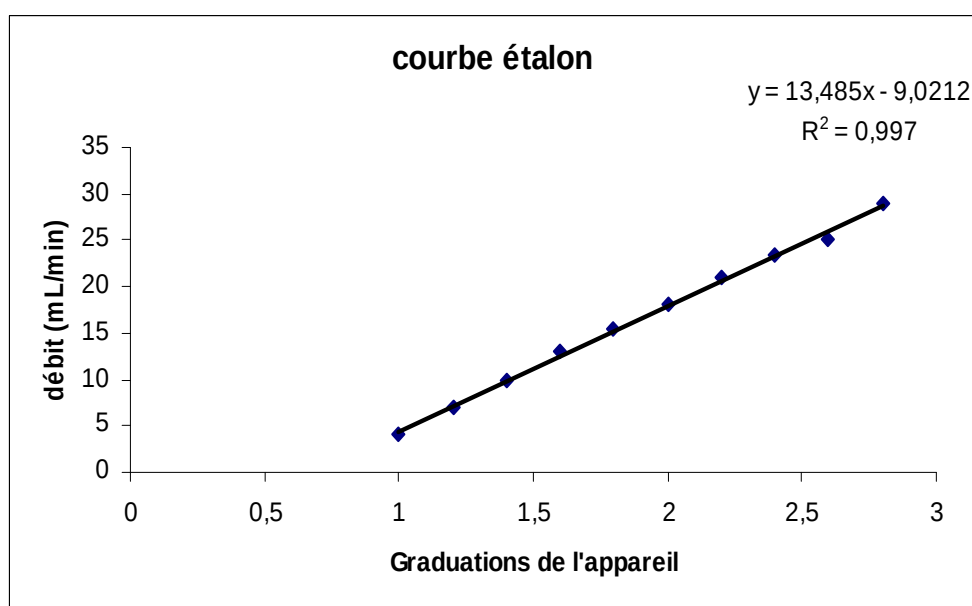


Figure-II.4 : Droite d'étalonnage de la pompe péristaltique (Masterflex®, L/STM, model 7519-25, BioblockScientific, France). Par commodité, l'étalonnage de la pompe a été effectué à partir des graduations du potentiomètre de réglage.

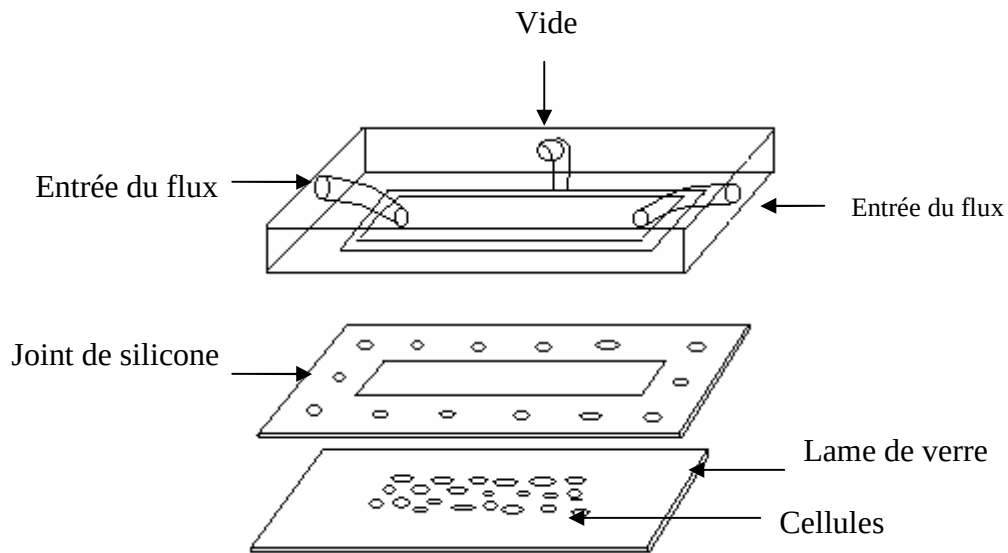


Figure-II.5 : Montage de la chambre d'écoulement utilisée au laboratoire (D'après X. Wang).

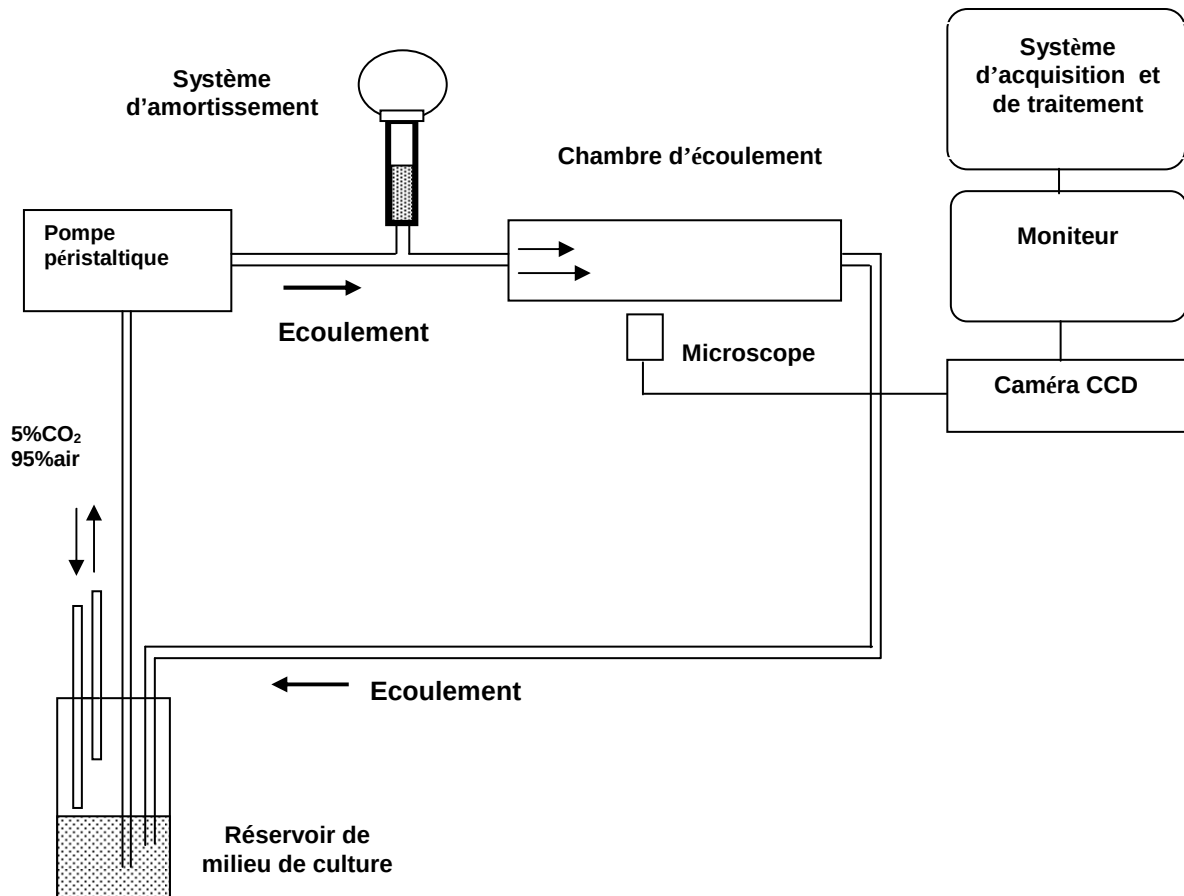


Figure-II.6 : Schéma du système de mise sous contraintes de flux.

II.4.3 – Incubation des cellules avec des lipoprotéines (DiI-LDL, DiO-LDL, DiI-DiO-LDL, DiI-ox-LDL)

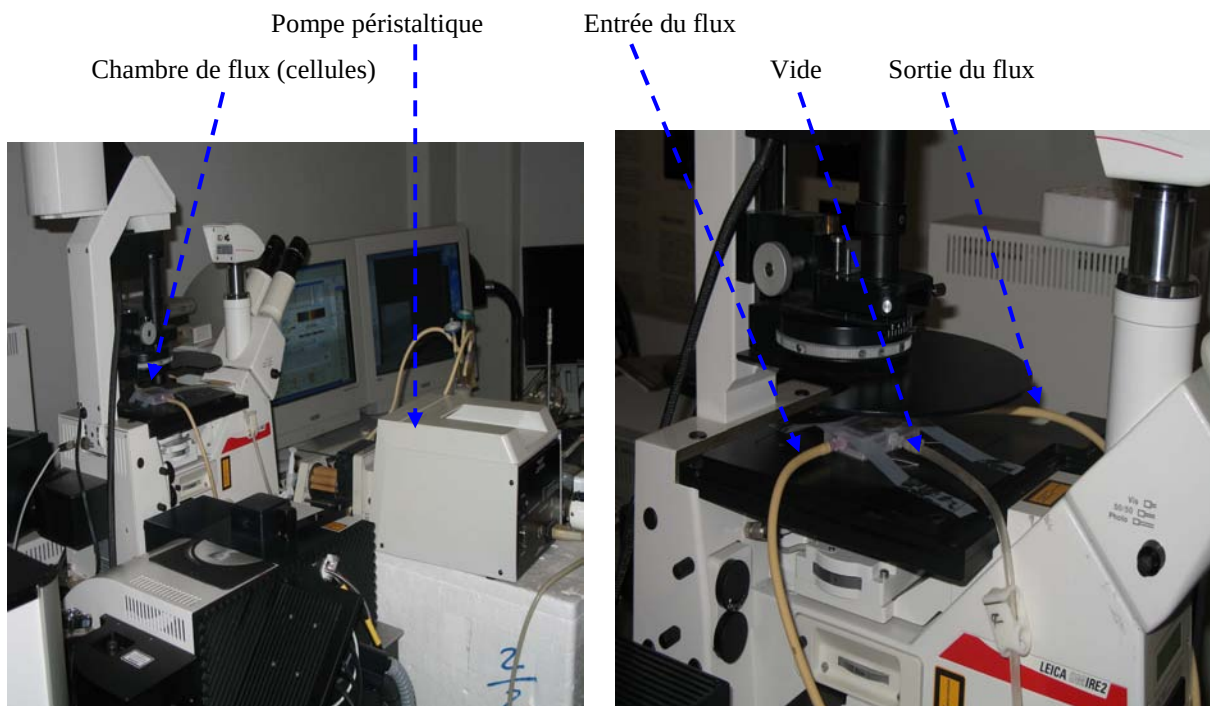
Milieux de base sans rouge de phénol :

Pour réaliser les expériences d'incubation des cellules avec les différents types de LDL et afin d'éviter toute interférence des résidus de lipides du milieu de culture dans lequel les cellules ont été cultivées, nous avons remplacé le milieu complet par un milieu de culture fraîchement préparé à partir des deux milieux de base (proportion volumétrique) complémenté soit avec 10% de sérum AB ou avec 2% de Ultroser G qui est un substitut de sérum. Ensuite les cellules cultivées sur les lamelles pour les expériences en microscopie, sont incubées avec ce nouveau milieu pendant 12 à 24 h avant l'expérimentation.

A la fin de cette étape d'incubation et après un bref lavage des cellules avec du milieu sans sérum, suivi d'un contrôle de l'aspect morphologique des cellules, celles-ci sont montées dans une chambre de flux fixée sur la platine motorisée du microscope de fluorescence confocale. L'assemblage de la chambre et du système de flux ainsi que leur adaptation au microscope, sont décrits ci-dessus dans la partie II.4.2. Les cellules sont ensuite incubées dans les différents milieux préparés comme suit : milieu complet composé de 40% de M199 et 40% de RPMI-1640 contenant 10% de sérum AB pour les HUVECs ou 2% de Ultroser, 2% de glutamine, 1% de pénicilline-streptomycine, de fungizone et soit du DiI-LDL, ou DiO-LDL ou du DiI-DiO-LDL en fonction des expérimentations avec une concentration finale de LDL à 10 μ g pour 1 mL de milieu complet. Les différents milieux ainsi préparés constituent les milieux pour les différents groupes d'expérimentation (DiI-LDL, DiO-LDL, DiI-DiO-LDL). Ils sont ensuite ajoutés aux cellules et l'ensemble est incubé soit sous conditions statiques, soit sous conditions dynamiques (1 Pa) pendant 0 à 24 h à 37°C, 5% de CO₂, 95% d'air. Le groupe de contrôle étant représenté par les cellules incubées dans les milieux complets mais ne contenant pas de LDL marqués.

Pour observer, en temps réel, la cinétique d'internalisation et de dégradation des LDL dans les cellules soumises ou non aux contraintes de cisaillement, les différents types de LDL sont ajoutés aux cellules sous microscope confocal (réf. Leica SP2-AOBS, Germany) (*Figure-II.7.A-B- C*), et l'acquisition des images est effectuée en XYZ (3D) et en mode séquentiel avec des longueurs d'onde λ excitation 488 nm pour le DiO, λ excitation 543 nm pour le DiI, en mode normal, et λ excitation 488 nm pour le DiI en mode FRET. Parallèlement à ces

expériences, les lames d'HUVECs et d'ECV304 sont incubées avec les mêmes milieux dans l'incubateur à 37°C (5% de CO₂, 95% d'air).



A

B

Réservoir de milieu de culture (placé au bain marie à 37°C)



C

Figure-II.7A-B-C : Montage de la chambre de flux sur la plate-forme du microscope de fluorescence confocale (Leica SP2-AOBS, Germany) : Lasers utilisés (Arg 488 nm, HeNe 543 nm). A : montage vu de derrière ; B : montage vu de face. C : vu d'ensemble de l'adaptation du système en flux au microscope.

II.5- TECHNIQUES D'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE

Des molécules exprimées à la surface cellulaire ou à l'intérieur des cellules peuvent être reconnues par des anticorps spécifiques (Ac) (Ac primaire reconnaissant spécifiquement la molécule étudiée). Ensuite, la reconnaissance de l'Ac primaire est effectuée par un Ac secondaire conjugué à un fluorochrome (tel que la FITC) afin de visualiser les molécules étudiées (*Figure-II.8*) et d'amplifier le signal.

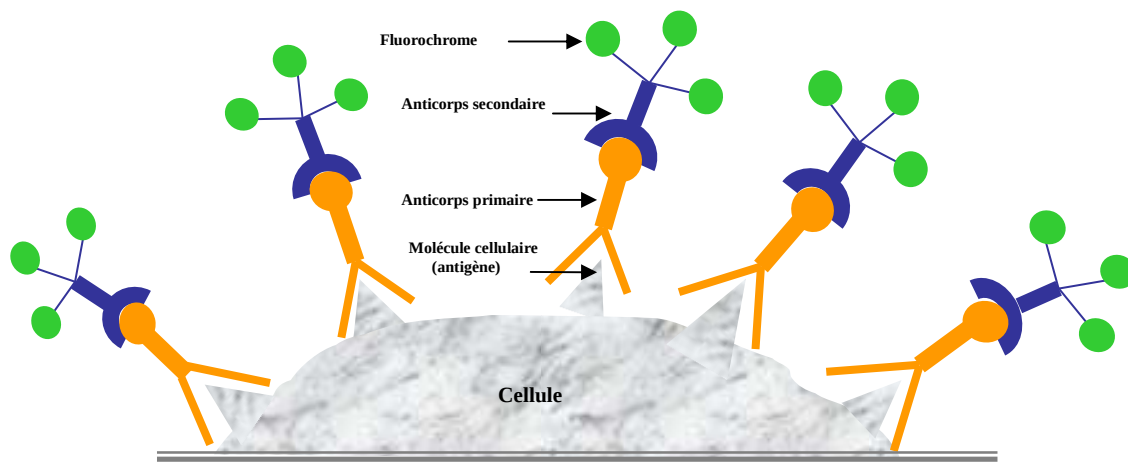


Figure-II.8 : Principe d'un immunomarquage indirect.

II.5.1.– Marquage de la cavéoline-1

Les molécules de cavéolines, présentes dans les cellules endothéliales, sont les principales protéines des caveolae qui sont des petites poches ou invaginations de la membrane plasmique. Pour leur étude, étant donné qu'elles sont également présentes à l'intérieur de la cellule, nous avons réalisé une perméabilisation des cellules après fixation. Elles sont mises en évidence (*Figure-II.9*) par la technique de l'immunofluorescence indirecte dont le principe est décrit ci-dessus. Une dilution de 1:50 de l'AC primaire (lapins anti-cavéoline-1 humaine) est utilisée et l'AC secondaire est l'anticorps de chèvre (anti-IgG de lapins) (dilution 1:50). Le protocole de marquage, la période d'incubation et le rinçage sont indiqués précédemment.

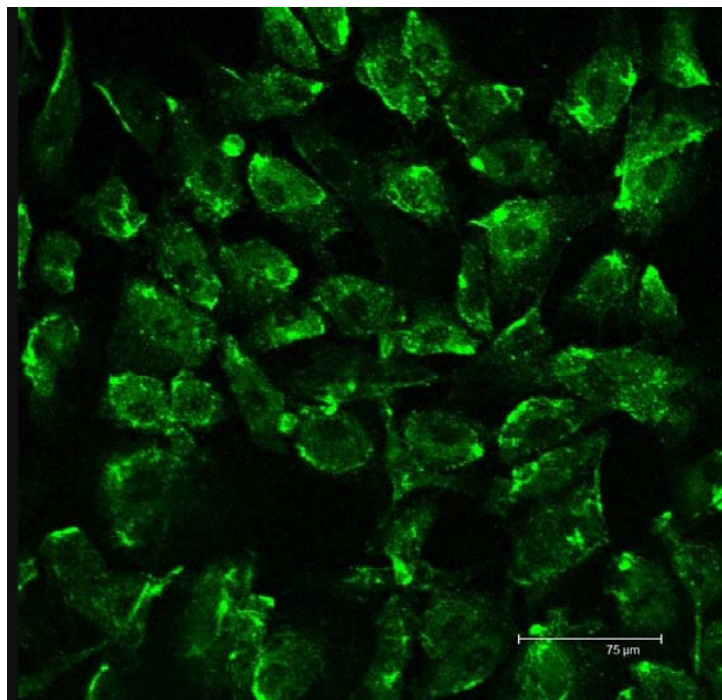


Figure-II.9 : Marquage de la cavéoline-1 dans les HUVECs par immunofluorescence indirecte. Cavéoline : couleur verte, image obtenue par microscope de fluorescence confocale (Leica SP2-AOBS, objectif x40 ; échelle 75μm).

II.5.2.– Marquage du cytosquelette

La phalloïdine, toxine présente dans un champignon, qui a une grande affinité pour la F-actine, est conjuguée à un fluorochrome : Alexa Fluor[®] 488 Phalloïdin (réf. A 12379, Invitrogen- Molecular Probes, USA).

Le marquage du cytosquelette s'effectue après lavage des cellules avec du milieu sans rouge de phénol, fixation par le paraformaldéhyde 1% pendant 10 min et perméabilisation par le Triton X-100 0,5% pendant 15 min à 37°C. L'Alexa Fluor[®] 488 Phalloïdine, dilué à 1/100 dans du Triton X-100 0,5% est déposée sur les cellules pendant 45 min à 37°C. Ensuite, les cellules sont rincées abondamment avec du tampon PBS et sont prêtes pour l'examen microscopique (Figure-II.10).

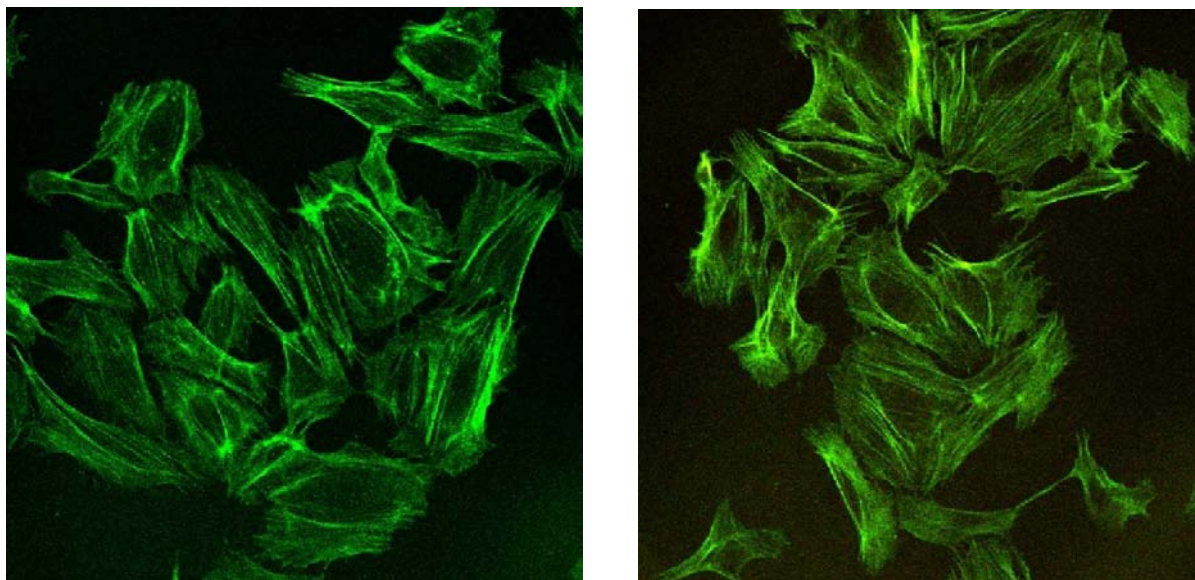


Figure-II.10 : Marquage du cytosquelette par l’Alexa Fluor[®] 488 Phalloïdine. (microscope de fluorescence confocale, Leica SP2-AOBS, objectif x40).

II.6 – MICROSCOPIE A FLUORESCENCE

II.6.1 – La Fluorescence

Parmi les méthodes d’investigation des milieux biologiques, la fluorescence, de par sa grande sensibilité d’analyse (supérieure aux méthodes utilisant les radioéléments), présente un grand intérêt pour l’analyse de cellules ou de tissus. La fluorescence est un phénomène de luminescence dont le mécanisme d’excitation est d’origine lumineuse.

De nombreuses molécules synthétiques et naturelles peuvent absorber la lumière dans le spectre visible et la retransmettre par la suite – c’est ce que l’on appelle le processus de fluorescence.

Lorsqu’un fluorophore est porté dans un état excité par l’absorption d’un photon, il revient spontanément à l’état fondamental selon des voies très diverses. L’ensemble de ce processus est présenté schématiquement dans le diagramme dit de Perrin-Jablonski (*Figure-II.11*). L’absorption d’un photon d’énergie appropriée fait passer le fluorophore de l’état fondamental (S_0) à un état électronique excité (S_1 ou S_2). La molécule portée à l’état énergétique (S_2) peut retourner à l’état énergétique inférieur (S_1) par conversion interne qui est une transition non radiative (il n’y a pas d’émission de photons). Une perte d’énergie peut aussi avoir lieu par relaxation vibrationnelle dans le même état électronique. L’émission de photons accompagnant la relaxation (S_1)-(S_0) est appelée **fluorescence**.

Le retour à l’état de base S_0 n’est effectué qu’après quelques nanosecondes.

Une autre voie d'excitation est possible à partir de l'état S_1 en passant par un état intermédiaire T_1 , c'est le passage inter-système qui est suivi du phénomène de phosphorescence. La fluorescence et la phosphorescence diffèrent par l'énergie des photons émis et par la durée de vie de leurs états excités.

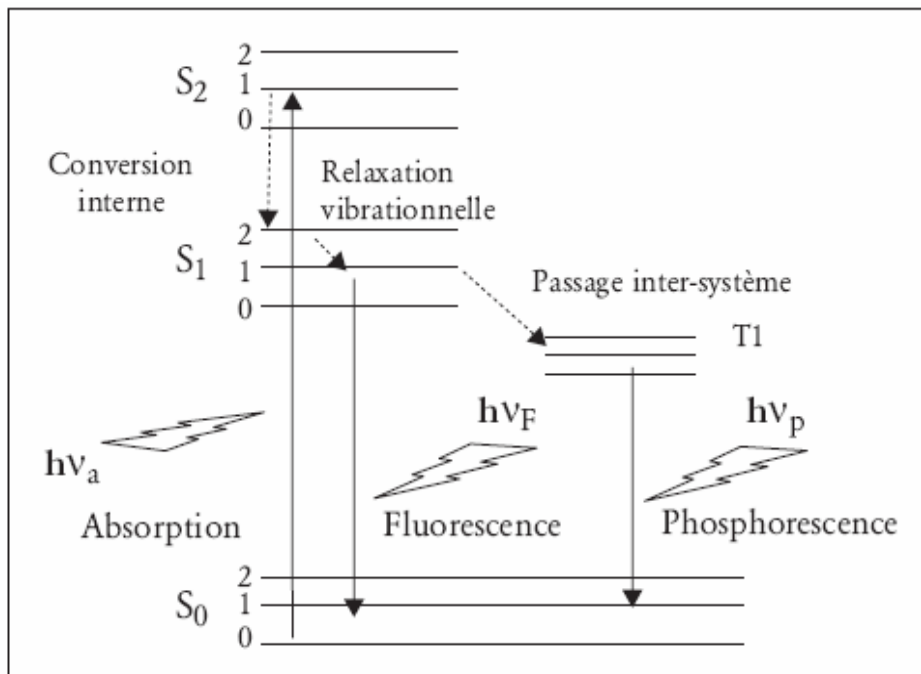


Figure-II.11 : Diagramme simplifié dit de Perrin-Jablonski. Les états électroniques singulets sont notés S_0 , S_1 , S_2 et l'état triplet T_1 . Les flèches verticales correspondent aux phénomènes d'absorption ou d'émission de photons. Les flèches en pointillés correspondent à des pertes énergétiques non radiatives.

Au bout de quelques nanosecondes (durée de vie de la fluorescence) la molécule libère un photon, reprend son état initial et peut être excitée une nouvelle fois. En raison des interactions thermiques avec le solvant, le fluorophore excité perd de l'énergie. Il en résulte un décalage de la longueur d'onde du photon de fluorescence émis vers de plus hautes fréquences par comparaison au photon d'excitation. Ce phénomène est appelé « déplacement de Stokes » (Stokes' Shift).

Des paramètres présentent une importance primordiale pour analyser le comportement d'un fluorophore donné : le coefficient d'extinction molaire, le rendement quantique de fluorescence et la durée de vie de fluorescence. Ces données sont caractéristiques du fluorophore et de son environnement.

Caractéristiques photophysiques d'un fluorophore

Le coefficient d'extinction molaire (exprimé en $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) représente la capacité qu'a une molécule d'absorber des photons à une longueur d'onde. L'extinction de fluorescence comprend au sens large tout phénomène diminuant l'intensité de fluorescence. En mettant à part les effets de propriétés optiques (réabsorption, turbidité de la solution...) qui ne sont pas des phénomènes à l'échelle moléculaire, cette diminution de l'intensité de fluorescence peut avoir diverses origines :

- (i) - extinction par réaction chimique à l'état excité. Dans ce cas, la diminution de l'intensité correspond à la diminution de molécules fluorescentes, le rendement quantique reste constant.
- (ii) - extinction par collision ("quenching" dynamique). Le contact d'un fluorophore à l'état excité avec une molécule dite extinctrice ou inhibitrice désexcite le fluorophore sans émission de photons. Dans ce cas c'est k_{nr} (vitesse de désexcitation non radiative) qui augmente. La diminution est fonction de la probabilité de collision entre l'extincteur et le fluorophore qui dépend soit de la diffusion moléculaire de l'extincteur dans la solution, et donc de la viscosité du milieu, soit de la concentration de l'extincteur.
- (iii) - extinction par formation d'un complexe non fluorescent ("quenching" statique). Dans ce cas, comme pour (i), la diminution de l'intensité correspond à la diminution de la concentration de molécules fluorescentes.
- (iv) - extinction par transfert d'énergie. Brièvement, le transfert d'énergie diminue le rendement quantique par l'augmentation de la constante de vitesse non radiative k_{nr} .
- (v) - extinction par la formation d'agrégats. Dans ce cas, cette agrégation met en jeu les atomes impliqués dans le phénomène de fluorescence (chromophore) donnant naissance à une autre espèce fluorescente dont le rendement quantique diminue sensiblement soit par la diminution de k_r (vitesse de désexcitation radiative), soit par l'augmentation de k_{nr} .

Le rendement quantique de fluorescence (sans unité) est la capacité d'un fluorophore d'émettre des photons par fluorescence suite à l'absorption de photons. Le photon est absorbé, la molécule excitée peut revenir à son état fondamental par différents procédés non radiatifs comme la conversion interne ou l'extinction de fluorescence. Le rendement quantique rend compte de la compétition entre le phénomène de désexcitation radiatif et les différents phénomènes de désexcitation non radiatifs. En considérant un diagramme de Perrin-Jablonski simplifié, on peut associer deux vitesses de désexcitation, une radiative, k_r , et une non radiative, k_{nr} . k_r et k_{nr} correspondent à la vitesse de désexcitation radiative et non radiative, respectivement. Ces constantes de vitesse dépeuplent toutes deux l'état excité. Le rendement quantique, Q , peut se caractériser par : $Q = k_r / (k_r + k_{nr})$

L'intensité de fluorescence d'une solution est ainsi proportionnelle à l'intensité d'excitation, à la concentration du fluorophore, à son coefficient d'extinction molaire, qui est une propriété intrinsèque de la molécule, et à son rendement quantique, qui, lui, varie en fonction du microenvironnement du fluorophore.

La durée de vie de fluorescence est l'une des caractéristiques les plus importantes d'une molécule fluorescente, parce qu'elle lui est propre et qu'elle est très sensible à l'environnement moléculaire du fluorophore. La durée de vie de fluorescence se définit comme le temps moyen pendant lequel une molécule fluorescente demeure excitée. Dans le cas d'une population de molécules, la durée de vie de fluorescence correspond au temps moyen de décroissance de la population de molécules excitées simultanément :

$$\langle \tau \rangle = \int t N(t) dt / \int N(t) dt \text{ où } N(t) \text{ est le nombre de molécules encore excitées au temps } t.$$

Il faut souligner que cette la durée de vie τ est indépendante de la concentration. Elle correspond au temps moyen de désexcitation à partir de l'état S1 qui varie en moyenne de 1 à 100 ns pour les fluorophores organiques et biologiques.

II.6.2 – Les microscopies – Techniques de microscopie de fluorescence

Dans notre étude, nous avons utilisé les techniques suivantes : microscopie de fluorescence 3D (Scanner cellulaire, microscopie confocale), technique de FRET- transfert d'énergie de fluorescence (FRET – *Förster resonance Energy Transfer*), la spectroscopie à corrélation de fluorescence (FCS – *Fluorescence Correlation Spectroscopy*) et la microscopie de fluorescence résolue dans le temps (FLIM – *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*).

II.6.2.a – Scanner cellulaire

– Principe

La technique de « Scanner cellulaire » utilise un microscope à fluorescence conventionnel (Olympus IX-70) associé à un système dit CELL scan™ (Scanalytics, USA) composé d'un module d'acquisition et d'un module de traitement. Le microscope est associé à un dispositif de déplacement axial nanométrique et d'un algorithme de reconstruction d'images qui permettent de visualiser des échantillons biologiques en trois dimensions (Dumas *et al.*, 2000).

– Acquisition et traitement des images

Les objectifs 60x/1,25NA et 100x/1,30NA ont été utilisés pour l'observation des cellules. L'objet est illuminé en entier (lampe xénon), à la différence de l'approche confocale (ci-

dessous). Une série d'images 2D est acquise en déplaçant le plan focal à travers l'objet et chacune des images 2D contient des informations de son plan focal (partie nette) et de tous les autres plans (partie floue). Ces informations peuvent être séparées par traitement d'image afin d'estimer la vraie structure 3D de l'objet étudié.

Le traitement d'image concerne la manipulation et l'analyse d'image (restauration, reconstruction et rehaussement ; numérisation et compression ; description et reconnaissance de formes). Le but de restauration d'image est de retrouver la scène originelle à partir d'observations dégradées.

Afin de supprimer l'information située en dehors du plan de focalisation, la PSF (*point spread function*) ou la fonction de transfert optique du système complet (microscope/détecteur) est mesurée et utilisée pour le déflouage.

La fonction de transfert optique décrit comment une source lumineuse ponctuelle est déformée lorsqu'elle est imagée par un système optique. D'une manière synthétique, la PSF caractérise la fonction de transfert du microscope pour des conditions expérimentales particulières, propres à chaque expérience (incrément entre chaque plan, ouverture numérique, milieu de montage, objectif, filtres, traceurs fluorescents, longueurs d'onde...). On utilise des billes fluorescentes en latex pour mesurer la PSF dont la longueur d'onde d'émission est la même que celle des spécimens biologiques à étudier.

La préparation de billes de 0,17 μm (suffisamment diluée) est placée sur la lame. On fait l'acquisition des coupes constituant le fichier "PSF" du bas vers le haut de la bille afin de minimiser l'influence du "bleaching". La normalisation permet d'avoir la même quantité d'énergie lumineuse dans chacun des plans et de compenser un éventuel "bleaching" du signal et/ou le papillotement de la source d'excitation.

Sur le principe des acquisitions par sectionnement optique, le système mathématique met en œuvre une étape de déconvolution numérique à l'aide d'algorithmes. CELL scanTM fait appel à une technologie de pointe en matière de corrections d'image : l'EPR (*Exhaustive Photon Reassignment*) ou restitution quantitative des photons issus d'un point source à leur plan d'origine. Elle consiste en une minimisation au sens des moindres carrés avec contraintes, qui conduit à une déconvolution 3D itérative. Pour chaque image, les photons défocalisés sont évalués et réinsérés à leur point d'origine. Dans la méthode EPR, les propriétés de distorsion et de profondeur de champ du microscope sont analysées mathématiquement afin d'obtenir des images plus nettes et plus contrastées. La reconstitution des images 3D est effectuée à partir des coupes 2D.

II.6.2 b – Microscopie Confocale à Balayage Laser

– Principe, avantages et applications

Le microscope confocal à balayage laser (en anglais CLSM pour *confocal laser scanning microscope*) est un microscope optique qui a la propriété de réaliser des images de très faible profondeur de champ (environ 600 nm) appelées «sections optiques». En positionnant le plan focal de l'objectif à différents niveaux de profondeur dans l'échantillon, il est possible de réaliser des séries d'images à partir desquelles on peut obtenir une représentation tridimensionnelle de l'objet. Son principe consiste à focaliser, par l'intermédiaire d'un objectif, un faisceau laser qui va exciter les fluorochromes en un point de l'échantillon, puis à récupérer, sur un photomultiplicateur, le signal lumineux émis en ce point. Un diaphragme de détection, placé devant le photomultiplicateur, et dont le rôle est essentiel dans la résolution spatiale, arrête tout signal ne provenant pas du plan focal. Le signal reçu est amplifié dans le photomultiplicateur, traité afin d'améliorer le rapport signal sur bruit, puis numérisé. L'image est construite point à point par balayage (X, Y) du champ analysé à l'aide de miroirs de déflexion de la source lumineuse. Une platine motorisée déplace la préparation suivant l'axe Z permettant la saisie de différents plans optiques dans l'épaisseur de l'objet. Les images ainsi formées sont stockées sur la mémoire de masse d'un ordinateur.

Le microscope confocal possède de nombreux avantages par rapport à la microscopie conventionnelle. Tout d'abord la faible profondeur de champ (0,5 - 1,5 μm) du microscope permet d'obtenir une image d'un plan focal (coupe optique) avec une définition bien supérieure au microscope conventionnel et par conséquent le bruit de fluorescence continu est pratiquement éliminé. Il en résulte une très bonne sensibilité de détection, une augmentation du contraste et une "clarification" des images. Un autre avantage du microscope confocal est que l'on peut obtenir des coupes optiques non seulement dans le plan XY mais également suivant un plan parallèle à l'axe optique (plan XZ) qui peuvent faire l'objet de reconstructions tridimensionnelles. Ces coupes optiques n'affectent en rien l'intégrité de l'échantillon biologique contrairement aux coupes physiques nécessaires en microscopie photonique et électronique. En outre, l'acquisition numérisée des images permet sur station de traitement d'images, d'accroître les possibilités d'analyse et de quantification. De nombreuses applications sont possibles avec cette technique et ont été développées dans notre groupe (Dumas *et al*, 2003, 2005; Werkmeister *et al.*, 2006).

II.6.2 c – Dynamique des interactions moléculaires

Au cœur de tout système biologique, les interactions moléculaires jouent un rôle essentiel dans la régulation des processus physiologiques. La compréhension de cet extraordinaire

dynamique du vivant a nécessité la mise en oeuvre de méthodologies autour des outils de fluorescence. Ces techniques comprennent le retour de fluorescence après photoblanchiment (FRAP), le transfert d'énergie de fluorescence (FRET), la corrélation de fluorescence (FCS) et la détection de molécules uniques (SPT). Bien que dédiées à la description du mode de diffusion des molécules, ces méthodes se distinguent les unes des autres par la quantification des paramètres qui leur sont propres.

II.6.2.c.1– Le FRET

La localisation et la nature des interactions entre les espèces de molécules spécifiques des cellules vivantes sont des sujets d'intérêt important dans les recherches biologiques mais ces dernières sont souvent limitées par la résolution des instruments d'optique utilisés. Les microscopes à fluorescence conventionnels peuvent détecter deux molécules dans les limites du critère de Rayleigh c'est-à-dire approximativement 200 nanomètres. Cependant, pour comprendre les interactions physiques entre protéines partenaires intervenant dans des processus biomoléculaires typiques, la proximité relative des molécules doit être déterminée plus précisément que le permettent les méthodes d'imagerie optique traditionnelles qui sont limitées par la diffraction. C'est là qu'intervient la technique de FRET qui utilisée avec un microscope optique confocal permet la détermination de l'approche de deux molécules distantes de quelques nanomètres seulement. Les bases théoriques du processus FRET ont été posées en 1946 par Theodore Förster qui a appliqué la fluorescence à la théorie de polarisation développée en 1927 par Francis et Jean-Baptiste Perrin, père et fils. Il s'agit alors d'une « Energie d'excitation transférée d'une molécule à une autre à travers une interaction entre dipôles oscillant de molécules proches dans l'espace ». Deux molécules susceptibles d'interagir peuvent transférer leur énergie d'excitation, d'un donneur (D) vers un accepteur (A). La distance R entre deux molécules interagissantes (dans la gamme des 10 à 100 Å) peut ainsi être déterminée par la technique de FRET. L'efficacité du transfert diminue donc avec la distance. Pour une molécule donneuse spécifiquement excitée, le transfert d'énergie peut être quantifié en détectant la fluorescence émise par la molécule acceptrice.

Le transfert d'énergie se traduit par une augmentation du rendement quantique (et de la durée de vie) de l'accepteur A et une diminution du rendement quantique (et de la durée de vie) du donneur D. Ce sont ces propriétés qui sont exploitées pour mesurer une efficacité de transfert et, visualiser l'absence ou la présence de FRET, et donc d'interactions moléculaires.

Le spectre d'émission du donneur doit recouvrir, au moins partiellement, le spectre d'absorption de l'accepteur (Figure-II.12). Ce recouvrement des spectres est défini par une intégrale appelée intégrale de recouvrement $J(\lambda)$:

$$J = \int f_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda$$

où f_D est l'intensité de la fluorescence émise par le donneur à une longueur d'onde donnée et ϵ_A le coefficient d'extinction molaire de l'accepteur. Le facteur J reflète donc la capacité d'une paire de fluorophores à émettre et absorber de l'énergie à la même longueur d'onde.

La Figure-II.12 présente le recouvrement des spectres d'absorption et d'émission des deux partenaires dans un processus de FRET.

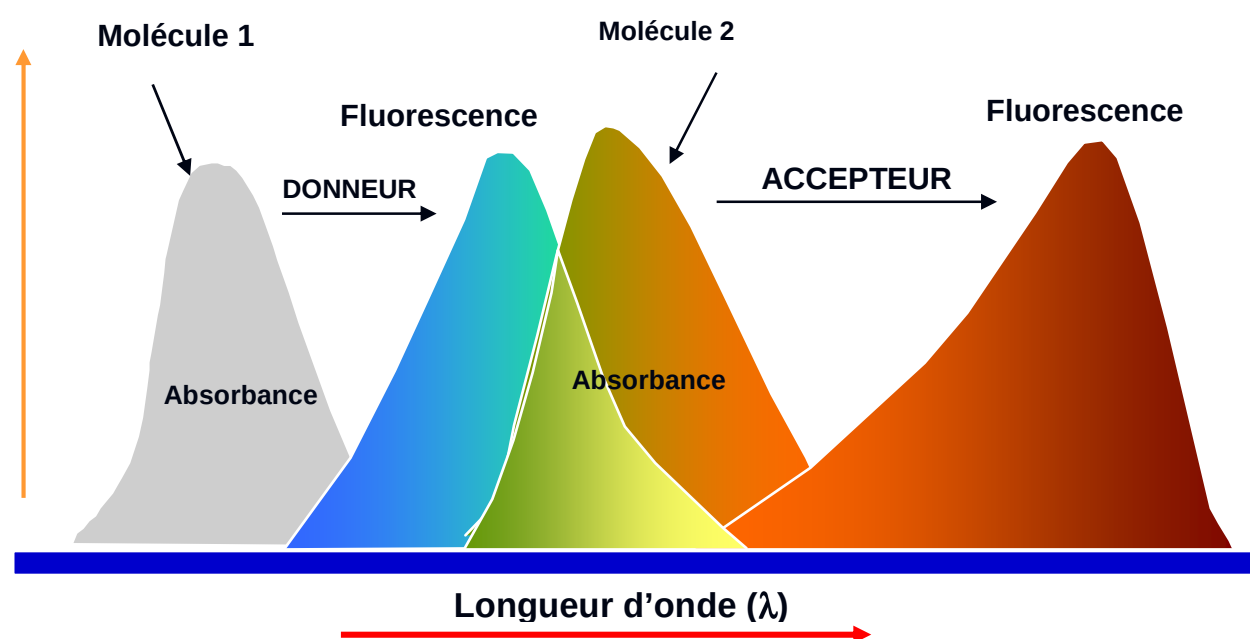


Figure-II.12 : Recouvrement des spectres d'absorption et d'émission des deux partenaires dans un processus de FRET.

En accord avec la théorie de Förster, le FRET est un processus qui dépend de la distance séparant les deux molécules, donneur et accepteur, comme le montre la formule suivante :

$$E = \frac{1}{1 + (R/R_0)^6}$$

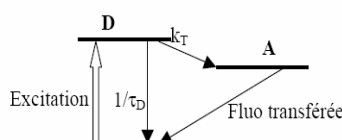
où R est la distance effective qui sépare les deux molécules et R_0 le rayon de Förster. Ce dernier correspond à la distance donneur-accepteur pour laquelle l'efficacité du transfert d'énergie est de 50%. Cette distance, qui dépend de la nature des fluorophores utilisés, est généralement comprise entre 1 et 10 nm (Stryer and Haugland, 1967). Au-delà de cette gamme, l'efficacité du transfert d'énergie chute très rapidement. L'expression mathématique pour le calcul de cette distance s'écrit :

$$R_0 = (10^{-3} \kappa^2 n^{-4} Q_D J)^{1/6} \times 9730$$

où J est l'intégrale de recouvrement, n l'indice de réfraction du milieu (n^{-4} est généralement compris entre 1/3 et 1/5), Q_D le rendement quantique du donneur en absence d'accepteur et κ^2 le facteur d'orientation qui est fonction de l'orientation relative des dipôles du donneur et de l'accepteur. Même si la valeur de κ^2 est théoriquement comprise entre 0 et 4, 2/3 est la valeur habituellement utilisée pour déterminer le R_0 . En effet, κ^2 est assimilé à 2/3 lorsque le donneur et l'accepteur présentent un degré de liberté suffisant pour être aléatoirement orientés dans l'espace (Stryer, 1978). Cette condition est généralement satisfaite pour les fluorophores attachés à des biomolécules car ils peuvent avoir une certaine liberté de rotation (Dale *et al.*, 1979).

II.6.2.c.2 – Efficacité du FRET

L'efficacité de transfert se définit comme le rendement quantique du phénomène de transfert d'énergie. Par analogie avec le rendement quantique de fluorescence, le rendement quantique de transfert correspond au nombre de molécules qui se désexcitent par transfert sur le nombre total de molécules excitées. Il caractérise à la fois l'efficacité E du transfert d'énergie et la vitesse (k_T) de ce transfert avec : $k_T = (R_0/R)^6/\tau_D$ où τ_D est la durée de vie radiative de l'état excité de la molécule donneuse, en l'absence d'interactions. L'efficacité du transfert est alors donnée par : $E = k_T/k$, où k est le taux total de la relaxation du donneur, qui inclut l'émission radiative et le transfert total de la relaxation du donneur, qui inclut l'émission radiative et le transfert. Ainsi, $Q_T = k_T / (k_r + k_{nr} + k_T) \equiv E$ où Q_T est le rendement quantique de FRET et E l'efficacité.



II.6.2.c.3 – Méthodes de visualisation du FRET

Le FRET peut se visualiser par une variation du rendement quantique (et donc de l'intensité de fluorescence) ou de la durée de vie de D comme celle de A. Plusieurs méthodes existent, la mesure du FRET par intensité, la mesure du FRET par déclin de fluorescence, la mesure du FRET par photoblanchiment et la mesure du FRET par polarisation.

- La première consiste à quantifier les variations de l'intensité de fluorescence en mesurant la diminution de la fluorescence émise par le donneur (Sokol *et al.*, 1998), l'augmentation de celle émise par l'accepteur (Chan *et al.*, 1979) ou en calculant un rapport que nous appellerons ratio (fluorescence émise par l'accepteur/fluorescence émise par le donneur) (Miyawaki *et al.*, 1997). Un recouvrement peut exister entre les spectres d'excitation et d'émission des fluorophores utilisés. Ce manque de sélectivité spectrale est à l'origine d'un

important bruit de fond (fuites spectrales) qui peut être amélioré en s'affranchissant d'une partie des signaux parasites grâce à une lecture en temps résolu.

- Ceci est possible en TR-FRET (*Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer*) grâce à l'utilisation de fluorophores à durée de vie longue tels que les chélates ou cryptates de terres rares. A ce jour, le TR-FRET est appliqué uniquement dans des formats microplaques.

II.6.2c.4 – FRET et FLIM (*Fluorescence lifetime imaging microscopy*)

La mesure de durées de vie sous un microscope est un développement assez récent, qui date du début des années 1990. L'avantage majeur de la mesure de durée de vie sous microscope est qu'il s'agit d'un paramètre indépendant de la concentration du fluorophore, tout en étant très sensible à l'environnement moléculaire de ce dernier. Son inconvénient jusqu'à récemment était sa mise en œuvre, mesurer des durées de vie nécessite une instrumentation pointue et coûteuse. La Figure-II.13 présente le système de FLIM utilisé au laboratoire).

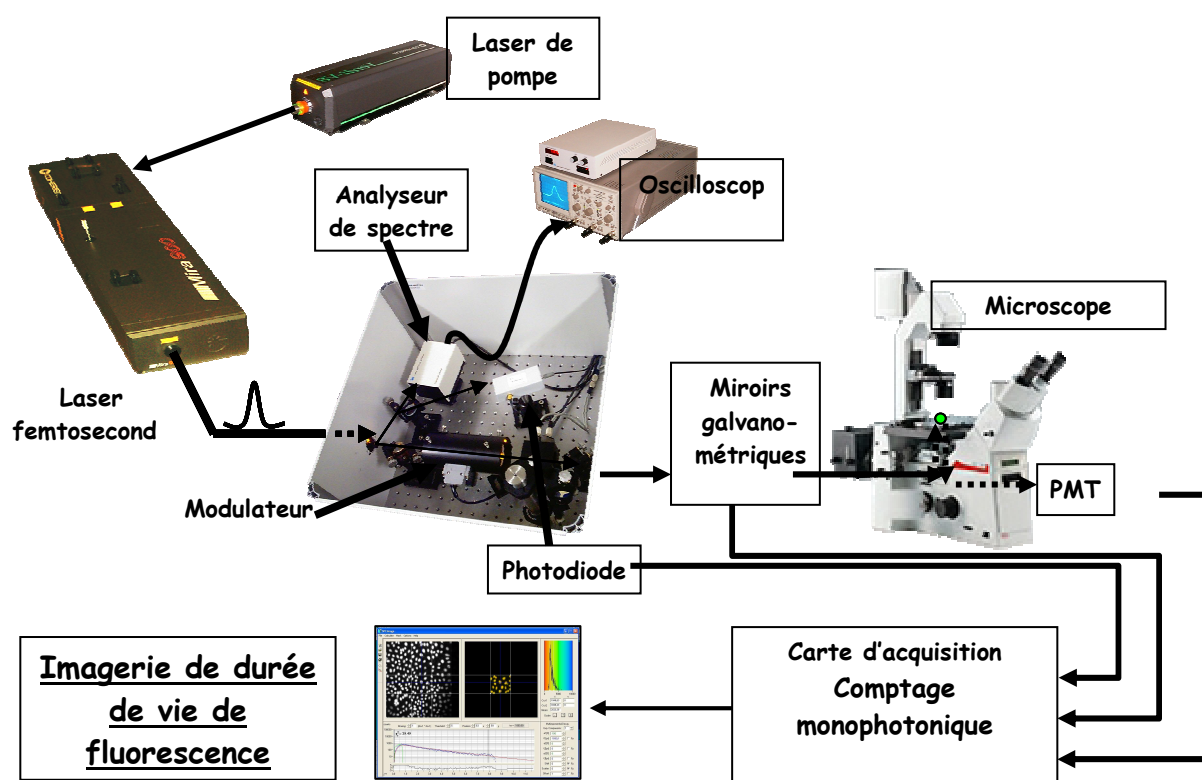
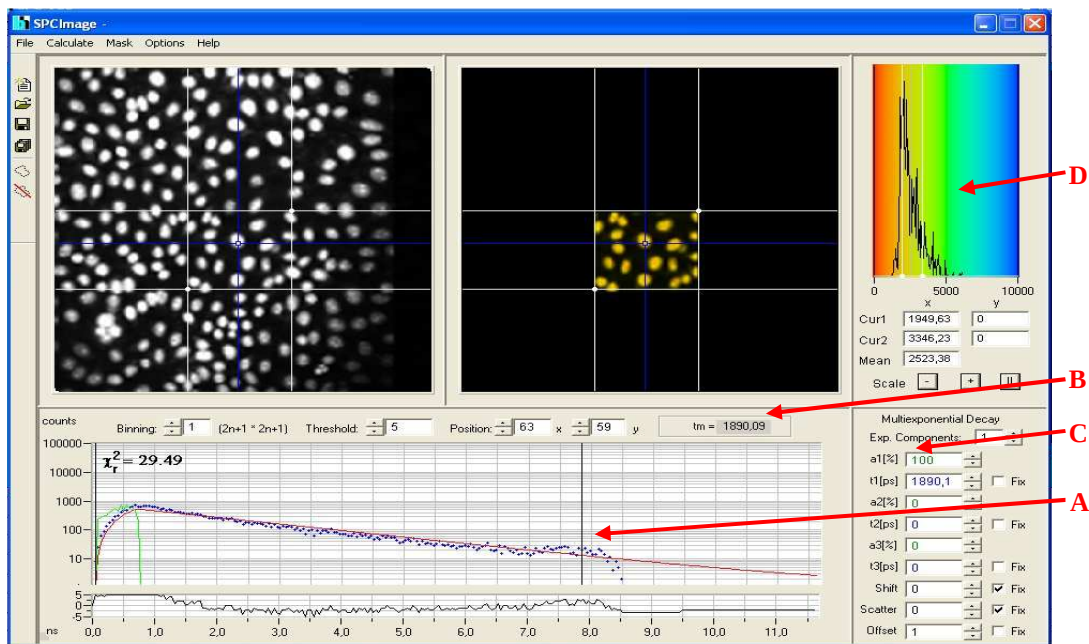


Figure-II.13 :Schéma du Système FLIM utilisé au laboratoire.

- le logiciel SPC software (Becker&Hickl) permettant à l'utilisateur de choisir le mode d'acquisition, de régler les paramètres de mesure, de contrôler les mesures effectuées, de consulter ou de sauvegarder des acquisitions, d'afficher l'image en intensité,...

- le logiciel SPCImage permettant d'afficher les images digitales de durée de vie de fluorescence produites en FLIM dans lesquelles la valeur de chaque pixel ou voxel représente la durée de vie de fluorescence. Des couleurs sont affectées aux différentes valeurs de durée de vie.
 - le déclin de fluorescence pour le pixel sélectionné : **A**
 - la durée de vie moyenne pour le pixel sélectionné : **B**
 - le poids de chaque composante lorsqu'on est en déclin multiexponentiel : **C**
 - la distribution des durées de vie de fluorescence de la partie d'image choisie par l'utilisateur : **D**



A : interface graphique du logiciel SPC image pour la détermination des déclins de fluorescence et des images FLIM

Principe :

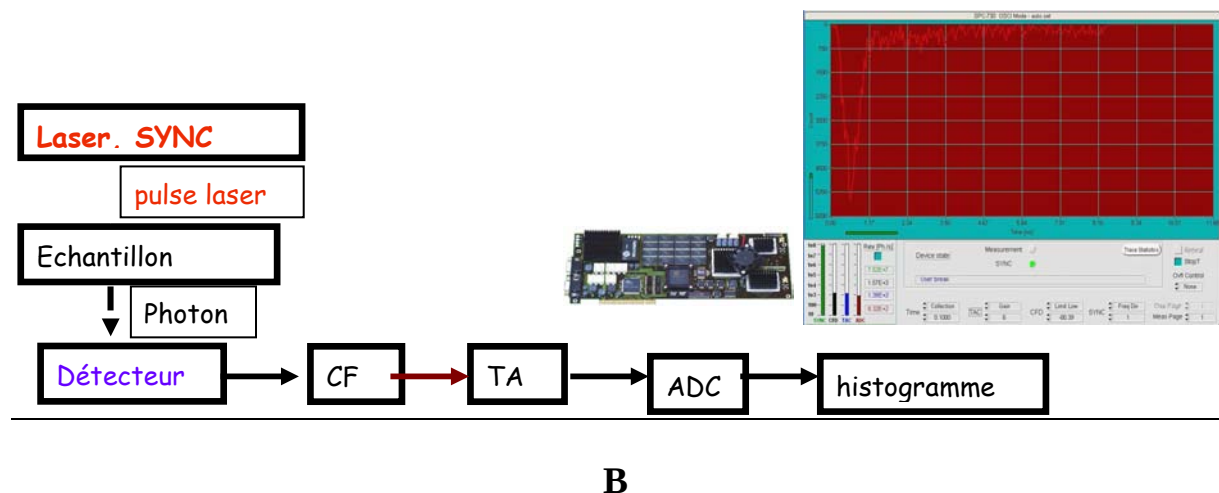


Figure-II.14 A-B : Principe de la technique FLIM

Après émission du premier photon de fluorescence émis par l'échantillon excité, le PMT NDD1 émet un pulse électronique correspondant à la détection de ce photon qui sera ensuite amplifié via le préamplificateur HFAC-26 et qui atteindra alors le premier bloc fonctionnel du module SPC730 : le « CFD ». Pour déterminer le temps Δt mis par le photon pour parvenir au détecteur après l'arrivée du pulse laser, le train d'impulsions du laser (76MHz du MIRA F900) a été détecté préalablement au moyen d'une photodiode rapide (temps de réponse < 1 ps) reliée elle aussi à un sélecteur d'impulsions rapide qui permet de délivrer un signal de sortie **Start** corrélé le plus précisément possible à la « localisation » temporelle de l'impulsion électronique correspondant à la détection d'un pulse laser d'excitation. Le composant utilisé est là aussi un « ZCT » reposant sur la technique de détection de passage à zéro. Le signal **Start** issu du bloc « SYNC » déclenche, à chaque impulsion laser, le premier composant du bloc « TAC » : le « RPG ». Celui-ci génère alors une tension continue qui augmente linéairement en fonction du temps. L'arrivée du signal **Stop** issu du bloc « CFD », reflet de la détection du premier photon émis par l'échantillon, provoque ensuite l'arrêt du « RPG ». La tension générée est proportionnelle à l'écart temporel entre l'arrivée de l'impulsion laser excitatrice et l'arrivée d'un photon de fluorescence. Cette valeur de tension correspondant donc à un photon détecté à un temps Δt après l'arrivée de l'impulsion laser, va ensuite être traitée et soumise à des contrôles pour donner naissance au signal **TACout** qui se dirigera vers l'étape suivante : l'« ADC avec correction d'erreur ».

Le module contient les blocs usuels suivants :

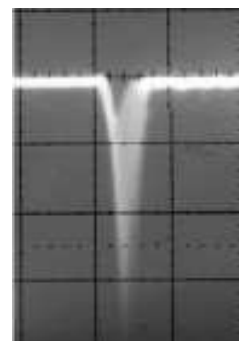
- le CFD ou Constant Fraction Discriminator
- le SYNC pour Synchronisation
- le TAC ou Time to Amplitude Converter
- l'ADC ou Analogic to Digital Converter

Tableau-II.1: Module électronique de la carte SPC 730 Becker & Hickl et du mode de synchronisation en TCSPC

	Nom	Fonction	Rôle
SYNC	Synchronization signal	Signal du laser (pulse)	Montre le taux de tir moyen pendant le balayage laser
CFD	Constant Fraction Discriminator	Discrimination: (bruit de fond électronique / signal) photons, traite le bruit, élimine le "jitter" temporel des impulsions	Montre tous les événements reconnus par la carte as des photons
TAC	Time to Amplitude Converter	Mesure le temps entre le photon et le pulse laser and le convertit en courant d'amplitude (voltage)	Montre tous les photons (nb) qui peuvent être corrélés ç un pulse laser.
ADC	Analogue to Digital Converter	Convertit le signal (voltage) analogique en un signal digital (nécessaire pour construire l'histogramme)	Montre tous les photons qui peuvent être adressés à une coordonnée x,y dans l'image

Le module SPC730 reçoit parallèlement différents signaux :

- les pulses électroniques issus du PMT NDD1, qui correspondent à la détection des photons uniques émis par l'échantillon
- les pulses de synchronisation issus de la photodiode rapide qui correspondent à la détection du train d'impulsions du laser, permettant l'excitation de l'échantillon
- les signaux « Line Clock » et « Frame Clock » provenant de l'unité de balayage du microscope SP2 DMIRE2



Pulse issu du PMT

Il existe deux façons principales de mesurer des durées de vie, dans un tube à essai comme sous un microscope : le comptage du photon unique et la modulation d'amplitude et le décalage de phase. Les principes, avantages et inconvénients sont détaillés ci-après.

– **Résolution temporelle en microscopie: Time correlated single photon counting (TCSPC)**

La technique la plus répandue pour la mesure de durées de vie de fluorescence dans le domaine temporel est le de photons uniques corrélés en temps ou CPUCT (ou

TCSPC pour *Time-Correlated Single Photon Counting*). Elle est basée sur la détection du premier photon de fluorescence émis par la molécule fluorophore excitée : il s'agit pour cela de déduire l'intensité incidente (excitation impulsionnelle) de manière à ce que la probabilité d'arrivée de deux photons de fluorescence simultanément au niveau du détecteur soit la plus faible possible.

C'est la méthode la plus précise dans la détermination des durées de vie de fluorescence. Concrètement, elle consiste à mesurer le temps entre l'impulsion laser qui émet le photon qui sera absorbé (*start*) et la détection du photon de fluorescence émis (*stop*). Elle nécessite une source pulsée à l'excitation. L'avantage de cette méthode est que le nombre d'événements comptés permet d'avoir une très bonne statistique et donc de déterminer très correctement les durées de vie. Son inconvénient majeur est le temps nécessaire à cette acquisition, parfois peu compatible avec des expériences sur des systèmes vivants.

– Frequency domain phase modulation (FDPM)

C'est une méthode indirecte comparativement à la précédente. Elle peut être réalisée avec une illumination continue ou pulsée. Un modulateur électro-optique est utilisé à une fréquence qui dépend de la durée de vie à mesurer. Il est néanmoins nécessaire d'utiliser un fluorophore de référence. Une fraction de la source d'excitation modulée est envoyée sur un échantillon de référence, le reste traverse l'échantillon et est détecté sur un autre photomultiplicateur. La comparaison des deux signaux permet ainsi de mesurer le déphasage (ϕ) et le rapport de modulation (M), ces données conduisant au calcul de la durée de vie du fluorophore.

II.6.2.c.5 – Calcul de l'efficacité du FRET en intensité du donneur et accepteur

Il est important de noter dès à présent que la mesure de l'efficacité de transfert est rarement possible en microscopie où l'essentiel des méthodes se fait en mesure d'intensité et part donc du principe que la concentration du donneur et celle de l'accepteur sont des constantes durant le temps de l'acquisition de l'image.

Le FRET est défini par rapport à la perte d'émission du donneur due à la « proximité » de l'accepteur. De nombreuses fuites spectrales sont à prendre en compte. L'efficacité de la diminution de l'émission théorique du donneur DiO (mesuré à l'aide du filtre « Donneur ») en présence de l'accepteur DiI est souvent mesurée comme :

$$E = (F_{\text{DiO}} - F_{\text{DiO-DiI}})/F_{\text{DiO}}$$

$F_{\text{DiO-DiI}}$: Fluorescence du donneur DiO en présence d'accepteur DiI.

F_{DiO} : Fluorescence du donneur DiO en absence d'accepteur DiI.

Dans cette étude, nous avons utilisé l'accepteur DiI comme révélateur de la présence de FRET aussi bien pour l'internalisation des DiO-DiI-LDL que pour leur dégradation en fonction du temps. Cette approche permet de suivre en parallèle en microscopie à corrélation de fluorescence le nombre de molécules DiI qui interagissent avec les molécules DiO sans parasiter l'analyse par le signal FRET DiO-DiI.

$$E = (F_{\text{DiO-DiI}} - F_{\text{DiI FRET}})/F_{\text{DiO}}$$

$F_{\text{DiO-DiI}}$: Fluorescence du donneur DiO en présence d'accepteur DiI (excitation du donneur à $\lambda = 488 \text{ nm}$).

$F_{\text{DiI FRET}}$: Signal de FRET de l'accepteur DiI en présence du donneur DiO (excitation du donneur $\lambda = 488 \text{ nm}$).

$$E = (F_{\text{DiI intégrée}} - F_{\text{DiI FRET}})/F_{\text{DiI intégrée}}$$

$F_{\text{DiI intégrée}}$: Fluorescence intégrée de l'accepteur DiI en présence du donneur DiO (excitation de l'accepteur $\lambda = 543 \text{ nm}$).

$F_{\text{DiI FRET}}$: Signal de FRET de l'accepteur DiI en présence du donneur DiO (excitation donneur $\lambda = 488 \text{ nm}$).

II.6.2.c.6 – Calcul de l'efficacité du FRET en durée de vie du donneur

La vitesse de désexcitation du donneur dépend donc de sa constante radiative intrinsèque, k_r , de sa constante non radiative en absence d'accepteur, k_{nr} , et de k_T . A partir du diagramme de Perrin-Jablonski simplifié sous-dessous (Figure-II.14), on peut écrire :

$$\tau_{\text{DA}} = (k_r + k_{nr} + k_T)^{-1}$$

et sans transfert d'énergie (en absence d'accepteur)

$\tau_D = (k_r + k_{nr})^{-1}$ où τ_{DA} et τ_D représentent les durées de vie du donneur en présence et en absence d'accepteur, respectivement.

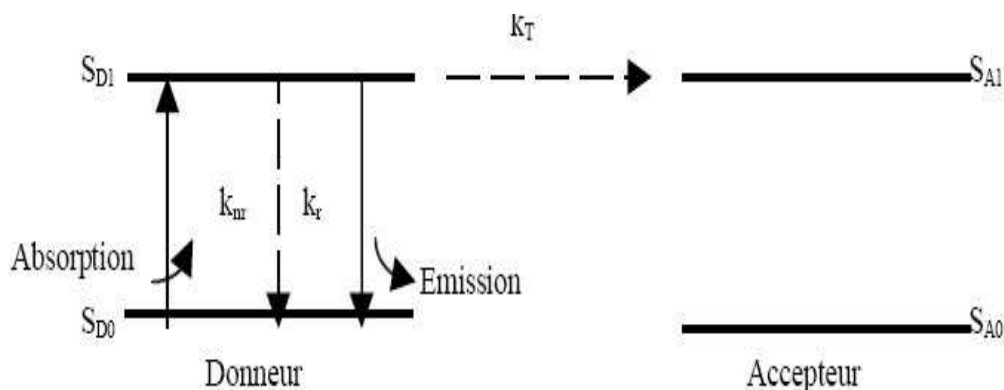


Figure-II.14 : Diagramme simplifié du phénomène de FRET et vitesses de désexcitation du donneur.

L'efficacité E du transfert d'énergie et la vitesse (k_T) de ce transfert avec :

$k_T = (R_0/R)^6 / \tau_{DiO}$ où τ_{DiO} est la durée de vie radiative de l'état excité de la molécule donneuse, en l'absence d'interactions.

II.6.2.d – Spectroscopie à Corrélation de Fluorescence (FCS - *Fluorescence Correlation Spectroscopy*)

De nombreuses techniques ont été mises au point pour l'examen de diffusion et d'interactions biologiques. Ces techniques se basent souvent sur la perturbation ciblée d'un système, suivie de l'observation du retour à un équilibre thermodynamique. Actuellement, la détermination des cinétiques d'interaction en temps réel repose sur deux méthodes majeures :

- **la technique de résonance plasmonique de surface** (BIAcore 3000 par exemple) est actuellement la méthode d'investigation majeure permettant la détermination des conditions cinétiques et des constantes caractéristiques des interactions moléculaires. Cependant, cette approche ne peut être transposée pour l'analyse sur cellules vivantes des mêmes paramètres cinétiques et en particulier dans un environnement biologique (matrice, co-culture,...).
- **la technique de FRAP** (Fluorescence Recovery After Photobleaching). Disponible au laboratoire sur le microscope confocal, et de mise en œuvre assez simple, la technique de FRAP a de nombreuses limitations (taille de la surface photoblanchie/réservoir de molécules fluorescentes...), réductrices en ce qui concerne l'analyse monomoléculaire en temps réel. Elle ne permet pas de suivre des variations temporelles de diffusion d'une espèce en suivant seulement un petit nombre de molécules.

Par ailleurs, ces méthodes nécessitent des quantités relativement importantes d'échantillons et des concentrations élevées ; pour cette raison, elles ne peuvent pas être envisagées pour les applications *in vivo* ou pour l'analyse de processus d'un point de vue moléculaire.

II.6.2.d.1 – Méthodologie liée à la Microscopie de Fluctuations

La technique de **Microscopie à corrélation de fluorescence** permet de déterminer les cinétiques d'interaction d'une molécule fluorescente mobile (récepteur, soluté, ligand,...) au niveau cellulaire (membrane) ou sub-cellulaire (cytoplasme, organites, noyau). Les coefficients de diffusion ainsi que les k_{on} et k_{off} d'une molécule fluorescente d'intérêt sont calculés selon le modèle approprié (diffusion/rétention par exemple pour un récepteur cellulaire de la membrane). La méthode FCS permet d'analyser des molécules à l'état d'équilibre. En effet, la FCS est une technique fine qui permet l'étude des mouvements moléculaires mais aussi de l'interaction entre molécules ; plus généralement on mesure des phénomènes dynamiques dans des systèmes à l'équilibre. Elle permet aussi de mesurer des concentrations locales ou bien la multimérisation de complexes moléculaires.

En FCS, ce sont les fluctuations du signal et non son intensité qui devient source d'information dans un volume d'observation de l'ordre du femto-litre au cours du temps. Au passage d'une molécule dans le champ d'observation, le détecteur reçoit une certaine quantité de photons qui se répète à chaque passage des molécules au cours du temps. La fluctuation de fluorescence est liée à la variation de la concentration dans le volume d'observation si aucun autre phénomène photophysique ne vient perturber le fluorophore (photodestruction, variation du rendement quantique...).

Pour des raisons statistiques, cette technique ne doit s'appliquer que pour de faibles concentrations moléculaires. La diffusion des molécules vers ou en dehors du volume de détection implique des changements d'intensité au cours du temps. Le principe repose sur une zone éclairée d'observation cellulaire très précise (sur la base de l'optique confocale) et les variations du nombre des molécules fluorescentes présentes dans cette zone dues à la diffusion ou à un phénomène parasite se traduisent en variation de l'intensité du signal émis. La constante de temps caractéristique des phénomènes responsables de ces variations peut être retrouvée grâce au calcul de la fonction d'autocorrélation. Cette méthode qui présente une bonne sensibilité (détection d'une seule molécule possible) intègre également des sources d'erreurs diverses (blanchiment des molécules pendant l'expérience, phénomène de scintillement des chromophores chimériques, interactions non spécifiques avec l'environnement cellulaire et présence d'un obstacle à la diffusion).

Ce sont ces changements d'intensité au cours du temps qu'il faut mettre en évidence, ce qui est réalisé par la fonction d'autocorrélation $G(\tau)$ d'intensité entre le signal à l'instant t et le signal moyen $\langle F \rangle$ que l'on note $\delta F(t)$ qui est multiplié par l'écart d'intensité entre le signal à l'instant $t + \tau$ et le signal moyen $\langle F \rangle$ que l'on note $\delta F(t + \tau)$ normalisé par le carré du signal moyen

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F \rangle^2}$$

Cette fonction d'autocorrélation est tracée en fonction du temps t sur une échelle logarithmique. Comme dans le cas du FRAP, l'expression analytique de la courbe d'autocorrélation va dépendre du type d'illumination utilisée et des mouvements moléculaires supposés des molécules de LDL marquées. Par exemple, pour un volume de détection confocal et une diffusion en 3D, le modèle suivant a été proposé :

$$G(\tau) - 1 = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{4D\tau}{\omega_0^2} \right)^{-1} \left(1 + \frac{4D\tau}{z_0^2} \right)^{-1/2}$$

À partir de cette équation, deux informations sont disponibles.

D'une part, l'amplitude à $s = 0$ est égale à l'inverse du nombre de molécules présentes dans le volume d'observation ($1/N$). Cela fournit une information sur la concentration de l'échantillon. D'autre part, le point d'inflexion de la fonction de corrélation correspond approximativement au temps moyen durant lequel une molécule reste dans le volume d'observation et permet de déterminer son coefficient de diffusion. Le FCS n'est pas une technique d'imagerie en soi, mais une technique de mesure sous un microscope.

Ces fluctuations sont incessantes mais la fluctuation temporelle autour de la valeur moyenne renseigne sur la dynamique du système étudié. Les formalismes de cette méthode ont été décrits dans les années 1970 pour mesurer la diffusion et la dynamique d'un agent intercalant de l'ADN (Magde D, Elson EL, Webb WW. Phys Rev Lett, 29, 705, 1972). Lorsque le nombre moyen de molécules détectables dans le volume d'observation devient inférieur à l'unité, la FCS réalise une mesure statistique d'ensemble réalisée à faible concentration moléculaire, ce qui s'apparente à un enregistrement du signal provenant de molécules individuelles. Ces molécules fluorescentes diffusent par mouvement brownien en solution c'est-à-dire entrent et sortent aléatoirement de la zone d'observation.

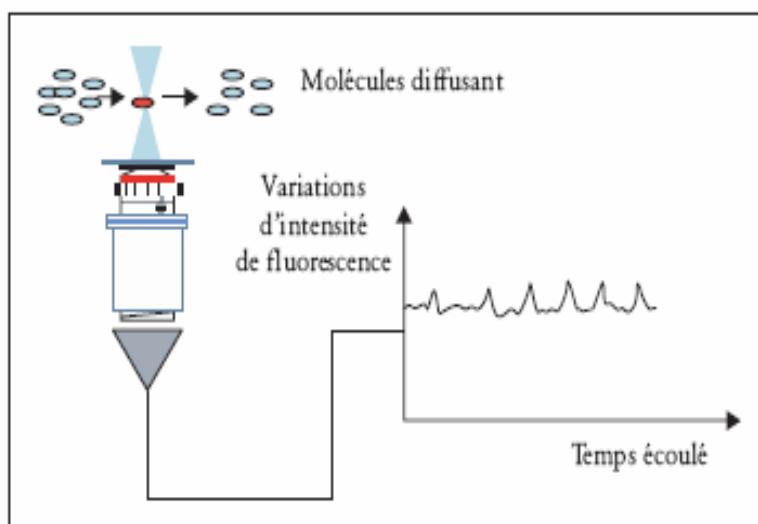


Figure II.15 : Fluctuations de signal mesurées lors du passage de molécules passant dans le volume d'observation, à l'aide d'un microscope spécifique durant une expérience de FCS.

Leur passage dans la lumière du laser génère des signaux d'émission de fluorescence qui sont comptabilisés en un signal global fluctuant (Figure-II.15 A-B). Les données brutes correspondent à l'enregistrement temporel d'un flux de photon émis par les molécules fluorescentes présentes dans le volume d'excitation.

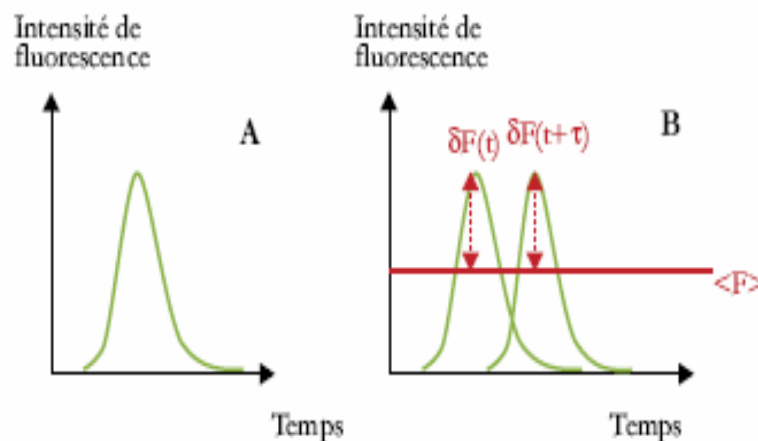


Figure-II.15 A-B : Variation d'intensité de fluorescence mesurée lors du passage d'une molécule dans le champ de détection (A). Quand deux molécules se suivent en traversant le champ d'observation, les variations successives sont utilisées pour construire la courbe de corrélation (B).

Pour relier les propriétés statistiques du signal fluctuant à la dynamique sous-jacente des molécules émettrices, les outils disponibles utilisent soit les fluctuations temporelles du signal (fonction d'autocorrélation, ACF), soit les fluctuations d'amplitude (distribution de

probabilité). D'autres approches ont été développées comme l'analyse des moments (moyenne des distributions pour le 1^{er} ordre, variance de la distribution pour le 2^e ordre).

Fonction d'autocorrélation

Dans ce travail, seule la fonction d'autocorrélation (Figure-II.15 C) a été exploitée pour suivre les fluctuations de la fluorescence $\delta F(t)$ autour de la valeur moyenne de fluorescence $\langle F \rangle$ pour obtenir les caractéristiques de diffusion des molécules. Si l'intensité du signal est stationnaire, la moyenne temporelle se confond avec la moyenne d'ensemble.

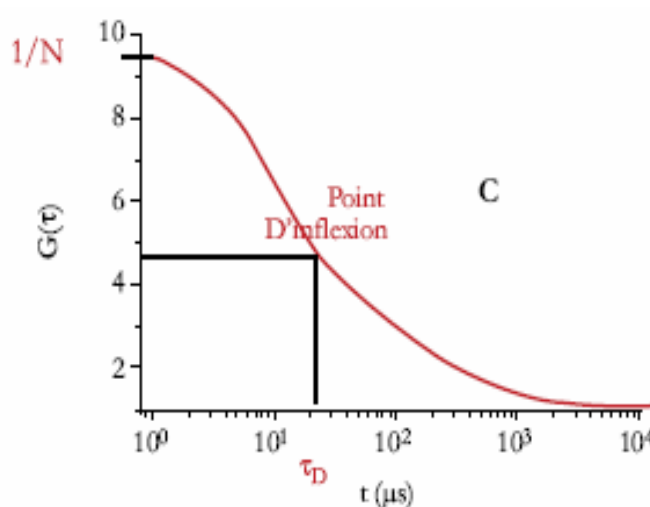


Figure-II.15 C : Tracé de la fonction d'autocorrélation, la détermination du temps de diffusion et du nombre de molécules présentes dans le volume d'observation (C).

Dans ce cas, la fonction d'autocorrélation $G(\tau)$ ne dépend que du laps de temps τ qui sépare deux détections :

La FCS permet de mesurer des fluctuations de fluorescence dans un volume d'observation de l'ordre du femto-litre au cours du temps à l'aide du microscope. Le principe repose sur une zone éclairée d'observation cellulaire très précise (sur la base de l'optique confocale) et les variations du nombre des molécules fluorescentes présentes dans cette zone dues à la diffusion ou à un phénomène parasite se traduisent en variation de l'intensité du signal émis. La constante de temps caractéristique des phénomènes responsables de ces variations peut être retrouvée grâce au calcul de la fonction d'autocorrélation. Cette méthode, qui présente une bonne sensibilité (détection d'une seule molécule possible), intègre également des sources

d'erreurs diverses (blanchiment des molécules pendant l'expérience, phénomène de scintillement des chromophores chimères, interactions non spécifiques avec l'environnement cellulaire et présence d'un obstacle à la diffusion).

Le système FCS utilisé est basé sur la technologie confocale éprouvée. Il représente une extension fonctionnelle du microscope confocal TCS-SP2-AOBS de Leica (*Figure-II.16*). L'excitation de la fluorescence pour la mesure FCS s'effectue au moyen de lasers couplés dans la tête de balayage. La lumière d'excitation est transmise par la tête de balayage sur l'échantillon. La lumière d'émission est collectée par l'objectif (40/1.2 NA et 60/1.4 NA immersion eau), traverse la tête de balayage et atteint le port d'extension X1 sur lequel se trouve l'adaptateur FCS. La détection du signal de fluorescence s'effectue hors de la tête de balayage. Le répartiteur optique répartit la lumière d'émission sur 2 canaux de détection. Cette lumière est transmise aux photodétecteurs respectifs par l'intermédiaire de fibres optiques multimode. Les fibres optiques permettent le désaccouplement mécanique de la tête de balayage et des détecteurs. En tant que détecteurs, l'on utilise deux photodiodes à avalanche ultrasensibles (APD) qui sont commutées en mode de comptage de photons individuels.

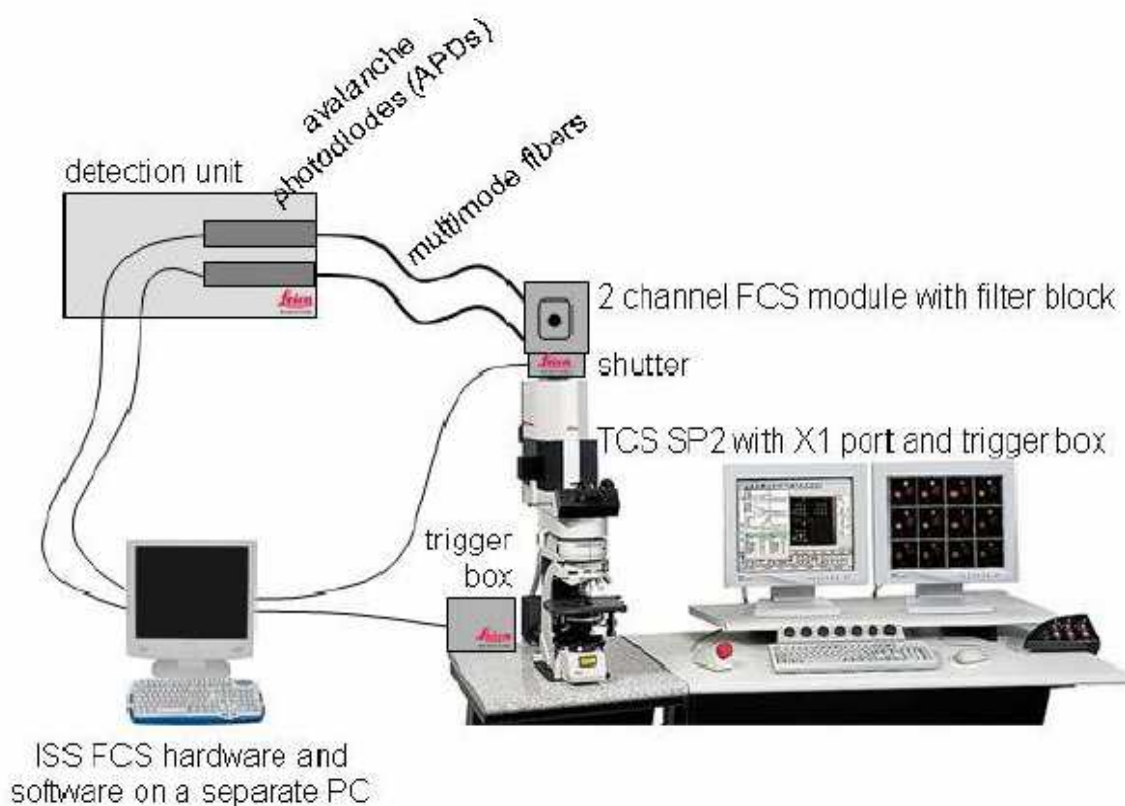


Figure-II.16 : Schéma du système FCS-2 SP2-AOBS Leica Microsystems (utilisé dans notre équipe).

Comme la FCS est une méthode de mesure basée sur la fluorescence, si les molécules examinées ne présentent pas de fluorescence intrinsèque, elles doivent être marquées comme dans notre cas les LDL couplées au DiO/DiI. Lorsque ces molécules traversent un rayon laser fortement focalisé, elles sont excitées et conduisent à une émission de fluorescence et les photons émis sont enregistrés au moyen de détecteurs ultra sensibles. Afin de limiter de manière définie l'expansion du volume d'analyse le long de l'axe optique, la lumière d'émission (DiO et DiI) est projetée à travers un diaphragme dans le plan confocal du microscope SP2-Leica AOBS. De par le fait que les molécules à examiner sont fluorescentes, la méthode FCS présente l'avantage d'un haut niveau de sélectivité et d'efficacité. Sur ce modèle commercial, la stabilité des lasers, de détecteurs sensibles et le microscope à haute résolution permet de réaliser des expériences dans une fraction d'un femtolitre, avec des concentrations de l'ordre nanomolaire et avec des processus dynamiques de l'ordre de quelques microsecondes à secondes. Une sensibilité supérieure peut être atteinte en mode double canal ou multicanaux : des partenaires d'association potentiels sont marqués par des fluorophores émettant à des longueurs d'onde différentes et leurs photons de fluorescence sont détectés dans des canaux distincts.

C'est cette approche que nous avons utilisée pour quantifier les molécules de LDL marquées au DiO/DiI et préciser le ratio de molécules libres de chaque espèce en solution (LDL, DiO ou DiI). Un cube de filtres permet de discriminer les signaux de fluorescence:

APD1 : bande passante 500-530 nm (collection du DiO)

APD2 : bande passante 560-630 nm (collection du DiI)

Le trajet optique confocal de l'appareil TCS Leica pour FCS permet de réaliser non seulement des essais *in vitro*, mais aussi des mesures dans des cellules et tissus vivants avec une résolution spatiale élevée. Les molécules biologiques, pour la plupart, ne sont probablement pas entièrement mobiles *in vivo*, mais changent d'état, passant d'états libres à des états liés, définis par leur fonction biologique, parfois même immobiles. La combinaison de la méthode FCS et de la microscopie confocale à balayage laser (CLSM) permet de caractériser de telles interactions dans l'espace : après l'acquisition d'une image, les positions auxquelles la diffusion et l'association des molécules doivent être examinées selon la méthode FCS peuvent être sélectionnées dans l'échantillon. Des méthodes de mesure du type FRAP (Fluorescence Recovery/Redistribution After Photobleaching) basées sur le photoblanchiment viennent compléter cette approche.

Fluorescence cross correlation spectroscopy (FCCS)

Comme décrit plus haut, la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) est une méthode qui permet de mesurer des coefficients de diffusion. Ces derniers sont liés au rayon hydrodynamique de la molécule, donc à son volume et à sa masse. Théoriquement, la FCS devrait permettre de mesurer des variations de masse, donc des interactions entre les molécules d'intérêt. Malheureusement, en première approximation, le coefficient de diffusion D varie avec $M^{-1/3}$; il faut donc augmenter la masse d'un facteur 8 pour diminuer D d'un facteur 2. Cela explique que le FCS peut être utilisé pour l'étude d'interaction moléculaire seulement dans le cas où la molécule portant le fluorophore est de bien plus petite taille que sa cible.

Pour pallier ce problème, la technique de spectroscopie de corrélation croisée de fluorescence a été développée. Le FCCS nécessite le marquage des deux molécules d'intérêt (A et B) par deux chromophores distincts. La courbe d'autocorrélation de chacune des molécules $G_A(s)$ et $G_B(s)$ est alors enregistrée dans deux canaux différents et les informations de ces deux canaux sont corrélées entre elles afin d'obtenir une courbe de corrélation croisée, $G_{AB}(s)$. L'amplitude de cette courbe de corrélation croisée à $s = 0$ ($G_{0,AB}$) contient les informations sur l'interaction entre les deux partenaires A et B. Dans le cas idéal, si la fixation se fait avec une stoechiométrie 1:1 ; si les deux fluorophores sont spectralement différenciables et si leur brillance ne change pas lors de l'interaction, le taux de liaison est alors donné par la relation suivante :

$$\theta = c_x / c_{\text{total},B} = G_{0,x} / G_{0,A}$$

de même $\theta = c_x / c_{\text{total},A} = G_{0,x} / G_{0,B}$

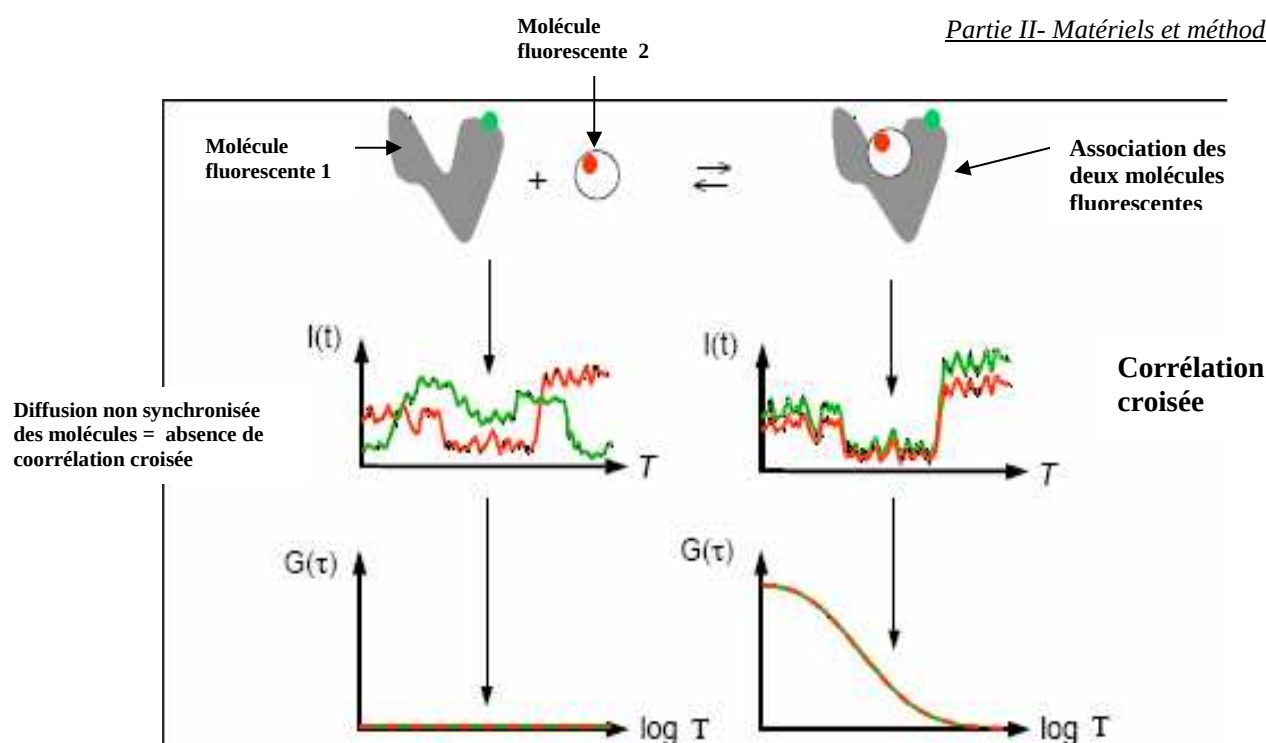


Figure-II.17 : Exemple de corrélation croisée ligand-récepteur et suivi de la corrélation croisée sur deux canaux.

Les signaux corréleront de façon croisée selon un principe analogue à celui de l'autocorrélation: pour le calcul de la fonction de corrélation croisée, la différence entre l'intensité et la valeur moyenne dans le premier canal est multipliée par la différence d'intensité temporisée dans le deuxième canal ; elle n'est donc pas multipliée, comme pour le calcul de la fonction d'autocorrélation, avec un duplicat du premier canal. Ce produit est alors moyenné et normalisé. Si aucune association n'a lieu entre les différentes molécules, ces dernières diffusent indépendamment les unes des autres. Ainsi, les signaux ne sont pas synchronisés et la corrélation croisée n'est pas donnée (partie gauche de la Figure-II.17). En cas d'interaction, la diffusion synchronisée entraîne des variations d'intensité synchronisées. Ce faisant, l'amplitude de la fonction de corrélation croisée augmente parallèlement à la hausse du degré de liaison (partie droite de la Figure-II.17).

Comme en FCS, la photodestruction doit absolument être évitée durant l'expérience car elle réduit très nettement l'amplitude de la courbe de corrélation croisée ($G_{0,x}$). Le recouvrement des spectres d'émission des deux chromophores doit aussi être évité afin de ne pas donner naissance à des faux positifs dans le canal d'autocorrélation.

II.6.2.d.2 – Analyse des données

Durant l'acquisition des données, le diagramme de comptage indique le nombre de photons arrivant pour chaque intervalle d'échantillonnage. Le diagramme de corrélation indique les fonctions de corrélation sélectionnées qui sont calculées en ligne.

Dans le logiciel ISS VISTA, l'adaptation des données se base sur l'algorithme non linéaire Marquardt-Levenberg des plus petites erreurs quadratiques. La fonction Point Spread influence fortement le calcul de la fonction de corrélation théorique. Dans ce contexte, la taille du foyer détermine la durée moyenne de séjour et le nombre de molécules diffusantes dans le foyer. La taille du foyer est différente pour l'excitation monophoton et l'excitation biphoton.

Les paramètres sont les suivants : la durée de vie triplet τ_T (en μs), l'amplitude triplet A , la durée de corrélation de diffusion τ_D (en μs), le nombre de molécules N et le rapport entre le rayon axial et le rayon latéral s . Le décompte moyen CPS et le paramètre de qualité d'adaptation χ^2 (Chi-sqr) sont le résultat de l'expérience et/ou du processus d'adaptation et ne peuvent donc pas être modifiés. Le diagramme « Residuals » indique la différence entre la fonction de corrélation adaptée et la fonction de corrélation mesurée. La courbe "Residual" est utilisée pour évaluer la qualité de l'adaptation.

II.6.2.d.3 – Autres méthodes d'analyse de fluctuation

Il existe encore d'autres méthodes pour analyser les fluctuations d'intensité des molécules diffusantes. Une des ces méthodes est l'histogramme de comptage de photons (PCH – Photon Counting Histogram, également connu sous le nom de FIDA -Fluorescence Intensity Distribution Analysis) : selon cette méthode, c'est l'amplitude des fluctuations d'intensité (et non pas l'évolution temporelle) qui est analysée. Pour cela, un histogramme est calculé à partir du nombre de photons comptés pendant des intervalles de temps définis. Une analyse poussée de cette répartition permet de caractériser la "luminosité moléculaire" de particules. Ceci permet par exemple de faire la distinction entre des monomères et des dimères de molécules à marquage fluorescent en examinant leur luminosité et de caractériser le processus d'association à la base.

Calibration avec une solution d'anticorps

Le nombre de molécule a été calculé pour trois concentrations d'anticorps Alexa Fluor 488 F(ab')₂ Fragments de chèvre anti-souris IgG (H+L) avec une solution mère à 2 mg/mL soit approximativement 19500 nM (Figure-II.18).

5.4 nM $\rightarrow N = 6.7 \pm 0.1$

21.6 nM $\rightarrow N = 12.8 \pm 0.2$

97.5 nM $\rightarrow N = 50 \pm 1$

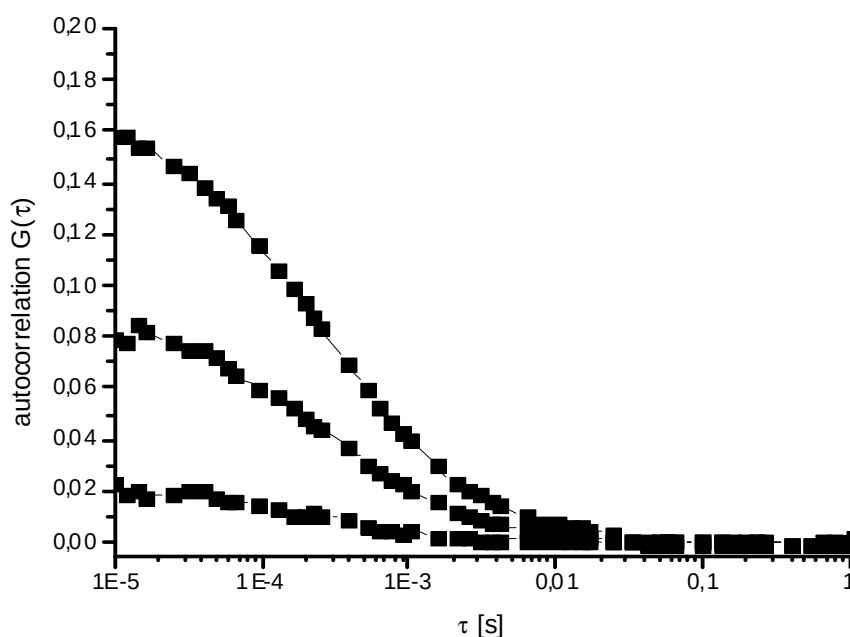


Figure-II.18 : Courbe de calibration de la solution mère à 2 mg/mL d'anticorps avec trois concentrations d'Alexa Fluor 488 F(ab')₂ de chèvre anti-souris IgG (H+L).

Taille du volume effectif d'observation

Concernant le photoblanchiment des fluorophores, le volume effectif d'excitation 1P est significativement plus large que celui en 2P. Les molécules fluorescentes ainsi exposées sont susceptibles d'être photodétruites avant d'entrer dans le volume effectif de collection du signal. En solution, il est simplement nécessaire de travailler avec un volume d'analyse suffisamment petit en regard du volume de solution pour considérer ce dernier comme un réservoir inépuisable de marqueurs moléculaires. La taille du spot d'observation dépend principalement de la longueur d'onde d'excitation λ (488 nm et 543 nm), de l'ouverture numérique de l'objectif (ON :1.62).

Pour déterminer le volume d'analyse dans les conditions de mesure données, une gamme de concentration d'un anticorps (IgG anti-souris chez la chèvre) couplé à un fluorophore (Alexa 488TM) a été utilisée dans une solution de milieu de culture (Tableau-II.2)

.

Tableau-II.2: Calibration Alexa Fluor 488 F(ab')₂ Fragments of goat anti-mouse IgG (H+L) 2 mg/mL. (2 mg/L solution ~19500 nM)

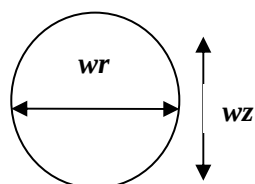
Concentration [nM]	Sample 1		Sample 2		Sample 3	
	G(0)/2	t* ms	G(0) /2	t*	G(0) /2	t*
5,41	0,07404	0,345	0,07331	0,345	0,0763	0,353
10,83	0,06002	0,354	0,05652	0,340	0,05652	0,352
21,66	0,03867	0,357	0,03984	0,356	0,03867	0,352
65	0,01572	0,341	0,01495	0,382	0,0157	0,351
78	0,01236	0,378	0,01274	0,357	0,01236	0,376
97,5	0,01002	0,329	0,01033	0,315	0,00992	0,368

Determination de w_r et w_z

Comme

$$\tau_r = \frac{r^2}{4D}$$

$$\tau_z = \frac{z^2}{4D}$$



w_r : diamètre latéral du volume d'observation ; w_z : diamètre spatial du volume d'observation, r : rayon latéral de la section du volume d'abservation latéral; τ : temps de diffusion ; D :courbe de diffusion.

Résultat :

$$\frac{\tau_r}{\tau_z} = \frac{r^2}{z^2}$$

	63x
τ_r [ms]	0.595 ± 0.091
τ_z [ms]	0.146 ± 0.036
$\frac{\tau_r}{\tau_z} = \frac{r^2}{z^2}$	4.075

Et on peut obtenir r comme une fonction de z

$$r = z \sqrt{\frac{\tau_r}{\tau_z}}$$

Si le volume est une ellipsoïde de révolution :

$$V = \frac{4}{3} \pi z r^2 = \frac{4}{3} \pi z^3 \frac{\tau_r}{\tau_z}$$

Et on peut obtenir z à partir du Volume déterminé de la calibration

$$z = \sqrt[3]{V \frac{3}{4\pi \frac{\tau_r}{\tau_z}}}$$

	V [fL]	$\frac{\tau_r}{\tau_z}$	z [nm]	r [nm]
63x	1,9 ± 0,4	4.012	113.058	226

Volume :

Objectif 63x

Puissance $V_{\text{eff}} = (2,29 \pm 0,07)$ fL

$Z = \text{nombre d'émolécule}$

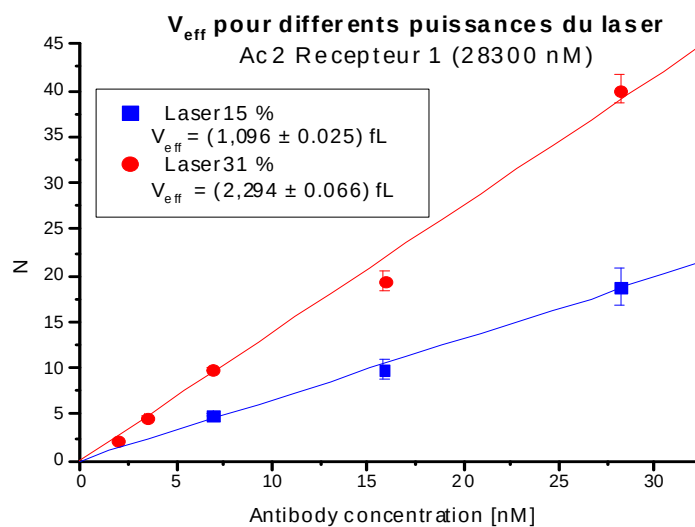


Figure-II.19 : Evolution du nombre de molécule (z) d'anticorps en fonction de la concentration en anticorps pour deux puissances de laser (15% et 31%).

PARTIE III

RESULTATS

Dans cette partie, nous présenterons d'une part, les résultats méthodologiques concernant la faisabilité, le marquage des LDL par les sondes fluorescentes (DiI ; DiO), et d'autre part, les résultats concernant le comportement des LDL vis-à-vis des cellules endothéliales : fixation, internalisation et dégradation des LDL dans les deux types de cellules (ECV304 ; HUVEC) utilisés dans notre étude.

III.1 – CONTROLE DES CARACTERISTIQUES SPECTROSCOPIQUES DE DiI ET DiO

Après la préparation de sondes fluorescentes (cf. II.2) et le marquage des LDL avec du DiI et du DiO (cf. II.3.3), nous avons contrôlé les caractéristiques spectroscopiques (spectres d'absorption et d'émission) des DiI et DiO seuls ou couplés aux LDL, et nous les avons comparé aux données de la littérature. Les résultats sont présentés sur la Figure-III.2 A-B-C. Les résultats obtenus dans nos expérimentations sont en conformité avec les données de la littérature (Figure-III.1).

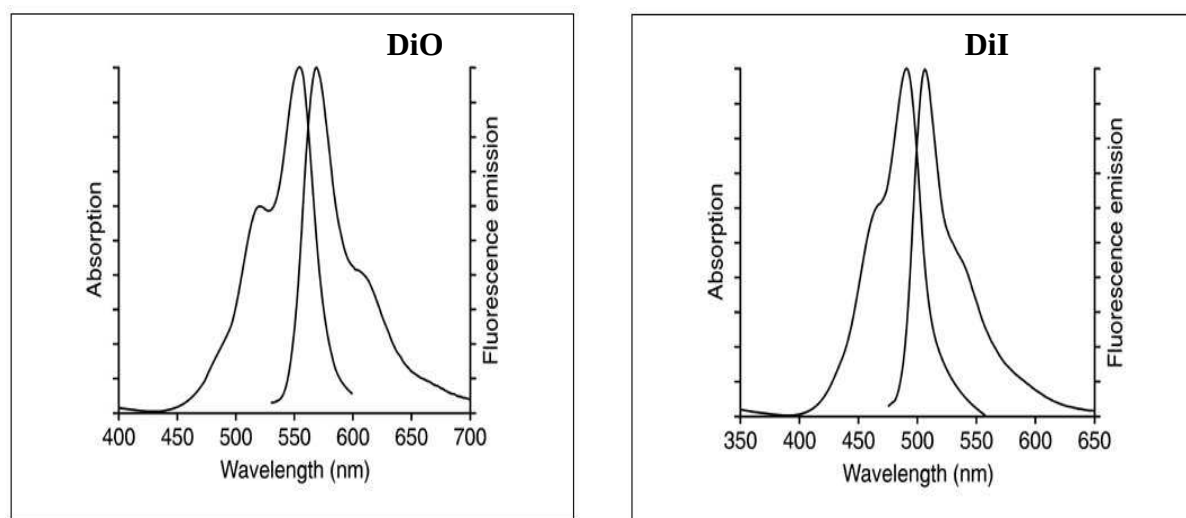


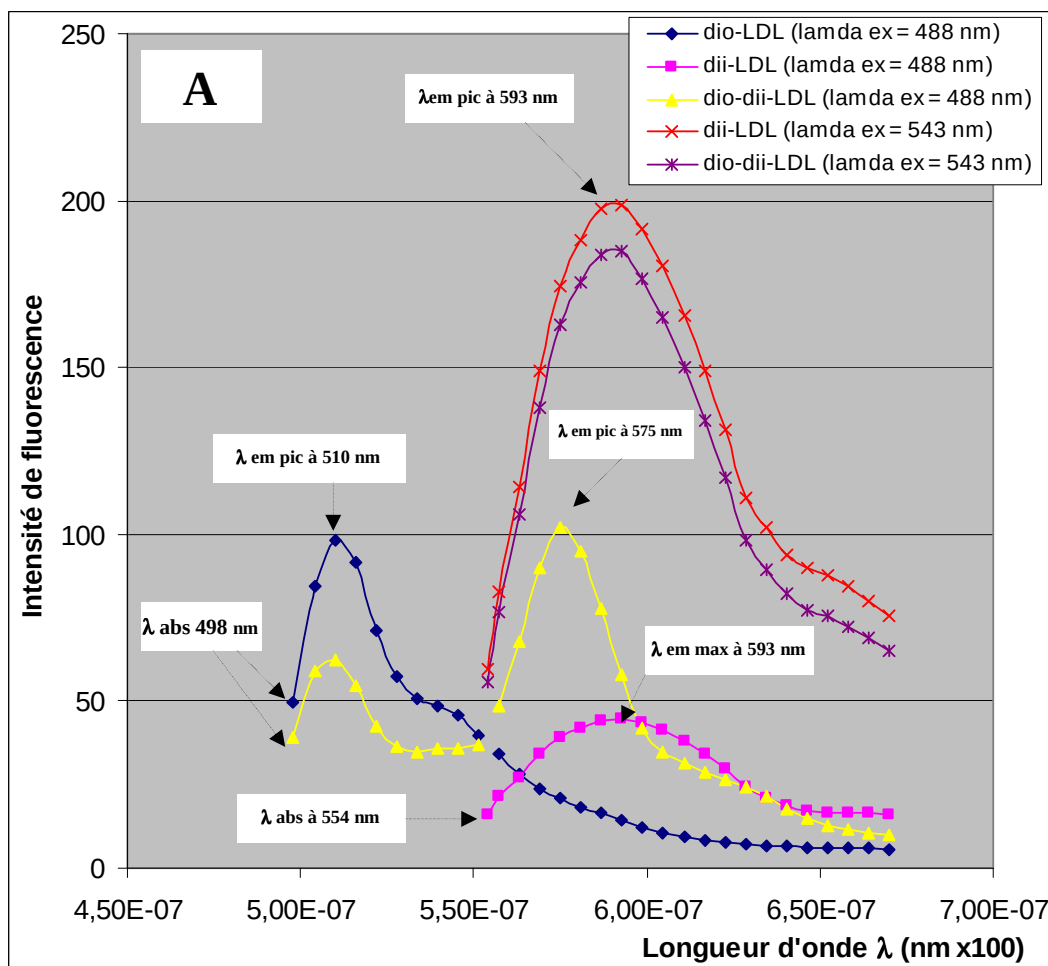
Figure-III.1 : Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence de DiO et DiI (données de la littérature : <http://www.invitrogen.com>)

Les spectres d'émission ont été réalisés aux deux longueurs d'ondes caractéristiques du DiO et DiI respectivement, soit 488 nm et 543 nm. Nous observons, pour le DiO excité aux deux longueurs d'ondes, un déplacement du spectre avec un pic à λ 510 nm pour $\lambda_{\text{exc}} = 488$ nm et un

pic à 593 nm pour $\lambda_{ex} = 543$ nm. En revanche, aucune différence n'est notée pour DiI excité aux deux λ_{ex} , en ce qui concerne le pic d'émission. Toutefois on note une baisse d'intensité de fluorescence (IF).

Lorsque ces mesures sont réalisées sur des LDL marquées avec les deux sondes, on remarque une différence dans le spectre d'émission selon que les LDL marquées sont excitées à la longueur d'onde $\lambda_{ex} = 488$ nm ou à 543 nm (Figure-III.2 A-B-C), aucune dérive du pic d'émission n'est notée si $\lambda_{ex} = 543$ nm, alors que la dérive ou le « shift » caractéristique au transfert d'énergie est bien visible si la suspension est excitée à $\lambda_{ex} = 488$ nm.

$\lambda_{ex} = 488$ nm sera donc utilisée dans la suite de nos expérimentations pour mettre en évidence les deux sondes. Cependant, il faut noter que compte tenu du logiciel utilisé pour le traitement des données, nous avons multiplié par 100 toutes les valeurs des longueurs d'ondes en abscisses afin de pouvoir obtenir les valeurs normales (par exemple, $4,50E-07 \times 100$ nm correspond à $\lambda = 450$ nm).



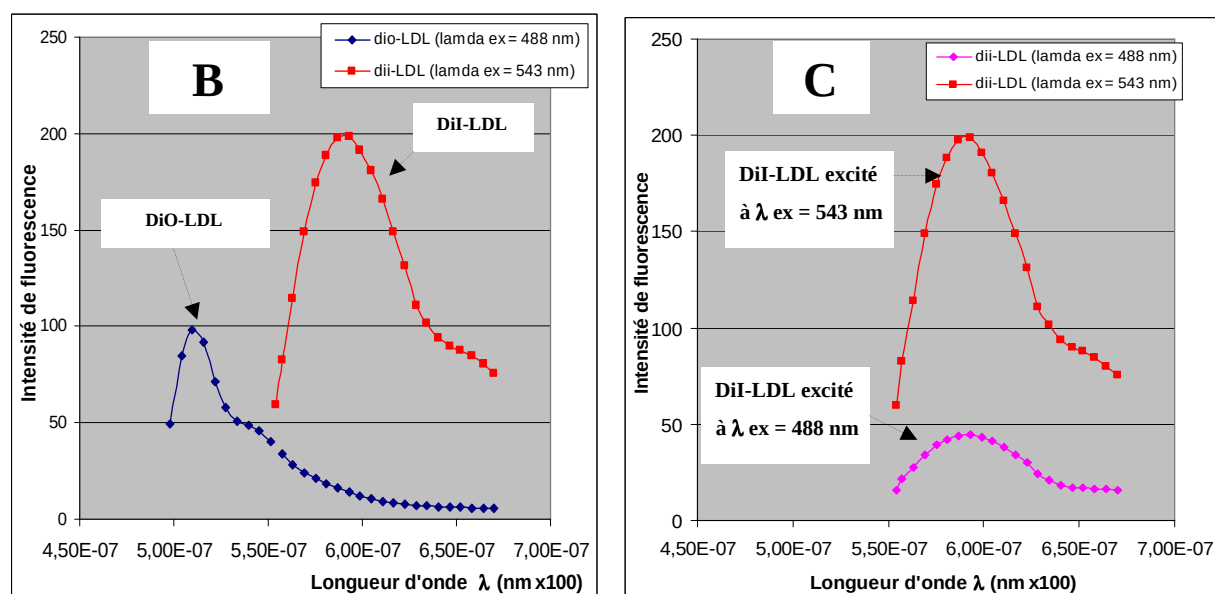


Figure-III.2 A-B-C : Spectres obtenus dans nos expérimentations. Les DiO et DiI ont été couplés avec les LDL par incubation à 37°C pendant 24h, ensuite les longueurs d'ondes excitation, d'absorbance et d'émission ont été contrôlées et présentées dans cette figure.

III.2 – DUREE DE VIE DES MOLECULES (PAR LA TECHNIQUE DE FLIM)

Comme nous l'avons rappelé dans la partie du Partie II.6.2 – c.4 de ce manuscrit, la mesure de durée de vie sous microscope présente certains avantages : il s'agit d'un paramètre indépendant de la concentration du fluorochrome, tout en étant très sensible à l'environnement moléculaire de ce dernier. En raison de ces données, pour éviter des artefacts dus à des différences de concentrations, l'efficacité du transfert d'énergie que nous noterons FRET a été mesurée par la durée de vie du donneur DiO, confirmée par des mesures FCS (cross-corrélation) et une analyse spectrale par la mesure de l'augmentation de l'intensité de l'accepteur DiI.

Dans ce modèle, le FRET est caractérisé en collectant l'émission du donneur DiO obtenue dans le voisinage immédiat ainsi que de l'accepteur DiI, et la perte du signal caractéristique du transfert d'énergie. L'analyse du spectre d'émission du donneur et de l'accepteur à la longueur d'onde d'excitation du donneur ($\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$) montre le transfert d'énergie qui se traduit par une diminution de la durée de vie de fluorescence du donneur (DiO) lorsque le signal propre est collecté (filtre spectral $\lambda = 500\text{-}520 \text{ nm}$ en FLIM).

La durée de vie moyenne du DiO couplé aux LDL mesurée expérimentalement dans les HUVECs suite à une excitation en mode multiphoton des molécules ($\lambda_{ex} = 800 \text{ nm}$) est de l'ordre de $2100 \text{ ps} \pm 800$ par ajustement d'ordre 1 (Figure-III.3 A-B-C-D). Tandis que la durée de vie moyenne du DiO couplé aux DiI-LDL mesurée expérimentalement dans les

HUVECs suite à une excitation en mode multiphoton ($\lambda_{ex} = 800 \text{ nm}$) des molécules est de l'ordre de $320 \text{ ps} \pm 400$ par ajustement d'ordre 1 (Figure-III.4 A-B-C-D).

Cette diminution de la durée de vie du donneur DiO (de 2100 ps à 320 ps) en présence de DiI reflète un transfert d'énergie dépendante de la proximité moléculaire des deux partenaires sur la molécule de LDL. Ce transfert est également caractérisé par la diminution du spectre d'émission caractéristique du DiO et l'augmentation du spectre d'émission caractéristique du DiI.

Ces étapes nous ont permis de valider le processus FRET au préalable à la cinétique de fixation et d'internalisation des LDL doublement marquées dans les HUVECs soumises ou non aux contraintes de cisaillement.

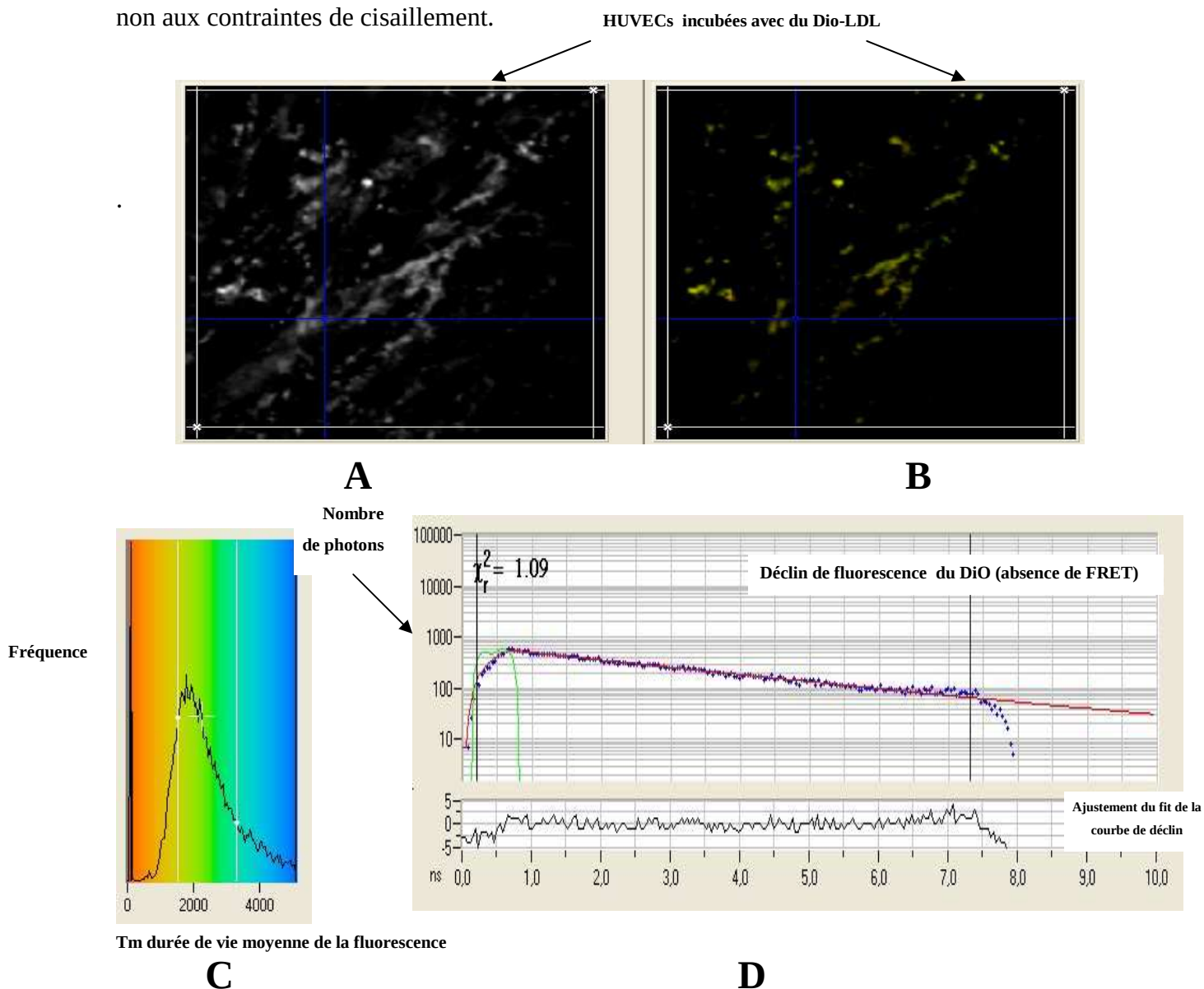


Figure-III.3 A-B-C-D: Imagerie FLIM - DiO-LDL dans les HUVECs. La durée de vie moyenne du DiO couplé aux LDL mesurée expérimentalement dans les HUVEC suite à une excitation en mode multiphoton ($\lambda_{excitation} = 800 \text{ nm}$; $\lambda_{émission} = 500-520 \text{ nm}$) est de l'ordre de $2100 \text{ ps} \pm 800$ par regression d'ordre 1. **A** : intensité de fluorescence de DiO-LDL dans les HUVEC, **B** : durée de vie de la fluorescence de DiO ; **C** : distribution des valeurs de durée de vie moyenne du donneur (DiO) = 2 ; **D** : Déclin.

HUVEC incubée avec du Dio-LDL

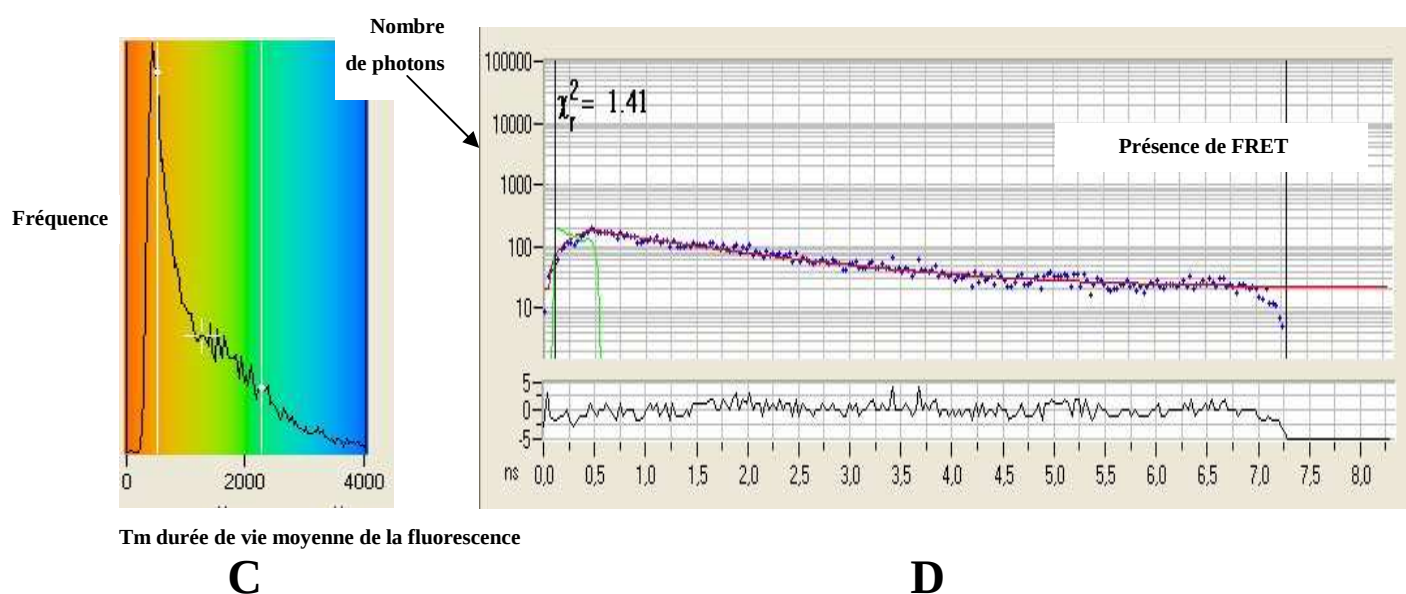
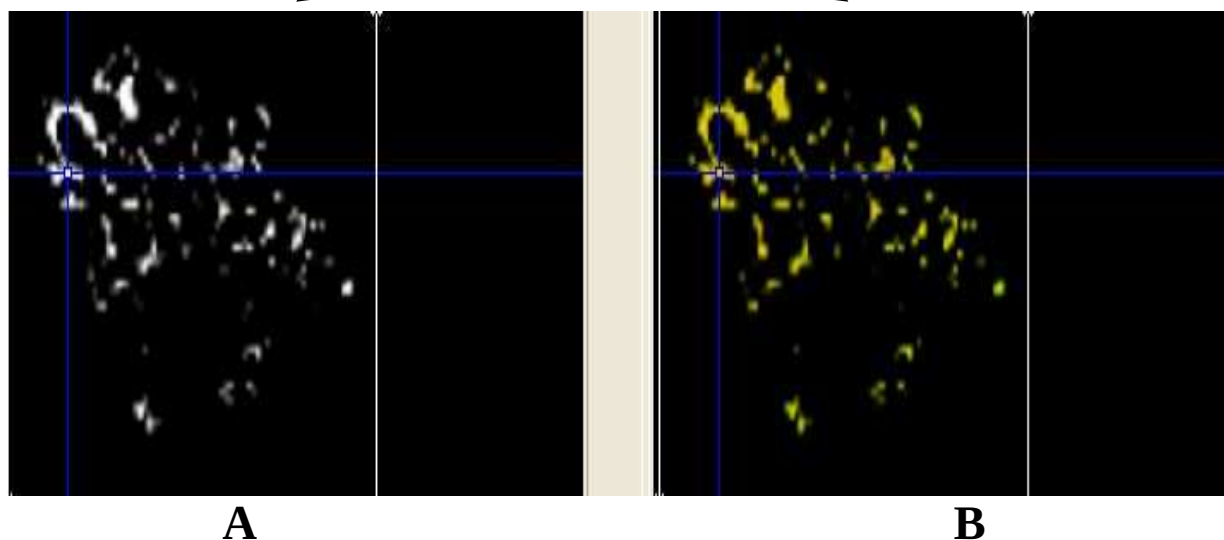


Figure-III.4 A-B-C-D : Imagerie FLIM – FRET du DiO-DiI-LDL dans les HUVECs. Distribution des valeurs de durées de vie moyenne pour le DiO (λ excitation = 800 nm ; collection λ 500-520 nm) et déclin de fluorescence du DiO seul. La durée de vie moyenne du DiO couplé aux DiI-LDL mesurée expérimentalement dans les HUVEC suite à une excitation en mode multiphoton (λ excitation = 800 nm ; λ émission 500-520 nm) est de l'ordre de 320 ps $\pm$ 400 par regression d'ordre 1

Quelques mesures effectuées sur les spectres expérimentaux

Dans notre étude, après contrôle des caractéristiques spectroscopiques de DiO, DiI couplés aux LDL, nous avons effectué à partir des spectres expérimentaux obtenus, des combinaisons possibles des spectres de ces molécules couplés aux LDL. Ceci nous a permis de réaliser des mesures concernant les ratios et les pourcentages de signal de fluorescence émise des molécules (DiO-LDL, DiI-LDL, DiO-DiI-LDL) suite aux excitations à des longueurs d'ondes

λ ex 488 nm et 543 nm utilisées dans nos expérimentations. Les résultats obtenus sont présentés dans les figures suivantes.

a) – Dans la **Figure-III. 5 A**, nous constatons que la quantité de DiI intégrée correspond à l'ensemble des molécules de DiI excitées à λ ex 543 nm, couplées ou non aux DiO-LDL (DiO-DiI-LDL). Calcul des ratios DiI FRET et DiI intégré dans une solution de DiO-DiI-LDL excitées à $\lambda_{ex} = 543$ nm. Pour ce calcul, nous avons tenu compte uniquement des valeurs fluorescence comprises dans les aires d'émission suites à l'excitation à 543 nm. Le rapport de DiI intégré et de DiI FRET pour déterminer le pourcentage de molécules qui participent au FRET est calculé comme suit : $2192,604 \times 100/2646,792 = 82,84\%$, où : 2192,604 correspond à la somme de l'intensité de fluorescence de DiI sous excitation λ 488 nm, et 2646,792 est la somme l'intensité de fluorescence de DiI sous excitation λ 543 nm. Ce qui signifie que 82,84% des molécules portées par les LDL sont sujet au processus de FRET avec le DiO.

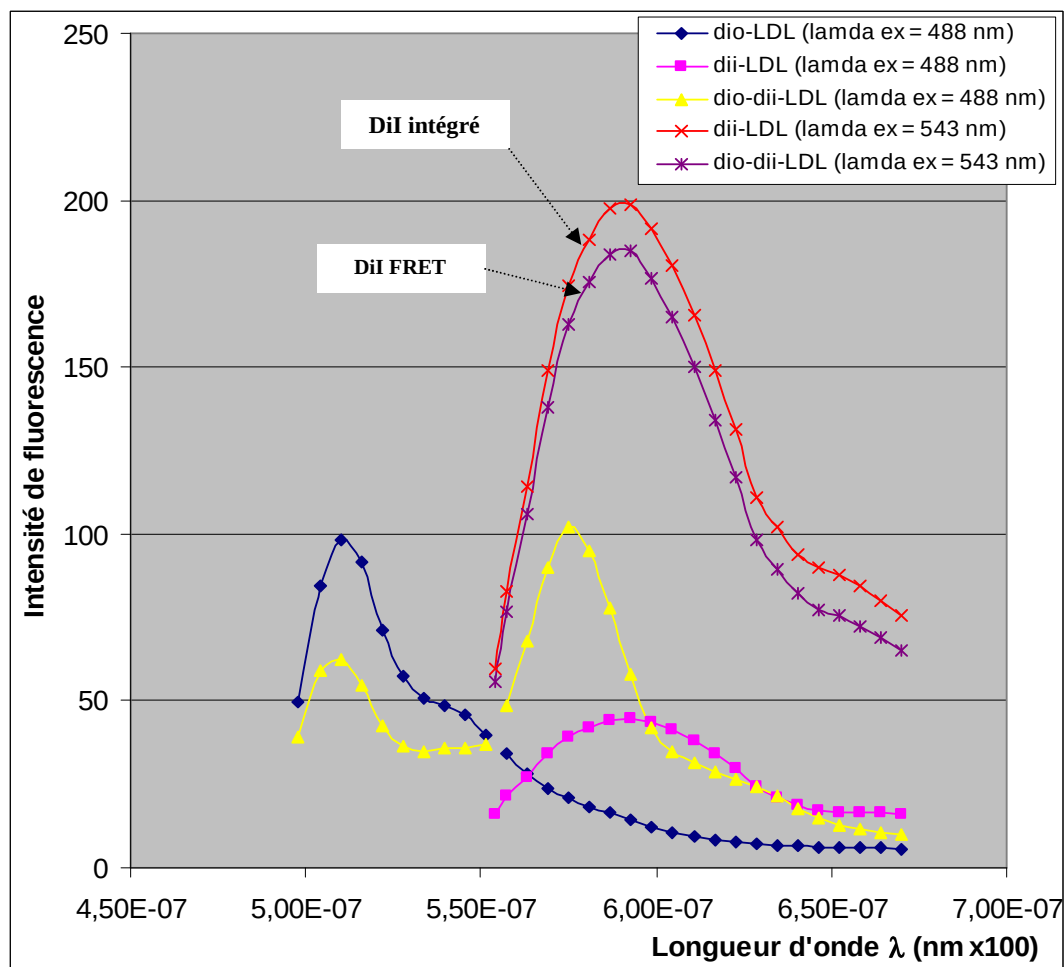


Figure-III.5 A: Spectres expérimentaux de DiO et DiI couplées ou non aux molécules de LDL, et utilisés pour calcul des ratios DiI FRET et DiI intégré dans une solution de DiO-DiI-LDL excitée à $\lambda_{ex} = 543$ nm. 82,84% des molécules portées par les LDL sont sujet au processus de FRET avec le DiO.

b) – Sur la **Figure-III.5 B**, le déplacement du spectre avec l'apparition d'un signal caractéristique du DiI montre l'existence du FRET entre les molécules de DiO et DiI portées par la même molécule de LDL suite à une illumination à 488 nm. Le ratio entre l'apparition du signal du DiI (de 44,63 à 102,13) et la disparition du signal de DiO (de 98,15 à 62,25) démontre bien le transfert d'énergie, en relation avec la diminution de la valeur de la durée de vie (de 2,1 ns à 320 ps).

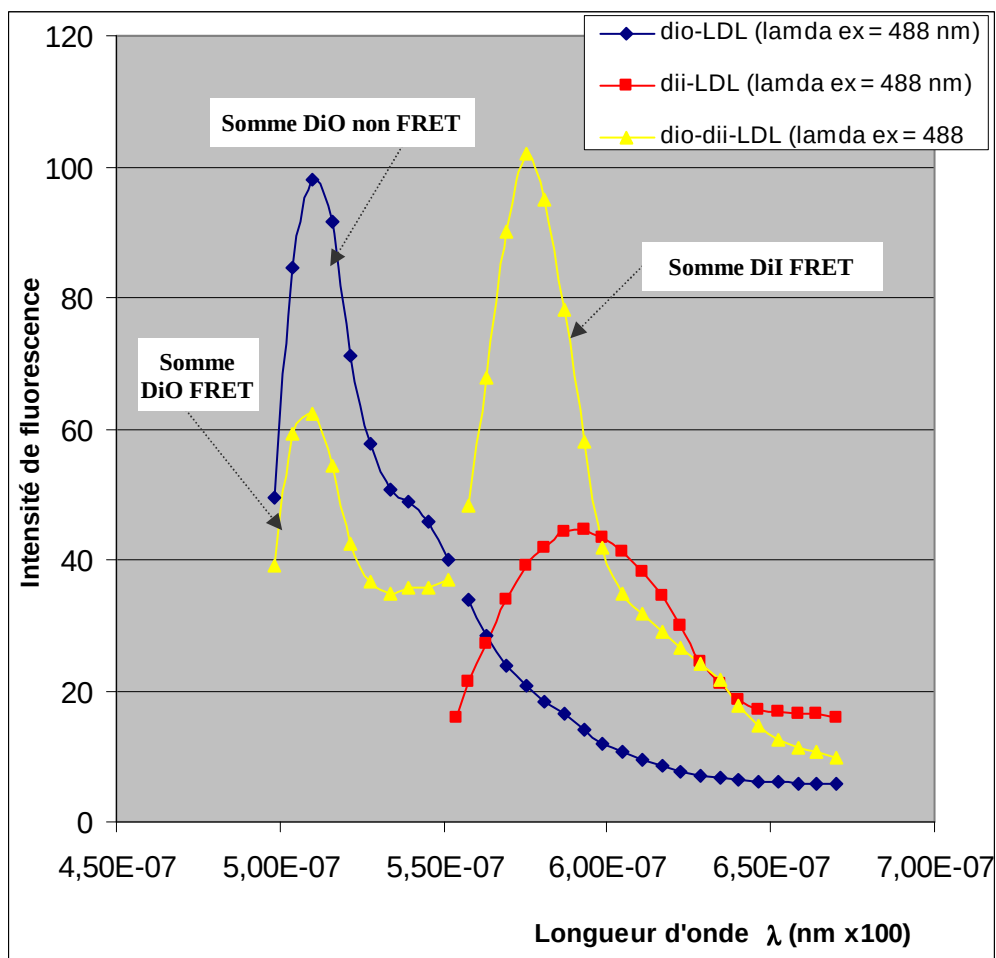


Figure-III.5 B : Spectres expérimentaux de DiO et DiI couplées ou non aux molécules de LDL. Somme des intensité significatives DiO-LDL et DiO-DiI-LDL pour mesurer le FRET.

Ces expériences préalables nous ont permis de valider la méthodologie FRET pour ce qui concerne le DiO-DiI-LDL aussi bien pour l'approche spectrale que pour l'approche FLIM.

III.3 – RENDEMENT DE MARQUAGE DES LDL PAR DiI ET DiO (PAR LA TECHNIQUE DE FCCS)

III.3.1 – Quelques rappels sur la technique

En microscopie de corrélation croisée de fluorescence (FCCS), la fluctuation temporelle de la diffusion de plusieurs molécules fluorescentes est mesurée dans un volume d'observation très restreint ($V_{\text{eff}}^{31} = 2,29 \pm 0,07 \text{ fL}$).

L'amplitude à l'origine $s = 0$ est égale à l'inverse du nombre de molécules présentes dans le volume d'observation ($1/N$). Cela fournit une information sur la concentration de l'échantillon pour chaque fluorochrome. Par ailleurs, le point d'inflexion de la fonction de corrélation correspond approximativement au temps moyen durant lequel une molécule reste dans le volume d'observation et permet de déterminer son coefficient de diffusion.

Le double marquage des LDL avec deux chromophores distincts comme molécules d'intérêt (DiO et DiI) a été mis à profit en FCCS. La courbe d'autocorrélation de chacune des molécules GA(s) et GB(s) est alors enregistrée dans deux canaux différents (Ch1 pour le DiO et Ch2 pour le DiI). Les informations de ces deux canaux sont corrélées entre elles afin d'obtenir une courbe de corrélation croisée, $G_x(s)$. L'amplitude de cette courbe de corrélation croisée à $s = 0$ ($G_{0,x}$) contient les informations sur l'interaction entre les deux partenaires DiO et DiI.

L'obtention de cette information nécessite cependant de nombreuses précautions. Comme en FCS, la photodestruction doit absolument être évitée durant l'expérience, car elle réduit très nettement l'amplitude de la courbe de corrélation croisée ($G_{0,x}$). Il est aussi nécessaire de s'assurer que les deux volumes visualisés dans chaque couleur sont parfaitement spatialement colocalisés et les appareils optiques sont parfaitement achromatiques. Le recouvrement des spectres d'émission du DiO et DiI est évité afin de ne pas donner naissance à des faux positifs dans le canal d'autocorrélation.

III.3.2 – Calcul de la fraction doublement marquée DiO/DiI

Le FCCS n'est pas une technique d'imagerie en soi, mais une technique de mesure sous microscope de la fluctuation de fluorescence. Celle-ci est reliée à la variation de la concentration dans le volume d'observation si aucun autre phénomène photophysique ne vient perturber le fluorophore (photodestruction, variation du rendement quantique...).

La proportion du nombre de molécules de LDL marquées conjointement par les deux fluorophores DiO et DiI est calculée en mesurant une fluorescence cross-corrélée dans les deux canaux collectant respectivement la fluorescence du DiO et la fluorescence du DiI.

a) – DiO-LDL

Pour la solution de DiO-LDL à une concentration de l'ordre de 100 nM, compatible avec la sensibilité du système FCS utilisé, il apparaît très clairement une fuite spectrale du signal du DiO excité à une longueur d'onde $\lambda_{ex} = 488$ nm normalement collecté dans le canal 1 et qui passe au niveau de la bande passante collectée dans le canal 2. Avant correction, le signal connaît une corrélation croisée entre le signal du DiO et la fuite associée. Ce problème a été résolu par l'adjonction de filtres d'arrêts spécifiques qui garantissent une collection du signal FRET dans le canal 2 exempt de toute contamination spectrale. La Figure-III.6 présente la corrélation de fluorescence d'une suspension de DiO-LDL pour une excitation $\lambda_{ex} = 488$ nm (Analyse en 3D Gaussien).

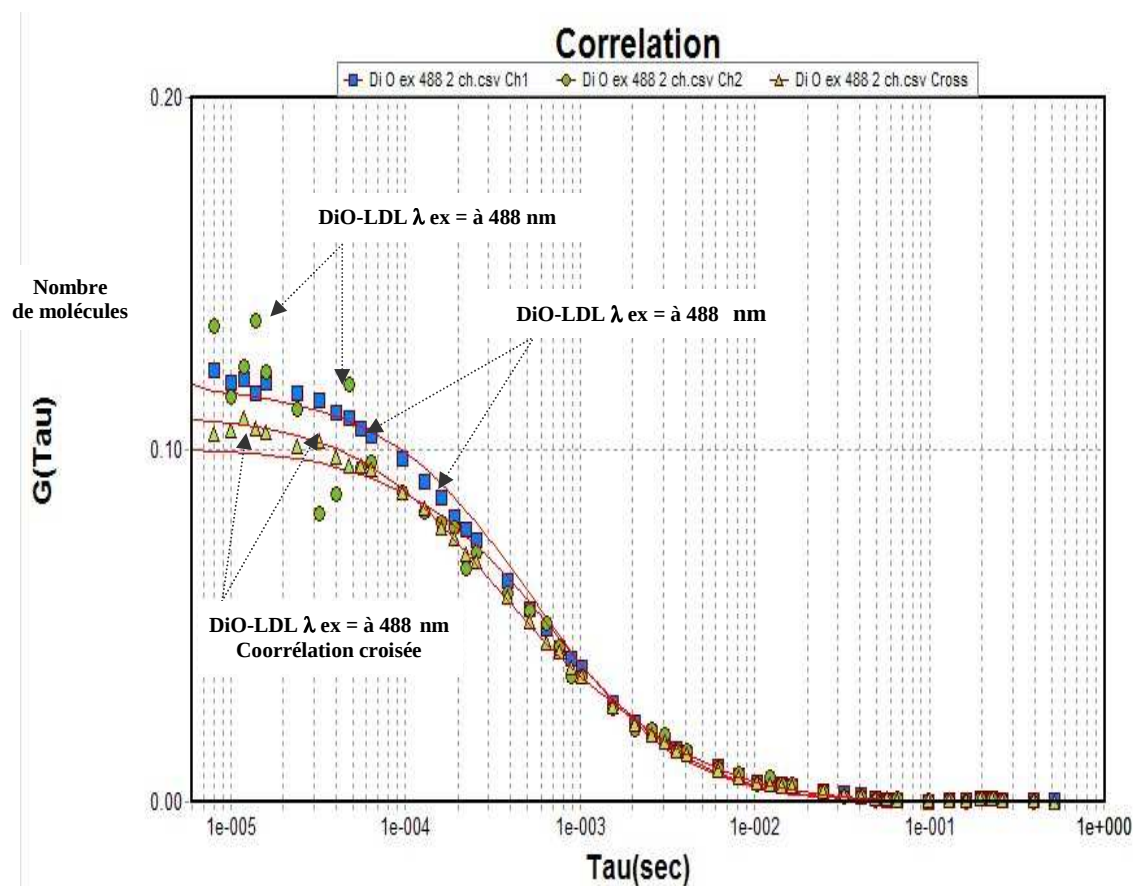


Figure-III.6 : Corrélation de fluorescence d'une suspension de DiO-LDL, $\lambda_{ex} = 488$ nm. Analyse en 3D Gaussien. $n = 9$ molécules dans le volume d'observation.

b) – DiI-LDL

Pour la solution de DiI-LDL à une concentration de l'ordre de 100 nM, la fonction d'autocorrélation montre un nombre moyen de 16,66 molécules dans le volume d'observation. Les résultats sont représentés dans la Figure-III.7.

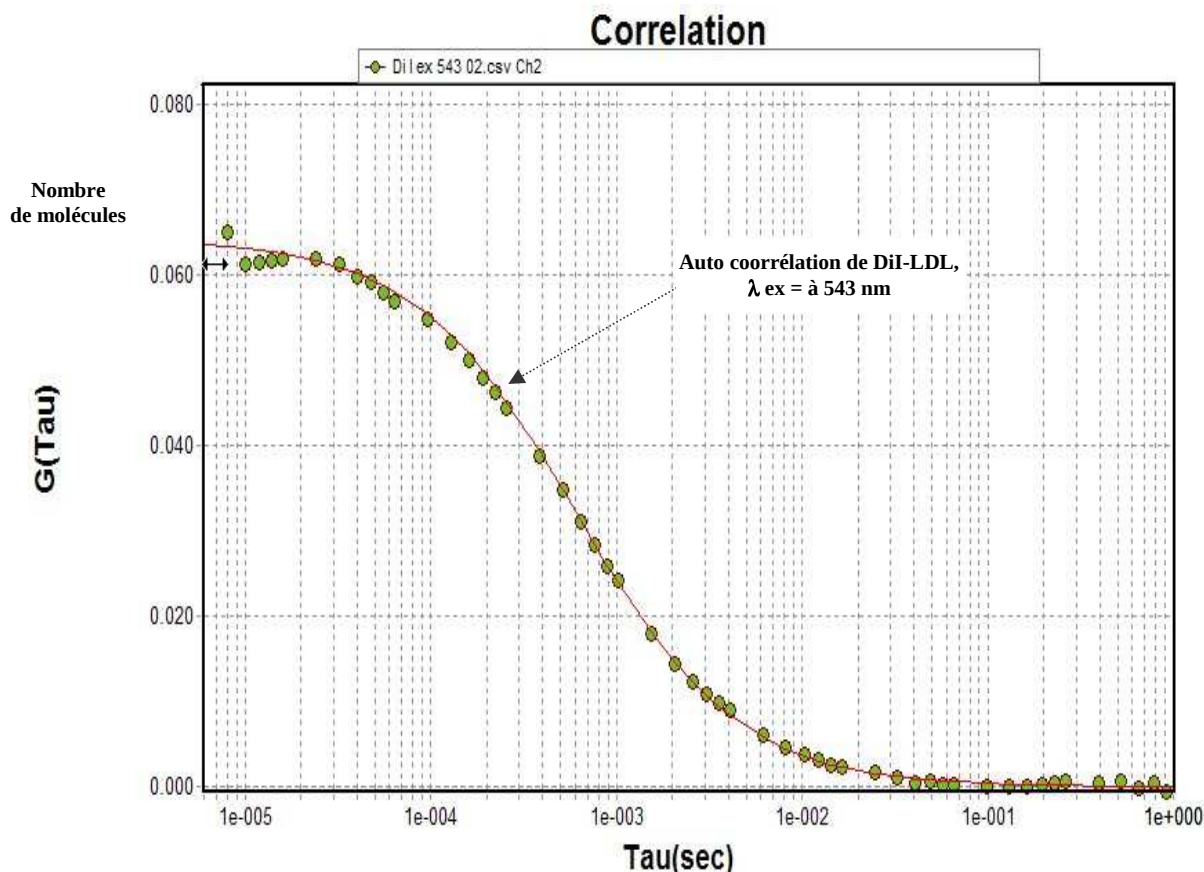


Figure-III.7 : Corrélation de fluorescence d'une suspension de DiI-LDL, $\lambda_{\text{ex}} = 543 \text{ nm}$. Analyse en 3D Gaussien (droite). $n = 16,6$ molécules dans le volume d'observation.

III.4 – INTERACTIONS MOLECULAIRES DiI-DiO-LDL EN SOLUTION (MESURE DU FRET)

Le FRET entre les partenaires DiO et DiI est normalisé par le nombre de molécules simplement marquées libres (DiO-LDL et DiI-LDL) au préalable de l'interprétation des molécules doublement liées (DiI-DiO-LDL). La stoechiométrie semble proche de 1:1, car les temps de diffusion sont très proches pour la diffusion des molécules DiO-LDL et DiI-LDL dans le volume d'observation. Ils ont la même mobilité ($D = 7 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$) (Bacia K *et al.*, 2004).

Lorsque les deux fluorophores sont spectralement discriminables (bande passante de 500-530 nm pour le DiO en Ch₁ et de 560-680 nm pour le DiI en Ch₂) et si leur brillance ne change pas lors de l'interaction, alors le taux de liaison est alors donné par la relation suivante :

$$N_{\text{DiO} \cdot \text{DiI}} = N_{\text{DiO}} \times N_{\text{DiI}} / N_{\text{CC DiO} \cdot \text{DiI}}$$

On ne considère pas les cas de marquages incomplets ou partiels (DiO-LDL ou DiI-LDL). En effet, le signal FRET, collecté en mesurant la fluorescence au niveau du Ch2 (DiI) suite à une excitation du DiO, est spécifique et très dépendante de la proximité moléculaires (1/R⁶) des deux partenaires DiO et DiI.

Au niveau cellulaire, la fixation *via* les récepteurs LDL est compétitive pour les LDL native, DiO-LDL, DiI-LDL et DiO-DiI-LDL, mais l'internalisation et la dégradation dans les lysosomes des LDL révélés par le suivi du signal FRET (DiO-DiI-LDL) sont minimisés du fait de la proportion de marquage (25% des LDL doublement marqués par DiO et DiI).

La Figure-III.8 A-B présente les taux de corrélation croisée (0,018 soit 55,55 molécules en moyenne) en FRET du DiI-DiO-LDL par rapport à la détection simple du DiO (0,07 soit 14,28 molécules en moyenne) et du DiI FRET (0,03 soit 33,33 molécules en moyenne) : 30,1%.

Pour le calcul de la fraction doublement marquée DiO/DiI, les valeurs obtenues dans nos expérimentations pour le temps de diffusion τ_D sont similaires à celles de la littérature ($1,03 \pm 0,05$).

Dans le cas du FRET, la brillance des deux partenaires change suite à l'interaction. La fraction doublement marquée DiI-DiO-LDL est d'environ 30% avec en moyenne 14,28 molécules de DiO, 33,33 molécules de DiI et 55,55 molécules en cross-corrélées (N = 8,58). Pour la cinétique de fixation et d'internalisation des LDL, il en ressort une compétition entre les molécules simplement marquées et les molécules doublement marquées et susceptible d'être détectée par le processus de FRET (1 molécule sur 4 environ) (Figure-III.9).

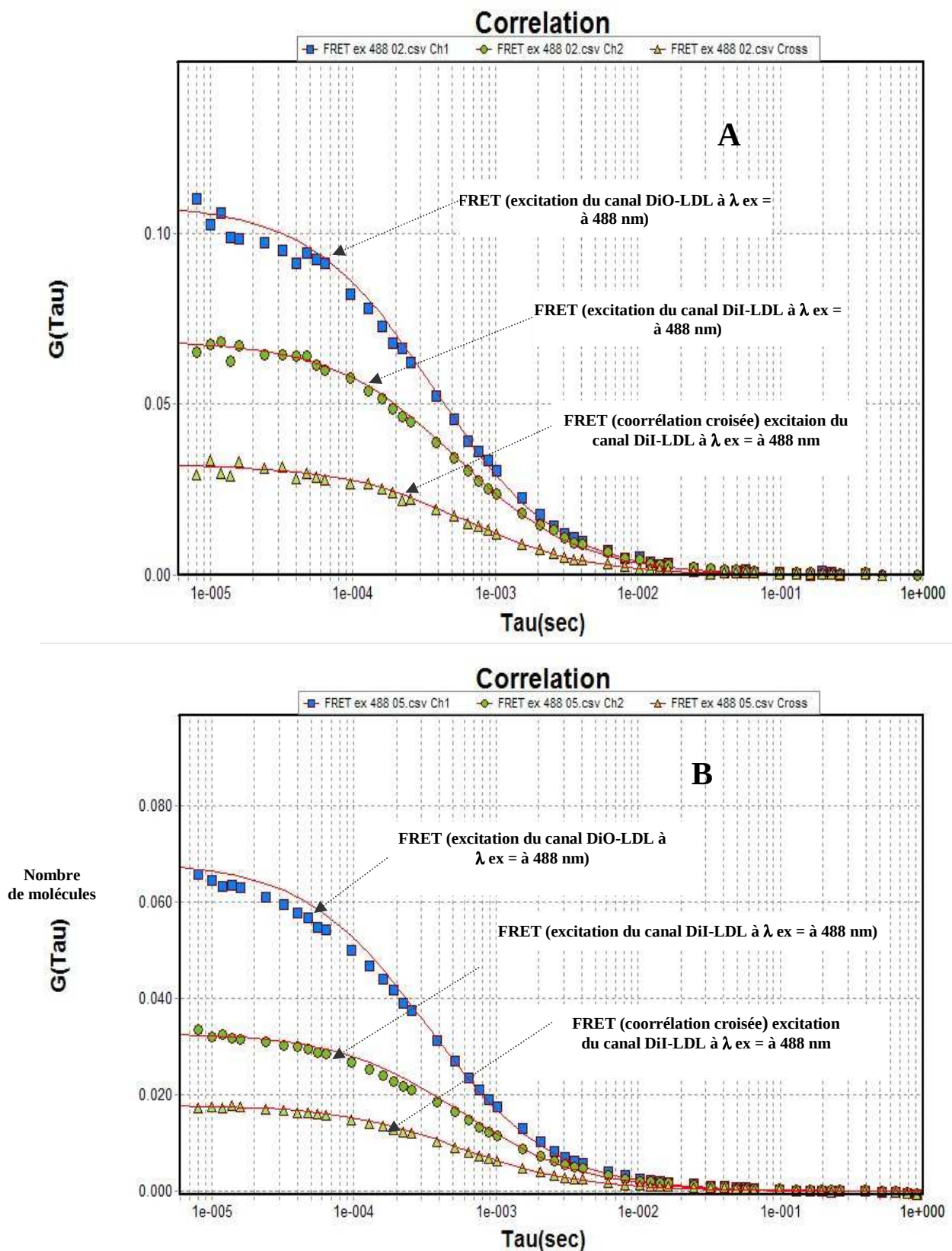


Figure-III.8 A-B : Taux de corrélation croisée (0,0118 soit 55,55 molécules en moyenne) en FRET du DiI-DiO-LDL par rapport à la détection simple du DiO (0,07 soit 14,28 molécules en moyenne) et du DiI FRET (0,03 soit 33,33 molécules en moyenne) : 30,1%.

Comme nous pouvons le constater dans la Figure-III.9, le signal collecté en FCS relatif à l'émission du DiI (partenaire accepteur dans le processus de FRET) suite à une excitation $\lambda_{ex} = 488$ nm indique très clairement qu'il n'est pas directement stimulé à la longueur d'onde d'excitation du DiO (partenaire donneur dans le processus de FRET).

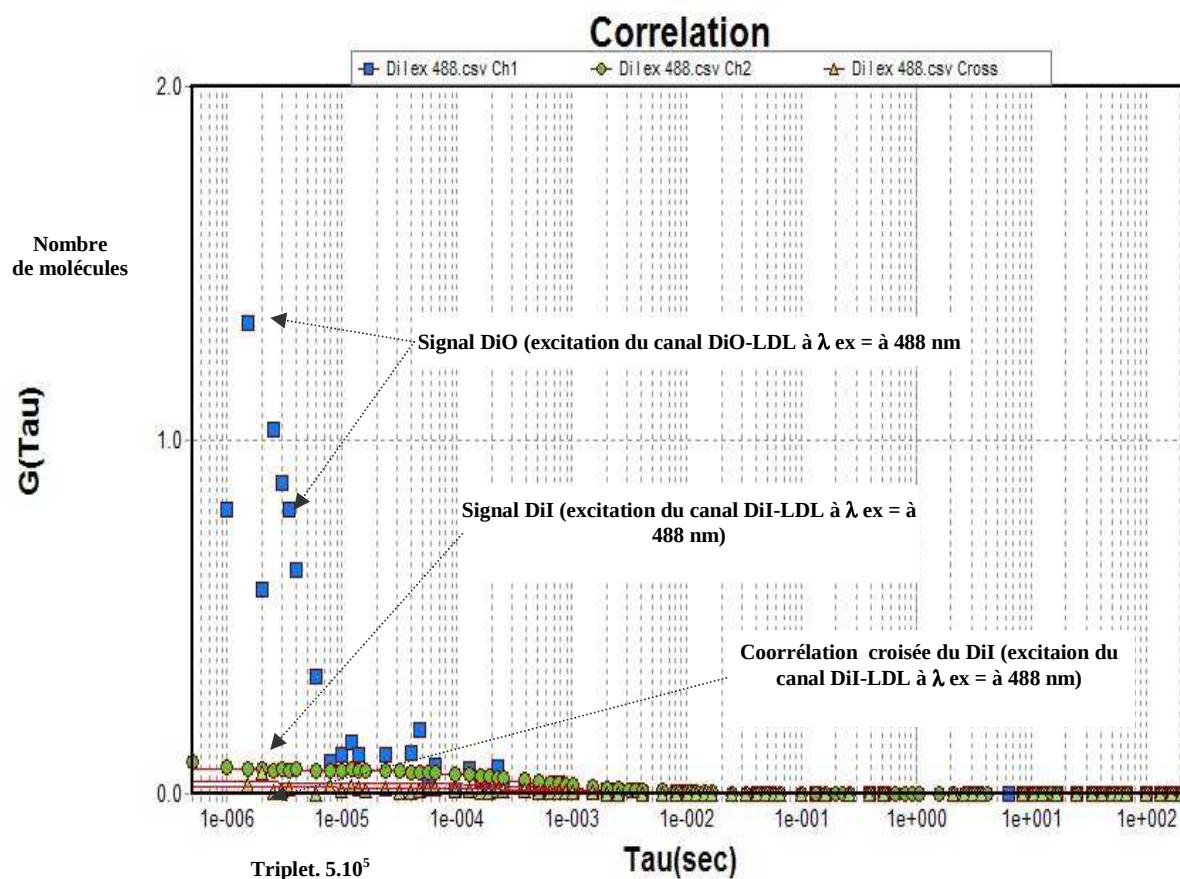


Figure-III.9 : Corrélation croisée de DiI

III.5 – FIXATION ET INTERNALISATION DES LDL (DiI-LDL, DiI-DiO-LDL) DANS LES ECV304

L'étude de la fixation et de l'internalisation des LDL dans les ECV304 utilisées dans les travaux préliminaires nous a permis d'une part, de faire la mise au point de la plupart des différentes techniques utilisées telles que la microscopie de fluorescence (Scanner Cellulaire, microscopie confocale) et d'autre part, déterminer les différents paramètres étudiés au cours de notre étude. Les résultats de ces travaux présentés dans la *Partie VI-Publications* du présent manuscrit (cf. **Article 1 : Clinical Hemorheology and Microcirculation, 2005, 33: 243-251**) démontrent que les ECV304 utilisés comme modèle d'études des HUVECs fixent, internalisent et dégradent les LDL.

III.6 – CINETIQUE D'INTERNALISATION ET DE DEGRADATION DES LDL (DiI-DiO-LDL) DANS LES HUVECS – ETUDE DU FRET PAR LA TECHNIQUE FCS

Pour étudier la cinétique d'internalisation et de dégradation des LDL (10 µg/mL) dans les HUVECs, nous avons utilisé les LDL doublement marquées par les sondes fluorescentes DiO et DiI respectivement. Ce marquage nous a permis d'une part, d'effectuer les mesures de l'intensité de fluorescence (IF) des deux sondes (à l'extérieur et à l'intérieur des cellules) à l'aide de la microscopie confocale, et d'autre part, de suivre, par la mesure de FRET, de la durée de vie des molécules (FLIM), par la technique de FCS le comportement des espèces de LDL (DiO-LDL, DiI-LDL, DiO-DiI-LDL).

Le processus de FRET qui a lieu entre ces deux molécules, la première étant la molécule donneuse (DiO) et la seconde la molécule acceptrice (DiI) est largement décrit dans la partie II.6 de ce manuscrit. Nous avons donc réalisé les différentes sections (appelées coupes) à travers l'unique population d'une zone d'intérêt de la monocouche d'HUVECs soumises ou non aux contraintes de cisaillement. Ensuite, nous avons procédé à l'acquisition des images et des spectres à travers ces différentes sections en fonction du temps (de 0 à 24 h). Nous avons déterminé le nombre de sections (coupes 15 à 88) réalisé à travers la monocouche selon le but de l'expérience, en notant sur ce nombre une influence sur la durée d'acquisition (fonction du nombre de plans). L'intervalle de temps entre deux acquisitions consécutives a été de l'ordre de 5 à 10 min. Chaque série d'expérimentation a été réalisée 3 à 4 fois afin de valider les données obtenues. **Il est important de signaler que toutes nos expérimentations, qu'elles soient sous contraintes de cisaillement ou dans des conditions statiques (c'est-à-dire sans contraintes de cisaillement), ont été réalisées sous le microscope en observation directe de fixation, d'internalisation et dégradation des LDL.**

Il faut rappeler que pour l'étude de la cinétique de dégradation, après la fixation et l'internalisation, les cellules ont été lavées avec du milieu sans LDL, et elles ont été incubées dans un milieu fraîchement préparé (sans LDL).

Sur la Figure-III.10, les différentes mesures de FCS effectuées et FRET dans la cellule après 24 h d'incubation montrent une absence de corrélation croisée entre les molécules de DiO et DiI ce qui est due à la dégradation des molécules de LDL qui portaient les deux molécules à la fois. Ces données sont confirmées par l'absence de signal FRET lorsqu'on excite les molécules (vésicules) présentes dans la cellule avec le laser DiO-DiI à $\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$.

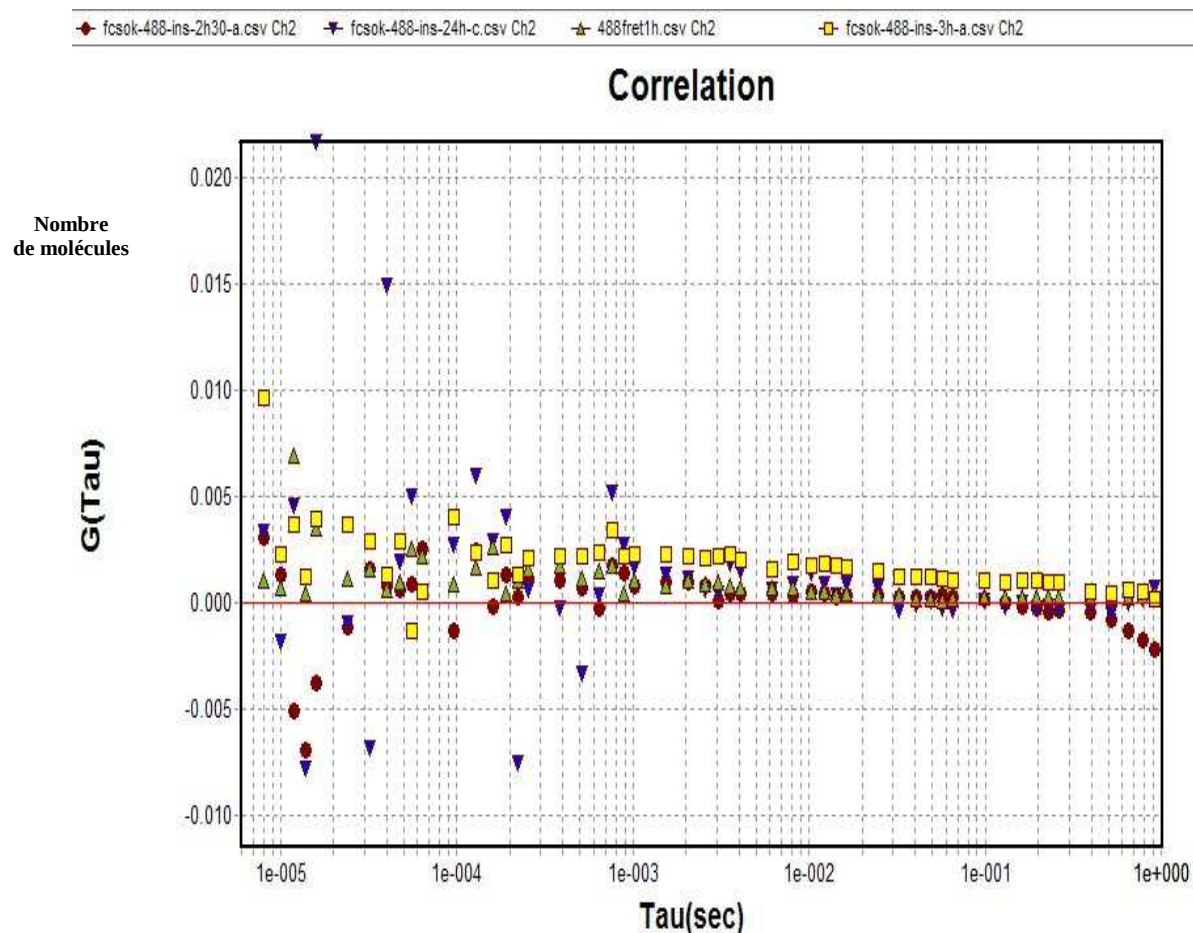


Figure-III.10 : Mesure FCS et du FRET après 1 h, 2,5 h, 3 h et 24 h d'incubation des HUVECs dans un milieu contenant du DiI-DiO-LDL (cinétique de dégradation des LDL).

III.6.1 – Cinétique d'internalisation et de dégradation de DiI-DiO-LDL dans les HUVECs sous conditions statiques (sans contraintes de cisaillement)

Dans les conditions statiques, nous avons constaté que les processus de fixation, d'internalisation et de dégradation des LDL étaient plus lents que dans les conditions de cisaillement. Ces mesures ont été confirmées, d'une part, par la mesure de l'intensité de fluorescence des molécules de DiI et du DiO couplées aux LDL et d'autre part, par la mesure de FRET. La dégradation a été déterminée par le suivi de la mesure de FRET dans les vésicules à l'intérieur des HUVECs. Nous avons également constaté qu'il y avait une prolongation de la surface-contact entre les LDL et la membrane cellulaire, tandis que l'internalisation et la dégradation étaient plus rapides dans les cellules soumises à des contraintes de cisaillement. Nous avons constaté ce même phénomène, même après 24 h d'incubation.

La Figure-III-11 présente la validation de la fixation, d'internalisation des DiI-DiO-LDL (10 $\mu\text{g/mL}$) dans les HUVECs.

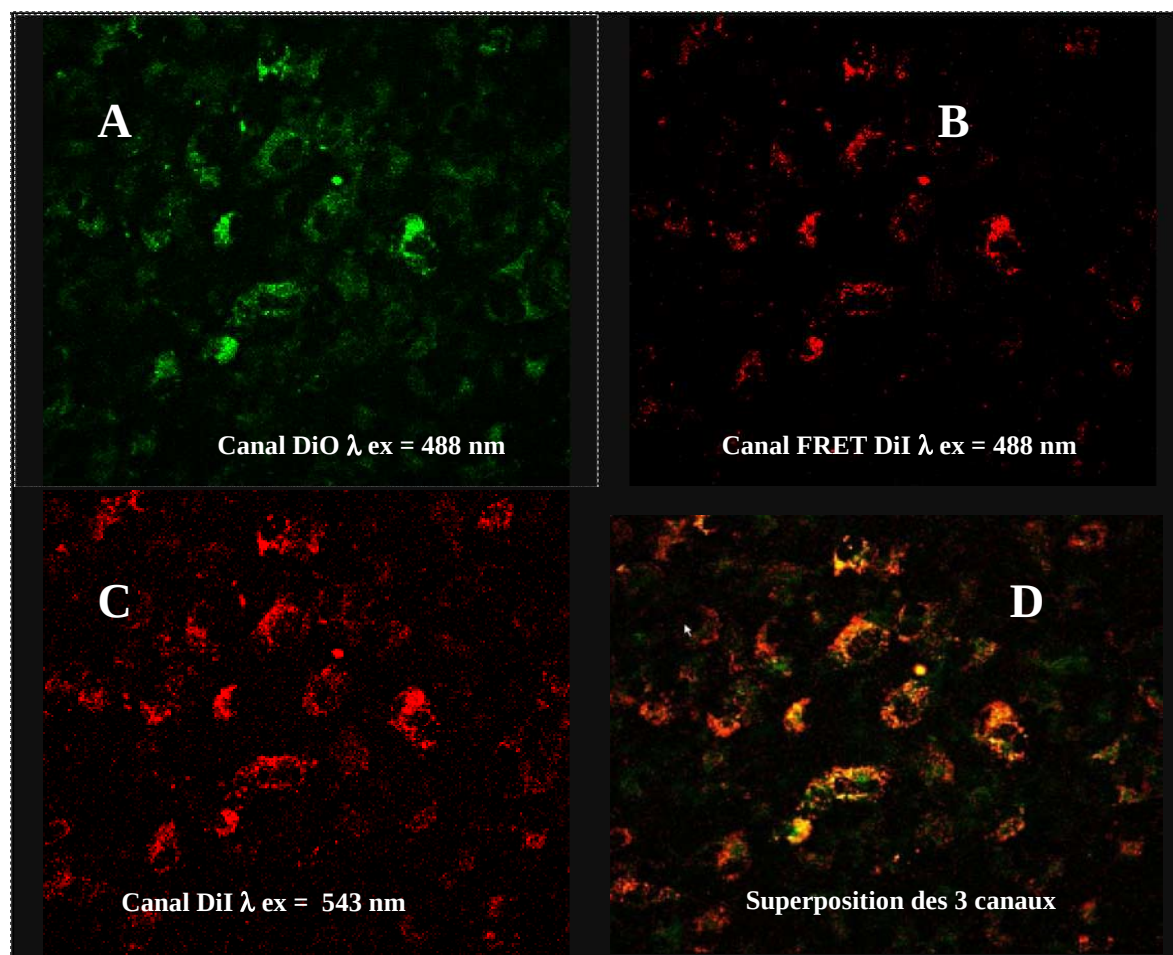


Figure-III.11 : Validation de la fixation et de l'internalisation des DiI-DiO-LDL ($10 \mu\text{g/mL}$) dans les HUVECs. Images obtenues par microscope de fluorescence confocale (Leica SP2-AOBS, objectif $\times 40$). **A** : canal d'excitation à 488 nm pour le DiO et la collecte de la fluorescence entre 500 et 520 nm ; **B** : canal d'émission de fluorescence de DiI suite une excitation à une longueur d'onde $\lambda = 488 \text{ nm}$ (DiI FRET) ; **C** : canal d'émission de la fluorescence de DiI intégrée $\lambda_{\text{ex}} = 543 \text{ nm}$ (c'est-à-dire la fluorescence DiI du canal FRET et la fluorescence de DiI du canal $\lambda_{\text{ex}} = 543 \text{ nm}$) ; **D** : superposition des canaux A B et C pour localiser les LDL dans les vésicules.

Tableau-III.1 : Caractéristiques spectroscopiques (longueur d'onde λ excitation et émission) des différents types de LDL utilisés dans nos expérimentations.

	λ excitation confocal / FCS (max)	λ émission (FCS)	$\epsilon \text{ (M}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{)}$	Tau (ps)
DiO	488 nm (484 nm)	500-530	95000	2.1 ns
DiI	543nm (530 nm)	560-630	8000	
FRET DiO-DiI	488 nm			
DiI intégrés	543 nm			

L'ensemble des données, c'est-à-dire la faible absorbance du DiI à 488 nm comparée à celle du DiO (coeff absorption respectivement de 8000 et 95000 M⁻¹ cm⁻¹), le rendement quantique de fluorescence similaire et la stœchiométrie ([dio] = [diI]) pour les DiO-DiI-LDL indiquent que seul le processus FRET est mesuré dans ces conditions.

Afin de pouvoir comparer le comportement des molécules de LDL couplées aux DiO et DiI au cours des processus de fixation, internalisation et dégradation, nous avons effectué des mesures concernant la variation de l'intensité de fluorescence de DiO ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$), DiI-FRET ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$) et DiI intégré ($\lambda_{\text{ex}} = 543 \text{ nm}$) à travers les différentes coupes réalisées sur le même et unique plan focal de la monocouche d'HUVECs sous microscope en présence de DiO-DiI-LDL (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Les résultats obtenus sont présentés dans la *Figure-III.12*. A partir de ces résultats, nous constatons qu'il y a une concordance locale et spatiale entre le signal DiO et DiI FRET (entre les sections 2 et 12 μm , $8 \pm 6 \mu\text{m}$ environ). Au niveau du DiI, le FRET ne concerne qu'une fraction seulement du signal collecté car le niveau du signal est plus faible pour le FRET. Il apparaît clairement une diffusion des molécules DiI car la distribution intracellulaire est plus large.

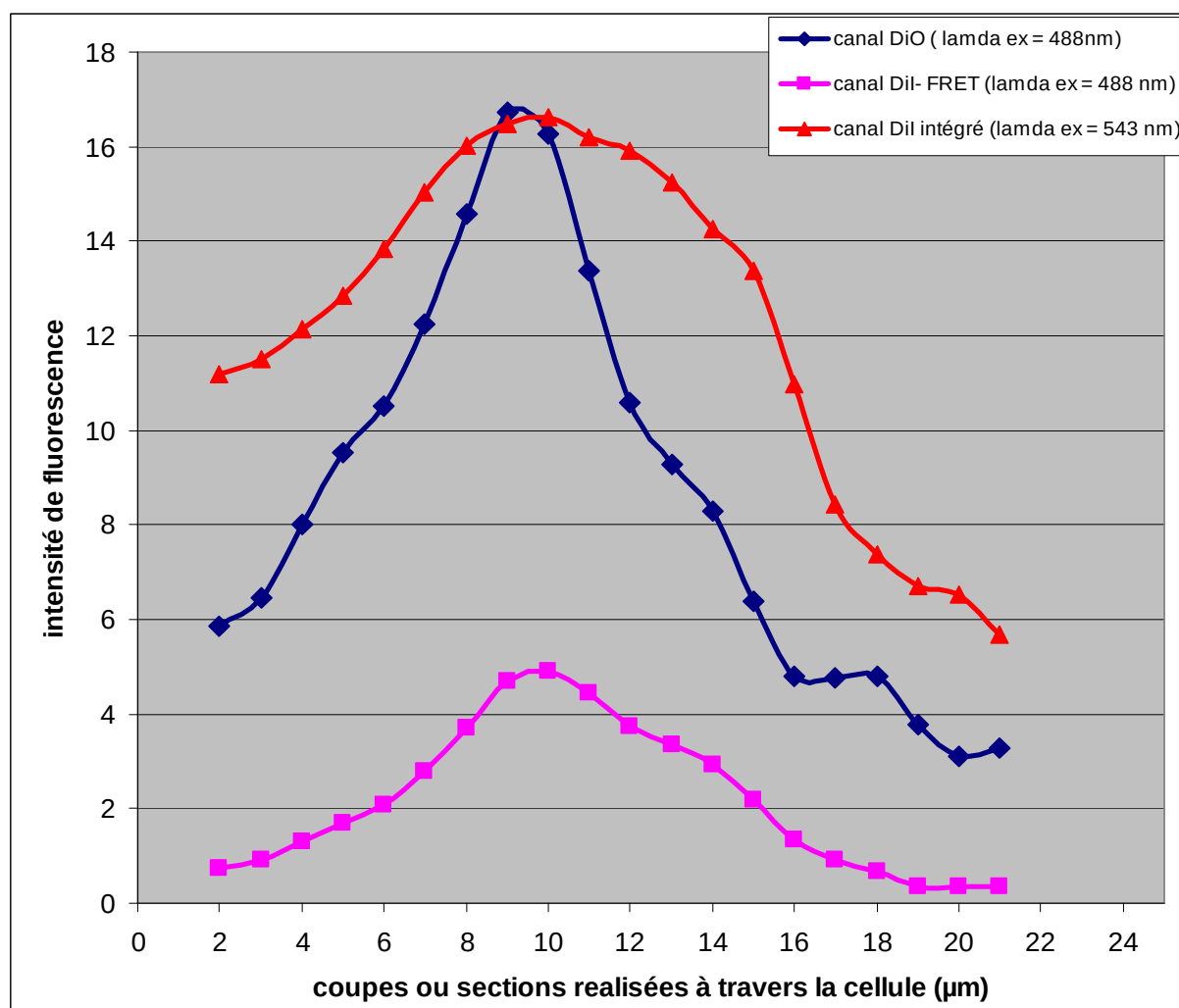


Figure-III.12 : Evolution de l'intensité de fluorescence des différentes coupes ou sections réalisées à travers la monocouche d'HUVECs de la Figure-III.11. HUVECs incubées avec de DiO-DiO-LDL (10 μg/mL) intensité de fluorescence de canal de DiO (λ ex = 488 nm ; collection émission λ = 500-520 nm) ; DiI FRET (λ ex = 488 nm ; collection émission λ = 540-560 nm) ; intensité de fluorescence totale de DiI (DiI intégré ; λ ex = 488 nm ; collection émission λ = 540-630 nm).

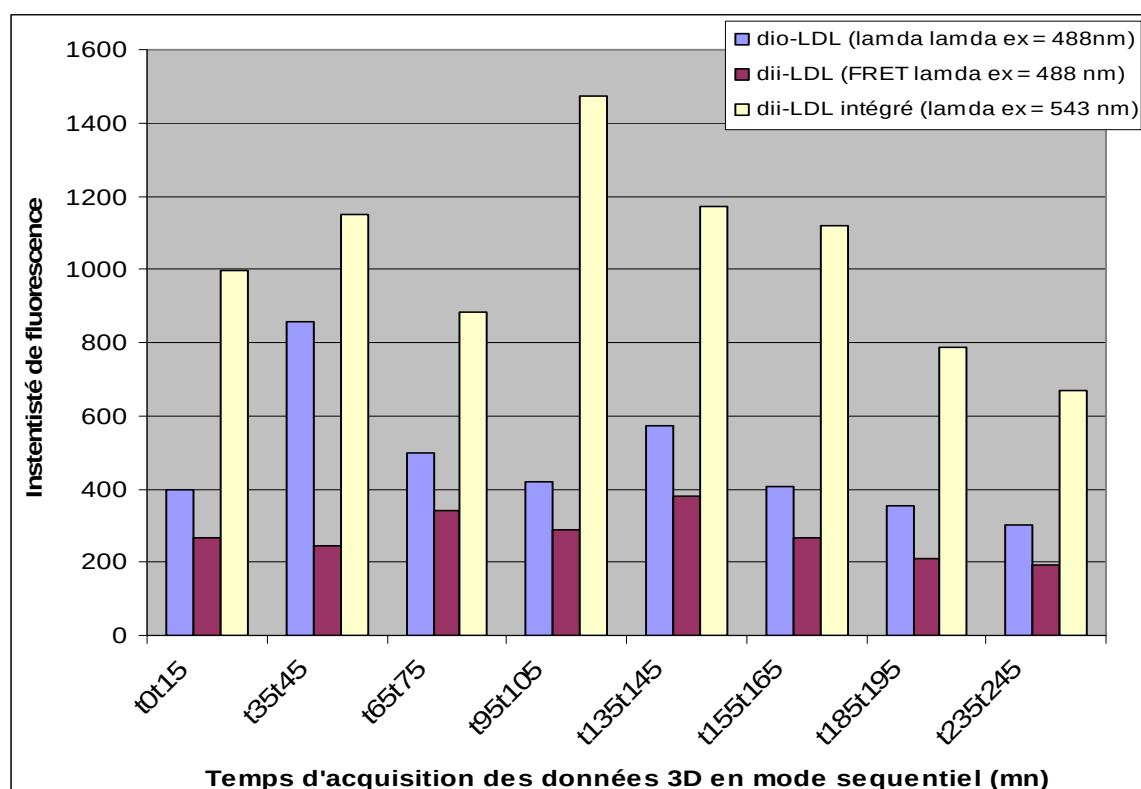
III.6.2 – Cinétique d'internalisation et de dégradation de DiI-DiO-LDL dans les HUVECs sous conditions mécaniques

Pour étudier la cinétique d'internalisation et de dégradation de DiI-DiO-LDL soit dans une seule et unique cellule ou dans une monocouche d'HUVECs soumises à des contraintes de cisaillement (1 Pa) pendant 0 à 24 h sous le microscope confocal (protocole largement détaillé

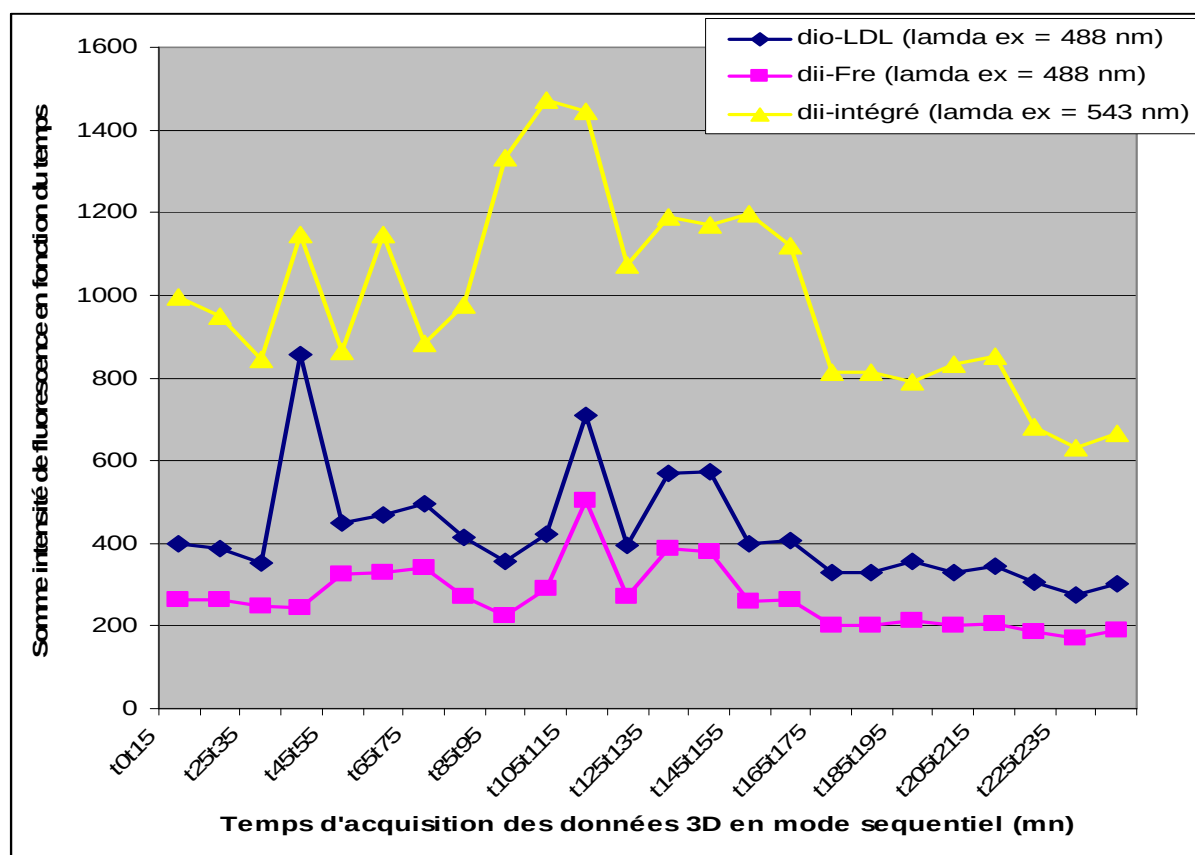
dans II.4.3, Figure-II.7 de la partie « Matériels et Méthodes » de ce manuscrit), nous avons utilisé deux méthodes. L'une est la mesure des intensités de fluorescence des DiI, DiO et DiI FRET (Figure-III.13 A-B) en fonction du temps à partir de la surface cellulaire en se déplaçant vers l'intérieur de la cellule sur des sections bien déterminées et respectées pendant toute la durée de l'expérimentation. La deuxième méthode consiste à faire des mesures FLIM et FCS comme précédemment décrit plus haut. Cependant, il est important de signaler que les résultats obtenus sur la monocouche ont été confirmés par ceux obtenus à partir d'une petite seule et unique cellule sur le même tapis cellulaire. **Pour l'étude de la cinétique de dégradation, les cellules ont été lavées afin d'éliminer les LDL non fixées ou internalisées par la cellule.**

a) – Mesures et résultats obtenus par la microscopie de fluorescence confocale

L'acquisition en mode séquentiel du signal d'intensité de fluorescence des trois canaux (DiO, DiI-FRET, DiI intégré) suite à une excitation à $\lambda_{ex} = 488$ nm pour DiO et DiI-FRET, et $\lambda_{ex} = 543$ nm pour le DiI intégré, nous a permis de mettre en évidence une cinétique d'internalisation et de dégradation des LDL dans les HUVECs (Figure-III.13 A-B).



A



B

Figure-III.13 A-B : Cinétique d'internalisation et de dégradation de DiO-DiI-LDL LDL (10 µg/mL) dans les HUVECs soumises à des contraintes de cisaillement (1 Pa) pendant 0 à 4 h. Acquisition de la variation de l'intensité de fluorescence en 3D mode séquentiel des 3 canaux (DiO, DiI FRET, DiI intégré) à travers les différentes sections du plan focal de la monocouche d'HUVECs. Pour la cinétique de dégradation, les cellules ont été lavées afin d'éliminer les LDL non fixées ou internalisées par la cellule.

La Figure-III.14 A représente l'évolution du signal FRET mesurée sur la monocouche d'HUVEC incubées avec DiI-DiO-LDL (10 µg/mL) sous contraintes de cisaillement de temps t0 à temps t245 minutes. Nous remarquons que le signal FRET augmente progressivement en fonction du temps et maximum de signal FRET est atteint à environ t110-115 min, ensuite il diminue progressivement jusqu'à t245 min. Cette diminution du signal est extrêmement importante lorsque nous comparons les signaux FRET de la même section (coupe réalisée à travers la cellule) de la cellule à des différents temps t105t115 min, t125t135 min t155 min, t185t195 min et t235t245 min, ce qui explique le fait donc la diminution du FRET entre les deux molécules (DiO, DiI) suite à une dégradation des LDL marquées aux DiO-DiI (DiO-DiO-LDL). La Figure-III.14 B est donc la somme du signal FRET sur la monocouche d'HUVECs.

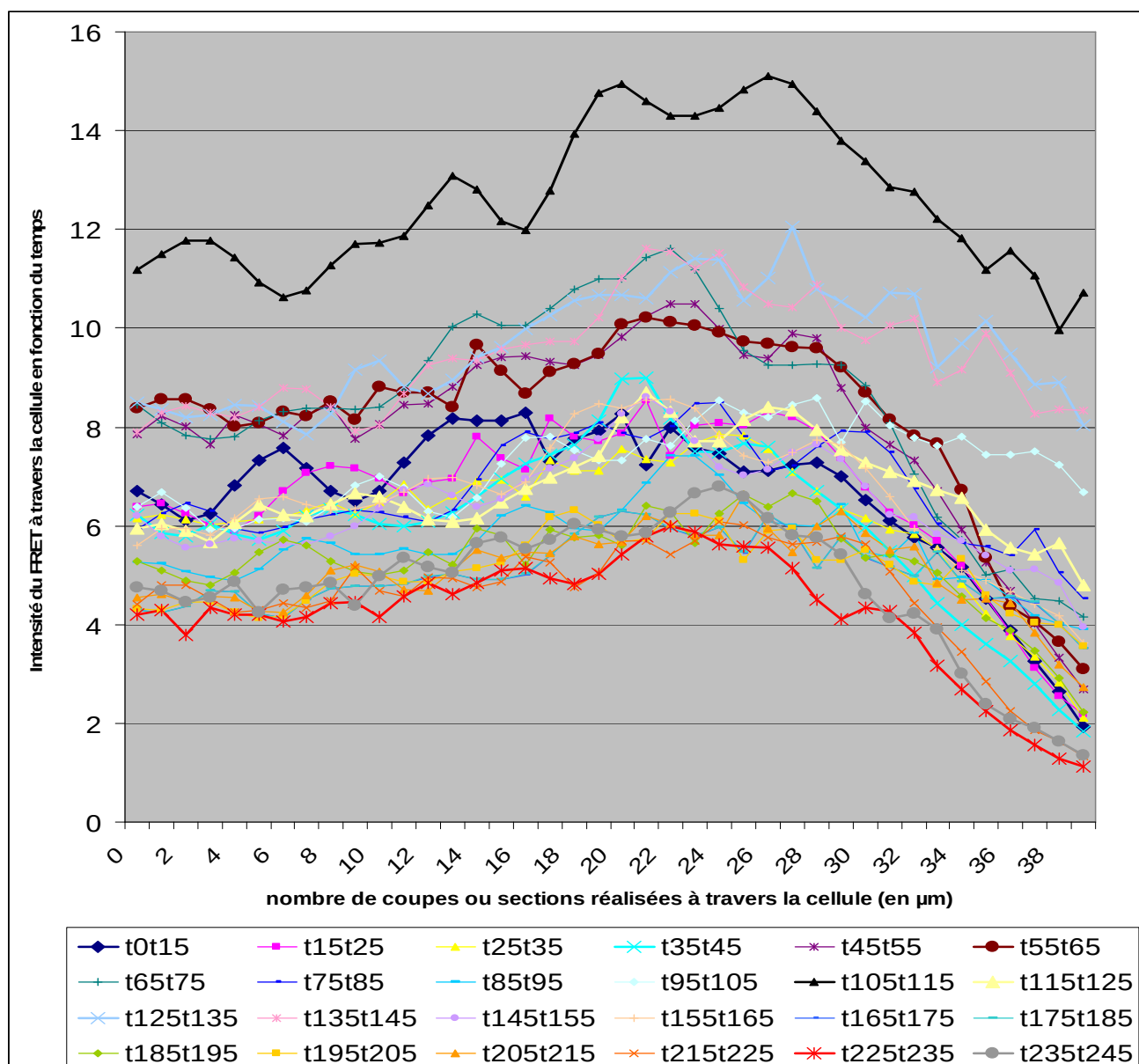


Figure-III.14 A: Mesure de l'évolution du signal FRET en fonction du temps sur une monocouche d'HUVECs incubées avec DiI-DiO-LDL ($10 \mu\text{g/mL}$) sous contraintes de cisaillement. t0t15 à t235t245 signifient les temps exprimés en minutes pour l'acquisition des différentes mesures de l'évolution du signal FRET. Les nombres 0, 2, 4, 5, 6... jusqu'à 38 représentent les numéros des différentes coupes sériées réalisées à travers la cellule pour mesurer le signal FRET en fonction du temps.

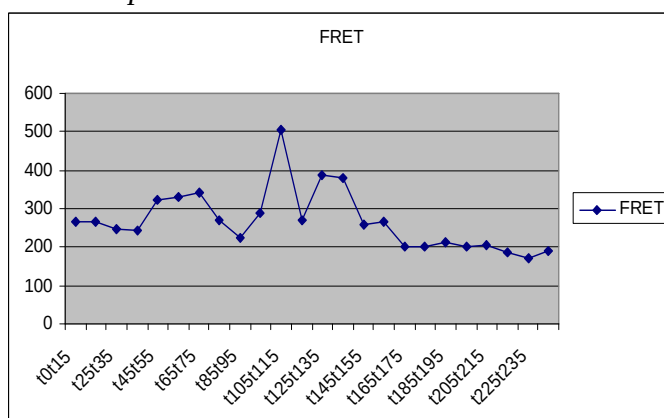


Figure-III.14 B: Somme de l'intensité du signal FRET dans une monocouche d'HUVECs incubées avec DiI-DiO-LDL ($10 \mu\text{g/mL}$).

Dans notre étude, pour vérifier et valider ces résultats, nous avons effectué les mesures dans les mêmes conditions sur trois cellules voisines sélectionnées sur cette même monocouche (*Figure-III.15*) avec une capture d'écran sur le même plan (dans notre cas, nous avons sélectionné le plan n°26 qui correspond à la coupe n°26 réalisée à travers la cellule).

HUVECs (image obtenue en lumière transmise en contraste de phase).

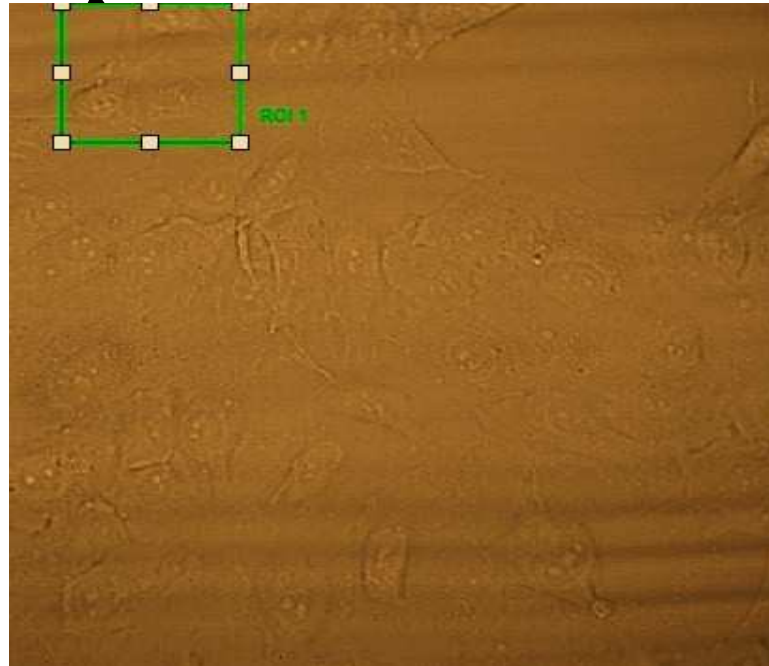
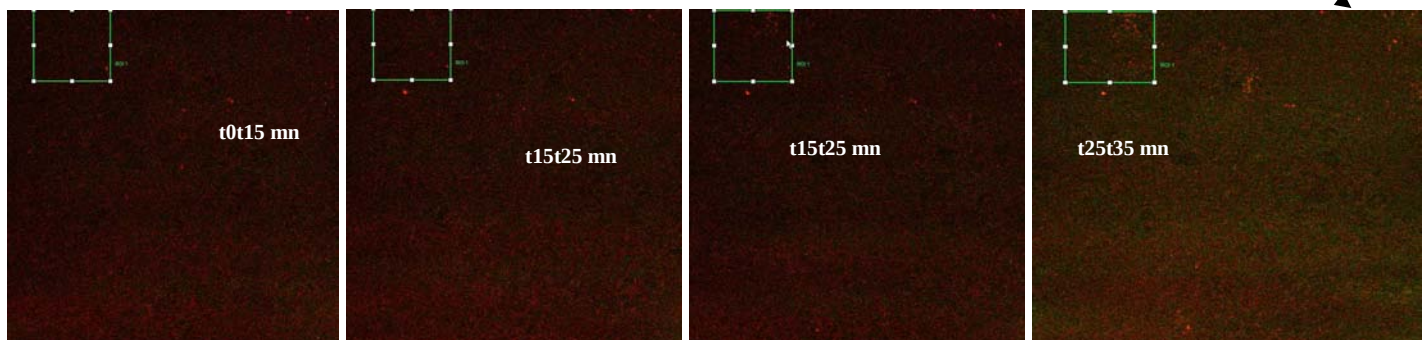


Image de la cinétique
d'internalisation des LDL dans
les HUVECs de temps t0 à
t235 minutes.



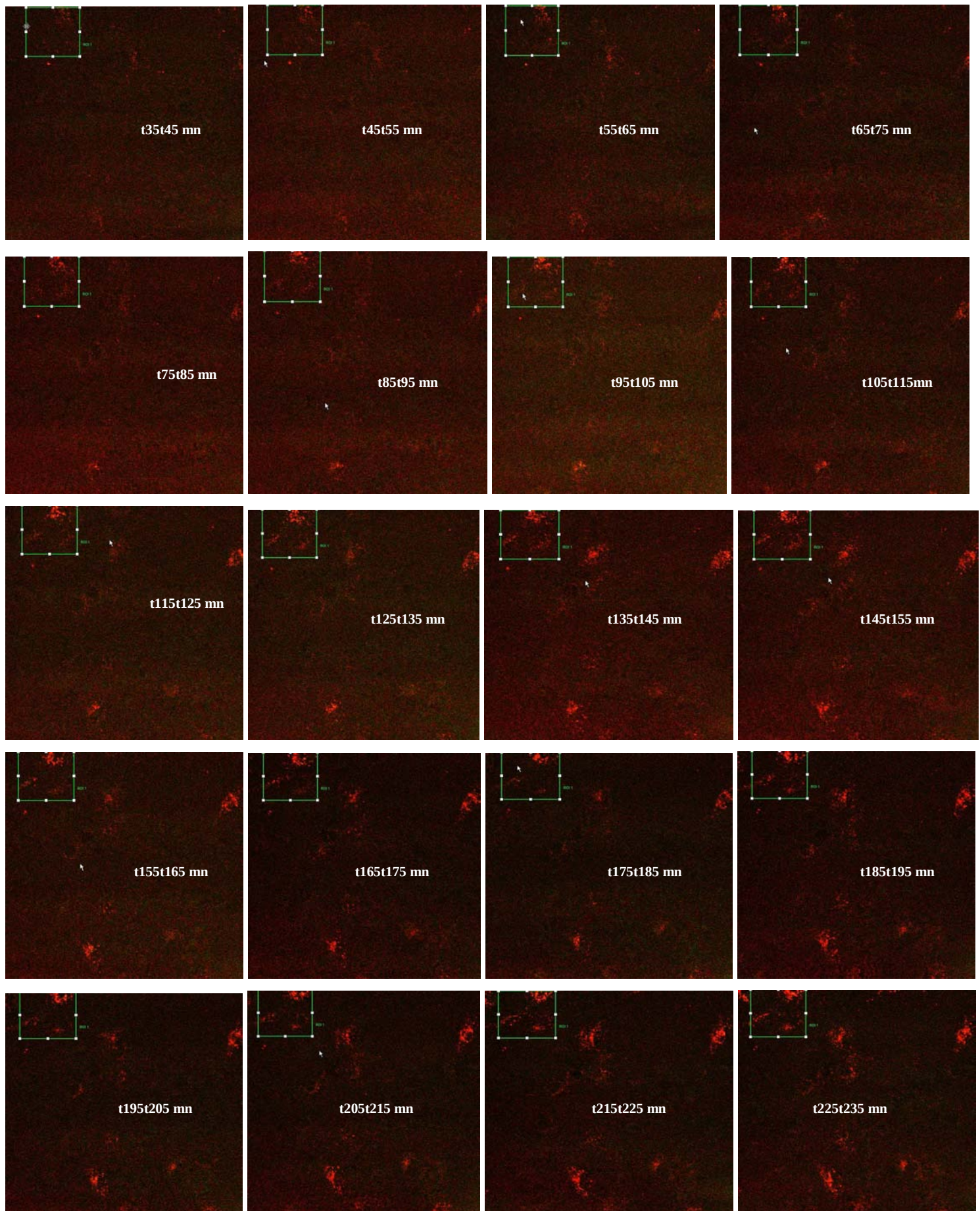


Figure-III.15 : suivi par imagerie confocale de l'internalisation des LDL (10 $\mu\text{g/mL}$) dans les HUVECs soumises à des contraintes de cisaillement (1 Pa) de temps 0 à 235 min (t0....t235 min). Images obtenues à l'aide du microscope confocal (Leica SP2-AOBS, Germany) objectif x40

b) – Mesures de la dégradation DiO-DiI-LDL au niveau des vésicules dans les HUVEC – (résultats obtenus par la technique FCS) : DiI intégré

Nous avons effectué des mesures sur les vésicules présentes dans les cellules, et lorsque les molécules DiO-DiI-LDL sont excitées à une longueur d'onde $\lambda_{ex} = 488$ nm pour la mesure de FRET (DiI-FRET), nous remarquons une absence de FRET suite à la dégradation de DiO-DiI-LDL (Figure-III.16 A). Ces résultats sont conformes à ceux obtenus suite à une excitation du canal DiI ($\lambda_{ex} = 543$ nm) présentant une diminution du nombre de molécules de DiI (de 100 à 25) dans le volume d'observation en fonction du temps (1 h, 2h30, 3 h et 5 h) (Figure-III.16 B) mais avec une présence de FRET (100 molécules). Cette diminution progressive du FRET due à la dégradation des molécules DiO-DiI-LDL est mise en évidence par le calcul des valeurs du tau de corrélation G (0,02, 0,04) qui sont obtenues selon la formule $G = 1/N$ (où N est le nombre de molécules présentes dans le volume d'observation, c'est-à-dire 1/100, 1/50, 1/25).

Sur la Figure-III.16 C, d'une part, lorsque le canal DiI-FRET est excité avec les deux longueurs d'onde à la fois (c'est-à-dire 488 nm et 543 nm), on note une absence de corrélation avec très peu de FRET, et d'autre part, l'excitation du canal DiI intégré avec les mêmes longueurs d'onde ($\lambda_{ex} = 488$ nm et 543 nm) il y'a une corrélation croisée entre DiI et DiO, ceci est dû à la proximité de quelques molécules de DiO et DiI qui sont encore présentes sur les LDL ou qui sont dégradées mais se retrouvent à des distances très proches pour permettre des émissions de signaux de FRET mais très faibles.

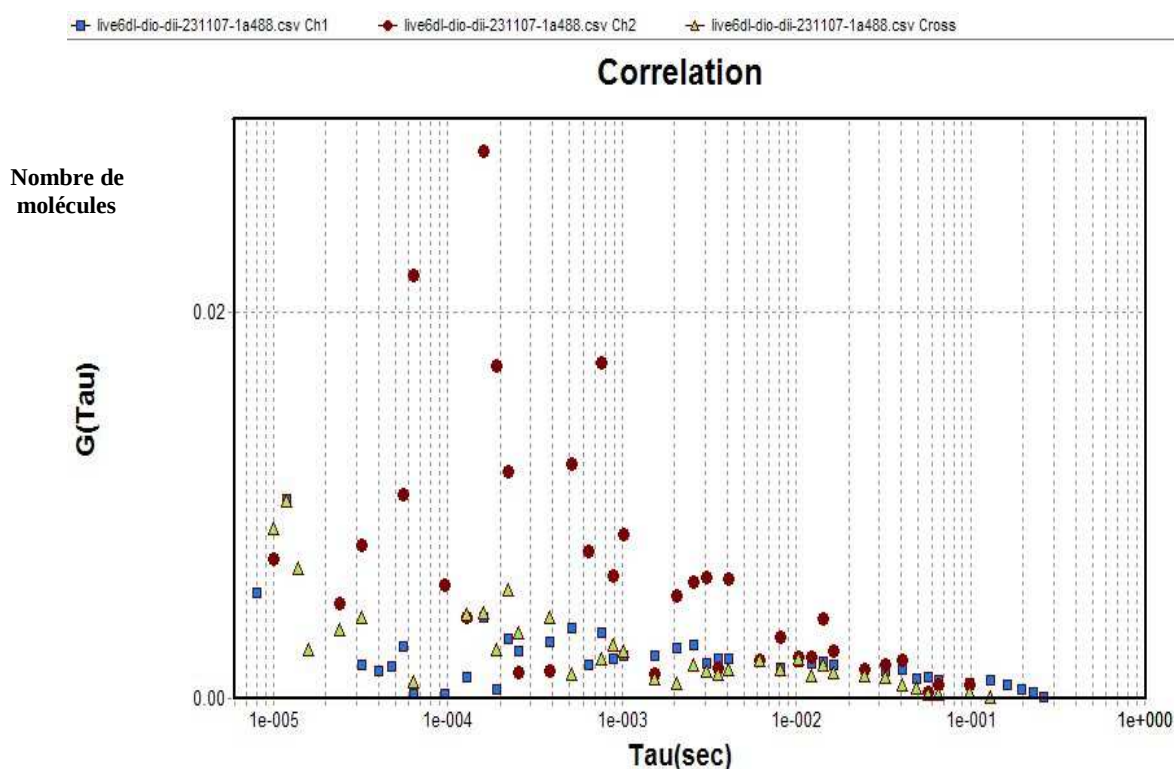


Figure-III.16 A : Excitation des molécules DiO-DiI-LDL dans les HUVECs à une longueur d'onde $\lambda_{ex} = 488$ nm pour le canal FRET (DiI-FRET) et le canal DiI.

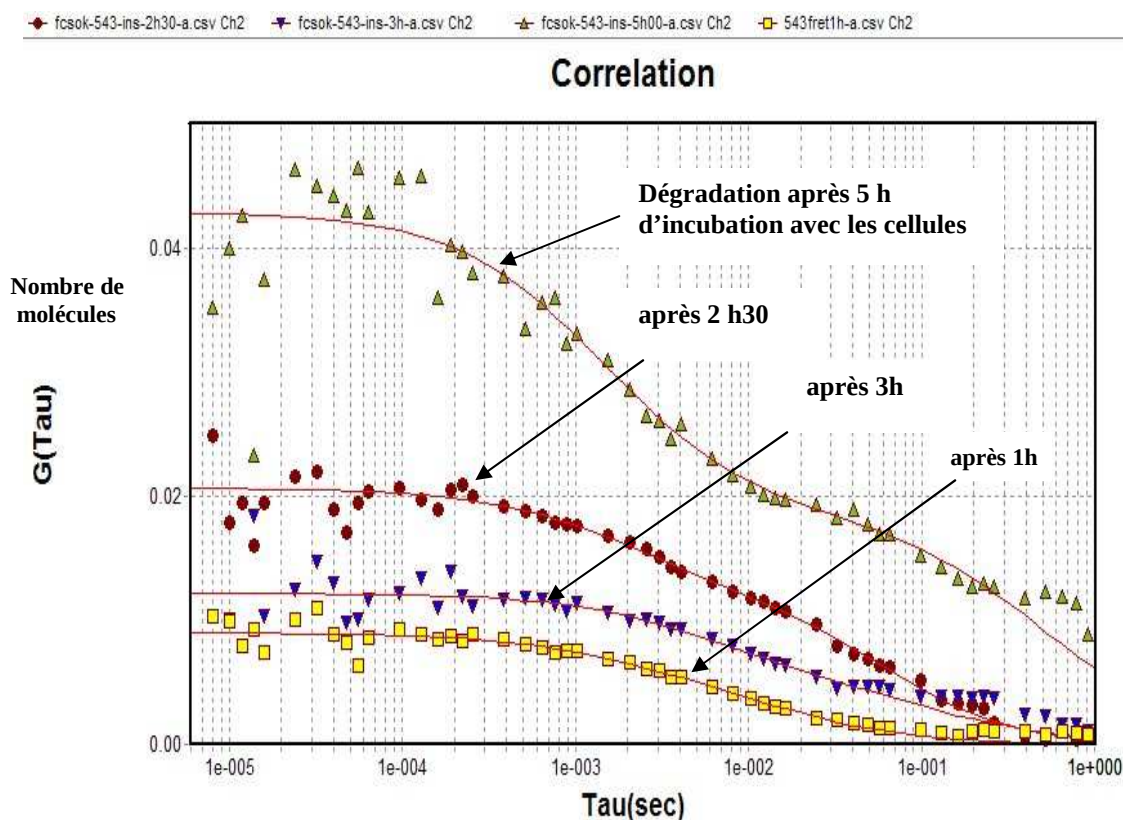


Figure-III.16 B : Diminution du nombre de molécules de DiI (intégré) dans le volume d'observation en fonction du temps (1 h, 2 h 30, 3 h et 5 h) suite à une dégradation des LDL dès 1 h d'incubation avec les HUVECs (λ_{exc} du canal DiI= 543 nm)

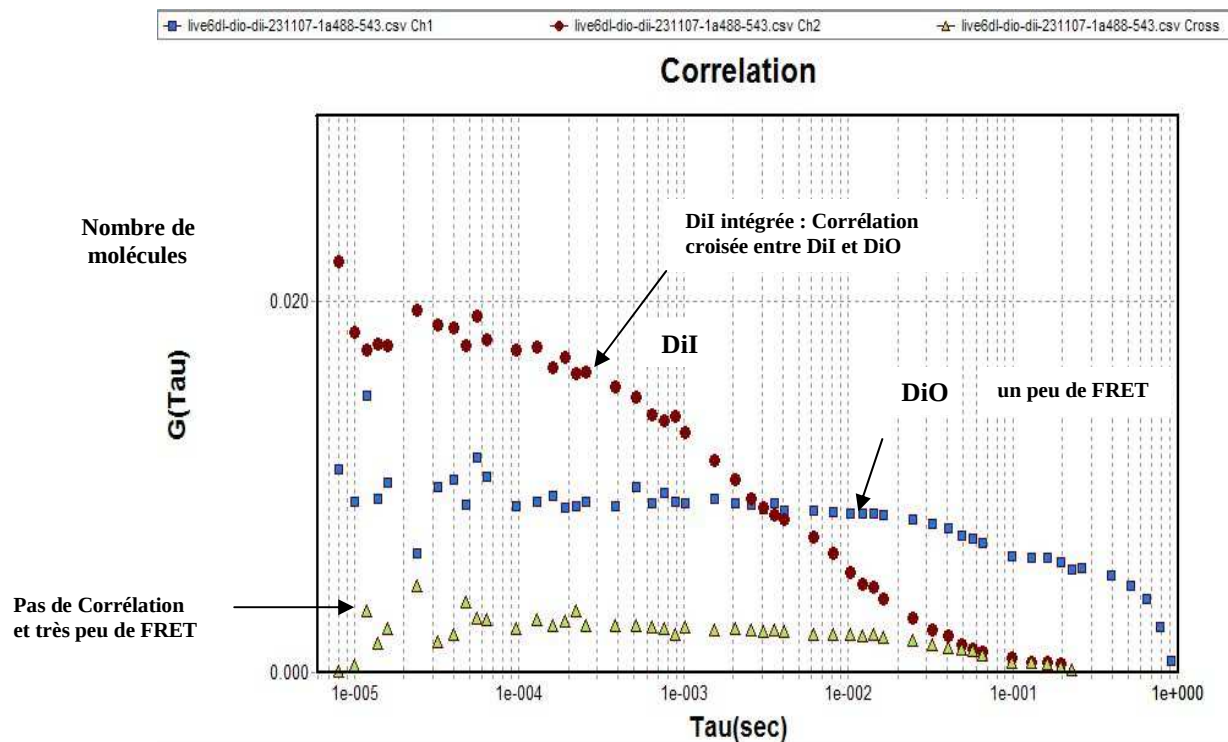


Figure-III.16 C : Absence de FRET

c) – Nous avons effectué les mêmes mesures de FRET en microscopie confocale et en FCS sur les HUVECs fixées à l'aide de paraformaldéhyde (0,1%), mais préalablement incubées avec DiI-DiO-LDL (10 $\mu\text{g/mL}$) à 37°C, et les résultats obtenus nous montrent une absence de diffusion des molécules sur les cellules fixées (Figure-III.17 A-B-C) quelque soit la zone d'intérêt choisie sur la tapis cellulaire (cellule entière, fond noir de la monocouche de cellule).

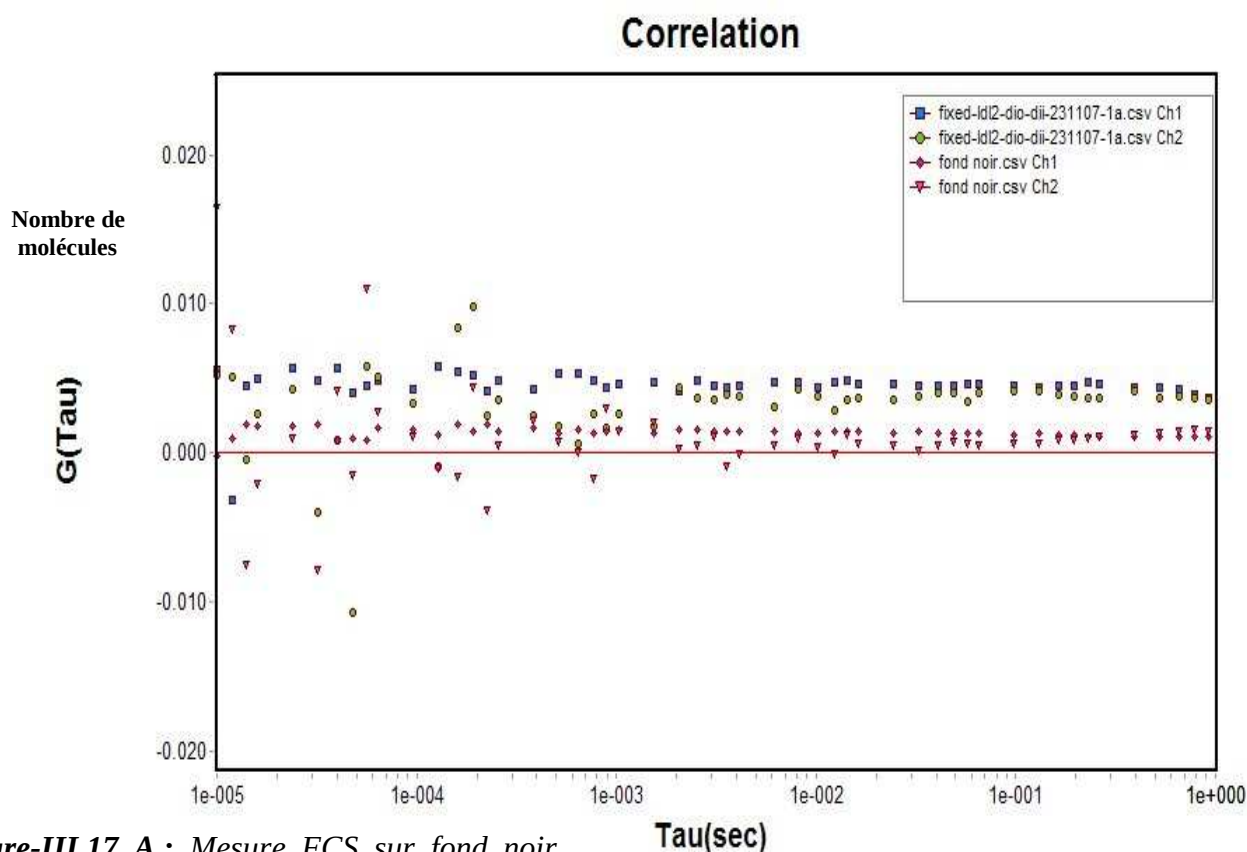


Figure-III.17 A : Mesure FCS sur fond noir des cellules fixées

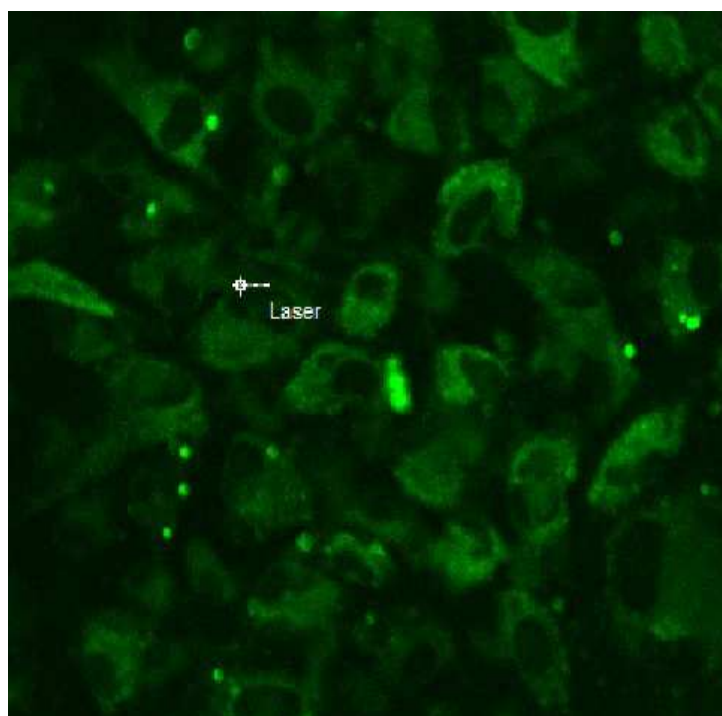


Figure-III.17 B : Monocouche d'HUVECs fixées après incubation avec DiO-DiI-LDL (10 $\mu\text{g/mL}$) à 37°C.

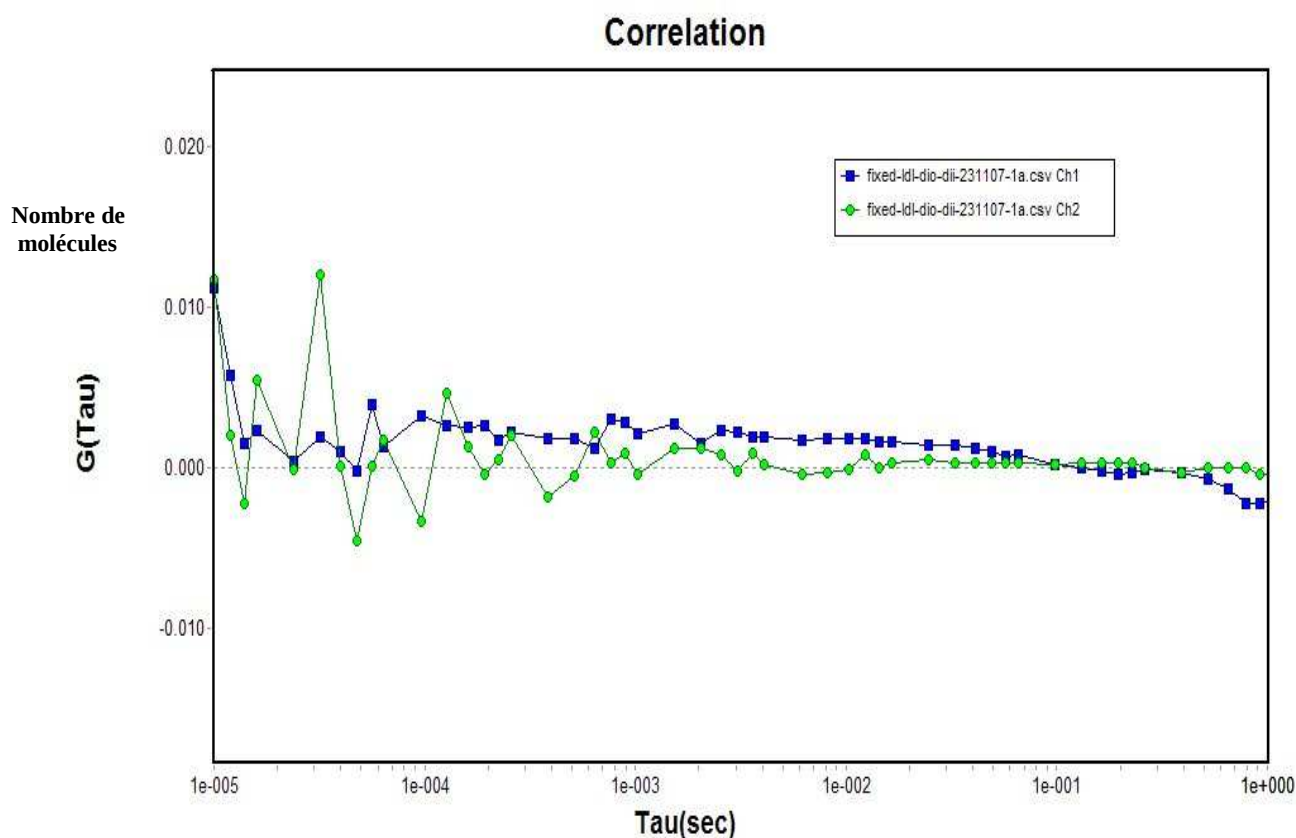
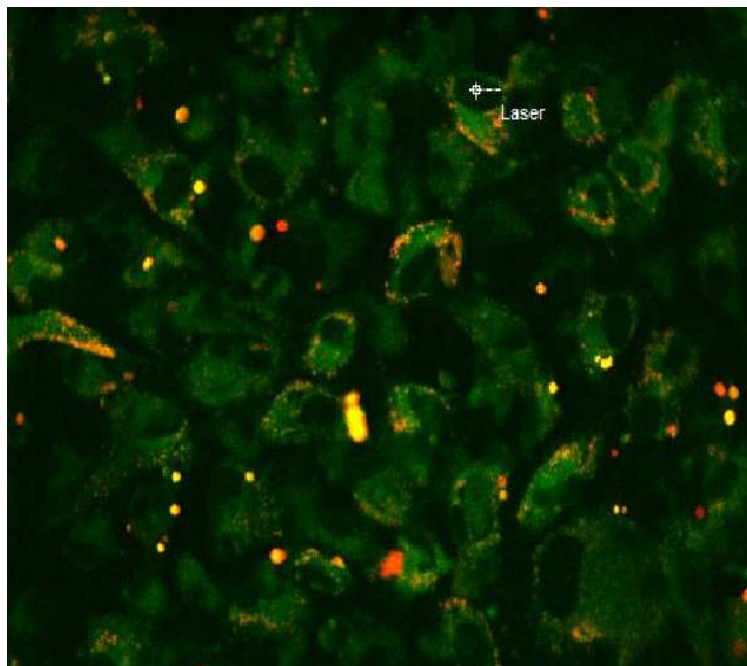


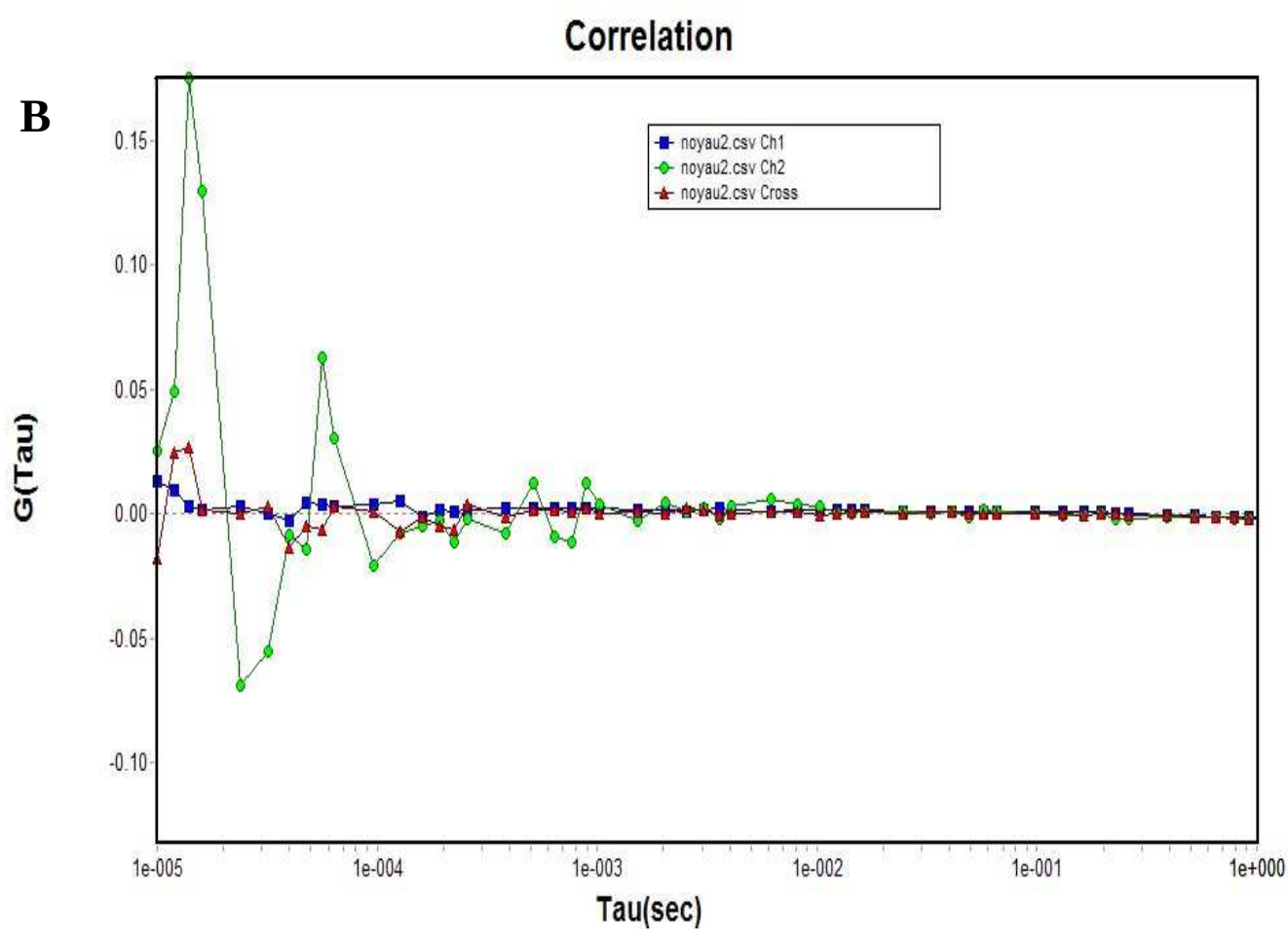
Figure-III.17 C : mesures de FRET en microscopie confocale et en FCS sur les HUVECs fixées à l'aide de paraformaldéhyde (0,1%), mais préalablement incubées avec DiI-DiO-LDL (10 μ g/mL) à 37°C.

Pour valider la provenance des signaux (FRET), nous avons effectué des mesures de FRET en FCS en microscopie confocale au niveau du noyau cellulaire pour confirmer que la fluorescence obtenue par microscopie et la cross-corrélation obtenue par FCS ne sont pas parasitées et proviennent uniquement des deux molécules (DiI et DiO) couplées aux LDL, ceci confirme donc l'absence des molécules au niveau du noyau (Figure-III.18 A B). Par contre, d'autres expérimentations nous ont permis de confirmer la présence des LDL, soit liées uniquement à l'une des deux sondes ou soit avec les deux à la fois, mais avec une prédominance de l'une ou l'autre (Figure-III.19 A B C).



A

Figure-III.18 A B : Contrôle de l'absence du signal de FRET et de Corrélation croisée de DiI et DiO au niveau du noyau cellulaire des HUVECs incubées avec DiI-DiO-LDL ($10 \mu\text{g/mL}$) à 37°C .



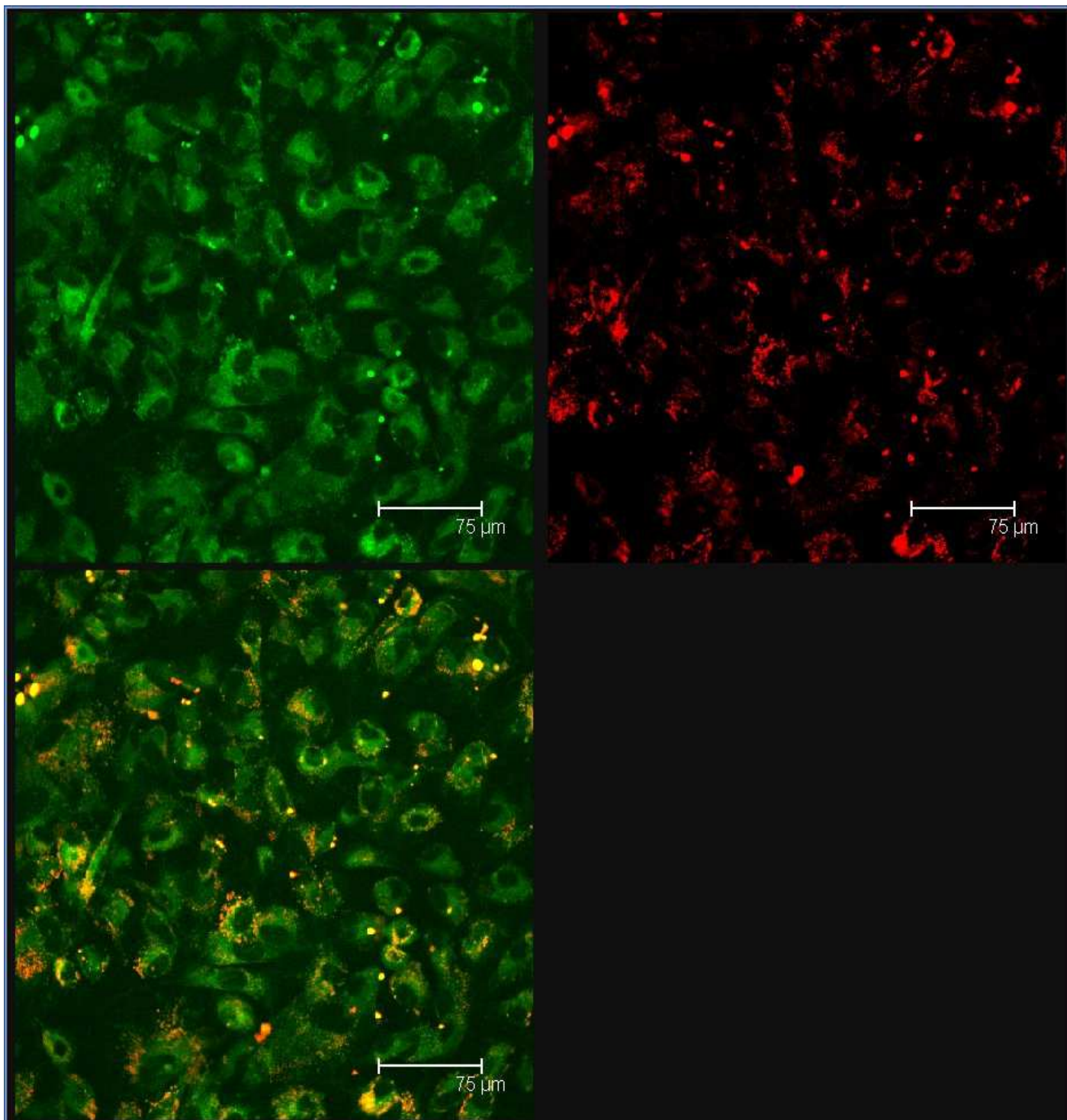


Figure-III.19 A : HUVECs incubées avec DiI-DiO-LDL ((10 $\mu\text{g/mL}$) à 37°C.

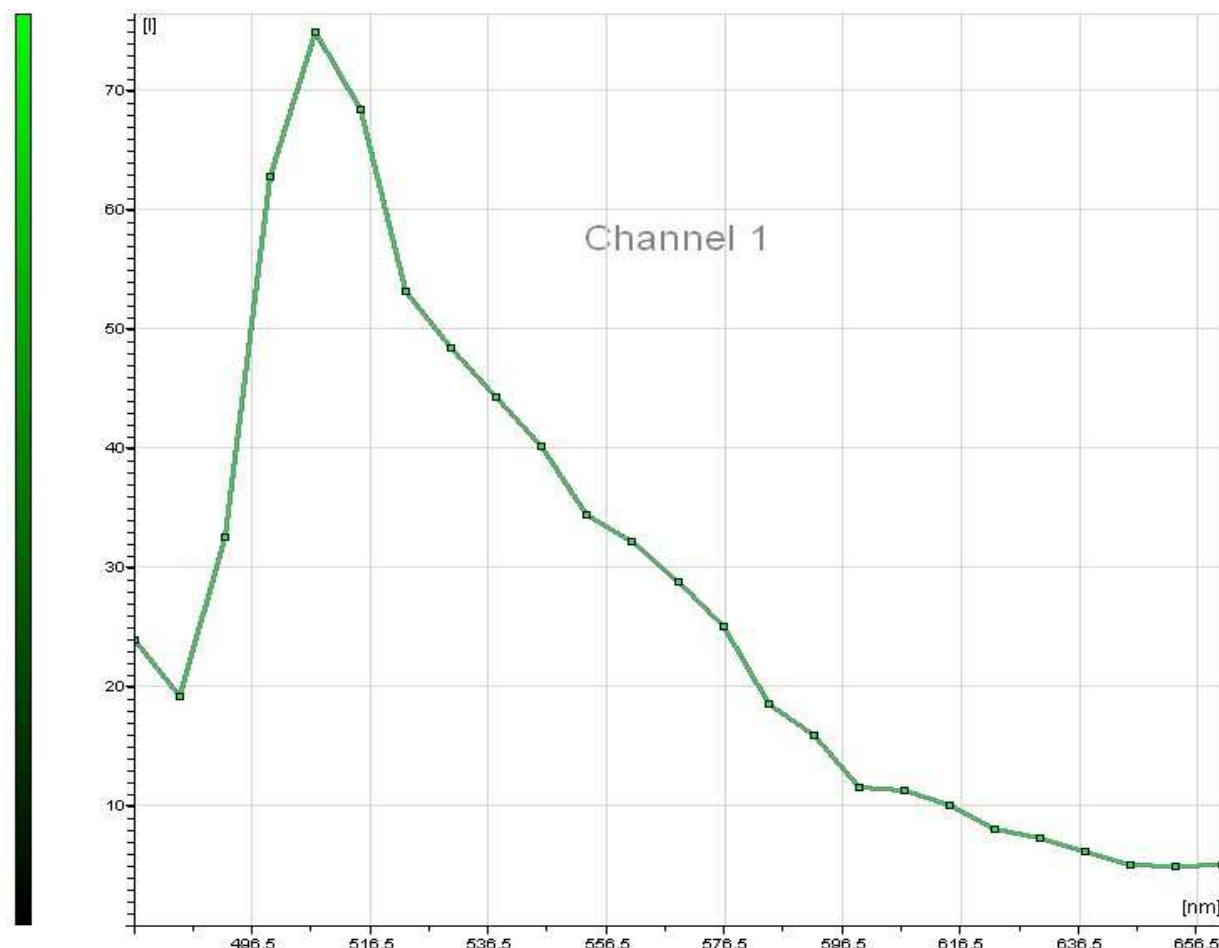


Figure III.19 B : Spectre d'émission de fluorescence DiI-DiO_LDL dans les HUVECs fixées après incubation avec DiI-DiO-LDL ($10 \mu\text{g/mL}$) à 37°C .

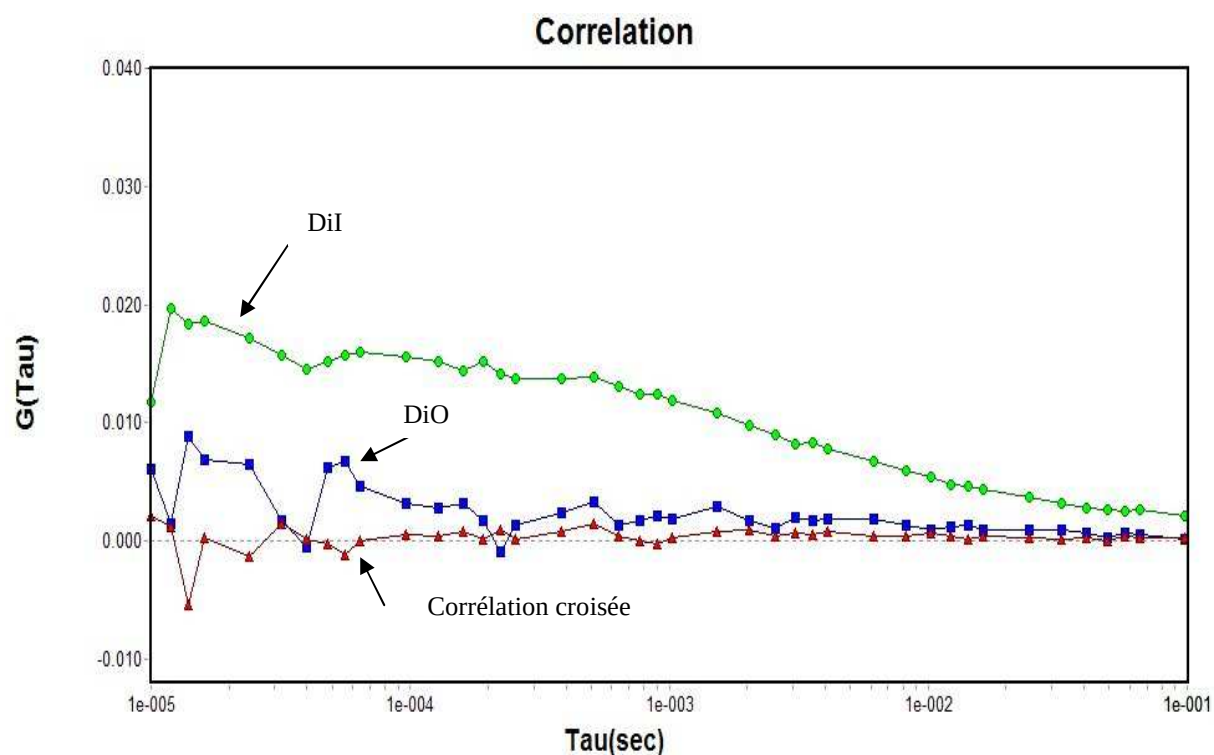


Figure-III.19 C : Signal du FRET important mesuré dans les HUVECs vivantes incubées avec DiI-DiO-LDL ($10 \mu\text{g/mL}$) à 37°C .

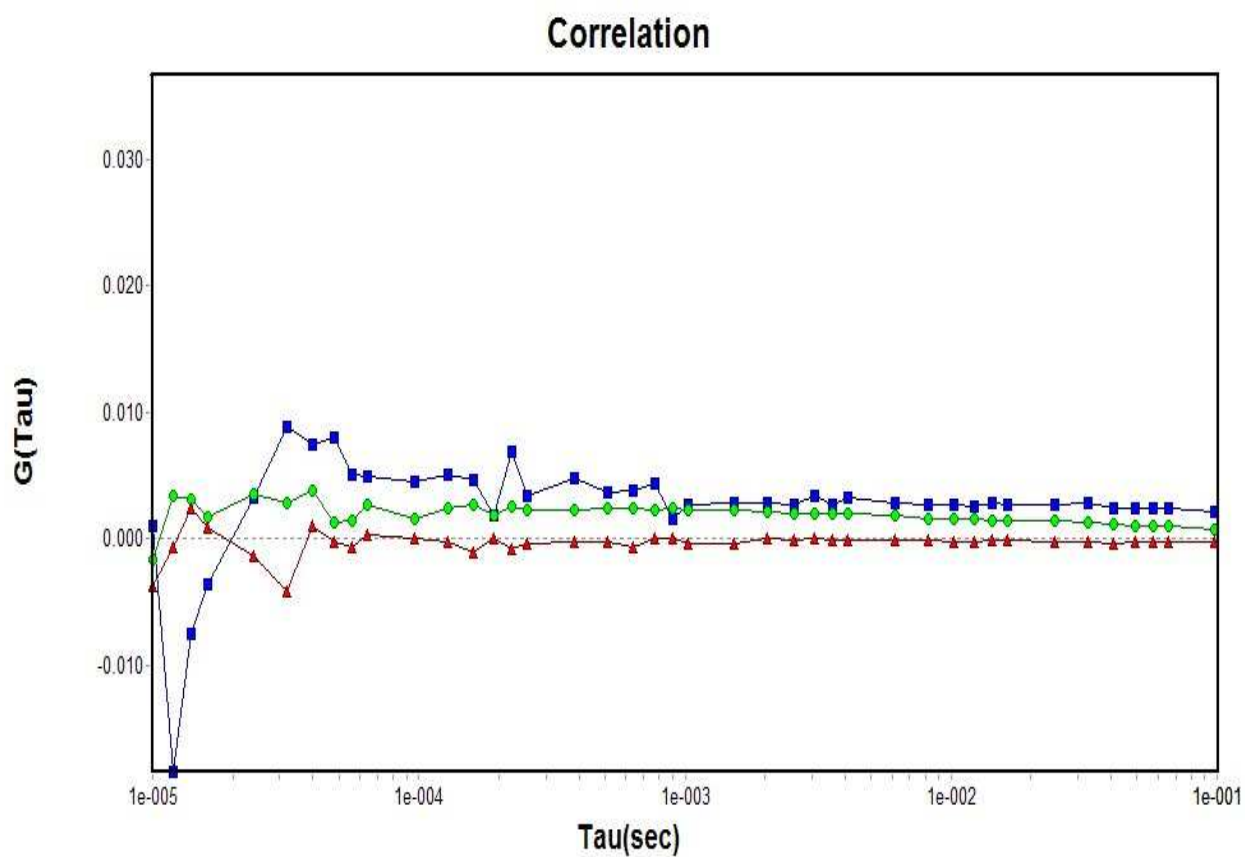


Figure-III.19 D : Signal du FRET faible dans les HUVECs après dégradation après 24 h d'incubation avec DiI-DiO-LDL ($10 \mu\text{g/mL}$) à 37°C .

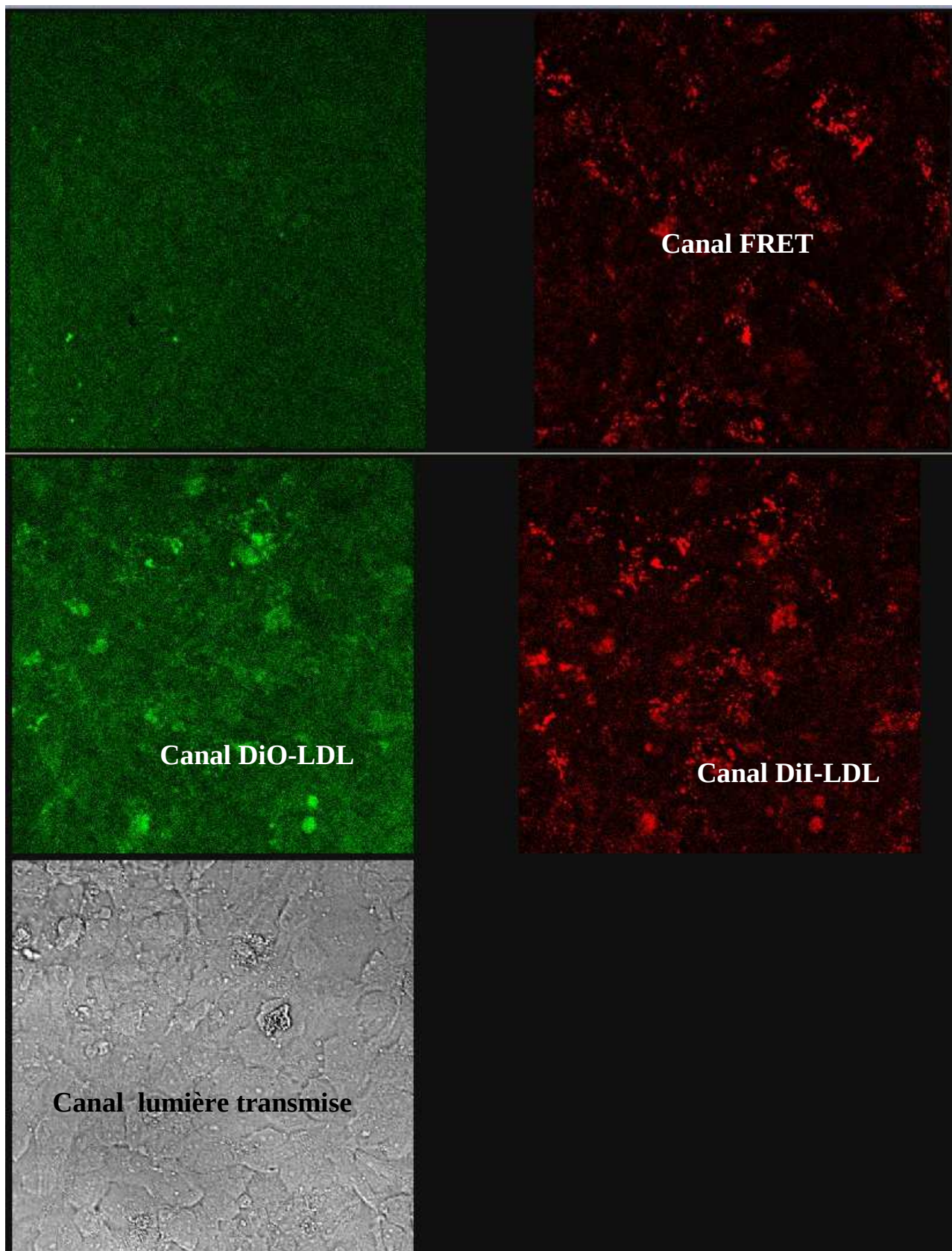
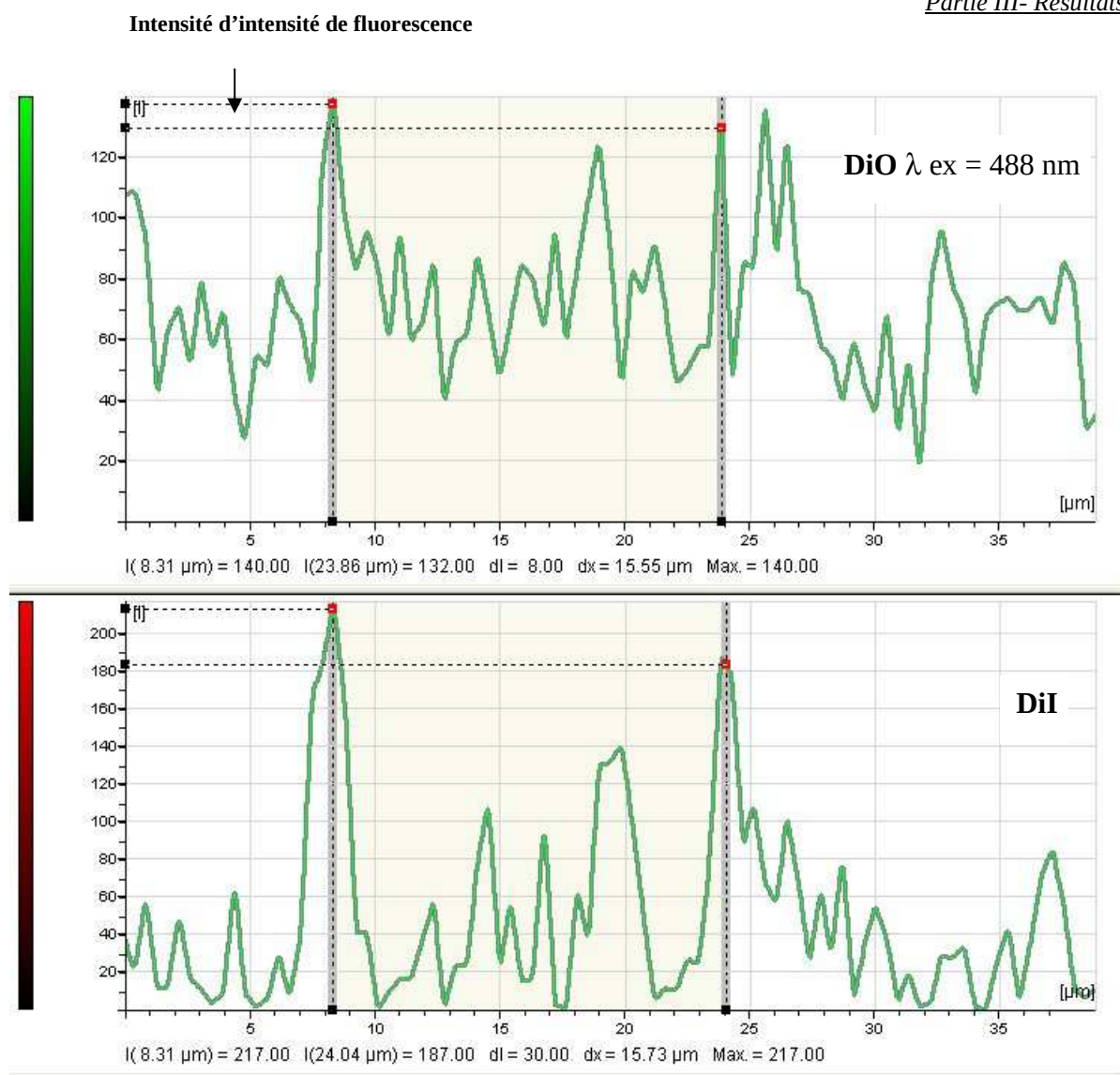


Figure-III.20 A : Visualisation des images transmises par les différents canaux utilisés dans nos expérimentations.



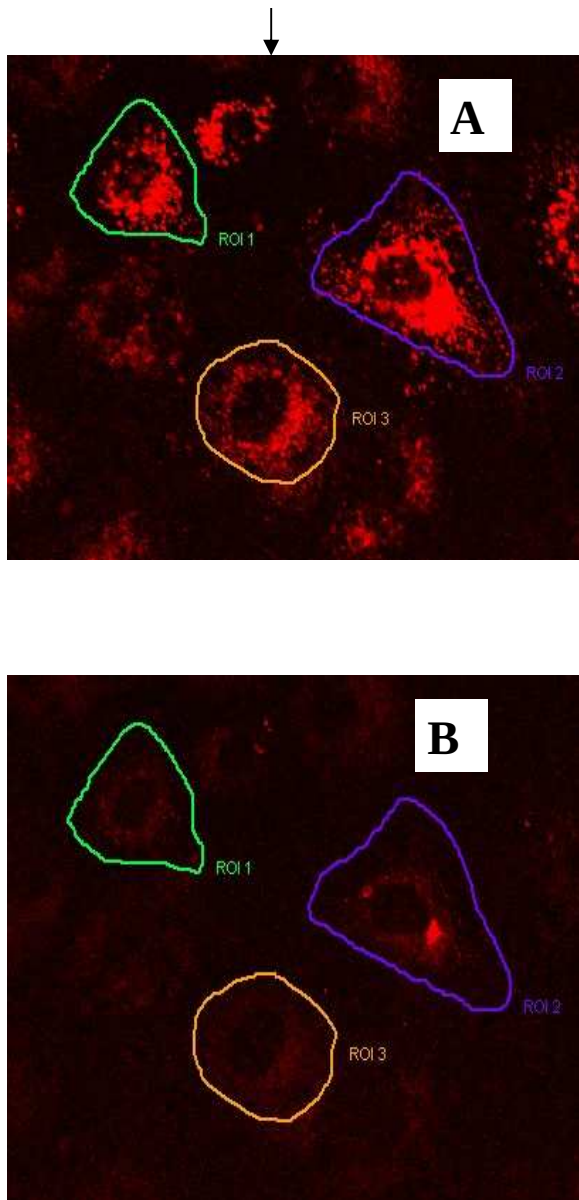
DiO (Max vert) = 140
 DiI (Max rouge) = 217

Figure-III.20 B : Profil de distribution de l'intensité de fluorescence montrant la superposition des deux signaux (DiO et DiI) et la présence du FRET sur la même vésicule dans la cellule.

III.6.3 – Dégradation des LDL par le Triton (TX100) dans les HUVECs fixées en statique

Les résultats présentés dans cette partie, représentent le témoin positif de la dégradation des LDL. D'après ces résultats (Figure-III.21 A-A' et B-B'), nous pouvons constater l'effet significatif du Triton-X100 (0,1%) sur la dégradation des LDL après une période de 1 min pour des HUVECs (préalablement incubées à 37°C pendant environ 4 h dans un milieu complet contenant du DiI-LDL (10 $\mu\text{g/mL}$) (voir la partie II-4 de ce manuscrit).

A-B : superposition des coupes sériées (Z) sur 12 μm d'épaisseur à travers la cellule



A'-B' : distribution des intensités de fluorescence après reconstitution 3D à l'aide des coupes sériées

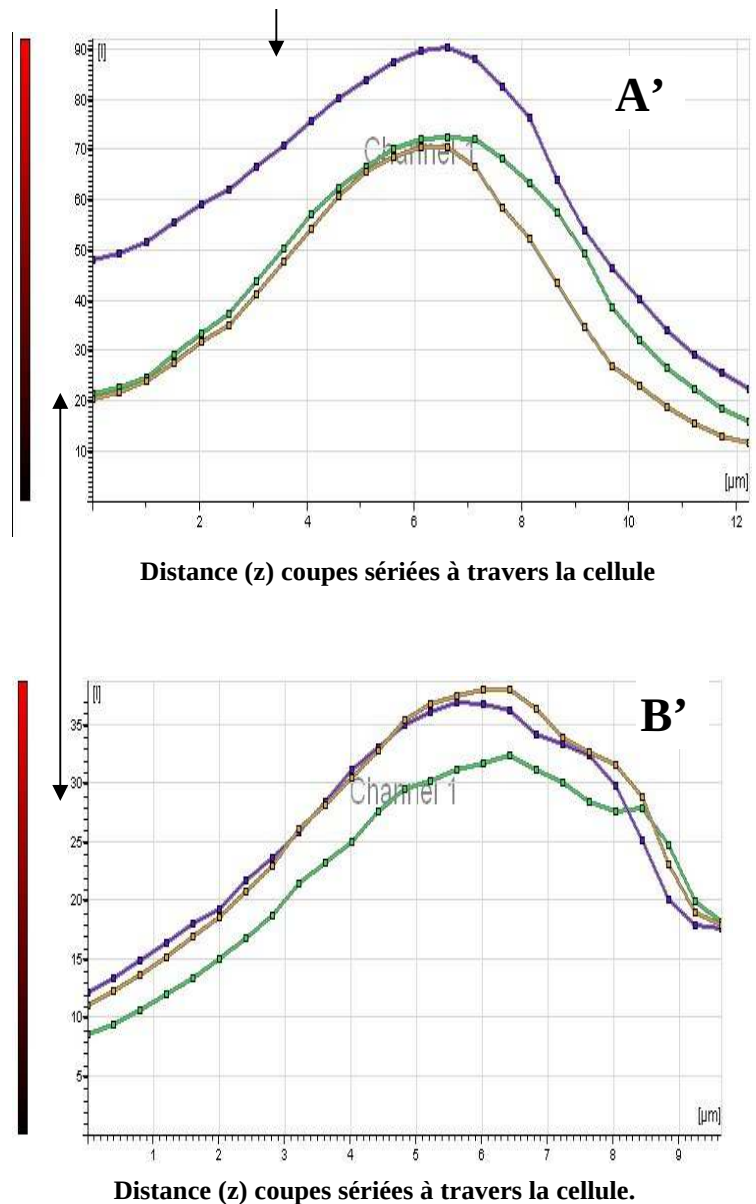


Figure-III.21 A-A' et B-B' : Supersposition des coupes sériées (z) sur 12 μm d'épaisseur de la cellule. Effet du Triton-X100 (0,1%) sur la dégradation des LDL dans les HUVECs préalablement incubées avec du DiI-LDL (10 $\mu\text{g/mL}$) à 37°C pendant environ 4 h. Trois cellules individuelles représentant les différentes zones d'intérêt (ROI 1, ROI 2 et ROI) tracées sur la monocouche de d'HUVECs ont été choisies pour démontrer l'effet du Triton-X100. Acquisition d'images en 3D à l'aide du microscope confocal (Leica SP2-AOBS, Germany) objectif x40. **A** : Image de superposition des coupes sériées (Z) sur 12 μm d'épaisseur à travers la cellule, avant l'addition du Triton-X100 ; **B** : Image de superposition des coupes sériées (Z) sur 12 μm d'épaisseur à travers la cellule, obtenue après 1 min suivant l'addition du Triton-X100 sur les cellules ; **A'** et **B'** représentent respectivement la distribution intensités de fluorescence du DiI couplé aux LDL avant et après l'addition du Triton-X100 aux cellules.

III.6.4 – Effet du TNF-alpha sur l'internalisation des LDL dans les cellules

Les résultats de nos expérimentations montrent que lorsque les cellules sont incubées avec les LDL en présence du TNF-alpha pour simuler les conditions pathologiques *in vitro*, l'internalisation des LDL est activée, les données sont représentées dans la partie Partie VI-Publications du présent manuscrit (cf. **Article 1 : Clinical Hemorheology and Microcirculation, 2005, 33: 243-251**).

III.6.5 – Internalisation et dégradation des ox-LDL

L'incubation des cellules en présence des LDL oxydée (ox-LDL) à une concentration de 10 µg/mL pendant 120 minutes à 37°C, augmente l'internalisation et la dégradation des LDL d'une part, et lorsque les cellules sont en contact prolongé avec ces LDL pour une période de plus de 4 h, les cellules se détachaient du tapis cellulaire soumis à un tau de cisaillement minimal (< 1 Pa). Ce phénomène pourrait expliquer l'effet cytotoxique des formes oxydées des LDL mis en évidence par de nombreux travaux. Les résultats de cette partie sont présentés dans la Partie VI-Publications du présent manuscrit (cf. **Article 1 : Clinical Hemorheology and Microcirculation, 2005, 33: 243-251**).

PARTIE IV

DISCUSSION – CONCLUSIONS – PERSPECTIVES

DISCUSSION – CONCLUSIONS

Les effets des paramètres de l'environnement, tels que les contraintes mécaniques locales (cisaillement ou pression) ou la charge électrique des vaisseaux sur l'internalisation des LDL-Cholestérol au niveau de l'endothélium vasculaire sont encore mal connus. Etant donné l'importance des maladies cardiovasculaires liées aux dyslipidémies dans les problèmes de santé publique, il est important de connaître ces paramètres. En effet, non seulement les LDL sont impliquées dans la formation des plaques d'athéromes, mais celles-ci apparaissent aux endroits du lit vasculaire où le flux est perturbé (bifurcations, sténoses, ...).

L'objectif de nos travaux était de **développer une approche méthodologique** et d'en étudier sa faisabilité pour analyser d'une part, la fixation et l'internalisation des lipoprotéines dans les cellules endothéliales vasculaires humaines, et d'autre part, d'en suivre la dégradation en présence ou en l'absence des contraintes de cisaillement. La microscopie confocale couplée à des mesures de corrélation de fluorescence, nous a permis de contrôler le rendement du marquage des LDL et de leur dégradation. Des mesures de transfert d'énergie (FRET) nous ont permis de contrôler l'intégrité structurale des LDL après un double marquage avec deux fluorophores complémentaires, le perchlorate de 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tétraméthylindocarbocyanine (DiO) comme donneur et le perchlorate de 3,3'-dioctadécyloxa-carbocyanine (DiI) comme récepteur.

Les mesures ont été réalisées principalement avec des HUVECs, mais également des ECV304.

Dans un premier temps, nous nous sommes assurés du **phénotype** de nos cellules endothéliales vasculaires humaines (HUVECs), par le contrôle de la production de facteur von Willebrand, marqueurs spécifiques des cellules endothéliales. De la même manière, nous avons contrôlé les caractéristiques spectroscopiques des deux fluorophores (DiO, DiI), afin d'éviter toute interprétation artéfactuelle.

Dans un second temps, nous avons mesuré **le taux du marquage simultané des LDL par les deux fluorophores** en utilisant les techniques de corrélation de fluorescence. En effet, en microscopie de corrélation croisée de fluorescence (FCCS), la fluctuation temporelle de la diffusion de plusieurs molécules fluorescentes est mesurée dans un volume d'observation très restreint ($V_{eff}^{31} = 2,29 \pm 0,07 \text{ fL}$). L'amplitude à l'origine étant égale à l'inverse du nombre de molécules présentes dans le volume d'observation, nous avons obtenu une information sur

la concentration de l'échantillon pour chaque fluorophore. Par ailleurs, le point d'inflexion de la fonction de corrélation correspondant approximativement au temps moyen durant lequel une molécule reste dans le volume d'observation, nous avons pu déterminer son coefficient de diffusion. D'après ces travaux, nous avons pu estimer que le taux de marquage des LDL par les deux sondes fluorescentes était **proche de 30%**, ce qui représente un taux important permettant de considérer les données comme interprétables.

La durée de vie moyenne mesurée expérimentalement par la technique de **FLIM**, pour le **DiO couplé aux LDL** dans les HUVECs suite à une excitation en mode multiphoton ($\lambda_{ex} = 800 \text{ nm}$) des molécules est de l'ordre de $2\,100 \text{ ps} \pm 800$ par ajustement d'ordre 1, tandis celle du **DiO couplé aux DiI-LDL** mesurée dans les mêmes conditions est de l'ordre de $320 \text{ ps} \pm 400$. Cette diminution de la durée de vie du donneur DiO (de $2\,100 \text{ ps}$ à 320 ps) en présence de DiI reflète un transfert d'énergie dépendante de la proximité moléculaire des deux partenaires sur la molécule de LDL. Ce transfert est également caractérisé par la diminution du spectre d'émission caractéristique du DiO et l'augmentation du spectre d'émission caractéristique du DiI.

Le pourcentage de molécules participant au processus FRET calculé expérimentalement en fonction du rapport DiI intégré et DiI FRET est environ 82,84 %. Ce qui signifie que **82,84 % des molécules de DiI portées par les LDL sont sujets au processus de FRET avec le DiO**.

Par ailleurs, ces approches d'une part, se sont révélées complémentaires dans l'étude de la dégradation des LDL, puisqu'elles donnent des informations sur la présence d'un double marquage sur une même molécule de LDL ; et d'autre part, elles nous ont permis de valider le processus de FRET préalable à l'étude de la cinétique de fixation, d'internalisation et de dégradation des LDL doublement marquées dans les HUVECs.

Une fois ces résultats plus méthodologiques acquis, nous avons étudié **la fixation et l'internalisation des LDL** marquées dans les cellules. Il est apparu que les LDL marquées avec du DiO ou du DiI ont présenté des cinétiques d'internalisation semblables. Les sondes n'ont donc pas d'influence directe sur les propriétés des LDL, notamment sur leur site de fixation aux récepteurs aux LDL présents à la surface des cellules endothéliales.

En revanche, la présence de contraintes mécaniques, et notamment de contraintes de cisaillement physiologiques (de l'ordre de 0,5 à 1,5 Pa) n'inhibe pas la fixation des LDL à la surface cellulaire, mais augmente de manière significative l'entrée des LDL dans les cellules.

Les cinétiques d'internalisation réalisées avec l'une ou les deux sondes ont montré que le temps d'internalisation passait d'environ 4 heures à 1 heure selon que l'on était en absence ou en présence d'une contrainte de cisaillement. Nous avons également pu montrer la localisation des LDL dans la cellule en fonction du temps.

Ces cinétiques d'internalisation ont été réalisées sur une période de 0 à 24 heures, nous permettant de suivre également la **dégradation des LDL** par la cellule. Cependant, ce paramètre n'a pu être étudié que dans le cas du double marquage des LDL. En effet, les méthodes que nous avons utilisées nous permettent, par le suivi des caractéristiques spectroscopiques des deux sondes fluorescentes utilisées, de mettre en évidence des interactions nécessitant une proximité immédiate des 2 fluorophores, le donneur et l'accepteur d'électron ne devront pas être séparés de plus de 10 nm dans le cas du transfert d'énergie (FRET). Dans un premier temps, nous avons contrôlé la validité de cette approche par l'étude de la dégradation des LDL induite par un détergent (Triton X-100).

Les mesures nous ont permis donc de visualiser la dégradation des LDL en temps réel et *in situ*, en recueillant simultanément les images en microscopie de fluorescence et les valeurs d'intensité de fluorescence caractéristiques de la présence de FRET, dans notre cas $\lambda_{em} = 543$ nm pour les sondes après transfert, contre $\lambda_{em} = 515$ nm pour le DiO et $\lambda_{em} = 610$ nm pour le DiI en absence d'interactions entre les 2 sondes. D'après nos données, et dans ces conditions, il est apparu que la dégradation des LDL par la cellule débute à la 4^{ème} heure après internalisation des LDL dans les cellules. De plus, ces résultats ont été confirmés par les mesures de corrélation croisée de fluorescence.

En conclusion de notre travail, nous avons montré la faisabilité de cette approche particulière pour l'étude du comportement des LDL dans les cellules endothéliales (valable également pour d'autres cellules, telles que les cellules musculaires lisses, *cf. article 3 ci-joint à ce manuscrit*). Cependant, il reste encore de nombreuses études à réaliser pour connaître le comportement des LDL et pour extrapoler vers les mécanismes cellulaires et moléculaires des maladies cardiovasculaires.

PERSPECTIVES

Ces travaux ont été réalisés sur des LDL natives. Cependant, *in vivo*, ces lipoprotéines sont le plus souvent sous leurs formes oxydées lorsqu'elles sont en présence de cellules endothéliales. Nous avons montré, dans une étude préliminaire, que l'internalisation de LDL

oxydées sous contraintes de cisaillement semblait plus rapide que celle de LDL natives. Cependant ces résultats sont à confirmer.

Il serait également nécessaire de travailler avec des LDL-Cholestérol, qui sont la forme circulante courante de ces lipoprotéines. De plus, leurs concentrations, augmentées dans les dyslipidémies, pourraient avoir une influence sur leur fixation, leur internalisation et leur dégradation. Afin de préciser les différents mécanismes de l'interaction des LDL avec l'endothélium, il serait également intéressant de suivre par cytométrie en flux et microscopie, le nombre et la répartition de récepteurs à LDL sur les cellules.

Par ailleurs, il s'agissait d'un des objectifs initiaux de ma thèse que les contraintes liées aux mises au point expérimentales n'ont pas permis, l'incidence des sites anioniques (charges négatives membranaires) sur l'internalisation des LDL mériterait une étude (Born *et al*,...). En effet, la perfusion de dermatan sulfate (négatif) dans les carotides de lapin entraîne une diminution significative de l'adsorption des LDL (Ludlam et Born, 1994). Par ailleurs, le rôle majeur du NO dans l'athérosclérose, aussi bien production que dégradation, pourrait être envisagé avec notre modèle expérimental qui permet par imagerie cellulaire une approche plus originale de la cinétique d'internalisation dans la cellule (alors que toutes les études précédentes ont été menées par méthodes isotopiques donc plus contraignantes). Ainsi, les travaux de Ohara *et al*..., et Pritchard *et al*,...ont montré que la libération de composés nitroylés est augmentée par des vaisseaux atherosclérotiques ou hypercholestérolémiques avec une diminution de l'activité du NO. Ces observations s'expliqueraient par une augmentation de radicaux libres entraînant la dégradation du NO.

En fait, en perspectives à notre travail il serait intéressant d'étudier les principales fonctions endothéliales : récepteurs tels que ICAM -1, VCAM... et synthèses de composés tels que NO, ET1, Facteur von Willebrand....ainsi que l'effet d'agents vasoactifs comme les catécholamines qui augmenteraient l'adsorption du LDL (Cardona-Sanclemente et Born, 1992, Shafi *et al*, 1992) ou la réserpine qui la diminuerait. Enfin, et ceci rejoindrait en partie mes travaux de master sur les cellules musculaires lisses, des études pourraient être effectuées soit sur des vaisseaux natifs ou soit par co-culture des cellules musculaires lisses et cellules endothéliales. Le modèle de biomatériaux développé au laboratoire avec des films de polyélectrolytes pourrait s'avérer être un bon modèle de compréhension.

PARTIE V

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANDERSON TJ, GERHARD MD, MEREDITH IT, CHARBONNEAU F, DELAGRANGE D, CREAGER MA, SEWYN AP

BACIA K., SCHERFELD D, KAHYA N, SCWILLE P. Fluorescence Correlation Spectroscopy Relates raft in Model and native Membranes. **Biophysical journal** Vol 87, 2004, p1034-1043.

BONEU B., CAZENAVE J. Introduction à l'étude de l'hémostase et de la thrombose. 2^{ème} Edition révisée, 1997, **Boehringer Ingelheim France**, pp 8-15.

BOREN J., GUSTAFSSON M., SKALEN K., FLOOD C., T.L. Role of extracellular retention of low density lipoproteins in atherosclerosis. **Curr Opin Lipidol**, 2000 :11:451-456.

BRADDOCK M., SCHWACHTGEN J.L., HOUSTON P., DICKSON M.C., LEE M.J., CAMPBELL C.J. Fluid shear stress modulation of gene expression in endothelial cells. **News Physiol Sci**, 1998, 13:241-246.

BROWN MS., GOLDSTEIN J.L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science**, 1986, 232:34-47.

CARDONA-SANCLEMENTE LE, BORN GVR. Adrenaline increases the uptake of low-density lipoproteins in carotid arteries of rabbits. **Artherosclerosis**, 1992, 96: 215-218.

CARDONA-SANCLEMENTE LE, BORN GVR. Effect of inhibition of nitric oxide synthesis on the uptake of LDL and fibrinogen by arterial walls and other organs of the rat. **Br J Pharmacol**, 1995, 114: 1490-1494.

CAREW TE., PITTMAN R.C., MARCHAND E.R., STEINBERG D. Measurement in vivo of irreversible degradation of low density lipoprotein in the rabbit aorta : predominance of intimal degradation. **Arteriosclerosis**, 1984, 4 : 214-224.

CARO C., FITZ-GERALD J., SCHROTER R. Arterial wall shear and distribution of early atheroma in man. **Nature**, 1969, 223 : 1159-1161.

CHAPPEY O., WAUTIER M.P., WAUTIER J.L. Structure et fonctions de l'endothélium.

La revue du Parisien (Paris), 1997, 47 : 2223-2226.

CHAPMAN M.J. Atherogenicity of Low Density Lipoprotein : mechanisms. In : Barter PJ., Rye KA. **Plasma Lipids and their role in disease**, Taylor and Francis, **London**. 1999.

CHARARA J. Effet de l'écoulement sur le devenir des cellules endothéliales : dispositifs d'études, revue et commentaires. **RBM**, 1993, 15 : 435-445.

CHARLES C. MICHEL, C. R. NEAL. Pathways through microvascular endothelium of normal and increased permeability. In: **Vascular Endothelium, Physiology, pathology, and Therapeutic Opportunities**. Born G.V.R. and Schwartz C.J. Schattauer, Stuttgart, 1997: 37-48

CHIU J., WANG D., CHIEN S., SKALAK R., USAMI S. Effects of disturbed flow on endothelial cells. **J Biomechanical Engineering**, 1998, 120, 2-8.

COLIN J. SCHWARTZ. Some regulatory components of endothelial endocytosis and transcytosis. In: **Vascular Endothelium, Physiology, pathology, and Therapeutic Opportunities**. Born G.V.R. and Schwartz C.J. Schattauer, Stuttgart, 1997: 49-60.

C. BOURA, H. KERDJOUDJ, V. MOBY, D. VAUTER, D. DUMAS, P. CHAAF, J.C. VOEGEL, J-F. STOLTZ, P. MENU. Initial adhesion of endothelial cells on polyelectrolyte multilayer film. **Bio-med; Mater Eng**, 2006, 16 : S115-121.

DAVIES P., TRIPATHI S. Mechanical stress mechanisms and the cell. An endothelial paradigm. **Circ Res**, 1993, 2 : 239-245.

DAVIES M.J. Stability and instability : Two faces of coronary atherosclerosis - The Paul Dudley White Lecture 1995. **Circulation**, 1996 : 94 : 2013-2020.

DAVIES P.F., VOLIN M.V., JOSEPH L., BARBEE K.A. (1997b) Endothelial response to hemodynamic shear stress : spatial and temporal considerations. **Vascular Endothelium, Physiology, Pathology, and Therapeutic Opportunities**. Born G.V.R. and Schwartz C.J. (ed) New horizon series; Vol.3 Schattauer, Stuttgart, 1997b, pp 167-176.

DAVIES P., REMUZZI A., GORDON E., DEWEY JR. C., GIMBRONE JR. M. Turbulent fluid shear stress induces vascular endothelial cell turnover in vitro. **Proc Natl Acad Sci USA**, 1986, 83 : 2114-2117.

DAVIES P.F., BARBEE K.A., VOLIN M.V. ROBOTENSKYJ A., CHEN J., JOSEPH L., GRIEM M.L., WERNICK M.N., JACOBS E., POLACEK D.C., DEPAOLA N., AND BARAKAT A.I. Spatial relationships in early signaling events of flow-mediated endothelial mechanotransduction. **J Physiol**. 1997-a, 59:527-49.

DECATARINA R., LIBBY P., PENG HB, THANNIKAL VJ, RAJAVASHI TB, GIMBORE MA, SHIN WS, LIAO JK. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and pro-inflammatory cytokines. **J Clin Invest**.1995, 96 : 60-68.

DIAMOND S.L., SHAREFKIN J.B., DIEFFENBACH C., FRASIER-SCOTT K., MCINTIRE L.V. ESKIN S.G. Tissue plasminogen activator messenger RNA, levels increase in cultured human endothelial cells exposed to laminar shear stress. **J Cell Physiol**, 1990, 143 : 364-371.

DUMAS D., MULLER S., GOUIN F., BAROS F., VIRIOT M-L., STOLTZ J-F. Membrane fluidity and oxygen diffusion in cholesterol-enriched erythrocyte membrane. **Archives of Biochemistry and Biophysics**,1997, 341 : 34-39.

DUMAS D., GIGANT C., PRESLE N., CIPOLLETTA C., MIRALLES G., PAYAN E., JOUZEAU J., MAINARD D., TERLAIN B., NETTER P., STOLTZ J-F. The role of 3D-microscopy in the study of chondrocyte-matrix interaction (alginate bead or sponge, rat femoral head cap, human osteoarthritic cartilage) and pharmacological application. **Biorheology**, 2000, 37: 165-176.

DUMAS D., MULLER S., PADILLA J.J., LATGER V., WOODARD S., CARRÉ M.C., BLONDEL W., BAROS F., VIRIOT M.L., STOLTZ J-F. New trends in optical bioengineering: Applications to cell biology. **Recent Res Devel Optical Engg**, 1999, 2 : 295-315.

ERICK S.G. STROES, TON J. RABELINK. Hyperlipidemia and endothelium function. In: **Vascular Endothelium, Physiology, pathology, and Therapeutic Opportunities**. Born G.V.R. and Schwartz C.J. Schattauer, Stuttgart, 1997: 311-328. G

ENEST J. JR., COHN J.S. - Epidemiological evidence linking plasma lipoprotein disorders to atherosclerosis and other diseases. In : Barter P.J., Rye K A. **Plasma Lipids and their role in disease**. Taylor and Francis, London, 1999 : 46-48.

GIGANT C., LATGER-CANNARD V., BENSOUSSAN D., FAWZI S. FEUGIER P., BORDIGONI P., STOLTZ J-F. CD 34⁺ cells homing : Quantitative expression of adhesion molecules and adhesion of CD34⁺ cells to endothelial cells exposed to shear stress. **Biorheology**. 2003, 40 : 189-195.

GIRAL P. Athérome : anatomie pathologique, physiopathologie, épidémiologie et facteurs de risque, prévention. **Rev Prat**, 1998, 48 : 99-106.

GLAGOV S., ZARINS C., GIDDENS D.P. KU D.N. Hemodynamics and atherosclerosis. **Arch. Pathol. Lab. Med**, 1988, 112 : 1018-1031.

GOLDSTEIN JL, BROWN MS. The low density lipoprotein pathway and its relation with atherosclerosis. **Ann rev Biochem**, 1977, 46: 897-930.

GÖROG P, BORN GVR. Increased uptake of circulating low density lipoprotein and fibrinogen by arterial walls after removal of sialic from endothelial surfaces. **Br J Exp Pathol**, 1982, 63: 447-451.

GUSTAV V. R. BORN, R. MEDINA, S SHAFI, L. E. CARDONA-SANCLEMENTE. Factors influencing the transendothelial accumulation of atherogenic plasma proteins in artery walls. In: **Vascular Endothelium, Physiology, pathology, and Therapeutic Opportunities**. Born G.V.R. and Schwartz C.J. Schattauer, Stuttgart, 1997 : 299-310.

HEMLINGER G., GEIGER R.V, SCHRECK S., NEREM R. Effects of pulsatile flow on cultured vascular endothelial cell morphology. **J Biomech Eng**, 1991, 113 : 123-31.

HSIEH H.J., LI N.Q., FRANGOS J.A. Pulsatile and steady flow induces c-fos expression in human endothelial cells. **J Cell Physiol**, 1993, 154:143-151.

BARKEFORS I., K. AIDUN C., ULRIKA EGERTSDOTTER E.M. Effect of fluid shear stress on endocytosis of heparin sulfate and low density lipoproteins. **J of Biomed and Botechnology**, 2007, ID65136.

HESSLER J.R., MOREL D.W., LEWIS L.J., CHISOLM G.M. Lipoprotein oxidation and lipoprotein-induced cytotoxicity. **Arteriosclerosis**, 1983, 3 : 215-222.

JAFFE E.A., NACHMAN R.L., BECHER C.G., MINICK C.R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. **J Clin Invest**, 1973, 52 : 2745-2756.

KU D., GIDDENS D., ZARINS C., GLAGOV S. Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation. Positive correlation between plaque location and low oscillating shear stress. **Arteriosclerosis**, 1985, 5 (3) : 293-302.

LABRADOR V., LI Y.S., MULLER S., STOLTZ J-F, CHIEN S. Interactions of mechanotransduction pathways. **Biorheology**, 2003. 40 : 47-52.

LABRADOR V., RIHA P., MULLER S., DUMAS D., WANG X., STOLTZ J-F. The strenght of integrin binding on normal neutrophils and endothelial cells. **European Biophysics Journal**, 2003, 32: 684-688.

LEGRAND Y. Le Sang et les vaisseaux. **Hermann, France**, 1987, pp 3-29.

LUDLAM C, ARISAWA A, BORN GVR. Increased uptake of low density lipoprotein after heparinase perfusion of carotid arteries anaesthetised rabbits. **J Physiol (Lond)**, 1991, 446: 220.

Luscher TF. The endothelium as starget and mediator of cardiovascular disease. **Eur J clin Invest**, 1993, 23: 670-685.

LUDLAM C, BORN GVR. Importance of electro-neagive charge properties of the arterial endothelium in relation to atherogenesis: effec of dermatan sulphate on the intravascular clearance of low density lipoproteins in rabbits and mice in vivo. **Siegenthaler W, Hass R, eds. Publikakoionen der Jung-Stiftung für Wissenschaft und Forschung, Hamburg**, 1994, 6: 233-241.

MULLER S., SUN R., LEGRAND S., LABRADOR V., WANG X., STOLTZ J-F. Influence of laminar shear stress on cytoskeleton and ICAM-1 expression of endothelial cells. **Appl. Mech. and Engineering**, 1999, 4 : 151-156.

MULLER S., LABRADOR V., DA ISLALA N., DUMAS D., SUN RJ, WANG X., WEI L., FAWZI-GRANCHER S., YANG W., TRAORÉ M., BOURA C., BENSOUSSAN D., ELJAAFARI A., STOLTZ J-F. From Hemorheology to vascular mechanobiology: An overview. **Clin. Hemorheology**. 2004, 30 (3-4) : 185-200.

NAPOHI C., D'ARMIENTO EP., MANCINI E P. et coll. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. **J Clin Invest**, 1997, 100 : 2680-2690.

OHARA Y., TE PETERSON and D.G HARRISON. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. **J Clin Invest**, 1993, 91 : 2546-2551.

PRITCHARD K.A., L. GROSZEK? D.M SMALLEY, W.C. SESSA, M.WU, P. VILLALON, M.S WOLIN and M.B STEMERMAN. Native low density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxide synthase generation of superoxide anion. *Cir. Res.* 1995, 77: 510-518.

ROSS R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. **N Engl J Med**, 1999, 340 : 115-126.

ROSS R. The pathogenesis of atherosclerosis : a perspective for the 1990s. **Nature**, 1993, 362 : 801-809.

RUGGERI Z.M. ZIMMERMAN T.S. von Willebrand factor and von Willebrand disease. **Blood**, 1987, 70 : 895-904.

SCHWENKE D C., CAREW T E. Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits, I : focal increases in arterial LDL concentration precede development of fatty streak lesions. **Arteriosclerosis**, 1989, 9 : 895-907.

SCHWENKE D C., CAREW T E. Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits, II : Selective retention of LDL vs. selective increases in LDL permeability in susceptible sites of arteries. **Arteriosclerosis**, 1989, 9 : 908-918.

SHAFI S, CUSACK NJ, BORN GVR. Increased uptake of methyld low density lipoprotein induced by noradrenaline in carotid arteries of anaesthetised rabbits. **Procc R Soc Lond B**, 1989, 235 : 289-298.

SHI W., HABERLAND M E., JIEN M L., SHIH D M., LUSIS A.J. Endothelial responses to oxidized lipoproteins determine genetic susceptibility to atherosclerosis in mice. **Circulation**, 2000, 102 :75-81.

SPRINGER T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. **Cell**, 1994, 76:301-314.

STARY H., BLANKENHORM D., CHANDLER A., GLAGOV S., INSULL W., RICHARDSON M., ROSENFELD M., SCHAFFER S., SCHWARTZ C., WAGNER W., WISSLER R. A definition of intima of human arteries and of its atherosclerosis-pron regions, A report from the committee on vascular lesions of the council on arteriosclerosis, American Heart Association. **Circulation**, 1992, 85 : 391-405.

STEINBERG D., GOTTO A.M. JR. Preventing coronary artery disease by lowering cholesterol levels : fifty years from bench to bedside. **JAMA**. 1999, 282 : 2043-2050.

STOLTZ J.F., BOISSEAU M., MULLER S., WANG X., LEGRAND S., LABRADOR M.V. Hémo-rhéologie et cellules endothéliales vasculaires. **Journal des Maladies Vasculaires** (Paris), 1999, 24 (2) : 99-109.

STOLTZ J.F., DUMAS D., WANG X., PAYAN E., MAINARD D., PAULUS F., MAURICE G., NETTER P., MULLER S. Influence of mechanical forces on the cells and tissues. **Biorheology**, 2000, 37:3-14.

STOLTZ J-F., WANG X. From Biomechanics to Mechanobiolgy. **Biorheology**. 2002, 39 : 5-10.

STOLTZ J-F., MULLER S., KADI A., SUN R. Endothelial cell biology and influence of mechanical parameters. **Clin. Hemorheol and Microcirul.**, 2007, 37: 5-8.

SUN R., MULLER S., WANG X., ZHUANG FY., STOLTZ J-F. Regulation of von Willebrand factor of human endothelial cells exposed to laminar flows: an in vitro study. **Clin. Hemorheol and Microcircul.**, 2000, 23 : 1-11.

SUN R., MULLER S., STOLTZ J-F., WANG X. Shear stress induces caveolin-1 translocation in cultured endothelial cells, **European Biophysical Journal**, 2002, 30 : 605-611.

TOUSSAINT-LATGER-HACQUARD M., DEVAUX Y., LONGROIS D., FAIVRE-FIORINA B., MULLER S. ? STOLTZ J-F. ? VIGNERON C., MENU P. Biological response of human aortic endothelial cells exposed to a cellular hemoglobin solution developed as a potential blood substitutes. **Live Sciences**, 2003, 72 : 1143-1157.

VASILE E., SIMIONESCU M., SIMIONESCU N. Visualization of the binding, endocytosis, and transcytosis of low-density lipoprotein in the arterial endothelium in situ. **J Cell Biol**, 1983, 96 : 1677-1689.

VICTOR W. M. Van HINSBERGH, GEERTEN P. Van NIEUW AMERONGEN, RICHARD DRAIJER. Regulation of permeability of human endothelial cell monolayers. In : **Vascular Endothelium, Physiology, pathology, and Therapeutic Opportunities**. Born G.V.R. and Schwartz C.J. Schattauer, Stuttgart, 1997: 61-76.

VIRIOT M.L, CARRE M.C, GEOFFROY-CHAPOTOT C. BREMBILLA A., MULLER S., STOLTZ J.F., Molecular rotors as fluorescent probes for biological studies. **Clin. Hemorheol. and Microcircul.**, 1998, &ç: 151-160.

WEI L., MULLER S., OUYANG J., STOLTZ J-F., WANG X. Changes of vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) and its phosphorylation in endothelial cells exposed to laminar flow. **Clin Hemorheol and Microcircul**, 2003, 28 : 113-120.

WILLIAMS K.J., TABAS I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 1995, 15 : 551-561.

YOUNG S.G., PARTHASARATHY S. Why are low-density lipoproteins atherogenic ? **West J Med**, 1994, 160 : 153-164.

ZHAO H., ZHUANG F, STOLTZ J-F., WANG X. Comparative study of LFA-1: ICAM-1 interaction by micropipette and flow chamber techniques. **Biorheology**, 2003 40 : 179-187.

PARTIE VI

COPIES SELECTIONS PUBLICATIONS REALISEES

Article 1

Clinical Hemorheology and Microcirculation, 2005, 33: 243-251.

(Traoré *et al.*, 2005)

Kinetics of the endocytotic pathway of Low Density Lipoprotein (LDL) in human endothelial cells line under shear stress: An *in vitro* confocal microscopy study

M. Traoré^{a,*}, R.J. Sun^{b,**}, S. Fawzi-Grancher^a, D. Dumas^a, X. Qing^b, R. Santus^c, J.-F. Stoltz^a and S. Muller^a

^a *Groupe de Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, UMR-CNRS 7563 LEMTA et IFR 111 Bioingénierie, Faculté de Médecine, 54500 Vandoeuvre lès Nancy, France*

^b *Research Institute of Clinical Medical Sciences, China–Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China*

^c *Muséum National d'Histoire Naturelle, Laboratoire de Photobiologie, 43 rue Cuvier 75231, Paris cedex 05, France*

Abstract. We studied the effect of mechanical forces (shear stress) on the kinetics of internalization of native LDL and ox-LDL in endothelial cell line ECV304. This study was performed by using Confocal microscopy and FRET with two carbocyanine dyes, 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiO) as the donor and 3,3'-dioctadecyloxacarbocyanine perchlorate (DiI) as the receptor. The cells were incubated with a culture medium containing either 10 µg/ml DiI-LDL or DiO-LDL in static conditions or subjected to a laminar flow under a Confocal Laser Scanning Microscope (SP2 Leica, Germany). The results showed: (1) the possibility to evaluate the kinetics of LDL endocytosis in living cells, (2) shear stress in comparison with control group more effectively enhanced LDL uptake, (3) ox-LDL (>50 µg/ml) >4 hours incubation was found to affect the cells as reflected by their detachment at low shear stress.

Keywords: Atherosclerosis, low density lipoproteins, shear stress, confocal microscopy, kinetics

1. Introduction

All lipoproteins that contain apolipoprotein B (apo-B), such as low-density lipoprotein (LDL), very-low-density lipoprotein (VLDL), and intermediate-density lipoprotein (IDL), tend to promote atherosclerosis [1]. Although several theories or hypothesis about atherogenesis have been proposed during the past decades, none can completely explain the whole process of the pathogenesis of atherosclerosis because this disease is associated with multiple risk factors [2]. This complex pathologic process

*Corresponding author: Mariama Traore, Groupe de Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, UMR-CNRS 7563 (LEMETA), Faculté de Médecine BP: 184, 54500 Vandoeuvre lès Nancy, France. Tel.: +33 0 3 83 68 34 56; Fax: +33 0 3 83 68 34 59; E-mail: Mariama.Traore@medecine.uhp-nancy.fr.

**Present address: Department of Life Sciences, National Natural Science Foundation of China, 100085 Beijing, PR of China.

is initiated by the formation of cholesterol-rich plaque. Studies on the pathogenesis of atherosclerosis suggest that several steps are involved [3], such as lipid accumulation in the artery wall resulting from transendothelial entry of LDL, followed by LDL oxidation and uptake by monocytes/macrophages [4], smooth muscle proliferation, and platelet aggregation. The inflammatory mediator TNF- α , which is known to contribute to apoptosis of vascular smooth muscle cells, has been shown to be intimately involved in the atherosclerotic process, being present at elevated levels in human atheroma as well as possibly being responsible for plaque rupture.

The oxidation of LDL is linked to the risk of atherosclerosis [5,6]. *In vitro* studies have demonstrated that ox-LDL is present in atherosclerotic lesions [7], and it markedly alters the function of vascular cells, monocytes and macrophages [8]. In addition, ox-LDL has been also shown to be toxic to vascular cells [9–12].

The uptake and transport of LDL by the arterial wall is a continuous dynamic process. The increased uptake in the lesion-prone areas can be due to an enhanced permeability through endothelial junctions [13] and/or LDL receptor (LDLR)-mediated endocytosis [14]. The chemical and physical causes of atherosclerosis include not only hypercholesterolemia and certain changes of plasma protein content, but also shears stress or turbulences due to increased blood pressure. Fluid shear stress and circumferential stretch play important roles in maintaining the homeostasis of the blood vessel, and they can also be pathophysiological factors in cardiovascular diseases such as atherosclerosis and hypertension. This thesis is supported by the studies demonstrating that: although every part of the arterial tree is exposed to the same concentration of plasma LDL, atherosclerotic lesions preferentially tend to occur at the regions of arterial branching and curvature [15–19] where shear stress on the vessel wall may be low and the flow may be disturbed [20,21], which suggests that local hemodynamic forces play a significant role in the focal nature of the lesions [22].

In this work, we report a feasibility study to follow-up the kinetics of the internalization of fluorescent labeled-LDL by cultured human endothelial-like cells line ECV304 under static conditions or under shear stress as dynamic conditions using a Confocal Laser Scanning Microscope (SP2 Leica, Germany). As the oxidative process occurs in atherosclerosis, the ox-LDL was used in order to study the effect of the oxidation process on the uptake of the LDL. Thus LDL and ox-LDL were labeled either with 1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) or 3,3'-dioctadecyloxacarbocyanine perchlorate (DiO) to visualize LDL binding sites in single, living cells for internalization assays.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Culture Medium M-199, Gibco Dulbecco's medium without phenol red, Foetal bovine serum (FBS) and Ultoser'G (USG) were from Gibco Co. DiI, unlabeled LDL (L-3486), labeled LDL (DiI-LDL L-3482) were purchased from Molecular Probes. Trypsin-EDTA solution and routine reagents were purchased from Sigma Chemical Co. All reagents were used according to provided instructions. For confocal laser scanning microscopy, a Leica TCS SP unit (SP2 Leica, Germany) equipped with a UV laser was used.

2.2. Cell culture

The endothelial-like cell line ECV304 were grown in M-199 medium (Gibco-Life Technologies) supplemented with heat-inactivated 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 200 mM/l glutamine, 100 units/ml penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin, 1 $\mu\text{g/ml}$ amphotericin B in a humidified air atmosphere of 5% CO_2 –95% at 37°C. For shear stress and LDL uptake experiments, the cells were seeded on a cover slides (70 $\times$ 44 mm) at 37°C in a humidified atmosphere (5% CO_2 –95% air) until confluence. Before the experiments, we first pre-incubated the cells for 1 hour at 37°C with a complete culture media of Gibco Dulbecco's medium without phenol red where 10% (v/v) FBS is replaced by 2% of USG. After this period of incubation, the cells were rinsed twice with 37°C warmed serum-free medium and ready for experimental use.

2.3. Oxidized-LDL preparation

Fresh human LDL stock solution was oxidized by incubating 1 mg/ml LDL with 10 $\mu\text{mol/l}$ CuSO_4 in PBS at 37°C for 24 hours, then dialyzed for overnight at 4°C to remove EDTA. The LDL preparations were diluted to a final concentration of 300 $\mu\text{g/ml}$ and kept at 4°C.

2.4. LDL and ox-LDL labelling

LDL or ox-LDL with protein concentration of 300 $\mu\text{g/ml}$ were labeled with 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) or 3,3'-dioctadecyloxacarbocyanine perchlorate (DiO). Details of the incubation procedure were described in a previous work [23]. All modified samples were kept at 4°C.

2.5. Shear stress experiment

A flow system was used to impose a constant laminar shear stress (1.0 Pa) on cultured ECs. In brief, a 70 $\times$ 44 mm glass slide was seeded with cells, which were cultured until reaching a confluent monolayer. During the flow experiments, the system was kept at 37°C in a constant temperature and equilibrated with 95% humidified air plus 5% CO_2 .

2.6. Fluorescent-labeled LDL uptake

Confluent monolayer cells grown on cover slides were briefly washed twice with serum-free medium without red phenol and then kept as static controls or shear stressed (1.0 Pa) for 3 to 4 h at 37°C. The influx was initiated by addition of 10 $\mu\text{g/ml}$ DiI-LDL or DiO-LDL in complete media without phenol red containing 5% FBS or 2% USG. Fluorescence spectra were recorded by acquisition of digital acquiring images at intervals of 5 to 180 min. Images processing was done with a three-dimensional (3D) multichannel image processing software for confocal microscopic image.

3. Results

3.1. Kinetics of the labeled-LDL uptake – effect of shear stress

First, we studied the LDL uptake by recording the time-dependent evolution of the fluorescence intensity in the cell for DiO-LDL or DiI-LDL, respectively. We found that the type of the probes does not

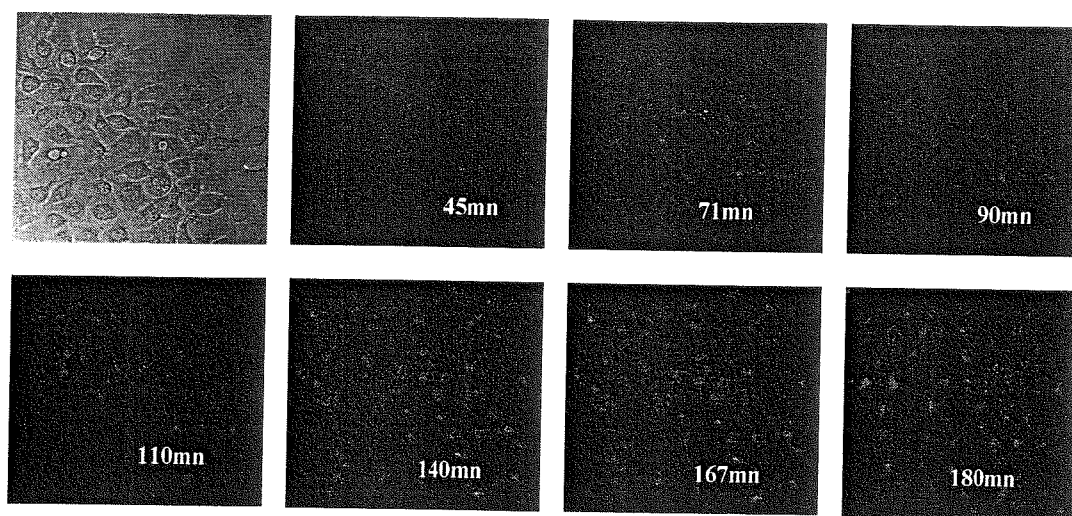


Fig. 1A. Kinetic of the uptake of DiO-LDL in confluent monolayers of ECV304 under static conditions. A complete medium containing 5% of foetal bovine serum (FBS) or 2% of USG and DiO-LDL ($10 \mu\text{g/ml}$) was added to the cells for 3 to 4 hours at 37°C and the images were recorded with Confocal Laser Scanning Microscope (SP2 Leica, Germany) $\times 40$.

affect the uptake process (data not shown) and the fluorescence intensity for both probes was enhanced for a long time period (Fig. 1A).

Second, to investigate the effect of shear stress on LDL binding and internalization in the cells, confluent monolayers of ECV304 were kept as static controls or subjected to a laminar flow (1.0 Pa) for various lengths of time (5 to 180 min). Shear stress in comparison with control group more effectively enhanced LDL binding and internalization (Fig. 1B).

3.2. Location of labeled-LDL in the living cell

On Fig. 3, we studied the kinetics and location of LDL in the cells. For this purpose, confluent monolayer cells grown on cover slides were incubated with a complete medium containing 5% of FBS or 2% of USG and $10 \mu\text{g/ml}$ of DiI-LDL or DiO-LDL were added for 3 to 4 hours at 37°C under static or dynamic conditions. The fluorescence intensity recorded on different scanning sections (depths) from the top to the bottom of the cells shows the distribution of LDL. The fluorescence signal reached a maximum at 1 h of incubation. We could suggest that (i) the maximum of fluorescence intensity is observed under the apical membrane and (ii) the LDL do not migrate in depth.

3.3. Effect of oxidation on LDL uptake

The endothelial-like cell line ECV304 were incubated in the presence or absence of ox-LDL ($10 \mu\text{g/ml}$) at 37°C then the fluorescence intensity was recorded. Compared to the curve of the uptake of native LDL, the oxidation of LDL induced a rapid uptake as shown on Fig. 4, followed by a decreased phase of fluorescence, which may be due to a probable degradation of LDL. In addition, a long time period of incubation (>4 hours) of the cells with oxidized-LDL ($>50 \mu\text{g/ml}$) was found to affect the cells as reflected by their detachment at low shear stress.

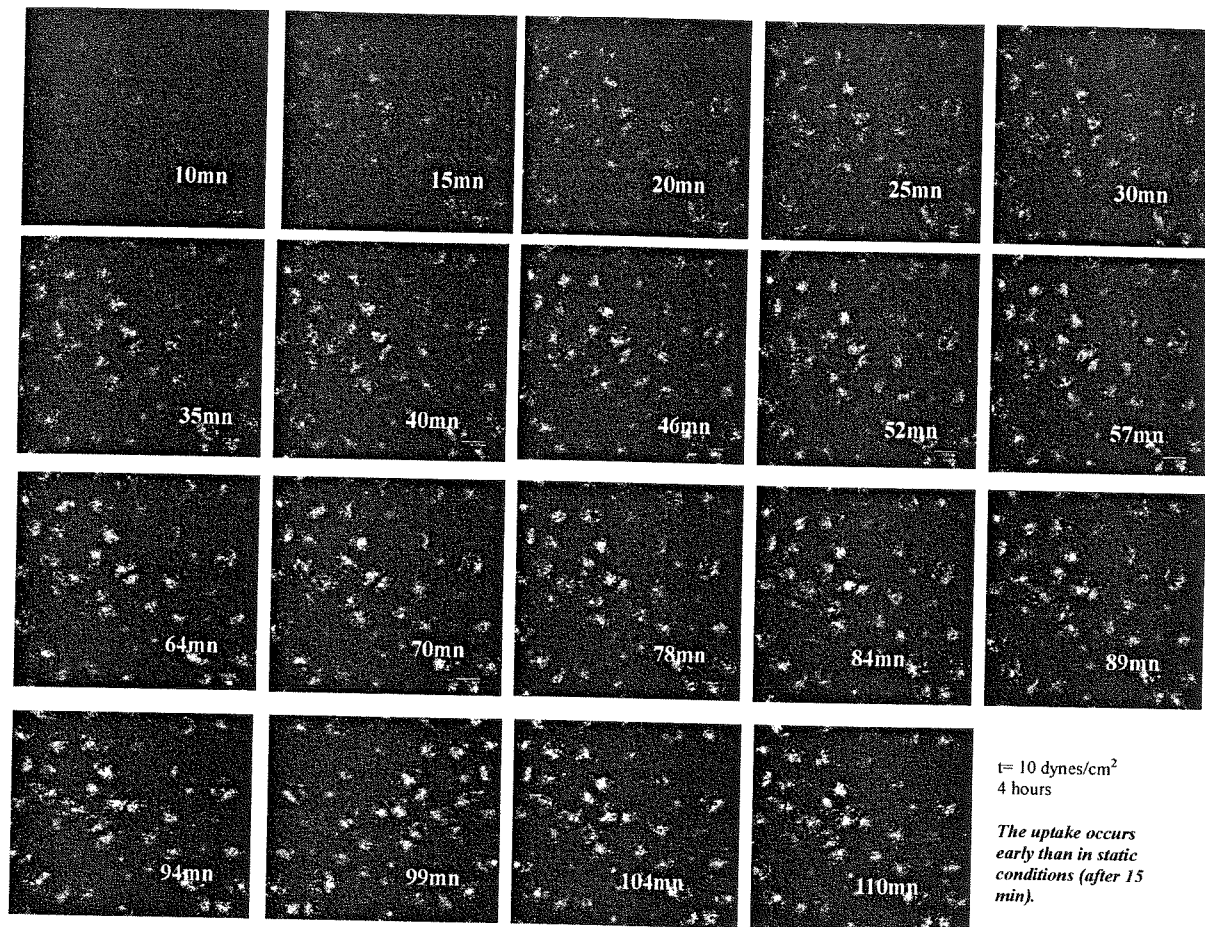


Fig. 1B. Kinetics of LDL internalization in endothelial-like cell line ECV304 incubated with DiI-LDL under shear stress as dynamic conditions. A complete medium containing 5% of foetal bovine serum (FBS) or 2% of USG and DiI-LDL ($10 \mu\text{g/ml}$) was added to confluent monolayer cells and subjected to a laminar flow (1.0 Pa) for 3 to 4 hours at 37°C . Images processing was done with a three-dimensional (3D) multichannel image processing software for confocal microscopic image.

4. Discussion and conclusion

It is known that the cardiovascular system is driven by the haemodynamic influences of blood, and atherosclerosis has an underlying mechanical basis, as evidenced by the presence of characteristic plaques at the sites of obvious mechanical significance – regions of arterial branching and curvature, where shear stress on the vessel wall may be low.

The role of low density lipoproteins, major carrier of cholesterol, in the pathogenesis and progression of atherosclerotic lesions has been extensively studied during the past few years with a positive correlation between the severity of coronary atherosclerosis and the oxidative susceptibility of LDL.

The present study on confocal microscopy allowed us to show the uptake and distribution of fluorescent labeled-LDL according to the depth in the cell.

In this work, we showed the possibility to evaluate the kinetics of LDL endocytosis in living cells. We can suggest that, when the cells were incubated with fluorescent labeled-LDL, the maximum of fluorescence intensity was located under apical membrane and we can also see that the LDL does not

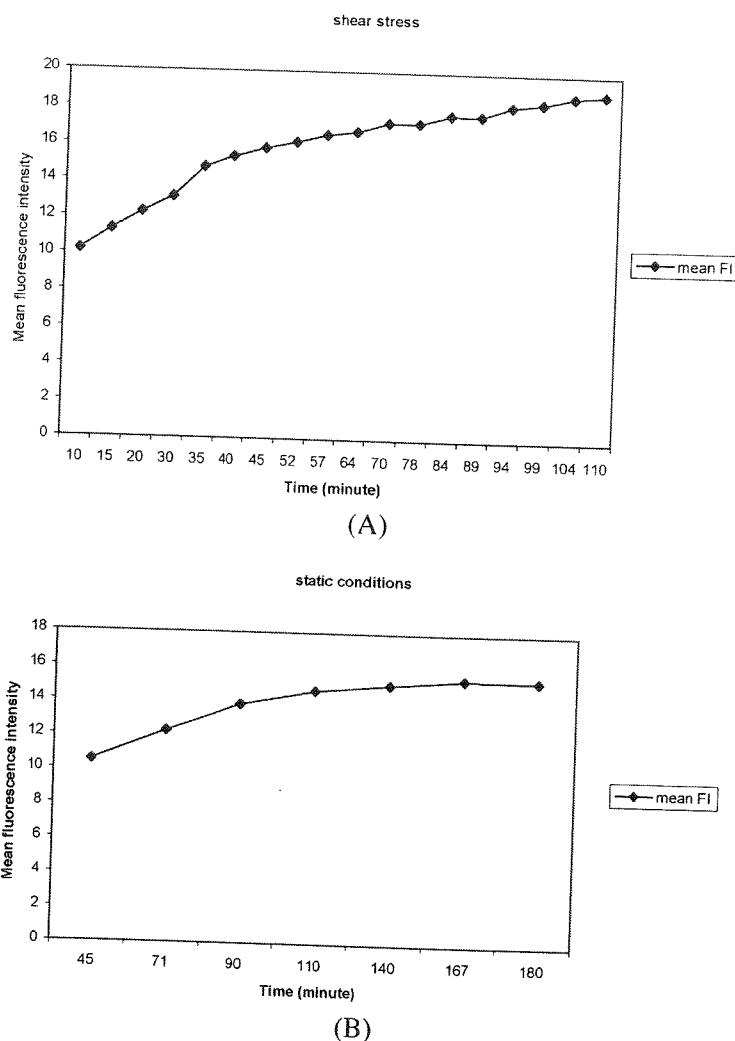


Fig. 2. Time-dependent variation of mean fluorescence intensity of LDL internalization recorded under static conditions (Fig. 1A) or under shear stress as dynamic conditions (Fig. 1B).

migrate in the depth. It appears that shear stress and the modifications (oxidation) of LDL in comparison with control group more effectively enhanced LDL uptake. These findings are in agreement with previous studies [24] demonstrating in cultured vascular endothelial cells that laminar shear stress increased the binding, internalization, and degradation of LDL in ECs, and these changes were mediated through upregulated LDL receptors (LDLR). The oxidative stress and inflammatory mediators such as tumor necrosis factor- α , interleukin-1, and macrophage colony-stimulating increase the binding of LDL to endothelium and smooth muscle as well as the transcription of the LDL-receptor gene [25,26]. Lectin-like oxidized-LDL receptor-1 (LOX-1) has been recently identified as a cell-surface receptor for oxidized-LDL in endothelial cells [27].

This preliminary study, in methodological manner, allows us to show that the behaviour of LDL was not related to the probes but depends on its biochemical characteristics. It appears that the oxidation of LDL induce many changes in their behaviour.

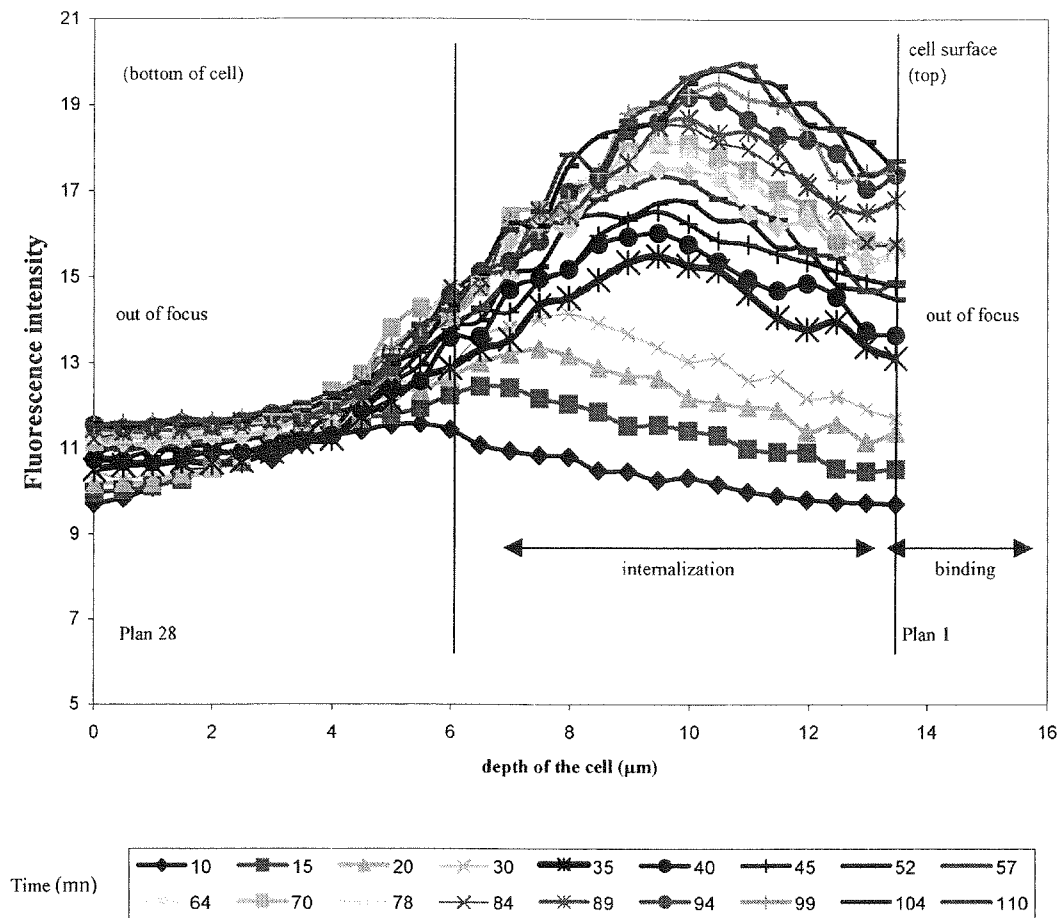


Fig. 3. Internalization of DiI-LDL in different scanning sections according to the depths of the cells under shear stress as dynamic conditions. The scanning was made from the top to the bottom of the cell, and the evolution of fluorescence intensity was recorded at intervals time of 15 to 110 min.

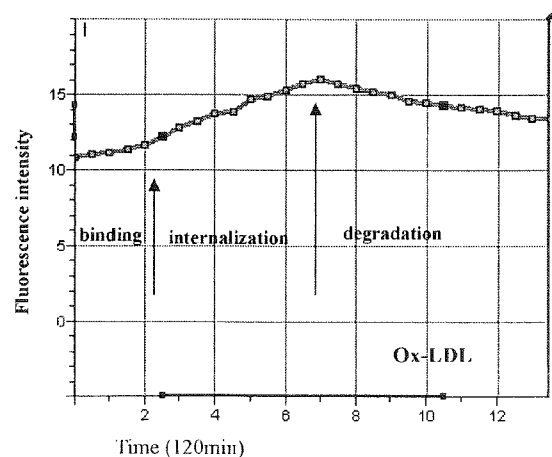


Fig. 4. Uptake and degradation of fluorescent labelled ox-LDL (DiO-oxLDL) in the cells. The endothelial-like cell line ECV304 were incubated in the presence or absence of ox-LDL ($10 \mu\text{g/ml}$) at 37°C then the fluorescence intensity was recorded.

Jaakkola et al. [28] suggested that the atherogenicity is also associated with reduced sialic acid content of the LDL subspecies.

Regarding all available data, we conclude that confocal microscopic study could be a rapid and useful method to establish the basic and clinic studies of diseases where LDL uptake plays an important role. However, further studies need to be performed to elucidate the molecular mechanism by which shear stress modulates the expression of LDLR. In addition, in experiments performed to assess the Forster-type resonance energy transfer (FRET) by Multiphoton Laser Scanning Microscopy, LDL was labeled with the two carbocyanine dyes, DiO as the donor and DiI as the acceptor.

In summary, our findings must to be confirmed by FRET study that will permit to investigate the degradation of LDL but also to have more knowledge on its atherogenic effect.

Acknowledgement

This work was supported in part by a grant of AFCRST (Paris) PRA B03-08.

References

- [1] P.O. Kwiterovich, Jr., Clinical relevant of the biochemical metabolic, and genetic factors that influence LDL heterogeneity, *Am. J. Cardiol.* **17** 90(8A) (2002), 30i–47i.
- [2] J. Fan and T. Watanabe, Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis, *J. Atheroscler. Thromb.* **10**(2) (2003), 63–71.
- [3] C.J. Schwartz, A.J. Valente and E.A. Sprague, A modern view of atherosclerosis, *Am. J. Cardiol.* **25** (1993); **71**(6), 9B–14B.
- [4] D. Steinberg, Role of oxidized LDL and antioxidants in atherosclerosis, *Adv. Exp. Med. Biol.* **369** (1995), 39–48.
- [5] D. Steinberg, S. Parthasarathy, T.E. Carew, J.C. Khoo and J.L. Witztum, Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity, *N. Engl. J. Med.* **320** (1989), 915–924.
- [6] G.M. Chisolm and M.S. Penn, Oxidized lipoproteins and atherosclerosis, in: *Atherosclerosis and Coronary Disease*, V. Fuster, R. Ross and E. Topol, eds, Raven Press, New York, 1996, pp. 129–146.
- [7] S. Yla-Herttuala, W. Palinski, M.E. Rosenfeld, D. Steinberg and J.L. Witztum, Lipoproteins in normal and atherosclerotic aorta, *Eur. Heart J.* **11**(Suppl. E) (1990), 88–99.
- [8] M.S. Penn and G.M. Chisolm, Oxidized lipoproteins, altered cell function and atherosclerosis, *Atherosclerosis* **108**(Suppl.) (1994), S21–S29.
- [9] T. Henriksen, S.A. Evensen and B. Carlander, Injury to human endothelial cells in culture induced by low density lipoproteins, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **39** (1979), 361–368.
- [10] J.R. Hessler, A.L. Robertson, Jr. and G.M. Chisolm, LDL-induced cytotoxicity and its inhibition by HDL in human vascular smooth muscle and endothelial cells in culture, *Atherosclerosis* **32** (1979), 213–229.
- [11] J.R. Hessler, D.W. Morel, L.J. Lewis and G.M. Chisolm, Lipoprotein oxidation and lipoprotein-induced cytotoxicity, *Arteriosclerosis* **3** (1983), 215–222.
- [12] D.W. Morel, J.R. Hessler and G.M. Chisolm, Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid, *J. Lipid Res.* **24** (1983), 1070–1076.
- [13] S. Weinbaum and S. Chien, Lipid transport aspects of atherogenesis, *J. Biomech. Eng.* **115** (1993), 602–610.
- [14] J.L. Goldstein, T. Kita and M.S. Brown, Defective lipoprotein receptors and atherosclerosis: lessons from an animal counterpart of familial hypercholesterolemia, *N. Engl. J. Med.* **309** (1983), 288–296.
- [15] E. Tjøtta, The distribution of atheromatosis in the coronary arteries, *J. Atheroscler. Res.* **3** (1963), 253–261.
- [16] C.G. Willis, Localizing factors in atherosclerosis, *Can. Med. Assoc. J.* **70** (1954), 1–9.
- [17] B. Fox and W.A. Seed, Localization of early atheroma in the human coronary arteries, *J. Biomech. Eng.* **103** (1981), 208–212.
- [18] N. Sakata and S. Takebayashi, Localization of atherosclerotic lesions in the curving sites of human internal carotid arteries, *Biorheology* **25** (1988), 567–578.
- [19] O. Smedby, J. Johanson, J. Molgaard, J.A. Osen, G. Waldius and U. Erikson, Predilection of atherosclerosis for the inner curvature in the femoral artery, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15** (1995), 912–917.

- [20] R.W. Wissler, An overview of the quantitative influence of several risk factors on progression of atherosclerosis in young people in the United States: Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) research group, *Am. J. Med. Sci.* **310** (1995), S29–S36.
- [21] D.C. Schwenke and T.E. Carew, Quantification in vivo of increased LDL content and rate of LDL degradation in normal rabbit aorta occurring at sites susceptible to early atherosclerotic lesions, *Circ. Res.* **62** (1988), 699–710.
- [22] R.M. Nerem, Hemodynamics and the vascular endothelium, *J. Biomech. Eng.* **115** (1993), 510–514.
- [23] G. Ouedraogo, P. Morliere, C. Maziere, J.C. Maziere and R. Santus, Alteration of the endocytotic pathway by photosensitization with fluoroquinolones, *Photochem. Photobiol.* **72**(4) (2000), 458–463.
- [24] E.A. Sprague, B.L. Steinbach, R.M. Nerem and C.J. Schwartz, Influence of a laminar steady-state fluid-imposed wall shear stress on the binding, internalization, and degradation of low-density lipoproteins by cultured arterial endothelium, *Circulation* **76** (1987), 648–656.
- [25] A.T. Stopeck, A.C. Nicholson, F.P. Mancini and D.P. Hajjar, Cytokine regulation of low density lipoprotein receptor gene transcription in HepG2 cells, *J. Biol. Chem.* **268** (1993), 17489–17494.
- [26] D.P. Hajjar and M.E. Haberland, Lipoprotein trafficking in vascular cells: molecular Trojan horses and cellular saboteurs, *J. Biol. Chem.* **272** (1997), 22975–22978.
- [27] Sawamura et al., An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein, *Nature* **386** (1997), 73–77.
- [28] O. Jaakkola, T. Solakivi, V.V. Tertov, A.N. Orkhov, T.A. Miettinen and T. Nikkari, Characteristics of low-density lipoprotein subfractions from patients with coronary artery disease, *Coron. Artery Dis.* **4**(4) (1993), 379–385.

Article 2

Actas de Bioq. 2003, 6: 81-90
(Dumas *et al.*, 2005)

CONFOCAL AND WIDE-FIELD DECONVOLUTION MICROSCOPY: INTEREST OF MULTI-PHOTON EXCITATION IN OPTICAL BIOENGINEERING

Dominique Dumas^a, Laurent Grossin^b, Rui-Juan Sun^{a,d}, Mariama Traore^a, Jacky Didelon^c, Jean-François Stoltz^a

^a Laboratoire de Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire. – UMR CNRS 7563 LEMTA et IFR 111 CNRS –UHP-INPL-CHU. Faculté de Médecine, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

^b Physiopathologie et Pharmacologie Articulaires, UMR 7561 CNRS-UHP Nancy 1, 54505 Vandoeuvre les Nancy, France

^c Laboratoire IMAC, Centre Alexis Vautrin, 54511 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

^d Centre de Recherches – Hôpital Sino-Japonais, Beijing, 100029, Chine
E mail: dumas@hemato.u-nancy.fr

ABSTRACT

A variety of optical techniques have been developed over the years for experimental study into living specimens. The increase in lateral and spatial resolutions is one of the major targets of research and development in the field of optical microscopies applied to living tissue. The optical geometry of Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) demonstrates its undeniable advantage on conventional fluorescence microscopy by segregating the planes outside the focussing plane. The methodological and technological advances of the last five years have been fast evolving, especially with regard to the optimisation of CLSM and deconvolution process. The limited analysis in thick tissue have given rise to the development of other techniques, MultiPhoton excitation Microscopy in particular.

In this paper, we have applied these techniques on major biological applications in bioengineering (skin, endothelial cell, chondrocyte) and discussed the technical limitations and perspectives.

1. INTRODUCTION

Molecular emission spectroscopic techniques (fluorescence, phosphorescence, chemo- and bio-luminescence), which correspond to excitation deactivation processes, are now widely used to study variably complex media such as cells or tissues. Among the physical methods available to investigate biological media, fluorescence, with its high analytical sensitivity and resolutions (spectral, spatial, temporal, order) offers interesting possibilities for cell or tissue biological analysis. But it was mainly in the past decade that it became possible to shift from whole-specimen analysis to smaller and smaller volumes, through microscopy techniques (far and near-field microscopies, fluorescence correlation, etc), down to almost single-molecule exploration (1). Fluorescence microscopy is exempt from a number of constraints normally attached to standard fluorometry (probe concentration, low cellular density, exploration and display at the cellular scale). Furthermore, it is the only methods of investigation currently available with a high enough resolution to specify the distribution of the fluorescent probe, because it collects fluorescence signals emitted at the probe incorporation site.

Multiphoton imaging with near IR laser pulses significantly reduces tissue damage due to laser beam absorption and scattering of short wavelength visible or near UV-excitation sources. This technique allows living cells to be probed in real time.

Fluorescence can be used in different ways, especially with regard to the excitation mode. Also, when combined with adequate optical instru-

ments, fluorescence measurements can be useful in terms of spectral microscopy, optical microscopy, or a combination of both (time-resolved fluorescence microscopy). The capabilities of these techniques can be significantly enhanced by choosing the appropriate fluorescent markers, by making proper use of their emission characteristics (wavelength, *i.e.*, spectral resolution; excited state lifetime, *i.e.*, temporal resolution; fluorescence quantum yield, etc.) and by changes in the immediate surroundings of fluorescent probes (phase transition temperature, polarity, viscosity, pH, pressure, temperature, presence of inhibitors, etc.).

1. OPTICAL SCANNING MICROSCOPY

One of the major limitations of fluorescence microscopy, whether applied conventionally (Fig.1.A) or confocally (Fig.1.B), is the progressive bleaching of the fluorochrome during prolonged exposure. Unfortunately, when focusing at a particular depth within a transparent fluorescently labelled 3D specimen, fluorochromes molecules throughout the whole of its thickness are excited. The diffraction light disrupts the image which reduces contrast and spatial resolution, allowing few strategies to overcome these limitations:

2.1 Confocal Laser Scanning Microscope

The optical geometry of Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

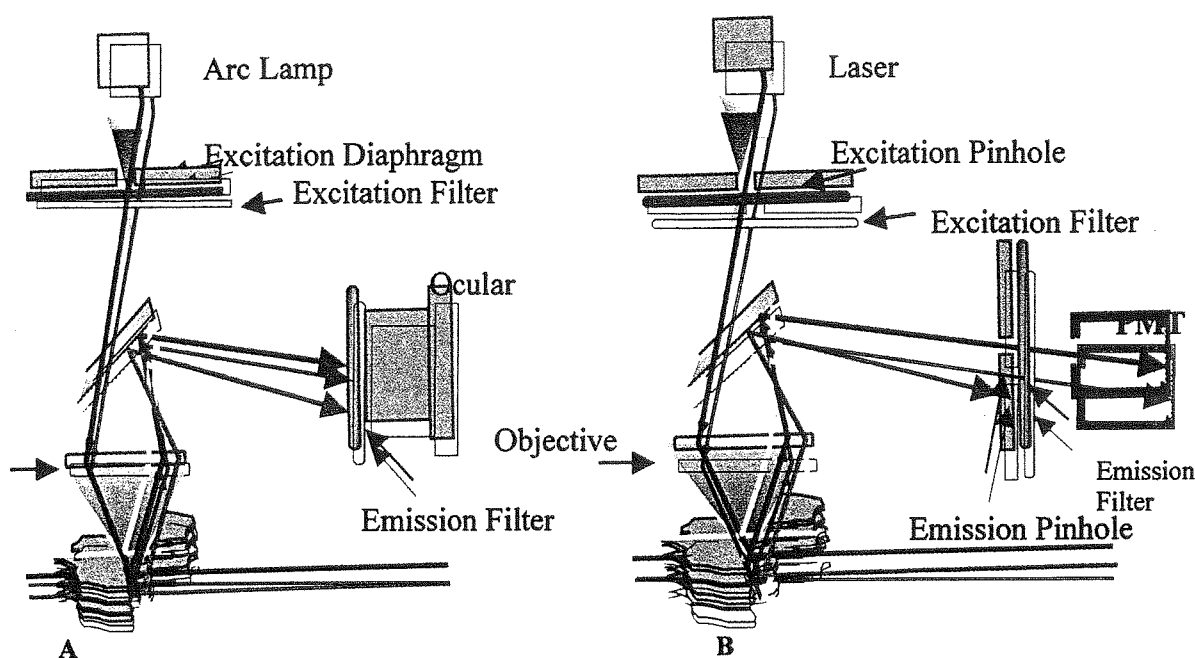


Fig. 1 – A. In conventional epi-illumination light microscopy, the simultaneous illumination of the entire field of view of a specimen will excite fluorescence emissions or reflections throughout the whole depth of the specimen, rather than just at the focal plane. Much of the light collected by the objective lens to form the image will thus come from regions of the specimen above and below the selected focal plane, contributing as out-of-focus blur to the final image, and seriously degrading it by reducing contrast and sharpness. In confocal Microscopy (B), a laser beam is focused to a small waist within the specimen, then reimaged onto a detector through a confocal aperture (pinhole) which serves to block fluorescence from all other z positions along the beam path (from Robinson).

demonstrates its undeniable advantage on conventional fluorescence microscopy by rejection out-of the focus plane. In a confocal imaging system, a single point of laser light is scanned across the specimen and the light passing through the emission pinhole (Fig. 1.B) is detected by a photomultiplier.

The benefits of confocal microscopy are 1) Increased effective resolution 2) Improved signal to noise ratio 3) Clear examination of thick specimens 4) Depth perception in Z-sectioned images 5) Magnification can be adjusted electronically 6) Reduced blurring of the image from light scattering.

The improvements were essentially

aimed at offering solutions to the problems posed by CLSM 1) by multiple marking in fluorescence (cross-talking) 2) the too low scanning rate to catch rapid biological events, 3) the fast photodegradation of the fluorescent probe as well as cytotoxicity (under UV light mainly) 4) the low quantum efficiency of detector 5) the fluorescence emission restricted by optical configuration (pinhole).

Moreover, CLSM posed certain problems linked to the use of living cells due to the high density of incident light (laser source) focussed on a small volume (femtoliter).

To obviate these limitations, an alternative method for removing out-of-

-focus haze is wide-field deconvolution microscopy.

2.2 Wide-Field Deconvolution Microscopy

In Deconvolution microscopy, a conventional fluorescence microscope is used to capture a stack of haze-containing images (Fig. 2). Fluorescence emanating from above and below the image plane creates an out-of-focus haze. Contrary to CLSM, each acquired 2D image (X, Y) contains

data of its focal plane (clear area) and of all other planes (blurred area). These interference data can be removed and images run through a computationally intensive set of algorithms that permit reassigning the photons from adjacent planes to the focal plane. This approach uses mathematical algorithms to reconstruct images based on the optical properties of the system. The optical transfer function reflects the way in which a punctual source is deformed when displayed via an optical system and determines the impulse response of the optical system or point-spread

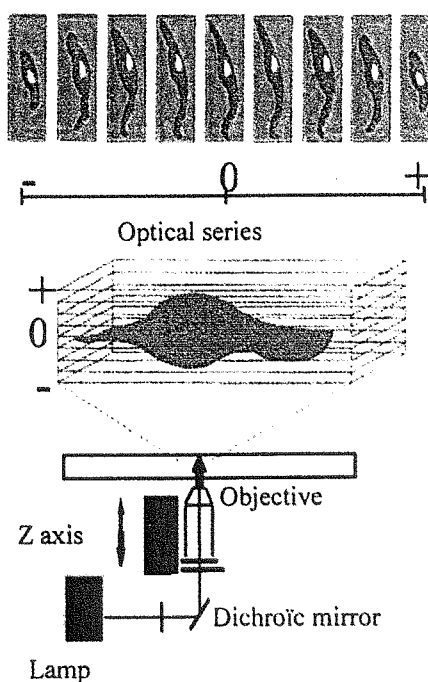


Fig. 2 – Optical sections were obtained with an Olympus IX-70 epifluorescence inverted microscope equipped with the CellScanTM optical sectioning acquisition system (Scanalytics, Billerica, Massachusetts) and a 60xPSF/1.2-NA water immersion apochromatic objective (Olympus, France). The scanning along the optical axis was performed by a piezoelectric z-axis focus device (at a z spacing of 0.25 μm). Images of biological samples were collected on a cooled 12 bit Charge-Coupled Device (CCD) camera (Princeton Instruments Inc, USA). The intensity of the excitation source throughout one measurement (0.1 s) did not induce any photobleaching. A filter set (green WU cube, red WNG cube) selected the fluorescence excitation (330-365 nm or 560-590 nm) and the integral part of the monomer emission spectrum (390-420 nm or 615-650 nm). An image intensity kit (InSpeck, Molecular Probes, Eugene City, OR., USA) was used for the calibration.

function (PSF). These techniques are oriented towards modelling degradation phenomena (defocussing, noise) and to the application of reverse procedures (mathematical reversion) or iterative deconvolution so as to obtain an approximation of the original scene (an estimate of the subject by using the transfer function image). This technique improves imaging resolution as shown in Fig. 3 (autofluorescence of the rat skin and the percutaneous absorption of pyrene) and Fig. 4 (oxidative stress and F-actin organization on endothelial cells). Fig. 5 shows GFP expression (spot) which was observed as the result of the *in vivo* physical introduction in rats cartilage cells of a plasmid DNA construct.

2.3 Spectral Imaging

Traditionally, spectroscopy is the measurement of the light intensity which is emitted, transmitted, scattered or reflected from a sample, as a function of wavelength. Most confocal and multiphoton microscopes currently have the ability to collect two or three pre-specified colors simultaneously. However, there is often a need for more complete spectral information to optimize the spectral window of a specific fluorophore. Spectrally resolved confocal fluorescence microscope measures the spectral components for each pixel in the image (7). So, spectral bio-imaging can be used to identify and map several fluorophores, simulta-

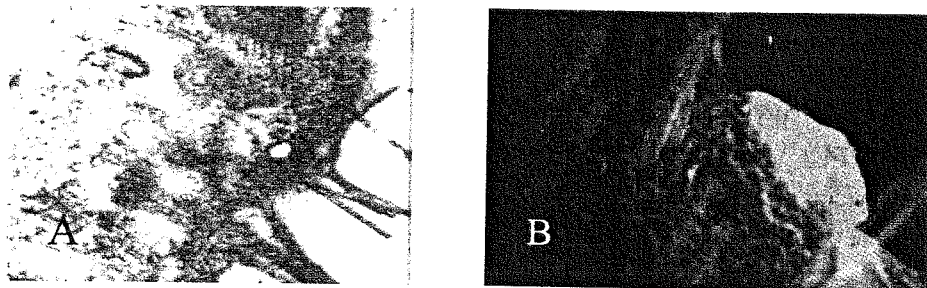


Fig. 3 – Distribution of Pyrene (A) in Hairy rat skin and autofluorescence (green-red) of stratum corneum and deep areas (B).

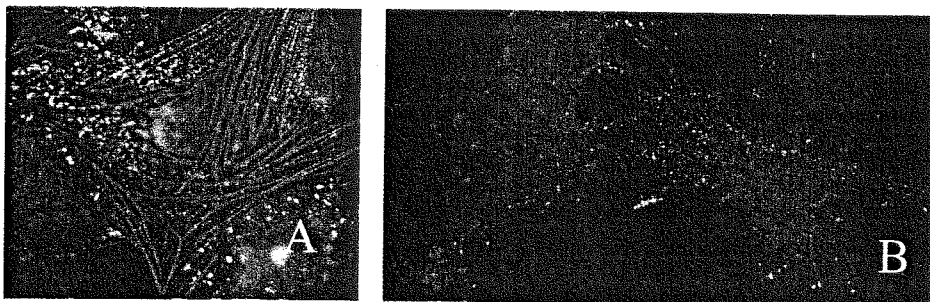


Fig. 4 – Effect of Ciprofloxacin (10^{-5} M) on organisation of F-actin filament (red) and distribution of Icam-1 (green) in human endothelial cells monolayer before (A) and after (B) irradiation (20 J/cm^2).

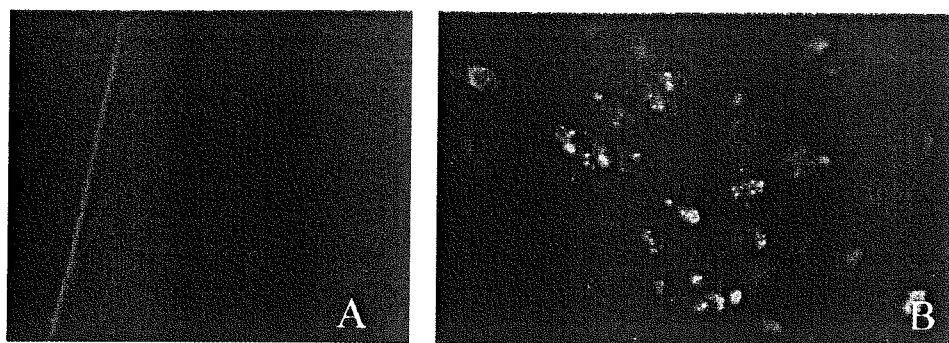


Fig. 5 – Rats were submitted to electro-permeabilization-mediated gene transfer to achieve gene expression into chondrocytes *in vivo*. (A). No GFP spots were observed in the experiment with plasmid DNA intra-articular injection without electric pulses administration or with electric stimulation alone. (B) Cell expression GFP was located in definite areas (superficial layer, middle and deep areas) indicating that the target tissue was transduced in its whole depth.

neously, in one measurement. Benefits of spectral imaging are 1) optimization and discrimination of spectral windows for multiple labels 2) collection of the desired signal in the presence of noise (detection noise, fluorescence background, etc...). Fig. 6.A illustrates the endocytosis in Human Vascular Endothelial Cell (Huvec) of Low-density lipoproteins (LDL) loaded with carbocyanine dye (diI).

2.4 Multiphoton Microscopy

The technique is based upon the two-photon principle first described by Goeppert-Mayer in 1931. This multiphoton process (simultaneous absorption of 2 photons) is made possible by a very high intensity combined with time-related concentration of a very brief (pico or femtosecond) and very high-frequency (about 80

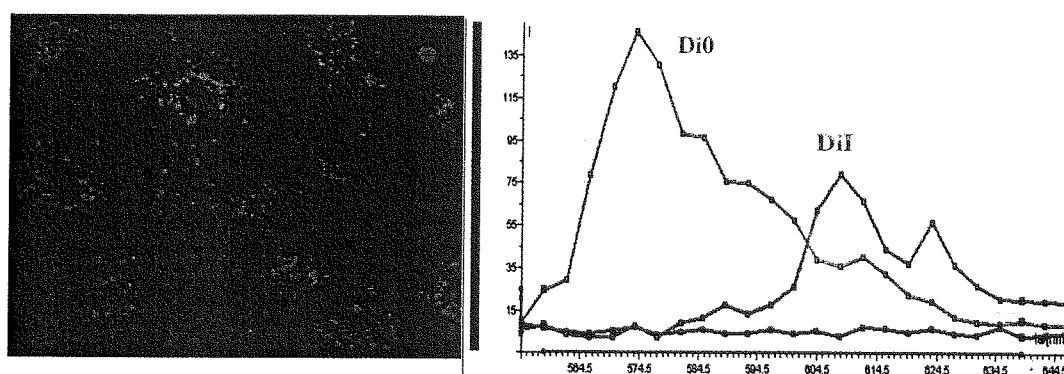


Fig. 6 – A. Confocal Image (SP2-MP Leica) of endocytosis of Lipoprotein combined to DiI or in Human Endothelial Cell (HUVEC). B. Fluorescence Energy Transfer between LDL-DiO and LDL-DiI in HUVEC. Excitation at 488 nm. Step: 5nm.

MHz) laser flash (2). Because in multi-photon mode spatial resolution is the result of absorption (and excitation) confinement to the focal event (smaller of one femtoliter) (3), the photobleaching patterns and photodegradation outside the focal plane are reduced (4). According to the pulse duration/peak power ratio, two red photons can excite a fluorophore whose excitation spectrum is in UV for an emission spectrum in the blue. Although the excitation properties of a fluorescent molecule are different for single photon and multi-photon events, the emission spectrum remains unchanged, regardless of how the electronic transition occurred. Fig. 7 shows endothelial cells labelled with three fluorophores (emission in blue, green and red) simultaneously excited by 2P-excitation using 820 nm laser light.

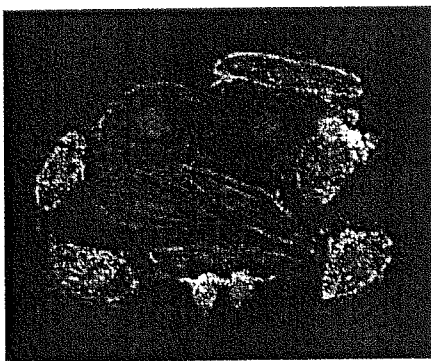


Fig. 7 – Simultaneous illumination by 2-Photon absorption light at 820 nm of endothelial cell: F-actine in red (rhodamine-phalloidine), nucleus in blue (Hoescht), and Icam-1 in green (Alexa 488TM-Mab). Laser femtoseconde MIRA 900.

Since the red or near infrared illuminating light used for 2-P excitation has approximatively twice the wave-

length of that employed for 1-P excitation, scattering effects at the excitation wavelengths are greatly reduced allowing deeper penetration into tissues than with visible or UV excitation (Fig. 8). This experiment illustrates the need for deeper penetration on rat cartilage head cap to study the chondrocyte-matrix interaction (5). As shown in Fig. 9, depth penetration in thick specimen (rat articular cartilage) is greatly enhanced (from 64 μm to 219 μm). The effects of the heat produced after high-frequency pulse illumination in a restricted volume (approx. 1 μm^3) and the optical aberrations are thought to be negligible and similar to those observed with single-photon confocal microscopy (6).

The benefits of Multiphoton Excitation microscopy are: 1) Increased effective resolution (deeper spatial resolution/1P) 2) Improved signal to noise ratio 3) Clear examination of thick and difficult specimens 4) Z-axis scanning (penetration enhanced into biological or material specimens) 5)

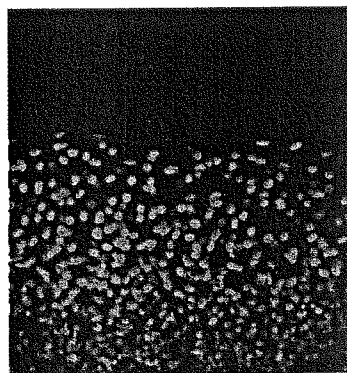


Fig. 8 – Illumination by 2-Photon absorption light at 780 nm (Laser femtoseconde MIRA 900) of chondrocyte encapsulated in alginate bead (diameter 2 mm) – Nucleus, Hoescht – (depth illumination: 1.6 mm).

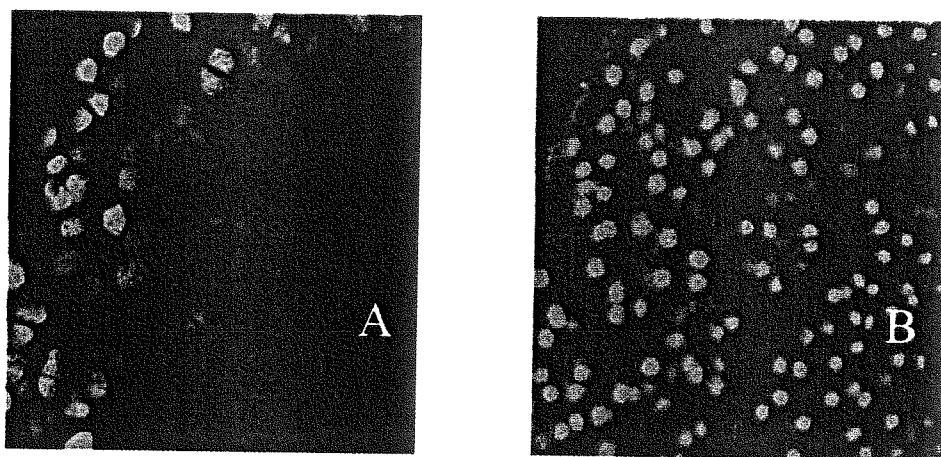


Fig. 9 – A. Illumination by 1-Photon absorption light at 488 nm (Laser Argon) of chondrocyte in rat cartilage head cap (F-actine. Oregon Green- Phalloidine; depth illumination: $64\ \mu\text{m}$). B. Illumination by 2-Photon absorption light at 780 nm (Laser femtoseconde MIRA 900) of chondrocyte in rat cartilage head cap (Nucleus, Hoescht; depth illumination: $219\ \mu\text{m}$).

Phototoxicity due to the long wavelength negligible/IP 6) Reduced bleaching 7) Reduced blurring of the image from light scattering.

At this time, the main disadvantages of Multiphoton Microscopy are the cost of femtosecond laser sources, the incomplete data on the two-photon absorption and fluorescence properties of commonly used fluorophores, the possible thermal damage, and the lack of affordable optical fiber coupling.

2.5 Lifetime Imaging

Because the excitation mode conditions the nature of data available, users can have access to two main types of measurements :

- Fluorescence intensity values with continuous excitation, the steady-state conditions give a balance between excited state production and deactivation.

- Fluorescence temporal decay values with pulsed mode or modulated mode (kinetic conditions; decay statistic of acquiring (single photon counting)/streak camera, time window (Boxcar type); phase modulation (phase fluorometry).

Measurements based on fluorescence intensity generally require rather simple instrumentation, essentially an excitation source (lamp or laser beam) and a detector (photomultiplier or Charge-Coupled Device camera). These components lack stability with time and fluorescence intensity determination can be subject to fluctuations, among other shortcomings. Measuring source correction and intensity can partly solve that problem, but sometimes in a non-satisfactory manner. Furthermore, this method does not take into account the changes of fluorescent marker concentration resulting from photobleaching, which induces a significant

amount of fading. In biological specimens, either *ex vivo* or *in vitro*, under physiological conditions (pH, temperature, culture medium...) fluorescence quantitation at the sub-cellular level with a fluorescence microscope suffers from the same limiting factors.

Two obviate these difficulties, (excitation source stability, photo bleaching, fluctuating marker concentrations...) another method is available, which consists in dealing with the lifetimes of excited states (fluorescence decay). The fluorescence lifetime of a substance represents an average amount of time the molecule remains in the excited state prior to its return to the ground state, while emitting fluorescence. The advantages and disadvantages of measuring the fluorescence signal in terms of intensity or lifetime have often been discussed (7). The precise nature of the fluorescence decay can reveal more details about the interactions of the fluorophore with its close surrounding: this parameter can reveal the frequency of collisional encounters with quenching agents, the rate of excited state reactions. Multiple decay constants can be the reflection of several distinct surroundings of a fluorophore or of the presence of several conformational states of a molecule. Factors such as ionic strength, hydrophobicity, oxygen concentration, binding to macromolecules can all modify the lifetime of a fluorophore, considered as an indicator of these parameters.

The shift from fluorescence measurement in a stationary state to time-resolved fluorescence involves all fluorescence-based techniques (flow cytometry, spectrometry and micros-

copy). So, Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) combines the advantages of lifetime spectroscopy with fluorescence microscopy by revealing the spatial distribution of a fluorescent molecule together with information about its microenvironment.

In spectral and lifetime imaging used to discriminate among multiple fluorophores on the basis of spectra as well as lifetime (Fig. 10), the Fluorescent Resonant Energy Transfer (FRET) is a powerful technique for measuring intermolecular distances, the proximity of molecules that can deplete the excited state by resonance energy transfer, as shown in Fig. 6.B between a donor (DiO) and a acceptor (DiI) loaded to LDL (8).

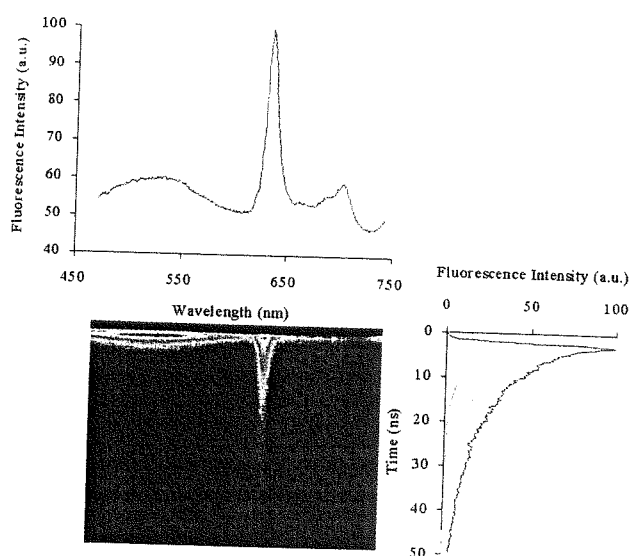


Fig. 10 – Streak image where the horizontal and vertical axis are respectively the wavelength and the decay of fluorescence (lifetime) of intrinsically fluorescent molecules (NAD/FAD) which emit at 520 nm (green), shorter than those of the extrinsic fluorophore (porphyrin derivative) which emits at 630 nm (red).

3. CONCLUSION

Even if the deconvolution techniques require considerable computing power capacities and extended computation time, they prove very useful in situations of low intensity levels or restricted use of confocal microscopy to improve spatial resolution in multiphoton microscopy. At this time, Multiphoton Imaging has established itself as an important method for optical microscopy particularly for subcellular events within organized tissue environment. With the elimination of UV excitation, more imaging scans are permitted, and time-sequence studies on sample kept at physiological conditions are permitted. Moreover, a number of variants have been developed allowing optimised imaging for high speed or high resolution with the use of living tissue (Multifocal Microscopy, Spectral analysis, Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, Optical tweezers, 4Pi Microscopy, Fluorescence Correlation Microscopy...).

Correspondance to:
DUMAS Dominique
Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire
UMR CNRS 7563
Faculté de Médecine - B.P. 184
54505 Vandoeuvre-les- Nancy Cedex -France
Tél.: (33) 03.83.59.26.74
Fax: (33) 03.83.59.26.43
E mail: dumas@hemato.u-nancy.fr

References

1. Denk W, Stricklen JH, Webb WW. Two-photon fluorescence scanning microscopy, *Science* 1990; 2: 248-273.
2. Diaspro A, Robello M. Two-photon excitation of fluorescence for three-dimensional optical imaging of biological structures, *J Photochem Photobiol* 2000; 55: 1-8.
3. Dumas D, Muller S, Padilla JJ, Latger V, Woodard S, Carré MC, Blondel W, Baros F, Viriot ML, Stoltz JF. New trends in optical bioengineering: applications to cell biology, *Recent Res Devel Optical Engg* 1999; 2: 295-315.
4. Dumas D, Gigant C, Presle N, Cipolletta C, Miralles G, Payan E, Jouzeau JY, Mainard D, Terlain B, Netter P, Stoltz JF. The role of 3D-microscopy in the study of chondrocyte-matrix interaction (alginate bead or sponge, rat femoral head cap human osteoarthritic cartilage) and pharmacological application, *Biorheology* 2000; 37: 165-176.
5. Haralampus-Grynawski N, Stimson MJ, Simon JD. Design and applications of rapid-scan spectrally resolved fluorescence microscopy. *Appl Spectrosc* 2000; 54: 1727-1733.
6. Koester HJ, Baur D, Uhl R, Hell SW. Ca²⁺ fluorescence imaging with Pico- and femtosecond two-photon excitation: signal and photodamage, *Biophys J* 1999; 77: 2226-2236.
7. Szmajnski H, Lakowicz JR. Fluorescence lifetime based on imaging, *Sens Actuator B-Chem* 1995; 29: 16-24.
8. Ouédraogo G, Morliere G, Santus R, Miranda MA, Castell JV. Damage to mitochondria of cultured human skin fibroblasts photosensitized by fluoroquinolones, *J Photochem Photobiol* 2000; 58: 20-25.

Article 3

Biorheology. 2003, 40: 389-394.
(Traoré *et al.*, 2003)

Influence of *Angelicae sinensis* extract on lipid accumulation in rabbit aortic smooth muscle cells induced by oxidized LDL

Mariama Traoré^{a,*}, Hong Jialing^b and Xu Chunling^b

^a *Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, LEMTA, UMR CNRS 7563 Faculté de Médecine, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France*

^b *Department of Biochemistry, Medical College of Wuhan University Wuhan 430071, P.R. of China*

Abstract. *Objective:* To further establish a definite basic of the application value of sodium ferulate (SF) for prevention and cure of acute coronary heart disease, we examined the effects of SF on LDL oxidation and lipid accumulation in rabbit aortic smooth muscle cells induced by modified-LDL.

Methods: LDL oxidation was carried out in the presence and absence of SF. Cultured rabbit aortic smooth muscle cells were used as the model. To investigate the effects of SF on intracellular lipid accumulation, cells were incubated with Ox-LDL and SF. The lipid content (cholesterol and triglycerides) of the cells were determined.

Results: Intracellular cholesterol and triglycerides were significantly increased in cell-modified LDL group. The enhancements of above indexes were decreased after addition of SF (200 µg/ml). On the other hand, incubation of LDL with SF resulted in a significant decrease in TBARS activity and electrophoretic mobility.

Conclusion: The results indicated that SF assume significance both in the protection of LDL against oxidation and inhibition of cell-modified LDL effects on intracellular lipid with the potential to prevent cell foamation.

Keywords: Oxidized low density lipoproteins, foam cells, atherosclerosis, sodium ferulate

1. Introduction

Several lines of evidence support a role for oxidatively modified forms of low-density lipoproteins (Ox-LDL) in the genesis of the atherosclerotic lesion. Hence, its inhibition by an appropriate antioxidant might therefore be an important step in preventing atherosclerotic lesion.

Studies investigating the effects of natural antioxidants such as vitamin E, vitamin C and estrogen, pharmacological antioxidants such as probucol, Chinese herbal medicine such as *radix rhapontici seu echinopsis*, *radix notogingeng*, *fructus hippophae*, etc. have been inconclusive. Sodium ferulate (SF) a potent water-soluble component of *Angelicae sinensis* has been suggested to inhibit lipid peroxidation induced by free radicals oxygen and hydrogen peroxide and the hemolysis induced by lipid peroxide [10]; SF is also known to inhibit platelet aggregation and thrombosis [5,14], etc.... Previous studies have reported that the monocyte/macrophages and smooth muscle cells were implicated as precursors of cholesterol-laden foam cells, which are prominent components of atherosclerotic plaques. Thus, the aim

* Address for correspondence: Mariama Traoré, Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, LEMTA, UMR CNRS 7563, Faculté de Médecine-B.P.184, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France. Tel.: +33 03 83 59 26 41; Fax: +33 03 83 59 26 43; E-mail: Mariama.Traore@hemato.u-nancy.fr.

of the present study was based on a previous work [15] to investigate the effect of SF on LDL oxidative modification and intracellular lipid accumulation, relationship between oxidized LDL and advanced atherosclerotic foam cells formation.

2. Methods

2.1. Cell culture

Rabbit aortic smooth muscle cells (SMC) were prepared using procedures described previously [12]. Cells in primary culture were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) with 20% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, and 2 mM L-glutamine and incubated at 37°C, 5% CO₂ in air. At confluence, cells were passaged with 0.2% trypsin. The Cells in subculture were grown in DMEM supplemented with 20% fetal calf serum, and were used between passages 3 and 7 for experimentation. Dynamic observation of cells growth condition was carried out, the "hill-valleys" growing characters of the cultured SMC were observed under an inverted microscope (Fig. 1).

2.2. Preparation of low density lipoproteins

2.2.1. LDL isolation

Fresh human blood from healthy donors was purchased from the blood bank of the First Affiliated Hospital of Hubei Medical University. The plasma was separated immediately by low spin centrifugation at 4°C. LDL ($d = 1.0$ to 1.063 g/ml) was isolated from plasma by density gradient ultracentrifugation (60 000 r/min in Beckman L8-80 for 5 h at 10°C) and the purity of LDL preparation was determined by agarose gel electrophoresis after staining with sudan B black. To prevent the degradation and lipid oxidation, all media used during LDL preparation contained 7.7 mmol/l NaN₃, 10 mmol/l glutathione, 3.2 mmol/l EDTA. The isolated LDL were dialyzed against 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH (7.4) for 24 h at 4°C, sterilized by filtration ($\varnothing$ 0.22 μ m). Total protein content of the LDL preparation was measured by the method of Lowry et al. [9] and used within 2 weeks of isolation.

2.2.2. Oxidative modification of LDL and its characterization

Modification by Cu²⁺: LDL (1 mg protein/ml) were incubated with 10 μ mol/l CuSO₄ for 20 h at 37°C and the oxidation reaction was terminated by addition of EDTA (1 mmol/l final concentration).

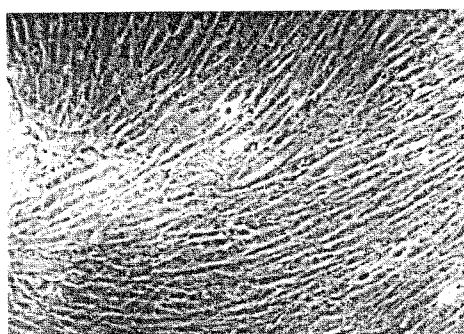


Fig. 1. Rabbit aortic smooth muscle cells after 7 days in culture (LMx 200). Demonstrates the "hills and valleys" growing characters of the culture. Cultured aortic smooth muscle cells were grown as described in the text.

Modification by cells: Smooth muscle cell-modified LDL were prepared according to methods described previously [6].

Characterization: Oxidized LDL were characterized by (1) measurement of thiobarbituric acid-reactive substance by a modification of the assay of Buege and Aust [3] as described previously [8] using malondialdehyde as standard, (2) electrophoretic migration on agarose gel and (3) the formation of conjugated dienes was measured by continuously monitoring absorbance [4] at 234 nm in UV-265 spectrophotometer (Shimadzu, Japan).

2.3. Measurement of intracellular cholesterol and triglycerides

Medium was removed from confluent smooth muscle cell cultures grown in plastic flasks and the remaining cells were washed three times with cold PBS and briefly exposed to 0.2% trypsin solution; the cell suspension was then centrifuged (1000 rpm for 7 min). The sediment was washed three times with 0.9% NaCl, and dissolved in 200 μ l NaOH (0.1 N). HCl (1 N) was used to regularize the pH to 7.0. Suitable aliquots (20 μ l) of the solution were taken for the measurement of cellular proteins and the rest of the sample was used to measure cellular cholesterol and triglycerides.

2.4. Statistical analysis

Data are presented as mean $\pm$ standard error. Statistical analysis was performed using Student–Newman–Keuls test for variables Ch and TG.

3. Results

3.1. Characterization of cell-mediated LDL oxidation

At the end of the incubation of SMC with LDL, the medium was collected, and the TBARS assays were carried out and the formation of conjugated dienes was measured by monitoring absorbance at 234 nm (Table 1).

3.2. Effects of SF on Cu^{2+} induced LDL oxidation

Modification of LDL (1 mg protein/ml) during its incubation with Cu^{2+} (10 μ mol/l) for 20 h at 37°C resulted in accelerated electrophoretic migration, and an increase of thiobarbituric acid-reactive substances compared to native LDL. To investigate the effect of SF on Cu^{2+} -catalyzed LDL oxidation, LDL (1 mg protein/ml) were incubated with Cu^{2+} (10 μ mol/l) in the presence and absence of SF (200 μ g/ml).

Table 1

Oxidation parameters of LDL (50 μ g protein/ml) incubated with rabbit aortic smooth muscle cells in the presence of Cu^{2+} (1 μ mol/l) at 37°C for 48 h, values are mean $\pm$ SD

Group	n	MDA (mmol/l)	Δ 234 nm
N-LDL	6	1.3 $\pm$ 0.10	
C-Ox LDL	6	5.96 $\pm$ 0.73*	1.22 $\pm$ 0.35

*Compared with native LDL (N-LDL) group, $p < 0.01$.

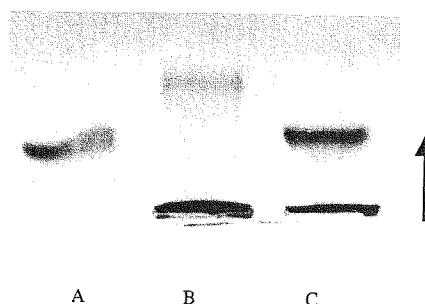


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of native LDL (N-LDL), oxidized-LDL (Ox-LDL) pre-stained with sudan B black. LDL (1 mg protein/ml) were incubated at 37°C for 20 h with 10 $\mu\text{mol/l}$ Cu^{2+} in the absence and presence of sodium ferulate SF (200 $\mu\text{g/ml}$). After incubation, samples were analyzed as described in methods. A: sodium ferulate + Cu^{2+} + LDL: (SF- Cu^{2+} -LDL); B: oxidized-LDL (Ox-LDL); C: native LDL (N-LDL).

Table 2

The content of malondialdehyde (MDA) in LDL (1 mg protein/ml) after Cu^{2+} (10 $\mu\text{mol/l}$) oxidative modification in the presence and absence of SF (200 $\mu\text{g/ml}$) at 37°C for 20 h, values are mean $\pm$ SD

Group	<i>n</i>	MDA (nmol/l)
Cu^{2+} -Ox-LDL	6	50.93 $\pm$ 1.48
SF- Cu^{2+} -Ox-LDL	6	1.50 $\pm$ 0.13*

*Compared with Cu^{2+} -Ox-LDL group, $p < 0.01$.

The concentration of SF used was that which resulted in maximum inhibition of LDL oxidative modification. And suitable aliquots were subjected to agarose gel electrophoretic and TBARS assays. We found that the incubation of LDL with Cu^{2+} in the presence of SF resulted in a marked decrease of electrophoretic migration as well as TBARS activity compared to Cu^{2+} oxidized LDL (Fig. 2, Table 2). These results indicated that SF can inhibit Cu^{2+} catalyzed LDL oxidation.

3.3. Effects of SF on lipid accumulation induced by cell-modified LDL

To investigate the effect of SF on intracellular lipid accumulation, SMC were incubated with LDL (50 μg protein/ml) and Cu^{2+} (1 $\mu\text{mol/l}$) in the presence and absence of different concentrations of SF (25, 50, 100, 150 and 200 $\mu\text{g/ml}$). The results showed that SF may inhibit the intracellular cholesterol and triglycerides accumulation, and the inhibitory action was accompanied with the dose-effect relation (Fig. 3).

Further, SMC were incubated with SF (200 $\mu\text{g/ml}$), concentration which has been shown to inhibit LDL oxidation, LDL (50 μg protein/ml) and Cu^{2+} (1 $\mu\text{mol/l}$), then intracellular Ch and TG were determined and compared with the group without SF (Table 3, Fig. 4).

4. Discussion

Atherosclerosis is a multifactorial disease and the modified lipoproteins affect multiple functions of all major cells of the arterial wall. It has also been reported that cellular cholesterol accumulation in the arterial wall affects the properties of cells [7,11,13], and the early lesion in human atherosclerosis is composed of monocyte-derived macrophages which accumulate cholesterol which is originated mostly from

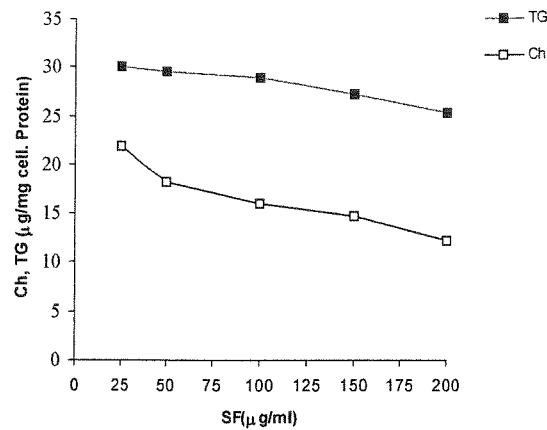


Fig. 3. The effects of SF (25–200 µg/ml) on cholesterol (Ch) or triglycerides (TG) accumulation in cultured rabbit aortic smooth muscle cells incubated with LDL (50 µg protein/ml) in the presence of Cu^{2+} (1 µmol/l) at 37°C for 48 h.

Table 3

Effect of SF 200 µg/ml on cholesterol (Ch) and triglyceride (TG) accumulation in rabbit aortic smooth muscle cells incubated with LDL (50 µg protein/ml) and Cu^{2+} (1 µmol/l) at 37°C for 48 h, values are mean ± SD

Cellular lipids (µg/mg cell protein)	Control	C-Ox-LDL	SF-C-Ox-LDL
Ch	17.40 ± 2.39	23.87 ± 0.46*	14.22 ± 0.66**
TG	26.75 ± 2.95	30.05 ± 3.02*	27.44 ± 1.51**

*Compared with control, $p < 0.01$.

**Compared with C-Ox-LDL group, $p < 0.01$.

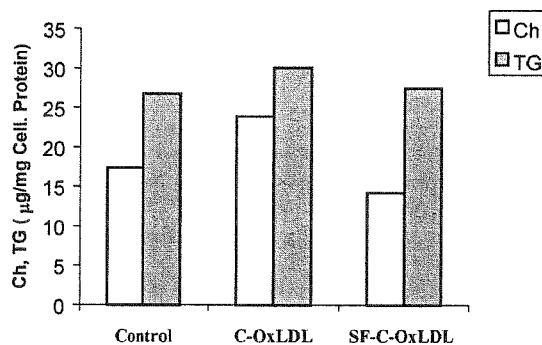


Fig. 4. Effects of sodium ferulate (SF) and cell-modified LDL (C-Ox-LDL) on cholesterol (Ch) and triglycerides (TG) accumulation in cultured rabbit aortic smooth muscle cells. Cells were grown as described in the text and incubated at 37°C for 48 h with LDL (50 µg protein/ml) and Cu^{2+} (1 µmol/l) in the presence and absence of SF 200 µg/ml. The results are presented as mean ± SD.

plasma LDL [2]. This native LDL has to undergo some modification in order to contribute to macrophage cholesterol accumulation *in vitro* [1,11,13]. Whereas macrophages predominate in early lesion, in the advanced atherosclerotic plaque, arterial smooth muscle cells play a major role by their proliferation, migration and cholesterol accumulation and thus contribute to the formation of the complicated fibrous plaque.

In the present study we investigated the effect of SF on LDL oxidative modification and intracellular lipid accumulation, this in order to obtain a better appreciation of the antioxidizing effect and application value of SF in prevention and cure of acute coronary heart disease.

Cu²⁺-catalyzed and cell-mediated LDL oxidative modifications were carried out in the presence and absence of sodium ferulate. SF (200 µg/ml) inhibited LDL oxidation and it was found a decrease of electrophoretic mobility and thiobabaturic acid-reactive substances (TBARS) activity; the conjugated dienes formation was also inhibited during LDL oxidation. Furthermore, the incubation of SF with cell-oxidized LDL resulted in a significant decrease in intracellular cholesterol (Ch) and triglycerides (TG) accumulation ($p < 0.01$, compared to cell-oxidized LDL groups without SF). However, there were no significant differences between SF groups and control groups.

In conclusion, sodium ferulate, as evidenced by all of the selected indices, significantly inhibited both LDL oxidation and lipid accumulation in rabbit aortic smooth muscle cells induced by cell-oxidized LDL; and may be important in reducing the formation of advanced atherosclerotic foam cells. Thus these findings confirm previous report that SF inhibited the proliferation of rabbit aortic smooth muscle cells induced by oxidized LDL [15]. However, additional studies need to be performed to establish a definite basis of the antiatherosclerotic effect of SF.

References

- [1] M. Aviram, Effect of lipoproteins and platelets on macrophage cholesterol metabolism, in: *Blood Cell Biochemistry*, Vol. 2: Megakaryocytes, Platelets, Macrophages and Eosinophils, J.R. Harris, ed., Plenum Publishing Co., N.Y., 1991, Chapter 7, pp. 179–208.
- [2] M.S. Brown and J.L. Goldstein, Lipoprotein metabolism in macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis, *Ann. Rev. Biochem.* **52** (1983), 223–261.
- [3] J.A. Buege and S.D. Aust, Microsomal lipid peroxidation, *Methods Enzymol.* **52** (1978), 302–310.
- [4] H. Esterbauer, G. Striegl, H. Puhl et al., Continuous monitoring of in vitro oxidation of human LDL, *Free Rad. Res. Commun.* **6** (1989), 67–75.
- [5] S.W. Gao et al., The effect of sodium ferulate on TXA₂ and platelet aggregation in patient with CHD, *Chin. J. Intergr. Tradit. West Med.* **8** (1988), 263–267.
- [6] J.W. Heinecke, H. Rosen and A. Chait, Iron and copper promote modification of LDL by human arterial smooth muscle cells in culture, *J. Clin. Invest.* **74** (1984), 1890–1894.
- [7] J.W. Heinecke, L. Baker, H. Rosen and A. Chait, Superoxide-mediated modification of LDL by arterial smooth muscle cells, *J. Clin. Invest.* **77** (1986), 757–761.
- [8] I. Jialal, D. Freeman and S.M. Grundy, Varying susceptibility of different LDL to oxidative modification, *Arterioscler. Thromb.* **11** (1991), 482–488.
- [9] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr et al., Proteins measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* **193** (1951), 265–275.
- [10] H.Z. Pan, C.Y. Zhao and L.N. Xu, The effect of sodium ferulate on lipid peroxidation of erythrocyte membrane, *Chin. J. Intergr. Tradit. West Med.* **5** (1985), 678–680.
- [11] D. Steinberg, S. Parthasarathy, T.E. Carew et al., Beyond cholesterol: modification of LDL that increase its atherogenicity, *N. Engl. J. Med.* **320** (1989), 915–924.
- [12] H.J. Tang, J.L. Hong et al., Culture techniques of fetus arterial smooth muscle cells, *Acta Acad. Med. Hubei* **20** (1999), 89–91.
- [13] J.L. Witztum and D. Steinberg, Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis, *J. Clin. Invest.* **88** (1991), 1785–1792.
- [14] L.N. Xu, R. Ouyang et al., The inhibitory effect of sodium ferulate on thrombosis, *Acta Pharmacologica Sin.* **2** (1981), 35–37.
- [15] H. Yu, J.L. Hong and D.C. Wu, Effects of sodium ferulate on proliferation of rabbit aortic smooth muscle cells induced by oxidized LDL, *J. Chin. Materia Med.* **24** (1999), 365–366.

Article 4

Clinical Hemorheology and Microcirculation, 2005, 33: 253-261

(Fawzi-Grancher *et al.*, 2005)

Role of Ca^{2+} in the effects of shear stress and $\text{TNF-}\alpha$ on caveolin-1 expression

S. Fawzi-Grancher^a, R.J. Sun^{b,*}, Mariama Traoré^a, J.F. Stoltz^a and S. Muller^{a,**}

^a *Cell and Tissue Engineering and Mechanics, LEMTA-UMR CNRS 7563, Faculté de Médecine Plateau de Brabois, 54500 Vandoeuvre lès Nancy, France*

^b *Research Institute of Clinical Medical Sciences, China–Japan Friendship Hospital, 100029 Beijing, China*

Abstract. The aim of this work was to study the influences of Ca^{2+} (medium free calcium, with BAPTA, with 100 mM Ca^{2+} , 100 mM Ca^{2+} + 10 μM ionomycin) on the expression of caveolin-1 (structural protein of caveolae) of endothelial cells (ECs) submitted to mechanical forces (shear stress) or biochemical stimulation ($\text{TNF-}\alpha$). We found that shear stress enhanced the caveolin-1 expression. Simultaneously, the caveolin-1 expression is dependant on $[\text{Ca}^{2+}]_i$: $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free medium}+100 \mu\text{M BAPTA}} < [\text{Ca}^{2+}]_{\text{free medium}} < [\text{Ca}^{2+}]_{100 \text{ mM}} < [\text{Ca}^{2+}]_{100 \text{ mM}+10 \mu\text{M ionomycin}}$. In contrast, $\text{TNF-}\alpha$ induced a decrease of caveolin-1 in the cells, whatever the $[\text{Ca}^{2+}]_i$. These results suggest that there could be a synergistic effect between shear stress and Ca^{2+} on caveolin-1 expression but an inflammatory stimulation ($\text{TNF-}\alpha$) induces a down regulation of caveolin-1 expression.

Keywords: Caveolin-1, Ca^{2+} , endothelial cell, $\text{TNF-}\alpha$, shear stress, 3D fluorescence microscopy

1. Introduction

Caveolae are cholesterol and glycosphingolipid-rich membrane micro domains that function as mobile signalling platforms in the plasma membrane. They are ubiquitous features of endothelial cells comprising 95% of cell surface vesicles and ~15% of endothelial cell volume [6,7,15–17]. Because of their high abundance in ECs, caveolae have been implicated in the regulation of many functions including macromolecular transport in the microcirculation [6]. Thus, caveolae are enriched in a variety of signal transducing molecules. Complex signalling events have been localized in this domain, and the caveolin family of lipid binding proteins have been identified as molecules involved in the activity of various signalling molecules in caveolae. A variety of studies now support the proposal that caveolae compartmentalize signal transduction pathways [2,3,6,11].

The function of caveolae in the signal transduction is to optimize interactions among sets of signalling molecules involved in relaying information between the cell surface and various intracellular sites [10]. A protein of 21–24 kDa, subsequently named caveolin-1, is a principal component of caveolae [18]. Caveolin-1 also binds directly to cholesterol and interacts with such signalling molecules as G-protein

* Present address: Department of Life Sciences, National Natural Science Foundation of China, 100085 Beijing, China.

** Corresponding author: Dr. Sylvaine Muller, Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, UMR CNRS 7563 (LEMETA), Faculté de Médecine – B.P. 184, 54500 Vandoeuvre lès Nancy cedex, France. Tel.: +33 0 3 83 68 34 74; Fax: +33 0 3 83 68 34 59; E-mail: mullers@medecine.uhp-nancy.fr.

α -subunits, Ras, Src family kinases, and the endothelial form of nitric oxide synthase (eNOS) [15]. Caveolin-1 is able to act as the driving force for caveolae formation [3,4,17–19]. As Ca^{2+} influx channels and pumps are localized in caveolae, caveolin-1 is also an important determinant of Ca^{2+} signalling in endothelial cell [13].

Intracellular calcium $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is a second messenger mediating many vascular endothelial cell (EC) functions, including the production of vasoactive substances, cell proliferation, and genes expressions [9]. In many cell types including excitable and nonexcitable cells, binding of ligands with G protein-coupled receptors stimulates phospholipase C and induces the hydrolysis of membrane [9]. Several molecules involved in Ca^{2+} translocation have been localized in to the caveolae, including a *D-myo*-inositol-1,4,5-trisphosphate receptor like protein, dihydropyridine-sensitive Ca^{2+} channels, a Ca^{2+} -ATPase, and Trp1 channels involved in capacitive Ca^{2+} entry [12,13].

It has been shown, in ours laboratory, that there was a modification of caveolin-1 distribution, as well as elongation of the ECs, with respect to the flow direction and times. Variations in their expression were studied following various shear stresses, and biological stimuli (TNF- α). Caveolin-1 expression increased after 24 h exposure to shear stress and there was a down regulation of caveolin-1 in the cells stimulated with TNF- α [14,20,21].

In this work, we studied the role of Ca^{2+} in caveolin-1 expression in the ECs exposed to physiological stimuli, fluid shear stress or TNF- α (pro-inflammatory cytokine).

2. Materials and methods

2.1. Materials

Anti caveolin-1 polyclonal-Ab (rabbit IgG against caveolin-1 residues 2–21; Santa Cruz Biotech, USA); AlexaTM-488 ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$) conjugated goat anti-rabbit IgG, BAPTA/AM and Ionomycin (Molecule Probes, Eugene, Oregon, USA); Hank's balanced salt solution (HBSS), trypsin-EDTA solution, TNF- α , paraformaldehyde and Triton X-100 (Sigma, France); FBS (Fetal bovine serum), M199 medium and Penicillin-Streptomycin and Amphotericin B (GibcoBRL, Life Technologie, France).

2.2. EC culture

The endothelial cell (ECV304, ECACC No.92091712) were grown in M199 medium containing 10% FBS (Fetal bovine serum), antibiotics (50 U/ml penicillin, 50 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin, 1 $\mu\text{g/ml}$ amphotericin B), and 200 mM L-glutamin were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 –95% air. The medium was changed twice a week. For shear stress experiments, the cells were seeded on cover-slides (70 $\times$ 44 mm) at 37°C in a humidified atmosphere (5% CO_2 –95% air) until confluence.

2.3. Treatment of endothelial cell with Ca^{2+}

Confluent monolayer of cells on cover-slides were washed with HBSS and pre-treated with:

- (1) Ca^{2+} free medium;
- (2) Ca^{2+} free medium + 100 μM BAPTA (as calcium chelator);

- (3) Medium with 100 mM CaCl_2 ;
- (4) Medium with 100 mM CaCl_2 + 10 μM calcium ionophore (ionomycin) [22].

Cells were incubated for 30 min at 37°C in each of these conditions, rinsed twice with HBSS and exposed to shear stress 1.2 Pa for 1 h or 4 h.

2.4. Measurement of calcium concentration

The cells adhering to cover-slides were incubated for 30 min in the dark at 37°C with 1 μM Indo-1/AM and 0.02% pluronic acid F127 in normal physiological saline solution (N-PSS) containing 140 mM NaCl, 1 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM glucose, 5 mM HEPES, pH = 7.4 [23], with or without 100 mM CaCl_2 . Before starting the experimental protocol, cells were pre-treated with N-PSS without Ca^{2+} or with BAPTA, or with ionomycin + 100 mM calcium chloride as described above in the treatment. Fluorescence signals of Indo-1 were obtained using a OSP100 device on fluorescence inverted microscope (Olympus, Japan). The fluorescence emitted by the cells formed two-dimensional dual images through the objective (100 $\times$, oil immersion), a beam splitter, a band pass (410 nm) or long pass (480 nm) filters, and photomultipliers. Indo-1 undergoes a large shift in peak emission from 480 (F480) to 410 nm (F410) upon binding with Ca^{2+} .

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ could be feasibly presented by recorded emission fluorescence as a ratio R ($R = F_{410}/F_{480}$).

2.5. Exposing endothelial cells to fluid shear stress or stimulation by $\text{TNF-}\alpha$

A flow chamber was used to impose shear stress on cultured ECs. The glass slide covered by a confluent monolayer of EC was assembled into a parallel plate flow chamber forming a laminar flow. The wall shear stress (τ) can be calculated with the following equation: $\tau = 6Q\mu/H^2W$ where Q is the volumetric flow rate, μ the dynamic viscosity of the medium which was measured by a capillary viscometer after correction of density (0.0072 Pa.s), H is the height (0.025 cm) and W is the width (1.8 cm) of the flow chamber. ECs were exposed to shear stress of 1.2 Pa for different times (1–4 h). Shear experiments were carried out at 37°C. Cells cultured in a static condition were considered as normal controls. The biological stimulation to ECs was performed by $\text{TNF-}\alpha$ of 100 U/ml for 30–60 min at 37°C.

2.6. Immunofluorescence labeling of caveolin-1

Cells were fixed with 1% paraformaldehyde for 10 min at room temperature, rinsed three times with PBS, and permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 2–5 min in PBS solution. After fixation and permeabilization, cells were firstly labelled with rabbit anti-caveolin-1 polyclonal antibody at 1 : 50 dilution for 30 min at room temperature and then the cells were rinsed three times during 5 min each with PBS. Secondary, AlexaTM-488 conjugated goat anti-rabbit IgG was used at a dilution 1 : 100 for 30 min at room temperature in the dark to visualized the primary bound antibodies. At the end of incubation period, cells were washed with PBS, and cells were ready to observe with 3D fluorescence microscopy.

2.7. 3D microscopy fluorescence study

Caveolin-1 expression was observed with a Olympus IX-70 fluorescence inverted microscope equipped with the CellScan optical sectioning acquisition system (Scanalytics, USA). The scanning along the optical axis was performed by a piezoelectric z -axis focus device (z scanning = 0.25 μm) and images were recorded with a slow scan coding 12-bit CCD camera (Princeton Institute, USA).

3. Results

3.1. Change of $[Ca^{2+}]_i$ in different condition

Figure 1 represents the curves of fluorescence intensity (FI) and the ratio of (F_{410}/F_{480}). We can see that the $[Ca^{2+}]_i$ was higher when the cells were treated with ionomycin with high concentration of Ca^{2+} (100 mM), ($R \cong 1.6$, Fig. 1D), than cells incubated with medium rich in calcium (100 mM) ($R \cong 0.8$, Fig. 1C).

But the ratio obtained from the cells pre-treated in the medium free Ca^{2+} was less ($R \cong 0.7$, Fig. 1A, and the least ratio was got in the cells treated with BAPTA (100 μ M) in the medium free Ca^{2+} ($R \cong 0.6$, Fig. 1B). Therefore, the intracellular calcium concentration $[Ca^{2+}]_i$ could be changed in different conditions according to the ratio (F_{410}/F_{480}) as the following order: $[Ca^{2+}]_{iBAPTA} < [Ca^{2+}]_{i\text{free medium}} < [Ca^{2+}]_{i100\text{ mM}} < [Ca^{2+}]_{i100\text{ mM} + \text{ionomycin}}$.

3.2. Effect of Ca^{2+} and shear stress on caveolin-1 expression

Figure 3 showed the localization of caveolin-1 in the cells. In control cells, caveolin-1 was primarily localized on the cell surface (Fig. 2A), but when cells were pre-treated with Ca^{2+} (100 mM) in static condition, an intracellular caveolin distribution, like clusters, was observed (Fig. 2B). After shear stress (1.2 Pa, 1 h or 4 h), an increase of caveolin-1 in the cells was found (Fig. 3b,c), as we have shown in previous works [20,21].

The presence of Ca^{2+} induce an increase of the size of the spots of caveolin-1 (Fig. 2g), and this increase was more showed that there was more in the cells sheared for 4 h than that for 1 h (Fig. 3i,l).

3.3. Effect of Ca^{2+} and $TNF-\alpha$ on caveolin-1 expression

In Fig. 4, the results showed that there was no significant effect of Ca^{2+} on caveolin-1 expression in the cells stimulated by $TNF-\alpha$ (100 U/ml) for different time (30 and 60 min). Moreover our experiments showed a down-regulation of caveolin-1 in the cells stimulated with $TNF-\alpha$, whatever the $[Ca^{2+}]_i$.

4. Discussion and conclusions

Mechanical force is an essential modulator of cell function in many tissues, but is particularly critical in the cardiovascular system. Shear stress, one of the mechanical forces sensed by the endothelium initiated by the blood flow, regulates EC survival, chemokinesis, gene expression, and cytoskeleton remodelling [8]. Because all these cellular responses are consequent to mechanotransduction phenomenon, ECs are therefore able to converting physical forces into intracellular signalling events. Caveolins, a structure protein of caveolae, interact each other and bind to cholesterol to form a caveolin-rich scaffold. The molecular composition and interaction each other of caveolae show that they have the capability to activate messengers such as cAMP, calcium, adenosine and non-receptor tyrosine kinases to initiate crucial phosphorylation cascades [2]. Previous work in our laboratory showed that there was a correlation between caveolin-1 translocation and the hemo-dynamic forces distribution (shear stress gradient and/or pressure), and there could be an increase in caveolin-1 synthesis in the cells under shear stress [20,21].

On the basis of these knowledges, we have been interested in the effect of Ca^{2+} on the expression of caveolin-1 of ECs exposed to shear stress or $TNF-\alpha$. Our results showed that Ca^{2+} changed the

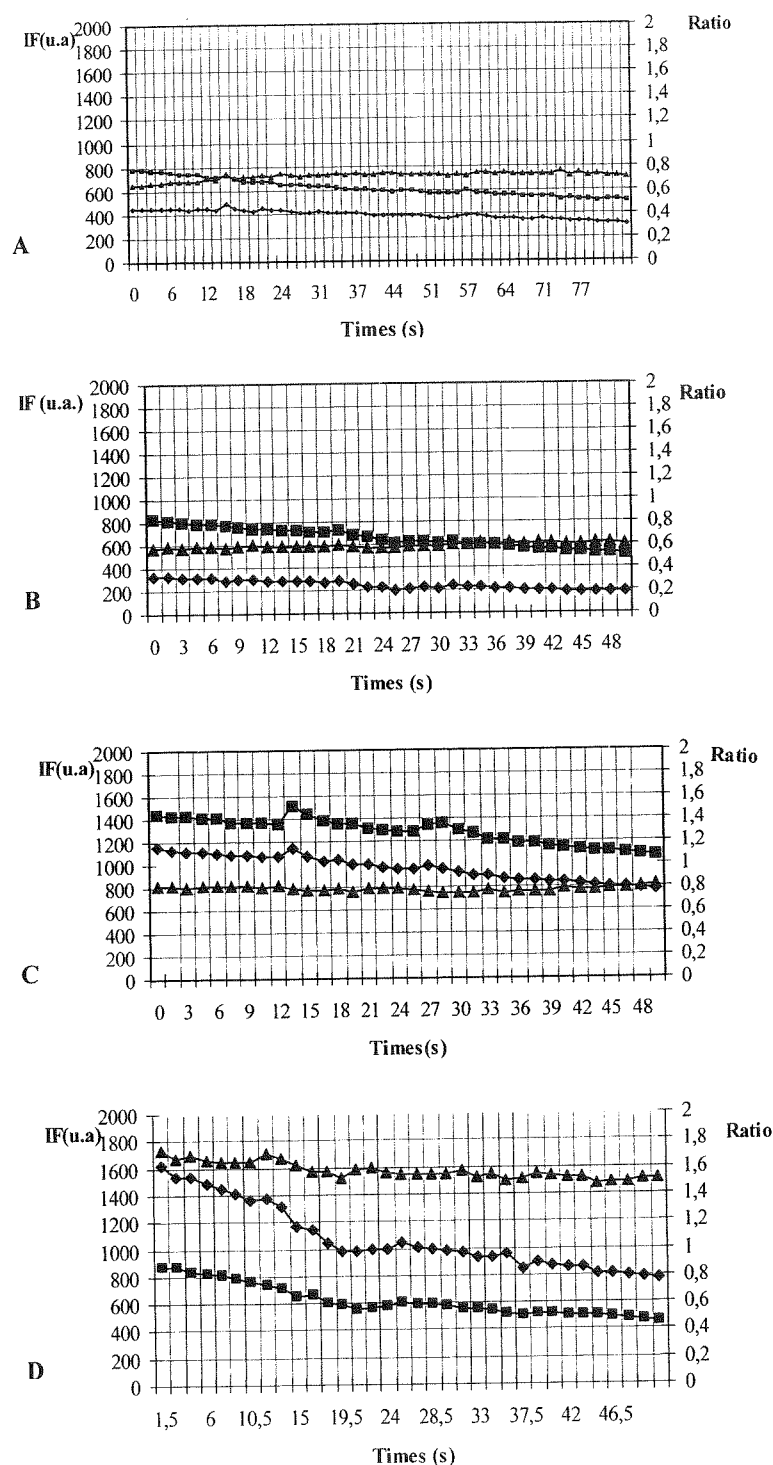


Fig. 1. Kinetic values of $[Ca^{2+}]_i$ of ECs in different Ca^{2+} medium conditions. A; medium free Ca^{2+} , B; medium free Ca^{2+} with BAPTA (100 μ M), C: medium with 100 mM Ca^{2+} , D: medium with 100 mM Ca^{2+} + ionomycin. (■ F_{410} = Indo-1 bind Ca^{2+} , ♦ F_{480} = Indo-1 free Ca^{2+} , ▲ ratio (R) = F_{410}/F_{480} .)

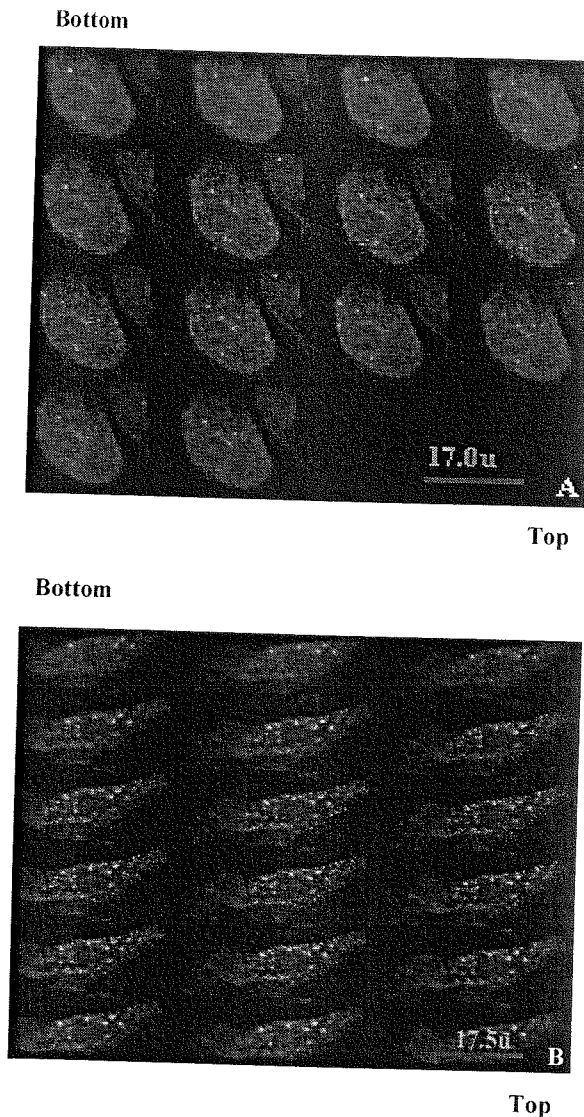


Fig. 2. Effect of Ca^{2+} on caveolin-1 distribution. A and B: Scanning sections of each cell from cell bottom to the top. A: control cell in the absence of Ca^{2+} , B: control cell with 100 mM $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

distribution of caveolin-1, and the formation of spots like cluster, as well as it increased its expression. Therefore, we showed a synergistic effect between Ca^{2+} and shear stress. The increase of caveolin-1 expression in the presence of Ca^{2+} suggest that a higher activity of calcium dependant metabolism could induce a need of sensitive calcium structure, such as a caveolae and then an increase of caveolin-1 in the cells.

On the other hand, our results showed a reduction of caveolin-1 expression in the cells stimulated by $\text{TNF-}\alpha$ for 30 or 60 min. This reduction has been confirmed by a western blot assay in our laboratory (data not shown). One hypothesis of this phenomenon could be explained by the effect of $\text{TNF-}\alpha$ on the eNOS. Indeed, shear stress generated by blood flow is reported to induce Ca^{2+} influx in vascular endothelial cells, thus induce the production of NO and PGI_2 , which cause subsequent vasodilatation [23].

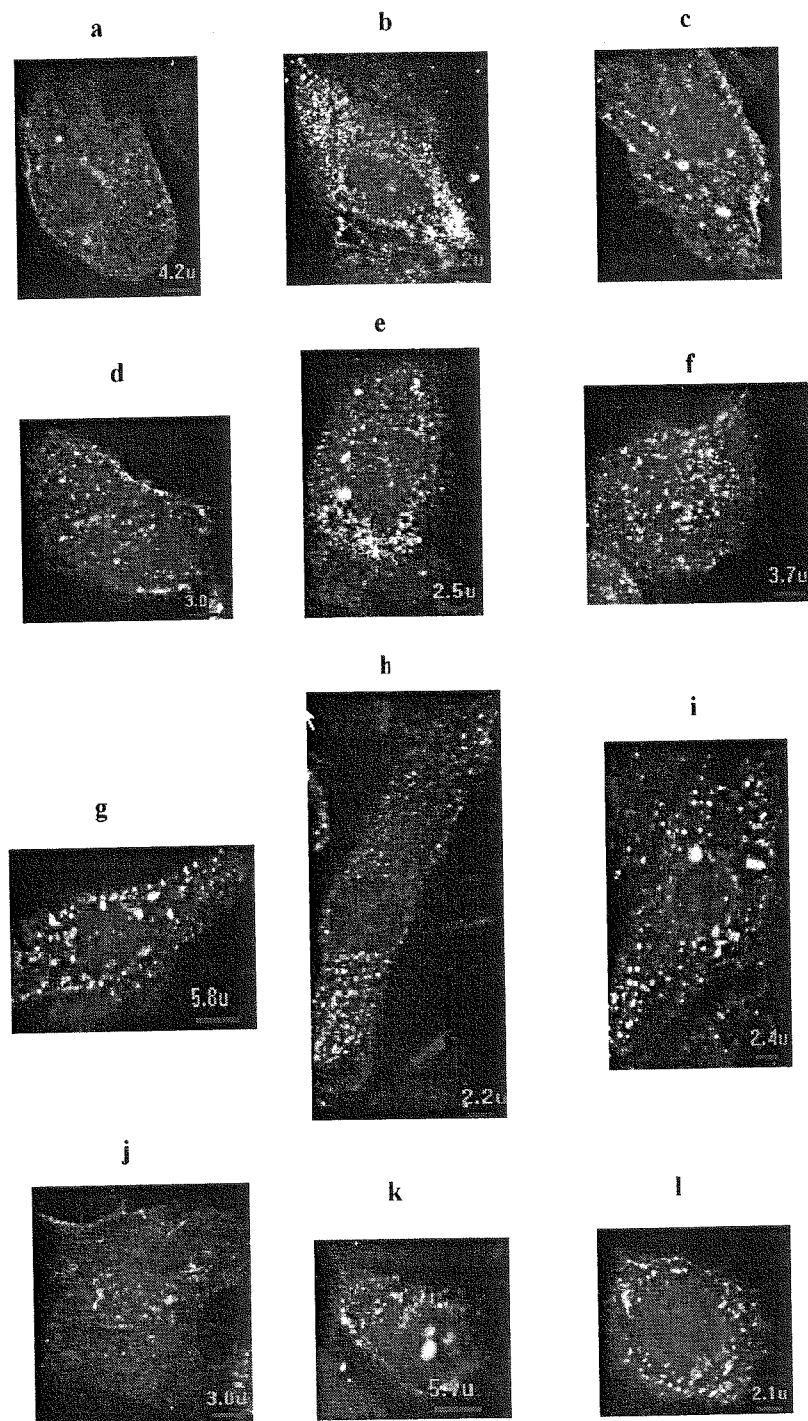


Fig. 3. Effect of Ca^{2+} on caveolin-1 expression of ECs exposed to shear stress. The results were obtained by using an indirect immunofluorescence labelling. Images were obtained by fluorescence microscopy (CELLscan[®], Scanalytic, USA; objective $\times 60/\text{NA } 1.25$). a,b,c: medium free Ca^{2+} ; d,e,f: medium free calcium with BAPTA ($100 \mu\text{M}$); g,h,i: medium with 100 mM calcium; j,k,l: medium with 100 mM calcium + $10 \mu\text{M}$ Ionomycin. a,d,g,j: control cells; b,e,h,k: $\tau = 1.2 \text{ Pa}$ for 1 h, c,f,i,l: $\tau = 1.2 \text{ Pa}$ for 4 h.

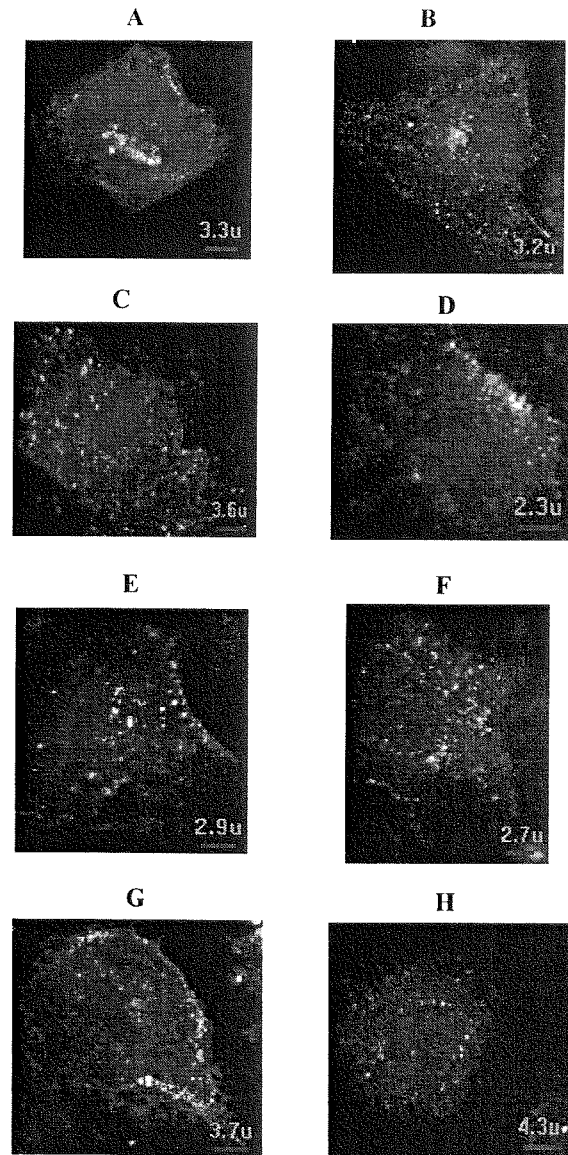


Fig. 4. Effect of Ca^{2+} on caveolin-1 expression of ECs stimulated by $\text{TNF-}\alpha$. The results were obtained by using an indirect immunofluorescence labelling. Images were obtained by fluorescence microscopy (CELLscan[®], Scanalytic, USA; objective $\times 60/\text{NA } 1.25$). A,B: medium free Ca^{2+} ; C,D: medium free calcium with BAPTA ($100 \mu\text{M}$), E,F: medium with 100 mM calcium; G,H: medium with 100 mM calcium + $10 \mu\text{M}$ Ionomycin. A,C,E,G: $\text{TNF-}\alpha$ stimulation for 30 min ; B,D,F,H: $\text{TNF-}\alpha$ stimulation for 60 min .

NO is produced by eNOS, which is highly concentrated in endothelial cell caveolae, and it is classified as a constitutive and strictly Ca^{2+} /calmodulin (CaM) dependent enzyme [5]. Moreover, it has been demonstrated that $\text{TNF-}\alpha$ reduce the expression of eNOS mRNA in endothelial cells [1]. $\text{TNF-}\alpha$ could also induces a decrease of caveolin-1 expression. More experiment is needed to explain this phenomenon. Thus, we can conclude that caveolae was implicated under the main pathway of the answer of EC to shear stress, and seems to be regulated by the Ca^{2+} wave.

Acknowledgements

This work was partly supported by Region de Lorraine (PRST Bioengineering), and the “Association Franco-Chinoise pour la Recherche Scientifique & Technique (PRA B02-08)”, and NSFC (30170241).

References

- [1] A. Aljada, H. Ghanim, E. Assian and P. Dandona, Tumor necrosis factor- α inhibits insulin-induced increase in endothelial nitric oxide synthase and reduces insulin receptor content and phosphorylation in human aortic endothelial cells, *Metabolism* **4** (2002), 487–491.
- [2] R.G. Anderson, Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** (1993), 10909–10913.
- [3] R.G. Anderson, The caveolae membrane system, *Annu. Rev. Biochem.* **67** (1998), 199–225.
- [4] J. Couet, M.M. Belanger, E. Roussel and M.C. Drolet, Cell biology of caveolae and caveolin, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **49** (2001), 223–235.
- [5] I. Fleming and R. Busse, Signal transduction of eNOS activation, *Cardiovasc. Res.* **43** (1999), 532–541.
- [6] J.P. Gratton, P. Bernatchez and W.C. Sessa, Caveolae and caveolins in the cardiovascular system, *Circ. Res.* **94** (2004), 1408–1417.
- [7] J. Harris, D. Werling, J.C. Hope, G. Taylor and C.J. Howard, Caveolae and caveolin in immune cells: distribution and functions, *Trends Immunol.* **23** (2002), 158–164.
- [8] M. Isshiki and R.G. Anderson, Function of caveolae in Ca^{2+} entry and Ca^{2+} -dependent signal transduction, *Traffic* **4** (2003), 717–723.
- [9] M. Isshiki, J. Ando, R. Korenaga, H. Kogo, T. Fujimoto, T. Fujita and A. Kamiya, Endothelial Ca^{2+} waves preferentially originate at specific loci in caveolin-rich cell edges, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** (1998), 5009–5014.
- [10] M. Isshiki and R.G.W. Anderson, Calcium signal transduction from caveolae, *Cell Calcium* **26** (1999), 201–208.
- [11] M. Isshiki, J. Ando, K. Yamamoto, T. Fujita, Y. Ying and R.G. Anderson, Sites of Ca^{2+} wave initiation move with caveolae to the trailing edge of migrating cells, *J. Cell Sci.* **115** (2002), 475–484.
- [12] O. Kifor, R. Diaz, R. Butters, I. Kifor and E.M. Brown, The calcium-sensing receptor is localized in caveolin-rich plasma membrane domains of bovine parathyroid cells, *J. Biol. Chem.* **273** (1998), 21708–21713.
- [13] R.D. Minshall, W.C. Sessa, R.V. Stan, R.G. Anderson and A.B. Malik, Caveolin regulation of endothelial function, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **285** (2003), L1179–L1183.
- [14] S. Muller, V. Labrador, N. Da Isla, D. Dumas, R. Sun, X. Wang, L. Wei, S. Fawzi-Grancher, W. Yang, M. Traore, C. Boura, D. Bensoussan, A. Eljaafari and J.F. Stoltz, From hemorheology to vascular mechanobiology: An overview, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **30** (2004), 185–200.
- [15] H. Park, Y.M. Go, R. Darji, J.W. Choi, M.P. Lisanti, M.C. Maland and H. Jo, Caveolin-1 regulates shear stress-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **278** (2000), H1285–H1293.
- [16] D. Predescu and G.E. Palad, Plasmalemmal vesicles represent the large pore system of continuous microvascular endothelium, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **265** (1993), H725–H733.
- [17] B. Razani and M.P. Lisanti, Caveolins and caveolae: molecular and functional relationships, *Exp. Cell Res.* **271** (2001), 36–44.
- [18] B. Razani, A. Schlegel, J. Liu and M.P. Lisanti, Caveolin-1, a putative tumour suppressor gene, *Biochem. Soc. Trans.* **29** (2001), 494–499.
- [19] G.N. Stamatas and L.V. McIntire, Rapid flow-induced responses in endothelial cells, *Biotechnol. Prog.* **17** (2001), 383–402.
- [20] R.J. Sun, S. Muller, J.F. Stoltz and X. Wang, Shear stress induces caveolin-1 translocation in cultured endothelial cells, *Eur. Biophys. J.* **30** (2002), 605–611.
- [21] R.J. Sun, S. Muller, F.Y. Zhuang, J.F. Stoltz and X. Wang, Caveolin-1 redistribution in human endothelial cells induced by laminar flow and cytokine, *Biorheology* **40** (2003), 31–39.
- [22] H. Watanabe, R. Takahashi, X.X. Zhang, Y. Goto, H. Hayashi, J. Ando, M. Isshiki, M. Seto, H. Hidaka, I. Niki and R. Ohno, An essential role of myosin light-chain kinase in the regulation of agonist- and fluid flow-stimulated Ca^{2+} influx in endothelial cells, *FASEB J.* **12** (1998), 341–348.
- [23] X. Yao, H.Y. Kwan, F.L. Chan, N.W. Chan and Y. Huang, A protein kinase G-sensitive channel mediates flow-induced Ca^{2+} entry into vascular endothelial cells, *FASEB J.* **14** (2000), 932–938.

RESUME

Interactions des lipoprotéines de faible densité avec les cellules endothéliales vasculaires humaines : influence des contraintes de cisaillement – étude *in vitro* par microscopie de fluorescence confocale

De nombreuses études sur la genèse de l'athérosclérose suggèrent l'existence de nombreuses étapes, telles que l'accumulation de lipides le long de la paroi artérielle, qui entraîne l'entrée des LDL-Cholestérol dans les cellules, suivi par une oxydation de ces lipoprotéines. Dans notre étude, nous avons développé une approche méthodologique couplant la microscopie confocale et des méthodes spectroscopiques (techniques de transfert d'énergie (FRET) et de corrélation de fluorescence (FCS)) pour étudier l'effet des contraintes de cisaillement sur la cinétique d'internalisation de LDL natives dans des cellules endothéliales vasculaires humaines.

Les LDL natives ont été marquées avec deux sondes fluorescentes : le perchlorate de 1,1'-dioctadécyl-3,3,3',3'-tétraméthylindocarbocyanine (DiO) comme donneur et le perchlorate de 3,3'-dioctadécyloxa-carbocyanine (DiI) comme récepteur. La FCS nous a permis d'évaluer le rendement du marquage des LDL par les deux fluorophores ainsi que de la dégradation des LDL, la durée de vie moyenne des molécules a été déterminée par la technique de FLIM, alors que les mesures de FRET nous ont permis de mesurer les cinétiques de dégradation des LDL internalisées dans les cellules.

Nos études ont montré : **1)** – que le rendement du double marquage des LDL est de l'ordre de 30% après 24 h d'incubation des LDL avec DiI et DiO, et 82,84 % des molécules de DiI portées par les LDL sont sujets au processus de FRET avec le DiO ; **2)** – la durée de vie moyenne mesurée expérimentalement par la technique de FLIM, pour le DiO couplé aux LDL dans les HUVECs suite à une excitation en mode multiphoton ($\lambda_{ex} = 800$ nm) des molécules est de l'ordre de $2100 \text{ ps} \pm 800$ par ajustement d'ordre 1, tandis celle du DiO couplé aux DiI-LDL mesurée dans les mêmes conditions est de l'ordre de $320 \text{ ps} \pm 400$. Cette diminution de la durée de vie du donneur DiO (de 2100 ps à 320 ps) en présence de DiI reflète un transfert d'énergie dépendante de la proximité moléculaire des deux partenaires sur la molécule de LDL. **3)** – la possibilité d'évaluer la cinétique d'internalisation et de dégradation des LDL dans les cellules vasculaires endothéliales, ainsi que la dépendance de la dégradation des lipoprotéines aux contraintes de cisaillement.

Au regard des données de la littérature et de nos résultats, nous pouvons conclure que le couplage des études de microscopie confocale, de FRET, FCS et de FLIM permettent l'étude *in situ* de l'internalisation et de la dégradation des LDL et d'appliquer ces résultats aux études cliniques sur l'athérosclérose. Cependant, d'autres études seront nécessaires pour élucider les mécanismes moléculaires de la modulation de l'expression des récepteurs aux LDL par les contraintes de cisaillement.

Mots clés : cellule endothéliale, lipoprotéines de faible densité, athérosclérose, contraintes de cisaillement, microscopie confocale, FRET, FCS, FLIM.

ABSTRACT

Interaction of low density lipoproteins with human vascular endothelial cell: influence of shear stress – *in vitro* study by fluorescence confocal microscopy

Numerous studies on the pathogenesis of atherosclerosis suggest that several steps are involved, such as lipid accumulation in the artery wall resulting from transendothelial uptake of LDL-Cholesterol, followed by LDL oxidation. In this work, we developed spectroscopic and microscopic methods to study the effect of shear stress on the kinetics of internalization and degradation of native LDL in human vascular endothelial cells.

FRET and FCS techniques were performed by using confocal microscopy. Native LDL were labeled with two carbocyanine dyes, 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiO) as donor and 3,3'-dioctadecyloxa-carbocyanine perchlorate (DiI) as receptor. FCS techniques allowed us to evaluate the yield of the double labeling of the LDL with DiI and DiO, whereas the average lifetime of the both fluorophore was determined by FLIM techniques, and the FRET measurements enable us to follow the degradation of the LDL in the living single cells.

Our studies show: **1)** – that the yield of the LDL double-labeling with DiI and DiO was about 30%, and 82,84% of DiI carried by LDL are subject in FRET process with DiO. **2)** – the average lifetime of DiO coupled with LDL in HUVEC was about $2100 \text{ ps} \pm 800$ by adjustment of order 1 following the excitation of molecules in multiphoton mode ($\lambda_{ex} = 800$ nm), whereas the average lifetime of DiO coupled with DiI-LDL measured under the same conditions was about $320 \text{ ps} \pm 400$, this decreasing of the lifetime of the donor DiO (from 2100 ps to 320 ps) in the presence of DiI reflects the energy transfer dependent on the molecular proximity of the two partners (DiO, DiI) on LDL molecules ; **3)** – the possibility to evaluate the kinetics of LDL endocytosis in living single cells and the degradation of LDL was depending on the shear conditions (shear stress induced changes in the kinetics of uptake and degradation).

In accordance with increasing knowledge and understanding, and regarding all available data, we conclude that confocal microscopic study, FRET, FCS and FLIM could be useful methods to establish the basic and clinical studies of LDL uptake in atherosclerosis. However, further studies need to be performed to elucidate the molecular mechanism by which shear stress modulates the expression of LDL receptors.

Key words: endothelial cell, low density lipoproteins, atherosclerosis, shear stress, confocal microscopy, FRET, FCS, FLIM.

Spécialité: Ingénierie Cellulaire et Tissulaire

Groupe Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, LEMTA UMR 7563 CNRS-INPL-UHP et IFR 111 CNRS-UHP
Nancy-Université, Université Henri Poincaré Nancy-1, Faculté de Médecine, B.P. 184, 54505 Vandoeuvre-lès- Nancy
Cedex, France.

Nom : **Mademoiselle TRAORE**

Prénom : **Mariama**

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

en **BIOLOGIE SANTÉ ENVIRONNEMENT**

Spécialité **INGÉNIERIE CELLULAIRE ET TISSULAIRE**

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER N°

Nancy, le 10/6/08

Le Président de l'Université

Jean-Pierre FINANCE

