

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Effet des agents enzymatiques antioxydants dans les cellules endothéliales

Toussaint, Olivier

*Award date:*  
1988

*Awarding institution:*  
Universite de Namur

[Link to publication](#)

#### **General rights**

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

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

#### **Take down policy**

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

1988



FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX  
NAMUR  
FACULTÉ DES SCIENCES

---

**Effet des agents enzymatiques  
antioxydants dans les cellules endothéliales.**

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

**Olivier Toussaint.**

## Remerciements.

Imprimer ceci à l'aide d'un traitement de texte m'aurait donné l'impression que je me cachais pour dire merci.

Merci à Monsieur le Professeur J. Remacle qui m'a accueilli dans son laboratoire et qui, grâce à son art de la navigation, m'a guidé, ce qui m'a permis d'éviter les hauts-fonds.

Combien sont grandes la patience et la gentillesse de Carine et d'Andrée. Vous m'avez tout appris, jusqu'à l'organisation ou la facilitation du moindre mouvement.

Ces quelques mots sont aussi dédiés à tous les membres du laboratoire qui m'ont aidé, et bien souvent sauvé de situations "périlleuses", par leurs conseils judicieux (et leurs réponses spontanées à tous mes appels au secours).

Vous vous reconnaissez tous, j'ai bien envie de citer vos prénoms, si je vous remercie de m'avoir soutenu, volontairement ou non, aux moments où tout pouvait basculer : votre amitié, vos soutiens, votre humour et votre expérience ont été le support nécessaire à la réalisation de ce travail et m'ont fait découvrir jusqu'où pouvait aller le respect de l'autre, la solidarité et la gaieté de vivre.

Enfin, je pense à ma famille et surtout à mes parents qui m'ont eu quel le choix d'apprendre qu'il faut savoir ce qu'on veut, s'y tenir et se donner pour y parvenir.

Pour m'avoir permis de vivre cette expérience, merci à tous.

Olivier Toussaint.

## Plan de ce mémoire.

### I. Introduction

- (1) Définitions préliminaires - Présentation des antagonistes.
    - 1) Les radicaux libres et leur réactivité.
    - 2) Les radicaux libres dérivés de l'oxygène moléculaire.
  - (2) Les radicaux libres en biologie - Origine des antagonistes.
    - (A) Les sources exogènes.
    - (B) Les sources endogènes.
  - (3) Toxicité des radicaux libres.
    - .Les réactions d'altération des molécules biologiques.
      - (A) Peroxydation lipidique.
      - (B) Altération de l'ADN.
      - (C) Altération des molécules cytosoliques.
      - (D) Altération des molécules extracellulaires.
    - .Rôles bénéfiques des radicaux libres.
      - (a) Intervention des molécules dans l'inflammation.
      - (b) Métabolisme de certaines molécules.
  - (4) Les protections de l'organisme envers les radicaux libres dérivés de l'oxygène moléculaire.
    - (A) Les protections enzymatiques.
      - a) La superoxyde dismutase.
      - b) La catalase.
      - c) La glutathion peroxydase.
    - (B) Protections non enzymatiques.
      - a) Le glutathion.
      - b) La vitamine E.
      - c) La vitamine C ou acide ascorbique.
        - Toxicité comparée de la vitamine C et de la vitamine E.
- Conclusion sur les antioxydants naturels.

(5) La cellule endothéliale.

(6) Cellules endothéliales et stress oxydants.

- a) Les cellules endothéliales face aux phagocytes activés.
- b) Hyperoxie - xénobiotiques - ozone - dioxyde d'azote.
- c) L'ischémie et la reperfusion.

## II Matériels et méthodes.

- 1) Mise en culture des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine.
- 2) Repiquage des cellules et subcultures.
- 3) Mise en évidence de la protéine F VIII : R ag du facteur VIII de la coagulation par immunofluorescence.
- 4) Micro-injection.
- 5) Stress oxydant : un modèle d'hyperoxie.
- 6) Effet de la vitamine E et de la vitamine C.
- 7) Dosages enzymatiques.
  - a) Dosage de catalase.
  - b) Dosage de la SOD.
  - c) Dosage de la glutathion peroxydase.
- 8) Dosage du GSH et du GSSG par spectrofluorimétrie.
- 9) Dosage de la malonaldéhyde.
- 10) Autoradiographie.
- 11) Test statistique.

## III Résultats.

- 1) Mise en culture des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine.
- 2) Subcultures.
- 3) Marquage par immunofluorescence de la protéine F VIII : R ag du facteur VIII de la coagulation.
- 4) Dosage des enzymes antioxydants et du glutathion dans les CE; comparaison avec les fibroblastes.

5) Les CE et l'hyperoxie.

5.1. Dosage de la malonaldéhyde (MDA) dans le milieu de culture M199+S.

5.2. Autoradiographie.

5.3. Evolution morphologique des CE sous hyperoxie.

5.4. Evolution du contenu en GSH et en GSSG pendant deux jours d'hyperoxie.

6) Etude de l'effet de la vitamine E et de la vitamine C sur les CE sous hyperoxie.

7) Effet de la micro-injection d'enzymes antioxydants sur la survie des CE soumises à une hyperoxie.

7.1. Effet de la micro-injection sur la survie des CE.

7.2. Micro-injection d'enzymes antioxydants.

a) Résultats obtenus pour la micro-injection de catalase (CAT).

b) Résultats obtenus pour la micro-injection de la superoxyde dismutase (SOD).

c) Résultats obtenus pour la micro-injection de la glutathione peroxydase (GPX).

IV Conclusion.

V Bibliographie.

## But de ce mémoire.

Par leur proximité de sources majeures de radicaux libres dérivés de l'oxygène moléculaire (leucocytes polymorphonucléaires activés lors de l'inflammation, pollution atmosphérique, hyperoxie pulmonaire) ou par leur propre production de radicaux libres (activation de la xanthine oxydase), les cellules endothéliales subissent souvent les effets néfastes de ces radicaux libres.

L'introduction de ce mémoire se divise en trois grandes parties. Dans la première partie, après avoir défini les radicaux libres dérivés de l'oxygène moléculaire, nous passons en revue les sources de radicaux libres, externes et internes aux organismes vivants. Nous décrivons ensuite les principales réactions d'altération des molécules biologiques causées par la réactivité de ces radicaux et nous développons les principaux mécanismes de protection qui défendent les êtres vivants aérobies, constamment agressés par les radicaux libres dérivés de l'oxygène moléculaire.

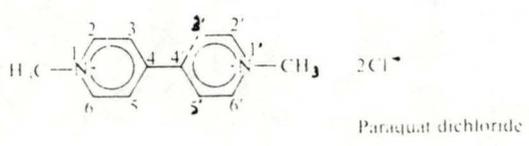
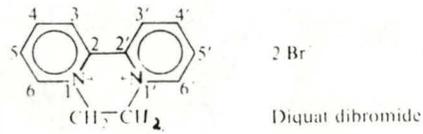
La seconde partie décrit brièvement les caractéristiques les plus remarquables des cellules endothéliales.

Enfin, nous développons trois modèles de stress oxydants : nous montrons comment l'activation des leucocytes polymorphonucléaires, l'hyperoxie (= augmentation de la concentration en oxygène) et la reperfusion (= reprise de la circulation sanguine après une interruption momentanée) peuvent endommager la cellule endothéliale.

La connaissance de l'importance des possibilités de défense des cellules endothéliales était, dans ce mémoire, un pré-requis nécessaire à la recherche de certains agents de protection face à l'agression des molécules radicalaires. Outre la réalisation d'expériences avec des antioxydants extracellulaires, nous avons testé l'effet d'antioxydants enzymatiques introduits dans la cellule.

Nous avons choisi de travailler *in vitro* sur des cultures de cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine et d'appliquer la technique de micro-injection de solutions d'enzymes, dans un modèle d'hyperoxie.

L'observation des effets de protection de certaines molécules face à l'hyperoxie permet, par la connaissance des réactions qu'elles inhibent, une approche du talon d'Achille de la défense des cellules endothéliales face aux radicaux libres, préalable indispensable à la recherche de moyens de protection face à certains troubles dus notamment à l'inflammation, à la reperfusion ou au syndrome de détresse respiratoire de l'adulte.



**Figure 1.** Les herbicides paraquat et diquat sont des molécules qui peuvent capter un électron et rester stables dans cette forme radicalaire (d'après Halliwell et Gutteridge, 1987).

## I. Introduction

### (1) Définitions préliminaires - Présentations des antagonistes.

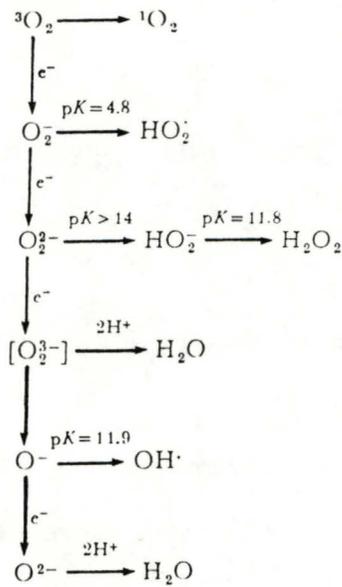
To be tired of dioxygen chemistry is to be tired of life (Green *et al.*, 1984).

#### 1) Les radicaux libres et leur réactivité.

Par définition, les radicaux libres sont des entités chimiques qui contiennent un nombre impair d'électrons. Ils peuvent être de charge positive, négative ou nulle. Par exemple, le radical  $\text{CCl}_3\cdot$  provenant du tétrachlorure de carbone ( $\text{CCl}_4$ ) par perte d'un radical  $\text{Cl}\cdot$  et le radical thiyl qui résulte de l'abstraction de l'atome d'hydrogène d'un thiol ( $\text{R-SH}$ ) par un autre radical libre ( $\text{R}'\cdot$ ), selon la réaction  $\text{R-SH} + \text{R}'\cdot \longrightarrow \text{RS}'\cdot + \text{RH}$ , sont des radicaux libres neutres (Pryor, 1976). Un exemple de radical libre positif est le cation bipyrynyl de certains herbicides comme le paraquat (Halliwell et Gutteridge, 1985) (figure 1). Le radical superoxyde ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) est un radical de charge négative (voir infra). Par la présence d'un électron célibataire, les radicaux libres présentent une forte réactivité. Cette réactivité dépend de leur nature. Même à une température de  $37^\circ$  celsius, des différences de réactivité sont encore nettes. Le radical  $\text{Cl}\cdot$  et le radical hydroxyle  $\text{OH}\cdot$  sont d'une réactivité telle que leur probabilité de réaction atteint presque celle de leur collision avec des molécules voisines. Ils existent donc en très faible concentration dans un milieu donné. La plupart des radicaux libres organiques, dont le radical thiyl, bien que moins réactionnels que le radical hydroxyle, sont aussi d'une réactivité élevée. Certains radicaux libres constituent des exceptions et réagissent assez lentement; le radical nitroxyde ( $\text{R}_2\text{N-O}\cdot$ ) en est un bon exemple (Pryor, 1976).

#### 2) Les radicaux libres dérivés de l'oxygène moléculaire ( $\text{O}_2$ ).

Ils peuvent être présentés par la description brève de la réduction monovalente de l' $\text{O}_2$  : l'oxygène moléculaire est une molécule paramagnétique c'est-à-dire que ses deux électrons non appariés ont des spins parallèles qui lui confèrent des propriétés

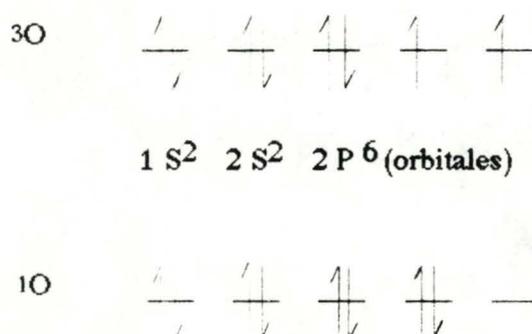


La réduction monovalente de l'oxygène moléculaire se solde par la production de radicaux libres. Ce schéma présente les différentes étapes de cette réduction vers la molécule d'eau. La première étape donne le radical superoxyde ( $\text{O}_2^{\cdot(-)}$ ) et son acide conjugué, à l'issue de la seconde est formé le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). La phase suivante, en l'occurrence la formation d'une molécule possédant trois charges négatives est hypothétique et, si elle existe, très brève. L'avant-dernière étape produit des radicaux hydroxyles ( $\text{OH}^\cdot$ ), très réactionnels. La phase ultime aboutit à la formation de l'eau.

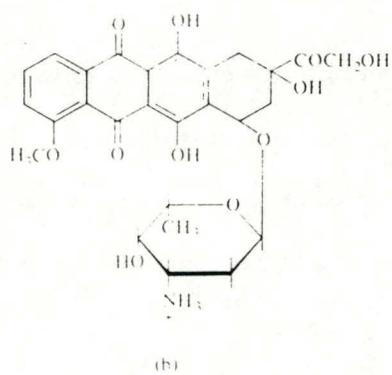
**Figure 2.** La réduction monovalente de l'oxygène moléculaire (d'après Halliwell et Gutteridge, 1987).

telles que, dans un champ magnétique, trois états sont révélés : il y a formation d'un triplet ( $^3O_2$ ) (Green *et al.*, 1984).

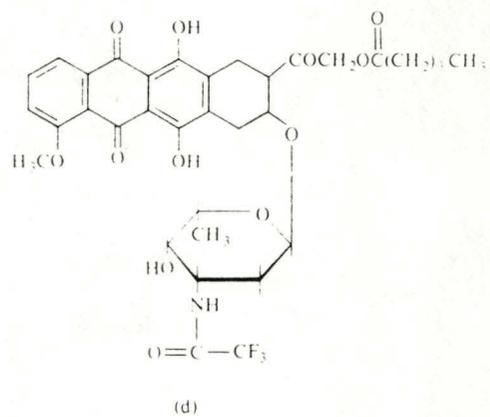
La conversion de l'oxygène moléculaire en sa forme excitée, décrite sous le nom de "oxygène singulet" ( $^1O_2$ ), donne une molécule qui ne révèle qu'un état dans un champ magnétique, les deux électrons non appariés ayant des spins antiparallèles (Pryor, 1976). La réactivité de la molécule à l'état singulet est supérieure à celle de la même molécule à l'état triplet (Sies, 1985).



Les électrons de la plupart des composés organiques qui pourraient réagir avec l'oxygène moléculaire sont répartis en doublets électroniques formés de deux électrons de spins antiparallèles. L'insertion simultanée de deux électrons d'un même doublet dans une molécule d'oxygène à l'état triplet violerait les lois de la mécanique quantique, deux électrons de même spin se retrouvant dans un même doublet; en conséquence, l'oxygène, à l'état triplet, est assez peu réactionnel. Il est cependant possible que deux électrons d'un même doublet soient transférés consécutivement sur l'oxygène moléculaire, formant ainsi des intermédiaires radicalaires de la réduction de l'oxygène moléculaire. La réduction de l'oxygène en eau par les tissus vivants se réalise de deux façons différentes. La cytochrome oxydase réduit plus de 95 pourcents de l'oxygène en eau par la réduction tétravalente suivante :  $4 e^- + 4 H^+ + O_2 \longrightarrow 2 H_2O$ . Cette réduction se réalise par le transfert de quatre électrons non appariés mais sans que des intermédiaires radicalaires ne soient détectés en dehors de l'enzyme ; pour les quelques pourcents restants, la réduction est univalente et produit ainsi des intermédiaires radicalaires (Hammond *et al.*, 1985). La figure 2 présente les différents intermédiaires de la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire.



adriamycin



AD32

**Figure 3.** L'adriamycine et son dérivé, l'AD 32, produisent des radicaux libres par le cycle rédox de leur quinone (d'après Halliwell et Gutteridge, 1987).

Par leur réactivité, les radicaux libres affectent potentiellement tous les aspects de la biologie moléculaire que ce soit au niveau des molécules de structure, du métabolisme ou du matériel génétique de la cellule vivante (Freeman et Crapo, 1982). Des mécanismes de protection ont évolué chez tous les organismes aérobies (Fridovich, 1976) et permettent la défense de ces derniers par la détoxification de ces radicaux.

Des xénobiotiques (médicaments, produits toxiques) (Roberfroid *et al.*, 1987), d'autres stress environnementaux (fumée de tabac, hyperoxie, pollution,...) et des états pathologiques peuvent, au moins localement, surpasser ces défenses et porter atteinte au bon déroulement des processus biologiques.

## **(2) Les radicaux libres en biologie - Origine des antagonistes.**

Les radicaux libres dérivés de l'oxygène moléculaire sont produits tant par certaines conditions environnementales que par l'organisme lui-même lors du fonctionnement normal des cellules.

(A) Les sources exogènes: les xénobiotiques. En plus de toutes les sources naturelles de radicaux libres dans l'environnement (rayonnements divers dont la lumière, présence de radicaux dans l'alimentation (Chan, 1987), ...), beaucoup de molécules synthétisées par l'homme sont à l'origine de la production de radicaux libres.

Des agents antinéoplasiques (ex : l'adriamycine (figure 3) qui, lors de son cycle redox, réduit du  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$  qui intervient dans la réaction de Fenton (cfr infra)), des anesthésiques et des antibiotiques possédant des quinones sont capables de réduire l'oxygène moléculaire en  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  et en  $\cdot OH$  (Freeman et Crapo, 1982).

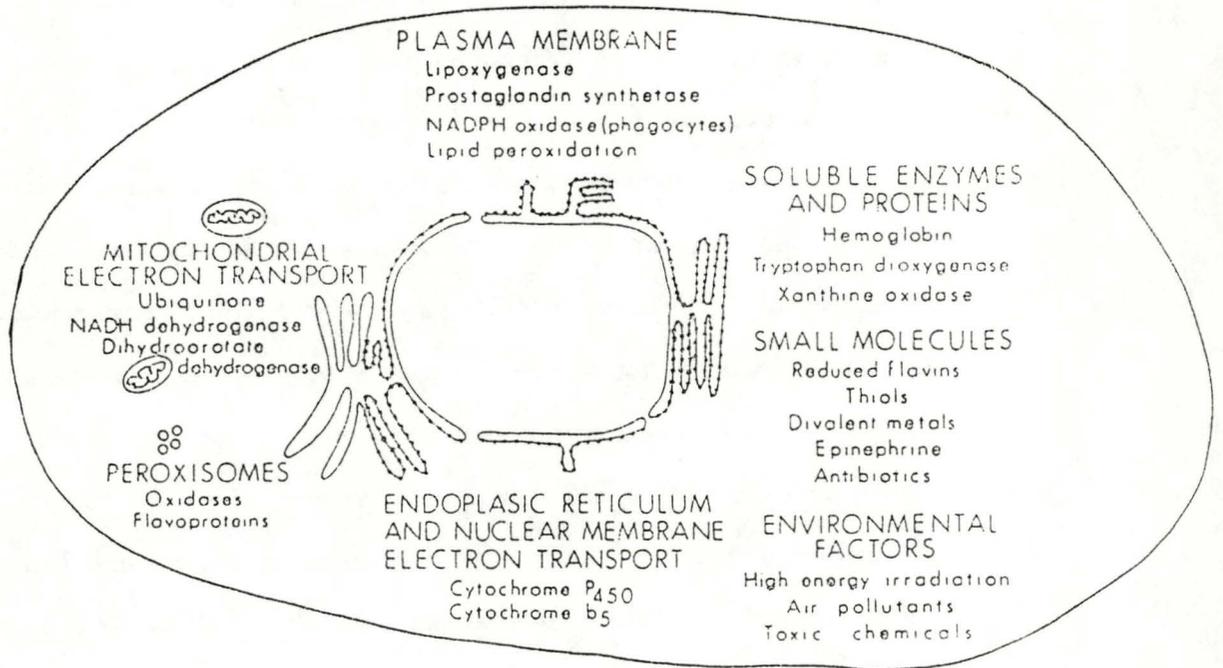
L'irradiation par des radiations électromagnétiques (rayons X) et par des radiations particulaires ( $e^-$ , particules  $\alpha$ ,  $\beta$ , ...) produisent des radicaux libres par transfert d'énergie notamment à la molécule d'eau (Freeman et Crapo,

1982). En présence d'oxygène, ce sont surtout des radicaux hydroxyles qui sont produits par les rayons X (Schulte-Frohlinde et Von Sonntag, 1985).

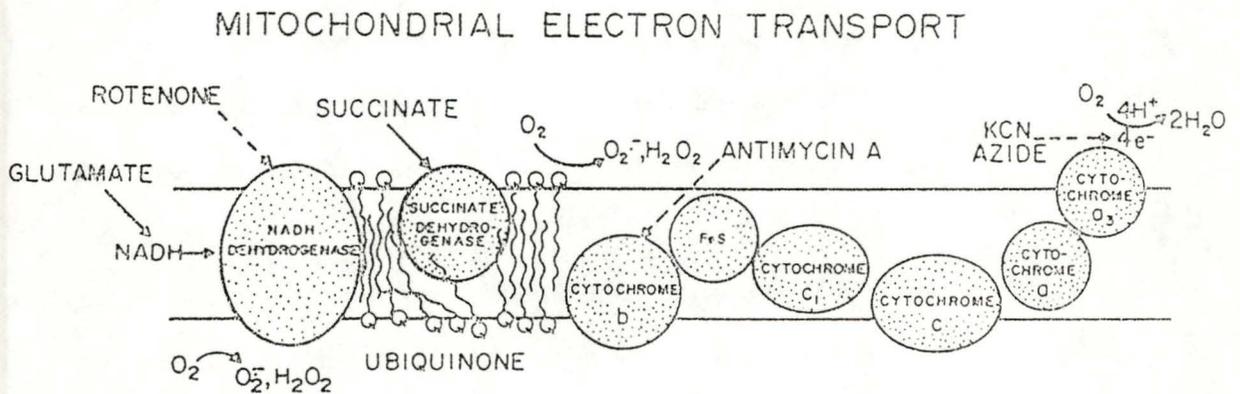
Un autre exemple intéressant est la fumée de tabac. Qu'elle soit inhalée par les fumeurs ou les non fumeurs, elle contient des radicaux libres qui activent les polymorphonucléaires neutrophiles pulmonaires et inactivent un inhibiteur de protéases, l' $\alpha$ -1 antiprotéase dont le rôle est d'inhiber l'élastase libérée par les phagocytes. Si cette élastase n'est plus inhibée, cela peut entraîner une série de modifications du tissu pulmonaire pouvant entraîner à long terme l'emphysème pulmonaire. Le dioxyde d'azote peut aussi réaliser des abstractions d'hydrogène ouvrant ainsi les voies de la peroxydation lipidique, il peut aussi oxyder la cystéine et le glutathion (Bendich *et al.*, 1986; Halliwell et Gutteridge, 1985).

Certains pesticides et herbicides ont un mode d'action basé sur la production de radicaux libres dans l'organisme cible. Le paraquat, herbicide largement utilisé, agit sur des protéines non hémiques du photosystème I et sur une NADP-réductase des chloroplastes de nombreuses espèces de plantes. L'industrie produit celui-ci sous forme d'un cation divalent ( $BP^{2+}$ ) qui accepte un électron pour devenir un cation bypirinyl monovalent ( $BP^{\cdot+}$ ). En présence d'oxygène moléculaire, la réaction suivante se produit :  $BP^{\cdot+} + O_2 \longrightarrow O_2^{\cdot(-)} + BP^{2+}$ . Malheureusement, cet herbicide agit aussi au niveau des poumons sur les espèces animales et provoque de nombreux effets toxiques (Halliwell et Gutteridge, 1985).

Créés par des réactions photochimiques, des gaz atmosphériques tels que l'ozone et le dioxyde d'azote ( $O_3$  et  $NO_2$ ) sont aussi des sources de radicaux libres. On les rencontre dans des conditions particulières bien connues. 90 % des effets d'oxydation du "smog" de la côte de la Californie du sud aux U.S.A. sont dus à l'ozone. Naturellement synthétisé en altitude, l'ozone pourrait donc être en concentration toxique dans la carlingue de certains avions mais, heureusement, malgré des cas répertoriés de trop hautes concentrations à l'intérieur de certains avions, l'ozone est instable et est détruit de façon majeure



**Figure 4. Résumé de la plupart des sources endogènes et exogènes de radicaux libres dans une cellule (d'après Freeman et Crapo, 1982).**



**Figure 5. Production mitochondriale de radicaux libres via la chaîne des transporteurs d'électrons (d'après Freeman et Crapo, 1982).**

par contact avec les surfaces métalliques des avions. Les équipements à haute tension et des purificateurs d'air et d'eau sont aussi des sources d'ozone.

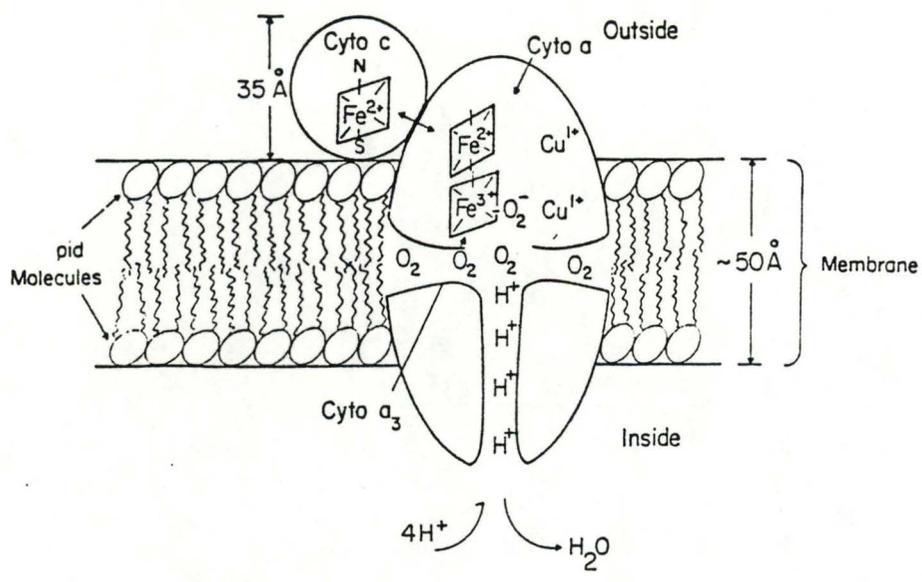
Quant au dioxyde d'azote, il est aussi produit par les moteurs à explosion (Mustafa et Tierney, 1978).

(B) Tous les organismes aérobies produisent des radicaux libres dérivés de l'oxygène qu'ils respirent. La figure 4 résume la plupart des sources endogènes de radicaux libres.

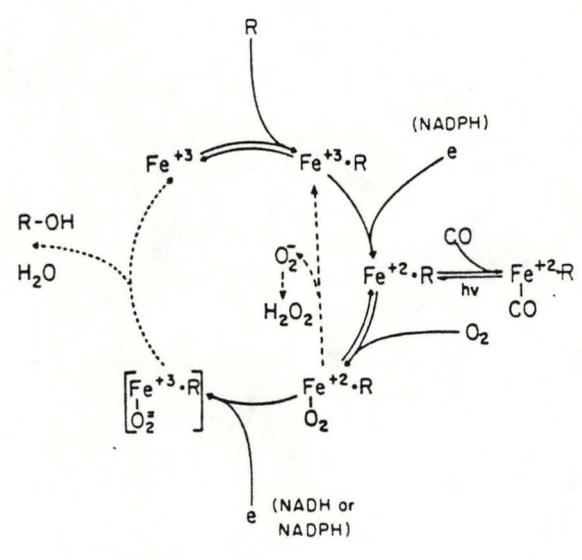
a) La respiration mitochondriale est une source de radicaux libres produits au niveau de la NADH déshydrogénase et du cytochrome b lors de la transition entre un transfert bivalent d'électrons et un transfert univalent par la succinate déshydrogénase-cytochrome b. La chaîne des transporteurs d'électrons mitochondriaux est illustrée à la figure 5. Quelques pourcents de la consommation mitochondriale d'oxygène moléculaire se retrouvent dans la production d' $O_2^{\cdot -}$ . Une partie de ces ions superoxydes sont réduits en peroxyde d'hydrogène; les antioxydants se chargent de la plus grande partie des ions superoxydes restants (voir plus bas). Les  $H_2O_2$  formés passent éventuellement dans le cytoplasme cellulaire (Freeman et Crapo, 1982; Chance *et al.*, 1979) :  $H_2O_2$  et  $O_2^{\cdot -}$  peuvent traverser toutes les membranes de la cellule, la membrane plasmique comprise, les premiers en traversant les membranes comme les molécules d'eau et les seconds en empruntant les canaux anioniques des membranes (Freeman et Crapo, 1982).

Le cytochrome  $aa_3$  ne largue pas de radical libre dérivé de l'oxygène; des intermédiaires existent, notamment un radical peroxy ( $-OO^{\cdot}$ ), mais ils restent fixés dans une crypte hypothétique de ce cytochrome jusqu'à la formation de la molécule d'eau (Chance *et al.*, 1979) (figure 6).

b) En plus des mitochondries, d'autres organites de la cellule sont des sources de radicaux libres. La membrane du réticulum endoplasmique et la membrane externe du noyau possèdent des cytochromes  $P_{450}$  et  $b_5$  qui peuvent réduire

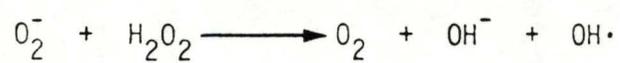


**Figure 6.** Schéma de la réduction de l'oxygène moléculaire au niveau du cytochrome a<sub>3</sub> dans la membrane mitochondriale interne (d'après Chance *et al.*, 1979).



**Figure 7.** Production possible de radicaux libres par le cytochrome P 450 (d'après Chance *et al.*, 1979).

Classical Haber-Weiss Reaction



Modified Haber-Weiss Reaction  
(Fenton Reaction)

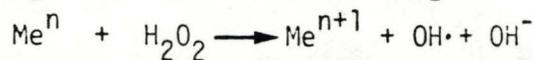
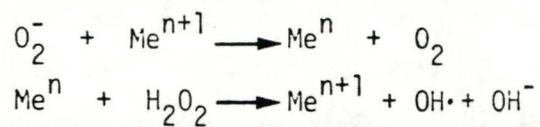


Figure 8. Réaction de Haber-Weiss et de Fenton (d'après Fantone et Ward, 1982).

l'oxygène moléculaire et laisser échapper des intermédiaires radicalaires lors du métabolisme de certaines molécules (Freeman et Crapo, 1982) (figure 7).

Les peroxyosomes contiennent une concentration appréciable d'oxydases. Aucune d'entre elles n'a montré qu'elle produisait des ions superoxydes comme intermédiaires de la formation des  $H_2O_2$  décelés (urate oxydase, D-amino acide oxydase,...). Une partie de ces  $H_2O_2$  diffuse dans le cytoplasme, malgré la présence de la catalase, enzyme responsable de la dégradation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène (Freeman et Crapo, 1982; Chance *et al.*, 1979).

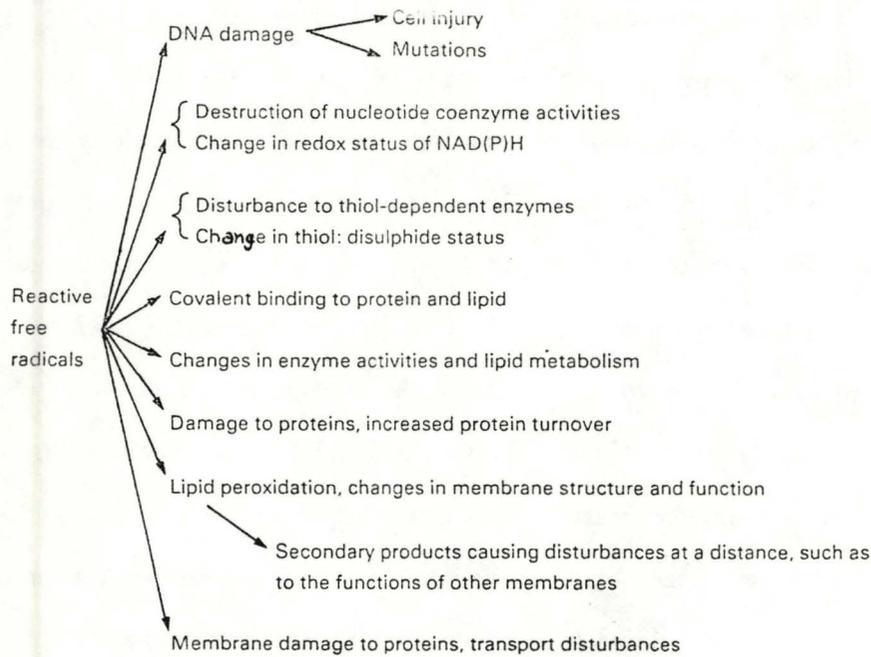
En plus d'une pénétration possible de radicaux superoxydes et de peroxydes d'hydrogène à travers la membrane plasmique, des enzymes associés à cette dernière, par exemple la cyclooxygénase et la lipoxygénase, peuvent libérer des intermédiaires radicalaires (Freeman et Crapo, 1982; Flohé *et al.*, 1985; Roberfroid *et al.*, 1987).

c) Des enzymes cytoplasmiques.

La xanthine oxydase est très étudiée en tant que productrice de radicaux superoxydes (voir infra). D'autres enzymes comme la tryptophane dioxygénase, qui clive le cycle indolique du tryptophane, et l'aldéhyde oxydase libéreraient aussi des radicaux libres (Chance *et al.*, 1979; Freeman et Crapo, 1982).

d) La réaction de Haber-Weiss et de Fenton (figure 8) sont des mécanismes importants de transfert univalent d'un électron à partir de cations de métaux de transition, tels les ions  $Fe^{2+}$  (Halliwell, 1987).

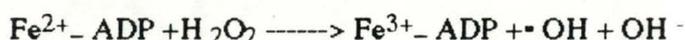
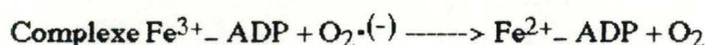
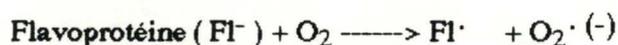
e) Un autre exemple est le transfert univalent d'un électron à partir de cations de métaux de transition s'alliant à une production de radicaux libres par des flavoprotéines comme la xanthine oxydase (Pryor, 1976) :



**Figure 9. Eventail des molécules qui sont les cibles potentielles des radicaux libres (d'après Slater *et al.*, 1987).**

- |   |  |
|---|--|
| Nutritional disorders (deficiencies of $\alpha$ -tocopherol and other antioxidants; excesses of free-radical-initiating agents) | Alcoholism   |
| Inflammation  | Iron overload of the liver   |
| Rheumatoid arthritis  | Many types of toxic liver injury (carbon tetrachloride, other halogeno-alkanes, paracetamol, bromobenzene) |
| Atherosclerosis   | Some types of tumour promotion   |
| Some parasitic infections   | Some examples of chemical carcinogenesis   |
| Some lung disorders (paraquat)  | Reperfusion injury   |

**Figure 10 Maladies et troubles associés aux radicaux libres (qui n'en sont pas pour cela la cause) (d'après Slater *et al.*, 1987).**



f) Des molécules de petit poids moléculaire peuvent aussi réagir avec des radicaux libres dérivés de l'oxygène moléculaire (thiols, hydroquinones, flavines, ...) par des réactions d'autoxydation. L'autoxydation de ces molécules est concomitante à la réduction de l'oxygène en anions superoxydes (Freeman et Crapo, 1982).

