



**HAL**  
open science

# Adhésion leucocytes-endothélium et interaction des voies de mécano-transduction chez la cellule endothéliale

Marie-Vénus Labrador

## ► To cite this version:

Marie-Vénus Labrador. Adhésion leucocytes-endothélium et interaction des voies de mécano-transduction chez la cellule endothéliale. Sciences de l'ingénieur [physics]. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2001. Français. NNT : 2001NAN11320 . tel-01746418

**HAL Id: tel-01746418**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01746418v1>**

Submitted on 29 Mar 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY 1

Faculté de Médecine

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE – SANTÉ-ENVIRONNEMENT

0136  
DOUBLE

N° attribué par la bibliothèque

158509

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

**THESE**

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ-NANCY 1**

*Discipline : Génie Biologique et Médical*



Présentée et soutenue publiquement  
par

**Marie-Vénus LABRADOR**

le 20 décembre 2001

**ADHESION LEUCOCYTES/ENDOTHELIUM ET  
INTERACTIONS DES VOIES DE MECANO-TRANSDUCTION  
CHEZ LA CELLULE ENDOTHELIALE**

Directeur de thèse : Docteur S. MULLER

JURY

Rapporteurs :	M. C. ODDOU	Professeur	Université de Créteil
	M. R. SANTUS	Professeur	MNHN, Paris
Examineurs :	Mme S. MULLER	C.R.1	INSERM, UHP, Nancy
	M. J.F. STOLTZ	Professeur	UHP, Nancy
	Mme M.L. VIRIOT	D.R.	CNRS, INPL, Nancy
	M. F.ZANNAD	Professeur	UHP, Nancy

BIBLIOTHEQUE MEDECINE NANCY 1



D 007 201660 3

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ-NANCY 1

Faculté de Médecine

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE



N° attribué par la bibliothèque

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

**THESE**

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ-NANCY 1**

*Discipline : Génie Biologique et Médical*

Présentée et soutenue publiquement  
par

**Marie-Vénus LABRADOR**

le 20 décembre 2001

**ADHESION LEUCOCYTES/ENDOTHELIUM ET  
INTERACTIONS DES VOIES DE MECANO-TRANSDUCTION  
CHEZ LA CELLULE ENDOTHELIALE**

Directeur de thèse : Docteur S. MULLER

JURY

Rapporteurs :	M. C. ODDOU	Professeur	Université de Créteil
	M. R. SANTUS	Professeur	MNHN, Paris
Examineurs :	Mme S. MULLER	C.R. 1	INSERM, UHP, Nancy
	M. J.F. STOLTZ	Professeur	UHP, Nancy
	Mme M.L. VIRIOT	D.R.	CNRS, INPL, Nancy
	M. F. ZANNAD	Professeur	UHP, Nancy

# **AVANT-PROPOS ET REMERCIEMENTS**

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une convention de collaboration scientifique entre le Laboratoire de Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire-UMR CNRS 7563 (UHP-Faculté de Médecine-Nancy-France) et le Laboratoire de BioIngénierie (UCSD-San Diego-U.S.A.).

*A mes parents*

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

*Je remercie tout particulièrement Monsieur le Professeur **Jean-François STOLTZ**, mon directeur de laboratoire, qui m'a fait l'honneur de m'avoir accueillie et m'a permis de réaliser ce travail dans son laboratoire. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance pour sa confiance, ses remarques, sa confiance en mes capacités, son soutien financier et scientifique.*

*J'exprime également ma reconnaissance à Madame **Sylvaine Muller**, mon directeur de thèse, pour sa disponibilité, ses conseils et ses encouragements. Je la remercie plus spécialement pour son amitié et sa profonde gentillesse. Qu'elle trouve ici toute ma gratitude et mon profond respect.*

*J'exprime ma sincère reconnaissance à Monsieur le Professeur **Shu CHIEN**, qui m'a fait l'honneur de m'avoir accueillie et a mis à disposition son laboratoire pour la réalisation de mes travaux.*

*J'exprime toute ma gratitude et mon profond respect à Monsieur le Professeur **Christian ODDOU** et Monsieur le Professeur **René SANTUS** pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse.*

*Je remercie très sincèrement Madame **Marie-Laure VIRIOT**, pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de juger mon travail ainsi que pour sa bienveillance.*

*Je remercie vivement Monsieur le Professeur **Faiez ZANNAD**, pour avoir accepté de faire partie de mon jury.*

*Mes remerciements vont également vers mes chers collègues et mes amis :*

***Natalia de Isla**, pour sa profonde sympathie, l'affection et le soutien permanent dont elle m'a fait part.*

***Annie Moriot** pour son assistance, son amitié et sa disponibilité.*

*Francine Paulus, pour sa gentillesse, son soutien scientifique et ses encouragements.*

*Tous les membres, collègues et amis du laboratoire pour leur sympathie et leur soutien pendant ces 3 ans : Brigitte, Cédric, Céline, Claude, Dominique, Ghislaine, Hong, Lei, Michel, Monique, Mariama, Pascale, Rui-Juiian, Shalaw, Véronique, Walter, Xiong et tous les chercheurs étrangers de passage.*

*Les chercheurs de San Diego pour leur gentillesse pendant mon séjour : Peter, Roland, Miao, Benjamin, Jane, Song. Je remercie particulièrement Julie et Dennis pour la patience dont ils ont témoigné lors de mon séjour dans son laboratoire et le temps qu'ils m'ont accordé afin de m'apprendre les techniques nécessaires à l'élaboration de mes travaux.*

*Les membres du service de cytologie de l'Etablissement Français du Sang : Docteur Véronique Latger-Cannard, Docteur Humbert, Gilles, Doris, Françoise et Isabelle.*

*Et, j'ai une pensée particulière pour tous mes amis, à travers le monde, qui m'ont permis de garder mon enthousiasme grâce à leur témoignage d'affection permanent.*



# **TABLE DES MATIERES**



# Table des Matières

<b>Avant-propos et remerciements</b>	2
<b>Liste des publications et communications réalisées</b>	12
<b>Liste des abréviations et notations</b>	15
<b>Table des illustrations</b>	22
<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	26
<b>CHAPITRE I : ETUDES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	30
<b>I.1. Hémodynamique et cellules endothéliales</b>	31
I.1.1. Propriétés et fonctionnalités de l'endothélium vasculaire	31
I.1.1.1. Les cellules endothéliales	31
I.1.1.2. Etats fonctionnels biologiques et pathologiques des CE	32
a). Barrière de perméabilité sélective	32
b). Action antithrombosante et thrombosante	34
c). Propriétés anti-adhésive et adhésive	35
d). Synthèse de médiateurs vasoactifs	39
I.1.2. Forces hémodynamiques agissant sur la paroi vasculaire	41
I.1.2.1. Contrainte de cisaillement	42
I.1.2.2. Pression hydrostatique	42
I.1.2.3. Déformation périodique	42
I.1.3. Effets de l'hémodynamique sur les CE – La mécano-transduction	43
I.1.3.1. Morphologie des cellules endothéliales	43
I.1.3.2. La mécano-transduction	45
a). Distribution de contraintes mécaniques	45
b). Les mécano-récepteurs	47
c). Les réponses des CE aux contraintes de cisaillement	54
d). Régulation génique	57
<b>I.2. Athérogénèse et contrainte de cisaillement</b>	60
I.2.1. Facteurs biochimiques	60
I.2.1.1. LDL	60
I.2.1.2. Cytokines	61
I.2.1.3. Infections	62
I.2.1.4. Autres composés	62

I.2.2. Cellules impliquées dans l'athérogénèse	62
I.2.2.1. Leucocytes	
a). la cascade d'adhésion	63
b). Les différentes implications cliniques des leucocytes	67
I.2.2.2. Plaquettes	69
I.2.2.3. Cellules musculaires lisses	70
I.2.3. Facteurs biomécaniques	70
<b>I.3. Objectifs de notre travail</b>	<b>74</b>
<b>CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES</b>	<b>75</b>
<b>II.1. Culture de cellules endothéliales</b>	<b>76</b>
II.1.1. Réactifs et matériels	76
II.1.1.1. ECV 304	76
a). Milieu de culture	76
b). Additifs au milieu de culture de base	76
c). Tampon PBS	76
d). Solution de trypsine-EDTA	77
II.1.1.2. BAEC	77
a). Milieu de culture	77
b). Additifs au milieu de culture de base	77
c). Tampon PBS	77
d). Solution de trypsine-EDTA	77
e). Extraction des cellules	78
II.1.2. Mise en culture et passage	79
II.1.2.1. Supports de cellules en culture	79
a). ECV304	79
b). BAEC	79
II.1.2.2. Entretien de la culture	79
II.1.2.3. Culture sur lamelles	80
II.1.3. Stimulation et traitement	80
II.1.3.1. Stimulation mécanique	80
II.1.3.2. Traitement biochimique	81
a). TNF- $\alpha$	81
b). BAPTA/AM	81
c). Peptide RGD	81
d). Toxine de Pertussis	81
<b>II.2. Isolement des PNN</b>	<b>82</b>

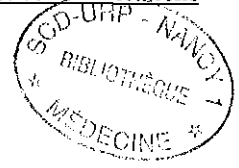
II.2.1. Réactifs et matériels	82
II.2.2. Isolement des PNN	82
II.2.3. Stimulation des PNN	82
<b>II.3. Système en flux</b>	<b>83</b>
II.3.1. Préparation des lamelles	83
II.3.1.1. Nettoyage	83
II.3.1.2. Fixation du fibrinogène	83
II.3.2. Mise sous flux	83
II.3.3. Acquisition des images	84
II.3.4. Traitement des images	84
<b>II.4. Fluorescence-Immunofluorescence</b>	<b>87</b>
II.4.1. Réactifs	87
II.4.1.1. Tampon de lavage	87
II.4.1.2. Fixateur	87
II.4.1.3. Perméabilisant	87
II.4.1.4. Anticorps	87
II.4.2. Marquage en immunofluorescence	87
II.4.2.1. Principe de l'immunofluorescence indirecte	87
II.4.2.2. Marquage des molécules d'adhésion	88
a). Marquage des molécules d'ICAM-1	88
b). Marquage des molécules d'adhésion sur les PNN	88
II.4.3. Marquage du cytosquelette	88
II.4.4. Cytométrie en flux	88
II.4.4.1. Immunomarquage des billes de calibration	89
II.4.4.2. Analyse des échantillons	92
<b>II.5. Microscopie à fluorescence 3D (à sectionnement optique)</b>	<b>93</b>
II.5.1. Acquisition des images	94
II.5.2. Traitement des images	95
<b>II.6. Immunoprécipitation et marquage des protéines</b>	<b>96</b>
II.6.1. Lyse des cellules et quantification de la concentration protéique	96
II.6.1.1. Tampons de lyse	
a). Marquage du complexe $\alpha\beta3$ -Shc	96
b). Tampon de lyse pour le marquage de l'activité de la JNK	96
II.6.1.2. Dosage des protéines dans les lysats cellulaires	96
II.6.2. Immunoprécipitation et électrophorèse des protéines	97
II.6.2.1. Tampons	97
a). Tampon de charge SDS	97
b). Tampon de migration	97

c). Tampon de kinase I	97
d). Tampon de kinase II	97
e). Tampon de transfert	97
f). Tampon de coloration	97
g). Tampon de blocage	98
II.6.2.2. Gels d'électrophorèse.	98
a). Gel de stockage	98
b). Gel de séparation à 10% d'acrylamide	98
c). Gel de séparation à 12% d'acrylamide	98
II.6.2.3. Préparation de la solution d'immunoprécipitation	99
a). Couplage des billes à la protéine A	99
b). Couplage des Ac au complexe "billes-protéine A"	99
II.6.2.4. Immunoprécipitation et électrophorèse de l'intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{3}$	99
II.6.2.5. Immunoprécipitation et électrophorèse de la JNK	100
II.6.2.6. Transfert des protéines et immunomarquage du complexe $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Shc	100
II.6.2.7. Marquage radioactif de la JNK	100
II.6.2.8. Calcul des densités	100
<b>CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION</b>	101
<b>III.1. Etude de l'efficacité d'adhésion des leucocytes</b>	104
III.1.1. Contrôle de la morphologie des PNN	106
III.1.2. Temps de sédimentation	106
III.1.3. Contrôle de l'homogénéité du dépôt des neutrophiles sur la lamelle de silice	107
III.1.4. Evolution du taux de couverture en fonction de la concentration cellulaire	108
III.1.5. Contrôle de l'état d'activation des leucocytes	109
III.1.5.1. Etude quantitative	109
III.1.5.2. Etude qualitative : localisation des molécules d'adhésion à la surface	110
III.1.6. Contrôle de l'état d'activation des CE	112
III.1.6.1. Etude qualitative : localisation des molécules ICAM-1 à la surface	113
III.1.6.2. Etude de l'évolution du cytosquelette	114
III.1.6.3. Relation entre cytosquelette et expression de ICAM-1	115
III.1.7. Effet de l'activation cellulaire sur le détachement des PNN	116
III.1.7.1. Détachement des PNN adhérents sur du fibrinogène	116
a). PNN non activés	117
b). PNN stimulés par le FMLP	118
III.1.7.2. Détachement des PNN adhérents sur des CE non stimulées	119
a). PNN non activés	120
b). PNN stimulés par le FMLP	120
III.1.7.3. Détachement des PNN adhérents aux CE stimulées par le TNF- $\alpha$	120
a). PNN non activés	121

b). PNN stimulés par le FMLP	122
III.1.8. Effet du substrat sur le détachement des PNN	122
<b>III.2. Interactions entre les différents acteurs de la mécano-transduction</b>	124
III.2.1. Rappel : Action des inhibiteurs	125
III.2.1.1. Peptide RGD : inhibition du site de liaison des intégrines	126
III.2.1.2. La toxine de Pertussis : inhibition de la sous-unité Gi des protéines G	127
III.2.1.3. Le BAPTA/AM : chélation du calcium intracellulaire	128
III.2.2. Modulation des interactions de l'intégrine $\alpha\beta3$ avec la protéine Shc	128
III.2.2.1. Effet du flux sur l'association $\alpha\beta3$ -Shc	131
III.2.2.2. Effet de l'inhibition du site de liaison des intégrines par le peptide RGD	131
III.2.2.3. Effet de la chélation du $[Ca^{2+}]_i$ par le BAPTA/AM	133
III.2.2.4. Effet de l'inhibition de la protéine Gi par la PTX	136
III.2.3. Modulation de l'activation de la JNK	138
III.2.3.1. Effet du flux sur l'activité JNK	140
III.2.3.2. Effet de l'inhibition du site de liaison des intégrines par le peptide RGD	140
III.2.3.3. Effet de la chélation du $[Ca^{2+}]_i$ par le BAPTA/AM	141
III.2.3.4. Effet de l'inhibition de la protéine Gi par la PTX	143
<b>CHAPITRE IV : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b>	146
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	153
<b>PUBLICATIONS</b>	178



**LISTE DES PUBLICATIONS  
ET COMMUNICATIONS**



## Publications internationales

1. **Labrador V.**, Legrand S., Muller S., Carl P., Senger B., Voegel J.-C., Latger-Cannard V., Stoltz J.-F. Modelisation of leukocyte adhesion on a fibrinogen coated surface in static conditions. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 1999;21:375-382.
2. Muller S., Sun R., Legrand S., **Labrador V.**, Wang X., Stoltz J.F. Influence of laminar shear stress on cytoskeleton and ICAM-1 expression of endothelial cells. *Appl. Mech. and Engineering*. 1999;4:151-156
3. Stoltz J.F., Boisseau M., Muller S., Wang X., Legrand S., **Labrador V.** Hémo-rhéologie et cellules endothéliales vasculaires. *Journal des Maladies Vasculaires*, 1999;24,2:99-109.
4. Stoltz J.F., Muller S., Wang X., Dumas D., Boisseau M., Legrand S., **Labrador V.** Hemorheology and endothelial cells. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 1999;20:127-139.
5. Stoltz J.F., Muller S., **Labrador V.** Electrochemical Properties of Platelets : Clinical and Pharmacological Applications in « A new generation of antidotes, protectors and decorporators for biological and chemical hazards ». Eds T Sohns, VA Voicu, VA eds- Kluwer Academic Publishers, Amsterdam. 1999:127-154.
6. Riha P., Dumas D., Latger V., Muller S., **Labrador V.**, Stoltz J.F. Molecular mechanisms of leukocyte rolling and tight adhesion to endothelium. *International Journal of Cardiovascular Medicine and Science*, 1999,2;3/4:131-135.





7. Stoltz J.F., Wang X., Muller S., **Labrador V.** Introduction to mechanobiology of cells. Appl. Mech. and Engineering. 1999;4:177-183.
8. **Labrador V.**, Legrand S., Muller S., Carl P., Senger B., Voegel J.C., Latger-Cannard V., Riha P., Stoltz J.F. Adhésion des leucocytes sur une surface recouverte de fibrinogène en conditions statiques: expérience et modélisation. Journal des Maladies Vasculaires, 2000;25,1:47-52.
9. **Labrador V.**, Chen K., Li Y., Muller S., Stoltz J.F., Chien S. Interactions of mechanotransduction pathways. (soumis à Microcirculation).
10. **Labrador V.**, Muller S. and Stoltz J.F. Leukocyte adhesion forces depend on both activation state and cell-substrate. (en préparation)

### **Communications à des Congrès**

11. **Labrador V.**, Chen K., Li Y., Muller S., Stoltz J.F., Chien S. Interactions of Mechanosensors in Shear Stress-Induced Signal Transduction in Endothelial Cells. Proceedings of the Euromech colloquium 420 (Nancy, France 24-26 avril 2001). Biorheology. Sous presse.
12. **Labrador V.**, Chen K.-D., Li Y.-S., Muller S., Stoltz J.-F., Chien S. JNK activity is regulated by different mechanotransducers of endothelial cells. Pathophysiology of the endothelium: Vascular and infectious diseases (Giessen, Allemagne 24-26 mai 2001)
13. **Labrador V.**, Muller S., N'negue M-A., Wang X., Riha P., Paulus F., Latger-Cannard V., Dumas D., Stoltz J.F. *In vitro* experimental approach of cell adhesion. International conference on "Problems in fluid mechanics and hydrology" (Prague, République Tchèque, 23-26 juin 1999)

**LISTE DES ABREVIATIONS ET  
ANNOTATIONS**



## Abréviations

<b>Ac</b>	anticorps
<b>AC</b>	adénylate cyclase
<b>ACE</b>	"angiotensin-converting enzyme"
<b>ADN</b>	acide désoxyribonucléique
<b>ADP</b>	adénosine diphosphate
<b>AFM</b>	"atomic force microscopy"
<b>AMP</b>	adénosine monophosphate
<b>AP-1</b>	"activator protein-1"
<b>ARNm</b>	acide ribonucléique messenger
<b>ATP</b>	adénosine triphosphate
<b>BAPTA/AM</b>	1,2-bis (o-Amino-5-fluorophenoxy)éthane-N,N,N',N'-tétraacétique acide étra-acétyméthyl ester
<b>BAEC</b>	"bovine aortic endothelial cell"
<b>BSA</b>	"bovine serum albumin"
<b>CD</b>	classe de différenciation
<b>CE</b>	cellule(s) endothéliale(s)
<b>c-fos et c-jun</b>	"members of proto-oncogen family"
<b>CML</b>	cellule(s) musculaire(s) lisse(s)
<b>CNP</b>	"c-type natriuretic peptide"
<b>COX</b>	cyclo-oxygénase
<b>CR</b>	"complement receptor"
<b>DAG</b>	diacylglycerol
<b>DMP</b>	diméthylpimelimidate
<b>DMEM</b>	"Dulbecco's modified eagle medium"
<b>DO</b>	densité optique
<b>DPB</b>	"dense peripheral bands"
<b>Eahy926</b>	lignée permanente de cellules endothéliales dérivant de l'hybridation des HUVEC et de la lignée cellulaire épithéliale de A549
<b>ECGF</b>	"endothelial cell growth factor"
<b>ECGS</b>	"endothelial cell growth supplement"

<b>ECV304</b>	lignée de cellules endothéliales permanente de veine ombilicale humaine transformée spontanément
<b>EDRF</b>	"endothelium-derived relaxing factor"
<b>EDTA</b>	acide éthylène dinitrilotétra acétique
<b>EGF</b>	"epidermal growth factor"
<b>Egr-1</b>	"early growth response factor-1"
<b>ELAM</b>	"endothelial leukocyte adhesion molecule"
<b>ERK</b>	"extracellular signal regulated kinase"
<b>EPR</b>	"exhaustive photon reassignment"
<b>ESL</b>	"e-selectin ligand"
<b>ET</b>	endotheline
<b>F-actine</b>	"fibrillar actin" (fibres d'actine)
<b>FAK</b>	"focal adhesion kinase"
<b>FGF</b>	"fibroblast growth factor"
<b>FITC</b>	isothiocyanate de fluorescéine
<b>FMLP</b>	N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin
<b>Fn</b>	fibronectine
<b>FSC</b>	"forward scatter detector"
<b>GC</b>	guanylate cyclase
<b>GDP</b>	guanosine diphosphate
<b>GlyCAM</b>	"glycosylation-dependent cell adhesion molecule"
<b>GMP</b>	guanosine monophosphate
<b>GMP140</b>	"granule membrane protein-140"
<b>Grb2</b>	"growth factor receptor binding protein 2"
<b>GP</b>	glycoprotéine
<b>GST</b>	glutathione S-transférase
<b>GTP</b>	guanosine triphosphate
<b>h</b>	heure
<b>HAEC</b>	"human aortic endothelial cell"
<b>HBSS</b>	"Hank's balance salts solution"
<b>HSV</b>	"herpes virus simplex"
<b>HTP</b>	hydroxytryptophane
<b>HUVEC</b>	cellule(s) endothéliale(s) de veine ombilicales humaine

<b>iC3b</b>	"inactive complement 3b"
<b>ICAM</b>	"intercellular adhesion molecule"
<b>IF</b>	interféron
<b>Ig</b>	"immunoglobulin"
<b>IL</b>	interleukine
<b>IMF</b>	intensité moyenne de fluorescence
<b>IP<sub>3</sub></b>	1,4,5-triphosphate
<b>JNK</b>	"c-jun N-terminal kinase"
<b>LAD</b>	"leukocyte adhesion deficiency"
<b>LAM</b>	"leukocyte adhesion molecule"
<b>LDL</b>	lipoprotéines de faible densité du plasma
<b>LFA</b>	"leukocyte function antigen"
<b>m</b>	mitochondrie
<b>MAEC</b>	cellules endothéliales d'aorte de souris
<b>MadCAM</b>	"mucosal addressin cell adhesion molecule"
<b>MAP</b>	"mitogen-activated protein"
<b>MAPK/MEK</b>	MAP-kinase-kinase
<b>MAPKK/MEKK</b>	MAP-kinase-kinase-kinase
<b>MB</b>	membrane basale
<b>MCP</b>	"monocyte chemoattractant protein"
<b>M-CSF</b>	"monocyte-clony stimulating factor"
<b>MEC</b>	mouse endothelial cell"
<b>MEL-14</b>	anticorps monoclonal MEL-14
<b>min</b>	minute
<b>MIF</b>	intensité moyenne de fluorescence
<b>n</b>	noyau
<b>NFκB</b>	"nuclear factor kappa B"
<b>NK</b>	"nature killer"
<b>NO</b>	oxyde nitrique
<b>NOS</b>	NO synthase
<b>Pa</b>	pascal
<b>PADGEM</b>	"platelet activation-dependent granule external membrane protein"
<b>PAEC</b>	"porcine aortic endothelial cell"

<b>PAF</b>	"platelet activator factor"
<b>PAI</b>	inhibiteur de l'activateur du plaminogène
<b>PBS</b>	"phosphate buffered saline"
<b>PECAM</b>	"platelet endothelial cell adhesion molecule"
<b>PDGF</b>	"platelet derived growth factor"
<b>PG</b>	Prostaglandine
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostacycline
<b>PIP<sub>2</sub></b>	4,5-bisphosphate
<b>PKC</b>	protéine kinase C
<b>PLC</b>	phospholipase C
<b>PNN</b>	polynucléaire neutrophile
<b>pp125<sup>FAK</sup></b>	tyrosine kinase d'adhésion focale
<b>PSF</b>	"point spread function"
<b>PSGL</b>	"p-selectin glycoprotein ligand"
<b>PTB</b>	"phosphotyrosine binding"
<b>PTK</b>	protéine tyrosine kinase
<b>PTX</b>	toxine de Pertussis
<b>RAEC</b>	"rabbit aortic endothelial cell"
<b>RCEC</b>	"rabbit carotide endothelial cell"
<b>RE</b>	réticulum endoplasmique
<b>RGD</b>	Arginine-Glycine-Aspartate
<b>RTK</b>	récepteur tyrosine-kinase
<b>SDS</b>	sodium dodecyl sulfate
<b>Shc</b>	"Src homology2/alpha collagen"
<b>SH2</b>	"Src homology domain-2"
<b>sLe<sup>x</sup>, <sup>a</sup></b>	sialyl lewis <sup>x</sup> ou <sup>a</sup>
<b>SOS</b>	"son of sevenless"
<b>SSC</b>	"side scatter detector"
<b>SSRE</b>	"shear stress response element"
<b>SVF</b>	sérum de veau fœtal
<b>TF</b>	"tissue factor"
<b>Tm</b>	Thrombomoduline
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	"tumor necrosis factor"

<b>t-PA</b>	activateur tissulaire du plasminogène
<b>U</b>	Unité
<b>u-PA</b>	activateur du plasminogène de type urokinase
<b>VCAM</b>	"vascular cell adhesion molecule"
<b>VIH</b>	virus de l'immunodéficience humaine
<b>VLA</b>	"very late antigen"
<b>vWF</b>	facteur von Willebrand
<b>WP</b>	corps de Weibel Palade





## Notations

$A^\circ$	Angström
$c_\tau$	Nombre de cellules/images pour une contrainte de cisaillement $\tau$
$d_{CS}$	Densité de la bande pour les CE non traitées en conditions statiques
$d_{IS}$	Densité de la bande pour les CE traitées par l'inhibiteur en conditions statiques
$d_{CF}$	Densité de la bande pour les CE non traitées soumises au flux
$d_{IF}$	Densité de la bande obtenue pour les CE traitées par l'inhibiteur puis exposées au flux
$D$	Diamètre de paroi (systole)
$D_0$	Diamètre de paroi (diastole)
$\varepsilon$	Déformation périodique
$e$	Epaisseur du joint de silicone
$H_1-H_2$	Différence de hauteur entre les deux réservoirs
$m_\tau$	Moyenne du nombre de cellules/image pour la valeur de flux $\tau$
$n$	Nombre d'images pour chaque contrainte de cisaillement
$p$	Pression hydrostatique
$Q$	Débit volumique
$\theta_\tau$	Pourcentage de cellules adhérentes pour la contrainte de cisaillement $\tau$
$r$	Rayon interne du vaisseau
$\tau$	Contrainte de cisaillement
$\tau_{50}$	Contrainte de cisaillement pour laquelle 50% des PNN sont adhérents
$\mu$	Viscosité du milieu
$w$	Largeur de la chambre d'écoulement



## **TABLE DES ILLUSTRATIONS**

## Figures

### Chapitre I :

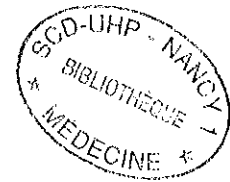
<b>Figure I-1</b>	Structure schématique des cellules endothéliales	32
<b>Figure I-2</b>	Représentation schématique de la structure des sélectines	35
<b>Figure I-3</b>	Représentation schématique de la structure des intégrines	37
<b>Figure I-4</b>	Représentation schématique de la structure de la superfamille des Immunoglobines	39
<b>Figure I-5</b>	Contraintes mécaniques agissant sur les CE	41
<b>Figure I-6</b>	Influence des contraintes mécaniques sur la morphologie des CE	44
<b>Figure I-7</b>	Organisation des fibres d'actine du cytosquelette <i>in vivo</i>	44
<b>Figure I-8</b>	Distributions de la contrainte de cisaillement et de la pression à la surface d'une CE	45
<b>Figure I-9</b>	Distribution de la contrainte de cisaillement à la surface de la CE	46
<b>Figure I-10</b>	Représentation schématique des canaux ioniques et des échangeurs d'ions en tant que possible mécano-transducteurs	49
<b>Figure I-11</b>	Activation des protéines-G : le cycle GTPase	51
<b>Figure I-12</b>	Diversité des sous-unités $G\alpha$ des protéines-G	51
<b>Figure I-13</b>	Représentation des récepteurs liés aux protéines G et des signaux intracellulaires associés à leur activation par les contraintes de cisaillement	52
<b>Figure I-14</b>	Représentation schématique des différents récepteurs tyrosine-kinase.	53
<b>Figure I-15</b>	Représentation des voies de signalisation activées par les récepteurs tyrosine-kinase	54
<b>Figure I-16</b>	Représentation schématique des multiples voies de signalisation activées par les contraintes de cisaillement appliquées à la surface de l'endothélium	59
<b>Figure I-17</b>	Rôle des LDL dans le processus d'athérosclérose	61
<b>Figure I-18</b>	Action des cytokines pro-inflammatoires	61
<b>Figure I-19</b>	L'adhésion et de la transmigration leucocytaire	63
<b>Figure I-20</b>	Localisation des plaques d'athérosclérose	72

<b>Figure I-21</b>	Sites préférentiels de la formation de plaques dans l'aorte (A) et représentation de la distribution des contraintes de cisaillement (B) à la bifurcation d'artère carotidienne	73
 <b>Chapitre II :</b>		
<b>Figure II-1</b>	Aspect d'une monocouche de CE (ECV304) en culture	79
<b>Figure II-2</b>	Chambre de flux	80
<b>Figure II-3</b>	Circuit d'écoulement	80
<b>Figure II.4</b>	Plan de prise des images	84
<b>Figure II-5</b>	Schéma du principe de l'immunomarquage indirect	88
<b>Figure II-6</b>	Fluorescence des billes de fenêtrage sur le cytomètre en flux	90
<b>Figure II-7</b>	Billes de calibration	91
<b>Figure II-8</b>	Courbe de calibration (TallyCAL). Y : nombre de sites ; X : IMF	92
<b>Figure II-9</b>	Représentation schématique du microscope optique à fluorescence équipé du système CELLscan™.	93
<b>Figure II-10</b>	Représentation de l'acquisition des images 2D en x et y selon l'axe z	94
 <b>Chapitre III :</b>		
<b>Figure III-1</b>	PNN adhérents sur une monocouche de CE	107
<b>Figure III-2</b>	Evaluation de l'homogénéité du dépôt cellulaire à la surface de la lame	108
<b>Figure III-3</b>	Influence de la concentration cellulaire sur le taux de couverture	108
<b>Figure III-4</b>	Influence des conditions d'activation sur l'expression des molécules d'adhésion à la surface des PNN	109
<b>Figure III-5</b>	Influence de l'état d'activation sur la répartition des molécules d'adhésion à la surface des PNN	111
<b>Figure III-6</b>	Effet d'une stimulation mécanique ou biochimique sur la localisation et l'expression de ICAM-1 à la surface des CE	113
<b>Figure III-7</b>	Apparition des fibres d'actine en fonction des contraintes de cisaillement	114
<b>Figure III-8</b>	Effet du TNF- $\alpha$ sur la localisation et l'expression de ICAM-1	115
<b>Figure III-9</b>	Co-localisation des fibres de stress et de ICAM-1	116
<b>Figure III-10</b>	Influence de l'état d'activation sur le détachement des PNN non activés adhérents au fibrinogène	117

<b>Figure III-11</b>	Influence de l'état d'activation sur le détachement des PNN non activés adhérents aux CE non stimulées	119
<b>Figure III-12</b>	Influence de l'état d'activation sur le détachement des PNN non activés adhérents aux CE stimulées par le TNF- $\alpha$	121
<b>Figure III-13</b>	Influence de la nature du substrat sur le détachement des PNN adhérents à différents substrats	123
<b>Figure III-14</b>	Interaction des intégrines avec leurs ligands extra – et intra-cellulaires	127
<b>Figure III-15</b>	Structure de la toxine de Pertussis	127
<b>Figure III-16</b>	Structure du BAPTA/AM	128
<b>Figure III-17</b>	Le processus d'angiogénèse	129
<b>Figure III-18</b>	Cascade de mécano-transduction mettant en jeu la JNK	130
<b>Figure III-19</b>	Effet du flux et de l'inhibition du site de liaison des intégrines sur la formation des complexes intégrine-Shc	132
<b>Figure III-20</b>	Effet des contraintes de cisaillement et de la chélation du $[Ca^{2+}]_i$ sur la formation des complexes intégrine-shc	134
<b>Figure III-21</b>	Effet des contraintes de cisaillement et de l'inhibition des protéines Gi sur la formation des complexes intégrines-shc	137
<b>Figure III-22</b>	Régulation génique par les MAP-kinases	139
<b>Figure III-23</b>	Effet des contraintes de cisaillement et de l'inhibition du site de liaison des intégrines sur l'activation de la JNK	141
<b>Figure III-24</b>	Effet des contraintes de cisaillement et de l'inhibition des protéines Gi sur l'activation de la JNK	142
<b>Figure III-25</b>	Effet des contraintes de cisaillement et de la chélation du $[Ca^{2+}]_i$ sur l'activation de la JNK	144
 <b>Chapitre IV :</b>		
<b>Figure IV-1</b>	Modèle simplifié de la mécano-transduction-Contribution de nos recherches	151



# **INTRODUCTION GENERALE**



Les maladies cardiovasculaires sont aujourd'hui la première cause de mortalité dans les pays développés. La recherche cardiovasculaire dans son ensemble a fait depuis une vingtaine d'années des progrès remarquables. Le domaine de la biologie des vaisseaux a véritablement explosé et les connaissances acquises ont changé le regard porté sur l'athérosclérose, mais aussi sur d'autres pathologies vasculaires.

L'observation des lésions d'athérosclérose en clinique ou en expérimentation chez l'animal montre que l'environnement hémodynamique, en particulier les forces de cisaillement, est certainement un facteur de première importance pour expliquer l'athérogénèse.

Les leucocytes et l'endothélium sont les 2 principaux acteurs du processus d'athérogénèse. La migration des leucocytes, en particulier les polynucléaires neutrophiles (PNN), depuis les lumières vasculaires jusqu'aux tissus lésés est réglée par des substances chimiotactiques. Ces substances régulent l'expression des protéines d'adhésion et permettent de contrôler leur adhésion et leur passage à travers la couche endothéliale. Bien que les molécules responsables de la cascade d'adhésion leucocyte/endothélium soient connues, certaines questions restent en suspens: quelle est la nature des interactions entre les intégrines leucocytaires et leur substrat ? quels processus moléculaires sont mis en jeu lors des différentes étapes de la cascade d'adhésion ?

L'endothélium vasculaire, quant à lui, est activé soit biochimiquement par les produits issus des tissus lésés, les cytokines soit mécaniquement par l'écoulement sanguin *via* le processus de mécano-transduction. Cette activation induit l'expression des molécules de surface qui réagissent avec les molécules présentes dans la membrane des polynucléaires neutrophiles. Ni la morphologie, ni la fonctionnalité des cellules endothéliales (CE)

n'échappent à l'influence des contraintes hémodynamiques locales (Reinhart 1994, Davies et col. 1997-a, Ballermann et col. 1998).

Ces contraintes sont générées par le fluide en écoulement dans la lumière du vaisseau et par la déformation du conduit. Restent à identifier tous les mécanismes qui conduisent des stimuli mécaniques aux réponses de la cellule endothéliale, c'est-à-dire, en résumé, aux effets sur la morphologie, les activités de synthèse et la division cellulaire. S'agit-il d'une activation mécanique des canaux ioniques, du contrôle du transport moléculaire par la contrainte de cisaillement, ou de ces différents phénomènes associés... ? Existe-t-il des capteurs de déformation dans la paroi, des récepteurs membranaires sensibles au cisaillement ?

Certaines réponses à ces questions ont été élucidées au niveau de nombreuses fonctions cellulaires (électrophysiologie, produits libérés et récepteurs cellulaires, etc.) et de la régulation génique. Les diverses réponses endothéliales peuvent être classées en temps de réaction, bien qu'elles soient souvent simultanées. Par exemple, les changements rapides électrophysiologiques du potentiel membranaire et l'activation ou la libération de certains médiateurs vasoactifs apparaissent beaucoup plus tôt que les modifications de la morphologie cellulaire dans la séquence des événements de la mécano-transduction.

Cependant, en raison de la complexité de ces phénomènes de mécano-transduction, les CE montrent une grande variation dans la réponse des fonctions cellulaires. Malgré le nombre d'études publiées dans différentes conditions (*in vivo* ou *in vitro*, durée expérimentale, etc.) et sur divers modèles cellulaires, les résultats restent toujours incomplets.

Dans le souci de contribuer à ces recherches, le but de notre travail était d'une part de caractériser le phénomène d'adhésion des leucocytes à l'endothélium en conditions dynamiques, d'autre part de définir deux étapes du phénomène de mécano-transduction: une étape précoce par l'étude des interactions intégrine-Shc et une étape plus tardive par l'étude de l'activité JNK. Afin de connaître l'état d'activation des cellules étudiées dans ces travaux, les PNN et les CE, nous avons réalisé l'étude de l'expression des molécules d'adhésion sur ces 2 types cellulaires après leur stimulation chimique ou mécanique: les intégrines leucocytaires impliquées dans l'adhésion ferme des leucocytes à l'endothélium et ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule-1), ligand des intégrines leucocytaires, présente à la surface de l'endothélium.

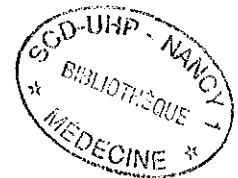
Dans le premier chapitre, nous présenterons une étude bibliographique détaillant les propriétés et les fonctions des CE, les forces hémodynamiques qui s'appliquent à la paroi

vasculaire, les effets de la contrainte de cisaillement sur CE, et les facteurs et les cellules impliquées dans l'athérogenèse.

Le chapitre II rapportera la méthodologie générale du travail et le matériel utilisé dans le cadre des différents types d'expérience. Nous présenterons en particulier la préparation des cellules endothéliales et des polynucléaires neutrophiles, la mise en place du système en flux laminaire, et les techniques utilisées pour caractériser le processus d'adhésion ferme des leucocytes et étudier qualitativement ou quantitativement les différentes molécules étudiées.

Dans le troisième chapitre, nous présenterons les résultats expérimentaux avec en deux sous chapitres : l'étude de l'efficacité d'adhésion des leucocytes à différents substrats biologiques, puis les interactions entre les différents acteurs de la mécano-transduction.

Enfin, le chapitre IV sera consacré aux conclusions et perspectives de notre travail.





**CHAPITRE I**  
**ETUDES BIBLIOGRAPHIQUES**



## I.1. Hémodynamique et cellules endothéliales

### I.1.1. Propriétés et fonctionnalités de l'endothélium vasculaire

#### I.1.1.1. Les cellules endothéliales

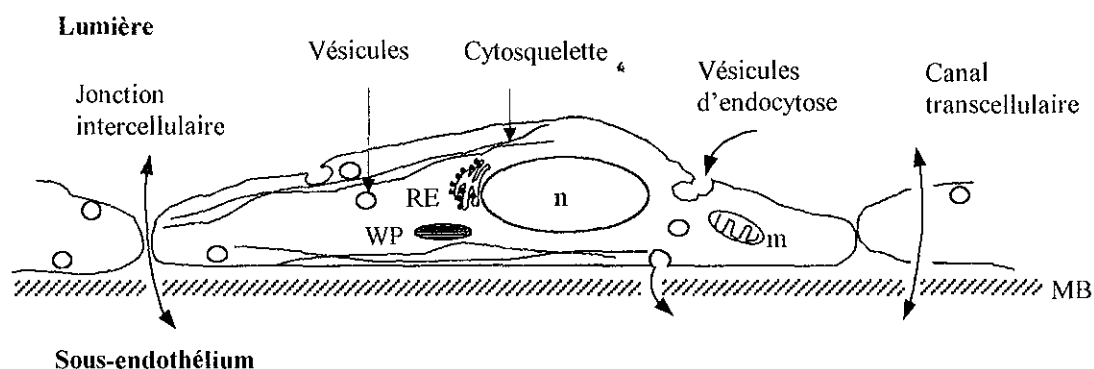
Les parois des vaisseaux sont constituées d'un tissu polarisé, moins différencié qu'un épithélium classique : l'endothélium vasculaire. Il est posé au niveau artériel et veineux sur un tissu conjonctif dense (lame élastique) et un tissu musculaire lisse plus ou moins abondants. Il acquiert des propriétés spécifiques qui diffèrent selon le territoire anatomique, ce qui rend son étude d'autant plus complexe.

Les CE vasculaires forment une monocouche cellulaire sur tout l'appareil circulatoire sanguin, dont le poids total est estimé à 1,5 kg et leur surface couverte est de plus de 1000 m<sup>2</sup> (Boneu et Cazenave 1997, West 1990). La CE est une cellule polarisée: par sa base, elle s'implante sur une matrice extracellulaire sous-endothéliale complexe faite de macromolécules de nature collagénique et de protéines adhésives et par sa face vasculaire, elle est en contact avec le sang. La CE fait quelques micromètres d'épaisseur, 10-15µm de largeur et 20-50µm de longueur dans la direction du flux sanguin (Legrand 1987, Williams et col. 1995, Chappey et col. 1997). La cohésion des CE est assurée par des protéines adhésives localisées à la jonction inter-endothéliale. Ces jonctions diffèrent suivant le niveau de l'arbre vasculaire: dans les artères, ces jonctions sont étroites (tight junction), alors que elles sont plus lâches (gap junction) dans les veines (Legrand 1987). Elles sont importantes dans le contrôle des échanges trans-endothéliaux de l'eau, des gaz et des ions, etc. Il existe également à la surface des CE des canaux, des pores, des vésicules transcellulaires.

La membrane de la CE est recouverte d'une couche de charges négatives riches en carbohydrates, présents sous forme de protéoglycanes. Parmi les constituants intracellulaires on remarque la présence de corps de Weibel-Palade (WP), des organelles cytoplasmiques contenant le facteur von Willebrand (vWF), qui sont spécifiques de la CE (Figure I-1). Les corps de Weibel-Palade se présentent sous la forme de bâtonnets de 0,2×2-3µm, résultant de la juxtaposition de petits tubules orientés parallèlement à l'axe longitudinal et entourés par une structure membranaire. Ces tubules représentent probablement les multimères de vWF (Legrand 1987, Ruggeri et Ware 1993, Williams et col. 1995, Chappey et col. 1997).

Les CE se renouvellent et se multiplient lentement, à l'exception de certaines régions vasculaires tels que les orifices vasculaires et les bifurcations, où les forces hémodynamiques à la paroi sont complexes et conduisent à une prolifération plus importante. C'est d'ailleurs à ce niveau, dans les gros vaisseaux artériels, que se localisent préférentiellement les lésions précoces d'athérosclérose (Boneu et Cazenave 1997).

Les CE interviennent dans la défense immunitaire par leurs fonctions biologiques, en particulier dans la recirculation lymphocytaire et le recrutement des leucocytes circulant lors des états inflammatoires (Springer 1994).



**Figure I-1.** Structure schématique d'une CE (Legrand 1987, Drenckhahn et Ness 1997) (m : mitochondrie ; n : noyau ; MB : membrane basale ; RE : réticule endoplasmique ; WP : corps de Weibel Palade)

### I.1.1.2. Etats fonctionnels biologiques et pathologiques des CE

A différents états physiques et pathologiques, quatre aspects de la physiologie endothéliale sont importants à considérer (Stoltz et col. 1999).

#### a). Barrière de perméabilité sélective

L'endothélium vasculaire est une barrière de perméabilité sélective qui permet et régule les échanges de molécules de taille variable, eau, sels, protéines, entre le sang et les tissus. Les voies de transport au travers de la barrière endothéliale varient selon leur localisation artérielle, veineuse ou microcirculatoire. La perméabilité sélective de cette interface cellulaire est essentielle, notamment lors de la réponse inflammatoire.

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

- par diffusion cytoplasmique passive (gaz, ions, etc),
- par transport intracellulaire par pinocytose (protéines, lipides),
- par le biais de transporteurs membranaires,

- au travers de l'espace intercellulaire permettant le passage des cellules migratrices (diapédèse).

L'eau et les solutés hydrophiles dissous traversent rapidement l'endothélium capillaire. La diffusion des solutés dissous est rapide pour les solutés ayant un rayon inférieur à  $40\text{\AA}$  et elle se fait au travers de canaux aqueux ( $50\text{\AA}$ ). Les pores de petite taille constituent une voie paracellulaire de perméation pour l'eau et les petits solutés hydrophiles et les échanges les plus importants s'effectuent à ce niveau par diffusion. La diffusion des solutés dépend du rapport entre le diamètre du canal et celui du soluté. Il existe une autre catégorie de pores dont le diamètre est plus grand ( $250$  à  $500\text{\AA}$ ) mais ceux-ci sont beaucoup plus rares dans la membrane plasmique.

Le passage des macromolécules se fait selon 2 processus:

- transcytose grâce à un récepteur spécifique qui lie la macromolécule
- au travers d'un pore de grand diamètre mais cela reste un phénomène rare.

La perméabilité peut être augmentée sous l'effet de certains facteurs tels que l'histamine, la sérotonine, le facteur activateur des plaquettes (PAF), l'adénosine triphosphate (ATP) et les leukotriènes.

Les régulations physiologiques de la diffusion transcapillaire sont effectuées par contrôle de la surface disponible pour les échanges, par relaxation de l'artériole terminale et du sphincter précapillaire. La perméabilité hydraulique des capillaires est très grande.

L'absence d'albumine élève la perméabilité hydraulique de façon très importante. L'interaction des molécules d'albumine avec les charges négatives des molécules d'héparane sulfate liées à la surface luminale des capillaires permet la création d'un glycocalix et ces interactions ajoutent une couche mal mélangée qui diminue la perméabilité endothéliale (modèle de la matrice fibreuse proposé par Michel 1999).

Les pressions hydrostatiques et osmotiques déterminent également un flux convectif de solution et il est fondamental dans la régulation du volume plasmatique. De plus, dans les processus inflammatoires, la perméabilité endothéliale est accrue au niveau des petites veinules due à l'élargissement des jonctions intercellulaires.

Par ailleurs, il existe au niveau de la surface vasculaire des récepteurs membranaires qui permettent le passage des macromolécules. Citons, par exemple les récepteurs membranaires glycoprotéiniques qui vont permettre la fixation des lipoprotéines de faible densité (LDL) du plasma et leur passage dans la cellule par un mécanisme d'endocytose spécifique. De même le facteur de croissance vasculaire endothélial possède des récepteurs

membranaires spécifiques au niveau de l'endothélium et régule ainsi la perméabilité vasculaire, la prolifération endothéliale et l'angiogénèse (Boneu et Cazenave 1997).

**b). Action antithrombotique et thrombotique**

La surface luminale de la CE est physiologiquement thromborésistante, alors que la surface abluminale adhère fortement aux macromolécules thrombogènes du sous-endothélium qu'elle synthétise.

La thromborésistance de l'endothélium est le résultat de propriétés actives et passives des CE qui empêchent l'activation du système de la coagulation (c'est-à-dire la génération de thrombine, l'adhésion et l'activation des plaquettes à l'interface). Une action fondamentale de l'endothélium dans ce domaine est la production et l'expression d'une glycoprotéine transmembranaire: la thrombomoduline, récepteur de la thrombine. Cette protéine constitue alors un complexe qui active la protéine C. Il s'agit d'une fonction anticoagulante importante, maîtrisant la génération constante de thrombine à l'interface du sous-endothélium et des cellules sanguines. La thromborésistance endothéliale dépend donc principalement de la modulation de la thrombine, des fonctions plaquettaires et de l'induction de propriétés biologiques de l'endothélium. L'endothélium exerce des activités anticoagulantes par d'autres voies telles que la captation et la dégradation de substances thrombogènes (adénosine diphosphate, hydroxytryptophane) et la synthèse des produits vasomoteurs (prostacycline, et oxyde nitrique, etc.) sur les plaquettes.

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

Les propriétés thrombogènes de l'endothélium sont induites sous l'effet de molécules impliquées dans les processus de la coagulation (thrombine) ou des processus inflammatoires (endotoxine, cytokines, etc.). Le système de la coagulation est activé à la suite de l'exposition des phospholipides anioniques de la membrane, de la synthèse de facteur tissulaire et de facteur V, de l'expression de récepteurs membranaires pour le facteur Xa (Boneu et Cazenave 1997). Les CE synthétisent des facteurs indispensables à la coagulation (facteur VIII et de Willebrand) et les libèrent en réponse à ces stimuli.

L'émergence des corps de WP est un phénomène précoce et rapide au cours de l'activation endothéliale. Les corps de WP fusionnés aux membranes superficielles de l'endothélium secrètent le vWF, adhésine majeure des plaquettes sanguines et expriment la P-sélectine disponible pour l'adhésion leucocytaire, polynucléaire et monocytaire.

Succédant à cette réaction rapide, la thrombomoduline est clivée en surface, au niveau de 5 ou 6 sites de sa partie extramembranaire, clivage auquel contribuent les leucocytes adhérents. L'endothélium perd ainsi sa fonction principale de régulation de la thrombine.

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

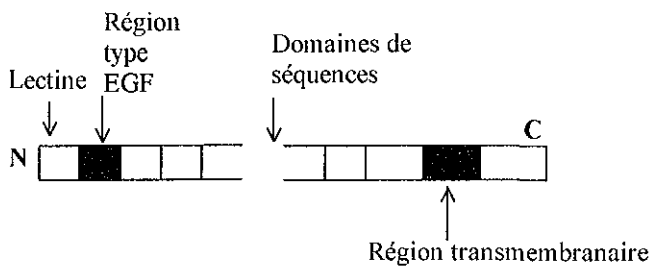
### c). Propriétés anti-adhésive et adhésive

La CE exprime à la surface vasculaire de façon constitutive ou après induction biochimique ou mécanique, des récepteurs d'adhésion pour les PNN, les lymphocytes, les monocytes et les plaquettes.

Au moins trois familles de molécules d'adhésion vont principalement intervenir dans les processus d'adhésion leucocytaire: les sélectines, les intégrines et les membres de la superfamille des immunoglobulines (Carlos et Harlan 1994, Springer 1994, Tedder et col. 1995, Aplin et col. 1998).

#### • Sélectines

Il existe trois types de sélectines : les E(endothelial)-, L(leucocyte)-, et P(platelet)-sélectines. Chacune comprend un domaine N-terminal de reconnaissance des carbohydrates (c-type lectin domain) (Figure I-2). Le rôle principal des sélectines concerne les interactions entre leucocytes et CE.



**Figure I-2.** Représentation schématique de la structure des sélectines (Stoltz et col. 1999), EGF : epidermal growth factor

*E-sélectine (ELAM-1, CD62E)*: elle est restreinte aux CE activées par les cytokines telles que l'interleukine-1 (IL-1) ou le tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ). Elle est impliquée dans l'adhésion des monocytes à l'endothélium activé et son expression abondante sur les CE présentes au niveau des lésions inflammatoires est corrélée avec l'afflux des neutrophiles.

*L-sélectine (LECAM-1, Mel-14 ou CD62L)*: elle est exprimée par 60% des lymphocytes circulants, par les monocytes et par tous les granulocytes. Elle intervient dans l'adhésion des leucocytes aux CE et est impliquée dans la migration des lymphocytes vers les ganglions lymphatiques. Son expression à la surface cellulaire est très sensible à la stimulation cellulaire. Les neutrophiles ayant émigré vers les sites d'inflammation expriment un taux très bas de L-sélectine.

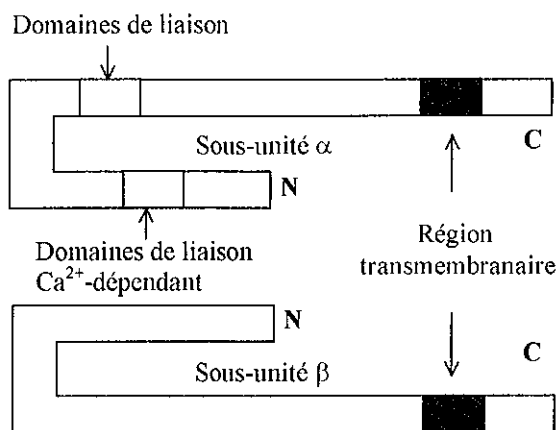
*P-sélectine (GMP140, CD62P)*: elle est exprimée dans les granules  $\alpha$  des plaquettes et les corps de WP des CE. L'expression à la surface des P-sélectines, en réponse à une grande variété d'agents tels que la thrombine, les cytokines, etc., est généralement très courte (de l'ordre de la minute), ce qui en fait un excellent intermédiaire dans la médiation des premières interactions leucocytes/endothélium, ainsi que dans l'interaction plaquettes/endothélium.

- *Intégrines*

Les intégrines sont responsables de l'adhésion cellulaire et de la migration sur la matrice extracellulaire. *Via* leurs interactions avec d'autres molécules, elles entrent dans la modulation de l'organisation du cytosquelette tout comme la prolifération, la survie et la différenciation cellulaires. Elles sont largement impliquées dans la régulation du développement embryonnaire, l'apoptose, l'hémostase, le recrutement et l'activation des leucocytes, la résorption osseuse et la rétraction du caillot sanguin. Certaines ont, de plus, un rôle significatif dans la croissance des tumeurs cellulaires et des métastases.

Ce sont des glycoprotéines transmembranaires hétérodimériques formé de deux chaînes qui ne sont pas liées de manière covalente (Figure I-3). A ce jour, 8 chaînes  $\beta$  et 16 chaînes  $\alpha$  sont répertoriées. Le domaine cytoplasmique de la sous-unité  $\beta$  est nécessaire et suffisant à la formation des points d'adhésion focaux après liaison au ligand, tandis que le domaine cytoplasmique de la sous-unité  $\alpha$  régule la spécificité des interactions après liaison au ligand. Un grand nombre d'intégrines sont membres de la sous-famille  $\beta 1$  ou VLA (Very Late Antigens). La sous-famille  $\beta 2$  est représentée par les récepteurs leucocytaires LFA-1,

Mac-1 et p150,95 qui sont exclusivement exprimés sur les leucocytes. La sous-famille  $\beta_3$ , exprimée dans les CE et les plaquettes, consiste en la glycoprotéine GPIIb/IIIa et le récepteur de la vitronectine.



**Figure I-3.** Représentation schématique de la structure des intégrines (Stoltz et col. 1999).

Lors de leur liaison aux intégrines, les ligands se lient fermement ou regroupent les intégrines en se liant aux intégrines adjacentes à la surface cellulaire. La liaison ou le regroupement des intégrines conduit à la formation de points focaux d'adhésion où les intégrines se lient à des complexes cytosquelettiques intracellulaires et indirectement aux filaments d'actine. A la suite de cette liaison ferme des intégrines à leurs ligands, elles "intègrent" les signaux extérieurs donnés par les autres cellules ou les composants de la matrice extracellulaire auxquelles elles adhèrent, signaux qu'elles transmettent à l'intérieur de la cellule en s'associant par leur domaine intracellulaire au cytosquelette et en déclenchant des signaux de transduction. Ceux-ci conduisent à l'hydrolyse des phospho-inositols et donc à l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, à la phosphorylation de plusieurs protéines, notamment l'activation de la tyrosine kinase de l'adhésion focale ( $\text{pp125}^{\text{FAK}}$ ) et à l'induction de différents gènes.

L'application d'une contrainte de cisaillement sur les CE provoque l'activation rapide des protéines kinases dont ERK (extracellular signal-regulated kinase) et JNK (c-Jun N-terminal kinase) (Li et col. 1996). Cela fait partie de l'activation transcriptionnelle des gènes précoces tels que ceux codant pour MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) et c-fos (Shyy et col. 1994, Jalali et col. 1998). Ces activations sont modulées par la protéine Ras elle-même régulée par la protéine Sos (Son of sevenless). Cependant, en réponse à de nombreux facteurs de croissance tels que le PDGF (platelet derived growth factor) ou l'EGF (Epidermal growth factor), la protéine adaptatrice Shc (Src homology2/alpha collagen) est phosphorylée au



niveau de ses tyrosines et s'associe avec les phospho-tyrosines du récepteur Tyrosine Kinase par le domaine SH2 (Src homology domain-2). Après phosphorylation, elle peut aussi s'associer à la protéine Grb2 (Growth factor receptor-binding protein-2) par le domaine SH2. L'assemblage Shc-Grb2-Sos fournit donc une voie alternative de signalisation à la voie Grb2-Sos utilisée par la protéine Ras.

Récemment il a été montré que la protéine Shc est impliquée dans les signaux de transduction. En effet, chez les cellules A341, il a été montré que Shc est associée aux intégrines  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$  et  $\alpha_v\beta_3$ . Cette étude a mis en évidence également que Shc est nécessaire et suffisant à l'activation de ERK en réponse à la liaison des intégrines. Les expériences de co-immunoprécipitation et de mutagenèse ont prouvé que le recrutement de Shc est spécifique au domaine extracellulaire ou transmembranaire de la sous-unité  $\alpha$  de l'intégrine. Ces résultats suggèrent que les facteurs de croissance et les intégrines peuvent réguler la voie d'activation de ERK *via* Shc et par extension que l'association d'intégrines spécifiques avec Shc régule la survie cellulaire (Wary et col. 1996).

- *Superfamille des immunoglobulines*

La superfamille des immunoglobulines représente la plus abondante famille des molécules d'adhésion présentes à la surface cellulaire. Leur structure est caractérisée par des domaines répétitifs semblables à ceux trouvés sur les immunoglobulines (Figure I-4). Leur présence est nécessaire pour l'adhésion des leucocytes à l'endothélium, en effet, bien que le roulement des leucocytes soit un pré-requis pour une adhérence ferme sur la paroi vasculaire, l'adhésion des leucocytes via les sélectines ne permet pas une adhérence réelle à moins que des molécules de la superfamille des immunoglobulines n'interagissent. Pour les interactions entre les CE et les leucocytes, les membres les plus importants de cette famille sont: ICAM-1, ICAM-2 et VCAM-1, qui servent de ligand pour les intégrines LFA-1 et VLA-4. ICAM-1 et 2 sont des ligands pour l'intégrine de la sous-unité  $\beta_2$ , LFA-1 (CD11a/CD18). Elles diffèrent cependant par leur répartition et leur fonction:

*ICAM-1* est fortement exprimée dans les CE activées par des cytokines ou par les contraintes de cisaillement locales, etc., mais ne se trouve qu'en faible quantité dans les CE au repos. Elle semble jouer un rôle important au cours de l'inflammation et dans le développement de l'athérosclérose.

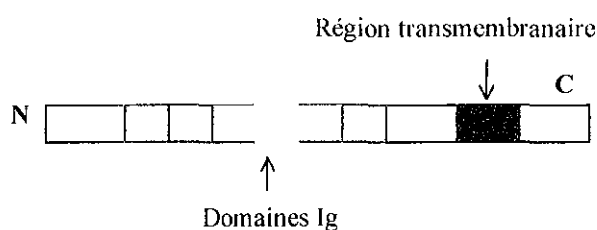
*ICAM-2* est principalement trouvée dans les cellules au repos, ainsi que dans les leucocytes. Son expression n'est pas augmentée par l'activation des cellules.

*VCAM-1* est exprimée à la surface des CE activées et absente sur des CE au repos. Elle se lie aux intégrines  $\alpha 4\beta 1$  (VLA-4), et peut être régulée par les médiateurs de l'inflammation tels que les cytokines. Parmi les autres molécules de cette famille, il faut également signaler :

*ICAM-3* est exprimée constitutivement par les leucocytes et joue un rôle important dans la stimulation des cellules T.

*PECAM-1* (*CD31, Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1*) est exprimée de manière prédominante dans les CE et les plaquettes. Elle est nécessaire pour la migration transendothéliale des leucocytes à travers les jonctions intercellulaires endothéliales vasculaires.

*MadCAM-1* (*Mucosal adressin Cell Adhesion Molecule 1*) est impliquée au niveau des nodules lymphoïdes et des tissus lymphoïdes muqueux.



**Figure I-4.** Représentation schématique de la structure de la superfamille des immunoglobulines (Stoltz et col. 1999), Ig : immunoglobuline.

#### d). Synthèse de médiateurs vasoactifs

La CE est le siège d'une activité biologique importante de synthèse et de sécrétion. Elle a une activité métabolique intense et diversifiée.

Elle synthétise les composants sous-endothéliaux de la matrice extracellulaire sur lesquels elle repose en adhérant et qui sont éminemment thrombogènes. Elle exprime la thrombomoduline qui fixe spécifiquement la thrombine. La CE synthétise également d'autres facteurs de la coagulation (facteur V, récepteur du facteur IX/IXa, récepteur du facteur Xa, protéine S et son récepteur,  $\alpha_2$ -macroglobuline). De plus, elle synthétise différentes protéines telles que le facteur von Willebrand, des activateurs du plasminogène (t-PA, u-PA et de son

inhibiteur PAI-1), des facteurs autocoïdes contractants (l'endothéline 1,) ou relaxants (monoxyde d'azote, prostacycline) qui contractent ou dilatent les vaisseaux sanguins (Stoltz et col. 1999). La CE possède des enzymes qui inactivent la bradykinine et transforment l'angiotensine I en angiotensine II vasoactive. Par ailleurs, elle est également la source de certains facteurs de croissance (ECGF, aFGF, bFGF).

- *Endothéline-1 (ET-1)*

L'endothélium vasculaire synthétise un peptide, l'endothéline-1, un des trois isoformes polypeptidiques de 21 acides aminés connus (ET-1, 2 et 3) (Inoue et col. 1989). ET-2 et 3 sont produits par d'autres tissus, et leurs fonctions sur la physiologie et la physiopathologie vasculaires ne sont pas encore élucidées.

L'ET-1 est un des vasoconstricteurs les plus actifs, avec un potentiel 10 fois supérieur à celui de l'angiotensine II. Ses effets sont modulés en fonction des localisations anatomiques et des conditions physiopathologiques (comme par exemple en cas de brèche vasculaire : vasoconstriction prolongée et activation plaquettaire).

D'un point de vue rhéologique, il a été démontré que des CE en culture, soumises à un écoulement périodique, produisent rapidement de l'ET-1 (<20min), mais une contrainte de cisaillement soutenue (>1h) aboutit à une réduction de l'ET-1 (Kuchan et Frangos 1993).

Il existe au moins deux récepteurs de l'ET: ET<sub>A</sub> avec une grande affinité pour l'ET-1 et ET<sub>B</sub> pouvant fixer les trois formes d'endothéline (Sakurai et col. 1992).

- *Prostacycline (PGI<sub>2</sub>)*

La prostacycline est un agent hypotenseur dont le mécanisme principal est lié à son effet vasodilatateur. Parmi les prostaglandines synthétisées, la prostacycline a un rôle déterminant. Découverte en 1976, la prostacycline est un dérivé de l'acide arachidonique (Moncada et col. 1976). La quantité de PIG<sub>2</sub> synthétisée par le tissu vasculaire est plus importante à la surface de l'intima et décroît vers l'adventice. Les CE sont les plus actives dans cette synthèse. L'enzyme qui permet la transformation de l'acide arachidonique endoperoxyde en PIG<sub>2</sub> est la prostacycline synthétase humaine qui a été clonée récemment en 1994. La synthèse de PIG<sub>2</sub> est également contrôlée par les cyclo-oxygénases (COX): COX-1 exprimée par la plupart des tissus et COX-2 particulièrement importante pour la synthèse des

prostaglandines dans l'inflammation et qui est d'un intérêt fondamental pour l'étude de nouvelles molécules anti-inflammatoires.

Par ailleurs, la prostacycline est le plus important des inhibiteurs endogènes de l'agrégation plaquettaire, mais aussi de leur adhésion (interactions collagène-plaquettes). Cet effet, cependant, ne s'applique que sur une courte période de temps (<30min).

- *Oxyde Nitrique (NO ou EDRF)*

Le NO/EDRF (endothelium-derived relaxing factor) est un agent vasodilatateur instable dont l'effet aléatoire a été souligné en 1980 (Furchgott et Zawadzki 1980). Il faut cependant attendre jusqu'en 1987 pour que Palmer et col. montrent que le NO et l'EDRF représentent une même molécule (Palmer et col. 1987). Il est synthétisé dans la CE à partir d'une L-arginine par l'activité d'une NO synthase endothéliale (eNOS). Trois isoformes de la eNOS ont été clonées : deux d'entre elles sont  $Ca^{2+}$  dépendantes et la troisième est inductible par les cytokines.

D'un point de vue physiologique, le NO inhibe l'agrégation et l'adhésion des plaquettes avec une synergie très marquée avec l'action de la prostacycline. D'autre part, la libération de NO par la contrainte de cisaillement locale ou par stimulation biochimique, joue un rôle déterminant pour la régulation du flux sanguin. Sa production est modifiée dans les syndromes inflammatoires (Gorbunov et Esposito 1993). Son effet antiagrégant et vasodilatatoire est mis à profit en thérapeutique (Salvemini et Mollace 1994).

### I.1.2. Forces hémodynamiques agissant sur la paroi vasculaire

La monocouche de CE est soumise *in vivo* à 3 contraintes mécaniques principales (Figure I-5) dont l'intensité change en fonction du lit vasculaire : la contrainte de cisaillement ( $\tau$ ), la pression hydrostatique (p) et la déformation périodique ( $\epsilon$ ) (Charara 1993, Gooch et Tennant 1997).

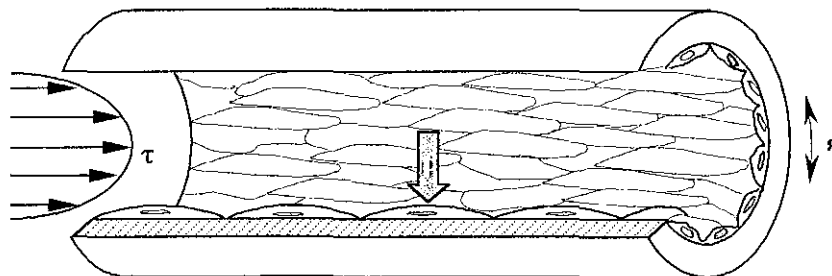


Figure I-5. Contraintes mécaniques agissant sur les CE.

### I.1.2.1. Contrainte de cisaillement

La contrainte de cisaillement est développée par l'écoulement sanguin et agit tangentiellement sur les CE. La contrainte de cisaillement à la paroi,  $\tau$ , est calculée par la relation de Poiseuille en prenant comme hypothèse un écoulement stationnaire d'un fluide newtonien dans une conduite cylindrique suffisamment longue:

$$\tau = 4Q\mu / \pi r^3$$

où Q est le débit,  $\mu$  la viscosité dynamique du sang et r le rayon interne du vaisseau.

### I.1.2.2. Pression hydrostatique

La pression hydrostatique agit perpendiculairement à la surface de l'endothélium. Elle agit aussi bien sur la matrice extracellulaire que sur l'endothélium. La pression hydrostatique est générée pour surmonter la résistance des artères et de la viscosité sanguine (Williams 1995).

A l'échelle macroscopique, l'écoulement du sang dans les artères est généralement laminaire. Cependant, la géométrie des vaisseaux à proximité des singularités vasculaires (bifurcations, anévrismes, sténoses et régions de courbure) prédispose à la séparation de l'écoulement et à l'apparition de tourbillons. Dans ces régions, la contrainte de cisaillement et la pression présentent des grandes fluctuations en amplitude et en direction sur de faibles distances (Charara 1993).

A l'échelle microscopique, il faut également noter que la distribution de la contrainte de cisaillement et de la pression à la surface de chaque CE ne sont pas uniformes et sont fonction de la topographie de la surface cellulaire.

### I.1.2.3. Déformation périodique

En plus de la contrainte de cisaillement et la pression, l'endothélium est exposé à une déformation périodique de la paroi correspondant aux pulsations cardiaques.

La déformation classiquement mesurée est la déformation circonférentielle, c'est-à-dire la variation de diamètre (interne et externe) :

$$\varepsilon = (D - D_0) / D_0$$

$\varepsilon$ : déformation (%), D et  $D_0$ , les diamètres de paroi lors de la systole et de la diastole ventriculaire.

### **I.1.3. Effets de l'hémodynamique sur les CE - La mécano-transduction**

Etant donné la situation interfaciale et l'importance fonctionnelle des CE, leur comportement sous l'influence des forces hémodynamiques constitue un objet de recherche qui intéresse de nombreux chercheurs dans le cadre des implications pathologiques cardiovasculaires.

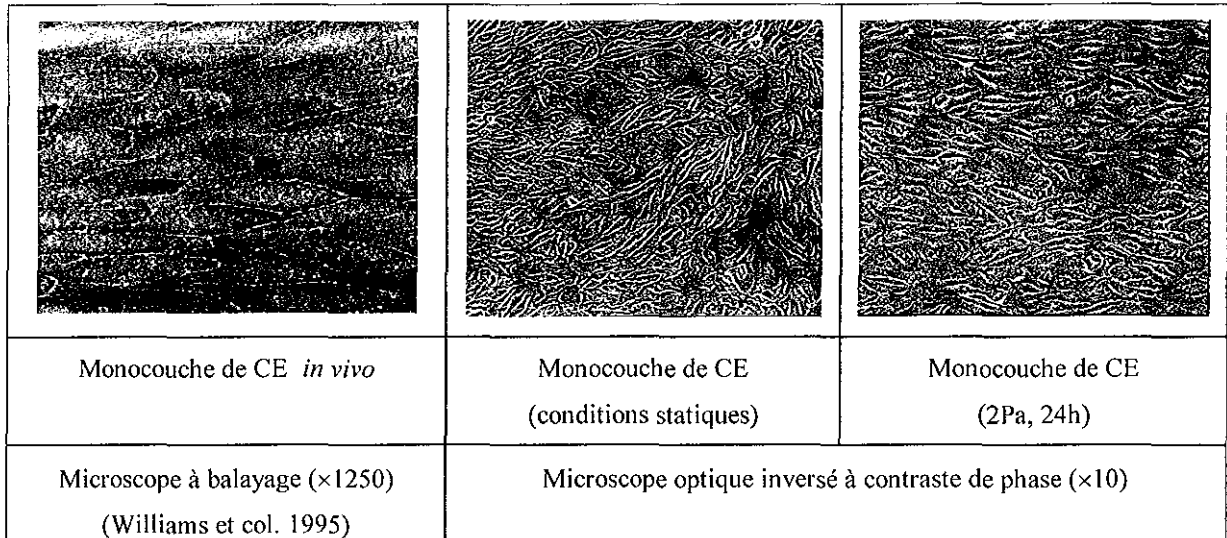
En 1968, Fry décrit des modifications de l'endothélium vasculaire en relation avec le gradient de vitesse pariétal (Fry 1968). En 1981, Dewey et col. parlent d'une réponse dynamique des CE vis-à-vis des forces de cisaillement (Dewey et col. 1981) et Nerem et col. suggèrent que la morphologie de CE peut être un indicateur de la condition hémodynamique locale (Nerem et col. 1981). Au cours des dix dernières années, l'influence des conditions hémodynamiques locales sur les CE a suscité un intérêt croissant. Des travaux plus récents ont souligné le rôle déterminant des conditions locales d'écoulement sur leurs propriétés (Reinhart 1994, Davies et col. 1997-a, Ballermann et col. 1998). Il est maintenant admis de parler d'un phénomène de mécano-transduction.

Les différents travaux publiés dans ce domaine ont tenté de mieux comprendre le rôle des CE dans la physiologie et la pathologie vasculaire et plus particulièrement dans l'athérosclérose. Actuellement, on pense que l'endothélium est une interface sensible aux contraintes de cisaillement et jouerait le rôle d'acteur principal dans les processus de la mécano-transduction du signal afin de réguler la vasomotion et la fonctionnalité de la paroi vasculaire (Davies et col. 1997-b). Aussi, ni la morphologie ni la fonctionnalité des CE n'échappent à l'influence des contraintes mécaniques.

#### I.1.3.1. Morphologie des cellules endothéliales

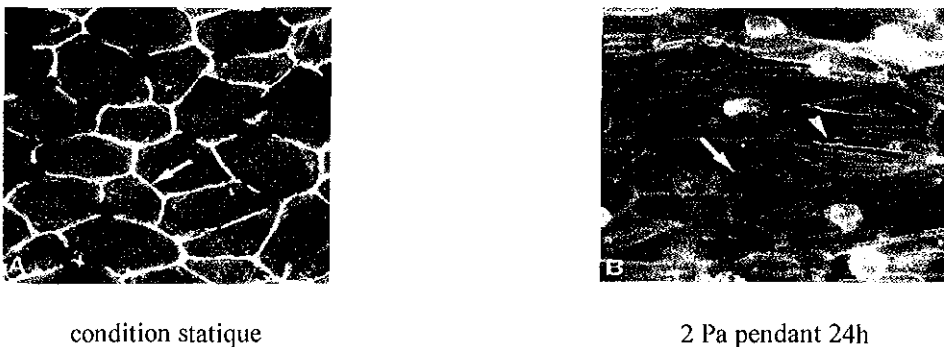
Les changements morphologiques, correspondant à l'allongement et à l'orientation des CE parallèlement à la direction de l'écoulement et la réorganisation de cytosquelette, sont responsables de la motilité et de l'adhésion cellulaire (Dewey et col. 1981, Nerem et col. 1981, Ookawa et col. 1993, Thoumine et col. 1995, Cucina et col. 1995). A faible contrainte de cisaillement, aussi bien *in vivo* que *in vitro*, les CE montrent une forme polygonale et sont

moins allongées en comparaison avec des CE soumises à une forte contrainte de cisaillement (Franke et col. 1984, Walpola et col. 1993, Drenckhahn et Ness 1997) (Figure I-6). Par ailleurs, les changements morphologiques des CE sont variables selon leur localisation dans les vaisseaux (branchements, bifurcations) et les conditions d'écoulements (laminaire, perturbé, présence de vortex, etc.) (Davies et col. 1986, Helmlinger et col. 1991, Sato et Ohshima 1994, Truskey et col. 1995, Chiu et col. 1998).



**Figure I-6.** Influence des contraintes mécaniques sur la morphologie des CE.

Tous les éléments du cytosquelette (filaments d'actine, microtubules, filaments intermédiaires, protéines cytosquelettaires telles que la e.g. vinculine) présentent une réorganisation lors de l'application d'une contrainte de cisaillement (Figure I-7).



**Figure I-7.** Organisation des fibres d'actine du cytosquelette *in vivo*, marqués par la phalloïdine (Drenckhahn et Ness 1997).

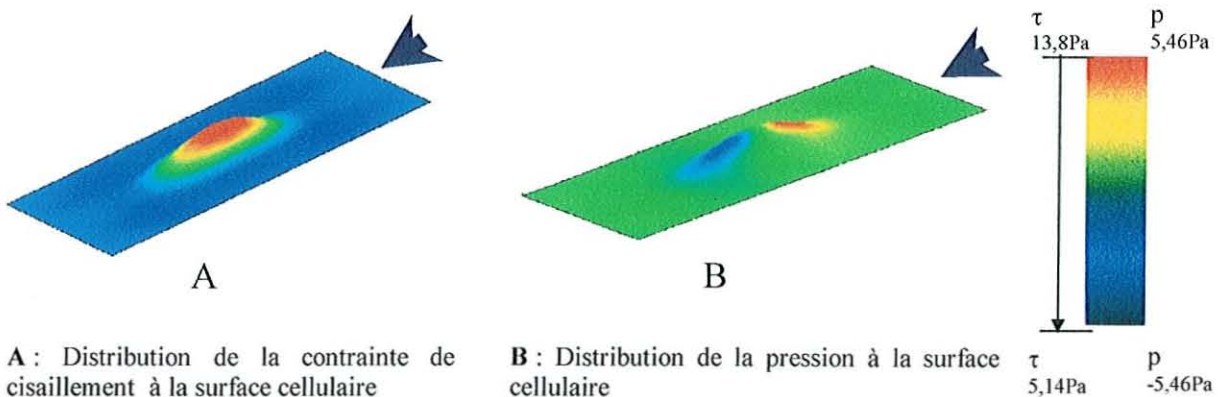
Cette réorganisation du cytosquelette en fonction du temps est influencée par l'amplitude et la durée de la contrainte de cisaillement (Sato et Ohshima 1994, Girard et

Nerem 1995, Galbraith et col. 1998). Les CE au repos montrent des bandes périphériques denses (DPB), les fibres de stress se terminant dans les régions des DPB. Les vinculines sont associées aux extrémités des filaments d'actine à la périphérie et à celles des fibres de stress. Après un cisaillement prolongé, les CE se sont allongées dans le sens de l'écoulement. Dans la cellule, de même que la redistribution des fibres de stress et des microtubules, on observe l'alignement des faisceaux de filaments intermédiaires suivant la direction de l'écoulement.

### I.1.3.2. La mécano-transduction

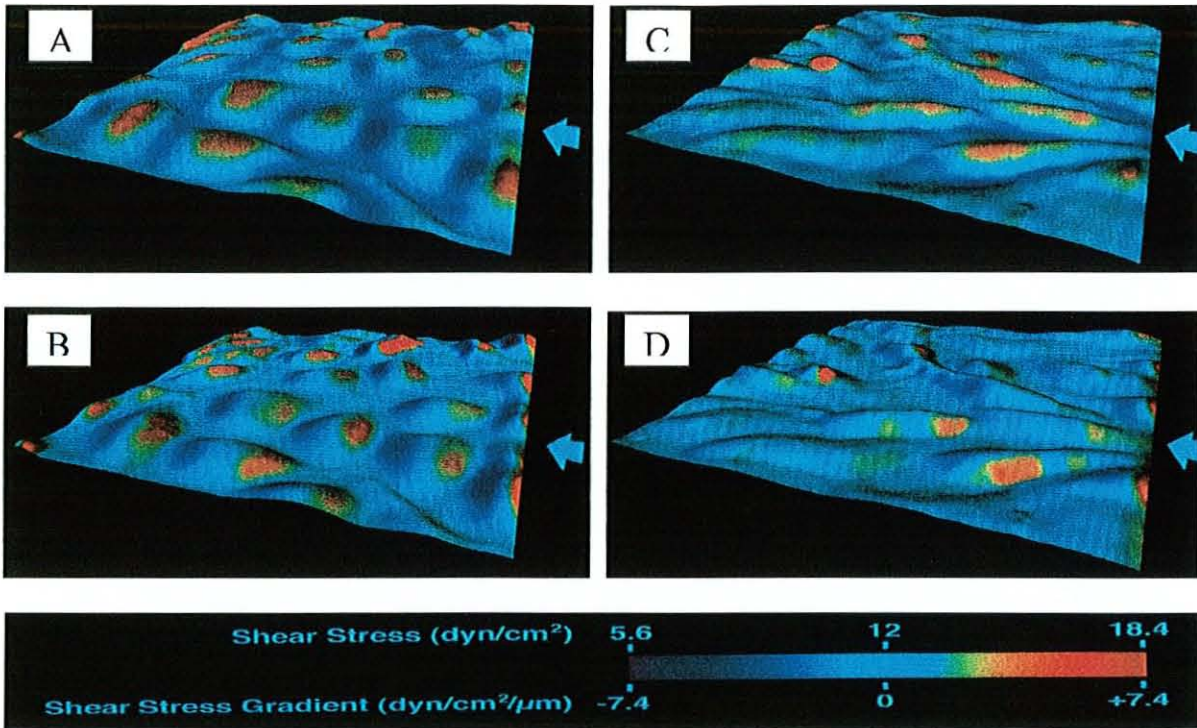
#### a). Distribution de contraintes mécaniques

La distribution des contraintes hémodynamiques à la surface cellulaire et dans la cellule est fonction de la forme 3-D des cellules. Barbee et col. ont simulé numériquement l'écoulement près d'une monocouche endothéliale obtenue par microscopie à force atomique (AFM). Dans des conditions statiques, les frontières cellulaires sont visibles et la hauteur moyenne des ondulations (entre le point le plus haut et le point le plus bas aux jonctions cellulaires) est de l'ordre de quelques micromètres ( $\approx 6\mu\text{m}$ ). Quand les CE sont exposées à un écoulement ( $12\text{dynes/cm}^2$ , 24h), elles s'alignent avec la direction de l'écoulement. Une diminution significative de l'amplitude des ondulations a également été trouvée. Le maximum de la contrainte de cisaillement est au sommet des cellules aussi bien pour les cellules de contrôle que pour celles soumises au flux. Mais les zones exposées aux maxima de la contrainte de cisaillement et du gradient de contrainte de cisaillement sont plus petites sur les cellules alignées que sur celles non-alignées (Barbee et col. 1995, Davies et col. 1997-a et b). Des études réalisées au laboratoire confirment ces données (Figures I-8 et I-9).



**Figure I-8.** Distributions de la contrainte de cisaillement et de la pression à la surface d'une CE. La contrainte pariétale moyenne=5Pa (Waché 2000). La flèche représente le sens de l'écoulement.





**Figure I-9.** Distribution de la contrainte de cisaillement à la surface de la CE (Barbee et col. 1995). A et B: CE avant déformation; C et D: CE allongées soumises à une contrainte de cisaillement moyenne de 12 dyn/cm<sup>2</sup> pendant 24h; A et C: la distribution de la contrainte de cisaillement; B et D: la distribution du gradient de la contrainte de cisaillement.

Il est proposé que les variations de la distribution de contrainte de cisaillement peuvent aider à expliquer les différentes réponses endothéliales aux écoulements. La monocouche endothéliale étant hétérogène, la sensibilité d'une cellule peut être déterminée par la fraction de surface exposée à une contrainte au-dessus d'un certain seuil critique.

En plus des variations de la distribution des contraintes entre les cellules, la distribution des forces subcellulaires est variable dans l'espace. Dans ce cas, la localisation des éléments mécano-sensibles est un facteur clé si le nombre de ces éléments est limité.

De ce point de vue, on peut imaginer que la sensibilité d'une cellule est déterminée par sa forme ainsi que par la localisation et l'activation de ses éléments mécano-sensibles. Cependant, il faut considérer également l'hétérogénéité des propriétés biologiques cellulaires. Ainsi quand on étudie les changements de cellules exposées à des contraintes mécaniques, un nombre suffisant de cellules doit être observé dans chaque écoulement.

Si on accepte l'hypothèse de la présence de récepteurs sensibles au flux répartis à la surface membranaire, leur distribution devient un facteur important: un récepteur membranaire sera sensible à l'écoulement selon qu'il se trouve ou non dans une zone de

grande contrainte. Par conséquent, un écoulement particulier peut ne pas provoquer une réponse cellulaire si ses récepteurs sont localisés dans une zone où la contrainte est inférieure à un certain seuil (Satcher et col. 1992, Barbee et col. 1995, Davies et col. 1997-a et b).

Les mécanismes par lesquels les CE identifient les forces des contraintes de cisaillement et les convertissent en des signaux électro-physiologiques et biochimiques demeurent encore imprécis.

La réponse des CE à des stimuli mécaniques concerne pratiquement tous les mécanismes liés à la croissance et au métabolisme cellulaire. Tous les produits dérivés de l'endothélium sont régulés par les contraintes mécaniques développées par l'écoulement sanguin, *via* un phénomène de "mécano-transduction". Mais le mécanisme de la mécano-transduction reste hypothétique: comment et par quels "capteurs" les CE reçoivent-elles les stimuli mécaniques et les convertissent-elles en des signaux biochimiques ?

#### **b). Les mécano-récepteurs**

Les molécules présentes à la surface luminale cellulaire sont les candidats idéaux car elles sont en contact direct avec le sang circulant. Ces molécules peuvent être activées directement par un déplacement physique (changement conformationnel) ou indirectement par transfert de gradients (qui changent les interactions ligand-récepteur) (Davies et Tripathi 1993, Nollert et col. 1991). Ces structures membranaires ou mécano-récepteurs incluent les intégrines, les canaux ioniques, les protéines G liées aux récepteurs et les récepteurs tyrosine kinase (Davies 1995).

Ces mécano-récepteurs peuvent générer des cascades de réponse du côté cytoplasmique de la membrane plasmique, grâce à des seconds messagers biochimiques (mode centralisé de la mécano-transduction). Ainsi l'activation des protéines kinases est suivie de la stimulation de facteurs de transcription cytosolique, et/ou de la régulation de la transcription génique au niveau du noyau (Patrick et McIntire 1995).

Une autre voie de transduction du signal induit par le flux est liée à l'interaction des mécano-récepteurs activés par le flux avec les éléments cytosquelettiques. En utilisant un mode "décentralisé" de mécano-transduction, la transmission du signal peut se faire *via* des connections avec le cytosquelette (sites d'adhésion focale, jonctions cellule-cellule, membrane nucléaire) et conduit à une plus grande diversité des réponses cellulaires.

Certaines de ces réponses générées par des molécules de signalisation intracellulaire (seconds messagers) sont rapides, de l'ordre de la seconde ou de la minute (min) tels que les changements de la perméabilité ionique, la production d'inositol trisphosphate (IP-3), la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et l'activité de l'adénylate cyclase (AC). D'autres réponses se développent dans les heures suivant la naissance du signal (expression du gène cible, redistribution du cytosquelette et changement de la forme de la cellule) (Davies et Tripathi 1993, Resnick et Gimbrone, 1995).

