

**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
GRENOBLE I**

DEA DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE

Mémoire présenté par

Jérôme COSTE

**Relations entre métabolisme et régulation de la
pression partielle en oxygène intracellulaire.
Vers une cartographie intracellulaire de l'oxygène.**

Année universitaire 1999-2000

**LABORATOIRE DE BIOENERGETIQUE
FONDAMENTALE ET APPLIQUEE**

-GROUPE D'ELECTROPHYSIOLOGIE MOLECULAIRE-

responsable de stage : Gilles FAURY

Relations entre métabolisme et régulation de la pression partielle en oxygène intracellulaire.

Vers une cartographie intracellulaire de l'oxygène.

| | |
|--|----|
| I. INTRODUCTION | 1 |
| II. MATERIELS ET METHODES | 4 |
| II 1. Modèle cellulaire: cellules endothéliales de veine ombilicale (HUVEC) | 4 |
| II 2. Sondes fluorescentes à oxygène | 4 |
| II 2 A. Principe de fonctionnement | 4 |
| II 2 B. Les sondes utilisées | 6 |
| II 2 C. Spectres des sondes employées et sensibilité aux variations de la pO ₂ | 7 |
| II 3. Méthodes d'étude des variations de la pO₂ | 8 |
| II 3 A. Etude d'une suspension d'HUVEC chargées en sonde à oxygène par spectrofluorométrie | 8 |
| II 3 B. Imagerie confocale à balayage laser des HUVEC chargés en sonde à oxygène | 10 |
| III. RESULTATS | 12 |
| III 1. Métabolisme mitochondrial et variations de la pression partielle d'oxygène intracellulaire | 12 |
| III 1 A. Etude sur la phénantroline en solution dans du Tyrode | 12 |
| III 1 B. Etude sur des suspensions cellulaires préincubées avec la phénantroline | 12 |
| III 1 C. Etude sur cellules adhérentes avec la technique de microscopie confocale | 14 |

| | |
|--|-----------|
| III 2. Variation de la pO₂ extracellulaire et conséquences sur la pO₂ intracellulaire | 15 |
| III 2 A. Etude sur des suspensions cellulaires d'HUVEC | 15 |
| III 2 B. Etude effectuée en microscopie confocale | 16 |
| III 3. Métabolisme non mitochondrial et variations de la pression partielle d'oxygène intracellulaire: conséquences sur l'activation de la NO synthase des cellules endothéliales | 21 |
| IV. DISCUSSION | 25 |
| V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 27 |
| VI. ANNEXES | 29 |
| V 1. Les flux d'oxygène et le métabolisme mitochondrial | 29 |
| V 2. La consommation de NO par la NOS | 29 |

I Introduction.

L'oxygène est vital pour la quasi totalité des cellules. En effet, l'oxygène est une molécule impliquée dans un grand nombre de réactions chimiques cellulaires. En particulier, une partie du métabolisme énergétique, processus par lequel les aliments consommés produisent de l'énergie pour répondre aux besoins de l'organisme, s'accompagne d'une consommation d'oxygène et d'un rejet de CO₂ dans l'environnement.

Dans le métabolisme aérobie, la mitochondrie est le siège de transferts d'électrons qui ont lieu au sein de la chaîne respiratoire : l'oxygène est utilisé comme accepteur final d'électrons. Il est réduit par la cytochrome oxydase, l'enzyme terminale de la chaîne de transport des électrons au niveau de la membrane mitochondriale interne. L'oxygène permet la réoxydation des coenzymes réduits (NADH, FADH₂) et la force générée par cette oxydation est majoritairement utilisée pour synthétiser de l'ATP. Par ailleurs, des enzymes cellulaires extramitochondriales non impliquées dans la fonction respiratoire peuvent aussi utiliser l'oxygène. C'est le cas, par exemple, de l'oxyde nitrique synthase (NOS) qui produit le monoxyde d'azote (NO), un gaz neuromodulateur et vasomoteur très répandu. Cette enzyme consomme une molécule d'oxygène pour fabriquer une molécule de NO.

Cependant, bien que l'oxygène soit un élément capital de la vie cellulaire, dans les cellules animales, l'apport d'oxygène est exogène. Le transport de l'oxygène du sang vers l'intérieur de la cellule se produit par diffusion à travers la membrane cellulaire et les milieux intra et extracellulaires, suivant le gradient de concentration. La connaissance et la validation de ce mécanisme a nécessité de disposer de techniques pour mesurer la pression partielle en oxygène (pO₂). Différents moyens existent pour étudier la pO₂ suivant que l'on considère des tissus, des vaisseaux ou encore des cellules et des organelles. L'oxygène, au niveau musculaire, est étudié à l'aide de micro-électrodes sensibles à l'oxygène. Au niveau vasculaire et en particulier pour les artérioles, capillaires et veinules, la spectrophotométrie est utilisée pour mesurer la saturation de l'hémoglobine dont le spectre d'émission diffère suivant qu'elle soit ou non saturée en oxygène (1).

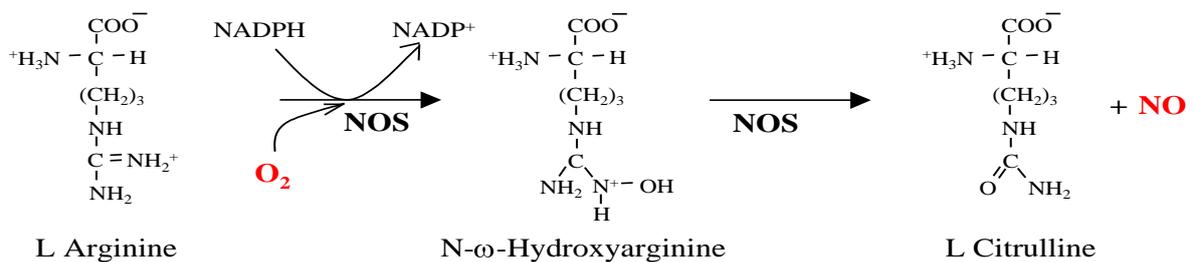
Un nouvel outil d'étude de la pO₂ a été développé: les sondes fluorescentes à oxygène, dont les propriétés optiques sont affectées par la pO₂. Elles présentent en effet l'avantage d'être un système non invasif permettant une quantification de la concentration en O₂. De plus, le délai de réponse de la sonde est très court, permettant de répondre à des variations rapides de la pO₂. Jusqu'alors, ces sondes moléculaires ont été ajoutées au milieu baignant les cellules (1-3).

Dans ce travail, nous avons choisi d'étudier l'impact, sur la pO_2 intracellulaire, de deux mécanismes consommateurs d'oxygène, que sont la respiration mitochondriale et la synthèse de NO. Nous nous intéresserons également à l'effet d'une hypoxie induite par une diminution de la pO_2 dans le milieu extracellulaire sur la pO_2 intracellulaire.

Nous avons choisi de réaliser cette étude sur des cellules endothéliales issues de veines ombilicales humaines (HUVEC). Ce modèle cellulaire est intéressant à plusieurs titres :

- les cellules endothéliales ont un potentiel glycolytique leur permettant de supporter l'hypoxie ou l'anoxie de courte durée (4). Par un simple bullage d'argon, l'oxygène sera chassé du milieu baignant les cellules et l'impact sur la pO_2 intracellulaire sera observé.

- les cellules endothéliales peuvent induire une vasodilatation en synthétisant un médiateur majeur : NO. En stimulant ou en bloquant la NO synthase endothéliale endogène (eNOS) par l'action de l'acétylcholine ou de la N- ω -nitro-L-arginine méthyl ester (L-NAME), nous pourrions évaluer si une modification mesurable de la pO_2 est imputable à l'activation de cette enzyme non impliquée dans la fonction respiratoire. Le NO est un gaz synthétisé à partir de L-arginine. Cette synthèse s'accompagne d'une consommation d'oxygène et d'une production de citrulline selon la réaction ci dessous :



De plus, par l'utilisation de découplants de l'oxydation phosphorylante et d'inhibiteurs de la chaîne respiratoire, nous étudierons les variations de la pO_2 intracellulaire consécutives à une altération du métabolisme de la mitochondrie.

Deux sondes fluorescentes à oxygène sont utilisées comme outils dans le cadre de notre étude des variations de la pO_2 intracellulaire:

- une phénantroline ($[Ru(di\Phi phen. Sulfonate)_3]^{2+}$) élaborée et fabriquée dans le cadre d'un projet unissant notre laboratoire à des équipes de chimistes et de physiciens de Grenoble. Depuis le début de cette étude, une équipe de la faculté de médecine du Maryland a synthétisé et décrit cette même sonde (5) sans présenter cependant d'application.

- une porphyrine ($Pd(II)meso-tetra(4-carboxy phényl) porphyrine$) est également utilisée. Quelques expériences effectuées sur cellules isolées ont consisté à ajouter la sonde dans le milieu baignant les cellules (6, 7).

Ce travail est mené en utilisant les techniques de spectrofluorimétrie, en mesurant les variations de l'intensité de luminescence des sondes moléculaires à oxygène, mais aussi par mesure du déclin de luminescence (τ). Enfin, des expériences ont été réalisées en microscopie confocale. Dans le cadre d'un projet à plus long terme, ce travail donne aussi la possibilité de déterminer si les sondes fluorescentes à oxygène, dont nous disposons actuellement, sont susceptibles d'être utilisées pour réaliser une cartographie intracellulaire de l'oxygène.

II Matériels et méthodes.

II 1. Modèle cellulaire : cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC).

Les cellules utilisées sont des cellules endothéliales obtenues à partir de veines ombilicales humaines (Human Umbilical Venous Endothelial Cells : HUVEC), isolées et mises en culture selon la méthode de Jaffe (8, 9).

Sous une hotte stérile, les veines ombilicales sont canulées et perfusées par un milieu tamponné HBS (NaCl 140 mM, KCl 4 mM, glucose 7.6 mM, HEPES 15 mM, streptomycine 0.1 mg.mL⁻¹, pénicilline 100 UI.mL⁻¹, amphotéricine B 2.5µg.mL⁻¹ et rouge de phénol 0.1% V/V, pH 7.4). Les cellules sont isolées par l'action d'une solution de collagénase (tampon HBS contenant 0.1% de collagénase 1A Sigma). Après 10 minutes d'incubation à 37°C, la réaction est stoppée en perfusant la veine par du milieu de culture 199 additionné de : HEPES 20 mM, NaHCO₃ 10 mM, streptomycine 0.075 mg.mL⁻¹, pénicilline 75 UI.mL⁻¹, L-glutamine 2 mM, rouge de phénol 0.1% (V/V), pH 7.4) contenant 22% (V/V) de sérum humain. La suspension cellulaire est centrifugée 10 minutes à 200 G et le culot est suspendu dans du milieu de culture avant ensemencement dans une boîte de Pétri traitée par de la fibronectine. La culture est effectuée à 37°C et 5% CO₂. Le milieu de culture est changé 2 heures plus tard, puis toutes les 48 heures. Les cellules sont alors transférées tous les 2 à 4 jours pour un maximum de 4 transferts.

Les hépatocytes de rats employés ont été préparés par Carole Ichai et Fanny Leenhardt. (Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée dirigé par le Pr Xavier Leverve). Il sont préparés suivant la méthode de Berry et Friend modifiée par Groen et Col. (10, 11) reposant sur une digestion enzymatique par la collagénase du collagène de la matrice extracellulaire à partir d'un foie perfusé fraîchement isolé.

II 2. Sondes fluorescentes à oxygène.

II 2 A. Principe de fonctionnement.

Les sondes organiques présentent des niveaux d'énergie dans le domaine du visible. Deux types d'états d'énergie existent : les singulets et les triplets de spin. Le couplage au champ électrique de la lumière rend les transitions singulet-singulet hautement permises et ces états ont donc une durée de vie extrêmement courte de l'ordre de la nanoseconde. En revanche, les transitions entre état singulet et triplet ne sont en général pas autorisées et l'état triplet a une durée de vie longue supérieure ou égale à la microseconde. Les sondes utilisées sont des

complexes ou composés de coordination dont l'atome central a des propriétés magnétiques favorisant le phénomène de transition singulet-triplet. En plus de ces transitions optiques, l'énergie des sondes peut être transférée vers des molécules avoisinantes (dans le cas présent, il s'agira de l'oxygène moléculaire).