### (3) Toxicité des radicaux libres.

Les effets de la toxicité de l'oxygène ont été montrés pour la première fois en 1943 : des animaux ont été exposés à des pressions de 2 ou 3 atmosphères d'oxygène pur et des dommages pulmonaires ont été observés (Chance *et al.*, 1979).

La théorie de toxicité des ions superoxydes a été proposée au début des années 70 (Halliwell, 1987). Elle repose sur trois idées principales :

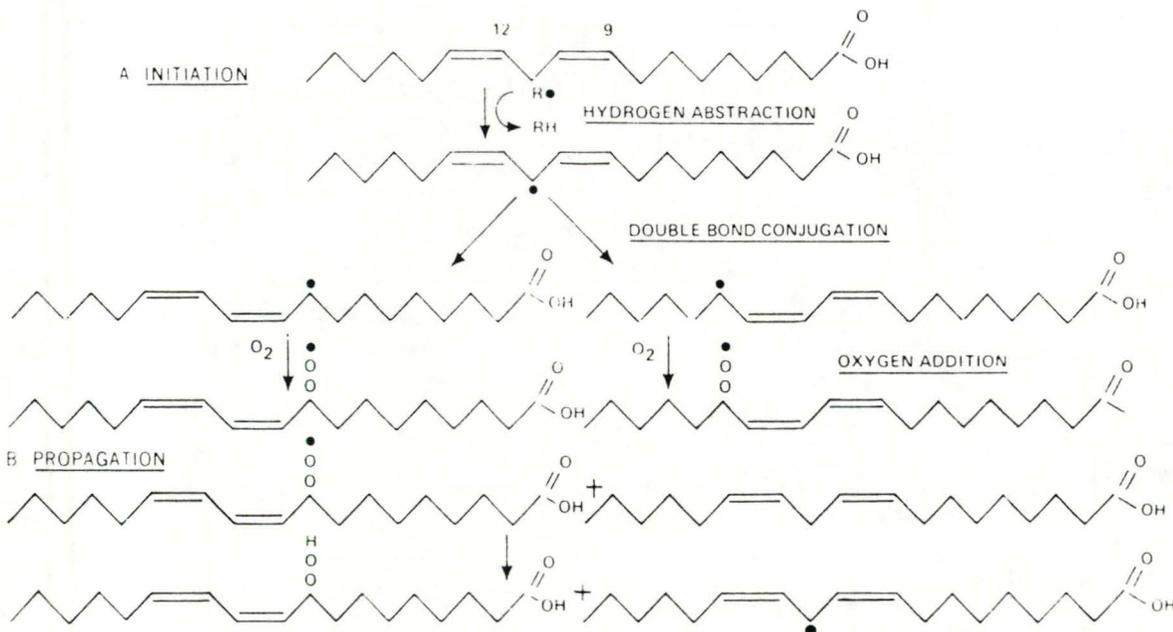
1) Des ions superoxydes sont produits naturellement dans l'organisme vivant (Halliwell, 1987; Rosen et Freeman, 1984) et ces ions peuvent occasionner par leur réactivité un grand éventail de dommages aux molécules biologiques. Des exemples de pareilles modifications sont donnés à la figure 9. D'autre part, on a montré la présence de ces radicaux libres dans une série de maladies (figure 10).

2) S'il existe, dans les cellules, une quantité importante d'un enzyme comme la superoxyde dismutase (SOD) qui catalyse la réaction suivante :  $2\text{O}_2^{\cdot(-)} + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ , réaction de dismutation des ions superoxydes, c'est donc que ces ions sont indésirables pour les cellules (Halliwell, 1987).

3) La possibilité de réduction des ions superoxydes en ions hydroxyles, si réactionnels, est un élément explicatif de la toxicité des radicaux superoxydes, même si, dans ce cas, elle s'exerce de manière indirecte.

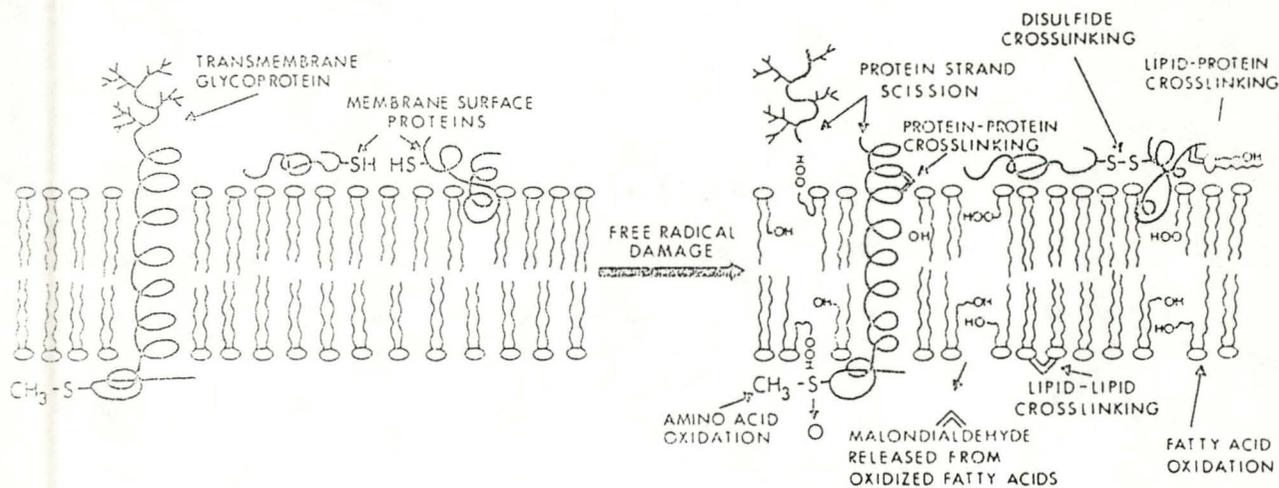
Toutes les molécules biologiques peuvent être la cible des radicaux libres dérivés de l'oxygène moléculaire. Les réactions générales d'altération de ces molécules sont connues; on peut les classer selon la nature chimique des molécules cibles.

(A) La peroxydation lipidique. Les réactions conduisant à la formation de peroxydes lipidiques sont les suivantes:



D'après Mc Cay et King, 1980.

Le radical hydroxyle peut, par sa réactivité, initier cette peroxydation en arrachant un  $H\cdot$  à un acide gras insaturé d'un phospholipide membranaire. Des délocalisations électroniques expliquent le réarrangement moléculaire qui suit. Puis, un oxygène moléculaire réagit avec cet acide gras; le radical formé est ensuite capable d'arracher un  $H\cdot$  à un acide gras voisin, ce qui entraîne la formation d'un hydroperoxyde lipidique et la propagation de la réaction à cet acide gras voisin (Halliwell, 1987). La propagation de la réaction est permise par la proximité des acides gras dans les membranes biologiques (Mead, 1976).



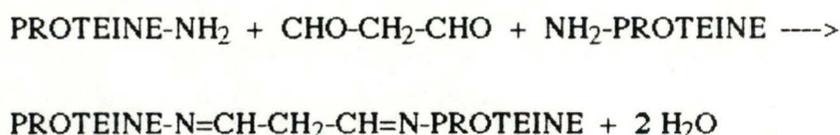
**Figure 11.** Altérations membranaires par les réactions radicalaires qui provoquent la peroxydation des lipides et entraînent une série d'autres réactions secondaires (d'après Freeman et Crapo, 1982).

1. Decrease in relative content of C<sub>20:4</sub> and C<sub>22:6</sub> fatty acids (1)
2. Formation of lipid hydroperoxides that may stimulate or inhibit specific enzymes associated with biomembranes
3. Oxidation of thiol-groups that may affect enzyme activities in the membrane; and protein conformation that is related to protein-lipid associations
4. Decrease in lipid fluidity of the biomembrane
5. Liberation of breakdown products from the site of lipid peroxidation to produce damaging effects elsewhere

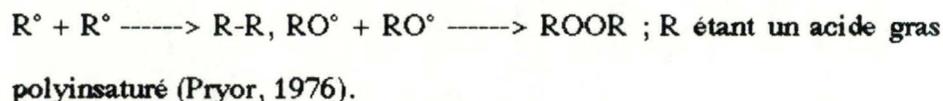
(1) The abbreviated form for designating fatty acids gives the number of carbons followed by the number of double bonds; thus, 22:6 is a docosahexaenoic acid.

**Figure 12.** Effet de la peroxydation lipidique sur les membranes biologiques (d'après Slater *et al.*, 1987).

Les hydroperoxydes lipidiques peuvent évoluer en peroxydes cycliques ou en endoperoxydes cycliques; ces trois derniers types de molécules sont fragmentables en aldéhydes, telle la malonaldéhyde (MDA). La MDA (CHO-CH<sub>2</sub>-CHO) réagit avec les protéines, liant ainsi des protéines entre elles.

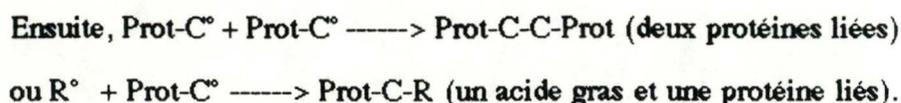
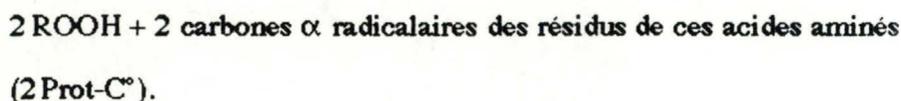


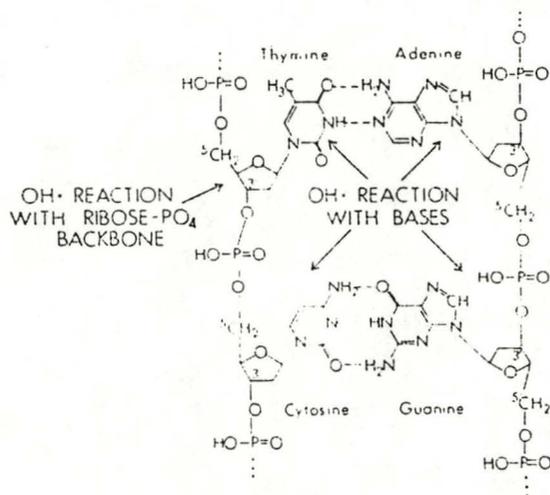
Les hydrolases lysosomales ne peuvent dégrader l'entièreté des protéines liées avec la MDA et le résidu de digestion un pigment fluorescent, la lipofuscine, témoin du vieillissement cellulaire (Michiels, 1986). Les effets de cette peroxydation sont divers (figures 11 et 12). Des liens lipide-lipide se créent lors des réactions de terminaison:



Un certain turn-over des acides gras polyinsaturés comme l'acide arachidonique permet le remplacement de ces acides gras peroxydés par les acyltransférases suite à l'activité des phospholipases A<sub>2</sub>, A<sub>1</sub> et B qui clivent ces acides gras peroxydés des phospholipides membranaires. Les protéines et les glycoprotéines subissent les effets de cette peroxydation.

a) Des liens lipide-protéine et protéine-protéine peuvent aussi se former, résultant des réactions suivantes (Freeman et Crapo, 1982; Davies, 1987):





**Figure 13.** Le radical hydroxyle ( $\text{OH}^\cdot$ ) peut réagir avec les bases et le désoxyribose de l'ADN provoquant alors une scission de la chaîne (d'après Freeman et Crapo, 1982).

Notons que les ions hydroxyles sont aussi efficaces que des radicaux peroxylys ( $\text{ROO}^\circ$ ) pour réaliser une abstraction d'hydrogène.

b) D' autres liens protéine -protéine peuvent aussi se former par l'intermédiaire de la malonaldéhyde ou en formant des ponts disulfures ( $2 \text{ROO}^\circ + 2 \text{Prot-SH} \longrightarrow 2 \text{ROOH} + \text{Prot-S-S-Prot}$ ) pouvant aussi lier des protéines entre elles.

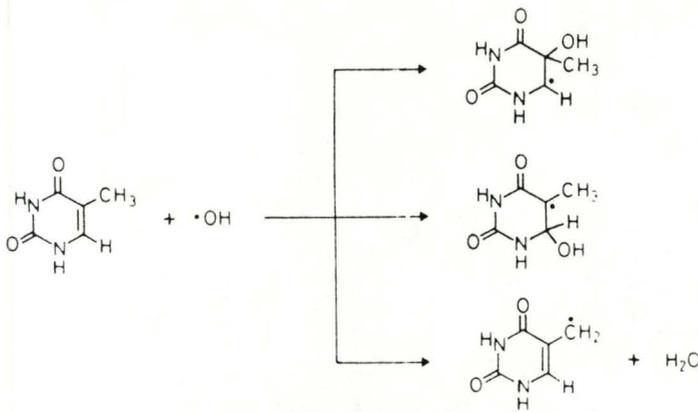
c) Des scissions de chaînes protéiques ont lieu (Davies, 1987; Dean et Cheeseman, 1987) :



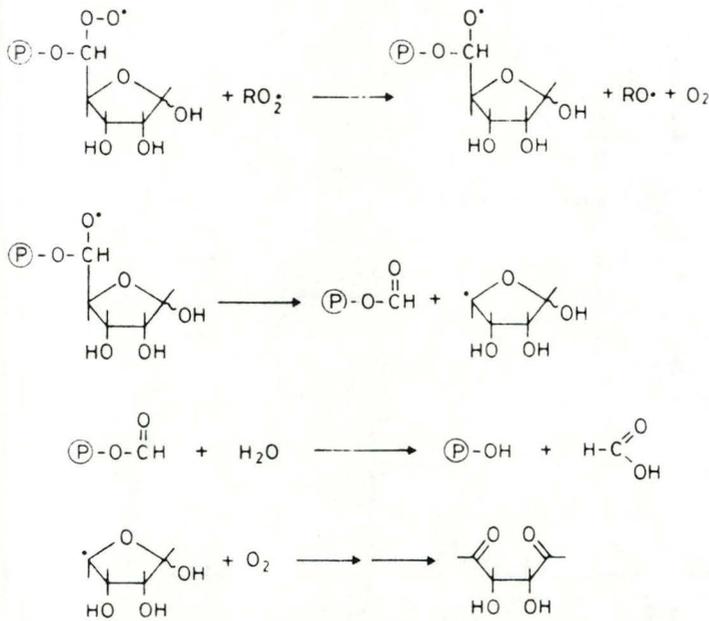
Ensuite peut avoir lieu une décomposition de cette protéine en deux aldéhydes.

d) De nombreux acides aminés peuvent subir des oxydations dues surtout à des attaques par des ions hydroxyles (Davies, 1987); et ensuite, soit former des ponts disulfures, pour les acides aminés possédant une fonction thiol (la méthionine, la cystéine), subir des réarrangements moléculaires, pour les acides aminés insaturés (le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine) (Freeman et Crapo, 1982), ou subir des abstractions d'hydrogène au niveau de leur carbone  $\alpha$ , pour tous les acides aminés. Les enzymes seront inactivés si de telles réactions affectent les acides aminés importants pour leur structure.

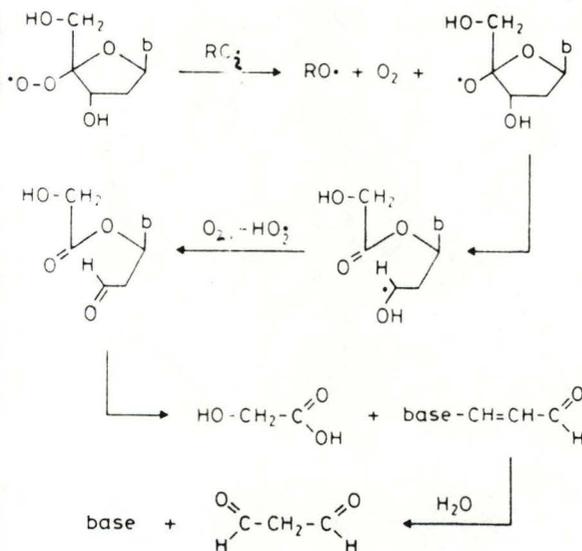
(B) L'ADN et les acides nucléiques peuvent aussi être attaqués. Les radiations ionisantes provoquent des mutations qui entraînent parfois la mort de la cellule, par libération de molécules excitées, d'ions et de radicaux libres dont  $\text{OH}^\cdot$  (figure 13). Des modifications stériques et des scissions des brins d'ADN se produisent alors (Freeman et Crapo, 1982). Les pyrimidines sont attaquées par



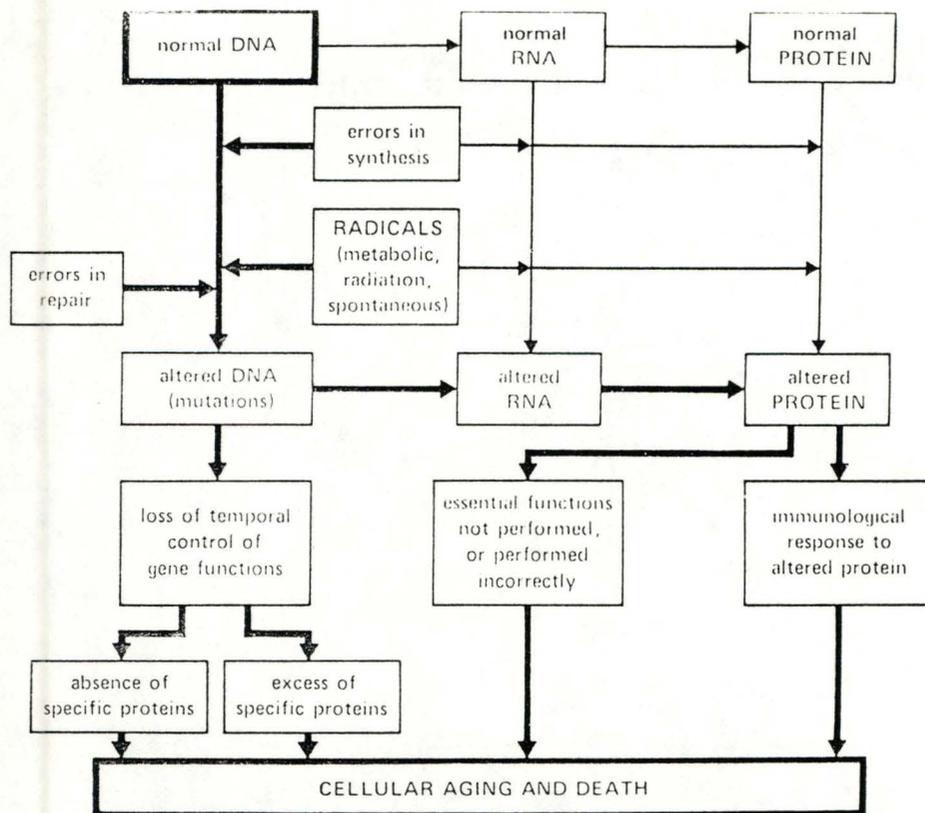
**Figure 14.** Réaction de  $\text{OH}^\cdot$  avec les pyrimidines dont la thymidine (d'après Schulte-Frohlinde et Von Sonntag, 1985).



**Figure 15.** Le C'6 du ribose peut subir une abstraction d'hydrogène, réagir ensuite avec l'oxygène moléculaire et se scinder (d'après Schulte-Frohlinde et Von Sonntag, 1985).



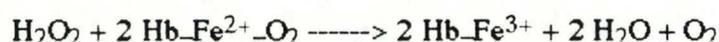
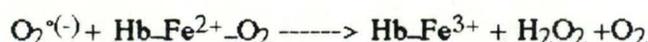
**Figure 16.** Séparation du ribose et d'une base nucléique (d'après Schulte-Frohlinde et Von Sonntag, 1985).



**Figure 17. Rôle possible des radicaux libres dans l'accumulation de dommages au niveau des molécules informationnelles (d'après Walton et Packer, 1980).**

des OH<sup>•</sup> au niveau du carbone en position 5 pour l'uracile, la cytosine et la thymidine. Cette dernière peut aussi être attaquée au niveau de son carbone situé en position 6 et au niveau de son groupe méthyl (figure 14). Les sites d'attaques sur les bases puriques sont moins bien connus, en partie à cause de la faible solubilité de la guanine dans l'eau. L'élimination du phosphate du ribose-5-phosphate conduit aussi à la scission du brin d'ADN (figure 15). Une réaction sur le carbone 4' du ribose peut entraîner la scission du brin d'ADN par libération d'une base nucléique et d'une molécule de MDA (Schulte-Frohlinde et Von Sonntag, 1985) (Figure 16).

- (C) Des molécules cytosoliques contenant un hème, telle l'hémoglobine (Hb) sont la cible du peroxyde d'hydrogène et des radicaux superoxydes, l'oxyhémoglobine (Hb active avec Fe<sup>2+</sup>) devenant méthémoglobine (Hb inactive avec Fe<sup>3+</sup>) (Freeman et Crapo, 1982). L'oxydation peut se réaliser par les réactions suivantes :



- (D) Des molécules extracellulaires dont l'acide hyaluronique et le collagène peuvent être altérées voire scindées (Freeman et Crapo, 1982) lors de phénomènes inflammatoires chroniques, par exemple lors de la polyarthrite rhumatoïde.

Certaines théories du vieillissement sont basées sur la présence de ces réactions d'altération des molécules biologiques, mais il est certain qu'il faut envisager ces réactions dans l'ensemble du phénomène de vieillissement de l'organisme. La figure 17 indique le rôle possible des radicaux libres dans la sénescence et la mort des cellules (Walton et Packer, 1980) : ils interviendraient d'après cet auteur notamment dans l'accumulation de dommages au niveau des molécules informationnelles.

Deux données permettent de relativiser l'influence néfaste des dérivés radicalaires de l'oxygène moléculaire. La première est le rôle parfois bénéfique des radicaux libres

Superoxide and Hydrogen Peroxide Production by Macrophages

Cell	Source	Stimulus	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> Production†† (nmole/mg protein/30 min)		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> †† (nmole/mg protein/30 min)	
			Non-stimulated	Stimulated	Non-stimulated	Stimulated
<u>Monocyte</u>	Human Peripheral blood *	PMA	-	172.0	-	438
		Opsonized zymosan	-	99.5	-	300
Alveolar macrophage ***	Human <u>Nonsmoker</u>	PMA	10.06	28.4	-	-
		Heat-killed bacteria	10.6	18.4	-	-
	<u>Smoker</u>	PMA	19.2	58.0	-	-
		Heat-killed bacteria	19.2	31.4	-	-

† Values are normalized /mg protein/30 min from several different experiments.

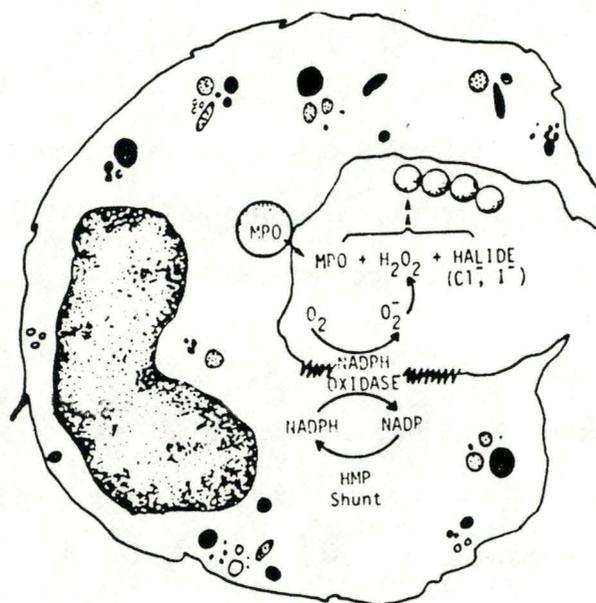
‡ Values may vary due to different experimental conditions.

PMA = phorbol myristate acetate

Superoxide and Hydrogen Peroxide Production by Polymorphonuclear Leukocytes

Cell	Source	Stimulus	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> Production (nmole/10 <sup>6</sup> PMN/15 min)		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (nmole/10 <sup>6</sup> PMN/15 min)	
			Nonstimulated	Stimulated	Nonstimulated	Stimulated
<u>PMN</u>	Human**	Opsonized zymosan	1.2	6.9	-	-
		Cb.:	1.2	4.2	-	-
		IgG-aggregated	1.2	3.0	-	-
PMN	Human**	Opsonized <i>Staphylococcus aureus</i>	-	11.7	-	1.4

**Figure 18.** La stimulation des PMN et des macrophages provoque la production d'anions superoxydes (d'après Fantone et Ward, 1982).



**Figure 19.** Rôles du shunt des HMP dans la production de radicaux superoxydes et d'autres molécules toxiques (d'après Fantone et Ward, 1982).

dans l'organisme vivant. La seconde est l'existence de mécanismes protecteurs face à l'agression constante de ces radicaux. Examinons d'abord deux des rôles bénéfiques des radicaux libres.

a) La poussée respiratoire lors de l'inflammation (Fantone et Ward, 1982).

La défense de l'organisme contre des éléments étrangers comme les bactéries passe en partie par l'action des phagocytes. La toxicité des molécules radicalaires (figure 18) est mise à profit dans le cadre de cette défense. La stimulation des phagocytes, par exemple par des bactéries opsonisées, entraîne l'activation de la NADPH oxydase membranaire.

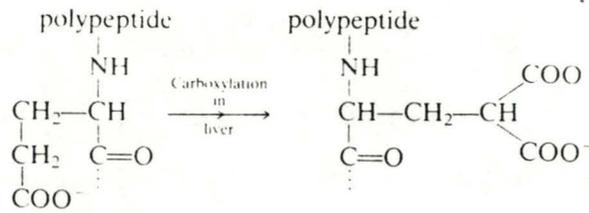
L'oxydation du NADPH en  $\text{NADP}^+$  permet la réduction de l'oxygène moléculaire en ions superoxydes. Le shunt des hexoses monophosphates (HMP Shunt) permet de réduire le  $\text{NADP}^+$  formé en NADPH.

On estime que 90% de la consommation d'oxygène des phagocytes stimulés sert à cette libération d'ions superoxydes. Les  $\text{H}_2\text{O}_2$  décelés viennent en majorité de la dismutation des ions superoxydes en  $\text{O}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Un enzyme, la myéloperoxydase (MPO) leucocytaire, complexé au peroxyde d'hydrogène, est capable d'oxyder des anions tels  $\text{I}^-$  et  $\text{Cl}^-$  en produits très toxiques tels que  $\text{HClO}$  (figure 19).

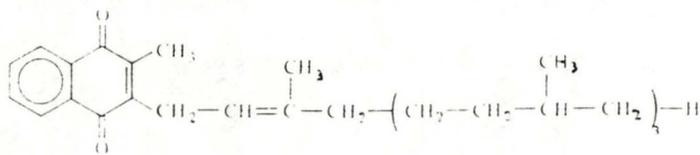
Les radicaux libres ne sont pas les seuls à intervenir dans le cadre de cette lutte : par exemple des protéases leucocytaires sont aussi relarguées dans la vésicule de phagocytose par fusion de lysosomes avec cette dernière.

Stimulés, les leucocytes ont un temps de vie assez bref car ils finissent, malgré leurs protections, par devenir la cible même de ces attaques radicalaires (Fantone et Ward, 1982).

b) Ces radicaux interviennent aussi dans le métabolisme de molécules biologiques notamment du fait de leur pouvoir d'oxydation. Ils jouent un rôle positif dans des réactions d'oxydation, de carboxylation et d'hydroxylation. Nous ne citerons que quelques exemples.



**Figure 20.** Carboxylation de l'acide glutamique au cours de la synthèse de la prothrombine et des facteurs VII et IX de la coagulation (d'après Halliwell et Gutteridge, 1985).



**Figure 21.** Formule de la vitamine K<sub>1</sub> (d'après Halliwell et Gutteridge, 1985).

Il n'y a pas d'évidence claire de l'existence de radicaux hydroxyles dans le mécanisme d'action d'aucune hydroxylase bien que des complexes  $Fe^{2+}-O_2$  interviennent par exemple dans la réaction catalysée par la lysyl ou la prolyl hydroxylase, enzymes impliqués dans la synthèse du collagène. Des mécanismes de résonance permettent d'expliquer l'existence de complexes  $Fe^{3+}-O_2^{\circ(-)}$  pendant la réaction (Halliwell et Gutteridge, 1985).

La synthèse de prothrombine et des facteurs VII et IX de la coagulation passe par une carboxylation d'un certain nombre de résidus d'acide glutamique (figure 20). L'enzyme du réticulum endoplasmique hépatique responsable de cette réaction a pour cofacteur la vitamine  $K_1$ , une quinone, (figure 21) qui peut être oxydée en semiquinone pendant la réduction de l'oxygène moléculaire en anion superoxyde. Une quantité importante de superoxyde dismutase inhibe cette carboxylation, ce qui fait penser que les ions  $O_2^{\circ(-)}$  sont nécessaires à la réalisation de cette réaction (Halliwell et Gutteridge, 1985).

Une étape de la synthèse des catécholamines est leur oxydation par des dérivés radicalaires de l'oxygène moléculaire. L'iodination de la thyrosine et la condensation de la thyrosine vers la thyroxine sont réalisées par du peroxyde d'hydrogène qui viendrait d'anions superoxydes produits par des oxydases de la glande thyroïde.

L'agrégation des plaquettes et le relargage de la sérotonine sont réalisés en partie par l'intervention d'ions superoxydes (Fried, 1980), de plus les ions superoxydes pourraient transformer des molécules du plasma en facteurs chémotactiques pour les phagocytes (Halliwell et Gutteridge, 1985).

#### **(4) Les protections de l'organisme envers les radicaux libres dérivés de l'oxygène moléculaire.**

Le passage des êtres vivants d'une atmosphère réductrice à notre milieu actuel n'a pu se réaliser que par l'évolution de mécanismes de protection face aux radicaux libres dérivés de l'oxygène (Fridovich, 1976). Les animaux supérieurs exhibent une large panoplie de possibilités de défense.

Mis à part la peau, les muqueuses de l'appareil respiratoire, l'avant extérieur de l'oeil et le début du tube digestif, aucune partie de l'organisme n'est en contact direct avec notre atmosphère contenant 20 % d'oxygène. Le cas de la rétine est particulier car celle-ci est bombardée de photons, sources eux-aussi de radicaux libres produits par des réactions photochimiques.

C'est donc par voie sanguine que les cellules reçoivent l'oxygène vital. La proportion d'oxygène dissous dans la sang est faible (quelques % de l'oxygène total qui circule dans un vaisseau sanguin), en effet la majeure partie de l'oxygène est fixé par l'hémoglobine qui constitue donc un premier moyen de défense puisqu'elle fixe l'oxygène jusqu'à sa destination finale (Jones, 1985), libérant l'oxygène surtout là où sa teneur sanguine est faible. D'autres facteurs plasmatiques agissent plus spécifiquement.

En plus de son contenu en vitamine E (voir plus bas), une partie de l'activité antioxydante du plasma dépend d'une  $\alpha_2$ -glycoprotéine contenant du cuivre et appelée céruloplasmine. Cependant, le cuivre seul et la céruloplasmine seule ne montrent aucune activité antioxydante. Trois mécanismes d'action de ces molécules ont été proposés; premièrement, cette protéine réaliserait une dismutation des ions superoxydes, de la même façon que la SOD (Fantone et Ward, 1982). Mais cette activité est 50 000 fois inférieure à celle de la SOD et donc peu importante (Freeman et Crapo, 1982). Un deuxième mécanisme invoqué serait la détoxification des ions hydroxyles et peut-être des molécules d'oxygène singulet. Enfin, on a aussi proposé une activité de ferro-oxydase, oxydant ainsi les ions  $Fe^{2+}$  en  $Fe^{3+}$  ce qui empêcherait la formation d'ions hydroxyles par la réaction de Fenton (Fantone et Ward, 1982).

Antioxidant Defense in Biological Systems.

System	Remarks
Non-enzymatic	
$\alpha$ -Tocopherol (vitamin E)	Membrane-bound; receptors? Regeneration from chromanoxo radical?
Ascorbate (vitamin C)	Water-soluble
Flavonoids	Plant antioxidants (rutin, quercetin, etc.)
Chemical	Food additives, e.g. BHA (butylated hydroxyanisole), BHT (butylated hydroxytoluene)
$\beta$ -Carotene, vitamin A	Singlet oxygen quencher
Urate	Singlet oxygen quencher, radical scavenger?
Plasma proteins	e.g., Coeruloplasmin
Enzymatic	
Superoxide dismutases	CuZn enzyme, Mn enzyme
GSH peroxidases	Selenoenzyme; non-Se enzyme; some GSH <i>S</i> -transferases e.g., isoenzymes B and AA Cytosol and mitochondrial matrix
Catalase	Heme enzyme Predominantly in peroxisomal matrix
Ancillary enzymes	
NADPH-quinone oxidoreductase (DT-diaphorase)	Two-electron reduction, dicoumarol-sensitive
Epoxide hydrolase	
Conjugation enzymes	UDP-glucuronyltransferase Sulfotransferase GSH <i>S</i> -transferases
GSSG reductase	
NADPH supply	Glucose-6-phosphate dehydrogenase 6-Phosphogluconate dehydrogenase Isocitrate dehydrogenases Malic enzyme Energy-linked transhydrogenase
Transport systems	GSSG export Conjugate export

**Figure 22. Les systèmes antioxydants biologiques (d'après Sies, 1985).**

Une autre protéine, la transferrine, possède aussi une activité antioxydante que l'on a attribué à sa capacité de lier des atomes de fer (Fantone et Ward, 1982).

Des enzymes ayant une activité antioxydante existent dans le sang, elles sont de même nature que les enzymes antioxydants intracellulaires, qui seront décrits plus bas; en effet, on trouve de la glutathione peroxydase et de la SOD qui, dans le sang, est tétramérique (Hjalmarsson, 1987). La demi-vie de ces enzymes, dans le plasma, se compte en minutes.

Descendons maintenant au niveau intracellulaire. En plus des systèmes de réparation des brins d'ADN mutés ou rompus, de protéolyse des protéines oxydées et modifiées (Davies *et al.*, 1987) et de remplacement des acides gras peroxydés, il existe des antioxydants spécifiques (figure 22). On peut classer les antioxydants cellulaires d'au moins trois manières différentes selon qu'ils sont enzymatiques ou non enzymatiques, qu'ils sont préventifs c'est-à-dire qu'ils empêchent l'attaque des molécules biologiques par les radicaux libres ou qu'ils rompent les réactions de propagation y compris celles qui existent dans la peroxydation lipidique (Slater *et al.*, 1987) ou, enfin, selon qu'ils sont hydrosolubles ou liposolubles.

Toute molécule qui réagit avec un radical libre peut l'éliminer (en anglais "scavenger" = éboueur); des sucres, des acides aminés insaturés ou possédant une fonction thiol et des acides gras polyinsaturés pourraient donc être considérés comme des antioxydants mais il faut aussi savoir si leur réduction qui découle de l'élimination d'un radical engendre des radicaux plus ou moins toxiques que le radical de départ (Freeman et Crapo, 1982).