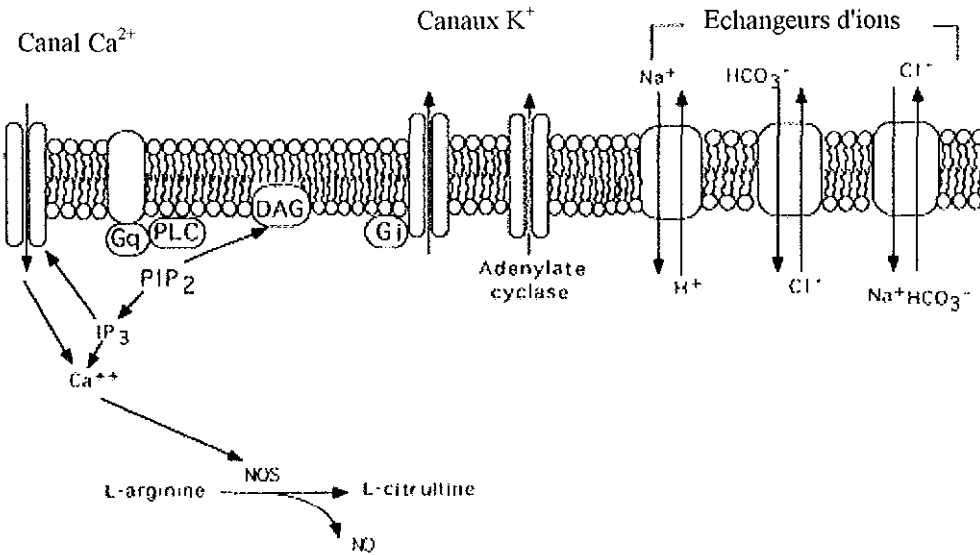
- *Les canaux ioniques*

La double couche lipidique des membranes cellulaires a une haute perméabilité pour les molécules polaires de petite taille et les molécules hydrophobes tandis qu'elle est hautement imperméable aux ions et aux molécules chargées. Des protéines membranaires spécialisées (canaux et transporteurs) sont responsables du transfert spécifiques d'ions à travers la membrane. Ainsi de nombreux canaux recouvrent la surface luminale de l'endothélium mais il n'a pas encore été déterminé si l'activation des canaux ioniques est secondaire à l'activation des mécano-récepteurs en amont ou si elle résulte d'une altération conformationnelle des protéines dont les canaux ioniques. Les canaux ioniques et les échangeurs d'ions sont donc de potentiels mécano-récepteurs (Davies 1995) comme indiqué sur la Figure I-10.

Les canaux ioniques  $\text{K}^+$ , sensibles à l'étirement de la membrane, voient leur activité modifiée en réponse à une contrainte mécanique. Olesen et col. ont identifié un courant  $\text{K}^+$  sélectif activé par la contrainte de cisaillement. Ce courant membranaire hyperpolarisant se développe en fonction de la contrainte de cisaillement, atteignant la moitié de son maximum d'activation à  $0,7\text{dynes/cm}^2$  et la saturation à  $15\text{-}20\text{dynes/cm}^2$ . Il est rapidement activé par la contrainte de cisaillement (quelques secondes), augmente lentement (quelques minutes), et un retour complet à la normale est observé quand l'écoulement est arrêté (Olesen et col. 1988). Néanmoins, il n'est pas sûr que l'activation de ces canaux soit une réponse primaire à la contrainte de cisaillement.

De même, de nombreux canaux et échangeurs d'ions sont utilisés par le calcium. L'influx de calcium peut activer de nombreuses voies de signalisation en aval, dont une qui stimule notamment la production de NO et par conséquent la vasodilatation des vaisseaux (Himmel et col. 1993). Il a même été proposé que les mécanismes dépendant de la

concentration calcique intracellulaire pourraient jouer un rôle important dans les réponses précoces et transitoires, alors que les mécanismes indépendants des changements de  $[Ca^{2+}]_i$  sont importants dans les réponses lentes et prolongées (Berk et col. 1995).



**Figure I-10.** Représentation schématique des canaux ioniques et des échangeurs d'ions en tant que possibles mécano-transducteurs. (Papadaki et Eskin 1997)

- *Les intégrines*

Selon certains auteurs, il existerait des mécanorécepteurs de surface liés au cytosquelette, les intégrines. Le déplacement d'une intégrine transmembranaire pourrait communiquer la force au cytosquelette à travers des liens protéine/protéine du côté cytoplasmique de la membrane.

Par exemple, le récepteur de matrices extracellulaires, l'intégrine  $\beta_1$ , peut induire une formation d'adhésion focale induisant un signal contrainte-dépendant. La rigidité cytosquelettique augmenterait avec la contrainte appliquée, ce qui nécessiterait des microtubules intacts ainsi que des filaments intermédiaires et des microfilaments (Wang et col. 1993).

D'autres études montrent également que la contrainte de cisaillement intervient sur la morphologie cellulaire et l'organisation de F-actine par des protéines associées aux points focaux d'adhésion (Girard et Nerem 1995).

Une étude récente a montré que certaines intégrines ( $\alpha\beta3$ ,  $\beta1$  et  $\beta5$ ) sont des récepteurs cellulaires sensibles au flux chez les CE, induisant une transduction du signal et que l'application d'un flux induit l'association intégrine-shc (Chen et col. 1999), l'assemblage de complexe de signalisation cellulaire et l'activation de la JNK (Li et col. 1997).

Ainsi l'ensemble des protéines cytosquelettiques (filaments d'actine, microtubules, filaments intermédiaires) pourrait participer au mécanisme de mécano-transduction qui reste aujourd'hui à préciser.

- *Les protéines G*

La stimulation de nombreux récepteurs membranaires est retransmise par une classe de protéines spécifiques, liant le GTP (Guanosine Tri-Phosphate), appelées les Protéines G. Elles opèrent le couplage des récepteurs avec les effecteurs intracellulaires, et à ce titre exercent un contrôle important sur la transmission du signal. Les interactions entre les récepteurs et leurs seconds messagers sont médiées par des enzymes ou des canaux ioniques activés par la liaison à des protéines G.

Les protéines G sont des protéines hétérotrimériques, composées d'une sous-unité  $\alpha$  fermement liée au dimère  $\beta\gamma$ . La sous-unité  $\alpha$  se lie au GTP, l'hydrolyse en GDP (Guanosine Di-Phosphate) puis régule la réponse de la plupart des effecteurs. Un récepteur couplé à une protéine G au repos est activé par la liaison d'un agoniste spécifique. Le changement de conformation du complexe agoniste-récepteur, induit par cette liaison, permet l'activation de l'échange du GDP par du GTP et donc l'activation des sous-unités  $G\alpha$  et  $G\beta/\gamma$  intracellulaires qui vont aller réguler l'activité de divers effecteurs membranaires ou cytosoliques. Le déclenchement de l'activité phosphatase, intrinsèque à la sous-unité  $G\alpha$ , entraîne la réassociation des sous-unités  $G\alpha$  et  $G\beta/\gamma$  et le retour à l'état initial. Ces différentes étapes sont illustrées sur la [Figure I-11](#).

L'amplification du signal porté par un modulateur extracellulaire a lieu en fait à deux niveaux; tout d'abord au niveau du récepteur activé qui peut activer de nombreuses protéines G les unes à la suite des autres; ensuite au niveau de la sous-unité  $\alpha$ -GTP qui peut maintenir le système amplificateur activé tant que le GTP n'est pas hydrolysé en GDP.

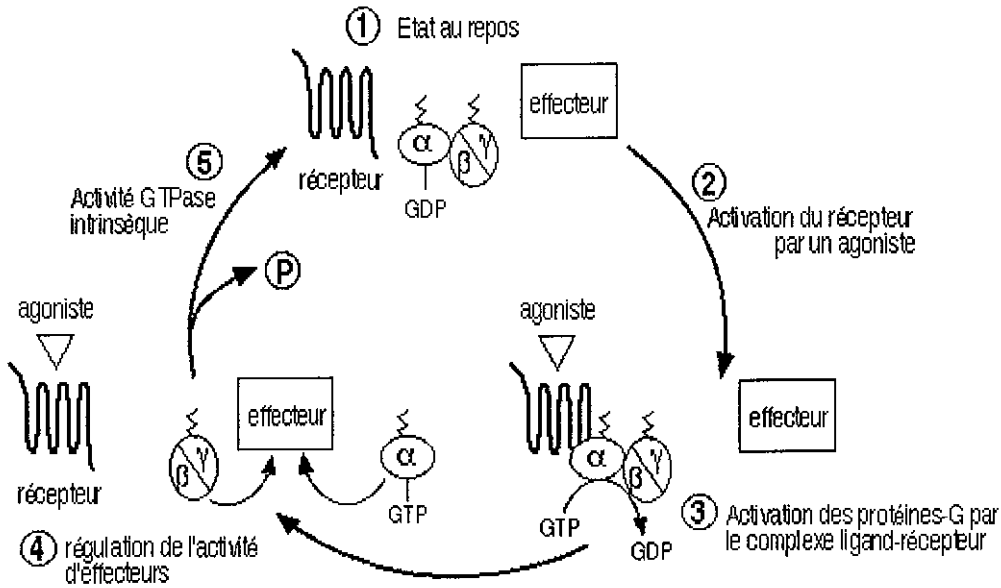


Figure I-11. Activation des protéines-G: le cycle GTPase.

Les protéines G se classent en trois différentes sous-classes (Simon et col. 1991) (Figure I-12) :

- protéines G<sub>q</sub>, activant la phospholipase C (PLC)
- protéines G<sub>s</sub>, activant les canaux calciques et l'AC
- protéines G<sub>i</sub>, qui inhibent l'AC et qui semblent être impliquées dans la stimulation des canaux K<sup>+</sup> au niveau de l'endothélium

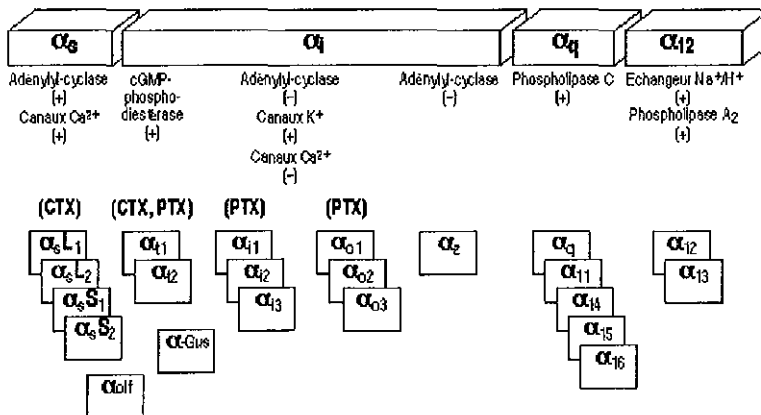
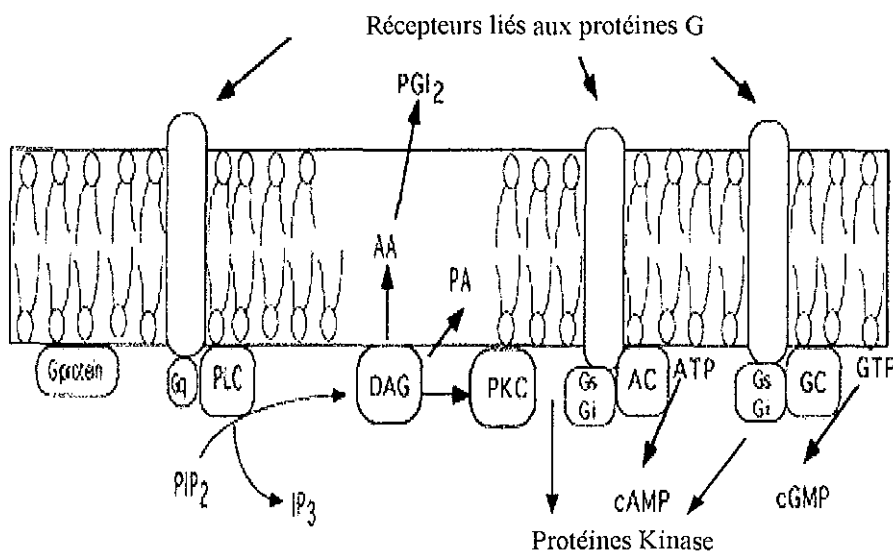


Figure I-12. Diversité des sous-unités Gα des protéines-G.

Récemment, un nouveau rôle pour les protéines G hétérotrimériques dans les voies de signalisation a été proposé. Elles seraient responsables des changements induits par les contraintes de cisaillement (Gudi et col. 1996). En effet, cette étude a montré que l'activation de la protéine G fait partie d'un des événements les plus précoces dans les événements de signalisation induits par le flux. A la suite de ces travaux, une nouvelle étude a mis en évidence des changements sélectifs et spécifiques à la nature de la protéine G stimulée, corrélés avec les changements dans la signalisation du signal et la fonctionnalité de la protéine G (Redmond et col. 1998).

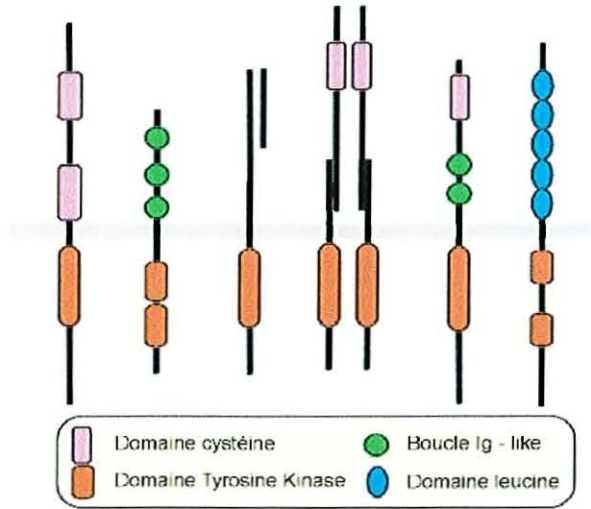
Ainsi, les récepteurs liés aux protéines G sont considérés comme de potentiels mécano-transducteurs et, en aval, comme des éléments de signalisation (Figure I-13).



**Figure I-13.** Représentation des récepteurs liés aux protéines G et des signaux intracellulaires associés à leur activation par les contraintes de cisaillement (Papadaki et col. 1997).

- *Les récepteurs tyrosine-kinase (RTK)*

Ce sont des protéines transmembranaires qui, après stimulation, induisent des voies de signalisation. Les caractéristiques qu'ils ont en commun sont la présence d'un segment transmembranaire unique et d'un domaine intracellulaire possédant une activité catalytique de type protéine tyrosine-kinase. Le domaine extracellulaire varie considérablement comme illustré dans la Figure I-14.



**Figure I-14.** Représentation schématique des différents types de récepteurs tyrosine-kinase.

La liaison du ligand entraîne la dimérisation des récepteurs. La dimérisation permet que l'activité kinase portée par chacune des deux chaînes intracellulaires rencontre la séquence cible adjacente portée elle aussi par chacune des deux chaînes. Ceci permet une phosphorylation croisée inter-moléculaire de plusieurs résidus tyrosine. Le dimère phosphorylé représente le récepteur activé. Il possède toute une série de résidus tyrosine phosphorylés qui ont la capacité de se lier à des protéines pour former des complexes de signalisation. De plus, le récepteur dimérisé et phosphorylé a le potentiel de phosphoryler ses cibles.

L'analyse des séquences qui se lient aux récepteurs phosphorylés a montré que la plupart d'entre elles, mais pas toutes, contiennent des domaines SH2. D'autres contiennent des domaines PTB (PhosphoTyrosine Binding Protein). En conclusion, l'assemblage des complexes de signalisation dépend du recrutement par les tyrosines phosphorylés des récepteurs de protéines possédant des domaines SH2 ou PTB. De nombreuses protéines contenant des domaines SH2 s'associent aux RTK pour former des complexes. Certaines de ces protéines sont elles-mêmes phosphorylés à l'issue de cette association.

En conclusion, les contraintes mécaniques activeraient des capteurs mécano-sensibles, tels que les récepteurs de surface, les canaux ioniques, les points focaux d'adhésion et le cytosquelette. Cette étape initiale se poursuivrait ensuite au niveau des seconds messagers, tels que le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, la protéine kinase C (PKC), la protéine G, l'Adénosine monophosphate (AMP) cyclique et la guanosine monophosphate (GMP) cyclique, etc., qui



subissent à leur tour des perturbations. Ces modifications profondes de l'équilibre des seconds messagers entraîneront alors un changement de l'état d'activation des "DNA binding factors" (Hsieh et col. 1992, Morita et col. 1994, Kuchan et Frangos 1994).

L'étape finale se résume alors dans une altération de l'activité de transcription de nombreux gènes via des éléments de réponse aux contraintes de cisaillement locales tel que le Shear Stress Response Element (SSRE) positifs ou négatifs, ou une combinaison des deux, agissant à différentes étapes (Figure I-15).

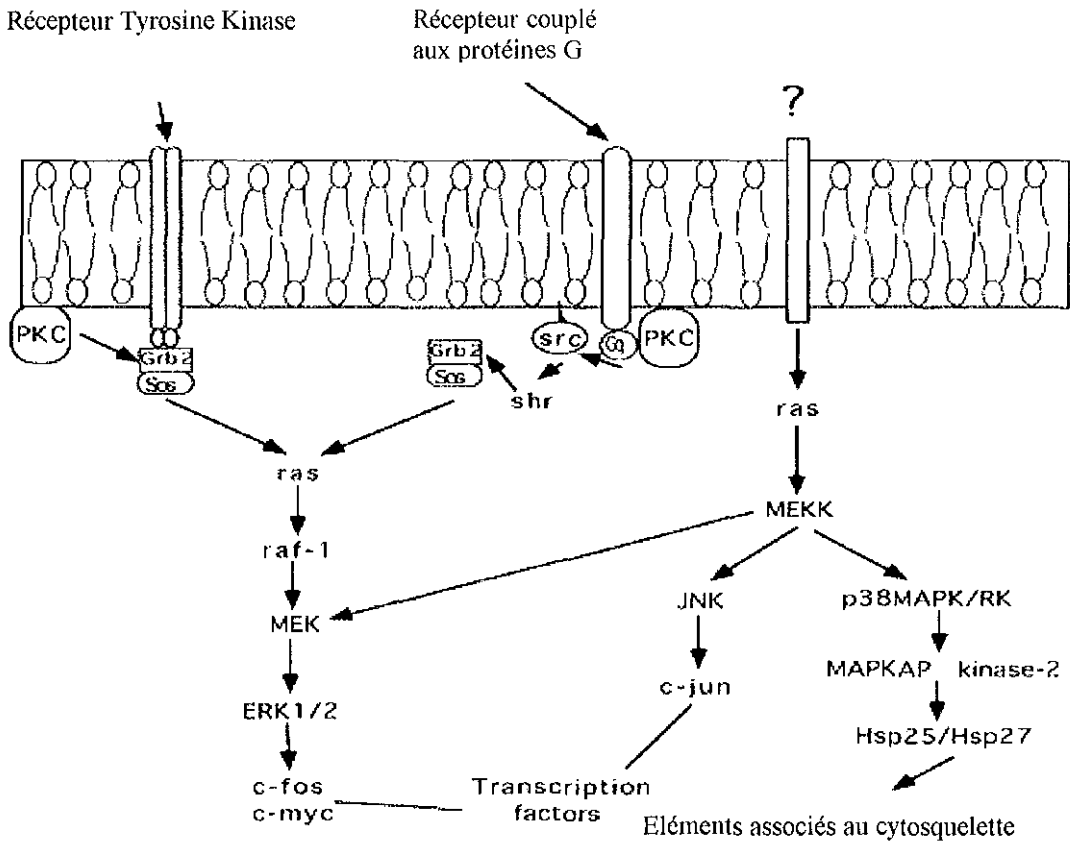


Figure I-15. Représentation des voies de signalisation activées par les récepteurs Tyrosine-Kinase (Papadaki et Eskin 1997).

c). Les réponses des CE aux contraintes de cisaillement

Depuis une quinzaine d'années, la réponse des CE à des contraintes mécaniques a été largement étudiée et les variations d'un grand nombre de fonctions cellulaires ont été rapportées (électrophysiologique, biochimique, récepteurs, régulation de gène, etc.) (Reinhart 1994, Davies et col. 1997-a). Les effets de cisaillement brutal ou chronique ont été très étudiés *in vitro* (Ballermann et col. 1998, Braddock et col. 1998). Les diverses réponses

endothéliales aux contraintes mécaniques peuvent être classées en fonction du temps de réaction, bien qu'elles soient souvent simultanées. Par exemple, les changements électrophysiologiques rapides du potentiel membranaire (de l'ordre de la seconde) et l'activation des cascades biochimiques montrent un temps caractéristique similaire. L'activation de protéine G, la libération de NO, la mobilisation des dérivés phosphoinosides, la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, la phosphorylation de nucléotide cyclique, etc, nécessitent des temps de réponses plus longs. Les modifications structurelles, comme la réorganisation de filaments d'actine et la morphologie cellulaire apparaissent beaucoup plus tard dans la séquence des événements de mécano-transduction.

Les Tableau I-1a et I-1b résument les principales réponses des CE aux contraintes de cisaillement pour les différents temps caractéristiques.

**Tableau I-1a.** Réponses précoces des CE à la contrainte de cisaillement.

Temps	Réponses	Signification physiologique	Références
secondes	Activation du canal $\text{K}^+$	- ouverture des canaux $\text{K}^+$ sélectifs - favoriser l'entrée du calcium	Olesen et col. 1988
	Activation des messagers secondaires (IP <sub>3</sub> , DAG, $\text{Ca}^{2+}$ , PKC, protéine-G, ...)	- activation de la transduction du signal (e.g. activation de la voie $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante)	Prasad et col. 1993 Bhagyalakshmi et col. 1992 Shen et col. 1992 Helmlinger et col. 1995 Hsieh et col. 1992 Berthiaume et Frangos 1992 Kuchan et col. 1994
	Libération de NO	- vasorelaxation flux - dépendante	Kuchan et Frangos 1994 Gooch et Tennant 1997
minutes	Libération de PG	- vasodilatation et anti-thrombose	Frangos et col. 1985
	Activation de MAP kinase	- transduction du signal	Tseng et col. 1995
	Activation de NF $\kappa$ B Régulation de PDGF-B SSRE-dépendant	- activation de la transcription - régulation de la croissance cellulaire	Mohan et col. 1997 Hsieh et col. 1991

**Tableau I-1b.** Réponses tardives des CE à la contrainte de cisaillement pour les différents temps.

Temps	Réponses	Signification physiologique	Références
>1h	Régulation SSRE-dépendante (PDGF, NOS, tPA, TGF $\beta$ 1, ICAM-1, c-fos, MCP-1, etc.)	- régulation de la croissance cellulaire - vasorelaxation flux - dépendante - augmentation de l'activité fibrinolytique - adhésion cellulaire - transduction du signal - recrutement de monocytes	Hsieh et col. 1991 Xiao et col. 1997 Diamond et col. 1989 Diamond et col. 1990 Ohno et col. 1992 Nagel et col. 1994 Sampath et col. 1995 Hsieh et col. 1993 Shyy et col. 1994
>6h	ET-1: augmentation (faible cisaillement) ; diminution (>0.6Pa)	- vasoconstriction	Kuchan et Frangos 1993
	VCAM-1: diminution	- adhésion cellulaire	Ando et col. 1994
	Réarrangement du Cytosquelette Alignement des sites d'adhésion focale Augmentation de la connexine 43 Réarrangement des organelles cellulaires (MTOC, Golgi etc.)	- mécanisme dans les variations de la morphologie	Galbraith et col. 1998 Davies et col. 1994 Davies 1997-b
	Prolifération cellulaire Augmentation : écoulement turbulent ou perturbé Non changement ou diminution: écoulement laminaire	- prolifération de CE	Davies et col. 1986 Gooch et Tennant 1997
	Changement de la morphologie (>12h) Réarrangement de Fn	- adaptation au flux	Davies 1997-b Barbee et col. 1995 Wechezak et col. 1985
	Régulation négative de Tm	- anti-thrombose	Malek et col. 1994
>24h	Augmentation de la rigidité de la surface cellulaire	- diminution de la déformabilité de la surface cellulaire	Sato et col. 1987
	Alignement et élongation des CE	- morphologie adaptée au flux	Girard et Nerem 1995 Galbraith et col. 1998

IP<sub>3</sub> : inositol triphosphate ; DAG : diacylglycerol ; PKC : protein kinase C ; NF $\kappa$ B : nuclear factor kappa B ; MAP : mitogen-activated protein ; SSRE : shear stress response element ; PDGF-B : platelet derived growth factor B chain ; bFGF : basic fibroblast growth factor beta ; NO : nitric oxide ; PG : prostaglandins ; NOS : nitric oxide synthase ; tPA : tissue plasminogen activator ; TGF $\beta$  : transforming growth factor beta ; ICAM-1 : intercellular adhesion molecule-1 ; MCP-1 : monocyte chemoattractant protein-1 ; ET-1 : endothelin-1 ; VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule-1 ; Tm : thrombomodulin ; Fn : fibronectin.

#### d). Régulation génique

La régulation de l'expression génique de molécules synthétisées par les CE et responsables de sa fonctionnalité, comme l'ET-1 (Morita et col. 1994), le PAF (Diamond et col. 1990), le PDGF  $\alpha$  et  $\beta$  (Hsieh et col. 1991), la MCP-1 (Shyy et col. 1994), les molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1) (Nagel et col. 1994, Sampath et col. 1995, Ando et col. 1994), est influencée par l'écoulement. Par exemple, le PDGF-B et le FGF sont surexprimés dans les CE et dans les cellules musculaires lisses (CML) vasculaires soumises à des forces de cisaillement. Resnik et col. ont montré que l'expression du PDGF-B dans les CE est dépendante d'une séquence de 12 nucléotides (SSRE) dans la région promotrice du gène du PDGF-B distincte de toutes les séquences servant de site de liaison aux facteurs transcriptionnels connus. Cette même équipe a montré qu'un autre gène, particulièrement intéressant du point de vue de l'inflammation, ayant cette séquence SSRE est également surexprimé dans les CE soumises à des forces de cisaillement: il s'agit du gène codant pour ICAM-1 alors que l'expression de VCAM-1 et de ELAM-1, dont les régions promotrices sont dépourvues de la séquence SSRE, n'est pas affectée dans les mêmes conditions. Ces faits suggèrent que les SSRE pourraient être présents dans la CE et activable par des mécanismes de mécano-transduction. Les autres facteurs de transcription qui participent à l'activation de promoteurs par la contrainte de cisaillement sont le facteur nucléaire kappa B (NF- $\kappa$ B), la protéine activatrice-1 (AP-1), le facteur de croissance précoce-1 (Egr-1) c-fos, c-jun, c-myc et de la protéine stable 1 (Sp-1) (Resnick et Gimbrone 1995, Gimbrone et col. 1997). Les variations observées dans la régulation génique suggèrent qu'il y a peut-être deux types d'éléments géniques sensibles aux contraintes de cisaillement (positif et négatif) et en plus, des régulations multiples en compagnie des autres facteurs transcriptionnels.

La réponse des CE sur l'expression génique aux contraintes de flux peut être classée en trois types:

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

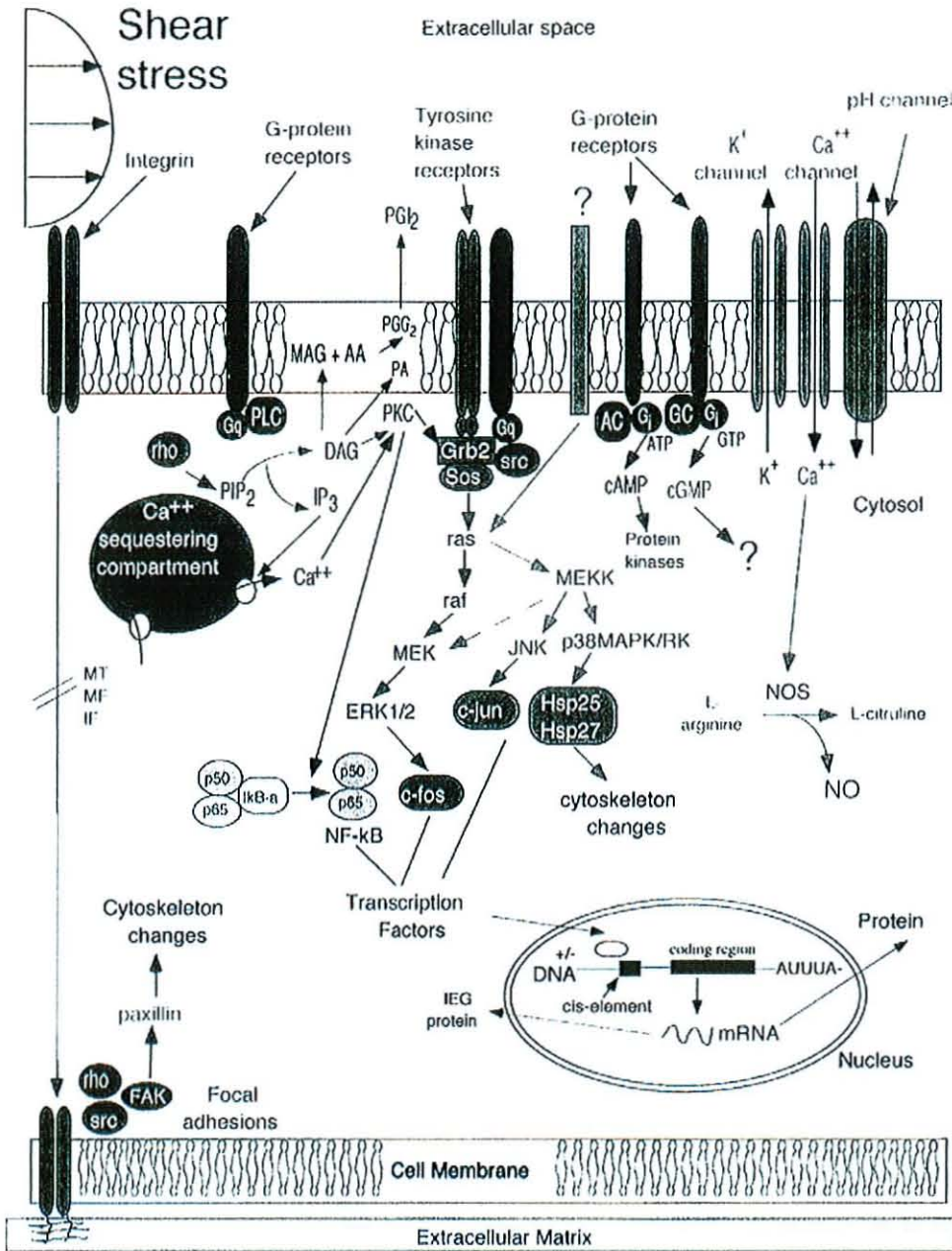
Le Tableau I-2 réunit les différents niveau de régulation de la transcription (niveau d'ARNm) des molécules par la contrainte de cisaillement.

**Tableau I-2.** Régulation de la transcription (niveau d'ARNm) des molécules par la contrainte de cisaillement (Braddock et col. 1998, Stoltz et col. 1999).

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

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

Papadaki et Eskin ont présenté, en 1997, un premier modèle récapitulant les voies de signalisation à "réponses multiples" activées par les contraintes de cisaillement au sein des CE. L'activation d'un ou plusieurs hypothétique(s) mécano-récepteur(s) induit des événements biochimiques qui conduisent à des changements intracellulaires au niveau de l'expression métabolique et génique de la cellule. Le modèle est présenté sur la [Figure I-16](#) mais il reste encore différentes étapes à éclaircir.



**Figure I-16.** Représentation schématique des multiples voies de signalisation activées par les contraintes de cisaillement appliquées à la surface de l'endothélium (Papadaki et Eskin 1997).

## I.2. Athérogénèse et contrainte de cisaillement

Si l'athérosclérose humaine a été étudiée depuis plus d'un siècle, c'est seulement ces dernières vingt années que le processus pathologique commence à être appréhendé grâce à des techniques en biologie cellulaire et moléculaire.

Le pathologiste Rudolf Virchow a donné naissance aux 2 grands courants de pensée sur la pathogénie et l'étiologie de l'athérosclérose en 1856 : certains produits dérivés du sang seraient absorbés directement à travers l'endothélium par l'intima et s'y déposeraient. Il pensait également qu'il y avait, à l'origine de l'imbibition de certains produits sanguins dans la paroi, un traumatisme endothélial provoqué par des facteurs mécaniques. A partir de ces pensées, différentes hypothèses ont été développées: l'hypothèse de dépôts de lipides; l'hypothèse de la réponse à l'effraction endothéliale, etc. Plus récemment, ce concept a été élargi jusqu'à inclure les altérations cellulaires et biochimiques dans la fonction endothéliale. On parle alors volontiers de « dysfonctionnement endothélial » (Ross 1981, Schwartz et col. 1993, Tedgui 1997, Traub et Berk 1998).

### I.2.1. Facteurs biochimiques

#### I.2.1.1. LDL (Low Density Lipoprotein)

Les LDL (lipoprotéines de faible densité), dont le rôle dans la pathogénie de l'athérosclérose est maintenant reconnu, ont des effets majeurs sur les fonctions endothéliales. Lorsque les LDL sont modérément oxydées, elles stimulent l'adhérence des monocytes aux CE en induisant l'expression des molécules d'adhésion, VCAM-1 et ICAM-1 (Tsao et col. 1996, Smalley et col. 1996, Haller 1997). Elles stimulent en outre la libération par les CE de puissants activateurs des monocytes qui sont le facteur chimiotactique MCP-1 et le facteur hématopoïétique M-CSF (monocyte-colony stimulating factor). De plus, les LDL oxydées deviennent cytotoxiques pour les CE, participant à la destruction de l'endothélium vasculaire et initiant le processus d'athérosclérose (Tedgui 1997, Berliner et col. 1997). Ces différentes étapes sont résumées sur la [Figure I-17](#).

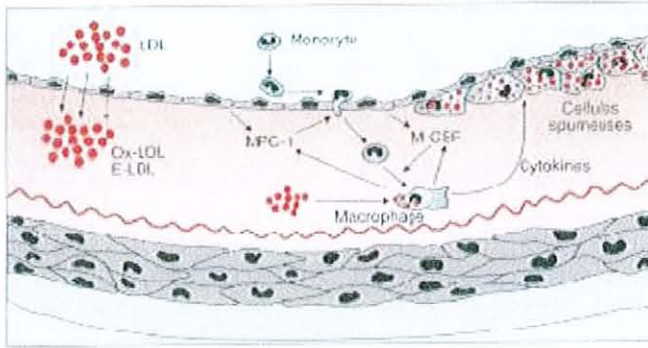


Figure I-17. Rôle des LDL dans le processus d'athérosclérose.

### I.2.1.2. Cytokines

Les cytokines pro-inflammatoires, dont le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 ou l'interféron  $\gamma$  (IF- $\gamma$ ), sont de puissants activateurs des CE. Présentes dans les plaques d'athérosclérose humaines, ces protéines peuvent pérenniser le processus athéromateux en agissant directement sur l'endothélium par altération de sa perméabilité, et ses propriétés antiadhésives et anticoagulantes. Le TNF- $\alpha$  et IF- $\gamma$  sont retrouvés dans le tissu athéromateux, alors qu'ils ne sont pas présents dans la paroi artérielle normale (Barath et col. 1990). L'IL-1 $\beta$  est exprimée dans les cellules spumeuses et les CE d'artères coronaires athéromateuses. Le gène codant MCP-1 est abondamment exprimé dans l'athérome, en particulier dans les macrophages et les cellules musculaires lisses de la plaque. Ces dernières pourraient ainsi participer activement au recrutement des monocytes sur le site athéromateux (Tedgui 1997). La Figure I-18 présente l'action des cytokines pro-inflammatoires.

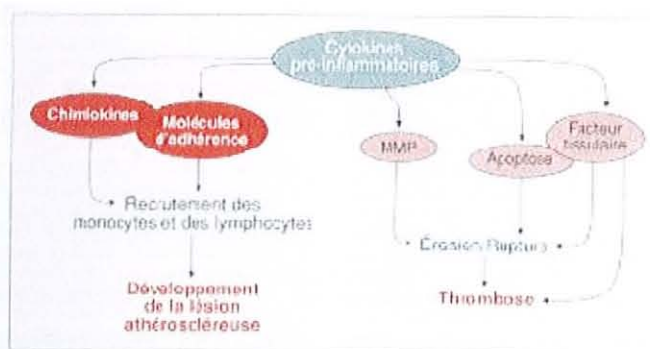


Figure I-18. Action des cytokines pro-inflammatoires.



### I.2.1.3. Infections

L'infection virale des CE a été récemment reconnue comme un facteur déclenchant possible de l'athérogénèse. La présence des herpès virus simplex (HSV) de type 1 et 2, du cytomégalovirus et de chlamydia pneumoniae a été rapportée dans les plaques athéroscléreuses. L'infection virale des CE augmente l'adhérence leucocytaire, en partie relayée par l'expression membranaire d'une néoglycoprotéine d'origine virale: la glycoprotéine C (Tedgui 1997).

### I.2.1.4. Autres composés

Par ailleurs, la concentration élevée du glucose (diabète) ou du fibrinogène dans le sang sont aussi des facteurs de risque de l'athérosclérose.

## **I.2.2. Cellules impliquées dans l'athérogénèse**

Au moins 2 types de cellules sanguines et 2 types de cellules vasculaires interviennent dans le processus d'athérogénèse : leucocytes (monocyte/macrophage et lymphocyte) et plaquettes pour le sang ; CE et CML pour le tissu vasculaire (Ross 1981).

Les CE jouent un rôle clé dans ce processus pathologique par leurs interactions avec les monocytes/macrophages, les plaquettes, ainsi que les lymphocytes T. Les produits dérivés des cellules sanguines (cytokines, interleukines, ...) peuvent activer les CE, les CML et les cellules sanguines.

L'endothélium intervient à plusieurs niveaux dans le processus d'athérogénèse:

- dans l'accumulation sous-endothéliale des lipoprotéines athérogènes, par sa perméabilité,
- dans l'accumulation des macrophages dans l'intima, par sa capacité à déclencher le recrutement et l'adhérence des monocytes circulants lorsqu'il est activé,
- dans le vasospasme, lorsque ses propriétés vasodilatatrices sont altérées,
- dans la formation du thrombus, lorsqu'il est érodé (Tedgui 1997).

### I.2.2.1. Leucocytes

L'adhésion des monocytes et lymphocytes circulants à l'endothélium vasculaire est un des événements les plus précoces observé dans l'athérome humain et l'athérome expérimental chez l'animal (Ross 1993, Schwartz et col. 1993, Stary et col. 1992). Les monocytes migrent ensuite dans l'espace sous-endothélial et se chargent en lipides qu'ils tentent d'éliminer pour aboutir aux macrophages spumeux, qui participent à la formation du noyau lipidique. La sécrétion par ces macrophages, mais également par les CML, de cytokines et de facteurs de croissance contribue à l'entretien du recrutement de cellules immuno-compétentes provenant en grande partie du sang circulant. Cette interaction entre monocyte et endothélium artériel est rendue possible grâce à des modifications de l'adhésivité endothéliale, qui impliquent l'expression de récepteurs endothéliaux (Cesarini et Tedgui 1997). Dans des conditions physiologiques, les leucocytes n'adhèrent qu'exceptionnellement à l'endothélium artériel; leur rôle est d'assurer une réponse immunitaire face aux agressions humorales représentées par des antigènes étrangers. L'adhésion a lieu essentiellement dans les veinules post-capillaires, où le flux sanguin est lent et les forces de friction faibles.

L'athérogénèse peut être considérée comme un processus inflammatoire chronique localisé dans la paroi artérielle dont les mécanismes de défense sont dépassés. Trois familles de molécules d'adhésion vont intervenir dans la cascade d'adhésion les sélectines, les intégrines et les membres de la superfamille des immunoglobulines (cf. chapitre I.1.1-2c).

#### a). la cascade d'adhésion

Cette cascade se divise en trois phases distinctes comme le montre la Figure I-19:

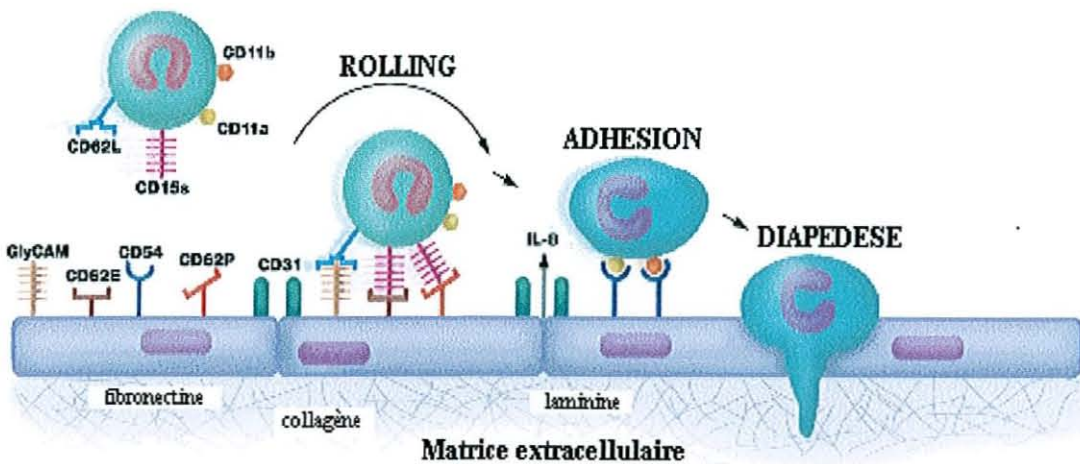


Figure I-19. L'adhésion et de la transmigration leucocytaire (Carlos et Harlan 1994).

- *Le roulement lent des leucocytes (rolling)*

Le contact initial avec la paroi des vaisseaux est en grande partie dû au hasard et peut-être induit par des altérations locales des caractéristiques du flux sanguin. Les leucocytes, et notamment les PNN, peuvent s'agréger entre eux lorsqu'ils sont activés par des agents chimiotactiques. Il s'agit d'une réaction transitoire de courte durée mais ces agrégats peuvent, sinon boucher les petits capillaires, du moins ralentir le débit sanguin. Il est possible que ce ralentissement joue un rôle dans la réaction d'adhérence des PNN avec l'endothélium. Après un premier contact les leucocytes roulent le long des parois vasculaires adjacentes jusqu'aux sites de lésion. Cette phase de rolling est le résultat de la combinaison des contraintes de cisaillement agissant sur les leucocytes de façon individuelle et d'une interaction adhésive des leucocytes avec l'endothélium. Des expériences, *in vitro* et *in vivo*, ont mis en évidence que les molécules impliquées dans cette étape sont les sélectines grâce à la reconnaissance des structures réceptrices carbohydrates sialyl-Lewis<sup>x</sup> (sLe<sup>x</sup>) rapidement exprimées aux sites d'inflammation (Carlos et Harlan 1994). Ces interactions sélectines/carbohydrates sont labiles et permettent aux leucocytes de rouler le long de l'endothélium vasculaire dans la direction du flux sanguin.

- *L'activation cellulaire*

Il s'agit d'une activation bidirectionnelle du PNN et de la CE, consistant en une variation de l'expression des intégrines leucocytaires et en une synthèse *de novo* des protéines d'adhésion endothéliales. L'activation des PNN est due à des stimuli exprimés à la surface des CE ou en solution, générés au niveau du site inflammatoire. L'accumulation des leucocytes, *in vivo*, serait sous la dépendance de stimuli inflammatoires générés par différents types cellulaires :

- les cellules tissulaires ou inflammatoires (protéines du complément, cytokines, ...)
- les micro-organismes (peptides formylés, lipopolysaccharides),
- les cellules endothéliales.

Cette activation se traduit par une augmentation de l'expression des intégrines  $\beta 2$  et par une perte de L-sélectine à la surface cellulaire (Simon et col. 1995). De plus, il existe des changements qualitatifs au niveau de l'avidité des récepteurs de l'adhésion: ceux-ci sont dans un état de faible avidité sur les leucocytes circulants et adoptent, après stimulation, un état de

haute avidité vis-à-vis de leurs ligands. De récentes études montrent que cette augmentation de l'avidité pourrait être régulée par deux mécanismes distincts:

- une augmentation de l'affinité des récepteurs pour leur ligand (Hynes 1992),
- des événements ayant lieu après la liaison au récepteur tels qu'une association du cytosquelette, des changements intracellulaires de pH et de flux calcique, la phosphorylation des tyrosines (Sugimori et col. 1997, Gahmberg et col. 1997).

Cette modulation de l'avidité permet aux leucocytes de circuler librement puis d'adhérer fermement aux sites inflammatoires afin d'empêcher la migration (Pardi, 1994). Le passage inactif-actif est associé à des changements conformationnels des domaines exoplasmiques des récepteurs tandis que les domaines cytoplasmiques des intégrines régulent l'affinité et les événements post-récepteur tels que la formations de points focaux et de fibres de stress importants dans l'adhésion ferme (Sugimori et col. 1997).

Quant à l'activation des CE, deux formes distinctes sont connues: la première est due à la stimulation par la thrombine ou l'histamine induisant ainsi une adhérence maximale. La deuxième survient plus tardivement après stimulation par les lipopolysaccharides, l'IL-1, le TNF- $\alpha$  ou l'IF- $\gamma$  et permet aux leucocytes de commencer la diapédèse (Carlos et Harlan 1994). Les chimioattractants ont été initialement reconnus par leur pouvoir d'induire une orientation et une cinétique du déplacement des PNN. En leur présence, le PNN change de forme par réorientation des éléments cytosqueletiques, des expansions cytoplasmiques apparaissent au pôle cellulaire frontal (lamellipode) et au pôle opposé (uropode) (Hughes et col. 1992).

- *L'adhésion ferme*

Cette étape consiste en une adhérence ferme due aux changements conformationnels et/ou numériques des molécules d'adhésion, notamment CD18 et ICAM-1. Cependant nombre de leucocytes liés fermement passent par la suite sous la surface lumineuse de l'endothélium pour atteindre les tissus sous-jacents, ce qui suppose une adhérence réversible c'est-à-dire une modulation cyclique de l'avidité des récepteurs aux intégrines.

Les molécules responsables de l'adhésion leucocytaire à l'endothélium sont répertoriées dans le Tableau I-3.

**Tableau I-3.** Principales molécules d'adhésion et leurs ligands impliquées dans les interactions CE/leucocytes.

Molécule	Distribution cellulaire	Ligand	Fonction
<b>Sélectines</b> E-sélectine (CD62E, ELAM-1)  L-sélectine (CD62L, LAM-1, MEL-14)  P-sélectine (CD62P, PADGEM, GMP140)	restreinte aux CE activées par des cytokines  tous les leucocytes  CE et plaquettes activées	sLe <sup>x</sup> , sLe <sup>a</sup> , ESL-1 PSGL-1  GlyCAM-1, CD34, MAdCAM-1  sLe <sup>x</sup> , sLe <sup>a</sup> , PSGL-1	Adhérence des leucocytes aux CE activées Adhésion des plaquettes aux leucocytes
<b>Intégrines</b> CD11a/CD18 (LFA-1, αLβ2)  CD11b/CD18 (Mac-1, CR3, αMβ2)  CD11c/CD18 (CR4, p150,95, αXβ2)  VLA-4 (CD49d/CD29, α4β7)	neutrophiles, lymphocytes, monocytes, macrophages, éosinophiles  neutrophiles, monocytes, macrophages, cellules NK  neutrophiles, monocytes, macrophages, lymphocytes, cellules NK  lymphocytes, monocytes, macrophages, cellules NK, thymocytes, éosinophiles	ICAM-1 (CD54) ICAM-2 (CD102) ICAM-3 (CD50)  ICAM-1 fibrinogène facteur X, iC3b  iC3b, fibrinogène  VCAM-1 Fibronectine MAdCAM-1 Invasine	Adhésion des monocytes, lymphocytes et polynucléaires éosinophiles aux CE
<b>Ig-SF</b> ICAM-1 (CD54)  ICAM-2 (CD102)  ICAM-3 (CD50)  VCAM-1 (CD106)  PECAM-1 (CD31)	CE, monocytes, cellules épithéliales, fibroblastes, cellules dendritiques  CE, lymphocytes, monocytes, cellules NK, plaquettes  Neutrophiles, monocytes, lymphocytes  CE activées par cytokines  CE, monocytes, neutrophiles, plaquettes, cellules NK	CD11a/CD18 CD11b/CD18  CD11a/CD18  CD11a/CD18  VLA-4  CD31 ?	Adhésion et migration leucocytaire

(Springer 1994, Carlos et Harlan 1994, Tedder et col. 1995)

MEL-14: anticorps monoclonal MEL-14; PADGEM: platelet activation-dependent granule-external membrane protein; GMP140: granule membrane protein-140; ESL-1: E-selectin ligand; PSEL-1: P-selectin glycoprotein ligand; GlyCAM: glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1; CR: complement receptor; NK: nature killer; iC3b : inactive complement 3b.

b). Les différentes implications cliniques des leucocytes

Les PNN agissent dans de nombreuses pathologies dans lesquelles les mécanismes d'adhésion sont directement impliqués. Parmi celles-ci citons en particulier:

- *LAD I (Leukocyte Adhesion Deficiency I)*

C'est une maladie héréditaire transmise selon le mode autosomique récessif. L'altération fonctionnelle des PNN consiste en un défaut d'adhérence à une surface ce qui se traduit par une insuffisance d'agrégabilité, de déplacement et de réponse métabolique des PNN à des particules solides. Ces anomalies résultent de l'insuffisance ou de l'absence de glycoprotéines responsables de l'adhérence les CD11a/CD18 et CD11b/CD18 due à l'absence d'expression de la chaîne  $\beta 2$  ou de son impossibilité à s'apparier à la chaîne  $\alpha$  (Anderson et Springer 1987, Arnaout et col. 1984). Ces PNN, déficitaires en CD18, peuvent entreprendre la phase de rolling sélectine-dépendante mais ne peuvent ni adhérer fermement aux CE ni assurer la migration trans-endothéliale qui sont des phases intégrines dépendantes. Il en résulte des infections bactériennes graves caractérisées par l'absence de pus et l'accumulation massive de polynucléaires neutrophiles dans le sang. Il existe différents stades de gravité selon le taux d'expression des molécules d'adhésion sur ces PNN atteints.

- *LAD II (Leukocyte Adhesion Deficiency II)*

Cette maladie est un syndrome complexe qui comporte aussi un retard mental. Il résulte d'un défaut d'interaction des leucocytes avec l'endothélium vasculaire secondaire à un défaut d'expression de résidus sucrés sLe<sup>x</sup> greffés sur des fucoses normalement présents sur les glycoprotéines ligands des sélectines (L, E et P sélectines). Ce déficit résulte d'un déficit enzymatique responsable d'un défaut de formation de fucose (Etzioni et col. 1992).

- *Inflammation aiguë*

De nombreuses situations comme les sepsis, les traumatismes, la chirurgie, les brûlures provoquent une réaction immunologique dans laquelle les cytokines et autres métabolites sécrétés entraînent une activation leucocytaire. L'étude des sepsis a montré une augmentation

de l'expression membranaire de CD11b à la surface des PNN ainsi qu'une corrélation entre cette expression et le rapport entre l'interleukine-1 et son récepteur. Cette observation corrobore le rôle de l'activation des PNN et de certaines cytokines dans les lésions tissulaires et microvasculaires (Lin et col. 1994). Concernant les lésions pulmonaires, il a été constaté une augmentation de la production de peroxyde d'hydrogène par les PNN associée à des taux circulants élevés de TNF- $\alpha$  (Chollet-Martin et col. 1992).

- *Inflammation chronique*

Au niveau membranaire il existe dans ce type de maladie inflammatoire une augmentation du taux de molécules d'adhésion CD11a/CD18 et CD11c/CD18 ou de CD11b/CD18 selon la pathologie considérée (Mc Carthy et col. 1992, Shakoor et Hamblin 1992).

- *Pathologies infectieuses*

Récemment, il a été mis en évidence une augmentation des molécules d'adhésion à la surface des leucocytes circulants lors de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) corrélée négativement au taux d'expression de CD4, molécule exprimée par les lymphocytes T helper. Cette constatation pourrait expliquer les anomalies au niveau de l'extravasation des leucocytes et leur agrégation qui sont observées lors de l'infection (Palmer et Hamblin 1993).

- *Pathologies vasculaires*

Lors de ces pathologies entraînant des altérations vasculaires, il a été noté une activation des PNN, des monocytes, des plaquettes et des CE, ainsi qu'une sécrétion de cytokines et une consommation de fibrinogène. Ces observations amènent à penser que l'activation cellulaire occupe un rôle central dans les phénomènes de coagulation sanguine. Deux hypothèses peuvent se dégager sur le rôle du PNN dans les lésions tissulaires (Ernst et col. 1987):

- libération de substances toxiques induisant des altérations de l'endothélium vasculaire,

- accumulation intra-vasculaire d'agrégats de PNN activés, oblitérant les capillaires.

- *Diabète*

Les causes des complications vasculaires sont multiples, incluant les phénomènes de phagocytose par les leucocytes avec une augmentation de l'expression de CD11b/CD18 et une diminution du chimiotactisme (Delamaire et col. 1995).

### I.2.2.2. Plaquettes

Les plaquettes ont un potentiel puissant vis-à-vis de la paroi, en particulier avec le facteur de croissance PDGF, actif sur la migration et la multiplication des cellules musculaires lisses et chémoattractif pour les leucocytes. Elles expriment, en outre, des enzymes, des facteurs agrégants, de l'ADP, de la sérotonine. Elles peuvent former du thromboxane A<sub>2</sub> (pro-agrégant) à partir d'acide arachidonique et faciliter la génération de thrombine sur leur membrane.

Cependant, leur action est limitée tant qu'il n'y a pas contact avec le sous-endothélium, et prédomine dans les régions de desquamation endothéliale, telles que les zones lésées (Cloarec 1996). Des plages de dénudation endothéliale peuvent donner naissance à un thrombus riche en plaquettes avec risque d'occlusion. Une rupture de plaque est responsable de 70% des thrombus graves, les 30% restant étant dus à une érosion endothéliale (Tedgui 1997).

Dans l'athérosclérose expérimentalement provoquée, si l'endothélium est endommagé mécaniquement (cathétérisation par ballon intra artériel, par exemple), une série d'événements va suivre l'adhésion et la dégranulation des plaquettes sur le site endommagé. On peut constater en particulier la migration, dans les premiers jours après la blessure, des cellules musculaires lisses depuis la média vers l'intima à travers les pores des lamina élastique. Par conséquent, ces cellules musculaires intimes prolifèrent et induisent un épaissement considérable de l'intima. Cette réponse de la prolifération intinale peut être empêchée si la fonction plaquettaire est inhibée par défaut de libération du PDGF.

Le vWF a un rôle important dans l'adhésion et l'agrégation plaquettaire. Une inhibition de la prolifération a été trouvée chez des cochons atteints de la maladie de von



Willebrand (déficiency génétique en facteur von Willebrand). Il a également été constaté que la thrombose occlusive dans l'artère coronaire peut être empêchée chez des modèles porcins par injection d'anticorps anti-vWF ou chez des porcins ayant la maladie de von Willebrand (Fuster et col. 1978, Nichols et col. 1986, Bellinger et col. 1987).

Dans le site intimal épaissi provoqué expérimentalement par un collier, on constate une augmentation de ARNm de vWF, un dépôt de vWF et des changements de la morphologie ultrastructurale des CE (augmentation des corps de WP et des réticulums endoplasmiques rugueux dans des CE), avec pour conséquence, un dépôt de plaquettes sur la paroi vasculaire. Cette augmentation de vWF est supposée liée à la contrainte de cisaillement locale. Il est possible que le dépôt de vWF dans la matrice intimale soit un indicateur de l'activation endothéliale (De Meyer et col. 1997 et 1999).

#### 1.2.2.3. Cellules musculaires lisses

Elles jouent un rôle important dans la progression de la plaque d'athérosclérose. Les CML dont la prolifération et la migration dans l'intima seraient favorisées par le PDGF, synthétisent à leur tour les protéines de la matrice interstitielle: élastine, collagène et protéoglycanes. Les CML s'associent alors aux cellules spumeuses et au tissu conjonctif synthétisé pour former le noyau lipidique (Schwartz et col. 1993, Tedgui 1997).

Tous ces points montrent que les CE jouent un rôle important dans le processus d'athérogénèse lorsqu'elles présentent un dysfonctionnement avec sur-expression membranaire des molécules d'adhésion pour les leucocytes et les plaquettes.

#### **1.2.3. Facteurs biomécaniques**

L'environnement hémodynamique, en particulier les forces de cisaillement agissant sur l'endothélium, est certainement un facteur de première importance pour expliquer l'implication de l'endothélium dans l'athérogénèse.

Il a été observé en clinique que l'athérosclérose apparaît généralement dans les zones de branchement, bifurcation dans des artères de grands ou moyens diamètres. Dans ces zones, l'écoulement sanguin est complexe, présentant souvent une zone de re-circulation et un cisaillement faible. Il a été ainsi suggéré que la modification de l'écoulement induisait ou

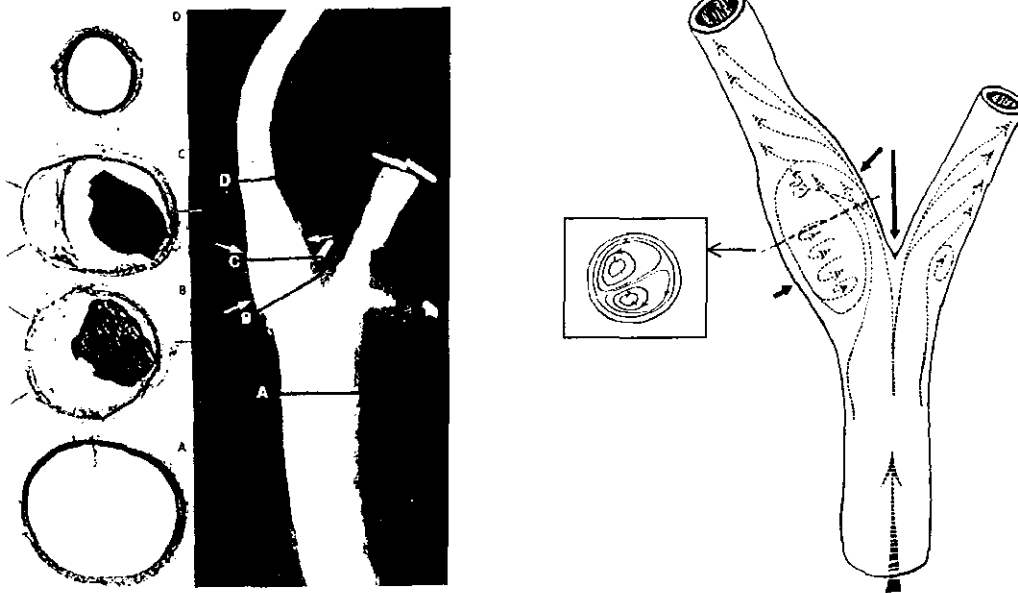
stimulait la formation de plaques intimes (Caro et col. 1969, Glagov et col. 1988, Nerem 1992).

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

Comme nous l'avons cité précédemment, les lésions d'athérosclérose apparaissent préférentiellement dans les régions de branchement ou d'une courbure prononcée. Des études de la co-localisation des sites de prédilection et de la contrainte de cisaillement ont été effectuées (Caro et col. 1969, Ku et col. 1985, Glagov et col. 1988).

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

Le fait que ce gradient soit plus critique dans la régulation de la fonction cellulaire est encore incertain, mais il est évident que la formation de plaques est bien corrélée avec une faible contrainte de cisaillement et une oscillation dans la direction du cisaillement. Dans les régions de cisaillement laminaire fort et unidirectionnel, les parois ne présentent pas d'irrégularité ou de lésions (Figure I-20).

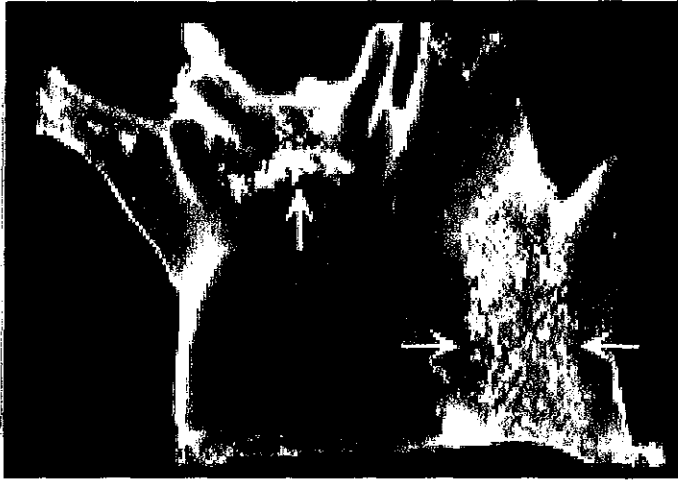


**A :** Bifurcation d'artère carotidienne d'un patient asymptomatique. Les flèches blanches indiquent le côté séparateur d'écoulement (flèche seule) et la paroi latérale (deux flèches). Très peu ou pas de plaque du côté séparateur d'écoulement. La formation de plaque se trouve souvent à la paroi latérale. Le sinus proximal (niveau B) et moyen (niveau C) sont souvent affectés, mais la carotide commune (niveau A) et la carotide interne distale (niveau D) sont épargnées.

**B :** Représentation schématique des contraintes de cisaillement d'artère carotidienne. Présence d'une zone d'écoulement complexe (re-circulation, écoulement secondaire) sur la paroi latérale de la carotide interne où la contrainte de cisaillement est plus faible. Par contre, l'écoulement reste laminaire et unidirectionnel du côté séparateur d'écoulement où la contrainte de cisaillement est plus importante.

**Figure I-20.** Localisation des plaques d'athérosclérose (A) et représentation de la distribution des contraintes de cisaillement (B) à la bifurcation d'artère carotidienne (Glagov et col. 1988).

Dans l'aorte humaine, on trouve souvent des plaques à l'entrée ou du côté proximal de l'orifice. L'entrée proximale d'une branche aortique est une région de faible cisaillement et d'écoulement complexe, tandis que le côté du diviseur d'écoulement présente un cisaillement relativement élevé. Les divisions d'artères brachiocéphaliques et la bifurcation aortique abdominale sont également des sites préférentiels de la formation de plaques. Les études récentes suggèrent que la faible contrainte de cisaillement, l'écoulement oscillatoire ou/et de séparation jouent un rôle important dans le processus pathogène (Chappell et col. 1998, Chiu et col. 1998, Traub and Berk 1998, Ziegler et col. 1998, Bao et col. 1999). La Figure I-21 présente des sites préférentiels de la formation de plaques chez la souris en tant que modèle d'athérosclérose.



**Figure I-21.** Sites préférentiels de la formation de plaques dans l'aorte.

Aorte de souris en modèle de déficience en apolipoprotéine E, nourrie par la diète "western-type". Les lésions blanches à la surface luminale de l'arc aortique sont visibles. Deux régions de développement de lésions sévères peuvent être constatées: la courbure moindre (à droite, entre les 2 flèches) et les orifices de l'artère brachiocéphalique (à gauche, flèche seule) (d'après Nakashima et col. 1994).

### I.3. Objectifs de notre travail

Les objectifs de ce travail sont d'étudier l'influence des forces mécaniques induites par l'écoulement sanguin, en particulier les contraintes de cisaillement, sur l'adhésion des PNN aux CE (notions de mécano-activation et de mécano-transduction) afin de mieux comprendre le mécanisme de l'athérogénèse.

Des expériences seront effectuées, *in vitro*, sur des CE et PNN à l'aide de chambres d'écoulement permettant de créer des flux laminaires. L'effet des contraintes de cisaillement sur les forces d'adhésion entre les deux types cellulaires et ensuite sur les voies de mécano-transduction chez les CE sera étudié. Ce travail de thèse comprend principalement 2 parties :

1. Caractérisation des forces d'adhésion des leucocytes à différents substrats
2. Coopération des récepteurs endothéliaux sensibles aux flux impliqués dans différentes voies de mécano-transduction

**CHAPITRE II**  
**MATERIEL ET METHODES**

## II.1. Culture de cellules endothéliales

Deux types de cellules endothéliales ont été utilisés dans ce travail. Une lignée dite de cellules endothéliales (ECV304), lignée cellulaire transformée spontanément d'HUVEC (ECACC No. 92091712). Elle a été achetée par le Centre Européen de Recherche et de Développement en Information et Communication Scientifiques (CERDICS, Sophia Antipolis, France) à "European Collection of Cell Cultures". Le deuxième type de cellules sont des cellules endothéliales d'aorte bovine (BAEC) obtenues à partir d'aorte bovine fraîche.

### II.1.1. Réactifs et matériels

#### II.1.1.1. ECV 304

##### a). Milieu de culture

M199 (Gibco BRL, réf. 22340-020, distribué par Life Technologie Sarl, Cergy Pontoise, France) complété en L-glutamine, 25mM HEPES, sels d'Earle et rouge de phénol. Le milieu de base, M199, contient notamment des acides aminés, des bases puriques et pyrimidiques, des sels minéraux, des vitamines et du glucose.

Les additifs au milieu ci-dessous sont filtrés à 0,22 $\mu$ m (Polylabo, France) et additionnés au milieu de base pour former le milieu complet.

##### b). Additifs au milieu de culture de base

- Antibiotiques :
  - Pénicilline à 5000UI/mL (réf. 15070, GibcoBRL, France): 1%
  - Streptomycine à 5000 $\mu$ g/mL (réf. 15070, GibcoBRL, France): 1%
- Antifongique :
  - Fungizone à 250 $\mu$ g/mL (réf. 15290, GibcoBRL, France): 0,06%
- Sérum de veau fœtal (SVF) (réf. P30-1801, lot P 972201, D. Dutscher, France): 10%

Il est décomplémenté à 56°C pendant 30min.

##### c). Tampon PBS (Phosphate buffered saline)

- NaCl : 137mM
- KCl : 2,7mM
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 10mM

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 1,4mM
- D-Glucose : 1 g/L

**d). Solution de trypsine-EDTA**

- Trypsine liquide 0,25% (réf. 25050-014, GibcoBRL, France): 2mL
- EDTA 0,02% (réf. K13490018, Merck, France): 2mL

L' EDTA (Acide éthylène dinitrilotétra acétique) est préparé dans une solution de PBS. La solution digestive est préparée, aliquotée et congelée à  $-20^\circ\text{C}$ . Elle est décongelée extemporanément.

**II.1.1.2. BAEC**

**a). Milieu de culture**

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, réf. 995007, GibcoBRL, U.S.A.). Il contient des acides aminés, des bases puriques et pyrimidiques, des sels minéraux, des vitamines et du glucose.

Les additifs au milieu ci-dessous sont additionnés au milieu de base pour former le milieu complet.

**b). Additifs au milieu de culture de base**

- Antibiotiques:  
Pénicilline/Streptomycine 1mM (réf. 15140, GibcoBRL, U.S.A.): 1%
- Sérum de veau fœtal (SVF) (réf. P30-1801, Omega Scientific, U.S.A.): 10%  
Il est décomplémenté à  $56^\circ\text{C}$  pendant 30min.
- L-Glutamine (réf. 25030, GibcoBRL, U.S.A.): 1%
- Pyruvate de sodium (NaPy, réf.11360, GibcoBRL, U.S.A.): 1%

**c). Tampon PBS**

Phosphate Buffer Saline (PBS) conditionné en bouteille stérile (réf. 21600, Gibco-BRL, U.S.A.)

**d). Solution de trypsine-EDTA**

La solution de trypsine 0.05%, 0,53mM est préparée dans une solution de PBS (réf. 15400, GibcoBRL, U.S.A.): 2mL



e). Extraction des cellules

Les BAEC sont extraites d'aorte bovine. Elles sont isolées après incubation d'un morceau d'aorte avec 1mg/mL collagénase IV (37°C, 15min). Les CE sont lavées avec PBS et centrifugées à 1000 rpm pendant 5 min. Le culot cellulaire est resuspendu dans du DMEM complet puis déposé dans les boîtes de culture.

**II.1.2. Mise en culture et passage**

II.1.2.1. Supports de cellules en culture

a). ECV304

- Lamelles en verre : 78x53mm, épaisseur 0,28/0,32 mm (réf. 28785-01, Polylabo, France)
- Boîtes de culture : 25 ou 75cm<sup>2</sup> en polypropylène (Costar, Dutscher, France)

b). BAEC

- Lamelles en verre : 75x38mm, épaisseur 0,90/1,10mm (réf. 2947, Corning, U.S.A.)
- Boîtes de culture : 175cm<sup>2</sup> (réf. 431079, Corning, U.S.A.)

II.1.2.2. Entretien de la culture

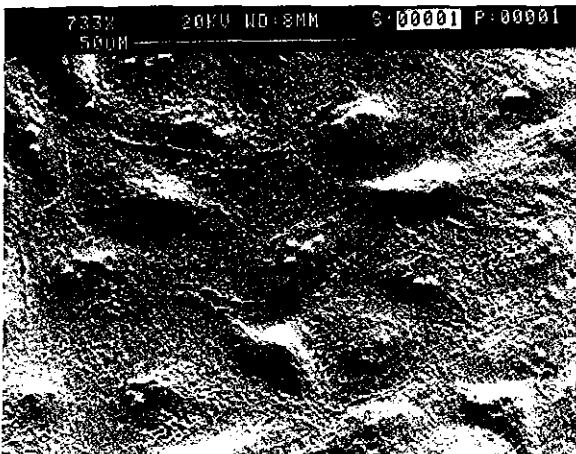
Lorsque les cellules sont à confluence dans la boîte de culture, le milieu de culture est éliminé et les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS. Ce lavage permet d'une part d'éliminer le sérum qui inhibe l'activité enzymatique de la trypsine, et d'autre part de libérer des ions Ca<sup>2+</sup> qui secondairement faciliteront l'adhésion des CE. La solution de digestion (trypsine/EDTA) filtrée à 0,22µm, est ajoutée à la boîte. Le détachement du tapis cellulaire est contrôlé au microscope optique inversé. L'action enzymatique de la trypsine est stoppée par effet de protéine en ajoutant 5mL de milieu complet (M199 ou DMEM selon la nature des cellules). Cette suspension cellulaire est centrifugée (200g, 6min) puis remise en suspension dans du milieu complet. Un comptage des cellules et une estimation de la viabilité cellulaire sont ensuite effectués dans une cellule de Thoma afin de resuspendre la suspension cellulaire dans un volume de milieu adéquat pour obtenir une concentration de 10<sup>5</sup>cellules/mL.

Cette suspension cellulaire servira à ensemercer les différents supports de culture utilisés, boîtes de culture pour entretien de la culture, et lamelles de verre autoclavées pour des expériences.

### II.1.2.3. Culture sur lamelles

1mL de suspension cellulaire à  $10^5$  cellules/mL est ensemencé à la surface de la lamelle placée dans une boîte de Pétri ( $1.10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>). La boîte est ensuite placée dans un incubateur (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Après 2h de sédimentation au repos, les cellules ont adhéré en majeure partie à la lamelle. 10mL de milieu complet sont alors ajoutés. Les cellules sont confluentes après 2 à 3 jours.

L'examen morphologique au microscope optique inversé et électronique de cellules endothéliales à confluence respectivement présente un aspect en « pavés de chaussée » caractéristique des cellules endothéliales (Figure II-1).



A. Microscopie électronique à balayage



B. Microscopie optique inversée à contraste de phase en lumière transmise, (x 20)

**Figure II-1.** Aspect d'une monocouche de cellules endothéliales (ECV304) en culture.

## II.1.3. Stimulation et traitement

### II.1.3.1. Stimulation mécanique

Les CE sont exposées à un flux laminaire de 12 dynes/cm<sup>2</sup> (30min, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) pour les expériences d'immunoprécipitation.

Afin de simuler les conditions d'écoulements laminaires et complexes, une chambre d'écoulement rectangulaire (Figure II-2) permettant de créer des écoulements laminaires a été mise au point au laboratoire. Un joint de silicone (0,025cm) est utilisé dans la chambre d'écoulement conférant un canal où l'écoulement est laminaire.

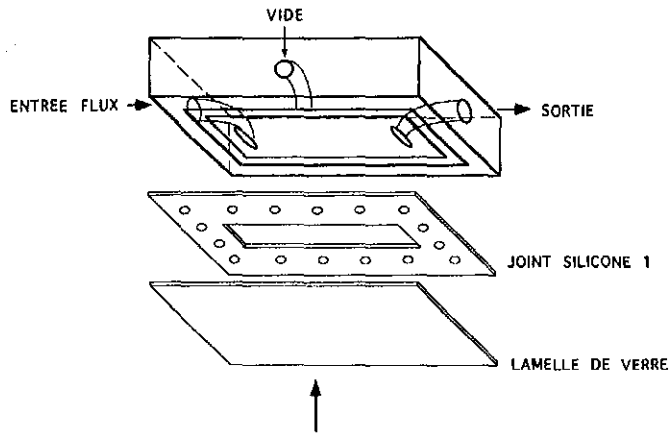


Figure II-2. Chambre de flux.

La chambre d'écoulement est connectée à un circuit d'écoulement (Figure II-3):

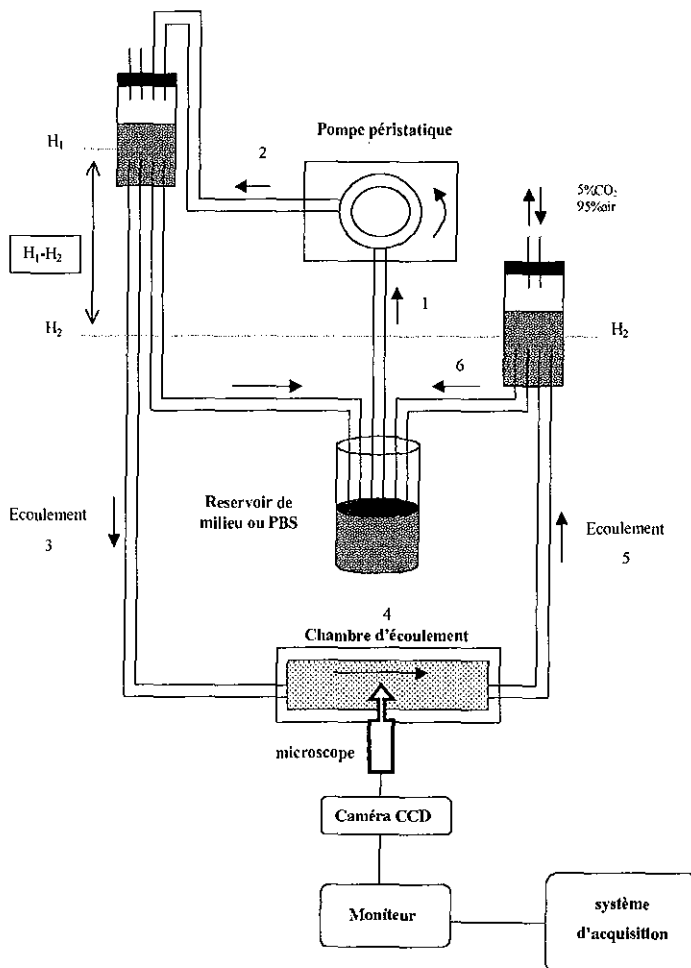


Figure II-3. Circuit d'écoulement.

La contrainte de cisaillement est calculée par l'équation (1):

$$\tau = 6Q\mu/e^2w \quad (1)$$

où Q est le débit (mL/s),  $\mu$  la viscosité du milieu (mPa.s), e l'épaisseur (cm) et w la largeur de la chambre (cm) avec:

$$\mu = 0,83\text{mPa.s (pour le milieu) et } 0.69\text{mPa.s (pour le PBS)}$$

$$e = 0,025 \text{ cm}$$

$$w = 2,3 \text{ cm}$$

### II.1.3.2. Traitement biochimique

#### a). TNF- $\alpha$

La préparation de la solution de TNF- $\alpha$  s'effectue à partir d'une solution de 10 $\mu$ g de TNF- $\alpha$  dans 1mL de tampon PBS plus 0,1% de BSA (réf. T-0157, Sigma, France) dilué avec du milieu M199 puis aliquoté à raison de 200 $\mu$ L par tube (concentration finale: 200U/mL). Le TNF- $\alpha$  ainsi préparé est conservé à -80°C.

Pour les expériences d'adhésion leucocytaire/endothélium, les ECV304 sont stimulées avec du TNF- $\alpha$  à une concentration finale de 100UI/mL. La solution de TNF- $\alpha$  (100 UI/mL) est ajoutée aux cellules. L'incubation se fait pendant 4 h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

#### b). BAPTA/AM

Les BAEC sont incubées avec du 1,2-bis(o-Amino-5-fluorophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid étraacetylmethyl ester (BAPTA/AM, réf. 298724, Calbiochem, U.S.A.) pendant 30 min à une concentration finale de 12,5, 25 ou 50 $\mu$ M (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

#### c). Peptide RDG

Les BAEC sont incubées avec le peptide RGD (réf. 12135-018, GibcoBRL, U.S.A.) pendant 30 min à une concentration finale de 100 $\mu$ g/mL (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

#### d). Toxine de Pertussis

Les BAEC sont traitées avec la PTX (réf. P7208, Sigma, U.S.A.) pendant 18 h à une concentration finale de 0,1 $\mu$ g/mL (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

## II.2. Isolement des polynucléaires neutrophiles

### II.2.1. Réactifs et matériels

- Dextran T250 (Sigma) à 6% final (poids/volume) dans du tampon phosphate glucosé.
- Tampon phosphate à pH 7,2-7,3 :
  - NaCl anhydre (SDS, France): 140mM.
  - KCl anhydre (Merck, France): 2,7mM.
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma, France): 5,3mM.
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Prolabo, France): 1,4mM.
  - D-(+)-Glucose (Sigma, France): 5,5mM.
  - H<sub>2</sub>O distillée q. s. p. 1 L.
- H<sub>2</sub>O distillée conservée à 4°C.
- Liquide physiologique (NaCl: 2M ).
- Sang total prélevé dans des tubes de 4,5mL. (Vacutainer ® Becton Dickison) avec anticoagulant citrate (0,129 M citrate trisodique 32g/L, acide citrique 4,1g/L et sorbate de potassium 0,2g/L)

### II.2.2. Isolement des PNN

Les polynucléaires neutrophiles sont obtenus à partir de sang total, prélevé sur citrate 0,129 M. Le sang total est mis à sédimenter pendant 45min à température ambiante dans une solution de PBS-Dextran 6% (vol./vol.). Cette sédimentation est suivie d'une première centrifugation du surnageant à 500g pendant 15min. Le culot ainsi obtenu est soumis à une lyse hypotonique puis de nouveau centrifugé à 500g pendant 15min. Le culot issu de cette centrifugation, riche en polynucléaires neutrophiles, est resuspendu dans 1L de tampon phosphate glucosé. La concentration finale est déterminée par un comptage sur une cellule de Thoma.

### II.2.3. Stimulation des PNN

Les cellules sont soumises à une activation par le FMLP (N-formyl-méthionyl-leucyl-phenylalanin, Sigma, France): 10µL de FMLP à une concentration 10<sup>-5</sup>M sont ajoutés à 1mL de suspension cellulaire pour obtenir une concentration finale de 10<sup>-7</sup>M de FMLP. Les cellules sont incubées 30 min à 37°C.

## II.3. Système en flux

### II.3.1. Préparation des lamelles

#### II.3.1.1. Nettoyage

Les lamelles en verre sont nettoyées selon le protocole ci-dessous:

- Imbiber les lamelles, pendant 20min pour les dégraisser, dans la solution suivante:
  - KOH : 24g
  - Eau distillée: 25g
  - Ethanol: 135g
- Rincer avec de l'eau distillée
- Sécher les lamelles et les autoclaver.

#### II.3.1.2. Fixation du fibrinogène

Dans le cas où le fibrinogène est utilisé comme substrat des PNN, les lamelles de verre doivent être recouvertes par du fibrinogène 12h avant l'expérience. Après nettoyage des lamelles, le fibrinogène (0,01%), préalablement décongelé, est adsorbé pendant 3h sur la surface des lamelles. A l'issue de cette étape les lamelles sont déposées dans une solution de NaCl ( $10^{-1}M$ ) et y restent jusqu'au montage de la cellule de sédimentation.

### II.3.2. Mise sous flux

Pour observer l'influence de la contrainte de cisaillement sur l'adhésion des PNN à ses substrats et déterminer quelle est la contrainte nécessaire à détacher les PNN, différents débits sont utilisés dans la chambre. L'ajustement de la hauteur ( $H_1-H_2$ ) entre les 2 réservoirs modulent le débit et donc le flux imposé (Figure II-3).

La lamelle, revêtue de la monocouche de cellules endothéliales ou de fibrinogène, et la chambre sont assemblées et maintenues sous pression par des clips.

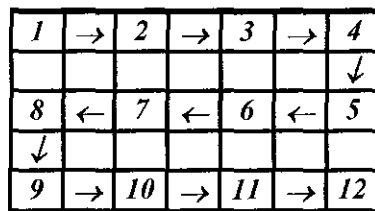
La pompe péristaltique permet de créer une circulation fermée du milieu de culture ou ouverte du PBS. Un mélange gazeux (5%CO<sub>2</sub> et 95% air) est introduit dans le réservoir de milieu pour maintenir les conditions de culture. Le milieu de culture ou le PBS sont maintenus à 37°C dans un bain-marie.

### II.3.3. Acquisition des images

La cellule de sédimentation est montée avant la fin de la purification des PNN afin de réduire tous les temps d'attente entre la purification et la prise d'images.

Les PNN, une fois isolés, sont injectés dans la cellule de sédimentation. Après homogénéisation manuelle, la cellule est positionnée sur la platine du microscope IMT-2 (OLYMPUS) afin que les PNN sédimentent pendant 30min sans subir de contraintes externes. Suite à ce laps de temps, on applique un flux de 0,03Pa afin d'éliminer les cellules non adhérentes fermement au substrat. Puis les images sont prises grâce à une caméra CCD (SONY) pour chaque valeur de flux.

Le plan de prise d'images a été déterminé précisément et reste le même pour toutes les expériences afin d'éviter le biais méthodologique qui pourrait être introduit et permet une totale et réelle randomisation de la prise d'images des échantillons. Comme on peut le voir sur la Figure II-4, les rectangles blancs représentent les images prises; il existe donc des surfaces inexplorées entre deux photos consécutives.



**Figure II.4.** Plan de prise des images.

Pour chaque expérience, 50 images sont réalisées pour chaque flux afin d'effectuer une étude statistique des résultats. La prise d'image se fait avec une légère diffraction sur les globules blancs afin d'obtenir le meilleur contraste possible entre la lamelle et les cellules. Les images sont digitalisées grâce à un convertisseur analogique-numérique et sont enregistrées sous un format de 768x574 pixels.

### II.3.4. Traitement des images

Les images sont traitées à l'aide du logiciel Visilog 5.1 (Noesis, France). Le traitement est divisé en plusieurs étapes :

- Seuillage (Thresholding): Sélection des cellules par labélisation préférentielle des niveaux de gris (les cellules blanches sur fond noir).

- Nettoyage (Opening): Elimination des signaux parasites labélisés (valeur comprise entre 1 et 3).
- Individualisation (Separate): Séparation des cellules en tant qu'entité indépendante. (valeur comprise entre 0 et 2).
- Analyse individuelle (Individual analysis): Analyse individuelle de chaque entité avec enregistrement de quatre paramètres pour chacune d'elle:
  - coordonnée du premier point sur l'axe (XX')
  - coordonnée du premier point sur l'axe (YY')
  - coordonnée du barycentre sur l'axe (XX')
  - coordonnée du barycentre sur l'axe (YY')

Toutes ces étapes sont réalisées de façon semi-automatisée: le chemin d'accès aux commandes est automatisé mais l'opérateur attribue la valeur, pour les paramètres «opening» et «separate», qu'il estime être la meilleure pour l'image considérée.

La totalité de ces étapes permet d'obtenir le nombre de leucocytes adhérents sur chaque image. Afin de comparer les différentes expériences entre elles, on calcule la moyenne du nombre de cellules adhérentes pour les 50 images pour chaque valeur de flux:

$$m_{\tau} = \frac{\sum c_{\tau}}{n}$$

avec  $m_{\tau}$ : moyenne du nombre de cellules/image pour la valeur de flux  $\tau$

$c_{\tau}$ : nombre de cellules/image pour une contrainte de cisaillement  $\tau$

$n$ : nombre d'images pour chaque contrainte de cisaillement. Dans nos expériences  $n=50$

Puis, on calcule alors le pourcentage (%) de cellules adhérentes par rapport à la valeur de départ pour chaque contrainte de cisaillement:

$$\theta_{\tau} = \frac{m_0}{m_{\tau}} \times 100 \%$$

avec:  $\theta_{\tau}$ : pourcentage de cellules adhérentes pour la contrainte de cisaillement  $\tau$

$m_{\tau}$ : moyenne du nombre de cellules adhérentes pour la contrainte de cisaillement  $\tau$

$m_0$ :  $m_{\tau}$  pour  $\tau=0,03$  Pa (cette contrainte de cisaillement est appliquée pour éliminer les cellules non adhérentes)

Les points expérimentaux ( $\theta_{\tau}=f(\tau)$ ) permettent d'étudier le détachement des PNN en fonction de la contrainte de cisaillement.



De plus, à partir des valeurs de  $\theta_t$ , on peut tracer la courbe de tendance sigmoïde ( $R^2 > 0,99$ ), et calculer  $\tau_{50}$ : valeur de la contrainte de cisaillement pour laquelle 50% des cellules sont adhérentes et 50% sont détachées. Cette valeur est représentative de l'énergie d'association des leucocytes au substrat.

## II.4. Fluorescence-Immunofluorescence

### II.4.1. Réactifs

#### II.4.1.1. Tampon de lavage

Cellwash (réf. 349524, Becton Dickinson, France)

#### II.4.1.2. Fixateur

- Paraformaldehyde: 1g
- PBS: 100mL

#### II.4.1.3. Perméabilisant

- Triton-X100: 0.5mL
- PBS: 100mL

#### II.4.1.4. Anticorps

- Ac primaires monoclonaux décrits dans le Tableau II-1.
- Ac secondaire couplé à la FITC: Fragments de F(ab')<sub>2</sub> d'immunoglobulines de chèvre anti-souris conjugués à la FITC (Tableau II-1)

**Tableau II-1 : Caractéristiques et références des Ac utilisés.**

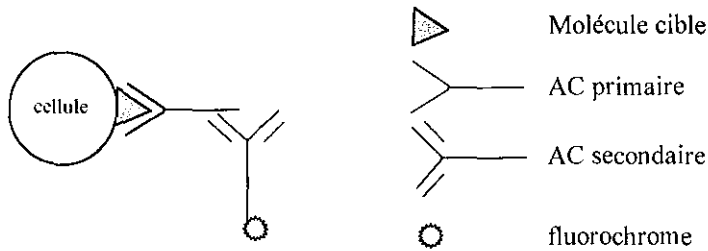
SPECIFICITE	ISOTYPE	CLONE	ORIGINE COMMERCIALE
Contrôle isotypique	IgG1	679.1Mc7	Dako (réf. 0571)
CD11a	IgG1, kappa	MHM24	Dako (réf. M0782)
CD11b	IgG1, kappa	2LPM19c	Dako (réf. M0741)
CD11c	IgG1, kappa	KB90	Dako (réf. M0732)
CD18	IgG1, kappa	MHM23	Dako (réf. M0783)
CD62L	IgG1, kappa	FMC46	Dako (réf. M7084)
Ac conjugué-FITC	F(ab') <sub>2</sub>		Dako (réf. F0479)
ICAM-1			Immunotech (réf. 0544)

### II.4.2. Marquage en immunofluorescence

#### II.4.2.1. Principe de l'immunofluorescence indirecte

Des molécules exprimées à la surface cellulaire ou à l'intérieur des cellules peuvent être reconnues par des Ac spécifiques (Ac primaire reconnaissant spécifiquement la molécule étudiée). Ensuite, la reconnaissance de l'Ac primaire est effectuée par un Ac secondaire

conjugué à un fluorochrome (tel que la FITC) afin de visualiser les molécules étudiées (Figure II-5) et d'amplifier le signal.