Une source lumineuse excite la sonde de son état fondamental S1 vers l'état excité singulet S2 (figure 1). Rapidement, le phénomène de relaxation intersystème conduit la sonde vers un état triplet T ayant une longue durée de vie. Cela autorise le transfert d'énergie vers la molécule d'oxygène. Au niveau de la sonde, la présence d'oxygène se traduit par un déficit en émission de lumière (extinction par transfert d'énergie). En d'autres termes, lorsque la pO_2 augmente dans l'environnement de la sonde, la fluorescence de celle ci diminue.

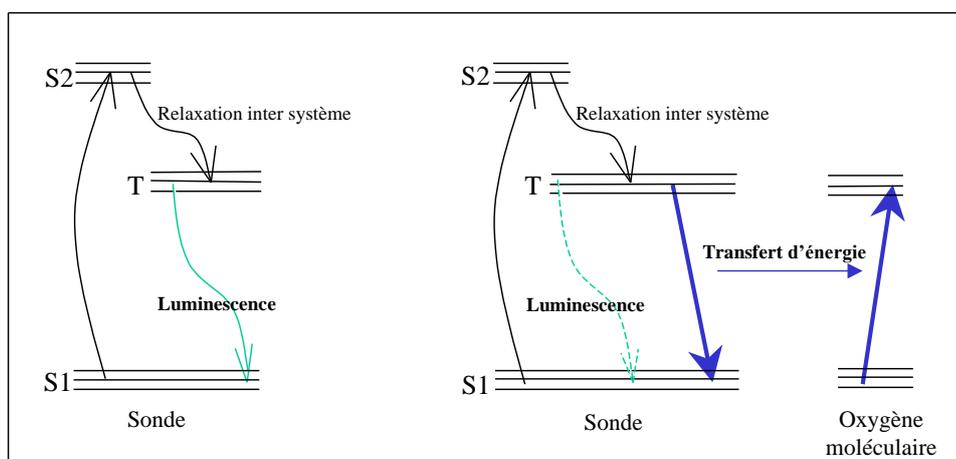


Figure 1. Principe de l'extinction de luminescence par transfert d'énergie vers l'oxygène moléculaire. Excitée par une source lumineuse, la sonde passe de l'état fondamental (S1) dans un état excité singulet (S2), puis très rapidement dans un état triplet (T). Un retour à l'état fondamental implique une perte d'énergie avec émission de lumière. En présence d'oxygène, une partie de l'énergie sera transférée vers O₂ provoquant une réduction de la quantité de lumière émise.

Une quantification est possible en mesurant l'intensité de luminescence émise par la sonde excitée par une source lumineuse : l'intensité de luminescence diminue lorsque la pO_2 augmente. Par ailleurs, lorsque la source laser excitant les sondes est utilisée sous forme de flashes de durée très brèves (quelques μs), le temps nécessaire pour que la lumière émise par la sonde diminue d'un facteur e (2,72) après un flash est appelé temps de vie (τ) : on parle aussi de déclin de luminescence. Ce temps de vie est affecté par la pO_2 à proximité de la sonde : il diminue lorsque la pO_2 augmente (figure 2).

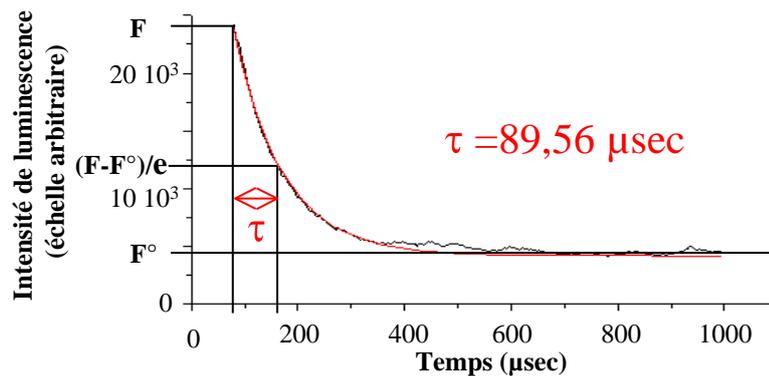


Figure 2. Mise en évidence du temps de vie ou tau (τ).

Le déclin de luminescence présenté est celui de la porphyrine, chargée dans les HUVEC, immédiatement après un flash laser (514 nm ; 5 kHz).

II 2 B. Les sondes utilisées.

Les sondes étudiées sont des complexes hydrosolubles.

Une molécule de la famille des phénantrolines est synthétisée au Laboratoire d'Electrochimie et Photochimie Redox (LEOPR UMR 5630) dirigé par le professeur Alain Deronzier. Elle est liée à un atome de ruthénium pour former le complexe chargé $[\text{Ru}(\text{di}\Phi \text{ phen. Sulfonate})_3]^{2+}$ (figure 3) qui s'associe à un contre ion Na^+ . Excité à 488 nm, ce fluorochrome présente un maximum d'émission à 605 nm (Fig. 4A). Dans un premier temps, nous ne disposons que de cette sonde.

La porphyrine étudiée est commercialisée par Porphyrin Products : elle est complexée à un atome de palladium et a pour nom Pd(II)meso-tetra(4-carboxy phényl) porphyrine (figure 3). Excitée à 514 nm, cette sonde émet de la lumière à 710 nm (Fig. 4B). Un traitement basique de la sonde, réalisé par NaOH, permet d'améliorer sa solubilisation afin de l'employer à la concentration finale de 100 μM .

Par la suite nous utiliserons les termes « phénantroline » et « porphyrine » pour désigner ces molécules. La non toxicité des sondes sur les HUVEC a été contrôlée après une incubation d'une heure d'une suspension de cellules avec chacune des sondes. Le test d'exclusion au bleu trypan permet d'estimer que la viabilité des cellules est d'environ 95%. De plus, aucune altération morphologique des cellules n'a été décelée en microscopie 3 à 4 heures après le chargement des sondes.

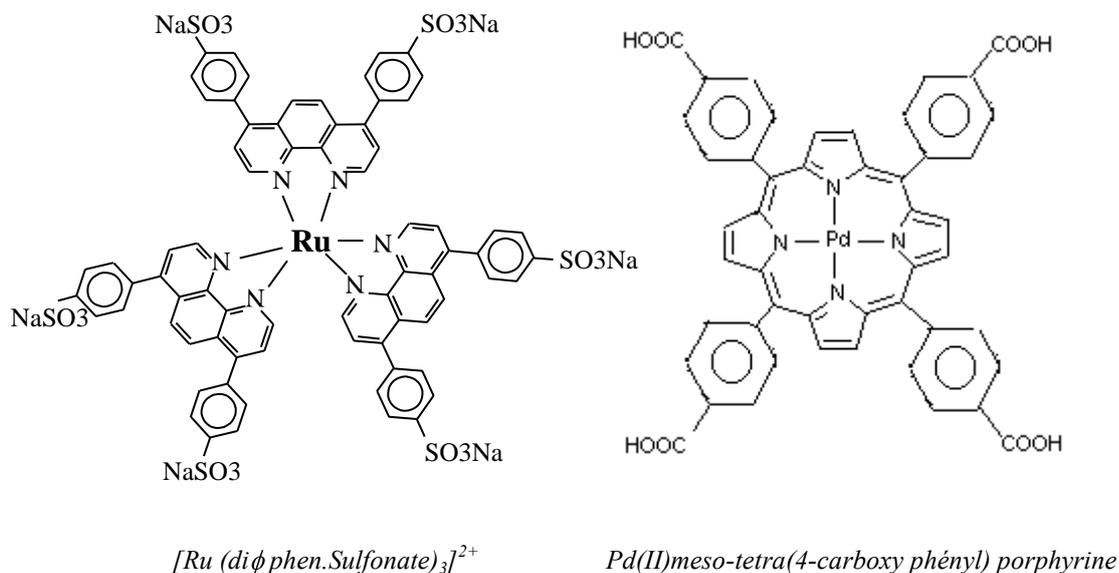


Figure 3. Formules des 2 sondes à oxygène employées.

II 2 C. Spectres des sondes employées et sensibilité aux variations de la pO₂.

Les spectres d'émission de chacune des sondes en solution dans du Tyrode sont présentés sur la figure 4. Le spectre de la phénantroline, à pO₂ atmosphérique est représenté par le spectre de faible amplitude sur la figure 4A. En appauvrissant le milieu en oxygène, par un bullage à l'argon, cela a pour effet une augmentation d'un facteur 3,5 de l'intensité de luminescence à 605 nm (pic de forte amplitude, figure 4A). Cette sonde présente un signal fort mais une dynamique faible lorsque la pO₂ varie. Le pic d'émission de la porphyrine, centré à 710 nm, est très peu élevé en l'absence de bullage d'argon (figure 4B). Sous bullage argon, l'intensité de luminescence augmente d'un facteur 10 (figure 4B), ce qui révèle une forte sensibilité aux variations de pO₂. L'intensité de luminescence est plus faible mais cela n'est pas visible sur la figure 4 car une normalisation a été effectuée.

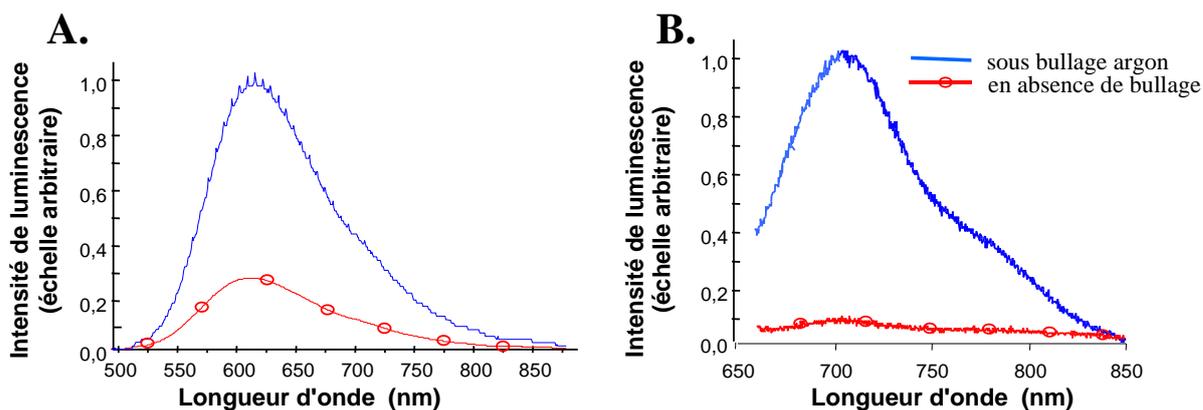


Figure 4. Maximum d'émission de la phénantroline 100 μ M (A) et de la porphyrine 10 μ M (B) solubilisées dans une solution de Tyrode. Par spectrométrie en cuve, les pics d'émission sont enregistrés sans traitement préalable ou après 20 min d'un bullage argon. La phénantroline est excitée à 488 nm et la porphyrine à 514 nm.

II 3 Méthodes d'étude des variations de la pO₂.

II 3 A. Etude d'une suspension d'HUVEC chargées en sonde à oxygène par spectrofluorimétrie.

II 3 A a. Préparation des suspensions cellulaires et chargement des sondes.

Une boîte de culture contenant des HUVEC à sub-confluence est rincée avec une solution de Tyrode (NaCl 118 mM, KCl 5.6 mM, CaCl₂ 2.4 mM, MgCl₂ 1.2 mM, HEPES 10 mM et glucose 11mM, pH 7.4). Une solution de trypsine 0.1%, EDTA 0.01%, sérum albumine bovine (SAB) 0.25% dans le Tyrode permet en moins d'une minute de suspendre les cellules endothéliales. L'action enzymatique de la trypsine est stoppée par ajout de sérum humain (Tyrode, sérum humain V/V). La suspension cellulaire est alors transférée dans un tube à centrifuger. La boîte de culture est rincée par une solution de Tyrode. Après centrifugation à 200G pendant 5 minutes, le culot de cellules est resuspendu dans du Tyrode et centrifugé à nouveau. Le culot est repris avec une solution de Tyrode additionnée de : SAB 5mg.mL⁻¹. Pluronic F-127 0.45 mg.mL⁻¹ en présence de phénantroline ou de porphyrine à la concentration de 100 μ M. La suspension, homogénéisée toutes les 10 minutes, est placée à 37°C et 5% de CO₂ durant 1 heure. Après centrifugation, le culot est repris avec du Tyrode afin d'éliminer la sonde présente en solution. Deux autres étapes de lavage sont effectuées.