	Catalase	Glutathione Peroxidase		Superoxide Dismutase
		Se dependent	Non Se dependent: glutathione S-transferase B	
Enzyme structure				
Molecular weight	240,000	76,000	46,000	33,000
Subunits	4	4	2	2
Active center group	Fe <sup>3+</sup> -protoporphyrin	Selenium		Copper-zinc (cytosol) Manganese (mitochondria)
Enzyme function				
Reaction	$H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ (catalatic) $H_2O_2 + AH_2 \rightarrow 2H_2O + A$ (peroxidatic)	$ROOH + 2GSH \rightarrow ROH + H_2O + GSSG$		$2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
Subcellular distribution	Peroxisome, cytosol?	Cytosol, mitochondrial matrix		Cytosol, mitochondrial matrix

**Figure 23. Caractéristiques principales de la CAT, la SOD, la GPX et la glutathione transférase B (d'après Chance *et al.*, 1979).**

Nous avons repris ci-dessous des antioxydants naturels reconnus, de manière générale ou dans des cas particuliers, en tant que protecteurs de la cellule animale confrontée à des stress oxydatifs.

<u>Nom</u>	<u>Enzyme ou non</u>	<u>Prévention ou rupture de réaction</u>		<u>Liposoluble ou hydrosoluble</u>
GPX	+	+	+	+
SOD	+	+		+
Catalase	+	+		+
Vitamine E	+		+	+
Vitamine C	+	+(nongénéral)		+
$\beta$ -carotène	+	+		+
Glutathion	+	+	+	+

Dans la suite de cette introduction, nous avons choisi de classer les antioxydants selon leur nature enzymatique ou non enzymatique.

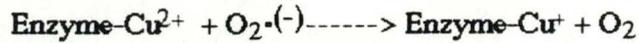
(A) Les protections enzymatiques. La figure 23 reprend les caractéristiques principales de la superoxyde dismutase (SOD), de la catalase (CAT) et de la glutathion peroxydase (GPX).

a) La superoxyde dismutase.

Nous savons déjà que la SOD catalyse la dismutation des ions superoxydes en eau et en peroxyde d'hydrogène.

Les scientifiques connaissaient l'existence de cette protéine avant de leur attribuer une activité enzymatique. En 1953, une protéine est décrite pour le foie du cheval : l'"hépatocupréine" : elle contient 0,38 % de cuivre. D'autres protéines de ce type sont purifiées dans la suite. On découvre en 1970 que l'"érythrocupréine" humaine contient des ions  $Zn^{2+}$  et  $Cu^{2+}$  (Fridovich, 1976). Fridovich et Mac Cord travaillent ensuite sur l'activité enzymatique de ces "cupréines", qui n'est autre que la dismutation des ions superoxydes.

La réaction catalysée par cet enzyme est :



On a donc, comme bilan final de la dismutation :  $2\text{H}^+ + 2\text{O}_2 \cdot (-) \text{-----} > \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ .

Le  $\text{Cu}^{2+}$  catalyse la dismutation des ions superoxydes et se trouve dans le site actif de l'enzyme. Les  $\text{Zn}^{2+}$  augmenteraient la stabilité de l'enzyme et peuvent être remplacés *in vitro* par des ions  $\text{Co}^{2+}$  ou des ions  $\text{Hg}^{2+}$  (Fridovich, 1976). La séquence des acides aminés est connue (Fridovich, 1976). On connaît aussi la séquence de l'ADN complémentaire (cDNA) codant pour les SOD intracytosolique et extracellulaire (Hjalmarsson, 1987).

Dans la cellule eucaryote, on trouve la SOD dans le cytosol et dans les mitochondries. L'enzyme cytosolique possède l'ion  $\text{Cu}^{2+}$  (CuSOD) dans son site actif et a un poids moléculaire proche de 66 000, soit 33 000 pour chacun des deux monomères qui le constitue (Chance *et al.*, 1979). La SOD de la matrice mitochondriale partage une caractéristique avec la SOD de nombreuses bactéries dont Escherichia Coli : ce sont des cations du manganèse ( $\text{Mn}^{2+}$ ) (MnSOD) qui tiennent le rôle des ions du zinc et du cuivre de la SOD cytosolique. Dans la mitochondrie, cet enzyme est tétramérique, chaque sous-unité possédant un poids moléculaire proche de 21 500 (Freeman et Crapo, 1982), alors que l'enzyme bactérien est dimérique. Des bactéries possèdent en outre une SOD possédant des ions du fer, celle-ci protégeant l'espace périplasmique de la bactérie (Fridovich, 1976).

On sait qu'environ la moitié de l'activité enzymatique superoxyde dismutase mitochondriale se trouve dans la matrice de l'organite (MnSOD), l'autre moitié étant confinée à l'espace intermembranaire de la mitochondrie contenant de la CuSOD (Chance *et al.*, 1979). La localisation de l'enzyme correspond donc bien à celle de la plus importante production de radicaux superoxydes : la membrane mitochondriale interne.

Dans l'espèce humaine, le gène codant pour cet enzyme est situé sur le chromosome 21, au niveau de la bande q22,1, bande associée au syndrome de

Down (trisomie 21). Un second gène positionné sur cette bande code pour un enzyme de la voie métabolique de synthèse des purines : la phosphoribosylglycinamide synthétase. La synthèse d'une fois et demie la quantité normale de SOD et de cet enzyme de la voie des purines pourrait être lié à des symptômes observés dans la trisomie 21. Le fait qu'une surcharge en purines cause souvent un retard mental et que les ions superoxydes soient nécessaires à leur anabolisme ne serait pas étrangers à cette pathologie (Patterson, 1987).

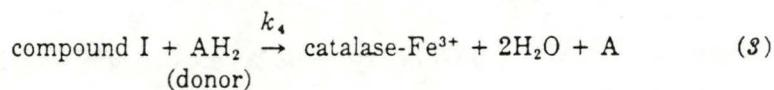
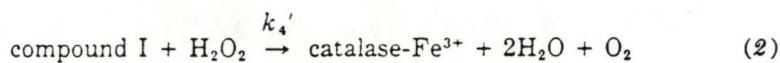
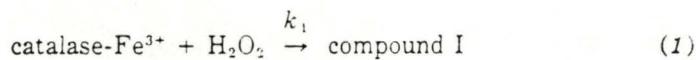
Nous noterons aussi que la SOD peut être inactivée par le peroxyde d'hydrogène. De plus, elle ne possède pas de constante de Michaelis car son activité enzymatique augmente linéairement sur une très large zone de concentrations en ions superoxydes (Chance *et al.*, 1979), propriété partagée avec l'enzyme suivant que nous allons décrire : la catalase.

## 2) La catalase.

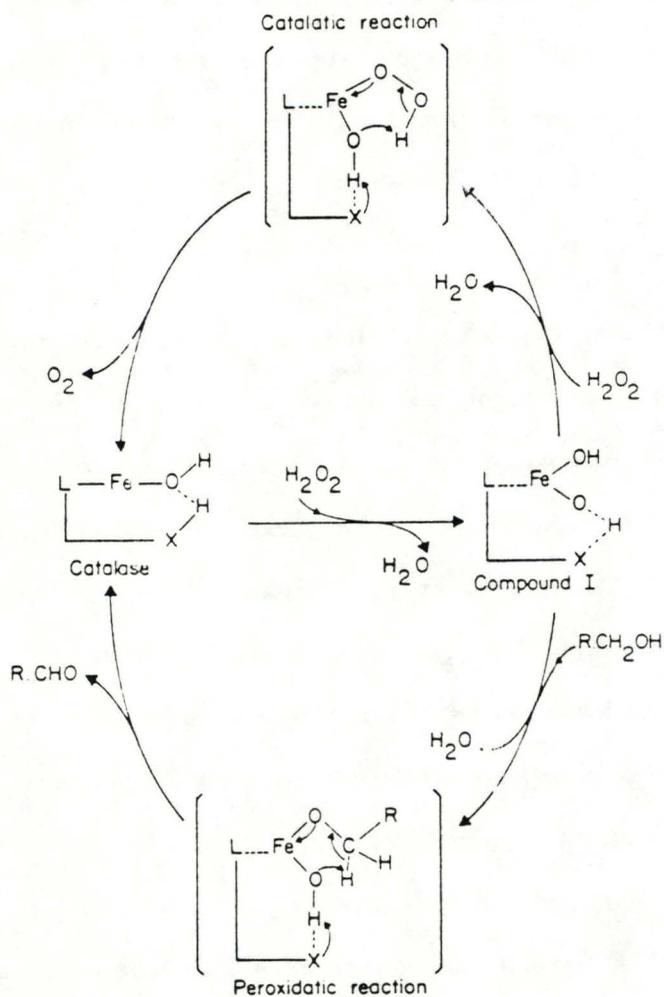
Codé par le chromosome 11, dans le génome humain, cet enzyme est présent à l'intérieur des peroxyosomes par exemple des cellules du foie et du rein, chez certains types de cellules on le trouve dans les microperoxyosomes, parfois dans le cytosol et peut-être même dans des mitochondries (Chance *et al.*, 1979). La catalase, au même titre que les peroxydases, est considérée comme un enzyme protecteur contre les radicaux libres bien qu'elle agisse sur des peroxydes. On sait, par référence à la réaction de Fenton notamment, que les peroxydes peuvent être des sources de radicaux libres, c'est donc par extension de sens que ces enzymes sont appelés scavengers de radicaux libres.

Les caractéristiques les plus générales de la catalase nous apprennent qu'elle a un poids moléculaire de 240 000 soit 60 000 pour chacune des quatre sous-unités et que son site actif est constitué d'une protoporphyrine possédant un ion  $Fe^{3+}$ .

Cet enzyme peut fonctionner selon deux modes : le mode catalatique et le mode peroxydasique. La réaction catalysée dans le mode catalatique est :



**Figure 24.** Les trois étapes de réaction de la catalase montrant une activité catalasique (1 et 2) et peroxydasique (1 et 3) (d'après Chance *et al.*, 1979).



**Figure 25.** Mécanismes réactionnels proposés pour les réactions catalysées par la catalase (d'après Chance *et al.*, 1979).

$2 \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$  lorsque la concentration de peroxyde d'hydrogène est assez élevée, comme cela est souvent le cas dans les peroxysomes. La réaction catalysée dans le mode peroxydasique est :

$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{AH}_2 \longrightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{A}$  quand la concentration en peroxyde d'hydrogène est plus faible, A étant un donneur d'hydrogène, par exemple  $\text{RCH}_2\text{OH}$  devenant  $\text{RCHO}$ . Les réactions chimiques reproduites sur la figure 24 donnent le mécanisme réactionnel.

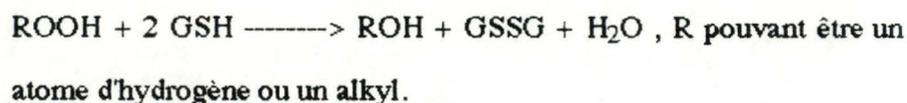
Le composé I (compound I) est l'intermédiaire commun aux deux modes de réaction, son temps de demi-vie est très bref. La figure 25 résume le mécanisme réactionnel proposé.

Le fait que l'activité enzymatique de la catalase augmente linéairement avec la concentration en peroxyde d'hydrogène permet une bonne régulation des taux physiologiques de ce peroxyde (Chance *et al.*, 1979).

L'absence de catalase dans les tissus thyroïdiens n'est pas "un oubli du créateur" mais est nécessaire à la synthèse des hormones thyroïdiennes (Fridovich, 1976).

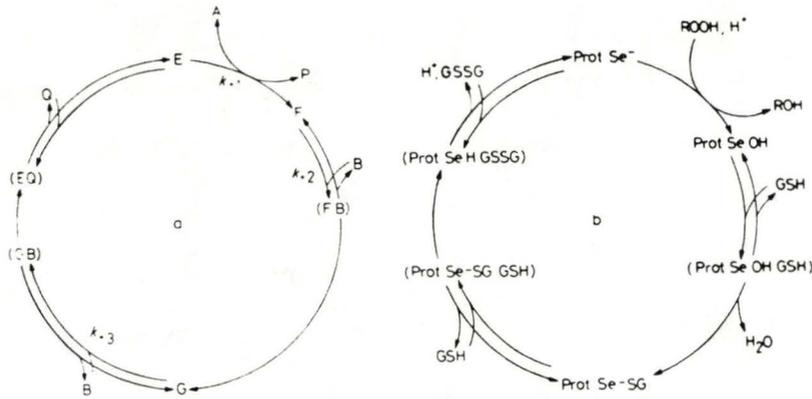
#### c) La glutathion peroxydase (GPX).

Découverte en 1957 par Mills, la GPX catalyse la réaction des hydroperoxydes ( $\text{ROOH}$ ) avec le glutathion (GSH) (voir plus bas) qui donne du glutathion oxydé (GSSG) et un produit de la réduction de ces hydroperoxydes (Chance *et al.*, 1979) :



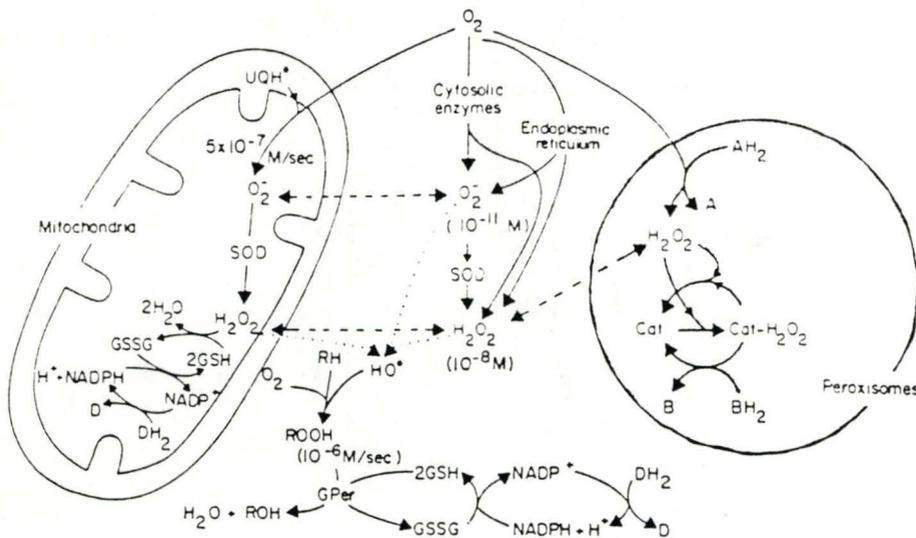
La régénération du GSH réduit est catalysée par la glutathion réductase qui oxyde du NADPH, produit par le shunt des hexoses monophosphates.

Le site actif de la GPX est occupé par un atome de sélénium; cet enzyme possède quatre sous-unités (Chance *et al.*, 1979) donnant un poids moléculaire global égal à 85 000 (Fantone et Ward, 1982). Chacun des quatre sites actifs est formé par la proximité de quatre boucles. L'acide aminé de la position 35 est la cystéine dont l'atome de soufre est remplacé par un atome de sélénium.



Current view of the reaction mechanism of GSH peroxidase. Figure 4a represents a formal description of the reaction sequence as derived from kinetic measurement. A, B, and P, Q are substrates and products, respectively. E, F, and G stand for different enzyme forms, while the expressions in brackets represent enzyme-substrate or enzyme-product complexes;  $k_{-1}$ ,  $k_{-2}$ , and  $k_{-3}$  are the rate constants determining the rate equation [Eq. (7)]. Figure 4b attempts to correlate knowledge of enzyme chemistry with functional studies. Kinetic entities E, F, and G correspond to three different redox states of the enzyme-bound selenium: a selenol, a selenenic acid derivative, and a seleno sulfide formed between the enzyme and GSH, respectively.

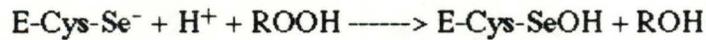
**Figure 26.** Cycle réactionnel de la GPX (d'après Flohé, 1982).



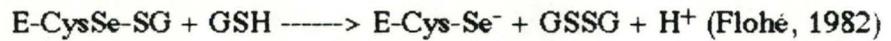
General scheme of roles of catalase, glutathione peroxidase, and superoxide dismutase in different subcellular locations. Concentrations and formation rates of oxygen metabolites are estimated. UQH<sup>•</sup>, ubiquinone radical; GSSG, oxidized glutathione; GSH, reduced glutathione; DH<sub>2</sub> and D, a nonspecified NADP reducing system; SOD, superoxide dismutase; NADPH and NADP, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; O<sub>2</sub><sup>-</sup>, superoxide anion; HO<sup>•</sup>, hydroxyl radical; ROOH, an alkyl hydroperoxide; GPer, glutathione peroxidase; Cat, catalase; B and BH<sub>2</sub>, hydrogen donors of a specificity appropriate to catalase, such as ethanol.

**Figure 27.** Vue générale des réactions catalysées par la SOD, GPX et CAT et des interactions possibles entre ces réactions (d'après Chance *et al.*, 1979).

La première étape du cycle catalytique de la GPX pourrait être une oxydation du séléniol ionisé d'une sous-unité par un hydroperoxyde :



La régénération du séléniol grâce au GSH aurait lieu comme suit (aussi figure 26) :



La GPX est présente dans le cytosol et dans la matrice mitochondriale dans une proportion 2/3 - 1/3.

Notons que certains isoenzymes de la GSH-transférase présente une activité glutathion peroxydase indépendante du sélénium (Chance *et al.*, 1979).

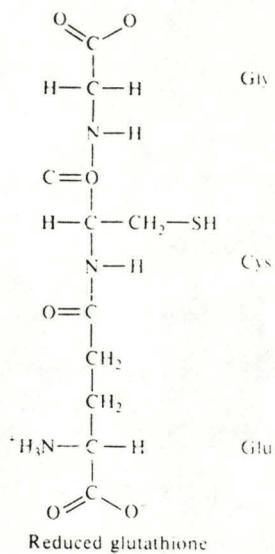
De cette brève description de la superoxyde dismutase, de la catalase et de la glutathion peroxydase, on peut conclure que leur localisation leur permet d'avoir des activités enzymatiques complémentaires, sachant que des molécules comme le peroxyde d'hydrogène et l'ion superoxyde traversent facilement les compartimentations cellulaires. La figure 27 exprime bien que cette complémentarité procure une protection optimale à la cellule. Ces trois enzymes ne sont pas les seuls à lutter contre les radicaux libres ou contre leurs effets néfastes. Des protections non enzymatiques existent aussi.

#### (B) Protections non enzymatiques.

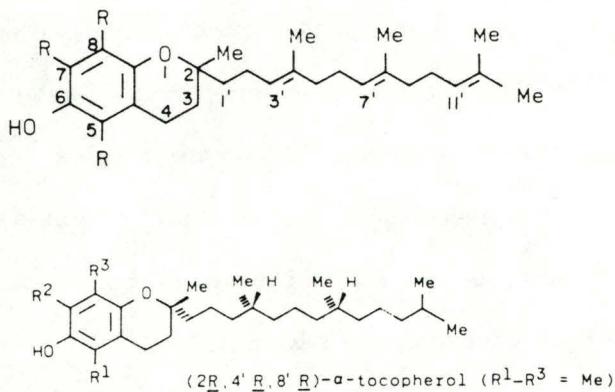
Nous allons décrire particulièrement le cas de trois molécules : le glutathion, la vitamine E et la vitamine C.

##### a) Le glutathion

Nous venons de citer cette molécule dans la description de la GPX. Il s'agit d'un tripeptide, acide glutamique-cystéine-glycine (figure 28). L'oxydation de la fonction thiol de la cystéine de deux molécules de GSH engendre la formation d'un pont disulfure donnant ainsi un GSSG.



**Figure 28.** Formule du glutathion (d'après Halliwell et Gutteridge, 1985).



**Figure 29.** Formule et configuration de l' $\alpha$ -tocophérol (d'après Kasparek, 1980).

Une concentration de l'ordre de 1 à 10 millimolaires dans la plupart des tissus donne une importance considérable au GSH (Halliwell et Gutteridge, 1985) : en effet, la présence de cette molécule dans une cellule est capitale car, en plus de son rôle dans la protection des cellules face aux radicaux libres dérivés de l'oxygène moléculaire, elle permettrait la mise en place de la structure tridimensionnelle de certaines protéines par une oxydation d'une partie de leurs thiols, la régulation de nombreuses enzymes ayant un thiol dans leur site actif, et des rôles dans la transmission de messages hormonaux vers l'intérieur de la cellule (Brigelius, 1985).

#### b) La vitamine E.

La vitamine E ou  $\alpha$ -tocophérol, fait partie des vitamines liposolubles tout comme les vitamines A et K<sub>1</sub>. En 1922, fut découvert, par Long et Evans, un facteur de fertilité des rats mâles et femelles, qu'on appela vitamine E car on connaissait déjà les vitamines A, B, appelée maintenant B<sub>1</sub>, C et D. C'est en 1936 que la vitamine E fut purifiée par Evans et ses collaborateurs, à partir d'huile de germe de blé. La formule chimique était connue en 1938 (Mason, 1980) (figure 29).

La vitamine E, synthétisée par les plantes supérieures et les algues (Draper, 1980, a) , est absorbée chez l'humain, par voie lymphatique, après la traversée des entérocytes. Arrivée dans le sang, son transport par voie sanguine est réalisé surtout par les LDL (Heinecke, 1987). Tous les tissus sont capables de prélever la vitamine E (Gallo-Thores, 1980).

Sa propriété d'antioxydant lipidique fut démontrée peu après la découverte de sa structure moléculaire, notamment par la découverte du fait qu'elle permettait la conservation des réserves de vitamine A et de carotène dans les tissus, sous leur forme réduite (Draper, 1980, b) . La vitamine E, présente dans les bicouches lipidiques des membranes biologiques, donne un hydrogène à un radical peroxy issu de la peroxydation lipidique, l'empêchant ainsi de propager la réaction (Mac Cay et King, 1980).



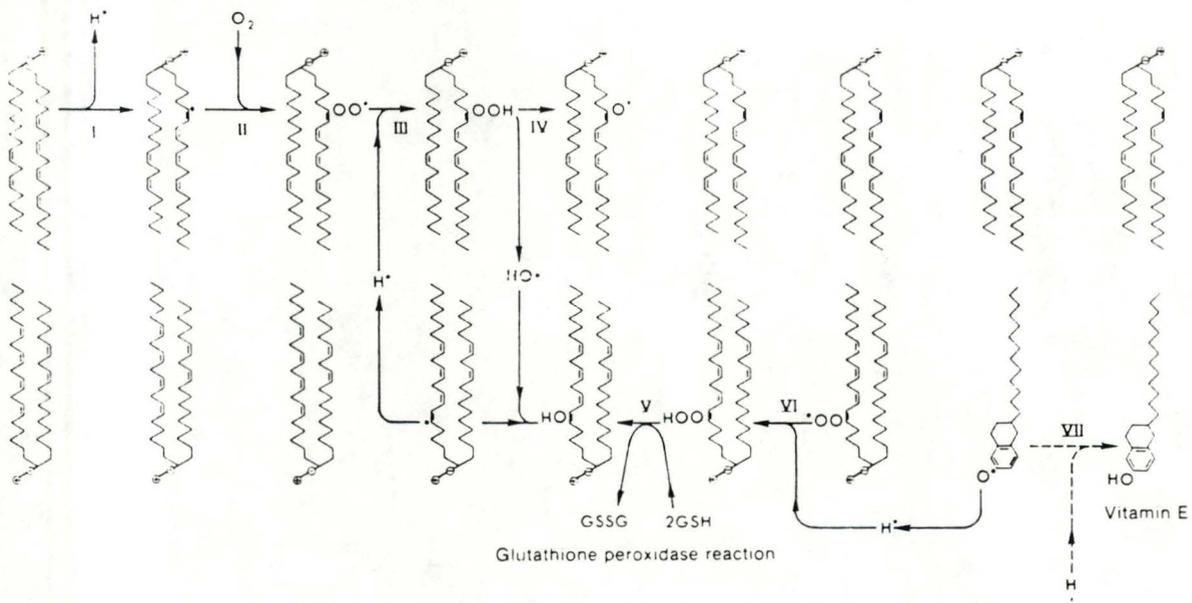


Figure 30.

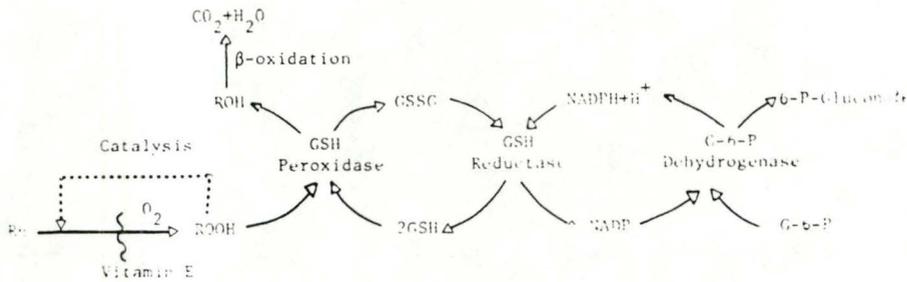
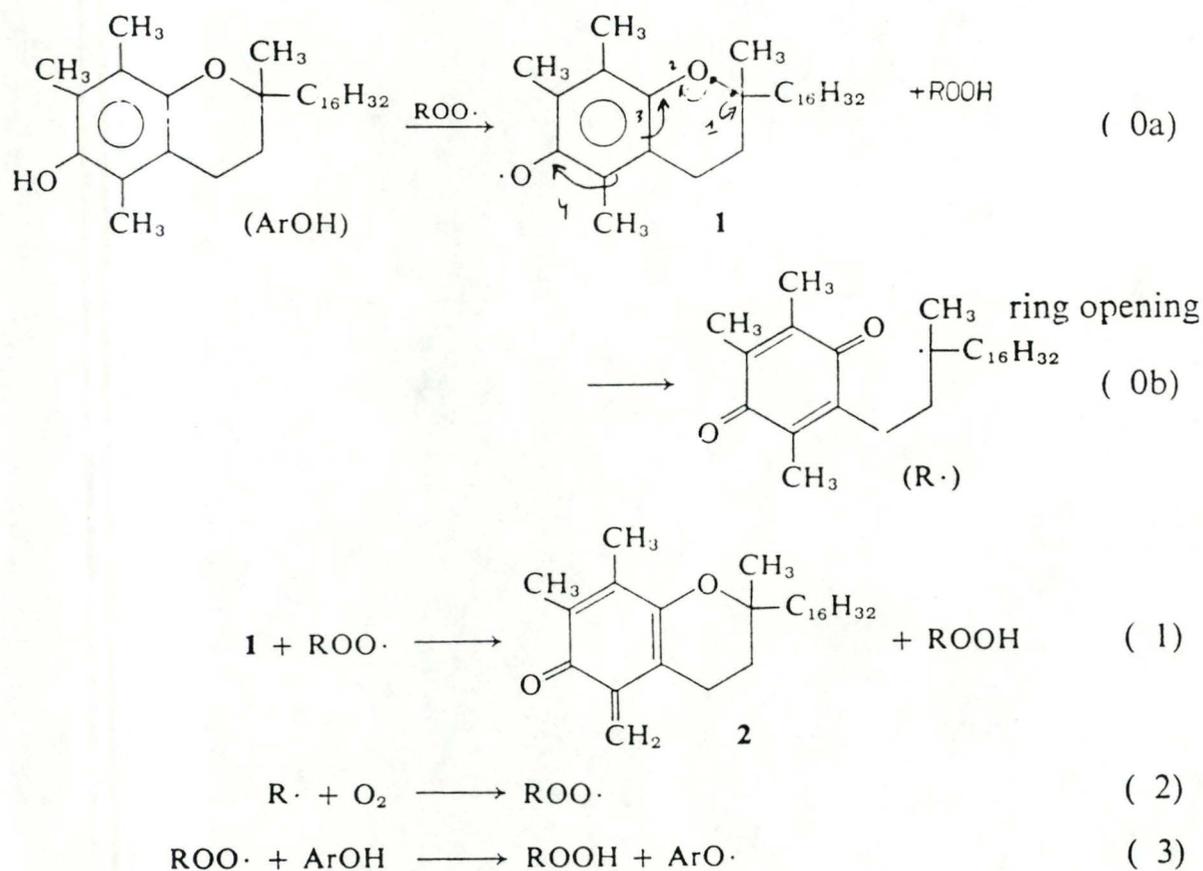
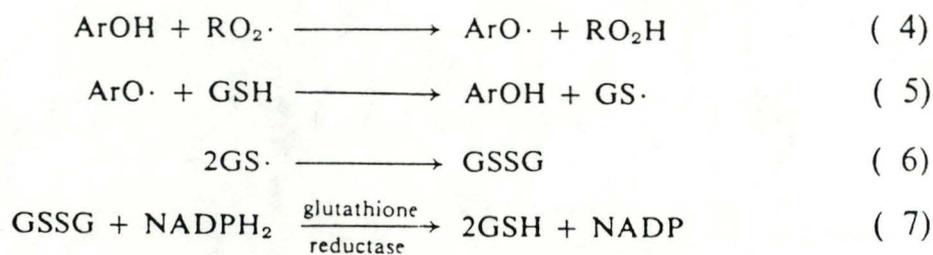


Figure 30 et 31. Rôles antioxydants de la GPX et de la vitamine E (d'après Walton et Packer, 1980 et Draper, 1980 b).



**Figure 32.** Réactions de la vitamine E avec les radicaux peroxy (d'après Pryor, 1976).



**Figure 33.** Rôle possible du GSH dans la régénération de la vitamine E (d'après Pryor, 1976).

Elle peut aussi donner son hydrogène à un R·

$R\cdot + \text{Vit E} \longrightarrow \text{RH} + \text{Vit E}\cdot$  (Fantone et Ward, 1982). L' $\alpha$ -tocophérol empêchant la formation de radical acyl ( $R^\circ$ ) et la GPX éliminant les peroxydes lipidiques, on peut dire que la première agit sur la cause des réactions en chaîne et que la seconde agit sur leurs effets (figures 30 et 31).

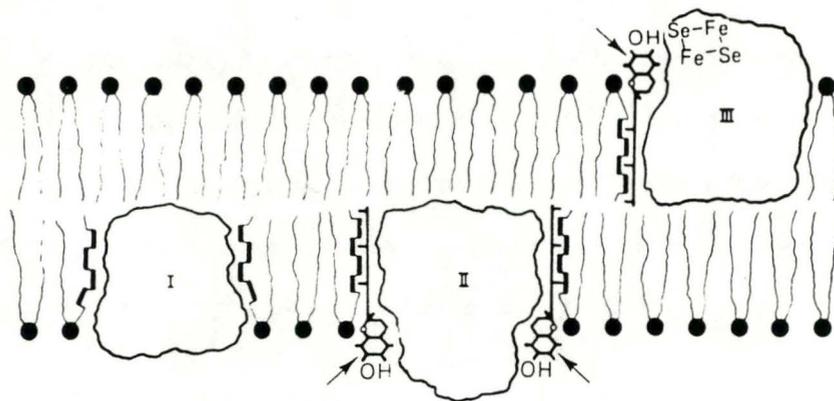
*In vitro*, plusieurs réactions secondaires se passent, après que la vitamine E ait donné un premier hydrogène à un radical lipidique (figure 32, réactions Oa, 2 et 3).

réaction 1) La vitamine E peut subir une ouverture de son cycle chromanol formant ainsi un radical qui peut ainsi devenir lui-même un peroxyde lipidique, la vitamine E n'ayant dans ce cas plus aucun rôle d'antioxydant (figure 32 réaction Ob).

réaction 2) Un second hydrogène peut être donné à un autre radical peroxy avant la rupture de ce cycle, chaque molécule de vitamine E éliminant ainsi deux peroxy (figure 32 réaction 1).

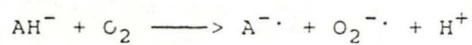
L'efficacité *in vivo* de cette vitamine en tant qu'antioxydant peut résulter de l'importance relative de ces deux réactions et peut s'expliquer par une réduction du radical tocophéryl, par du GSH (figure 33), avant que le cycle ne s'ouvre (Pryor, 1976) ou après que la vitamine ait donné son second hydrogène. On a découvert ensuite que la réduction de la vitamine E par le GSH s'effectue par l'intermédiaire de la vitamine C près des membranes (Willson, 1987).

De multiples travaux ont été réalisés sur l'effet de la vitamine E dans les membranes biologiques. Dans les membranes mitochondriales internes, on a montré que, lors de carence ou de déficience en vitamine E, l'oxydation de substrats par des enzymes de ces membranes produisait des peroxydes *in vitro* et qu'il apparaissait donc que les acides gras polyinsaturés associés aux protéines de transport des électrons lors de la respiration mitochondriale pouvaient être oxydés. D'autre part, par l'usage de modèles moléculaires, on a émis l'hypothèse que les groupes méthyls présents en C-4 et en C-8 sur la chaîne phytol de la vitamine E épousait la forme des poches réalisées par le jeu des doubles liaisons



Proposed localization of the tocopherol molecule (see arrows) in the membrane. I = integral protein; II = integral protein, forming part of a mixed function oxidase; III = integral selenide-containing non-heme iron protein.

**Figure 34.** Position efficace de la vitamine E dans les membranes biologiques (d'après Molenaar *et al.*, 1980).



**Figure 35.** Autoxydation de la vitamine C (d'après Bendich *et al.*, 1986).

cis de certains acides gras polyinsaturés (figure 34) dont l'acide arachidonique, indiquant ici l'importance de la structure de la vitamine E qui lui permet de s'ancrer dans les membranes et d'y exercer sa fonction d'antioxydant par son cycle chromanol. Le rôle structural de la vitamine E expliquerait aussi la baisse de stabilité et l'augmentation de perméabilité des membranes observées dans les cas de déficience en vitamine E (Molenaar *et al.*, 1980). Un exemple d'utilité de la vitamine E est qu'elle inhibe l'hémolyse des érythrocytes provoquée par des radicaux libres (Yamamoto *et al.*, 1986).

On explique plus précisément le rôle de la vitamine E quand on sait que l'importance de l'activité de certains enzymes membranaires dépend de la nature chimique de leur environnement lipidique (accessibilité du substrat, des cofacteurs, évacuation des produits, conformation de la protéine) (Molenaar *et al.*, 1980); si une peroxydation a lieu, l'activité enzymatique pourrait donc diminuer suite à des modifications de structure spatiale.

### c) La vitamine C ou acide ascorbique.

Cette vitamine fut isolée en 1928 par Szent-György. Deux ans plus tard, il montrait qu'il s'agit du facteur anti-scorbutique (Langley-Danysz, 1988).

Elle joue aussi un rôle dans les réactions d'hydroxylation nécessaires à la synthèse du collagène et elle a un rôle dans l'absorption du fer (Bendich *et al.*, 1986).

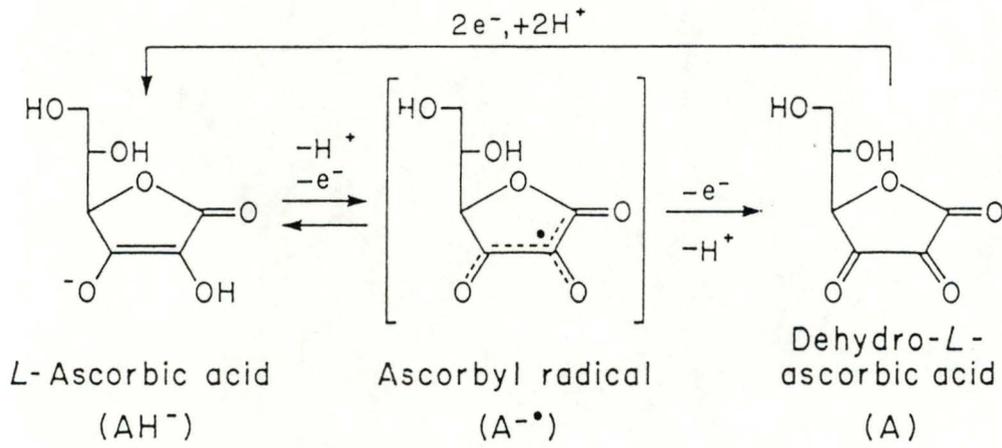
La vitamine C en tant qu'antioxydant hydrosoluble nous intéresse plus particulièrement. Elle réduirait directement les radicaux peroxyls hydrosolubles ou agirait indirectement, par la réduction des radicaux  $\alpha$ -tocophéryls. Une restriction (figure 35) s'impose devant ce rôle général de la vitamine C : l'autoxydation de l'acide ascorbique surtout en présence d'ions de certains métaux de transition et lorsqu'elle est en concentration assez importante, peut en faire une molécule pro-oxydante, donc éventuellement toxique, selon la réaction suivante :



L'acide ascorbique peut subir une oxydation réversible en réduisant un radical peroxy. La délocalisation importante de l'électron non apparié du radical

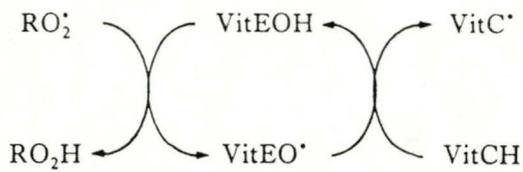


**Figure 36.** Réaction possible de la vitamine C avec un proton. (d'après Bendich *et al.*, 1986).

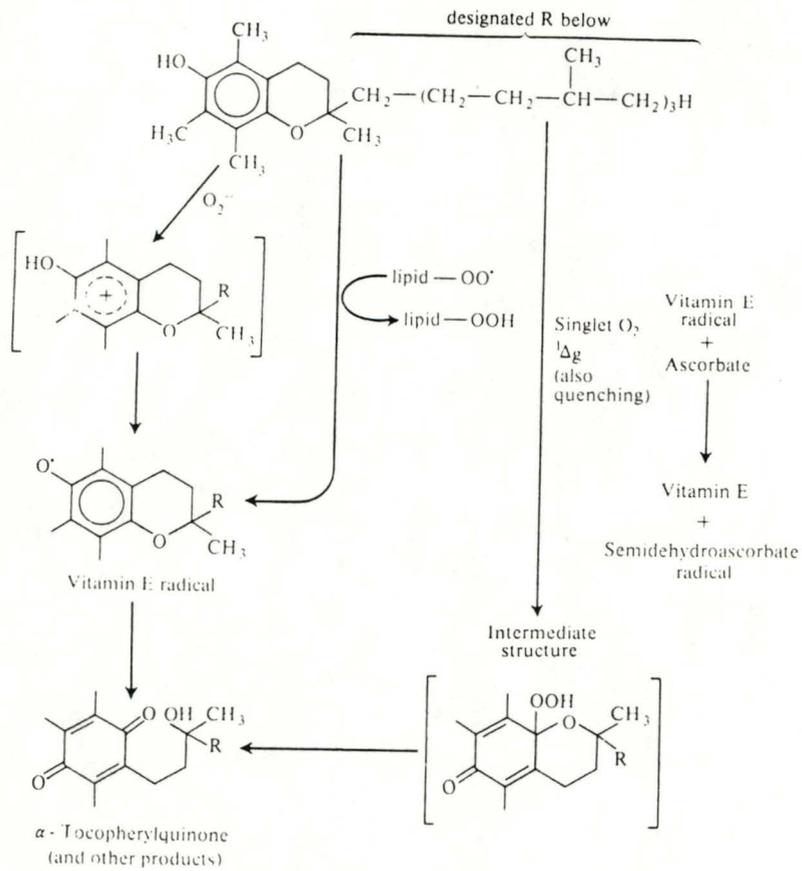


Oxidation of ascorbic acid

**Figure 37.** Oxydation de l'acide ascorbique (d'après Bendich *et al.*, 1986).



**Figure 38. Relation entre la vitamine C et la vitamine E.** (Chan *et al.*, 1987)



**Figure 39. Régénération de la vitamine E par la vitamine C** (Halliwell et Gutteridge, 1985).

ascorbate ainsi formé explique la réactivité assez faible de ce dernier. Ce radical ascorbate peut s'éliminer de deux façons : soit par réaction avec un proton (figure 36), deux radicaux ascorbates ( $2AH^{\bullet(-)}$ ) donnant une molécule d'acide ascorbique ( $AH^+$ ) et une d'acide déhydroascorbique (A), soit en donnant un second électron à un nouveau radical peroxy (*figure 37*), formant ainsi une molécule d'acide déhydroascorbique (A).

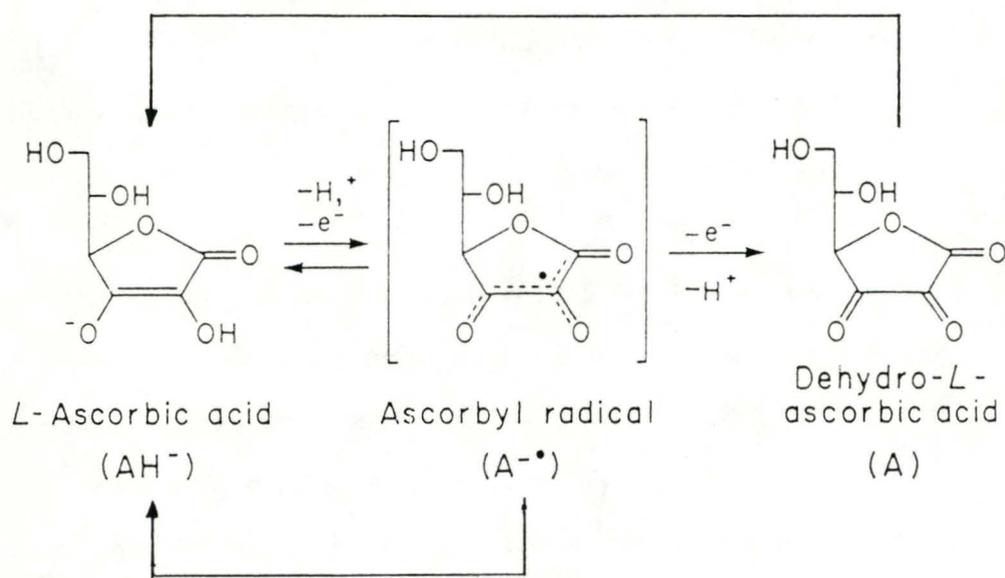
La vitamine C peut aussi éliminer l'oxygène singulet, produit notamment par des réactions de photoexcitation.

Comment la vitamine C peut-elle réduire la vitamine E (*figures 38 et 39*) alors que ces deux vitamines sont dans deux phases différentes? Des études récentes basées sur des observations réalisées sur des liposomes ont montré que la vitamine C peut réduire des radicaux peroxydes dans la phase aqueuse et aussi réduire la vitamine E présente dans la phase lipidique sans toutefois s'attaquer aux radicaux peroxydes de la phase lipique (Bendich *et al.*, 1986). D'autres études ont montré une interaction entre ces deux vitamines *in vivo*; un travail réalisé sur l'homme montrait une diminution des peroxydes lipidiques du sérum, bien que ce fût après une administration journalière de vitamine C sur une durée de quatre mois; l'effet cumulatif des deux vitamines était supérieur à celui des deux vitamines administrées séparément, montrant ainsi une interaction entre celles-ci. D'autre part, si des cochons d'Inde reçoivent une alimentation déficiente en vitamine C, on observe une diminution de la vitamine E dans les poumons et dans le foie (Bendich *et al.*, 1986).

Dans de nombreux cas, la vitamine C protège les cellules et des organes contre l'effet des oxydants. Une concentration importante en vitamine C dans les PMN neutrophiles, les macrophages et les mastocytes pourrait les protéger d'une autodestruction par les molécules radicalaires qu'ils produisent.

L'effet antioxydant de la vitamine C s'observe aussi dans les tissus pulmonaires, dans les humeurs aqueuse et vitrée de l'oeil et dans le tissu rétinien.

déhydroascorbate réductase



semi-déhydroascorbate réductase

**Figure 40.** Régénération enzymatique de la vitamine C.

*In vivo*, la régénération du radical ascorbate et de l'acide déhydroascorbique est réalisée respectivement par la semi-déhydroascorbate réductase utilisant le NADH comme cofacteur et la déhydroascorbate réductase qui oxyde deux molécules de GSH pour la réduction d'une molécule d'acide déhydroascorbique (figure 40).

Des études réalisées *in vitro*, sans enzyme, ont montré que le GSH ne serait capable de régénérer qu'une certaine partie de la vitamine C en formant avec elle un couple rédox et qu'il interviendrait, en l'absence d'enzyme, en prévenant son autoxydation par la chélation des ions du cuivre qui catalysent cette réaction (Winkler, 1987).

En plus de la régénération de la vitamine C par le GSH, de quelque manière que ce soit, des mécanismes de transport membranaire renouvellent la quantité de vitamine qui n'est pas réduite (Winkler, 1987). D'autres études ont montré que la SOD, la catalase, des protéines sériques et des acides aminés pouvaient inhiber la catalyse de l'oxydation de l'ascorbate par les ions  $\text{Cu}^{2+}$  en complexant ces derniers (Lovstad, 1987).

#### Toxicité comparée de la vitamine C et de la vitamine E

Des effets de toxicité de la vitamine E ont été montrés après 13 semaines d'administration journalière excessive à des rats (hémorragie interne dans les cas les plus graves, modifications hématologiques,...) (Abdo *et al.*, 1986). Notons toutefois que ces administrations étaient bien loin au-delà des prescriptions habituelles : elles atteignaient en effet des doses de deux grammes par kilogramme de poids corporel. On peut donc dire que la vitamine E n'est pas toxique à des doses habituelles.

La vitamine C est plus toxique car elle se transforme en pro-oxydant lorsqu'elle est administrée en doses trop importantes selon la réaction : Acide ascorbique +  $\text{O}_2$   $\longrightarrow$  Radical ascorbate +  $\text{O}_2^{\cdot(-)}$  +  $\text{H}^+$  (Bendich *et al.*, 1986).

Le catabolisme de la vitamine C et de la glycine se termine par l'acide oxalique, normalement éliminé par voie urinaire. Une altération des fonctions rénales peut donc conduire à son accumulation dans le sang (Ono, 1986).

En conclusion, on voit donc que beaucoup de protections existent face aux dérivés toxiques de l'oxygène moléculaire, que ce soit en les éliminant avant qu'ils ne réagissent avec d'autres molécules (SOD, CAT,...) ou en réduisant leurs effets (GPX, vitamine E, ...).

Les multiples tentatives d'administration d'antioxydants, à des animaux normaux en conditions normales ou *in vitro* (voir par exemple les expériences réalisées *in vivo* par Jackson, 1987 et *in vitro* par Horrum *et al.*, 1987), visant à réduire au maximum les dommages infligés aux molécules biologiques par les radicaux libres, dans le but de retarder le vieillissement, ont toutes échoué. Néanmoins, la connaissance fine des moyens de protection de notre organisme face aux radicaux libres débouche sur de nombreuses applications, car si l'organisme se défend face aux radicaux libres dans des conditions normales, il risque de se retrouver perdant face à des conditions inhabituelles dans lesquelles la production locale de radicaux libres dépasse les capacités de défense décrites ci-dessus et va parfois même jusqu'à les amoindrir par l'inactivation des enzymes protecteurs amorçant ainsi un cercle vicieux de destruction pure et simple de certaines cellules ou d'un organe entier, causant parfois la mort d'un individu.

En effet, à côté des pathologies où les radicaux libres sont simplement des conséquences d'un dysfonctionnement (par exemple dans certaines dystrophies musculaires (Halliwell, 1987)), il existe des troubles où les radicaux libres sont souvent considérés comme la (ou une des) cause(s) principale(s) des dommages encourus; l'inflammation, les problèmes pulmonaires dus à la pollution de l'atmosphère et aux xénobiotiques, et les lésions qui peuvent résulter de l'ischémie (arrêt de la circulation sanguine dans un organe) et de la reperfusion (reprise de la circulation dans un organe). Ces problèmes nous intéressent et nous allons les aborder maintenant.

Les cellules endothéliales de l'appareil circulatoire seront souvent des cibles et parfois des victimes par leur proximité de ces sources inhabituelles de radicaux libres. Ce sont ces cellules que nous allons examiner.

ESTIMATED ENDOTHELIAL SURFACE AREA IN A 70 kg MAN

Data simplified from that given by Wolinsky, 1980.

<i>Vessels</i>	<i>Endothelial surface area (cm<sup>2</sup>)</i>
Aorta	160
Vena cava	180
Large arteries	3 300
Large veins	7 000
Small arteries	14 500
Small veins	32 500
Arterioles	260 000
Venules	880 000
Capillaries (resting)	1 500 000
Capillaries (exercise)	3 000 000
Capillaries (total)	6 000 000
Total (resting)	2 697 640
Total (exercise)	4 197 640
Total (potentially available)	7 197 640

**Figure 41. Estimation de la surface couverte par l'endothélium humain (D'après Cryer, 1983).**

	<i>Orientation size, shape</i>
Arteries	Dependent on flow. Parallel to flow direction 55-75 $\mu\text{m}$ long, 10 $\mu\text{m}$ wide Relatively thick; 1-3 $\mu\text{m}$
Capillaries	Thinnest part of the endothelial lining; down to 0.1 $\mu\text{m}$
Venules	0.2-0.4 $\mu\text{m}$ thick. a. pericytic Larger and thicker than capillaries. Muscular b. muscular venules have slightly thicker endothelium than pericytic venules.
Veins	Varying from short, polygonal to large, long and narrow.

**Figure 42. Orientation *in vivo*, taille et forme des cellules endothéliales (d'après Thorgeirson, 1983).**

## (5) La cellule endothéliale.

Les multiples fonctions de l'endothélium des vaisseaux sanguins se répartissent en trois groupes donnant trois rôles généraux aux cellules endothéliales. Le premier est la réalisation d'une barrière de perméabilité sélective (Del Vecchio *et al.*, 1987; Cryer, 1983). Deuxièmement, ce tissu métabolise ou synthétise de nombreuses molécules destinées à une exocytose. Enfin, l'endothélium constitue une interface compatible avec le sang, c'est sa propriété de thromborésistance (Gerritsen, 1987; Cryer, 1983; pour une revue, voir Jaffe, 1987).

L'estimation de la surface qui serait réalisée par la juxtaposition de toutes les cellules endothéliales donne une idée de l'importance des interactions de l'endothélium avec les autres tissus de l'organisme (figure 41).

L'endothélium de l'ensemble du système circulatoire est constitué d'une monocouche de cellules qui, à l'exception de l'endothélium des veinules post-capillaires des vaisseaux lymphatiques, est composée de cellules aplaties, de forme grossièrement polygonale, séparées des tissus abluminaux par une membrane basale (Cryer, 1983).

L'épaisseur d'une cellule endothéliale typique varie, du noyau à la périphérie de la cellule, de  $3\mu\text{m}$  à  $1\mu\text{m}$ , dans l'aorte, voire  $0,1\mu\text{m}$  dans les capillaires et les veines. Elle est allongée ( $25$  à  $50\mu\text{m}$ ) dans le sens du flux sanguin et sa largeur oscille entre  $10$  et  $15\mu\text{m}$ ; la figure 42 montre que des variations de dimension existent selon le type de vaisseaux où l'on observe ces cellules (Thorgeirsson, 1983).

Leur disposition et leur morphologie, en microscopie électronique, permettent de classer les cellules endothéliales en trois groupes : endothélium continu, discontinu et fenestré (Gerritsen, 1987). D'autres différences existent selon le type de vaisseau où l'on observe ces cellules (veines, artères ou capillaires), que ce soit par exemple au niveau du métabolisme de l'acide arachidonique (Hall *et al.*, 1987; Gerritsen, 1987), de la synthèse de peptides vasoactifs, de l'importance des récepteurs hormonaux ou des protections enzymatiques antioxydantes (Housset et Junod, 1982).

Bien qu'aucune étude n'ait été réalisée, dans le cadre de ce mémoire, en microscopie électronique, signalons qu'il existe un marqueur ultrastructural spécifique de ces

cellules : il s'agit des corps de Weibel-Palade que l'on retrouve aussi chez les cellules mises en culture, même après un nombre élevé de générations (Haudenschild *et al.*, 1975; Thorgeirsson, 1983).

Si la barrière endothéliale est rompue, on assiste à une coagulation sanguine à laquelle participent les cellules endothéliales notamment par la synthèse de certains facteurs de la coagulation. Le facteur VIII de la coagulation est une glycoprotéine faite de l'association de deux types de protéines. La première de ces protéines (F VIII : R ag) est formée de l'assemblage de 4 sous-unités de 220 000 daltons qui peuvent s'associer, donnant un poids moléculaire global qui peut atteindre 12 millions. Elle intervient dans la fonction des plaquettes sanguines. La seconde protéine (F VIII C), d'un poids moléculaire égal à 285 000, exhibe une activité procoagulante et n'est pas présente chez les sujets atteints d'hémophilie classique (Barnes et Scott, 1983). La première de ces protéines est synthétisée par les cellules endothéliales, aussi en culture, tandis que la seconde ne l'est apparemment pas. La détection de la protéine F VIII : R ag par immunofluorescence est une manière facile d'identifier des cellules endothéliales en culture. Cette identification se complète par des observations morphologiques en microscopie optique (Jaffe, 1984) et est affinée par des travaux réalisés en microscopie électronique. On notera toutefois que des cellules endothéliales en culture depuis trop longtemps peuvent se différencier et néanmoins continuer d'exprimer ce facteur de la coagulation; on voit donc l'importance d'une observation morphologique.

Bien que les conditions soient totalement différentes en culture (milieu nutritif, environnement humoral, conditions hydrodynamiques différentes (Del Vecchio *et al.*, 1987; Haudenschild, 1984), les cellules endothéliales d'origines diverses continuent à pousser en monocouche de cellules polygonales, donnant un aspect typique à la culture (voir résultats), bien que celui-ci soit insuffisant pour une identification certaine (Haudenschild, 1984).

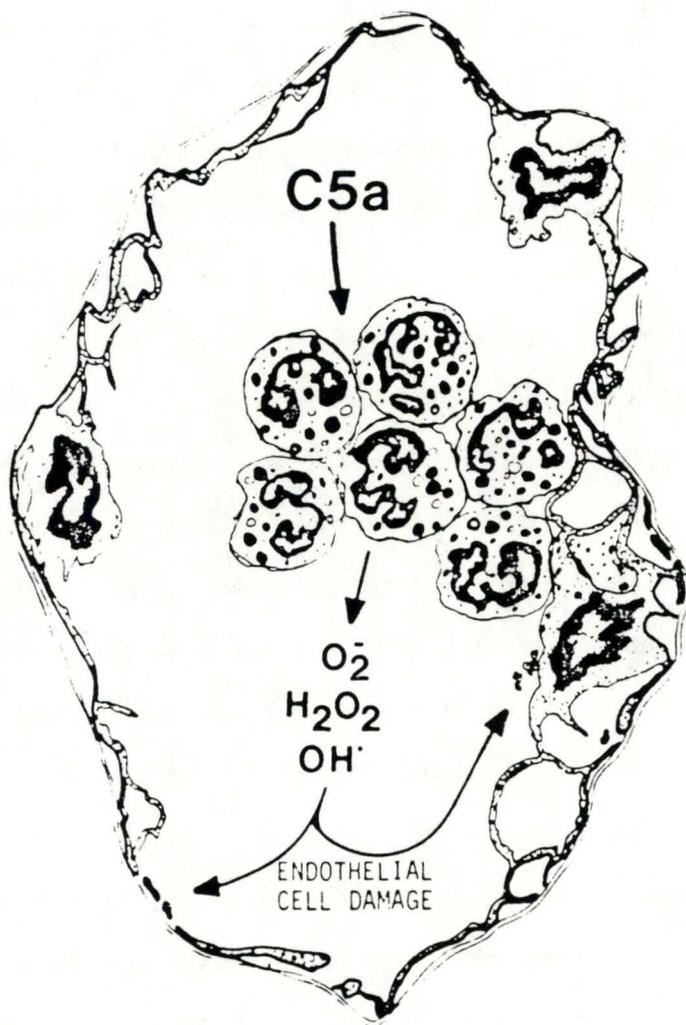


Figure 43. L'activation du complément peut entraîner une altération des cellules endothéliales par leur proximité des PMN (d'après Fantone et Ward, 1980).

## **(6) Cellules endothéliales et stress oxydants.**

Divers stress oxydants peuvent déborder les défenses des cellules endothéliales. Des modèles de ces stress ont été développés; plusieurs facteurs difficilement contrôlables régissant l'oxygénation cellulaire, *in vivo*, les organes isolés et les cultures de cellules sont donc d'une grande utilité pour l'étude des effets de ces stress (Jones, 1985; Walton et Packer, 1980). Les caractéristiques communes de ces modèles sont d'abord la formation de radicaux libres, puis, la formation d'oxydants potentiels et, ensuite, une inactivation macromoléculaire (Jones, 1985). Ces modèles impliquent généralement l'étude des mécanismes de protection des cellules et la réalisation d'essais de protection supplémentaires. Développons trois de ces modèles.

### **a) Les cellules endothéliales face aux phagocytes activés.**

Les radicaux libres libérés lors des réactions inflammatoires peuvent altérer les cellules saines proches des phagocytes activés soit directement par le fragment C5a du complément par exemple (Sacks *et al.*, 1978) (figure 43) ou indirectement par l'inactivation des inhibiteurs de protéases (Fantone et Ward, 1982). Lors de l'inflammation, les leucocytes sont très proches des cellules endothéliales car ceux-ci adhèrent beaucoup plus à l'endothélium, cela leur permet la traversée (diapédèse) des parois vasculaires (Mason et Balis, 1980). Cette proximité augmente les possibilités de cytotoxicité des phagocytes pour l'endothélium. L'altération des cellules endothéliales par les phagocytes activés peut conduire à une perméabilité vasculaire accrue qui peut entraîner par exemple la formation d'œdèmes pulmonaires. Ces derniers sont parfois la cause du syndrome de détresse respiratoire (Hammond *et al.*, 1985).

En plus de l'observation des dommages morphologiques (pour une revue des altérations morphologiques en microscopie électronique, voir Mason et Balis, 1980), des variations de perméabilité membranaire (relargage de  $^{51}\text{Cr}$ , de lactate déshydrogénase, relargage de 2-déoxy-D- $^3\text{H}$ -glucose (Andreoli *et al.*, 1985)), les expérimentateurs ont étudié l'importance relative des différents mécanismes détoxifiant les radicaux libres. Andreoli *et al.* (1986) montrent qu'une forte

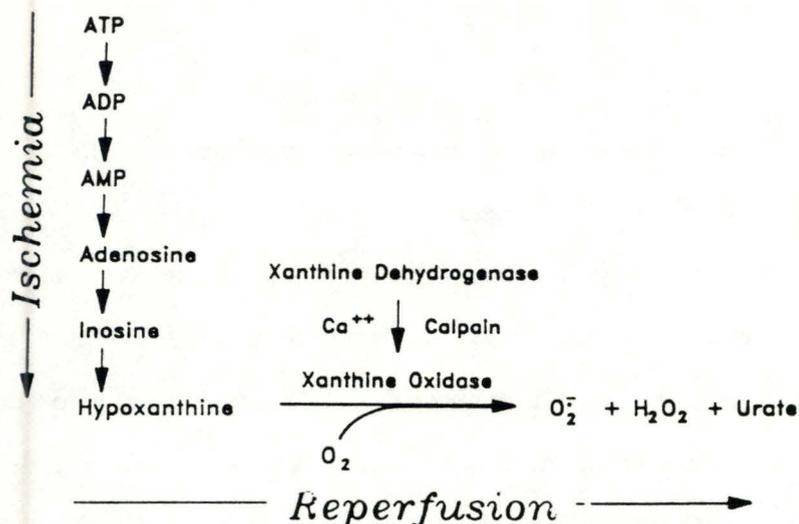
diminution de la concentration en glucose empêche la régénération du GSSG en GSH par le shunt des hexoses monophosphates des cellules endothéliales, ce qui entraîne une diminution de la résistance face à des polymorphonucléaires activés. Harlan *et al.* (1984) et Suttorp *et al.* (1986), utilisant différents inhibiteurs de la CAT et des enzymes impliqués dans la synthèse du GSH ou dans la réduction du GSSG, démontrent la grande efficacité de la GPX dans la protection des cellules endothéliales. L'efficacité de la GPX serait supérieure à celle de la CAT, dans les cellules endothéliales; le fait que la CAT est essentiellement présente dans les peroxyosomes et que la GPX peut, en plus de la détoxification du peroxyde d'hydrogène, métaboliser les peroxydes lipidiques peut expliquer ces résultats (Suttorp *et al.*, 1986). La supériorité de la GPX sur la CAT a aussi été démontrée pour la protection des fibroblastes (Raes *et al.*, 1987).

#### b) Hyperoxie - xénobiotiques - ozone - dioxyde d'azote.

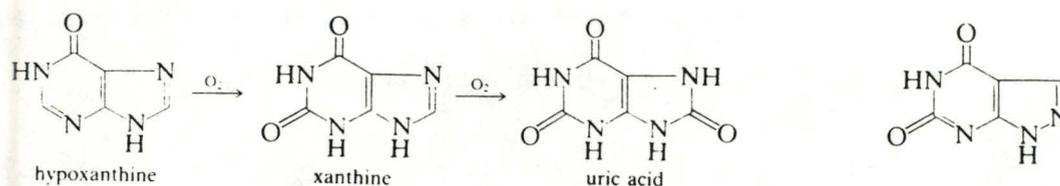
L'exercice de la plongée sous-marine expose les humains à des pressions en oxygène plus forte qu'en conditions normales (Mustafa et Tierney, 1978). Une hyperoxie (=augmentation de la pression en oxygène) infligée à des cellules endothéliales en culture peut entraîner certaines variations : contenu en ADN, en protéines, relargage de différentes molécules, ... (Rubin *et al.*, 1983). Housset et Junod (1982) ont montré que la mortalité des cellules endothéliales en culture, après une hyperoxie prolongée, est identique selon que ces cellules proviennent d'une veine ou d'une artère, bien que des différences existent dans la proportion de enzymes SOD, catalase et GPX. De plus, toutes les cellules ne meurent pas au même moment, révélant ainsi une hétérogénéité entre elles, même lorsqu'elles proviennent du même vaisseau sanguin (Rubin *et al.*, 1983).

Des modèles utilisant l'ozone et le dioxyde d'azote permettent l'étude de l'effet de ces molécules sur le métabolisme cellulaire (pour une revue, voir Mustafa et Tierney, 1978).

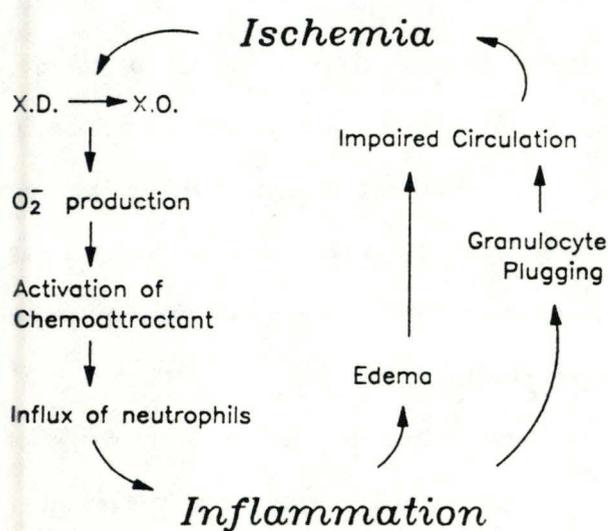
Les dommages pulmonaires dus aux xénobiotiques ont aussi été approchés par des études en culture cellulaire (Ody et Junod, 1985).



**Figure 44.** Mécanisme proposé de la production d'anions superoxydes pendant la reperfusion (d'après Mc Cord, 1985).



**Figure 45.** Oxydation de l'hypoxanthine en acide urique par la xanthine oxydase et formule de l'allopurinol, inhibiteur de la xanthine oxydase (d'après Halliwell et Gutteridge, 1985).



**Figure 46.** L'ischémie peut aussi entraîner l'activation des PMN, celle-ci pouvant entraîner une nouvelle ischémie (d'après Mc Cord, 1987).

### c) L'ischémie et la reperfusion.

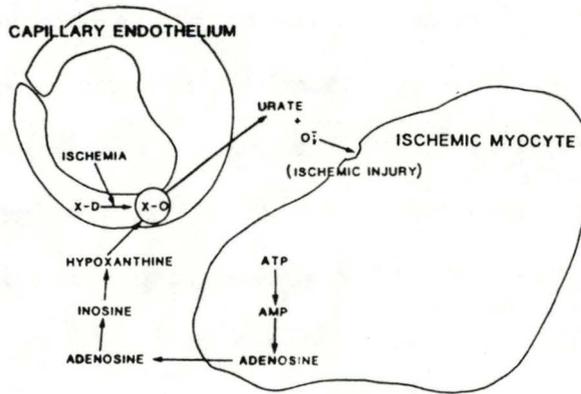
L'interruption de la circulation dans un organe cause une ischémie : l'oxygène, les substances nutritives et hormonales ne sont plus fournis et les métabolites ne sont plus éliminés (Jones, 1985). Le manque d'oxygène entraîne rapidement une accumulation d'AMP car la cellule ne peut plus régénérer l'ATP. Cet AMP est métabolisé en hypoxanthine dont la quantité augmente (Hansson *et al.*, 1982; Mac Cord, 1985; Mac Cord, 1986; Mac Cord, 1987; Bulkley, 1987), c'est la base du modèle utilisant la xanthine oxydase.

Parallèlement à cette accumulation d'hypoxanthine, la xanthine déshydrogénase cellulaire (XD) est clivée par une protéase, probablement la calpaïne, elle-même activée par des ions  $Ca^{++}$  entrés dans la cellule suite à une diminution de l'activité des pompes ioniques dépendantes de l'ATP; la XD acquiert ainsi une activité d'oxydase (XO : xanthine oxydase) (Mac Cord, 1987; Halliwell et Gutteridge, 1985). Elle métabolise l'hypoxanthine en xanthine puis en acide urique par la réduction d'oxygène moléculaire en anion superoxyde (figures 44 et 45).

Lors de la reperfusion, une activation des PMN (figure 46) pourrait augmenter les dommages (pour une revue, voir Mc Cord, 1986).

Bien que des ions superoxydes soient aussi formés pendant l'ischémie (Hamer, 1987), il est permis de penser que c'est surtout au moment de la reperfusion que les dommages les plus importants seront effectués par la XO, celle-ci disposant de tout l'oxygène moléculaire qu'elle désire (Hansson *et al.*, 1982; Bulkley, 1987).

Les applications de ce modèle sont nombreuses. L'ischémie du myocarde cause souvent un infarctus du myocarde (Bulkley, 1987; Mac Cord, 1985; Simpson *et al.*, 1987; Das *et al.*, 1987, Hammond *et al.*, 1985). Notons que les myocytes humains ne contiennent pas de XO, même après une ischémie prolongée (Das, 1987), mais que les cellules endothéliales des capillaires du myocarde en contiennent (figure 47). L'utilisation de molécules antioxydantes lors de reperfusions expérimentales permet de réduire la taille des zones nécrosées (Ytrehus, 1987). Un arrêt cardiaque ou une hémorragie peuvent entraîner une



**Figure 47.** L'ischémie des capillaires du myocarde peut entraîner une altération des myocytes par la production d'anions superoxydes à partir de l'activité de la xanthine oxydase (d'après Hearse *et al.*, 1986).

Xanthine oxidase is present in:	Xanthine oxidase is absent from:
Alveolar epithelial cells of lactating mammary gland Alveolar epithelial cells of non-lactating mammary gland (weakly) Capillary endothelial cells of Small and large intestine Heart and skeletal muscle Lung Kidney (capillaries and vasa recta of the medulla) Liver (sinusoids) Thymus Spleen Placenta Epidermis Choroid plexus of brain White adipose tissue Arterial wall	Ductal epithelial cells of mammary gland Myoepithelial cells of mammary gland and salivary gland Endothelial cells of Large blood vessels (arteries and veins) Endocardium Capillaries of brain (gray and white matter) Capillaries of testis Epithelial cells of Liver Lung Kidney Thymus Epidermis Intestine Fibroblasts. Adipocytes. Muscle cells. Nerve cells. Leukocytes. Lymphocytes. Macrophages. Kupffer cells. Erythrocytes

**Figure 48.** Localisation de la xanthine oxydase dans des cellules bovines (d'après Jarasch *et al.*, 1986).

ischémie généralisée; le cerveau ne supportant pas sans dommage une ischémie d'une durée supérieure à 4 minutes, on comprend l'enjeu de la recherche de moyens de protection, même partielle, du cerveau par des antioxydants lors de la reperfusion (Bulkley, 1987).

Les opérations chirurgicales sur les membres, par le pincement des vaisseaux sanguins pour empêcher une hémorragie, peuvent entraîner des dommages après la reperfusion (Walker, 1987).

Les cellules endothéliales ne font pas que subir les effets de la reperfusion, elles peuvent aussi y participer car la XD des cellules endothéliales des capillaires sanguins (figure 48) se transforme aussi en XO pendant une ischémie (Jarasch *et al.*, 1981; Jarasch *et al.*, 1986). Dans un organe, la source de XO étant souvent les cellules endothéliales, leur mise en culture, dans le but de l'étude de la conversion de la XD en XO, permet de tester des modèles d'anoxie (l'oxygène n'est plus fourni) et de réoxygénation dans le but de simuler l'anoxie qui a lieu *in vivo* pendant une ischémie (Ratyck *et al.*, 1987), bien que, rappelons-le, une ischémie ne soit pas simplement une anoxie ou une hypoxie.

## II. Matériels et méthodes.

Les enzymes, leurs substrats et cofacteurs proviennent de la firme Sigma Chemical Company (St-Louis, USA) ; les autres produits, sauf spécification, viennent de la firme Merck A.G. (Allemagne Fédérale).

### 1) Mise en culture de cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine.

Notre méthode est une adaptation d'un procédé décrit pour la première fois en 1963 par Maruyama (Balconi et Dejana, 1986; Fryer *et al.*, 1966; Jaffe *et al.*, 1973). Toutes les étapes de la mise en culture sont réalisées stérilement.

Le cordon ombilical est séparé du placenta juste après la naissance de l'enfant et est recueilli dans un milieu de conservation (KCl 4mM; NaCl 140 mM; Hépés 10 mM (Janssen Chimica); D-glucose 1 mM; streptomycine 100 µg/ml (Sigma) et pénicilline 100 U/ml (Continental Pharma); fungizone 0,25 µg/ml (Gibco, Scotland); pH 7,3 conservé à 4°C.)

Ce milieu a été préalablement stérilisé (pompe péristaltique et filtre 0.22 µm, Millipore) et conservé à 4°C dans des récipients stériles (Tzafon, Israël).

Les cellules sont mises en culture endéans les trois jours. Un cathétère est introduit dans la veine ombilicale et est immobilisé par un serre-fil de plastique (Fix). On perfuse la veine avec une seringue de 50 ml (Terumo, Ribbon Pack, USA) contenant une solution de PBS additionnée de fungizone et d'antibiotiques de même concentration que le milieu de récolte des cordons ombilicaux. L'autre extrémité de la veine est alors obturée par un second cathétère. Un bouchon (Travenol Laboratories, USA) est fixé sur chaque cathétère.

Une solution de collagénase 0,02 % (Type II) est injectée à travers un des deux bouchons. Le cordon est déposé dans une boîte de Pétri et est incubé pendant trente minutes à 37°C.