**Figure II-5.** Schéma du principe de l'immunomarquage indirect.

#### II.4.2.2. Marquage des molécules d'adhésion

##### a). Marquage des molécules d'ICAM-1

Il n'est pas nécessaire de perméabiliser les cellules pour le marquage des ICAM-1, étant donné que les molécules ICAM-1 sont exprimées à la surface des CE.

Après un rinçage avec du tampon PBS, les cellules sont incubées avec l'Ac primaire (souris anti-ICAM-1, dilution 1:10 dans du tampon PBS) pendant 30min, à température ambiante. Après un rinçage avec du tampon PBS pour éliminer l'excès d'Ac primaire, les cellules sont marquées avec l'Ac secondaire (dilution 1:20) pendant 30min à température ambiante à l'obscurité afin de prévenir la photolyse de la FITC. Enfin, les cellules sont lavées avec du tampon PBS et recouvertes de milieu de culture sans rouge de phénol. Les cellules sont prêtes à être observées en microscopie à fluorescence.

Dans le cas d'un double marquage ICAM-1/F-actine, les cellules seront fixées et perméabilisées après le marquage des ICAM-1.

##### b). Marquage des molécules d'adhésion sur les PNN

Après purification, les PNN sont incubés dans la glace. Le fait de les maintenir à 4°C ralentit toutes les réactions biologiques (dont la variation du taux d'expression des molécules à la surface cellulaire).

Les cellules sont ensuite incubées avec 100µL d'Ac monoclonal primaire (anti-cD11a, CD11b, CD11c, CD18 et CD62-L) pendant 1h puis lavées 2 fois dans du tampon phosphate (500g, 5min.).

La deuxième étape du marquage est identique à la première mais l'Ac primaire est remplacé par 100µL d'Ac secondaire de chèvre anti-souris, ou conjugué, couplé à la FITC

dilué 50 fois. Le culot cellulaire est ensuite remis en suspension dans 500 $\mu$ L de tampon phosphate.

Parallèlement au marquage des molécules d'adhésion, deux échantillons subissent des traitements similaires et servent de contrôle:

- le contrôle négatif, ou blanc, ne contenant que les cellules et le tampon phosphate.
- le contrôle isotypique (Ac monoclonal non spécifique, de même classe, de même isotype et incubé à la même concentration que l'Ac primaire).

L'analyse des échantillons au cytomètre est effectuée dans un délai inférieur à 1h.

### II.4.3. Marquage du cytosquelette

La phalloïdine, toxine présente dans un champignon, qui a une grande affinité pour la F-actine, est conjuguée à un fluorochrome: Phalloïdine-rhodamine (réf. R-415, Molecular Probes, U.S.A.).

Le marquage du cytosquelette s'effectue après fixation, par le paraformaldéhyde (10%), et perméabilisation, par le triton X-100 (5%). La phalloïdine-rhodamine (2U/mL) est déposée pendant 20min à 37°C sur les CE. Les cellules sont rincées abondamment ensuite avec du tampon PBS (Muller et col. 1999)

### II.4.4. Cytométrie en flux

Afin de vérifier l'état physiologique des PNN, une détermination quantitative des molécules d'adhésion (CD11a/CD18, CD11b/CD18, CD11c/CD18, et CD62L) exprimées à la surface membranaire est effectuée après isolement des PNN dans les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées lors des expériences de sédimentation.

La procédure utilisée pour ces marquages est une réaction d'immuno-fluorescence indirecte qui permet la quantification de ces molécules à la surface membranaire. Les échantillons sont analysés en cytométrie en flux sur un cytomètre FACscan, Becton-Dickinson, U.S.A.) équipé d'un laser He-Ne émettant à 488nm.

Chaque échantillon est d'abord analysé en diffusion [FSC (forward scatter detector) et SSC (side scatter detector)] afin d'identifier les cellules en fonction de leur taille et de leur granulosité. Cela permet de sélectionner la population cellulaire adéquate. La fluorescence des Ac secondaires conjugués à la FITC est détectée à 530nm (FL1). Pour mesurer l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) des cellules, le réglage de FL1 de l'appareil est effectué à partir du contrôle isotypique. La fluorescence du contrôle doit se situer entre 0 et 10 sur l'échelle de FL1. Les échantillons sont ensuite passés au cytomètre en flux. L'acquisition se

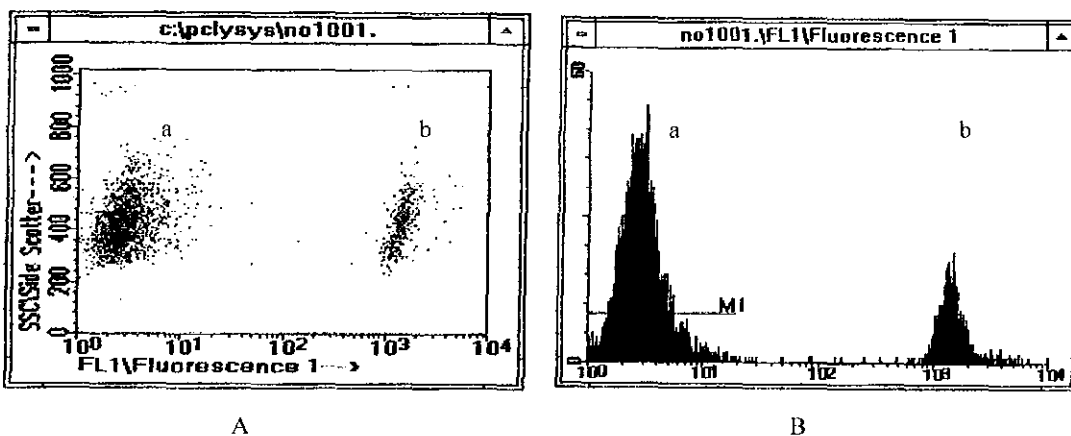
fait sur 10.000 évènements. L'IMF de la population cellulaire est mesurée automatiquement par le FACscan.

#### II.4.4.1. Immunomarquage des billes de calibration

Il est nécessaire d'étalonner et de calibrer le cytomètre en flux de manière à quantifier le nombre de molécules d'adhésion présentes sur les cellules.

Le kit de calibration contient des billes de fenêtrage et des billes de calibration et permet de mesurer la densité antigénique à la surface des cellules. Il se compose de billes de 10µm de diamètre, mimant des cellules, et portant un nombre bien défini de molécules d'Ac monoclonaux (anti-humain, isotype IgG2a). Cette utilisation peut être étendue à la quantification de tout Ac monoclonal de souris de classe IgG. Un test QIFIKIT est effectué lors de chaque marquage.

- Les billes de fenêtrage sont analysées par le cytomètre en flux et la fenêtre d'analyse est établie. Ces billes sont composées de 2 populations, des billes sans Ac (blancs) et des billes portant une quantité élevée d'Ac. Sur l'histogramme de SSC-FL1, les deux populations de billes sont visualisées. Le réglage de l'appareil est effectué dès que la fluorescence des billes sans Ac se situe dans la partie négative (entre 0 et 10). La 2<sup>ème</sup> population de billes doit se situer entre les 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> décades ( $10^3$  et  $10^4$ ) sur l'échelle logarithmique de FL1 (Figure II-6).



**Figure II-6.** Fluorescence des billes de fenêtrage sur le cytomètre en flux.

A : cytogramme montrant deux populations de billes en SSC et FL1 ; B : histogramme montrant deux populations de billes. (X): FL1 et (Y): nombre de cellules. a: billes sans Ac; b: billes portant les sites antigéniques.

- Les billes sont traitées en parallèle des cellules en suivant le même protocole. Elles sont analysées avec un réglage identique à celui décrit ci-dessus. Elles sont divisées en cinq populations de billes recouvertes de quantités croissantes avec un nombre exact d'immunoglobulines de souris spécifique pour chaque lot (Tableau II-2).

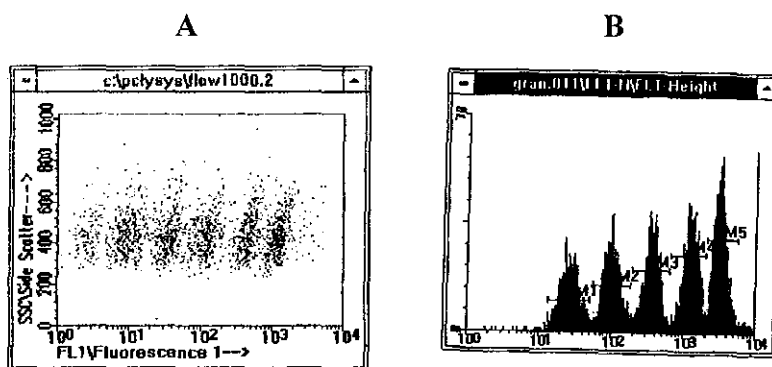
**Tableau II-2.** Calibration de la fluorescence-Qifikit (Dako) sur les billes

Populations de billes	Nombre d'Ac monoclonaux fixés
A	4 000
B	17 000
C	59 000
D	200 000
E	490 000

Les billes sont marquées avec l'Ac de chèvre anti-IgG de souris/FITC simultanément au marquage des échantillons selon le protocole suivant :

- 100µL de billes de fenêtrage et 100µl de billes de calibration sont placées séparément dans deux tubes et lavées avec Cellwash comme les échantillons.
- Prélever le surnageant et laisser environ 50µL de liquide dans chaque tube.
- 100µL d'Ac secondaire dilué au 1:50<sup>ème</sup> sont ajoutés pour marquer les billes de manière identique aux échantillons.

La figure II-7 montre le cytogramme et l'histogramme représentant la fluorescence de chaque population de billes. Les cinq pics sont d'aspect homogène, régulièrement disposés et bien différenciés. Chaque pic présente une distribution gaussienne de la population, ce qui permet par extrapolation mathématique d'en mesurer l'intensité moyenne de fluorescence (MIF). La fluorescence est représentée en abscisse, sur une échelle logarithmique comprenant quatre décades, le nombre d'événements analysés est quant à lui représenté en ordonnée.



**Figure II-7.** Billes de calibration.

A: cytogramme de la diffusion de la fluorescence; B: histogramme de la fluorescence.

Les billes de calibration permettent de tracer une droite de régression en fonction du nombre des molécules d'Ac monoclonaux primaires fixées et l'IMF.

L'immunomarquage est réalisé en conditions saturantes et la fixation du fragment F(ab)<sub>2</sub> est considérée comme monovalente. Dans ce cas, le nombre de molécules d'Ac primaire fixées correspond donc au nombre de sites antigéniques présents à la surface de la cellule (Poncelet et col. 1996).

La courbe de calibration (Figure II-8) relie le nombre de sites antigéniques à l'intensité de fluorescence moyenne mesurée: c'est une droite de régression (coefficient de corrélation:  $R^2 > 0,999$ ).

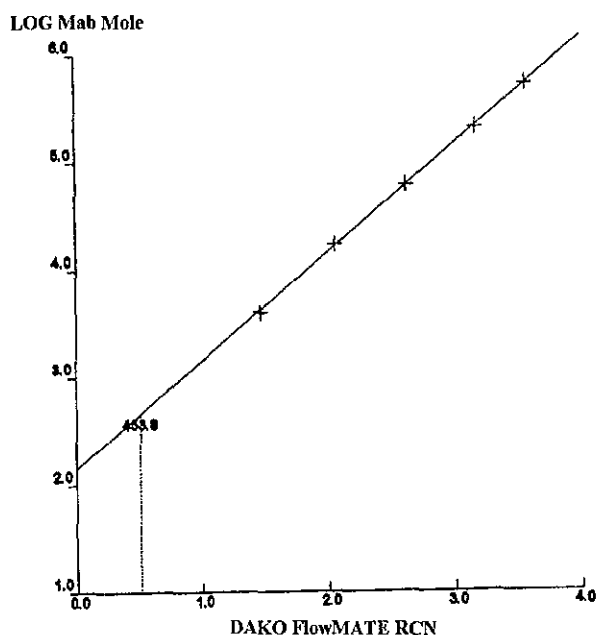


Figure II-8. Courbe de calibration (TallyCAL). Y: nombre de sites; X: IMF.

#### II.4.4.2. Analyse des échantillons

Les échantillons sont ensuite analysés et la capacité de fixation de l'Ac (densité antigénique) est calculée par interpolation sur la courbe de calibration. Le calcul peut être fait sur un logiciel de programmes de calibration et de quantification (TallyCAL pour Windows, code S2034). Ce système donne le nombre moyen de sites antigéniques par cellule.

## II.5. Microscopie à fluorescence 3D (à sectionnement optique)

Cette technique utilise un microscope à fluorescence conventionnel (Olympus IX-70) associé à un système-CELLScan™ (Scanalytics, U.S.A.) composé d'un module d'acquisition et d'un module de traitement. Le microscope est associé à un dispositif de déplacement axial nanométrique et à de puissants algorithmes de restauration et de reconstruction d'images qui permettent de visualiser des échantillons biologiques en trois dimensions (Figure II-9) (Dumas et col. 2000).

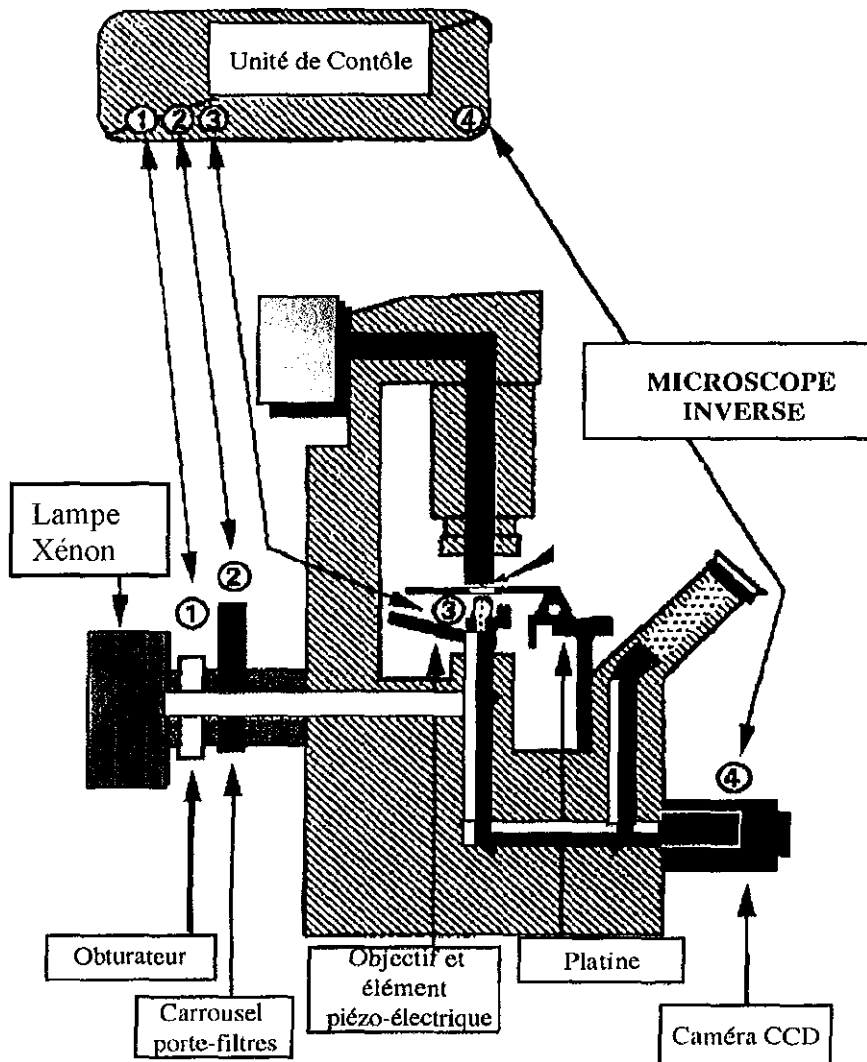


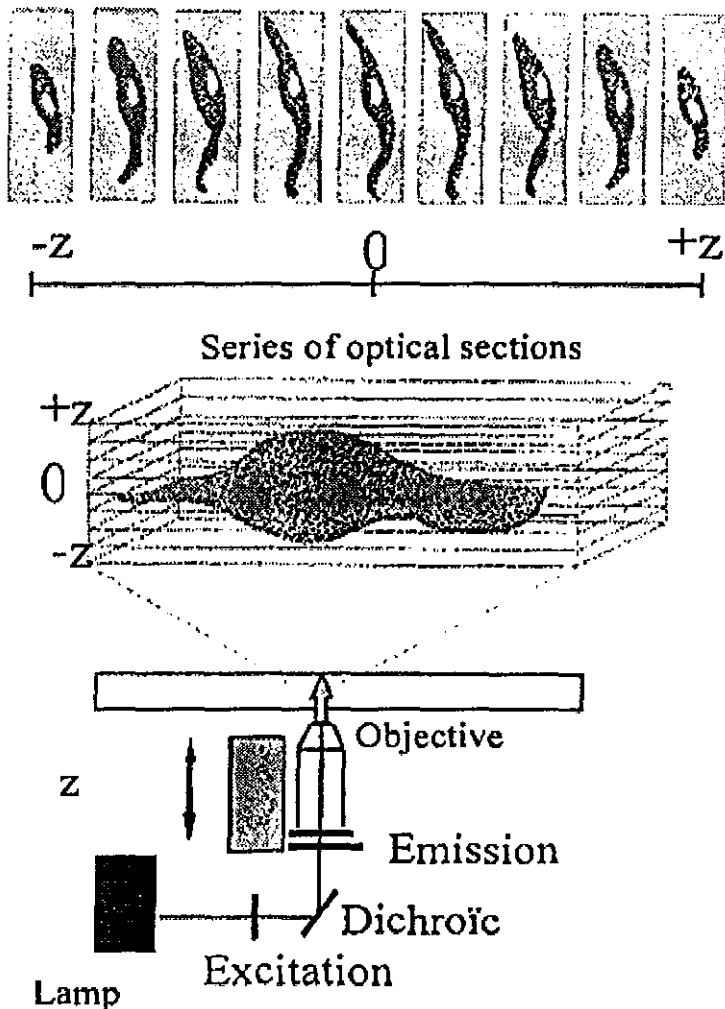
Figure II-9. Représentation schématique du microscope optique à fluorescence équipé du système CELLscan™.



### II.5.1. Acquisition des images

Les objectifs 60×/1,25NA et 100×/1,30NA ont été utilisés pour l'observation des cellules.

Une série d'images 2D est acquise en déplaçant le plan focal à travers l'objet, grâce à un système de déplacement en l'axe z par un module piézo-électrique contrôlé par ordinateur (Figure II-10). Chacune des images 2D contient des informations de son plan de focalisation (partie "nette") et de tous les autres plans (partie "floue"). La partie nette de l'image correspond aux informations relatives au plan focal, le flou dans l'image provient des informations de tous les autres plans. Ces informations peuvent être séparées par traitement d'image afin d'estimer la vraie structure 3D de l'objet étudié.



**Figure II-10.** Représentation de l'acquisition des images 2D en x et y selon l'axe z (pas minimum: 0,25 $\mu$ m).

### II.5.2. Traitement des images

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

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

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

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

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

La reconstitution des images 3D est effectuée à partir des coupes 2D.

## II.6. Immunoprécipitation et marquage des protéines

### II.6.1. Lyse des cellules et quantification de la concentration protéique

#### II.6.1.1 Tampons de lyse

##### a). Marquage du complexe $\alpha v\beta 3$ -Shc

Décoller les cellules endothéliales avec 500 $\mu$ L de tampon de lyse préparé extemporanément (4°C):

- HEPES: 25mM, pH 7,4
- NaCl: 0,5mM
- Triton X-100: 1%
- SDS: 0,1 %
- EDTA: 5Mm

##### b). Tampon de lyse pour le marquage de l'activité de la JNK

Décoller les cellules endothéliales avec 500 $\mu$ L de tampon de lyse préparé extemporanément :

- Tris-HCl: 25mM, pH 7,5
- NaCl: 150mM
- Triton X-100: 1%

#### II.6.1.2. Dosage des protéines dans les lysats cellulaires

Les lysats cellulaires sont centrifugés (500 rpm, 15min.) et le surnageant éliminé.

Le dosage des protéines dans les lysats cellulaires s'effectue selon le protocole suivant :

- 1/ Faire une gamme étalon d'albumine de sérum bovin (BSA) (0-2-5-10-15-20  $\mu$ g).
- 2/ Réactif de quantification (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate réf. 500-0006, Bio-Rad, U.S.A.): 80% d'H<sub>2</sub>O et 20% de réactif Biorad.
- 3/ Ajouter 1mL de réactif A à chaque échantillon de la gamme étalon de BSA.
- 4/ Ajouter 1mL de réactif A à 5 $\mu$ L de chaque lysat cellulaire.
- 5/ Mesure de la densité optique (DO) à 595nm.
- 6/ Evaluer la concentration protéique dans les lysats cellulaires.

## II.6.2. Immunoprécipitation et électrophorèse des protéines

### II.6.2.1. Tampons

#### a). Tampon de charge SDS

- Tris-HCl: 50mM
- Dithiothréitol: 100mM
- SDS: 2%
- Bleu de bromophénol: 0,1%
- Glycérol: 10%

#### b). Tampon de migration

- Tris: 25Mm
- Glycine: 250 mM, pH 8,3
- SDS: 0,1%

#### c). Tampon de kinase I

- HEPES: 100mM, pH 7,4
- MgCl<sub>2</sub>: 100mM

#### d). Tampon de kinase II

- ATP: 25μM
- [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]ATP: 10μCi
- GST-c-Jun: 2μg

#### e). Tampon de transfert

- Tris-borate: 90mM
- EDTA: 2mM

#### f). Tampon de coloration

- Bleu de Coomassie R250: 0,25g
- Ethanol: 30%
- Acide acétique: 10%
- Eau distillée q.s.p. 1L

g). Tampon de blocage

- Tris-HCl: 10mM, pH 7,4
- NaCl: 150mM
- Tween 20: 0,05%
- BSA: 0,1%

II.6.2.2. Gels d'électrophorèse

a). Gel de stockage

- H<sub>2</sub>O: 2,7mL
- acrylamide (30%): 0,67mL
- 1mM Tris (pH 6,8): 0,5mL
- 10 % SDS: 0,04mL
- 10% ammonium persulfate: 0,04mL
- TEMED: 0,004mL

b). Gel de séparation à 10% d'acrylamide

- H<sub>2</sub>O: 4mL
- Acrylamide (30%): 3,3mL
- 1,5mM Tris (pH 8,8): 2,5mL
- 10 % SDS: 0,mL
- 10% ammonium persulfate: 0,1mL
- TEMED: 0,004mL

c). Gel de séparation à 12% d'acrylamide

- H<sub>2</sub>O: 3,3mL
- Acrylamide (30%): 4mL
- 1,5mM Tris (pH 8,8): 2,5 mL
- 10 % SDS: 0,1mL
- 10% ammonium persulfate: 0,1mL
- TEMED: 0,004mL

### II.6.2.3. Préparation de la solution d'immunoprécipitation

#### a). Couplage des billes à la protéine A

0,5g de billes de sépharose-protéine A CL-4B (réf. 17-0780-01, Amersham, U.S.A.) sont hydratées avec 15mL d'H<sub>2</sub>O ultra pure pendant une heure sous agitation douce. On effectue ensuite 3 lavages dans du PBS (3000 rpm, 5 min.) avant de remettre les billes en suspension dans un volume de PBS identique au volume de billes.

#### b). Couplage des Ac au complexe "billes-protéine A"

100 µL de billes de sépharose-protéine A à 10% sont centrifugées (3000rpm, 3min) et on élimine le surnageant (90µL). Le culot billes+protéine est incubé avec 20µL d'Ac et 70µL de tampon de lyse (sans Triton X-100) à T° ambiante sous-agitation douce pendant 1 h. La solution est ensuite centrifugée (3000rpm, 5min.), le surnageant est éliminé et le culot est lavé 2 fois avec 1mL de Sodium Borate (réf. S9640, Sigma-Aldrich, U.S.A.). Le culot est ensuite incubé avec 1mL de Sodium Borate et 5mg de Diméthylpimelimidate (DMP, réf. D8388, Sigma-Aldrich, U.S.A.) sous agitation douce pendant 30min. à T° ambiante. Le surnageant est éliminé après une centrifugation (3000rpm, 5min.) et le culot est incubé avec 1mL d'éthanolamine (réf.15014, Sigma-Aldrich, U.S.A.) sous agitation douce pendant 2h à T° ambiante. Le surnageant est de nouveau éliminé après centrifugation (3000rpm, 5min.) et le culot est remis en suspension dans 100µL de tampon de lyse.

### II.6.2.4. Immunoprécipitation et électrophorèse de l'intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{3}$

Après incubation de 200µg de protéines extraites des lysats cellulaires avec 2µg d'Ac et 20µL de billes-protéine A pendant 16h, 2 lavages avec 200µL de tampon de lyse, 2µL de tampon de charge SDS sont ajoutés et on place les échantillons à 100°C pendant 2min pour dénaturer les protéines.

Les échantillons sont déposés sur un gel d'électrophorèse [4% gel de stockage-10% gel de séparation] afin que les protéines migrent à 100Volts pendant 2h dans le tampon de migration

### II.6.2.5. Immunoprécipitation et électrophorèse de la JNK

Après incubation de 100µg de protéines extraites des lysats cellulaires avec 1µg d'Ac anti-JNK et 20µL de billes-protéine A pendant 4h, 2 lavages avec 500µL de tampon de lyse et 1 lavage avec 500µL de tampon kinase I sont effectués.

Les échantillons sont mis en suspension dans 20 $\mu$ L de tampon kinase II et incubés pendant 30min au bain-marie. Après ébullition, 2 $\mu$ L de tampon de charge SDS sont ajoutés à chaque échantillon et ils sont portés à ébullition pendant 3min.

Les échantillons sont déposés sur un gel d'électrophorèse [4% gel de stockage-12% gel de séparation] afin de faire migrer les protéines à 100Volts pendant 1h30 dans un tampon de migration.

#### II.6.2.6. Transfert des protéines sur membrane et immunomarquage du complexe $\alpha\beta$ 3-Shc

Le transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose s'effectue dans le tampon de transfert à 200mA pendant 6 h. Les sites non spécifiques sont ensuite bloqués par une solution à 5% de B.S.A. pendant 1h. Afin de marquer les bandes spécifiques, la membrane est incubée avec l'Ac primaire anti-Shc (1:1000) pendant 1h dans le tampon de blocage sous agitation, puis lavée 3 fois avec un tampon PBS. L'Ac de chèvre anti-souris (1:1000) est ajouté pendant 1h dans le tampon de blocage sous agitation.

La révélation des bandes protéiques sur la membrane est réalisée grâce à un réactif de détection de l'activité peroxydase (ECL Western Blotting Detection Reagents, réf. RPN2106, Amersham, U.S.A.).

#### II.6.2.7. Marquage radioactif de la JNK

Après la SDS-PAGE, le gel est coloré dans le tampon de coloration pendant 1 h sous agitation douce puis lavé plusieurs fois à l'eau. Le gel est ensuite séché pendant 12 h sur une plaque chauffante et l'activité de la JNK est révélée par autoradiographie.

#### II.6.2.8. Calcul des densités

Lorsque le film est révélé, on scanne les bandes obtenues et on compare leur densité:

- $d_{CS}$ : densité de la bande obtenue chez les CE non traitées en conditions statiques
- $d_{IS}$ : densité de la bande obtenue chez les CE traitées par l'inhibiteur en conditions statiques
- $d_{CF}$  : densité de la bande obtenue chez les CE non traitées soumises à une contrainte de flux (12dynes/cm<sup>2</sup>)
- $d_{IF}$ : densité de la bande obtenue chez les CE traitées par l'inhibiteur puis exposées à une contrainte de flux (12dynes/cm<sup>2</sup>)

On considère que  $d_{CS}$  est la valeur de référence et on calcule:

1.  $d_{CS}/d_{CS}=1$
2.  $d_{IS}/d_{CS}$  : Effet de l'inhibiteur chez les CE statiques
3.  $d_{CF}/d_{CS}$  : Effet des contraintes de cisaillement
4.  $d_{IS}/d_{CS}$ : Effet des contraintes de cisaillement après incubation avec l'inhibiteur

Les résultats présentés sur les Figures III-19 à III-21 et III-23 à III-25 sont exprimés par la moyenne de ces rapports  $\pm$  intervalle de confiance, de plus:

- \* :  $p < 0,05$  en comparaison avec  $d_{CS}/d_{CS}$
- # :  $p < 0,05$  en comparaison avec  $d_{CF}/d_{CS}$



**CHAPITRE III**  
**RESULTATS ET DISCUSSION**

Les maladies cardio-vasculaires représentent un risque majeur dans notre société actuelle. De nombreuses études sont menées afin de mieux comprendre les origines et les mécanismes mis en place par les différents acteurs cellulaires impliqués dans ces pathologies en particulier les CE et les leucocytes.

Dans ce but, nous avons entrepris différents types d'expérience après la mise au point de nombreuses et indispensables conditions expérimentales.

Dans un premier temps, nous nous sommes concentrés sur l'étude des forces d'adhésion entre leucocytes et endothélium lors de l'application d'un flux laminaire afin de mieux comprendre la cascade leucocyte/endothélium lors du phénomène d'inflammation.

Dans un deuxième temps, étant donné que l'état d'activation des CE peut influencer les propriétés d'adhésion *via* les voies de la mécano-transduction, nos recherches se sont focalisées sur les interactions entre les molécules impliquées dans les mécanismes mécano-sensibles au sein des CE soumises à un flux laminaire. Cette deuxième partie a été effectuée au sein du laboratoire du Professeur Shu Chien (Département de Bio-Ingénierie, Whitaker Institute-UCSD, San Diego, U.S.A.) avec lequel nous travaillons en collaboration.

### III.1. Etude de l'efficacité d'adhésion des leucocytes

Dans les conditions physiologiques, la plupart des leucocytes circulent dans le sang et expriment peu de molécules d'adhésion à leur surface. La migration des leucocytes requiert la formation de pseudopodes et l'adhésion à l'endothélium. La compréhension physique de l'adhésion est ardue car les cellules vivantes ont une structure très complexe et sont soumises à des interactions spécifiques qui sont déterminantes pour le mouvement: polymérisation des filaments d'actine, expression des molécules d'adhésion, mouvement des filaments grâce aux moteurs moléculaires, etc.

L'adhésion s'avère un phénomène primordial car il guide le comportement des cellules. Son étude revêt ainsi un caractère de première envergure. En biochimie, bien que l'on ait déjà effectué des mesures d'association de molécules en solution (constante d'affinité, de dissociation...), on ne peut pas prédire comment des molécules, liées à des membranes, vont se comporter. Les notions utilisables pour décrire le comportement des molécules à trois dimensions n'ont plus de sens sur une surface car d'autres paramètres interviennent (flexibilité de la molécule, longueur...). Par ailleurs, des études sur les processus biomécaniques de l'adhésion cellulaire ont mis en évidence que dans le phénomène d'adhésion, les molécules d'adhésion sont liées à des membranes cellulaires et leurs interactions sont donc gouvernées par des cinétiques bi-dimensionnelles et non tri-dimensionnelles comme c'est le cas lors de leur liaison à des ligands solubles (Zhu 2000).

De récentes études ont montré que l'application d'un flux ( $1-1,5 \text{ dyne/cm}^2$ ) sur les leucocytes:

- prévient la formation des pseudopodes (Moazzam et col. 1997, Fukuda et col. 2000),
- réduit l'adhésion des leucocytes à l'endothélium (Moazzam et col. 1997)
- n'a pas d'effet sur les leucocytes en présence de médiateurs inflammatoires (Platelet Activator Factor (PAF), FMLP) qui conduisent à la formation de pseudopodes et à l'adhésion (Fukuda et col. 2000).

Nous nous sommes proposés de trouver un mode exhaustif de description du comportement de cellules liées à des surfaces biologiques sur lesquelles on applique un flux laminaire croissant.

D'une part, notre ambition est de mesurer l'adhésion des leucocytes et la dépendance de cette adhésion vis-à-vis des forces appliquées du système extérieur. Parmi plusieurs approches possibles pour cette étude, nous avons choisi la chambre de flux parallèle.

D'autre part, on s'aperçoit qu'il existe des états d'adhésion intermédiaires entre la molécule attachée ou non. Une fois la première liaison formée, comment la cellule continue-t-elle à s'attacher ? Comment la cellule contrôle la forme du cytosquelette ? On sait que cette forme et l'organisation du cytosquelette sont guidées par une centaine de molécules liées à l'actine, elles-mêmes contrôlées par des phénomènes transitoires (flux ioniques, ...).

Parmi deux approches possibles, biochimique (à partir de systèmes reconstitués) et biocellulaire (à partir de l'analyse de la réponse à une perturbation de la cellule), nous avons choisi la seconde qui nous semblait plus pertinente. Pour cela, nous avons développé des techniques d'analyse d'images adaptées à l'étude du comportement de la cellule. Nos résultats montrent l'effet des contraintes de cisaillement sur l'adhésion des PNN à différents substrats différents. Il est déterminé par le pourcentage de cellules adhérentes au substrat biologique après application du flux en comparaison aux conditions de départ:  $\theta = f(\tau)$ .

Dans un premier temps, la mise au point de notre technique d'étude de l'adhésion des leucocytes a nécessité la détermination et le choix de paramètres fondamentaux pour la réalisation des expériences.

En effet, il a été nécessaire de vérifier pour chaque expérience la morphologie des PNN, de respecter le temps nécessaire à la sédimentation et à l'adhésion des cellules sur leur substrat.

Par ailleurs, nous avons réalisé une étude statistique afin de contrôler que l'homogénéité du dépôt des cellules sur toute la surface, le nombre de cellules par image pour chaque valeur de flux devant être constant afin de pouvoir comparer les valeurs entre elles.

De même, afin de s'assurer que toutes les cellules se déposent en monocouche sur le substrat, et déterminer la gamme de concentration dans laquelle nos expériences étaient réalisables sans qu'il n'y ait de formation d'agrégats cellulaires, nous avons vérifié que l'augmentation du taux de couverture était proportionnelle à la concentration cellulaire injectée dans la chambre de sédimentation.

Nous avons également défini les paramètres de la prise d'image et du traitement d'images (valeurs de seuillage, de nettoyage, d'individualisation et d'analyse individuelle) afin de déterminer le nombre de leucocytes par image. Ces étapes ont fait l'objet d'un travail préliminaire et ne seront pas détaillées ici (Labrador 1998).

Lors des maladies cardio-vasculaires, les leucocytes et/ou les CE sont activés par des facteurs chimiotactiques, des cytokines, des agents bactériens, etc. L'activation des cellules peut-elle induire des modifications cellulaires (structurales, biochimiques) afin de favoriser l'adhésion? La dernière étape dans la mise au point des conditions expérimentales fut, donc la vérification de l'activation cellulaire pour les 2 types cellulaires impliqués dans l'adhésion. Dans le cas des leucocytes, nous avons vérifié l'effet de la stimulation biochimique (FMLP) sur les intégrines impliquées dans l'adhésion. Chez les CE, nous avons étudié l'expression de la molécule d'adhésion ICAM-1, le récepteur des intégrines leucocytaires, ainsi que les modifications au niveau du cytosquelette après stimulation mécanique (flux laminaire) ou biochimique (TNF- $\alpha$ ).

### **III.1.1. Contrôle de la morphologie des PNN**

Après le prélèvement du sang total sur les tubes citratés, la purification des PNN débute dans le délai le plus court possible, permettant d'éviter un changement morphologique ou fonctionnel des neutrophiles. Suite à la purification des PNN, ceux-ci sont observés au microscope optique, puis comptés sur une cellule de Thoma afin de déterminer le degré de pureté de la suspension enrichie en PNN. Nous avons aussi vérifié que les cellules présentes dans l'échantillon sont vivantes, ont une forme normale, et que la contamination cellulaire est faible. Nous avons observé qu'après injection des PNN dans la cellule de sédimentation et la demi-heure de sédimentation, les PNN conservent les mêmes caractéristiques morphologiques.

### **III.1.2. Temps de sédimentation**

Afin de vérifier que tous les neutrophiles contenus dans la cellule de sédimentation sont déposés sur la surface, une étude préliminaire concernant le temps nécessaire pour la sédimentation a été réalisée avec différents temps de sédimentation compris entre 0 et 30 min. Nous avons observé que passé ce délai toutes les cellules apparaissent sur le même plan focal.

En observant le dépôt des neutrophiles en temps réel, on constate qu'ils ne s'immobilisent pas immédiatement après leur dépôt sur la lamelle mais se déplacent légèrement avant de se fixer à la surface. On peut donc penser que les cellules sont fixées sur les ligands par des pontages macromoléculaires établis entre les ligands et leurs récepteurs. Il est possible que les cellules explorent également la surface avant d'adhérer de façon irréversible à leur substrat ainsi que cela a déjà été décrit pour les globules rouges (Lavalle et col. 1996). La prise d'image débute immédiatement après la demi-heure de sédimentation (Figure III-1).

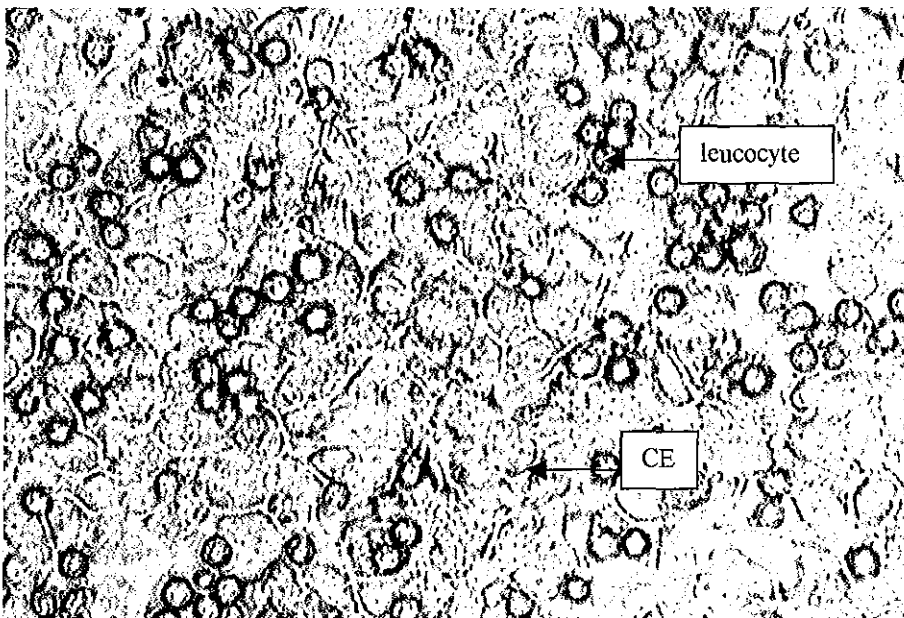


Figure III-1. PNN adhérents sur une monocouche de CE (x40).

### III.1.3. Contrôle de l'homogénéité du dépôt des neutrophiles sur la lamelle de silice

Avant la prise d'images, une vérification du dépôt aléatoire des cellules est effectuée. La surface est explorée globalement et 50 images de la lame sont prises pour chaque valeur de flux imposée. Afin de vérifier l'homogénéité des mesures, le nombre de PNN est compté pour chaque image. A partir du graphe obtenu, l'équation de la droite de régression linéaire est calculée. La pente de la droite sert de référence pour accepter ou rejeter l'expérience: lorsque le coefficient directeur de la droite est suffisamment proche de 0, l'homogénéité du dépôt des PNN à la surface est respectée. Pour chaque valeur de flux l'équation de la droite de régression linéaire est calculée.

La Figure III-2 montre un exemple de contrôle du dépôt cellulaire à la surface.

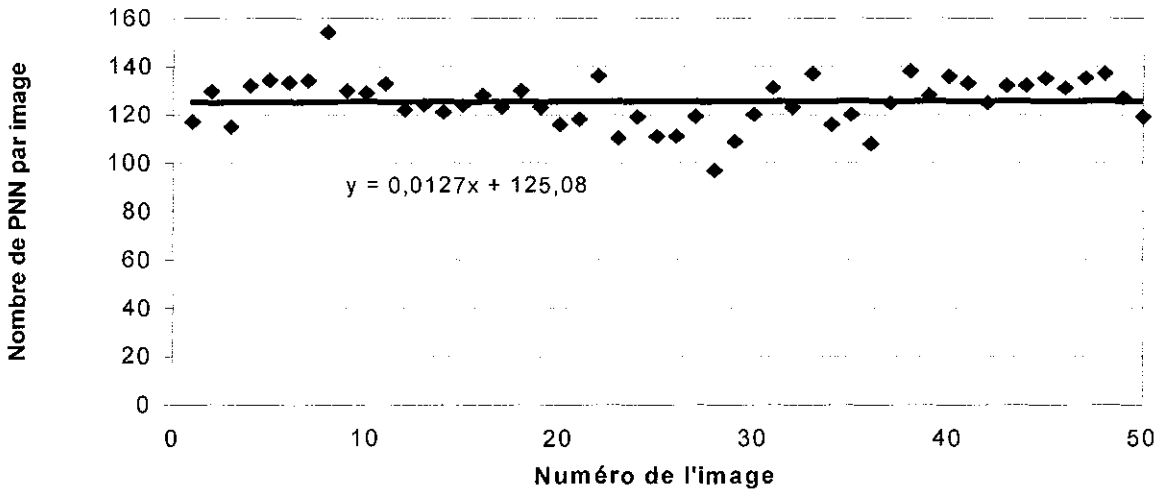


Figure III-2. Evaluation de l'homogénéité du dépôt cellulaire à la surface de la lame.

### III.1.4. Evolution du taux de couverture en fonction de la concentration cellulaire

Il est nécessaire de contrôler la corrélation entre la concentration cellulaire et le taux de couverture afin de vérifier que toutes les cellules se déposent bien sur la lamelle recouverte de fibrinogène ou de CE.

Ainsi qu'il est montré sur la Figure III-3, le taux de couverture augmente proportionnellement à la concentration de PNN injectés dans la chambre de flux démontrant que toutes les cellules se déposent à la surface et que la formation de doublets ou agrégats est négligeable.

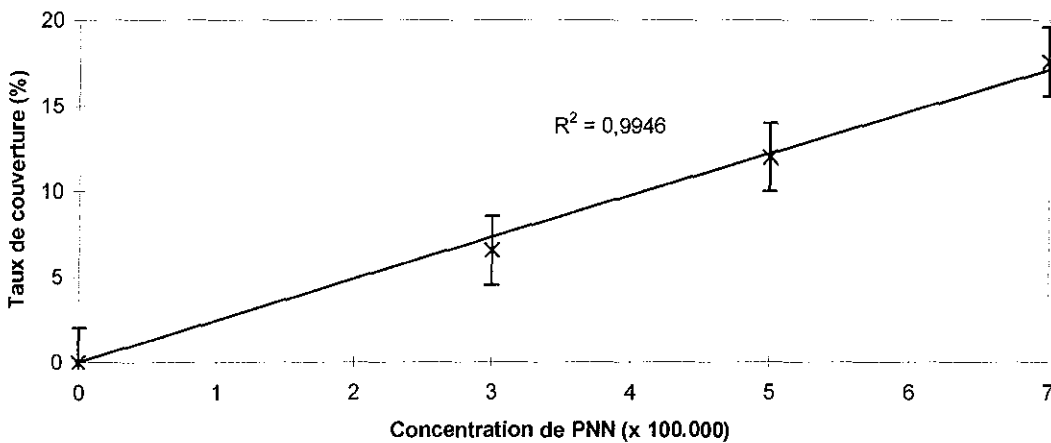


Figure III-3. Influence de la concentration cellulaire sur le taux de couverture.

### III.1.5. Contrôle de l'état d'activation des leucocytes

#### III.1.5.1. Etude quantitative

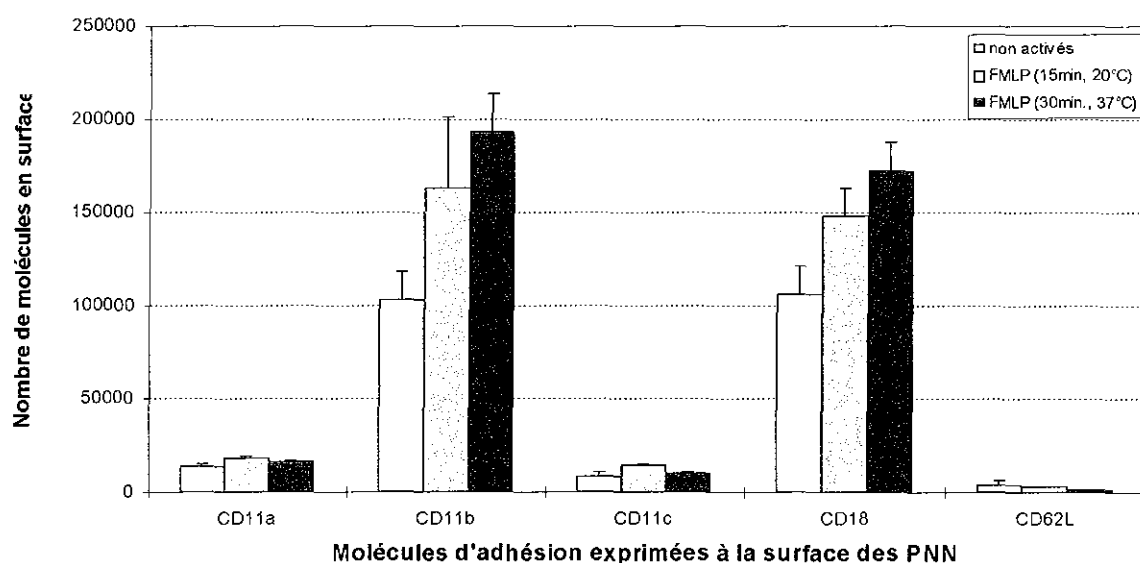
Nous avons quantifié l'expression des cinq principales molécules d'adhésion à la surface des PNN par cytométrie de flux:

- CD62L (L-sélectine) impliquée dans la phase de rolling.
- CD11a, CD11b, CD11c et CD18 impliquées dans la phase d'adhésion ferme. L'intégrine CD18 est la sous-unité  $\beta$  commune aux 3 sous-unités  $\alpha$  CD11a, CD11b, CD11c.

Les PNN non marqués, considérés comme témoins négatifs, ont permis d'obtenir la valeur d'auto-fluorescence des PNN et ainsi de la retrancher aux valeurs obtenues pour les PNN marqués.

Le contrôle isotypique s'est révélé négatif montrant ainsi la spécificité des anticorps dirigés contre les molécules d'adhésion étudiées.

Sur la [figure III-4](#) sont rassemblés les résultats obtenus pour la quantification des molécules d'adhésion sur les PNN en fonction de leur état d'activation.



**Figure III-4.** Expression des molécules d'adhésion à la surface des PNN (CD62L, CD11a,b et c, CD18) dans différentes conditions: PNN non activés, Incubation avec du FMLP à  $10^{-7}$ M (15min,  $T^{\circ}$  ambiante) ou avec du FMLP  $10^{-7}$ M (30min à  $37^{\circ}$ C).



D'après les résultats obtenus, on peut observer que le niveau d'expression varie en fonction de la nature de la molécule d'adhésion et des conditions d'incubation (temps, température):

- Chez les cellules quiescentes, l'expression de CD11a, CD11c et CD62-L, reste très faible (inférieur à 15.000 molécules/cellule). Par contre, le niveau d'expression de CD11b et CD18 est nettement supérieur ( $102.898 \pm 15.587$  et  $106.097 \pm 15.155$ ).
- L'incubation des PNN avec le FMLP n'a aucun effet significatif sur l'expression de CD11a, CD11c ou CD62-L quelles que soient les conditions d'incubation de l'agent chimiotactique.
- En revanche, l'effet du FMLP est largement démontré sur les intégrines CD11b et CD18. En effet, en comparaison avec les PNN quiescents, le nombre de molécules CD11b est augmentée de 1,6 fois (FMLP: 15 min, 20°C) à 1,9 fois (FMLP: 30min, 37°C), et l'expression membranaire de CD18 est multipliée par 1,3 (FMLP: 15min, 20°C) et par 1,5 (FMLP: 37°C, 30min).

L'expression des molécules d'adhésion leucocytaires est donc modulée par la stimulation d'agents bactériens. L'infection bactérienne induit, en effet, des changements quantitatifs significatifs au niveau de l'expression surfacique des molécules impliquées dans la phase d'adhésion ferme de la cascade d'adhésion leucocyte/endothélium, les CD11b et CD18. (Labrador et col. 1999 et 2000) la vue de ces résultats, nous avons jugé judicieux d'utiliser les conditions expérimentales suivantes: stimulation des PNN avec le FMLP pendant 30min à 37°C.

#### III.1.5.2. Etude qualitative: localisation des molécules d'adhésion à la surface

Nous avons poursuivi ces travaux par une étude qualitative de l'expression des molécules d'adhésion à la surface cellulaire avant et après activation des cellules. Ces expériences ont été réalisées en microscopie de fluorescence 3D.

Seules les 2 intégrines C11b et CD18 ont été étudiées, car les expériences de cytométrie de flux ont montré non seulement une expression importante à la surface mais aussi une modulation quantitative de leur expression après stimulation par le FMLP.

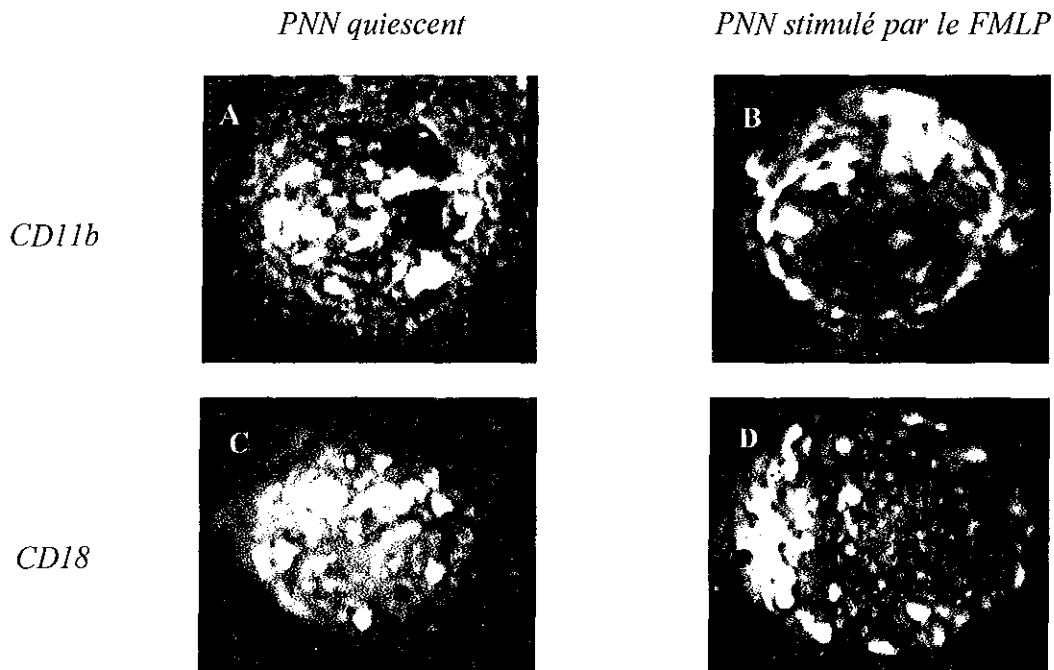
L'adhésion leucocytaire dépend de l'expression de récepteurs dont l'avidité pour leurs ligands fluctue en fonction de l'état d'activation de la cellule. La diapédèse requiert non

seulement une capacité de liaison des cellules aux CE, mais aussi la régulation de l'expression de ligands à la surface de ces cellules. La principale intégrine de surface du neutrophile, CD11b, adhère à l'endothélium *via* ICAM-1, favorisant de la sorte la fixation, et donc l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium.

Les images suivantes présentent les expressions de ces molécules sous différentes conditions: conditions statiques, stimulation par du FMLP.

Les molécules d'adhésion présentent une répartition homogène chez les cellules quiescentes (Figures III-5 A et C).

Après stimulation avec le peptide formylé mimant un peptide de dégradation bactérienne, on a remarqué des changements de l'expression en surface. En effet, on constate une forte polarisation des molécules d'adhésion (Figures III-5 B et D).



**Figure III-5.** Influence de l'état d'activation sur la répartition des molécules d'adhésion à la surface des PNN ( $\times 100$ , NA 0,95, Cellscan<sup>TM</sup>).

En réponse à l'incubation avec un agent mimant une infection bactérienne, l'expression en surface des intégrines CD11b et CD18 subit des modifications quantitatives (augmentation du taux d'expression) mais aussi qualitatives (regroupement des molécules). A la vue de ces résultats, plusieurs questions restent en suspens notamment:

- Quel est le rôle du regroupement des intégrines (clusterisation) à la surface des PNN ?

- Ces modifications de l'expression des intégrines sont-elles à l'origine de modifications de l'adhésion des PNN à leur substrat ?

### III.1.6. Contrôle de l'état d'activation des CE

L'adhésion anormale des leucocytes à l'endothélium est l'un des événements précoces associés à l'athérogénèse. Les molécules d'adhésion, notamment les E, P-sélectines, ICAM-1 et VCAM-1 des CE jouent des rôles majeurs dans le recrutement des leucocytes (monocytes, PNN) comme décrit précédemment (cf. chapitre I). Parmi les molécules d'adhésion endothéliales, ICAM-1 participe aux deux dernières étapes du processus d'adhésion leucocytaire, l'adhésion ferme et la transmigration.

La molécule ICAM-1, également connue sous le nom de CD54, est une glycoprotéine membranaire comportant 7 sites potentiels de glycosylation. Cet antigène de poids moléculaire de 90kDa est composé, dans sa partie extracellulaire, de 5 domaines de type immunoglobuline (Makgoba et col. 1988). La région intra-cytoplasmique est une séquence de 28 acides aminés en connexion avec les protéines du cytosquelette (Carpén et col. 1992).

L'expression de ICAM-1 est modifiée lorsque la CE se trouve dans un état activé à la suite d'une stimulation biochimique ou mécanique. Cependant, il existe une certaine hétérogénéité dans les résultats publiés par différentes équipes sur les modifications de l'expression de ICAM-1 des CE exposées aux flux (Tableau III-1).

**Tableau III-1.** Expression de ICAM-1 de CE - Rappel bibliographique.

Cellules	$\tau$ (Pa)	Temps d'exposition (h)	Expression de ICAM-1		Caractérisation	Références
			à la surface	ARNm		
HUVEC	0,25 à 4,6	4-48	↑	↑ (2-24h)	T-dépendant $\tau$ -dépendant	Nagel et col 1994
MEC	0 à 0,71	0-24	—			Ando et col 1994
HUVEC	1,5	1-24	↑	↑ (4h)	T-dépendant	Tsuboi et col 1995
HUVEC	0,8 (laminaire) 1 à 1,2 (turbulent)	3-15	↑ —		T-indépendant	Morigi et col. 1995
RCEC*	0,326±0,058 3,05±0,46	5 jours	↓	↑		Walpola et col. 1995
HUVEC	0,2 à 2,5	1-24	biphasique		T-indépendant	Sampath et col. 1995
MAEC*	$\tau$ faible et complexe	4 semaines	↑			Nakashima et col. 1995
HUVEC	+0,5 à -0,5 oscillatoire	24	↑	↑ (24h)	T-indépendant	Chappell et col. 1995

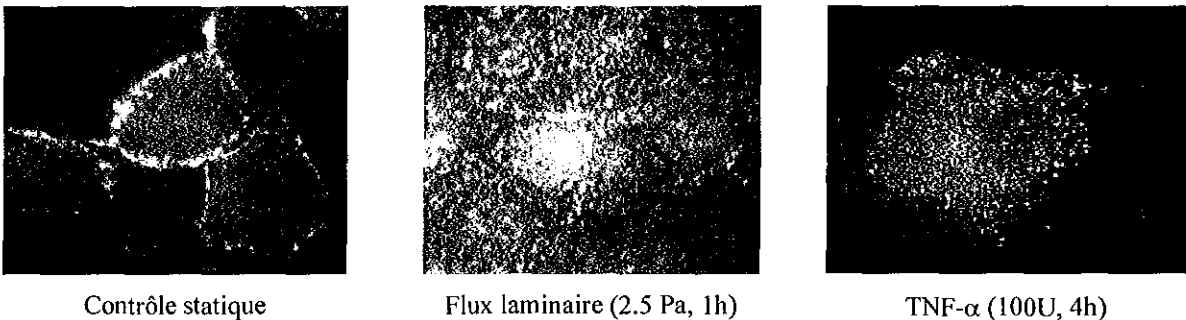
\* : *in vivo* ; ↑ : augmente ; ↓ : diminue ; — : pas de variation significative ; T : temps d'exposition ;  $\tau$  : contrainte de cisaillement ; RCEC : CE de la carotide commune de lapin ; MAEC : CE d'aorte de souris.

Sachant que la molécule ICAM-1, exprimée à la surface des CE, est le ligand des intégrines leucocytaires, nous nous sommes particulièrement intéressés aux changements de l'expression de celle-ci en réponse à différents stimuli.

### III.1.6.1. Etude qualitative: localisation des molécules ICAM-1 à la surface

Nous avons étudié l'effet de stimulations mécanique ou biochimique sur la répartition de ICAM-1 à la surface endothéliale:

- stimulation mécanique: contraintes de cisaillement. Nous avons appliqué un flux laminaire et constant sur la monocouche de CE.
- stimulation biochimique: TNF- $\alpha$ . Le TNF- $\alpha$ , qui appartient à la famille des interleukines, est produit par les lymphocytes activés et par les monocytes/macrophages. Il constitue un médiateur majeur de l'inflammation, induit chez l'endothélium vasculaire la production de substances vasodilatatrices (NO) et de molécules adhésives qui favorisent la fixation des leucocytes. Il a également un effet antitumoral par stimulation de l'activité phagocytaire des leucocytes.



**Figure III-6.** Effet d'une stimulation mécanique ou biochimique sur la localisation et l'expression de ICAM-1 à la surface des CE. ( $\times 100$ , NA 0,95, Cellscan<sup>TM</sup>).

La Figure III-6 montre une distribution périphérique des ICAM-1 à la surface des cellules en conditions statiques. En revanche, après application d'un flux, les molécules sont distribuées de façon homogène à la surface cellulaire. La stimulation par le TNF- $\alpha$  induit des modifications similaires.

La répartition des molécules ICAM-1 à la surface cellulaire est donc dépendante de l'état d'activation des cellules mais non de la nature de cette stimulation. Ces changements

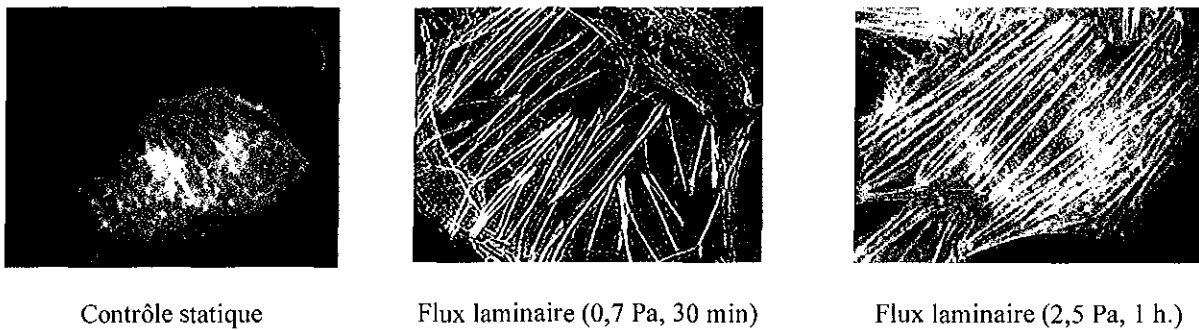
peuvent être le résultat d'une migration des ICAM-1 et/ou d'une expression protéique *de novo* (Nagel et col. 1994, Tsuboi et col. 1995)

### III.1.6.2. Etude de l'évolution du cytosquelette

Il a été démontré que l'application d'un flux sur les CE provoque un changement de leur morphologie et une orientation différente des cellules selon la direction du flux. Le recrutement du cytosquelette dans le processus de mécano-transduction étant une des hypothèses mécanistiques, nous avons étudié la formation et l'orientation des fibres de stress par le marquage avec la phalloïdine-rhodamine.

La phalloïdine est une toxine présente chez un champignon (*Amanita phalloïdes*) qui a une grande affinité pour l'actine filamenteuse (actine F). Elle bloque l'actine sous forme polymérisée par stabilisation de certains contacts entre monomères. La phalloïdine se lie à deux monomères au niveau des méthionines 119 et 355, de la cystéine 10 et du glutamate 117 dans la face arrière du sous-domaine I (Vandekerckhove et col. 1985). Grâce à son couplage à la rhodamine, une molécule fluorescente, on peut observer les fibres d'actine par fluorescence.

La Figure III-7, montre l'évolution des fibres de stress en fonction de la contrainte de cisaillement. Il existe un réseau de microfilaments d'actine non organisé chez les CE statiques. Après l'application d'un flux (0,7Pa, 30 min), des fibres de stress apparaissent. Si on soumet les CE à un flux laminaire de 2,5Pa pendant 1h, on constate non seulement que le nombre et la longueur de fibres de stress augmentent mais également qu'elles sont orientées selon la direction du flux.



**Figure III-7.** Apparition des fibres d'actine en fonction des contraintes de cisaillement ( $\times 100$ , NA 0,95, Cellscan<sup>TM</sup>).

Ces deux séries d'expériences ont montré des modifications de la distribution de ICAM-1 à la surface et du cytosquelette après stimulation des CE. Une question reste à poser:

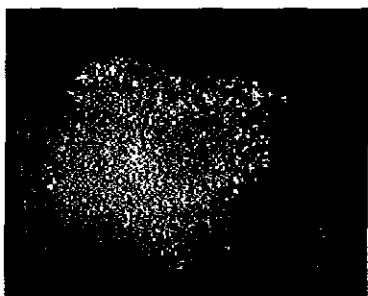
le changement de la localisation des ICAM-1 à la surface des CE est-il lié à l'apparition des fibres de stress ?

### III.1.6.3. Relation entre cytosquelette et expression de ICAM-1

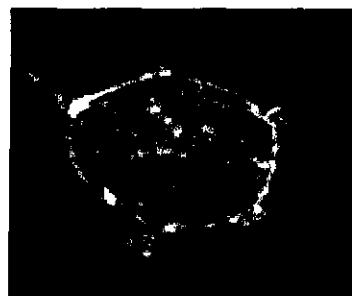
Le cytosquelette présente des modifications importantes lors de l'activation des cellules, son implication dans la réponse aux stimuli mécaniques ou biochimiques n'est donc pas à négliger. Dans ce but, nous avons mené une étude complémentaire visant à étudier les relations existantes entre l'expression de ICAM-1 et le cytosquelette. Afin de déterminer si le changement de distribution des ICAM-1 à la surface est lié à des modifications structurales du cytosquelette, nous avons étudié la co-localisation ICAM-1/cytosquelette sur les CE. Pour cela, nous avons bloqué la formation des fibres de stress par la cytochalasine D et marqué les ICAM-1 et/ou le cytosquelette des CE.

La cytochalasine D est une toxine fongique perméable qui se lie à l'extrémité barbelée des filaments d'actine inhibant leur polymérisation et dépolymérisation. Elle affecte la dynamique de l'actine, bloque le clivage cellulaire en fin de mitose et démantèle le réseau d'actine interphasique.

Les images de la [Figure III-8](#) montrent la distribution des ICAM-1 sur des CE en conditions statiques ou stimulées par le TNF- $\alpha$ . Les CE traitées par la cytochalasine D (5 $\mu$ M) et le TNF- $\alpha$  présentent une localisation périphérique des ICAM-1 comparable à celle observée chez les CE en conditions statiques.

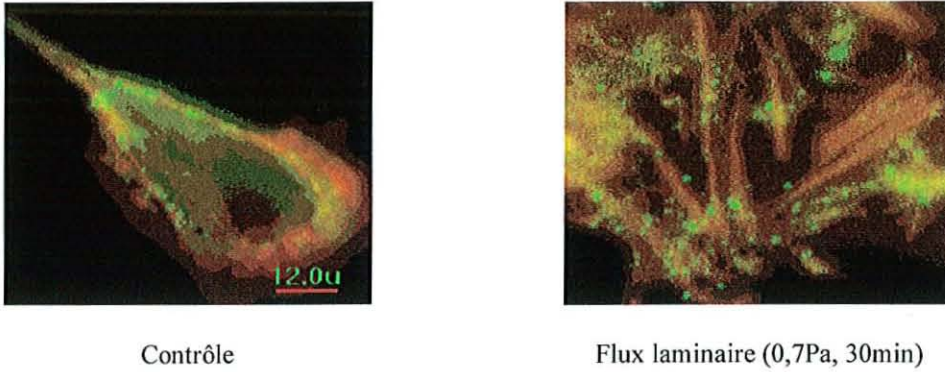


TNF- $\alpha$  (100 U, 4 h)



TNF- $\alpha$  (100 U) +  
Cytochalasine-D (5 $\mu$ M), 4 h

**Figure III-8.** Effet du TNF- $\alpha$  sur la localisation et l'expression de ICAM-1. ( $\times 100$ , NA 0,95, Cellscan<sup>TM</sup>).



**Figure III-9.** Co-localisation des fibres de stress et de ICAM-1 (fluorescence rouge: F-actine marquée par la phalloïdine-rhodamine, fluorescence verte: ICAM-1).

On remarque, sur la [Figure III-9](#), une co-localisation entre la répartition des molécules d'adhésion et celle des fibres d'actine après l'exposition au flux.

Il semble donc que la localisation des ICAM-1 soit directement corrélée à la formation des fibres de stress.

En conclusion, ces études ont mis en évidence l'influence des contraintes de cisaillement sur l'expression des molécules d'adhésion endothéliales. Les contraintes de cisaillement induisent une migration des ICAM-1 à la surface des CE, associée à la formation et à l'orientation des fibres de stress en fonction des contraintes de cisaillement. Les modifications fonctionnelles et morphologiques des CE, migration des ICAM-1 à la surface endothéliale et modifications du cytosquelette ont-elles un rôle dans l'étape d'adhésion ferme des leucocytes à la paroi vasculaire lors des phénomènes inflammatoires ?

### III.1.7. Effet de l'activation cellulaire sur le détachement des PNN

#### III.1.7.1. Détachement des PNN adhérents sur du fibrinogène

Notre étude porte sur la caractérisation de l'adhésion des PNN à l'endothélium vasculaire. Dans un premier temps, en raison de la complexité du substrat biologique naturel des PNN, les CE, nous avons effectué cette étude sur du fibrinogène qui est un substrat possible des intégrines impliquées dans la phase d'adhésion ferme.

Dans l'interprétation de ces résultats, nous considérerons que les molécules d'adhésion entrant en jeu sont exclusivement les intégrines CD11b/CD18:

- 1- ce sont les seules intégrines dont l'expression varie après stimulation des PNN par le FMLP (cf. chapitre III.1.5.1),

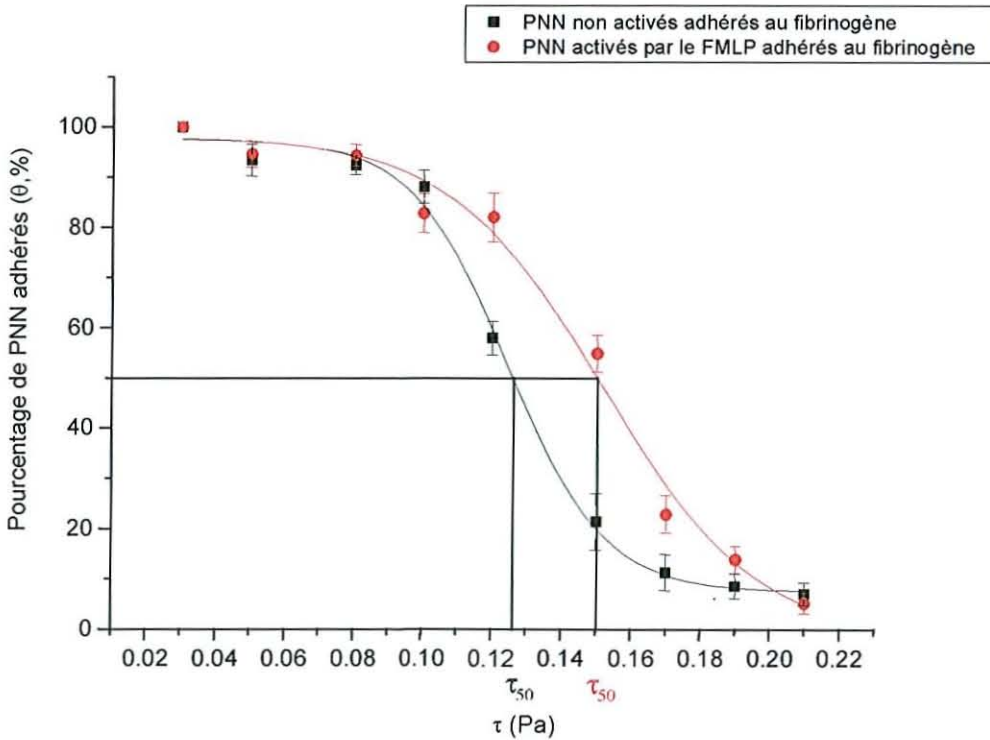
2- ce sont celles qui sont impliquées dans la phase d'adhésion ferme.

En effet, sur le lieu de l'inflammation, les intégrines leucocytaires sont activées par les chémokines, et les leucocytes peuvent alors remplir leur rôle cytotoxique sur l'endothélium lésé. A la surface des leucocytes, les sélectines dont la CD62L, impliquée dans la phase de rolling et non dans l'adhésion ferme des PNN, n'est pas un ligand du fibrinogène et n'est pas sensible à la stimulation par les agents chimiotactiques tels que le FMLP. En revanche, les intégrines, CD11b/CD18 et CD11c/CD18, peuvent notamment se lier au fibrinogène par des domaines spécifiques (Altieri et col. 1990, Loike et col. 1991) justifiant ainsi notre modèle de substrat. Elles jouent un rôle important dans l'adhésion, la phagocytose et la dégranulation des neutrophiles.

L'étude des forces d'adhésion des leucocytes au fibrinogène permettra de déterminer le rôle des intégrines dans l'adhésion des leucocytes.

#### a). PNN non activés

La Figure III-10 présente les résultats obtenus pour le détachement des PNN non activés adhérents au fibrinogène.



**Figure III-10.** Influence de l'état d'activation sur le détachement des PNN non activés ou activés par du FMLP ( $10^{-7}M$ , 30min,  $37^{\circ}C$ ) puis adhérents au fibrinogène. ( $n=7$ ,  $p<0,05$ ). Courbes de régression sigmoïde ( $R^2>0,99$ ).



L'évolution du pourcentage des leucocytes ( $\theta$ ) non stimulés adhérents au fibrinogène en fonction de la valeur de la contrainte de cisaillement ( $\tau$ ) présente 3 phases caractéristiques:

1.  $0,03\text{Pa} \leq \tau \leq 0,08\text{Pa}$ : on observe l'existence d'un plateau avec une variation faible de  $\theta$  (100% à  $88 \pm 3\%$ ).
2.  $0,1\text{Pa} \leq \tau \leq 0,17\text{Pa}$ : on constate la présence d'une chute brutale de  $\theta$  ( $88 \pm 3\%$  à  $11 \pm 3\%$ ).
3.  $0,19\text{Pa} \leq \tau \leq 0,21\text{Pa}$ : on observe l'existence d'un plateau car  $\theta$  ne varie pas significativement ( $11 \pm 3\%$  à  $7 \pm 2\%$ ).

Nous avons modélisé l'évolution de  $\theta$  par une courbe de régression sigmoïde. La valeur de la contrainte de cisaillement pour laquelle 50% des cellules sont détachées du substrat ( $\tau_{50}$ ) a été déterminée. Dans le cas présent,  $\tau_{50} = 0,124\text{Pa}$ .

#### b). PNN stimulés par le FMLP

D'après les résultats présentés sur la Figure III-10 on constate une évolution similaire de la courbe de détachement des leucocytes stimulés par le FMLP à celle des leucocytes quiescents. En effet, on constate un processus triphasique similaire mais l'existence d'une translation vers la droite de la courbe sur l'axe (XX'):

1.  $\tau \leq 0,12\text{Pa}$ : plateau avec une légère variation de  $\theta$  (100% à  $82 \pm 4,8\%$ ).
2.  $0,15\text{Pa} \leq \tau \leq 0,19\text{Pa}$ : chute brutale de  $\theta$  ( $82 \pm 4,8\%$  à  $14 \pm 2,7\%$ )
3.  $0,19\text{Pa} \leq \tau \leq 0,21\text{Pa}$ : amorçage d'un plateau avec une diminution faible de  $\theta$  ( $14 \pm 2,7\%$  à  $5 \pm 2\%$ ).

Par contre, on constate une augmentation notable de la valeur de flux à appliquer pour détacher 50% des cellules:  $\tau_{50} = 0,152\text{Pa}$

On peut en déduire que le processus de détachement des leucocytes activés par le médiateur inflammatoire est identique à celui des PNN quiescents. D'après les 2 types d'expériences (n=7) ? on observe que dans le cas des PNN stimulé par le FMLP:

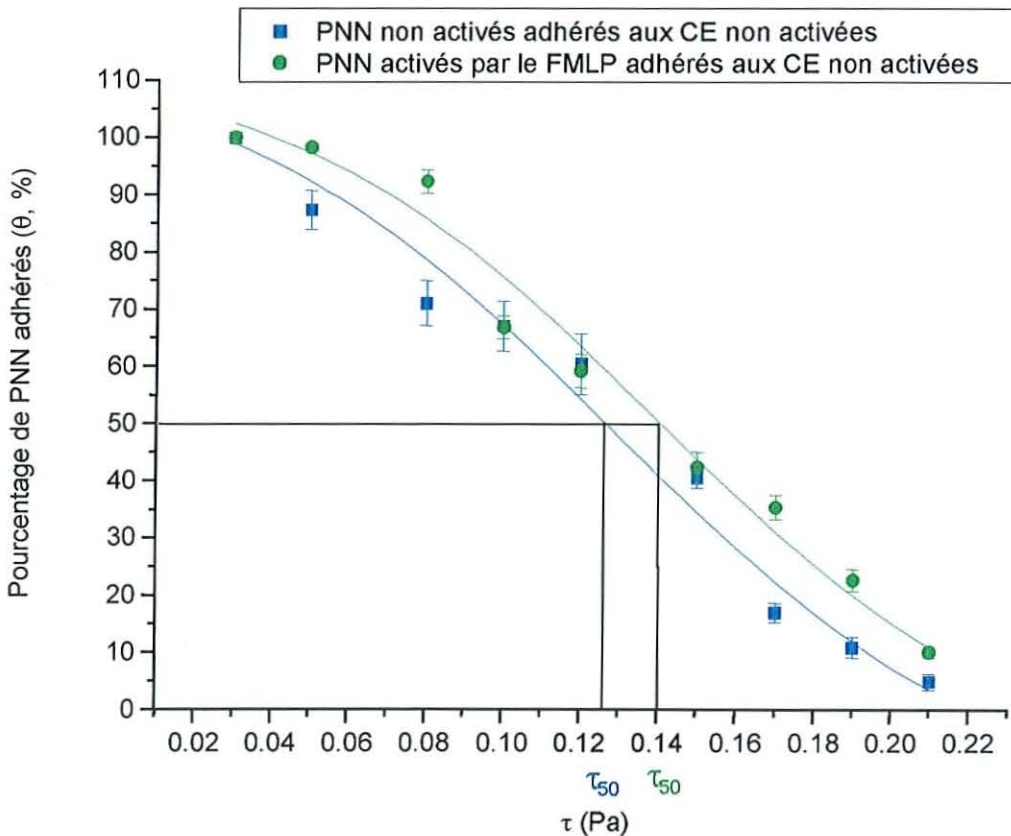
- ◆  $\theta$  est significativement supérieur pour  $0,12\text{Pa} \leq \tau \leq 0,17\text{Pa}$  ( $p < 0,05$ )
- ◆  $\tau_{50}$  est significativement supérieur ( $p < 0,05$ ).

Par conséquent, l'activation des leucocytes par le FMLP augmente la force d'adhésivité des PNN mais ne modifie pas le processus de détachement des leucocytes au fibrinogène.

### III.1.7.2. Détachement des PNN adhérents sur des CE non stimulées

Les CE portent à leur surface des ligands non seulement pour les intégrines, CD11b/CD18 et CD11c/CD18, mais pour d'autres molécules d'adhésion leucocytaires. Elles expriment une diversité de ligands capables de se lier au PNN plus importante que le fibrinogène qui se lie spécifiquement à ces 2 intégrines. Cependant, les CE non activées expriment peu de ligands pour les leucocytes afin de les laisser circuler librement. L'étude des forces d'adhésion des PNN sur les CE permettra donc d'obtenir de nouvelles données sur l'adhésion leucocytaire aux CE et notamment sur le rôle des molécules responsables impliquées dans cette liaison spécifique.

La [Figure III-11](#) présente les résultats obtenus pour le détachement des PNN, quiescents et activés par le FMLP, puis adhérents à une monocouche de CE non activées.



**Figure III-11.** Influence de l'état d'activation sur le détachement des PNN non activés ou activés par le FMLP ( $10^{-7}$ M, 30min, 37°C) puis adhérents aux CE non stimulées. (n=7, p<0,05).  
Courbes de régression sigmoïde ( $R^2>0,99$ )

#### a). PNN non activés

Sur la Figure III-11, on observe l'évolution du nombre de PNN adhérents au CE après application d'une contrainte de cisaillement de force croissante. On remarque que le processus de détachement est tout à fait différent de celui observé si le fibrinogène est utilisé comme substrat.

En effet, le pourcentage de PNN adhérents diminue de façon proportionnelle avec l'augmentation de la valeur du flux:  $\theta$  diminue proportionnellement avec l'augmentation du flux appliqué. En revanche,  $\tau_{50}$  (0,129 Pa) n'est pas significativement différent du  $\tau_{50}$  des leucocytes quiescents adhérents au fibrinogène.

#### b). PNN stimulés par le FMLP

De même que dans le cas des PNN non stimulés, le détachement des PNN stimulés par le FMLP adhérents aux CE suit une évolution proportionnelle à la valeur du flux (Figure III-11). En effet  $\theta$  diminue proportionnellement avec l'augmentation du flux. Cependant, on observe une translation de la courbe sur l'axe des (XX') après stimulation des leucocytes. Par ailleurs,  $\tau_{50}$  est légèrement supérieure (0,139Pa).

On peut en déduire que le processus de détachement des leucocytes activés par le médiateur inflammatoire est identique à celui des PNN quiescents. D'après les 2 types d'expériences (n=7) on observe que dans le cas des PNN stimulé par le FMLP:

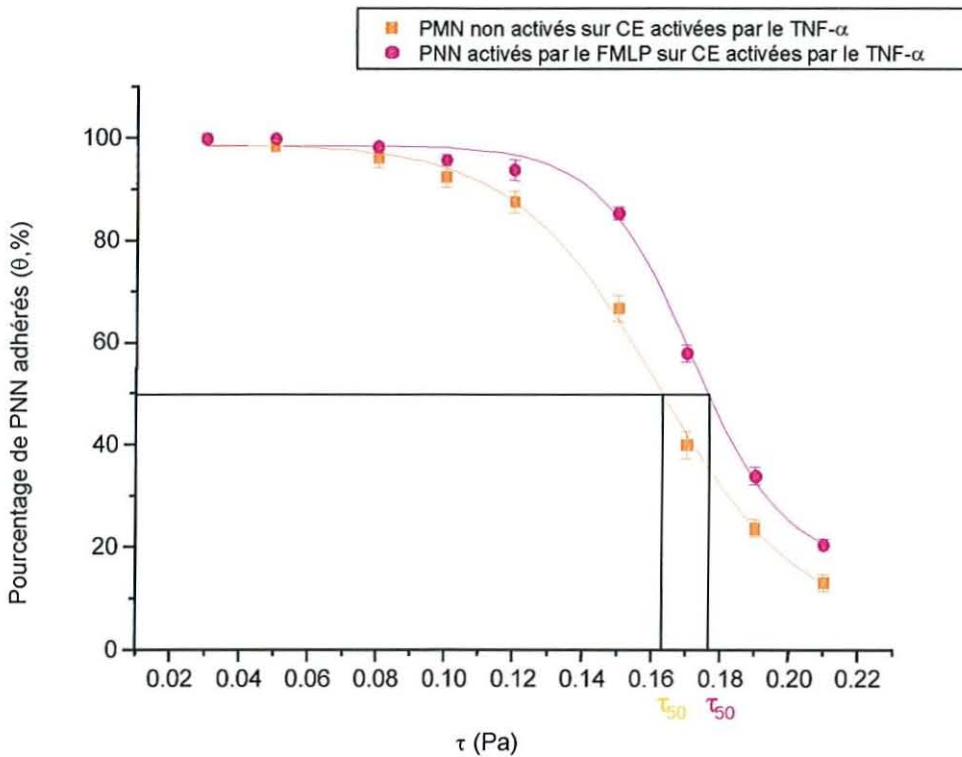
- ◆  $\theta$  est significativement supérieur pour  $0 \leq \tau \leq 0,21$ Pa (p<0,05)
- ◆  $\tau_{50}$  est significativement supérieur (p<0,05)

En conclusion, le détachement des leucocytes à l'endothélium est proportionnel à la contrainte appliquée quel que soit l'état d'activation des leucocytes. L'activation des PNN ne modifie pas le processus de détachement des PNN aux CE mais augmente les forces d'adhésion leucocytes/endothélium.

### III.7.1.3. Détachement des PNN adhérents aux CE stimulées par le TNF- $\alpha$

Le TNF- $\alpha$  a différents effets dont la stimulation de la synthèse par l'endothélium vasculaire de molécules adhésives qui favorisent la fixation des leucocytes. En effet, les résultats que nous avons présentés dans le chapitre III-6-2 ont montré que cette cytokine augmente l'expression de ICAM-1, modifie sa localisation à la surface des CE et induit la formation de fibres de stress. Le TNF- $\alpha$  n'agit pas uniquement sur l'expression des ICAM-1 mais induit des modifications intracellulaires chez les CE.

La Figure III-12 présente les résultats expérimentaux sur l'influence de l'activation sur le détachement des PNN adhérents à des CE stimulées par le TNF- $\alpha$ .



**Figure III-12.** Influence de l'état d'activation sur le détachement des PNN non activés ou activés par le FMLP ( $10^{-7}M$ , 30min,  $37^{\circ}C$ ) puis adhérents aux CE stimulées par le TNF- $\alpha$ . ( $n=5$ ,  $p<0,05$ ). Courbes de régression sigmoïde ( $R^2>0,99$ ).

#### a). PNN non activés

La figure III-12 présente l'évolution du pourcentage de PNN quiescents adhérents aux CE stimulées par le TNF- $\alpha$ . Le décollement des leucocytes se divise en 3 phases:

1.  $\tau \leq 0,1 Pa$  : plateau avec une variation peu importante de  $\theta$  (100% à  $92 \pm 2$  %).

2.  $0,1\text{Pa} \leq \tau \leq 0,21\text{Pa}$ : chute brutale de  $\theta$  ( $92 \pm 2\%$  à  $13 \pm 1,6\%$ )
3. Tendence vers la formation d'un plateau pour  $\tau \geq 0,21\text{Pa}$

De plus  $\tau_{50} = 0,161\text{Pa}$ .