Deux paramètres peuvent être étudiés sur les suspensions cellulaires : l'intensité de luminescence qui diminue lorsque la concentration en oxygène augmente et le temps de vie de la sonde excitée par des flashes de lumière qui diminue dans les mêmes conditions. Si l'intensité de luminescence est un paramètre lié à la concentration de sonde employée, en revanche le temps de vie de la sonde est un paramètre indépendant de la concentration de

sonde.

II 3 A b. Mesure de l'intensité de luminescence.

La suspension cellulaire (2.10^5 cellules.mL⁻¹) incubée en présence de la phénantroline est placée dans la cuve d'un spectrofluorimètre (Deltascan Model C-61/2000, Photon Technologie International, Princeton, NJ, USA). Excité à 488 nm, la fluorescence d'émission est mesurée par un photomultiplicateur à 605 nm.

L'étude de la porphyrine requière un autre photomultiplicateur, sensible à 710 nm. Les mesures ont donc été réalisées au Laboratoire de Spectrométrie Physique (professeur Jean Claude Vial, groupe OPSO, UJF) où nous disposons d'un photomultiplicateur adapté à photocathode AsGa. Le dispositif expérimental est représenté sur la figure 5. Dans le mode de mesure de l'intensité de luminescence (fig. 5A), un laser Argon permet d'exciter la sonde à 514 nm et un monochromateur réalise un balayage de la gamme spectrale de 550 à 850 nm afin d'obtenir un spectre d'émission de la sonde.

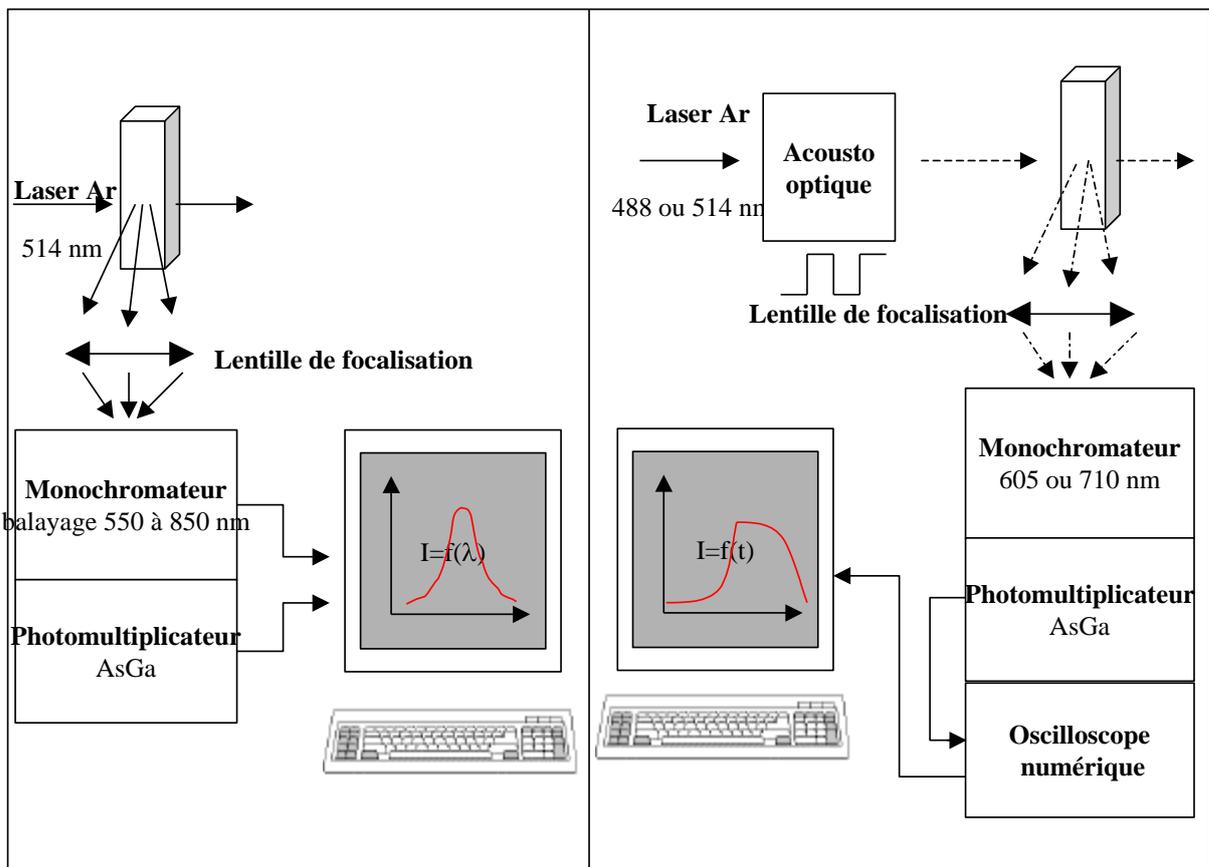


Figure 5. Dispositifs expérimentaux.

A. Dispositif expérimental d'acquisition de spectres d'émission de la sonde porphyrine lorsque l'intensité de luminescence est étudiée. B. Dispositif expérimental permettant la mesure du temps de vie (τ) des sondes étudiées.

II 3 A c. Mesure du déclin de luminescence.

La mesure des déclin (ou temps de vie, τ) de chacune des sondes est effectuée en réglant le monochromateur sur le maximum d'émission des sondes ($\lambda=710$ nm pour la porphyrine excitée à 514 nm et 605 nm pour la phénantroline éclairée à 488 nm). Un acousto optique permet d'obtenir un faisceau laser discontinu, modulé en créneaux (fig. 5B).

La suspension de cellules chargées en porphyrine suivant le protocole précédemment décrit, est soumise à des impulsions laser de 100 μ sec à la fréquence de 5 kHz. Avec la phénantroline, les déclin sont obtenus en travaillant avec des flashes de 10 μ sec à la fréquence de 50 kHz. Le front de montée est de 50 nsec et 200 déclin successifs sont moyennés afin de déterminer le temps de vie.

Les mesures effectuées en cuve sont réalisées sous agitation douce et à température ambiante.

II 3 B. Imagerie confocale à balayage laser des HUVEC chargées en sonde à oxygène.

II 3 B a. Principe.

Si le microscope photonique classique capte simultanément tous les points de l'objet, le balayage utilise une configuration optique dans laquelle la source lumineuse est fortement focalisée sur un point qui peut être balayé. En mode confocal, le détecteur est simultanément focalisé sur ce même point. Cette technique permet de réaliser des coupes optiques fines des cellules. L'inconvénient inhérent à cette technique est le photoblanchiment accru des sondes fluorescentes, consécutif à la focalisation de la source.

II 3 B b. Mode opératoire.

Les cellules sont repiquées dans des boîtes de culture dont le fond, percé d'un trou de 0.75 cm de diamètre, est pourvu d'une lamelle de verre collée sur la face externe de la boîte au moyen de mastic au silicone (figure 6). Le verre est prétraité par une solution de soude (0.5 N) pendant 24 heures et les boîtes sont traitées par de la fibronectine (incubation 24 heures à 37°C, 0.25 mg.mL⁻¹). Les cellules sont rincées par la solution physiologique de Tyrode puis incubées à 37°C et à l'obscurité en présence de la sonde à oxygène à la concentration de 100 μ M dans la solution de Tyrode additionnée de : SAB 5mg.mL⁻¹, Pluronic F-127 0.45 mg.mL⁻¹ pendant 1 heure à 37°C et 5% de CO₂. Les cellules sont ensuite rincées par la solution de Tyrode avant l'observation à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser (ZEISS LSM 410, Iena, RFA). Pour réaliser ces études, nous collaborons avec le Dr. Yves Usson de l'équipe Dynamique de l'Organisation du Génome (DyOGen, INSERM U309, Institut Albert Bonniot, UJF) dirigée par le professeur Michel Robert-Nicoud.

Les boîtes de culture (figure 6) permettent une périfusion des cellules par une solution de

Tyrode dans laquelle un bullage peut être effectué.

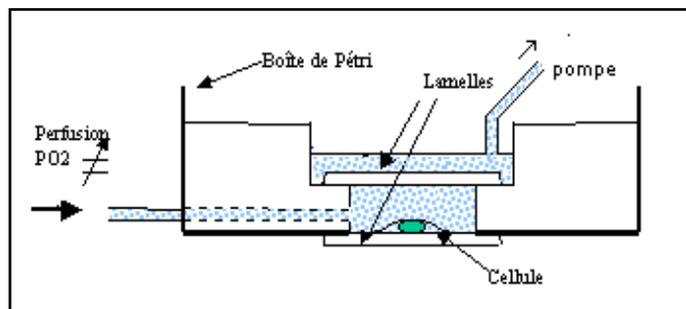


Figure 6. Schéma du dispositif de perfusion utilisé.

Le liquide perfusé s'écoule par gravité (débit : 30 mL.h^{-1}) jusqu'à la chambre de $700 \mu\text{L}$ au fond de laquelle les cellules adhèrent. Une pompe péristaltique permet d'éliminer la solution de Tyrode qui déborde de la chambre. L'ensemble du dispositif est adapté à une observation des cellules sous le microscope.

Nous observons un champ comprenant environ 10 cellules. Pour chaque expérience d'une durée de 40 minutes, une mesure de fluorescence est réalisée par minute. L'image obtenue est la moyenne de 4 balayages successifs de tout le champ.

Un programme d'analyse des données, spécialement conçu par le Dr. Yves Usson pour notre étude, permet de déterminer l'intensité de luminescence dans chacune des cellules. En effet, un masque binaire permet de délimiter le contour des cellules. Le rapport de la fluorescence mesurée pour chaque image (F) sur la fluorescence de l'image initiale (F°) est calculé : F/F° .

III Résultats.

III 1. Métabolisme mitochondrial et variations de la pression partielle d'oxygène intracellulaire.

III 1 A. Etude sur la phénantroline en solution dans du Tyrode (milieu acellulaire).

L'étude a été menée en utilisant la phénantroline synthétisée à Grenoble. Nous nous sommes assurés que les inhibiteurs et découplants, employés pour moduler la respiration des cellules, n'altéraient pas les propriétés optiques de la phénantroline en solution. Les résultats obtenus par mesure de l'intensité de luminescence sont présentés sur la figure 7. L'ajout de DNP 300 μM , un découplant de l'oxydation phosphorylante provoquant une surconsommation d' O_2 par la mitochondrie, entraîne une diminution de 30% de la luminescence à 605 nm. Le CCCP 800 nM (un autre découplant) et le KCN 1 mM, un inhibiteur du complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale, provoquent respectivement des diminutions de 4% et 0,5% seulement. Le DNP semble donc interagir avec la phénantroline et ne sera pas utilisé par la suite.