On suspend ensuite le cordon par une extrémité, on recueille la solution de collagénase contenant des cellules endothéliales et on perfuse la veine avec 20 ml de

milieu M 199 + S (M 199 = milieu en poudre Gibco contenant des sels de Hanks, Clépes 10 mM,  $\text{NaHCO}_3$  1,75 g/l, L-glutamine 100  $\mu\text{g/ml}$  (Sigma) et porté à pH 7,2 avec du NaOH; S = sérum de veau foetal (Sera-Lab ) représentant 20 % du volume final) de manière à récupérer le plus possible de cellules et à inhiber la collagénase. Le tout est centrifugé (1000 RPM, 10 minutes, Hettich Universal). Le culot obtenu est suspendu dans du M 199 + S et on transfère ce milieu contenant les cellules dans une boîte de culture de 25  $\text{cm}^2$  ( Cell Cult, Sterilin, Angleterre) dont le fond avait été préalablement recouvert d'une pellicule de gélatine à 0,2 %. Le lendemain, on change ce milieu de manière à retirer le maximum de globules rouges, d'autres cellules sanguines et la fungizone (1  $\mu\text{l/ml}$  de milieu) ajoutée la veille. La croissance des cellules est observée chaque jour en microscopie à contraste de phase (microscope inversé Zeiss).

## 2) Repiquage des cellules et subcultures.

Après avoir rincé la boîte avec du M 199 + S deux fois pendant deux minutes, on ajoute une solution de trypsine 0,25 % (Gibco) que l'on incube à 37°C. L'évolution du détachement des cellules est suivie attentivement en microscopie de phase. On réintroduit du M 199 + S (contient des inhibiteurs de trypsine) et on récupère les cellules. La centrifugation et les étapes suivantes sont réalisées de la même manière que pour la mise en culture. Le type de boîtes de culture où l'on transfère les cellules dépend de leur utilisation ultérieure; la surface de celles-ci devra toujours être recouverte de gélatine avant d'y déposer les cellules.

## 3) Mise en évidence de la protéine F VIII : R ag du facteur VIII de la coagulation par immunofluorescence.

Le marquage se réalise sur des cellules repiquées sur un couvre-objet en verre recouvert de gélatine. Après un triple rinçage au PBS, on fixe les cellules par une

Figure 48 : ensemble de micro-injection :

(A) Microscope inversé DIAVERT Leitz

(B) Micromanipulateur Leitz

(C) Démultiplicateur de mouvement

(D) Support de la micro-pipette reliée à l'unité de pression

(E) Interrupteur d'injection (ON-OFF)

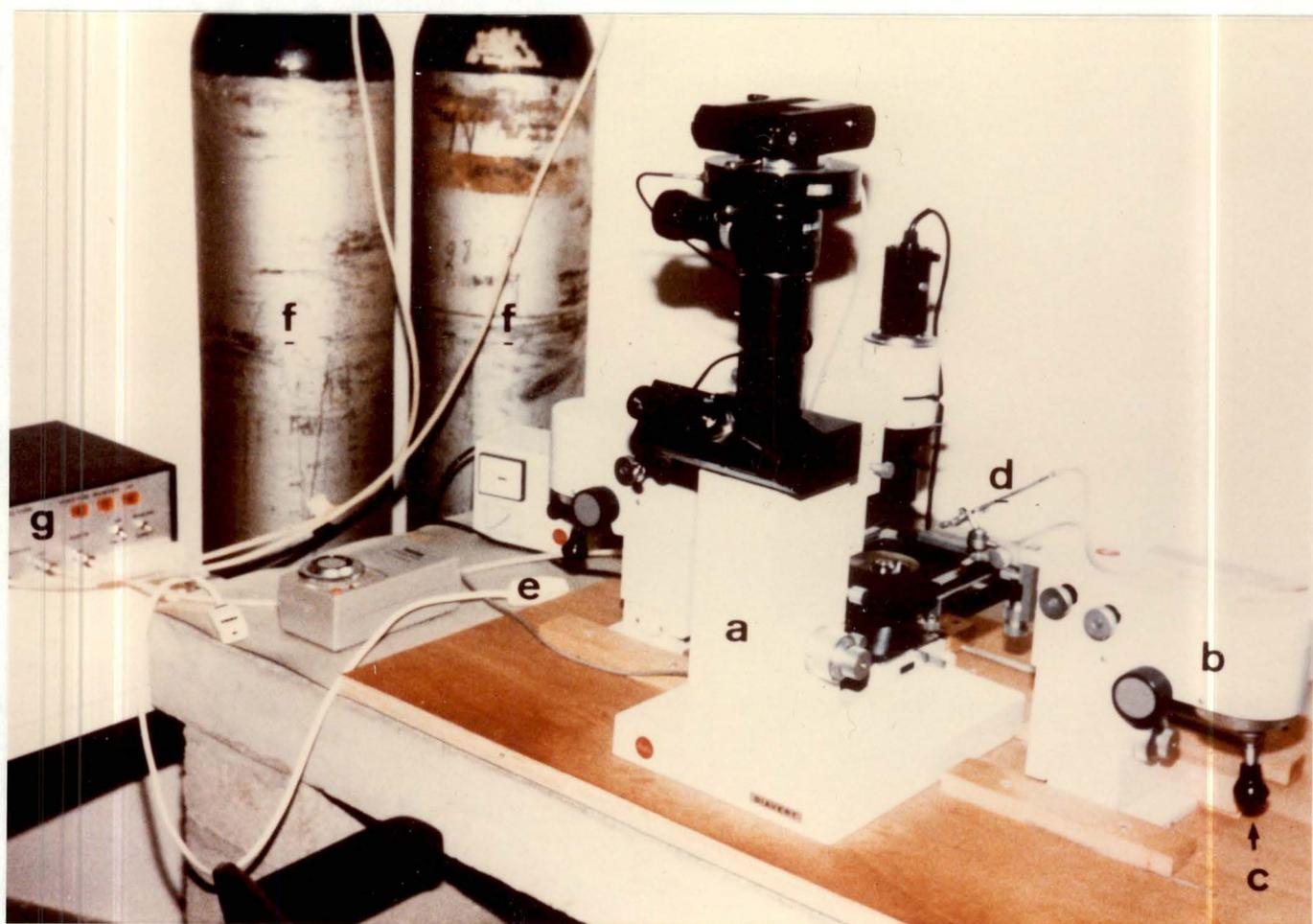
(F) Bombone d'azote

(G) Unité de pression à 3 sélections :

-pression de maintien

-pression d'injection

-haute pression



solution de PBS contenant 3 % de formaldéhyde (Belgolabo), du  $\text{CaCl}_2$  et du  $\text{MgCl}_2$  à une concentration  $10^{-4}$  M, pendant 20 minutes.

On effectue trois nouveaux rinçages au PBS.

Ensuite, on dépose les couvre-objets dans une chambre humide et on les recouvre de 100  $\mu\text{l}$  d'antisérum de lapin anti-facteur VIII (Berhing Werke A.G., Allemagne Fédérale) diluée 50 fois pour le test et de 100  $\mu\text{l}$  de PBS pour le contrôle. Les couvre-objets sont incubés pendant trente minutes.

Après deux rinçages de cinq minutes avec du PBS contenant 0,2 % de gélatine, on recouvre tous les couvre-objets de 100  $\mu\text{l}$  de gamma-globulines anti-lapin de chèvre couplées à la fluorescéine et diluée 20 fois, on les incube pendant trente minutes.

On rince deux fois au PBS + gélatine. Il reste alors à monter les couvre-objets sur les lames porte-objets à l'aide d'un mélange de glycérol et de PBS (9/1), à observer les cellules en microscopie à fluorescence (Dialux 22, Leiz) et à prendre des photographies, de préférence avec un film couleur.

#### 4) Micro-injection.

Nous avons travaillé sur un système décrit par Graessmann *et al.* (1980) et modifiée par Ansorge (1982). Des solutions enzymatiques sont injectées dans les cellules par l'intermédiaire de micro-pipettes réalisées à partir de capillaires (Clark Electromedical Instruments, Parrybourne, Angleterre) étirés après avoir été chauffés à température de fusion (Microelectrode Puffer Unit, Palmer, Angleterre). Une description du système de micro-injection est donnée sur la figure 48. Le volume minimal injecté dans une cellule peut atteindre  $10^{-11}$  ml (Graessmann *et al.*, 1980).

Pendant la micro-injection, les cellules, repiquées la veille à faible dilution dans une boîte de culture d'un diamètre suffisant (diamètre 60 mm, Falcon, USA) préalablement quadrillée pour faciliter le comptage des cellules par la réalisation de cases où elles sont confinées, baignent dans la solution de Puck ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 160 mg/l,  $\text{KCl}$  400 mg/l;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 150 mg/l;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 154 mg/l;  $\text{NaCl}$ , 8 mg/l;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 290 mg/l; glucose, 1100 mg/l).

L'apparition d'un point clair sur la surface de la membrane cellulaire signale l'introduction de la micro-pipette à l'intérieur de la cellule. Le tampon d'injection dans lequel sont dissous les enzymes est composé de  $\text{KH}_2\text{P}_0_4$  5,45 mM;  $\text{KH}_2\text{P}_0_4$  4,55 mM; KCl 70,5 mM et NaCl 7,05 mM à pH 7,2.

Après injection, les cellules sont rincées deux fois avec du PBS contenant 1 U/ml de pénicilline (Gibco) et 1  $\mu\text{g/ml}$  de streptomycine. Du M 199 + S est réintroduit dans la boîte de culture.

De manière à réduire la variabilité expérimentale au maximum, on utilise la même boîte de culture pour réaliser une expérience comprenant les groupes de 30 cellules injectées avec du tampon d'injection seul, injectées avec différentes concentrations d'un enzyme dissout dans ce tampon ou non injectées.

#### 5) Stress oxydant : un modèle d'hyperoxie.

Les cellules injectées et non injectées sont placées dans une atmosphère de 95 % d'oxygène moléculaire et 5 % de dioxyde de carbone et les cellules survivantes en microscopie de phase sont comptées toutes les 24 heures.

Le rapport entre le résultat de l'intégration de la courbe de survie des cellules injectées avec des enzymes et celui de la courbe de survie des cellules injectées avec du tampon d'injection seul, nous donne un pourcentage de protection des cellules.

La comparaison, au premier jour après l'injection, du pourcentage de cellules survivantes injectées avec du tampon seul et du pourcentage de cellules survivantes non injectées nous fournit une indication sur la mortalité des cellules due à l'injection.

#### 6) Effet de la vitamine E et de la vitamine C.

La vitamine E (Sigma) est dissoute dans de l'éthanol absolu. Différents volumes de cette solution à 0,2 M sont ajoutés au milieu de culture d'une boîte multicompartimentée (Sterilin, Angleterre). Les cases témoins ne contiennent pas de

vitamine. Après trois jours d'hyperoxie, on dose la quantité de protéines représentant les cellules par la méthode décrite en 1951 par Lowry *et al.*.

On agit de même avec une solution aqueuse de vitamine C.

### 7) Dosages enzymatiques sur des homogénats de cellules.

Les cellules à confluence d'une boîte de 75 cm<sup>2</sup> (Cell Cult, Sterilin, Angleterre) sont raclées dans du PBS et leur membranes sont détruites dans un homogénéiseur de Dounce.

#### a) Dosage de la catalase.

Le dosage et le calcul de l'activité sont réalisés selon la méthode décrite par Baudhuin *et al.* (1964).

Le principe du dosage est d'ajouter du peroxyde d'hydrogène dans l'homogénat de cellules où l'on fait agir du Triton X 100, de manière à rompre les membranes peroxysomales, et de mesurer la quantité de peroxyde d'hydrogène qui reste après 45 minutes d'incubation en le fixant avec de l'oxysulfate de titane, ce qui permet une lecture au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 420 nm.

On calcule l'activité enzymatique de la catalase de la manière suivante :

$$\text{Unité/ml} = \text{Log} \frac{(\text{valeur SC lue} - \text{valeur du blanc}) \times 5,2 \times \text{dilution}}{(\text{valeur test lue} - \text{valeur du blanc}) \times 0,1 \times 45 \times 50}$$

valeur SC = valeur lue pour les tubes où l'on met du peroxyde d'hydrogène et pas d'homogénat.

valeur test = valeur lue pour les tubes où l'on met du peroxyde et de l'homogénat.

valeur du blanc = valeur lue pour les tubes sans peroxyde d'hydrogène et sans homogénat.

Justification des paramètres de calcul : 0,1 = volume d'homogénat en ml; 5,2 = volume final en ml avec le mélange réactionnel; 45 = temps d'incubation en minutes; 50 car l'unité choisie d'activité de la catalase est la quantité d'enzyme qui détruit 90 % du peroxyde d'hydrogène fourni dans 50 ml de mixture par minute.

L'ensemble du dosage se réalise à température ambiante.

(b) Dosage de la SOD.

La méthode utilisée, mise au point dans notre laboratoire, consiste en une mesure de l'activité par chémoluminescence (Corbisier *et al.*, 1987).

Un système de production stable d'anions superoxydes basé sur l'activité de la xanthine oxydase (grade III) qui oxyde la xanthine en acide urique en réduisant l'oxygène moléculaire en ions superoxydes, est couplé à la détection de la production des ions superoxydes par la mesure de la chémoluminescence de la lucigénine (Sigma), spécifique des ions superoxydes, à l'aide d'un Lumac Biocounter 2010.

L'intensité de la chémoluminescence est notée après 30 (ou 60) secondes. L'activité de la SOD se calcule en pourcentage d'inhibition de la réaction de chémoluminescence; celui-ci est égal au rapport de la chémoluminescence du mélange réactionnel sans homogénat (blanc) et avec homogénat.

Pour convertir ce pourcentage d'inhibition en unités enzymatiques, on réalise une courbe d'étalonnage qui donne la valeur du pourcentage d'inhibition pour un nombre connu d'unités enzymatique de la SOD (voir résultats). Ces unités ont été définies comme la quantité de SOD qui donne 50 % d'inhibition de la production d'anions superoxydes dans le système xanthine / xanthine oxydase utilisé par Corbisier *et al.* (1987).

Ce dosage est effectué à température ambiante et ne demande que 25  $\mu$ l d'homogénat par test.

(c) Dosage de la glutathion peroxydase (Mbemba et al. 1985; remis au point par Pigeolet, 1985-1986).

Le principe du dosage repose sur la mesure au spectrophotomètre (Perkin-Elmer 557) de la décroissance de l'absorbance du NADPH à 366 nm.

Le mélange réactionnel contient du tampon phosphate (pH 8,5), de l'EDTA, du NADPH, du GSH et de la glutathion réductase. La diminution de NADPH témoigne de l'activité de la glutathion réductase qui réduit le GSSG formé par l'activité de la GPX. Le substrat avec lequel l'enzyme est incubé est le t-butylhydroperoxyde ou TBHP (Aldrich-Europe, Belgique). Le mélange est conservé à 0° C pendant la durée des dosages et le dosage en lui-même s'effectue à température ambiante.

L'activité se calcule comme suit :

$$\text{Activité} = \frac{\Delta \text{D.O.} / \text{min} \times 10 \times \text{dilution}}{6,22 \times 1,667} = \frac{\quad}{\quad} \quad 1 \text{ unité} = 1 \mu\text{mole de NADPH oxydé} / \text{min.}$$

Les activités des enzymes catalase, SOD et GPX sont rapportées en unités par microgrammes de protéines de l'homogénat selon la méthode décrite par Lowry *et al.* (1951).

8) Dosage du GSH et du GSSG par spectrofluorimétrie (Hissin et Hilf, 1976).

Les cellules sont raclées dans une solution d'acide phosphorique 5 % qui fixe l'état redox des molécules cellulaires.

Pour le dosage du GSH, 0,1 ml d'homogénat auquel on ajoute 15 µl de NaOH 5N est incubé avec de l'OPT (O-phtalaldéhyde, Aldrich-Europe) qui complexe le GSH. L'excitation du complexe formé à 360 nm donne une fluorescence détectée à 465 nm (spectrofluorimètre Kontron SMF 25).

Pour doser le GSSG, l'homogénat est incubé avec du NEM 0,04 (N-éthylmaleimide). Ensuite, on incube avec de l'OPT et le complexe ainsi formé émet une fluorescence à 465 nm après excitation à 360 nm.

Pour la mesure du quenching (absorption de la fluorescence par d'autres molécules de l'homogénat), on incube du GSH (ou du GSSG) d'une concentration étalon, seul ou avec de l'homogénat cellulaire et on compare l'intensité des deux fluorescences : c'est le calcul du rendement dont on tient compte pour le calcul de la fluorescence réelle due au GSH (ou au GSSG).

La concentration du GSH (ou du GSSG), en  $\mu\text{g}$  de GSH (ou de GSSG) par  $\mu\text{gramme}$  de protéines de l'homogénat, est calculé de la manière suivante :

Concentration GSH (GSSG) étalon x fluorescence réelle du test x dilution du test

---

$\mu\text{g}$  de protéines x fluorescence du GSH (GSSG) étalon x dilution du GSH (GSSG)

#### 9) Dosage de la malonaldéhyde (Placer *et al.*, 1966).

Le dosage de malonaldéhyde (MDA) est basé sur le principe suivant : on incube pendant 30 minutes à 95 ° C avec de l'acide thiobarbiturique (TBA) dilué dans de l'acide trichloracétique (TCA) 10 %. Le TCA sert à précipiter les protéines. On centrifuge 10 minutes à 15 000 RPM dans une centrifugeuse Janetski et on lit l'absorbance du complexe MDA-TBA à 532 nm.

#### 10) Autoradiographie (Cristofalo, 1973)

On repique des cellules à faible dilution dans une boîte de plastique Falcon ( $\varnothing$  60 mm) et on les incube avec 1  $\mu\text{l}$  de thymidine tritiée (1 mCi/ml, NEM, Angleterre) pendant 24 heures. Après avoir rincé la boîte au PBS, les cellules sont fixées dans un mélange méthanol/acide acétique (3/1) d'abord dilué deux fois dans du PBS puis pur.

Le lendemain, on recouvre la boîte d'une solution d'alun-gélatine (gélatine 0,5 %; alun de chrome 0,05 %). On laisse sécher.

En chambre noire, on recouvre les cellules avec l'émulsion photographique diluée dans deux volumes d'eau distillée. On retire l'excès d'émulsion de manière à en laisser une pellicule sur les cellules. On conserve la boîte de culture dans une petite chambre noire contenant du silicagel pendant 15 jours.

On développe ensuite l'émulsion (développeur D 19) et, après rinçage à l'eau distillée, on fixe (fixateur Kodak, dilué dans quatre volumes d'eau distillée). On laisse sécher et il reste à observer les cellules en microscopie à contraste de phase.

#### 11) Teststatistique.

La signification des résultats a été déterminée par un test t de student.

## IV. Résultats.

### 1) Mise en culture des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine.

L'observation des cellules, au premier jour après leur mise en culture, nous donnait déjà une indication sur leur identité : les cellules poussaient en petits groupes de 5 à 50, voire 100 cellules confluentes, de taille identique et de forme polygonale, dont le noyau possédait un nombre restreint de nucléoles, ce qui différait de l'aspect des fibroblastes en culture.

Les cellules poussaient en monocouche et, arrivées à confluence, elles connaissaient une inhibition de leurs mitoses et nous n'avons pas obtenu plusieurs couches de cellules à l'intérieur de la boîte de culture, ce qui est le cas pour des cellules musculaires lisses en culture.

La planche 1 montre des photographies prises à des temps différents de la culture, à deux grossissements différents. On y retrouve les caractéristiques morphologiques des CE en microscopie optique : leur position les unes par rapport aux autres (monocouche), leur forme polygonale et leur taille.

Le souci d'obtenir en culture des cellules endothéliales (CE) sans contamination par des autres types de cellules telles que des fibroblastes ou des cellules musculaires lisses explique le choix de notre méthode. L'utilisation de la collagénase pour détacher les cellules de la membrane basale possède deux avantages sur celle de la trypsine. Le premier est que la trypsine digère plus facilement les constituants de la membrane basale, ce qui entraîne un risque de contamination plus important notamment par des cellules musculaires lisses (Balconi et Dejana, 1986). Le second est qu'il a été signalé que la trypsine pouvait entraîner des aberrations chromosomiques altérant la croissance cellulaire (Fryer *et al.*, 1966).

Nous avons observé qu'il était plus aisé de perfuser la veine ombilicale plutôt que les artères ombilicales car ces dernières sont sujettes à une vasoconstriction importante due en partie à la conservation du cordon ombilical à 4° C. Certains auteurs précisent qu'il est

Planche 1 : évolution des CE en culture.

A) Faible grossissement (144 x).

Au jour 1 (photo 1), les CE se sont attachées au fond gélatineux de la boîte de culture et se sont réparties en petits groupes assez dispersés. On peut observer leur forme polygonale.

Au jour 2 (photo 2), la densité des cellules a augmenté ; elles se sont divisées.

Au jour 4 (photo 3), les cellules sont presque confluentes. Elles constituent une monocouche presque complète. Leur forme est toujours aussi remarquable.

Au jour 7 (photo 4), les CE sont à confluence depuis 1 jour, elles ne se diviseront plus : le contact des cellules avec leurs voisines inhibe les mitoses. La forme des cellules devient assez variable.

B) Fort grossissement (558 x) : on retrouve les mêmes caractéristiques morphologiques. On peut mieux observer la forme des cellules. Les noyaux sont bien visibles et le nombre de nucléoles est restreint. On observe quelques cellules binucléées.

Photo 1' : CE au jour 1 de leur mise en culture ; photo 2' : jour 2 ; photo 3' : jour 4 ; photo 4' : jour 7

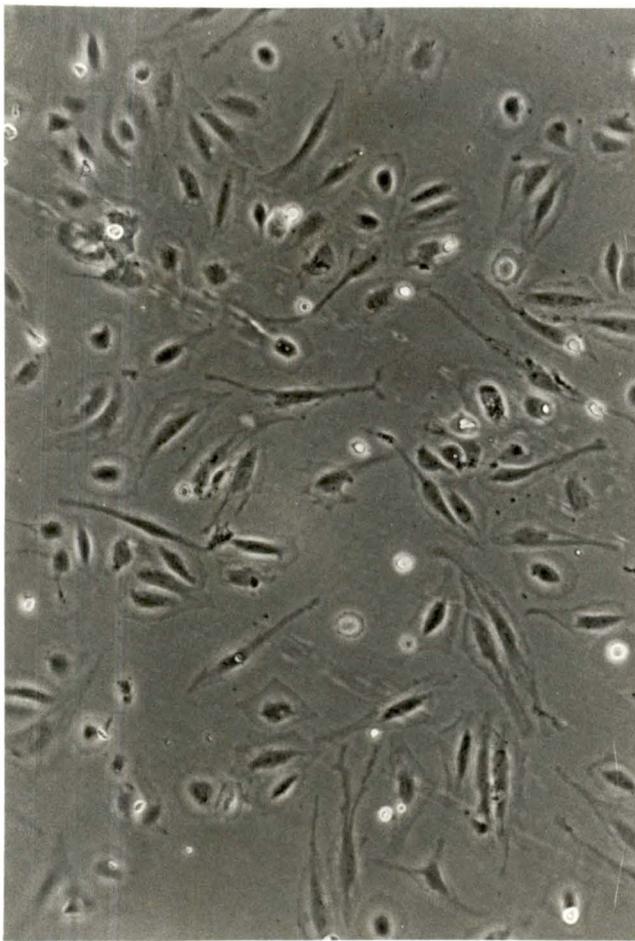


Photo 1

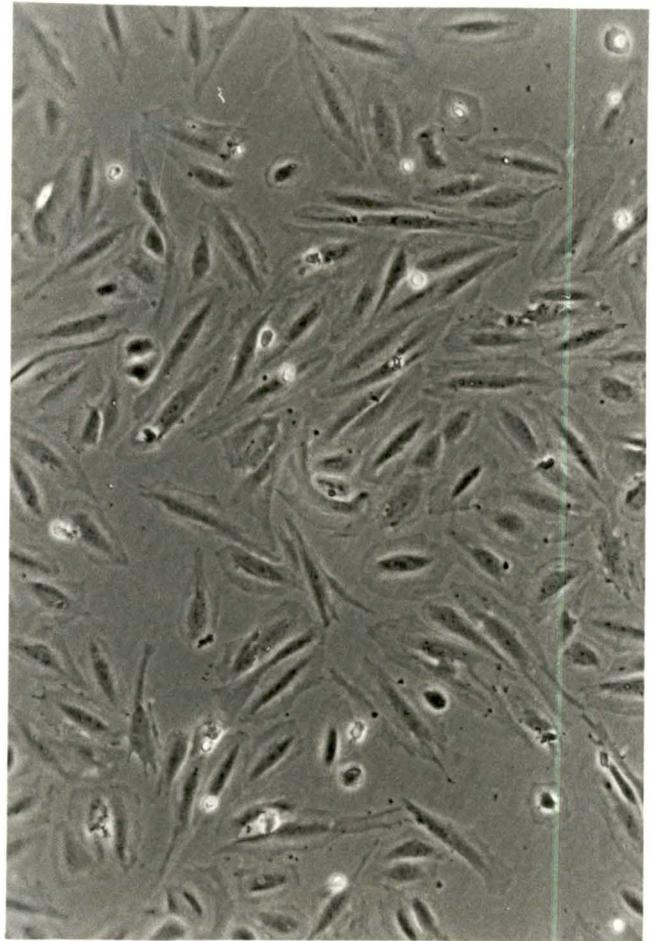


Photo 2

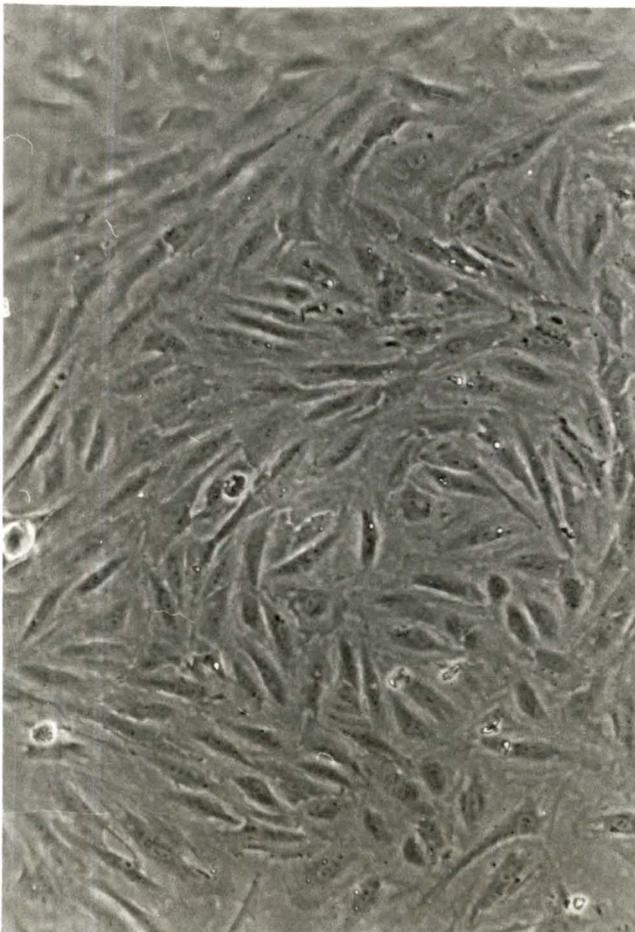


Photo 3

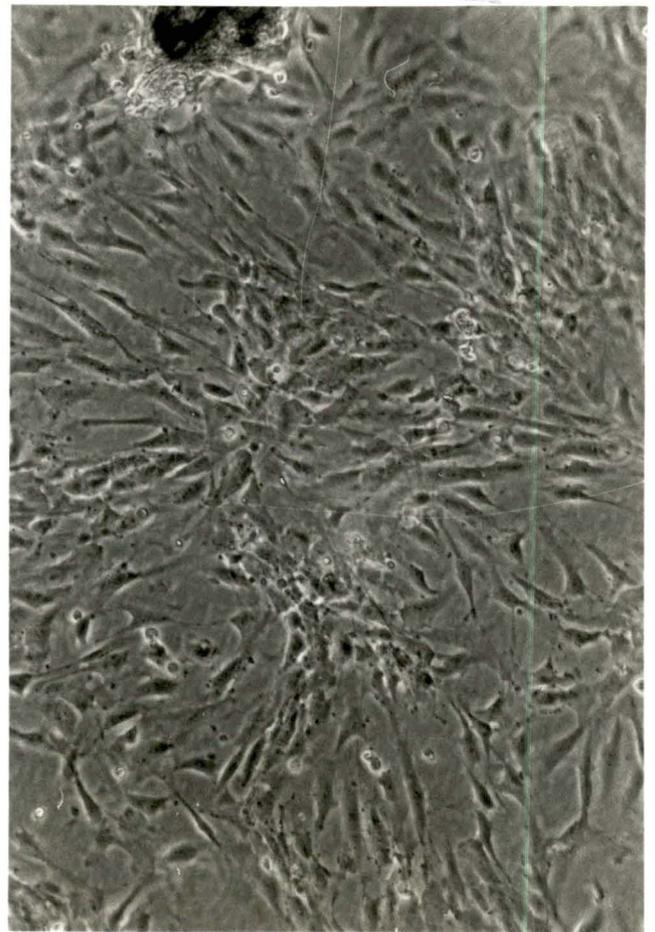


Photo 4

Planche 1 : évolution des CE en culture. Faible grossissement (144 x).

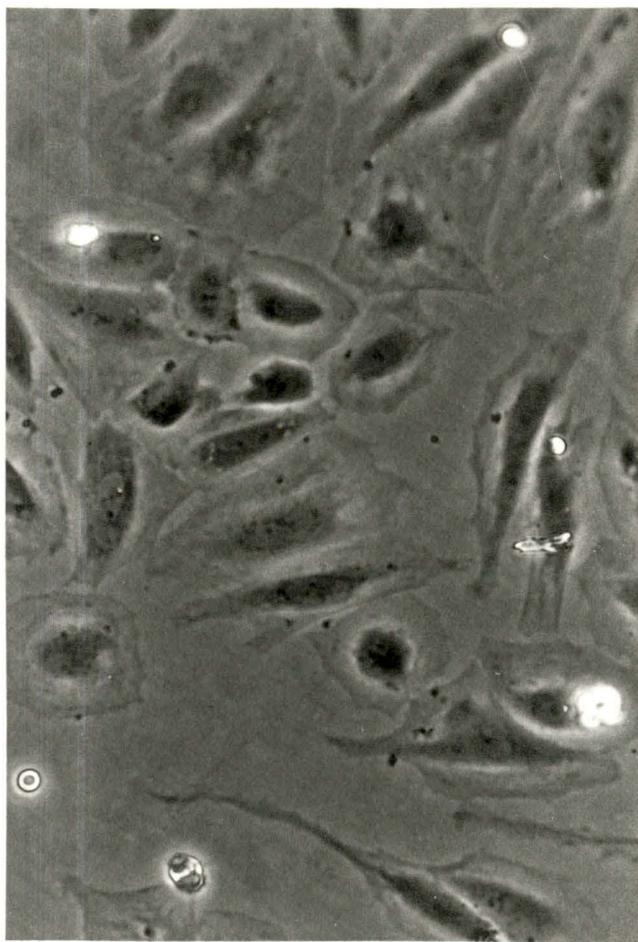


Photo 1'

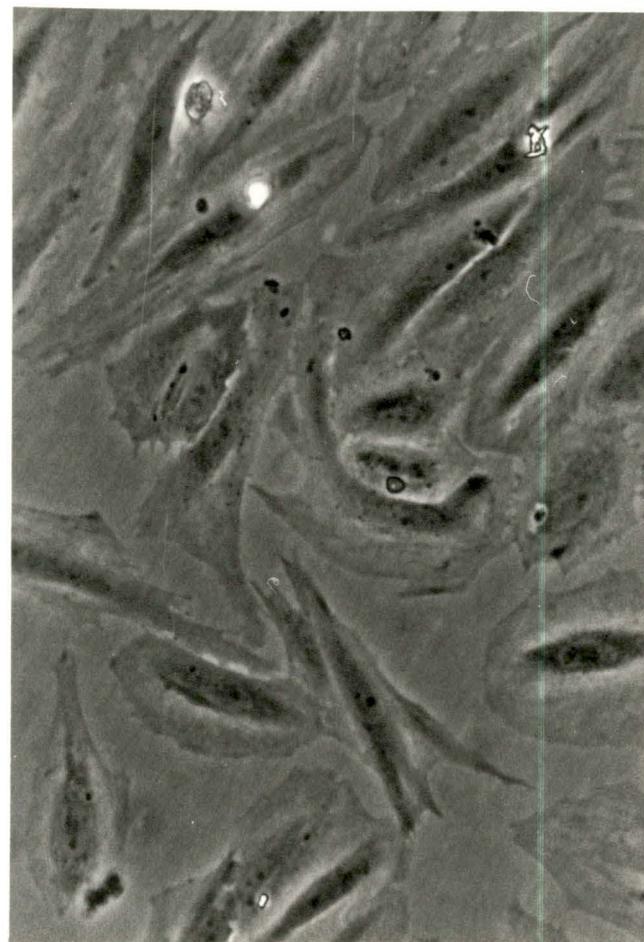


Photo 2'



Photo 3'

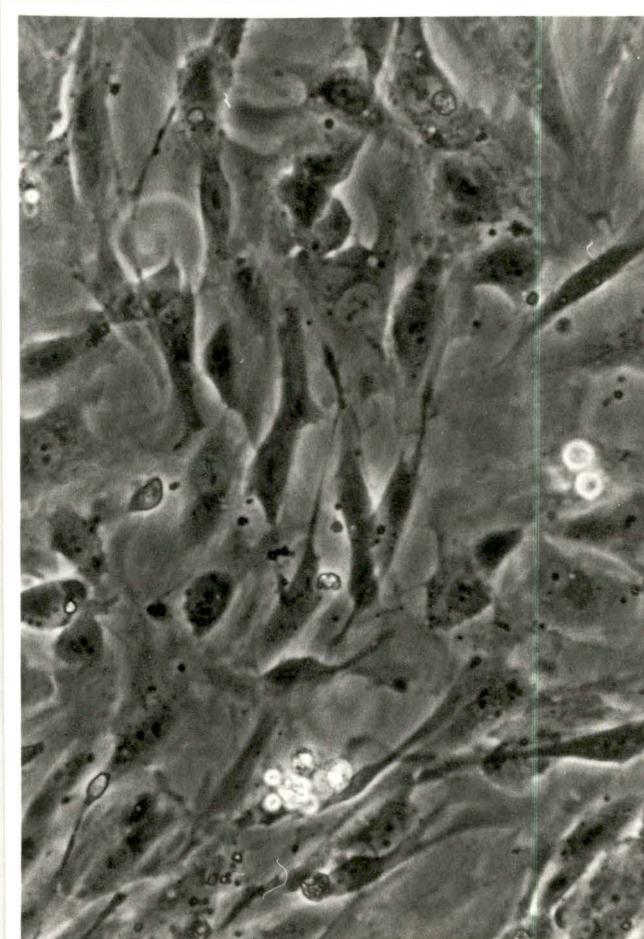


Photo 4'

Planche 1 : évolution des CE en culture. Fort grossissement (558 x).

nécessaire de conserver ces cordons à 37° C pour empêcher la vasoconstriction (Fryer *et al.*, 1966). Une pression suffisante du liquide de perfusion permet d'ôter la plupart des cellules sanguines et empêche ainsi leur présence dans la culture.