#### **b). PNN stimulés par le FMLP**

La Figure III-12 présente le pourcentage de PNN, activés par le FMLP, adhérents aux CE stimulées par le TNF- $\alpha$ . De même que dans le cas des leucocytes non stimulés, le phénomène se compose de 3 phases:

1.  $\tau \leq 0,12\text{Pa}$  : plateau avec  $\theta$  qui varie de 100% à  $94 \pm 2\%$ .
2.  $0,12\text{Pa} \leq \tau \leq 0,2\text{Pa}$ : chute brutale de  $\theta$  ( $94 \pm 2\%$  à  $20 \pm 1,2\%$ )

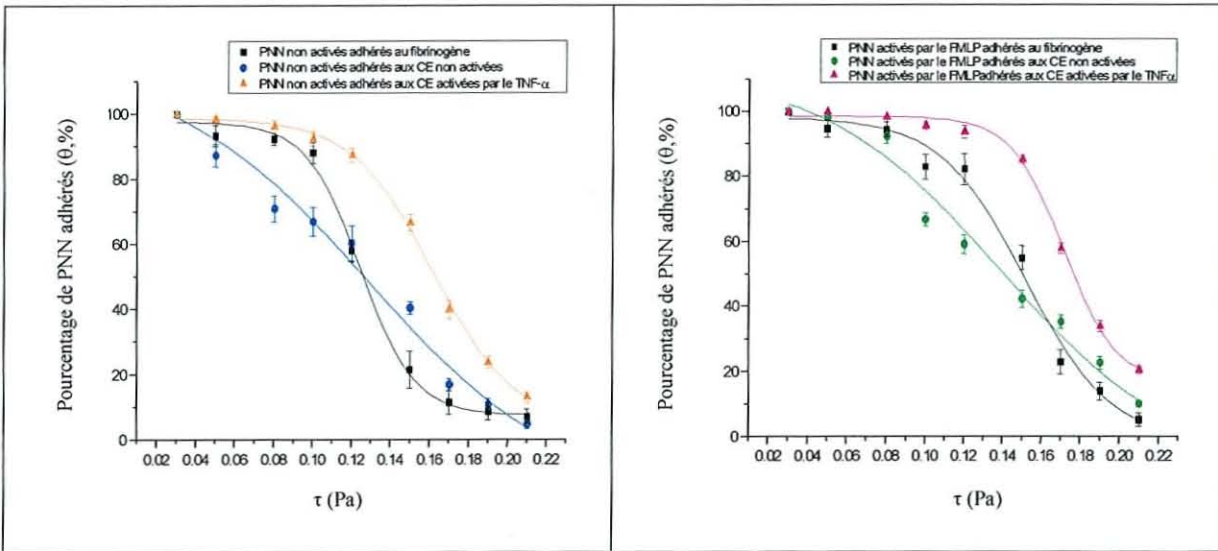
Par contre  $\tau_{50}$  est plus élevé:  $\tau_{50} = 0,171\text{Pa}$ .

En conclusion, le détachement des leucocytes à l'endothélium activé suit un processus triphasique avec décollement rapide des cellules après une valeur de flux seuil quelque soit l'état d'activation des leucocytes. L'activation des PNN n'affecte en rien le processus de détachement des PNN aux CE activées par le TNF- $\alpha$  mais augmente les forces d'adhésion des leucocytes.

Nos résultats précédents (cf. chapitre III.1.5) ont montré que l'activation par le FMLP provoque non seulement une augmentation significative du taux d'expression des intégrines CD11b et CD18 mais aussi une localisation polarisée à la surface des PNN. Il semblerait donc que les modifications quantitatives et spatiales induites par le FMLP sur ces intégrines soient à l'origine des modifications des propriétés d'adhésion des leucocytes sur les 3 substrats étudiés. En effet, l'activation augmente le taux de PNN adhérents donc augmente la force d'adhésivité des PNN à leurs ligands.

#### **III.1.8. Effet du substrat sur le détachement des PNN**

La Figure III-13 présente l'évolution du nombre de PNN adhérents sur différents substrats en fonction du flux laminaire appliqué.



**Figure III-13.** Influence de la nature du substrat sur le détachement des PNN non activés ou activés par du FMLP ( $10^{-7}$  M, 30 min,  $37^{\circ}\text{C}$ ) puis adhérents à différents substrats. ( $n=5$  pour les PNN adhérents sur CE stimulées par le  $\text{TNF-}\alpha$  et  $n=7$  pour les PNN adhérents sur fibrinogène ou CE quiescentes,  $p<0,05$ ). Courbes de régression sigmoïde ( $R^2>0,99$ )

On remarque que les courbes des processus de détachement sont similaires quel que soit l'état d'activation des PNN. Les processus de détachement sont directement liés à la nature du substrat (fibrinogène, CE non stimulées, CE stimulées par le  $\text{TNF-}\alpha$ ) et ne sont pas modifiés après l'activation des leucocytes par le FMLP. La nature du processus du détachement est fonction du substrat, tandis que la force d'adhésivité est corrélée à l'état d'activation des PNN.

On observe que le détachement des leucocytes suit différents processus selon la nature du substrat. Dans le cas du fibrinogène aussi bien que des CE stimulées par le  $\text{TNF-}\alpha$ , la courbe de détachement suit une évolution en 3 phases (plateau-chute brusque-plateau).

Le fibrinogène est un ligand spécifique des intégrines  $\text{CD11b/CD18}$  et  $\text{CD11c/CD18}$ . Les interactions leucocytes/fibrinogène sont donc, uniquement, supportées par ces 2 intégrines. Par ailleurs, la stimulation des CE par le  $\text{TNF-}\alpha$  induit une augmentation et une localisation apicale des  $\text{ICAM-1}$ , intégrines exprimées par les CE et participant spécifiquement à la phase d'adhésion ferme des leucocytes à l'endothélium. Les  $\text{ICAM-1}$  deviennent ainsi plus accessibles à leur ligands notamment les  $\text{CD11a, b}$  et  $\text{c}$  et  $\text{CD18}$  exprimés à la surface des leucocytes. Ces 2 types d'interactions seraient responsables du plateau observé sur les courbes de détachement des leucocytes à faible flux.

En revanche, ainsi que nous l'avons montré dans le chapitre III.1.6.1, les CE à l'état quiescent ne présentent pas une répartition apicale de  $\text{ICAM-1}$  prévenant l'adhésion des PNN

et leur permettant de circuler librement et rapidement dans le sang. Par contre, elles présentent divers ligands spécialisés dans les différentes étapes de la cascade d'adhésion leucocytes/endothélium: E, P-sélectines et VCAM-1, permettant une interaction leucocytes/endothélium qui expliquerait, néanmoins, la présence d'un phénomène d'adhésion. Ceci serait responsable du détachement plus important des leucocytes pour  $\tau < 0.1$  Pa si le substrat est constitué d'une monocouche de CE en comparaison au fibrinogène ou aux CE stimulées.

Par contre, il est connu que les contraintes de cisaillement induisent dans le temps des modifications de l'expression et de la localisation des ICAM-1 à la surface des CE (cf. chapitre III.1.6.1). L'"adhésivité" du substrat serait donc modifiée dans le temps par les contraintes de cisaillement imposées par le flux. Ce phénomène serait responsable de l'évolution différente des courbes de détachement entre les leucocytes adhérents au fibrinogène et les leucocytes adhérents au CE.

### III.2. Interactions entre les différents acteurs de la mécano-transduction

Dans nos travaux, nous avons vu que les contraintes mécaniques telles que les contraintes de cisaillement induisaient des modifications fonctionnelles et morphologiques des CE. En effet, l'application d'un flux laminaire constant entraîne une modification de la répartition des molécules d'adhésion ICAM-1 à leur surface, corrélée à la formation de fibres de stress. Ces phénomènes entraînent une modification de leurs propriétés d'adhésion.

La CE est donc sensible aux signaux mécaniques. Mais comment la CE assimile-t-elle les modifications de son environnement ? Cette question fut à l'origine de nombreuses recherches ces dernières années. Il a ainsi été montré des modifications due à l'organisation du cytosquelette, de l'expression des molécules d'adhésion à la surface, de l'expression de certains gènes et de protéines correspondantes. Cependant beaucoup de progrès restent à faire dans la compréhension du phénomène de transduction du signal mécanique en signal biochimique, des différentes voies de transduction existantes et de leurs interactions au sein de la CE. Toutes ces investigations ont donné naissance au concept de mécano-transduction (cf. chapitre I.1.3.2).

Dans le but de comprendre ce phénomène, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à deux étapes d'une des voies de transduction connues de la CE:

- une étape précoce: l'association de l'intégrine  $\alpha v \beta 3$  à la protéine Shc. Elle se met en place dans les premières secondes de la réponse des CE aux contraintes de cisaillement. L'intégrine joue le rôle de mécano-récepteur en transformant le signal mécanique en signal biochimique par son association avec les éléments cytoplasmiques. Cette étape constitue une des réponses précoces de la CE aux contraintes de cisaillement.
- une étape plus tardive: l'activité de la protéine kinase JNK. Elle fait partie d'une cascade de phosphorylation entre les différentes protéines kinases mise en place suite à l'activation des mécano-récepteurs. Cette activation a lieu en aval de la réponse précoce, et constitue une réponse secondaire de la CE aux contraintes de cisaillement.



Afin de mettre en évidence les coopérations existantes entre les molécules impliquées dans les différentes voies de mécano-transduction et d'identifier les répercussions en aval (activité kinase) des modifications au niveau des mécano-récepteurs, nous avons inhibé le site de liaison des intégrines, le calcium intracellulaire et les protéines Gi ayant un rôle majeur dans la mécano-transduction par leurs inhibiteurs spécifiques respectifs: le peptide RGD, le BAPTA/AM, la toxine de Pertussis.

L'effet des inhibiteurs a été quantifié grâce à l'analyse densitométrique des films autoradiographiques provenant des différents échantillons. Le taux d'association  $\alpha\beta3$ -Shc ou d'activation de la JNK est défini par l'intensité des bandes par rapport à la bande contrôle (cf. chapitre II.6.2.8).

Ces travaux ont été effectués sur des CE d'aorte de bœuf (BAECs). Elles ont été isolées de l'aorte bovine et cultivées dans un incubateur (37°C, 95% air, 5% CO<sub>2</sub>). Les monocouches confluentes sur lamelle de verre sont exposées à un flux laminaire (12dynes/cm<sup>2</sup>, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) dans une chambre de flux ou servent de contrôles statiques (cf. chapitre II).

Dans un premier temps nous décrivons les inhibiteurs utilisés avant de présenter les résultats obtenus sur l'effet des inhibiteurs sur l'association intégrine-Shc et l'activité JNK.

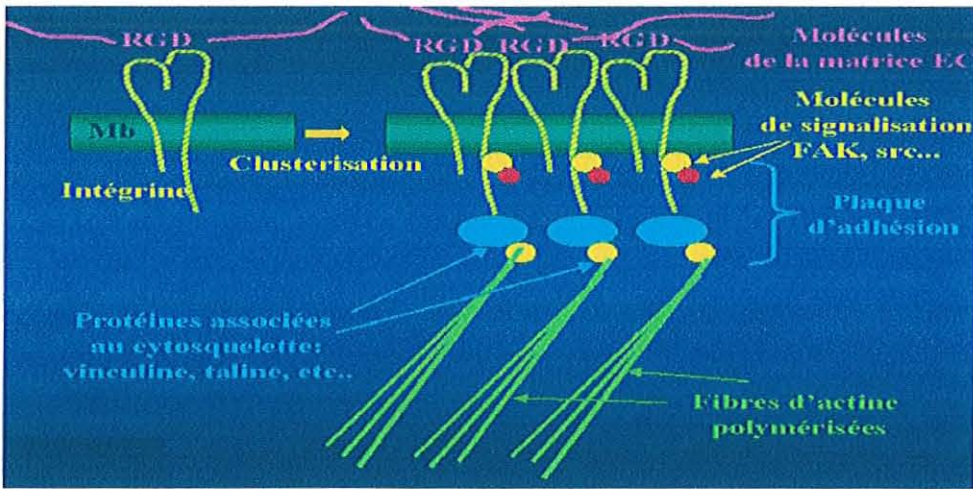
### **III.2.1. Rappel: Action des inhibiteurs**

#### **III.2.1.1. Peptide RGD: inhibition du site de liaison des intégrines**

Le traitement avec le tri-peptide RGD a pour but d'inhiber les interactions cellulaires mettant en jeu les intégrines à la surface cellulaire avec la fibronectine, le fibrinogène, la vitronectine et les cellules. Il empêche ainsi le développement embryonnaire, l'adhésion cellulaire, la migration cellulaire et le pouvoir métastatique de tumeurs expérimentales.

Nous avons utilisé cet inhibiteur afin de mettre en évidence le rôle et l'importance des intégrines dans la transduction du signal.

Le site de liaison des intégrines ne comporte que quelques acides aminés et il reconnaît une séquence spécifique d'acides aminés dont la première à avoir été individualisée est la séquence Arg-Gly-Asp (RGD). Elle est reconnue par la plupart des intégrines afin d'établir la liaison intégrine-ligand. Sur la Figure III-14 sont présentés les mécanismes induits par l'activation des intégrines à la surface endothéliale.

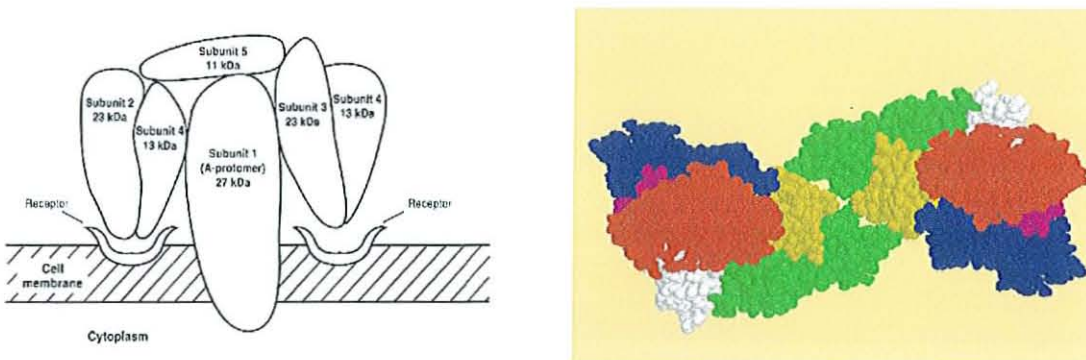


**Figure III-14.** Interactions extra- et intra-cellulaires des intégrines

III.2.1.2. La toxine de Pertussis: inhibition de la sous-unité Gi des protéines G

La toxine de Pertussis est un inhibiteur spécifique de la sous-unité Gi des protéines G fréquemment utilisé. Par ADP-ribosylation, elle altère la fonction de la protéine Gi. Cette toxine est composée de cinq sous-unités arrangées sous forme d'un protomère A composé de la sous-unité S1 et d'un oligomère B composé des sous-unités S2, S3, S4 et S5.

L'oligomère B est responsable de la fixation de la PTX à la membrane des cellules cibles et de l'internalisation de S1 qui possède une activité enzymatique d'ADP-ribosylation. Cette protéine oligomère constitue un bon modèle d'étude de la relation structure-fonction d'une enzyme ADP-ribosylante. La sous-unité S1 possède une activité d'ADP-ribosyltransférase sur différentes protéines G dans les cellules cibles (Figure III-15).



**Figure III-15:** Structure de la toxine de Pertussis: S1:235 résidus (rouge), S2:199 résidus (vert), S3:199 résidus (bleu), S4:110 résidus (jaune), S4:110 résidus (violet), S5:99 résidus (blanc).

### III.2.1.3. Le BAPTA/AM: chélation du calcium intracellulaire

La concentration de calcium dans le cytoplasme est extrêmement faible parce que, outre les mécanismes de régulation de ses échanges avec le milieu extra-cellulaire, il existe dans la cellule des organites susceptibles de le capter. Ces organites sont le réticulum sarcoplasmique, les mitochondries et le noyau cellulaire.

Au total, la concentration de calcium dans le cytoplasme peut augmenter essentiellement par entrée du calcium extracellulaire et par libération de calcium à partir du réticulum sarcoplasmique. On admet que ces deux mécanismes agissent d'une manière complémentaire: la pénétration de calcium d'origine extracellulaire à l'intérieur du cytoplasme déclenche un stockage de calcium par le réticulum sarcoplasmique.

Le calcium relargué active diverses enzymes cytoplasmiques (protéine kinase C, calmoduline, calpaïne, phospholipase A2, ...) et nucléaires comme les endonucléases. Il intervient également *via* la calmoduline dans l'activation du cycle cellulaire et *via* la NO synthase dans la synthèse du NO.

Le BAPTA/AM ( $C_{34}H_{38}F_2N_2O_{18}$ ) est un analogue du BAPTA, mais il possède l'avantage d'être perméant à la membrane et agit comme chélateur du calcium intracellulaire (Figure III-16). Le calcium chélaté par le BAPTA/AM ne peut ni se fixer sur ses molécules cibles ni induire leur activation.

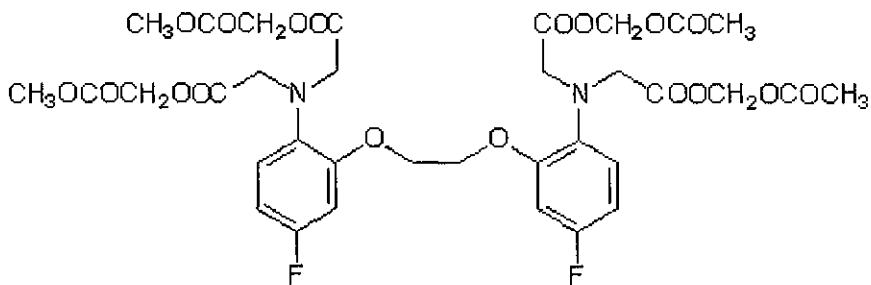
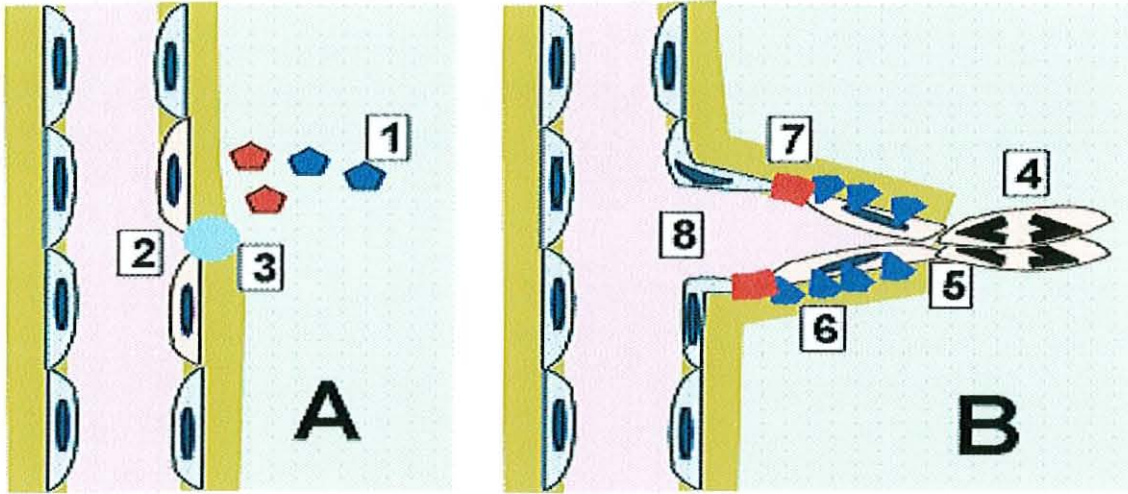


Figure III-16. Structure du BAPTA/AM.

### III.2.2. Modulation des interactions de l'intégrine $\alpha v\beta 3$ avec la protéine Shc

La croissance des tumeurs, y compris la formation de métastases, dépend essentiellement de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins qui apportent les éléments nécessaires à leur survie et évacuent leurs déchets (Figure III-17).

Les vaisseaux sanguins sont constitués principalement de CE qui, pour croître et se développer, doivent adhérer à un support (la matrice extracellulaire). Leur adhésion à cette matrice se fait au moyen de molécules d'ancrage, les intégrines. Parmi ces dernières, l'intégrine  $\alpha\beta3$  n'est exprimée que par les CE angiogéniques et est essentielle à leur survie. Elle joue un rôle majeur de cohésion à l'interface cellule-espace extracellulaire.



Les facteurs de stimulation (VEGF, FGF) issus de la tumeur [1] entraînent une réaction des CE [2], qui synthétisent les enzymes protéolytiques nécessaires à la rupture de la membrane basale [3].

Les CE prolifèrent [4] ; elles fabriquent [5] les éléments constitutifs de la membrane basale (collagènes, protéoglycanes, etc.), puis les molécules d'adhésion : intégrines et V-CAM [6], sélectines [7] nécessaires au développement des capillaires.

**Figure III-17.** Le processus d'angiogénèse

L'approche basée sur l'inhibition d'angiogénèse et/ou la destruction de vaisseaux nourrissant la tumeur est à l'heure actuelle poursuivie très activement dans la recherche de traitements antitumoraux.

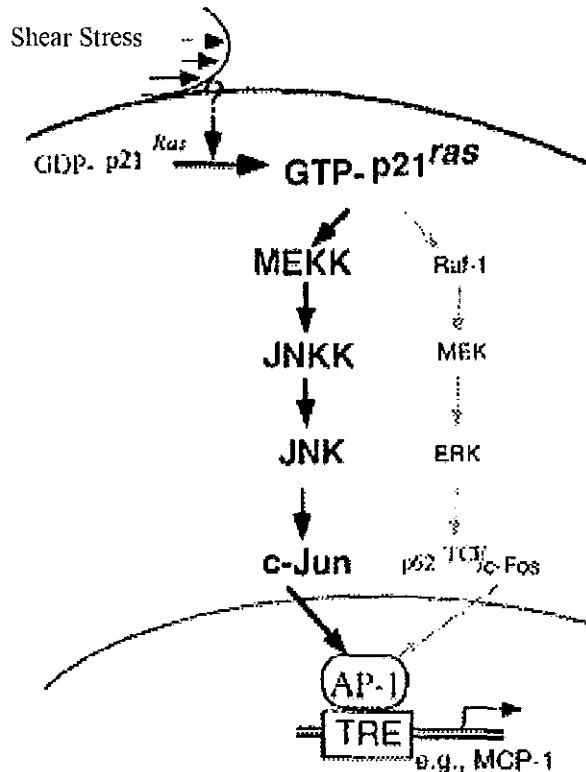
Certaines équipes cherchent à éliminer sélectivement les CE à l'intérieur des tumeurs par l'introduction de gènes inactivant la fonction de l'intégrine  $\alpha\beta3$ , et donc l'adhésion à la matrice extracellulaire (Oguey et col. 2000). L'effet attendu est la mort sélective des CE des vaisseaux angiogéniques de la tumeur tout en laissant intactes les CE des vaisseaux au repos dans les tissus normaux, aboutissant ainsi à une régression sélective de la tumeur.

Dans le cadre de notre collaboration avec le Département de Bio-Ingénierie de l'Université de Californie à San Diego, nous avons poursuivi les travaux entrepris sur les

effets du flux sur les interactions intégrines  $\alpha\beta 3$ -protéine Shc et sur l'activation de la JNK chez les CE.

La réponse des CE aux contraintes de cisaillement s'effectue par les différents mécano-récepteurs (cf. chapitre I.1.3.2.b). Parmi eux, les intégrines jouent un rôle important et on sait que celles-ci s'associent, sous flux, à des protéines impliquées dans la transduction du signal notamment, la protéine Shc, ainsi que l'a montré l'équipe du Professeur Chien (Chen et col. 1999).

Shc est une protéine adaptatrice, contenant un domaine SH2 et un domaine ayant aussi une affinité pour les séquences peptidiques phosphorylées sur les résidus tyrosine "PTB". Elle est phosphorylée sur les tyrosines en réponse aux facteurs de croissance comme le PDGF, ce qui crée un site de liaison pour Grb2 (Pelicci et col. 1992). La formation du complexe Shc-Grb2-Sos est impliquée dans l'activation de la protéine ras. Or l'implication de la voie de signalisation ras-JNK dans l'expression génique induite par le shear stress a été mise en évidence par l'équipe du Professeur Chien (Li et col.1996) ainsi que nous pouvons le voir sur la [Figure III-18](#).



**Figure III-18.** Cascade de mécano-transduction mettant en jeu la JNK

L'association  $\alpha\beta3$ -Shc a été mise en évidence par immunoprécipitation du complexe  $\alpha\beta3$ -Shc chez les BAECs. Afin d'obtenir une immuno-précipitation maximale de l'intégrine  $\alpha\beta3$  il faut, avant chaque expérience, procéder au couplage de l'anticorps sur les billes de sépharose-protéine A. L'anticorps est lié à la matrice (billes de sépharose-protéine A) par son domaine Fc, ainsi le site de reconnaissance antigénique de l'anticorps est orienté correctement pour un maximum d'interaction avec les antigènes. Les colonnes anticorps-billes liées à la protéine A font parties des colonnes de purification les plus utilisées dans les techniques de purification d'affinité.

#### III.2.2.1. Effet du flux sur l'association $\alpha\beta3$ -Shc

Nous avons répété la série d'expériences réalisées par Chen et col. afin de calculer la valeur de référence d'association  $\alpha\beta3$ -Shc chez les cellules en conditions statiques (Chen et col. 1999).

Comme le montre la Figure III-19, chez les cellules non stimulées, nous constatons l'existence d'une bande, l'intégrine est donc déjà liée à la protéine Shc.

Nous avons considéré cette valeur comme la valeur de référence (égal à 1) afin de faire le rapport entre le niveau d'association obtenu pour différentes conditions expérimentales et celui de la valeur de référence.

Après exposition à un flux (12dynes/cm<sup>2</sup>, 30min), la densité des bandes augmente significativement ( $d_{CF}/d_{CS}=1,41 \pm 0,06$ ,  $n=7$ ,  $p<0,05$ ). Les associations des intégrines avec la protéine Shc, bien qu'existantes chez les CE en conditions statiques, sont plus importantes après stimulation mécanique des cellules.

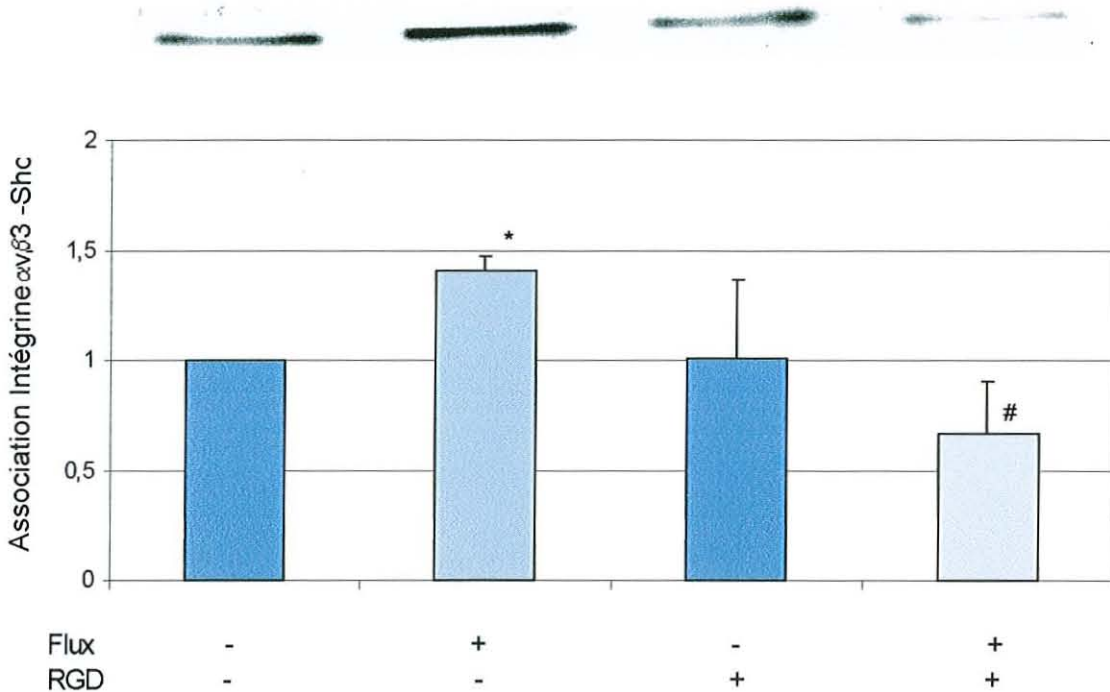
Les CE sont donc sensibles au flux et y répondent notamment par une élévation des associations des molécules d'adhésion situées sur la membrane et les constituants cytoplasmiques. Cette augmentation des interactions pourrait être due à une modification de l'expression des intégrines à la surface membranaire et/ou de la protéine Shc au sein de la CE.

#### III.2.2.2. Effet de l'inhibition du site de liaison des intégrines par le peptide RGD

Comme il est montré sur la Figure III-19, les densités entre les différentes bandes après traitement par le peptide RGD (100ug/mL, 30 min) ne sont pas significativement différentes chez les cellules en conditions statiques ( $d_{IS}/d_{CS}=1,004 \pm 0,36$ ,  $p<0,05$ ,  $n=7$ ).

Le peptide RGD n'a agit donc pas sur l'association  $\alpha v\beta 3$ -Shc sur les CE en conditions statiques. L'association intégrine-Shc n'est donc pas affectée chez les CE en conditions statiques par l'inhibition du site de liaison des intégrines. L'association entre les intégrines et la protéine Shc ne requiert pas la disponibilité du site de liaison des intégrines à leur ligand. En effet, les interactions des intégrines avec les protéines cytoplasmiques se font *via* leurs domaines cytoplasmiques.

En revanche, chez les CE soumises au flux, le peptide RGD induit une diminution significative de l'association flux-dépendante ( $d_{IF}/d_{CS}=0,66 \pm 0,24$ ,  $p<0,05$ ,  $n=7$  alors que  $d_{CF}/d_{CS}=1,41 \pm 0,06$ ,  $n=10$ ,  $p<0,05$ ). La fixation de l'inhibiteur sur les CE masque leur domaine de liaison, et provoque une insensibilité des intégrines au flux.



**Figure III-19.** Effet du flux et du RGD ( $100\mu\text{g/mL}$ , 30 min,  $37^\circ\text{C}$ ) sur la formation des complexes intégrine-Shc ( $n=7$ ,  $p<0,05$ ).

Ces premiers résultats mettent en évidence une des réponses précoces des CE aux contraintes de cisaillement: l'augmentation de leurs interactions avec les molécules cytoplasmiques, et montrent l'importance du site de liaison dans la mécano-transduction de ce signal. En effet, compte tenu du fait que le peptide RGD bloque le site de liaison des intégrines  $\alpha v\beta 3$ , on peut en conclure que le flux agit sur les intégrines *via* leur site de

liaison, comme un médiateur biochimique, afin d'induire ces interactions intégrines/éléments cytoplasmiques.

### III.2.2.3. Effet de la chélation du $[Ca^{2+}]_i$ par le BAPTA/AM

La deuxième étape de notre étude s'est focalisée sur l'importance du calcium intracellulaire dans les réponses précoces de mécano-transduction. D'après les récentes études de Malek et col, la concentration intracellulaire de calcium chez les CE en conditions statiques est de l'ordre de 160nM. L'exposition à un flux laminaire (12 dynes/cm<sup>2</sup>, 100secondes) induit une augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  avec un pic à 400nM. Cette augmentation a lieu dans les 50secondes suivant le début de l'exposition au flux, puis la concentration revient à la normale en 200secondes (Malek et col. 1999).

Différentes expériences menées sur l'effet de la chélation du calcium via le BAPTA/AM, montrent de grandes disparités entre les concentrations de chélateur utilisées:

- Une concentration de 5 $\mu$ M de BAPTA/AM suffit à atténuer l'expression d'ARNm du CNP (C-type Natriuretic Peptide) sous flux (Zhang 1999).
- Une concentration de 10 $\mu$ M de BAPTA/AM suffit à inhiber l'activation de NOS de  $[Ca^{2+}]_i$  (Fleming et col. 1998)
- L'incubation des CE avec 30 $\mu$ M de BAPTA/AM inhibe la production de NOS et l'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  induite par le flux (Malek et col. 1999).
- L'activation de la tyrosine kinase Src est totalement inhibée par 50 $\mu$ M de BAPTA /AM (Okuda et col. 1999).
- La chélation du calcium par 75 $\mu$ M de BAPTA/AM n'a pas d'effet sur la PKC d'après les expériences menées par (Traub et col. 1997).

D'après ces données, il semble que certaines molécules soient plus sensibles à la disponibilité du calcium intracellulaire. Afin de déterminer la sensibilité des interactions intégrine-Shc à  $[Ca^{2+}]_i$  nous avons donc décidé d'utiliser 3 concentrations de BAPTA/AM.

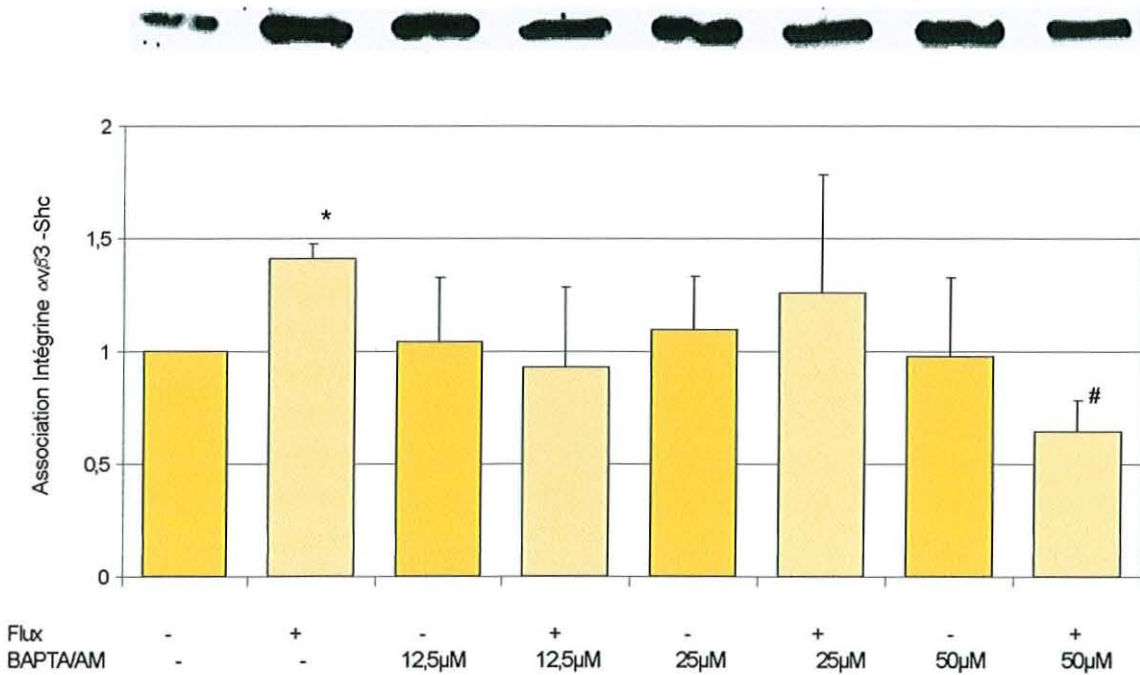
Les résultats obtenus concernant les interactions intégrines-Shc, après chélation du calcium intracellulaire, chez les CE sont présentés sur la Figure III-20.



L'association intégrine-Shc chez les cellules en conditions statiques, après incubation avec le BAPTA/AM, ne varie pas de façon significative quelle que soit la concentration de chélateur utilisée:

- à 12,5 $\mu$ M BAPTA/AM:  $d_{IS}/d_{CS}=1,04 \pm 0,27$  (n=7, p<0,05)
- à 25 $\mu$ M BAPTA/AM:  $d_{IS}/d_{CS}=1,09 \pm 0,23$  (n=7, p<0,05)
- à 50 $\mu$ M BAPTA/AM:  $d_{IS}/d_{CS}=0,97 \pm 0,34$  (n=7, p<0,05)

En revanche, l'effet du BAPTA/AM sur l'association des intégrines avec les éléments cytoplasmiques, après exposition au flux, est dépendant de la concentration. En effet, bien que la chélation du BAPTA/AM ne modifie pas l'association intégrine-Shc flux-dépendante sur les cellules traitées à 12,5 $\mu$ M ou 25 $\mu$ M de BAPTA/AM (respectivement  $d_{IF}/d_{CS}=0,92 \pm 0,35$  pour 12,5 $\mu$ M [BAPTA/AM] et  $d_{IF}/d_{CS}=1,2 \pm 0,52$  pour 25 $\mu$ M [BAPTA/AM], p<0,05, n=7), la chélation par 50 $\mu$ M de BAPTA/AM provoque une diminution significative des associations ( $d_{IF}/d_{CS}=0,64 \pm 0,13$ , n=7, p<0,05) après exposition au flux.



**Figure III-20.** Effet des contraintes de cisaillement et du BAPTA/AM (12,5 $\mu$ M, 25 $\mu$ M et 50  $\mu$ M, 30 min, 37°C) sur la formation des complexes intégrine-shc (n=7, p<0,05).

Nous pouvons déduire, d'après ces résultats, que l'adjonction de BAPTA/AM à des concentrations inférieures ou égales à 50 $\mu$ M n'a aucun effet significatif sur l'association intégrine-Shc sur des CE en conditions statiques. En revanche, la réponse précoce des CE au flux, et plus particulièrement au niveau des associations entre les molécules d'adhésion et la protéine Shc, est sensible à une forte chélation du calcium intracellulaire.

Les études menées jusqu'ici ont montré que certaines réponses des CE au flux sont dépendantes du  $[Ca^{2+}]_i$  tandis que d'autres sont indépendantes. Ainsi, Berk et col. ont proposé un modèle de mécano-transduction impliquant des cascades de phosphorylation *via* l'activation de protéines kinase calcium-dépendantes et calcium-indépendantes (Berk et col. 1995):

- La voie calcium-dépendante implique l'activation de la PLC, l'hydrolyse du PIP<sub>2</sub>, l'augmentation de calcium intracellulaire et la stimulation de kinases telle que la PKC. Elle est responsable de la réponse rapide et transitoire au flux, telle que l'activation rapide de la NOS et du transport ionique. Par ailleurs, le calcium intracellulaire est crucial pour la réorganisation du cytosquelette et l'alignement des CE soumises à un flux (Malek et col. 1996).
- La voie calcium-indépendante met en jeu l'activation des petites GTPases liant le GTP et la stimulation de PKC et MAP kinase calcium-indépendantes. Elle induit une réponse plus lente comme l'activation soutenue de la NOS et les changements de morphologie cellulaire et d'expression génique.

Les signaux générés *via* les intégrines présentes dans les complexes d'adhésion focale pourraient utiliser en parallèle les 2 types de voies lors de la réponse des CE aux flux.

Nos résultats ci-dessus approuvent ces hypothèses, puisque les interactions intégrine-Shc ne sont pas perturbées par la chélation du calcium intracellulaire à basse concentration de BAPTA/AM, et qu'à plus forte concentration, la formation des complexes intégrines-Shc en réponse au flux persiste bien qu'elle soit plus faible. De nouvelles expériences à des concentrations plus élevées, mais non cytotoxiques, de BAPTA/AM permettraient de définir plus précisément la dépendance des interactions intégrine-Shc vis-à-vis de  $[Ca^{2+}]_i$ .

#### III.2.2.4. Effet de l'inhibition de la sous-unité Gi des protéines par la PTX

Gudi et col. ont montré que l'activation des protéines G chez les CE (Gudi et col. 1996):

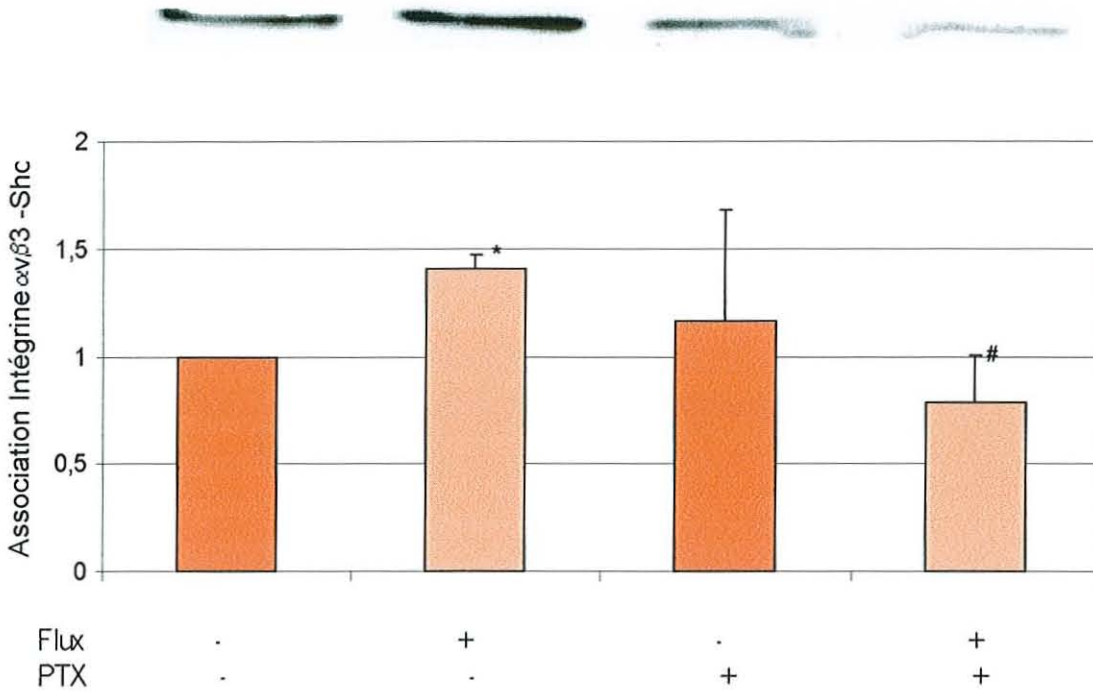
- constitue une des réponses des CE lorsqu'elles sont exposés à un flux laminaire,
- fait partie des réponses très précoces des CE au flux (dans les premières d'exposition aux flux),
- peut être médiée par la bicouche lipidique en absence des récepteurs de surface.

Les protéines G sont donc de potentiels mécano-récepteurs, c'est pourquoi nous nous sommes intéressés à l'influence de leur activité sur les associations  $\alpha v \beta 3$ -Shc.

Dans un premier temps nous avons testé un inhibiteur général des protéines G, le GDP $\beta$ -S; mais la membrane n'étant pas perméable à ce produit nous avons perméabilisé la membrane par différents agents (saponine, triton X-100, ...). Malheureusement, la perméabilisation induit la formation de trous dans la membrane des cellules et donc des modifications ne permettant plus l'étude des récepteurs membranaires.

Par la suite, nous avons donc utilisé la toxine de Pertussis. Celle-ci est internalisée par la cellule *via* sa sous-unité B et ne nécessite pas la perméabilisation de la membrane.

Sur la figure III-21 sont rassemblés les résultats obtenus après incubation des cellules avec la PTX (18h, 1mg/mL, 37°C). Chez les cellules en conditions statiques, le rapport  $d_{IS}/d_{CS}$  est de  $1,16 \pm 0,51$  ( $n=7$ ,  $p<0,05$ ), l'association de l'intégrine  $\alpha v \beta 3$  avec la protéine intracellulaire Shc n'est donc pas significativement modifiée dans ces conditions. Alors qu'après exposition à un flux, et inhibition des protéines G, le ratio des densités des bandes est  $d_{IF}/d_{CS}=0,78 \pm 0,22$  ( $n=7$ ,  $p<0,05$ ) contre  $1,4 \pm 0,065$  ( $n=7$ ,  $p<0,05$ ) sans PTX. La formation des complexes intégrine-Shc est donc diminuée chez les cellules traitées par la PTX, puis exposées au flux.



**Figure III-21.** Effet des contraintes de cisaillement et de la PTX (1mg/mL, 18h, 37°C) sur la formation des complexes intégrines-shc (n=7, p<0,05).

Chez les CE en conditions statiques, l'association intégrine-Shc n'est pas donc pas sensible à l'inhibition des protéines Gi.

Par contre l'ADP-ribosylation des protéines Gi, chez les CE soumises au flux, stoppe l'augmentation de l'association  $\alpha\beta 3$ -Shc. Les CE traitées par la PTX deviennent donc insensibles aux signaux mécaniques provoqués par les contraintes de cisaillement appliquées à la cellule.

Ces expériences mettent donc en évidence l'existence d'une coopération entre les protéines G et les complexes intégrine-Shc lors de la réponse des CE au flux. Plus précisément, la réponse des intégrines au flux est dépendante de l'activation des protéines Gi donc la réponse des intégrines a lieu en aval de celles des protéines Gi.

Nos résultats sont en accord avec le fait que l'activation des protéines G a lieu dans les premières secondes de la réponse des CE au flux (Gudi et col. 1996) alors que la formation des complexes intégrine-Shc par le flux apparaît dans les 10min d'exposition des CE au flux (Chen 1999).

En résumé, nos expériences confirment et mettent en évidence, grâce à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des intégrines (RGD), du calcium intracellulaire (BAPTA/AM) et des protéines Gi (PTX), différents phénomènes précoces de mécano-transduction au sein de la CE:

- L'existence du complexe intégrine  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -protéine Shc chez les CE en conditions statiques.
- L'augmentation des associations intégrine-Shc après l'exposition des CE à un flux laminaire. La cellule transforme le signal mécanique, exercé à sa surface, en signal biochimique. De plus, la transduction du signal mécanique se fait par le même processus que celle du signal biochimique, c'est-à-dire par le site de liaison des intégrines à leur ligand.
- Le calcium est nécessaire mais n'est pas essentiel à la formation des complexes intégrine-Shc induite par le flux chez les CE. D'après les hypothèses émises par Berk, les intégrines seraient impliquées dans des voies calcium-dépendantes et calcium-indépendantes (Berk et col. 1995), ce qui expliquerait que les effets de la chélation du calcium ne soient visibles qu'à forte concentration.
- L'augmentation des interactions  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Shc, provoquées par les contraintes de cisaillement, est dépendante de l'activité des protéines Gi.

### **III.2.3. Modulation de l'activation de la JNK**

Le flux sanguin régule la production de nombreux agents vasoactifs chez les CE dont l'expression est elle-même régulée par les MAP-kinases (mitogen-activated protein kinases) dont font partie JNK (c-Jun NH<sub>2</sub> Terminal Kinase) et ERK (Extracellular Signal Regulated Kinase). Elles ont été proposées comme des acteurs importants de la croissance cellulaire, de la différenciation et de la régulation métabolique.

Les MAP-kinases sont des protéines kinases qui catalysent la phosphorylation des protéines MAP. Les MAP-kinases s'activent les unes les autres en cascade: la MAP-kinase est activée par une MAP-kinase-kinase, elle-même activée par d'autres enzymes: MAP-kinase-kinase (MEK ou MAPK), MAP-kinase-kinase-kinase (MEKK ou MAPKK).

L'activation de la JNK peut être induite par divers stimuli, dont les cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$  et IL-1), les récepteurs couplés aux protéines G, les récepteurs co-

stimulateurs des lymphocytes (CD28 et CD40), le choc osmotique, les inhibiteurs de synthèse protéique, etc. Son activité requiert l'activation en amont des protéines G, ras et des tyrosines kinases (Figure III-22). Effectivement comme nous l'avons rappelé dans le paragraphe précédent, la formation du complexe intégrine-Shc constitue la réponse précoce de la voie Shc-ras-JNK aux contraintes de flux chez les CE.

L'activation de la JNK pourrait réguler l'expression des gènes sensibles aux contraintes de cisaillement et la perte de l'équilibre entre JNK et ERK1/2 pourrait contribuer à la progression des maladies cardio-vasculaires comme l'athérosclérose (Jo et col. 1997). De plus, JNK joue un rôle essentiel dans les réponses aux contraintes de cisaillement, la prolifération cellulaire, l'apoptose et l'oncogénèse.

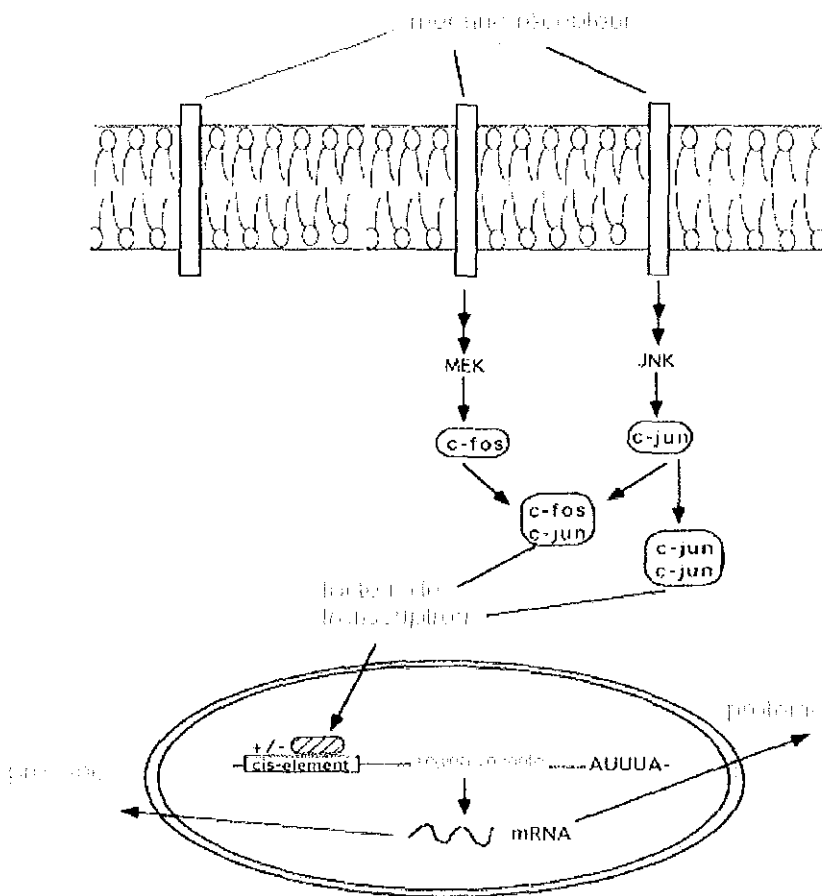


Figure III-22. Régulation génique par les MAP-kinases.

Dans le cadre de nos expériences, les lysats cellulaires ont été incubés avec du  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  et c-Jun (acides aminés 5-89) couplé à la Glutathione S-transférase (GST) afin

de détecter l'activité de la JNK. La phosphorylation de GST-c-Jun a été détectée par autoradiographie.

### III.2.3.1. Effet du flux sur l'activité JNK

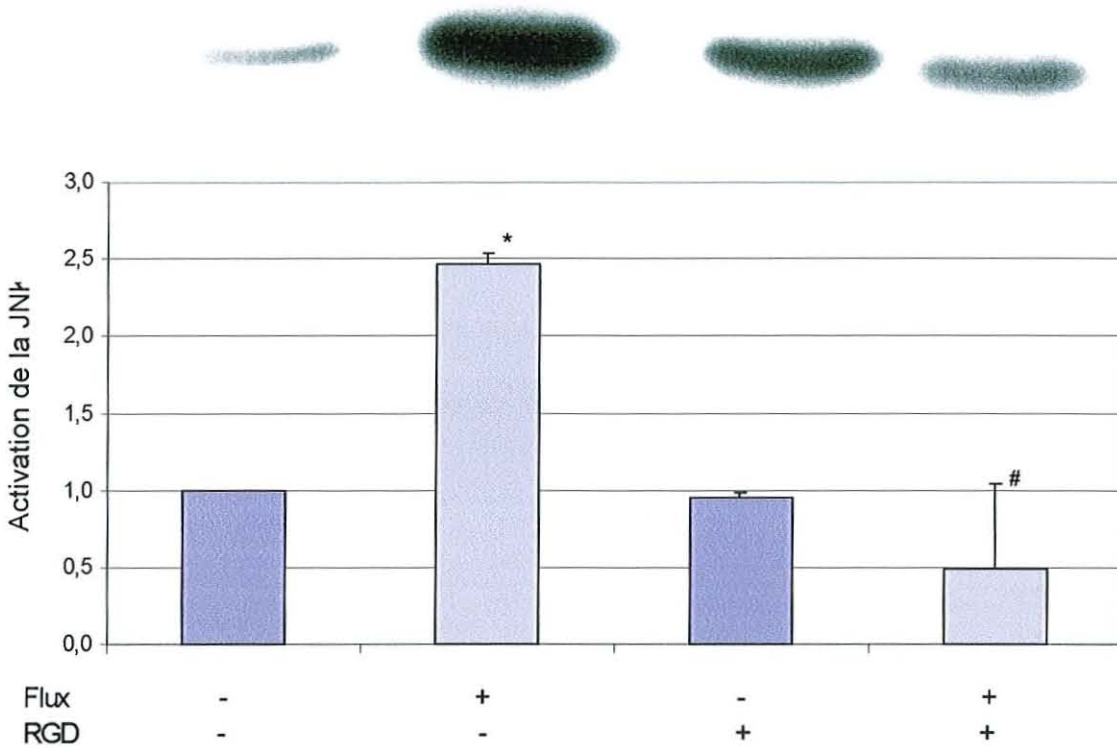
Nous remarquons sur la Figure III-23, la présence d'une bande d'intensité faible chez les CE en conditions statiques. La JNK est donc active chez ces CE. Nous avons considéré cette valeur comme la valeur de référence (égal à 1) afin de faire le rapport entre l'activité de la JNK dans différentes conditions expérimentales et celle de la valeur de référence. Après exposition au flux (12 dynes/cm<sup>2</sup>, 30min), le ratio  $d_{CF}/d_{CS}$  est égal à  $2,47 \pm 0,06$  (n=4, p<0,05). Bien que la JNK soit active chez les CE en conditions statiques, nos résultats mettent en évidence une forte stimulation de l'activité kinase de la JNK par les contraintes de cisaillement.

Ces résultats confirment que les CE sont sensibles au flux, qu'elles intègrent les signaux mécaniques afin de les transformer en signaux biochimiques (telle que l'activation des protéines kinases) et illustrent parfaitement la définition du terme "mécano-transduction": transformation d'un signal mécanique en un signal biochimique.

### III.2.3.2. Effet de l'inhibition des intégrines par le peptide RGD sur l'activité JNK

Comme montré sur la Figure III-23, le ratio  $d_{IS}/d_{CS}=0,955 \pm 0,03$  (n=4, p<0,05). Il n'y a pas de différence significative entre les activités kinase mesurées chez les cellules en conditions statiques incubées ou non avec le peptide RGD (100µg/mL; 30min; 37°C). Cet inhibiteur ne provoque aucune modification de l'activité JNK chez la CE non stimulée mécaniquement.

En revanche, chez les CE soumises au flux après l'incubation avec l'inhibiteur des intégrines, le ratio  $d_{IF}/d_{CS}$  est très faible ( $0,48 \pm 0,56$ , n=4, p<0,05) et il est significativement inférieur à  $d_{CF}/d_{CS}$ . Le peptide RGD induit donc une inhibition totale de l'activation flux-dépendante de la JNK.



**Figure III-23.** Effet des contraintes de cisaillement et du RGD (100 $\mu$ g/mL, 30 min, 37°C) sur l'activation de la JNK (n=4, p<0,05).

Le blocage du site de liaison des intégrines par le peptide RGD provoque un blocage absolu de l'activation-flux dépendante de la JNK. A la vue de ces résultats, il semble que la réponse de la JNK soit dépendante de la réponse précoce des intégrines aux contraintes de cisaillement. Selon de récentes études, la protéine Shc joue un rôle important dans l'activation de la JNK chez les CE soumises à un flux (Chen et col. 1999). Nos résultats confirment non seulement ces travaux, mais prouvent l'implication des complexes intégrine-Shc dans l'activation de la JNK.

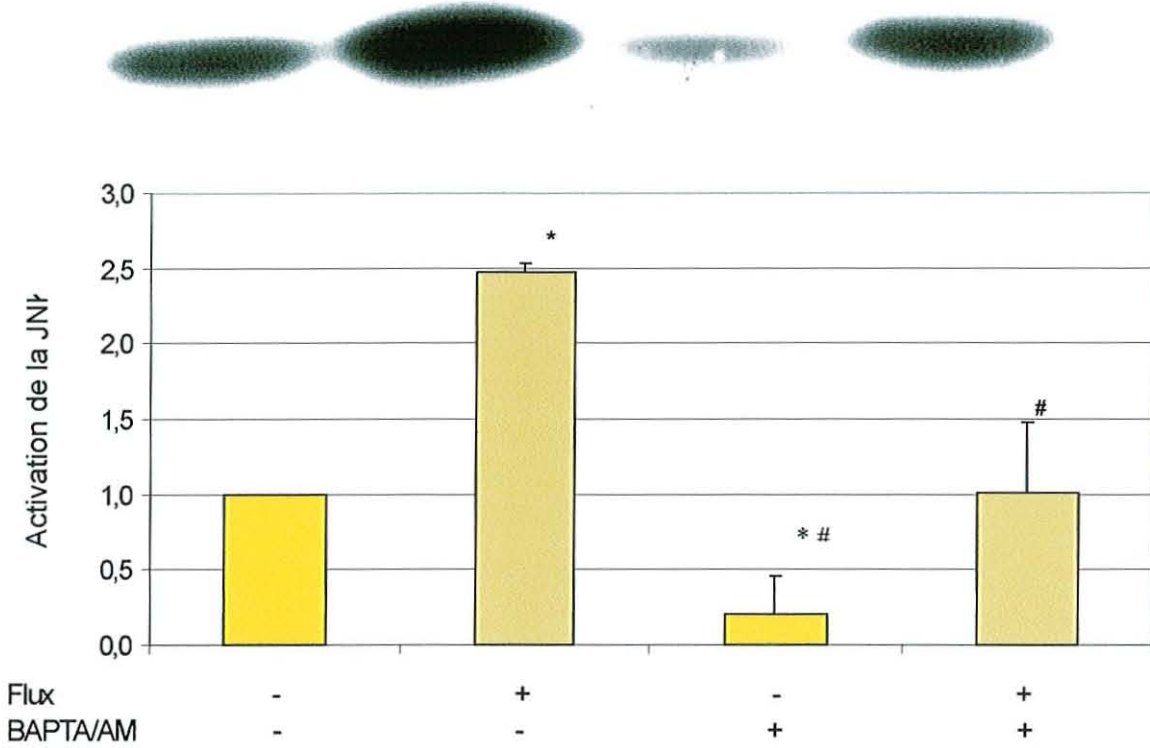
### III.2.3.3. Effet de la chélation du $[Ca^{2+}]_i$ par le BAPTA/AM

L'incubation des CE en conditions statiques avec une concentration de 25 $\mu$ M de BAPTA/AM provoque une baisse importante de la densité des bandes ( $d_{IS}/d_{CS}=0,198 \pm 0,25$ , n=4, p<0,05) comparativement à celles des cellules non traitées (Figure III-24). Cette concentration de chélateur induit donc une inhibition quasi-totale de l'activité JNK.



Après exposition au flux des cellules traitées par le BAPTA/AM, le rapport  $d_{IF}/d_{CS}$  est de  $1,05 \pm 0,47$  ( $n=4$ ,  $p<0,05$ ). Cette valeur est:

1. supérieure de façon significative à la valeur obtenue chez les CE en conditions statiques traitées par le BAPTA/AM
2. inférieure significativement à la valeur mesurée chez les CE stimulées par le flux et non traitées par le BAPTA/AM



**Figure III-24.** Effet des contraintes de cisaillement du BAPTA ( $25 \mu\text{M}$ , 30min,  $37^\circ\text{C}$ ) sur l'activation de la JNK ( $n=4$ ,  $p<0,05$ ).

Nous pouvons donc en déduire que:

1. L'activité JNK est calcium-dépendante aussi bien chez les CE en conditions statiques que chez les CE soumises à un flux.
2. l'activation flux-dépendante de la JNK n'est pas inhibée totalement par  $25\mu\text{M}$  de BAPTA/AM

La chélation du calcium par  $25\mu\text{M}$  de BAPTA/AM provoque donc une diminution de la réponse kinase quelles que soient les conditions de stimulation des CE, mais celle-ci

est en partie compensée par l'application d'un flux. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats:

- i. La concentration de BAPTA/AM n'est pas suffisante à la chélation de la totalité du calcium intracellulaire. Dans ce cas l'exposition au flux permet l'activation de la JNK. En effet, dans le paragraphe précédent nous avons montré que pour des concentrations inférieures à  $50\mu\text{M}$ , on n'observait aucun effet du BAPTA/AM sur la formation des complexes  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Shc.
- ii. L'effet inhibiteur sur l'activité JNK par la chélation du calcium intracellulaire peut être compensée par l'activation sous flux d'autres composants cellulaires calcium-indépendants. Le calcium ne serait donc pas primordial dans l'activation de la cascade de phosphorylation des protéines kinases.

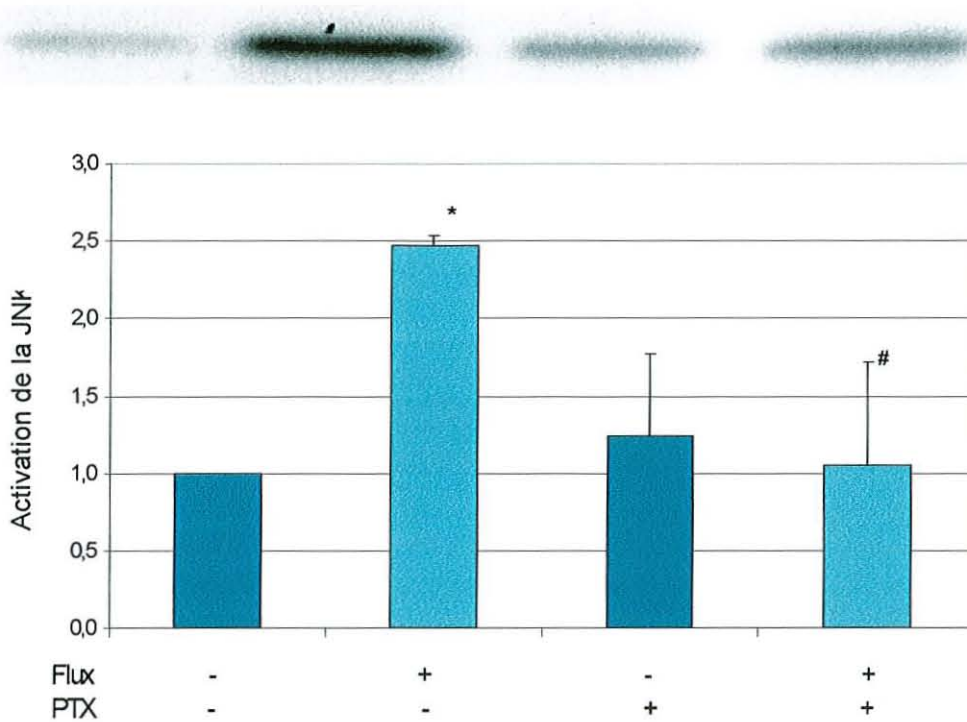
De nouvelles expériences avec des concentrations de BAPTA supérieures à  $25\mu\text{M}$  permettront de trancher entre ces 2 hypothèses.

Nous pouvons cependant, déjà, en conclure que le calcium intracellulaire est impliqué dans l'activation de la JNK chez les CE exposées à un flux laminaire. Nos résultats confirment le modèle de mécano-transduction dans lequel l'activation rapide de la NOS serait due à l'activation de voies calcium-dépendante (Berk et col. 1995).

#### III.2.3.4. Effet de l'inhibition protéine $G_i$ par la PTX

La Figure III-25 présente les résultats obtenus pour l'activité JNK avec ou sans incubation des cellules avec la PTX ( $1\text{mg/mL}$ , 18h,  $37^\circ\text{C}$ ).

La densité des bandes chez les CE traitées par la PTX ne varie pas, en effet  $d_{IS}/d_{CS}=1,24\pm 0,47$  ( $n=4$ ,  $p<0,05$ ). L'incubation de la PTX dans le milieu de culture des CE, en conditions statiques, ne produit aucune modification significative sur l'activité JNK. Tandis que les mesures de la densité des bandes chez les CE traitées par la PTX puis exposées au flux montrent une inhibition de l'effet du flux sur l'activité JNK:  $d_{IF}/d_{CS}=1,04\pm 0,59$  ( $n=4$ ,  $p<0,05$ ) contre  $d_{CF}/d_{CS}=2,47 \pm 0,06$  ( $n=4$ ,  $p<0,05$ ). Ces résultats mettent donc en évidence le rôle des sous-unités  $G_i$  des protéines G dans l'activation flux-dépendante de la JNK.



**Figure III-25.** Effet des contraintes de cisaillement et de la PTX (1mg/mL, 18h, 37°C) sur l'activation de la JNK (n=4, p<0,05).

D'après ces résultats on peut en déduire que la JNK devient insensible au flux après blocage de la sous-unité Gi par la toxine de Pertussis et conserve une activité proche de celle mesurée chez les CE en conditions statiques et non traitées.

L'implication des protéines G a déjà été démontrée dans la production de NO (Ohno et col. 1993). Nos expériences démontrent leur implication dans l'activité d'une MAP kinase, la JNK. Plus particulièrement nous avons montré que les sous-unités Gi sont sensibles aux contraintes de cisaillement et que leur activation est responsable de l'activation des protéines kinases au sein des CE.

En résumé, l'usage des inhibiteurs spécifiques du site de liaison des intégrines (RGD), du calcium intracellulaire (BAPTA/AM) et des protéines Gi (PTX) a permis la mise en évidence et la confirmation de différents phénomènes de mécano-transduction au sein de la CE:

- Il existe des modifications métaboliques au niveau de la CE et des cascades de transduction du signal afin de permettre l'adaptation de la cellule aux contraintes mécaniques.

- L'exposition à un flux laminaire provoque l'activation des MAP kinases et plus précisément de la JNK.
- L'activation de la JNK par le flux est dépendante de la réponse précoce des intégrines au flux *via* leur site de liaison.
- L'activité JNK est tributaire de la présence de calcium intracellulaire chez les CE en conditions statiques ou exposées au flux.
- L'activation par le flux de la JNK est dépendante de l'activité catalytique des protéines Gi en réponse aux flux.

En conclusion, les expériences que nous avons mené sur les phénomènes de mécano-transduction chez les CE ont permis de mieux comprendre les différentes étapes de ce processus et de compléter les modèles établis grâce à la mise en évidence de certaines interactions entre les différents mécano-senseurs.

## **CHAPITRE IV**

### **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

Comme nous l'avons déjà évoqué, les conditions hémodynamiques locales peuvent affecter la plupart des fonctions cellulaires. Des variations des conditions hémodynamiques peuvent intervenir dans différents troubles cardio-vasculaires, particulièrement dans l'athérosclérose via des modifications des cellules soumises à ces variations telles que les leucocytes ou les CE.

Lors d'une réaction inflammatoire, les leucocytes sont recrutés au niveau de l'endothélium vasculaire et doivent traverser la paroi endothéliale afin d'atteindre le site d'inflammation. La cascade d'adhésion leucocytes/endothélium est un phénomène complexe mettant en jeu un grand nombre de molécules d'adhésion exprimées à la surface de ces 2 types cellulaires. Bien qu'elles aient été identifiées par de nombreux travaux, le rôle exact des molécules d'adhésion dans chaque étape de cette cascade reste à éclaircir.

Dans ce but, dans la première étape de notre travail nous avons étudié l'adhésion leucocytes/endothélium en conditions dynamiques et nous avons cherché à caractériser la force d'adhésion des leucocytes à l'endothélium. Nous nous sommes intéressés au processus de détachement des leucocytes à leurs substrats biologiques afin de mieux comprendre le rôle des molécules d'adhésion spécifiques à chaque type cellulaire dans la production de la force maintenant les PNN adhérents aux CE, bien que les contraintes de cisaillement appliquées sur la paroi des vaisseaux sanguins soient relativement élevées.

Nous avons donc étudié le détachement des PNN quiescents ou activés à trois substrats physiologiques: fibrinogène, CE quiescentes, CE activées. Dans un premier temps, nous avons travaillé sur un modèle simple, le fibrinogène (Altieri et col. 1990) et dans un deuxième temps sur une monocouche de CE. Nous avons pris en compte non seulement la nature du substrat mais aussi l'état d'activation des cellules. En effet, nous nous sommes interrogés sur le rôle des modifications fonctionnelles et morphologiques de ces cellules induites par leur activation dans l'étape d'adhésion ferme des leucocytes à la paroi vasculaire lors des phénomènes inflammatoires.

Dans cette étude nous avons pu déduire l'existence de deux processus principaux: d'une part **la force d'adhésion au substrat estimée en fonction du taux de PNN adhérents,**

**est augmentée par leur activation mais ne modifie pas le processus de détachement.** Ces modifications des propriétés d'adhésion des leucocytes à leurs substrats sont dues aux modifications quantitatives et spatiales induites par le FMLP sur les intégrines CD11b et CD18. En effet, l'étude quantitative et spatiale de molécules d'adhésion sur les PNN après une stimulation biochimique par le FMLP mimant une attaque bactérienne, ont montré des changements quantitatifs et qualitatifs au niveau de l'expression surfacique des molécules impliquées dans la phase d'adhésion ferme leucocyte/endothélium, les intégrines CD11b/CD18. Ces résultats sont en accord avec les hypothèses de Riha et col. sur la diminution des forces d'étirement exercées par le flux sur les ponts moléculaires intégrine-ligand, permettant une adhésivité plus forte entre les 2 types cellulaires après la formation de clusters d'intégrines chez les leucocytes activés (Riha et col. 2000). En revanche, les sélectines (CD62-L) ne sont pas surexprimées. L'activation des PNN va donc influencer uniquement la phase d'adhésion ferme et non le rolling.

D'autre part, **le processus de détachement des PNN est directement lié à la nature du substrat.** En effet, le processus de détachement des PNN adhérents au fibrinogène ou aux CE activées est triphasique tandis que dans le cas de l'adhésion sur les CE quiescentes, le détachement des PNN est monophasique et proportionnel à la valeur de la contrainte de cisaillement appliquée. Ceci peut s'expliquer par la présence de pôles d'adhésion favorables, tant au niveau du fibrinogène, pour lequel les intégrines leucocytaires ont des sites d'adhésion, que pour les CE. En effet, chez les CE nous avons observé que l'activation, quelle qu'elle soit, entraîne une surexpression des molécules d'adhésion ICAM-1, ligand des intégrines leucocytaires, favorisant ainsi l'adhésion ferme. Par ailleurs, on observe une transmigration des molécules d'ICAM-1 vers le pôle apical de la CE *via* le cytosquelette créant ainsi une région facilement accessible aux cellules circulantes et fortement adhésives.

Ce phénomène n'existe pas pour les CE quiescentes soumises à un faible cisaillement, mais une évolution de leur état d'activation survient avec le temps et l'augmentation de la force de la contrainte de cisaillement expliquant ainsi le processus de détachement.

**La force d'adhésion des PNN à leurs substrats est donc fonction de leur état d'activation, tandis que la nature du processus du détachement est fonction de la nature du substrat.**

La connaissance du processus de détachement apporte de nouvelles données à prendre en compte dans les modèles d'adhésion cellulaire proposés par Zhu (2000). Dans cet optique, Dong a commencé à modéliser la phase de rolling des PNN sur l'endothélium en adoptant un modèle à deux dimensions et en proposant différents types de ponts d'adhésion (Dong 2000). Cependant la complexité des phénomènes ne permet toujours pas la modélisation de la cascade d'adhésion. Dans le sillage de nos recherches, l'utilisation d'autres substrats permettront d'identifier plus clairement les rôles de chaque molécule d'adhésion dans ce phénomène. On pourrait ainsi répéter nos expériences sur les substrats suivants:

- Fibrinogène recouvert d'Ac anti-CD11b
- Fibrinogène recouvert d'Ac anti-CD18
- CE traitées par un Ac anti-ICAM-1
- Lame de silice recouverte d'une couche de poly-électrolytes chargés positivement ou négativement

De même, l'étude cinétique du processus de détachement apporterait des paramètres nouveaux afin de modéliser l'attachement leucocyte/endothélium.

Cependant il ne suffit pas de connaître le mécanisme des interactions cellulaires pour approcher dans son ensemble la genèse des maladies cardio-vasculaires. Nous avons observé une modification fonctionnelle des CE après stimulation biochimique ou mécanique, et plus précisément, dans ces cas particuliers, une modification de ses propriétés adhésives, qui s'est traduit par une expression différente à la surface des molécules cible et une modification des interactions intercellulaires. Mais que se passe-t-il au sein des CE positionnées aux endroits stratégiques de l'arbre vasculaire (bifurcations, anévrisme, ...) où les flux sont complexes et les pathologies vasculaires fréquentes ? Comment ces contraintes mécaniques agissent sur les CE et les conduisent à modifier leur métabolisme, leur structure, leurs propriétés de synthèse, en un mot leur fonctionnalité ?

C'est pour répondre à ces questions que dans la seconde étape de notre travail, nous avons porté notre intérêt sur les interactions entre certains acteurs particuliers du processus de mécano-transduction induit par les contraintes de cisaillement chez les CE. Les voies de signalisation engagent des phénomènes complexes hautement régulés faisant intervenir de nombreux mécanismes qui sont loin d'être encore élucidés. Le schéma linéaire récepteur,



transducteur, amplificateur du signal ne représente pas la diversité des molécules intracellulaires qui interagissent avec différentes voies de signalisation pour former un réseau intégrant les signaux de l'ensemble récepteurs, transducteurs et "seconds messagers".

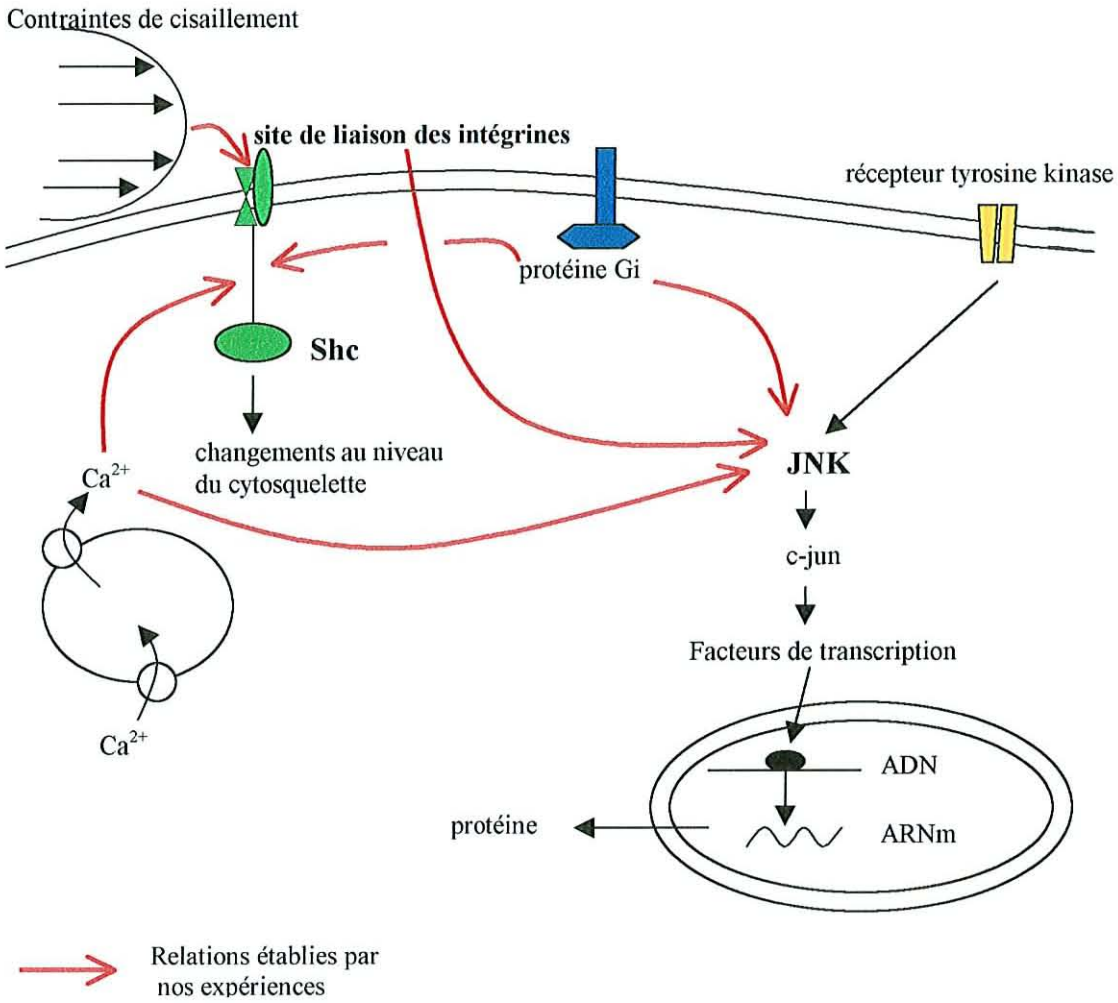
Ainsi, un même stimulus extracellulaire peut entraîner l'activation de nombreuses voies de signalisation en fonction du type cellulaire, et ces mêmes voies de signalisation peuvent également être modulées par d'autres stimuli extracellulaires (cross-talk) (Schwartz et Baron 1999). Par exemple, la synthèse d'ADN est modulée en fonction de l'état d'adhésion de la cellule qui active ou inhibe les voies de signalisation induites par le facteur de croissance. Ces interconnexions permettent donc de moduler la réponse cellulaire. Un autre aspect de la transduction du signal fait intervenir la notion de localisation des protéines au niveau subcellulaire. Cette régulation peut être due à des protéines "échafaudages" ou "scaffold" (Pawson et Scott 1997), mais également à des vésicules spécifiques tels que les radeaux lipidiques (Brown et London 1998). Ces localisations subcellulaires sont à l'origine d'une spécificité de signalisation intracellulaire et donc d'une réponse biologique.

Afin d'identifier de nouvelles interactions entre les différents mécano-senseurs, nous avons particulièrement étudié deux étapes différentes du phénomène de mécano-transduction: réponse précoce, les interactions intégrine-shc et une étape en aval, l'activité de la JNK.

Grâce à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques du site de liaison des intégrines (RGD), du calcium intracellulaire (BAPTA/AM) et des protéines Gi (PTX), nous avons confirmé l'existence d'interactions au sein de la CE afin de permettre l'adaptation de la cellule aux contraintes mécaniques. En effet, **l'exposition des CE à un flux laminaire constant induit la formation rapide (dans la demi-heure) de nouveaux complexes intracellulaires entre les intégrines  $\alpha\beta3$  et la protéine Shc.** Cette réponse se fait *via* le même processus que celle du signal biochimique, c'est-à-dire **par le site de liaison des intégrines à leur ligand.** De plus, **la formation de ces complexes en réponse au flux est dépendante en partie de la concentration intracellulaire de calcium, mais aussi de l'activité des protéines Gi.**

Cette étape est par ailleurs indispensable à la réponse plus tardive des CE aux contraintes de cisaillement telle que l'activation de la JNK, *via* le site de liaison des intégrines, la présence de calcium intracellulaire et l'activité catalytique des protéines Gi.

Sur la [Figure IV-1](#) sont résumés les apports de nos recherches au modèle de mécano-transduction.



**Figure IV-1.** Modèle simplifié de la mécano-transduction et contribution de nos recherches

En conclusion, les travaux que nous avons menés sur le phénomène de mécano-transduction chez les CE ont permis de mieux comprendre les différentes étapes de ce processus au niveau du mécanisme global et ainsi de compléter les modèles établis grâce à la mise en évidence de certaines interactions entre différents mécano-senseurs.

Notre étude fait partie des premiers travaux prenant en compte les interactions intracellulaires des mécano-senseurs afin de diversifier la réponse des CE aux contraintes de cisaillement. Ce type d'étude ouvre la porte à de nombreuses perspectives afin d'identifier les régulations et les passerelles entre les différentes cascades de mécano-transduction au sein de la CE *via* l'utilisation d'autres inhibiteurs spécifiques. En effet, les intégrines  $\alpha v \beta 3$  ne sont pas les seules intégrines à la surface endothéliale et d'autre part il existe de nombreux canaux ioniques à la surface cellulaire et des récepteurs tyrosine kinases qui peuvent générer le

processus de mécano-transduction. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de ces différentes molécules permettrait de mettre en évidence de nouvelles régulations au sein des CE.

L'ensemble de ces études devrait nous permettre de mieux comprendre le rôle des forces hémodynamiques et du processus de mécano-transduction dans l'athérogénèse, la thrombose et l'inflammation.



## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

ADAMS D., SHAW S.

Leukocyte-endothelial interactions and regulation of leukocyte migration.

Lancet, 1994, 343, 831-836.

ALTIERI D., AGBANYO F., PLESCIA J., GINSBERG M., EDGINGTON T., PLOW E.

A unique recognition site mediates the interaction of fibrinogen with the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18).

J. Biol. Chem., 1990, 265, 21, 12119-22.

ALTIERI D.C., PLESCIA J., PLOW E.

The structural motif Glycine 190-Valine 202 of the fibrinogen  $\gamma$  chain interacts with CD11b/CD18 integrin ( $\alpha_M\beta_2$ , Mac-1) and promotes Leukocyte adhesion.

J. Biol. Chem., 1993, 268, 1847-1853.

ANDERSON D., SPRINGER T.

Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the Mac-1, LAF-1 and p150,95 glycoproteins.

Annual Review in Medecine, 1987, 38, 175-194.

ANDO J., TSUBOI H., KORENAGA R., TAKADA Y., TOYAMA-SORIMACHI N., MIYASAKA M., KAMIYA A.

Shear stress inhibits adhesion of cultured mouse endothelial cells to lymphocytes by downregulating VCAM-1 expression.

Am. J. Physiol., 1994, 267, C679-C687.

APLIN A.E., HOWE A., ALAHARI S.K., JULIANO R.L.

Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins.

Pharmacological Reviews, 1998, 50, 2, 197-263.

ARNAOUT M., SPITTS H., TERHOST C., PITT J., TODD III R.F.

Deficiency of a leukocyte surface glycoprotein (LF1-1) in two patients with Mo1 deficiency.

J. C. Investigation, 1984, 74, 1291-1300.

ARNAOUT M.

Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18.

Blood, 1990, 75, 1037-1050.

BALLERMANN B.J., DARDIK A., ENG E., LIU A.

Shear stress and the endothelium.

Kindney International, 1998, 54 (suppl.67), s100-s108.

BAO X-P., LU C., FRANGOS J.

Temporal gradient in shear but not steady shear stress induces PDGF-A and MCP-1 expression in endothelial cells, role of NO, NF $\kappa$ B, and egr-1.

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 1999, 19, 996-1003.

BARATH P., FISHBEIN M., CAO J., BERENSON J., HELFANT R., FORRESTER J.

Detection and localization of tumor necrosis factor in human atheroma.

Am. J. Cardiol., 1990, 65, 297-302.

BARBEE K., MUNDEL T., LAL R., DAVIES P.

Subcellular distribution of shear stress at the surface of flow-aligned and nonaligned endothelial monolayers.

Am. J. Physiol., 1995, 268 (Heart Circ Physiol 37), H1765-H1772.

BELLINGER D., NICHOLS T., READ M., REDDICK R., LAMB M., BRINKHOUS K., EVATT B., GRIGGS T.

Prevention of occlusive coronary artery thrombosis by a murine monoclonal antibody to porcine von Willebrand factor.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 8100-8104.

BERK, B., CORSON M., PETERSON T., TSENG H.

Protein kinases as mediators of fluid shear stress stimulated signal transduction in endothelial cells: A hypothesis for calcium-dependent and calcium-independent events activated by flow.

J. Biomech., 1995, 28, 1439-1450.

BERLINER J., LEITINGER N., WATSON A., HUBER J., FOGELMAN A., NAVAB M.  
Oxidized lipids in atherogenesis: formation, destruction and action. *Trombosis and Haemostasis*, 1997, 78, 1, 195-99.

BERTHIAUME F., FRANGOS J.  
Flow-induced prostacyclin production is mediated by a pertussis toxin-sensitive G protein. *FEBS Lett.*, 1992, 308, 277-79.

BHAGYALAKSHMI A., BERTIAUME F., REICH K., FRANGOS J.  
Fluid shear stress stimulates membrane phospholipid metabolism in cultured human endothelial cells.  
*J. Vasc. Res.*, 1992, 29, 443-49.

BONEU B., CAZENAVE J.  
Introduction à l'étude de l'hémostase et de la thrombose. 2ème édition révisée, 1997, Boehringer Ingelheim France, pp8-15.

BRADDOCK M., SCHWACHTGEN J., HOUSTON P., DICKSON M., LEE M., CAMPBELL C.  
Fluid shear stress modulation of gene expression in endothelial cells.  
*News Physiol. Sci.*, 1998, 13, 241-46.

BROWN D., LONDON E.  
Functions of lipid rafts in biological membranes.  
*Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 1998, 14, 111-36.

CARLOS T., HARLAN J.  
Leukocyte-endothelial adhesion molecules.  
*Blood*, 1994, 84, 7, 2068-2101.

CARO C., FITZ-GERALD J., SCHROTER R.  
Arterial wall shear and distribution of early atheroma in man.  
*Nature*, 1969, 223, 1159-61.

CARPÉN O., PALLAI P., STAUNTON D., AND SPRINGER T.

Association of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) with actin-containing cytoskeleton and  $\alpha$ -actinin.

J. Cell. Biol., 1992, 118, 1223-1234.

CESARINI M-L, TEDQUI A.

L'adhésion endothéliale des monocytes: un rôle pivot dans l'athérogenèse.

Sang Trombose Vaisseaux, 1997, 9, 476-86.

CHAPPELL D., VARNER S., NEREM R., MEDFORD R., ALEXANDER R.

Oscillatory shear stress stimulates adhesion molecule expression in cultured endothelium.

Circ. Res., 1998, 82, 532-539.

CHAPPEY O., WAUTIER M.P., WAUTIER J.L.

Structure et fonctions de l'endothélium.

La revue du Parisien (Paris), 1997, 47, 2223-6.

CHARARA J.

Effet de l'écoulement sur le devenir des cellules endothéliales: dispositifs d'études, revue et commentaires.

RBM, 1993, 15, 8, 435-45.

CHEN K-D., LI Y-S., KIM M., LI S., CHIEN S., SHYY J.

Mechanotransduction in response to shear stress: roles of receptor tyrosine kinases, integrins, and Shc.

J. Biol. Chem., 1999, 274, 18393-18400.

CHIU J., WANG D., CHIEN S., SKALAK R., USAMI S.

Effects of disturbed flow on endothelial cells.

J Biomechanical Engineering, 1998, 120, 2-8.



CHOLLET-MARTIN S., MONTRAVERS P., GILBERT C., ELBIM C., DESMONT S. J.M., FAGON J.Y., GOUGEROT POCIDALO M.A.

Subpopulation of hyperresponsive polymorphonuclear neutrophils in patients with adult respiratory distress syndrome.

American Review of Respiratory Disease, 1992, 146, 990—996.

CLOAREC M.

Genèse de l'athérosclérose: notions récentes.

Act. Méd. Int-Angiologie, 1996, 13, 226, 4510-14.

CUCINA A., STERPETTI A., PUPELIS G., FRAGALE A., LEPIDI S., CAVALLARO A., GIUSTINIANI Q., AND D'ANGELO L.