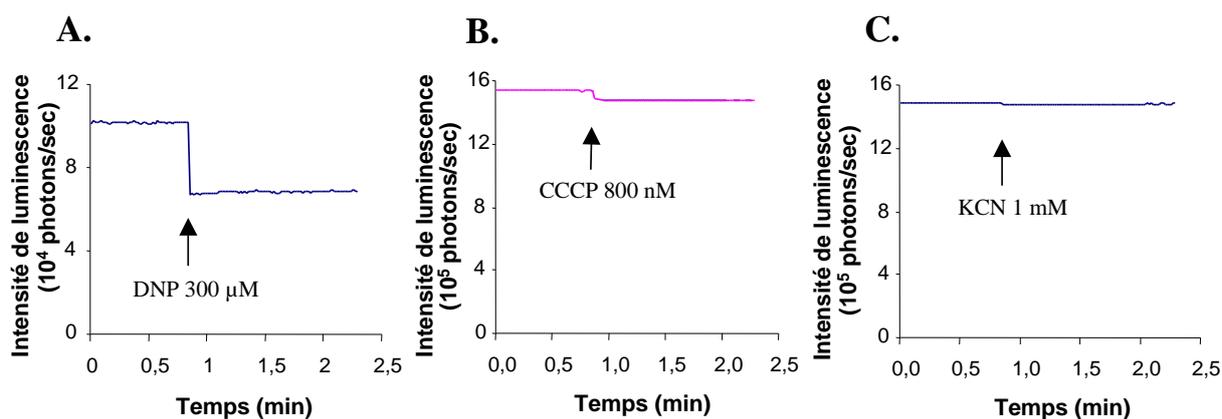


Figure 7. Evaluation des interactions entre la phénantroline 10 mM et le DNP 300 μM (A.), le CCCP 800 nM (B.) et le KCN 1 mM (C.) par mesure de l'intensité de luminescence. (excitation : 488 nm ; émission : 605 nm.). (une figure représentative montrée dans chaque cas ; $n=2$ pour chacun des produits testés)

III 1 B. Etude sur des suspensions cellulaires préincubées avec la phénantroline.

Nous utilisons ici les découplants et inhibiteurs à leurs concentrations efficaces. Le cyanure ne provoque pas de variation de l'intensité de luminescence de la phénantroline chargée dans les HUVEC en suspension comme cela est montré sur la figure 8. De même, les expériences menées en mode de déclin de luminescence ne font pas apparaître de variations de τ en réponse à l'ajout de KCN 100 μM (figure 9).

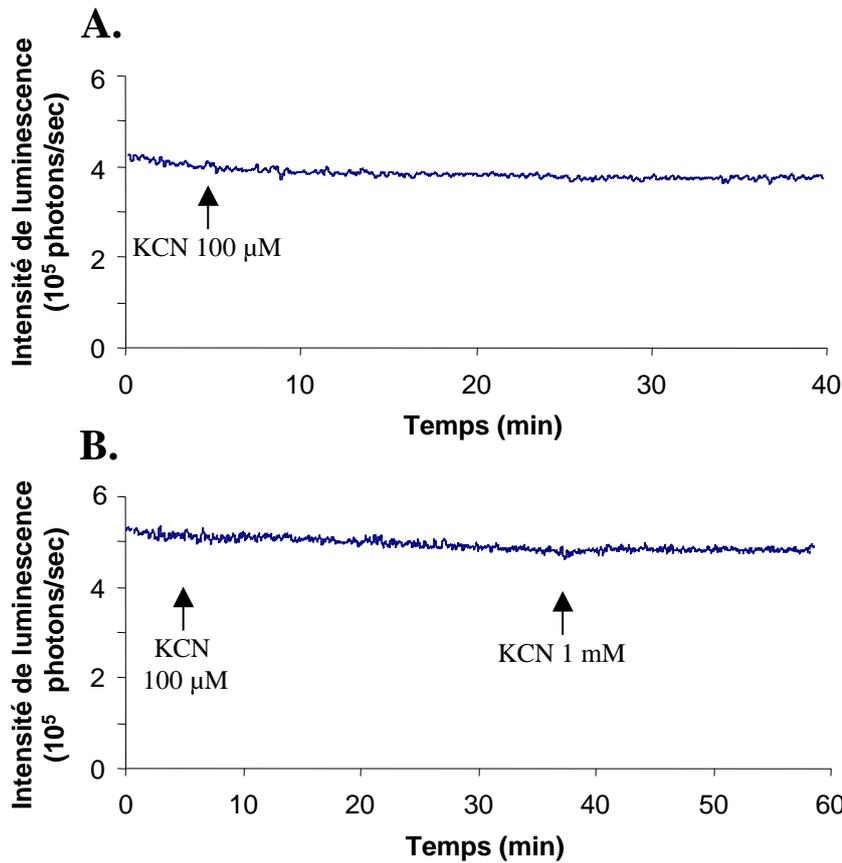


Figure 8. Effet de KCN sur l'intensité de luminescence de la phénantroline chargée dans une suspension d'HUVEC. (A) Ajout KCN 100 μ M (une figure représentative montrée ; $n=3$). (B) Ajouts successifs de KCN 100 μ M et 1mM (une figure représentative montrée ; $n=2$).

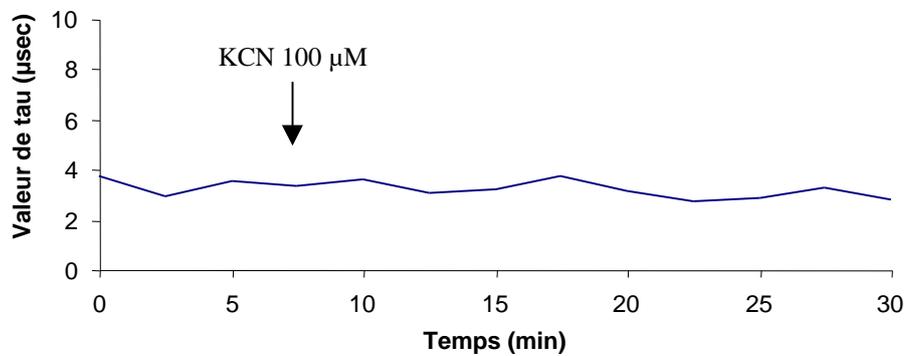


Figure 9. Effet de KCN 100 μ M sur une suspension d'HUVEC chargée en phénantroline étudié en mode de mesure de déclin de luminescence. (une figure représentative montrée ; $n=2$)

D'autre part, l'ajout de CCCP 400 nM est sans effet sur l'intensité de luminescence de la phénantroline chargée dans une suspension d'HUVEC comme cela est montré sur la figure 10.

Dans une deuxième série d'expérience, disposant de la sonde porphyrine, plus sensible aux faibles variations de la pO_2 que la phénantroline, nous avons réalisé des mesures similaires en mode de mesure du déclin de luminescence. Nos résultats montrent que dans cette

configuration expérimentale aussi, le KCN ne modifie pas la luminescence de la sonde dans les cellules (figure 11).

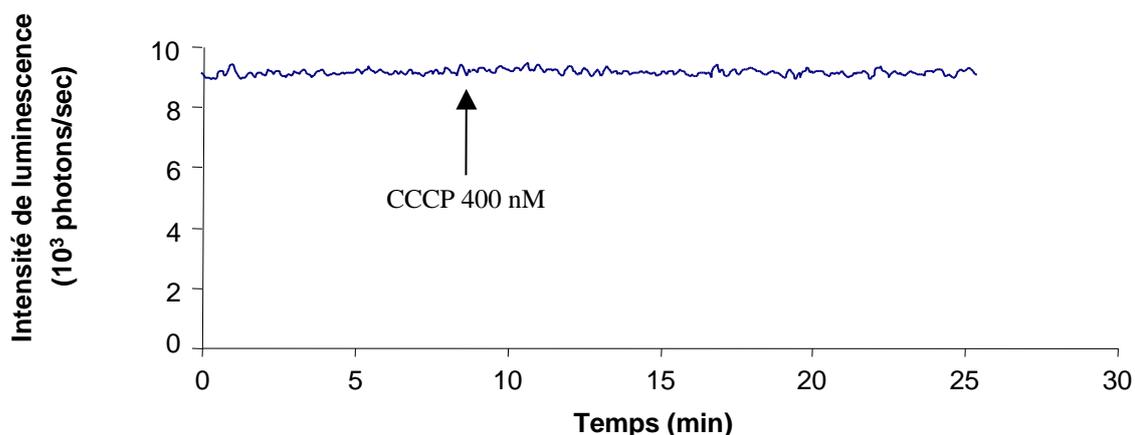


Figure 10. Effet d'un ajout de CCCP 400 nM sur l'intensité de luminescence d'une suspension d'HUVEC chargée en phénantroline. (une figure représentative montrée ; n=2)

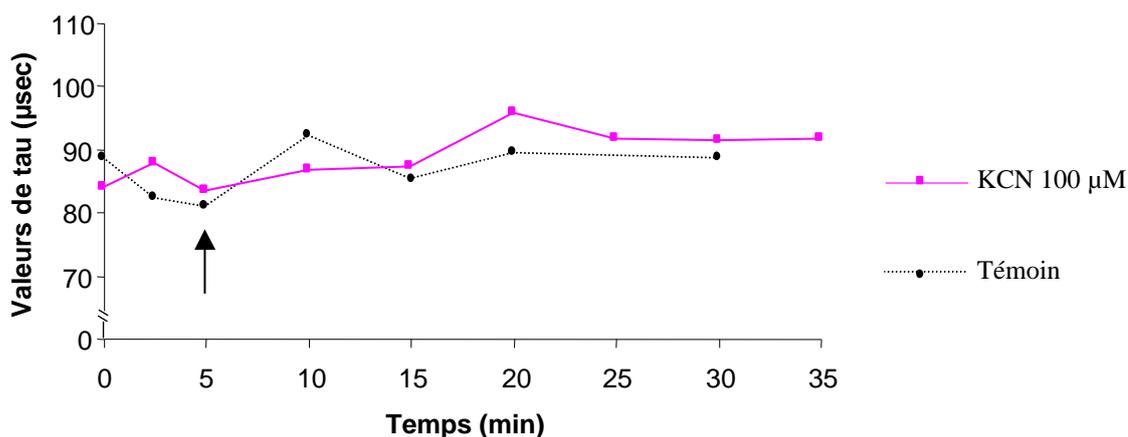


Figure 11. Effet de KCN 100µM sur une suspension d'HUVEC chargée en porphyrine étudié en mode de déclin de luminescence. (excitation : 514 nm ; émission : 710 nm). La flèche indique le moment de l'ajout de KCN (une figure représentative montrée ; n=2).

III 1 C. Etude sur cellules adhérentes avec la technique de microscopie confocale.

Une autre approche a consisté à travailler en microscopie confocale à balayage laser afin de localiser les régions intracellulaires présentant une forte fluorescence (pauvres en O₂) et d'en mesurer les variations. La porphyrine présente une luminescence plus faible que la phénantroline et ne permet pas d'extraire un signal suffisant en microscopie, que ce soit en mode confocal ou non confocal, dans la configuration actuelle du matériel. Toutes les

expériences conduites à ce jour en microscopie confocale ont donc été réalisées à l'aide de la phénantroline.

III 1 C a. Utilisation de KCN et CCCP pour moduler la respiration.

Pour l'ensemble des mesures réalisées, une diminution basale de la fluorescence est constatée au cours du temps suggérant que la sonde est sensible au photoblanchiment comme montré sur la figure 12D. L'effet de KCN a été testé au cours de 4 expériences : 3 pour lesquelles les résultats obtenus sont identiques aux témoins correspondants et 1 montrant une diminution plus forte de la fluorescence que pour les témoins ad hoc suggérant une diminution de la consommation de O₂. Un exemple est montré sur la figure 12 (E,F,G et H).

L'ajout de CCCP a été réalisé sur 4 expériences : 3 présentant une superposition des valeurs F/F° avec les témoins correspondants et une pour laquelle la diminution de fluorescence est moindre que pour le témoin. Une illustration est présentée sur la figure 12 (I,J,K et L). Les essais réalisés avec l'antimycine ou le myxothiazol n'ont pas mis en évidence de modifications de la pO₂ mesurables par la phénantroline (non montrés).

Pour chaque expérience menée, un témoin est réalisé pour lequel une solution de Tyrode est substituée à l'inhibiteur ou au découplant utilisés (figure 12 A, B, C, D).

Nous n'avons mis en évidence aucun effet de KCN ou du CCCP, donc de l'activité des mitochondries sur les variations de la pO₂ intracellulaire par l'utilisation des sondes fluorescentes à oxygène.

III 1 C b. Localisation de la fluorescence de la phénantroline.

La fluorescence de la phénantroline chargée dans une cellule n'est pas homogène : elle se présente sous forme de granulations. Nous avons recherché si la fluorescence de la phénantroline dans les cellules coïncidait avec la localisation des mitochondries.

Pour permettre cette étude, nous avons élaboré un protocole de chargement des cellules avec la phénantroline et un marqueur du potentiel de membrane des mitochondries, la rhodamine 123. La fluorescence de chacune des sondes a permis de définir des masques binaires dont on peut calculer le pourcentage de recouvrement par analyse d'image. Si les cellules du centre de l'image (figure. 13 A.) sont considérées dans leur intégralité, 21 % de la surface marquée par la phénantroline coïncide exactement (pixel/pixel) avec le marquage des mitochondries (figure 13 D, E, F).

Dans la région périnucléaire, déterminée en transmission, se trouve 55% du marquage des mitochondries et 52% de la fluorescence de la phénantroline. Dans cette région, 31 % de la surface marquée par la phénantroline est exactement superposé avec le marquage des mitochondries (figure 13 B, C, D). Si le reste de la fluorescence de la phénantroline n'est pas exactement superposé aux mitochondries, il apparaît cependant que celle-ci se trouve à proximité immédiate traduisant une colocalisation forte.

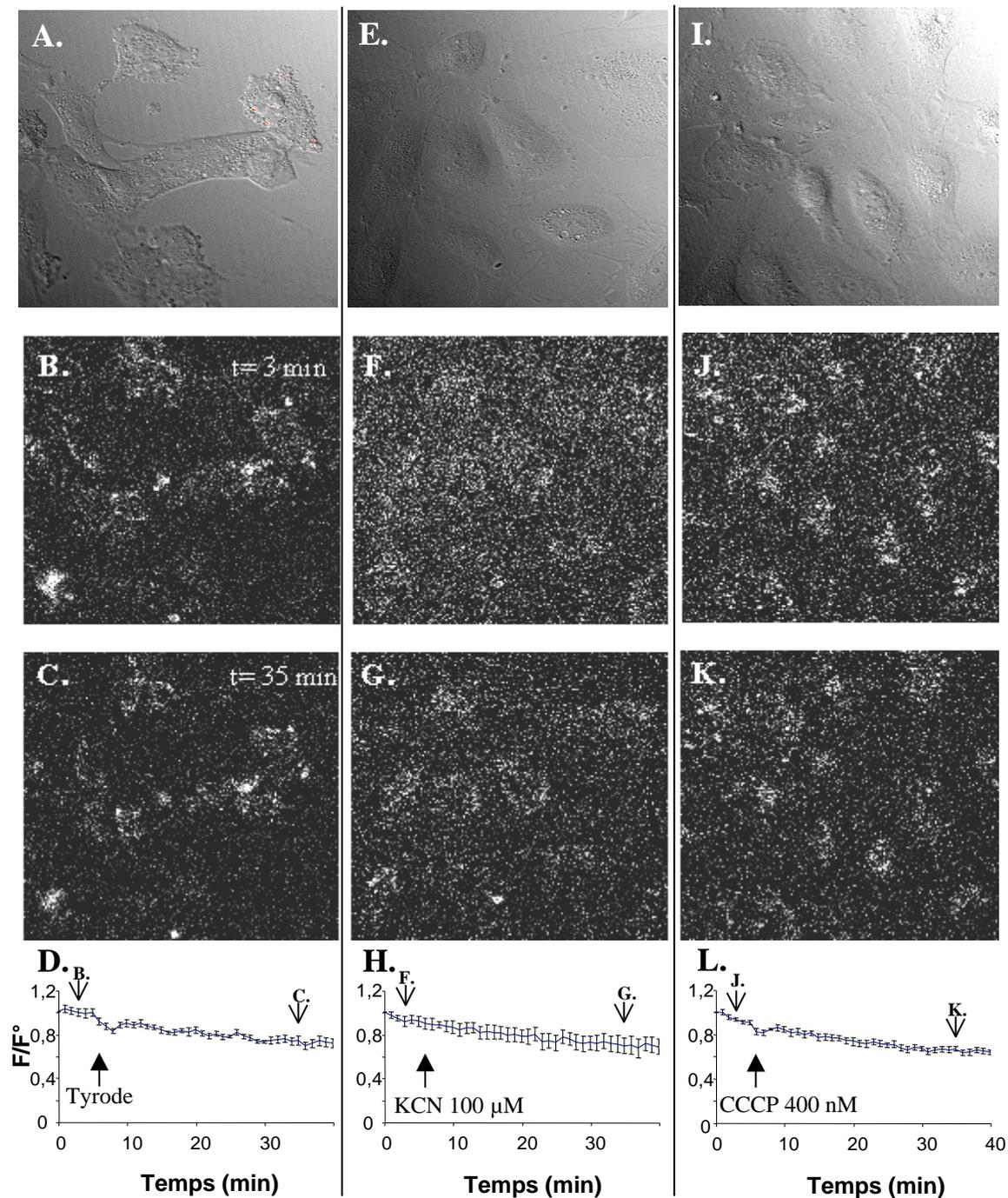


Figure 12. Effets de KCN 100 μM et de CCCP 400 nM sur la $p\text{O}_2$ intracellulaire d'HUVEC, chargés en phénantroline, étudiés en microscopie confocale.

Chacune des colonnes représente une expérience indépendante. Images des champs considérés (prises en transmission) : A [8 cellules] ; E [7 cellules] ; I [8 cellules]. Les images de fluorescence sont réalisées toutes les minutes. Images de fluorescence obtenues 3 min avant ajout de tyrode, de KCN 100 μM ou de CCCP 400 nM (B, F et J) et 30 min après (C, G et K) respectivement. Les figures D, H et L représentent la valeur moyenne du rapport F/F° pour les cellules analysées dans le champ. Les écarts types sont représentés. (n=4 par produit employé.)

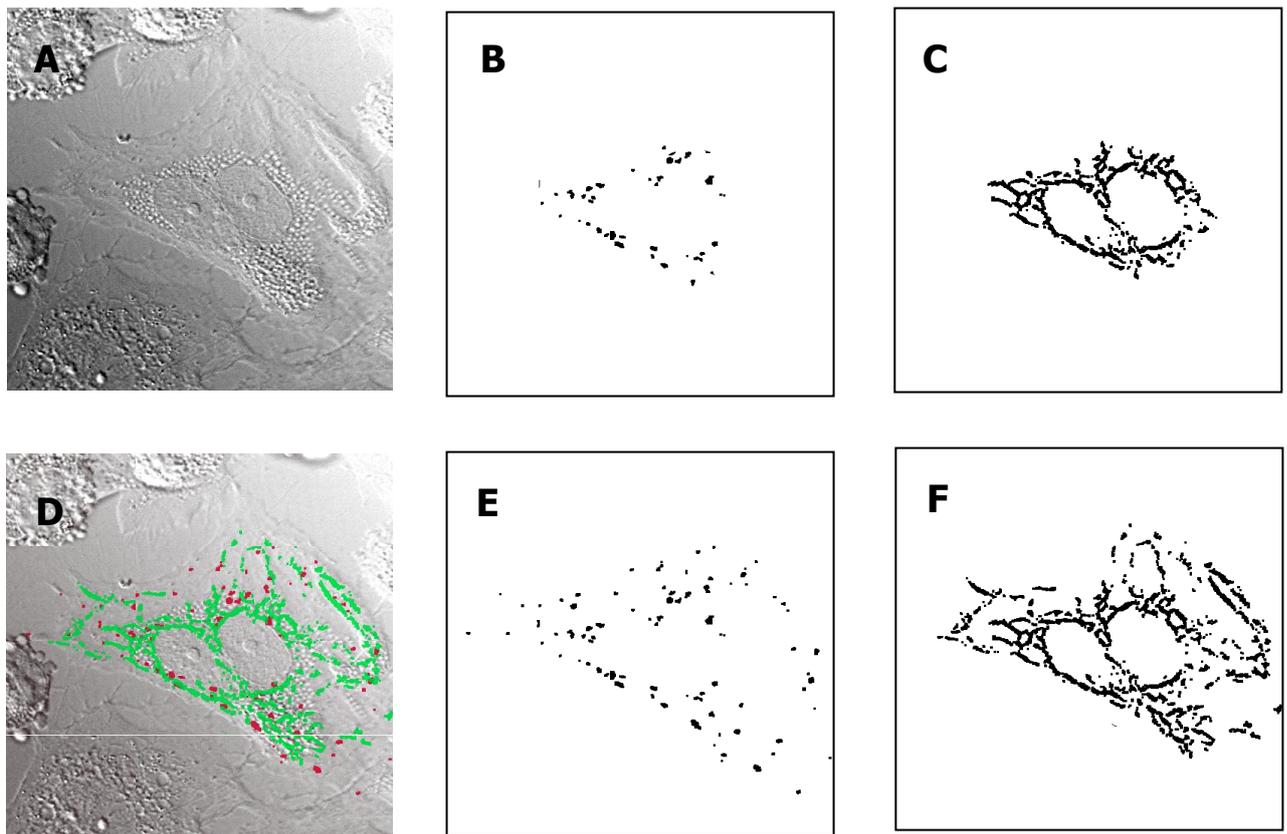


Figure 13. Double marquage par la phénantroline 1 mM (excitation 488 nm ; miroirs dichroïques 510, 560 ; filtre passe long 590 nm ; atténuation 305) et la rhodamine 123 5 μ M (excitation 488 nm ; miroirs dichroïques 510, 560 ; filtre 515-565 nm ; atténuation 35). Image obtenue en transmission (A.). Masques binaires de la fluorescence de la phénantroline et de la rhodamine 123 dans la région périnucléaire des cellules du centre de l'image (respectivement B et C) et dans l'intégralité des cellules du centre de l'image (respectivement E et F). Superposition avec l'image de transmission des masques des deux sondes dans les cellules considérées (D.). Un programme informatique écrit par le Dr. Yves Usson permet de calculer le pourcentage de la surface du masque de la phénantroline se superposant à celui de la rhodamine 123 dans les régions étudiées.

III 2. Variations de la pO₂ extracellulaire et conséquences sur la pO₂ intracellulaire.

Nous mesurons ici l'impact d'un appauvrissement de la pO₂ dans le milieu baignant les cellules sur la pO₂ intracellulaire en spectrofluorimétrie et en microscopie confocale.

III 2 A. Etude sur des suspensions cellulaires d'HUVEC.

L'intensité de luminescence de la phénantroline, observée à 605 nm, augmente de 15% jusqu'à atteindre un plateau au cours d'un bullage d'argon qui chasse tout l'oxygène du milieu baignant les cellules (figure 14 A.). En revanche, un bullage d'argon effectué sur la suspension cellulaire incubée en présence de porphyrine induit une augmentation de 600% l'intensité de lumière émise à 710 nm (figure 14 B.).

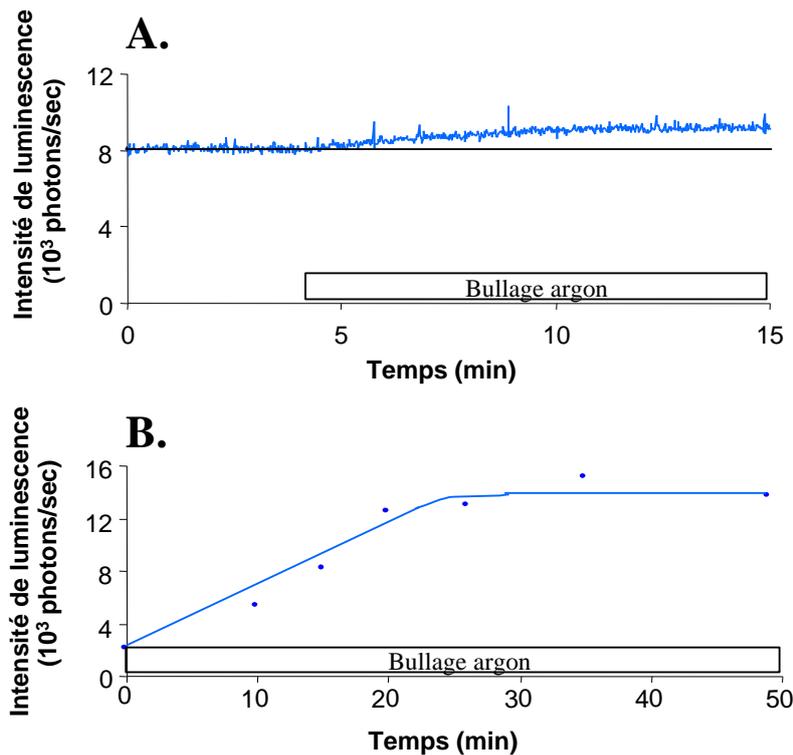


Figure 14. Effet d'un bullage d'argon sur l'intensité de lumière émise par des suspensions d'HUVEC incubées en présence de phénantroline (A.) ou de porphyrine (B.). L'intensité de lumière émise par la phénantroline excitée à 488 nm, est recueillie à 605 nm à l'aide d'un spectrofluorimètre. Les HUVEC chargées en porphyrine sont soumises à un faisceau laser de 514 nm. L'intensité de lumière à 710 nm, obtenue d'après les spectres d'émission enregistrés à différents temps, sont reportés sur la figure B.

Globalement, l'amplitude de la réponse des deux sondes à un appauvrissement du milieu en oxygène est moindre lorsque celles-ci sont localisées dans les cellules que lorsqu'elles sont en solution aqueuse (voir figure 4 pour comparaison). Cette constatation est particulièrement notable en ce qui concerne la phénantroline. La porphyrine apparaît donc comme la plus performante des deux. Nous n'avons pas réalisé de bullage d'oxygène sur cette dernière sonde car la fluorescence de la porphyrine est déjà quasi nulle à pO₂ atmosphérique.

III 2 B. Etude effectuée en microscopie confocale.

A l'aide des boîtes de culture cellulaires présentées en figure 6, les cellules endothéliales adhérentes en fond de boîte sont perfusées avec une solution de Tyrode appauvrie en oxygène par un bullage argon. Dans ces conditions, aucun signal n'a été détecté avec la porphyrine.

En revanche, la phénantroline chargée dans des hépatocytes et dans les HUVEC est observable en microscopie confocale. Les hépatocytes et les HUVEC adhérents en fond de boîte sont perfusés par une solution de Tyrode bullée soit par de l'oxygène, soit par de l'argon. Les résultats sous bullage d'O₂ sont présentés en figure 15. Il apparaît que l'intensité

de fluorescence de la phénantroline chargée dans les HUVEC est plus intense sous bullage d'argon que sous bullage d'O₂.

Les variations de la pO₂ extracellulaire se répercutent donc vraisemblablement par diffusion sur la pO₂ intracellulaire.

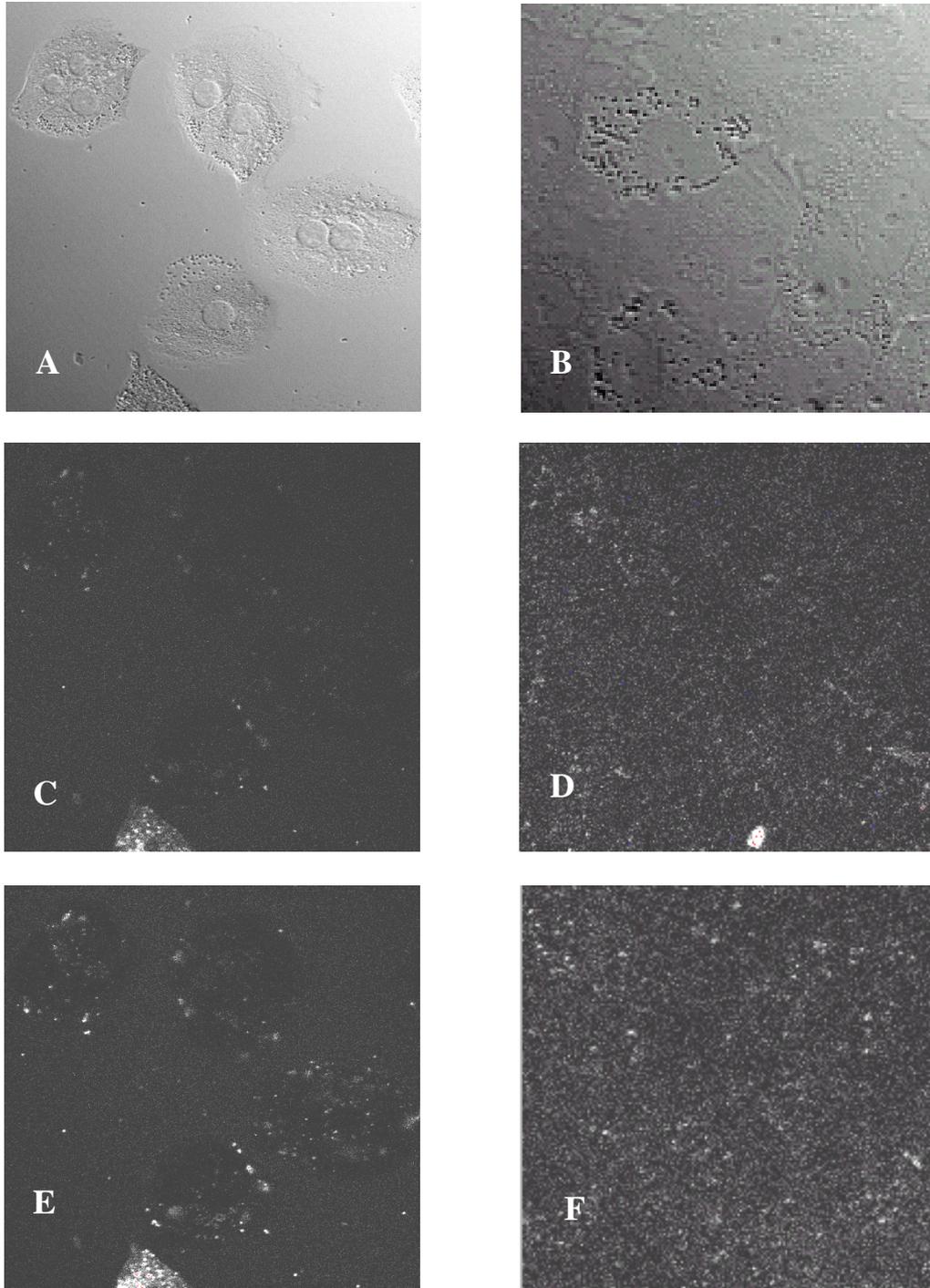


Figure 15. Images d'hépatocytes et d'HUVEC chargés en phénantroline obtenues à l'aide de la technique de microscopie confocale à balayage laser. Images des hépatocytes (A, C, E) et des HUVEC (B, D, F) obtenues en contraste interférentiel différentiel (A, B), en fluorescence acquise sous bullage d'oxygène pour chacun des types cellulaires (C et D) et en fluorescence obtenue sous bullage d'argon (E. et F.) . Excitation laser 488 nm ; Emission : miroirs dichroïques 510 et 560 nm, filtre passe-long

III 3 Métabolisme non mitochondrial et variations de la pression partielle d'oxygène intracellulaire : conséquences sur l'activation de la NO synthase des cellules endothéliales.

Dans la suite de ce travail, seule la porphyrine est utilisée puisqu'elle s'est révélée être plus sensible aux variations de la pO_2 . La méthode de mesure du déclin de luminescence a été utilisée. En effet, l'acquisition de temps de vie (τ) étant plus rapide, cette méthode permet d'étudier des phénomènes transitoires. De plus, la mesure du déclin de luminescence étant indépendante de la concentration de sonde utilisée, cela permet de travailler avec le signal très faible de la porphyrine.

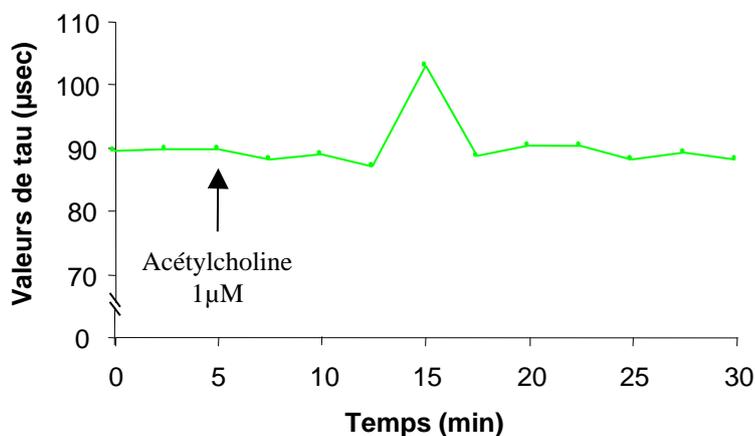


Figure 16. L'ajout d'acétylcholine sur une suspension d'HUVEC chargée en porphyrine 100µM provoque une augmentation transitoire de τ (une figure représentative montrée ;n=3).

La figure 16 montre qu'un ajout d'acétylcholine 1 µM provoque une augmentation transitoire de τ . Cette augmentation de 17 % de τ survient après un délai d'une dizaine de minutes. Ce résultat suggère une diminution mesurable de la pO_2 dans les cellules. Par ailleurs, nous nous sommes assurés qu'il n'existait pas d'interaction directe entre l'acétylcholine et la porphyrine qui modifierait les propriétés optiques de la sonde. (fig. 17 A.). Les valeurs moyennes de τ mesurées sur des solutions et des suspensions cellulaires sont différentes (environ 6 µsec et 90 µsec, respectivement). Cela pourrait être expliqué par le fait que l'environnement des sondes est très différent suivant qu'elles se trouvent dans une solution saline ou dans les cellules : en présence de protéines, l'oxygène semble moins accessible à la sonde. En effet, nous avons constaté, par ajout SAB sur la porphyrine en solution, que l'augmentation de la concentration en protéines provoquait une augmentation de la luminescence de la sonde. Ce résultat est aussi décrit dans la littérature (14).

Afin d'établir si la consommation d'O₂ liée à la voie de synthèse de NO par la NOS est bien impliquée dans cette augmentation de τ suite à l'ajout d'acétylcholine, la L-NAME (inhibiteur de la NO synthase) est employée. Cependant, nous avons dû vérifier, au préalable et en l'absence de cellules, que la L-NAME (ou le KCN) n'interagissent pas directement avec la sonde pour altérer ses propriétés (fig. 17.A.).

Le résultat obtenu avec la L-NAME indique un lien de cause à effet entre la synthèse de NO et l'augmentation transitoire de τ . La littérature faisant état de la sensibilité de certaines porphyrines à NO (12) ou encore de l'utilisation de dérivés de porphyrines comme sonde à NO (13), des quantités de 10 et 100 nmol de NO ont été ajoutées à une solution de porphyrine 10 μ M dans du Tyrode afin de vérifier que NO n'induit pas de variations de τ (fig. 17 B.).

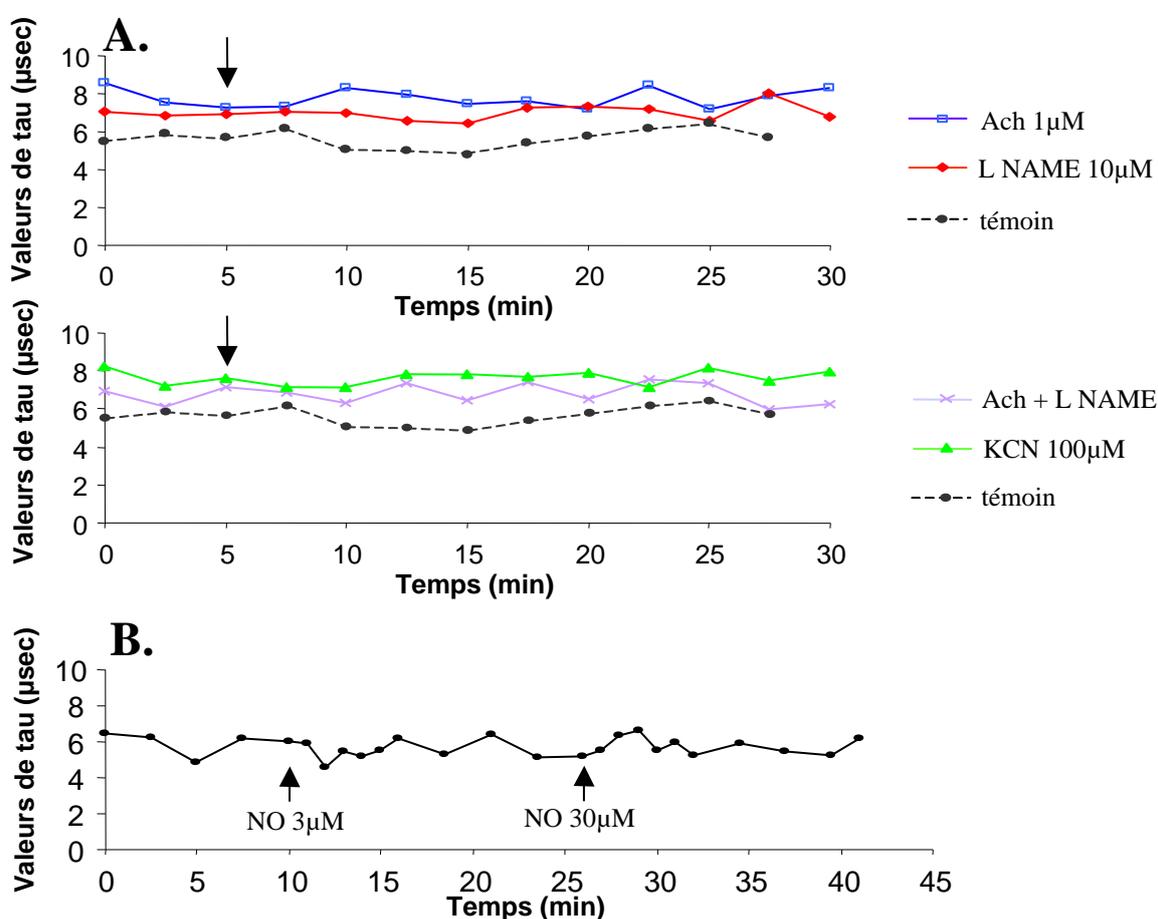


Figure 17. Mesure des interactions entre les molécules utilisées et la porphyrine 10 μ M en solution dans du Tyrode (milieu extracellulaire). (A.) Les effets d'un ajout d'acétylcholine 1 μ M, de L NAME 10 μ M, d'acétylcholine et de LNAME, de KCN 100 μ M sur la porphyrine 10 μ M en solution sont testés. Un témoin, sans ajout, est présenté. Chaque contrôle est dupliqué. (B.) Une solution saturée en NO est utilisée pour évaluer la sensibilité de la sonde 10 μ M à un ajout de 10 et 100 nmol de NO. Les flèches indiquent le moment de l'ajout des produits (une figure représentative montrée ; n=2).

Ces différentes observations ayant été faites, la suspension cellulaire est mise en contact avec

10 μ M de L-NAME pendant l'incubation de la sonde. La figure 18A montre une absence d'augmentation de τ en réponse à un ajout d'acétylcholine immédiatement après l'incubation avec la L NAME ; 2 heures après la fin de l'incubation, lorsque l'action de la L-NAME s'est estompée, τ augmente de nouveau de façon transitoire après un ajout d'acétylcholine.

D'autre part, le KCN 100 μ M n'a pas d'incidence sur l'augmentation (18%) de la valeur de τ consécutive à un ajout d'acétylcholine 1 μ M (fig. 18 B.). Ceci suggère que l'effet de l'acétylcholine n'est pas lié à la respiration mitochondriale.

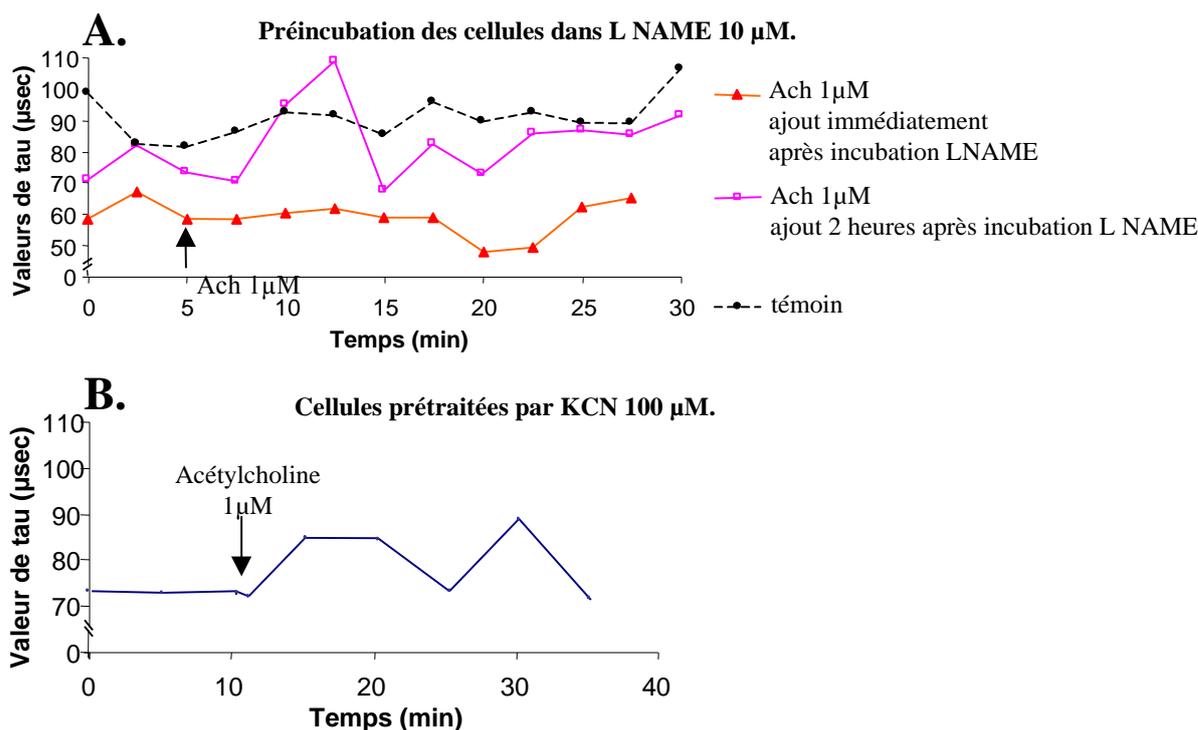


Figure 18. La réponse à l'acétylcholine est inhibée en présence de L NAME mais pas en présence de cyanure. Les HUVEC sont chargées en porphyrine 100 μ M.

(A.) Après 60 minutes d'incubation des HUVEC avec la L NAME 10 μ M, 3 rinçages sont effectués. L'effet de l'acétylcholine 1 μ M est testé immédiatement et 2 heures après la fin de l'incubation avec L NAME.

(B.) KCN 100 μ M est ajouté à la suspension cellulaire 25 minutes avant l'ajout d'acétylcholine 1 μ M (une figure représentative montrée ; n=2).

Après stimulation par l'acétylcholine, une augmentation transitoire de la luminescence de la porphyrine, chargée dans les cellules, est observée, indiquant une diminution de la pO₂. L'acétylcholine induit donc une augmentation mesurable de la consommation d'oxygène consécutive à l'augmentation de l'activité de l'enzyme NO synthase

Lorsque l'activité de la NO synthase est bloquée par la L NAME, alors aucune variation de la pO₂ n'est détectée en réponse à l'ajout d'acétylcholine.

Enfin, KCN est sans effet sur l'augmentation transitoire de τ en réponse à l'ajout

d'acétylcholine. Cela confirme que les variations de pO_2 observées relèvent d'un mécanisme qui n'est pas lié à la respiration mitochondriale.

IV Discussion.

Nous avons étudié plusieurs mécanismes susceptibles d'affecter la pO_2 intracellulaire. Nous avons observé en spectrofluorimétrie qu'un appauvrissement de la pO_2 extracellulaire provoquait une augmentation de l'intensité de luminescence de chacune des sondes et en particulier de la porphyrine. En microscopie confocale, un résultat similaire est observé en utilisant la phénantroline. Comme le montre la figure 14 A., l'augmentation de la fluorescence en réponse à un bullage d'argon est instantanée, suggérant une diffusion rapide de l'oxygène dans les cellules. Ce travail, effectué avec chacune des deux sondes, illustre aussi la forte sensibilité de la porphyrine pour O_2 .

L'activation de la NOS endothéliale endogène par l'acétylcholine entraîne une augmentation transitoire de τ que nous attribuons à une consommation d'oxygène par l'enzyme. En effet, NO, le produit de la réaction catalysée par la eNOS, ne modifie pas les propriétés optiques de la sonde, comme cela est montré sur la figure 18 B avec des quantités très importantes de NO. En effet, nous avons testé des quantités de NO de 10^4 et 10^5 pmol sur la porphyrine alors que des expériences menées sur des cellules endothéliales isolées de rats, grâce à une électrode à NO, indiquent que la quantité de NO au niveau de la membrane est inférieure à 10^{-4} pmol en l'absence de stimulation par l'acétylcholine (19). Nous nous sommes aussi assurés que l'augmentation transitoire de τ ne se produisait pas en présence d'un inhibiteur de la NOS. Cependant, 2 heures après l'incubation en présence de L-NAME (figure 18A), lorsque la L-NAME a été dégradée, une stimulation par l'acétylcholine produit à nouveau une consommation d'oxygène. Enfin, une préincubation des cellules en présence de cyanure n'empêche pas l'augmentation transitoire de τ en réponse à l'ajout d'acétylcholine, ce qui confirme que cette consommation d'oxygène est le fait d'un métabolisme différent de la respiration mitochondriale. Il est intéressant de noter que, par comparaison, des altérations du fonctionnement de la phosphorylation oxydative, en inhibant le complexe cytochrome oxydase par KCN ou en utilisant un découplant comme le CCCP, n'ont pas provoqué de modifications mesurables de la pO_2 intracellulaire. Cependant, les premiers résultats de microscopie confocale obtenus en incubant les cellules simultanément avec la phénantroline et la rhodamine 123 suggèrent que la fluorescence de la phénantroline est superposée, ou au moins à proximité immédiate, des mitochondries. Les mitochondries, piégeant et consommant de l'oxygène, semblent créer à leur périphérie immédiate une région où la pO_2 est faible, ce qui se traduit par une forte fluorescence de la phénantroline. Il nous semble que la région périnucléaire, particulièrement riche en mitochondries correspond à une zone où la pO_2 est faible.

Ces résultats peuvent être interprétés grâce au modèle développé en annexe 1. Dans ce

modèle, la respiration cellulaire est estimée à $4 \cdot 10^{-17}$ mol O₂. sec⁻¹ par cellule (HUVEC) ; la quantité d'oxygène solubilisée dans les cellules à $4 \cdot 10^{-15}$ mol O₂. cellule⁻¹ et l'apport d'oxygène par diffusion à $3,3 \cdot 10^{-15}$ mol O₂.sec⁻¹.cellule⁻¹ dans une zone périnucléaire (lieu de forte localisation des mitochondries d'après nos observations), où on estime la pO₂ entourant une mitochondrie à environ 0 mmHg. De ces valeurs, on remarque que la consommation d'oxygène par les mitochondries est 100 fois plus faible que le flux d'oxygène maximum que permet la diffusion. De plus, d'après ce modèle, la quantité d'oxygène solubilisée dans les cellules est 100 fois plus élevée que la quantité d'oxygène consommée par la cellule par seconde. L'annexe 2 présente le calcul de la quantité d'oxygène consommée par l'enzyme NO synthase: 10^{-16} mol O₂. sec⁻¹. Ce résultat est comparable à la consommation mitochondriale d'O₂.

La diffusion et la forte teneur cellulaire en O₂ ne permettent pas d'observer des variations globales de la pO₂ résultants de modifications du métabolisme. En revanche, lorsque la NOS est activée par l'acétylcholine, la consommation d'oxygène s'élève jusqu'à 10^{-13} mol O₂. sec⁻¹, soit 1000 fois plus qu'au niveau basal. Cette consommation d'oxygène, bien supérieure à la consommation d'oxygène maximale par la mitochondrie (10^{-15} mol O₂. sec⁻¹), est du même ordre de grandeur que le flux d'oxygène par diffusion. Nos résultats suggèrent donc que la respiration mitochondriale pourrait influencer la pO₂ intracellulaire beaucoup moins que d'autres mécanismes cellulaires consommant de l'oxygène.

La phénantroline synthétisée dans le cadre de ce travail et la porphyrine, utilisée ici comme sonde moléculaire intracellulaire, présentent des potentialités différentes : la porphyrine est plus sensible aux variations de la pO₂ que la phénantroline. Cependant, seule la phénantroline présente une luminescence détectable en microscopie.

Dans le cadre de ce projet, nous disposerons bientôt d'un microscope bi photons qui permettra peut être d'utiliser la porphyrine en microscopie confocale pour réaliser une cartographie intracellulaire de la pO₂. De plus, nos partenaires chimistes développent de nouvelles molécules fluorescentes qui répondront peut être mieux à nos attentes.

V Références Bibliographiques.

Hogan, M. C. (1999) Phosphorescence quenching method for measurement of intracellular pO₂ in isolated skeletal muscle fibers. *J. Appl. Physiol.* **86(2)**, 720-724.

Buerk, D. G., Tsai, A. G., Intaglietta, M. et Johnson, P. C. (1998) *In vivo* tissue pO₂ measurements in hamster skinfold by recessed pO₂ microelectrodes and phosphorescence quenching are in agreement. *Microcirculation.* **5**, 219-225.

Richmond, K. N., Shonat, R. D., Lynch, R. M. et Johnson, P. C. (1999) Critical pO₂ of skeletal muscle in vivo. *Heart Circ. Physiol.* **46**, h1831-h1840.

Buderus, S. *et al.* (1989) Resistance of endothelial cells to anoxia-reoxygenation in isolated guinea pig hearts. *Am. J. Physiol.* **257**, H488-H493.

Castellano, F. N. et Lakowicz, J. R. (1998) A water soluble luminescence sensor. *Photochem. and Photobiol.* **67(2)**, 179-183.

Robiolo, M., Rumsey, W. L. et Wilson, D. F. (1989) Oxygen diffusion and mitochondrial respiration in neuroblastoma cells. *Am. J. Physiol.* **256(25)**, 1207-13.

Steinlechner-Maran, R. *et al* (1996) Oxygen dependence of respiration in coupled and uncoupled endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **271(40)**, C2053-61.

Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G. et Mimick, C. R. (1973) Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* **52**, 2745-2756.

Queyroy, A. et Verdetti, J. (1992) Cooperative gating of chloride channel subunits in endothelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1108**, 159-168.

Berry, M. N. et Friend, D. S. (1969) High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. A biochemical and fine structural study. *J. Cell. Biol.*, **43**, 506-520

Groen, A. K. *et al* (1982) Intracellular compartmentation and control of alanine metabolim in

rat liver parenchymal cell. *Eur. J. Biochem.* **122**, 87-93.

Pawlowski, M. et Wilson D. (1994) Imaging oxygen pressure in tissue *in vivo* by phosphorescence decay. *Advances in experimental Medicine and Biology.* **361**, 83-91.

Clark, A *et al* (1998) Subcellular optochemical nanobiosensors : probes encapsulated by biologically localised embedding. *Sensors and Actuators* **B 51**, 12-16.

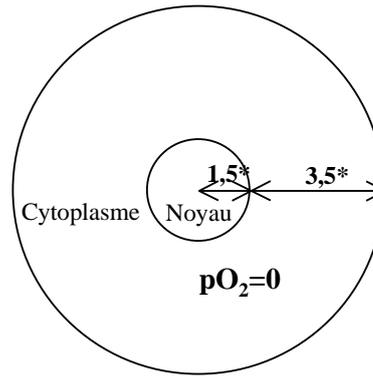
Lo, L-W., Koch, C. J. et Wilson, D. F. (1995) Calibration of oxygen-dependent quenching of the phosphorescence of Pd-meso-tetra (4-Carboxyphenyl) porphine. *Analytical Biochemistry* **236**, 153-160.

Clark, A. Jr *et al* (1987) how large is the drop in pO_2 between cytosol and mitochondrion ? *am. J. physiol.* **252**, C583-C587.

Oxygen transport to tissue XVI édité par Hogan, M. C., Mathieu-Costello, O et Wagner P. D., Plenum press, New York 1994.

Browkovich, V *et al* (1999) Nitric oxide release from normal and disfonctionnal endothelium. *J. Physiol. Pharmacol.* **50(4)**, 575-86.

VI Annexes.



La cellule est assimilée à une sphère de diamètre 10 μm .

*: Distances en μm

VI 1. Les flux d'oxygène et le métabolisme mitochondrial.

Calcul du flux d'oxygène entrant par diffusion :

La cellule est assimilée à une sphère de diamètre 10 μm .

Le coefficient de diffusion de l'oxygène à travers la membrane plasmique et le cytosol vaut :

$$D = 5 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1} \cdot \text{atm}^{-1} = 5 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \cdot \text{sec}^{-1} \cdot \text{atm}^{-1} = 5 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \cdot \text{sec}^{-1} \cdot \text{atm}^{-1} \quad (15,16)$$

$$A \text{ est la surface de membrane : } A = 4\pi R^2 = 4\pi (5 \cdot 10^{-6})^2 = 3,1 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2.$$

Pour atteindre les mitochondries se trouvant en périphérie du noyau de 3 μm de diamètre, l'oxygène doit traverser une barrière que constitue le cytoplasme et dont l'épaisseur est : $dx = 3,5 \mu\text{m} = 3,5 \cdot 10^{-6} \text{ m}$.

Si nous considérons le cas extrême pour lequel la différence de concentration entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule est de $d[\text{O}_2] = -7,6 \cdot 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{atm}^{-1}$, correspondant à un épuisement total de la $p\text{O}_2$ intracellulaire alors la loi de Fick nous permet de calculer un flux d'oxygène J entrant par diffusion :

$$J = -DA \frac{d[\text{O}_2]}{dx} = 5 \cdot 10^{-11} \cdot 3,1 \cdot 10^{-10} \cdot 7,6 \cdot 10^{-1} / 3,5 \cdot 10^{-6} \quad \underline{\underline{J = 3,3 \cdot 10^{-15} \text{ mol O}_2 \cdot \text{sec}^{-1} \cdot \text{cellule}^{-1}}}$$

Consommation d'oxygène par les HUVEC :

Des mesures d'oxygraphie présentées dans la publication de Steinlechner-Maran, R. *et al* (1996) donnent le résultat suivant pour des HUVEC à 37°C.

$$C = 70 \text{ pmol O}_2 \cdot \text{sec}^{-1} \cdot \text{cm}^{-3} \text{ pour un pool de } 1,6 \cdot 10^6 \text{ cellules} \cdot \text{cm}^{-3} \quad \underline{\underline{C = 4 \cdot 10^{-17} \text{ mol O}_2 \cdot \text{sec}^{-1} \cdot \text{cellule}^{-1}}}$$

Calcul de la quantité d'O₂ dans les cellules, d'après le coefficient de solubilité de l'oxygène :

Le coefficient de solubilité S de l'oxygène dans une solution saline est de:

$$S = 1 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-3} \cdot \text{torr}^{-1} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{torr}^{-1} = 7,6 \cdot 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{atm}^{-1} \quad (15)$$

V est le volume de la cellule, que nous assimilons à une sphère de diamètre 10 μm .

$$V = (4/3) \pi R^3 = (4/3) \pi (5 \cdot 10^{-6})^3 = 5,2 \cdot 10^{-16} \text{ m}^3.$$

La quantité d'oxygène solubilisée dans les cellules est donnée par le produit $S5V$:

$$7,6 \cdot 10^{-1} \cdot 5 \cdot 5,2 \cdot 10^{-16} = \underline{\underline{4 \cdot 10^{-16} \text{ mol O}_2 \cdot \text{cellule}^{-1}}}$$

VI 2. La consommation d'oxygène par l'activité de synthèse de NO.

Une microélectrode à NO a permis à Brovkowiych *et al.* (17) de calculer la concentration de NO au niveau d'une sphère de 50 μm de rayon entourant une cellule endothéliale d'aorte de rat en l'absence de stimulation par l'acétylcholine : $[\text{NO}] = 1,2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ dans un volume V :

$$V = (4/3) \pi (50 \cdot 10^{-6})^3 = 5,2 \cdot 10^{-13} \text{ m}^3 = 5,2 \cdot 10^{-10} \text{ L}.$$

$$\text{soit } n, \text{ la quantité de NO correspondante, } n = C \cdot V = 1,2 \cdot 10^{-6} \cdot 5,2 \cdot 10^{-10} = 6,2 \cdot 10^{-16} \text{ mol NO}.$$

En approximant que NO, très réactif, a une durée de vie comprise entre 1 et 10 secondes, la quantité de NO produite peut être estimée à $6,2 \cdot 10^{-16} \text{ mol NO} \cdot \text{sec}^{-1}$. La réaction de synthèse de NO présentant une stoechiométrie de 1/1 en ce qui concerne O_2 et NO, une consommation de $6,2 \cdot 10^{-16} \text{ mol O}_2 \cdot \text{sec}^{-1}$ permet le fonctionnement basal de synthèse de NO au niveau d'une cellule.

En émettant l'hypothèse qu'une stimulation par l'acétylcholine provoque une augmentation de synthèse de NO d'un facteur 1000, alors la quantité de O₂ consommée est de : $1000 \cdot 5 \cdot 10^{-16} = \underline{\underline{10^{-13} \text{ mol O}_2 \cdot \text{sec}^{-1}}}$.

RÉSUMÉ

Bien que l'oxygène occupe un rôle vital dans la physiologie cellulaire, la nécessité de son approvisionnement exogène ainsi que sa répartition intracellulaire demeurent encore un objet de spéculation et de modélisation plus que de quantification directe. Afin de mesurer les variations de la pression partielle en oxygène (pO_2) intracellulaire sous l'influence de mécanismes cellulaires consommateurs d'oxygène, nous avons développé une nouvelle approche basée sur l'importation dans les cellules de sondes moléculaires fluorescentes (porphyrine et phénantroline) dont les propriétés de luminescence sont affectées par des variations locales de la pO_2 .

Les impacts respectifs, sur la pO_2 intracellulaire, de la respiration mitochondriale, de la synthèse de monoxyde d'azote (NO) -forte consommatrice d'oxygène- et d'un abaissement de la pO_2 extracellulaire ont été mesurés par des techniques de spectrofluorimétrie et de microscopie confocale à balayage laser sur des cellules endothéliales issues de veines de cordons ombilicaux humains. Nous avons observé qu'une diminution de la pO_2 extracellulaire par bullage d'argon, se répercute à la pO_2 intracellulaire, illustrant le phénomène de diffusion de l'oxygène et validant la faisabilité de la mesure. D'autre part, la colocalisation de la fluorescence de la phénantroline avec les mitochondries (par utilisation d'un fluorochrome marquant le potentiel de membrane des mitochondries) suggère que la pO_2 dans le voisinage immédiat de ces organites est extrêmement faible. Cependant, l'induction de modulations de la respiration mitochondriale par emploi de KCN (un bloqueur) ou de CCCP (un découplant) notamment, n'a pas révélé de variations de la pO_2 mesurable en spectrofluorimétrie. En revanche, la stimulation par l'acétylcholine de l'enzyme extramitochondriale NO synthase, grande consommatrice d'oxygène, s'est révélée déclencher une baisse de la pO_2 intracellulaire mesurable à l'aide de notre technique.

A la lumière de nos données et des données de la littérature, nous estimons possible que la diffusion très rapide de l'oxygène compense largement sa consommation cellulaire due à la respiration mitochondriale au niveau basal ou sous stimulation. En revanche, des consommations d'oxygène de plus grande ampleur, comme lors de l'élévation d'activité de la NO synthase des cellules endothéliales, ne pourraient être compensées instantanément, conduisant à une diminution temporaire de la pO_2 intracellulaire. Nos résultats suggèrent enfin qu'il sera possible à moyen terme de réaliser une cartographie intracellulaire de l'oxygène.