Les CE qui poussent en culture dans un milieu contenant des érythrocytes peuvent acquérir certaines caractéristiques morphologiques que nous avons remarquées dans les premières mises en culture; c'est pour cette raison que nous avons changé le milieu de culture dès que les CE étaient attachées à leur substrat. Il semble que ces caractéristiques pourraient être dues à une phagocytose des globules rouges par les CE (Fryer *et al.*, 1966).

Des cordons ombilicaux conservés depuis trop longtemps (plus de quatre jours) libèrent des cellules mais elles poussent moins vite ou ne poussent pas du tout, bien qu'elles soient encore capables de se fixer sur leur substrat gélatineux. On y observe souvent l'apparition de points sombres. Cette diminution de capacité de mitose peut s'expliquer par une altération de l'ADN due à une hypoxie (la concentration en oxygène diminue) ou à une anoxie (l'oxygène n'est plus fourni), l'ATP étant plus difficilement régénéré, des enzymes de réparation de l'ADN dépendantes de certaines molécules riches en énergie seront moins efficaces et moins synthétisées. Cette hypoxie s'explique par la conservation du cordon ombilical dans un récipient hermétique et par la formation possible de caillots sanguins dans la veine, empêchant ainsi l'arrivée de milieu de conservation tamponné, oxygéné et riche en glucose. En plus de cette altération possible des brins codants, après le transfert des cellules dans un milieu de culture riche, une altération de la membrane par un gonflement de la cellule suite à une diminution d'activité des pompes ioniques dépendantes de l'ATP peut gêner la division cellulaire. Le transfert des cellules endéans les 48 heures au maximum d'un milieu de conservation pauvre en substances nutritives (et éventuellement hormonales) vers un milieu riche contenant 20 % de sérum de veau foetal permet donc leur survie. Des cultures en présence de sérum humain n'ont pas été réalisées.

La taille des cellules, bien qu'étant identique pour les cellules provenant d'un même cordon ombilical, varie pour les cellules provenant de veines ombilicales différentes; nous avons observé des variations importantes.

## 2) Subcultures.

La trypsine 0,25 % est efficace pour détacher les CE de leur substrat. Le temps nécessaire à leur détachement est de l'ordre de 25 minutes mais peut varier de 20 à 90 minutes. Moins les cellules sont confluentes, plus ce temps sera long. L'âge de la culture est aussi déterminant car les cellules s'attachent de plus en plus à leur substrat au fur et à mesure qu'elles vieillissent .

La forme des cellules obtenues en subculture était en général identique à celle des cellules de la culture primaire; on a toutefois observé des cas isolés où les cellules avaient perdu leur forme caractéristique, ces cas correspondaient à des temps de contact trop longs avec la trypsine.

## 3) Marquage par immunofluorescence de la protéine F VIII : R ag du facteur VIII de la coagulation.

Ce marquage a été réalisé sur des cellules en subculture à dilution importante, de manière à être dans des conditions comparables aux conditions requises pour les expériences de micro-injection.

La planche 2 montre les résultats de ce marquage (grossissement 1250 x). Les témoins étaient négatifs .

La morphologie des cellules marquées (photo I, II et III) est bien celle des CE, les points les plus intensément marqués signalent la présence de protéines F VIII : R ag très proches les unes des autres. En effet, celles-ci sont stockées dans les organites marqueurs des CE : les corps de Weibel-Palade (Jaffe, 1973).

## 4) Dosage des enzymes antioxydants et du glutathion dans les CE; comparaison avec les fibroblastes.

(A) Des fibroblastes WI-38 provenant de l'"American Type Culture Collection" sont mis en culture selon la méthode décrite par Hayflick (1965), ils sont raclés juste quand ils

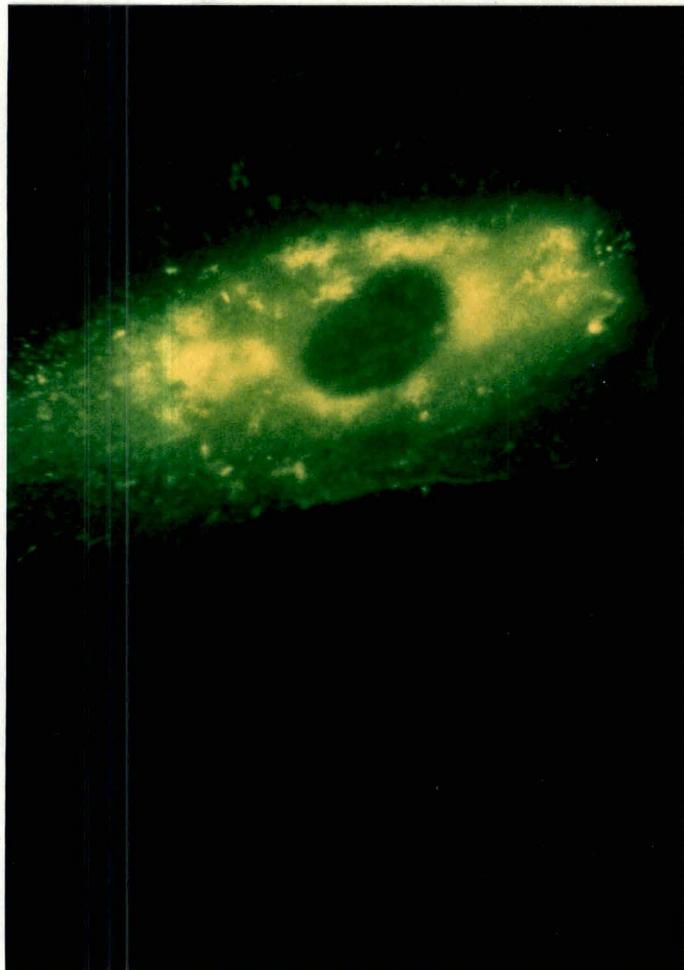


Photo I

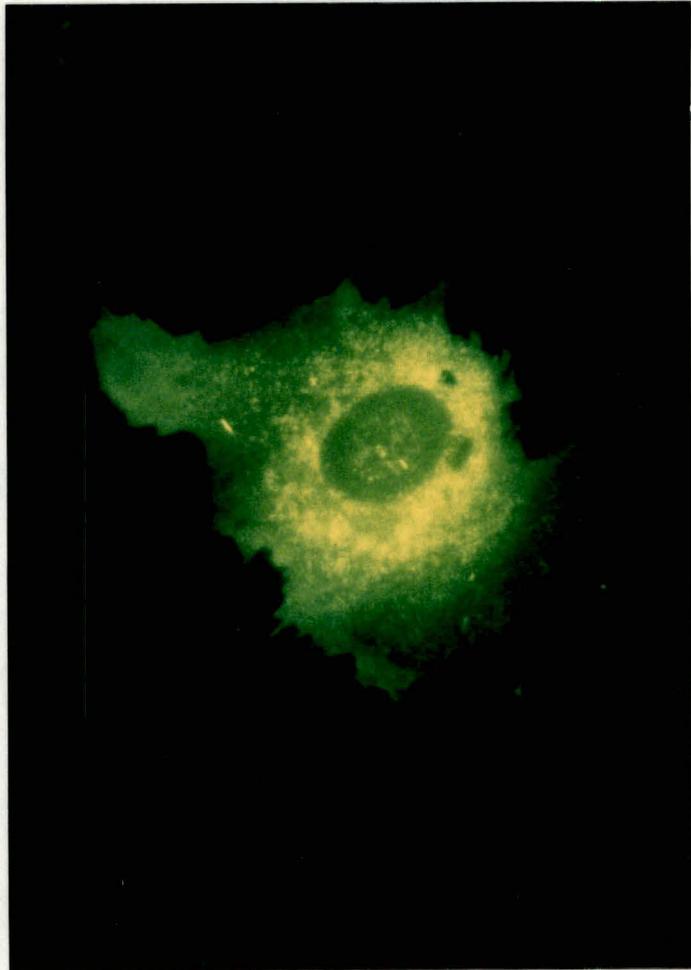


Photo II

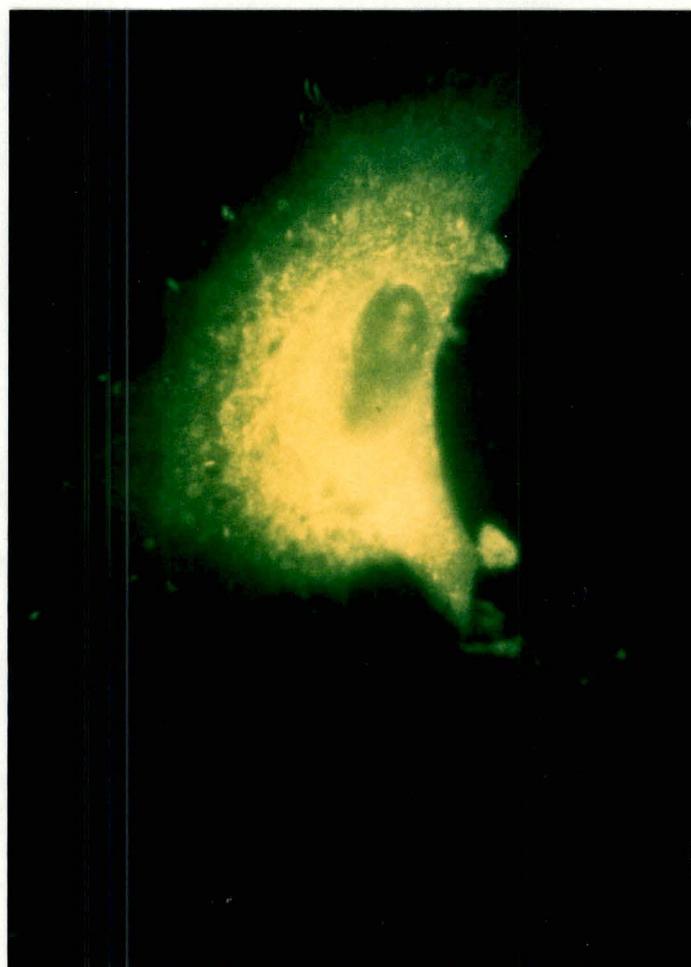


Photo III

Planche 2 : Marquage de la protéine F VIII

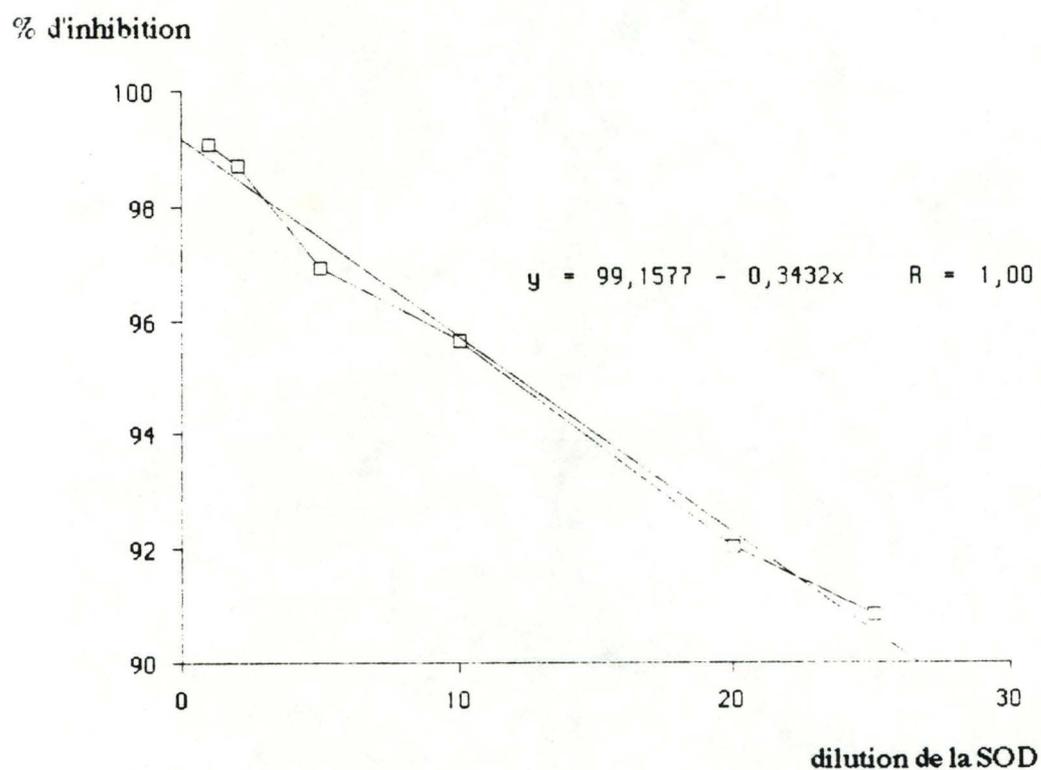
R : ag du facteur VIII de la coagulation.

Les photos I et II montrent un marquage net  
des corps de Weibel-Palade.

La photo III montre un marquage plus  
diffus.

arrivent à confluence, homogénéisés et conservés dans du PBS à 4° C pendant la durée des dosages. Des CE à confluence et en première subculture sont traitées de la même manière.

1) Courbe d'étalonnage pour le dosage de la SOD en chémoluminescence (graphe 1).



Grphe 1 : % d'inhibition de la chémoluminescence en fonction de la dilution d'une solution de SOD 24 U Sigma / ml

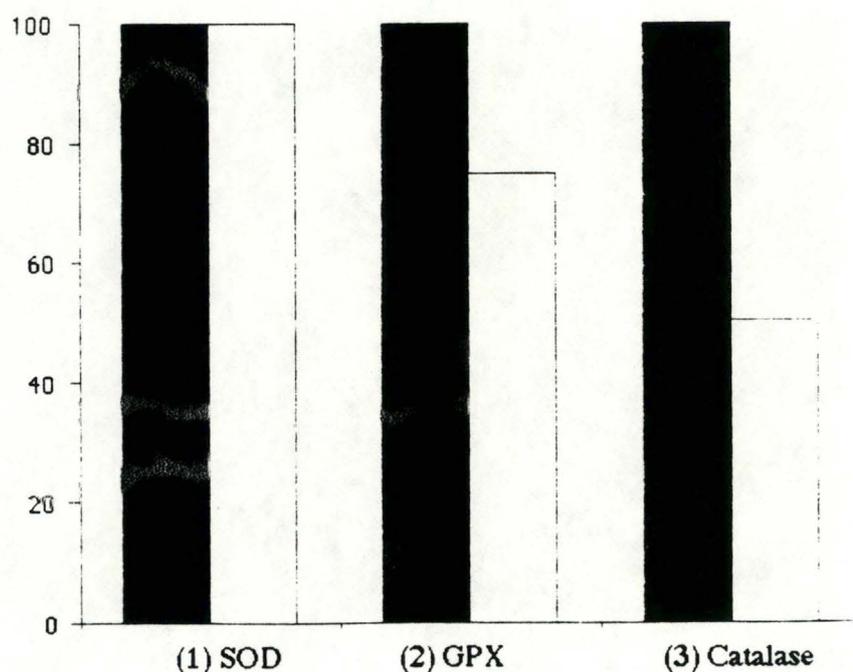
Dans ces mêmes conditions, la valeur moyenne obtenue pour le dosage de la SOD dans un homogénat de fibroblastes était  $0,05245 \pm 0,0022$  % d'inhibition par  $\mu\text{g}$  de protéines et dans les CE  $0,0549 \pm 0,05011$  % d'inhibition par  $\mu\text{g}$  de protéines.

2) Résultats des dosages de la SOD, de la GPX et de la catalase.

Enzyme	Fibroblastes (fib)	CE	Rapport fib/CE
	(U/ $\mu$ g de protéines)	(U/ $\mu$ g de protéines)	
SOD	0,2886 $\pm$ 0,0024	0,2887 $\pm$ 0,0019	100 %
GPX	0,0200 $\pm$ 0,0000	0,01535 $\pm$ 0,0000	76,7 %
Catalase	0,0040 $\pm$ 0,0003	0,0019 $\pm$ 0,0002	47,5 %
	(n = 3)	(n = 3)	

L'activité enzymatique de la SOD est identique pour les fibroblastes et les CE (1). L'activité de la GPX des CE est légèrement inférieure à celle des fibroblastes (76,7 %) (2). Quant à l'activité de la catalase des CE, elle est plus faible et ne représente que 48 % de celle des fibroblastes (3) (graphe 2).

% d'activité des CE / activité des fibroblastes (100 %)



**Grphe 2 :** représentation comparative des activités enzymatiques de la SOD, de la GPX et de la catalase dans les CE et dans les fibroblastes.

(en noir, activité dans les fibroblastes et en blanc, activité dans les CE)

(B) Dosage du GSH et du GSSG.

<u>Type de cellules</u>	<u>GSH</u>	<u>GSSG</u>	<u>GSH / GSSG</u>
	<u>µg GSH / µg de protéines</u>	<u>µg GSSG / µg de protéine</u>	<u>µmole/µmole</u>
Fibroblastes.	24,12 ± 0,00	8,12 ± 0,00	4,80
CE	48,84 ± 0,54	9,93 ± 0,00	9,83
	(n = 2)	(n = 2)	

On observe que les quantités de GSSG par µg de protéines de l'homogénat sont assez proches pour les fibroblastes et les CE. Par contre, les CE possèdent 2 fois plus de GSH par µg de protéines de l'homogénat que les fibroblastes n'en contiennent, ce qui fait que le rapport micromolaire de la quantité de GSH sur la quantité de GSSG est deux fois plus grand pour les CE que pour les fibroblastes.

Dans les CE, la GPX a 2,5 fois plus de substrat à sa disposition que dans les fibroblastes, ce qui pourrait éventuellement l'aider à rattraper le déficit de son activité qui, rappelons-le, égale 75 % de la concentration qu'elle a dans les fibroblastes.

L'activité de la glutathion réductase est aussi plus faible dans les CE que dans les fibroblastes (Michiels *et al.*, 1988); pourtant, la quantité de GSSG présente dans les CE est proche de celle trouvée pour les fibroblastes. Plusieurs explications sont possibles pour expliquer ces observations : d'une part, il est certain que la quantité de GSSG ne dépend sans doute pas uniquement de la quantité de réductase présente, mais résulte d'un équilibre entre sa formation et sa réduction. D'autre part, une partie du GSSG peut être éliminée dans le milieu de culture. Enfin, il faut savoir que le dosage du GSSG utilisé surestime la quantité de GSSG, il mesure aussi les ponts disulfures mixtes entre protéines et glutathion.

## 5) Les CE et l'hyperoxie.

### 5.1. Dosage de la malonaldéhyde (MDA) dans le milieu de culture M199 + S.

Avant de rechercher des moyens de protection des CE face à l'hyperoxie, il fallait s'assurer que cette hyperoxie avait un effet direct sur les cellules et non par le biais du milieu de culture qui pourrait être oxydé dans ces conditions.

Les arguments de Brosemer et Rutter (1961) faisaient déjà penser que le milieu de culture n'est pas plus oxydé en hyperoxie qu'en atmosphère normale; en résumé, ces arguments étaient les suivants :

Si on préincube du milieu de culture sous hyperoxie pendant plusieurs jours, lorsqu'il est remis en atmosphère normale et qu'on y met des cellules en culture, cette préincubation ne cause pas une baisse des taux de croissance des cellules.

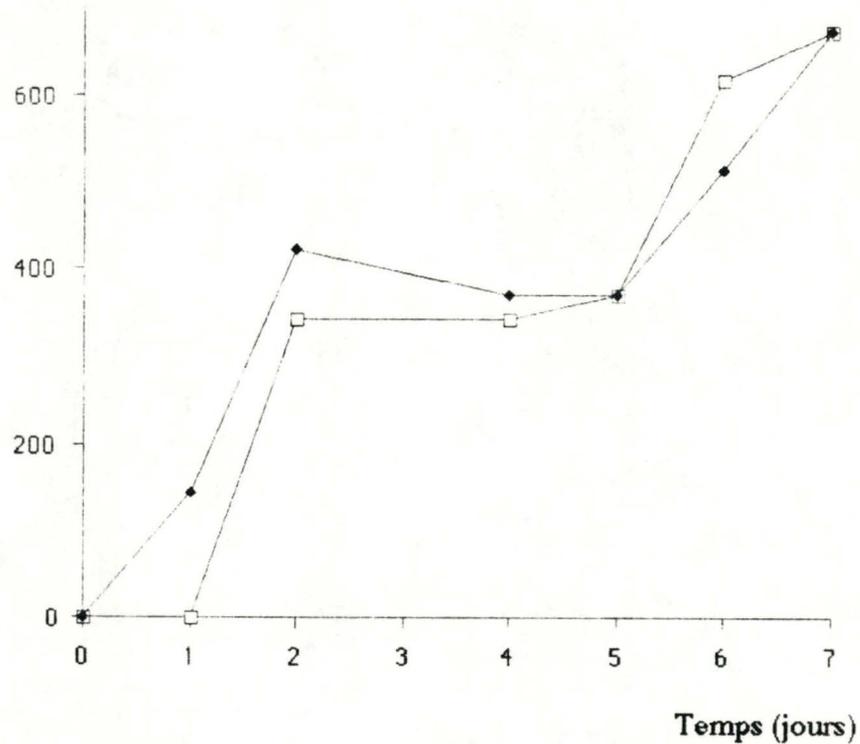
Le changement de milieu des cellules sous hyperoxie n'entraîne pas la reprise des mitoses, sachant que ces dernières sont interrompues sous hyperoxie prolongée; il a été montré indirectement que la synthèse d'ADN diminue sous hyperoxie en se basant sur l'observation que l'incorporation de phosphate inorganique radioactif dans l'ADN et l'ARN diminue sous hyperoxie.

L'ajout d'antioxydants dans le milieu ne supprime jamais les effets de l'hyperoxie sur les cellules, même s'il les diminue, suggérant ainsi que ce n'est pas une oxydation du milieu qui entraîne des dommages aux cellules.

Notre milieu de culture contenant 20 % de sérum de veau foetal, il était pensable que la faible quantité d'acides gras des phospholipides qu'il contient puissent être peroxydée sous hyperoxie et que les radicaux peroxylys formés puissent avoir un effet sur les membranes des cellules. La formation de MDA étant un bon indice de peroxydation lipidique, nous avons dosé cette molécule dans du milieu de culture incubé sous hyperoxie pendant des temps variant entre 0 et 7 jours.

Le graphe 3 montre l'évolution de la concentration en MDA, en nanomoles de MDA par ml de milieu.

MDA en nmoles / ml de milieu M 199 + S



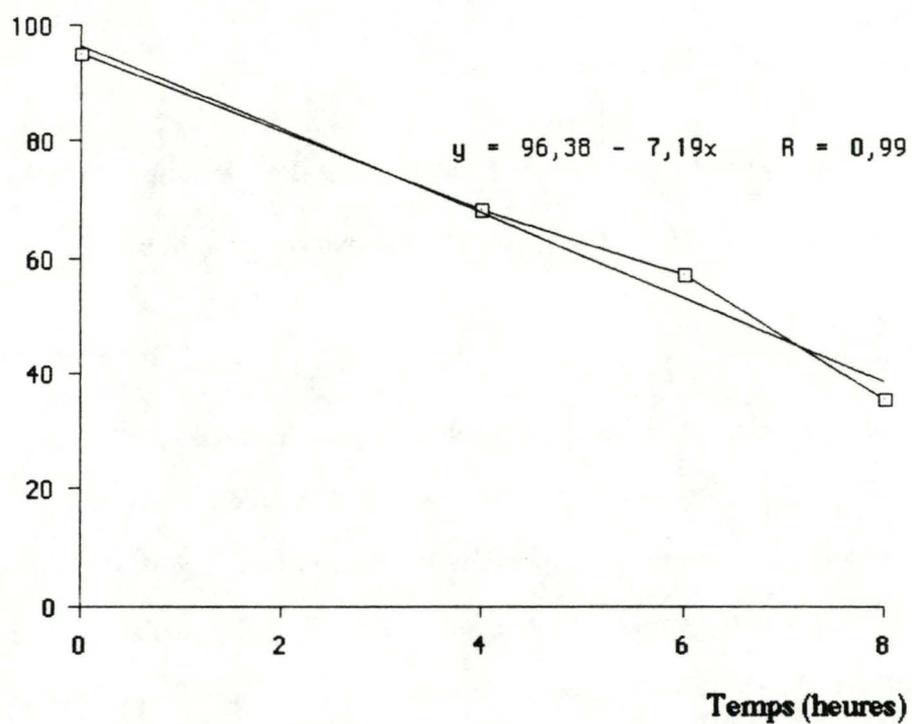
Graphe 3 : évolution de la quantité de MDA par ml de milieu de culture M 199 + S

(carrés pleins : milieu sous hyperoxie et carrés vides : milieu en atmosphère normale)

Même s'il existe des différences statistiquement significatives entre les concentrations en MDA selon les différents temps d'incubation du milieu, sous hyperoxie et en atmosphère normale, on observe que la peroxydation lipidique évolue de la même façon dans les deux types d'atmosphère. La température de 37 °C à laquelle ont été incubés les milieux suffit-elle pour augmenter la vitesse des réactions de peroxydation car la MDA n'est pas décelée dans le milieu conservé à 4° C ou congelé.

Ce résultat est un argument de plus qui permet d'avancer que l'hyperoxie a un effet direct sur les cellules en culture par l'augmentation de la concentration en oxygène et non par l'intermédiaire de certaines molécules qui seraient particulièrement oxydées dans le milieu de culture.

% de cellules marquées



**Grphe 4 : évolution de la proportion de cellules marquées par la thymidine tritiée en 24 h après des temps variables sous hyperoxie**

## 5.2 Autoradiographie.

Nous savons déjà qu'une inhibition des divisions cellulaires a lieu lorsque des cellules de mammifère subissent une hyperoxie dans une atmosphère contenant 95 % d'oxygène (Brosemer et Rutter, 1961).

Pour avoir une idée de l'impact de l'hyperoxie sur la synthèse de l'ADN, nous avons incubé des CE avec de la thymidine tritiée pendant 24 heures dans une atmosphère normale après leur avoir fait subir une hyperoxie, d'une durée variant entre 0 et 12 heures.

Nous avons alors déterminé la proportion des cellules marquées dans un lot de 500 cellules prises au hasard dans une boîte d'autoradiographie pour chaque temps d'incubation sous hyperoxie; les résultats obtenus sont les suivants:

Temps (heures)	Cellules marquées (%)	Cellules non marquées (%)
0	95,2	4,8
4	68,1	31,9
6	57,0	43,0
8	35,8	64,2

Ce qui donne le graphe 4.

### 5.3. Evolution morphologique des CE sous hyperoxie.

La planche 3 montre l'évolution des CE au cours du temps : des CE ont subi une hyperoxie d'un nombre de jours qui varie entre 0 et 5 jours, elles sont fixées à la formaldéhyde 3 % / PBS et photographiées en microscopie de phase au grossissement 144x et 558 x.

5.3.1. L'augmentation de taille (gonflement mais sans augmentation de la quantité de matériel cellulaire, comme en témoignent les dosages de protéines d'homogénat) des cellules de mammifère en culture sous hyperoxie est connue depuis longtemps (Brosemer et Rutter, 1961) et les CE n'échappent pas à cette règle, elles connaissent aussi, après 24 à 48 heures d'hyperoxie, une augmentation de leurs dimensions. Rubin *et al.* (1983) ont observé que le relargage de lactate déshydrogénase, signe d'une altération membranaire, n'avait aussi lieu qu'après 24 à 48 heures d'hyperoxie.

L'altération des membranes par hyperoxie n'est donc pas étrangère à ce gonflement du volume cellulaire : la peroxydation lipidique et toutes ses conséquences, décrites dans l'introduction de ce mémoire, peuvent endommager les pompes ioniques membranaires et porter ainsi atteinte au bon déroulement des échanges ioniques conduisant à l'entrée d'ions suivis par un certain volume d'eau. Une rigidification des membranes (Molenaar *et al.*, 1980) par des liaisons entre des lipides ou des protéines peuvent aussi modifier la perméabilité des membranes biologiques.

5.3.2. Le rapport nucléocytoplasmique (taille du noyau / taille du cytoplasme) diminue suite à l'augmentation du volume du cytoplasme.

5.3.3. On remarque, au cours du temps, que les membranes s'abîment de plus en plus et que le noyau finit par être altéré aussi : il devient pycnotique. Les cellules finissent ensuite par mourir.

Planche 3 : evolution morphologique des CE sous hyperoxie.

A faible grossissement (144 x).

Sur la photo a, on observe des cellules de première subculture, à forte dilution et sous atmosphère normale.

Photo b : après un jour d'hyperoxie, les CE ne montrent pas de variation morphologique, si ce n'est parfois une faible augmentation de taille.

Photo c : après deux jours d'hyperoxie, les CE connaissent une forte augmentation de leur taille.

Photo d : l'altération des membranes devient visible après quatre jours d'hyperoxie (voir l'aspect de la cellule, en bas, à gauche), ces variations entraînent une diminution de la taille des cellules.

Photo e : la taille des cellules est devenue plus faible. Les membranes sont très altérées et la cellule se détache de son substrat; la présence d'un halot clair autour de la cellule en témoigne. Le noyau est devenu très sombre et sa taille a diminué. (5 jours d'hyperoxie).

A fort grossissement (558 x).

Photo a' : CE sous atmosphère normale, à forte dilution, en première subculture.

Photo b' : après un jour d'hyperoxie, la taille des cellules n'a pas changé.

Photo c' : après deux jours d'hyperoxie, les cellules sont devenues très grandes et le rapport nucléocytoplasmique (noyau / cytoplasme) est faible.

Photo d' : au jour quatre, les membranes sont altérées (voir l'aspect de la cellule, en bas, à gauche) et commencent à se détacher de leur substrat gélatineux.

Photo e' : la taille de la cellule décroît. Le noyau est pycnotique. La cellule disparaîtra le lendemain, au 6<sup>ème</sup> jour.



Photo a



Photo b



Photo c



Photo d



Photo e

Planche 3 : évolution morphologique des CE sous hyperoxie. Faible grossissement (144 x).



Photo a'



Photo b'



Photo c'

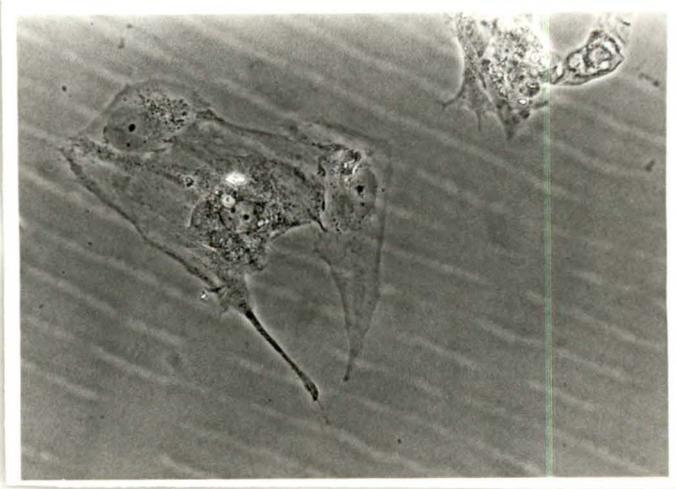


Photo d'



Photo e'

Planche 3 : évolution morphologique des CE sous hyperoxie. Fort grossissement (558 x).

Les CE sont plus sensibles à l'hyperoxie que les fibroblastes (Housset et Junod, 1982); la comparaison de l'évolution morphologique vers la dégénérescence totale observé par Michiels pour des fibroblastes (1984-1985) montre que ces derniers sont moins rapidement altérés. En effet, dans les mêmes conditions, la dégénérescence des CE s'observe après 6 jours alors que celle des fibroblastes ne survient qu'après 9 jours.

#### 5.4 Evolution du contenu en GSH et en GSSG pendant deux jours d'hyperoxie.

Des CE à confluence sont soumises à 1 et 2 jours d'hyperoxie et sont raclées dans de l'acide métaphosphorique. Les cellules d'une boîte de culture témoin ne subissent pas d'hyperoxie. Les résultats du dosage sont comparés à ceux obtenu pour des fibroblastes à confluence qui ont poussé sous atmosphère normale.

Cellules	$\mu\text{g GSH} /$ $\mu\text{g de protéines}$	$\mu\text{g GSSG} /$ $\mu\text{g de protéines}$	$\Sigma (\text{GSSG} + \text{GSH}) /$ $\mu\text{g de protéines}$	$\text{GSH} /$ $\text{GSSG}$  ( $\mu\text{m}$ )
fibroblastes	24,12 ± 0,00	8,12 ± 0,00	32,24 ± 0,00	4,80
CE 0 jour O <sub>2</sub>	48,84 ± 0,54	9,93 ± 0,00	56,77 ± 0,54	9,45
1 jour O <sub>2</sub>	26,48 ± 0,00	6,71 ± 0,00	33,19 ± 0,00	7,88
2 jours O <sub>2</sub>	24,84 ± 0,00	5,90 ± 0,00	30,74 ± 0,00	8,42
	(n = 2)	(n = 2)		

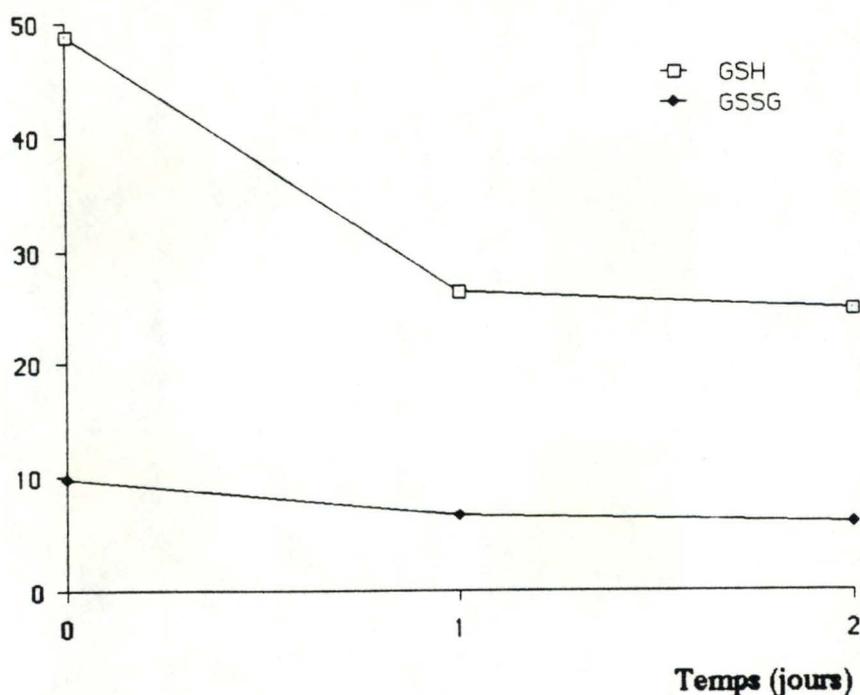
Contrairement aux cellules de l'artère pulmonaire bovine (Deneke *et al.*, 1987), on observe une baisse brutale du GSH pendant les premières 24 heures d'hyperoxie; après 24 heures, la diminution de GSH s'atténue.

De plus, la quantité de GSSG diminue aussi de manière significative au cours de l'incubation. L'évolution décroissante de la quantité totale de glutathion permet néanmoins de conserver un rapport plus ou moins constant entre les quantités molaires de GSH et de GSSG.

La comparaison des quantités de glutathion oxydé et réduit entre les fibroblastes et les CE (voir plus haut), en atmosphère normale, faisait déjà penser que les CE maintiennent plus de GSH à l'état réduit que les fibroblastes. L'évolution du rapport GSH / GSSG et la quantité totale décroissante du glutathion suggèrent que la CE, pourrait utiliser d'autres moyens que la réduction pour éliminer le GSSG formé. La CE se défendrait autant grâce à sa concentration naturellement haute de GSH que grâce à ses enzymes GPX et glutathion réductase. L'augmentation, par microinjection, de la concentration en GPX pourrait donc avoir un effet protecteur sur la CE face à l'hyperoxie.

Le graphe 5 reprend les résultats des dosages de GSH et GSSG

$\mu\text{g}$  de GSH et de GSSG /  $\mu\text{g}$  de protéines



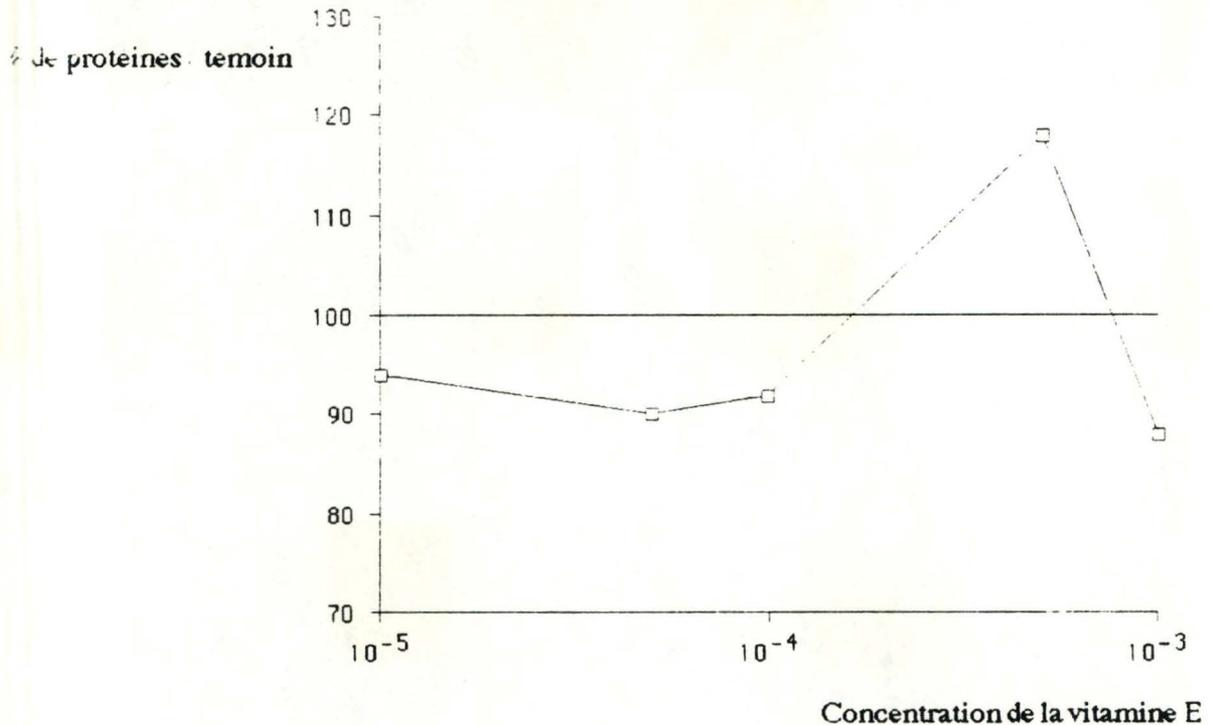
Graph 5 : évolution du GSH et du GSSG dans les CE avec le nombre de jours sous hyperoxie

Des auteurs tels que Deneke *et al.* (1987) ont montré que les activités enzymatiques de la SOD et de la GPX augmentent lorsque des CE bovines sont placées sous hyperoxie. Une telle augmentation d'activité dans les CE humaines serait un facteur de protection supplémentaire.

6) Etude de l'effet de la vitamine E et de la vitamine C sur les CE sous hyperoxie.

a) La vitamine E.

Dans une boîte multicompartimentée, les CE sont incubées avec différentes concentrations de vitamine E. Le résultat des dosages des protéines cellulaires effectués après trois jours d'hyperoxie donne la courbe suivante (graphe 6):



Grappe 6 : effet de la vitamine E sur la quantité de protéines cellulaires, après 3 jours d'hyperoxie. 100 % = quantité de protéines du témoin

En hyperoxie, on observe une protection par la vitamine E pour une concentration de  $5 \times 10^{-4}$  M. On n'observe aucune toxicité pour la vitamine E, même aux plus hautes concentrations.

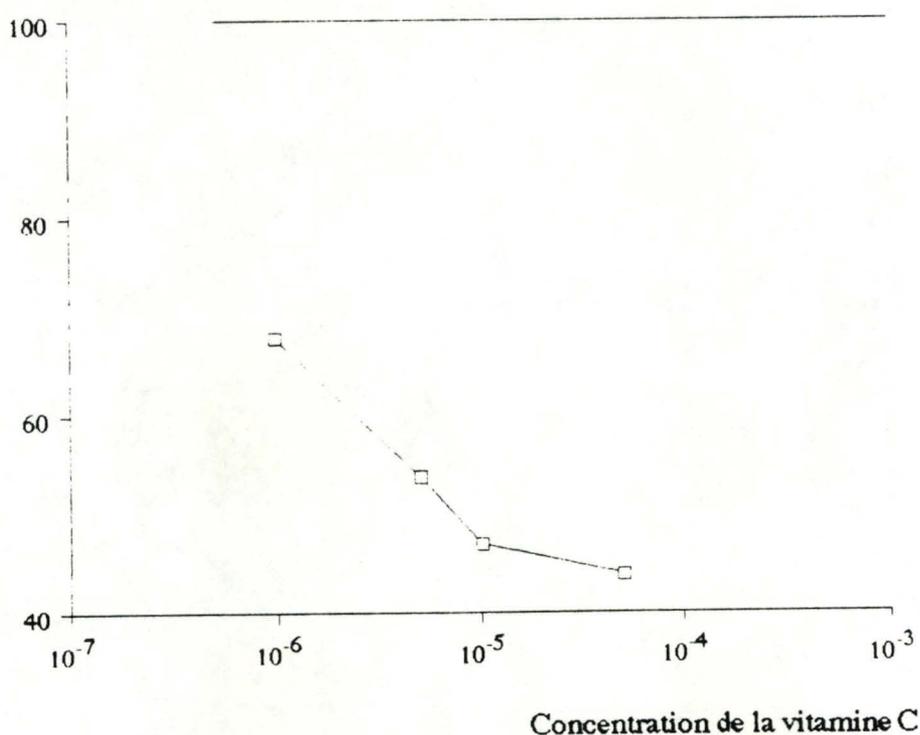
Les molécules de vitamine E, une fois déposées dans le milieu de culture, peuvent soit se rapprocher des parois de plastique de la boîte par le jeu des forces hydrophobes, soit former des micelles si la concentration en vitamine E est suffisamment importante, avec leur cycle chromanol vers l'extérieur, soit être captées par les lipoprotéines du sérum du milieu. Si la concentration en vitamine E est trop importante, cette dernière reste en surface, constituant une phase lipidique.

La présence de vitamine E dans les CE se fait soit par captation des micelles et des lipoprotéines, soit par un équilibre de la vitamine E entre les divers compartiments hydrophobes présents c'est-dire aussi avec les membranes cellulaires.

#### b) La vitamine C.

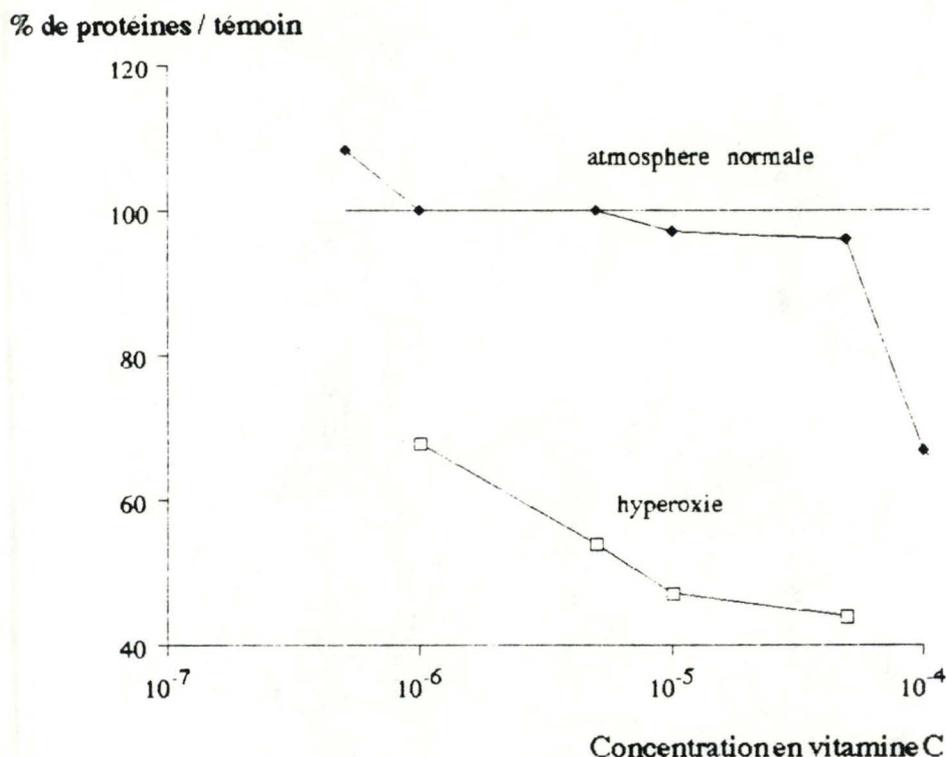
Les résultats des dosages des protéines cellulaires après trois jours d'hyperoxie en présence de différentes concentrations de la vitamine C donnent les graphiques suivants (graphes 7 et 8):

% de protéines / témoin



Graph 7: Effet de la vitamine C sur la quantité de protéines cellulaires, après trois jours sous

hyperoxie. 100% = quantité de protéines du témoin



**Graph 8 :** comparaison de l'effet de la vitamine C sur la quantité de protéines cellulaires, après trois jours sous hyperoxie (□) ou sous atmosphère normale (♦).

100 % = quantité de protéines du témoin

La vitamine C est toxique en hyperoxie dès une concentration micromolaire; elle n'apporte aucun rôle protecteur. En atmosphère normale, elle devient toxique à partir d'une concentration  $10^{-4}$  M.

Hydrophile, l'acide ascorbique se dilue dans le milieu de culture et ne pénètre pas dans les membranes des cellules. Il ne peut entrer dans la cellule que par des mécanismes actifs. La vitamine C aurait aussi pu être protectrice par la réduction de la vitamine E oxydée présente naturellement dans la membrane plasmique; si cette protection existe, elle est effacée par la toxicité de la vitamine qui pourrait être due à l'autoxydation de la vitamine C comme expliqué dans l'introduction. Dans ce modèle d'hyperoxie, la vitamine C semble donc agir plutôt en tant que pro-oxydant.

Les ions du cuivre présents dans le milieu ne sont sans doute pas étrangers à cette l'oxydation de la vitamine C, car ce sont des catalyseurs de cette réaction (Lovstad, 1987). Des expériences en présence de chélateurs des ions du cuivre, tels que la céruloplasmine ou la méthionine, pourraient être envisagées.

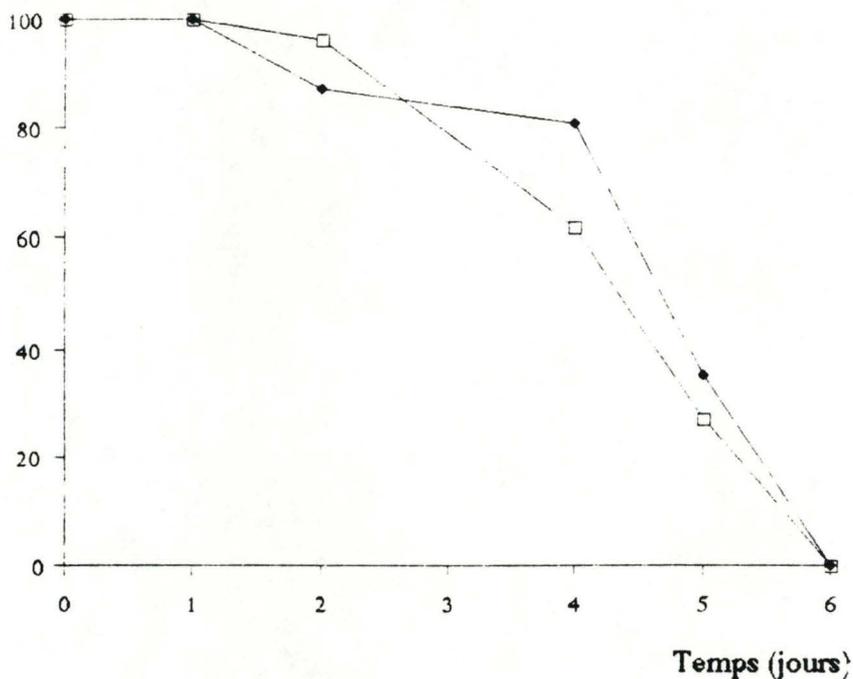
7) Etude de l'effet de la micro-injection d'enzymes antioxydants sur la survie des CE soumise à une hyperoxie.

7.1 Effet de la micro-injection sur la survie des CE.

La mortalité des CE due à la micro-injection se situe entre 0 et 10 %; dans le cas où la mortalité due à l'injection dépasse 10 %, les résultats obtenus ne sont pas considérés.

La courbe suivante est une courbe de survie de 60 CE sous hyperoxie, dont 30 ont été injectées avec du tampon d'injection et 30 n'ont subi aucun traitement (graphe 9).

% de survie des cellules



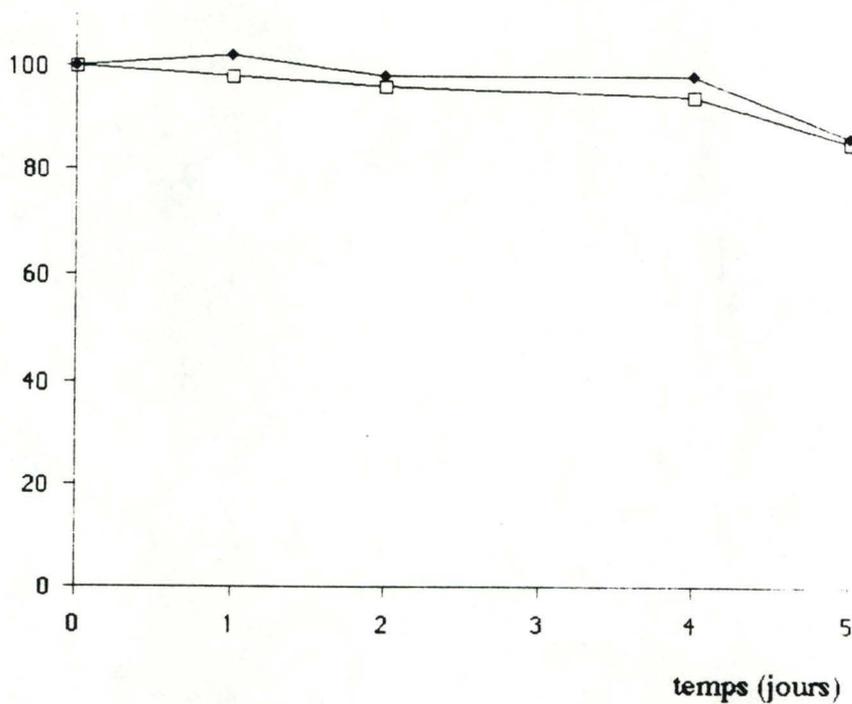
Grappe 9 : Survie des CE sous hyperoxie : cellules injectées (♦) : cellules non injectées. (□)

La mortalité, au premier jour après l'injection, est nulle pour les cellules injectées et non injectées. Les 60 cellules, à faible dilution, ne survivront pas plus de 6 jours à l'hyperoxie.

Nous avons remarqué que les CE cultivées à plus forte densité survivaient plus longtemps que les autres. Aussi, pour ne pas avoir de variabilité due à la proximité des cellules entre elles, nous n'avons injecté que les cellules qui se trouvaient en faible nombre (5-10) dans une case du quadrillage réalisé dans le fond de la boîte.

Nous avons aussi injecté des CE de seconde subculture. Celles-ci résistent aussi bien à la micro-injection que les CE de première subculture. La courbe présentée ci-dessous exprime la survie de 60 cellules en atmosphère normale dont 30 après l'injection de tampon d'injection et 30 non injectées (graphe 10).

% de survie des cellules



Graphe 10 : survie des CE en seconde subculture, en atmosphère normale

(□) : cellules injectées et (◆) : cellules non injectées

On observe que la mortalité des cellules de seconde subculture ayant subi une micro-injection est très faible. La mortalité de ces cellules sous hyperoxie est identique à celle des cellules de première subculture.

## 7.2 Micro-injection d'enzymes antioxydants.

Nous avons réalisé des micro-injections de trois enzymes purifiées : la catalase de foie de boeuf (E C. 1.11.1.6), la GPX et la SOD d'érythrocytes bovins (respectivement EC 1.11.1.9 et EC 1.15.1.1). Les concentrations choisies étaient :

Enzymes	activités (Unite Sigma / ml)
SOD	240 000
	120 000
	60 000
GPX	180
	90
Catalase	5400
	2700
	1350

Les dilutions étaient réalisées à partir de solutions "stock" congelées à -70 °C et conservées à 0 °C pendant des injections.

L'injection des plus hautes concentrations en enzymes SOD, GPX et catalase revient à augmenter le contenu cellulaire respectivement de 4,3; 1 / 250 et 1 / 500 fois si on se base sur le volume d'injection de  $10^{-10}$  ml par cellule, calculé par Graessmann (1980).

Pour bien montrer que, lors d'expériences de micro-injection où l'on met les cellules sous hyperoxie, les protections observées sont bien dues aux enzymes injectés et non à l'introduction de protéines dans le cytoplasme, Raes *et al* (1987) ont effectué

des micro-injections avec des enzymes dénaturés dans des fibroblastes mis ensuite sous hyperoxie : les enzymes dénaturés n'offraient aucune protection.

a) Résultats obtenus pour la micro-injection de catalase (CAT).

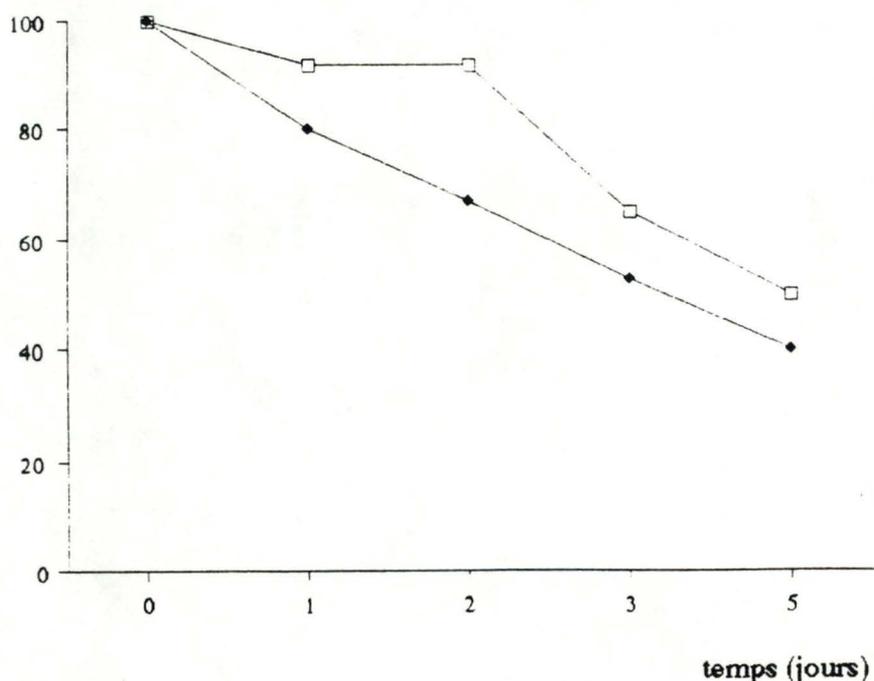
Les résultats sont donnés en pourcentage de protection. Rappelons que le pourcentage de protection est le rapport entre les surfaces d'intégration sur trois jours de la courbe de survie des cellules injectées avec des enzymes et de la courbe de survie des cellules injectées avec du tampon .

Les pourcentages de protection obtenus pour l'injection de catalase sont les suivants

concentration de l'enzyme (Unité Sigma / ml)	% de protection	Signification des résultats (n = 5)
5400	142,75 ± 16,52	S(P>0,995)
2700	118,00 ± 14,00	S(P>0,95)
1350	96,00 ± 2,00	S(P>0,975)

Les graphes 11, 12, 13, 14 et 15 montrent les données expérimentales :

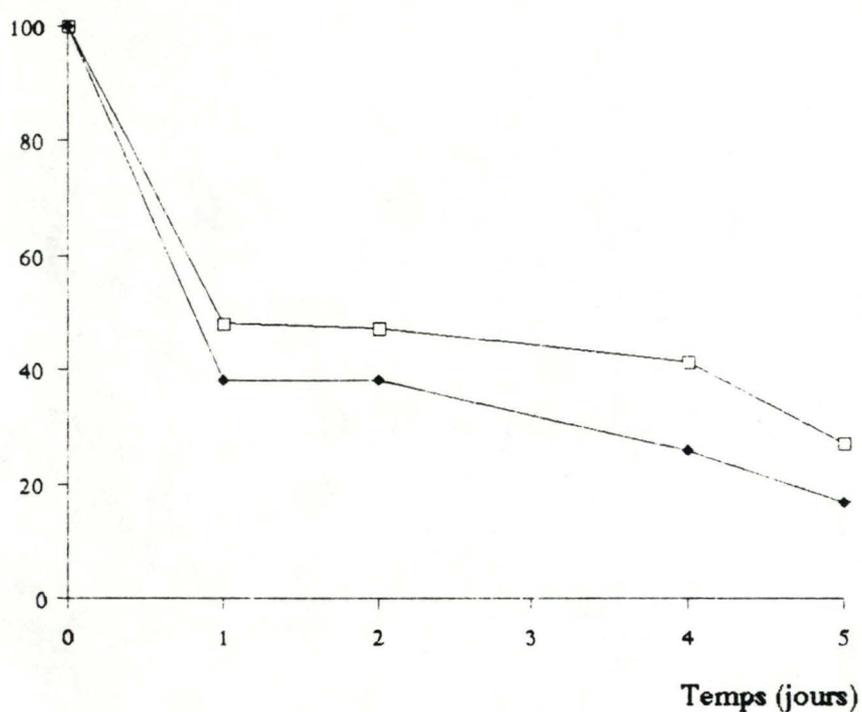
% de survie des cellules



Graph 11 : courbes de survie des CE injectées avec de la solution de catalase à 5400 U/ ml

(□) et les cellules injectées avec du tampon d'injection (◆).

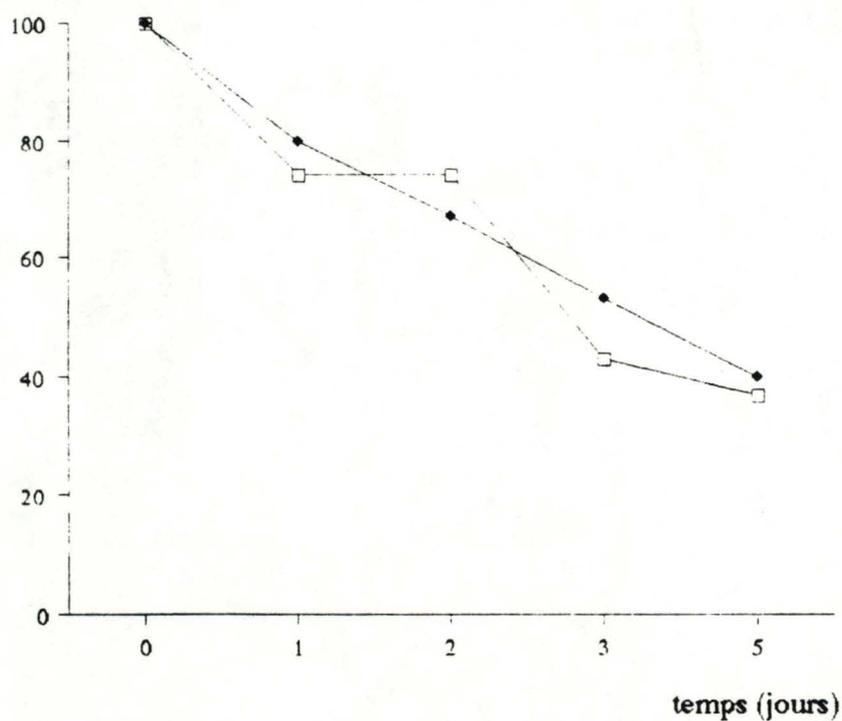
% de survie des cellules



Graph 12 : courbes de survie des CE injectées avec de la solution de catalase à 2700 U/ml

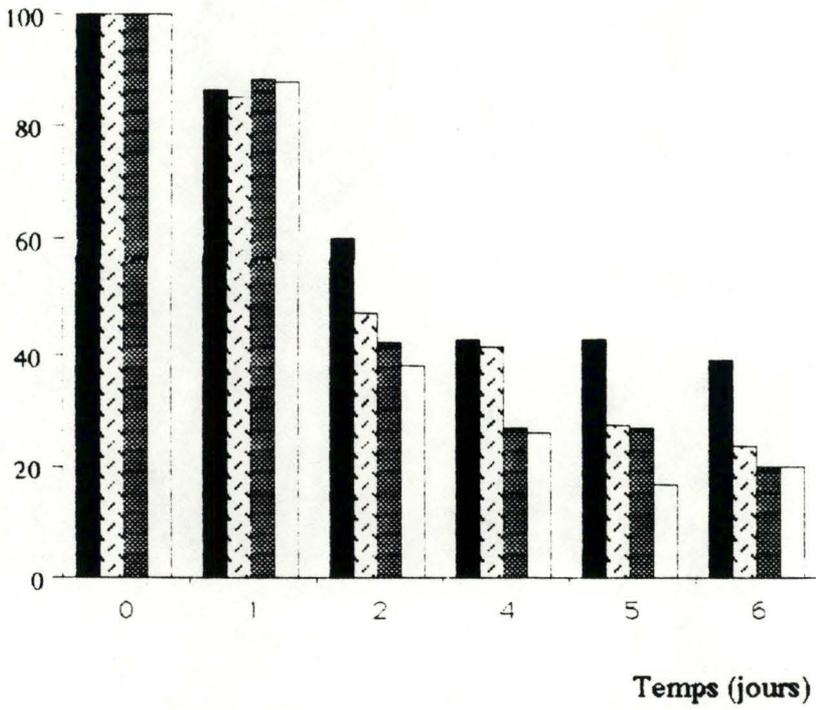
(□) et des cellules injectées avec du tampon d'injection (◆).

% de survie des cellules



Graph 13 : courbes de survie des CE injectées avec la solution de catalase à 1350 U/ml

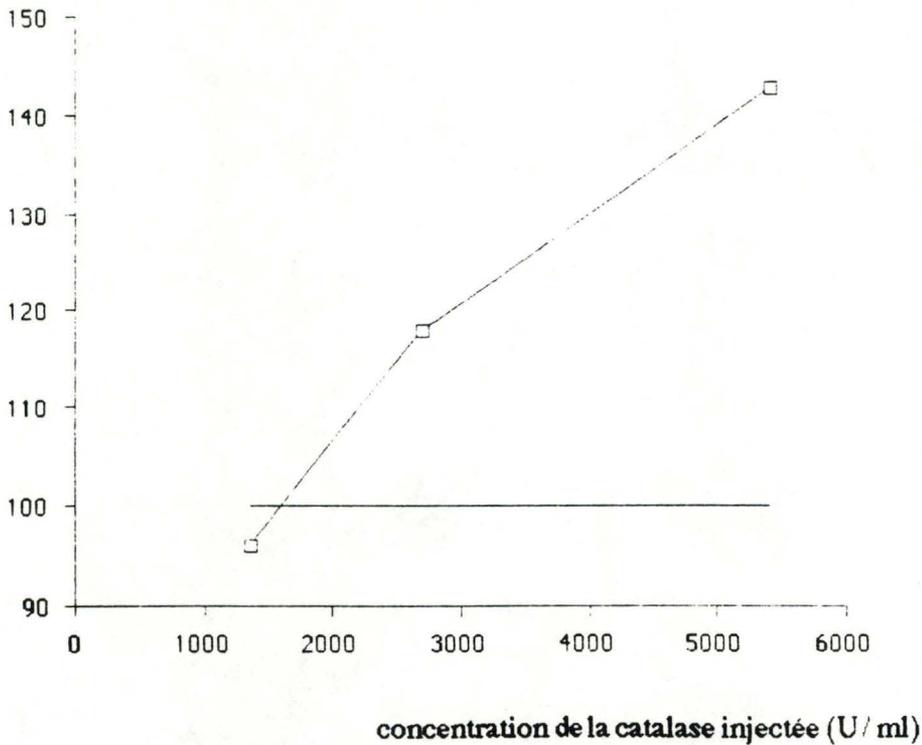
(□) et injectées avec du tampon d'injection (◆).



Graph 14 : survie des CE sous hyperoxie, après injection de la catalase 5400 U / ml (■).

2700 U / ml (▨) et du tampon d'injection (▩) et des CE non injectées (□).

% de protection des cellules



Graph 15 : pourcentages de protection des CE en hyperoxie en fonction de la dilution de la catalase injectée (5400, 2700 et 1350 U / ml)

On observe que les courbes de survie des cellules injectées avec de la catalase à 5400 et 2700 U / ml sont bien au-dessus des courbes de survie des cellules témoins. Par contre, à 1350 U / ml, la catalase ne protège plus les cellules. On a donc une protection par la catalase qui est croissante en fonction de la concentration injectée.

La détoxification du peroxyde d'hydrogène semble donc avoir un effet notable sur la survie des cellules. La toxicité du peroxyde d'hydrogène en lui-même est probablement moindre que celle du produit de sa réduction : l'ion hydroxyle.

L'apparition d'une activité cytoplasmique supplémentaire pour la destruction du peroxyde d'hydrogène semble donc avoir un effet important. De plus, la catalase ne consomme pas de GSH, dont on a vu que la concentration diminue avec le temps sous hyperoxie.

Même si l'on observe toujours une augmentation du pourcentage de protection des cellules avec l'augmentation de la concentration en catalase injectée pour les cellules provenant de la même veine ombilicale, les valeurs absolues de protection des cellules pour une même concentration d'enzyme, pour des cellules provenant de cordons ombilicaux différents, variaient d'une culture à l'autre, d'où l'importance des écart-types calculés. Si les résultats n'avaient pas été significatifs pour des groupes de cellules provenant d'individu différents, il aurait encore été possible d'injecter plusieurs groupes de cellules provenant du même individu.

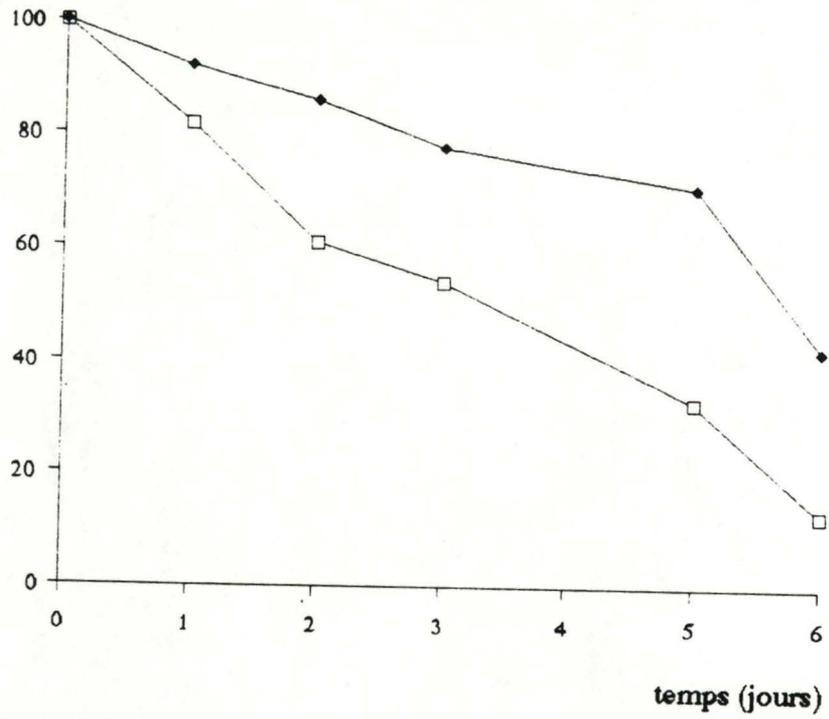
b) Resultats obtenus pour la micro-injection de la superoxyde dismutase (SOD).

Les pourcentages de protection obtenus sur 5 expériences sont les suivants :

concentration de l'enzyme (U Sigma / ml)	% de protection	Signification des résultats
240 000	86,70 ± 9,6	S (P>0,975)
120 000	93,40 ± 8,74	S (P>0,8)
60 000	86,30 ± 4,04	S (P>0,9)

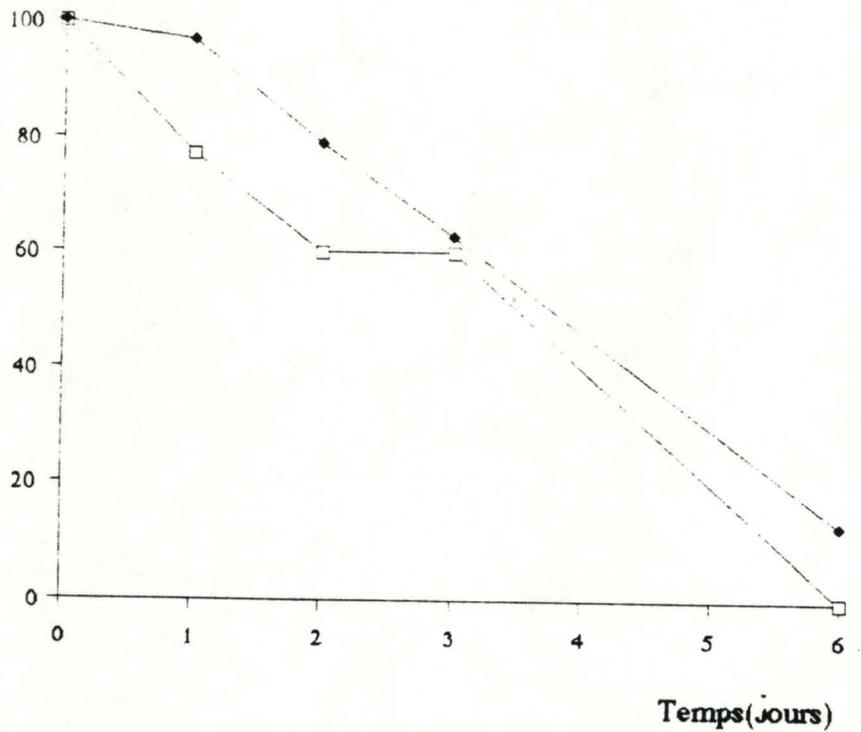
Les graphes 16, 17 et 18 donnent les valeurs expérimentales :

% de survie des cellules



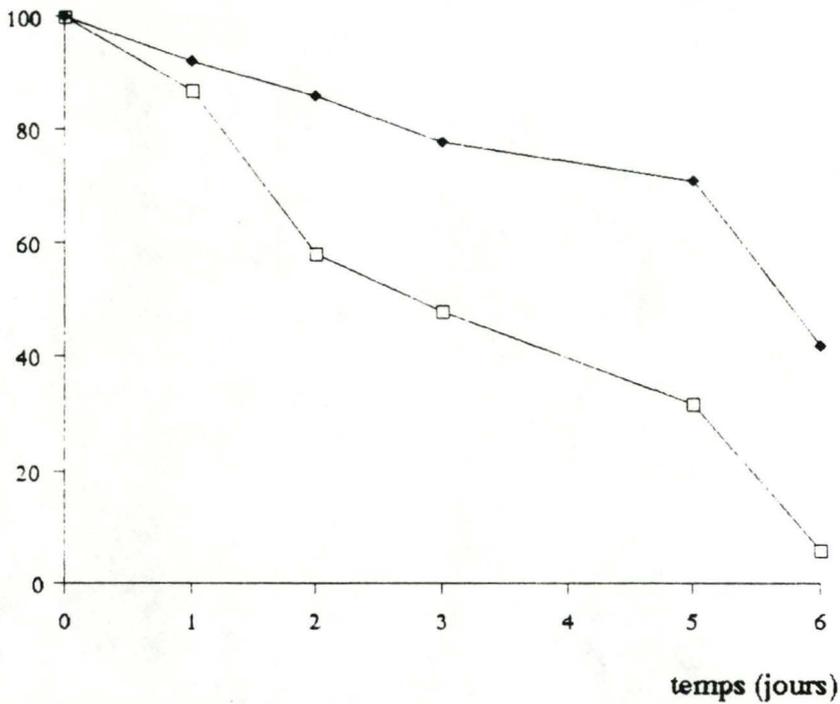
Grphe 16 : courbes de survie des CE injectées avec la concentration de SOD 240 000 U / ml (□) et des cellules injectées avec du tampon d'injection (◆).

% de survie des cellules



Grphe 17 : courbes de survie des CE injectées avec la concentration de SOD 120 000 U / ml (□) et des cellules injectées avec du tampon d'injection (◆).

% de survie des cellules



Courbe 18 : courbes de survie des CE injectées avec la concentration de SOD 60 000 U / ml (□) et des cellules injectées avec du tampon d'injection (◆).

On n'observe aucune protection des CE par la SOD et on constate même une certaine toxicité : les courbes de survie des cellules injectées avec de la SOD sont en-dessous des courbes de survie des cellules témoins. Une activité superoxyde dismutase trop importante augmenterait la concentration de peroxyde d'hydrogène dans la cellule, dont on sait qu'il participe à la réaction de Fenton qui produit des radicaux hydroxyles très toxiques.

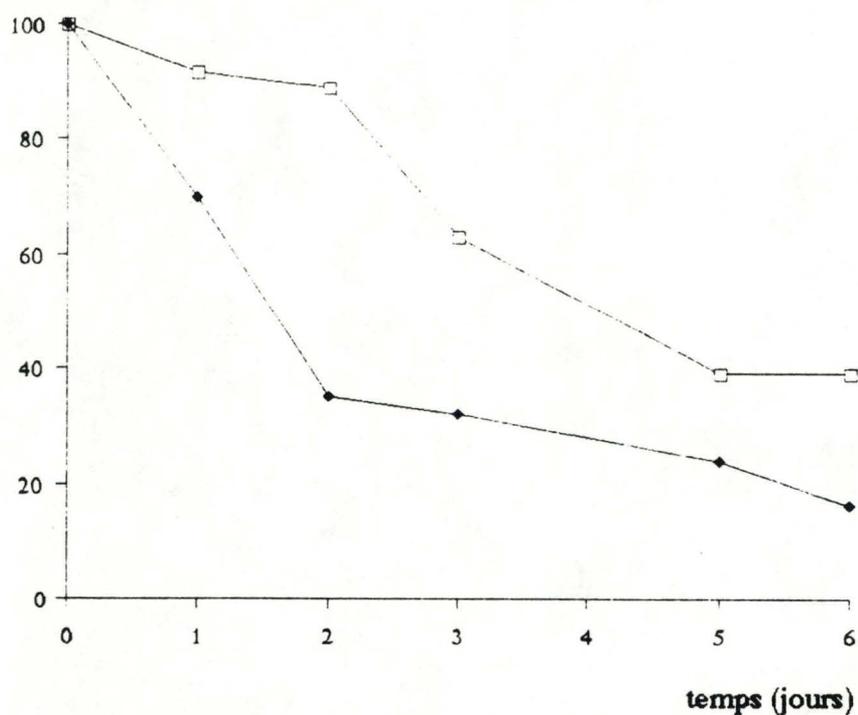
L'injection de SOD dans les fibroblastes n'apportait qu'une faible protection (Michiels, 1984-1985) face à l'hyperoxie, malgré que la quantité de SOD injectée était aussi 4,3 fois supérieure à la quantité de cet enzyme déjà contenu dans les cellules.

c) Résultats obtenus pour la micro-injection de la glutathione peroxydase (GPX).

concentrations de l'enzyme	% de protection	Signification des résultats (n = 5)
180	141,14 ± 16,07	S(P>0,995)
90	100,00 ± 7,26	NS

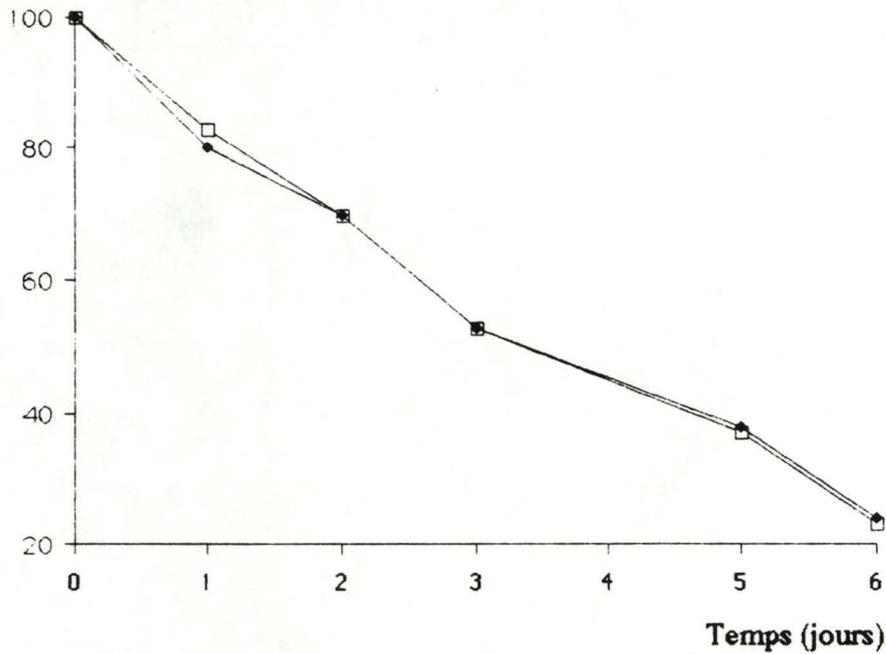
Les deux graphes suivants donnent les valeurs expérimentales ( graphes 19 et 20) :

% de survie des cellules



Graphe 19 : courbes de survie des CE après injection de concentration de GPX 180 U / ml (□) et des cellules injectées avec du tampon d'injection (◆)

% de survie des cellules



**Graph 20 : courbes de survie des CE injectées avec la concentration de GPX 90 U / ml (□) et des cellules injectées avec du tampon d'injection (◆).**

La GPX protège les CE pour une concentration de 180 unités par ml, aucune protection n'existe à la concentration de 90 unités par ml (voir les graphes 21 et 22). Il semble donc que la détoxification des peroxydes lipidiques et aussi du peroxyde d'hydrogène (attesté par la protection par la catalase) soit un atout pour la protection des cellules endothéliales contre les attaques radicalaires. On a vu plus haut que la concentration en GSH diminue en fonction du temps sous hyperoxie : il serait donc consommé en partie par l'activité de la GPX et cet enzyme jouerait un rôle antioxydant important. Un apport supplémentaire de cet enzyme est donc bien susceptible de protéger la cellule.

## V. Conclusion générale.

Les résultats ont montré que la vitamine E, la GPX et la catalase offrent une protection aux cellules endothéliales en culture alors que la vitamine C et la SOD ne protègent pas les cellules lorsqu'elles subissent une hyperoxie. Des résultats semblables ont été obtenus pour les fibroblastes WI-38.

Quelques variantes doivent cependant être signalées. Alors que l'injection de la SOD offrait une faible protection aux fibroblastes, elle n'en apporte aucune aux cellules endothéliales. Il faut malgré tout souligner que Michiels (1985-1986) a aussi obtenu un accroissement de toxicité de la SOD lorsqu'elle était injectée en présence de faibles concentrations en catalase. Il apparaît donc que c'est le rapport SOD / catalase qui est déterminant pour la protection des cellules; ce qui pourrait expliquer le résultat négatif obtenu pour la SOD sur les cellules endothéliales. Dans le cas des cellules endothéliales, la protection par la GPX est plus faible; ce résultat peut être corrélé à la diminution de la quantité de GSH lors de l'hyperoxie.

Beaucoup de travaux réalisés sur les enzymes antioxydants des cellules endothéliales ont suggéré la supériorité de la GPX sur la catalase pour la défense de ces cellules face aux radicaux libres dérivés de l'oxygène moléculaire (Andreoli *et al.*, 1986; Sutorp *et al.* 1986). Ces expériences étaient basées sur l'effet de l'inhibition d'un de ces deux enzymes ou d'enzymes de la synthèse ou de la réduction du GSH. D'autres auteurs travaillant sur des fibroblastes en culture ont montré que l'effet de l'injection de la GPX était supérieur à celui de l'injection de la catalase (Raes *et al.*, 1987).

Les résultats que nous avons obtenus montrent que, avec les cellules endothéliales, l'injection de la GPX a aussi un effet protecteur supérieur à celui obtenu avec la catalase.

A partir des résultats de protection obtenus sur les trois enzymes, nous avons calculé les concentrations d'enzymes qui, injectées dans les fibroblastes et dans les cellules endothéliales, procurent une protection de 20% aux deux types de cellules, lorsqu'elles sont incubées sous une atmosphère d'oxygène :

	Fibroblastes (Michiels, 1985-1986)	Cellules endothéliales
SOD(mole/ml)	$1451.10^{-9}$	—
CAT(mole/ml)	$11,1.10^{-9}$	$3,9.10^{-9}$
GPX(mole/ml)	$1,1.10^{-9}$	$0,33.10^{-9}$

Pour protéger la cellule endothéliale, il faut donc injecter une concentration en catalase et en GPX inférieure à la concentration nécessaire pour les fibroblastes. Cette observation peut sans doute être rapprochée des concentrations cellulaires naturelles en ces deux enzymes dans les deux types de cellules : la meilleure protection des cellules endothéliales par rapport aux fibroblastes serait plus facilement obtenue du fait que la proportion des enzymes que l'on injecte par rapport aux concentrations naturelles est plus importante pour la cellule endothéliale que pour le fibroblaste. On observe aussi que pour obtenir une égale protection de 20% avec la catalase et la GPX, on injecte une concentration en GPX 10 fois inférieure à celle de la catalase.

Probablement du fait de ces concentrations plus faibles en enzymes, les cellules endothéliales sont plus sensibles à l'hyperoxie que les fibroblastes. Nous avons en effet obtenu que, dans des conditions identiques d'hyperoxie, les fibroblastes en culture survivent pendant neuf jours alors que les cellules endothéliales survivent pendant six jours. De plus, les altérations de la cellule endothéliale sous hyperoxie apparaissent plus tôt que celle des fibroblastes, dans les mêmes conditions.

Certes, il faut toujours rester prudent lorsque l'on extrapole des résultats acquis *in vitro* à des situations *in vivo* mais si les fibroblastes résistent mieux aux radicaux libres dérivés de l'oxygène moléculaire que les cellules endothéliales dans des conditions physiologiques ou pathologiques, des conséquences extrêmement

importantes peuvent en découler. La destruction des cellules endothéliales par les radicaux libres rend vulnérable la membrane basale des vaisseaux sanguins. La pathobiologie nous enseigne que l'organisme est souvent capable de se défendre face à une agression en remplaçant des cellules altérées d'un type particulier par des tissus fibroblastiques.

Puisque la cellule endothéliale est plus sensible que les fibroblastes, cette situation favoriserait donc l'apparition de ces tissus de remplacement et par exemple l'altération de l'intima des vaisseaux sanguins, ce qui est le début du phénomène d'athérosclérose.

On a vu dans l'introduction que plusieurs situations pathologiques conduisent à la formation de radicaux libres dérivés de l'oxygène moléculaire. Le foie est le siège de la production de radicaux libres lors de l'alcoolisme chronique (Halliwell et Gutteridge, 1985). Une des causes de la dégénérescence de cet organe vers la cirrhose pourrait être l'altération de sa micro-circulation par le biais de dommages aux cellules endothéliales.

L'inflammation, par sa production de radicaux libres porte également atteinte aux vaisseaux sanguins par la destruction de cellules endothéliales.

Les cellules endothéliales des capillaires peuvent voir leur xanthine oxydase activée lors du phénomène d'ischémie-reperfusion. Des dégâts très importants peuvent donc être occasionnés aux capillaires lors de la reperfusion; d'autant plus que cette situation d'altération des capillaires peut enflammer le tissu, ouvrant ainsi la voie à un cercle vicieux où l'inflammation, l'ischémie et la reperfusion peuvent endommager le tissu. Nous savons aussi que le phénomène d'ischémie-reperfusion peut avoir lieu dans un certain nombre de situations telles que le pincement des vaisseaux sanguins lors des opérations chirurgicales, lors des infarctus du myocarde et la conservation d'organes en vue de la transplantation.

Des modifications du tissu pulmonaire pourront aussi avoir lieu suite à l'activation des PMN pulmonaires lors de pathologie comme le syndrome de détresse respiratoire.

Les cellules endothéliales possèdent d'autres défenses antioxydantes que la vitamine E et les enzymes GPX , SOD et catalase; la ferritine est souvent citée en exemple. Néanmoins, la plus grande sensibilité des cellules endothéliales sous hyperoxie, par rapport aux fibroblastes est connue depuis plusieurs années (Housset et Junod, 1982). Même s'il reste encore beaucoup d'inconnues dans notre description de l'équilibre précaire entre la production des radicaux libres et leur élimination, nous avons répondu à la question de savoir si l'augmentation de certaines protections enzymatiques permettait une meilleure défense des cellules endothéliales, face aux radicaux libres dérivés de l'oxygène moléculaire, dans un modèle d'hyperoxie *in vitro* et nous avons montré que la GPX est certainement l'enzyme à considérer si l'on veut agir le plus efficacement contre les dégâts occasionnés par les attaques radicalaires.

V. Bibliographie.

**Ansorge W.,1982.**

Improved system for capillary microinjection in living cells.  
Exp. Cell Res.,140, 31-37, 1982.

**Abdo K.M., G. Rao, C.A. Montgomery, 1986.**

Thirteen-week toxicity study of D-alpha-tocopheryl acetate (vitamin E) in Fisher 344 rats.  
Food and Chem. Toxicol., 24, 1043-1050, 1986.

**Andreoli S.P., R.L. Baehner, J.M. Bergstein, 1985.**

In vitro detection of endothelial cell damage using 2-deoxy-d-3H-glucose : comparison with chromium 51, 3H- leucine, 3H-Adenine, and lactate deshydrogenase.  
J. Lab. Clin. Med., 106, 253-261, 1985.

**Andreoli S.P., C.P. Mallet, J.M. Bergstein, 1986.**

Role of glutathione in protecting endothelial cells against H2O2 oxidant injury .  
J. Lab. Clin. Med., 108, 190-198, 1986.

**Balconi G. et E. Dejana, 1986.**

Cultivation of endothelial cells : limitations and perspectives.  
Med. Biol., 64, 231-245, 1986.

**Barnes M. J. et D.M. Scott, 1983.**

Glycoproteins secreted by the endothelium and their involvement in specific interactions at the endothelium.  
in : Biochemical interactions at the endothelium, Edité par A. Cryer, 111-150, 1983.

**Baudhuin P, H. Beaufays, V. Rahman-Li, O. Z. Sellinger, R. Wattiaux, P. Jacques, C. De Duve, 1964.**

Tissue fractionnement studies. 17 intracellular distribution of monoamine oxydase, aspartate aminotransferase, alanine deshydrogenase, D-amino acid oxydase and catalase in rat liver tissue.

Biochem. J., 92, 179-184, 1964.

**Bendich A., L.J. Machlin, O. Scandurra, 1986.**

The antioxidant role of vitamin C.

Adv. Free Rad. Biol. Med., 2, 419-444, 1986.

**Brigelius R., 1985.**

Mixed disulfides : biological function and increase in oxidative stress.

in : Oxidative stress. Edité par H. Sies, 243-272, 1985.

**Brosemer R.W. et W.J. Rutter, 1961.**

The effects of oxygen tension on the growth and metabolism of a mammalian cell.

Exp. Cell Res. 25, 101-113, 1961.

**Bulkley G.B., 1987.**

Pathophysiology of free radical-mediated reperfusion injury.

J. Vasc. Surg., 5, (3), 512-517, 1987.

**Celis J. E., 1984**

Microinjection of somatic cells with micropipettes : comparison with other transfer techniques.

Biochem. J., 223, 281-291, 1984.

**Chan H. W-S., 1987.**

Oxygen free radicals in food.

Proc. Nutr. Soc., 46, 35-41, 1987.

**Chance B., H. Sies, A. Boveris, 1979.**

Hydrogen peroxide metabolism.

Physiol. Rev., 59, (3), 527-589, 1979.

**Corbisier P., A. Houbion, J. Remacle, 1987.**

A new technique for highly sensitive detection of superoxide dismutase activity by chemiluminescence.

Anal. Bioch., 164, 240-247, 1987.

**Corwin L.M., 1980.**

The role of vitamin E in mitochondrial metabolism.

in: Vitamin E. A comprehensive treatise. Edite par L.J. Machlin, 332-347, 1980.

**Christofalo V. J. et B.B. Sharf, 1973.**

Cellular senescence and DNA synthesis.

Exp. Cell Res., 76, 419-427, 1973.

**Cryer A., 1983.**

Scale and diversity of interactions at the vascular endothelium.

in: Biochemical interactions at the endothelium. Edité par A. Cryer, 1-3, 1983.

**Das D.K., R.M. Engelman, R. Clement, 1987.**

Role of xanthine oxidase inhibitor as free radical scavenger: a novel mechanism of action of allopurinol and oxipurinol in myocardial salvage

Bioch. Biophys. Res. Comm., 148, (1), 314-319, 1987.

**Davies K. J. A., 1987.**

Protein damage and degradation by oxygen radical. I General aspects.

J. Biol. Chem., 220, (20), 9885-9901, 1987.

**Davies K. J. A. et M. E. Delsignore, 1987**

Protein damage and degradation by oxygen radical. III Modification in secondary and tertiary structure.

J. Biol. Chem., 262, (20), 9907-9913, 1987.

**Davies K. J. A., M. E. Delsignore, S. W. Lin, 1987**

Protein damage and degradation by oxygen radical. II Modification of amino acid.

J. Biol. Chem., 262, (20), 9901-9907, 1987.

**Dean R.T. et K.H. Cheeseman, 1987.**

Vitamin E protects proteins against free radical damage in lipid environment.

Bioch. Biophys. Res. Comm., 148, (3), 1277-1282, 1987.

**Del Vecchio P. J., A. Siflinger-Birnboim, R. Bizios, 1987.**

Endothelial monolayers permeability to macromolecules.

Fed. Proc., 46, (8), 2511-2515, 1987.

**Deneke S.M., V. Steiger, B.L. Fanburg, 1987.**

Effect of hyperoxia on glutathione levels and glutamic acid uptake in endothelial cells.

J. Appl. Physiol, 63, (5), 1966-1971, 1987.

**Draper H.H., 1980 (a).**

Biogenesis of vitamin E.

in: Vitamin E. A comprehensive treatise. Edité par L.J. Machlin, 268-271, 1980.

**Draper H.H., 1980 (b).**

Nutrient interrelationships. (of vit. E).

in : Vitamin E. A comprehensive treatise. Edité par L.J. Machlin, 272-288, 1980.

**Evan A.P., V.H. Gattone, R.S. Filo, 1983.**

Glomerular endothelial injury related to renal perfusion. A scanning electronic microscopic study.

Transplantation, 35, (5), 436-441, 1983.

**Fantone J.C. et P.A. Ward, 1982.**

Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leucocyte-dependent inflammatory reactions.

Am. J. Pathol., 107, (3), 397-418, 1982.

**Flohé L., 1982.**

Glutathione peroxidase brought into focus.

in : Free radicals in biology. Volume V Edité par W. A. Pryor, 223-254, 1982.

**Flohé L., R. Beckmann, H. Giertz, G. Loschen, 1985.**

Oxygen-centered free radicals as mediators of inflammation.

in : Oxidative stress. Edité par H. Sies, 403-435, 1985.

**Freeman B.A. et J.D. Crapo, 1982.**

Biology of disease. Free radicals and tissue injury.

Lab. Invest., 45, (5), 412-426, 1982.

**Fridovich I., 1976.**

Oxygen radical, hydrogen peroxide and oxygen toxicity.

in : Free radicals in biology. Volume 1. Edité par William A. Pryor, 239-277, 1976.

**Fried R., 1980.**

Metabolic role of xanthine oxidase as a source of superoxides radicals and hydrogen peroxide.

in : Chemical and biochemical aspects of superoxide and superoxide dismutase.

Edité par J.V. Bannister et H.A.O. Hill, 1980.

**Fryer D.G., G. Birnbaum, C.N. Luttrell, 1966.**

Human endothelium in cell culture.

J. Atheroscl. Res., 6, 151-163, 1966.

**Gallo-Torres H.E., 1980.**

Transport and metabolism.

in : Vitamin E. A comprehensive treatise. Edité par L.J. Machlin, 193-267, 1980.

**Gerritsen M.E., 1987.**

Functional heterogeneity of vascular endothelial cells.

Biochem. Pharmacol., 36, (17), 2701-2711, 1987.

**Graessman A., M. Graessman, C. Muller, 1980.**

Microinjection of early SV 40 DNA fragments and T antigen.

Meth. Enzymol., 65, 4831-4834, 1980.

**Green M. J., H. Allen, O. Hill, 1984.**

Chemistry and biochemistry of oxygen.

Meth. Enzymol., 105, 3-22, 1984.

**Hall E.R., Ch.E. Manner, J. Carinhas, R. Sнопto, M. Rafelson, 1987.**

Selective internalisation of arachidonic acid by endothelial cells.

Biochem. J., 247, 151-157, 1987.

**Halliwell B. et J. M. C. Gutteridge, 1985 (éd.)**

in : Free radical in biology and medicine. Clarendon press, 1985.

**Halliwell B., 1987.**

Free radicals and metal ions in health and disease.

Proc. Nutr. Soc., 46, 13-28, 1987.

**Hansson R., B. Gustafsson, O. Jonsson, 1982.**

Effects of xanthine oxydase inhibition on renal circulation after ischemia.

Transpl. Proc., 14, (1), 51-58, 1982.

**Hamer, 1987.**

Activités enzymatiques impliquées dans le métabolisme des radicaux libres du foie de rat ischémié. Effet de l'hypothermie.

Mémoire de fin de licence, Facultés Notre-Dame de la Paix, Namur, 1987.

**Hammond B., H.A. Kontos, M.L. Hess, 1985.**

Oxygen radicals in the adult respiratory distress syndrome, in myocardial ischemia and reperfusion injury, and in cerebral vascular damage.

Can. J. Physiol. Pharmacol, 63, 173-187, 1985.

**Harlan J.M., J.D. Levine, K.S. Callahan, B.R. Schwartz, 1984.**

Glutathione redox cycle protects cultured endothelial cells against lysis by extracellularly generated  $H_2O_2$ .

J. Clin. Invest., 73, 706-713, 1984

**Haudenschild C.C., R.S. Cotran, M.A. Gimbrone, 1975.**

Fine structure of vascular endothelium in culture.

J. Ultrast. Res., 50, 22-32, 1975

**Haudenschild C.C., 1984.**

Morphology of vascular endothelial cells in culture.

in : Biology of endothelial cells. Edite par E. A. Jaffe, 130-141, 1984.

**Hearse, D.J., A.S. Manning, J.M. Downey, 1986.**

Xanthine oxydase : a critical mediator of myocardial injury during ischemia and reperfusion ?

Acta Physiol. Scand. (Suppl.), 548 , 65-78, 1986.

**Heinecke J . W., 1987.**

Free radical modification of low density lipoprotein : mechanism and biological consequences.

Free Rad. Biol. Med., 3, 65-73, 1987.

**Hissin P. J. et R. Hilf, 1976.**

A fluorimetric method for determination of oxidised and reduced glutathione in tissues.

Anal. Bioch., 74, 214-226, 1976.

**Hyalmarsson, 1987.**

Isolation and sequence of the complementary DNA encoding for human extracellularSOD.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, (18), 6340-6344, 1987.

**Horum M.A., D.Harman, R .B. Tobin, 1987.**

Free radical theory of aging: effects of antioxidants on mitochondrial function.

Age, 10, 58-61, 1987.

**Houssset B. et A.F. Junod, 1982.**

Effects of culture conditions and hyperoxia on antioxidant enzymes in pig pulmonary artery and aortic endothelium.

Biochim. Biophys. Acta, 716, 283-289, 1982.

**Houssset B., C. Ody, D.B. Rubin, G. Elemer, A.F. Junod, 1983.**

Oxygen toxicity in cultured aortic endothelium: selenium-induced partial protective effect.

J. App. Physiol., 55, (2), 343-352, 1983.

**Jackson M.J., 1987.**

Muscle damage during exercise: possible role of free radicals and protective effect of vitamine E.

Proc. Nutr. Soc., 46, 77-80, 1987.

**Jaffe E. A., 1987.**

Cell biology of endothelial cells.

Hum. Pathol. 18, (3), 234-240, 1987.

**Jaffe E. A., R.L. Nachman, C.G. Becker, C.R. Minick, 1973.**

Culture of human endothelial cells derivated from umbilical veins.

J. Clin. Invest., 52, 2745-2756, 1973.

**Jaffe E. A., 1984 (éd).**

Synthesis of factor VIII by endothelial cells.

in: Biology of endothelial cells, 209-212, 1984, édité par E. A., 1984.

**Jarash E.-D., C. Grund, G. Bruder, 1981.**

Localisation of xanthine oxidase in mammary gland epithelium and capillary endothelium.

Cell, 25, 67-82, 1981.

**Jarasch E. D., G. Bruder, H. W. Heid, 1986.**

Significance of xanthine oxidase in capillary endothelial cells.

Acta Physiol. Scand. (Suppl.), 548, 39-46, 1986.

**Jones D. P., 1985.**

The role of oxygen concentration in oxidative stress : hypoxic and hyperoxic models.

in : Oxidative stress. Edité par H. Sies, 151-195, 1985.

**Kasperek S., 1980.**

Chemistry of tocopherols and tocotrienols.

in : Vitamine E. A comprehensive treatise. Edite par L.J. Machlin, 7-65, 1980.

**Langley-Danyez P., 1988.**

A quoi servent les vitamines ?

La Recherche, (197), 412-421, Mars 1988.

**Lovstad R.A., 1987.**

Copper catalysed oxidation of ascorbate (vitamine C). Inhibition effect of catalase, superoxide dismutase, serum proteins (ceruloplasmine, albumine, apotransferrine) and amino acids.

Int. J. Biochem., 19, (4), 309-313, 1987.

**Lowry O. H., N. J. Rosebrought, A. L. Farr, R. J. Randall, 1951.**

Protein measurement with Folin phenol reagent.

J. Biol. Chem., 193, 265-275, 1951.

**Maruyama, Y., 1963.**

The human endothelial cell tissue culture.

Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat., 60, 69-75, 1963.

**Mason K.E., 1980.**

The first two decades of vitamin E history.

in : Vitamin E. A comprehensive treatise. Edité par L.J. Machlin, 1-6, 1980.

**Mason R.G. et J.U. Balis, 1980.**

Pathology of the endothelium.

in : Pathobiology of cell membranes II. Edité par B.F. Trump et A.U. Arstila, 425-472, 1980.

**Mac Cay P.B., M.M. King, 1980.**

Vitamin E: its role as a biologic free radical scavenger and its relationship to the microsomal mixed-function oxidase system.

in : Vitamin E. A comprehensive treatise. Edité par L.J. Machlin, 289-317, 1980.

**Mac Cord J. M., 1985.**

Oxygen-derived free radicals in postischemic injury.

New Engl. J. Med., 312, (3), 159-163, 1987.

**Mac Cord J. M., 1986.**

Superoxide radical : link between reperfusion injury and inflammation.

Adv. Free Rad. Biol. Med., 2, 325-345, 1986.

**Mac Cord J. M., 1987.**

Oxygen-derived radicals : a link between reperfusion injury and inflammation.

Fed. Proc., 46, 2402-2406, 1987.

**Mbemba F., A. Houbion, M. Raes, J. Remacle, 1985.**

Subcellular localisation and modification with ageing of glutathione, glutathione peroxidase and glutathione reductase activities in human fibroblasts.

Biochim. Biophys. Acta, 838, 211-220, 1985.

**Mead J. F., 1976.**

Free radicals mechanisms of lipid damage and consequences for cellular membranes.

in : Free radicals in biology, Volume 1. Edité par William A. Pryor, 51-68, 1976.

**Michiels C., 1986.**

Rapport d'activité I.R.S. I. A., 1985-1986.

Facultés Notre-Dame de la Paix, Namur, 1986.

**Michiels C., O. Toussaint, Remacle J., 1988.**

Comparison between oxygen toxicity upon endothelial cell and fibroblasts.

in : Second Benelux Workshop on free radicals in medicine, édité par l'université de Nijmegen, Pays-bas, 1988.

**Mills G. C., 1957.**

Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxydase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown.

J. Biol. Chem., 229,189-197, 1957.

**Molenaar I., C.E. Hulstaert, M. J. Hardonk, 1980.**

Role in function and ultrastructure of cellular membranes.

in : Vitamin E. A comprehensive treatise. Edité par L.J. Machlin, 373-389, 1980.

**Mustafa M.G. et D.F. Tierney, 1978.**

Biochemical and metabolic changes in the lung with oxygen, ozone, and nitrogen dioxides toxicity.

Am. Rev. Resp. Dis., 118, 1061-1090, 1978.

**Ody C. et A.F. Junod, 1985.**

Direct effects of paraquat and oxygen on cultured endothelial cells.

Lab. Invest., 52, (1), 77-84, 1985.

**Ono K., 1986.**

Secondary hyperoxalemia caused by vitamin C. Supplementation in regular hemodialysis.

Clin. Nephrol., 26, (5), 239-243, 1986.

**Patterson, 1987.**

La trisomie 21.

Pour la Science, 78-85, 1987.

**Placer Z., Cushman L., Johnson C., 1966.**

Estimation of production of lipid peroxydation (malonyldialdehyde) in biochemical systems.

Anal. Bioch., 116, 359-364, 1966.

**Pigeolet E., 1985-1986.**

Rapport d'activité I.R.S.I.A., 1985-1986.

Facultés Notre-Dame de la Paix, Namur, 1986.

**Pryor W. A., 1976.**

The role of free radical reactions in biological system.

in : Free radical in biology. Volume 1. Edité par W. A. Pryor, 1-49, 1976.

**Raes M., Michiels C., Remacle J., 1987.**

Comparative study of the enzymatic defense systems against oxygen-derived free radical : the key role of glutathione peroxydase.

Free Rad. Biol. Med., 3, 3-7, 1987.

**Ratyck R.E., R.S. Chuknyiska, G.B. Bulkley, 1987.**

The primary localisation of free radical generation after anoxia / reoxygenation.

Surgery, 102, (2), 122-131, 1987.

**Roberfroid M.B., H. G. Viehe, Remacle J., 1987.**

Free radical and drug research.

Adv. Drug Res., 16, 1-84, 1987.

**Rosen G.M. et B.A. Freeman, 1984.**

Detection of superoxide radicals generated by endothelial cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 7269-7273, 1984.

**Rubin D. B., B. Housset, Y. Jean-Mairet, A.F. Junod, 1983.**

Effects of hyperoxia on biochemical indexes of pig aorta endothelial function.

In Vitro, 19, (8), 625-634, 1983.

**Sacks T., C.F. Moldow, P.R. Craddock, T. K. Bowers, 1978.**

Oxygen radicals mediate endothelial cell damage by complement-stimulated granulocytes. An In vitro model of immune vascular damage.

J. Clin. Invest., 6, 1161-1167, 1978.

**Schulte-Fohlind D. et C. Von Sonntag, 1985.**

Radiolysis of DNA and model systems in the presence of oxygen.

in : Oxidative stress. Edité par H. Sies, 11-40, 1985.

**Sies H., 1985.**

Oxidative stress : introductory remarks.

in : Oxidative stress. Edité par H. Sies, 1-8, 1985.

**Slater F, K.H. Cheeseman, M.J. Davies, K. proudfoot, W. Xin, 1987.**

Free radical mechanisms in relation to tissue injury.

Proc. Nutr. Soc., 46, 1-12, 1987.

**Simpson P.J., J.K. Michelson, B.R. Lucchesi, 1987.**

Free radical scavengers in myocardial ischemia.

Fed. Proc., 46, (7), 2413-2421, 1987.

**Suttorp N., W. Toepfer, L. Roka, 1986.**

Antioxidant defense mechanisms of endothelial cells : glutathione redox cycle versus catalase.

Am. J. Physiol., 251, C 671-C 680, 1986.

**Thorgeirsson G., 1983.**

Structure and morphological features of vascular endothelium.

in : Biochemical interactions at the endothelium. Edité par A. Cryer, 5-30, 1983.

**Walker P.M, T.F. Lindsay, R. Labbe, 1987.**

Salvage of skeletal muscle with free radical scavengers.

J. Vasc. Surg., 5, (1), 68-75, 1987.

**Walton J.R. et L.Packer, 1980.**

Free radical damage and protection: relationship to cellular aging and cancer.

in : Vitamine E. A comprehensive treatise. Edité par L.J. Machlin, 495-517, 1980.

**Willson R.L., 1987.**

Vitamin, selenium, zinc and copper interactions in free radical against ill-placed iron.

Proc. Nutr. Soc., 46, 27-34, 1987.

**Winkler B.S., 1987.**

In vitro oxidation of ascorbic acid and its prevention by glutathione.

Biochim. Biophys. Acta, (925), 258-264, 1987.

**Yamamoto Y., E. Niki, Y. Kamiya, 1986.**

Free radical chain oxidation and hemolysis of erythrocytes by molecular oxygen and their inhibition by vitamin E

J.Nutr.Sci., 32, 475-479, 1986.

**Ytrehus K., S. Gunnes, R. Myklebust, O.D. Myos, 1987.**

Protection by superoxide dismutase and catalase in the isolated rat heart reperfused after prolonged cardioplegia : combined study of metabolic, functional, and morphometricultrastructural variables.

Cardiovasc. Res., 21, 492-499, 1987.