Shear stress induces changes in the morphology and cytoskeleton organisation of arterial endothelial cells.

Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg., 1995, 9, 86-92.

DAVIES P.

Flow-mediated endothelial mechanotransduction.

Physiol Rev, 1995, 75, 3, 519-60.

DAVIES P., REMUZZI A., GORDON E., DEWEY JR. C., GIMBRONE JR. M.

Turbulent fluid shear stress induces vascular endothelial cell turnover in vitro.

Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 1986, 83, 2114-2117.

DAVIES P., TRIPATHI S.

Mechanical stress mechanisms and the cell. An endothelial paradigm.

Circ. Res., 1993, 2, 239-45.

DAVIES P., BARBEE K., VOLIN M., ROBOTOWSKYJ A., CHEN J., JOSEPH L., GRIEM M.L., WERNICK M., JACOBS E., POLACEK D., DEPAOLA N., BARAKAT A.

Spatial relationships in early signaling events of flow-mediated endothelial mechanotransduction.

J. Physiol., 1997-a, 59, 527-49.

DAVIES P., VOLIN M., JOSEPH L., BARBEE K.

Endothelial response to hemodynamic shear stress: spatial and temporal considerations.  
Vascular Endothelium, Physiology, Pathology, and Therapeutic Opportunities.

In: Bone G.V.R. and Schwartz C.J. (ed) New horizon series; Vol.3 Schattauer, Stuttgart, 1997-b, pp167-76.

DELAMAIRE M., MAUGENDRE D., MORENO M., LE GOFF M., ALLANIC H., GENETET B.

Exploration des différentes étapes du fonctionnement des polynucléaires neutrophiles chez les patients diabétiques.

J. Mal. Vasc., 1995, 20, 107-112.

DE MEYER G., VAN PUT D., KOCKX M., VAN SCHIL P., BOSMANS R., BULT H., BUYSSSENS N., VANMAELE R., HERMAN A.

Possible mechanisms of collar-induced intimal thickening.

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 1997, 17, 1924-1930.

DE MEYER G., HOYLAERTS M., KOCKX M., YAMAMOTO H., HERMAN A., BULT H.

Intimal deposition of functional von Willebrand factor in atherogenesis.

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 1999, 19, 2524-2534.

DEWEY JR C.F., BUSSOLARI S., GIMBRONE JR M., DAVIES P.

The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress.

J Biomech Eng, 1981, 103, 177-85.

DIAMOND S., ESKIN S., MCINTIRE L.

Fluid flow stimulates tissue plasminogen activator secretion by cultured human endothelial cells.

Science, 1989, 243, 1483-85.

DIAMOND S., SHAREFKIN J., DIEFFENBACH C., FRASIER-SCOTT K., MCINTIRE L., ESKIN S.

Tissue plasminogen activator messenger RNA levels increase in cultured human endothelial cells exposed to laminar shear stress.

J. Cell. Physiol., 1990, 143, 364-371.

DRENCKHAHN D., NESS W

The endothelial contractile cytoskeleton. Vascular Endothelium, Physiology, Pathology, and Therapeutic Opportunities.

In: Bone G.V.R. and Schwartz C.J. (ed) New horizon series; Vol.3 Schattauer, Stuttgart, 1997, pp1-25.

DUMAS D., GIGANT C., PRESLE N., CIPOLLETTA C., MIRALLES G., PAYAN E., JOUZEAU J., MAINARD D., TERLAIN B., NETTER P., STOLTZ JF.

The role of 3D-microscopy in the study of chondrocyte-matrix interaction (alginate bead or sponge, rat femoral head cap, human osteoarthritic cartilage) and pharmacological application.

Biorheology, 2000, 37(1-2),165-76.

ERNST E., HAMMER SCHMIDT D., BAGGE U., MATRAI A., DORMANDY J.

Leukocyte and the risk of ischemic diseases.

JAMA, 1987, 257, 2318-2324.

ETZIONI A., FRYDMAN M., POLLACK S., AVIDOR I., PHILLIPS M., PAULSON J., GERSHONI-BARUCH R.

Recurrent severe infections caused by a novel leukocyte adhesion deficiency.

N. Engl. J. Med., 1992, 7, 327, 1789-92.

FEARON D., COLLINS L.

Increased expression of C3b receptors on polymorphonuclear leukocytes induced by chemotactic factors and by purification procedures.

J. Immunol., 1983, 130, 1, 370-375.

FLEMING I., BAUERSACHS J., FISSLTHALER B., BUSSE R.

Ca<sup>2+</sup>-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase in response to tyrosine phosphatase inhibitors and fluid shear stress.

Circ. Res., 1998, 82, 6, 686-95.

FRANGOS J., ESKIN S., MCINTIRE L., IVES C.

Flow effects on prostacyclin production by cultured human endothelial cells.

Science, 1985, 22, 227, 4693 1477-9.

FRANKE R., GRÄFE M., SCHNITTLER H., SEIFFGE D., MITTERMAYER C.

Induction of human vascular endothelial stress fibres by fluid shear stress.

Nature, 1984, 307, 648-49.

FRY D.L.

Acute vascular endothelial changes associated with increased blood velocity gradients.

Circ. Res., 1968, 22, 167-97.

FURCHGOTT R., ZAWADZKI J.

The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.

Nature, 1980, 228, 373-6.

FUSTER V., BOWIE W., LEWIS J., FASS D., OWEN C., BROWN A.

Resistance to arteriosclerosis in pigs with von Willebrand's disease.

J. Clin. Invest., 1978, 61, 722-730.

GAHMBERG C., TOLVANEN M., KOTOVUORI P.

Leukocyte adhesion: Structure and function of human leukocyte  $\beta_2$ -integrins and their cellular ligands.

Eur. J. Biochem., 1997, 245, 215-232.

GALBRAITH C., SKALAK R., CHIEN S.

Shear stress induces spatial reorganization of the endothelial cell cytoskeleton.

Cell Motility and the Cytoskeleton, 1998, 40, 317-30.

GIMBRONE M. JR, NAGEL T., TOPPER J.

Biomechanical activation: an emerging paradigm in endothelial adhesion biology.  
J. Clin. Invest., 1997, 100, 11, S61-5.

GIRARD P., NEREM R.

Shear stress modulates endothelial cell morphology and F-actin organization through the regulation of focal adhesion-associated proteins.  
J. Cell. Physiol., 1995, 163, 179-93.

GLAGOV S., ZARINS C., GIDDENS DP., KU DN.

Hemodynamics and atherosclerosis. Insights and perspectives gained from studies of human arteries.  
Arch. Pathol. Lab. Med., 1988, 112, 10, 1018-31.

GOOCH K.J., TENNANT C.

Mechanical forces: their effects on cells and tissues.  
Landes Bioscience, 1997, pp15-53

GORBUNOV N., ESPOSITO E.

Nitric oxide as a mediator of inflammation.  
Intern. J. Immunopath. and Pharmacol., 1993, 6, 67-75.

GUDI S., CRAIG B., FRANGOS J.A.

Fluid flow rapidly activates G-proteins in human endothelial cells.  
Circ. Res., 1996, 79, 834-839.

HALLER H.

Risk factors for cardiovascular disease and the endothelium. Vascular Endothelium, Physiology, Pathology, and Therapeutic Opportunities.  
In: Bone G.V.R. and Schwartz C.J. (ed) New horizon series; Vol.3 Schattauer, Stuttgart, 1997, pp273-86.

HAMBLIN A., TAYLOR M., BERNHAGEN J., SHAKOOR Z., MAYALL S., NOBLE G.,  
McCARTHY D.

A method of preparing blood leukocytes for flow cytometry which prevents upregulation of leukocyte integrins.

J. Immunol. Meth., 1992, 146, 219-228.

HELMLINGER G., GEIGER R.V, SCHRECK S., NEREM R.

Effects of pulsatile flow on cultured vascular endothelial cell morphology.

J. Biomech. Eng, 1991, 113, 123-31.

HELMLINGER G., BERK B., NEREM R.

Calcium responses of endothelial cell monolayers subjected to pulsatile and steady laminar flow differ.

Am. J. Physiol., 1995, 269,2, C367-75.

HIMMEL H. M., WHORTON A. R., AND STRAUSS H. C.

Intracellular calcium, currents, and stimulus-response coupling in endothelial cells. Hypertension, 1993, 21, 112-127.

HSIEH H., LI N., FRANGOS J.

Shear stress increases endothelial platelet-derived growth factor mRNA levels.

Am. J. Physiol., 1991, 260, H642-H646.

HSIEH H., LI N., FRANGOS J.

Shear-induced platelet-derived growth factor gene expression in human endothelial cells is mediated by Protein kinase C.

J. Cell. Physiol., 1992, 150, 552-558.

HSIEH H., LI N., FRANGOS J.

Pulsatile and steady flow induces c-fos expression in human endothelial cells.

J. Cell. Physiol., 1993, 154, 143-151.

HUGHES B., HOLLERS J., CROCKETT-TORABI E., WAYNE SMITH C.

Recruitment of CD11b/CD18 to the neutrophil surface and adherence-dependent cell locomotion.

J. Clin. Invest., 1992, 90, 1687-1696

HYNES RO.

Integrins: versability, modulation and signaling in cell adhesion.

Cell, 1992, 69, 11-25.

INOUE A., YANAGISAWA M., KIMURA S., KASUYA Y., MIYAUCHI T., GOTO K., MASAKI T.

The human endothelin family: Three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 2863-7.

JALALI S., LI YS., SOTOUDEH M., YUAN S., LI S., CHIEN S., SHYY JY.

Shear stress activates p60src-Ras-MAPK signaling pathways in vascular endothelial cells.

Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998, 18, 2, 227-34.

JANG Y., LINCOFF A.M., PLOW E.F., and TOPOL E.J.

Cell adhesion molecules in coronary artery disease.

J. Am. Coll. Cardiol., 1994, 24, 1591-1597.

JO H., SIPOS K., GO YM, LAW R., RONG J., M. MCDONALD J.

Differential effect of shear stress on extracellular signal-regulated kinase and N-terminal jun kinase in endothelial cells- Gi<sub>2</sub>- and Gβ/γ dependent signalling pathways.

The Journal of Biological Chemistry, 1997, 272, 1395-1401.

KU D., GIDDENS D., ZARINS C., GLAGOV S.

Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation. Positive correlation between plaque location and low oscillating shear stress.

Arteriosclerosis, 1985, 5, 3, 293-302.

KUCHAN M., FRANGOS J.

Shear stress regulates endothelin-1 release via protein kinase C and cGMP in cultured endothelial cells.

Am. J. Physiol., 1993, 264, H150-H156.

KUCHAN M., JO H., FRANGOS J.

Role of G proteins in shear stress-mediated nitric oxide production by endothelial cells.

Am. J. Physiol., 1994, 267 (Cell Physiol), C753-C758.

KUCHAN M., FRANGOS J.

Role of calcium and calmodulin in flow-induced nitric oxide production in endothelial cells.

Am. J. Physiol., 1994, 266 (Cell Physiol), C628-C636.

KUIJPER P., GALLARDO TORRES H., VAN DER LINDEN J., LAMMERS J., SIXMA J., ZWAGINGA J., JOENDERMAN L.

Neutrophil adhesion to fibrinogen and fibrin under flow conditions is diminished by activation and L-selectin shedding.

Blood, 1997, 89, 6, 2131-2138.

LABRADOR V.

Adhésion des polynucléaires neutrophiles sur une interface liquide/solide - Influence de l'état d'activation.

Rapport de DEA - Spécialité Génie Biologique - UHP Nancy I, Juin 1998.

LANGUINO L., PLESCIA J., DUPERRAY A., BRIAN A., PLOW E., GELTOSKY J., ALIERI D.

Fibrinogen mediates leukocyte adhesion to vascular endothelium through an ICAM-1 dependent pathway.

Cell, 1993, 73, 1423-1430.

LAVALLE P., STOLTZ J., SENGER B., VOEGEL J., SCHAFF P.

Red blood cell adhesion on a solid/liquid interface.

Proc. Natl. Acad. Sci USA, 1996, 93, 15136-15140.



LEGRAND Y.

Le Sang et les vaisseaux.

Ed. Hermann, France, 1987, pp3-29

LI Y., SHYY J., LI S., LEE J., SU B., KARIN M., CHIEN S.

The Ras-JNK pathway is involved in shear-induced gene expression.

Mol. Cell. Biol., 1996, 16, 11, 5947-54

LI, S., KIM, M., SCHLAEPFER, D., HUNTER, T., CHIEN, S., SHYY, J.

The fluid shear stress induction of JNK pathway is mediated through FAK-Grb2-Sos.

J. Biol. Chem., 1997, 272, 30455-30622.

LIN R., ASTIZ M., SAXON J., SAHA D., RACKOW E.

Relationships between plasma cytokine concentration and leukocyte functional antigen expression in patients with sepsis.

Critical Care of Medecine, 1994, 22, 1595-1602.

LO S.K., VAN SEVENTER GIJS A., LEVIN S., WRIGHT S.

Two Leukocyte receptors (CD11a/CD18 and CD11b/CD18) mediate transient adhesion to endothelium by binding to different ligands.

J. Immunol., 1989, 143, 10, 3325-3329.

LOIKE J., SODEIK B., CAO L., LEUCONA S., WEITZ J., DETMERS P., WRIGHT S., SILVERSTEIN S.

CD11c/CD18 on neutrophils recognizes a domain at the N terminus of the A alpha chain of fibrinogen.

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 1991, 88, 3, 1044-8.

MACEY M., JIANG X., VEYS P., McCARTHY D., NEWLAND A.

Expression of functional antigens on neutrophils - Effects of preparation.

J. Immunol. Meth., 1992, 149, 37-42.

MACEY M., McCARTHY D., VORDERMEIER S., NEWLAND A., BROWN K.

Effects of purification methods on CD11b and L-selectin expression as well as the adherence and activation of leucocytes.

J. Immunol. Meth., 1995, 181, 211-219.

MCCARTHY D., TAYLOR M., BERNHAGNE J., PERRY J., HAMBLIN A.

Leukocyte integrin and CR1 expression on peripheral blood leucocytes of patients with rheumatoid arthritis.

Annals of the Rheumatic Diseases, 1992, 51, 307-312.

MAKGOBA M., SANDERS M., GINTHER LUCE G., DUSTIN M., SPRINGER T., CLARK E., MANNONI P., SHAW S.

ICAM-1 a ligand for LFA-1 dependent adhesion of B, T and myeloid cells.

Nature, 1988, 331, 86-88.

MALEK A., JACKMAN R., ROSENBERG R., IZUMO S.

Endothelial expression of thrombomodulin is reversibly regulated by fluid shear stress.

Circ. Res., 1994, 74, 852-860.

MALEK A., IZUMO S., ALPER S.

Modulation by pathophysiological stimuli of the shear stress-induced up-regulation of endothelial nitric oxide synthase expression in endothelial cells.

Neurosurgery, 1999, 45, 2, 334-44; discussion 344-5.

MANN E.K., WOJTASZCZYK P., SENGER B., VOEGEL J., SCHAAF P.

A paradox resolved: apparently identical radial distribution functions, different density variances.

Europhysics letters, 1995, 30, 5, 261-265.

MOHAN S., MOHAN N., SPRAGUE E.

Diferential activation of NF $\kappa$ B in human aortic endothelial cells conditioned to specific flow environments.

Am. J. Physiol., 1997, 273 (Cell Physiol. 42), C572-578.

MONCADA S., GRYGLEWSKI R., BUNTING S., VANE J.

An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation.

Nature, 1976, 263, 633-5.

MORITA T., KURIHARA H, MAEMURA K., YOSHIZUMI M., NAGAI R., YAZAKI Y.

Role of  $Ca^{2+}$  and protein kinase C in shear stress-induced actin depolymerization and endothelin 1 Gene expression.

Circ. Res., 1994, 75, 630-36.

NAGEL T., RESNICK N., ATKINSON W., DEWEY JR. C., GIMBRON JR. M.

Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells.

J. Clin. Invest., 1994, 94, 885-91.

NEREM R., LEVESQUE M., CORNHILL J.

Vascular endothelial morphology as an indicator of the pattern of blood flow.

J. Biomech. Eng., 1981, 103, 3, 172-6.

NEREM R.

Vascular fluid mechanics, the arterial wall, and atherosclerosis.

J. Biomech. Eng., 1992, 114, 275.

NICHOLS T., BELLINGER D., JOHNSON T., LAMB M., GRIGGS T.

von Willebrand's disease prevents occlusive thrombosis in stenosed and injured porcine coronary arteries.

Circ. Res., 1986, 59, 15-26.

NOLLERT M., DIAMOND S., MCINTIRE L.

Hydrodynamic shear stress and mass transport modulation of endothelial cell metabolism.

Biotech. Bioeng., 1991, 38:588-602.

OGUEY D., GEORGE P., RUEGG C.

Disruption of integrin-dependent adhesion and survival of endothelial cells by recombinant adenovirus expressing isolated beta integrin cytoplasmic domains.

Gene Ther., 2000, 7, 15, 1292-303.

OHNO M., GIBBONS G., LOPEZ F., COOKE J., DZAU V.

Shear stress induces transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1) expression via a flow-activated potassium channel.

Clin. Res., 1992, 40, 294.

OHNO M., GIBBONS G., DZAU V., COOKE J.

Shear stress elevates endothelial cGMP. Role of a potassium channel and G protein coupling.

Circulation, 1993, 88, 1, 193-7.

OKUDA M., TAKAHASHI M., SUERO J., MURRY C., TRAUB O., KAWAKATSU H., BERK B.

Shear stress stimulation of p130(cas) tyrosine phosphorylation requires calcium-dependent c-Src activation.

J. Biol. Chem., 1999, 274, 38, 26803-9.

OLESEN S., CLAPHAM D., DAVIES P.

Haemodynamic shear stress activates a K<sup>+</sup> current in vascular endothelial cells.

Nature, 1988, 331, 168-70.

OOKAWA K., SATO M., OHSHIMA N.

Morphological changes of endothelial cells after exposure to fluid-imposed shear stress: differential responses induced by extracellular matrices.

Biorheology, 1993, 30,131-40.

PAPADAKI M., ESKIN S.

Effects of Fluid Shear Stress on Gene Regulation of Vascular Cells.

Biotechnol. Prog., 1997, 13, 3, 209 –221.

PALMER R., FERRIGE A., MONCADA S.

Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor.

Nature, 1987, 327, 524-6.

PALMER S., HAMBLIN A.

Increased CD11/CD18 expression on the peripheral blood leucocytes of patients with HIV disease : relationship to disease severity.

Immunology, 1993, 93, 344-349.

PARDI R.

« Inside-out » and « outside-out » mechanisms in leukocyte adhesion.

FCI, 1994, 2, 136-146.

PATRICK C., MCINTIRE L.

Shear stress and cyclic strain modulation of gene expression in vascular endothelial cells.

Blood Purif., 1995, 13, 3-4, 112-24

PAWSON T., SCOTT J.

Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins.

Science, 1997, 278, 5346, 2075-80.

PELICCI G., LANFRANCONE L., GRIGNANI F., MCGLADE J., CAVALLO F., FORNI G., NICOLETTI I., GRIGNANI F., PAWSON T., PELICCI P.

A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction.

Cell, 1992, 70, 1 93-104.

PONCELET P., GEORGE F., PAPA S., LANZA F.

Quantification of hemopoietic cell antigens in flow cytometry.

Eur. J. Histochem., 1996, 40, SUPPL 1,15-32.

PRASAD A., LOGAN S., NEREM R., SCHWARTZ C., SPRAGUE E.

Flow-related responses of intracellular inositol phosphate levels in cultured human endothelial cells.

Circ. Res., 1993, 72, 827-36.

REDMOND E., CAHILL P., SITZMANN J.

Flow-induced regulation of G-protein expression in cocultured vascular smooth muscle and endothelial cells.

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 1998, 18,1, 75-83.

REINHART W.

Shear-dependence of endothelial functions.

Experientia, 1994, 50,2, 87-93.

RESNICK N., GIMBRONE M.

Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression.

FASEB J., 1995, 9, 874-882.

RIHA P., DUMAS D., STOLTZ J.

Modelling of molecular mechanics of leukocyte adhesion in the microcirculation.

Proceedings of the International conference on Biorheology and School for young scientists.

Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, 18-22 oct 2000.

Ed by N. Antonova, Frady Publ (Sofia), pp 78-83.

ROSS R.

Atherosclerosis : A problem of the biology of arterial wall cells and their interactions with blood components.

Arteriosclerosis, 1981, 1, 293-311.

ROSS R.

The pathogenesis of atherosclerosis : a perspective for the 1990s.

Nature, 1993, 362, 801-809.

RUGGERI Z., WARE J.

Von Willebrand factor.

FASEB J., 1993, 7, 2, 308-16.

SAKURAI T., YANAGISAWA M., MASAKI T.

Molecular characterization of endothelin receptors.

Trends Pharmacol Sci, 1992, 13, 103-8.

SALVEMINI D., MOLLACE V.

Roles and therapeutic implications of nitric oxide in the cardiovascular system.

Drug News and Perspectives, 1994, 7, 158-66.

SAMPATH R., KUKIELKA G., SMITH C., ESKIN S., MCINTIRE L.

Shear stress-mediated changes in the expression of leukocyte adhesion receptors on human umbilical vein endothelial cells in vitro.

Ann. Biomed. Eng., 1995, 23, 247-56.

SATCHER JR. R., BUSSOLARI S., GIMBRONE JR. M., DEWEY JR. C.

The distribution of fluid forces on model arterial endothelium using computational fluid dynamics.

J. Biomech. Eng., 1992, 114, 309-16.

SATO M., LEVESQUE M., NEREM R.

Micropipette aspiration of cultured bovine aortic endothelial cells exposed to shear stress.

Arteriosclerosis, 1987, 7, 276-286.

SATO M., OHSHIMA N.

Flow-induced changes in shape and cytoskeletal structure of vascular endothelial cells.

Biorheology, 1994, 31, 143-53.

SCHWARTZ C., VALENT A., SPRAGUE E.

A modern view of atherogenesis.

Am. J. Cardiol., 1993, 71, 9B-14B.

SHAKOOR Z., HAMBLIN A.

Increased CD11/CD18 expression on peripheral blood leukocytes of patients with sarcoidis.  
Clin. Exp. Immunol., 1992, 90, 99-105.

SHEN J., LUSCINSKAS F.W., CONNOLLY A., DEWEY C.F.JR., GIMBRONE M.A.JR.

Fluid shear stress modulates cytosolic free calcium in vascular endothelial cells.  
Am. J. Physiol., 1992, 262, C384-C392.

SHYY H.J., HSIEN H.J., USAMI S., CHIEN S.

Fluid shear stress induces a biphasic response of human monocyte chemotactic protein 1 gene expression in vascular endothelium.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 1994, 91, 4678-82.

SIMON M., STRATHMANN M., GAUTAM N.

Diversity of G proteins in signal transduction.  
Science, 1991, 252, 5007, 802-8.

SIMON S., BURNS A., TAYLOR A., GOPALAN P., LYNAM E., SKLAR L., SMITH C.

L-selectin (CD62L) cross-linking signals neutrophil adhesive functions via the Mac-1 (CD11b/CD18)  $\beta$ 2-integrin.  
J. Immunol., 1995, 155, 1502-1514.

SMALLEY D., LIN J., CURTIS M., KOBARI Y., STEMERMAN M., PRITCHARD K. JR.

Native LDL increases endothelial cell adhesiveness by inducing intercellular adhesion molecule-1.  
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 1996, 16, 585-590.

SPRINGER T.

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



STARY H., BLANKENHORN D., CHANDLER A., GLAGOV S., INSULL W., RICHARDSON M., ROSENFELD M., SCHAFFER S., SCHWARTZ C., WAGNER W., WISSLER R.

A definition of intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions, A report from the committee on vascular lesions of the council on arteriosclerosis, American Heart Association.

Circulation, 1992, 85, 391-405.

STEWART G.J.

Neutrophils and deep venous thrombosis.

Haematosi, 1993, 23, 127-132.

STOLTZ J., BOISSEAU M., MULLER S., WANG X., LEGRAND S., LABRADOR M.

Hémorhéologie et cellules endothéliales vasculaires.

Journal des Maladies Vasculaires (Paris), 1999, 24, 2, 99-109.

SUGIMORI T., GRIFFITH D., ARNAOUT A.

Emerging paradigms of integrin ligand binding and activation.

Kidney International, 1997, 51, 1454-1462.

TEDDER T., STEEBER D., CHEN A., ENGEL P.

The selectins: vascular adhesion molecules.

FASEB J., 1995, 9, 866-873.

TEDGUI A.

Rôle de l'endothélium dans l'athérosclérose.

La revue du praticien (Paris), 1997, 47, 2262-67.

THOUMINE O., ZIEGLER T., GIRARD P., NEREM R.

Elongation of confluent endothelial cells in culture: the importance of fields of force in the associated alterations of their cytoskeletal structure.

Exp. Cell. Res., 1995, 219:427-41.

TRAUB O., MONIA B., DEAN N., BERK B.

PKC-epsilon is required for mechano-sensitive activation of ERK1/2 in endothelial cells.

J. Biol. Chem., 1997, 272, 50, 31251-7.

TRAUB O., BERK B.

Laminar shear stress, Mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force.

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 1998, 18, 677-685.

TRUSKEY G., BARBER K., ROBEY T., OLIVIER L., COMBS M.

Characterization of a sudden expansion flow chamber to study the response of endothelium to flow recirculation.

J. Biomech. Eng., 1995, 117, 203-10.

TSAO P., BUITRAGO R., CHAN J., COOK J.

Fluid flow inhibits endothelial adhesiveness, Nitric oxide and transcriptional regulation of VCAM-1.

Circulation, 1996, 94, 1682-89.

TSENG H., PETERSON T., KOVACH N., BERK B.

Fluid shear stress stimulates mitogen-activated protein kinase in endothelial cells.

Circ. Res., 1995, 77, 869-878.

TSUBOI H., ANDO J., KORENAGA R., TAKADA Y., KAMIYA A.

Flow stimulates ICAM-1 expression time and shear stress dependently in cultured human endothelial cells.

Biochem. Biophys. Res. Comm., 1995, 206, 3, 988-96.

VANDEKERCKHOVE J., DEBOBEN A., NASSAL M., WIELAND T.

The phalloidin binding site of F-actin.

EMBO J., 1985, 4, 11, 2815-8.

WALPOLA P., GOTILIEB A., LANGILLE B.

Monocyte adhesion and changes in endothelial cell number, morphology, and F-actin distribution elicited by low shear stress in vivo.

Am. J. Pathol., 1993, 142, 1392-1400.

WALPOLA P., GOTLIEB A., CYBULSKY M., LANGILLE B.

Expression of ICAM-1 and VCAM-1 and monocyte adherence in arteries exposed to altered shear stress.

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 1995, 15, 1, 2-10.

WANG N., BULTER J., INGBER D.

Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton.

Nature, 1993, 260, 1124-27.

WARY K., MAINIERO F., ISAKOFF S., MARCANTONIO E., GIANCOTTI FG.

The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression.

Cell, 1996, 87, 4, 733-43.

WECHEZAK A., VIGGERS R., SAUVAGE L.

Fibronectin and F-actin redistribution in cultured endothelial cells exposed to shear stress.

Lab. Invest., 1985, 53, 639-647.

WEST C., WEST D., KUMAR S., MOORE J.

A comparison of the sensitivity to photodynamic treatment of endothelial and tumour cells in different proliferative states.

Int. J. Radiat. Biol., 1990, 58, 1, 145-56.

WILLIAMS P., WARWICK R., DYSON M., BANNISTER L., WERNECK H.

Gray's Anatomy, thirty-eighth edition, Churchill Livingstone, Great Britain, 1995, pp1451-1459, pp36-43.

WRIGHT S., WEITZ J., HUANG A., LEVIN S., SILVERSTEIN S., LOIKE J.

Complement receptor type three (CD11b/CD18) of human polymorphonuclear leukocytes recognizes fibrinogen.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, 85, 7734-7738.

WOJTASZCZYK P., SCHAFF P., SENGER B., ZEMBALA M., VOEGEL J.-C.

Statistical properties of surfaces covered by large spheres.

J. Chem. Phys., 1993, 99, 9, 7198-7208.



XIAO Z., ZHANG Z., DIAMOND S.

Shear stress induction of the endothelial nitric oxide synthase gene is calcium dependent but not calcium activated.

J. Cell. Physiol., 1997, 171, 205-211.

ZHANG Z., XIAO Z., DIAMOND S.

Shear stress induction of C-type natriuretic peptide (CNP) in endothelial cells is independent of NO autocrine signaling.

Ann. Biomed. Eng., 1999, 27, 4, 419-26.

ZHU C.

Kinetics and mechanics of cell adhesion.

J. Biomech., 2000, 33, 1, 23-33.

ZIEGLER T., BOUZOURÈNE K., HARRISON V., BRUNNER H., HAYOZ D.

Influence of oscillatory and unidirectional flow environments on the expression of endothelin and Nitric oxide synthase in cultured endothelial cells.

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 1998, 18, 686-92.

## **PUBLICATIONS**



## INFLUENCE OF LAMINAR SHEAR STRESS ON CYTOSKELETON AND ICAM-1 EXPRESSION OF ENDOTHELIAL CELLS

S. MULLER, R. SUN, S. LEGRAND, V. LABRADOR, X. WANG and J.-F. STOLTZ  
Angiohématologie-Hémorhéologie, UMR CNRS 7563 (LEMMA), Faculté de Médecine de Nancy,  
Plateau de Brabois, 54500 Vandoeuvre les Nancy, FRANCE

The aim of this work was to study the morphological behavior and the surface adhesion molecules expression and localization of a human endothelial cell line subjected *in vitro* to a laminar flow in a parallel plate flow chamber, by a 3-D fluorescence microscopy and cytofluorimetry. At rest, endothelial cells showed an array of microfilament bundles of the actin fibers, and a peripheral distribution of ICAM-1 molecules. After shear stress (1 to 30 dyne/cm<sup>2</sup>, 1 to 24 hours), the stress fibers appeared and were oriented related to the flow direction but also to the shear. The ICAM-1 expression varied according to the shear stress characteristics and their distribution at the cell surface appeared also modified and related to the stress fibers formation.

**Key words:** endothelial cells, shear stress, cytoskeleton, adhesion molecules, fluorescence microscopy.

### 1. Introduction

The vascular endothelium provides the interface between blood and vascular tissues. Endothelial cells (ECs) are continually subjected to hemodynamic forces, in particular blood shear stress, which play a determinant role in the pathogenesis of cardiovascular diseases and atherosclerosis. Under the effect of these dynamic forces, the endothelial cells undergo a number of morphological, structural and functional changes (Davies *et al.*, 1997). Changes in morphology and cytoskeleton organization were responses to mechanical perturbation of flow and leads to alterations in metabolic functions (Born and Schwartz, 1997; Grabowsky and Llam, 1995; Malek and Izumo, 1995; Muller *et al.*, 1998), such as vaso-regulatory molecule synthesis and release (NO, prostacycline, Endothelin-1), ion channel regulation (Helminger *et al.*, 1991), gene expression (Shyy *et al.*, 1995) and, more particularly, at the level of the main adhesion molecule expression. These effects appear to result from a mechano-activation or a mechano-transduction phenomenon through the shear-stress parameters of the flow (Malek and Uzami, 1995; Drenkhan and Ness, 1997). Thus, the effects of disturbed flow on the endothelial cell functions at particular vascular locations (bifurcation, stenosis, aneurysms) were known to favor thrombosis, lipid uptake and atherosclerosis (Vane *et al.*, 1995; Koller and Kaley, 1996), therefore it is for interest to study the structural behavior of endothelial cells in a vascular peculiarity.

The aim of this work was to study the morphological behavior and the surface adhesion molecules expression and localization of a human endothelial cell line subjected *in vitro* to a laminar flow, and the relationship between the cytoskeleton and the intercellular adhesion molecules-1 (ICAM-1) distribution.

### 2. Methods

#### 2.1. Endothelial cells (ECs)

Cell line : human endothelial cell line ECV304 (ECACC N°92091712).  
The ECs were grown in M199 medium (Gibco) with 10% foetal calf serum. ECs were cultured on coverslides N°2 (70x44mm) at 37°C in humidified atmosphere (5%CO<sub>2</sub>, 95% air).

## 2.2. Flow in a step flow chamber

We used a modified rectangular parallel flow chamber (figure 1). Two silicone gaskets with a thickness of 0.027cm containing a rectangular opening of same width  $w$  (1.0cm) but different lengths to create an asymmetric sudden expansion. The whole chamber system was assembled by vacuum (about -450 mbar). The entrance height  $h$  is 0.027cm and the outlet height  $H$  0.054cm. Thus the expansion ratio was 2: 1 and the ratio width/height was 20: 1. Because of the large value of  $w/h$ , the down stream flow could be considered as one dimensional laminar flow and the wall shear stress in established flow region can be calculated by the following formula:  $t_w = 6mQ/wH^2$  where  $m$  is the dynamic viscosity of the media which is measured by a capillary viscometer at 37°C.

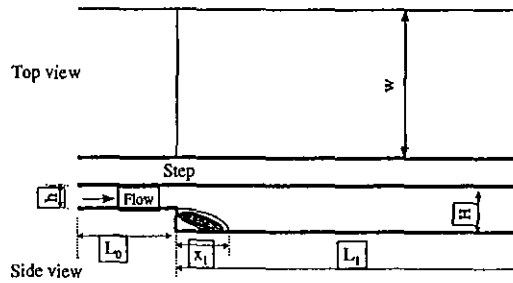


Fig.1. Parallel step flow chamber ( $H=0.050\text{cm}$ ,  $h=0.027\text{cm}$ ,  $w=1.0\text{cm}$ ,  $L_0=1.5\text{cm}$ ,  $L_1=2.5\text{cm}$ ).

## 2.3. Exposure of ECs to shear stress

The coverslide with an endothelial cells monolayer was assembled to the used rectangular flow chamber, which can mimic a vascular aneurysm, and a flow rate was generated by a peristaltic pump.  $\tau$  was include in a range of 0.2 to 2 Pa.

## 2.4. 3D microscopic fluorescence studies

The fluorescence studies were performed with a Olympus IX-70 fluorescence inverted microscope equipped with the CellScan<sup>TM</sup> optical sectioning acquisition system (Scanalytics, USA and Bionis, France) using a x100/0.95NA objectif ( $z$  scanning =  $0.25\mu\text{m}$ ). This device allows a 3D image restoration and a fluorescence quantification through an EPR calculation. Images were recorded with a Slow Scan Coding 12 bit CCD camera (Princeton Instruments Inc., USA). The blurring function of the optical system (PSF) was characterised by imaging a through-focus series of optical sections of a  $0.17\mu\text{m}$  diameter fluorescent bead (Microscope point source kit, Molecular Probes, USA) (Shaw, 1998).

## 2.5. Cytoskeleton

Phalloïdine-rhodamine was used to label the F-actin microfilaments of the cytoskeleton (2U/ml, fixation: paraformaldehyde 1%, permeabilization: triton X100, 0.5%).

## 2.6. Image processing

The measurement of the length ( $L$ ), the thickness ( $l$ ) and the orientation angle ( $0 < \alpha < 180^\circ$ ) of stress fibers towards flow direction was performed by image analysis software (Visilog 5.1, Noesis, France) as described on figure 2.

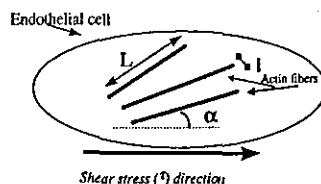


Fig.2. Length (L), thickness (l) and orientation angle ( $0 < \alpha < 180^\circ$ ) of stress fibers towards flow direction analyzed by image software.

## 2.7. Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1)

ICAM-1 molecules present at the CE surface were studied by indirect immunofluorescence labelling. Monoclonal anti-ICAM1 (IgG1, mouse anti-human, Immunotech, France) was used as primary antibody, FITC-conjugated goat anti-mouse (Dako) was used as a secondary antibody. In some samples, cells were previously treated 10 minutes with cytochalasine-D ( $5\mu\text{M}$ ) in order to inhibit the stress fibers formation. For the co-localization studies, a double-labeling was performed: the cells were labeled firstly with the anti-ICAM-1 antibody, then the cytoskeleton was labeled.

## 2.8. Flow-cytometry assays

Surface expression of ICAM-1 was studied by incubating the ECs monolayer on the coverslide with diluted primary antibody (human anti-ICAM-1, 1/20) at room temperature for 20min. Subsequently, the cells were washed in a phosphate buffer saline (PBS) and labeled with FITC-conjugated goat-anti mouse IgG for 20min in the dark. ECs were then detached from coverslides mechanically using a cell scraper, washed one time in PBS (200g, 10 min) and finally resuspended in 0.5ml of PBS. ICAM-1 level was determined by using a flow cytometer (FacScan, Beckton Dickinson, San Jose, USA) incorporating an He-Ne laser tuned to 488 nm. Forward light scatter,  $90^\circ$  light scatter and fluorescence emission were collected for  $5.10^5$  cells using the  $90^\circ$  light scatter parameter as the master signal. Forward and  $90^\circ$  light scatters were analyzed for the identification of cell debris or doublet. The quantification of ICAM-1 on a single cell was performed by using DAKO QIFIKIT<sup>®</sup> (Dako). The primary antibody used for labeling of the cell specimen was used at saturating concentration. An isotypic antibody (Immunotech, France) was used to determine the percentage of non-specific labeling. The number of bound primary antibody molecules corresponded to the number of antigenic sites present on the cell surface. The secondary antibody was also used at saturating concentration. Consequently, the fluorescence was correlated with the number of bound primary antibody molecules on the cells. ICAM-1 expression was then represented either as the number of molecules per cell.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Cytoskeleton studies

At rest, endothelial cells showed an array of microfilament bundles of the actin fibers. After shear stress exposition, the stress fibers appeared and were oriented related to the flow direction in the areas where the flow is reestablished (fig. 3). The  $\alpha$  distribution was more homogeneous and became lower ( $45\text{-}50^\circ$  to  $60\text{-}70^\circ$ ) when the shear stress increased, in order to adapt the cell structure to the flow direction. This seems to be an adjustment of the cells towards the mechanical stresses. The stress fibers were characterized by a length and a thickness higher than the size of bundles of F-actin microfilaments in the resting cells. Otherwise, the cells localized on the reattachment line showed a different pattern of stress fibers orientations: the stress fibers were polymerized (high thickness), but the orientation is random, according to the perturbed flow, as it was shown on the images concerning the cells submitted at a perturbed flow (fig.3).



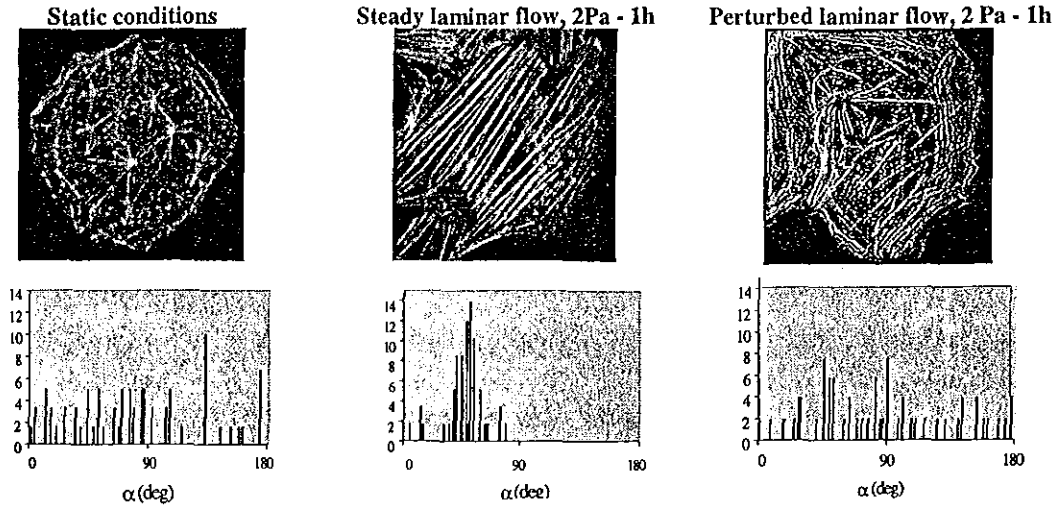


Fig.3: Distribution of the stress fibers and angle orientation ( $\alpha$ ): effect of the flow the histograms showed the relative frequency of  $\alpha$  ; ( $\times 100$ , NA 0.95, Cellscan<sup>TM</sup>).

### 3.2. Adhesion molecule distribution and expression studies

At rest, endothelial cells showed a peripheral distribution of ICAM-1 molecules. When the cells were submitted to a shear stress, the localization of ICAM-1 molecules became apical, on the areas which were more affected by the mechanical stresses. Moreover, complementary studies performed with pretreated cytochalasin-D cells ( $5\mu\text{M}$ ), which inhibits the stress fibers formation (Ingber, 1997; Pourati *et al.*, 1998), showed no modifications compared to the static control samples (fig.4).

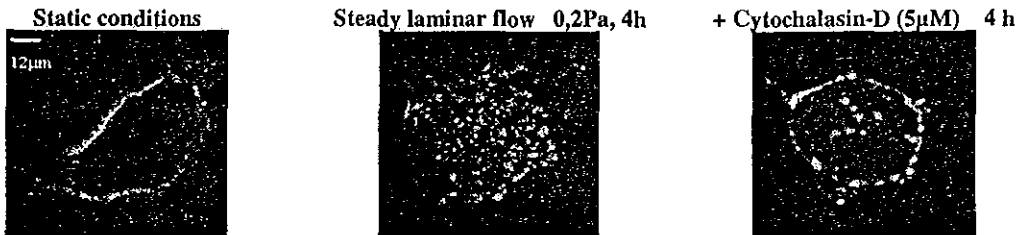


Fig.4. ICAM-1 distribution at the endothelial cell surface: effect of the treatment. ( $\times 100$ , NA 0.95, Cellscan<sup>TM</sup>).

These experimentations allowed to show that there is a link between the stress fiber and the ICAM-1 molecules localization at the cell surface membrane. These results were confirmed by the double-labeling studies (fig.5).

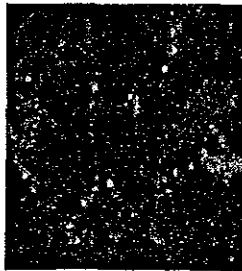


Fig.5. ICAM-1 - stress fibers colocalisation (double-labeling : red fluorescence, phalloïdine rhodamine F-actin labelin ; green fluorescence, fluorescein ICAM-1 labeling). ( $\times 100$ , NA 0.95, Cellscan<sup>TM</sup>).

Thus, actin filaments were implied in this phenomenon according to the specificity of cytochalasin-D.

Otherwise, flow cytometry studies of the cell surface ICAM-1 expression have shown that shear stress enhanced ICAM-1 expression, but the presence of cytochalasin-D inhibited this phenomenon (table 1), corroborating in this way the relationship between the F-actine and the cell surface adhesion molecules expression.

Table 1. Influence of the treatment on the cell surface ICAM-1 sites. Flow cytometric study.

Treatment	static control	cyto-D <sup>1</sup>	dynamic <sup>2</sup>	dynamic + cyto-D
Number of ICAM-1 sites on the cell surface	15500 ± 3000	15000 ± 2400	42000 ± 3800	12000 ± 3000

<sup>1</sup> : Steady laminar flow, 0,2Pa, 4h ; <sup>2</sup> : cytochalasin-D, 5µM

#### 4. Conclusions

It has been shown that the modifications of the morphological properties of ECs through the cytoskeleton were coupled to the mechanical characteristics of the flow (laminar flow, disturbed flow, shear stress value and duration). Surface expression and localization of ICAM-1 was straight related to the shear stress by the cytoskeleton modifications, in particular through the F-actin changes, but other studies will be necessary to explain the function of the other cytoskeleton components.

Otherwise, it seems that the adhesive properties of ECs could be different according to the geometrical properties of the vessels (laminar flow, disturbed flow in aneurysm areas).

These results could bring a better knowledge to the behaviour of endothelial cells subjected to a perturbed flow in vascular singularities (such as aneurysm, stenosis, ...) or during cardiovascular pathologies.

#### 5. Reference

- Born G.V.R. and Schwartz G. (1997): In: Vascular endothelium. Physiology, pathology and therapeutic opportunities. G.V.R Born and G Schwartz Eds., (Schattauer, Stuttgart, Germany), 1 vol., 391pp.
- Caille N., Tardy Y. and Meister J.J. (1998): *Assessment of strain field in endothelial cells subjected to uniaxial deformation of their substrate.* - Ann Biomed Eng. v.26, pp.409-416.
- Davies P.F., Barbee K.N., Volin M.V., Robotewskyj A., Chen J., Joseph L., Griem M.L., Wernick M.N., Jacobs E., Polacek D.C., DePaola N. and Barakat A.I. (1997): *Spatial relationships in early signaling events of flow-mediated endothelial mechanotransduction.* - J. Physiol. V.59, pp.527-549.
- Drenckhahn D. and Ness W. (1997): *The endothelial contractils cytoskeleton.* - In ref 1- pp.1-25.
- Grabowski E.F. and Lam F.P. (1995): *Endothelial cell function, including tissue factor expression, under flow conditions.* - Thromb. Haemost., v.74, pp.123-128.
- Helming G., Geiger R.V., Schreek S. and Nerem R.M. (1991): *Effects of pulsatile flow on cultured endothelial cell morphology.* - J. Biomed. Eng. v.113, pp.123-131.
- Ingber D.E. (1997): *Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction.* - Annu. Rev. Physiol. V.59, pp.575-599.

- Koller A. and Kaley G. (1996): *Shear stress dependent regulation of vascular resistance in health and disease: rôle of endothelium*. - *Endothelium*, v.4, pp.247-272.
- Malek A.M. and Izumo S. (1995): *Control of endothelial cell gene expression by flow*. - *J. Biomechanics*, v.28, pp.1515-1528.
- Muller S., Legrand S., Wache P., Dumas D., Wang X., Latger V. and Stoltz J.F. (1998): *Cytoskeleton, surface adhesion molecules and  $[Ca^{2+}]_i$  changes of endothelial cells in a vascular singularity pattern. An in vitro fluorescence microscopy study*. - Xth International vascular biology meeting, Cairns, Australia 23-27 august 1998, p.79.
- Pourati J., Maniotis A., Spiegel D., Schaffer S.L., Butler J.P., Fredberg J.J., Ingber D.E., Stamenovic D. and Wang N. (1998): *Is cytoskeletal tension a major determinant of cell deformability in adherent endothelial cells?* - *Am. J. Physiol.*, pp.C1283-C1289.
- Shaw P.J. (1998): *Computational deblurring of fluorescence microscope images*. - In "Cell Biology: a laboratory handbook" - Academic Press eds., v.3, pp.206-217.
- Shyy J.Y.J., Li Y.S., Lin M.C., Chen W., Yuan S.L., Usami S. and Chien S. (1995): *Multiple cis-elements mediate shear stress-induced gene expression*. - *J. Biomechanics*, v.28, pp.1451-1457.
- Stamenovic D., Fredberg J.J., Wang N., Butler J.P. and Ingber D.E. (1996): *A microstructural approach to cytoskeletal mechanics based on tensegrity*. - *J. Theor. Biol.*, v.181, pp.125-136.
- Suciu A., Civelekoglu G., Tardy Y. and Meister J.J. (1997): *Model for the alignment of actin filaments in endothelial cells subjected to fluid shear stress*. - *Bull. Math. Biol.*, v.59, pp.1029-1046.
- Vane J.R., Born G.V.R. and Welzel D. (1995): *The endothelial cell*. - In « Health and Disease », (Schattauer, Stuttgart, Germany), 1 vol., 204pp.

## INTRODUCTION TO MECANOBIOLOGY OF CELLS

J.F. STOLTZ, X. WANG, S. MULLER and V. LABRADOR

Angiohématologie - Hémorhéologie - UMR CNRS 7563

Faculté de Médecine - Brabois - BP 184 - 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, FRANCE

One fundamental property of living tissues is their ability of adaptation to environment because cells are always exposed to mechanical stresses related to environment or to movement (i.e. external pressure, blood flow pressure related to walking, ...). Today it's generally accepted that these mechanical forces can modify the biological behaviour of cells by affecting their metabolism, secretion of autocrins factors, phenotype, etc ... and that tissues can be remodelled by the mechanical environment.

The modifications induced by mechanical factors are now considered as determinant to the comprehension of some patho-physiological processes (i.e.: atherosclerosis, thrombosis, arthrosis, inflammation, ...).

In this work, we are going to demonstrate, through 3 examples of cells (cartilage chondrocyte, osteocyte and vascular endothelial cell), the importance of the mechanical factors in cell behaviour and the need of a better link between physics, mechanics and biology. Although numerous studies on this topics, the mechanisms of transduction from a mechanical signal to physiological responses or gene expression in cells remain unclear. In vitro studies on cultured cells allow us to have a good control of mechanical parameters and thus to understand better the induced modifications.

### 1. Chondrocyte

Chondrocyte is the predominant cell of cartilage which is an interface tissue avascular, aneural and alymphatic. It represents about 10% of the cartilage volume.

The chondrocyte can be considered as a cell under pressure. In fact the pressure exerted on cartilage varies between 0 to 20 MPa (200 atm) during movement. Measurements performed on a patient who carries a hip prosthesis show a pressure of a 0.7 MPa in standing position and variations from 0.1 to 4 MPa during walking at a frequency of 1 Hz. But the pressure reached 20 MPa when the patient jumped down from a chair.

Physiologically the chondrocyte is in a matrix composed of collagens and proteoglycan (PG) aggregates with 60 to 80 % of water. These molecules consist of a hyaluronate backbone of 30 to 100 monomers which are composed of glycosaminoglycans (GAG, # 50) bound to a core protein. These GAGs show negative electric charges (sulfate and carboxyl). One factor of cartilage resistance to deformation is the high osmotic pressure which increases with fixed density of the negative charges. When there is a load, the number of fixed charges being constant, the decrease of the volume will induce an increase of the density of charges. Thus in order to maintain neutrality the fixed negative charges attract and retain cations ( $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ka^+$ ,  $Ca^+$ , etc...) from outside of the cartilage, leading to a hyperosmotic, acidic environment.

#### 1.1. Influence of mechanical forces on cartilage in vivo

It was known more than 100 years ago that cartilage responded to mechanical stimuli and was able to remodel. It was found that in exercised rabbits, the chondrocytes were larger than those in sedentary control and that immobilisation of an articulation reduces prostaglandins (PG) synthesis. In another way the local lesions of osteo-arthritis in the hip and in the knee occur together in zones of maximum loading, suggesting that excessive mechanical forces are involved in its pathogenesis.

## 1.2. Influence of mechanical forces on cartilage in vitro

All of the in vitro studies carried out on cultured chondrocytes show that mechanical forces play a key role in the rates of synthesis or degradation of the matrix.

### a) *Static compression*

Static compression of cartilage leads to a decreased synthesis of PG and collagens through metabolic modifications induced at the level of chondrocyte.

At equilibrium, the compression induces an increased concentration of cations and a decreased concentration of anions, thus leading to a hyper-osmotic environment by loosing water with acidosis.

In other respect, experiments on cultured cells show that the shape of chondrocyte is not, *a priori*, a determinant factor in cell metabolism.

### b) *Periodic compression*

Periodic compression will increase the synthesis of many components depending of the amplitude. Thus small amplitude oscillation (which are closed to those occurring in vivo) stimulates prostaglandins synthesis.

The frequency of the applied compression seem also to be of great importance. High frequency (0.1 to 1 Hz) compression increased the incorporation of  $^{35}\text{S}$  - sulfate and  $^3\text{H}$  proline, but lower frequency had little effects. Chondrocyte deformation of cell in culture on an elastic membrane subjected to a 10% to stretching, induced an increase in GAG synthesis, and some studies support the assertion that cell deformation can alter chondrocyte phenotype and prostaglandins synthesis.

### c) *Influence of flow in cartilage*

Modelization of the flow in a cartilage under compression loading demonstrates that the radial velocity increases with the distance and that the pressure decreases. According to different authors, the synthesis of PG is localized in regions where flow velocity is proved high. This prediction is confirmed by Smith et al who show that in vitro monolayers of human or bovine chondrocytes exposed to laminar flows have an increased synthesis of GAG, more release of prostaglandin E2 and higher mRNA levels for tissues inhibitors of metalloproteinase.

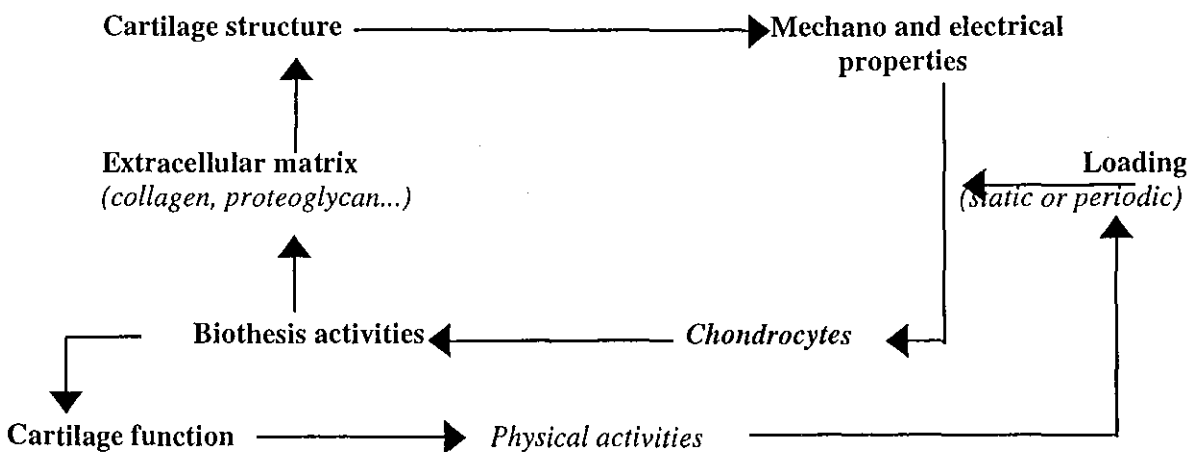


Fig.1: Influence of loading on biosynthesis activities of chondrocyte.

*In summary periodic compression of cartilage generates a flow which improves transport inside the tissue and induces shear stresses and streaming potential modifying the capacity of biosynthesis of chondrocytes (fig. 1).*

## 2. Influence of mechanical forces on bone cells

The basic function of bone is to form a rigid framework for the body and to allow movement.

### 2.1. In vivo studies

If the influence of mechanical stresses on anatomy and bone density was suggested since 1867, the first demonstration of the relationship between mechanical forces and bone remodeling was given by Wolff one century ago. Since then a great number of studies have confirmed and elucidated this relationship. As for other type of tissues, it has been observed that bone formation in vivo, seems not to be promoted by static loading but stimulated by loading with frequencies at physiological levels ( $> 0.5\text{Hz}$ ). This finding suggests that the rate of strain may be an important factor in bone remodelling. The strain rate is correlated with the velocity of interstitial fluid flow.

But the mechanisms by which bone remodeling is affected by mechanical loading is not well understood and are subject of investigations and speculations. A lot of in vivo studies point out the relationship between mechanical stimuli and prostaglandin synthesis, glucose -6- phosphate dehydrogenase and the release of growth hormones in blood circulation.

### 2.2. In vitro studies

A great number of in vitro studies have been carried out in order to better understand the link between mechanical stimuli and metabolic signals. The most common results of mechanocoupling seem to be the influence of mechanical forces on cell deformation and the increase of interstitial flow in bone matrix which then creates a streaming potential as well as a shear stress on cells. Another hypothesis is that the mechanical forces directly act on cell's responses. In this case, the role of ion channels, G proteins and the transduction via cytoskeleton is suggested. Just like in the case of cartilage, both static and cyclic loading tests have been performed.

#### *a)...Static loading*

If in vivo static compression does not lead to an increase of bone formation, some in vitro studies show, however, a proliferation of bone cells and a production of second messengers (Somejen *et al.*, 1980; Rawkinso *et al.*, 1993).

In fact, a supraphysiological static compression (5 to 20 MPa) seems to induce a cell response negatively (inhibition of osteoblasts differentiation, decreased synthesis of RNA and proteins, cytoskelon destabilization, stimulation of new osteoblasts, increased production of prostaglandin E2 (PGE2), inhibition of collagen synthesis, alkaline phosphates activity suppressed, etc...). However it must be pointed that there is some contradiction in published results and that the extent of cell's deformation is generally much larger in vitro (about 10 %), than in vivo (about 0,1 %).

#### *b)...Cyclic loading*

In vitro cyclic compression of bone cells shows an increase of tissue formation with a decreased bone resorption. One of the most common results is an increase of PG synthesis when bone cells are exposed to cyclic deformations. Studies on synthesis of more them 100 proteins by cultures osteoblasts show some modifications, in particular, an increased synthesis of calmodulin,  $\alpha$ -tubulin, vimentin, vincultin and phosphorylase B, a decreased sunthesis of actin. The increase of the synthesis of phosphatase alcaline is particularly important because of its potential role in mineralisation. Cyclic stretching has been also reported to stimulate proliferation and DNA synthesis.

### 3. Influence of mechanical factors on vascular endothelial cells

Vascular endothelial cells form a monocellular layer on vessel walls, for a total estimated mass of 1.5 kg. Their properties are not identical in all part of the body and they acquire specificities that differentiate them according to the anatomical site and local flow, which makes their study all the more difficult. It was initially accepted that their main function was to make up a barrier designed to counter protein losses and permit nutrient distribution to tissues. However, Palade's studies on organelles (awarded by the Nobel Prize) and those of Florey clearly demonstrated the particular role of these multiple-activity cells.

It is now a known fact that their role is determinant in hemodynamic control by their various metabolic activities such as control of homeostasis, vascular tonus, blood fluidity and coagulating properties, cellular adhesion... Recent studies have underlined the crucial role of local blood flow conditions on their properties.

In microcirculation, the endothelial cells of venules are particularly active and constitute the physiological site of liquid exchange (permeability) and above all cellular transit. During critical ischemia, the so-called post-capillary venules are deeply involved, as are upstream capillaries (often dilated). Lastly, the properties of endothelial cells may be impaired in a number of diseases (atherosclerosis, hypertension, inflammation, metabolic diseases,...).

#### 3.1. Functional states of vascular endothelial cell

The endothelium is normally anti-thrombotic and anti-adhesive, to ensure "blood fluidity". During aggressions, frequently multi factorial (agonists and/or cytokines), the endothelium can reverse its functions by expressing stored material or by slower involvement of genes that until then had been repressed. There is a dual determinism: to stop bleeding by microvessel obliteration induced by cellular transit, triggered by inflammation chemo-attraction. If these effects initially appear to be beneficial, they become deleterious in the course of ischemia.

##### a) Anti-thrombotic action

The anti-thrombotic and "fluidifying" action of endothelial cells is due to three types of properties which combine together:

*Vaso-regulating properties:* Microcirculation endothelium releases the vasomotor balance components: vaso-constricting endothelin on one hand and prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) and vaso-dilatory nitrite oxide (NO) on the other.

*Anti-thrombotic properties:* The endothelial cells are rich in a variety of antithrombotic properties. They express proteoglycans on their surface, including some negative-charge, sulfate glycoaminoaglycans (heparane-sulfate) and secrete plasminogen tissular activator (t-PA) and tissular factor inhibitor. One fundamental property of the endothelium in that area is the production and expression of a transmembrane protein: thrombomodulin, which is a thrombin receptor. The endothelium also exerts anticoagulant properties by other channels, such as the capture and degradation of thrombogenic substances (ADP, 5-HTP) and through the effect of active products on platelets.

*Anti-adhesion properties:* At non active state, endothelial cells little express adhesion receptors such as the Intercellular Adhesion Molecules 1 (ICAM 1), which are the main integrines linked, and express.

##### c) Thrombotic and adhesive action

During inflammation and vascular diseases in particular, the endothelial cell properties may be reversed and variations in local shear stresses may modify the secretion of vasomotor substances.

*Coagulating properties:* in this case thrombomodulin is down-regulated and no longer appears on the endothelium surface. In addition, the cells express tissular factor.

*Adhesion effects:* circulating cells can adhere to the endothelium in physiopathological conditions. Leucocytes adhesion manifests itself as several successive waves of receptors expression. The various mechanisms by which leucocytes adhere to the endothelium have been recently elucidated.

### 3.2. Rheological properties of endothelial cells

Given the interface situation of endothelial cells, knowing their mechanical properties is particularly relevant. If a number of studies have investigated the morphological modifications in flowing systems, few have been focussed on stress and deformation within the cell (intracellular stress and deformation). A recent study conducted *in vitro* with confocal microscopy, during induced deformations and monitoring the motion of internalized latex beads, has shown that endothelial cells behaved like an elastic isotropic material. Deformation however is less marked in the nucleus vicinity, indicating its greater rigidity. It was also shown that endothelial cells were motile in the direction of the flow, indifferently upstream or downstream. The explanation of that phenomenon is still hypothetical. Is it a passive or an active mechanism?

The morphology and the functions of endothelial cells are influenced by mechanical forces induced by blood flow. It has been shown that cell shape and the structure of actin network were linked to local shear stress. Similarly cultured endothelial cells which have a initial polygonal base, will be elongated and orientated in the direction of shear stress when they are exposed to a flow for several hours. This change is accompanied at the subcellular level, by a *remodeling* of cytoskeleton with preferential orientation of actin filaments (Fig. 2).

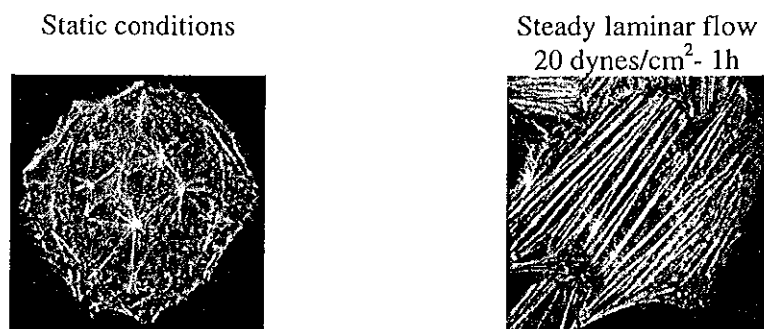


Fig.2. Distribution of E.C. stress fibers in static and in a shear flow (2 Pa).

There is little works on cell *remodeling* due to circonfereential stresses induced by the deformation of extracellular matrix during cardiac pulsation, even though endothelial cells *in vivo* are exposed simultaneously to the two kinds of forces.

### 3.3. Influence of local flow conditions on endothelial cellular responses

The influence of local hemodynamic conditions on endothelial cells (ECs) has raised increased interest over the recent years. The various studies on the subject have tried to clarify the physiology and modifications of EC during vascular diseases and to study the compatibility of vascular biomaterials. Endothelial cells react to hemodynamic forces by modifying their morphology, metabolism and adhesion properties. The metabolic changes mainly include increased prostacyclin synthesis, plasminogen tissular activator expression, differential regulation of adhesion molecule and proto-oncogene expression and ion transfer ( $K^+$ ,  $Ca^{++}$ ). Shear stress also stimulates endothelial cell proliferation and migration. It is also important to consider the condition of cells when the local flow conditions are modified. Indeed, it has been shown that confluent endothelial cells (forming a continuous monolayer) do not react in the same manner as isolated cells. One of the major differences



between endothelial cell behavior in vivo and in vitro is that in vitro the cell renewal rate is higher than in vivo. That rate is reduced when shear stress exceeds 3 Pa in laminar flow. Also, in vitro studies elicited many interactions between the two types of cells. Although the studies conducted were able to demonstrate the different types of cellular response to mechanical forces, the underlying mechanisms are far from being totally elucidated. Cells respond differently according to local shear stress and their responses are also conditioned by local and temporal variations of the flow (steady or periodic).

### 3.4. Mechano-transduction

The endothelial cell response to mechanical stimuli practically involves all the mechanisms linked to cellular growth and metabolism. Thus, ionic channels, sensitive to membrane stretching, adenylate cyclase, protein kinase C have their activity modified in response to mechanical stresses. According to some authors, surface mechano-receptors would exist, linked to the cytoskeleton. The cytoskeleton alterations induced by shear stress would disrupt cellular equilibrium and so modify the activity of receptors and trans-membrane channels. Also, the mechanism of gene expression of the molecules produced by the endothelial cell is involved in their functions (such as endothelin 1 (ET-1), plasminogen tissular activator, NO production, PDGF  $\gamma$  and  $\beta$ , growth factors, thrombomodulin (TB). Adhesion molecules are also influenced by flow. A model of the regulation steps of gene expression under stress was proposed by Malek et al. Stress would activate mechano-sensitive structures, including the cytoskeleton, adhesion foci, mechano-sensitive channels and thus would modify membrane receptor activity. This initial step is then applied to the second messengers like intracellular  $Ca^{++}$ , protein kinase C (PKC), cyclic AMP (cAMP), cyclic GMP, etc... which in turn are disrupted. Such deep changes in the balance of the secondary messengers will then alter the activation status of the DNA binding factors. The final step then amounts to alteration of the transcription of a number of genes through positive or negative local shear stress response elements (SSRE) or a combination of both, acting at various times.

Various types of response to mechanical stress have been described. They are restricted to specific sequences of the DNA chain. For instance, the GAGACC sequence controls the response of plasminogen tissular activator (t-PA), of NO synthetase, ICAM-1, etc.... These effects will produce time-dependent response of functional molecules synthesized by endothelial cells. So the endothelial cell response to the applied shear stress could be classified in three classes: 1. Type I: early and transient increase (c-fos, c-jun, c-myc, PDGF) - 2. Type II: continuous increase in mRNA expression (t-PA, NOS, ICAM1) - 3. Type III: two-phase regulation: increase followed by a continuous decrease until the 12<sup>th</sup> hour (ET-1, PDGF- $\beta$ , TM, VCAM1).

As a subject of many studies, the mechanisms of transduction of a mechanical signal into structural electrophysical, biochemical or genetical responses need to be better understood. In order to explain the directional characteristics of Ecs remodeling i.e. either parallel to shear stress, or perpendicular to extracellular matrix deformation, it's necessary to consider thoroughly the mechanical aspect of the signal transduction. In fact it's difficult to imagine that the sequence of physiological events induced by flow contains spatial information which could impose a privileged direction for depolymerization/polymerization of actin filaments. Some theoretical models suggest that some transmembrane structures could be directly brought to luminal membrane by shear stress and thus influence the distribution of actin filaments which are attached to them from the side of cytoplasma. In spite of their simplified representation of the dynamics of cytoskeleton interactions, these models provide some explications to the remodeling of Ecs under shear stress. In other respects the co-localization of receptors (i. e. ICAM-I) with actin fibers under shear stress can be considered.

*In conclusion characterizing the endothelium response to the local flow conditions and associated mechanisms (i. e. leucocyte adhesion) could lead to a better understanding of the pathogenesis of vascular diseases.*

## 4. Mechanotransduction: How?

One fundamental question which remains partially unanswered today is how the cells sense the mechanical stimuli and translate them into expression of receptors. We can underline that the capacity of cells to sense and to respond to physical forces is not limited to specialized sensory cell types with sensory structures but is exhibited by most cell types. Different hypotheses have been suggested to explain the phenomena of mechanotransduction, but none of them allows to explain all the experimental data obtained.

### 4.1. Electrokinetic charge

The cell's membrane have a net negative charge that attracts a layer of cations (double layer). Fluid motion along the surface results in a net movement of charges knowed as streaming potential. Some works have hypothesized that flow-induced response can be mediated by streaming potential.

### 4.2. Variation in the physics chemical environment

Fluid flow can increase the transport of compounds to and from the surface of the membrane. If these compounds are degraded at the cell surface, flow will result in an increase in their concentrations at the cell surface. In relation with this hypothesis acute response of ECs to flow and ATP can be given.

### 4.3. Membrane and cytoskeleton

Main attempts to locate potential mechanotransducers have focused on two parts of the cell: membrane and cytoskeleton, because forces act directly to the plasma membrane and that the force applied is transmitted to the cytoskeleton.

Different hypotheses can then be proposed:

- a) mechanically sensitive ion channels (i.e.: Stretching which increases the surface of EC, increased intercellular  $\text{Ca}^{++}$ ).
- b) activation of G-Proteins in mechanotransduction have been demonstrated by studies of responses of ECs and osteoblasts in presence of G-Protein inhibition (GPD-B-S and pertussis toxin). These results should be considered carefully because it is possible that G-protein activity is required for cell responses but does not mediate responses to mechanical stimuli. In fact direct measurement of G-protein activation is difficult and it is unclear whether G-proteins are mechanotransducers or whether they participate in the transduction cascade.
- c) cytoskeleton : As the main load bearing structure in cells, cytoskeleton is a potential location for mechanotransduction and it is demonstrated that forces applied to the surface of cells can be transmitted the cytoskeleton. But, as for G-proteins, it is unclear whether by the cytoskeleton is actual mechanotransducer or merely is a step in the transduction pathway.

*In conclusion many hypotheses can explain mechanotransduction but none is completely consistent with all of the experimental data. This may be because of the cells use different pathways for mechanotransduction further researches are then needed.*

*Given the numerous publications on this topics and the limited paper length no references are listed. However, the authors can give a list of publications to interested peoples.*

## ELECTROCHEMICAL PROPERTIES OF PLATELETS: CLINICAL AND PHARMACOLOGICAL APPLICATIONS

J.F. STOLTZ - S. MULLER - V. LABRADOR  
*Angiohématologie - Hémostase - équipe UMR CNRS 7563*  
*Faculté de Médecine - Brabois, 54500 Vandoeuvre Lès-Nancy,*  
*France*

### INTRODUCTION

Although it has been accepted that platelets take part in hemostasis and in arterial thrombosis formation, the physicochemical mechanisms of platelet adhesion and aggregation have still been clearly determined.

Under physiological conditions the platelet membrane has an overall negative charge, and it has been suggested that this charge may play a role in the adhesion and aggregation processes.<sup>1</sup> The use of electrophoretic mobility measurements of cells allows to characterize biological cells and pathological states<sup>2,3</sup>. After a reminder about the use of liquid phase electrophoresis techniques for studying platelet membrane ionized or ionizable groups, we shall consider the importance of surface charge in aggregation phenomena and the possible connections with membrane groups. Participation of these electrochemical phenomena in various pathological states will also be considered.

### IONIZED AND IONIZABLE GROUPS OF PLATELET MEMBRANE

#### *Introduction*

Under physiological conditions blood platelets possess a net negative surface charge<sup>1-4</sup>. The electrokinetic charge of the peripheral or surface region of a platelet may be estimated from its zeta potential by the use of the Gouy Chapman theory<sup>9</sup>. This theory assumes that the membrane acquires a surface charge and that this results in a difference in potential between the surface and the solution. Under physiological conditions only those charge groups within about 8 Å of the surface of the platelet will contribute to a significant extent to the electrophoretic properties. An increase in the electrolyte concentration leads to a compacting of the diffuse double layer<sup>9</sup>.

Under appropriate conditions electrophoretic mobility measurements will yield information about the net electrokinetic charge of the peripheral zone of the cells<sup>7</sup>. But such measurements afford no direct indication about any heterogeneity which may exist in the distribution of this charge in various parts of the periphery since the model upon which the equations for the calculations of the charge density are based assumes an uniform charge distribution.

The electrophoretic mobility of blood platelets varies with the composition, ionic strength, and pH of the suspending medium<sup>10</sup> and is subjected to strong biological controls<sup>11</sup>. The ionization characteristics of fixed surface groups may be examined by the use of pH versus mobility relationship at a fixed ionic strength.

Starlinger *et al.* have estimated that the cell's isoelectric point is situated between 4.7 and 5.4<sup>9</sup>. Ross has suggested a value of 4.0<sup>12</sup>. The problem has been clarified by Kirschmann *et al.* who have shown that the isoelectric point is situated between 4.5 and 4.75 and that mobility becomes positive below this value and is stabilized at a value of 1.1  $\mu\text{s}/\text{V}/\text{cm}$  as soon as the pH reaches 3.5<sup>13</sup>. It should also be noted that the mobility-pH curve which Kirschmann<sup>13</sup> obtained for platelets is very different from the curve usually obtained for erythrocytes. This difference in behavior may be taken as an indication that, unlike erythrocytes in whose surface phospholipids are predominant, the surface of thrombocytes is probably mainly protein in nature. If various buffer solutions used are isotonic they may differ in ionic strength. As ionic strength has a marked influence on mobility, the variations observed do not depend on pH alone. In order to obtain more data it is possible to carry out mobility measurements at different values of ionic strengths. Under the circumstances, the shape of the mobility-pH curve resembles those of the buffered solutions obtained by Kirschmann and the run is similar to that of an acidic protein with an isoelectric point between 4.4 and 4.7.

A comparison of the different results that have been obtained on the isoelectric point is difficult because of the variety of the conditions under the studies were made. Moreover, plasma constituent adsorption may influence mobility and the relation between mobility and pH. Ross *et al.* have shown that pH is significantly altered by serum proteins and hemoglobin.<sup>12</sup> The work conducted by Seaman<sup>7</sup> has shown that the pH is also modified by blocking or cleavage in certain groups. Seaman found a pH value of 3.6 on nontreated platelets, whereas on acetaldehyde-modified platelets the pH drops to 1.9 and after sialic acid cleavage by neuraminidase is in the region of 4.3.

The influence of ionic strength on electrophoretic mobility at constant pH is represented in FIG. 1 and reveals a two-phased variation : an increase for weak ionic strengths and a decrease for ionic strengths of over 0.005. At salt concentrations lower than 0.0045 M a drop in mobility is observed. This drop can be interpreted as a « surface coagulation » of the membrane proteins leading to a decrease in surface charge<sup>13</sup>.

### *Distribution of the Platelet Surface Groups*

Using liquid phase electrophoresis or physicochemical methods the existence of carboxyl, amino, sulfhydryl, and phosphate groups on platelet

membrane has been demonstrated. However, as shown in the following paragraphs, although the contribution of each type of groups appears to be well quantified, numerous unknown quantities still remain.

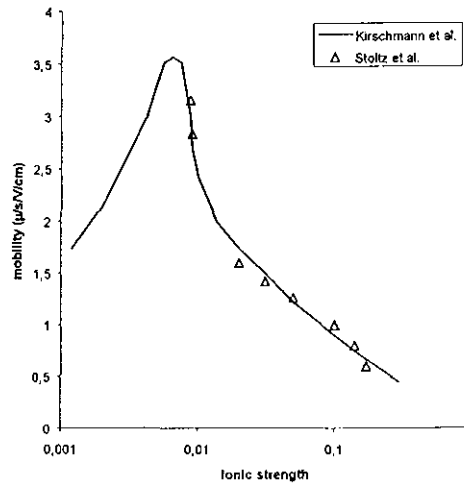


FIGURE 1. Effect of ionic strength on the electrophoretic mobility of human blood platelets (after Stoltz<sup>9</sup>)

### *Carboxyl Groups*

*Methods.* Sialosubstances (glycolipid or glycoprotein) are an important characteristic of biological membranes. Therefore sialic acid is an important component of the surface of various animals cells. Evidence of the existence of the carboxyl groups on cell membranes can be demonstrated in two ways :

- (1) In a global way by their esterification ; but no distinction between the carboxyl groups of the residues of *N*-acetylneuraminic acid and the carboxyl groups of the residues of the dicarboxylic amino acids (such as aspartic and glutamic acids) can be singled out.
- (2) By determination of the carboxyl groups of *N*-acetylneuraminic acid, after its release from the membrane either by acid or by enzymatic hydrolysis.

*Total carboxyl groups.* Several reagents have been used in order to modify the carboxyl groups. However, they were not hydrosoluble and the reaction was often not quantitative. A technique involving an initial activation of the acid groups by a hydrosoluble carbodiimide, followed by the action of a nucleophilic molecule, presents an important advantage. This procedure, is indeed, quantitative and the reaction takes place in good conditions. Its mechanism has been described by Hoare and Koshland. In our studies, we have used 1-ethyl-3-dimethyl-aminopropyl-carbodiimide- (EDC) and the chlorohydrate of glycine methyl ester as nucleophilic reagent. The modification by amidification of electronegative carboxyl groups will imply, as a theoretical consequence, a decrease in the surface charge<sup>14</sup>.

*Enzyme-treated cells.* Release of sialic acid by neuraminidase is associated with a reduction of negative surface charge density.

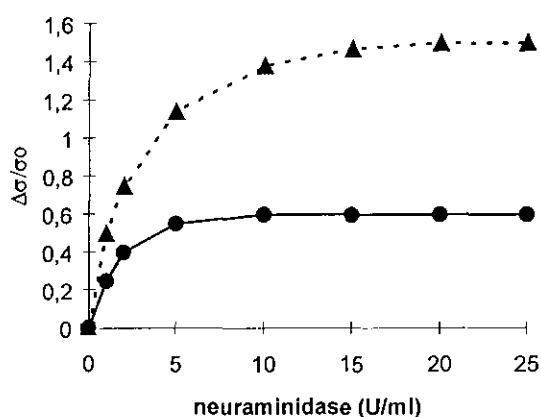


FIGURE 2. Relative variations of electrokinetic charge in relation to EDC (1/40) (●) and neuraminidase (▲) (after Stoltz and Nicolas<sup>14</sup>).

*Carboxyl Groups of the Platelet Membrane.* The influence of EDC on the platelet charge reveals a very significant decrease in charge with the reactive concentration, resulting in the cancelation and inversion of charge (FIG. 2). Using these results, the total number of carboxyl groups on the platelet membrane can be calculated. The results of our own investigations give a total of  $24.7 \pm 2 \times 10^5$  per cell<sup>14</sup>.

Concurrently, the influence of neuraminidase on the platelet charge makes it possible to distinguish the carboxyl groups of sialic acid (FIG. 2). In our experiments the maximum variation of charge observed is nearly 60-65 %, which corresponds to a calculated number of enzyme - sensitive groups varying from  $9.9$  to  $10.7 \times 10^5$  per cell. This number represents 42% of the total carboxyl groups of the membrane. This proportion of carboxyl groups, corresponding to sialic acid, is in the same range as

that previously found by Seaman ( $8.6 \times 10^5$ ) and Madoff et al.<sup>15</sup> ( $9.5 \times 10^5$ ). The only difference is the value of the final level of electrophoretic mobility. As a matter of fact, we observe a decrease of 60-65 % of the mobility

where Bray obtains 44.5 % and Grøttum 47 %. However, these authors use a medium with a lower ionic strength (equal to 0.072). On the other hand, Seaman, working at an ionic strength of 0.145, observes a decrease of 53 %. But, as the value of the sialic acid released is low, the use of an insufficient concentration of neuraminidase can be assumed.

If we represent the variations of the relative surface charge in relation to the released sialic acid, assayed by chemical procedures, we can observe two distinct phases :

- (1) The first step is a release of sialic acid with a parallel variation of cell surface charge. This phase terminates after a release of about 60 % leading to a variation of charge of nearly 60-65 %.
- (2) An additional release of 15 % of sialic acid without any influence on the charge<sup>9</sup>

All the works concerning enzymatic hydrolysis by neuraminidase are in agreement with the fact that the enzymatic hydrolysis never releases the total sialic acid of the platelet. Bray *et al*<sup>15</sup>, using the same conditions as those in the experiments of Madoff et al.<sup>15</sup> obtain a maximum release of nearly 80 %. Jamieson et al. find a release of sialic acid of 74 %. Our experiments seem to confirm these data, as we also obtain a result of nearly 80 %.

In an attempt to clarify these results, several hypotheses may be suggested. The first possibility is that all the links in which sialic acid is involved are not split up by the enzyme, either because sialic acid is linked with some lipids, or because substitutes, other than the acetyl radical, block the hydrolysis of the cetonic link. Another possibility is that the full amount of sialic acid is not exclusively situated on the platelet surface. A study by Hagen, confirmed by Greenberg, seems to support this hypothesis and shows that 20 % of the sialic acid can be released from the platelet granules by the action of thrombin. Several hypotheses can be suggested in an attempt to elucidate the absence of correlation between the decrease of the electrokinetic charge and the level of sialic acid after the cation of neuraminidase ; (1) modification of the pH of the groups dissociated on the shear surface ; (2) modification of the dielectric constant near the membrane ; (3) appearance on the membrane surface of anionic groups situated inside the membrane, or migration of positive groups ; (4) change of the membrane thickness ; and (5) modification of the curvature of the cell membrane. All these modifications would lead to a stabilizing of the electrokinetic potential of the platelet surface. Seaman and Vassar<sup>26</sup> suggest the same hypotheses, and note that not taking the Haydon coefficient into consideration would lead to a minimizing of the value of the platelet charge. Further, as in the case of erythrocytes, there is a possibility that enzyme adsorption occurs on the cell surface.

The studies carried out reveal the existence of  $14.4 \times 10^5$  nonidentified carboxyl groups as a result of carbodiimide action. Mehrishi<sup>6</sup> has only found a total of  $6.5 \times 10^5$ . We might, in this case, question the specific character of the reactive (carbodiimide). It is therefore extremely important in future research to define the nature of these unknown groups, which represent over half the total number of carboxyl groups.

More recently, Crook et al.<sup>16</sup> are shown that human platelets can be separated into subpopulation which had different electrophoretic mobilities according to their total sialic acid amount. Moreover, the sialic enriched platelet subpopulation had more alpha 2-adrenoreceptors than the less electrophoretically mobile platelets.

### *Phosphate Groups*

*Methods.* Two different reagents can be used: alkaline phosphatase (susceptible phosphate groups) and a chemical substance of the pyridil-aldoxime groups, pralidoxime, which has the property of combining specifically with phosphate groups which induces a decrease of the surface charge. In a parallel way, phosphorous level released after action of the phosphatase can be estimated a colorimetric method.

*Phosphate Groups of the Platelet Membrane.* Using an alkaline phosphatase, the presence of  $3 \times 10^5$  to  $8 \times 10^5$  phosphate groups per cell can be revealed with electrophoresis techniques.<sup>12</sup> These results are in full agreement with the results obtained by Mehrishi<sup>18</sup> ( $5 \times 10^5$  to  $10^6$  groups per cell). When pralidoxime is used, the total number of phosphate groups is estimated to be between  $1 \times 10^5$  and  $6 \times 10^5$ , which is slightly lower than the results obtained by enzyme cleavage<sup>19</sup>. By proceeding with quantity determination of the phosphorous released by the enzyme reaction, we have obtained, using chemical procedures, a number of phosphate groups much higher ( $1.3$  to  $1.6 \times 10^5$  per cell). This important difference between the number of groups shown by electrophoresis and chemical determination is not easy to explain. We can suggest that for high doses of enzyme there is a deep scraping on the layers containing phosphorus. In an other way, the calculation of the groups by the electrophoretic method supposes that after enzymatic action the departure on one electron corresponds to one phosphate group. Such a hypothesis is true only when the group is completely ionized in the medium, which is certainly only an approximation. The number of sites thus determined would be less than the total number of actual groups. Finally the disappearance of negative charges by enzyme action may be concealed by the appearance of positive charges in underlying layers.

### *Sulphydryl Groups*

*Methods.* The presence of sulphydryl groups on many cell surfaces has been suggested by many authors. However, numerous difficulties have arisen when using



the sulfhydryl blocking agents. Generally, the sulfhydryl groups can be determined using two different classes of molecules ; (1) Molecules with S-S bridge, which allow spectrophotometric assays ; and (2) Blockade of the sulfhydryl groups by mercurial compounds, which can be followed by a radioisotopic count (PCMB14C) or by atomic Adsorption spectrometry of mercury (PCMBS).

The determination of sulfhydryl groups by means of cell electrophoresis can be investigated only in the case of molecules introducing a carboxyl group on to the cellular surface.

It seems that the titration of surface DTNB-reactive sulphhydryl (-SH) groups revealed an inverse relationship between electronegativity and membrane -SH group status. This electrophoretic expression of subpopulation heterogeneity within the circulating platelet pool may have advantages in studying clinical conditions<sup>21</sup>.

*Mode of action of molecules with S-S bridge.* The general mechanism of action of these molecules consists in an exchange between the sulfhydryl group of membranes and the disulfide group of the chemical reagent. This results in the release of an anion which can be determined quantitatively by its U.V. or visible adsorption. Among the molecules corresponding to this type of action are dithio 5.5' bis (nitro-2-benzoic) acid (DTNB), dithio 2.2 pyridine (2-DPS), and dithio 6.6' dinicotinic acid (CPDS).

*Mode of action of mercurial compounds.* In this second group of substances, we can use parachloromercuribenzoic (PCMB) and parachloromercuribenzene sulfonic acid (PCMBS). The reaction of these compounds with the sulfhydryl group introduces an acid group instead of the sulfhydryl group. This leads to an increase of the negative charge of the cells. The assay of the fixed molecule will be carried out by liquid scintillation in the case of PCMB labelled with <sup>14</sup>C, and by atomic Adsorption in the case of PCMBS.

*Sulfhydryl Groups of the Platelet Membrane.* By treating the platelets with PCMBS we were able to estimate the number of SH platelet groups at  $3.1 \times 10^5$  per cell, whereas CPDS treatment gave a total of  $2.66 \times 10^5$  groups<sup>8</sup>. These results agree with the figures given by Mehrishi *et al.* who obtained a total of  $2.75 \times 10^5$  groups per cell using CPDS<sup>21</sup>. The use of parachloro-mercuribenzene-sulfonic acid leads to a result slightly higher. This might be due to a more complete ionization of the added carboxyl group at pH 7.

It is possible, using certain reactives, to estimate the SH groups by means of physicochemical procedures. Investigations using different specific reactives gave the following results :  $0.63 \pm 0.15 \times 10^8$  groups with DTNB ;  $2.6 \pm 0.3 \times 10^8$  groups with 2-DPS ; and  $1.0 \pm 0.2 \times 10^8$  groups with CPDS. The differences observed can be easily explained by the penetration kinetics of these reactives in the cell, particularly in the case of 2-PDS which is not charged and is more liposoluble. The other two reactives introduce a carboxyl group which makes penetration more difficult. These results are in agreement with the figures obtained by Fantl who found  $6 \times 10^7$  groups using mercurial compounds. It should be noted that when mercurial compounds are used, fewer groups are usually found ( $4.9$  to  $7.4 \times 10^7$  for Ando *et*

a/). This fact can be explained by the lower reactivity of these molecules and by their low capacity of intracellular penetration.

### *Amino Groups*

*Methods.* Of the possible basic groups present in the cell periphery, we can list the side-chain amino groups of lysine and hydroxylysine, terminal protein, amino groups of arginine, and phospholipid and glycolipid amines. The study of amino groups may be carried out by the action of different aldehydes and acid anhydrides, but most of the reagents used for the detection of positively charged amino groups are not specific. Particularly, TNBS reacts with amino and SH groups.

*Aldehydes.* The reagents generally used are acetaldehyde and glutaraldehyde. The latter is a dialdehyde with a rapid reaction velocity and it has little effect on cellular structures. The action of these two aldehydes increases the overall negative charge of cells associated with disappearance of positive amino groups.

*Acid anhydrides.* It can also be use the action of acetic anhydride. Its power has been compared with that of the corresponding aldehyde, and with that of citraconic anhydride which, in contrast to the preceding, is a diacid anhydride with a well known specificity for amino groups.

*Trinitro 2-4-6 benzenesulfonic acid (TNBS).* The mode of action of TNBS on amino groups is relatively complex, but the substance induces an increase of the negative charge. For chemical assays, Field's method can be used.

*Amino Groups of the Platelet Membrane.* As far as acetaldehyde is concerned, Seaman obtained a variation of charge of 20 % and a number of groups equal to  $3.5 \times 10^5$ .<sup>7-9, 12-22</sup> These data are close to our ones with different reagents<sup>23</sup>. In all cases, increase in electrophoretic mobility is observed.

The number of groups calculated for the limit values of extrapolated electrophoretic mobility ( $1.86$  to  $3.94 \times 10^5$  per cell) reveals a total number of amino groups in the region of the figures obtained by Seaman. Mehrishi also obtained similar results with acid anhydrides  $2.86$  to  $2.57 \times 10^5$  groups per cell). When comparing the reactivities effectiveness for inducing a 10 % variation in charge, it appears that TNBS is by far the most active compound. Further, with this reactive using chemical procedures it is possible to estimate the number of  $\text{NH}_2$  groups ( $1.65$  to  $3.6 \times 10^8$  per cell according to our results).

### *Platelet Surface Groups (Molecular Mosaic)*

In conclusion, a repartition of the platelet charge and mean inter-group ranges may therefore be proposed<sup>9</sup> (cf. Table 1).

All the carboxyl groups provide evidence for the absence of knowledge concerning positive groups. In fact, only a quarter of the apparent positive groups are identified. The number of groups determined by chemical or isotopic methods is

always higher than that obtained with electrophoresis. This may be explained by the fact that cell electrophoresis only makes it possible to determine the outer groups of the membrane, those situated on the shear surface. In consequence buried inactive groups could be chemically modified and taken into account by chemical assays. Moreover, the fact that the number of groups obtained by these two procedures are not directly related, provides evidence for a difference of localization on or in the membrane. The origin of the platelet charge appears therefore to be complex, contrary to that of the red cells, whose only ionized groups actually determined are carboxyl groups.

#### SURFACE CHARGE AND PLATELET AGGREGATION

##### *Influence of ADP, ATP, Noradrenalin and 5HT on Platelet Electrophoretic Mobility*

ADP is well known for its use as an aggregating agent and provides a means of assessing the platelets aggregating capacity. At low concentration the aggregation induced by ADP is reversible and depends on the presence in the medium of calcium and certain plasma proteins. At high concentrations, release reactions appear, with endogenous ADP release, producing irreversible aggregation. The action of ADP on platelet electrophoretic mobility reveals maximum variations in this parameter after 10 minutes' incubation and a return to normal value after approximately 1 hour<sup>24-28</sup> (Fig. 3).

If the relative mean variations of electrophoretic mobility are represented as a function of the dose of ADP, an increase in mean variations in normal subjects is observed at doses of ADP below approximately 0.1  $\mu\text{g/ml}$  and a decrease in mobility is observed at doses of aggregating agent above 0.1  $\mu\text{g/ml}$ <sup>24-25</sup>.

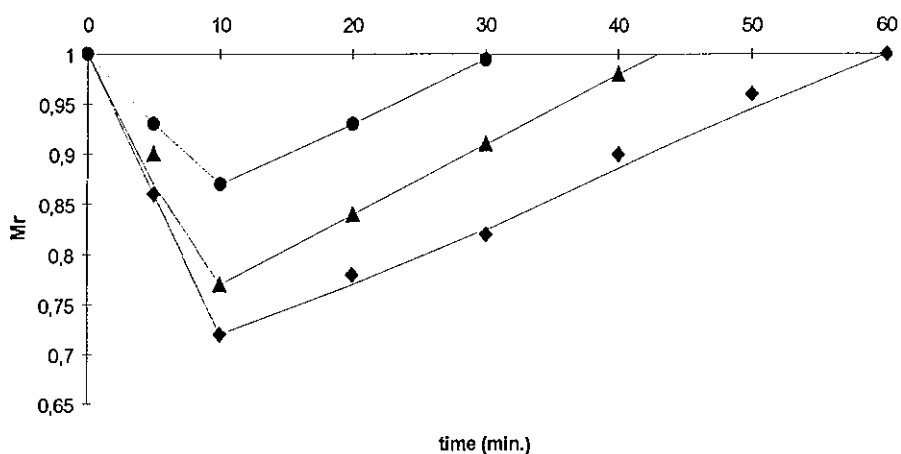


FIGURE 3. Time dependence of the decrease in electrophoretic mobility of platelets in citrated plasma after addition of ADP (● 1µg/ml, ■ 5µg/ml, ◆ 10µg/ml).

This particular sensitivity to ADP was found by Hampton *et al.* in 101 subjects out of a total normal population of 104<sup>25</sup>. Only 3 subjects in this population revealed abnormal sensitivity to 0.005 µg/ml of aggregating agent. It should be noted that although the decrease in charge at high concentrations of ADP has been confirmed by the work published by Grøttum,<sup>23</sup> Seaman *et al.*<sup>24</sup> and by our own work<sup>27-31</sup> (FIG. 4), but the increase in electrophoretic mobility observed at low concentrations remains open to discussion. This point is worth studying in greater detail because of the potential clinical implications of the result.

ATP also induces a biphasic action on platelet electrophoretic mobility<sup>25</sup>. However, the maximum variations observed appear after 20 minutes of incubation and the maximum mobility increase is observed appear after 20 minutes of incubation and the maximum mobility increase is observed at a dose of 0.5 µg/ml of ATP. In parallel with ADP, the study on noradrenalin at the same concentrations reveals similar action to that of ADP, with an increase at low doses and a decrease at high doses of aggregating agent (above 0.1 µg/ml). It should finally be noted that if two doses of ADP are added to normal platelets at an hour's interval, the same mobility change is induced<sup>25</sup>.

TABLE 1  
PLATELET SURFACE MOLECULAR MOSAIC (DETERMINED BY CELL ELECTROPHORESIS) <sup>a</sup>

Groups	Number per Cell (x 10 <sup>5</sup> )	Mean Surface for One Group (A <sup>2</sup> x 10 <sup>2</sup> )	Average Distance between Neighboring Groups (Å)	References
Carboxyl groups	24,7	11,8	34	Stoltz
Unidentified anigenic groups	14,4 6,53	20 -	45 -	Stoltz Mehrishi
Carboxyl groups (Neuraminidase susceptible)	10,3 9,5 8,9	28 29,8 32	53 55 56	Stoltz & Nicolas Madoff, Ebbe et al. Seaman
SH groups	3 (2,7-3,1) 2,75	94 103	97 -	Stoltz Mehrishi & Grassetti
Phosphate groups (alkaline phosphatase susceptible)	5 (3-8) 5	56 56	75 75	Stoltz Mehrishi
Phosphate groups (Pralidoxime)	7,5 (5-10)	-	-	Stoltz & Nicolas
Positively charged amino-groups	3 (1,9-3,9) 2,42	94 117	97 108	Stoltz Mehrishi
Unidentified positively charged groups	9,5	30	55	Stoltz & Nicolas

<sup>a</sup> After Stoltz<sup>7</sup>

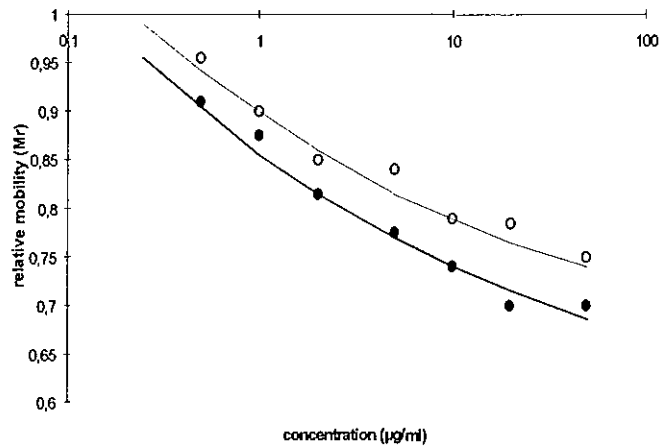


FIGURE 4. Effect of ADP and noradrenaline on the electrophoretic mobility of human blood platelets in citrated plasma (● ADP, ○ noradrenaline).

The increase in mobility observed by various authors as well as in our own initial experiments is paradoxical and cannot be accounted for satisfactorily just by ADP adsorption on the platelet's membrane, as suggested by Hampton *et al.*<sup>25</sup>. Indeed, at concentrations below  $10^{-4}$ M, ADP has no influence on electrophoretic mobility of platelets washed in standard calcium-free saline. Moreover, certain authors (Salzman *et al.*) have observed that platelets do not fix ADP labeled with  $^{32}$ P, but incorporate them only after dephosphorilation. In contrast, noradrenalin, which is positively charged, produces the same effect as ADP. This paradoxical result could be explained by the following hypothesis: Noradrenalin could act on the platelet charge through endogenous ADP secretion. At low noradrenalin concentrations, endogenous ADP would be absorbed on the platelet surface. With regard to high concentrations, calcium adsorption only occurs, however, when there is a particular spatial arrangement of ADP molecules on the platelet surface.

As concerns 5HT, this agent up to a concentration of  $2 \cdot 10^{-4}$ M does not affect the mobility of human blood platelet in citrated plasma but does exert a synergistic effect when used in conjunction with ADP<sup>29</sup>. It has been found that  $2 \cdot 10^{-6}$ M of 5HT in conjunction with the same concentration of ADP is equivalent in action on the surface charge to  $10^{-5}$ M ADP alone. The effect of 5HT may arise from its stimulation of release of ADP from the platelets.

#### *Influence of Collagen and Thrombin on Platelet Electrophoretic Mobility*

As for ADP and noradrenalin, thrombin and collagen also have a biphasic action on platelet electrophoretic mobility. Maximum variations are observed after the aggregating agent has been incubated for 10 minutes. However, we were not able

to observe the biphasic effect in our own experiments. As for noradrenalin, it might be possible to explain the biphasic actions via the intermediary of endogenous ADP release.

It should finally be noted that the electrophoretic response and platelet aggregability to these aggregating agents appears to be dependent on the time that elapses between sampling and measuring. Time intervals over 90 minutes are apt to change the cell's response capacity quite significantly (Mason *et al.*).

### *Role of Platelet Membrane Ionized or Ionizable Groups in the Response to Aggregating Agents and in Thrombus Formation*

#### *Tests for Interpreting Response Curves to Aggregating Agents : Importance of Membrane Groups*

In an attempt to interpret the biphasic variations of platelet sensitivity to aggregating agents, Hampton *et al.*<sup>32</sup> studied the influence of specific substances on platelet response :

- *n*-ethylmaleimide and *p*-hydroxymercuribenzoate, which are nonspecific membrane groups blockers ;
- potassium cyanide, which inhibits oxidase cytochromes ;
- sodium fluoride, which is a phosphopyruvate synthesis inhibitor ;
- sodium monofluoroacetate, which is an inhibitor of both aconitasis and the tricarboxylic cycle.

Their works revealed that in the presence of NEM at  $10^{-4}$ M platelet mobility returns to normal value after 10 minutes instead of 30 minutes and that at concentrations of  $10^{-3}$ M, NEM entirely suppresses the increase and decrease in mobility induced by thrombin and collagen. *p*-Hydroxymercuribenzoate has an action similar to that of NEM. At a final concentration of  $10^{-3}$ M it abolished both the increase and decrease in mobility induced by ADP, ATP, noradrenalin, thrombin and collagen, whereas cysteine at an equimolar concentration prevents this effect. As is the case for NEM, it quickly reverses the effects of noradrenalin when it is added 9 minutes later.

Monofluoroacetate (MFA) and monofluorocitrate (MFC) have similar effects. They do not modify the biphasic change in mobility induced by ADP and ATP. Moreover, although MFA and MFC have very little effect on the decrease in mobility induced by high noradrenalin, thrombin, and collagen concentrations. The increase was suppressed by adding 1.0 mg/ml of MFA and MFC. Mobility was reduced with 0.1 mg/ml of MFA and MFC and the addition of 0.001 mg/ml had no effect whatsoever. Moreover,  $1.5 \cdot 10^{-3}$ M of potassium cyanide and  $2.510^{-4}$ M of

sodium fluoride had no effect on the biphasic change in mobility induced by ADP, ATP, noradrenalin, thrombin and collagen.

ADP can be removed by the enzyme pyruvate kinase (PK) according to the following reaction :



Reaction equilibrium encourages the production of ATP.

Hampton et al.<sup>32</sup> then showed that 0.005 mg/ml of PEP and 0.1 mg/ml of PK taken separately or together have no effect on platelet mobility after contact. In contrast, the addition of aggregating agents shows that the increase and decrease in mobility induced by ADP is suppressed by this enzymatic system. The effect persists even at concentrations as low as 0.001 mg/ml (PK) and 0.0005 µg/ml (PEP). Moreover, if this enzymatic system is added 9 minutes after ADP, platelet mobility measured 1 minute later reveals the usual change, but it does not last as long as usual.

It can therefore be assumed that this enzymatic system (PK-PEP) is capable of preventing changes in mobility, but not of inverting changes that are already in progress. In this respect it differs from non specific blockers such as NEM. Moreover, this enzymatic system has no action on the change in mobility produced by noradrenalin, thrombin and collagen.

To conclude it can be stated that ADP, noradrenalin, and thrombin are liable to produce a biphasic change in platelet electrophoretic mobility :

- at low concentrations they increase mobility,
- at high concentrations they decrease mobility.

Moreover, positively charged noradrenalin produces the same effect as negatively charged ADP. In this case, noradrenalin would appear to act through endogenous ADP release. The same would be true for thrombin and collagen. By studying the influence of inhibiting agents on platelet charge, it is partly possible to elucidate the mechanisms involved. One of the mechanisms is apparently direct and related to the action of exogenous ADP, and the other appears to be indirect and occurs after ADP release.

Exogenous ADP is absorbed on the platelet surface in the presence of calcium and requires membrane groups to be present. It is destroyed before adsorption by pyruvate kinase.

The other aggregating substances (noradrenalin, thrombin, and collagen) act by endogenous ADP release and the phenomenon is not suppressed by pyruvate kinase.

### *SH Groups and Aggregation*

We have seen that SH platelet groups could be revealed by means of reagents forming disulfide bridges. It is fully conceivable that disulfide bridges can, under specific aggregating conditions, form between platelets and this could be one of the parameters involved during non specific adhesion or aggregation reaction<sup>33</sup>.



### *Phosphate groups and aggregation.*

Alkaline phosphatase reduces platelet charge by removal of phosphate groups. However, if noradrenalin or adrenalin are injected in animals, they produce an increase in circulating alkaline phosphatase. An identical result is obtained during experimental stress in animals. It can therefore be assumed that following stress, the rapid production of catecholamine may lead to alkaline phosphatase release. Which by reducing platelet charge, encourages aggregate formation.

Moreover, according to Mehrishi, platelet aggregation by divalent cations ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ) results from interaction with phosphate groups<sup>33</sup>.

### *Sialic acid carboxylic groups.*

Total platelet sialic acid content and surface neuraminidase-labile sialic acid correlated positively with electronegativity<sup>34</sup>. Results obtained by Boisseau *et al.*<sup>35</sup> reveal an increase in platelet electrophoretic mobility in the region of 10 % when ADP is added to platelets at the concentration of 2  $\mu\text{M}$ . According to these authors the alteration, which occurs during the change in connection with sialic acid that is liable to be released by neuraminidase. Otherwise, total platelet sialic acid content seem to be depending of the pression of  $\text{CO}_2$ <sup>36</sup>.

### *Charged Polymers and Platelet Surface Charge*

Dextran DEAE and polybrene, which are positively charged polymers, both induce a decrease in platelet mobility<sup>37</sup>. Their action is not related to incubation time. The decrease in mobility is observed whatever the dose applied and increases when the dose is increased. Concentrations that produce a decrease of 15 to 20 % produce platelet aggregation. This aggregation is not inhibited either by ADPase or by EDTA<sup>35</sup>. It would therefore appear that ADP and divalent ions such as  $\text{Ca}^{++}$  and  $\text{Mg}^{++}$  play no part in the action mechanisms. The effect of other poly-electrolytes was studied by Kirschmann *et al.*<sup>38</sup>. and we too have studied this factor. Poly-L-Lysine and Poly-L-ornithine have been found to decrease platelet mobility, produce aggregation and inhibit serotonin incorporation.

Dextran 70 also involved a polymer depletion layer. Depletion from the platelet surface apparently became smaller with decreasing ionic strength. This indicated a more complex pattern of interaction of dextran with the platelet surface than with the RBC surface. It seems that ionic strength-dependent penetration into the hairy layer is more likely than ionic strength dependent adsorption changes<sup>39</sup>.

Dextran sulfate at certain doses produces the same effects as dextran DEAE and polybrene. In this case there is probably formation of a dextran  $\text{Ca}^{++}$  or  $\text{Mg}^{++}$  complex adsorbed on the platelet surface producing a reduction in charge density.

This action, in contrast to that observed in polybases, is inhibited by EDTA. When dextran sulfate is studied at higher doses, it produces an increase in electrophoretic mobility and does not induce aggregation. Polyinosidic-polycytidilic acid (Poly IC) gives rise to similar phenomena. Sodium polyanetholsulfonate (Liquoid<sup>TM</sup>), in a plasma medium, has a biphasic action on platelet charge<sup>31-40</sup>: low doses produce a decrease in mobility with massive aggregation, and high doses increase mobility (FIG. 5). These effects are inhibited by EDTA, but not by ADPase which would allow us to assume that  $\text{Ca}^{++}$  ions intervene in the mode of action. Indeed, it is possible that, to start with, a complex formed by Liquoid and bivalent ions is adsorbed on the platelets with a correlative decrease in mobility, then, since  $\text{Ca}^{++}$  ions are lacking, the electronegative polymer adsorbs on its own, thus creating an increase in mobility<sup>1,31</sup>. This hypothesis can be checked by studying a calcium-free medium and thus only an increase of mobility is observed (FIG. 5).

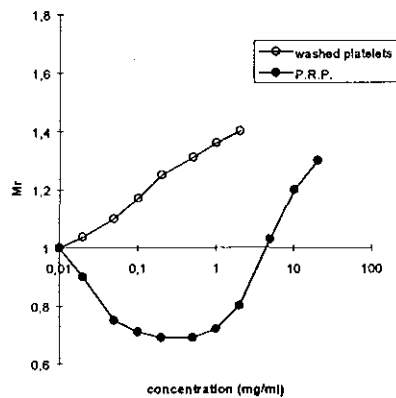


FIGURE 5. Electrophoretic mobility of platelets after addition of sodium polyanethol sulfonate. (personal results).

## ELECTROKINETICS AND DISEASES

### *Electrophoretic Mobility and Thrombasthenia*

Since electrophoresis provides a means of approaching the nature of the cell surface, there have, of course, been numerous studies on platelet surface charge during congenital disorders.

In the case of Von Willebrand thrombasthenia, for example, Zucker *et al.* were unable to reveal any difference in seven patients, either in the electrophoretic mobility value or in the isoelectric point value<sup>41</sup>. We ourselves have confirmed this result in two patients. However, Coller and Muraki *et al.*<sup>42</sup> have shown that ristocetin

reduced platelet charge at doses of 0.5 and 1 mg/ml, but no change was observed when normal platelets were suspended in plasma taken from a patient with Von Willebrand's disease. According to this result, which should be confirmed and studied in further detail, it might be assumed that positively charged ristocetin is adsorbed on the platelet membrane by forming a complex with the Von Willebrand factor. In the case of platelets suspended in Von Willebrand disease plasma, adsorption is impossible, thus explaining why platelets affected by this disease do not aggregate in the presence of ristocetin.

Research has also been undertaken on Glanzmann's thrombasthenia with regard to the molecular origin of this disease. We have, for example, been able to reveal a decrease in platelet electrophoretic mobility in three patients suffering from this disease as well as a modified response to ADP<sup>43,44</sup>. The origin of this drop in surface charge is fairly ambiguous, although certain authors have found a decrease in total platelet sialic acid. This observation has been confirmed in our patients<sup>43</sup>. Other hypotheses can, however, be considered: abnormal distribution of ionized membrane groups, change of ADP receptor sites, enzymatic mechanism disturbances, absence of certain membrane proteins.

It should also be mentioned that in three cases of giant platelet thrombocytopenia, Grøttum *et al.* also observed a decrease in electrophoretic mobility and sialic acid content<sup>45</sup>.

#### *Surface Charge in Thrombotic Diseases*

Because electrokinetic phenomena participate to the maintaining the physicochemical stability of suspensions, numerous studies have been carried out on the electrophoretic mobility of platelets during thrombosis states.

#### *Myocardial Infarction and Thrombosis*

Myocardial infarction and massive, recent arterial thrombosis are the diseases that most frequently reveal a change in electrophoretic mobility<sup>46-48</sup>. However, the subsequent change in mobility over a period of time is not easy to follow because patients are administered anticoagulant treatment which is apt to affect mobility and restore it to normal values. This fact may help to explain the negative results reported by Karppinen *et al.* The decrease in electrophoretic mobility appears to coincide with increased platelet aggregability. Moreover, Hampton *et al.* have observed that sensitivity to ADP response in a group of 34 patients suffering from myocardial infarction was altered as compared with controls<sup>47</sup>. Accordingly, the maximum mobility observed dropped from 0.05  $\mu\text{g/ml}$  in the control group to 0.005  $\mu\text{g/ml}$  in the group of patients. Identical effects were observed with noradrenalin. These results were confirmed by Turpie *et al.*<sup>48</sup>, who

observed the biphasic action of ADP and noradrenalin and confirmed the increase in platelet sensitization in patients suffering from acute cardiovascular diseases.

### *Cardiovascular Risk Factors*

Within the scope of their research on platelet sensitivity to aggregating agents in cardiovascular pathologies, Hampton *et al.* studied a group of seven hyperlipoproteinemia patients (six cases of type II and one case of type IV hyperlipoproteinemia). They observed that, as in the case of clinically diagnosed coronary artery disease, these patients' platelets had an abnormal biphasic response to ADP both in the case of patients undergoing hypolipidemia treatment and in those undergoing no treatment at all. According to Hampton *et al.*, this abnormal sensitivity to aggregating agents could be explained by the presence of an unidentified plasma factor.

### *Aggregations and DIVC*

In septicemic and infectious shock conditions, the decrease in electrophoretic mobility seems to reach a maximum during the acute phase and therefore only lasts during a very short period : merely a few hours, according to our own studies. Infectious conditions that progress over a prolonged period (pneumopathy arteritis...) are not accompanied by any apparent changes in electrophoretic mobility. In contrast, hemolytic accidents produce changes in this parameter. We have, for example, been able to reveal a decrease in electrophoretic mobility during post-abortion septicemia accompanied by significant hemoglobinemia. These results can be compared with those obtained by Ross *et al.* on the *in vitro* influence of hemoglobin on platelet electrophoretic mobility (decrease in mobility and change in isoelectric point).

It should finally be noted that we have observed reductions in electrophoretic mobility during fatty embolism. We also observed a decrease in mobility in patients with severe frostbite, but unfortunately only a small number of cases have been studied. In contrast, the study of more than 50 cases of various burns observed after 24 hours with albumin or low molecular weight dextran perfusion revealed no significant change. Changes in mobility, if they exist, appear to be transient and any attempt to find significant changes would require undertaking measurement as soon as possible after the accident.

It should finally be mentioned that Chohan *et al.* observed a very significant reduction in platelet electrophoretic mobility during pulmonary oedema. These changes coincided with an increase in fibrinogen and immunoglobulins. Moreover in the patients studied by the above authors, the platelets appeared to be more sensitive to the effect of ADP, thus confirming the results obtained by Hampton *et al.* Changes in platelet electrophoretic mobility during cancer of the prostate have been also

studied<sup>52</sup>. It was shown in particular that there was an increase in platelet electrophoretic mobility during this disease and that the phenomenon was more marked in patients treated with estrogens. According to Jung et al. the variations observed are connected with an increase in the cell sialic acid level.

#### SURFACE CHARGE AND DRUGS

A drug's action capacity with surface charge can be considered in three ways :

- (1) by direct action of the molecule on membrane potential ;
- (2) by indirect action, which might be connected with changes in plasma factors or adsorption ;
- (3) by a change in sensitivity to aggregating agents in the presence of the molecule or direct interference with ionized groups.

We shall consider some examples of molecules that interfere with platelet surface charge and comply with these criteria.

#### *Direct Action*

Numerous authors have examined the action of heparin on platelet charge. In our own experience, for example<sup>49</sup>, we have shown that for concentrations above 5IU/ml, heparin induced a significant increase in platelet charge (FIG. 6) and that this action was dependent on incubation time (maximum action between 10 and 15 min) (FIG. 7). As heparin has numerous anionic groups, its action on platelet charge can most probably be explained by the adsorption of the molecule on the cell surface. In contrast, time-dependent effect ought to be more thoroughly studied. In parallel, protamin sulfate used as a heparin antagonist, induces a decrease in platelet surface charge (FIG. 6) with maximum action between 4 and 10 minutes, depending on the used concentrations.

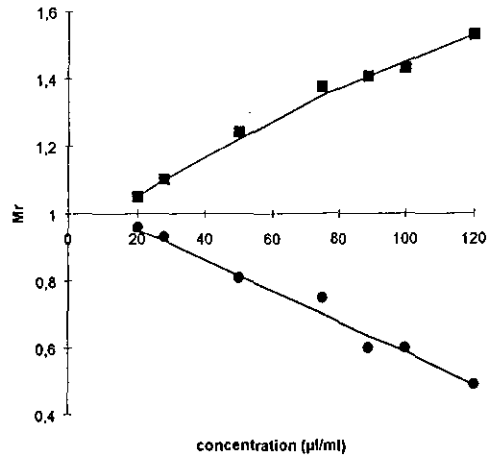


FIGURE 6. Effect of heparin ■ and protamin sulfate ● on the electrophoretic mobility of human blood platelet suspended in citrated plasma. Incubation time 15 min for heparin and 10 min. For protamin sulfate (Larcán *et al.*<sup>49</sup>).

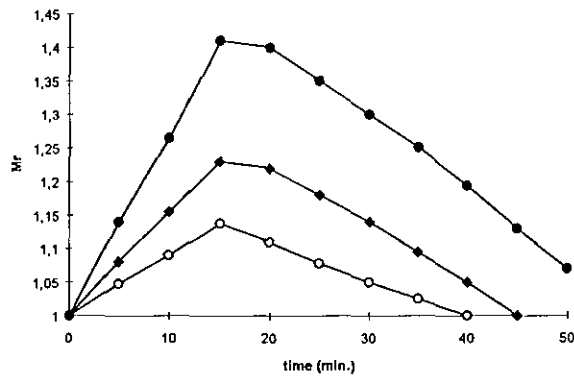


FIGURE 7. Time dependence of electrophoretic mobility of platelets suspended in citrated plasma after addition of heparin (○ 30 µl/ml, ◆ 50 µl/ml, ● 100 µl/ml) (Larcán *et al.*<sup>49</sup>).

Dextrans have also been studied. Ponder<sup>50, 39</sup> has shown that at molecular weights varying between 70 and 400 000 these molecules produced increases in platelet electrophoretic mobility in the region of 20 to 30 %. This observation was confirmed by Ross *et al.*<sup>12</sup> and further defined by Seaman and Brooks<sup>30</sup>. The observed increase is dependent not only on the dextran concentration, but also on the molecular weight. Since dextrans are essentially nonionic, these increases in charge might be explained by the adsorption of protein/dextran complexes on the cell surface, or by structural change in the membrane groups. This could also explain the

observed decrease in the isoelectric point value reported by Ross *et al.* Working on the basis of these results, it would be particularly interested to study the action on the surface charge of other plasma expanders used as plasma substitutes and, at some future date, liable to be infused in large volumes.

It should finally be noted that the action of other pharmacological agents on platelet electrochemical properties has been considered. Aznar *et al.*<sup>51</sup> have for example reported an increase in electrophoretic mobility caused by a sulfonic polysaccharide (SP 54), which is an antiplatelet agent, and Yung *et al.*<sup>52</sup> revealed no direct action of estrogens at concentrations of 1 to 100 µg/ml. We ourselves found no action from a hypoglycemic agent belonging to the sulfamide series.

### *Molecules Liable to Act through Plasma Changes*

The use of fibrinolytic agents is likely to alter platelet charge. According to Sawyer<sup>53</sup>, for example, brinase, at the concentration of 2 mg/kg in dogs or rabbits, increases platelet and red blood cell electrophoretic mobility, with a return to normal after 2 days. The same is true for brinolase, which has a similar effect at 1 mg/kg. These results are particularly interesting and are worth investigating further within the scope of a general study of fibrinolytic or defibrinating agents, particularly a study of Turpie *et al.*<sup>48</sup> stressed the favorable effect of Arvin on platelet sensitivity at low doses of ADP in patients with cardiovascular disease. According to these authors, the observed changes are connected with a decrease in the plasma fibrinogen level.

### *Changes in Sensitivity to Aggregating Agents or Action on Membrane Groups*

There is no doubt that apart from its direct action, a pharmacological agent is apt to act on platelet electrophoretic reactivity to aggregating agents, or possibly on ionized groups.

We have, for example, revealed that treatment with high doses of penicillin G (50 MIU/day) was likely to decrease platelet charge<sup>54</sup>. This fact is also observed *in vitro* under the same experimental conditions.

Moreover, Bolton *et al.*<sup>55</sup> showed that the administration of oral contraceptives gave a similar response to the action of ADP or noradrenalin to that obtained in patients with arterial diseases. They also showed that between two series of treatments, the response to the same aggregating agents was normal. According to the above authors, this increase in sensitivity is the result of a lecithin and low density lipoprotein disorder appearing in plasma, these products then being transformed into a substance that effects platelet electrophoretic mobility by the action of a labile plasma compound.

Hampton *et al.*<sup>56</sup> carried out an *in vitro* and an *in vivo* study on various vasoactive molecules. They found that Dipyridamol at 10<sup>-4</sup>M had no effect on the ADP response, but altered noradrenalin sensitivity. In parallel, other agents

(Tolasolin, propranolol, glyceryl, trinitate, intesain) inhibit the mobility increase induced by ADP and noradrenalin. These results were confirmed *in vivo* in normal subjects in the case of Persantin and Propranolol. The *in vivo* study of these two substances in patients with cardiovascular diseases and with increased electrophoretic sensitivity to ADP and noradrenalin, revealed that the response to ADP was unchanged, whereas with Persantin there was a decrease in sensitivity to noradrenalin. In parallel, the injection of 60 mg/day of propranolol in two patients with recent myocardial infarction, completely inhibited the increase in electrophoretic mobility at doses of ADP and noradrenalin between 0.0005 and 0.5 µg/ml.

#### NEW TRENDS IN PLATELET ELECTROPHORESIS - FUTURE ASPECTS

Cell electrophoresis with all its technical modifications has proven to be a useful method in biophysical cell research. Results obtained using this technique provide data on the surface charge and nature of the platelet membrane. Although numerous studies on platelet surface charge have provided improved perception of certain phenomena there are of course experimentation difficulties related to microscopic techniques, and this has meant that it has not been possible to generalize studies. However, automatic methods for analyzing the velocity spectra provides a means of studying electrophoretic mobility on a sample with more than 1000 cells in just a few minutes<sup>57</sup>. Amongst the many developments and research possible in the field of platelets we shall underline four areas in particular.

##### *Topochemistry of the Platelet Membrane Surface - Relation with Molecular hemorheology*

During the last decade, cell electrophoresis has made it possible to define procedures more accurately and undertake quantitative analysis of the main ionized and ionizable groups which are to be found on the surface of cells. However, the number and nature of certain groups are still, as yet, unknown. It is for this reason that further investigations in order to complete present knowledge on the topochemistry of the groups found on platelet membranes should be carried out, particularly since the most recent results would seem to indicate that only approximately 70 % of these groups are at present determined. Further, membrane spectroscopy techniques have provided a means of approaching membrane fluidity (local microviscosity). As is the case for red blood cells, it would be particularly interesting to study the possible changes in this parameter in relation to alterations in the distribution or number of membrane ionized groups and to carry out this investigation in parallel with a study on the membrane structure (lipid and protein composition).



### *Electrochemical Interaction between Cells : Platelet Aggregation*

It is a well known fact that surface phenomena play a part in any investigation on the stability of colloid suspensions. Verwey, Overbeek, Derjaguin, and Landau have thus concurrently developed a quantitative theory in which the stability of lyophobic solutions is treated in terms of free energy changes which take place when two particles approach each other. When the total energy maximum is large compared with the thermal energy  $kT$  of the particle the system should be stable. This should be kept in mind when undertaking investigations for defining the intercellular aggregation and thrombosis phenomena. It is therefore essential to define the role of the membrane groups within this theoretical framework.

Thus a large number of authors have underlined the participation of platelet electrochemical phenomena in aggregation and thrombus formation processes. In this respect it is important to define the part played by charged groups with ADP. Can we presume, as Mehrishi has suggested, that these interactions are in fact the primary reaction which initiates the subsequent phases of aggregation? At present we can merely note the correlation between the number of amino groups and the number of ADP sites determined by other methods! The part played by phosphate groups in "*in vivo*" platelet aggregation can also be considered, particularly in the case of stress where catecholamine release can lead to the liberation of alkaline phosphatase which, in turn by interacting with platelets, initiates a reduction in charge and favorable conditions for platelet aggregation and thrombus formation. Finally, the participation of sulfhydryl in intercellular interaction should be examined more thoroughly. The formation of disulfide bridges in certain special conditions could be considered.

### *Surface Charge and Diseases*

Research into the changes in surface charge during disease has been reported in many publications during the 70<sup>th</sup>. However, most of the work carried out is generally confined to clinical results and supplies no explanation as to membrane groups involvement. Moreover, Zadionchenko *et al.*<sup>58</sup> have showed that plasmapheresis produced a selective effect on the rheological blood properties depending on the initial level of the pathological disorders.

Two main clinical aspects deserve more thorough investigation :

- 1) The study of abnormal surface glycoproteins. Recent investigations have revealed the part played by surface glycoproteins in platelet adhesion, thrombin fixations and cell aggregation. At present, two conditions are known to be associated with the absence of specific membrane glycoproteins in different cell types : Bernard-Soulier and Glanzmann's diseases.
- 2) The problem of platelet electrophoretic sensitivity at low doses of aggregating agents should be confirmed and be studied more accurately.

*Surface Charge and Pharmacology*

Very few studies have as yet been considered on the interferences between drugs and platelet electrochemical properties. The few results given above, however, reveal the possibilities open through new approaches, either by direct interference between the drug and the membrane groups, or by inhibition studies on charge modifications by aggregating agents. From this viewpoint, the study of molecules acting through ADP, noradrenalin or 5HT could supply some interesting informations.

Finally, we can conclude that it is probable that in the future a number of investigations will supply a more accurate approach of the nature of ionized groups of platelet membrane. However, any new research on "quantitative cytology" is dependent on present developments in measuring methods which should, as a rule, allow greater sensitivity in cell differentiation. Moreover, the connection between molecular parameters and microrheological properties of cells deserves more thorough investigation in the physiological, pathological, and pharmacological fields.

**REFERENCES**

1. A. LARCAN, J.F. Stoltz & F. Streiff. 1974. La charge électrique des éléments figurés du sang. *E. M. Int (Paris)* 170 pp.
2. OSHIMA H. & KONDO T., 1991. On the electrophoretic mobility of biological cells. *Biophys. Chem.*, 39 : 191-198.
3. PETHIG R. & MARKX G.H., 1997. Application of dielectrophoresis in biotechnology. *Trends Biotechnol.*, 15 : 426-432.
4. H.A. ABRAMSON. 1928. The electrophoresis of the blood platelets of the horse with reference to their origin and to thrombus formation. *J. Exp. Med.* 47 : 677-683.
5. A.D. BANGHAM, B.A. PETHICA & G.V.F. SEAMAN. 1958. The charged groups at the interface of some blood cells. *Biochem. J.* 69 : 12-19.
6. J.N. MEHRISHI. 1972. Molecular aspects of the mammalian cell surface. *In Progress in Biophysics and Molecular Biology.* J.A.V. Butler & D. Noble, Eds. 25 :3-70. Pergamon Press. Oxford and New York.
7. G.V.F. SEAMAN. 1976. Electrochemical features of platelet interactions. *Thromb. Res.* 8 (Suppl. II) : 235-246.

8. J.F. STOLTZ & A. NICOLAS. 1979. Analytical study of ionized or ionizable groups of platelet membrane. *Blut* **38** : 103-117.
9. J.F. STOLTZ. 1981. Ionized or ionizable groups of blood cells. Chapter 9. *In* The Rheology of Blood, Blood Vessels and Associated Tissues. D.R. Gross & N.M.C. Hwang, Eds. NATO Advanced Study Institutes Series, Series E. **41** : 184-213. (Sijthoff and Noordhoff Publ.)
10. CROOK M., 1990. Plasma and platelet interactions : changes in platelet electrophoretic mobility. *Biochem. Soc. Trans.*, **18** : 1268-1269.
11. SLIVINSKY G.G., HYMER W.C. BAUER J.& MORRISON D.R., 1997. Cellular electrophoretic mobility data : a first approach to a database. *Electrophoresis*, **18** : 1109-1119.
12. S.W. ROSSW & R.V. EBERT. 1959. Microelectrophoresis of blood platelets and the effects of Dextran. *J. Clin. Invest.* **38** (1) : 155-160.
13. C. KIRSCHMANN, A. KATCHALSKY & A. DE VRIES. 1959. Electrochemical study of the platelet surface. *Arch. Biochem. Biophys.* **80** : 140-149.
14. J.F. STOLTZ & A. NICOLAS. 1977. Study of carboxyl groups on the human blood platelets membrane. *Biomedicine* **27** : 271-273.
15. M.A. MADOFF, S. EBBE & M. BALDINI. 1964. Sialic acid of human blood platelets. *J. Clin. Invest.* **43** : 870-878.
16. CROOK M. & CRAWFORD N., 1993. Alpha 2-adrenoreceptor status of human platelet subpopulations separated by continuous flow electrophoresis. *Thromb. Haemost.*, **69** : 60-76.
17. J.F. STOLTZ, A. LARCAN & A. NICOLAS. 1975. Physico-chemical study of phosphate groups on the human platelet membrane. *Biochem. Exp. Biol.* **11** : 359-363.
18. J.N. MEHRISHI. 1970. Phosphate groups/receptors on the surface of human blood platelets. *Nature* **226** : 452-453.
19. J.F. STOLTZ, A. NICOLAS, M. MIRJOLET & A. LARCAN. 1974. Application de l'électrophorèse en phase liquide à l'étude des groupements phosphates des plaquettes humaines bloqués par la pralidoxime. *C.R. Acad. Sc. Paris* **279** : 1951-1953.
20. CROOK M. & CRAWFORD N., 1988. Platelet surface charge heterogeneity : characterization of human platelet subpopulations separated by high voltage continuous flow electrophoresis. *Br. J. Haematol.*, **69** : 265-273.
21. J.N. MEHRISHI & D.R. GRASSETTE. 1969. Sulphydryl groups on the surface of intact Ehrlich ascites tumour cells, human blood platelets and lymphocytes. *Nature* **224** : 563-564.
22. G.V.F. SEAMAN. 1967. Surface potential and platelet aggregation. *In* Platelets : Their role in Hemostasis and Thrombosis. Schattauer Verlag. Stuttgart. pp. 53-68.
23. J.F. STOLTZ & A. NICOLAS. 1978. Study of amino groups of the human platelet membrane. *Acta Haematol.* **60** : 304-309.
24. J.R. HAMPTON & J.R.A. MITCHELL. 1966. Modification of the electrokinetic response of blood platelets to aggregating agents. *Nature* **210** : 1000-1002.

25. J.R. HAMPTON & J.R.A. MITCHELL. 1974. Platelet electrophoresis : The present position *Thrombos. Diathes. Haemorrh.* **31** : 204-244.
26. G.V.F. SEAMAN & P.S. VASSAR. 1966. Changes in the electrokinetic properties of platelets during their aggregation. *Arch. Biochem. Biophys.* **117** : 10-17.
27. J.F. STOLTZ, M. STOLTZ & A. LARCAN. 1969. Induced platelet aggregation and zeta potential. *Bibl. Anat.* **10** : 474-479.
28. J.F. STOLTZ, M. STOLTZ & A. LARCAN. 1971. Stability of the blood suspension and zeta potential of blood components. *In Theoretical and Clinical Hemorheology.* H. Hartet & A.L. Copley, Eds. : 253-261. Springer Verlag. Berlin, Heidelberg, New York.
29. K.A. GRÖTTUM. 1968. Influence of aggregating agents on electrophoretic mobility of blood platelets from healthy individuals and from patients with cardiovascular diseases. *The Lancet* : 1406-1408.
30. G.V.F. SEAMAN & D.E. BROOKS. 1970. Electrochemical aspects of platelet adhesion and aggregation. *In Platelet Adhesion and aggregation in Thrombosis : Counter Measures.* E.D. Mamman, G.F. Anderson & M.I. Barnhart, Eds. : 93-107. Schattauer Verlag. Stuttgart, New York.
31. J.F. STOLTZ. 1971. Electrokinetic charge and platelet aggregation. *In Platelet Aggregation.* J.P. Caen, Ed. : 213-218. Masson, Paris.
32. J.R. HAMPTON & J.R.A. MITCHELL. Modification of the electrokinetic response of blood platelets to aggregating agents. *Nature* **210** : 1000-1002.
33. J.N. MEHRISHI. 1971. The human blood platelet as a molecular mosaic its role in aggregation and thrombus formation. *Thromb. Diath. Haemorrh.* **26** : 370-377.
34. CROOK M. & CRAWFORD N., 1989. Electrokinetics, analytical and functional heterogeneity of circulating human platelets : separation of subpopulations by continuous flow electrophoresis after taxol stabilization. *Biochim. Biophys. Acta*, **1014** : 26-39.
35. M.R. BOISSEAU, M.F. LORIENT, G.V.R. BORN & F. MICHAEL. 1977. Change in electrophoretic mobility associated with the shape change of human blood platelets. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **196** : 471-474.
36. KIMURA R. & MILLER W.M., 1997. Glycosylation of CHO-derived recombinant tPA produced under elevated pCO<sub>2</sub>. *Biotechnol. Prog.*, **13** : 311-317.
37. K.A. GRÖTTUM. Electrophoretic investigations of blood platelets. *In Platelet Aggregation.* J.P. Caen, Ed. : 199-211. Masson. Paris.
38. Ch. KIRSCHMANN, A. KATCHALSKY-KATZIR & A. DE VRIES. 1961. Adsorption of polyplisne on to human blood platelets. *Bull. Res. Counc. Israel* **9** : 80-81.
39. BÄUMLER H, DONATH E., KRABI A., KNIPPEL W., BUDDE A. & KIESEWETTER H., 1996. Electrophoresis of human blood cells and platelets. Evidence for depletion of dextran. *Biorheology*, **33** : 333-351.
40. KA. GRÖTTUM, P.F. HJORT & M. JEREMIC. 1969. Interaction of bacterial endotoxin and liquid with blood platelets : Aggregation and decrease in the electrokinetic charge. *Thromb. Diath. Haemorrh.* **22** : 192-202.

41. N.B. ZUCKER & R.U. LEVINE. 1963. Microelectrophoresis of washed and unwashed human blood platelets with additional studies of platelets from patients with von Willebrand's disease and thrombasthenia. *Thromb. Diath. Haemorrh.* **10** : 1-8.
42. H. MURAKI, K. WATANABE, Y. ANDO, K. TOYAMA & M. HASEGAWA. 1977. Reduction of surface negative charge in human platelets by ristocetin. *Thromb. Haemostas.* **38** : 69 (abstract).
43. F. STREIFF, A. LARCAN, J.F. STOLTZ, P. ALEXANDRE & C. VIGNERON. 1970. Variations de la mobilité électrophorétique des plaquettes au cours de la maladie de Glanzmann. *Coagulation* **3** : 223-229.
44. J.F. STOLTZ & A. LARCAN. 1974. Platelet electrophoresis-Some comments. *Thromb. Diathes. Haemorrh.* **33** : 132-134.
45. K.A. GRÖTTUM & N.O. SOLUM. 1969. Congenital thrombocytopenia with giant platelets : A defect in the platelet membrane. *Br. J. Haematol.* **16** : 277-283.
46. K. KARPPINEN & P.I. HALONEN. 1970. Red cell and platelet electrophoresis in coronary heart disease. *Advan. Cardiol.* **4** : 175-178.
47. J.R. HAMPTON & R. GORLIN. 1972. Platelets studies in patients with coronary artery disease and in their relatives. *Br. Heart J.* **34** : 465-471.
48. A.G.G. TURPIE, G.P. MC NICOL & A.S. DOUGLAS. 1972. Platelet electrophoresis : Effect of defibrination by ancrod (Arvin). *Cardiovasc. Res.* **6** : 101-108.
49. A. LARCAN, J.F. STOLTZ & P. ALEXANDRE. 1969. Effets antagonistes de l'héparine et du sulfate de protamine sur la mobilité électrophorétique des plaquettes. *Pathol. Biol.* **17** : 729-734.
50. E. PONDER. 1957. Revêtement des plaquettes humaines et des globules rouges par les dextrans. *Rev. Hemat.* **12** : 11-15.
51. J. AZNAR, J. VALLES & P. VILLA. 1974. Effect of the SP-54 on the platelet electrophoretic mobility. *Thrombos. Diathes. Haemorrh.* **31** : 373-374.
52. S.M. JUNG, K. KINOSHITA, K. TANOUE, I. ISOHISA & H. YAMAZAKI. 1982. Role of surface negative charge in platelet function related to the hypereactive state in estrogentreated prostatic carcinoma. *Thromb. Haemost.* **47** : 203-209.
53. P.N. SAWYER. 1975. Effects of various fibrinolytic agents on the physicochemical characteristics of the cardiovascular system.
54. L. HOUBOUYAN, J.F. STOLTZ & A. GOGUEL. 1975. In vitro and in vivo influence of penicilin G on platelet aggregation. *Acta Haematol.* **53** : 300-308.
55. C.H. BOLTON, J.R. HAMPTON & J.R.A. MITCHELL. 1968. Effect of oral contraceptive agents on platelets and plasma-phospholipids. *The Lancet* **i** : 1336-1341.
56. J.R. HAMPTON, M.J.G. HARRISON, A.J. HONOUR & J.R.A. MITCHELL. 1967. Platelet behaviour and drugs used in cardiovascular disease. *Cardiovasc. Res.* **1** : 101-107.
57. E. MALHER, C. DUVIVIER & J.F. STOLTZ. 1980. Les techniques d'électrophorèse de cellules en suspension : Revue générale. *I.T.B.M.* **1** : 50-71.

58. V.S. ZADIONCHENKO, BEZPROZVANNYI A.B., DZHANASHIIA P.KH, ROMASHKIN A.V., KUZNETSOVA E., BORZOVA L.V. & DOBASHINA A.N., 1991. Effect of therapeutic plasmapheresis on rheological properties of blood in patients with ischemic heart disease. *Sov. Med.*, 10 : 3-6.
59. J.P HSU, S.H. LIN & S. TSENG. 1996. Electrophoretic mobility of biological cells in asymmetric electrolyte solutions. *J. Theor. Biol.*, 182 : 137-145.

# Modelling of leukocyte adhesion on a fibrinogen coated surface in static conditions

Y. Cabrador<sup>a</sup>, S. Legrand<sup>a</sup>, S. Muller<sup>a</sup>, P. Carl<sup>b</sup>, B. Senger<sup>b</sup>, J.-C. Voegel<sup>b</sup>,  
M. Gattiger-Cannard<sup>a</sup> and J.-F. Stoltz<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Hémorhéologie-Angiohématologie, UMR CNRS 7563 Fac. Méd., Vandoeuvre, France*  
<sup>b</sup>*ERM U424, Fac. de Méd., Strasbourg, France*

**Abstract.** The adhesion of polymorphonuclear leukocytes (PMNs) on the vascular endothelium is a complex process that occurs during biological and pathological events and involves a large family of molecules. This phenomenon could be approached by a modelling study of the adhesion of PMNs on a biological substrate, fibrinogen. Two different physiological conditions were tested such as the activated state of PMNs with a synthetic pro-inflammatory activator (N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Isoleucyl-Alanine, FMLP). The activated state of PMNs was both quantified by flow cytometry and controlled by fluorescence microscopy.

Our results suggest that quiescent PMNs deposit in accordance with the ballistic deposition model. The preliminary results obtained with FMLP-stimulated PMNs show a different deposit process compared to quiescent PMNs but do not allow to define exactly a deposition model.

## Introduction

The adhesion of proteins, bacteria, and cells to solid surfaces plays an important role in many biological phenomena. The recruitment of neutrophils from the mainstream of the vasculature to the extravascular space is an early and essential requisite in acute inflammation. This is a multistep cascade of events [1, 2], in which the initial interaction is mediated by selectins and results in the rolling of neutrophils along the length of the endothelium [2,15].  $\beta$ 2-integrins are present on the surface of neutrophils and support the stable firm adhesion of neutrophils to counter-receptors on the surface of endothelium [7,9, 10].  $\beta$ 2-integrin receptors on circulating leukocytes are normally in an inactive or low-avidity state in which they do not bind, or bind only minimally to their endothelial ligands. With an appropriate activation of leukocytes, the integrin receptors are transformed to an activate state in which they bind avidly to their ligand [6–8,16]. Moreover, Mac-1 (CD11b/CD18) was the first characterised of such leukocyte adhesion receptors [3,4,10,18] and we know that fibrinogen and fibrin are present at the inflammatory site [1].

Different studies have been devoted to the adhesion process of red blood cells (RBC) on various materials to compare specific and nonspecific adhesion, to describe the influence of a flow or a shear rate on the adhesion efficiency [11,19]. First studies were carried out on fixed RBC a simple cell model, but studies with this type of cell should contribute to the elucidation of the mechanism of adhesion. A comparison of experimental results and modelling had permit to find the general laws governing the deposition process of RBCs on a glass surface [11]. In this way, the study was continued in most

biological conditions: our present work was carried out on the adhesion process of PMNs on a fibrinogen coated surface. PMNs are used quiescent or stimulated by a synthetic pro-inflammatory factor that mimics the bacterial membrane, the N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine (FMLP). This work is supported by an image processing software and a mathematical study. Moreover, parallel studies in flow cytometry and fluorescence microscopy permitted to control the action of FMLP on adhesion molecules expressed at the PMN membrane.

## Materials and methods

### *Reagents*

Dextran, N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP), pure fibrinogen bovine, KOH were purchased from Sigma, glass slide (24 × 60 mm, Esco), monoclonal anti-adhesion molecule IgG1 mouse anti-human antibody (Immunotech, France), FITC-conjugated goat anti-mouse antibody and calibration beads (QIFIKIT) were purchased from Dako Co., Denmark.

### *PMNs isolation and FMLP-stimulation*

Human peripheral blood PMNs were isolated at room temperature (22°C) using a standard three-step procedure, from the venous blood of healthy, medication free, volunteers who gave informed consent. The citrated blood was treated in an equal volume of 6% PBS–dextran (w/v) for 45 minutes to lyse RBC. After washing, the leukocyte-rich pellet was exposed to hypotonic conditions to lyse RBC. PMNs were resuspended in PBS (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 5.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.5 mM glucose, pH 7.2–7.3) until used.

We used 3 concentrations of PMNs: 3, 5 and 7 × 10<sup>5</sup> cells/ml.

PMNs are used quiescent or after a FMLP stimulation (10<sup>-7</sup> M) during 15 min at room temperature or 30 min at 37°C.

### *Preparation of the covered fibrinogen slides*

Microscope slides were previously cleaned for 20 min in a KOH/ethanol solution [KOH: 50 mM, distilled water: 160 mM, ethanol: 350 mM], abundantly rinsed with demineralized water and air dried. Before the injection of the PMNs, the glass slide used for sedimentation cell was coated during 3 hours with bovine fibrinogen (0.01% in NaCl solution 10<sup>-1</sup> M) which serves to bind irreversibly the PMNs to the substrate. Then, slides were rinsed during 12 hours in a 100 mM NaCl solution.

### *Image processing software*

An inverted optical microscope IMT-2 (Olympus) was used for the observation of deposited PMNs. Pictures were taken by a charge-couple device (CCD) camera.

After one hour of sedimentation of PMNs on fibrinogen-coated surface, 200 pictures were taken for one experiment from the whole adsorbing glass surface. Then, the image processing software (Visilog 2, Noesis, France) allowed to determine the number and the co-ordinates geodesic centres of cells adhered on the surface and stored in a file for subsequent analysis.



*Mathematical parameters*

Reversible deposition process of particles on solid surfaces can be studied from both experimental and theoretical points of view. Also, the surface configurations of the adsorbed particles are characterised, for example, by the radial distribution function  $g(r)$  and by the reduced variance ( $\sigma^2/\langle n \rangle$ ) of the number of particles adsorbed on an assembly of subregions of the particle collector.

The radial distribution function  $g(r)$  is defined by the Eq. (1):

$$g(r) = \frac{n_i}{\rho A_i n_{\text{ref}}}, \tag{1}$$

$A_i$ , annulus area difference in area between disks of radii  $iw$  and  $(i + 1)w$ ,  
 $n_i$ , number of cells adsorbed at a distance  $r$  from the centre,  
 $n_{\text{ref}}$ , number of reference cells,  
 $\rho$ , density of adsorbed cells.

The mean number of cells per picture is calculated:

$$\langle n \rangle = \sum_{i=0}^{\infty} iP(i), \tag{2}$$

where  $P(i)$  is the probability to have  $n$  cells on a random picture  $i$ .  
 The reduced variance is defined by the Eq. (3):

$$\frac{\sigma^2}{\langle n \rangle} = \frac{\langle n^2 \rangle}{\langle n \rangle} - \langle n \rangle. \tag{3}$$

The reduced variance is related to the function  $g(r)$  of the particles on the surface through the relation (4):

$$\frac{\sigma^2}{\langle n \rangle} = 1 + \langle \rho \rangle \int_0^{\infty} [g(r) - 1] 2\pi r dr, \tag{4}$$

$n$ , number of particles on a given subarea  $a$  of the whole area  $A$   
 $\langle n \rangle$ , average of the number  $n$ .

During a slow and homogenous deposit process, when the surface coverage ( $\theta$ ) is low:  $\sigma^2 \approx \langle n \rangle$  that indicates:

$$\lim_{\substack{\theta \rightarrow 0 \\ \nu \rightarrow \infty}} \frac{\sigma^2}{\langle n \rangle} = 1, \tag{5}$$

$\theta$ , surface coverage,  
 $\nu$ , number of pictures.

Theoretical models are defined to characterise the deposition process [13]:

The *Random Sequential Adsorption* (RSA) model consists of sequential adsorption events. An adsorption site is chosen at random, and if no other particles block this site, the particle is placed there: the

sorption succeeds. If not, the particle is rejected, and a new site is chosen, again at random over the whole surface, for a new trial.

The *ballistic deposition model* is the most frequent modification of this model: under a strong gravitational influence, a particle is not rejected if it can reach the surface by rolling over previously adsorbed particles. Experimentally, this is observed on a horizontal surface for sufficiently large, heavy particles.

### 6. Quantification adhesion molecules on PMNs surface

To control the activation state of PMNs after isolation or stimulation by FMLP, a parallel study was performed consisting on the labelling of  $\beta 2$ -integrin (CD11a, CD11b, CD11c, CD18) and selectin CD62-an analysis was performed by FACScan flow cytometer (Becton Dickinson). These different molecules present at the PMNs surface were studied by indirect immunofluorescence labelling. Monoclonal anti-adhesion molecule IgG1 mouse anti-human antibody was used as primary antibody and FITC-conjugated anti-mouse antibody was used as a secondary antibody.

We used QIFIKIT calibration beads wearing a known quantity of antigen to quantify the adhesion molecules expressed at the PMNs surface.

### 7. 3D microscopic fluorescence studies

The fluorescence studies were performed with a Olympus IX-70 fluorescence inverted microscope equipped with the CellScan<sup>TM</sup> optical sectioning acquisition system (Scanalytics, USA and Bionis, France) using a  $\times 100/0.95$  NA objective ( $z$  scanning =  $0.25 \mu\text{m}$ ). This device allows a 3D image restoration and a fluorescence quantification through an EPR calculation. Images were recorded with a Slow Scan Coding 12 bit CCD camera (Princeton Instruments Inc., USA). The blurring function of the optical system (PSF) was characterised by imaging a through-focus series of optical sections of a  $0.17 \mu\text{m}$  diameter fluorescent bead (Microscope point source kit, Molecular Probes, USA)

## Results and discussion

### 1. Homogeneity of cell deposit and relation between cell concentration and surface coverage

The acceptance of the experience was dependent of the homogeneity of cell deposit on the substrate surface: the slope of the curve must be contained between  $-0.05$  and  $0.05$ . The Fig. 1 shows an example

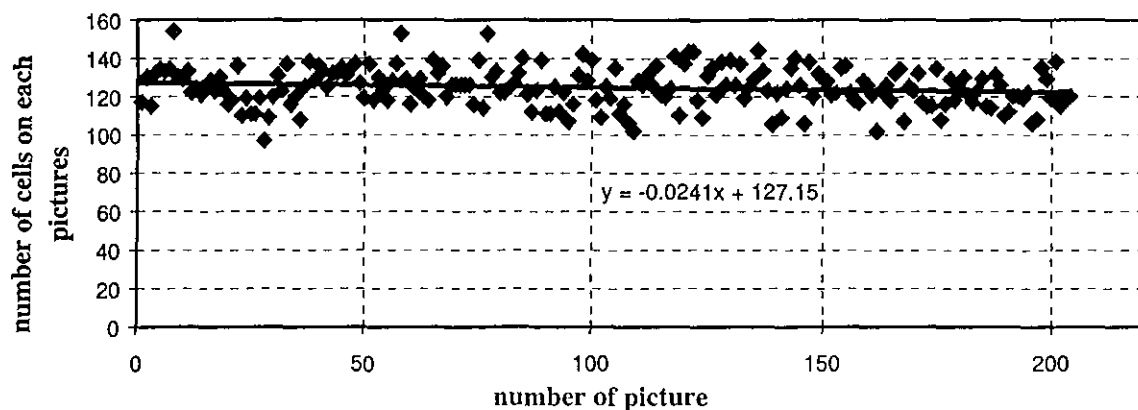


Fig. 1. Homogeneity of cell deposit at the surface.

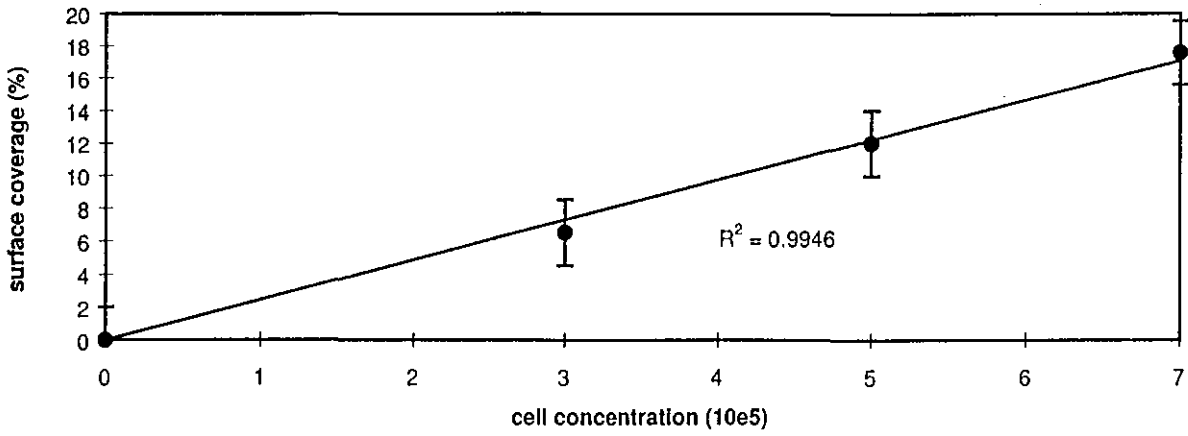


Fig. 2. Influence of cell concentration on surface coverage.

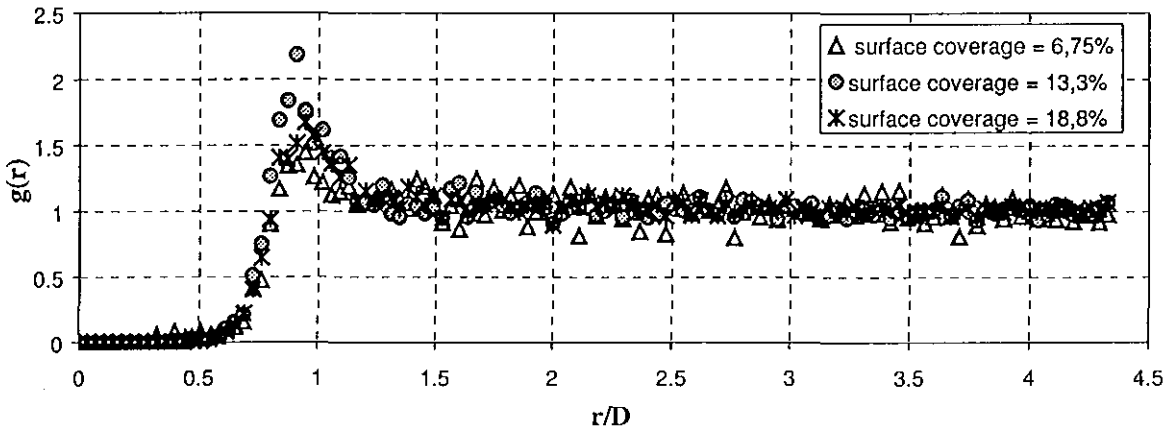


Fig. 3. The radial distribution function  $g(r)$  for different surface coverage of quiescent PMN.

ults obtained. If the deposition process of PMNs on the surface is homogenous the experiment was tested for mathematical study.

Moreover we can see, in Fig. 2, a correlation between cell concentration and surface coverage. This demonstrated the formation of a monolayer of cells at the fibrinogen coated surface in this range of concentrations.

#### Study of deposition process of quiescent PMNs

Figure 3 represents the distribution function  $g(r)$  as a function of ratio  $r/D$  ( $r$ , distance between two centres;  $D$ , diameter of one cell). We can see for each surface coverage one peak which corresponds to first neighbours. The peaks for second neighbours is never observed even for 25% surface coverage according to Wojtaszczyk et al. [17] who had demonstrated that the second peak only appeared for coverages superior than 30% [4]. We noted also, that  $g(r)$  tends towards 1 for the highest values of  $r/D$ . This saturation indicates that punctual density around one reference cell is the same that mean density on the whole surface.

In a second step, the experimental results concerning the reduced variance were compared to RSA ballistic models (Fig. 4). We did not detect a significant variation of the reduced variance for the range of surface coverage treated (0 to 25%). In this way, we can consider that the deposition model of quiescent PMNs tends towards ballistic model.

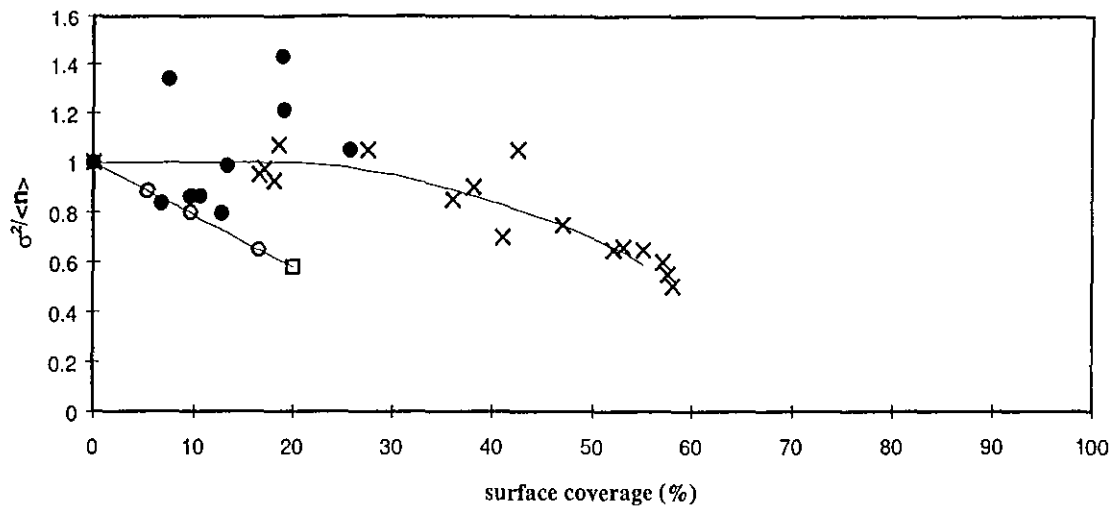


Fig. 4. Reduced variance as function of surface coverage (□: RSA model, x: Ballistic deposit model, ●: experimental results).

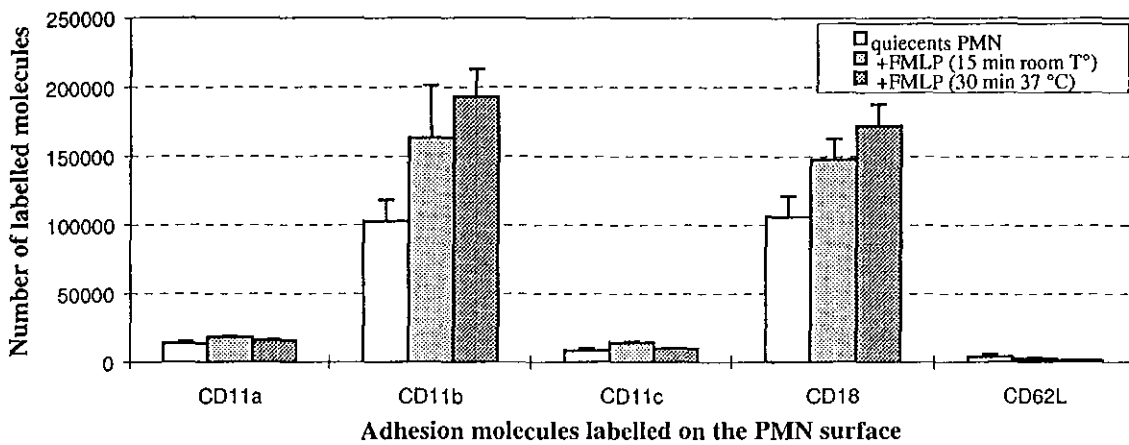


Fig. 5. Expression of adhesion molecules in different experimental conditions.

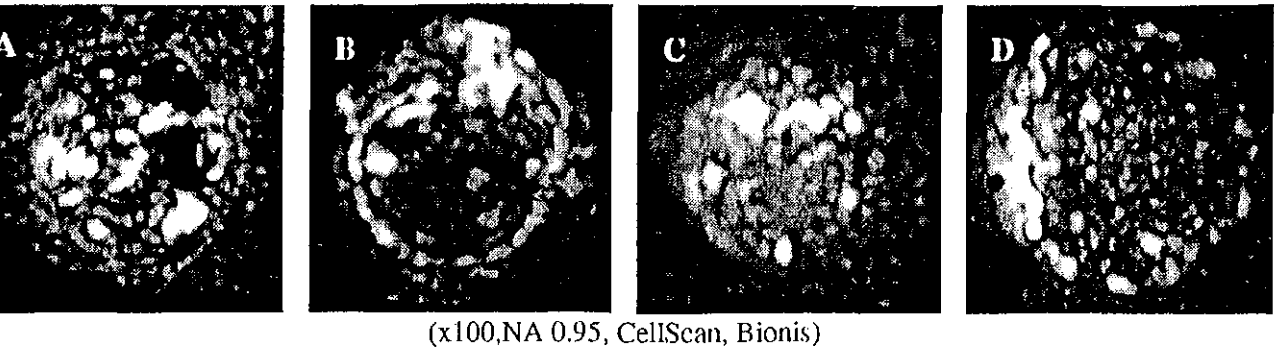
### 3. Study of deposition process of FMLP-stimulated PMNs

#### 3.1. Control of activation state of PMNs by flow cytometry

The quantification of adhesion cell molecules performed by flow cytometry after purification of PMNs is shown in Fig. 5. The basic level expression of CD11a, CD11b, CD11c, CD18 and CD62L on quiescent PMNs was different: surface expression of CD11a, CD11c and CD62L was low (<20.000 mol./cell), whereas expression of CD11b and CD18 was 5 fold higher (>100.000 mol./cell). The potential effect of FMLP on the adhesion molecules expression was tested in different conditions (incubation 15 minutes at room temperature, incubation 30 minutes at 37°C). Both presented a strong increase of CD11b and CD18 expression related to the experimental conditions. The membrane expression of CD11a, CD11c and CD62L did not change significantly.

This result shows a significant effect of FMLP on PMNs demonstrated by quantitative changes of surface expression of  $\beta$ 2-integrins CD11b and CD18.

Our results are in agreement with other studies that demonstrated a rapid translocation of CD11b/CD18 from intracellular granules to the plasma membrane in stimulated neutrophils. Furthermore, studies *in vitro* indicate that newly mobilised CD11b/CD18 receptors play an important role in subsequent adherence-dependent functions [6].



Distribution of CD11b molecules on quiescent (A) or FMLP stimulated (B) PMNs and CD18 molecules on quiescent (C) FMLP stimulated (D) PMNs.

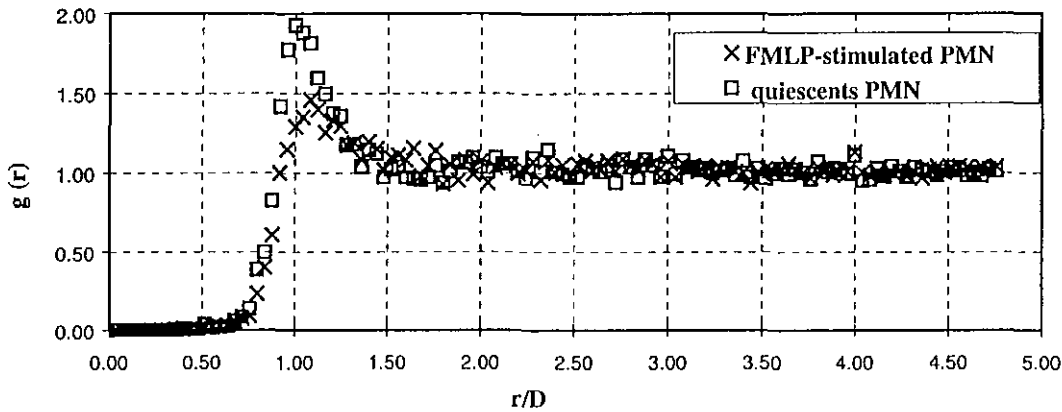


Fig. 7. The radial distribution function  $g(r)$  for quiescent PMN and FMLP-stimulated PMN (30 min, 37°C).

**3D Fluorescence microscopic study**

parallel study allowed to localise adhesion molecules on PMNs surface by 3D microscopic fluorescence studies and showed a clusterisation of CD11b and CD18 integrins after PMNs stimulation (Fig. 6). These results complete the flow cytometry study by showing a polarisation of molecules at the cell surface: FMLP induces quantitative and qualitative changes of adhesion molecules CD11b and CD18.

**Deposition process of FMLP-stimulated PMNs (30 min 37°C)**

we can note an unexpected decrease of the first neighbours peak (Fig. 7). This result can be explained by two different hypotheses: (1) the aggregation of cells can induce an evaluation error of surface coverage; (2) FMLP just act really on CD11b/CD18 and we know that other adhesion molecules, like CD62-L, are implicated on PMNs adhesion on endothelium.

**Conclusion**

our study made a part of the second step of the investigations realised since some years on the cell adhesion on solid/liquid interface. The first step used fixed red blood cells because they are very controlled and easy to obtain. In our work we used biological cells that have an important role in inflammatory responses, the PMNs. The repartition law of quiescent PMNs would tend towards the ballistic deposit model. Somewhere the deposit process of FMLP-stimulated PMNs is different to the deposit process of quiescent PMNs, these preliminary results do not allow to determine their repartition law. More investigations are necessary to define this model.

Moreover, this study will be continued using other biological substrates like quiescent or stimulated mechanical or chemical factors endothelial cells.

## References

- [ ] D. Adams and S. Shawn, Leukocyte-endothelial interactions and regulation of leukocyte migration, *The Lancet* **343** (April 1994), 831–836.
- [ ] D.C. Altieri, Fibrinogen–leukocyte interaction as a paradigm of inflammatory responses, in: *Coagulation-Inflammation Interface: Coagulation Assembly on Leukocytes*, Landes Bioscience, 1997.
- [ ] D.C. Altieri, J. Plescia and E. Plow, The structural motif Glycine 190–Valine 202 of the fibrinogen  $\gamma$  chain interacts with CD11b/CD18 integrin ( $\alpha_M\beta_2$ , Mac-1) and promotes leukocyte adhesion, *The Journal of Biological Chemistry* **268** (January 1993), 1847–1853.
- [ ] M.A. Arnaout, Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18, *Blood* **75** (March 1990) 1037–1050.
- [ ] T. M. Carlos and J.M. Harlan, Leukocyte-endothelial adhesion molecules, *Blood* **84**(7) (1994), 2068–2101.
- [ ] D.T. Fearon and L. Collins, Increased expression of C3b receptors on polymorphonuclear leukocytes induced by chemotactic factors and by purification procedures, *The Journal of Immunology* **130**(1) (1983), 370–375
- [ ] C.G. Gahmberg, M. Tolvanen and P. Kotovuori, Leukocyte adhesion: Structure and function of human leukocyte  $\beta_2$ -integrins and their cellular ligands, *European Journal of Biochemistry* **245** (1997), 215–232.
- [ ] B.J. Hughes, J.C. Hollers, E. Crockett-Torabi and C. Wayne Smith, Recruitment of CD11b/CD18 to the neutrophil surface and adherence-dependent cell locomotion, *Journal of Clinical Investigations* **90** (November 1992), 1687–1696.
- [ ] R.O. Hynes, Integrins: versability, modulation and signaling in cell adhesion, *Cell* **69** (1992), 11–25.
- [ ] L.R. Languino, J. Plescia, A. Duperray, A. Brian, E.F. Plow, J.E. Geltoski and D.C. Altieri, Fibrinogen mediates leukocyte adhesion to vascular endothelium through an ICAM-1 dependent pathway, *Cell* **73** (1993), 1423–1430.
- [ ] Ph. Lavalle, J.-F. Stoltz, B. Senger, J.-C. Voegel and P. Schaff, Red blood cell adhesion on a solid/liquid interface, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** (December 1996), 15 136–15 140.
- [ ] S.K. Lo, G.A. Van Seventer, S.M. Levin and S.D. Wright, Two leukocyte receptors (CD11a/CD18 and CD11b/CD18) mediate transient adhesion to endothelium by binding to different ligands, *The Journal of Immunology* **143**(10) (1989), 3325–3329.
- [ ] E.K. Mann, P. Wojtaszczyk, B. Senger, J.-C. Voegel and P. Schaff, A paradox resolved: apparently identical radial distribution functions, different density variances, *Europhysics Letters* **30**(5) (1995), 261–265.
- [ ] R. Pardi, “Inside-out” and “outside-out” mechanisms in leukocyte adhesion, *FCI* **2** (1994), 136–146.
- [ ] S.I. Simon, A.R. Burns, A.D. Andrew, P.K. Gopalan, E.B. Lynam, L.A. Sklar and C.W. Smith, L-selectin (CD62L) cross-linking signals neutrophil adhesive functions via the Mac-1 (CD11b/CD18)  $\beta_2$ -integrin, *The Journal of Immunology* **155** (1995), 1502–1514.
- [ ] T. Sugimori, D.L. Griffith and A. Arnaout, Emerging paradigms of integrin ligand binding and activation, *Kidney International* **51** (1997), 1454–1462.
- [ ] P. Wojtaszczyk, P. Schaff, B. Senger, M. Zembala and J.-C. Voegel, Statistical properties of surfaces covered by large spheres, *J. Chem. Phys.* **99**(9) (1993), 7198–7208.
- [ ] S.D. Wright, J.I. Weitz, A.J. Huang, S.M. Levin, S.C. Silverstein and J.D. Loike, Complement receptor type three (CD11b/CD18) of human polymorphonuclear leukocytes recognises fibrinogen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85** (October 1988), 7734–7738.
- [ ] Z. Xia, H.L. Goldsmith and T.G.M. Van De Ven, Flow-induced detachment of red blood cells adhering to surfaces by specific antigen-antibody bonds, *Biophys. J.* **66**(4) (1994), 1222–1230.

# ADHÉSION DES LEUCOCYTES SUR UNE SURFACE RECOUVERTE DE FIBRINOGENÈ EN CONDITIONS STATIQUES

## Expérience et modélisation

V. LABRADOR (1), S. LEGRAND (1), S. MULLER (1), P. CARL (2), B. SENGER (2), J.-C. VOEGEL (2),  
V. LATGER-CANNARD (1), P. RIHA (3), J.-F. STOLTZ (1)

(1) *Laboratoire d'Angiohématologie-Hémorhéologie, LEMTA UMR CNRS 7563, Faculté de Médecine,  
F-54500 Vandœuvre-les-Nancy.*

(2) *INSERM U424, Faculté de Médecine, F-Strasbourg.*

(3) *Institute of Hydrodynamics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic.*

### RÉSUMÉ :

**Adhésion des leucocytes sur une surface recouverte de fibrinogène en conditions statiques.**

L'adhésion des polynucléaires neutrophiles (PNNs) à l'endothélium vasculaire est un processus complexe mettant en jeu de nombreuses molécules et des mécanismes complexes. La cascade d'adhésion survient notamment après stimulation des PNN par des signaux moléculaires et cellulaires de nature variée. Le fibrinogène constitue un des substrats spécifiques de la  $\beta 2$ -intégrine CD11b/CD18 exprimée à la surface des neutrophiles. Or la liaison fibrinogène-neutrophile est induite lors des réactions inflammatoires.

Afin de comprendre ce phénomène, nous avons poursuivi des travaux initiés sur les hématies et les particules de synthèse sur un système plus complexe : le PNN. À l'aide d'une chambre de sédimentation, la modélisation de l'adhésion de PNN sur un substrat biologique, le fibrinogène a pu être mise en place, à partir de PNNs issus de sang total. Le processus d'adhésion des PNN au fibrinogène a été étudié dans deux conditions physiologiques distinctes : PNN quiescents ou stimulés par un activateur pro-inflammatoire synthétique, le FMLP (N-Formyl-Méthionyl-Leucyl-Phénylalanine). L'état d'activation des PNN a été quantifié par cytométrie en flux et contrôlé par microscopie de fluorescence.

Les résultats obtenus laissent supposer que les neutrophiles quiescents se déposent suivant le modèle de dépôt balistique, modèle de dépôt aléatoire comme le modèle RSA, se différenciant de celui-ci en acceptant le fait que les cellules qui arrivent à la surface puissent rouler sur les cellules déjà fixées au substrat et qui introduit l'existence d'une force gravitationnelle pour chaque cellule.

Les résultats préliminaires obtenus pour les PNN stimulés par le FMLP ne permettent pas de trancher pour l'un ou l'autre de ces modèles bien que le FMLP induise des changements qualitatifs et quantitatifs au niveau des molécules d'adhésion exprimées à la surface de neutrophiles. (J Mal Vasc 2000 ; 25 : 47-52)

**Mots-clés :** Polynucléaires neutrophiles. Modélisation. Sédimentation. FMLP.

### ABSTRACT :

**Adhesion of leukocytes on a fibrinogen-coated surface in static conditions: experimentation and modelization.**

The adhesion of polymorphonuclear leukocytes (PMNs) on the vascular endothelium is a complex process that occurs during different biological and pathological events and involves numerous molecules. The adhesion cascade is induced after PMN stimulation by various molecular or cellular signals. Fibrinogen is one of the substrates for CD11b/CD18  $\beta 2$ -integrins expressed at the PMN surface; fibrinogen-neutrophil binding is induced by inflammatory reactions.

In order to understand this process, we have carried out studies on the basis of preliminary experiments on red blood cells and synthetic particles. The modelization of quiescent PMNs adhesion on a fibrinogen substrate was investigated with a sedimentation cell chamber. Two different physiological conditions were tested: the activated state of PMN by a synthetic pro-inflammatory activator (FMLP). The activated state of PMNs was both quantified by flow cytometry and controlled by fluorescence microscopy.

The results suggest that quiescent neutrophils deposit in accordance with the ballistic deposition model. This random adsorption model differs from random sequential adsorption (RSA) in that the cells arriving at the surface are able to roll along cells previously adsorbed introducing the notion of gravitational attraction of cells.

The preliminary results obtained with stimulated PMN do not allow to choose between one of this two deposition models. Nevertheless, the qualitative and quantitative effects of FMLP on neutrophils were demonstrated by modifications of adhesion molecules expression. (J Mal Vasc 2000; 25: 47-52)

**Key-words :** Polymorphonuclear leukocyte. Modelization. Sedimentation. FMLP.

Travail présenté au XXXIII<sup>e</sup> congrès du Collège Français de Pathologie Vasculaire, Session d'Hémorhéologie Clinique sur « les marqueurs de l'activation cellulaire : intérêts cliniques et thérapeutiques ». Paris, le 10 mars 1999.

Reçu le 6 septembre 1999.

Acceptation par le comité de Rédaction le 15 novembre 1999.

Tirés à part : V. LABRADOR, adresse ci-dessus.

FMLP :	N-Formyl-Méthionyl-Leucyl-Phénylalanine
LAD :	Leukocyte Adhesion Deficiency
PNN :	Polynucléaire Neutrophile
FITC :	Isothiocyanate de fluorescéine
RSA :	Random Sequential Adsorption

L'adhésion des cellules sur des surfaces solides joue un rôle important dans de nombreux phénomènes biologiques. En particulier, l'adhésion des cellules sanguines à l'endothélium vasculaire intervient au cours de nombreuses pathologies vasculaires notamment lors de la réponse immunitaire et inflammatoire.

Dans ces cas particuliers les cellules sanguines, notamment les polynucléaires neutrophiles (PNN), peuvent adhérer à l'endothélium vasculaire. En effet, les PNN sont rapidement recrutés en grand nombre aux sites d'inflammation où ils constituent la réponse précoce à l'infection ou à la lésion. Ils se fixent aux cellules endothéliales grâce à la présence de molécules d'adhésion à leur surface et sur les cellules endothéliales. Les principales molécules responsables des deux étapes de l'adhésion (roulement et adhésion ferme) sont de différents types : le roulement est assuré grâce aux sélectines, molécules exprimées aussi bien sur les leucocytes que sur les cellules endothéliales. L'adhésion ferme met en jeu les intégrines leucocytaires (5, 13) dont les ligands sont divers et incluent les protéines exprimées par les cellules endothéliales (Intracellular Adhesion Molecule 1 et 2 : ICAM-1, ICAM-2) (1, 16) aussi bien que les protéines solubles telles que le fibrinogène (2, 26), le facteur X, la lamine, la laminine, le collagène, le facteur de Von Willebrand et les fragments du complément (6). Les  $\beta$ 2-intégrines sont largement impliquées dans les pathologies mettant en jeu des mécanismes d'adhésion tels que les Leukocyte Adhesion Deficiency I et II (LAD I et II) (3, 4, 10), les inflammations aiguës (7) ou chroniques (20, 22), les pathologies infectieuses (21) ou vasculaires (9) ainsi que le diabète (8). Leur mise en jeu dépend de l'état d'activation des PNN (24) et sera effective en présence de différents signaux émis par l'endothélium ou par des activateurs exogènes plasmatiques (bactéries, chémokines et cytokines) qui vont modifier leur capacité d'adhésion (12).

La liaison PNN-fibrinogène est reconnue comme une preuve de la physiopathologie de l'obstruction vasculaire et de l'athérogénèse et semble également jouer un rôle dans la pathogénèse de différentes maladies, telles que l'athérosclérose et la thrombose veineuse (14, 23).

La connaissance de la loi de répartition des PNN sur le fibrinogène permettrait de comprendre une partie des phénomènes complexes inter-cellulaires et moléculaires mis en jeu lors de la cascade d'adhésion due à l'inflammation. Une étude préalable sur les globules rouges fixés a permis de mieux appréhender les interactions des cellules à leur substrat (15). Afin de se rapprocher des conditions physiologiques, nous avons étudié l'adhésion au fibrinogène de leucocytes vivants activés ou non par du FMLP (N-Formyl-Méthionyl-Leucyl-Phénylalanine), activateur chimiotactique pro-inflammatoire de synthèse mimant la paroi bactérienne. Cette étude a été effectuée par analyse

d'images suivie d'un traitement informatique destiné à déterminer les paramètres statistiques caractérisant le dépôt des cellules sur une surface. Cette étude a été complétée par une analyse de cytométrie en flux afin de contrôler l'état d'activation des PNNs dans les mêmes conditions expérimentales.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### RÉACTIFS

Dextran (Sigma), N-formyl-Méthionyl-Leucyl-Phénylalanine (Sigma), fibrinogène pur bovin (Sigma), KOH (Sigma, St Quentin Fallavier, France), lamelles de verre (24 x 60 mm, Esco), anticorps monoclonal anti-molécule d'adhésion IgG1 de souris anti-humain (Immunotech, France), anticorps de chèvre anti-humain conjugué à la FITC et kit de calibration QIFIKIT (Dako Co., Denmark).

### ISOLEMENT DES POLYNUCLÉAIRES NEUTROPHILES (PNN) ET ACTIVATION AVEC LE FMLP

Les polynucléaires neutrophiles sont obtenus à partir de sang total, prélevé sur anticoagulant citraté. Le sang total est mis à sédimenter pendant 45 minutes à température ambiante dans une solution de tampon phosphate-Dextran 6 % (poids/volume). Cette sédimentation est suivie d'une première centrifugation du surnageant à 500g pendant 15 minutes. Le culot ainsi obtenu est soumis à une lyse hypotonique puis de nouveau centrifugé à 500g pendant 15 minutes. Le culot, riche en polynucléaires neutrophiles, est suspendu dans 1mL de tampon phosphate (pH 7,2-7,3, NaCl anhydre : 14.10<sup>-2</sup> M, KCl anhydre : 27.10<sup>-4</sup>M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 53.10<sup>-4</sup> M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 14.10<sup>-4</sup>M, D-(+)-Glucose : 55.10<sup>-4</sup>M). La concentration finale est déterminée par un comptage sur une cellule de Thoma.

Une partie des cellules est soumise à une activation par le FMLP (10<sup>-7</sup>M) 15 minutes à température ambiante ou 30 minutes à 37 °C.

### FIXATION DU FIBRINOGENE SUR LES LAMELLES DE VERRE

Les lamelles de verre sont lavées pendant vingt minutes dans une solution d'hydroxyde de potassium KOH/alcool : [KOH : 5.10<sup>-2</sup>M, eau distillée : 16.10<sup>-2</sup>M, éthanol : 35.10<sup>-2</sup>M]. Elles sont ensuite rincées à l'eau distillée puis séchées. Le fibrinogène (0,01 %) dans une solution de NaCl 10<sup>-1</sup>M est mis en contact sur les lamelles pendant 3 heures afin que celui-ci s'absorbe à la surface. Puis, les lamelles sont immergées dans une solution de NaCl (10<sup>-1</sup>M) jusqu'au montage de la cellule de sédimentation.

### SÉDIMENTATION DES PNN

Les PNN sont resuspendus dans du tampon phosphate à la concentration désirée (3 à 7 10<sup>5</sup> cellules/mL). Puis ils sont injectés dans la cellule de sédimentation. Après homogénéisation, les PNN sédimentent pendant trente minutes. Suite à ce laps de temps la prise d'images est effectuée grâce à une caméra CCD (Sony, Japon) reliée à un microscope IMT-2 (Olympus, Japon).

Le plan de prise d'images a été déterminé précisément et reste le même pour toutes les expériences afin d'éviter le biais métho-



biologique qui pourrait être introduit et permet une totale et réelle randomisation de la prise d'images des échantillons.

TRAITEMENT DES IMAGES

La prise de photo est effectuée immédiatement après les trente minutes de sédimentation.

Pour chaque expérience, 200 images sont réalisées afin d'effectuer une étude statistique des résultats. Les images sont numérisées grâce à un convertisseur analogique-numérique et sont enregistrées sous un format de 768 x 574 pixels. Elles sont traitées à l'aide du logiciel Visilog 5.1 (Noesis, France). Les résultats des expériences se présentent sous la forme des coordonnées cartésiennes des centres de toutes les cellules présentes sur chaque image.

CALCUL DES CARACTÉRISTIQUES DE LA DISTRIBUTION

L'étude de la fonction « g(r) », appelée fonction de distribution radiale ou fonction de corrélation de paire nous renseignera sur le mécanisme de dépôt des PNN. Le facteur « g(r) » marque l'écart par rapport à un dépôt totalement aléatoire.

Les paramètres obtenus par le traitement informatique sont :

- le taux de couverture moyen :  $\theta = \langle n \rangle b/B(1)$
- $\langle n \rangle$  : nombre de neutrophile moyen,
- b : aire recouverte par une cellule,
- B : aire totale d'une photo ;
- la fonction de distribution radiale en fonction du taux de couverture :

$g(r) = n_i/qA_i n_{ref}(2)$   
 Ai : aire de l'anneau défini par les disques de rayon « iω » et de rayon « (i + 1)ω » .  
 n<sub>ref</sub> : nombre de particules ayant servi de référence.  
 q : densité moyenne de particules adsorbées à la surface.

QUANTIFICATION DES MOLÉCULES D'ADHÉSION EXPRIMÉES À LA SURFACE

Afin de vérifier l'état physiologique des PNN, une détermination du nombre de molécules d'adhésion (CD11a/CD18, CD11b/CD18, CD11c/CD18 et CD62L) exprimées à la surface membranaire est effectuée après isolement des PNN dans les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées lors des expériences de sédimentation. Ces molécules sont mises en évidence par une réaction d'immuno-fluorescence indirecte qui

permet la quantification de ces molécules à la surface membranaire grâce à l'utilisation d'un système QIFIKIT (Dako) et d'un cytomètre en flux FACScann (Becton Dickinson).

LOCALISATION DES RÉCEPTEURS MEMBRANAIRES : ÉTUDE PAR MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE À SECTIONNEMENT OPTIQUE

Les études de fluorescence sont réalisées sur un microscope inversé de fluorescence IX-70 (Olympus, Japon) équipé d'un système d'acquisition optique CellScanTM (Scanalytics, USA) utilisant un objectif x 100/0.95NA (coupe = 0,25 μm). Ce dispositif conduit à la restauration d'une image 3D et à une quantification de fluorescence par un calcul EPR (Electron Proton Reassignment). Les images sont enregistrées grâce à une caméra 12 bit CCD Slow Scan Coding (Princeton Instruments Inc., USA). La fonction de déflouage du système optique est caractérisée par une série de coupes optiques de billes fluorescentes (0,17 μm de diamètre) (Microscope point source kit, Molecular Probes, USA).

RÉSULTATS

L'acceptation d'une expérience dépend de l'homogénéité du dépôt cellulaire à la surface : la pente de la droite doit être comprise entre -0.05 et 0.05 (fig. 1). Si le dépôt cellulaire est homogène, l'expérience est acceptée pour la suite de l'étude.

CONCENTRATION CELLULAIRE ET TAUX DE COUVERTURE

La viabilité cellulaire a été estimée à 99 % (test au bleu de Trypan). La pureté de la suspension cellulaire est estimée à 70 %. Après sédimentation, les PNN conservent les mêmes caractéristiques morphologiques.

L'influence de la concentration cellulaire sur le taux de couverture a été étudiée. On constate une corrélation entre la concentration cellulaire et le taux de couverture (fig. 2) avec R<sup>2</sup> = 0,99, ce qui traduit la formation d'une monocouche cellulaire à la surface pour les concentrations étudiées.

ÉTUDE DE LA RÉPARTITION DES PNN QUIESCENTS

En observant le dépôt des neutrophiles en temps réel, on constate qu'ils ne se s'immobilisent pas immédiate-

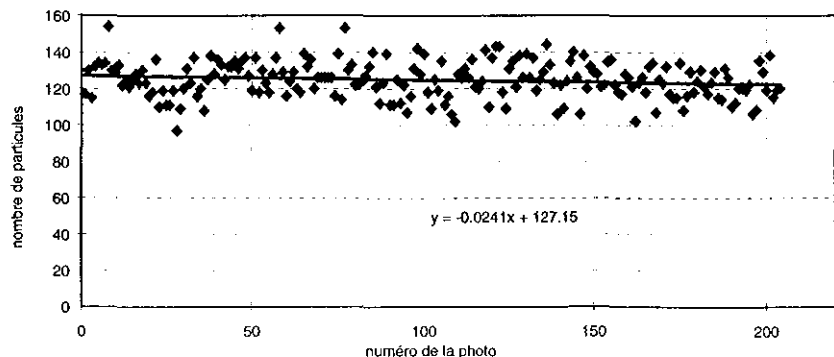


FIG. 1. – Homogénéité du dépôt cellulaire à la surface.

*Homogeneity of cell deposit at the surface.*

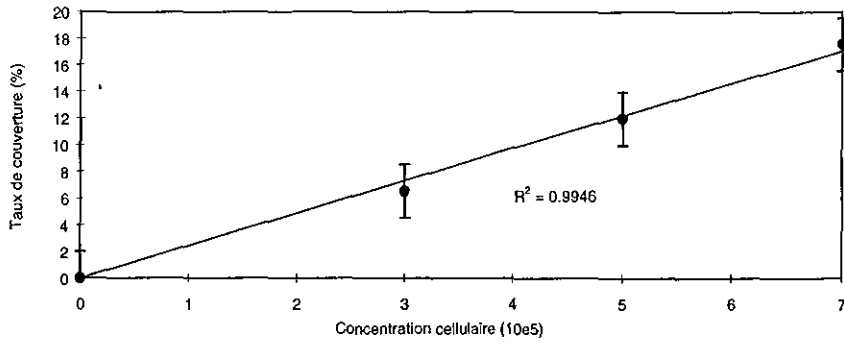


FIG. 2. – Influence de la concentration cellulaire sur le taux de couverture.  
Influence of cell concentration on surface coverage.

ment après leur dépôt sur la lamelle mais se déplacent légèrement avant de se fixer à la surface. On peut donc penser que les cellules sont fixées sur le fibrinogène par des pontages macromoléculaires établis entre le fibrinogène et son récepteur, CD11b/CD18. Il est donc possible que les cellules explorent la surface avant d'adhérer de façon irréversible à leur substrat ainsi que cela a déjà été décrit pour les globules rouges (15).

La figure 3 présente l'évolution de  $g(r)$  en fonction de la distance «  $r/D$  » (avec «  $r$  » : distance centre-à-centre de deux particules prises au hasard et «  $D$  » : diamètre du PNN). D'après les modèles théoriques et d'après les expériences réalisées avec des particules de synthèse, cette courbe doit présenter des pics au niveau des multiples des diamètres des particules ( $D, 2D, 3D$ ) (19). On constate ainsi pour chaque taux de couverture l'apparition d'un pic correspondant au pic des premiers voisins. Le pic des seconds voisins n'est jamais observé même pour les taux de couvertures expérimentaux les plus élevés (25%). Ce résultat est en accord avec les résultats obtenus avec des particules de synthèse pour lesquelles l'apparition du second pic se fait pour des taux de couverture supérieurs à 30 % (25).

L'épaulement autour de «  $r/D$  » = 1 pour les valeurs inférieures à 1 peut avoir deux raisons : (i) une déformation des cellules lors du dépôt (cellules « molles ») et (ii) plus probablement la présence d'un certain nombre de cellules à la surface qui ont un diamètre réel inférieur à celui pris en compte pour le calcul de  $g(r)$ .

Par ailleurs, on constate qu'il existe, ainsi que cela a été décrit (19), une saturation à 1 pour les grandes valeurs de

«  $r/D$  ». Cette saturation montre que la densité ponctuelle autour d'une cellule de référence est égale à la densité moyenne de la surface totale pour les grandes valeurs de «  $r/D$  ».

ÉTUDE DE LA RÉPARTITION DES PNN STIMULÉS PAR LE FMLP

Contrôle de l'état d'activation des PNN

Afin de contrôler l'état d'activation de PNN après leur purification et leur stimulation par le FMLP, une étude en cytométrie de flux a été réalisée. On remarque, pour les PNN non stimulés, que le niveau d'expression varie de façon considérable selon les molécules considérées. Tandis que l'expression en surface des molécules CD11a, CD11c et CD62L reste inférieure à 20 000 molécules par cellule, l'expression de CD11b et CD18 est 5 fois supérieure.

Deux conditions d'incubation ont été testées (15 minutes à  $t^\circ$  ambiante ou 30 minutes à  $37^\circ\text{C}$ ). Dans les 2 cas, on constate une augmentation significative des niveaux d'expression cellulaire des intégrines CD11b et CD18 ; en effet le nombre de molécules CD11b est augmentée de 1,6 fois ou 1,9 fois, l'expression membranaire de CD18 est multipliée par un facteur 1,3 ou 1,5 selon la condition expérimentale (fig. 4). Le taux d'expression de CD11a, CD11c et CD62L ne varie pas de façon significative quelles que soient les conditions expérimentales d'incubation.

Ainsi, malgré l'expression importante de CD11b et CD18 chez les témoins, on note l'importance de l'activa-

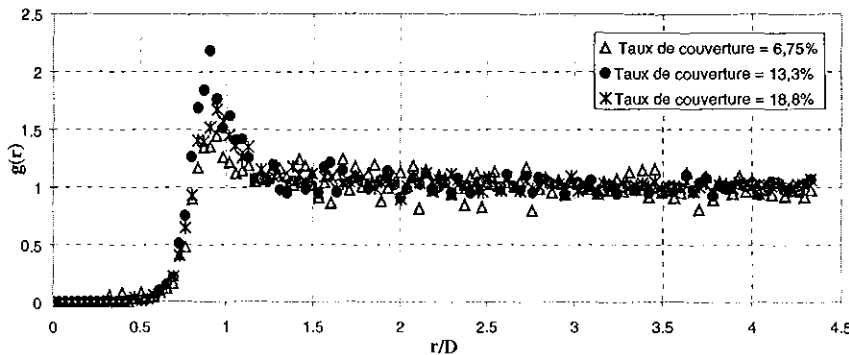


FIG. 3. – Fonction de distribution radiale  $g(r)$  pour différents taux de couverture de PNN quiescents.

The radial distribution function  $g(r)$  for different surface coverages of quiescent PMN.

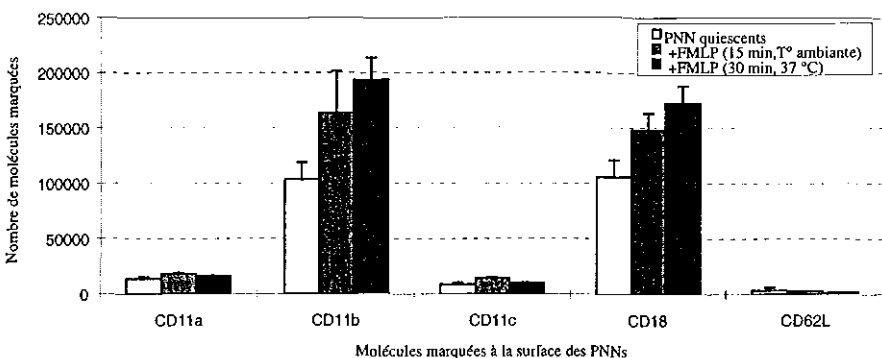


FIG. 4. - Expression des molécules d'adhésion à différentes conditions expérimentales.

*Expression of adhesion molecules in different experimental conditions.*

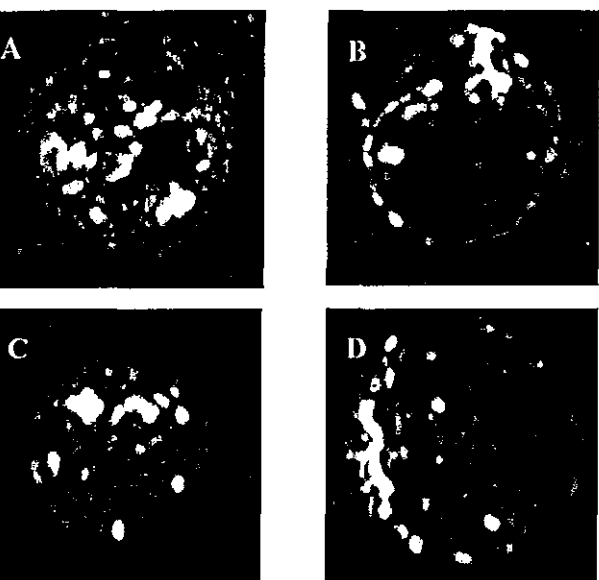


FIG. 5. - Distribution des molécules CD11b sur des PNNs quiescents (A) ou stimulés au FMLP (B) et des molécules CD18 sur des PNNs quiescents (C) ou stimulés au FMLP (D).

*Distribution of CD11b molecules on quiescent (A) or FMLP stimulated (B) PMNs and CD18 molecules on quiescent (C) and FMLP stimulated (D) PMNs ( $\times 100$ , NAO.95, CellScan, Biomis).*

tion par le FLMP. Ces résultats sont en accord avec d'autres études ayant démontré une rapide translocation de CD11b/CD18 à partir de granules cytoplasmiques vers la membrane plasmique chez les PNN activés (11).

Une expérience en microscopie de fluorescence a été réalisée dans le but d'étudier la localisation des molécules d'adhésion à la surface des PNN. On constate une polarisation des molécules en surface après stimulation (fig. 5).

**Répartition des PNN stimulés par le FMLP**

Pour un taux de couverture identique, l'amplitude du pic des premiers voisins est diminuée dans le cas des PNN stimulés comparativement aux PNN quiescents (fig. 6). Deux hypothèses peuvent être émises : (i) l'agrégation cellulaire induite par la stimulation peut entraîner une erreur d'évaluation du taux de couverture, (ii) le FMLP agit spécifiquement sur l'expression de CD11b/CD18 or d'autres molécules d'adhésion, telles que CD62L, sont impliquées dans l'adhésion des PNN à l'endothélium vasculaire.

**DISCUSSION-CONCLUSION**

Cette étude présente les résultats expérimentaux de l'adhésion de polynucléaires neutrophiles sur une surface de verre recouverte d'un substrat biologique, le fibrinogène. La variance du taux de couverture et la fonction de distribution radiale expérimentales ont été analysées et comparées aux modèles de dépôt connus.

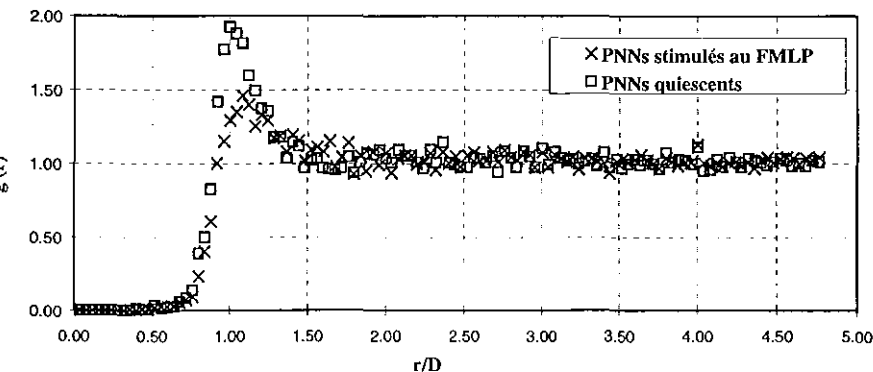


FIG. 6. - Fonction de distribution radiale pour un taux de couverture identique (19,5%) pour les PNN dans deux conditions physiologiques différentes.

*The radial distribution function  $g(r)$  for quiescent PMN and FMLP-stimulated PMN for a same surface coverage.*

Plusieurs modèles peuvent être envisagés pour caractériser le dépôt des cellules ; le modèle RSA (Random Sequential Adsorption) consiste en une suite d'événements d'adsorption séquentielle : un site d'adsorption est choisi au hasard, et s'il n'existe pas d'autres particules bloquant ce site, la particule choisie est placée et l'adsorption a lieu sur celui-ci sinon la particule est rejetée, et un nouveau site est choisi au hasard sur le reste de la surface pour un nouvel essai. Un autre modèle est celui du dépôt balistique : sous l'effet d'une force de gravitation importante, une particule n'est pas rejetée mais elle explore la surface par roulement sur des particules déjà adsorbées. Ceci est expérimentalement observé pour des particules lourdes et ayant un diamètre important (25).

Nos résultats ne permettent pas de déterminer avec exactitude le modèle de dépôt des PNN. En effet, en raison des limites méthodologiques liées au traitement d'image, les taux de couverture sont compris dans une gamme restreinte (6 à 25 %) et ne permettent pas de distinguer avec certitude les 2 modèles dont les divergences sont observées pour des taux de couverture supérieurs.

Cependant, il semblerait que les PNN se déposent à la surface suivant le modèle de dépôt balistique qui, tout en étant un modèle de dépôt aléatoire comme le modèle RSA, permet aux particules qui approchent de la surface de rouler sur celles qui y sont déjà fixées. Ce mécanisme donne lieu à un effet de surface exclue moins marqué que dans le modèle RSA, et conduit ainsi à une variance relative plus élevée pour un taux de recouvrement donné. Les cellules sédimenteraient donc au hasard malgré un état d'activation basal (traduit par une expression basale de CD11b/CD18 importante) (17, 18).

Nous ne pouvons pas appliquer de modèles connus à la loi de répartition des PNN stimulés. Cependant le processus d'adhésion des PNN stimulés sur le fibrinogène est différent de celui observé pour les PNN quiescents.

En conclusion, il semble nécessaire de poursuivre ces travaux en augmentant, dans la mesure du possible, le taux de couverture et en réalisant notamment des expériences supplémentaires pour les taux de couverture élevés ce qui permettrait de vérifier si les PNN se déposent suivant le modèle balistique ou non. Par ailleurs, il serait important d'introduire des modifications méthodologiques en soumettant les cellules à un flux afin de comparer les forces d'adhésion entre PNN quiescents et activés et à plus long terme de réaliser les mêmes expériences sur d'autres substrats : cellules endothéliales ou fibrinogène incluant des anticorps anti-molécules d'adhésion.

#### RÉFÉRENCES

- ADAMS D, SHAW S. Leukocyte-endothelial interactions and regulation of leukocyte migration. *The Lancet*, 1994 ; 343 : 831-6.
- ALTIERI DC, AGBANYOS F, PLESCIA J, GINSBERG M, EDGINGTON T, PLOW E. A unique recognition site mediates the interaction of fibrinogen with the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Biol Chem*, 1990 ; 265 : 12119-22.
- ANDERSON D, SPRINGER T. Leukocyte adhesion deficiency : an inherited defect in the Mac-1, LAF-1 and p150,95 glycoproteins. *Ann Rev Med*, 1987 ; 38 : 175-94.
- ARNAOUT M, SPTITS H, TERHOST C, PITT J, TODD III RF. Deficiency of a leukocyte surface glycoprotein (LF1-1) in two patients with Mol deficiency. *J Clin Invest*, 1984 ; 74 : 1291-300.
- ARNAOUT M. Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood*, 1990 ; 75 : 1037-50.
- CARLOS T, HARLAN J. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*, 1994 ; 84 : 2068-101.
- CHOLLET-MARTIN S, MONTRAVERS P, GILBERT C, ELBIM C, DESMONTS JM, FAGON JY, GOUGEROT POCIDALO MA. Subpopulation of hyperresponsive polymorphonuclear neutrophils in patients with adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis*, 1992 ; 146 : 990-6.
- DELAMAIRE M, MAUGENDRE D, MORENO M, LE GOFF MC, ALLANIC H, GENETET B. Exploration des différentes étapes du fonctionnement des polynucléaires neutrophiles chez les patients diabétiques. *J Mal Vasc*, 1995 ; 20 : 107-12.
- ERNST E, HAMMERSCHMIDT DE, BAGGE U, MATRAI A, DORMANDY JA. Leukocyte and the risk of ischemic diseases. *JAMA*, 1987 ; 257 : 2318-24.
- ETZIONI A, FRYDMAN M, POLLACK S, AVIDOR I, PHILLIPS ML, PAULSON JC, GERSHONI-BARUCH R. Brief report : recruitment sever infections caused by a novel leukocyte adhesion molecule deficiency. *N Engl J Med*, 1992 ; 327 : 1789-92.
- FEARON D, COLLINS L. Increased expression of C3b receptors on polymorphonuclear leukocytes induced by chemotactic factors and by purification procedures. *J Immunol*, 1983 ; 130 : 370-5.
- HUGHES B, HOLLERS JC, CROCKETT-TORABI E, WAYNE SMITH C. Recruitment of CD11b/CD18 to the neutrophil surface and adherence-dependent cell locomotion. *J Clin Invest*, 1992 ; 90 : 1687-96.
- HYNES RO. Integrins : versability, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell*, 1992 ; 69 : 11-25.
- JANG Y, LINCOFF AM, PLOW EF, TOPOL EJ. Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*, 1994 ; 24 : 1591-7.
- LAVALLE P, STOLTZ JF, SENGER B, VOEGEL JC, SCHAAF P. Red blood cell adhesion on a solid/liquid interface. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996 ; 93 : 15136-40.
- LO SK, VAN SEVENTER GA, LEVIN SM, WRIGHT SD. Two Leukocyte receptors (CD11a/CD18 and CD11b/CD18) mediate transient adhesion to endothelium by binding to different ligands. *J Immunol*, 1989 ; 143 : 3325-9.
- MACEY MG, JIANG XP, VEYS P, MCCARTHY D, NEWLAND AC. Expression of functional antigens on neutrophils — Effects of preparation. *J Immunol Methods*, 1992 ; 149 : 37-42.
- MACEY MG, MCCARTHY DA, VORDERMEIER S, NEWLAND AC, BROWN KA. Effects of purification methods on CD11b and L-selectin expression as well as the adherence and activation of leukocytes. *J Immunol Methods*, 1995 ; 181 : 211-9.
- MANN EK, WOJTASZCZYK P, SENGER B, VOEGEL JC, SCHAAF P. A paradox resolved : apparently identical radial distribution functions, different density variances. *Europhysics letters*, 1995 ; 30 : 261-5.
- MCCARTHY D, TAYLOR MJ, BERNHAGNE J, PERRY JD, HAMBLIN AS. Leukocyte integrin and CR1 expression on peripheral blood leukocytes of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 1992 ; 51 : 307-12.
- PALMER S, HAMBLIN AS. Increased CD11/CD18 expression on the peripheral blood leukocytes of patients with HIV disease : relationship to disease severity. *Immunology*, 1993 ; 93 : 344-9.
- SHAKOOR Z, HAMBLIN AS. Increased CD11/CD18 expression on peripheral blood leukocytes of patients with sarcoidis. *Clin Exp Immunol*, 1992 ; 90 : 99-105.
- STEWART GJ. Neutrophils and deep venous thrombosis. *Haemostasis*, 1993 ; 23 : 127-32.
- SUGIMORI T, GRIFFITH D, ARNAOUT A. Emerging paradigms of integrin ligand binding and activation. *Kidney Int*, 1997 ; 51 : 1454-62.
- WOJTASZCZYK P, SCHAFF P, SENGER B, ZEMBALA M, VOEGEL JC. Statistical properties of surfaces covered by large spheres. *J Chem Phys*, 1993 ; 99 : 7198-208.
- WRIGHT S, WEITZ J, HUANG A, LEVIN S, SILVERSTEIN S, LOIKE J. Complement receptor type three (CD11b/CD18) of human polymorphonuclear leukocytes recognizes fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988 ; 85 : 7734-8.

MISES AU POINT

# HÉMORHÉOLOGIE ET CELLULES ENDOTHÉLIALES VASCULAIRES

J.F. STOLTZ (1), M. BOISSEAU (2), S. MULLER (1), X. WANG (1), S. LEGRAND (1), M.V. LABRADOR (1)

(1) Laboratoire d'Angiohématologie-Hémorhéologie, LEMTA UMR CNRS 7563, Faculté de Médecine, 54500 Vandœuvre-les-Nancy, France.

(2) Laboratoire d'Hématologie, Faculté de Médecine, 33000 Bordeaux, France.

RÉSUMÉ :

**Hémorhéologie et cellules endothéliales vasculaires.**

A l'interface entre le sang et les tissus, l'endothélium représente un organe essentiel en physiologie vasculaire. Il est impliqué dans la plupart des maladies cardio-vasculaires, de l'athérosclérose, des phénomènes de thrombose et des processus d'inflammation. Le but de cette revue est de montrer comment, grâce à un double déterminisme de leurs fonctions, les cellules endothéliales jouent un rôle prépondérant dans le contrôle de l'homéostasie, des phénomènes hémorhéologiques, de la coagulabilité du sang et de l'adhésion cellulaire. En effet, l'endothélium est le siège de la synthèse des médiateurs vaso-actifs ou antithrombosants majeurs. A travers la balance prostacycline-oxyde nitrique/endothéline 1, son action vasodilatatoire peut être modifiée. Au niveau du contrôle de l'hémostase, l'endothélium met en jeu des réactions complexes avec son environnement. Ainsi, la thrombomoduline, le facteur Von Willebrand et le « tissue factor pathway » (TPF), sont des facteurs impliqués dans la fibrinolyse et la coagulation. Par ailleurs, la modulation de l'expression des molécules d'adhésion assure la régulation des propriétés d'adhésion.

Tous les produits dérivés de l'endothélium sont sujets à une régulation par les contraintes mécaniques développées par l'écoulement sanguin appelé « mécanotransduction ». C'est pourquoi la connaissance de l'ensemble des propriétés rhéologiques des cellules endothéliales et la maîtrise des phénomènes régissant la modulation de son double déterminisme est un élément clé dans la compréhension des maladies cardio-vasculaires. (J Mal Vasc 1999; 24: 99-109)

**Mots-clés :** Hémorhéologie — Cellules endothéliales — Adhésion — Thrombose — Molécules d'adhésion — Mécanotransduction

ABSTRACT :

**Hemorheology and vascular endothelial cells.**

The vascular endothelium is a biologically active monolayer of cells providing an interface between the blood flow and tissues. Vascular Endothelial Cells (VEC) have two functional states. The endothelium is normally anti-thrombotic and anti-adhesive to ensure blood fluidity. During aggressions, such as atherosclerosis, inflammation states, metabolic diseases (through chemical or mechanical stimuli), VEC can reverse its functions by expressing stored material or by slower involvement of previously repressed genes.

Endothelial cells have three types of anti-thrombotic properties: vaso regulating properties: VEC release vasomotor components, such as endothelin (vasoconstriction), prostacyclin and nitric oxide (vasodilatation).

Endothelial cells also have antithrombotic and hemostatic properties. They express proteoglycans on their surface, including some negative-charge, plasminogen, sulfate glycoaminoglycans (heparane-sulfate), and secrete plasminogen tissular activator (t-PA) and tissular factor inhibitor. One fundamental action of the endothelium in that area is the production and expression of thrombomodulin, a thrombin receptor. This function has a major anticoagulation effect, controlling continual thrombin generation at the sub-endothelium and blood cell interface. Moreover, endothelial cells show anti-adhesion properties. During cardio-vascular diseases, all of these properties may be reversed.

Thus, the VEC have a determinant role in hemodynamic control through these various metabolic activities, such as control of homeostasis, vascular tone, blood fluidity, coagulating properties, cellular adhesion. Otherwise, many studies have demonstrated that local blood flow conditions have a crucial role on the VEC properties (mechanoactivation and mechanotransduction concept). In conclusion, knowledge of all the properties of the endothelial cells and control of the phenomena which define their functions is a key element in understanding cardiovascular diseases. (J Mal Vasc 1999; 24: 99-109)

**Key-words :** Hemorheology — Endothelial cells — Adhesion — Thrombosis — Adhesion molecules — Mechanotransduction

Reçu le 4 août 1998.

Acceptation par le comité de Rédaction le 21 octobre 1998.

Tirés à part : J.F. STOLTZ, adresse ci-dessus.

## INTRODUCTION

Les cellules endothéliales vasculaires forment une couche monocellulaire sur tous les vaisseaux de la circulation sanguine, dont le poids total est estimé à 1,5 kg. Elles acquièrent des propriétés spécifiques qui les différencient selon le territoire anatomique ce qui rend leur étude d'autant plus difficile. Initialement il était admis que leur fonction primordiale était d'être une barrière destinée à s'opposer aux fuites protéiques tout en permettant la diffusion des nutriments aux tissus. Cependant, les travaux princeps de Palade sur les organelles (qui lui ont valu le prix Nobel) et ceux de Florey ont démontré le rôle original de ces cellules aux activités multiples.

On sait aujourd'hui que leur rôle est déterminant dans le contrôle de l'hémodynamique à travers leurs activités métaboliques (contrôle de l'homéostasie, tonus vasculaire, fluidité et coagulabilité du sang, adhésion cellulaire...) (6). D'autre part, depuis plus d'un siècle, des questions se posent sur le rôle des caractéristiques d'écoulement du flux sur l'ensemble des propriétés des cellules endothéliales. En effet, après que Poiseuille ait établi les lois régissant la dynamique des fluides (55), de nombreuses questions se sont posées concernant les propriétés des écoulements sanguins au niveau de l'arborescence vasculaire qui présente des disparités très importantes du point de vue de la taille et de l'épaisseur des vaisseaux. En 1893, Thoma propose une relation entre le diamètre des vaisseaux et la vitesse du flux. Plusieurs décennies plus tard, Fry (1968) décrit des modifications de l'endothélium vasculaire en relation avec le gradient de la vitesse pariétale (29). En 1981, Dewey parle d'une réponse dynamique des cellules endothéliales vis-à-vis des forces de cisaillement (23). Des travaux plus récents ont souligné le rôle déterminant des conditions locales d'écoulement sur leurs propriétés (21). Il est maintenant admis de parler d'un phénomène de mécanotransduction.

Par ailleurs, au niveau de la microcirculation, les cellules endothéliales des microveinules (versant veineux de la microcirculation) sont particulièrement actives et représentent le siège physiologique majeur des échanges liquidiens (perméabilité) et surtout du transit cellulaire. Au cours de l'ischémie critique les veinules dites post-capillaires sont fortement impliquées ainsi que les capillaires d'amont, souvent dilatés (60).

Enfin, les propriétés des cellules endothéliales peuvent être altérées ou modifiées dans de nombreuses pathologies (athérosclérose, hypertension, inflammation, maladies métaboliques...) (5, 9, 67).

Dans ce travail, différents aspects des propriétés des cellules endothéliales sont envisagés, en particulier l'incidence des contraintes mécaniques locales de l'écoulement.

#### RAPPELS CONCERNANT LES DEUX ÉTATS FONCTIONNELS DES CELLULES ENDOTHÉLIALES VASCULAIRES

L'endothélium est normalement antithrombosant et antiadhésif de façon à assurer la fluidité sanguine. Au

cours d'agressions souvent multifactorielles (agonistes et/ou cytokines) l'endothélium peut inverser ses fonctions par expression de matériel stocké ou par une action plus lente de mise en jeu de gènes jusque-là réprimés. Un double déterminisme existe : arrêter le saignement par oblitération des microvaisseaux et provoquer ce transit cellulaire à l'appel de chémoattractants de l'inflammation. Ces effets, qui sont bénéfiques a priori, deviennent par contre détériorants au cours de l'ischémie.

## ACTION ANTITHROMBOSANTE

L'action antithrombosante et « fluidifiante » des cellules endothéliales est due à trois séries de propriétés qui se combinent.

**Propriétés vasorégulatives**

Comme l'endothélium des gros vaisseaux et des artères, l'endothélium microcirculatoire libère les composants de l'équilibre vasomoteur : endothéline vasoconstrictive et prostacycline (PGI<sub>2</sub>) et nitrite d'oxyde (NO) vasodilatateurs (15).

**Propriétés antithrombosantes**

Les cellules endothéliales expriment à leur surface des protéoglycanes comprenant des glycoaminoglycanes sulfatés (héparane-sulfaté) à charges négatives. Elles sécrètent l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) et l'inhibiteur du facteur tissulaire. Une action fondamentale de l'endothélium dans ce domaine est la production et l'expression d'une glycoprotéine transmembranaire : la thrombomoduline, récepteur de la thrombine. Cette protéine constitue alors un complexe qui active la protéine C. Il s'agit là d'une fonction importante anticoagulante, maîtrisant la génération constante de thrombine à l'interface du sous-endothélium et des cellules sanguines. L'endothélium exerce des activités anticoagulantes par d'autres voies telles que la captation et la dégradation de substances thrombogènes (ADP, 5-HTP) et par l'effet des produits vasomoteurs sur les plaquettes (32).

**Propriétés anti-adhésives**

À l'état non activé, les cellules endothéliales expriment peu de récepteurs d'adhésion. Les « intercellular adhesion molecules-1 » ou ICAM-1, qui sont les ligands principaux des intégrines leucocytaires responsables de l'adhésion des leucocytes à l'endothélium, sont sous-exprimés dans la cellule au repos, contrairement à ICAM-2, constitutives de la cellule au repos.

## ACTION THROMBOSANTE ET ADHÉSIVE

Au cours de l'inflammation en particulier, les propriétés des cellules endothéliales s'inversent. Sur le plan vasomoteur, l'équilibre se maintient fréquemment au profit de la vasodilatation : production de NO due aux agonistes, synthèse accrue de PGI<sub>2</sub> par activation de la phospholipase A2. Parallèlement, les variations des contraintes locales peuvent modifier la sécrétion des produits vasomoteurs.

### Propriétés coagulantes

Dans ce cas, la thrombomoduline est sous-réglée et n'apparaît plus à la surface endothéliale. De plus, les cellules expriment du facteur tissulaire capable de se lier au VIIa plasmatique. A partir de là, la production de thrombine pourra s'effectuer, d'autant plus facilement que les facteurs IXa et X ont des sites de liaison sur l'endothélium. Sur le plan de la fibrinolyse, le PAI-1, inhibiteur de l'activateur du plasminogène d'origine endothéliale, est augmenté et le t-PA est sous-réglé au niveau génique.

### Effet adhésif

Les éléments figurés du sang, notamment les leucocytes et les plaquettes, adhèrent à l'endothélium dans des conditions physiopathologiques (31, 37). En particulier, l'adhésion des leucocytes est particulièrement importante lors de la formation d'une plaque athéromateuse. Elle se manifeste par plusieurs vagues successives d'expression de récepteurs (10, 11). Les différents mécanismes de l'adhésion des leucocytes à l'endothélium ont été récemment précisés (4). Les déterminantes de ce phénomène sont l'histamine, la bradykinine, la thrombine et surtout les radicaux libres oxygénés apparaissant lors d'épisodes de reperfusion par du sang oxygéné.

D'un point de vue cinétique, l'adhésion des leucocytes se divise en adhésion instable ou « rolling » et en adhésion stable.

### CELLULE ENDOTHÉLIALE ET SYNTHÈSES DE MÉDIATEURS VASOACTIFS

Les cellules endothéliales ont une activité métabolique intense et diversifiée. Elles possèdent des enzymes qui inactivent la bradykinine et transforment l'angiotensine I en angiotensine II vasoactif. De plus, la cellule endothéliale synthétise différentes protéines telles que le facteur von Willebrand (VWF), l'activateur tissulaire du plasminogène, des agents vasoactifs tels que la prostacycline, l'endothéline-1 (ET-1) ou l'oxyde nitrique (NO) (22).

### LA PROSTACYCLINE

Parmi les prostaglandines synthétisées, la prostacycline a un rôle déterminant. Découvert en 1976 par Vane *et al.*, la prostacycline est un des dérivés de l'acide arachidonique. La quantité de prostacycline synthétisée par le tissu vasculaire est plus importante à la surface de l'intima et décroît vers l'adventice. Les cellules endothéliales sont les plus actives dans cette synthèse. L'enzyme qui permet la transformation des endoperoxydes en prostacycline est la prostacycline synthétase humaine qui a été clonée récemment (1994). La synthèse de prostacycline est également contrôlée par les cyclo-oxygénases : COX-1 exprimée par la plupart des tissus et COX-2 particulièrement importante pour la synthèse des prostaglandines dans l'inflammation et qui est d'un intérêt fondamental pour l'étude de nouvelles molécules anti-inflammatoires.

La prostacycline est un agent hypotenseur dont le mécanisme principal est lié à son effet vasodilatateur. Par

ailleurs, la prostacycline est le plus important des inhibiteurs endogènes de l'agrégation plaquettaire, mais aussi de leur adhésion (interactions collagène-plaquettes). Cet effet, cependant, ne s'applique que sur une courte période de temps (inférieur à 30 min). Enfin, la prostacycline, comme d'autres prostaglandines, aurait un effet cytoprotecteur ce qui expliquerait certaines de ses propriétés thérapeutiques.

### ENDOTHELIN-1 (ET-1)

L'endothélium vasculaire synthétise un peptide, l'endothéline-1, dont trois formes sont connues (ET1, 2 et 3) (2, 39). L'ET-1 dérivé d'un prépropeptide qui conduit à une forme de 38 acides aminés qui, après clivage protéolytique, donne l'ET-1 (41). L'ET-1 est un des vasoconstricteurs les plus actifs, avec un potentiel 10 fois supérieur à celui de l'angiotensine II. D'un point de vue rhéologique, il a été démontré que des cellules endothéliales en culture, soumises à un écoulement périodique, produisent rapidement (< 20 min) de l'ET-1 avec un effet prolongé de plusieurs heures. Ce relargage (release) est dépendant de la synthèse de protéines (3).

Il existe au moins deux récepteurs d'ET : ET<sub>A</sub> avec une grande affinité pour l'ET-1 et ET<sub>B</sub> pouvant fixer les trois formes d'endothéline (57).

### EDRF/OXYDE NITRIQUE

L'EDRF/NO (endothelium-derived relaxing factor) est un agent vasodilatateur instable dont l'effet aléatoire a été souligné dès 1980 par Furchgott (30). Il faut cependant attendre 1987 pour que Palmer *et al.* montrent que l'oxyde nitrique (NO) et l'EDRF représentent une même molécule. Il est synthétisé dans la cellule endothéliale à partir d'une L-arginine. Trois isoformes de NO synthase ont été clonées : deux sont Ca<sup>++</sup> dépendantes et la troisième est inducible par les cytokines.

D'un point de vue physiologique, le NO inhibe l'agrégation et l'adhésion des plaquettes avec une synergie très marquée avec l'action de la prostacycline. D'autre part, la libération de NO par le cisaillement local ou par stimulation, joue un rôle déterminant pour la régulation du flux sanguin. Sa production est modifiée dans les syndromes inflammatoires (33). Son effet antiagrégant et vasodilatateur est mis à profit en thérapeutique (58).

### CELLULES ENDOTHÉLIALES ET HÉMOSTASE

#### FONCTIONS ANTITHROMBOSANTES

La cellule endothéliale sécrète des substances antiplaquettaires. Une ecto-ADPase permet, à la surface cellulaire, la destruction d'ADP provenant en particulier des globules rouges (facteur R). La production de NO, constante sous un cisaillement normal, est antiagrégante. Enfin, dans les mêmes conditions, l'activation de la phospholipase A2 induit la production de prostacycline (PGI<sub>2</sub>),

antiagrégante, de demi-vie de 6 minutes, supérieure à celle du thromboxane plaquettaire. Ce produit est également formé à partir d'endoperoxydes (PGG<sub>2</sub> et PGH<sub>2</sub>) produits par activation plaquettaire et transférés à la paroi. La PGI<sub>2</sub> n'a pas d'action sur l'adhésion plaquettaire ; en revanche, le NO développe une telle action, mais pour des vitesses de cisaillements pariétales élevées entre 300 et 1600 s<sup>-1</sup>. La production de NO et de PGI<sub>2</sub> est provoquée par de nombreux agonistes et apparaît comme un moyen de défense essentiel.

La cellule endothéliale intervient dans la fibrinolyse en sécrétant, sous l'influence de divers stimuli, les activateurs du plasminogène t-PA et SCU-PA ainsi que l'inhibiteur PAI-1. A leur surface, ces substances s'associent en complexes macromoléculaires qui ne se défont qu'au contact de la fibrine.

Par ailleurs, l'endothélium produit des récepteurs membranaires qui réagissent avec les protéines plasmatiques anticoagulantes. Le sulfate d'héparane interagit avec l'antithrombine III, le sulfate de dermatane avec le cofacteur 2 de l'héparine. De manière générale, ces glycoaminoglycans jouent un rôle d'héparinoïdes et contribuent à l'inertie de l'endothélium vis-à-vis de la thrombose.

La thrombomoduline, exprimée en molécule transmembranaire au niveau de l'endothélium, lui confère une fonction antithrombotique. Elle constitue un récepteur et un régulateur non enzymatique de la thrombine. Elle augmente considérablement la capacité de la thrombine à activer la protéine C. De plus, la protéine S augmente la vitesse de réaction du substrat thrombine-protéine C-thrombomoduline aboutissant à l'apparition de protéine C activée (PCA), anticoagulant majeur.

Enfin, le TFPI (tissue factor pathway inhibitor) est partiellement produit par l'endothélium, développant une action inhibitrice fondamentale sur le complexe facteur tissulaire-Xa.

## FONCTIONS THROMBOTIQUES

Autant l'endothélium est protecteur de l'intégrité vasculaire, en particulier au niveau de la microcirculation, autant il peut acquérir des fonctions inverses conduisant à l'oblitération des vaisseaux et à la nécrose. Ce déterminisme opposé correspond à une volonté de protection contre l'hémorragie ou à l'élimination du tissu détruit (65). Même à l'état de protection vasculaire, l'endothélium participe à la charge thrombotique. Les cellules endothéliales produisent également des substances conjonctives et des adhésines, qui complètent la matrice sous-endothéliale : microfibrilles, élastine, fibronectine et thrombospondine. De même, elles contribuent à la déposition de facteur tissulaire sous sa face profonde. Enfin, elles accumulent dans les corps de Weibel-Palade le facteur Von Willebrand dont il est l'unique producteur.

Dès la diminution du flux, donc des contraintes de cisaillement et de la production de NO, l'endothélium sous-régule son pouvoir anticoagulant au profit du thrombotique. L'hypoxie, les radicaux libres, la thrombine, les agonistes vasoactifs et de nombreux produits de l'inflammation dont les cytokines de type IL-1 et TNF $\alpha$ , complètent et amplifient ces propriétés.

Cette activation de l'endothélium n'évolue pas toutefois systématiquement vers la lésion (nécrose), des systèmes de régulation permettent le retour à la situation inverse. En particulier, l'IL-8, produite par l'endothélium lui-même ou les macrophages, contribue à restituer l'état protecteur. De même, une reprise du flux et de la production de NO et de PGI<sub>2</sub> auront les mêmes effets.

L'émission des corps de Weibel-Palade est un phénomène précoce et rapide au cours de l'activation endothéliale. Les sacs de ces corps fusionnés aux membranes superficielles de l'endothélium sécrètent le facteur Von Willebrand, adhésine majeure des plaquettes sanguines et extériorisent la P-sélectine disponible pour l'adhésion leucocytaire, polynucléaires et monocytes.

Succédant à cette réaction rapide, la thrombomoduline est clivée en surface, au niveau de 5 ou 6 sites de la partie extramembranaire, clivage auquel contribuent les leucocytes adhérents (élastase). L'endothélium perd ainsi sa fonction principale de régulation de la thrombine, laquelle peut agir uniquement dans le sens de la thrombose. Les fragments de thrombomoduline constituent la thrombomoduline plasmatique, marqueur de l'activation endothéliale.

Du facteur tissulaire est produit à la face superficielle des cellules endothéliales, cependant moins qu'à la face profonde.

L'endothélium expose des récepteurs pour des facteurs activés de la coagulation comme le facteur IXa et le facteur Va. Ces récepteurs peuvent correspondre à l'expression, sur l'endothélium activé, de phosphatidylsérine (PS), lieu de développement de la thrombinase et donc d'une vague de thrombinogénèse. Il est à noter que le TFPI ne peut inhiber le facteur IXa produit au niveau du sous-endothélium dénudé, ce qui permet à ce produit une recherche des sites PS dans l'environnement cellulaire.

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

## MISE EN JEU DE COMPLEXES CELLULAIRES THROMBOTIQUES DANS L'ENVIRONNEMENT DE L'ENDOTHÉLIUM

Dans la grande majorité des cas, l'activation endothéliale, cause de la perte des fonctions antithrombotiques, s'accompagne de la mise au contact du sang avec le sous-endothélium soit par contraction des cellules, ménageant de larges espaces entre elles, soit par des lésions associées. Il se constitue des amas de plaquettes adhérentes au contact, par contiguïté, des zones d'activations endothéliales. De plus, les monocytes adhérents aux cellules endothéliales constituent un lien entre les plaquettes qui leur sont accolées et l'endothélium. Sur de telles liaisons, de larges surfaces de PS exposées permettent la génération de thrombine et une amplification considérable de la thrombinogénèse (11).

Ces phénomènes sont particulièrement actifs lors de la rupture de la coque fibreuse d'une plaque « molle » athéroscléreuse.



En fait, les nombreuses fonctions de l'endothélium vis-à-vis de l'hémostase et de la thrombose sont intriquées avec les autres propriétés, concernant l'adhésion des cellules leucocytaires et les propriétés vasomotrices. Certains produits endothéliaux sont localisés à l'interface, comme le NO et la PGI<sub>2</sub>, intervenant effectivement dans l'hémostase, l'adhésion et la vasomotricité.

### COMPORTEMENT RHÉOLOGIQUE DE LA CELLULE ENDOTHÉLIALE : LA MECANOTRANSDUCTION

#### PROPRIÉTÉS RHÉOLOGIQUES DES CELLULES ENDOTHÉLIALES

Etant donné la situation interfaciale des cellules endothéliales, la connaissance de leurs propriétés mécaniques est particulièrement importante (7). Si de nombreuses études ont étudié les modifications morphologiques dans des systèmes en flux, très peu ont été consacrées aux contraintes et aux déformations à l'intérieur de la cellule.

Les cellules endothéliales se comportent comme un matériau isotrope élastique. La déformation est plus faible au voisinage du noyau, indiquant une plus grande rigidité de celui-ci. Par ailleurs, les cellules endothéliales ont une motilité dans la direction de l'écoulement mais indifféremment dans le sens aval ou amont. L'explication de ce phénomène reste hypothétique ; en particulier s'agit-il d'un mécanisme passif ou actif ?

#### INFLUENCE DES CONDITIONS LOCALES DE L'ÉCOULEMENT SUR LA RÉPONSE DES CELLULES ENDOTHÉLIALES

L'influence des conditions hémodynamiques locales sur les cellules endothéliales (CE) a suscité un intérêt croissant au cours des dix dernières années (13, 66). Les

différents travaux publiés dans ce domaine ont tenté de mieux comprendre le rôle des CE dans la physiologie et la pathologie vasculaire et plus particulièrement de l'athérosclérose, mais aussi d'étudier la biocompatibilité de matériaux vasculaires (14). Les cellules endothéliales répondent aux forces hémodynamiques en modifiant leur morphologie et leur métabolisme (13, 15, 26). Les changements morphologiques comprennent l'allongement et l'orientation des cellules endothéliales parallèlement à la direction de l'écoulement et la réorganisation de filaments d'actine responsable de la mobilité et de l'adhésion cellulaire ainsi que le montre la figure 1 (28, 45, 53).

Les changements métaboliques comprennent principalement l'augmentation de la synthèse de la prostacycline, l'expression de l'activateur tissulaire du plasminogène, la régulation différentielle de l'expression des molécules d'adhésion, des proto-oncogènes, ainsi que les transferts ioniques (K<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup>) (16, 27, 35, 51). Les contraintes de cisaillement stimulent aussi la migration et la prolifération des cellules endothéliales (1, 12). D'autre part, il est sans doute important de considérer l'état des cellules lors de modifications des conditions locales d'écoulement. En effet, il a été montré que des cellules endothéliales en monocouche ne réagissent pas de la même façon que des cellules isolées. L'une des différences importantes entre le comportement des cellules endothéliales in vitro et in vivo est que les cellules in vitro ont un taux de renouvellement supérieur à leur renouvellement in vivo. Cependant, ce taux peut être réduit en soumettant une couche confluite à des contraintes de cisaillement supérieures à 30 dynes/cm<sup>2</sup> dans un écoulement laminaire. La co-culture de cellules endothéliales en contact avec des cellules musculaires lisses plus proche de la physiologie réduirait de moitié ce renouvellement cellulaire. Par ailleurs, des études in vitro mettent en évidence de nombreuses interactions entre les deux types de cellules (52).

Bien que les études réalisées aient permis de montrer les différents types de réponses à des forces extérieures, les mécanismes sont loin d'être totalement définis (17, 19,

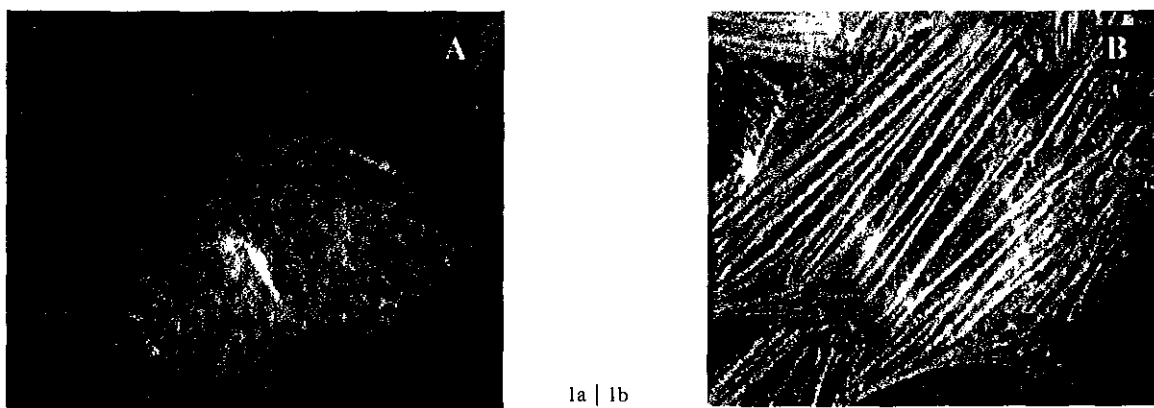


FIG. 1. — Influence des contraintes de cisaillement sur l'organisation des fibres d'actines du cytosquelette (71). Marquage spécifique de la F-actine par de la rhodamine-phalloïdine (2U/ml, 20 minutes à 37 °C), microscope de fluorescence IX70 Olympus, système CellScan™ (Bionis, France), (×100, NA 0.95). a. contrôle. b. flux laminaire,  $\tau=2$  Pa, 1 heure.

Modifications of the cytoskeleton of the VECs under flow conditions. Specific labeling with rhodamine-phalloidin (2U/ml, 20 min, 37 °C). Olympus microscope device IX70 (×100, NA 0.95, Cellscan™, Bionis, France). a. static control. b. laminar flow,  $\tau=2$  Pa, 1 hour.

20). Par ailleurs, les cellules répondent différemment selon les contraintes locales et les réponses sont fonction des variations temporelles des contraintes locales (régime stationnaire ou périodique) (13, 18).

MÉCANOTRANSDUCTION

La réponse des cellules endothéliales à des stimuli mécaniques concerne pratiquement tous les mécanismes liés à la croissance et au métabolisme cellulaire (46). Ainsi, les canaux ioniques, sensibles à l'étirement de la

membrane, l'adénylate cyclase, la protéine kinase C, ont une activité modifiée en réponse à une contrainte mécanique (42, 56, 67). Selon ces auteurs, il existerait des mécanorécepteurs de surface liés au cytosquelette. Les modifications du cytosquelette induites par les contraintes de cisaillement, conduiraient à des perturbations de l'équilibre cellulaire (50, 67), modifiant l'activité des récepteurs et canaux transmembranaires. Par ailleurs, le mécanisme de régulation de l'expression génique des molécules produites par la cellule endothéliale et intervenant dans ses fonctions, comme l'endothéline-1 (ET1), l'activateur tis-

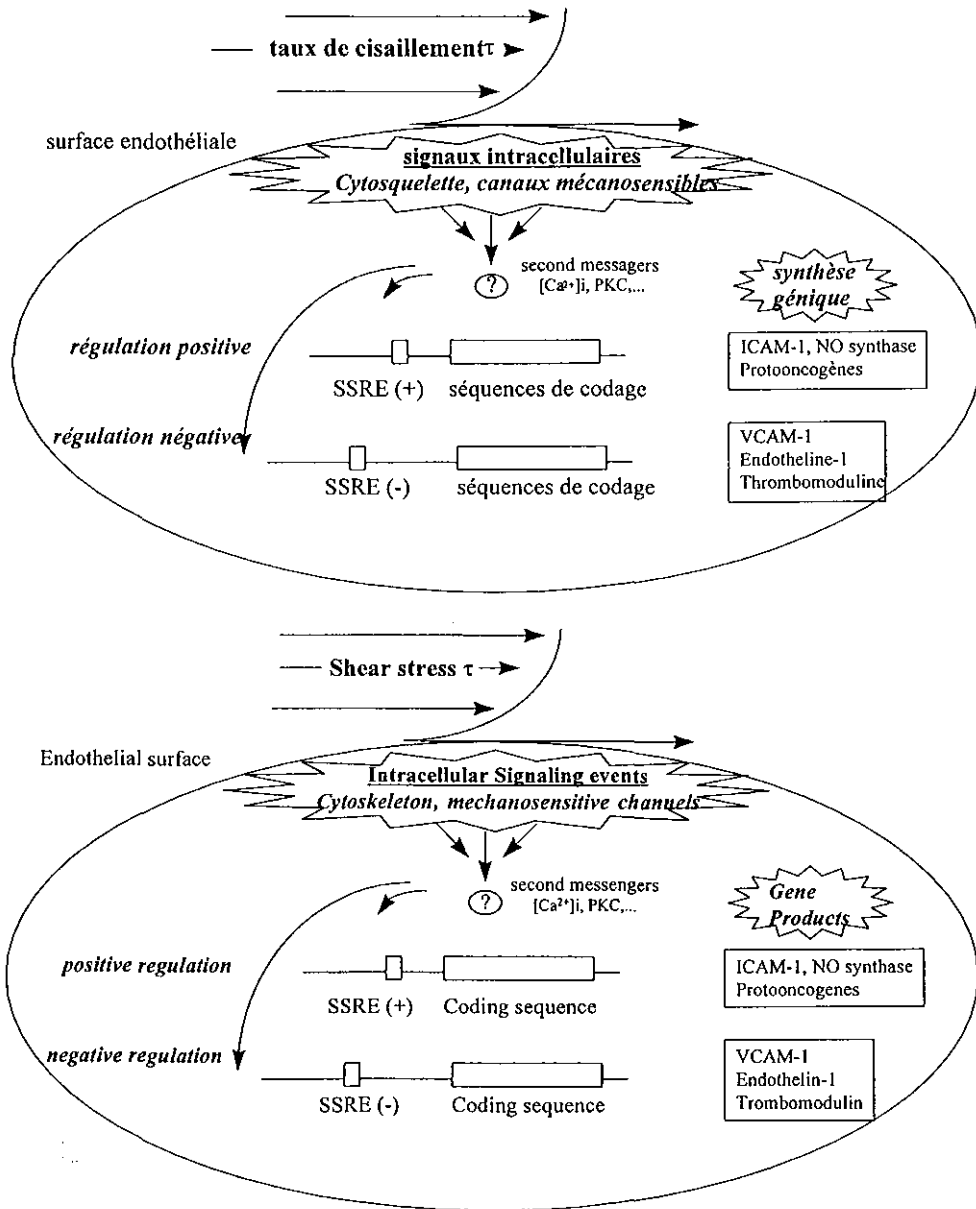


FIG. 2. – Contrôle des propriétés des cellules endothéliales par le phénomène de mécano-transduction (shear stress response element-SSRE : éléments de réponse aux contraintes de cisaillement).

Control of endothelial cell properties and mechanotransduction phenomenon. (SSRE: shear stress response element).

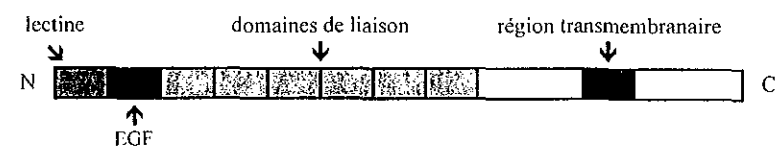


FIG. 3. – Représentation schématique de la structure de la E-sélectine humaine (EGF: endothelial growth factor, facteur de croissance endothélial).

Schematic representation of the human E-selectin structure (EGF: endothelial growth factor).

culaire du plasminogène (17, 24), la production de NO, le PDGF  $\alpha$  et  $\beta$ , les facteurs de croissance, la thrombomoduline (TB), les molécules d'adhésion (34, 43, 54, 59, 63), est influencé par l'écoulement. Un premier modèle moléculaire des étapes de la régulation de l'expression des gènes sous l'influence des contraintes a été envisagé (21, 47). Les contraintes activeraient des structures mécanosensibles, dont le cytosquelette, les points focaux d'adhésion, les canaux mécanosensibles, et modifieraient ainsi l'activité des récepteurs membranaires (25). Cette étape initiale est reportée ensuite au niveau des seconds messagers tels que le  $Ca^{++}$  intracellulaire, la protéine kinase C (PKC), l'AMP cyclique, la GMP cyclique, etc., qui subissent à leur tour des perturbations. Ces modifications profondes de l'équilibre des seconds messagers entraînera alors un changement des états d'activation des « DNA binding factors » (38, 42, 43).

L'étape finale se résume alors dans une altération de l'activité de transcription de nombreux gènes via des éléments de réponse aux contraintes de cisaillement locales (shear stress response elements, SSRE) positifs ou négatifs, ou une combinaison des deux, agissant à différentes périodes (fig. 2).

Différents types de réponses aux contraintes mécaniques ont été décrits. Ils se résument à des séquences spécifiques de la chaîne d'ADN. Par exemple, la séquence GAGACC des SSRE gère la réponse de l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA), de la NO synthase, de l'ICAM-1, etc. Ces effets vont gérer l'expression dépendante du temps des molécules fonctionnelles synthétisées par les cellules endothéliales. Ainsi, la réponse des cellules endothéliales en fonction des contraintes de flux peut être répertoriée en trois types :

1) type I : augmentation précoce transitoire (*c-fos*, *c-jun*, *c-myc*, PDGF...);

2) type II : augmentation continue de l'expression des ARNm (t-PA, NOS, ICAM1...);

3) type III : régulation biphasique : augmentation la 1<sup>re</sup> heure, suivie d'une décroissance rapide et continue jusqu'à la 12<sup>e</sup> heure (ET1, PDGF-B, TM, VCAM-1...).

Ces faits suggèrent qu'un grand nombre de SSRE pourraient être présents sur ou dans la cellule endothéliale et activables par des mécanismes de mécanotransduction. L'implication de facteurs de liaison, leur interaction ainsi que leur contribution à la balance transcriptionnelle finale commencent à être connues. Une caractérisation de la réponse de l'endothélium vis-à-vis des conditions locales d'écoulement et des mécanismes associés pourrait amener à une meilleure connaissance du développement de certaines pathologies vasculaires.

## MOLÉCULES D'ADHÉSION

L'adhésion intercellulaire est une étape importante dans les séquences complexes conduisant aux pathologies inflammatoires aiguës ou chroniques, aux maladies auto-immunes, dans le développement de l'athérosclérose ou de lésions vasculaires (49, 64, 68). Ces séquences d'adhésion intercellulaire sont rendues possibles grâce à des molécules dites « molécules d'adhésion » qui permettent les interactions entre les cellules de l'endothélium vasculaire et les différents éléments figurés du sang, notamment avec les leucocytes. En effet, les interactions des leucocytes circulants avec l'endothélium, « rolling » et adhésion, pendant les réactions immunes et inflammatoires sont dépendantes d'une série d'événements transitoires (44). Trois superfamilles de molécules d'adhésion vont intervenir dans ces processus.

Les sélectines, ou « lectin-epidermal growth factor-complement related cell adhesion molecule » (LECAMs; e.g. ELAM – endothelial leucocyte adhesion molecule – et GMP-140 – granule membrane protein 140), qui interagissent avec des ligands comprenant des carbohydrates.

Les intégrines, hétérodimériques : le « lymphocyte function associated antigen-1 (LFA-1), le « very late antigen-4 » (VLA-4) et « MAC-1 ».

Enfin, les membres de la superfamille des immunoglobulines (inter cellular molecule adhesion – ICAM ; vascular cell adhesion molecule 1 – VCAM-1).

La caractérisation de couples ligands-récepteurs impliqués dans l'adhésion des leucocytes à l'endothélium entre ICAM-1 ou ICAM-3 et LFA-1 établissent une interaction entre les superfamilles des immunoglobulines et des intégrines. Une seconde interaction entre ces deux superfamilles (VCAM-1 et VLA-4) a également été montrée.

Les caractéristiques des molécules d'adhésion intervenant spécifiquement dans les relations endothélium/leucocytes sont détaillées plus particulièrement ci-dessous.

## SÉLECTINES

Les sélectines (famille de protéines liées aux carbohydrates et  $Ca^{2+}$  dépendantes – carbohydrate-binding proteins) sont impliquées dans l'attachement initial des leucocytes circulants à l'endothélium vasculaire durant la capture et l'étape de « rolling » du mécanisme d'adhésion lors de processus inflammatoires. Les sélectines reconnaissent principalement comme ligands les structures contenant des carbohydrates fucosylés (fucosylated carbohydrate), notamment des groupements sialyl-Lewis<sup>x</sup> (sLe<sup>x</sup>). Ces interactions sélectines/carbohydrates sont labiles et permettent aux leucocytes de rouler le long de

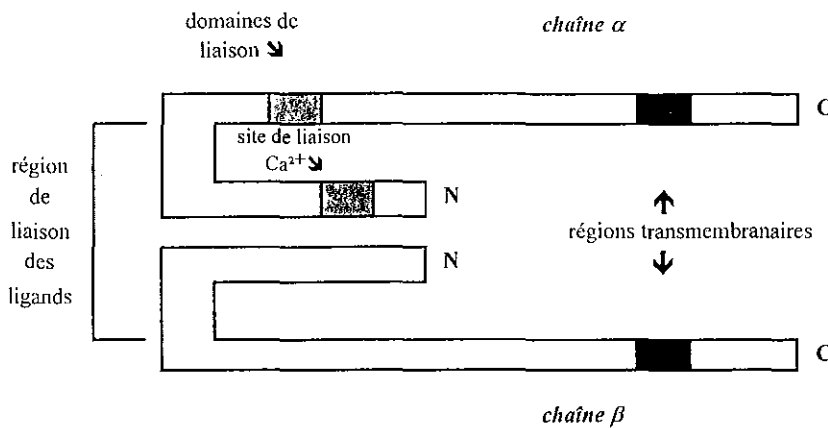


FIG. 4. - Représentation schématique de la structure d'une intégrine humaine.  
Schematic representation of the human E-selectin structure.

l'endothélium vasculaire dans la direction du flux sanguin (8). Il existe trois types de sélectines : les L(leucocyte)-, P(platelet)- et E(endothélial)-sélectines. Chacune comprend un domaine N-terminal de reconnaissance des carbohydrates (C-type lectin domain) (fig. 3). Les gènes de cette famille sont portés par le chromosome 1.

Le rôle principal des sélectines concerne principalement les interactions entre leucocytes et cellule endothéliale.

— *E-sélectines* : non constitutivement exprimées mais exprimées dans les cellules endothéliales activées par les cytokines et au niveau maximal au bout de 4 à 6 heures de traitement (4, 49), elles sont fortement exprimées au niveau des sites d'inflammation vasculaires, dans le cas de rejets d'allogreffes cardiaques et rénales, dans les vaisseaux cutanés proches de lésions superficielles dues au psoriasis, dans les cas de lupus érythémateux et du syndrome de Sjögren (5).

— *L-sélectines* : exprimées par les leucocytes. Leur expression à la surface cellulaire est très sensible à la stimulation cellulaire. Les neutrophiles ayant émigré vers les sites d'inflammation expriment un taux très bas de L-sélectine.

— *P-sélectines* : exprimées par les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales et dans les granules  $\alpha$  des

plaquettes. L'expression à la surface des P-sélectines, en réponse à une grande variété d'agents tels que la thrombine, les cytokines, etc., est généralement très courte (minutes), ce qui en fait un excellent intermédiaire dans la médiation des premières interactions leucocytes/endothélium (61).

INTÉGRINES

Les intégrines sont des glycoprotéines transmembranaires trouvées de manière prédominante à la surface cellulaire des leucocytes et liées au cytosquelette auquel elles communiquent les signaux extracellulaires. Chaque intégrine est un hétérodimère formé de deux chaînes (et qui ne sont pas liées de manière covalente (fig. 4). A ce jour, 8 chaînes  $\beta$  et 12 à 15 chaînes  $\alpha$  sont répertoriées (10). Un grand nombre d'intégrines sont membres de la sous-famille  $\beta_1$  ou VLA. La sous-famille  $\beta_2$  est représentée par les récepteurs leucocytaires LFA-1, Mac-1 et p150,95 qui sont exclusivement exprimés sur les leucocytes. La sous-famille  $\beta_3$ , exprimée dans les cellules endothéliales et les plaquettes, consiste en la glycoprotéine GPIIb/IIIa et le récepteur de la vitronectine (tableau I).

Les ligands des intégrines incluent les protéines virales et bactériennes, les facteurs de coagulation, les molécules

TABLEAU I. - Principales intégrines et leurs ligands impliquées dans les interactions cellules endothéliales/leucocytes.  
Main integrins and its endothelial binding sites implied in the endothelial cell/leucocyte interactions.

Hétérodimère Intégrine $\alpha\beta$	Sous-unité $\beta$	Autres noms	Sous-unité $\alpha$	Autres noms	Ligands
Famille VLA	$\beta_1$	VLA $\beta$ , gpIIa, CD29			
VLA-4			$\alpha_1$	CD49d	VCAM-1, fibronectin
Famille LeuCAM	$\beta_2$	CD18			
LFA-1			$\alpha_L$	CD11a	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3
Mac-1			$\alpha_M$	CD11b	ICAM-1, fibrinogen, C3bi
p150,95			$\alpha_X$	CD11c	fibrinogen, C3bi
$\alpha_d\beta_2$			$\alpha_d$		ICAM-3

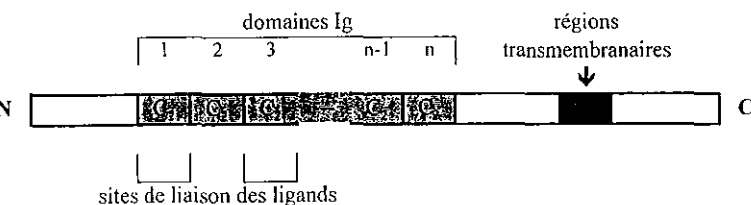


FIG. 5. — Représentation schématique de la structure générale des molécules d'adhésion de la superfamille des immunoglobulines humaines (n = 5 pour ICAM-1, 2 pour ICAM-2, 7 pour VCAM-1, ...).

*Schematic representation of the main structure of the human immunoglobulin superfamily adhesion molecules (n = 5 for ICAM-1, 2 for ICAM-2, 7 for VCAM-1).*

l'adhésion ICAM, VCAM, etc. Elles permettent l'adhésion des cellules leucocytaires sur les cellules endothéliales et sont impliquées dans les processus d'inflammation, de croissance cellulaire, de différenciation, etc. Nous nous intéressons plus particulièrement à LFA-1 qui est l'intégrine la plus impliquée au niveau des interactions leucocytes/endothélium. (*LFA-1* : leucocyte function associated molecule-1, CD11a/CD18,  $\alpha$ L $\beta$ 2)

UPERFAMILLE DES IMMUNOGLOBULINES

La superfamille des immunoglobulines représente la plus abondante famille des molécules de la surface cellulaire. Leur structure est caractérisée par des domaines épéptitifs semblables à ceux trouvés sur les immunoglobulines (fig. 5). Trois molécules de cette famille jouent un rôle dans la compréhension de l'adhésion leucocytaire sur la paroi vasculaire et sont impliquées dans les phénomènes d'inflammation. En effet, bien que le « rolling » des leucocytes soit un prérequis pour une adhérence ferme sur la paroi vasculaire, l'adhésion des leucocytes via les sélectines ne permet pas une adhésion réelle à moins que des molécules de la superfamille des immunoglobulines interagissent. Pour les interactions cellules endothéliales/leucocytes, les membres les plus importants de cette famille sont : ICAM-1, ICAM-2 (inter cellular molecule adhesion 1 et 2), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1), qui servent de ligand pour les intégrines LFA-1 et VLA-4.

Parmi les autres molécules de cette famille, il faut également signaler :

— ICAM-3 (inter cellular molecule adhesion 3) est exprimée constitutivement par les leucocytes et joue un rôle important dans la stimulation des cellules T.

— CD31/PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1) est exprimée de manière prédominante dans les cellules endothéliales et les plaquettes. Elle est nécessaire pour la migration transendothéliale des leucocytes à travers les jonctions intercellulaires des cellules endothéliales vasculaires.

— MadCAM-1 (mucosal addressin cell adhesion molecule 1) est impliquée au niveau des nodules lymphoïdes et des tissus lymphoïdes muqueux.

— ICAM-1 (CD54) et ICAM-2 (CD102) sont des ligands pour la sous-unité  $\beta$ 2 de l'intégrine LFA-1 (CD11a/CD18). Elles diffèrent cependant par leur répartition et leur fonction. ICAM-1 est fortement exprimée dans les cellules endothéliales activées par des cytokines ou par des contraintes de cisaillement locales, etc., mais ne se trouve qu'en faible quantité dans les cellules endothéliales

au repos. Elle semble jouer un rôle important au cours de l'inflammation et dans le développement de l'athérosclérose. En revanche, ICAM-2 est principalement trouvée dans les cellules au repos, ainsi que dans les leucocytes. Son expression n'est pas augmentée par l'activation des cellules. VCAM-1 est exprimée à la surface des cellules endothéliales activées et est absente des cellules endothéliales au repos. Elle se lie aux intégrines  $\alpha$ 4  $\beta$ 1 (VLA-4), est régulée par les médiateurs de l'inflammation tels que les cytokines et est diminuée lorsque la cellule est soumise à des contraintes de cisaillement. Par ailleurs, VCAM-1 est considéré comme un marqueur moléculaire de l'expression des gènes des cellules endothéliales redox-sensitives. Son expression génique est régulée par un mécanisme sensible à l'oxydation (48).

Les processus d'interaction endothélium/leucocytes sont représentés par des mécanismes complexes entre les différentes molécules d'adhésion spécifiques d'un type cellulaire ou d'un stimulus donné. Il existe un état d'équilibre entre ces molécules en absence de tout état pathologique de l'endothélium. Mais lors de la survenue d'un stimulus caractérisant un dysfonctionnement du vaisseau, cet équilibre sera rompu et l'expression d'une ou plusieurs des molécules d'adhésion sera modifiée. Ainsi, les cellules endothéliales peuvent influencer le développement et le rejet des allogreffes par une modification de l'expression des molécules des deux superfamilles : sélectines et immunoglobulines. Une expression accrue de E-selectin, ICAM-1 et VCAM-1 peut survenir durant des épisodes de rejets d'allogreffes de l'endothélium. Un recouvrement des prothèses vasculaires par une monocouche de cellules endothéliales pourrait remédier à ces phénomènes de rejet (36, 40, 62). L'étude des interactions endothélium/leucocyte est donc primordiale dans la compréhension et pour le traitement des principaux dysfonctionnements survenant au niveau vasculaire.

CONCLUSION

Cellules longtemps peu étudiées, les connaissances sur les cellules endothéliales ont connu un développement considérable ces 20 dernières années. Il a pu ainsi être précisé, qu'à travers des mécanismes complexes, elles secrètent de nombreuses substances vasoactives qui jouent un rôle déterminant dans le contrôle de l'hémodynamique : débit, pression mais aussi fluidité et coagulabilité du sang. Ainsi, pour ne citer que les principales, l'oxyde nitrique, l'endothéline et la protacycline jouent un rôle essentiel dans le contrôle de la circulation alors que la thrombomoduline, le facteur Von Willebrand et le TPF

sont des facteurs impliqués dans la fibrinolyse et la coagulation.

D'autre part, comme nous l'avons vu, la régulation de ces facteurs peut être affectée par l'écoulement soit par activation directe, soit par mécanotransduction. Ce dernier point est particulièrement important et mérite le développement de nouvelles recherches en hémorhéologie. De même, les propriétés mécaniques des cellules endothéliales ainsi que les mécanismes induisant leur orientation dans les écoulements sont encore très mal précisés.

En pathologie, il faut rappeler que les cellules endothéliales sont impliquées dans l'athérosclérose, la thrombose et l'inflammation.

Tous ces points sont non seulement particulièrement importants pour une meilleure compréhension des pathologies cardio-vasculaires en général, mais aussi par leurs implications thérapeutiques potentielles futures et ouvrent la voie à la réévaluation de médicaments actuellement utilisés ou le développement de nouvelles molécules.

#### RÉFÉRENCES

1. ANDO J, KOMATSUDA T, KAMIYA A. The effect of fluid shear stress on the migration and proliferation of cultured endothelial cells. *Microvasc Res*, 1987; 33: 62-70.
2. ARAI H, HORI S, ARAMOR I, OHKUBO H, NAKANISHI S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature*, 1990; 348: 730-2.
3. BATTISTINI B, CHAILLER P, D'ORLÉANS-JUSTE P, BRIÈRE N, SIROIS P. Growth regulatory properties of endothelins. *Peptides*, 1993; 14: 385-99.
4. BEVILACQUA MP, POBER JS, MENDRICK DL, COTRAN RS, GIMBRONE MA. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 1987; 84: 9238-43.
5. BEYNON HLC, ATHANASSIOU P, DAVIES KA. The role of the endothelium in systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. In: Immunological aspects of the vascular endothelium, SAVAGE C and PEARSON J, (Cambridge University Press, Cambridge, UK), 1995; 125-52.
6. BORN GVR, SCHWARTZ G. Vascular endothelium. Physiology, pathology and therapeutic opportunities. G.V.R. Born and G. Schwartz Eds., (Schattauer, Stuttgart, Germany), 1997; 1-391.
7. BRANT AM, SHAH SS, TODGERS VG, HOFFMEISTER J, HERMAN IM, KORMOS RL, BOROVETZ HS. Biomechanics of the arterial wall under simulated flow conditions. *J Biomech*, 1988; 21: 107-13.
8. BRUNK DK, HAMMER DA. Quantifying rolling adhesion with a cell-free assay: E-selectin and its carbohydrate ligands. *Biophys J*, 1997; 72: 2820-33.
9. CALVER A, COLLIER J, VALLANCE P. Forearm blood flow responses to a nitric oxide synthase inhibitor in patients with treated essential hypertension. *Cardiovasc Res*, 1994; 28: 1720-5.
10. CARLOS TM, HARLAN JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*, 1994; 84: 2068-101.
11. CELI A, LORENZET R, FURIE B, FURIE BC. Platelet-leukocyte-endothelial cell interaction on the blood vessel wall. *Seminars in hematology*, 1997; 34: 327-35.
12. CEZEAX JL, AUSTIN V, HOSEINIPOUR MC, WARD KA, ZIMMER S. The effects of shear stress and metastatic phenotype on the detachment of transformed cells. *Biorheology*, 1991; 28: 195-205.
13. CHAPPEL DC, VARNER SE, NEREM RM, MEDFORD RM, ALEXANDER RW. Oscillatory shear stress stimulates adhesion molecule expression in cultured human endothelium. *Circ Res*, 1998; 82: 532-9.
14. CHARARA J, BEAUDOIN G, GUIDOIN R. A nonlinear analysis of pulsatile flow applied to investigate shear in arterial prostheses. *Biomater Artif Cells and Immob Biotech*, 1992; 20: 1-21.
15. CHARARA J, DOILLON C, LEMAY F, RUEL J, LEMAY J, DUMAS G. Effet de l'écoulement sur le devenir des cellules endothéliales: dispositifs d'études, revues et commentaires. *RBM*, 1993; 15: 435-45.
16. CHEN J, LUSCINSKAS FW, CONNOLLY A, DEWEY CF, GIMBRONE MA Jr. Fluid shear stress modulates cytosolic free calcium in vascular endothelial cells. *Am Physiol Soc*, 1992; C384-C390.
17. DAVIES PF, DEWEY Jr CF, BUSSOLARI SR, GORDON EJ, GIMBRONE Jr MA. Influence of hemodynamic forces on vascular endothelial function: in vitro studies of shear stress and picocytosis in bovine aortic cells. *J Clin Invest*, 1984; 73: 1121-9.
18. DAVIES PF, REMUZZI A, GORDON EJ, DEWEY CF, GIMBRONE MA. Turbulent fluid shear stress induces vascular endothelial cell turnover in vitro. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 1986; 83: 2114-7.
19. DAVIES PF, DULL RO. How does the arterial endothelium sense flow? Hemodynamic forces and signal transduction. *Adv Exp Med Biol*, 1990; 273: 281-94.
20. DAVIES PF, TRIPATHI SC. Mechanical stress mechanisms and the cell, an endothelial paradigm. *Circ Res*, 1993; 72: 239-45.
21. DAVIES PF, BARBEE KN, VOLIN MV, ROBOTOWSKYJ A, CHEN J, JOSEPH L, GRIEM ML, WERNICK MN, JACOBS E, POLACEK DC, DEPAOLA N, BARAKAT AI. Spatial relationships in early signaling events of flow-mediated endothelial mechanotransduction. *J Physiol*, 1997; 59: 527-49.
22. DE NUCCI G, GRYGLEWSKI RJ, WARNER TD, VANE JR. Receptor-mediated release of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells is coupled. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 1988; 85: 2334-8.
23. DEWEY Jr CF, BUSSOLARI SR, GIMBRONE Jr MA, DAVIES PF. The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. *J Biomech Eng*, 1981; 103: 177-85.
24. DIAMOND SL, ESKIN SG, MCINTIRE LV. Fluid flow stimulates tissue plasminogen activator secretion by cultured human endothelial cells. *Science*, 1989; 243: 1483-5.
25. DRENCCKHAHN D, NESS W. The endothelial contractile cytoskeleton. «; Vascular endothelium. Physiology, pathology and therapeutic opportunities. » GVR BORN and G SCHWARTZ Eds., (Schattauer, Stuttgart, Germany), 1997; 1-155.
26. ESKIN SG, IVES CL, MCINTIRE LV, NAVARRO LT. Response of cultured endothelial cells to steady flow. *Microvasc Res*, 1984; 28: 87-94.
27. FRANGOS JA, MCINTIRE LV, ESKIN SG. Shear stress induced stimulation of mammalian cell metabolism. *Biotechnol Bioeng*, 1988; 32: 1053-60.
28. FRANKE RP, GRAFE M, SCHNITTLER D, MITTERMAYER C, DRENCCKHAN D. Induction of human vascular endothelial stress fibers by fluid shear stress. *Nature*, 1984; 307: 648-9.
29. FRY DL. Acute vascular endothelial changes associated with increased blood velocity gradients. *Circ Res*, 1968; 22: 167-97.
30. FURCHGOTT RF, ZAWADZKI JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 1980; 288: 373-6.
31. GOETZ DJ, EL SABBAN ME, HAMMER DA, PAULI BU. Lu-ECAM-1-mediated adhesion of melanoma cells to endothelium under conditions of flow. *Int J Cancer*, 1996; 65: 192-9.
32. GOLDSMITH H, KARINO T. Interactions of human blood cells with the vascular endothelium. *Ann NY Acad Sci*, 1987; 516: 468-83.
33. GORBUNOV N, ESPOSITO E. Nitric oxide as a mediator of inflammation. *Intern J Immunopath and Pharmacol*, 1993; 6: 67-75.
34. GRABOWSKI EF, LAM FP. Endothelial cell function, including tissue factor expression, under flow conditions. *Thromb Haemost*, 1995; 74: 123-8.
35. HELMINGER G, GEIGER RV, SCHREEK S, NEREM RM. Effects of pulsatile flow on cultured endothelial cell morphology. *J Biomed Eng*, 1991; 113: 123-31.
36. HERRING M, BAUGHMAN S, GLOWER J. Endothelium develops on seeded human arterial prosthesis: a brief clinical note. *J Vasc Surg*, 1985; 2: 727-30.
37. HOUSE SD, LIPOWSKY HH. Leukocyte, endothelium, adhesion: microhemodynamics in mesentery of the cat. *Microvasc Res*, 34: 363-79.
38. HSIEH HJ, LI NQ, FRANGOS JA. Shear-induced platelet-derived growth factor gene expression in human endothelial cells is mediated by protein kinase C. *J Cell Physiol*, 1992; 150: 552-8.

39. INOUE A, YANAGISAWA M, KIMURA S, KASUYA Y, MIYAUCHI T, GOTO K, MASAKI T. The human endothelin family: Three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 1989; 86: 2863-7.
40. IVARSSON BL, CAMBRIA RP, MIGERMAN J, ABBOTT WM. Fibrinogen enhances early shear stress resistance of seeded adult human venous endothelial cells. *J Surg Res*, 1989; 47: 203-7.
41. KAW S, HECKER M, VANE JR. The two-step conversion of big endothelin-1 to endothelin-1 and degradation of endothelin-1 by subcellular fractions from human polymorphonuclear leukocytes. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 1992; 89: 6886-90.
42. KUCHAN MJ, FRANGOS JA. Shear stress regulates endothelin-1 release via protein kinase C and cGMP in cultured endothelial cells. *Am J Physiol*, 1993; 264: H150-H156.
43. KUCHAN MJ, FRANGOS JA. Role of G proteins in shear stress-mediated nitric oxide production by endothelial cells. *Am J Physiol*, 1994; 267: C753-C758.
44. KUO SC, HAMMER DA, LAUFFENBURGER DA. Stimulation of detachment of specifically bound particles from surface by shear flow. *Biophys J*, 1997; 73: 517-31.
45. MULLER S, LEGRAND S, WACHE P, DUMAS D, WANG X, LATGER V, STOLTZ JF. Cytoskeleton, surface adhesion molecules and  $[Ca^{2+}]_i$  changes of endothelial cells in a vascular singularity pattern. An in vitro fluorescence microscopy study. Xth International vascular biology meeting, Cairns, Australia, 23-27 august 1998, 79.
46. LEVESQUE MJ, NEREM RM, SPRAGUE EA. Vascular endothelial cell proliferation in culture and the influence of flow. *Biomaterials*, 1990; 11: 702-7.
47. MALEK AM, IZUMO S. Control of endothelial cell gene expression by flow. *J Biomechanics*, 1995; 28: 1515-28.
48. MEDFORD RM. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene expression: a molecular paradigm for atherosclerosis. In: The endothelial cell in health and disease, JR VANE, GVR BORN and D WELZEL, (Schattauer, Stuttgart, Germany), 1995; 75-83.
49. NEEDHAM et al. Chapter 4. Adhesion of granulocytes, monocytes and related cell lines. In: The endothelial cell in health and disease, JR VANE, GVR BORN and D WELZEL, (Schattauer, Stuttgart, Germany), 1995; 25-37.
50. NEREM RM, LEVESQUE MJ, CORNHILL JF. Vascular endothelial morphology as an indicator of blood flow. *J Biomech Eng*, 1981; 103: 172-6.
51. OLESEN SP, CLAPHAM DE, DAVIES PF. Haemodynamic shear stress activates a  $K^+$  current in vascular endothelial cells. *Nature*, 1988; 331: 168-70.
52. ONO O, ANDO J, KAMIYA A, KUBOKI Y, YASUDA H. Flow effects on cultured vascular endothelial and smooth muscle cell functions. *Cell Struct Funct*, 1991; 16: 365-74.
53. OKAWA K, SATO M, OHISHIWA N. Changes in the microstructure of cultured porcine aortic endothelial cells in the early stage after applying a fluid-imposed shear stress. *J Biomech*, 1992; 25: 1321-8.
54. PATRICK CW Jr, MCINTIRE LV. Shear stress and cyclic strain modulation of gene expression in vascular endothelial cells. *Blood Purif*, 1995; 13: 112-24.
55. POISEUILLE JLM. Recherches expérimentales sur le mouvement des liquides dans les tubes de très petits diamètres. *CR Acad Sci*, 1840; 11: 1041-8.
56. SACHS F. In: Cell Shape: Determinants, Regulation and Regulatory Role, WD STEIN and F BRONNER, (Academic Press, San Diego, CA, USA), 1989; 63-92.
57. SAKURAI T, YANAGISAWA M, MASAKI T. Molecular characterization of endothelin receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 1992; 13: 103-8.
58. SALVEMINI D, MOLLACE V. Roles and therapeutic implications of nitric oxide in the cardiovascular system. *Drug News and Perspectives*, 1994; 7: 158-66.
59. SHYY JYJ, LI YS, LIN MC, CHEN W, YUAN SL, USAMI S, CHIEN S. Multiple cis-elements mediate shear stress-induced gene expression. *J Biomechanics*, 1995; 28: 1451-7.
60. STOLTZ JF, DONNER M, LARCAN A. Introduction to hemorheology: Theoretical aspects and hyperviscosity syndromes. *Inter Angiol*, 1987; 6: 119-32.
61. TEDDER TF, STEEBER DA, CHEN A, ENGEL P. The selectins: vascular adhesion molecules. *Faseb J*, 1995; 9: 866-73.
62. TRUSKEY GA, PIRONE JS. The effect of fluid shear stress upon cell adhesion to fibrinectin-treated surfaces. *J Biomed Mater Res*, 1990; 24: 1333-53.
63. UEMATSU M, OHARA Y, NAVAS JP, NISHIDA K, MURPHY TJ, ALEXANDER RW, NEREM RM, HARRISON DG. Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am J Physiol*, 1995; 269: C1371-C1378.
64. VANE JR, BORN GVR, WELZEL D. In: The endothelial cell in health and disease, JR VANE, GVR BORN and D WELZEL, (Schattauer, Stuttgart, Germany), 1995; 1-204.
65. VAYSSAIRAT M, CARPENTIER P. Microcirculation clinique. Masson Paris, 1996; 1 vol.
66. VIGGERS RF, WECHESAK AR, SAUVAGE LR. An apparatus to study the response of cultured endothelium to shear stress. *J Biomech Eng*, 1986; 108: 332-7.
67. WANG X, NAVIDBAKHS M, SKALAK R, CHIEN S, USAMI S. Morphology of bovine aortic endothelial cells in an oscillatory disturbed flow. *Arch Physiol Biochem*, 1996; 104: 581.
68. WAYNE SMITH C. Endothelial adhesion molecules and inflammation: in vitro studies on the modulating effects of interleukin-4. In: Vascular endothelium. Physiology, pathology and therapeutic opportunities., GVR BORN and G SCHWARTZ (Schattauer, Stuttgart, Germany), 1997; 141-55.

## Xth European Conference on Clinical Hemorheology, Lisbon, 29 June–2 July 1997

---

# Hemorheology and vascular endothelial cells

### *Opening lecture*

J.F. Stoltz<sup>a,\*</sup>, S. Muller<sup>a</sup>, X. Wang<sup>a</sup>, D. Dumas<sup>a</sup>, M. Boisseau<sup>b</sup>, S. Legrand<sup>a</sup>  
and V. Labrador<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Angiohematology-Hemorheology, UMR CNRS 7563 (LEMTA), Faculté de Médecine,  
54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France*

<sup>b</sup> *Hematology, Faculté de Médecine, 33000 Bordeaux, France*

**Abstract.** The vascular endothelium is a biologically active monolayer of cells provided an interface between blood and tissues. Vascular endothelial cells (ECs) have two functional states, which are allowed by their different properties: (i) vaso regulating properties: ECs releases vasomotor components, as endothelin (vaso constriction), prostacyclin and nitrite oxide (vaso dilatation); (ii) antithrombotic and hemostatic properties; and (iii) anti-adhesion properties. The endothelium is normally anti-thrombotic and anti-adhesive to ensure blood fluidity. During many cardio-vascular diseases, these properties may be reversed. Thus, the ECs have a determinant role in hemodynamic control through these various metabolic activities. Otherwise, many studies have demonstrated that local blood flow conditions have a crucial role on the EC properties (mechanotransduction concept). The knowledge of the properties of ECs and the control of the phenomena which define their functions is a key element in the cardiovascular diseases understanding.

**Keywords:** Endothelial cells, cell adhesion, adhesion molecules, hemorheology, mechanotransduction

### **1. Introduction**

Vascular endothelial cells form a monocellular layer on vessel walls, for a total estimated mass of 1.5 kg. Their properties are not identical in all part of the body and they acquire specificities that differentiate them according to the anatomical site, which makes their study all the more difficult. It was initially accepted that their main function was to make up a barrier designed to counter protein losses and permit nutrient distribution to tissues. However, Palade's studies on organelles (awarded by the Nobel Prize) and those of Florey clearly demonstrated the peculiar role of these multiple-activity cells.

It is now a known fact that their role is determinant in hemodynamic control by their various metabolic activities (control of homeostasis, vascular tonus, blood fluidity and coagulating properties, cellular adhesion. . .) [6,64]. Recent studies have underlined the crucial role of local blood flow conditions on their properties (mechano-transduction concept) [21,23,29].

In microcirculation, the endothelial cells of venules are particularly active and constitute the physiological site of liquid exchange (permeability) and above all cellular transit. During critical ischemia, the

---

\*Correspondence to: Pr. J.F. Stoltz, Laboratoire d'Angiohématologie-Hémorhéologie, UMR CNRS 7563 (LEMTA), Faculté de Médecine, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France. Tel.: +33 (0)3 83 59 26 41; E-mail: stoltz@hemato.u-nancy.fr.



so-called post-capillary venules are deeply involved, as are upstream capillaries (often dilated). Lastly, the properties of endothelial cells may be impaired in a number of diseases (atherosclerosis, hypertension, inflammation, metabolic diseases, . . .) [5,10,68].

In this paper, various aspects of endothelial cell properties were considered in relation with hemorheology.

## 2. Functional states of vascular endothelial cell

The endothelium is normally anti-thrombotic and anti-adhesive, to ensure "blood fluidity". During aggressions, frequently multi factor (agonists and/or cytokines), the endothelium can reverse its functions by expressing stored material or by slower involvement of genes that until then had been repressed. There is a dual determinism: to stop bleeding by microvessel obliteration induced by cellular transit, triggered by inflammation chemo-attraction. If these effects initially appear to be beneficial, they become deleterious in the course of ischemia.

### 2.1. Anti-thrombotic action

The anti-thrombotic and "fluidifying" action of endothelial cells is due to three types of properties which combine together:

*Vaso-regulating properties.* Microcirculation endothelium releases the vasomotor balance components: vaso-constricting endothelin on the one hand and prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) and vaso-dilatory nitrite oxide (NO) on the other [22].

*Anti-thrombotic properties.* The endothelial cells are rich in a variety of antithrombotic properties. They express proteoglycans on their surface, including some negative-charge, sulfate glycoaminoglycans (heparane-sulfate), they secrete plasminogen tissular activator (t-PA) and tissular factor inhibitor. One fundamental action of the endothelium in that area is the production and expression of a transmembrane protein, thrombomodulin, a thrombin receptor. That protein promotes the formation of a complex which activated protein C. That function is a major anticoagulation one, controlling continual thrombin generation at the sub-endothelium and blood cell interface. The endothelium also exert anticoagulant properties by other channels, such as the capture and degradation of thrombogenous substances (ADP, 5-HTP) and through the effect of active products on platelets [12].

*Anti-adhesion properties.* At non active state, endothelial cells little express adhesion receptors such as the intercellular adhesion molecules-1 (ICAM-1), which are the main integrines linked, and express ICAM-2.

### 2.2. Thrombotic and adhesive action

During inflammation in particular, the endothelial cell properties may be reversed. With regard to vasomotricity, the balance is often maintained to the benefit of vasodilation: NO production by agonists, increased PGI<sub>2</sub> synthesis by phospholipase A<sub>2</sub> activation. Variations in local shear stresses may modify the secretion of vasomotor substances.

**Coagulating properties.** In this case thrombomodulin is under-regulated and no longer appears on the endothelium surface. In addition, the cells express tissular factor that can bind to plasma factor VIIa. Hence thrombin production may occur all the more easily as factors I and X possess binding sites on the endothelium. Regarding fibrinolysis, PAI-1, an inhibitor of plasminogen activator of endothelial origin, is increased and t-PA is under-regulated in gene expression.

**Adhesion effects.** Circulating cells can adhere to the endothelium in physiopathological conditions [12, 31,37]. Leucocytes adhesion manifests itself as several successive waves of receptors expression [11]. The various mechanisms by which leucocytes adhere to the endothelium have recently been elucidated [4]. A few minutes after the beginning of the activation process, P-selectin (140 kD) is translocated from Palade cells to the cell surface, in a position to bind leucocytes by sialyl oligosaccharide residues related to the sLe<sup>x</sup> group. The determinant factors of this phenomenon are histamine, bradykinine, thrombin, and above all oxygenated free radicals which occur during episodes of reinfusion with oxygenated blood. From a kinetics standpoint, leucocyte adhesion is divided into "rolling" adhesion (link to L-selectin) and interaction with endothelium selectins P and E and stable adhesion. After binding, leucocytes are activated by the endothelial cells because they produce PAF-acether that comes in contact. The leucocyte then releases L-selectin and expresses the  $\beta_2$  integrins which enable it to bind to the ICAM-1 complex and migrate toward the extravascular domain.

### 3. Endothelial cells and vasoactive mediator synthesis

Endothelial cells have intense and diversified metabolic activity. They possess enzymes which deactivate bradykinine and transform angiotensin I (inactive decapeptide) into vasoactive angiotensin II. In addition, endothelial cells synthesize various proteins like Von Willebrand factor (VWF), plasminogen tissular activator, vasoactive agents like prostacyclin, endothelin-1 (ET-1) or nitric oxide (NO) [22].

#### 3.1. Prostacyclin

Among the prostaglandins secreted during cellular aggression, prostacyclin plays a determinant role. Discovered in 1976 by Vane et al. [69], prostacyclin is one of the arachidonic acid derivatives. The amount of prostacyclin synthesized by vascular tissue is greater on the intima surface and decreases toward the adventice. Endothelial cells are the most active ones in this synthesis. The enzyme which permits endoperoxide transformation into prostacyclin is the human prostacyclin synthetase cloned recently (1994). Prostacyclin synthesis is also controlled by cyclo-oxygenases (COX-1) expressed in most tissues and COX-2, which is specially important for prostaglandin synthesis in inflammation and potentially interesting to study new anti-inflammatory molecules.

Prostacyclin is a hypotensive agent whose main mechanism of action is linked to its vasodilator effect. Also, prostacyclin is the main endogenous inhibitor of platelet aggregation and adhesion (collagen-platelet interactions). That effect however only applies for a short time (less than 30 min). Lastly, prostacyclin, as other prostaglandins, is thought to have a cytoprotector effect, which would account for some of its therapeutical effects.

#### 3.2. Endothelin-1 (ET-1)

Vascular endothelium synthesizes a 21-aminoacid peptide, endothelin-1, of which three forms are now known: ETI-1, 2, and 3 [2,39]. ET-1 is derived from a prepropeptide leading to a 38-aminoacid form

which, after proteolytic cleavage, produces ET-1 [41]. ET-1 is one of the most effective vasoconstrictors, with a potential 10 times higher than angiotensin II. From a rheological standpoint, it was shown that cultured endothelial cells subjected to periodical flow rapidly produce ET-1 (<20 min) effective for several hours. This release is protein-synthesis-dependent [3]. There are at least two ET receptors: ETA with high affinity for ET-1 and ETB which can bind the three forms of endothelin [57].

### 3.3. Endothelium-derived relaxing factor (EDRF)/nitric oxide (NO)

EDRF/NO is an unstable vasodilating factor whose unpredictable effect was described by Furchgott as early as 1980 [30]. But it was only in 1987 that Palmer et al. [53] proved that nitric oxide (NO) and EDRF represent the same molecule.

Nitric oxide is synthesized in the endothelial cell from an L-arginine. Three isoforms of NO synthetase have been cloned (two are  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent and the third one is induced by cytokines). Physiologically, NO inhibits platelet aggregation and adhesion in a very strong synergy with the action of prostacyclin. NO release by local shear stress or stimulation plays a crucial role in controlling blood flow. NO release is modified in inflammatory processes and its vasodilatory and antiaggregant properties are used in therapeutic [33,58].

## 4. Endothelial cells and hemostasis

### 4.1. Anti-thrombotic functions

Endothelial cells secrete anti-platelet substances. On the cell surface, ecto-ADPase destroys ADP, in particular that originating from red blood cells (factor R). NO production, which is constant under normal shear stress conditions, constitutes an anti-aggregation factor. Lastly, under similar conditions, activation of phospholipase  $\text{A}_2$  induces the production of prostacycline ( $\text{PGI}_2$ ), which is an anti-aggregation agent with a 6 min half-life, longer than platelet thromboxane. This substance is also formed from endoperoxides ( $\text{PGG}_2$  and  $\text{PGH}_2$ ) produced as a result of platelet activation and transferred to the wall.  $\text{PGI}_2$  has no effect on platelet adhesion; in contrast, NO has such an effect, but only with shear stresses between 300 and 1600  $\text{sec}^{-1}$ . A variety of agonists can trigger NO and  $\text{PGI}_2$  production, which appears to be an essential defence mechanism. Endothelial cells are also involved in fibrinolysis by secreting plasminogen activators t-PA and SCU-PA, under the influence of certain stimuli, as well as inhibitor PAI-I. These substances associate and form macromolecular complexes that will only be broken up by contact with fibrin.

Endothelium expresses membrane receptors which react with anticoagulant plasma proteins. Heparane sulfate interacts with antithrombin III, dermatane sulfate with heparin cofactor 2. As a rule, these glycoaminoglycans act as heparinoids and contribute in the inertia of endothelium towards thrombosis.

Thrombomodulin, a transmembrane molecule, represents a major antithrombotic molecule. It is both a receptor and a non-enzyme regulator of thrombin. It considerably increases thrombin capacity to activate protein C. In addition, protein S increases the reacting time of thrombin-protein C-thrombomodulin substratum, leading to the occurrence of activated protein C (PCA), a major anticoagulant.

Lastly, TFPI (tissue factor pathway inhibitor) is produced in part by the endothelium, thus developing a fundamental inhibiting effect on the tissue factor-Xa complex.

#### 4.2. *Thrombotic functions*

If the endothelium is a protector of vascular integrity, especially in the microcirculation, it can also have reverse effects leading to vascular obliteration and necrosis. That conflicting determinism corresponds to the need to eliminate destroyed tissue or to protect it from haemorrhage [65]. Likewise, even at the vascular protecting stage, the endothelium participates in the thrombotic charge. Endothelial cells produce connective substances and adhesins which complement the sub-endothelial matrix: microfibrillae, elastin, fibronectin and thrombospondin. Similarly, the endothelium contributes in tissue factor deposition on its deeper surface. Lastly, it accumulates Von Willebrand factor (VWF), of which it is the oneself producer, in Weibel–Palade bodies.

Upon reduction of the flow, decreasing of shear stress and NO secretion sub-regulates its anticoagulant potency to the benefit of its thrombotic effect. Hypoxia, free radicals, thrombin, vasoactive agonists and many inflammation products, including IL-1 and TNF $\alpha$  type cytokines, complement and enhance these properties.

Endothelium activation however does not systematically progress into necrosis, regulation systems permitting reversal of the situation. In particular, IL-8 produced by the endothelium itself or macrophages, contributes in the restoration of the protective state. Likewise, resumption of flow and of NO and PGI<sub>2</sub> production will have similar effects.

The emergence of Weibel–Palade bodies is a precocious and quick manifestation of endothelial activation. Bags of these bodies, adhering to the superficial membrane of the endothelium, dispense their VWF, a major platelet adhesin and expel the P-selectin available for the adhesion of leucocytes, PMN and monocytes. Following that fast reaction, thrombomodulin is cleaved at the surface, on 5 to 6 sites of the extra-membrane part, a cleavage to which adherent leucocytes contribute (elastase). The endothelium so loses its main thrombin-regulating function and thrombin thus can only retain a thrombogenic effect. Thrombomodulin fragments constitute plasma thrombomodulin, a marker of endothelial activation. Tissue factor is produced on the superficial face of endothelial cells, although less than on the deeper face. The endothelium exposes the receptors for activated coagulation factors like IXa and factor Va. These receptors may account for the expression of phosphatidyl-serine (PS) on activated endothelium, the site of thrombinase development and thrombinogenesis. It has to be noted that TFPI cannot inhibit the factor IXa produced in the bare endothelium, which enables that product to detect PS sites within the cellular environment. Lastly, activated endothelium secretes large amounts of t-PA-PAI-I complexes to the benefit of the excess inhibitor, consistently with a decrease in fibrinolysis.

#### 4.3. *Involvement of thrombotic cellular complexes in the endothelial context*

In most cases, endothelial activation, obliterating antithrombotic function, is accompanied by blood contact with the sub-endothelium, either by cellular contraction leaving wide gaps between cells, or by associated lesions. Lumps of adherent platelets are formed by contact or contiguity with endothelial activation areas. Furthermore, vascular cell adherent molecules (VCAM) establish a link between the platelets flanking them and the endothelium. On these links, large PS areas are exposed and promote thrombin synthesis and considerably amplify thrombogenesis [12]. These phenomena are particularly active when the fibrous shell of a “soft” atherosclerotic plaque breaks-up.

In fact, many functions of the endothelium in relation to hemostasis and thrombosis are intricate with other properties involving leucocytes adhesion and vasomotor properties. Certain endothelial products, like NO and PGI<sub>2</sub>, are at the interface and are effectively implicated in hemostasis, adhesion and vasomotricity.

## 5. Rheological behaviour of the endothelial cell and mechano-transduction

### 5.1. Rheological properties of endothelial cells

Given the interface situation of endothelial cells, knowing their mechanical properties is particularly relevant [7,49]. If a number of studies have investigated the morphological modifications in flowing systems [25,26], few have been focused on stress and deformation within the cell (intracellular stress and deformation) [18]. A recent study conducted *in vitro* with confocal microscopy, during induced deformations and monitoring the motion of internalized latex beads, has shown that endothelial cells behaved like an elastic isotropic material. Deformation however is less marked in the nucleus vicinity, indicating its greater rigidity [9].

It was also shown that endothelial cells were motile in the direction of the flow, indifferently upstream or downstream. The explanation of that phenomenon is still hypothetical. Is it a passive or an active mechanism?

### 5.2. Influence of local flow conditions of endothelial cellular response

The influence of local hemodynamic conditions on endothelial cells (ECs) has raised increased interest over the recent years [66]. The various studies on the subject have tried to clarify the physiology and modifications of EC during vascular diseases and to study the biocompatibility of vascular biomaterials [15, 62]. Endothelial cells react to hemodynamic forces by modifying their morphology, their metabolism and their adhesion properties [13,17,26,59,67]. The morphological changes may include elongation and orientation of endothelial cells parallel to the flow direction as well as an actin filament re-arrangement, responsible for cellular mobility and adhesion (Fig. 1) [28,45,52]. The metabolic changes mainly include increased prostacyclin synthesis, plasminogen tissular activator expression, differential regulation of adhesion molecule and proto-oncogene expression and ion transfer ( $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ) [16,27,35,50]. Shear stress also stimulates endothelial cell proliferation and migration [1]. It is also important to consider the condition of cells when the local flow conditions are modified. Indeed, it has been shown that confluent endothelial cells (forming a continuous monolayer) do not react in the same manner as isolated cells.

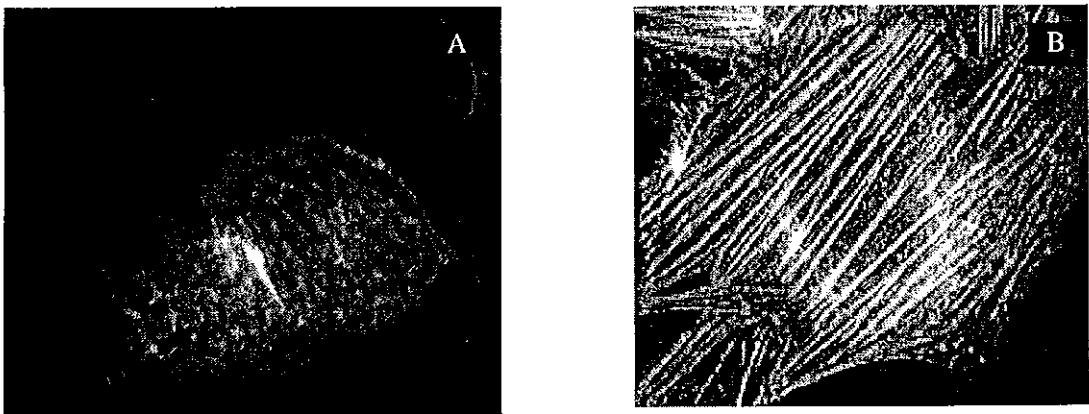


Fig. 1. Modifications of the cytoskeleton of the ECs under flow conditions. Specific labeling with rhodamine-phalloidin (2 U/ml, 20 min, 37°C). Olympus microscope device IX70 ( $\times 100$ , NA 0.95, Cellscan™, Bionis, France). (A) static control; (B) laminar flow,  $\tau = 2.5$  Pa, 1 hour.

One of the major differences between endothelial cell behavior *in vivo* and *in vitro* is that *in vitro* the cell renewal rate is higher than *in vivo*. That rate is reduced when shear stress exceeds 30 dyn/cm<sup>2</sup> in laminar flow. Endothelial cell co-culture in contact with smooth muscle cells, more closer to the physiological model, is thought to have the cellular renewal rate. Also, *in vitro* studies elicited many interactions between the two types of cells [51]. Although the studies conducted were able to demonstrate the different types of cellular response to extraneous forces, the underlying mechanisms are far from being totally elucidated [17,19,20]. Cells respond differently according to local shear stress and their responses are also conditioned by local and temporal variations (stationary or periodic flows) [14,18,35].

5.3. Mechano-transduction

The endothelial cell response to mechanical stimuli practically involves all the mechanisms linked to cellular growth and metabolism [46]. Thus, ionic channels, sensitive to membrane stretching, adenylate cyclase, protein kinase C have their activity modified in response to mechanical stress [38,42,43,56]. According to these authors, surface mechano-receptors would exist, linked to the cytoskeleton. The cytoskeleton alterations induced by shear stress would disrupt cellular equilibrium and so modify the activity of receptors and trans-membrane channels. Also, the mechanism of gene expression of the molecules produced by the endothelial cell and involved in their functions (such as endothelin-1 (ET-1), plasminogen tissular activator [24], NO production, PDGF  $\gamma$  and  $\beta$ , growth factors, thrombomodulin (TB), adhesion molecules [34,43,54,60,63]) are also influenced by flow. An initial molecular model of the regulation steps of gene expression under stress was considered by Malek et al. [47] (Fig. 2). Stress would activate mechano-sensitive structures, including the cytoskeleton, adhesion foci, mechano-sensitive channels and thus would modify membrane receptor activity [25]. This initial step is then applied to the second messengers like intracellular Ca<sup>2+</sup>, protein kinase C (PKC), cyclic AMP (cAMP), cyclic GMP, etc. which in turn are disrupted. Such deep changes in the balance of the secondary messengers will then alter the

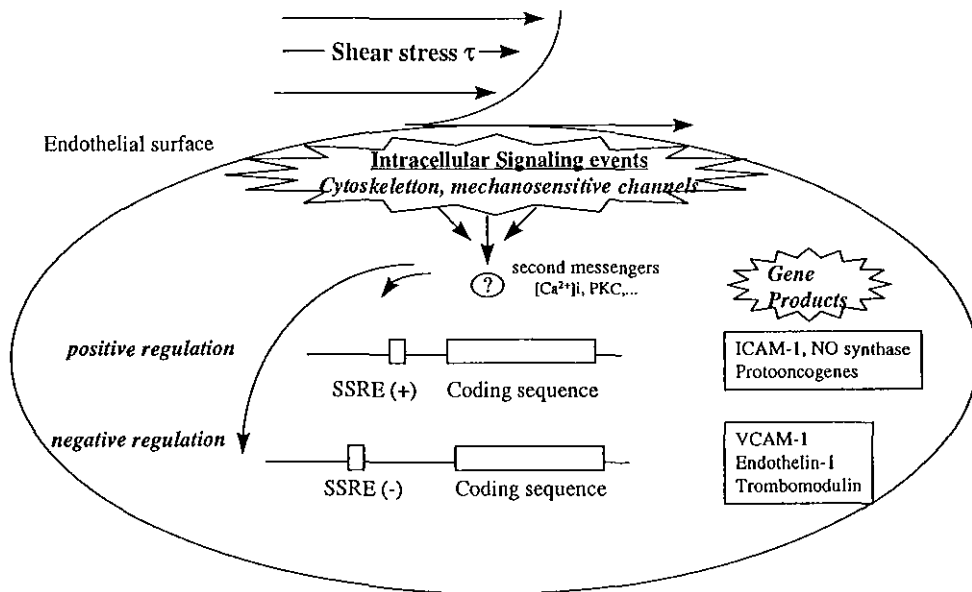


Fig. 2. Control of endothelial cell properties and mechanotransduction phenomenon. (SSRE: shear stress response element.)

activation status of the DNA binding factors. The final step then amounts to alteration of the transcription of a number of genes through positive or negative local shear stress response elements (SSRE) or a combination of both, acting at various times [59].

Various types of response to mechanical stress have been described. They are restricted to specific sequences of the DNA chain. For instance, the GAGACC sequence controls the response of plasminogen tissular activator (t-PA), of NO synthetase, ICAM-1, etc. [47]. These effects will produce time-dependent response of functional molecules synthesized by endothelial cells. So the endothelial cell response according to the applied shear stress could be classified in three classes:

1. Type I: early and transient increase (c-fos, c-jun, c-myc, PDGF).
2. Type II: continuous increase in mRNA expression (t-PA, NOS, ICAM-1).
3. Type III: two-phase regulation: increase during the first two hours followed by a continuous decrease until the 12th hour (ET-1, PDGF- $\beta$ , TM, VCAM-1).

These various facts would the presence of SSRE in large numbers in the endothelial cell, activable via mechanico-transduction mechanisms. The implication of binding factors, their interaction and their contribution to the final transcriptional equilibrium have just been recognized. Characterizing the endothelium response to the local flow conditions and associated mechanisms could lead to a better understanding of the pathogenesis of certain vascular diseases.

## 6. Adhesion molecules

Intercellular adhesion is a major step in the complex sequences that lead to acute or chronic inflammatory diseases, to autoimmune diseases, the pathogenesis of atherosclerosis or vascular lesions [48, 64,68]. Cellular adhesion is made possible by the so-called "adhesion molecules" which enable interactions between vascular endothelium cells and the various blood cells, leucocytes in particular. Indeed, the interactions of circulating leucocytes with the endothelium, rolling and adhesion during immune and inflammatory reactions are dependent on a series of transient events [44]. Three super-families of adhesion molecules are involved in these processes.

*Selectins*, or "lectin-epidermal growth factor-complement-related cell adhesion molecules" (LECAMs; e.g., ELAM – endothelial leucocyte adhesion molecule, and GMP 140 – granule membrane protein 140) interact with carbohydrate-containing ligands.

*Heterodimeric integrins*: "lymphocyte function associated" antigen-1 (LA-1), "very late" antigen-4 (VLA-4), and MAC-1.

Lastly, the *immunoglobulin super-family*: inter cellular adhesion molecule (ICAM) and vascular cell adhesion molecule (VCAM).

The characterized ligand-receptor couples involved in leucocyte adhesion to the endothelium, among ICAM-1, ICAM-3 or LFA-1, mediate an interaction between integrin and immunoglobulin super-families. Another interaction between these two super-families (VCAM-1 and VLA-4) has also been found.

The characteristics of the adhesion molecules specifically involved in endothelium/leucocyte relationships are described in more detail below.

### 6.1. Selectins

Selectins (calcium-dependent and carbohydrate-binding proteins) are implicated in the initial binding of circulating leucocytes to vascular endothelium during capture and the rolling step of adhesion in

the course of inflammation. Selectins mainly recognize as ligands structures which contain fucosylated carbohydrates, sialyl-Lewis<sup>x</sup> in particular (sLex). These selectin/carbohydrate interactions are labile and enable leucocytes to "roll" along the vascular endothelium in the direction of blood flow [8]. There are three types of selectins: L (leucocyte)-, P (platelet)- and E (endothelial)-selectins. Each features a C-type lectin domain. The genes of that family are carried by chromosome 1. The main role of selectins is primarily the interactions between leucocytes and endothelial cells.

- (i) *E-selectin*: expressed in endothelial cells activated by cytokines, they reach their peak level after 4 to 6 hours of stimulation [4]. They are strongly expressed around vascular inflammation sites, in cardiac or renal graft rejection, in skin vessels near psoriasis-related superficial lesions, in systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome [5].
- (ii) *L-selectin*: constitutionally expressed by leucocytes, their expression on the cell surface is very sensitive to cellular stimulation. Neutrophils, having migrated to inflammation sites, express a very low level of L-selectin.
- (iii) *P-selectin*: are expressed by the Weibel-Palade bodies of endothelial cells and in platelet granules  $\alpha$ . P-selectin surface expression in response to a variety of agents like thrombin, cytokines, etc., is usually very brief (a few minutes), making them an excellent go-between for the mediation of the initial leucocyte/endothelium interactions [61].

## 6.2. Integrins

They are transmembrane glycoproteins predominantly found on the surface of leucocytes and linked to the cytoskeleton, to which they transmit extracellular signals. Each integrin is a heterodimer formed by two  $\alpha$  and  $\beta$  chains that are not covalently linked. So far, eight  $\beta$  chains and 12 to 15  $\alpha$  chains have been identified and classified [11].

A large number of integrins belong to the  $\beta 1$  subset, or VLA. The  $\beta 2$  subset is represented by leucocyte receptors LFA-1, Mac-1, and p150,95 which are exclusively expressed on leucocytes. The  $\beta 3$  subset, expressed in endothelial cells and platelets, includes glycoprotein GPIIb/IIIa and the vitronectin receptor. The integrin ligands include viral and bacterial proteins, coagulation factors, adhesion molecules ICAM, VCAM, etc.

Integrins permit leucocyte cell adhesion to endothelial cells and are implicated in inflammation, cell growth, cellular differentiation, etc. Integrin LFA-1 is the most implicated in leucocyte/endothelium interactions (LFA-1: leucocyte function associated molecule-1, CD11a/CD18,  $\alpha L\beta 2$ ).

## 6.3. The immunoglobulin superfamily

Immunoglobulins constitute the largest family of cellular surface molecules. Their structure is characterized by repetitive domains similar to those found on immunoglobulins. Three molecules from that family play a predominant role in the mechanism of leucocyte adhesion to vascular walls and are involved in inflammatory phenomena. Although leucocyte rolling is a prerequisite to firm adhesion to the vascular wall, leucocyte adhesion through the involvement of selectins does not ensure proper adhesion except if molecules of the immunoglobulin superfamily interact. The most important molecules for endothelial cell/leucocyte interactions are ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, which act as ligands for integrins LFA-1 and VLA-4.

This protein family also includes:



ICAM-3 (intercellular adhesion molecule-3) is constitutionally expressed by leucocytes and playing an important role in T cell stimulation.

CD31/PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1), predominantly is expressed in endothelial cells and platelets. This molecule is necessary of transendothelial migration of leucocytes across the intracellular interfaces of vascular endothelial cells.

MadCAM-1 (mucosal addressin cell adhesion molecule-1) is implicated in lymph nodes and in mucosal lymphoid tissue.

ICAM-1 (CD54) and ICAM-2 (CD102) are ligands for subset  $\beta 2$  of integrin LFA-1 (CD11a/CD18). However, their distribution and function are different. ICAM-1 is highly expressed in endothelial cells activated by cytokines or by local shear stress but is only present in small amounts in resting endothelial cells. They appear to play a major role in inflammation and atherosclerosis. In contrast, ICAM-2 is mainly found in resting cells and in leucocytes. Its expression is not enhanced by cellular activation. VCAM-1 is expressed on activated endothelial cell surface and is absent from resting endothelial cells. It binds to integrins  $\gamma 4 \beta 1$  (VLA-4). It is regulated by inflammation mediators like cytokines and is reduced when cells are subjected to shear stress. VCAM-1 is also considered to be a molecular marker of gene expression of redox-sensitive endothelial cells. Its expression is regulated by an oxidation-sensitive mechanisms [48].

The endothelium/leucocyte interaction processes involve complex mechanisms of interaction between the various adhesion molecules specific for a given cellular type or stimulus. There is a state of equilibrium between these molecules in the absence of any endothelial pathology. But on the occurrence of a stimulus that characterizes vascular dysfunction, that equilibrium will be broken and the expression of one or several adhesion molecules will be modified. Thus endothelial cells can influence the growth or rejection of allografts by modifying the expression of both superfamilies: selectins and immunoglobulins. Increased expression of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 has been described in graft rejection episodes. The recovering of vascular prosthesis by ECs could limit these rejection phenomena [36,40,62]. The study of endothelium/leucocyte interactions is therefore crucial to understand and treat the main dysfunctions that may occur at the vascular level.

## 7. Conclusions

Over the last 20 years, endothelial cells have regained interest and their related knowledge has developed considerably. It has so been possible to establish that via complex mechanisms they secrete a number of vaso-active substances that play a determinant role in hemodynamic control: flow rate, pressure, fluidity and coagulability of blood. Among the main molecules are nitric oxide, endothelin and prostacyclin play a crucial role in controlling circulation, whereas thrombomodulin, VWF and TPF are implicated in fibrinolysis and coagulation.

Also, as already mentioned, the regulation of these factors can be affected by flow, either through direct activation or by mechano-transduction. The latter point is especially important and should benefit from further hematological research. Likewise, the mechanical properties of endothelial cells and the mechanisms which control their orientation in flow still remain to be defined more specifically.

In clinical practice, it is worth reminding that endothelial cells are implicated in atherosclerosis, thrombosis and inflammation.

All these topics not only are of particular importance in the understanding of cardio-vascular diseases and thrombosis, but they also have potential future therapeutic implications and open the way towards a reassessment of current drugs or towards the development of new molecules.

## References

- [1] J. Ando, T. Komatsuda and A. Kamiya, The effect of fluid shear stress on the migration and proliferation of cultured endothelial cells, *Microvasc. Res.* **33** (1987), 62–70.
- [2] H. Arai, S. Hori, I. Aramor, H. Ohkubo and S. Nakanishi, Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor, *Nature* **348** (1990), 730–732.
- [3] B. Battistini, P. Chailier, P. D'Orléans-Juste, N. Brière and P. Sirois, Growth regulatory properties of endothelins, *Peptides* **14** (1993), 385–399.
- [4] M.P. Bevilacqua, J.S. Pober, D.L. Mendrick, R.S. Cotran and M.A. Gimbrone, Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **84** (1987), 9238–9243.
- [5] H.L.C. Beynon, P. Athanassiou and K.A. Davies, The role of the endothelium in systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome, in: *Immunological Aspects of the Vascular Endothelium*, C. Savage and J. Pearson, eds, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1995, pp. 125–152.
- [6] G.V.R. Born and G. Schwartz, *Vascular Endothelium. Physiology, Pathology and Therapeutic Opportunities*, G.V.R. Born and G. Schwartz, eds, Schattauer, Stuttgart, Germany, 1997.
- [7] A.M. Brant, S.S. Shah, V.G. Todgers, J. Hoffmeister, I.M. Herman, R.L. Kormos and H.S. Borovetz, Biomechanics of the arterial wall under simulated flow conditions, *J. Biomech.* **21** (1988), 107–113.
- [8] D.K. Brunk and D.A. Hammer, Quantifying rolling adhesion with a cell-free assay: E-selectin and its carbohydrate ligands, *Biophys. J.* **72** (1997), 2820–2833.
- [9] N. Caille, Y. Tardy and J.J. Meister, Assessment of strain field in endothelial cells subjected to uniaxial deformation of their substrate, *Ann. Biomed. Eng.* **26** (1998), 409–416.
- [10] A. Calver, J. Collier and P. Vallance, Forearm blood flow responses to a nitric oxide synthase inhibitor in patients with treated essential hypertension, *Cardiovasc. Res.* **28** (1994), 1720–1725.
- [11] T.M. Carlos and J.M. Harlan, Leukocyte-endothelial adhesion molecules, *Blood* **84** (1994), 2068–2101.
- [12] A. Celi, R. Lorenzet, B. Furie and B.C. Furie, Platelet-leukocyte-endothelial cell interaction on the blood vessel wall, *Seminars in Hematology* **34** (1997), 327–335.
- [13] J.L. Cezeaux, V. Austin, M.C. Hoseinipour, K.A. Ward and S. Zimmer, The effects of shear stress and metastatic phenotype on the detachment of transformed cells, *Biorheology* **28** (1991), 195–205.
- [14] D.C. Chappel, S.E. Varner, R.M. Nerem, R.M. Medford and R.W. Alexander, Oscillatory shear stress stimulates adhesion molecule expression in cultured human endothelium, *Circ. Res.* **82** (1998), 532–539.
- [15] J. Charara, G. Beaudoin and R. Guidoin, A nonlinear analysis of pulsatile flow applied to investigate shear in arterial prostheses, *Biomater. Artif. Cells and Immob. Biotech.* **20** (1992), 1–21.
- [16] J. Chen, F.W. Lusinskas, A. Connolly, C.F. Dewey and M.A. Gimbrone, Jr., Fluid shear stress modulates cytosolic free calcium in vascular endothelial cells, *Am. Physiol. Soc.* (1992), C384–C390.
- [17] P.F. Davies, C.F. Dewey, Jr., S.R. Bussolari, E.J. Gordon and M.A. Gimbrone, Jr., Influence of hemodynamic forces on vascular endothelial function: *in vitro* studies of shear stress and pinocytosis in bovine aortic cells, *J. Clin. Invest.* **73** (1984), 1121–1129.
- [18] P.F. Davies, N. Barbee, E.J. Gordon, C.F. Dewey and M.A. Gimbrone, Turbulent fluid shear stress induces vascular endothelial cell turnover *in vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **83** (1986), 2114–2117.
- [19] P.F. Davies and R.O. Dull, How does the arterial endothelium sense flow? Hemodynamic forces and signal transduction, *Adv. Exp. Med. Biol.* **273** (1990), 281–294.
- [20] P.F. Davies and S.C. Tripathi, Mechanical stress mechanisms and the cell, an endothelial paradigm, *Circ. Res.* **72** (1993), 239–245.
- [21] P.F. Davies, K.N. Barbee, M.V. Volin, A. Robotewskyj, J. Chen L. Joseph, M.L. Griem, M.N. Wernick, E. Jacobs, D.C. Polacek, N. DePaola and A.I. Barakat, Spatial relationships in early signaling events of flow-mediated endothelial mechanotransduction, *J. Physiol.* **59** (1997), 527–549.
- [22] G. DeNucci, R.J. Gryglewski, T.D. Warner and J.R. Vane, Receptor-mediated release of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells is coupled, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **85** (1988), 2334–2338.
- [23] C.F. Dewey, Jr., S.R. Bussolari, M.A. Gimbrone, Jr. and P.F. Davies, The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress, *J. Biomech. Eng.* **103** (1981), 177–185.
- [24] S.L. Diamond, S.G. Eskin and L.V. McIntire, Fluid flow stimulates tissue plasminogen activator secretion by cultured human endothelial cells, *Science* **243** (1989), 1483–1485.
- [25] D. Drenckhahn and W. Ness, The endothelial contractile cytoskeleton, in: *Vascular Endothelium. Physiology, Pathology and Therapeutic Opportunities*, G.V.R. Born and G. Schwartz, eds, Schattauer, Stuttgart, Germany, 1997, pp. 1–25.
- [26] S.G. Eskin, C.L. Ives, L.V. McIntire and L.T. Navarro, Response of cultured endothelial cells to steady flow, *Microvasc. Res.* **28** (1984), 87–94.

- [27] J.A. Frangos, L.V. McIntire and S.G. Eskin, Shear stress induced stimulation of mammalian cell metabolism, *Biotechnol. Bioeng.* **32** (1988), 1053–1060.
- [28] R.P. Franke, M. Grafe, D. Schnittler, C. Mittermayer and D. Drenckhahn, Induction of human vascular endothelial stress fibers by fluid shear stress, *Nature* **307** (1984), 648–649.
- [29] D.L. Fry, Acute vascular endothelial changes associated with increased blood velocity gradients, *Circ. Res.* **22** (1968), 167–197.
- [30] R.F. Furchgott and J.V. Zawadzki, The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine, *Nature* **288** (1980), 373–376.
- [31] D.J. Goetz, M.E. ElSabban, D.A. Hammer and B.U. Pauli, Lu-ECAM-1-mediated adhesion of melanoma cells to endothelium under conditions of flow, *Int. J. Cancer* **65** (1996), 192–199.
- [32] H. Goldsmith and T. Karino, Interactions of human blood cells with the vascular endothelium, *Ann. NY Acad. Sci.* **516** (1987), 468–483.
- [33] N. Gorbunov and E. Esposito, Nitric oxide as a mediator of inflammation, *Intern. J. Immunopath. Pharmacol.* **6** (1993), 67–75.
- [34] E.F. Grabowski and F.P. Lam. Endothelial cell function, including tissue factor expression, under flow conditions, *Thromb. Haemost.* **74** (1995), 123–128.
- [35] G. Helminger, R.V. Geiger, S. Schreck and R.M. Nerem, Effects of pulsatile flow on cultured endothelial cell morphology, *J. Biomed. Eng.* **113** (1991), 123–131.
- [36] M. Herring, S. Baughman and J. Glower, Endothelium develops on seeded human arterial prosthesis: a brief clinical note, *J. Vasc. Surg.* **2** (1985), 727–730.
- [37] S.D. House and H.H. Lipowsky, Dynamics of leukocyte-endothelium interactions in the splanchnic microcirculation, *Microvasc. Res.* **42** (1991), 288–304.
- [38] H.J. Hsieh, N.Q. Li and J.A. Frangos, Shear-induced platelet-derived growth factor gene expression in human endothelial cells is mediated by protein kinase C, *J. Cell. Physiol.* **150** (1992), 552–558.
- [39] A. Inoue, M. Yanagisawa, S. Kimura, Y. Kasuya, T. Miyauchi, K. Goto and T. Masaki, The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **86** (1989), 2863–2867.
- [40] B.L. Ivarsson, R.P. Cambria, J. Migerman and W.M. Abbott, Fibronectin enhances early shear stress resistance of seeded adult human venous endothelial cells, *J. Surg. Res.* **47** (1989), 203–207.
- [41] S. Kaw, M. Hecker and J.R. Vane, The two-step conversion of big endothelin-1 to endothelin-1 and degradation of endothelin-1 by subcellular fractions from human polymorphonuclear leukocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **89** (1992), 6886–6890.
- [42] M.J. Kuchan and J.A. Frangos, Shear stress regulates endothelin-1 release via protein kinase C and cGMP in cultured endothelial cells, *Am. J. Physiol.* **264** (1993), H150–H156.
- [43] M.J. Kuchan and J.A. Frangos, Role of G proteins in shear stress-mediated nitric oxide production by endothelial cells, *Am. J. Physiol.* **267** (1994), C753–C758.
- [44] S.C. Kuo, D.A. Hammer and D.A. Lauffenburger, Stimulation of detachment of specifically bound particles from surface by shear flow, *Biophys. J.* **73** (1997), 517–531.
- [45] S. Muller, S. Legrand, P. Wache, D. Dumas, X. Wang, V. Latger and J.F. Stoltz, Cytoskeleton, surface adhesion molecules and  $[Ca^{2+}]_i$  changes of endothelial cells in a vascular singularity pattern. An *in vitro* fluorescence microscopy study, in: *Xth International Vascular Biology Meeting*, Cairns, Australia, 23–27 August 1998, p. 79.
- [46] M.J. Levesque, R.M. Nerem and E.A. Sprague, Vascular endothelial cell proliferation in culture and the influence of flow, *Biomaterials* **11** (1990), 702–707.
- [47] A.M. Malek and S. Izumo, Control of endothelial cell gene expression by flow, *J. Biomechanics* **28** (1995), 1515–1528.
- [48] R.M. Medford, Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene expression: a molecular paradigm for atherosclerosis, in: *The Endothelial Cell in Health and Disease*, J.R. Vane, G.V.R. Born and D. Welzel, eds, Schattauer, Stuttgart, Germany, 1995, pp. 75–83.
- [49] R.M. Nerem, M.J. Levesque and J.F. Cornhill, Vascular endothelial morphology as an indicator of blood flow, *J. Biomech. Eng.* **103** (1981), 172–176.
- [50] S.P. Olesen, D.E. Clapham and P.F. Davies, Hemodynamic shear stress activates a  $K^+$  current in vascular endothelial cells, *Nature* **331** (1988), 168–170.
- [51] O. Ono, J. Ando, A. Kamiya, Y. Kuboki and H. Yasuda, Flow effects on cultured vascular endothelial and smooth muscle cell functions, *Cell Struct. Funct.* **16** (1991), 365–374.
- [52] K. Okawa, M. Sato and N. Ohshiwa, Changes in the microstructure of cultured porcine aortic endothelial cells in the early stage after applying a fluid-imposed shear stress, *J. Biomech.* **25** (1992), 1321–1328.
- [53] R.M. Palmer, A.G. Ferrige and S. Moncada, Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor, *Nature* **327**(6122) (11–17 June 1987), 524–526.

- [54] C.W. Patrick, Jr. and L.V. McIntire, Shear stress and cyclic strain modulation of gene expression in vascular endothelial cells, *Blood Purif.* **13** (1995), 112–124.
- [55] J.L.M. Poiseuille, Recherches expérimentales sur le mouvement des liquides dans les tubes de très petits diamètres, *C.R. Acad. Sci.* **11** (1840), 1041–1048.
- [56] F. Sachs, in: *Cell Shape: Determinants, Regulation and Regulatory Role*, W.D. Stein and F. Bronner, eds, Academic Press, San Diego, CA, USA, 1989, pp. 63–92.
- [57] T. Sakurai, M. Yanagisawa and T. Masaki, Molecular characterization of endothelin receptors. Trends, *Pharmacol. Sci.* **13** (1992), 103–108.
- [58] D. Salvemini and V. Mollace, Roles and therapeutic implications of nitric oxide in the cardiovascular system, *Drug News and Perspectives* **7** (1994), 158–166.
- [59] J.L. Schwachtgen, P. Houston, C. Campbell, V. Sukhatme and M. Braddock, Fluid shear stress activation of egr-1 transcription in cultured human endothelial and epithelial cells is mediated via the extracellular signal-related kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase pathway, *J. Clin. Invest.* **101** (1998), 2540–2549.
- [60] J.Y.J. Shyy, Y.S. Li, M.C. Lin, W. Chen, S.L. Yuan, S. Usami and S. Chien, Multiple cis-elements mediate shear stress-induced gene expression, *J. Biomechanics* **28** (1995), 1451–1457.
- [61] T.F. Tedder, D.A. Steeber, A. Chen and P. Engel, The selectins: vascular adhesion molecules, *Faseb J.* **9** (1995), 866–873.
- [62] G.A. Truskey and J.S. Pirone, The effect of fluid shear stress upon cell adhesion to fibrinectin-treated surfaces, *J. Biomed. Mater. Res.* **24** (1990), 1333–1353.
- [63] M. Uematsu, Y. Ohara, J.P. Navas, K. Nishida, T.J. Murphy, R.W. Alexander, R.M. Nerem and D.G. Harrison, Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress, *Am. J. Physiol.* **269** (1995), C1371–C1378.
- [64] J.R. Vane, G.V.R. Born and D. Welzel, The endothelial cell, in: *Health and Disease*, J.R. Vane, G.V.R. Born and D. Welzel, eds, Schattauer, Stuttgart, Germany, 1995.
- [65] M. Vayssairat and P. Carpentier, *Microcirculation Clinique*, Vol. 1, Masson Publ., Paris, France, 1996.
- [66] R.F. Viggers, A.R. Wechezak and L.R. Sauvage, An apparatus to study the response of cultured endothelium to shear stress, *J. Biomech. Eng.* **108** (1986), 332–337.
- [67] X. Wang, M. Navidbakhsh, R. Skalak, S. Chien and S. Usami, Morphology of bovine aortic endothelial cells in an oscillatory disturbed flow, *Arch. Physiol. Biochem.* **104** (1996), 581.
- [68] C. Wayne Smith, Endothelial adhesion molecules and inflammation: *in vitro* studies on the modulating effects of interleukin-4, in: *Vascular Endothelium. Physiology, Pathology and Therapeutic Opportunities*, G.V.R. Born and G. Schwartz, eds, Schattauer, Stuttgart, Germany, 1997, pp. 141–155.
- [69] N. Whittaker, S. Bunting, J. Salmon, S. Moncada, J.R. Vane, R.A. Johnson, D.R. Morton, J.H. Kinner, R.R. Gorman, J.C. McGuire and F.F. Sun, The chemical structure of prostaglandin X (prostacyclin), *Prostaglandins* **12** (1976), 915–928.

## MOLECULAR MECHANISMS OF LEUKOCYTE ROLLING AND TIGHT ADHESION TO ENDOTHELIUM

Pavel Riha, PhD<sup>1,2</sup>, Dominique Dumas, PhD<sup>1</sup>, Veronique Latger, MD<sup>1</sup>,  
Sylvaine Muller, PhD<sup>1</sup>, Venus Labrador, MS<sup>1</sup> and Jean-François Stoltz, PhD<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Angiohematology-Hemorheology, UMR CNRS 7563, Faculty of Medicine,  
54505 Vandoeuvre les Nancy, France

<sup>2</sup>Institute of Hydrodynamics, Academy of Sciences, 166 12 Prague, Czech Republic

### ABSTRACT

The recruitment of circulating polymorphonuclear leukocytes (PMNs) to the sites of tissue inflammation is a crucial event in an immune response to invading pathogens. The recruitment proceeds in steps beginning with PMNs rolling along the surface and adhesion to endothelium after their activation primarily in the postcapillary venules from which PMNs migrate into the surrounding tissue. The rolling of PMNs is mediated by the selectin family of adhesion molecules while after PMN activation the molecules from the integrin family are involved in the adhesion process. Our investigation of selectin and integrin molecule distribution by 3-D scanning microscopy revealed their localization to clusters on the PMN surface. The significance of this finding is illustrated in a simple model of time variation of adhesive molecular bonds. Based upon the force description of the process, we proposed an interpretation of the experimental data as well as an interpretation of the affinity modulation and multimerization hypotheses of PMNs adhesion to endothelium. For representing the range of adhesive molecules on the PMN surface in the model, which takes place after the PMN activation, the mechanical binding concept needs to be supplemented by the description of bond functionality related to the molecular signal transduction not yet well understood. © 1999 Medical and Engineering Publishers, Inc.

### INTRODUCTION

Leukocytes (especially polymorphonuclear neutrophils-PMNs) circulating in blood as non-adherent cells provide first line of defense against cells in inflammatory response and adhere to endothelial cells (ECs) adjacent to infected tissue space. The sequence of events leading to the PMN adhesion and transendothelium migration into infected tissue starts with margination of the PMN which is loosely tethered to the vessel wall and rolls along venular endothelial surface. After a persistent period of rolling the PMN stops, changes shape, attaches to

**Keywords:** *Leukocyte adhesion, modeling, receptor distribution, 3-D scanning microscopy*

Address for correspondence and reprint request: Pavel Riha, PhD, Institute of Hydrodynamics, Academy of Sciences, 166 12 Prague, Czech Republic. Received 15 March 99, revised manuscript received July 99, accepted 26 July 99.

the endothelial surface and migrates through the vessel wall into the infected tissue [21, 26].

The initial contact and bond formation (tethering) between presumably non-activated PMNs and activated endothelial cells primarily in postcapillary venules at sites of inflammation is mediated by the neutrophil receptor L-selectin (CD62L). The attachment strength is in the equilibrium with forces induced by the blood flow and collisions with erythrocytes. The action of the forces results under normal physiological conditions a random rolling motion of PMNs. The rolling velocity is of the order of 10 % or less of the center line blood velocity [18].

The rolling of PMNs has been observed to have a stochastic character [2, 6, 20, 27, 28]. It suggests that the fluctuation in rolling velocities reflect stochastic nature of receptor-ligand bonds. Both formation and fracture of bonds is time dependent and is associated with receptor-ligand molecular complexes connecting the PMN and EC surfaces. The transitory bonding is localized to small regions of PMN lateral extension called microvilli [5, 23, 24]. The bond breaking up involves several mechanisms such as internal fracture of the molecular link and possible extraction of the receptor or ligand from the membrane [22].

In the course of the PMN activation by chemokines or other soluble products generated by the endothelial cells at the site of inflammation, the L-selectin is rapidly shed from the cell surface. On the other hand, the  $\beta 2$  integrin adhesion molecules distributed on the cell surface acquire the ability to attach to the PMN membrane and endothelial ligands what leads to enhanced interaction of PMN with endothelium and rolling ceases.

The above stated molecular mechanism of PMN rolling and tight adhesion has a corresponding mechanical mechanism resulting from the balance of forces acting on the receptor-ligand molecular complexes. The process of receptor-ligand bond formation occurs under flow and is affected by several factors such as the adhesion force between the PMN and the endothelial cell, the kinetics of the PMN receptor and ligand interaction and distribution of receptors. The number of adhesion molecules on the tips of microvilli is relatively small what does not exclude a possible fluctuation in the number of receptor-ligand bonds affecting the PMN tethering and rolling along the vessel wall. The changing number of bonds modulates randomly PMN rolling velocity along vascular wall [6, 9]. The stochasticity of PMN rolling was simulated numerically by taking into account

fluctuations in the number of receptors located at microvilli. The spatial distributions of adherent L-selectin (CD62L) and  $\beta_2$  integrin (CD11b/CD18) receptors on the surface of both non-activated and activated PMNs have been observed experimentally by 3-D conventional optical scanning microscopy [4]. This method of removing the out-of-focus light to increase the contrast and the fine image details is an alternative way to confocal laser microscopy in which the laser illumination on the specimen has deleterious effects on living cells (phototoxicity, bleaching of the probe). The use of the novel technique revealed the distribution of CD62L and CD11b/CD18 receptors to clusters on the surface of non-activated PMNs. Activation of PMNs by tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) led to a polar redistribution of clusters of CD62L and CD11b/CD18 receptors.

The effect of the found cluster distribution of receptors on PMN rolling was analyzed in [15]. The results show that if instead of a uniform receptor distribution on the PMN surface the cluster distribution is taken into account, the probability of receptor-ligand interaction is reduced. Similarly, it was found that the microvillus density and the probability is reduced as well. It suggests that the effect of receptor clusters on PMN tethering and rolling may influence also the period of non-tight adhesion, that is, the period of tight adhesion to endothelium. The tight adhesion requires activation of  $\beta_2$  integrins and following bond formation between  $\beta_2$  integrins and their counter-receptors on the endothelial cell. The interaction is preferentially excluded from microvilli and occurs only to achieve a stable interaction under the shear stresses in the postcapillary venules where the PMN exit to sites of local inflammation [1]. Hence a cooperative PMN tethering to L-selectin and PMN activation and redistribution of  $\beta_2$  integrins occurred prior to the tight binding. Two molecular models of transition from rolling to tight adhesion have been proposed [3]. The modulation model refers to a change in affinity of  $\beta_2$  integrins for their ligands. The clustering or multimerization model explains the increase of receptor-ligand affinity by the redistribution of receptors in the membrane leading to clusters that are capable of multivalent interaction with ligand [1, 3]. The mechanical background of the transition from rolling to tight adhesion governed by the balance of the receptor-ligand molecular complexes is analyzed in this

## Materials and Methods

PMNs were obtained from medication free volunteers using sodium citrate as an anticoagulant. PMNs were isolated from whole blood by dextran sedimentation (Dextran 500, Pharmacia, France) and resuspended in equal volume of 0.45% NaCl solution in order to restore normal osmolality. After two washings, the cells were resuspended in isotonic medium (CELL WASH, Becton Dickinson, Pont-De-Clair, France). The PMN stimulation was carried out by TNF $\alpha$  at concentration 100 U/ml, temperature 37 °C for 1 hour.

Flow cytometry measurement of PMN surface adhesive molecules was done according to the indirect immunofluorescence test using QIFIKIT<sup>®</sup> (Dako, Trappes, France) [13, 14]. All monoclonal antibodies (MoAb) were from Dako (Trappes, France): anti-CD62L MoAb (FMC46), CD11b MoAb (2LPM19c) and CD18 MoAb (MHM23). The MoAbs were applied under previously described saturating conditions in indirect immunofluorescence test. Non-specific labeling was blocked by bovine serum albumin (0.4 % solution in PBS, St. Quentin Fallavier, France). After addition of 10  $\mu$ l of FITC-conjugated MoAb to 100  $\mu$ l of PMN suspension, the mixture was kept in the dark room at room temperature (20-22 °C) for 45 min and then washed in isotonic phosphate buffer saline (PBS). Subsequently, the cells were resuspended in 100  $\mu$ l of the second coating solution (1/50 dilution of F(ab')<sub>2</sub> fraction of goat antimouse immunoglobulin G conjugated to fluorescein isothiocyanate and kept for 45 min in the

dark room at room temperature. After washing, the cells were resuspended in PBS. The number of receptors per cell was evaluated using the FACSCAN (Becton Dickinson, Pont-De-Clair, France) and PCLYSIS software. Under saturating conditions, the number of antigenic sites per bead is proportional to the mean fluorescence intensity (MFI) [13]. Thus for each sample tested, the corrected MFI, that is the specific MFI minus that of the isotypic negative control measured under the same conditions, can be converted into the mean number of molecules expressed on the cell surface.

The 3-D scanning microscopy (COSM) is a technique recently developed as an alternative to confocal microscopy [17, 19]. The technique enables to observe distribution of PMN adherence receptors on the cell surface labeled before placing PMN into the COSM. For each experiment, 100  $\mu$ l of the PMN suspension was deposited on a glass plate (CODE 79726, PolyLabo, Strasbourg, France) and immediately analyzed. The most of PMNs had a round shape but some PMNs were oval with pseudopods. Only round PMNs were used for observations. The optical cell cuts were obtained with an OLYMPUS IX-70 epifluorescence inverted microscope equipped with the CELLSCAN<sup>TM</sup> optical sectioning acquisition system (EPRTEM SYSTEM CELLSCAN, Scanalytics Inc, Fairfax, Virginia) and using 60xPSF/1.2-NA water immersion apochromatic objective (Olympus, Rungis, France). The scanning along the optical axis was performed at z spacing of 0.25  $\mu$ m by a piezo z-axis focus device. Images of biological samples were collected on a cooled 12 bit charge-couple device (CCD) camera (Princeton Instruments Inc., Evry, France). The filter set selected the fluorescence excitation and the integral part of emission spectrum (OLYMPUS WIB CUBE, 460-490, BA515). The image intensity calibration kit (INSPECK, Molecular Probes, Eugene, Oregon) was used for calibration. The blurring function of the optical system (the point spread function) was characterized by imaging through focus series of optical sections of 0.17  $\mu$ m-diameter green fluorescent bead (MICROSCOPE POINT SOURCE KIT, Molecular Probes, Eugene, Oregon). Both the blank images of the detector dark current and the background were subtracted pixel-by-pixel from each obtained cell image.

## RESULTS

### Experimental

The flow cytometry measurement provided information about the expression of CD62L and CD11b/CD18 receptors and the effect of PMN activation on this expression (Table 1). After the cell activation, CD62L molecules are nearly shed from the surface. On the other hand, the number of CD11b/CD18 molecules mediating a tight adhesion of PMNs to endothelium doubles after the cell activation by TNF $\alpha$ .

TABLE 1

Flow cytometric data indicating number of receptors on non-activated and activated polymorphonuclear neutrophils by TNF $\alpha$

PMN receptor	Number of receptors per cell ( $\times 1000$ )	
	PMN non-activated	PMN activated
CD62L	33.47 $\pm$ 9.59	1.01 $\pm$ 0.58
CD11b	41.79 $\pm$ 9.08	81.46 $\pm$ 22.62
CD18	27.07 $\pm$ 16.41	43.72 $\pm$ 7.03

The COSM technique used for evaluation of receptor distribution on the PMN surface revealed localized expression of CD62L and CD11b/CD18 receptors to clusters. This type of localization on the living cell was not yet observed so far by other technique. The distribution of CD62L receptor clusters over the cell surface of non-activated cell is irregular what follows from the representative cluster distribution shown in Fig. 1a. After PMNs activation by TNF $\alpha$ , a polarized distribution of CD62L receptors was observed with a few residual clusters (Fig. 1b). The expression of  $\alpha$  subunits of  $\beta_2$  integrins (CD11b/CD18) on the non-activated cell was found localized

the most cases (80 %) to clusters distributed irregularly over the face (Fig. 2a). In some cases (10-15 % of cells), the clusters were distributed on a circle around the cells (Fig. 2b). Finally, the polarized cluster distribution when the clusters are localized to two opposite poles was observed at less than 10 % of cells (Fig. 2c). The PMN activation by  $TNF\alpha$  resulted polarized distribution of clusters of CD11b/CD18 receptors on the surface of all cells (Fig. 3).

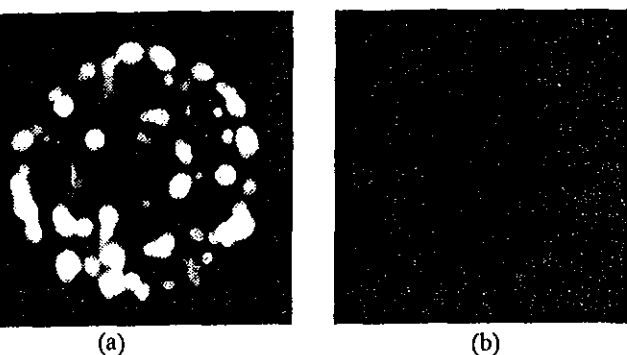


FIGURE 1

Representative image of L-selectin (CD62L) receptor distribution on the PMN surface: a) non-activated cell with receptors localized to clusters (bright spots), b) activated cell receptors by  $TNF\alpha$  are early released from the surface. Mean PMN diameter 12.25  $\mu m$ , mean cluster diameter 1.78  $\mu m$ .

The cluster distribution characterizes the mean number of clusters, mean cluster diameter and the mean cluster distance. In case of CD62L, the corresponding characteristics important for the analysis of PMN rolling are given in Table 2. The characteristics were determined analyzing deblurred cell slices 0.25  $\mu m$  apart along the cell surface. For each cell, 9 slices from the cell bottom to the plane 2  $\mu m$  above the bottom slice was used for evaluation of the number of clusters on the corresponding cell surface layer (excluding the abundance of the same cluster) as well as the evaluation of mean cluster diameter. The number of all clusters on the cell surface was determined proportionally to the ratio of cell surface area to the area of circular layer on which the number of clusters was counted.

TABLE 2

Scanning microscopy measurements of PMN and L-selectin cluster geometrical characteristics

Mean values	PMN	CD62L cluster
Diameter ( $\mu m$ )	12.25	1.78
Area ( $\mu m^2$ )	471	2.48
Number of clusters		98
Total area of clusters ( $\mu m^2$ )		243
Distance of cluster centers ( $\mu m$ )		2.36

According to various authors [5, 23, 24], PMN is constitutively expressing CD62L receptors on the apical surface of microvilli projections. Consequently, our experimental data on CD62L distribution on the surface of non-activated PMN suggest the following. The microvilli with CD62L receptors are localized into polarized clusters of size and topological distribution corresponding to observed CD62L receptor distribution on the PMN surface.

### PMN rolling

PMN rolling along the endothelium mediated by the selectins is a result of a net force imparted on the cell by chemical, colloidal and mechanical forces. The PMN rolling occurs when the mechanical stretching force required to rupture the receptor-ligand complex

exceeds the chemical binding force in the rearmost complex of the rolling cell and the receptor-ligand bond is released. The cell membrane in this way peels off the endothelium and cell rolls to a new position by the fluid mechanical forces where the balance between the chemical, colloidal and mechanical forces is reestablished [9, 27].

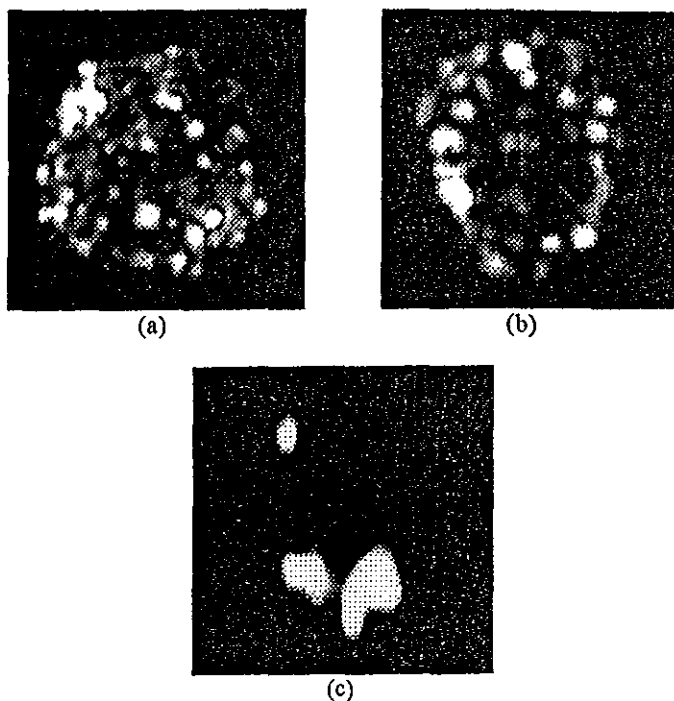


FIGURE 2

Representative image of the non-activated PMN with CD18 receptors localized to clusters on the cell surface (bright spots). a) Clusters distributed irregularly over the whole surface (80 % of cells), b) clusters distributed on the circle around the cell (10-15 % of cells), c) clusters localized on the opposite poles (less than 10 % of cells).

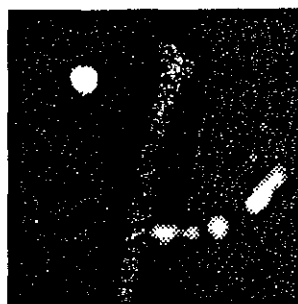


FIGURE 3

Representative image of the activated PMN by  $TNF\alpha$  with CD18 receptors localized to clusters on the opposite poles (bright spots).

The receptor-ligand complex formed by randomly coiled protein segments between its binding sites to PMN and to endothelial cell has an end-to-end vector  $R_c$  and may extend before rupture. The mass of the molecular complex is negligible and thus during the PMN rolling the vector  $R_c$  evolves in time according to

$$dR_c/dt = \xi(S_c - F_c) \quad (1)$$

where  $S_c$  denotes the stretching force due to the mechanical force the passing blood plasma applies to the PMN,  $F_c$  the restoring force due

chemical receptor-ligand binding and  $\xi$  denotes a function that relates the acting forces to the dynamics of the vector  $R_c$ . Generally, the stretching force acting on the receptor-ligand complex varies in dependence how many receptor-ligand complexes  $n_c$  are formed in the contact area. Hence, the equation 1 is a stochastic differential equation not solvable in the traditional deterministic sense. It can only be solved by specifying the probability  $p(R_c, t)$  that a complex has an end-to-end vector  $R_c$  and  $R_c + dR_c$  at a given time  $t$ .

When the PMN rolls along the endothelium, the receptor-ligand complex experiences two phases. First phase is the phase after the complex formation within the contact area between the PMN and endothelium when  $dR_c/dt < 0$  and the microvillus approaches the endothelial surface to a separation distance on the order of microvillus length of  $0.4 \mu\text{m}$ . In the second phase of rolling, when  $dR_c/dt > 0$ , the PMN rests in the contact with the endothelium but the rearmost receptor-ligand complex fractures when the critical complex length is reached.

The stretching force  $S_c$  per receptor-ligand complex relates to the force  $S$  the passing fluid applies to PMN,  $S = \sum_n S_c$ . This total force is specified in the closed form for the spherical particle near a wall [7, 8]. The opposite restoring force  $F_c$  is dependent on the length of the receptor-ligand complex  $|R_c|$ . At presumably small deformations the complex mechanical behavior may be similar to a linear spring  $F_c = ER_c$  where  $E$  denotes stiffness of the complex.

When the nonspecific adhesive forces between PMN and endothelial cell (such as electrostatic, van der Waals, steric repulsion, gravitational [9]) are negligible, the total stretching force acting on the PMN is balanced by the counter-acting total restoring force  $F = \sum_n F_c$ . The cell is attached and rolls on the endothelium

when  $S = F$  and  $S_c > F_c$  in some complexes in the second phase of rolling. The cell rolling velocity as well as the fracture of the rearmost receptor-ligand complex is affected by the number of receptor-ligand complexes  $n_c$  formed in the contact area between PMN and endothelium. It results stochasticity of cell rolling as observed experimentally [2, 6, 16, 27, 28].

### Tight adhesion

In the initial period of PMN rolling the subsequent period is the period when in the course of cell activation by inflammatory stimuli the cell becomes polarized, starts to adhere firmly to the endothelium, and begins their migration through the endothelium into the underlying tissue [11, 20, 26]. The rolling interaction mediated by L-selectin is required prior a tight integrin-mediated adhesion. Formation of bonds between  $\beta 2$  integrins and their endothelial immunoglobulin family ligands occurs too slowly to achieve a stable interaction in the presence of shear stresses present in the postcapillary venules where leukocytes exit to sites of extravascular inflammation occurs [1].

Several hypotheses have been proposed to explain the mechanism that allows the binding of the activated PMN to its ligand [1, 3]. The affinity maturation hypothesis refers to the change in the affinity of integrins for their ligands. The second clustering or multimerization hypothesis suggests that integrins may redistribute in the membrane and increase the local integrin concentration. It may lead to multivalent interaction of integrins with ligands and increased bond formation.

These hypotheses not necessarily mutually exclusive are represented by the proposed Equation 1 for the receptor-ligand bond time-dependence. The modulation of the receptor-ligand affinity is modeled by the change in the length of the complex characterized by the maximum force  $F_c^{\text{max}}$

that can be sustained by the complex. On the other hand, the doubled concentration of CD11b/CD18 concentration after PMN activation affects the

stretching force  $S_c$  in the complex since the probability of complex formation is increased as well and the more receptor-ligand complexes are formed the lesser is the stretching force  $S_c$  per one complex. To assure permanent cell adhesion,  $F_c^{\text{max}} > S_c$  must hold for all  $n_c > 0$ . The increased binding affinity and increased receptor concentration favorably contribute to that condition.

## DISCUSSION

The adhesion of activated PMN to endothelial cells is a crucial event in an immune response to an invading pathogen and successful host defense. The important role of adhesion is illustrated most dramatically by a human genetic disease called leukocyte adhesion deficiency ( $\beta 2$  integrins deficiency), type I (LAD) [1, 3]. LAD patients are unable to adequately mobilize PMNs to sites of bacterial infections and have a markedly increased incidence to infections.

Circulating PMNs interact with activated endothelial cells by rolling along the vascular wall. L-selectin distributed in clusters on the cell surface controls this event by its lectin domain [23, 24]. The binding mechanism allowing bond formation under flow conditions is very rapid [1]. The off-rate of a bond is also rapid and is modulated by the stretching force  $S_c$  applied to the bond [1, 9]. The fracture of the bond, when the bond is stretched by critical stretching force to a critical length leads to rolling of PMNs along the endothelium. The estimated maximum force required to rupture a bond is in the vicinity of  $1 \mu\text{dyn}$  [25]. The total stretching force resulting from shear stress and torque exerted by passing fluid in venules on the attached PMN can be estimated through the formula given in [16]. When the PMN radius  $6.1 \mu\text{m}$  (Table 2) and the radius of the contact area between the PMN and endothelium  $0.6 \mu\text{m}$  (10 % of the cell radius for the spherical PMN [16]) are taken into account, the total stretching force  $|S|$  is about  $420 \mu\text{dyn}$ . The number of receptors in the contact area,  $\pi \times 0.6^2 = 1.13 \mu\text{m}^2$ , is about 155 according to the experimental data given in Table 2 what gives the mean stretching force  $|S_c|$  in one bond about  $2.7 \mu\text{dyn}$  when contribution of nonspecific adhesive forces is negligible. The possible explanation for higher estimate of  $|S_c|$  is that the effective contact area may be larger than the estimated one for the spherical PMN in our analysis ( $1.13 \mu\text{m}^2$ ), due to deformation of the PMN by the passing fluid. The deformation extends the contact region in the direction of flow and the contact area is nearly doubled in comparison when the PMN is not deformed [28]. Consequently, the corresponding estimate of the mean stretching force  $|S_c|$  reduces to  $1.35 \mu\text{dyn}$  what is close to the value  $1 \mu\text{dyn}$  assumed in [25].

The tight adhesion of PMNs to endothelium requires activation of  $\beta 2$  integrins expressed on PMN surface when CD11b/CD18 molecules convert from low-affinity to high-affinity states [1, 3, 12]. The activation reduces L-selectin binding to ligands in a time course that allows CD11b/CD18 molecules to bind to the endothelial ligands before loosening L-selectin bonds and their release from the PMN. The affinity change of the receptors must be accompanied by a change induced by chemical reactions between the receptor and ligand including increasing stiffness of the formed complex including a possible effect of the intracellular part of the receptors [21]. In addition to that, the adhesion seems to be strengthened also by the redistribution of  $\beta 2$  integrins after activation. Our experimental data measured by the 3-D scanning microscopy technique show that  $\beta 2$  integrins are localized after activation to clusters on the opposite poles of PMN and their number is nearly doubled in comparison to the non-activated state. When  $\beta 2$  integrins are highly concentrated, they may be capable of multivalent interaction with endothelial ligands what could increase PMN adhesion without any change in the affinity of individual receptor [1].

The molecular basis of PMN activation is not yet completely understood. The signal transduction pathway that couples a particular



nal from the outside to a change in integrin adhesiveness remains elusive [1,3]. The affinity modulation model suggests that the intracellular signals evoke intracellular signals what induces a conformational change in the ligand-binding region of the integrin. Representing the conformational change in the model (1), the mechanical binding concept needs to be supplemented by the description of bond functionality related to the molecular signal induction through steps that lead to increased receptor affinity to ligand.

## CONCLUSIONS

Experimental data obtained by the 3-D scanning microscopy show that L-selectin (CD62L) and  $\beta 2$  integrin (CD11b/CD18) receptors on the unactivated PMN surface are localized to clusters. After cell activation with TNF $\alpha$ , CD62L receptors are released from the surface while CD11b/CD18 receptor concentration doubles and clusters are localized to two opposite pole regions. The carried out analysis suggests that CD62L cluster distribution reduces the probability of receptor-ligand bond formation but on the other hand when the cell is already attached the increased concentration of receptors to clusters strengthens attachment by multiplied bonds [15]. The tight adhesion of PMN by the integrin molecules benefits from increased number of receptors after the cell activation and their localization to two pole regions. The simple description of timing length of the receptor-ligand bond during PMN rolling and adhesion allows to quantify the effect of both receptor-ligand bond concentration and bond strength. The affinity modulation model and timerization model of the change in the integrin binding strength both represented in the description and do not necessarily exclude another. The literature data support the model of integrin activation through intracellular signals that lead to a change in the integrin affinity to endothelial ligands [3]. Our experimental data support in addition also the effect of redistribution of integrin to high concentration pole regions what may contribute to the multivalent bond formation and tight attachment of PMNs as well.

## REFERENCES

Brown, EJ. Adhesive interactions in the immune system. *Cell Biol* 1997; 7:289-295

Cozens-Roberts, C, DA Lauffenburger, JA Quinn. Receptor-mediated cell attachment and detachment kinetics. I. Probabilistic model and analysis. *Biophys J* 1990; 58:841-856

Diamond MS, TA Springer. The dynamic regulation of integrin adhesiveness. *Current Biol* 1994; 4:506-517

Dumas, D, V Latger, JF Stoltz. Biological relevancy of quantitative analysis of adherence receptors on polymorphonuclear neutrophil by flow cytometry and optical scanning microscopy. *Microsc Microanal* 1999; 5 (Suppl. 2: Proceedings):1122-1123

Erlandsen, SL, SR Hasslen and RD Nelson. Detection and spatial distribution of  $\beta 2$  integrin (Mac-1) and L-selectin (LECAL-1) adherence receptors on human neutrophils by high-resolution field emission SEM. *J Histochem Cytochem* 1993; 41:327-333

Goetz, DJ, ME El-Sabban, BU Pauli, DA Hammer. Dynamics of neutrophil rolling over stimulated endothelium in vitro. *Biophys J* 1994; 66:2202-2209

Goldman, AJ, RG Cox, H. Brenner. Slow viscous motion of a sphere parallel to a plane wall-II Couette flow. *Chem Engng Sci* 1967; 22:653-660

Hammer DA, DA Lauffenburger. A dynamical model for receptor-mediated cell adhesion to surfaces in viscous shear flow. *Cell Biol* 1989; 14:139-173

Hammer, DA, SM Apte. Simulation of cell rolling and adhesion on surfaces in shear flow: general results and analysis of selectin-mediated neutrophil adhesion. *Biophys J* 1992; 63:35-57

Lasky, LA. Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science* 1992; 258:964-969

11. Ley, K. Molecular mechanisms of leukocyte rolling and adhesion. In: Boccalon, H (Editor). *Vascular Medicine*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1993, 359-363

12. Lorant, DE, RP McEver, TM McIntyre, KL Moore, SM Prescott, GA Zimmerman. Activation of polymorphonuclear leukocytes reduces their adhesion to P-selectin and causes redistribution of ligands for P-selectin on their surface. *J Clin Invest* 1995; 96:171-182

13. Poncelet, P, P Crayon. Cytofluorimetric quantification of cell-surface antigens by indirect immunofluorescence using monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 1985; 85:65

14. Poncelet, P, F George, S Papa, F Lanza. Quantification of hematopoietic cell antigens in flow cytometry. *European J Histochem Cytochem* 1996; 40:15

15. Riha, P, D Dumas, V Latger, S Muller, V Labrador, JF Stoltz. L-selectin clusters revealed by 3-D scanning microscopy and their effect on leukocyte rolling. *Biophys J* 2000 (Submitted for publication)

16. Saterbak, A, SC Kuo, DA Lauffenburger. Heterogeneity and probabilistic binding contributions to receptor-mediated cell detachment kinetics. *Biophys J* 1993; 65:243-252

17. Scallietar, BA, JR Swedlow, JW Sedat, DA Agard. Dispersion, aberration and deconvolution in multi-wavelength fluorescence images. *J. Microsc.* 1996; 182:50-59

18. Schmid-Schönbein, GW, R. Skalak, SI Simon, RI Engler. The interaction between leukocytes and endothelium in vivo. In: Leonard, EF, VT Turitto, L. Vroman (Editors). *Blood in Contact with Natural and Artificial Surfaces*. The New York Academy of Sciences, New York, 1987, 348-361

19. Shaw, PJ. Comparison between confocal and wide-field imaging in 3-D microscopy. In: Pawley, JB (Editor). *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Plenum Press, New York, 1995, 373-387

20. Skalak, R, BA Skierczynski, S Usami, Y Zhao, S Chien. Cell rolling and locomotion in blood vessels. In: Singh, M, VP Saxena (Editors). *Advances in Physiological Fluid Dynamics*, Narosa, New Delhi, 1996, 34-41

21. Skierczynski, BA, R Skalak, S Chien. Modeling of molecular mechanisms of cell adhesion. *Biochem Cell Biol* 1995; 73:399-409

22. Tangelder, GJ, MGA Oude Egbrink, KE Arfors, DW Slaaf, RS Reneman. Interactions between marginated granulocytes, platelets and venular endothelium in vivo. In: Boccalon, H (Editor). *Vascular Medicine*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1993, 353-357

23. Tedder, TF, DA Steeber, A Chen, P Engel. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J* 1995; 9:866-873

24. von Andrian, UH, SR Hasslen, RD Nelson, SL Erlandsen, EC Butcher. A central role for microvillus receptor presentation in leukocyte adhesion under flow. *Cell* 1995; 82:989-999

25. Ward, MD, DA Hammer. A theoretical analysis for the effect of focal contact formation on cell-substrate attachment strength. *Biophys J* 1993; 64:936-959

26. Wautier, JL, GW Schmid-Schönbein, GB Nash. 1999. Measurement of leukocyte rheology in vascular disease: clinical rationale and methodology. *Clin Hemorehology & Microcirculation* 1999; 21:7-24

27. Zhao, Y, S Chien, R Skalak. 1995. A stochastic model of leukocyte rolling. *Biophys J* 1995; 69:1309-1320

28. Zhao, Y. Analysis of Leukocyte Rolling. PhD Thesis, University of California, San Diego, 1996



Nom : Mademoiselle LABRADOR  
Prénom : Marie-Vénus

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

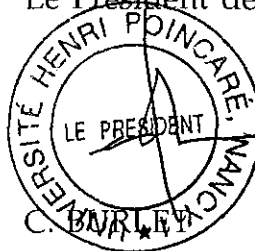
en BIOLOGIE SANTÉ ENVIRONNEMENT

Spécialité : GÉNIE BIOLOGIQUE ET MÉDICAL

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 21 janvier 2002 n°617

Le Président de l'Université



## RESUME

### ADHESION LEUCOCYTES/ENDOTHELIUM ET INTERACTIONS DES VOIES DE MECANO-TRANSDUCTION CHEZ LA CELLULE ENDOTHELIALE

Différents facteurs biochimiques et mécaniques sont à l'origine des troubles cardio-vasculaires et notamment l'athérosclérose, la thrombose ou l'inflammation. Les substances chimiotactiques secrétées par les tissus lésés induisent l'activation bi-directionnelle des leucocytes et des cellules endothéliales (CE) conduisant notamment à l'adhésion leucocyte/endothélium alors que les variations des conditions hémodynamiques locales conduisent à des changements morphologiques et fonctionnels des CE via un phénomène de mécano-transduction.

L'objectif de ce travail a été d'étudier, dans un premier temps, les forces d'adhésion des leucocytes à des substrats biologiques (fibrinogène, CE quiescentes et CE stimulées) à l'aide d'un système en flux. Dans un deuxième temps, l'étude des interactions entre différentes molécules impliquées dans 2 étapes (précoce et plus tardive) de la mécano-transduction a été réalisée.

Nos résultats ont montré que la force d'adhésion des leucocytes à leurs substrats est fonction de leur état d'activation, de l'expression et de la distribution des molécules d'adhésion, tandis que le processus du détachement dépend de la nature du substrat. Par ailleurs, nous avons complété le schéma de la mécano-transduction. La stimulation mécanique des CE induit la formation rapide de nouveaux complexes intégrines  $\alpha\beta3$ -protéine Shc via le site de liaison des intégrines à leur ligand. De plus, leur formation est dépendante en partie de la concentration intracellulaire de  $Ca^{2+}$  et de l'activité des protéines Gi. Cette étape précoce est, de plus, indispensable à l'activité JNK en aval, via le site de liaison des intégrines, la présence de calcium intracellulaire et l'activité catalytique des protéines Gi.

L'ensemble de ces études suggère que les modifications biochimiques et hémodynamiques de l'environnement local modulent la fonctionnalité des cellules impliquées dans l'athérogénèse, la thrombose et l'inflammation.

**Mots clés :** adhésion, cellules endothéliales, contrainte de cisaillement, leucocytes, mécano-transduction, molécules d'adhésion

## ABSTRACT

### ADHESION OF LEUKOCYTES ON ENDOTHELIUM AND INTERACTIONS OF MECHANOTRANSDUCTION PATHWAYS ON ENDOTHELIAL CELL

Many biochemical and mechanical factors are involved in cardio-vascular diseases, such atherosclerosis, thrombosis and inflammation. Chemotactic substances secreted by damaged tissues induce bi-directional activation of both leukocytes and endothelial cells (EC) to generate leukocyte/endothelium adhesion whereas local hemodynamic changes induce morphological and functional modifications on EC through a mechanotransduction process.

The aim of this study was to investigate adhesion forces of leukocytes on 3 biological substrates (fibrinogen, EC and activated EC) with flow chamber system and mechanotransductor interactions during early and late response of EC.

First adhesion force of leukocytes on the substrate depends of their activation state, of adhesion molecules localization and expression on cell surface whereas detachment process depends of the substrate. Second, we completed the mechano-transduction model. Flow stimulation of EC acts through the liaison site of integrins to induce the formation of  $\alpha\beta3$  integrin-Shc complexes which are partly dependent of intracellular calcium concentration and Gi-protein activity. This early response of EC is necessary to flow-dependent JNK late response by the liaison site of integrins and which depends of intracellular calcium concentration and Gi-protein activity.

All of these results suggest that biochemical and hemodynamic modifications of local environment modulate cell functions during atherogenesis, thrombosis and inflammation.

**Key words :** adhesion, endothelial cells, shear stress, mechanotransduction, adhesion molecules, leukocytes

---

**Spécialité :** Génie Biologique et Médical

**Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire**

Equipe LEMTA-UMR CNRS 7563

Faculté de Médecine de Nancy, BP 184, 54505 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex