

2m11.2701.8

Université de Montréal

**Purification et caractérisation d'un antigène de la
membrane luminale endothéliale du poumon de rat**

*Étude biochimique et immunocytochimique de la
localisation de l'ECA dans le poumon de rat*

par

Martin Côté

Département de pathologie et biologie cellulaire

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en pathologie et biologie cellulaire

Décembre, 1998

© Martin Côté, 1998



W

4

U58

1999

V.058

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Purification et caractérisation d'un antigène de la
membrane luminale endothéliale du poumon de rat**

*Étude biochimique et immunocytochimique de la
localisation de l'ECA dans le poumon de rat*

présenté par :

Martin Côté

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Victor Gisiger.....Président rapporteur
Jacques Paiement.....Membre du jury
Lucian D. Ghitescu.....Directeur de recherche

Mémoire accepté le :99-03-31.....

Table des matières

Table des matières	i
Liste des figures	iv
Liste des tableaux	vii
Liste des abréviations	viii
1. Sommaire	ix
2. Introduction	1
2.1. Endothélium vasculaire	1
2.1.1. Structure générale de l'endothélium	1
2.1.1.1. La polarisation de la cellule endothéliale	2
2.1.1.2. La face luminale est négativement chargée	5
2.1.2. Endothélium de la microcirculation	7
2.1.2.1. Types d'endothélium	7
2.1.2.1.1. Endothélium continu	8
2.1.2.1.2. Endothélium fenestré	9
2.1.2.1.3. Endothélium discontinu	10
2.1.2.2. Puits et vésicules recouverts de clathrine	11
2.1.2.3. Puits et vésicules plasmalemmals	13
2.1.2.4. Microdomaines endothéliaux	16

	ii
2.2. Endothélium pulmonaire	18
2.2.1. La membrane alvéolo-capillaire.....	19
2.2.2. Perméabilité de l'endothélium pulmonaire	20
2.3. Hétérogénéité des cellules endothéliales	22
3. Prémisses au projet.....	26
3.1. Purification des membranes lumineales des cellules endothéliales pulmonaires	27
3.2. Production et purification des anticorps monoclonaux.....	32
3.2.1. Immunisation de souris.....	33
3.2.2. Production des anticorps monoclonaux.....	34
3.2.3. Analyse du sérum et des surnageants de culture.....	36
3.2.4. Purification des anticorps monoclonaux	37
3.2.5. Présentation des anticorps monoclonaux et de leur antigène	39
3.3. Choix de l'antigène et expériences préliminaires.....	40
3.3.1. Électrophorèse en condition réductrice et non réductrice	41
3.3.2. Biotinylation <i>in situ</i> de la surface lumineale endothéliale.....	42
3.3.3. Digestion de la gp170 par l'endoglycosidase F	45
4. Méthodologie et résultats	47
4.1. Purification de l'antigène 11B10 (gp170) en vue de son séquençage.....	47
4.1.1. Purification de la gp170 par chromatographie d'affinité.....	48
4.1.2. Purification de la gp170 par électrophorèse préparative en présence de SDS	52
4.2. Identification de l'antigène 11B10	54
4.2.1. Théorie du séquençage	54
4.2.2. Séquençage de la gp170	55

	iii
4.3. Comparaison des caractéristiques biochimiques entre la gp170 et l'ECA	65
4.3.1. Détermination des poids moléculaires de l'ECA et de la gp170.....	66
4.3.2. Points isoélectriques de l'ECA et de la gp170	68
4.4. L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA)	75
4.5. Étude biochimique et immunocytochimique sur la localisation et la distribution de l'enzyme de conversion de l'angiotensine dans le poumon de rat	82
4.5.1. La purification des membranes lumineales est la base de l'étude.....	82
4.5.2. Morphométrie et rendement de la technique de purification des membranes luminales	83
4.5.3. Essais enzymatiques	85
4.5.4. Immunobuvardage.....	90
4.5.5. Immunocytochimie post-enrobage	94
4.5.6. Distribution des formes hydrophile et membranaire de l'ECA dans le poumon de rat.....	98
4.5.7. Importance du développement du nouvel anticorps anti-ECA 11B10 pour cette étude sur la localisation de l'ECA dans le poumon de rat.....	101
5. Discussion.....	103
6. Conclusion	115
Références.....	xiii
Remerciements.....	xxv

Liste des figures

- Fig. 1. Distribution des protéines de transport dans la cellule endothéliale d'un capillaire du cerveau. 3
- Fig. 2. Schéma de la purification des membranes lumineales endothéliales..... 30
- Fig. 3. A)Particules de silice associées au front luminal des membranes endothéliales. B-C)Préparation de membranes lumineales purifiées toujours associées à la silice. B) X 9391 C) X 36 000. 30
- Fig. 4. Présentation des 4 anticorps spécifiques à des protéines de la membrane lumineale endothéliale des poumons de rat. 40
- Fig. 5. Poids moléculaire des antigènes 11B10 et 21D5 détectés par immunobuvardage avec les anticorps spécifiques en conditions réductrice avec 640mM β -mercaptoéthanol ou non réductrice..... 42
- Fig. 6. Biotinylation *in situ* des protéines de la membrane plasmique lumineale endothéliale du poumon de rat. 44
- Fig. 7. Effet de la digestion de l'antigène 11B10 par l'endoglycosidase F. 45
- Fig. 8. Profil d'élution obtenu lors de la purification de l'antigène 11B10 par une colonne de Concanavaleine A immobilisée sur billes de Sépharose..... 51
- Fig. 9. Identification de la bande correspondant à l'antigène 11B10. A)Gel d'acrylamide coloré en Coomassie B)Membrane de nitrocellulose incubée avec l'anticorps 11B10. 53
- Fig. 10. Profil de masse de la gp170 après digestion à la trypsine. 56
- Fig. 11. Fractions obtenues après la chromatographie HPLC pour séparer les fragments venant de la digestion à la trypsine. La fraction #8 a été choisie pour le premier essai de séquençage puis la fraction #12 pour le séquençage des fragments 2 et 3. 56

	v
Fig. 12. Analyse de masse de la fraction #8 ; 1 seul fragment.	56
Fig. 13. Comparaison des fragments obtenus de la digestion de la gp170 et de l'ECA.....	60
Fig. 14. Analyse de masse de la fraction #12 qui montre la présence de 2 fragments.	62
Fig. 15. Séquence complète du précurseur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine. Les trois fragments séquencés de la gp170 sont soulignés. Les différents domaines de l'enzyme mature et les sites importants de la molécule sont aussi présentés. (▼) : site potentiel de coupure de l'ECA par une sécrétase.	62
Fig. 16. Comparaison du poids moléculaire de l'antigène 11B10 avec celui de l'ECA détecté par des anticorps anti-ECA connus.	67
Fig. 17. Graphique démontrant la linéarité du pH des fractions 1 à 20 obtenue suite à la focalisation isoélectrique de la préparation éluée de la colonne de Concanavaline A.....	71
Fig. 18. Points isoélectrique de la gp170 détectée avec l'anticorps 11B10 et de l'ECA détectée avec l'anti-ECA de lapin (Mab α ECA C-ter).....	72
Fig. 19. Comparaison des marquages obtenus par immunobuvardage sur des préparations d'homogénats de poumon et de plexus choroïde avec l'anticorps 11B10 et l'anti-ECA connu.	74
Fig. 20. Immunobuvardage avec l'anticorps 11B10 sur des préparations contenant 40 μ g de protéines provenant d'homogénat de différents tissus.....	74
Fig. 21. Immunofluorescence avec l'anticorps 11B10 sur des coupes de poumon, fait au cryostat, montrant l'ECA localisée dans l'endothélium.	81
Fig. 22. Schéma de l'obtention des fractions P ₂ et "Reste" à partir de l'homogénat de poumon.....	82
Fig. 23. Morphométrie. Photographie en microscopie électronique d'un poumon de rat perfusé avec la silice permettant de mesurer les surfaces lumineuses tapissées (T) ou non tapissée (NT) par la silice. X 9441.....	84

- Fig. 24. Graphique montrant la linéarité de la relation entre la densité optique et la quantité de matériel mise sur la membrane de nitrocellulose..... 91
- Fig. 25. Comparaison quantitative de la présence d'ECA dans la fraction P₂ et dans la fraction "Reste" obtenues à partir d'un homogénat de poumon perfusé avec la silice colloïdale. La quantification a été faite à l'aide de deux approches différentes : une approche utilisant la même quantité de protéines pour refléter la concentration d'ECA dans chaque fraction et une approche isovolumétrique afin de démontrer la quantité d'enzyme de conversion de l'angiotensine présente dans chaque fraction relativement à la quantité totale dans le tissu pulmonaire..... 93
- Fig. 26. Immunocytochimie post-enrobage sur une coupe de poumon incubée avec les anticorps 11B10 conjugués à des nanoparticules d'or colloïdal et amplifiés à l'argent. Agrandissement permettant de voir le marquage au niveau des parois alvéolaires. Toutefois, ce dernier est moins dense que celui retrouvé dans le milieu interstitiel. 96
- Fig. 27. Immunocytochimie post-enrobage sur une coupe de poumon incubée avec les anticorps 11B10 conjugués à des nanoparticules d'or colloïdal et amplifiés à l'argent. Photo à plus fort grossissement permettant de voir le marquage spécifique sur les membranes endothéliales et dans certaines régions du milieu interstitiel..... 97
- Fig. 28. Distribution des formes hydrophile et membranaire de l'ECA du poumon de rat 100
- Fig. 29. Capacité de l'anticorps 11B10 de reconnaître l'ECA hydrophile. De cette façon, il peut suivre le métabolisme de l'enzyme contrairement aux anticorps spécifiques son extrémité C-terminale absente de la forme hydrophile. .. 102

Liste des tableaux

Tableau I. Comparaison entre les anticorps monoclonaux et polyclonaux	32
Tableau II. Concentration protéique des fractions obtenues lors des différentes étapes de la chromatographie d'affinité avec la colonne de Concanavaleine A.....	50
Tableau III. Surface de l'endothélium marquée par la silice cationique.....	85
Tableau IV. Distribution de l'ECA dans le poumon de rat déterminée par l'activité enzymatique.....	89
Tableau V. Distribution de l'ECA dans le poumon de rat déterminée par immunobuvardage	93
Tableau VI. Distribution de la forme hydrophile et de la forme membranaire de l'ECA dans le poumon de rat.....	100

Liste des abréviations

ECA : Enzyme de conversion de l'angiotensine

BSA : Albumine de sérum de bœuf

Con A : Concanavaline A

DOC : Déoxycholate

Endo F : Endoglycosidase F

HHL : Hippuryl-Histidine-Leucine

HRP : Horse Radish Peroxidase

Mac : Anticorps monoclonal

P₂ : Fraction de membranes lumineales endothéliales purifiées associées à la Silice

pI : Point isoélectrique

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate (Lauryl Sulfate)

SDS-PAGE : SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

TX ou Triton : Triton X-100

1. Sommaire

Dans le but d'étudier et de démontrer l'hétérogénéité de l'endothélium selon les lits vasculaires, notre laboratoire a développé quatre anticorps monoclonaux contre des antigènes de la membrane luminale des cellules endothéliales du poumon de rat. Ces anticorps reconnaissent des glycoprotéines (gp) de 170KDa, 95KDa, 85KDa et 56KDa. L'objectif de ce projet de maîtrise était d'identifier et de caractériser un de ces antigènes. À la suite d'essais préliminaires en immunofluorescence et en immunobuvardage suggérant que la glycoprotéine de 170KDa (gp170) fusse un nouveau marqueur spécifique de l'endothélium pulmonaire, celle-ci a été choisie afin d'être purifiée, séquencée, identifiée et caractérisée.

D'abord, la gp170 a été purifiée à l'aide de la chromatographie d'affinité utilisant la lectine Concanavalline A immobilisée sur Sépharose et par électrophorèse sur gel d'acrylamide. L'identification de la protéine ainsi purifiée a été faite par une digestion contrôlée avec la trypsine et par l'analyse de certains fragments résultants. Pour trois de ces fragments, les séquences d'acides aminés ont été déterminées et comparées avec celles existant dans les banques de données. Les résultats de cette analyse ont permis de conclure que la gp170 était l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA). Malgré le fait que cette enzyme importante soit étudiée depuis longtemps, la

caractérisation effectuée lors de ce projet a présenté des éléments nouveaux remettant en cause les idées jusqu'à maintenant acceptées sur sa localisation.

L'ECA, reconnue longtemps comme étant un marqueur spécifique des cellules endothéliales, est une enzyme membranaire importante pour son rôle dans le métabolisme de certains agents vasoactifs. Des études ont démontré que les substrats de l'ECA étaient métabolisés majoritairement dans les poumons. Par la suite, des techniques d'immunofluorescence et d'immunocytochimie pré-enrobage ont contribué à l'image généralement acceptée d'une localisation endothéliale luminale de l'enzyme.

Une technique de purification des membranes, utilisant des particules de silice cationique, nous a permis d'isoler plus de 90% des membranes lumineales de l'endothélium pulmonaire. L'activité spécifique de l'ECA mesurée dans cette fraction est de 2 à 4 fois supérieure à celle retrouvée dans l'homogénat ce qui démontre l'enrichissement de l'enzyme au front luminal de l'endothélium pulmonaire. Cependant, des études comparatives d'activité spécifique et d'immunobuvardage entre la totalité du poumon, la fraction contenant les membranes lumineales et la fraction dépourvue de celles-ci, mais contenant le reste du tissu pulmonaire, ont démontré que seulement 5% de l'ECA totale est associée et active à la surface luminale de l'endothélium pulmonaire.

Ces résultats sont appuyés par des tests en immunocytochimie post-enrobage utilisant le nouvel anticorps anti-ECA, développé dans notre laboratoire, conjugué de

manière covalente à des nanoparticules d'or colloïdal. La méthode montre une localisation préférentielle de l'enzyme dans certaines régions du milieu interstitiel. De plus, une technique de fractionnement et de partition en Triton X-114 révèle qu'environ 50% de l'ECA pulmonaire est présente sous une forme hydrosoluble. Cette dernière étude valide la localisation de l'enzyme dans le milieu interstitiel démontrée par l'immunocytochimie post-enrobage.

Les résultats de ce travail lancent une nouvelle idée sur la localisation de l'enzyme dans le poumon. La localisation de l'ECA dans le milieu interstitiel nous oblige à revoir ses rôles, ses fonctions et surtout ses mécanismes d'action pour le métabolisme des agents vasoactifs circulants dans le sang. Les réponses à ces questions dépassent les objectifs de ce travail et n'ont pas été abordées. Toutefois, la compréhension des mécanismes d'action de cette enzyme importante ne peut être complète sans approfondir la piste lancée par le présent travail.

Mots clés : endothélium, hétérogénéité, marqueur, poumon, rat, anticorps monoclonaux, silice cationique, membranes lumineales, purification, chromatographie d'affinité, séquençage, enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), caractérisation, focalisation isoélectrique, activité spécifique, immunobuvardage, immunocytochimie post-enrobage.

2. Introduction

2.1.Endothélium vasculaire

Les vaisseaux sanguins, responsables du transport du sang dans l'organisme, se divisent en trois segments : les artères, les capillaires et les veines. Ces trois composants vasculaires sont très différents tant du point de vue morphologique que du point de vue fonctionnel. Ils diffèrent au niveau de leur longueur, de leur diamètre et au niveau de l'épaisseur et de la composition de leur paroi (1). C'est cette paroi qui confère aux vaisseaux leurs particularités et leurs fonctions. L'élément le plus important de la paroi vasculaire, l'endothélium, est partagé par tous les segments, mais n'est pas identique à travers tout le réseau vasculaire.

2.1.1.Structure générale de l'endothélium

Même s'il est intégré de façon intime aux tissus irrigués, l'endothélium des vaisseaux sanguins peut être considéré comme un tissu distinct à cause de ses nombreuses fonctions spécifiques. Il est responsable de plusieurs activités physiologiques : la régularisation de l'homéostasie par le contrôle de la perméabilité, le transport, la synthèse et le métabolisme de plusieurs substances (2). Il est aussi

impliqué dans la réponse inflammatoire, dans le tonus et la croissance vasculaire (1).

L'endothélium est un épithélium spécialisé composé d'une seule couche de cellules pavimenteuses, fortement amincies (0.1 à 0.5 μ m d'épaisseur) et jointes par des jonctions intercellulaires serrées. Elles tapissent l'intérieur des vaisseaux sanguins, lymphatiques et des cavités cardiaques. *In situ*, les cellules endothéliales ont une forme polygonale (10-15 μ m de large et 25-40 μ m de long) orientées selon l'axe des vaisseaux sanguins. Cette orientation est probablement due à l'effet d'entraînement par la circulation sanguine.

2.1.1.1. La polarisation de la cellule endothéliale

La cellule endothéliale est une cellule polarisée, donc asymétrique. La face luminale est exposée à la lumière des vaisseaux donc, en contact avec le sang, alors que l'autre face, le côté abluminal, est en contact avec la lame basale et le liquide interstitiel du tissu irrigué. Cette polarisation permet à l'endothélium de jouer un rôle important dans l'échange entre le sang et le tissu.

La polarisation de la cellule endothéliale est accompagnée par une asymétrie de composition moléculaire entre les domaines luminal et abluminal de la membrane plasmique. Par exemple, les protéines membranaires d'adhésion entre les cellules

adjacentes ou entre les cellules et la lame basale ne se retrouvent qu'à la membrane basolatérale.

L'asymétrie moléculaire entre les deux pôles cellulaires peut être qualitative ou quantitative. En effet, il peut y avoir des protéines présentes uniquement à l'une des faces de la cellule alors que d'autres se retrouvent sur les deux faces, mais à des concentrations très différentes. La figure 1 donne un exemple d'hétérogénéité d'expression de certaines protéines entre les deux pôles cellulaires (4).

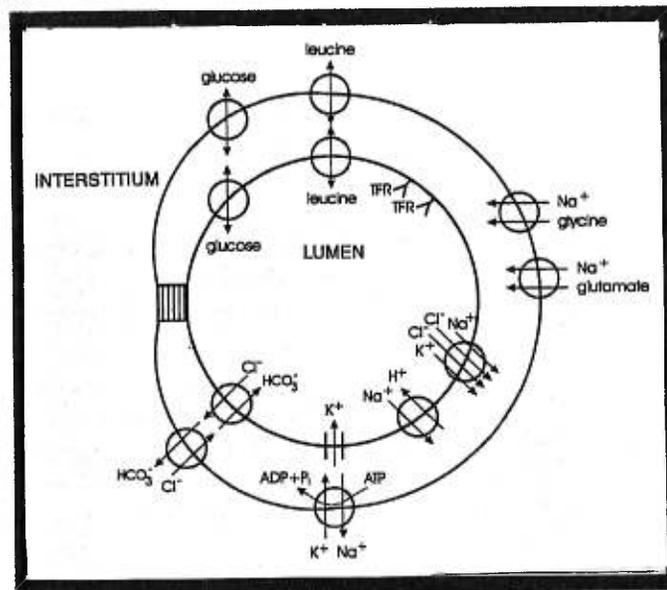


Fig. 1. Distribution des protéines de transport dans la cellule endothéliale d'un capillaire du cerveau. TFR : récepteur Transferrine.

Dans les capillaires du cerveau, certaines protéines responsables du transport actif des ions, dont les transporteurs antiports H^+/Na^+ et symports $K^+/Cl^-/Na^+$ qui permettent de transporter les ions sodium du sang vers l'intérieur de la cellule

endothéliale, sont uniquement exprimées à la membrane endothéliale luminale. Il en est de même pour le récepteur Transferrine qui permet l'absorption de fer par la cellule (Fig.1). D'autres protéines, dont la pompe Na^+/K^+ ATPase, qui permet la sortie de Na^+ de la cellule vers le milieu interstitiel, et certains transporteurs symports comme les Na^+ /acides aminés (glutamate, glycine), qui permettent l'entrée des acides aminés du milieu interstitiel vers l'intérieur de la cellule, sont uniquement exprimées à la membrane plasmique abluminale (Fig.1). Enfin, d'autres protéines membranaires sont présentes dans les deux pôles, mais à des concentrations différentes. Par exemple, la E-sélectine, protéine impliquée dans les interactions entre l'endothélium et les leucocytes, est exprimée de façon prédominante à la face luminale des cellules endothéliales des veines ombilicales humaines ; néanmoins elle est aussi présente à la face abluminale de ces mêmes cellules (5).

L'endothélium maintient une composition biochimique distincte entre ses deux pôles grâce aux jonctions serrées intercellulaires qui empêchent la diffusion des protéines membranaires entre les deux faces cellulaires. Un autre mécanisme par lequel les protéines sont confinées à un domaine de la membrane plutôt qu'à un autre est l'association de ces protéines à des éléments du cytosquelette ou à d'autres molécules intra ou extracellulaires ce qui les restreint à un site fixe dans la membrane. En plus, elles peuvent former des agrégats avec d'autres protéines membranaires ou

avec des protéines identiques ce qui limite leur déplacement dans la membrane.

2.1.1.2. La face luminale est négativement chargée

En plus d'avoir des différences majeures dans la composition de leur membrane, les deux pôles de la cellule endothéliale montre une différence morphologique importante. En effet, la face luminale des cellules endothéliales montre un manteau flou de 10 à 20nm d'épaisseur lorsque colorée par le rouge de ruthénium. Cette couche s'étend dans les espaces intercellulaires jusqu'aux jonctions serrées et dans les vésicules. Elle est appelée couche endo-endothéliale (6) ou glycocalyx (7). Elle est composée principalement de glycosaminoglycanes (8,9,10), sécrétées par les cellules endothéliales (11,12), et d'oligosaccharides appartenant aux glycoprotéines et aux glycolipides de la membrane cellulaire (13,14,15). Cette couche est toujours présente même après la perfusion des vaisseaux (2) ce qui démontre un fort attachement de ces molécules à la membrane luminale des cellules endothéliales.

La présence du glycocalyx fait en sorte que la surface luminale des cellules endothéliales est négativement chargée à cause de la présence importante des sialoconjugués (16,17,18) dont la podocalyxine retrouvée dans plusieurs lits vasculaires comme les poumons, le cœur, les reins, le cerveau, le pancréas, l'aorte,

l'intestin grêle, le foie et la rate (7). Cette charge négative à la surface de l'endothélium est un élément important puisqu'elle joue un rôle physiologique majeur. Elle réduit l'adhésion des cellules en circulation dans le sang sur la surface de l'endothélium et repousse les protéines majoritairement anioniques du plasma sanguin. La charge négative à la surface de l'endothélium est ainsi responsable d'une fonction importante de l'endothélium, c'est-à-dire jouer le rôle d'élément anti-thrombotique.

Cependant, comme il sera détaillé davantage plus loin, la répartition de cette charge n'est pas homogène sur toute la surface de l'endothélium. Certains sites de la surface ne sont pas chargés ce qui permet l'adsorption de plusieurs protéines solubles du le sang. Cette adsorption à la surface de l'endothélium influence sa perméabilité pour certaines molécules puisqu'elle limite l'accès physique de celles-ci aux sites de passage transendothélial et aux récepteurs. Des exemples de protéines adsorbées à la surface lumineales seront donnés à une section ultérieure.

2.1.2.Endothélium de la microcirculation

La structure générale de l'endothélium de la microcirculation est semblable à celle de l'endothélium des autres segments vasculaires. La différence se fait surtout au niveau de la concentration de certaines structures qui est plus grande dans les cellules endothéliales de la microcirculation. Ceci vient du fait que contrairement aux gros vaisseaux, les capillaires de la microcirculation ne servent pas uniquement de conduits pour la circulation du sang. En effet, leur rôle prépondérant est celui de faciliter et contrôler les échanges entre le sang et le tissu. Les spécialisations de l'endothélium de la microcirculation ont pour but de faciliter l'absorption et le transport des molécules entre le sang et le tissu.

2.1.2.1.Types d'endothélium

À travers le système circulatoire, l'endothélium montre des différences morphologiques majeures qui permettent de définir trois types importants de cellules endothéliales ; continues, fenestrées et discontinues. Selon l'organe et la fonction spécialisée que l'endothélium joue dans celui-ci, un type de cellules endothéliales est privilégié.

2.1.2.1.1. Endothélium continu

L'endothélium continu est le plus répandu et se retrouve dans les gros vaisseaux, les artères, les artérioles, les veines et les capillaires de la peau, des muscles, du système nerveux central, du mésentère et des poumons. Cet endothélium, de 0.2 à 0.3 μ m d'épaisseur (2), est surtout caractérisé par le fait que le corps cellulaire de la cellule endothéliale repose sur une lame basale continue et forme ainsi une barrière ininterrompue entre le sang et le tissu. De plus, les cellules endothéliales de ce type montrent une densité plus importante de vésicules de transport et de canaux transendothéliaux que les autres types (1,2). Le rôle de ces vésicules est de faciliter le transport de liquides et de molécules solubles à travers la couche endothéliale.

Les cellules endothéliales du type continu sont réunies latéralement entre elles par des jonctions serrées (1). Cependant, ces jonctions sont considérées incomplètes dans la plupart des cas si on fait la comparaison avec les jonctions serrées des épithéliums ordinaires. En effet, elles laissent des espaces appelées fentes intercellulaires assez grandes pour permettre le passage d'une certaine quantité de liquide, d'ions et de molécules de petite taille (2).

Toutefois, l'endothélium continu de certains organes, dont l'encéphale, le placenta et la rétine, n'a pas de fentes intercellulaires ce qui augmente son étanchéité et lui confère le rôle de barrière très sélective (barrière hémato-encéphalique ou

placentaire) (1). Ce type de barrière contribue au contrôle très minutieux de l'homéostasie dans ces tissus.

2.1.2.1.2. Endothélium fenestré

Le second type d'endothélium, l'endothélium fenestré, est plus mince (0.05 à 0.1 μm d'épaisseur) et se distingue par le fait que le corps de la cellule endothéliale est percé de pores ovales appelés fenestrations. Ces fenestrations, réparties au hasard sur la surface ou regroupées en plaques dans des régions de l'endothélium, sont formées par le rapprochement et la fusion des membranes cellulaires des deux pôles. Elles constituent ainsi un type particulier de pores qui traversent l'endothélium (2). Elles sont visibles en microscopie électronique sur une coupe transversale parce qu'elles forment des espaces de 60 à 80nm de diamètre le long de la membrane cellulaire. Les fenestrations peuvent ou non être refermées par un diaphragme très mince (6-8nm d'épaisseur) vu en microscopie électronique comme une pellicule simple, dense aux électrons, avec une tache centrale de 10 à 15nm. Les diaphragmes sont faits de macromolécules fibrillaires comme la protéoglycane héparane sulfate qui confère aux diaphragmes une forte charge anionique.

Les fenestrations, même avec leur fermeture partielle par des diaphragmes,

augmentent la perméabilité des capillaires aux liquides et aux molécules solubles. L'endothélium fenestré se trouve dans les organes où se produit un trafic important de molécules entre le sang et le tissu comme dans les capillaires de la muqueuse intestinale, les glandes endocrines, le plexus choroïde et les glomérules et les tubules rénaux (1, 19).

2.1.2.1.3. Endothélium discontinu

Le dernier type d'endothélium est appelé sinusoïde ou endothélium discontinu. Il se trouve dans le foie, la moelle osseuse et la rate. La lumière des capillaires discontinus est généralement irrégulière. Les jonctions serrées sont moins nombreuses que dans les endothéliums continus donc les fentes intercellulaires sont beaucoup plus larges. Elles sont suffisamment larges pour permettre en partie aux grosses molécules protéiques et même aux érythrocytes de passer du sang au tissu environnant et vice versa. Cependant, ce type d'endothélium se caractérise surtout par la présence de pores de grandes tailles, non fermés par des diaphragmes, regroupés dans des régions de la membrane cellulaire endothéliale appelées "plaques filtrantes". Ces pores permettent le passage facile des cellules et des macromolécules d'un côté à l'autre de l'endothélium.

Le rôle de ce type de capillaires est d'augmenter la rapidité de la filtration et de la décontamination du sang. En effet, sur les cellules endothéliales de ce type de vaisseaux, on retrouve de gros macrophages mobiles (dans le foie ils sont appelés cellule de Kupffer) dont les prolongements s'intercalent dans les fentes intercellulaires jusqu'à la lumière des vaisseaux. Ceux-ci peuvent capter les fragments des cellules mortes et les microorganismes circulants dans le sang. De cette façon, les bactéries intestinales ou celles qui entre dans la circulation lors des blessures sont éliminées du sang lors de leur passage dans le foie ou la rate (1). Les cellules de Kupffer du foie font même partie de la paroi vasculaire des sinusoides tellement l'espace entre les cellules endothéliales est large.

2.1.2.2.Puits et vésicules recouverts de clathrine

Les cellules endothéliales des endothéliums continus (20), fenestrés (21,22) et discontinus (23) possèdent à la surface cellulaire des structures appelées puits ou vésicules recouverts. Ces structures de 80 à 120nm de diamètre sont présentes des deux côtés de la cellule et peuvent représenter plus de 2% de la surface totale (2,3). Le composant biochimique principal de ces structures est la clathrine. Cette dernière est un complexe protéique formé de trois longues chaînes peptidiques et de trois autres

plus courtes ce qui forment une structure à trois pieds appelée triskélium. Les triskéliums se rassemblent pour former un réseau d'hexagones et de pentagones qui enveloppe la membrane des puits et des vésicules du côté cytoplasmique.

Lors de la formation des puits recouverts, certaines protéines membranaires et cytoplasmiques sont nécessaires pour la jonction entre la membrane plasmique et les molécules de clathrine. On considère que la présence de ces dernières sur la membrane plasmique crée les forces mécaniques responsables de son invagination, de la fermeture des vésicules et de leur détachement de la membrane plasmique.

Ces structures sont impliquées dans les mécanismes d'endocytose spécifique par l'intermédiaire de récepteur et dans l'endocytose de molécules solubles dans les liquides piégés lors de la fermeture des vésicules. Ensuite, elles suivent la voie endocytaire vers les endosomes (3). À partir de là, les molécules sont acheminées vers les lysosomes pour être dégradés alors que plusieurs récepteurs sont retournés vers la membrane plasmique. L'entrée de LDL dans les cellules endothéliales est un exemple d'une telle voie d'endocytose (24). Les vésicules qui bourgeonnent du réseau trans-golgien et fusionnent avec les endolysosomes pour y déverser les enzymes lysosomiales sont aussi recouvertes de clathrine. Il en est de même pour les vésicules impliquées dans le recyclage membranaire.

2.1.2.3.Puits et vésicules plasmalemmals

Le rôle principal de l'endothélium est la régulation des échanges de molécules entre le sang et le tissu dans les deux directions. Plusieurs théories ont été avancées pour expliquer les mécanismes de cette régulation. D'une part, les molécules pourraient être absorbées dans la cellule par l'intermédiaire des vésicules recouvertes de clathrine. Une fois ces vésicules fusionnées avec les endosomes, les molécules ayant un signal approprié pourraient être récupérées par des vésicules de transport destinées au côté abluminal de la cellule (3). D'autre part, certaines molécules pourraient passer par les fentes intercellulaires de 6nm. Cependant, ces mécanismes sont peu utilisés pour les échanges à travers l'endothélium. Pour les endothéliums de la microcirculation, les échanges de molécules entre le sang et le liquide interstitiel se font surtout par l'intermédiaire de vésicules non recouvertes de clathrine. Ces vésicules appelées vésicules plasmalemmales, cavéoles, vésicules pinocytiques ou vésicules de transport, sont fortement concentrées dans les cellules endothéliales de type continu de la microvascularisation (19).

Ces vésicules de 60 à 80nm de diamètre se retrouvent soit en contact avec la membrane cellulaire ou libre dans la cellule. Lorsqu'en contact avec la surface cellulaire à l'un des pôles de celle-ci, la membrane de la cellule est en continuité avec celle de la vésicule ce qui forme une invagination ouverte vers le milieu extracellulaire

(20,25,26). Ces puits ouverts ont un cou court et leur ouverture, de 20 à 40nm de diamètre, peut être fermée ou non par un diaphragme fibrillaire très mince (6-8nm d'épaisseur) avec un bouton central plus dense en microscopie électronique (2).

Lorsqu'elles sont libres, ces vésicules pourraient voyager entre les deux fronts cellulaires. Elles pourraient également fusionner entre elles pour former des canaux transendothéliaux (28). Ces canaux peuvent aussi être fermés ou non par des diaphragmes. Contrairement aux diaphragmes qui recouvrent les fenestrations de l'endothélium fenestré, les diaphragmes des vésicules et canaux transendothéliaux n'ont pas de charges négatives (2).

Le grand nombre de vésicules et de puits plasmalemmals peut doubler la surface endothéliale capillaire. La densité des cavéoles varie selon l'organe, le type de segment vasculaire et même entre différents endroits d'un même segment. Malgré l'aspect lisse de la membrane des cavéoles en microscopie électronique, celle-ci montre un recouvrement de sa face cytoplasmique lorsqu'elle est examinée par la technique de cryodécapage. La protéine dominante de ce recouvrement est un polypeptide de 21KD appelé cavéoline. Son rôle est encore incertain, mais elle pourrait jouer essentiellement le même rôle que la clathrine, c'est-à-dire offrir une force mécanique suffisante pour déformer la membrane plasmique et permettre la formation des vésicules.

En plus de la cavéoline, il y a d'autres protéines associées à ces vésicules.

Certaines de ces protéines, dont les GTPases vSNARE et VAMP-2, l'annexine II et IV et le facteur de fusion NSF, sensible à l'agent NEM (N-éthylmaleimide), avec sa protéine de liaison SNAP, sont impliquées dans différents aspects de la formation des vésicules jusqu'à la fusion homotypique avec les membranes cellulaires (27).

Ces vésicules sont utilisées pour le transport transendothélial de plusieurs molécules (2). Des études suggèrent que le chargement de ces puits se fait par diffusion simple (29, 30). Dans ce cas, l'ouverture des puits sur l'extérieur de la cellule permet leur chargement, suivi par leur internalisation, la séparation de la membrane plasmique et la formation des vésicules. Ensuite, ces vésicules voyagent dans le cytoplasme de la cellule et fusionnent avec la membrane plasmique à l'autre pôle. Ceci permet le relâchement des molécules de l'autre côté de la couche endothéliale. D'autres études ont démontré que les cavéoles permettaient la concentration de molécules dans des microdomaines de la surface cellulaire. La pompe calcique de la membrane plasmique est localisée dans les cavéoles (32).

Malgré le fait que les cavéoles soient des organites ubiquitaires et qu'elles montrent une morphologie semblable dans tous les types cellulaires, les fonctions qui lui sont attribuées diffèrent. Dans les fibroblastes, elle est impliquée dans la potocytose, un mécanisme par lequel la cellule concentre le méthyl tétrahydrofolate pour le faire passer à travers la membrane plasmique (31). Chez les cellules

musculaires, elle permet la concentration de la pompe calcique ATPase qui joue un rôle important dans la régulation de la concentration intracellulaire de calcium pour faciliter la contraction de la cellule (32). Dans les cellules endothéliales, ces structures sont associées au transport transendothélial de plusieurs macromolécules. Les différents rôles des vésicules plasmalemmales soulèvent des questions sur les mécanismes qui permettent à un organite morphologiquement identique et de composition biochimique semblable (cavéoline, protéines de fission et de fusion) de remplir des fonctions très différentes.

2.1.2.4. Microdomaines endothéliaux

En plus des différences morphologiques majeures, l'endothélium montre de fines variations entre les différents organes et surtout à l'intérieur d'un même segment capillaire du même organe. Ces variations comprennent la distribution inégale des charges électrostatiques dans des microdomaines plasmalemmals (33,34), la distribution des glycoconjugués à la surface cellulaire (35,36,37,38,39) et l'expression particulière de plusieurs enzymes et transporteurs transmembranaires (40,41,42,43) à certains sites de la membrane plasmique.

La distribution hétérogène des charges électrostatiques sur le front luminal des cellules endothéliales montre des différenciations locales (28) :

a-la membrane cellulaire est chargée négativement

b-le diaphragme des vésicules et des puits plasmalemmals et des canaux

transendothéliaux n'ont pas de sites anioniques

c-les diaphragmes des fenestrations présentent une plus grande densité de charges anioniques que le reste de la membrane plasmique

Cette hétérogénéité crée des microdomaines à la surface endothéliale ce qui module l'adsorption de molécules. Il a été démontré, *in vivo*, que plusieurs protéines du plasma sanguin étaient adsorbées à la surface endothéliale (44). Parmi elles, on retrouve l' α_2 -macroglobuline (inhibiteur de protéases) (45), l'albumine (46), la lipoprotéine lipase qui est la principale hydrolase des lipoprotéines triglycérides, le fibrinogène, l'héparine et l'élastase (2). De plus, beaucoup de facteurs de coagulation, synthétisés et relâchés par les cellules endothéliales, sont adsorbés à la surface dès leur exocytose : le facteur VIII (facteur anti-hémophylique), la thrombospondine et le facteur de von Willebrand qui active les plaquettes (2).

En plus, les microdomaines permettent de concentrer certaines molécules du sang à la surface cellulaire endothéliale pour augmenter l'efficacité de l'endocytose et du transport de ces molécules. Pour l'endocytose spécifique, l'augmentation de la

densité de certains récepteurs permet d'augmenter les chances de contact entre le récepteur-transporteur et son ligand.

2.2.Endothélium pulmonaire

L'endothélium pulmonaire, en plus de posséder la plupart des caractéristiques mentionnées plus haut, a des spécialisations qui lui permettent de remplir des fonctions uniques. Il est responsable des échanges gazeux en plus d'être un site privilégié pour le métabolisme de plusieurs molécules. En effet, le flux sanguin que reçoit le poumon, la surface totale couverte par l'endothélium pulmonaire, environ de 5×10^6 à 7×10^6 cm^2 chez l'Homme (19) et le fait que le poumon possède à lui seul près de 1/7 de la quantité totale des cellules endothéliales du corps, font de cet endothélium le site principal d'activation et d'inactivation de plusieurs molécules vasoactives (28).

De plus, l'activité de l'endothélium pulmonaire régularise la composition du sang artériel systémique, affecte la fonction de ciblage de certaines molécules vers les organes, contribue au maintien de l'homéostasie, voit à la bonne marche des réactions immunitaires et module le tonus vasculaire local et systémique (47).

2.2.1. La membrane alvéolo-capillaire

La structure essentielle du tissu pulmonaire est la membrane alvéolo-capillaire. Cette structure forme la paroi qui sépare un capillaire pulmonaire des alvéoles adjacents. C'est à ce niveau que s'effectuent les échanges gazeux entre le sang et les alvéoles. La barrière air-sang est composée de trois couches : la cellule épithéliale alvéolaire, une lame basale et la cellule endothéliale capillaire. Les cellules épithéliales sont des pneumocytes de type I qui tapissent l'intérieur des alvéoles et forment un épithélium pavimenteux simple. Ces cellules reposent sur une couche basale qui est fusionnée avec la membrane basale de l'endothélium. L'endothélium de type continu est le dernier élément de cette barrière air-sang.

À cause de son implication dans la barrière alvéolo-capillaire, la première spécialisation de l'endothélium pulmonaire est d'abord morphologique. La portion de la cellule endothéliale qui compose cette barrière est environ dix fois plus mince que l'endothélium de type continu normal, environ $0.03\mu\text{m}$ d'épaisseur. Cette portion de la cellule endothéliale, contrairement à la portion faisant face au tissu pulmonaire, est appelée avésiculaire à cause de l'absence de vésicules de transport (28). Les échanges gazeux se font par diffusion simple, à travers la membrane alvéolo-capillaire. L'oxygène diffuse des alvéoles au sang alors que le gaz carbonique emprunte le chemin inverse, du sang aux alvéoles. La grande majorité des éléments cytoplasmiques de la

cellule endothéliale, dont le noyau, le réticulum, le Golgi et les mitochondries, se retrouvent dans la portion de la cellule qui ne compose pas la membrane alvéolo-capillaire. Ceci permet d'amincir davantage cette structure et ainsi faciliter les échanges gazeux.

2.2.2.Perméabilité de l'endothélium pulmonaire

L'endothélium pulmonaire est un tissu plastique qui modifie ses structures pour changer sa perméabilité en fonction des conditions environnantes. Par exemple, lors d'œdème pulmonaire, l'endothélium change considérablement sa structure pour modifier sa perméabilité aux ions et son coefficient de filtration face à certaines molécules. La perméabilité de l'endothélium pulmonaire est accrue par l'augmentation significative du nombre des vésicules de transport (2,3).

La présence du glycocalyx, une structure fortement polyanionique, semble jouer un rôle majeur dans la perméabilité de l'endothélium du poumon aux molécules solubles. Il est maintenant connu que de nombreuses protéines du plasma interagissent avec les sites anioniques de l'endothélium capillaire pulmonaire. Cette adsorption de molécules plasmatiques sur le glycocalyx modifie la perméabilité de la cellule endothéliale aux petites molécules et à plusieurs macromolécules solubles (44,48). Les

protéines adsorbées réorganisent et rendent plus dense le réseau de glycoprotéines et de glycosaminoglycanes (44,49). Elles modifient la surface endothéliale diminuant ou augmentant ainsi l'accessibilité à certains domaines membranaires d'où la modification de la perméabilité face à certaines molécules (49).

Cependant, malgré le fait que l'adsorption protéique à la surface de l'endothélium de la membrane alvéolo-capillaire ne semble pas être différente de celle à la surface de l'endothélium du côté tissulaire (44), on note une différence majeure dans la régulation de la perméabilité cellulaire entre ces deux portions de la cellule endothéliale pulmonaire. Cette différence de perméabilité peut être due au fait que du côté air-sang, la cellule endothéliale est très amincie de sorte qu'il n'y a pas de vésicule de transport. Dans cette portion de la cellule, il y a presque exclusivement des échanges gazeux qui se font par diffusion simple.

Contrairement à cette portion de la cellule endothéliale, le côté tissulaire de la cellule possède des vésicules de transport. Les échanges des macromolécules entre le sang et le tissu pulmonaire y impliquent des mécanismes de transport plus complexes ce qui requiert la participation d'éléments biochimiques particuliers. C'est ce qui explique la présence des vésicules de transport observées du côté tissulaire de la cellule endothéliale pulmonaire.

2.3.Hétérogénéité des cellules endothéliales

La caractéristique unique des cellules endothéliales est d'avoir de nombreuses fonctions et des traits morphologiques communs en plus de démontrer une immense hétérogénéité. Les cellules endothéliales dérivent d'un précurseur commun, les angioblastes. Certains marqueurs sont présents dans tous les types d'endothéliums. Parmi ceux-ci, on retrouve les protéines de jonctions tel que la cadhérine et certains récepteurs dont le flk-1/KDR, récepteur tyrosine kinase spécifique du VEGF (vascular endothelial growth factor), qui a un rôle important dans la prolifération vasculaire.

Toutefois, une catégorie de marqueurs nécessite un environnement spécifique pour être exprimée. Ces marqueurs sont présents uniquement dans certains lits vasculaires, dans certaines circonstances et en concentrations différentes selon l'origine tissulaire. Parmi les marqueurs induits de façon spécifique, il existe deux classes. Il y a des marqueurs spécifiques exprimés de façon constitutive comme le récepteur Glut-1 exprimé dans la membrane endothéliale du cerveau (50,55), la LuECAM, une molécule d'adhésion spécifique aux cellules endothéliales des veines pulmonaires (51,55), la Hevin, une protéine anti-adhésive retrouvée uniquement dans l'endothélium spécialisé des veinules (52,55), et l'enzyme de conversion de l'angiotensine que l'on retrouve dans l'endothélium de plusieurs lits vasculaires : le rein, testicule, poumon, mais en concentration différente selon le site d'expression (53,54,55).

Les mécanismes qui permettent aux cellules endothéliales de prendre différentes voies de différenciation ne sont pas connus. Un déterminant majeur est l'environnement local dans lequel les cellules endothéliales vont se différencier, croître et surtout leur interaction avec les cellules environnantes. Cette interaction peut se faire par un contact direct entre deux cellules adjacentes, par la synthèse et l'organisation de la matrice extracellulaire sur laquelle elles se développent et par l'intermédiaire de molécules solubles sécrétées par des cellules voisines ou plus ou moins éloignées. Des molécules de jonctions intercellulaires et des récepteurs transfèrent les signaux venant de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule. Ce transfert d'information peut induire l'activation ou l'inhibition de certains gènes pour moduler l'expression de protéines et ainsi conférer de nouvelles fonctions à la cellule (55).

La plupart des caractéristiques spécialisées sont induites durant le développement alors que les endothéliums adultes n'ont pas la même susceptibilité aux différents facteurs de différenciation. Toutefois, l'endothélium adulte, malgré la stabilité de ses propriétés constitutives, peut changer de phénotype et de fonction suite à l'activation de certains gènes ou la suppression d'autres par des cytokines solubles ou par des facteurs de croissance libérés par les cellules adjacentes et ce, plusieurs fois dans sa vie. Les marqueurs exprimés seulement lors d'un changement de phénotype font partie de la seconde classe de marqueurs spécifiques.

Un exemple d'un changement de phénotype est observé lors de la croissance tumorale durant laquelle les cellules endothéliales sont transformées et adoptent d'autres propriétés dont la perte d'inhibition de croissance par contact intercellulaire et l'acquisition de propriétés invasives par le relâchement de protéases (55). Ces caractéristiques sont normalement absentes chez les cellules endothéliales et apparaissent uniquement après la transformation cellulaire. En plus, le vieillissement cellulaire influence aussi la réponse endothéliale à différents facteurs à cause de la perte de voies de signalisation (55). Par conséquent, les cellules endothéliales en sénescence montrent des propriétés différentes des cellules plus jeunes.

Finalement, l'hétérogénéité se reflète également sur les propriétés intrinsèques des protéines selon le tissu et le site d'expression. Il n'est pas rare de retrouver une même protéine exprimée dans plusieurs tissus avec des degrés et des qualités différentes de glycosylation (56). Un exemple est l'hétérogénéité de la N-glycosylation de l'enzyme de conversion de l'angiotensine. Ceci modifie les propriétés physiques des protéines en fonction du tissu où elles sont exprimées. Les patrons de glycosylation d'une protéine selon le tissu et les raisons d'une telle hétérogénéité ne sont pas connues en général, mais c'est sans doute un autre moyen que possèdent les cellules de communiquer entre elles de façon spécifique.

Bien que l'endothélium ne soit qu'un type particulier d'épithéliums et que les

différenciations moléculaires de ceux-ci soient largement étudiées et relativement bien connues, très peu d'éléments sur l'hétérogénéité moléculaire des endothéliums spécialisés sont identifiés. Une limitation dans l'étude de l'hétérogénéité des cellules endothéliales vient du fait qu'une fois en culture, elles tendent à perdre leurs propriétés caractéristiques.

Des techniques sont en essor pour faciliter les études sur le développement des cellules endothéliales. L'injection de phages, qui expriment une librairie de peptides capables de reconnaître des molécules de surface dans l'endothélium périphérique *in vivo* (55), a permis la découverte de certains marqueurs de la différenciation endothéliale. Cependant, tout comme la production d'anticorps monoclonaux à l'aide de l'immunisation d'animaux avec des homogénats de tissus (57,58,59) ou avec des cellules endothéliales entières développées *in vitro* (39,60,61), ces techniques utilisent des conditions expérimentales trop différentes des conditions *in vivo* pour que l'expression des marqueurs de différenciation soit comparable.

Une nouvelle technique facilite l'étude de l'hétérogénéité des cellules endothéliales. Elle permet d'isoler rapidement les membranes luminales endothéliales d'un tissu choisi et d'analyser leur composition biochimique. Il est possible d'étudier l'expression *in vivo* des molécules de la membrane luminale endothéliale afin de démontrer l'hétérogénéité de l'expression de certaines molécules selon l'origine tissulaire.

3. Prémisses au projet

Le développement récent de plusieurs techniques a permis à notre laboratoire de mettre sur pied un projet permettant d'étudier l'hétérogénéité des endothéliums selon leur lit vasculaire. Nous avons exploré le potentiel de la nouvelle méthode de purification des membranes lumineales endothéliales dans le but d'obtenir des anticorps monoclonaux. Ces anticorps sont spécifiques à des protéines membranaires exprimées à la surface lumineale des cellules endothéliales des poumons de rat. Ils ont été produits dans le but de démontrer l'hétérogénéité de l'expression de certaines molécules selon les lits vasculaires ou entre les différents segments vasculaires. Enfin, ils étaient susceptibles de permettre la découverte de nouveaux marqueurs des cellules endothéliales différenciées du poumon de rat.

La technique de purification des membranes lumineales que nous avons utilisée est sensiblement la même que la technique mise au point en 1992 par le groupe de Bruce S. Jacobson (62). La présente section résume la technique de purification des membranes lumineales endothéliales des poumons de rat qui a permis la production des anticorps monoclonaux.

Les anticorps monoclonaux constituent les outils essentiels de ce travail. C'est pour cette raison que la production des anticorps monoclonaux est présentée de façon

générale. Enfin, une première série d'expériences a été effectuée afin d'obtenir des informations sur les caractéristiques de ces anticorps et sur les antigènes contre lesquels ils ont été produits. Ces expériences ont fourni les informations nécessaires à la mise sur pied du projet et à l'élaboration de la stratégie.

3.1.Purification des membranes lumineales des cellules endothéliales pulmonaires

L'étape importante de la production d'anticorps monoclonaux est la préparation de l'extrait immunogénique qui est utilisé pour l'immunisation des animaux producteurs de ces anticorps. Nous avons utilisé la nouvelle technique de purification des membranes lumineales endothéliales pour préparer l'extrait qui a servi d'agent immunogène pour la production de nos anticorps monoclonaux.

La technique de purification des membranes lumineales endothéliales pulmonaires implique le revêtement du front luminal avec des billes de silice. Ce revêtement s'est fait par la perfusion séquentielle *in situ*, directement dans les poumons via l'artère pulmonaire, de particules de 20 à 40nm de diamètre de particules colloïdales de silice cationique et de polyacrylate de sodium (62). La taille des billes de silice les empêche de pénétrer dans le tissu via les jonctions intercellulaires et donc, ne leur permet pas d'adhérer au front abluminal. Par contre, elles adhèrent fortement à la

surface chargée négativement de la membrane luminale endothéliale (Fig.3.A, page 31).

La présence de la silice sur les membranes lumineales augmente la densité de celles-ci ce qui va permettre, après l'homogénéisation du tissu, d'isoler ces membranes du reste de l'homogénat à l'aide de centrifugations successives à travers un milieu très dense de Nycodenz [5-(N-2,3-dihydroxypropylacetamido)-2,4,6-triiodo-N,N'-bis (2,3-dihydroxypropyl) isophthalamide]. De plus, pour éviter la contamination de la préparation avec les éléments nucléaires des noyaux brisés, une étape de digestion avec une ADNase et une ARNase a été faite avant les centrifugations.

Après celles-ci, nous avons obtenu une préparation de membranes lumineales endothéliales purifiées toujours associées à la silice que nous avons appelée P₂ (Fig.3.B-C, page 31). Des essais enzymatiques mesurant les activités spécifiques de la glucose-6-phosphatase du réticulum endoplasmique, la β-N-acétyl-glucosaminidase du Golgi et la cytochrome oxydase mitochondriale ont été faits pour détecter la contamination de la préparation par des segments membranaires intracellulaires. Ces essais ont démontré la grande efficacité de cette méthode de purification des membranes lumineales puisque aucune activité associée à ces marqueurs de compartiments intracellulaire a été perçue (62,63).

Pour la production des anticorps, la fraction P₂ a subi une autre étape de

purification afin d'extraire les protéines périphériques du cytosquelette attachées à la face cytoplasmique des membranes plasmiques lumineales. Cette dernière étape a nécessité deux incubations successives d'une heure dans un tampon contenant 50mM carbonate de sodium pH=11.0 et un tampon 1.0M NaCl dans 25mM HEPES pH=7.2. Les éléments extraits ont été séparés de la préparation membranaire par microcentrifugations et le culot obtenu que nous avons appelé P₃ a été mis en suspension dans un tampon 25mM HEPES pH=7.2. C'est cette préparation qui a servi d'immunogène lors de l'immunisation de souris pour la production des anticorps monoclonaux. La concentration en protéines de la préparation a été mesurée par la méthode d'Amidoblack (64). Le schéma présenté à la figure 2 de la page suivante résume les principales étapes de la purification des membranes lumineales. Les détails de la technique sont décrites à l'annexe A à la fin de ce travail.

L'analyse par SDS-PAGE de chaque fraction montre un spectre de protéines pour la fraction P₃ complètement différent de celui associé à la fraction P₂ (résultats non présentés). Cette différence est due au fait qu'environ 90% des protéines associées à la fraction P₂ sont des protéines périphériques, non-liées de façon covalente avec la membrane lumineale. Ceci explique l'importance de la dernière étape de purification pour l'obtention d'anticorps dirigés contre des protéines intrinsèques de la membrane lumineale des cellules endothéliales.

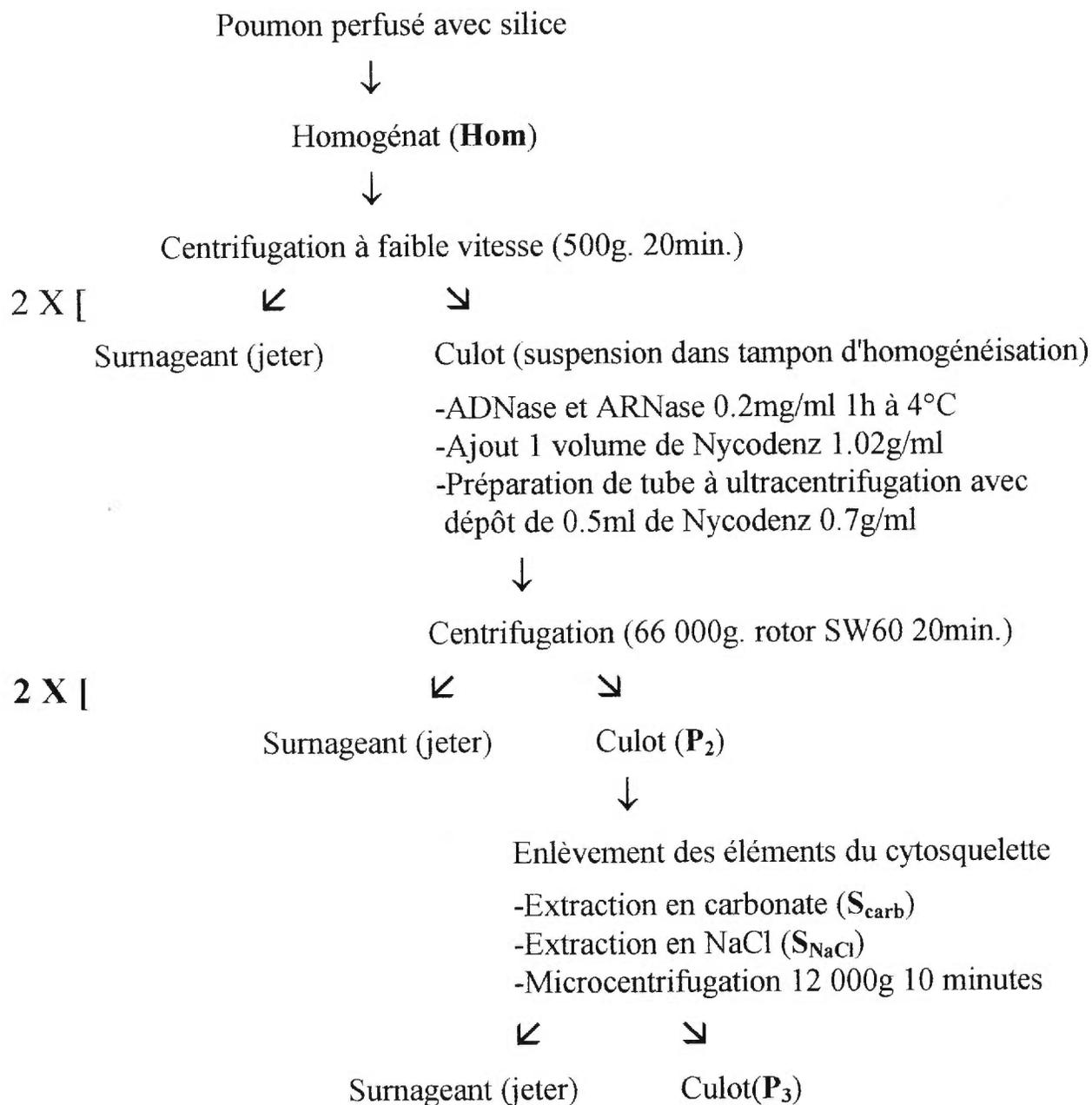
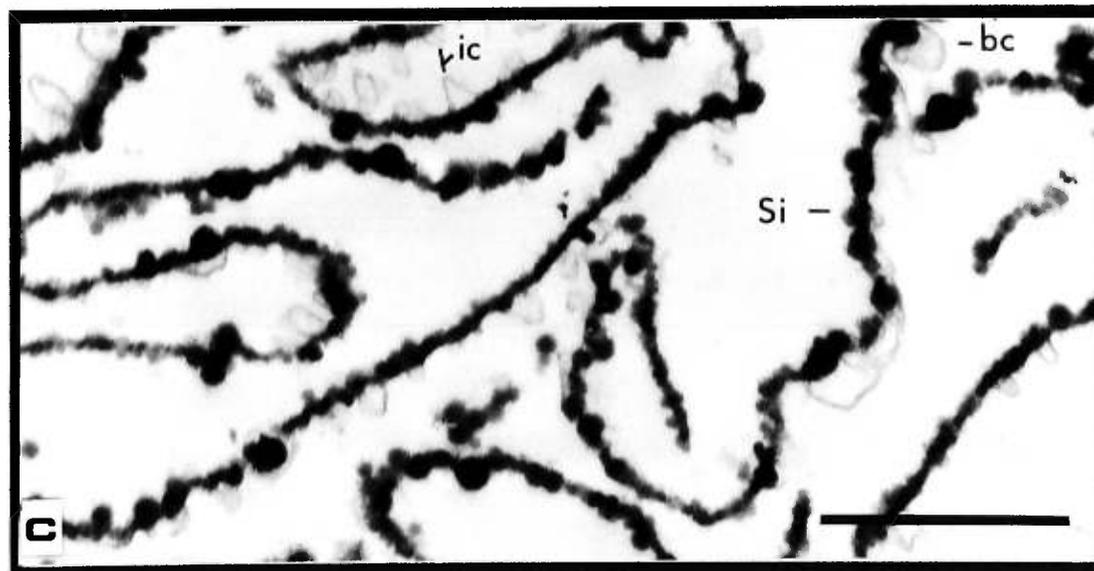
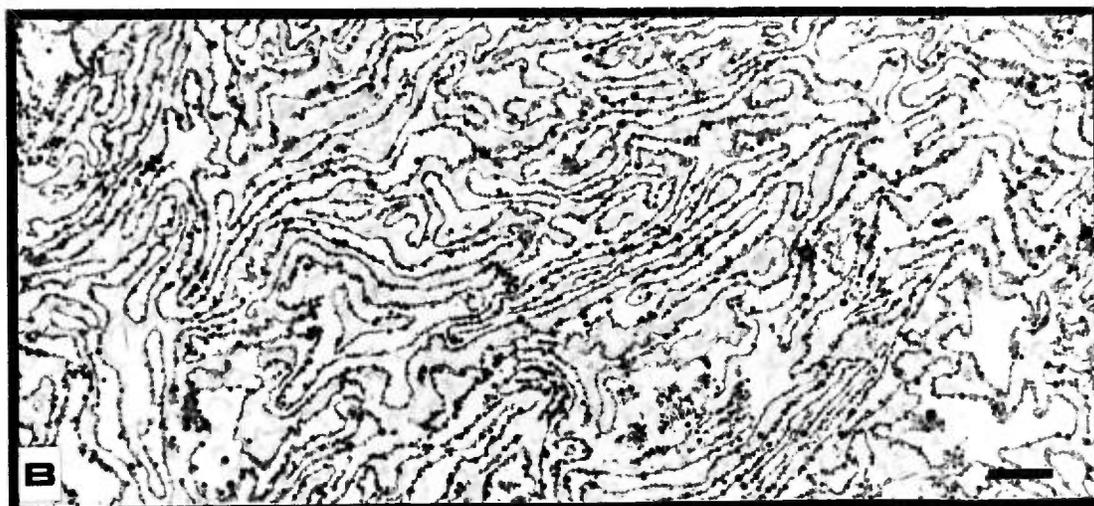
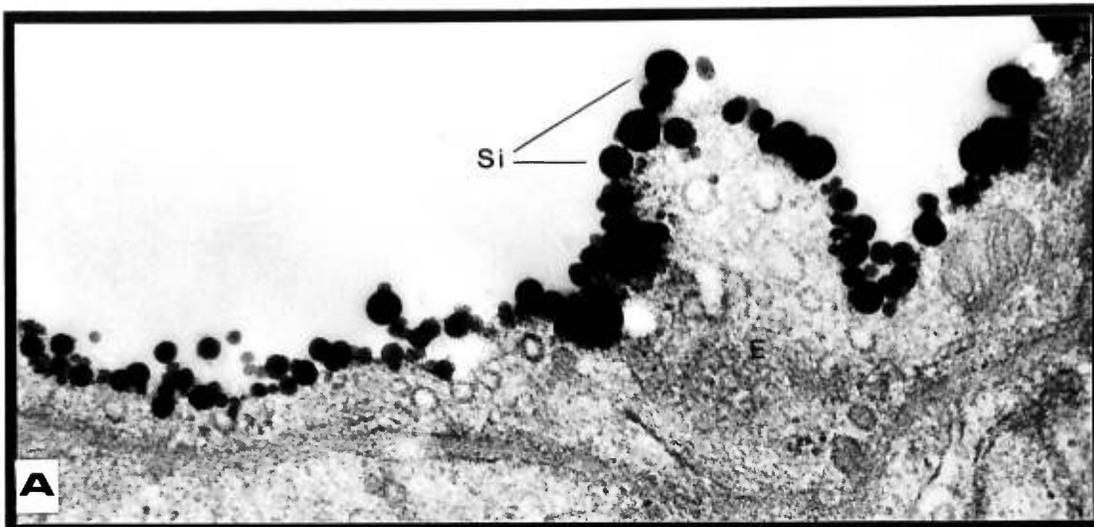


Fig. 2. Schéma de la purification des membranes lumineales endothéliales.

Fig. 3. (Page suivante). A) Particules de silice associées au front luminal des cellules endothéliales. B-C) Préparation de membranes lumineales purifiées toujours associées à la silice. B) X 9391 C) X 36 000, bars = 1.0µm. Si : billes de silice ; E : endothélium ic : cavéoles isolées ; bc : système de ramification des cavéoles.



3.2. Production et purification des anticorps monoclonaux

À cause du fait que la source immunogénique est complexe, les anticorps monoclonaux ont plusieurs avantages pratiques sur les anticorps polyclonaux. La spécificité et l'affinité de ces anticorps pour la molécule qui a induit leur production sont nettement supérieures à celles des anticorps polyclonaux. Ceci vient du fait qu'il est possible de sélectionner uniquement les clones sécrétant des anticorps monospécifiques de très haute affinité. Par contre, la production d'anticorps monoclonaux a aussi ses désavantages. Les anticorps polyclonaux sont plus rapides et moins coûteux à produire en plus de former une liaison plus stable avec leur antigène que les anticorps monoclonaux (65) (Tableau I).

Tableau I

Comparaison entre les anticorps monoclonaux et polyclonaux

	Polyclonaux	Monoclonaux haute affinité
Épitope reconnu	Beaucoup	1 seul
Spécificité	Polyspécifique	Monospécifique
Affinité	Variable	Élevée
Anticorps contaminants	Beaucoup	Peu
Coût	Faible	Élevé

3.2.1. Immunisation de souris

L'immunisation de souris vise l'induction de la production d'anticorps dirigés contre une ou plusieurs molécules d'une préparation. Pour notre étude, des souris BALB/c ont été immunisées avec une injection sous cutanée d'une préparation hautement purifiée de membranes luminales endothéliales de poumons de rat dont les éléments du cytosquelette ont été enlevés (P₃) (63). L'injection a été faite avec adjuvant complet de Freund, une suspension de mycobactéries mortes dans l'huile minérale (66). La présence d'adjuvant permet d'augmenter la réponse immune en diminuant la vitesse de la diffusion de l'antigène dans l'organisme exposant ainsi plus longtemps le système immunitaire à l'antigène. Après cette immunisation, l'expansion clonale et la stimulation des lymphocytes B est induite par la présence des molécules immunogéniques. Il y a aussi l'activation de cellules B mémoires dans la rate (65).

Par la suite, deux doses de rappel de la même préparation avec adjuvant incomplet (sans les mycobactéries) sont administrées à trois semaines d'intervalle. Les doses de rappel stimulent la mutation somatique causant le changement isotypique de classe d'immunoglobulines. Cette réaction est aidée par les cellules T_{facilitatrices} qui vont sécréter des cytokines captées par les cellules B. Le changement isotypique est favorable pour la production d'anticorps, habituellement de classe IgG, ayant une plus grande affinité avec l'antigène (65).

Enfin, trois jours avant la fusion, une quatrième injection intrapéritonéale de la préparation est administrée dans un tampon salin. Cette dose est nécessaire pour augmenter la production du clone sécrétant des anticorps de haute affinité. Le sérum est ensuite prélevé et testé pour vérifier la présence et la qualité des anticorps.

3.2.2. Production des anticorps monoclonaux

Les cellules de la rate d'une souris sont fusionnées avec les cellules de myélome P3-X63 Ag.653 en utilisant du polyéthylène glycol 2-4000 comme agent fusogénique afin de faciliter la fusion des membranes des deux types cellulaires (67). La lignée cellulaire P3-X63 Ag.653 est choisie parce qu'elle possède trois caractéristiques importantes : elle est immortelle, elle ne sécrète pas d'anticorps et elle ne possède pas l'enzyme hypoxanthine phosphoribosyl transférase (HPRT) (65). Après la fusion, les cellules sont distribuées dans des puits et cultivées dans un milieu de culture HAT.

Le milieu HAT contient de l'hypoxanthine, de l'aminoptérine et de la thymidine. L'aminoptérine bloque la voie principale de biosynthèse des purines et des pyrimidines par l'inhibition de l'enzyme dihydrofolate réductase. Il existe toutefois une voie secondaire de sauvetage qui permet l'utilisation de nucléotides exogènes. La voie de synthèse des pyrimidines utilise l'enzyme thymidine kinase (TK) avec la thymidine

exogène du milieu de culture alors que la voie de synthèse des purines utilise l'enzyme hypoxanthine phosphoribosyl transférase (HPRT) avec l'hypoxantine du milieu. Par conséquent, une délétion de l'une ou l'autre des deux enzymes va empêcher la synthèse d'un groupe de nucléotides qui va entraîner la mort des cellules.

Ce milieu de culture est un milieu de sélection. Les cellules de myélome qui n'auront pas fusionné vont mourir car sont déficientes en HPRT. De leur côté, les cellules lymphocytaires ne sont pas capables de subsister en culture et meurent rapidement. Seules les cellules fusionnées, c'est-à-dire les cellules qui ont acquis l'immortalité des cellules cancéreuses et le gène HPRT des lymphocytes vont pouvoir survivre.

Pour faciliter la sélection des meilleurs clones, des dilutions limites sont effectuées afin de distribuer une seule cellule dans chaque puits de culture. Alors, la division cellulaire va permettre le développement d'un clone dont toutes les cellules vont sécréter un anticorps reconnaissant un même site antigénique. Les anticorps sont sécrétés dans le milieu de culture et vont être récupérés dans le surnageant de culture. Après deux semaines, les surnageants de culture de chaque clone en division active sont analysés par immunobuvardage pour déterminer leur immunoréactivité et leur spécificité.

3.2.3. Analyse du sérum et des surnageants de culture

Le sérum des souris et les surnageants de culture des hybridomes ont été analysés par une technique d'immunobuvardage ponctuelle "dot blot" (63, 68). Une membrane de nitrocellulose est mise sur une plaque de 96 puits afin de marquer la position de chaque puits. Des aliquotes contenant environ 1 µg de protéines, venant de la préparation immunogénique, solubilisées dans 1% SDS, sont mis de façon ponctuelle sur les marques faites sur la membrane de nitrocellulose. Elle est incubée dans un tampon de blocage et ensuite mise sur une plaque de 96 puits contenant les échantillons (sérum ou surnageant) à analyser. L'incubation dans un 2^e anticorps anti-immunoglobulines spécifique à l'espèce, conjugué avec une enzyme HRP (Peroxydase de Raifort), et la détection du marquage par chimiluminescence vont permettre de retracer les clones produisant des anticorps capables de reconnaître une molécule de l'extrait. En se basant sur l'intensité du marquage, on peut alors choisir le clone qui produit la plus grande concentration d'anticorps ou qui produit les anticorps ayant la plus grande affinité pour l'une des protéines de l'extrait.

Les surnageants de culture montrant le plus fort signal sont ensuite analysés par immunobuvardage (*Western Blotting*) sur la préparation immunogénique P₃ dont les protéines sont séparées par électrophorèse en SDS-PAGE (*polyacrylamide gel electrophoresis*) et transférées sur membrane de nitrocellulose. Cet essai permet de

détecter les clones ayant la meilleure spécificité.

Pour augmenter la production des anticorps (d'un facteur de 10X environ), les hybridomes sont injectés dans le péritoine de souris. L'ascite formée (liquide intrapéritonéal) contient également les immunoglobulines endogènes de l'animal en plus de contenir en très grande quantité l'anticorps monoclonal désiré. Il doit donc y avoir une étape de purification des anticorps monoclonaux à partir de l'ascite.

3.2.4.Purification des anticorps monoclonaux

Pour nos travaux, quatre clones ont été conservés à partir des analyses d'immunoréactivité et de spécificité. Tous ces clones proviennent de la même souris. Les anticorps monoclonaux produits par ces clones ont été nommés 11B10, 21D5, 28D5 et 30B3, nomenclature qui correspond au numéro des clones sélectionnés. La classe et la sous-classe des anticorps ont été définies en utilisant un ensemble d'isotypage d'anticorps monoclonaux selon l'espèce. L'isotypage a permis de caractériser nos anticorps comme étant des IgG1 sauf le 11B10 qui est un IgM.

La stratégie de purification des anticorps monoclonaux varie selon la classe des immunoglobulines (65). Après la délipidation des ascites par centrifugation, les IgG ont été purifiés à l'aide d'une colonne d'affinité sur laquelle une protéine-G a été

immobilisée (Mab TrapGII de Pharmacia). Cette protéine d'origine bactérienne a une affinité pour la portion Fc des immunoglobulines de certaines classes selon leur origine. Une telle colonne peut ainsi retenir les anticorps qui seront libérés en augmentant progressivement la concentration saline. Cette stratégie a été utilisée pour la purification des anticorps 28D5 et 30B3.

Les IgG peuvent aussi être purifiés par le passage à travers une colonne DEAE-Sépharose. Nous avons utilisé cette technique pour la purification de l'antigène 21D5. Ce type de colonne contient des résidus éthanol suite au traitement avec le DEAE (DiEthylAminoEthyl) ce qui rend la matrice solide chargée positivement. Cette charge permet de retenir la majorité des protéines contaminantes puisqu'elles sont fortement chargées négativement. Les IgG ayant une charge faiblement négative dans un pH neutre sont faiblement retenus par la colonne. La liaison à une telle matrice dépend du nombre de résidus acides sur l'immunoglobuline.

L'IgM a été purifié par précipitation avec le sulfate d'ammonium (50% de saturation) suivie par une chromatographie sur un gel de Sépharose 6B. Les protéines sériques et les immunoglobulines précipitent dans un milieu où la concentration saline augmente. La majorité des contaminants sériques et des immunoglobulines précipitent rapidement alors que les IgM nécessitent une concentration de 50% de sulfate d'ammonium. Les IgM ont ensuite été resolubilisés et passés à travers une colonne de

Sépharose 6B pour enlever les contaminants restants. Cette étape permet de séparer les molécules selon leur taille. Les plus petites sont retardées par la colonne alors que les plus grosses ne le sont pas ou sont récupérées rapidement durant le lavage de la colonne. Les IgM ayant un poids moléculaire d'environ 900 000 Da sont facilement séparés. Chaque fraction a été analysée par électrophorèse comme contrôle de pureté et par immunobuvardage contre des membranes contenant les antigènes ayant servis à leur production afin de retrouver les fractions ayant la meilleure spécificité et affinité.

3.2.5. Présentation des anticorps monoclonaux et de leur antigène

Les anticorps monoclonaux produits, 11B10, 21D5, 28D5 et 30B3, sont spécifiques à des protéines exprimées à la surface luminale des cellules endothéliales. Lorsque les protéines d'un homogénat de poumon sont séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes, donc en présence de 640mM β -mercaptoéthanol et de 1% SDS, les anticorps reconnaissent quatre protéines de poids moléculaire de 170KDa, 56KDa, 95KDa et 85KDa respectivement (Fig. 4).

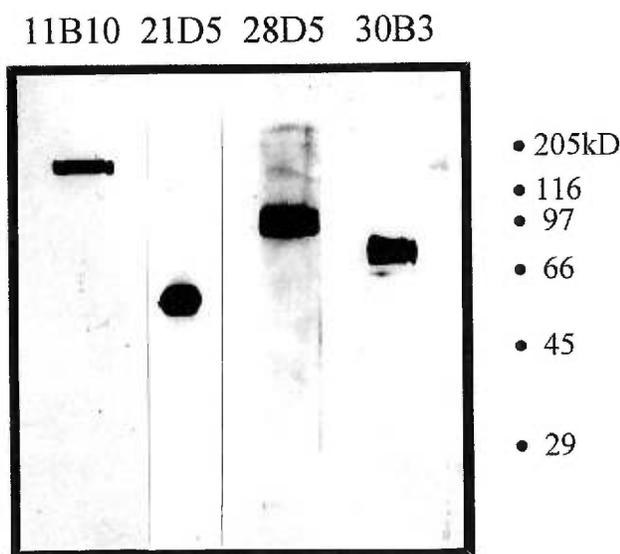


Fig. 4. Présentation des quatre anticorps spécifiques à des protéines de la membrane luminale endothéliale des poumons de rat.

3.3.Choix de l'antigène et expériences préliminaires

L'objectif de ce projet de maîtrise était de purifier et de caractériser un de ces quatre antigènes. Des expériences préliminaires nous ont permis de choisir l'antigène de 170KD comme candidat pour réaliser ce travail. Le choix s'est arrêté sur cet antigène parce que ses caractéristiques le désignaient comme un nouveau marqueur des cellules endothéliales pulmonaires et parce qu'il démontrait des propriétés facilitant sa purification.

Les premiers essais en immunofluorescence ont indiqué que cette protéine était spécifique au tissu pulmonaire. Dans la littérature, quelques protéines ont un poids moléculaire similaire à notre antigène dont l'enzyme de conversion de l'angiotensine

et l'endogline, mais aucune de celles-ci ne montraient une localisation unique dans l'endothélium pulmonaire. La possibilité que cet antigène soit un nouveau marqueur des cellules endothéliales du poumon a influencé le choix de cet antigène. De plus, à l'aide d'expériences préliminaires, une caractérisation de l'antigène a été faite afin d'orienter la démarche et mettre sur pied une stratégie afin de mener à bien ce projet.

3.3.1.Électrophorèse en conditions réductrice et non réductrice

Une comparaison de la migration de la gp170 sur SDS-PAGE en conditions réductrice et non réductrice a permis de s'assurer que l'antigène était un monomère. La présence de 640mM de mercaptoéthanol, un agent réducteur, n'a pas modifié le profil de migration de cette protéine comparativement à celui obtenu en condition non réductrice (Fig.5). Le β -mercaptoéthanol brise les ponts disulfures ce qui sépare les chaînes peptidiques d'un polymère et modifie le poids moléculaire apparent de la protéine. Comme témoin de l'efficacité de cette approche, nous avons traité de manière similaire l'antigène spécifique à l'anticorps 21D5. Cet antigène est un dimère car en condition réductrice, il montre deux bandes d'environ 55 et 56KD alors qu'en l'absence de mercaptoéthanol, l'antigène a un poids moléculaire d'environ 114KD. Il est formé de deux sous-unités qui dans ce cas-ci sont reconnus par l'anticorps 21D5 (Fig.5).

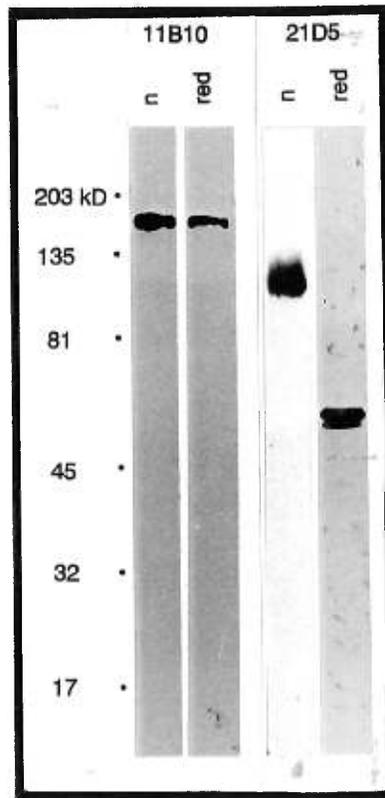


Fig. 5. Poids moléculaire des antigènes 11B10 et 21D5 détectés par immunobuvardage avec les anticorps spécifiques. Red : conditions réductrices avec 640mM β -mercaptoéthanol ; n : conditions non réductrices.

3.3.2. Biotinylation *in situ* de la surface luminale endothéliale

La présence de l'antigène 11B10 dans les fractions P_2 et P_3 et le fait qu'il n'est pas solubilisé par les conditions permettant d'extraire les protéines périphériques nous indiquent qu'il est fortement associé à la membrane plasmique des cellules endothéliales pulmonaires. Cependant, le type de protéine membranaire reste inconnu. Il peut s'agir d'une protéine transmembranaire, une protéine ancrée à la face externe de

la membrane par une ancre GPI ou liée à des acides gras à la face cytoplasmique. Dans les deux premiers cas, la protéine aura une portion exprimée à l'extérieur de la cellule.

Dans le but de vérifier la présence d'un domaine extracellulaire de l'antigène, une biotinylation *in situ* du front luminal pulmonaire a été effectuée (63). Un dérivé hydrosoluble de la biotine, le sulfo NHS-LC-Biotine, qui ne peut traverser la membrane cellulaire, a été utilisé parce qu'il possède une chaîne NHS (N-HydroxySuccinimidine) qui se lie de façon covalente avec la partie amino accessible des protéines. La perfusion de la biotine dans les poumons de rat s'est faite dans un tampon légèrement alcalin avant la perfusion de la silice. Par la suite, on a récupéré la fraction P₂ et la fraction P₃ de la façon décrite précédemment. Ces échantillons ainsi que l'homogénat et les extraits en carbonate et en NaCl ont été mis sur gel d'acrylamide et transférés sur membrane de nitrocellulose. La détection des protéines biotinylées s'est faite en incubant la membrane avec la streptavidine-HRP. Les résultats (non présentés) montrent que la biotine, dans les conditions de perfusion utilisées, ne pénètre pas dans les cellules puisqu'il y a très peu de marquage dans les extraits en carbonate ou en NaCl.

La fraction P₃ a été solubilisée en présence de détergent ce qui a permis d'extraire les protéines membranaires. Afin d'isoler les protéines biotinylées de l'extrait, il a été passé dans une colonne de chromatographie avec streptavidine immobilisée. Sa grande affinité pour la biotine a permis de retenir les protéines biotinylées qui ont

ensuite été éluées et mises sur gel d'acrylamide pour l'immunodétection des antigènes avec leur anticorps spécifique. Les résultats de la figure 6 démontrent que les antigènes 11B10, 21D5 et 28D5 ont une portion extracellulaire puisqu'ils sont biotinylables et donc retenus par la colonne. Un contrôle utilisant un échantillon de membranes non biotinylées a passé par la même colonne et l'éluat a été analysé avec les mêmes anticorps (fig. 6). Il démontre que la liaison de la gp170 à la colonne est due à sa biotinylation car les antigènes ne se trouvent pas dans l'éluat non biotinylé.

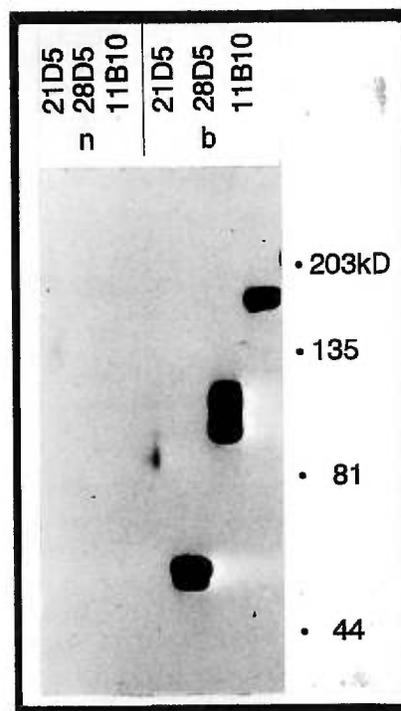


Fig. 6. Biotinylation *in situ* des protéines de la membrane plasmique luminale endothéliale du poumon de rat. n : membrane non biotinylée ; b : membrane biotinylée. Les deux préparations membranaires ont été incubées avec la colonne de streptavidine immobilisée. Les antigènes biotinylés ont été retenus par la colonne, élués et mis sur membrane de nitrocellulose pour leur détection avec leur anticorps spécifique.

3.3.3. Digestion de la gp170 par l'endoglycosidase F

La présence d'un domaine extracellulaire de la gp170 a été démontré par sa biotinylation. Ce résultat est appuyé par la démonstration que la protéine est glycosylée puisque seules les protéines ayant un domaine extracellulaire peuvent l'être. Pour démontrer la glycosylation de la gp170, les protéines de la fraction P₂ ont été traitées avec l'endoglycosidase F, mises sur SDS-PAGE et détectées par immunobuvardage avec l'anticorps 11B10 (63). La gp170 est fortement N-glycosylé puisque son poids moléculaire diminue de 10 à 15% suite à sa digestion (Fig.7).

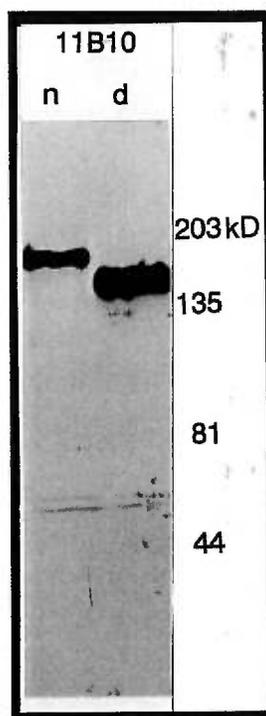


Fig. 7. Effet de la digestion de l'antigène 11B10 par l'endoglycosidase F. n : contrôle avec l'antigène non-digéré ; d : échantillon contenant l'antigène digéré par l'endo F.

La démonstration de la glycosylation de la gp170 a eu une influence importante sur le choix de la stratégie destinée à réaliser la première partie du travail, l'isolation de l'antigène pour son identification. La glycosylation importante de la protéine d'intérêt suggérait qu'il était possible de la purifier par chromatographie d'affinité grâce à l'utilisation d'une lectine immobilisée comme ligand. Finalement, le poids moléculaire élevé de la protéine offrait un avantage que les autres protéines n'avaient pas. Grâce à cette caractéristique, la séparation des protéines par électrophorèse en SDS-PAGE permettait de bien isoler la gp170 des autres protéines pulmonaires puisque peu de celles-ci avaient un poids moléculaire dans la même région. Pour toutes ces raisons, nous avons choisi de purifier, de séquencer et de caractériser l'antigène spécifique à l'anticorps monoclonal 11B10.

4. Méthodologie et résultats

La première étape de ce projet a été d'identifier l'antigène spécifique à l'anticorps monoclonal 11B10. L'identification de cet antigène, une glycoprotéine de 170KDa, a été faite par l'analyse de sa séquence d'acides aminés et par immunodétection utilisant notre anticorps en parallèle avec des anticorps connus. Cependant, l'identification de la séquence d'acides aminés nécessitait la purification de l'antigène désiré.

4.1.Purification de l'antigène 11B10 (gp170) en vue de son séquençage

Lors des travaux préliminaires, nous avons démontré que l'antigène 11B10 possédait des groupements d'oligosaccharides (Fig. 6 et 7). Par la suite, on a identifié les résidus glucidiques à l'aide d'incubation de membranes, sur lesquelles se trouvaient les protéines d'un homogénat de poumon, avec différentes lectines. Celles-ci reconnaissent des résidus saccharidiques spécifiques sur les glycoprotéines et s'y attachent. Puisque les lectines étaient conjuguées à des molécules de biotine, on a révélé les complexes avec de la streptavidine-HRP. Une bande identique de membrane a été incubée avec l'anticorps pour nous permettre de retracer l'antigène d'intérêt.

Cette expérience nous a démontré que l'antigène 11B10 était fortement reconnu

par la Concanavaline A, une lectine spécifique aux résidus α -D-mannopyranosyl et α -D-glucopyranosyl (résultats non montrés). À partir de cela, nous avons tenté de purifier notre antigène 11B10 à l'aide d'une colonne d'affinité sur laquelle la Con A était immobilisée. La liaison avec la Con A est réversible, donc il a été possible de récupérer les molécules retenues par une telle colonne à l'aide d'une élution compétitive utilisant des concentrations élevées de α -D-méthylmannoside (69).

4.1.1. Purification de la gp170 par chromatographie d'affinité

La purification de la gp170 a été faite à partir de l'homogénat de poumons. Après l'anesthésie du rat par l'injection intrapéritonéale de chloral hydrate, on a perfusé du PBS à 4°C via l'aorte abdominale jusqu'à ce que le lit vasculaire ne contienne plus de sang. Les poumons ont été perfusés avec du PBS via l'artère pulmonaire. Ils ont été prélevés et homogénéisés sur glace dans un tampon d'homogénéisation contenant : 25mM HEPES pH = 7.2, 250mM de sucrose, 1mM de MgCl₂, et des inhibiteurs de protéases 5mM de benzamidine et 1mM de PMSF (Phénylméthylsulfonylfluorure).

Puisque notre antigène est une protéine membranaire, il a été solubilisé avec l'aide d'un détergent. Nous avons utilisé le Triton X-100 (TX), un détergent non ionique à cause du fait que les détergents plus puissants, comme le sodium dodécyl

sulfate (SDS) et le sodium déoxycholate (DOC), séparent les quatre sous-unités de la concanavaline ce qui diminue son efficacité (70). En plus, le Triton X-100 est aussi efficace que le SDS pour solubiliser notre antigène. L'extraction des protéines membranaires de l'homogénat a été faite par une incubation d'une heure sur glace en présence de 1% Triton X-100. L'extrait contenant les protéines solubles en Triton a été récupéré dans la fraction surnageant suite à une centrifugation à 100 000g. pendant 30 minutes. Le dosage des protéines par Amidoblack (64) nous indique que plus de 60% des protéines de l'homogénat sont récupérés dans cet extrait.

Dans le but de protéger la colonne d'affinité et afin de réduire la contamination de la préparation par des protéines pouvant coller de façon non spécifique à la matrice solide, l'extrait en TX a été passé dans une pré-colonne de Sépharose. La fraction contenant les protéines non liées (NL) par la pré-colonne a été appliquée sur la colonne d'affinité de Con A-Sépharose (Sigma Chem. Co) équilibrée avec un tampon de lavage contenant 25mM HEPES pH de 7.2, 1% Triton X-100 et supplémentée avec 1mM $MgCl_2$ et 1mM $CaCl_2$. Pour mesurer la capacité de rétention de la colonne, nous l'avons chargée cinq fois avec des aliquotes de 10ml d'extrait en TX. Les extraits ont été incubés pendant 2 heures à 4°C avec agitation lente et constante. Les protéines retenues par la colonne ont été éluées avec 0.5M α -D-méthylmannoside dissout dans le tampon de lavage. Nous avons ensuite évalué par immunobuvardage la présence de

la gp170 dans toutes les fractions. Le Tableau II donne la quantité totale de protéines dans chacune déterminée par Amidoblack (64)

Tableau II
Concentration protéique des fractions obtenues lors des différentes étapes de la chromatographie d'affinité avec la colonne de Concanavoline A

Échantillons	Concentration (µg/ml)	Quantité de protéines (µg)	Rendement (%)
<u>Homogénat</u>	1351	27.013	100
<u>Extrait soluble en TX</u>	831	16.615	61.5
<u>NL par Pré-colonne</u>	651	13.030	48.2
<u>NL1 par Con A</u>	291	5.8138	21.5
<u>NL2</u>	339	6.7700	25.1
<u>NL3</u>	390	7.7905	28.8
<u>NL4</u>	343	6.8643	25.4
<u>NL5</u>	291	5.8138	21.5
<u>Lavage</u>	8	0.3858	1.4
<u>Éluat</u>	96	4.7890	17.7

Toutes les fractions ont été analysées par électrophorèse sur un mini gel de 10% acrylamide. Pour démontrer l'enrichissement en 11B10 dans la fraction éluée de la colonne, les puits ont été chargés avec le même volume pour tous les échantillons. Le volume choisi correspond à environ 35µg de protéines d'homogénat. Après l'électrotransfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose, la présence de l'antigène 11B10 a été révélée par immunobuvardage. La membrane a été incubée 2h à la température de la pièce avec l'anticorps 11B10 (1/200 dans le tampon de saturation) et ensuite pendant 1h avec un anticorps anti-souris conjugué au HRP

(1/20 000 dans le tampon de saturation). Le développement s'est fait par Diaminobenzidine (DAB). La figure 8 montre le profil d'élution obtenu lors de la purification de l'antigène 11B10 avec la colonne de Concanavoline A immobilisée.

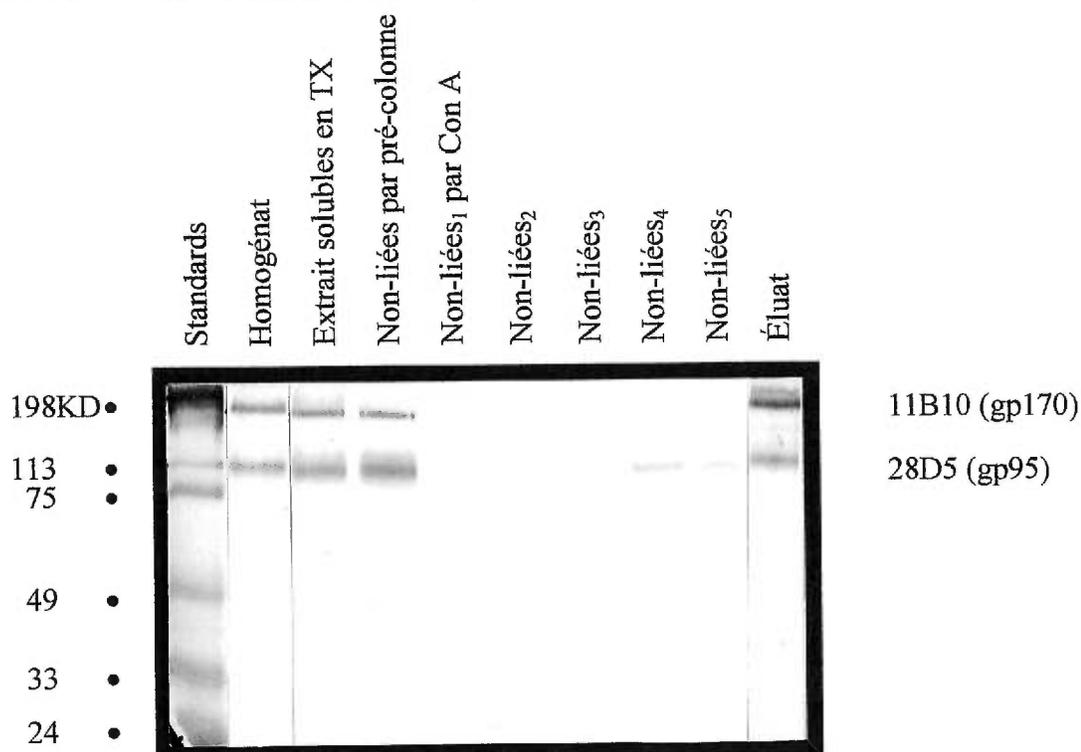


Fig. 8. Profil d'élution obtenu lors de la purification de l'antigène 11B10 par une colonne de Concanavoline A immobilisée sur billes de Sépharose.

Comme il a déjà été mentionné au début de cette section, la gp170 est en concentration suffisante dans l'homogénat pour avoir un marquage net. La même intensité de marquage est récupérée dans l'extrait soluble en Triton que dans l'homogénat ce qui démontre une extraction efficace de la glycoprotéine par le Triton. La pré-colonne ne retient pas la protéine d'intérêt puisque le marquage dans la fraction

non liée est identique à celui de l'échantillon de départ. L'éluat de la pré-colonne a été vérifié et ne montre pas la présence de la gp170 (non montré).

Les résultats démontrent le fait que la colonne de Concanavaleine A a retenu de façon très efficace la gp170. Par contre, une autre glycoprotéine membranaire (une gp95), reconnue par l'anticorps 28D5, a échappé à la colonne et s'est retrouvée dans les fractions non liées. La différence de marquage est une indication que l'antigène 11B10 est plus fortement mannosylé que le 28D5. Il n'y a pas d'interférence entre les deux anticorps de sorte que les marquages sont les mêmes que lorsqu'ils sont employés un à la fois dans deux incubations différentes. De plus, les poids moléculaires des deux antigènes sont assez différents donc il n'y a pas de risque de les confondre.

4.1.2. Purification de la gp170 par électrophorèse préparative en présence de SDS

La gp170 n'est pas la seule glycoprotéine mannosylée présente dans le poumon de rat. Il y donc plusieurs protéines qui sont aussi retenues par la colonne de Con A. Par conséquent, une autre étape de purification a été nécessaire avant le séquençage de la gp170. Les protéines de l'éluat de la colonne de Con A ont été concentrées par précipitation en présence de 0.015% DOC et 12% TCA, lavées avec une solution d'éthanol/éther (1:1) afin d'enlever le Triton et séparées par électrophorèse sur des

grands gels d'acrylamide contenant 1% SDS. Une portion de chaque gel a été transférée sur membrane de PVDF pour immunobuvardage avec le 11B10. Le reste des gels a été coloré par Coomassie G-250. Après l'alignement des gels avec les membranes (Fig.9), la bande correspondante à l'antigène 11B10 a été coupée dans tous les gels et utilisée pour le séquençage de la protéine. Selon l'intensité de la coloration, la protéine 11B10 représente environ 3% de la quantité totale de protéine donc, environ 200 μ g total de protéines antigéniques 11B10 ont été utilisées pour son séquençage.



Fig. 9. Identification de la bande correspondant à l'antigène 11B10. A)Gel d'acrylamide coloré en Coomassie B) Membrane de PVDF incubée avec l'anticorps 11B10.

4.2. Identification de l'antigène 11B10

4.2.1. Théorie du séquençage

L'identification d'une protéine ne peut se faire que par la détermination de sa séquence d'acides aminés. Ce processus nécessite plusieurs étapes (64). La première étape implique la digestion *in situ* de la protéine avec la trypsine pour la formation de fragments plus petits. La trypsine coupe les protéines spécifiquement aux sites Arg-X et Lys-X où X peut être n'importe quel acide aminé. La spectrométrie de masse des fragments obtenus par la digestion forme une carte peptidique qui nous informe sur le nombre de fragments et la taille de chacun. Cette carte est spécifique à chaque protéine. Il est donc possible de consulter des banques de données pour retrouver une protéine avec le même profil de digestion et ainsi identifier la protéine d'intérêt.

Après la digestion à la trypsine, les fragments peptidiques sont séparés par HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Chaque fraction est analysée pour déterminer la masse et la pureté des fragments présents. Certaines fractions, qui possèdent une pureté et une quantité suffisante de fragments, sont ensuite analysées pour déterminer la séquence d'acides aminés. Ceci se fait par une dégradation à l'extrémité N-terminale. Le peptide est exposé à une substance chimique qui ne réagit

qu'avec la fonction amine libre du peptide. Par hydrolyse acide, l'acide aminé terminal marqué est libéré et identifié par chromatographie. On effectue plusieurs cycles jusqu'à ce que tous les acides aminés du fragment aient été déterminés (3,71). La séquence trouvée est comparée avec les séquences peptidiques dans la littérature afin d'identifier la gp170.

4.2.2.Séquençage de la gp170

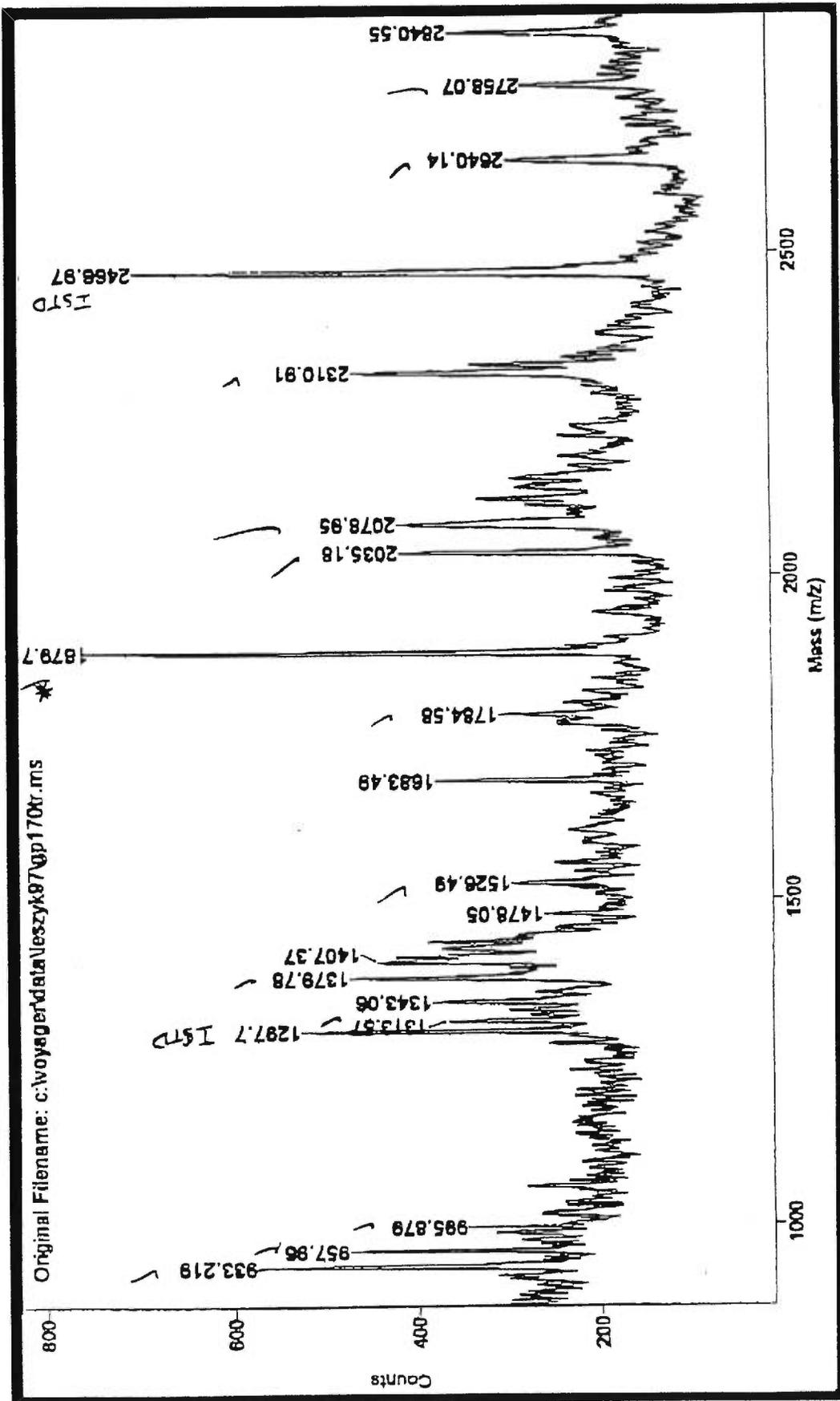
Le séquençage de la gp170 a été fait par le Dr John Leszyk de la Worcester Foundation For Biomedical Research à Shrewsbury au Massachusetts. Les figures 10, 11 et 12 montrent les résultats des étapes qui ont précédé l'identification des acides aminés lors de l'analyse d'un premier fragment. La figure 10 montre le profil en spectrométrie de masse des fragments obtenus par la digestion de la gp170 par la trypsine. La figure 11 fait suite à la chromatographie HPLC. Cette figure nous montre les fractions obtenues et la masse des fragments présents dans chacune. L'analyse de masse de la fraction # 8 (Fig.12) montre que cette fraction ne contient qu'un seul fragment présent en quantité suffisante pour le séquençage. La séquence en acides aminés de ce fragment est la suivante :

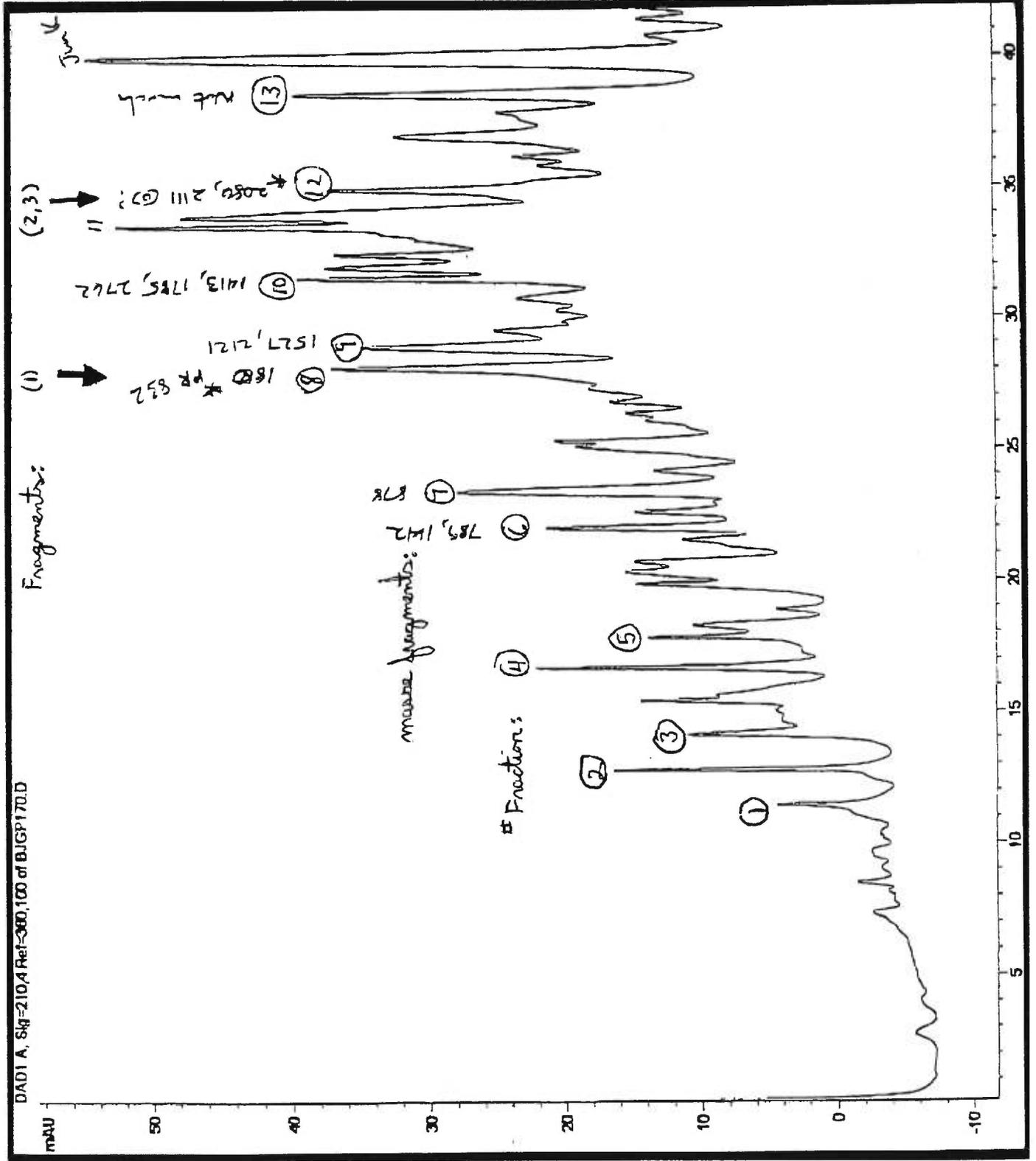
1) Ile-Ile-Gly-Ser-Val-Gln-Thr-Leu-Gly-Pro-Ala-Asn-Leu-Pro-Leu-Thr-Gln-Arg

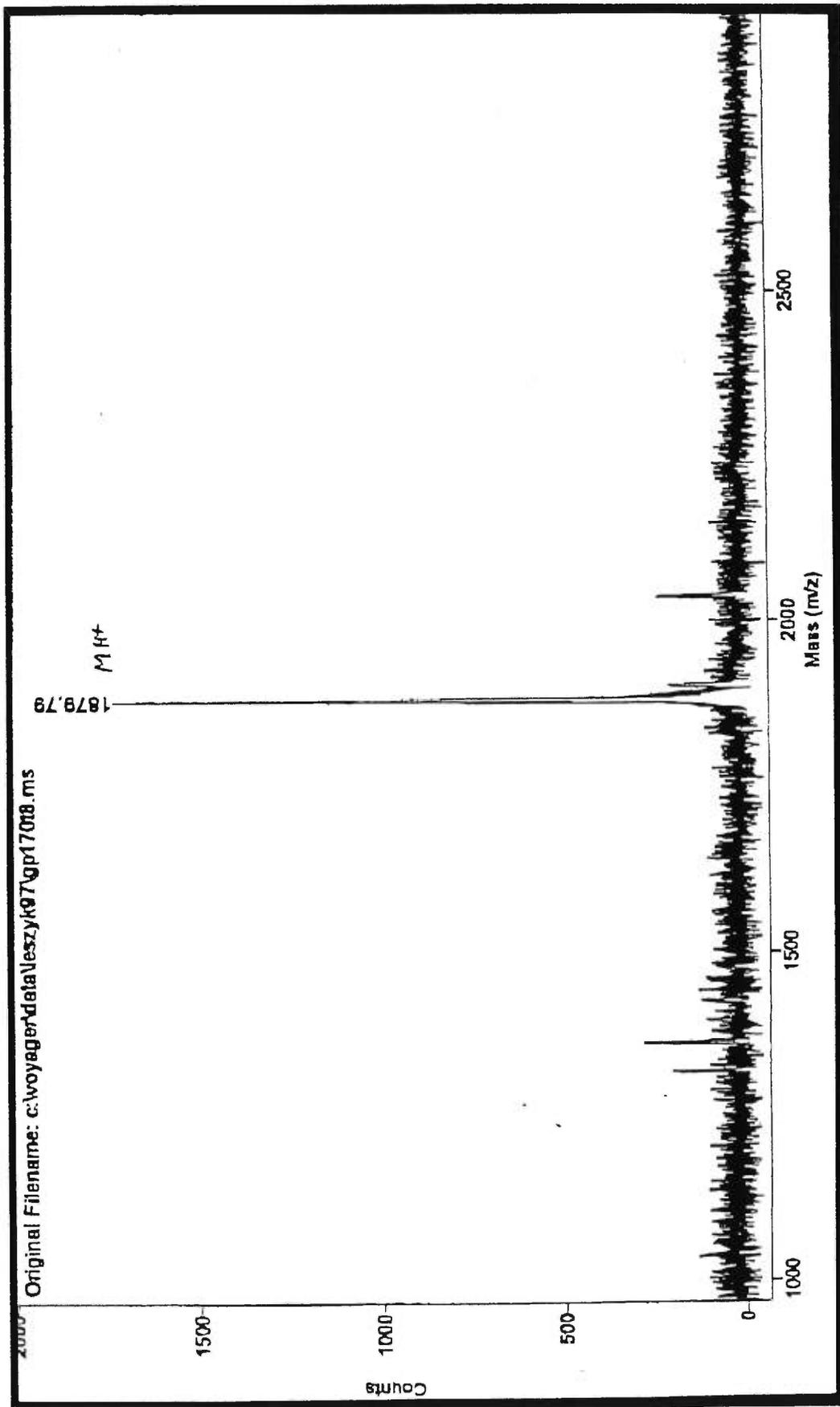
Fig. 10. (Page suivante) Profil de masse de la gp170 après digestion à la trypsine.

Fig. 11. (Page 58) Fractions obtenues après la chromatographie HPLC pour séparer les fragments venant de la digestion à la trypsine. La fraction #8 a été choisie pour le premier essai de séquençage puis la fraction #12 pour le séquençage des fragments 2 et 3.

Fig. 12. (Page 59) Analyse de masse de la fraction #8 ; 1 seul fragment.







Cette première analyse conjuguée à la comparaison des séquences dans les banques de données, a permis de retrouver une homologie de 100% entre ce fragment et la portion 126 à 143 du précurseur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine de rat somatique. Cette portion est toujours présente chez l'enzyme mature. Afin de vérifier ce résultat, le profil de masse obtenu après la digestion de notre antigène a été comparé à celui de l'ECA retrouvé dans une banque de données (Fig.13).

Mass submitted	Mass matched	Delta Da	start	end	Peptide Sequence (Click for Fragment Ions)
933.2000	933.1858	0.0142	803	810	(R) <u>A</u> ILPFFPK(Y)
958.0000	958.0186	-0.0186	658	664	(R) <u>F</u> VEEYDR(T)
995.9000	996.1619	-0.2618	409	416	(K) <u>D</u> LHVSLRR(G)
1313.6000	1313.5506	0.0494	1123	1133	(K) <u>F</u> HVPANVPYIR(Y)
1313.6000	1313.4772	0.1228	1161	1171	(K) <u>C</u> DIYOSKEAGK(L)
1343.1000	1341.3839	1.7161	821	832	(K) <u>L</u> NGYSDAGDSWR(S)
1379.8000	1379.5222	0.2779	494	502	(R) <u>Y</u> NYDWWYLR(T)
1526.5000	1525.6256	0.8744	1090	1100	(K) <u>E</u> NYNQEWWSLR(L)
1879.7000	1879.2180	0.4819	126	143	(R) <u>I</u> IGSVOTLG PANLPLTOR(L)
2035.2000	2035.4063	-0.2064	125	143	(R) <u>R</u> IIGSVOTLG PANLPLTOR(L)
2310.8999	2310.5775	0.3224	1014	1036	(R) <u>E</u> GANPGFHEAIGDVLALSVSTPK(H)
2310.8999	2309.6151	1.2848	1151	1171	(R) <u>A</u> AAGHTGPLYKCDIYOSKEAGK(L)
2640.1001	2639.9842	0.1159	417	442	(R) <u>G</u> ANPGFHEAIGDVLALSVSTPAHLHK(I)
5 unmatched masses: 1683.5 1784.6 2079.0 2758.1 2840.6					

Fig. 13. Comparaison des fragments obtenus de la digestion de la gp170 et de l'ECA.

Parmi les fragments obtenus de la digestion de la gp170, 11 des 16 fragments examinés sont communs à ceux obtenus suite à la digestion de l'ECA par la trypsine (Fig.13). Le premier fragment analysé de la gp170 d'une masse de 1879.7 m/z est un des fragments communs. Pour confirmer que la gp170 est l'enzyme de conversion de l'angiotensine, on a soumis une autre fraction au séquençage. L'analyse de masse de cette fraction (fraction #12) montre la présence de deux fragments (Fig.14). Selon le profil de masse, ces deux fragments de 2078.9 m/z et 2109 m/z, ne sont pas supposés provenir de l'ECA (Fig.13). Cependant, l'analyse partielle des acides aminés de ces deux fragments montre qu'ils appartiennent également à l'enzyme de conversion de l'angiotensine. Voici la séquence partielle (14cycles = 11 acides aminés) de ces 2 autres fragments :

2) Leu-Gln-Glu-Glu-Ala-Ala-Leu-Ile-Asn-Gln-Glu

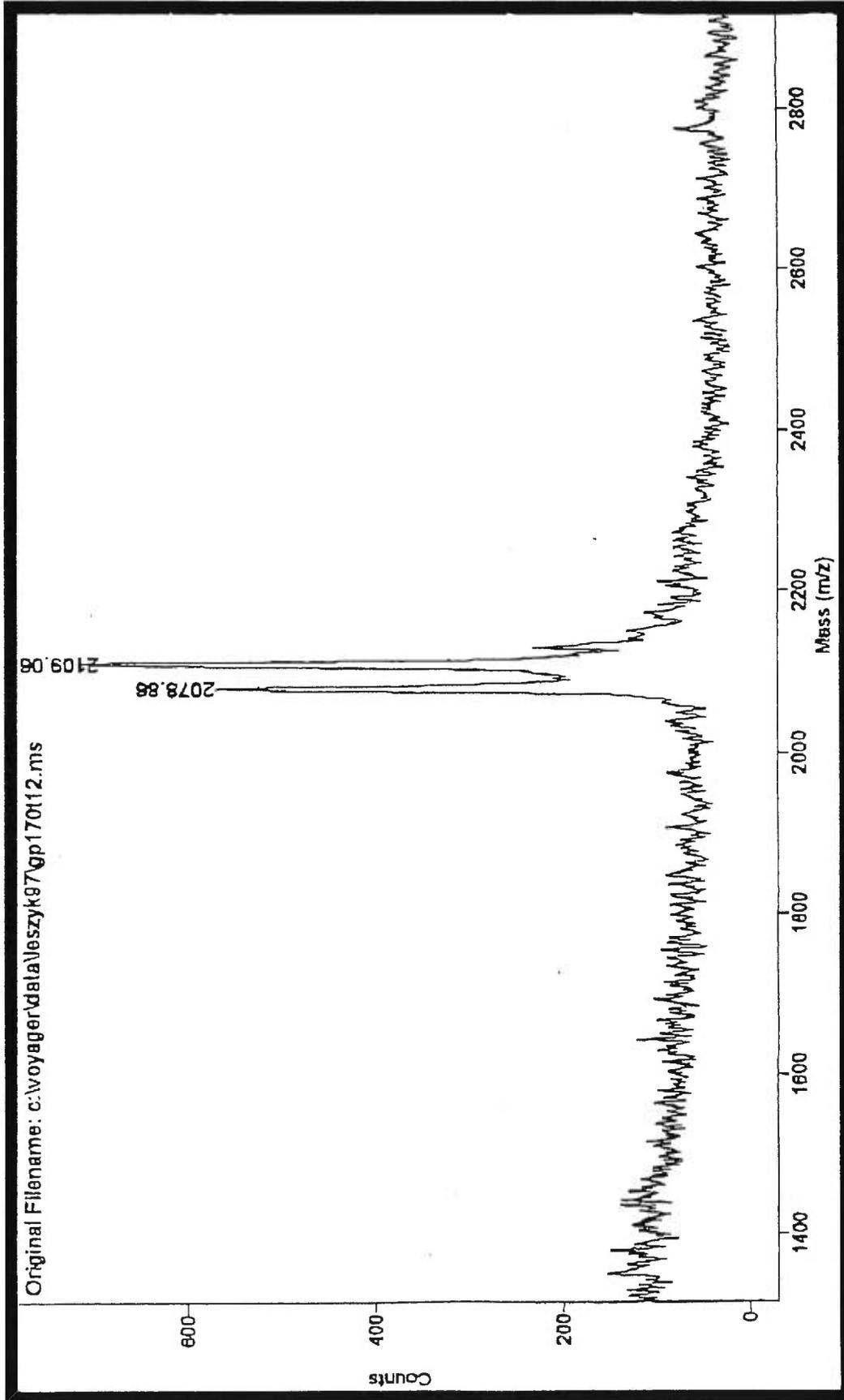
3) Ala-Val-Leu-Pro-Pro-Asn-Glu-Leu-Glu-Glu-Tyr

Le premier provient de la portion située entre les acides aminés 88 à 98 et le second entre les acides aminés 736 et 746 du précurseur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine. La présence de ces fragments après la digestion de la gp170 qui diffère de celle de l'ECA peut être due à une dégradation non spécifique de l'ECA, la cassure de la chaîne peptidique ou le changement par mutation de un ou plusieurs acides aminés ayant amené un nouveau site pouvant être hydrolysé par la trypsine.

La figure 15 donne la séquence complète du précurseur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine de poumon de rat retrouvée via l'Internet dans la banque de données Swiss-Prot au numéro d'accession P47820. Cette figure montre les trois fragments de la gp170 faisant partie de la séquence de l'ECA. De plus, elle donne les informations importantes sur la structure de la molécule et ses caractéristiques (enzyme mature : aa 36 à 1313 ; domaine extracellulaire : aa 36 à 1265 ; domaine transmembranaire : aa1266 à 1282 ; les sites catalytiques et d'attachement aux ions de zinc et les sites potentiels de glycosylation).

Fig. 14. (Page 63) Analyse de masse fraction #12 qui montre la présence de 2 fragments.

Fig. 15. (Page 64) Séquence complète du précurseur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine. Les trois fragments séquencés de la gp170 sont soulignés. Les différents domaines de l'enzyme mature et les sites importants de la molécule sont aussi présentés. (▼) : site potentiel de coupure de l'ECA par une sécrétase.



SIGNAL	1	35	BY SIMILARITY.
CHAIN	36	1313	ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME.
DOMAIN	36	1265	EXTRACELLULAR (POTENTIAL).
TRANSMEM	1266	1282	POTENTIAL.
DOMAIN	1283	1313	CYTOPLASMIC (POTENTIAL).
REPEAT	233	589	
REPEAT	831	1187	
METAL	396	396	ZINC 1 (CATALYTIC) (BY SIMILARITY).
ACT_SITE	397	397	1 (BY SIMILARITY).
METAL	400	400	ZINC 1 (CATALYTIC) (BY SIMILARITY).
METAL	994	994	ZINC 2 (CATALYTIC) (BY SIMILARITY).
ACT_SITE	995	995	2 (BY SIMILARITY).
METAL	998	998	ZINC 2 (CATALYTIC) (BY SIMILARITY).
VARIANT	207	207	R -> K.
CARBOHYD	44	44	POTENTIAL.
CARBOHYD	60	60	POTENTIAL.
CARBOHYD	80	80	POTENTIAL.
CARBOHYD	117	117	POTENTIAL.
CARBOHYD	152	152	POTENTIAL.
CARBOHYD	166	166	POTENTIAL.
CARBOHYD	324	324	POTENTIAL.
CARBOHYD	515	515	POTENTIAL.
CARBOHYD	683	683	POTENTIAL.
CARBOHYD	701	701	POTENTIAL.
CARBOHYD	720	720	POTENTIAL.
CARBOHYD	766	766	POTENTIAL.
CARBOHYD	948	948	POTENTIAL.
CARBOHYD	1197	1197	POTENTIAL.
SEQUENCE	1313 AA; 150907 MW; 974E87C7 CRC32;		
MGAASGQRGR	WPLSPPLML	SLLLLLLLPE	SPALDPGL QPGNFSADEA GAQLFADSYN
SSAEVVMFQS	TAASWAHDTN	ITEENARLOE	EAALINQEFA EVWGKKAKEL YESIWQNFTD
QKLRRIIGSV	OTLGPANLPL	TORLOYNLL	SNMSRIYSTG KVCFPNKTAT CWSLDPELTN
ILASSRNYAK	VLFAWEGWHD	AVGIPLRPLY	QDFTALSNEA YRQDGFSDTG AYWRSWYESP
SFEESLEHLY	HQVEPLYLNL	HAFVRRALHR	RYGDKYINLR GPIPAHLLGD MWAQSWENIY
DMVVPFPDKP	NLDVTSTMVQ	KGWNATHMFR	VAEEFFTSLG LSPMPPEFWA ESMLEKPADG
REVVCHASAW	DFYNRKDFRI	KQCTRVTMDQ	LSTVHHEMGH VQYYLQYKDL HVSLRRGANP
GFHEAIGDVL	ALSVSTPAHL	HKIGLLDRVA	NDIESDINYL LKMALEKIAF LPFGYLVDQW
RWGVFSGRTP	PSRYNYDWWY	LRTKYQGICP	PVARNETHFD AGAKFHIPSV TPYIRYFVSF
VLQFQFHQAL	CKEAGHQGPL	HQCDIYQSTK	AGAKLQQVLQ AGCSRPWQEV LKDLVGS DAL
DASALMEYFQ	PVSQWLQEQN	QRNGEVLGWP	EYQWRPPLPD NYPEGIDLET DEAKANRFVE
EYDRTAKVLW	NEYAEANWHY	NTNITIEGSK	ILLQKNKEVS NHTLKYGTWA KTFDVSNFQN
STIKRIIKKV	QNVDRAVLPP	NELEEYNQIL	LDMETTYSVA NVCYTNGTCL SLEPDLTNIM
ATSRKYEELL	WVWKSWRDKV	GRAILPFFPK	YVDFSNIKIAK LNGYSDAGDS WRSSYESDDL
EQDLEKLYQE	LQPLYLNLHA	YVRRSLHRHY	GSEYINLDGP IPAHLLGNMW AQTWSNIYDL
VAPFPSAPSI	DATEAMIKQG	WTPRRIFKEA	DNFFTSLGLL PVPPEFWNKS MLEKPTDGRE
VVCHASAWDF	YNGKDFRIKQ	CTSVNMEELV	IAHHEMGHIQ YFMQYKDLPV TIFREGANPGF
HEAIGDVLAL	SVSTPKHLHS	LNLLSSEGSV	YEHDINFLMK MALDKIAFIP FSYLIDQWRW
RVFDGSITKE	NYNQEWWSLR	LKYQGLCPPV	PRSQGDFDPG SKFHVPANVP YIRYFISFII
QFQFHEALCR	AAGHTGPLYK	CDIYQSKEAG	KLLADAMKLG YSKQWPEAMK IITGQPNMSA
SAIMNYFKPL	TEWLV TENRR	HGETLGWPEY	TWTPNTARAE GSLPESSRVN FLGMYLEPQQ
ARVGQWVLLF	LGVALLVATV	GLAHLRYNIH	NHHSRRRPHR GPQFGSEVEL RHS

4.3.Comparaison des caractéristiques biochimiques entre la gp170 et l'ECA

La corrélation entre les séquences de trois fragments distincts, obtenus par la digestion de notre préparation de gp170 purifiée, et des portions de la séquence de l'enzyme de conversion de l'angiotensine n'était pas suffisante pour conclure l'identification de notre antigène. Malgré la qualité de notre préparation, il peut y avoir des contaminants dont la digestion va donner des fragments semblables à certaines portions de l'ECA. Le doute sur l'identité de la protéine vient du fait que nos premiers essais d'immunofluorescence avec le 11B10 ont démontré un signal exclusivement dans les poumons. Aucun marquage n'a été détecté avec l'anticorps 11B10 dans les tissus où la présence d'ECA a été démontrée : le rein, le cœur, les testicules et la muqueuse intestinale. L'absence de marquage par immunofluorescence dans ces tissus peut être causée par une concentration d'antigène trop faible pour être révélé avec les concentrations d'anticorps utilisées.

Afin de valider les résultats du séquençage démontrant que l'antigène 11B10 est l'enzyme de conversion de l'angiotensine, nous avons utilisé deux anticorps anti-ECA reconnus. Le premier est l'anticorps monoclonal de souris spécifique à l'ECA de rat développé et généreusement offert par le Dr S. Danilov (Mab α -ECA 9B9) (72). Le second est un anticorps monoclonal de lapin spécifique à la portion C-terminale de l'ECA humaine généreusement offert par le Dr R.V. Stan de l'Université de Californie

à San Diego (Mab α -ECA C-ter). Ce dernier anticorps s'est montré capable de reconnaître l'enzyme de conversion de l'angiotensine du poumon de rat. Dans différentes expériences, nous avons comparé les marquages obtenus avec ces anticorps anti-ECA avec ceux obtenus à l'aide de notre anticorps monoclonal 11B10 afin d'établir avec certitude l'identification de la gp170.

4.3.1. Détermination des poids moléculaires de l'ECA et de la gp170

Pour vérifier si le poids moléculaire de l'ECA était le même que celui de la gp170, des aliquotes de 60 μ g de protéines d'homogénat de poumon ont été séparées par électrophorèse sur grand gel d'acrylamide (5 à 15%). Après la migration et le transfert sur nitrocellulose, les lanières ont été coupées et incubées avec l'un des trois anticorps. Les protéines révélées par les anticorps anti-ECA connus sont au même niveau que la bande marquée par notre anticorps 11B10 soit à environ 170KD (Fig.16). La gp170 a donc le même poids moléculaire que l'enzyme de conversion de l'angiotensine.

Cet essai m'a permis aussi de caractériser notre anticorps. Par exemple, le marquage de l'ECA obtenu avec l'anticorps anti-ECA 9B9 en plus d'être plus faible que celui obtenu avec notre anticorps 11B10 marque également de façon non spécifique une autre bande à 85KDa. Ainsi, dans ces conditions, notre anticorps 11B10 montre une spécificité plus grande et une excellente affinité pour l'ECA.

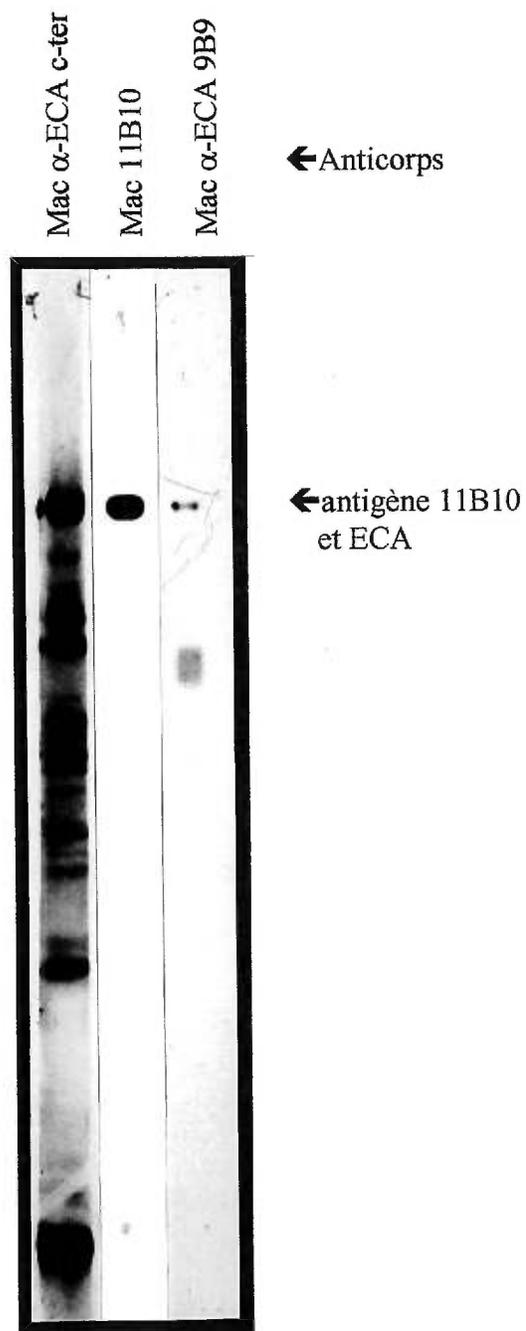


Fig. 16. Comparaison du poids moléculaire de l'antigène 11B10 avec celui de l'ECA détecté par des anticorps anti-ECA connus.

4.3.2. Points isoélectriques de l'ECA et de la gp170

La détection d'une bande protéique de même poids moléculaire avec deux anticorps différents n'indique pas qu'il s'agit de la même protéine. Il arrive parfois que des protéines différentes aient le même poids moléculaire ce qui rend impossible leur distinction en utilisant uniquement l'électrophorèse conventionnelle. En plus d'être séparées par leur poids moléculaire, les protéines peuvent être séparées selon leur point isoélectrique. C'est le principe de l'électrophorèse bidimensionnelle. Cependant, cette technique est longue et peut s'avérer difficile pour des personnes qui l'utilisent rarement. Premièrement, à cause du fait que les protéines précipitent souvent à leur point isoélectrique, il arrive que les protéines précipitent dans le gel de focalisation ce qui rend impossible la 2^e dimension. Aussi, la manipulation du gel tubulaire de focalisation est délicate et la superposition de ce dernier sur le gel conventionnel d'électrophorèse est difficile et rend souvent les résultats variables d'une expérience à l'autre.

Un nouvel appareil, le Rotofor de BioRad, qui permet la focalisation en milieu liquide offre une façon simple et reproductible de séparer les protéines selon leur point isoélectrique. Cet appareil comporte trois chambres ; aux deux extrémités, on retrouve les électrodes qui permettent de créer le champ électrique nécessaire à la migration des protéines présentes dans la chambre centrale de focalisation. Cette chambre possède

l'échantillon contenant les protéines que l'on veut séparer ainsi que les ampholytes nécessaires à l'établissement du gradient de pH qui permettra aux protéines de s'immobiliser à leur point isoélectrique. En effet, le point isoélectrique d'une protéine est le pH auquel sa charge est neutre. La chambre centrale est séparée en vingt compartiments, chacun ayant un pH différent. À l'aide de cet appareil, les protéines sont récupérées dans un milieu liquide ce qui permet de mesurer directement la valeur du pH à laquelle leur migration s'est arrêtée donc de déterminer leur pI.

Puisqu'il s'agissait d'un nouvel appareil, nous avons effectué quelques expériences pour vérifier la linéarité du gradient de pH et la fiabilité de la séparation isoélectrique en utilisant des marqueurs de points isoélectriques connus. Premièrement, ces standards, visibles en solution à cause de leur coloration distincte, étaient présents dans les fractions ayant un pH correspondant à leur point isoélectrique (résultats non-montrés). Dans un autre essai de focalisation, l'albumine de sérum de bœuf (BSA) a été retrouvée, après la migration, majoritairement dans les fractions de pH de 4.75 à 4.9 donc dans la région correspondant à son pI (non montré). Cette expérience avec le BSA nous a également démontré que le Rotofor permet une bonne reproductibilité des résultats puisqu'en plus de démontrer une constance dans la linéarité du pH, il permet de retrouver le BSA dans les mêmes fractions à chaque essai. Finalement, comme dernier contrôle, nous avons focalisé un échantillon contenant du BSA

cationique. Par focalisation sur gel d'agarose, le pI des molécules de BSA cationique s'étendait d'environ 6.5 à 8.5 alors que le BSA de départ se retrouve à environ 4.9 (non montré). Par focalisation en milieu liquide à l'aide du Rotofor, le BSA cationique se retrouve surtout dans les fractions de 6.1 à 9.0 donc dans les valeurs attendues de pI.

Ces essais ont tous été faits dans les paramètres spécifiés par le fabricant et dans les mêmes conditions que celles utilisées pour la focalisation des échantillons contenant l'antigène 11B10. Ces conditions comprennent la présence de 1% de détergent non-ionique, Triton X-114, nécessaire à la solubilisation des protéines membranaires, 1% d'ampholytes et 2% de glycérol qui permet, en combinaison avec les autres constituants, de réduire la précipitation des protéines à leur point isoélectrique. Le pH de départ des échantillons était neutre avant les focalisations. De plus, toutes les focalisations ont été arrêtées après que la différence de potentiel entre les deux électrodes ait été constante pendant 30 minutes donc après 2.5 à 3 hres de focalisation.

Les contrôles étant faits, on a focalisé un échantillon contenant les protéines éluées de la colonne de Con A donc, enrichi en antigène 11B10. Après la focalisation, nous avons mesuré le pH de chaque fraction pour vérifier la linéarité du pH. La figure 17 montre que le pH augmente de façon linéaire de la fraction 1 à la fraction 20. Ce graphique est semblable à tous ceux obtenus après chaque focalisation ce qui démontre une excellente reproductibilité.

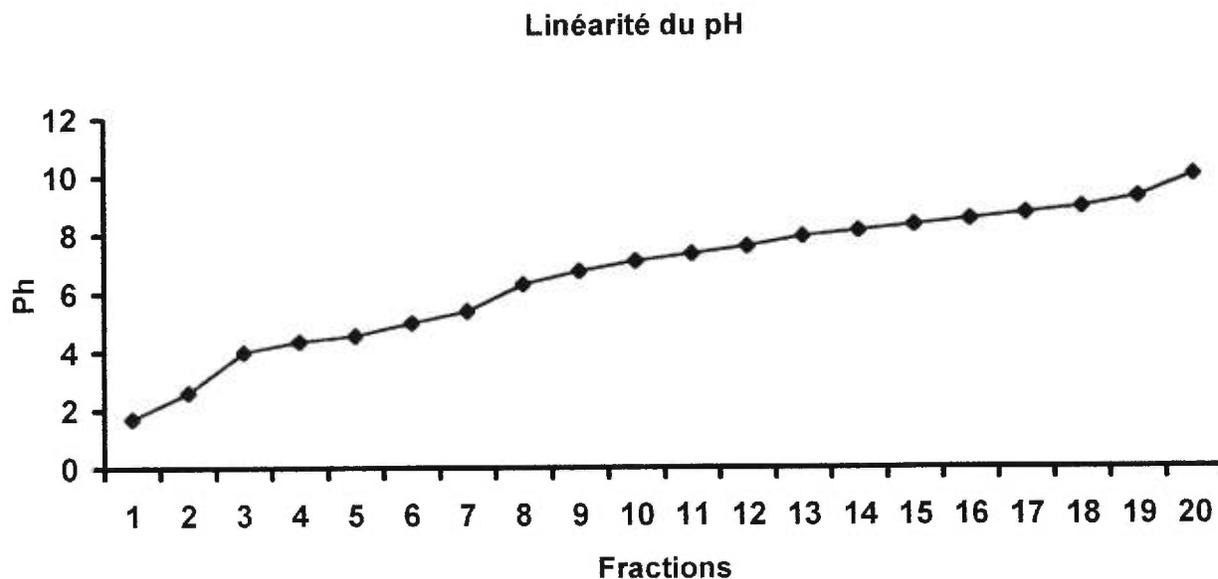


Fig. 17. Graphique démontrant la linéarité du pH des fractions 1 à 20 obtenue suite à la focalisation isoélectrique de la préparation éluée de la colonne de Concanavaline A.

La présence de la gp170 dans chaque fraction a été vérifiée par immunobuvardage avec l'anticorps 11B10. Celui-ci montre l'antigène uniquement dans les fractions 6 et 7 (surtout 6) correspondant à un point isoélectrique de 5.0 et 5.4 respectivement (Fig.6).

Pour comparer le pI de l'antigène 11B10 et celui de l'ECA, nous avons répété l'immunobuvardage sur la même membrane avec l'anti-ECA de lapin (Mab α ECA C-ter). La membrane a préalablement été lavée avec une solution de glycine-HCl, pH de 2.5 pour enlever les anticorps liés aux protéines sur la membrane. Pour s'assurer de

l'efficacité du lavage, nous avons incubé la membrane avec le 2^o anticorps anti-souris et refait le développement par chimiluminescence (ECL). Le développement a démontré que le lavage de la membrane a permis d'enlever les anticorps. Ensuite, nous avons refait l'immunobuvardage en utilisant l'anti-ECA connu. On retrouve le marquage dans les fractions 6 et 7, identique au marquage obtenu avec le 11B10 (Fig.18). Ceci respecte les données de la littérature sur le pI de l'ECA (entre 4.6 et 4.9).

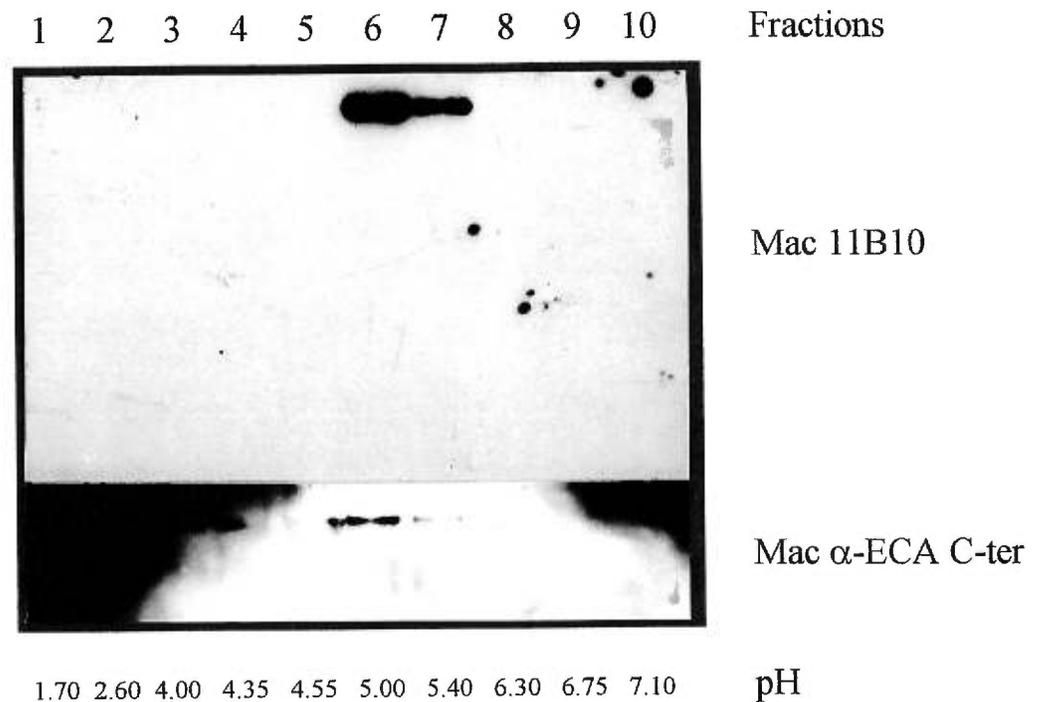


Fig. 18. Points isoélectrique de la gp170 détectée avec l'anticorps 11B10 et de l'ECA détectée avec l'anti-ECA de lapin (Mac α ECA C-ter).

4.3.3.Présence de l'antigène 11B10 dans plusieurs tissus

L'enzyme de conversion de l'angiotensine est une enzyme distribuée dans plusieurs tissus. Toutefois, lors des essais préliminaires, nous n'avons pas obtenu de résultats en ce sens en utilisant notre anticorps 11B10 en immunofluorescence. Nous avons donc utilisé la technique d'immunobuvardage pour démontrer la présence de l'antigène 11B10 dans certains tissus où l'expression de l'ECA a été démontrée.

Il a été démontré que l'activité spécifique de l'ECA était beaucoup plus grande dans le plexus choroïde que dans le poumon. Nous avons comparé la présence de l'antigène 11B10 et celle de l'ECA dans ces deux tissus par immunobuvardage avec les deux anticorps spécifiques (l'anticorps 11B10 et l'anti-ECA de lapin). Le marquage obtenu avec l'anticorps 11B10 est plus spécifique que celui de l'anticorps anti-ECA de lapin. En plus d'être au bon poids moléculaire, le marquage respecte la littérature concernant les différences d'expression de l'ECA entre les deux tissus (Fig. 19).

Nous avons vérifié la présence de l'antigène 11B10 dans certains tissus où l'ECA est exprimée. La figure 20 montre les marquages obtenus avec le 11B10 sur les homogénats de poumons, rein, cœur, testicule, plexus choroïde et muqueuse intestinale. Le marquage dans le plexus choroïde a une densité optique 2 fois plus grande que celui dans l'homogénat de poumon alors que dans la muqueuse intestinale la densité de marquage est 2 fois plus faible que dans le poumon.

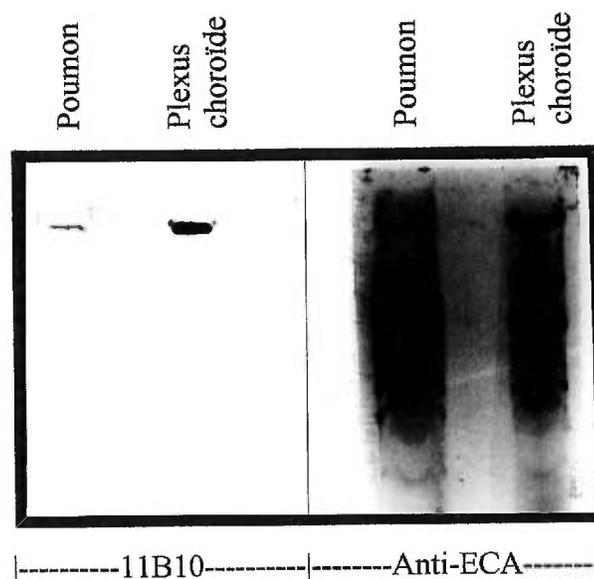


Fig. 19. Comparaison des marquages obtenus par immunobuvardage sur des préparations d'homogénats de poumon et de plexus choroïde avec l'anticorps 11B10 et l'anti-ECA connu (Mac α -ECA C-ter).

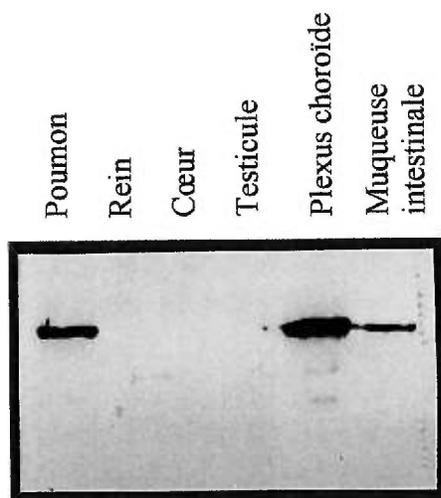


Fig. 20. Immunobuvardage avec l'anticorps 11B10 sur des préparations contenant $40\mu\text{g}$ de protéines provenant d'homogénats de différents tissus.

Les marquages, présentés aux figures 19 et 20, reflètent ce qu'on retrouve dans la littérature. Par contre, l'absence de marquage pour les autres tissus peut s'expliquer par une quantité plus faible d'ECA dans ces tissus et une concentration trop faible d'anticorps pour permettre la détection de l'enzyme présent dans ceux-ci.

En combinant les résultats obtenus à l'aide de l'analyse des acides aminés de trois fragments provenant de notre préparation d'antigène 11B10 purifié et les résultats présentés dans cette section, qui comparent les marquages obtenus avec notre anticorps 11B10 et de deux anti-ECA connus, les points isoélectriques de notre antigène et celui de l'ECA, nous avons la certitude que l'anticorps monoclonal 11B10 est spécifique à l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA).

4.4.L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA)

Les travaux réalisés jusqu'à présent ont permis d'identifier l'antigène gp170 comme étant l'ECA. Cette première étape du travail étant faite, on a regardé dans la littérature pour réunir les informations connues sur cette enzyme. La présente section résume les principales caractéristiques de l'enzyme de conversion de l'angiotensine.

L'ECA est une enzyme très importante pour son rôle sur le métabolisme de plusieurs agents vasoactifs. En effet, elle permet, entre autre, l'inactivation de la

bradykinine, un agent vasodépresseur, et la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II, un puissant vasopresseur. L'ECA (aussi appelée Kininase II) est une peptidyl-dipeptide-carboxyhydrolase puisqu'elle hydrolyse le dipeptide histidine-leucine de l'extrémité C-terminale. C'est aussi une métalloprotéase qui nécessite la présence de zinc pour être active et est inhibée par la présence d'agent chelateur comme l'EDTA.

Elle a été isolée et identifiée en 1954 à partir du plasma de cheval (73). Des travaux réalisés en 1967 et 1968 ont démontré que le métabolisme des agents vasoactifs avait lieu majoritairement dans les poumons (74, 75). En 1972, une enzyme capable d'un tel métabolisme a été isolée à partir d'un homogénat de poumon. Cette enzyme, capable d'hydrolyser les substrats circulants, s'est révélée avoir les mêmes caractéristiques que l'enzyme de conversion de l'angiotensine plasmatique déjà connue (76). Par la suite, des techniques d'immunocytochimie pré-enrobage et d'immunofluorescence ont localisé l'enzyme à la surface luminale des cellules endothéliales pulmonaires (77,78).

Depuis, des essais enzymatiques ont démontré que l'ECA était une enzyme largement distribuée dans l'organisme (79,80). D'ailleurs, elle a été isolée à partir des homogénats de plusieurs organes dont le rein, le cerveau, la muqueuse intestinale et les testicules. Il y a deux isoformes de l'enzyme de conversion de l'angiotensine : le type somatique et le type testiculaire.

Le premier est présent dans l'endothélium de plusieurs tissus. Il s'agit d'un monomère de 130 000 à 180 000 Da selon le tissu. Cette différence est due à une importante hétérogénéité de la glycosylation de l'enzyme selon son site d'expression (56). Elle est fortement glycosylée principalement, mais pas exclusivement, de façon N-liée. La glycosylation est spécifique à l'espèce. Par exemple, la séquence de l'ECA humaine somatique montre 17 sites potentiels de glycosylation alors que l'ECA de poumon de rat en offre 14 (fig.15). Malgré le fait qu'aucune préparation n'a montré une glycosylation de tous les sites, il a été démontré que la glycosylation de tous n'était pas nécessaire pour l'activité de l'enzyme. Selon le tissu, certains sites sont glycosylés et d'autres pas. Cette différence de glycosylation est responsable de la différence des propriétés physiologiques, immunologiques et catalytiques de l'ECA des différents tissus. De plus, l'ECA somatique possède deux larges domaines homologues, chacun possédant un site catalytique (81). Les deux domaines représentent environ la moitié du monomère.

Contrairement à la précédente, la forme testiculaire a un poids moléculaire d'environ 100 000 Da. Le séquençage de l'ADNc testiculaire a montré que sa séquence d'acides aminés est la moitié de celle de l'enzyme somatique. Elle a aussi une homologie d'environ 90% avec la portion C-terminale de cette dernière. Elle n'a qu'un seul site catalytique qui est situé près du centre de la molécule. Il semble que le gène

de la forme somatique provient de la duplication du gène ancestral responsable de la forme testiculaire(82). Cette dernière n'apparaît qu'à la puberté alors que la forme somatique apparaît très tôt dans le développement embryonnaire.

La forme testiculaire se retrouve uniquement dans les cellules germinales des tubules séminifères des testicules. Plus précisément, elle se trouve localisée exclusivement dans la couche centrale. Cette couche correspond au stade le plus avancé de la spermatogenèse, c'est-à-dire au stade des spermatides et des spermatozoïdes. La localisation exacte de l'ECA dans les spermatozoïdes semble être la membrane plasmique uniquement alors qu'on la retrouve dans le cytoplasme, au niveau de l'appareil de Golgi et de l'acrosome (un dérivé de l'appareil de Golgi), et dans la membrane plasmique des spermatides. La densité d'ECA dans les spermatides semble être beaucoup plus élevée que dans les spermatozoïdes ce qui montre une expression différentielle de l'ECA durant la spermatogenèse et suggère ainsi un contrôle de l'expression locale d'ECA par les hormones androgènes ou par le facteur de libération de l'hormone lutéinisante (LH-RH) sécrétée par l'hypothalamus (83).

L'isoforme somatique de l'enzyme se trouve particulièrement dans les cellules endothéliales des capillaires d'un grand nombre de tissus dont, le rein, la muqueuse intestinale, l'épididyme, les testicules, le poumon et dans bien d'autres tissus, mais en concentration plus faible. Cependant, bien que l'ECA ait été longtemps considérée

comme un marqueur spécifique des cellules endothéliales, il apparaît maintenant que l'ECA se retrouve de façon importante sur les membranes des cellules épithéliales où se fait une absorption importante. Les entérocytes du duodénum ou du jéjunum de l'intestin grêle, la membrane en bordure en brosse des cellules épithéliales des tubules contournés proximaux rénaux et les cellules épithéliales de l'épididyme seraient riches en ECA (83). Certains groupes ont marqué des monocytes, des macrophages et des lymphocytes avec des anticorps anti-ECA. Le rôle de l'ECA des cellules immunitaires et épithéliales n'est pas clair pour le moment. Certaines hypothèses ont été avancées afin d'expliquer la présence de l'enzyme dans ces types cellulaires. Dans les cellules immunitaires, l'enzyme pourrait être impliquée dans la diapédèse permettant aux cellules phagocytaires de traverser la paroi endothéliale (76). Dans les cellules épithéliales de l'intestin et des tubules rénaux, l'enzyme serait impliquée dans la réabsorption de molécules et d'eau de la lumière des tubules vers le tissu (76).

L'ECA se distribue également dans plusieurs régions du cerveau. D'abord, elle se trouve en très grande concentration à la membrane luminale (surface ventriculaire) des cellules épithéliales du plexus choroïde (84). De manière surprenante, il n'y a pas d'enzyme de conversion dans les cellules endothéliales de ce tissu. Par contre, dans les autres régions du cerveau où elle se trouve, dont la neurohypophyse, l'adénohypophyse, et l'hypothalamus, elle est exprimée dans les membranes des cellules endothéliales.

L'activité spécifique du plexus choroïde pour l'ECA est environ 500 fois plus grande que dans toutes les autres régions du cerveau. Elle est également plus concentrée dans le plexus choroïde que dans les poumons (de 5 à 50 fois selon les préparations). Le rôle de l'ECA dans le cerveau est sujet à spéculation. On présume qu'elle doit jouer le même rôle que dans les autres tissus soit de contrôler le tonus vasculaire. Cependant, même si l'angiotensinogène est très abondant dans le liquide céphalo-rachidien, la concentration d'angiotensine I et II y est très faible. Il est donc probable que l'ECA du cerveau joue également un rôle majeur dans le métabolisme d'autres molécules comme par exemple la substance P, important médiateur des messages nociceptifs (1), la substance K et la LH-RH. Il a été démontré qu'elle avait un rôle dans l'inactivation des opiacés ou enképhalines(85). Dans bien des cas, dont la substance P (86) et la LH-RH, les substrats de l'ECA peuvent agir aussi comme inhibiteurs rétroactifs de l'enzyme.

J'ai mentionné précédemment que depuis plusieurs années, certains groupes ont démontré que l'enzyme de conversion de l'angiotensine pulmonaire était localisée à la surface luminale des cellules endothéliales. L'image de la localisation de l'enzyme, obtenue suite à des techniques d'immunocytochimie pré-enrobage et d'immunofluorescence, comme celle que nous avons effectué avec l'anticorps 11B10 (Fig.21), est toujours acceptée et reconnue dans le monde scientifique.

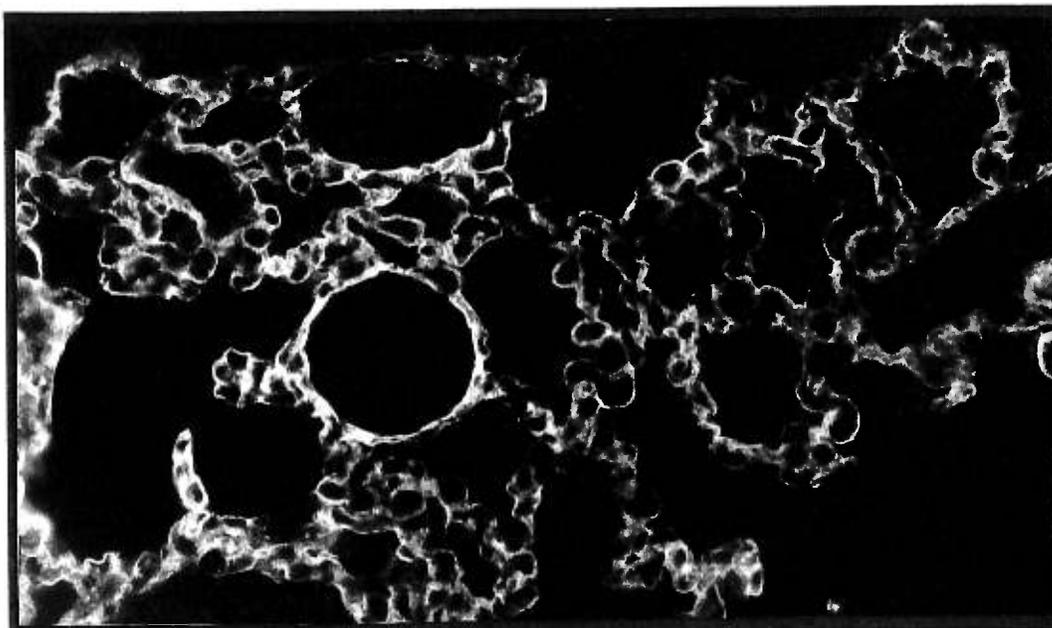


Fig. 21. Immunofluorescence avec l'anticorps 11B10 sur des coupes de poumon, fait au cryostat, montrant l'ECA localisée dans l'endothélium. Détails de la technique d'immunofluorescence à l'annexe B.

Dans la première portion de ce travail, nous avons démontré que ce nouvel anticorps reconnaissait de façon très spécifique et avec une haute affinité l'enzyme de conversion de l'angiotensine. Ceci étant fait, nous avons utilisé le potentiel de cet anticorps pour vérifier si l'enzyme était localisée uniquement à la surface luminale des cellules endothéliales dans les poumons de rat. Les résultats obtenus avec cet anticorps sont appuyés à l'aide de trois approches analytiques très différentes : essais enzymatiques, immunobuvardage et immunocytochimie post-enrobage. Les résultats de cette étude sont présentés à la prochaine section.

4.5. Étude biochimique et immunocytochimique sur la localisation et la distribution de l'enzyme de conversion de l'angiotensine dans le poumon de rat

4.5.1. La purification des membranes lumineales est à la base de l'étude

La possibilité de séparer un homogénat de poumon en deux fractions distinctes à l'aide de la perfusion, directement dans le poumon, d'une solution de silice colloïdale cationique est l'élément important de cette étude. La technique est la même que celle utilisée pour la production des anticorps présentée et illustrée à la figure 2 de la section 1.4. Lors de la perfusion, la silice adhère fortement à la surface lumineale de l'endothélium ce qui permet de séparer la fraction P₂, contenant uniquement les membranes lumineales endothéliales purifiées, du "Reste" du tissu pulmonaire. La figure 22 montre le schéma de la stratégie utilisée pour l'obtention des fractions.

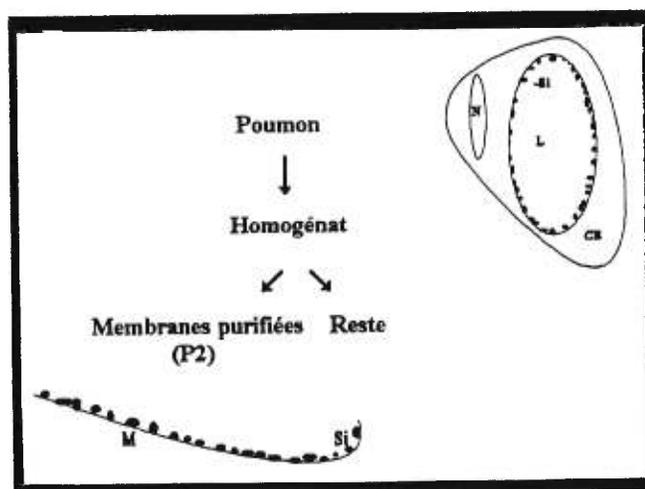


Fig. 22. Schéma de l'obtention des fractions P₂ et "Reste" à partir de l'homogénat de poumon.

4.5.2. Morphométrie et rendement de la technique de purification des membranes lumineuses

Afin d'estimer le pourcentage de récupération des membranes lumineuses pulmonaires, nous avons fait une étude morphométrique destinée à mesurer en microscopie électronique la surface lumineuse associée à la silice. Pour cette étude, nous avons perfusé trois rats avec la silice cationique. Pour chaque rat, nous avons préparé trois grilles avec des coupes fines de poumon. Sur chacune des grilles, trois champs aléatoires, comme celui de la figure 23, ont été examinés de façon à avoir une surface totale de membranes lumineuses endothéliales d'au moins 2mm par rat. À l'aide d'un programme informatique développé par M. Michel Lauzon, Technicien en microscopie électronique pour le Département de pathologie et biologie cellulaire, nous avons mesuré directement sur le moniteur les surfaces de membranes lumineuses associées et non associées avec la silice. Les résultats de cette étude morphométrique, présentés dans le tableau III, nous indiquent qu'environ 90% de la longueur totale de surface lumineuse examinée est liée à la silice. À l'aide de cette technique, la fraction P₂ contient au moins 90% des membranes lumineuses endothéliales du poumon. Par conséquent, la fraction "Reste" est ainsi dépourvue de pratiquement toute la totalité des membranes lumineuses.

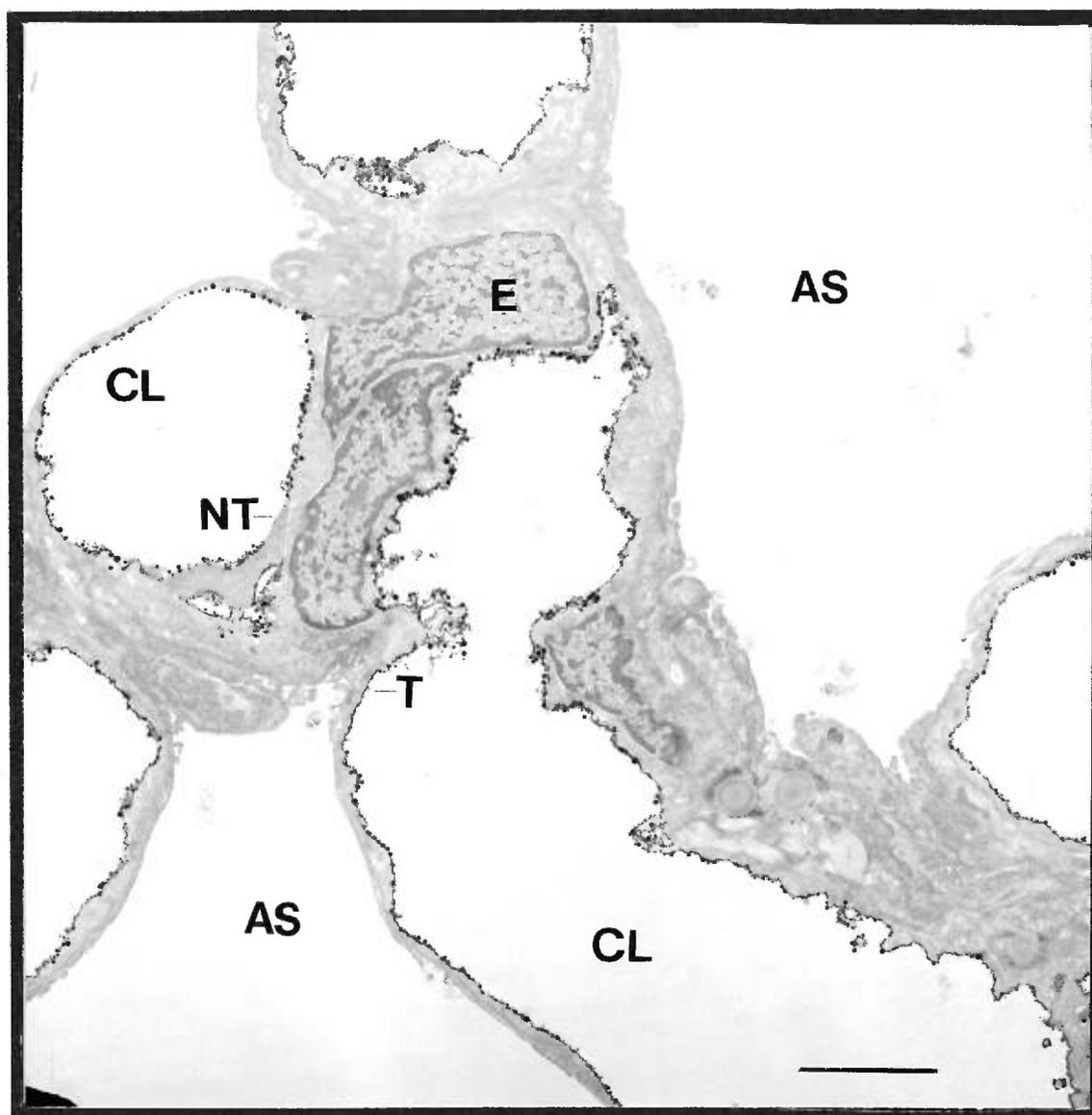


Fig. 23. Morphométrie. Poumon de rat perfusé avec la silice. AS : espace alvéolaire ; CL ; lumière des capillaires ; E : endothélium ; T surface tapissée par la silice ; NT : surface non-tapissée par la silice. X 9441, barre 2.0 μ m.

Tableau III
Surface de l'endothélium marquée par la silice cationique

	Nb de Profils vasculaires	Surface totale examinée (µm)	Surface totale marquée (%)
Rat 1	44	2022.50	89.97
Rat 2	43	2056.14	88.48
Rat 3	62	2153.67	90.36
Total	149	6232.31	89.60 ± 0.99

4.5.3. Essais enzymatiques

La première approche pour l'étude de la localisation de l'enzyme de conversion de l'angiotensine pulmonaire que nous avons faite a été de mesurer l'activité spécifique de l'ECA dans chaque fraction. Les essais enzymatiques se font en utilisant le substrat tripeptidique, Hippuryl-Histidine-Leucine (HHL), selon la méthode mise au point en 1970 par Cushman et Cheung (79,80). Le substrat, dissout dans un tampon potassium phosphate salin à pH=8.3, est incubé avec différents volumes de chaque échantillon. L'incubation se fait à 37°C pendant 30min. sous une agitation constante. Pendant l'incubation, le substrat est hydrolysé de façon spécifique par l'enzyme de conversion de l'angiotensine présent dans l'échantillon ce qui permet la libération de l'acide hippurique. La réaction est arrêtée par l'ajout de HCl qui inactive l'enzyme. L'acide hippurique libéré est ensuite séparé du substrat qui n'a pas réagi à l'aide d'une

extraction par l'acétate d'éthyl. Selon Cushman, l'acétate d'éthyl solubilise plus de 90% de l'acide hippurique alors que moins de 1% du substrat HHL est extrait. Après l'évaporation de l'acétate et la solubilisation de l'acide dans l'eau, la concentration d'acide hippurique libérée est mesurée par densité optique à 228nm. La concentration d'acide libérée est proportionnelle à l'activité enzymatique lorsque les conditions optimales sont utilisées, 1U d'ECA correspond à 1µmole d'acide hippurique libérée à partir du substrat HHL par minute à 37°C. Pour convertir la densité optique en unité enzymatique, la formule suivante doit être appliquée :

$$[(D.O._{228} - D.O._{228} \text{ contrôle}) \times 5.6] / \text{quantité de protéines dans l'essai} = \text{mU}/\mu\text{g}$$

où A_{228} contrôle est un essai dans lequel le HCl a été ajouté avant l'échantillon analysé, la valeur 5.6 est un facteur de conversion qui tient compte du rendement de l'extraction en acétate d'éthyl et des volumes utilisés. La division par la quantité de protéines présentes dans l'essai permet d'obtenir l'activité spécifique de l'ECA dans l'échantillon.

Avant de mesurer les activités spécifiques des différentes fractions, nous avons effectué quelques contrôles pour s'assurer de la validité des résultats. Nous avons d'abord vérifié si la présence du sang avait une influence sur l'activité enzymatique du poumon. Pour ce faire, on a mesuré et comparé les activités spécifiques d'homogénats de poumons perfusés avec seulement du PBS via l'aorte abdominale, pour enlever le sang, et d'homogénats de poumons non-perfusés, donc en présence du sang. Les

résultats présentés dans le tableau IV montrent que l'activité spécifique en présence du sang est un peu plus faible que celle en absence de sang. Ceci est dû à la présence des protéines sériques qui augmentent la concentration en protéines, mais ne contribue pas à l'activité.

Le second contrôle, le plus important pour l'étude, a été fait pour vérifier l'influence de la présence de la silice à la surface luminale endothéliale. En comparant les activités spécifiques des homogénats de poumons perfusés avec ou sans silice (Tableau IV), on observe qu'il n'y a pas de différences significatives entre leur activité spécifique. Donc, la présence de la silice à la surface luminale ne nuit pas à l'activité de l'enzyme de conversion pulmonaire, ni au contact avec son substrat et son hydrolyse.

Ensuite, comme dernier contrôle, nous avons voulu démontrer que les activités spécifiques mesurées étaient attribuables à l'ECA et non à un mélange de l'activité de plusieurs enzymes capables d'hydrolyser le substrat. Nous avons utilisé un agent reconnu pour être un bloqueur très spécifique de l'ECA (87), le lisinopril, dont l'utilisation inhibe 90% de l'activité enzymatique de l'homogénat de poumon (Tableau IV). On a ainsi l'assurance que les activités mesurées ne sont pas surévaluées à cause de l'activité d'une autre enzyme.

De plus, des essais enzymatiques en présence de notre anticorps 11B10 ont montré que ce dernier n'inhibe pas l'activité de l'ECA. En effet, 100µl de la solution

contenant 2.4mg/ml d'anticorps 11B10 a été incubée avec 20µl d'homogénat ayant une concentration de 6.544mg/ml pendant une heure à 4°C avant l'essai enzymatique. Les résultats de cet essai enzymatique sont comparés avec ceux obtenus avec 20µl d'homogénat incubés avec 100µl de tampon 50mM Potassium Phosphate pH de 8.3. Les résultats des deux essais enzymatiques sont identiques ce qui démontre que notre anticorps n'inhibe pas l'activité de l'ECA (résultats non présentés).

La comparaison des activités spécifiques des trois fractions, homogénat avec silice, la fraction P₂ contenant les membranes lumineales endothéliales purifiées et la fraction "Reste", nous révèle que la valeur de l'activité spécifique de la fraction des membranes lumineales purifiées est 2 fois plus grande que celles de l'homogénat et de la fraction "Reste" (Tableau IV). Ceci démontre un enrichissement de l'enzyme à la surface lumineale ce qui est en accord avec la localisation lumineale de l'ECA démontrée par plusieurs groupes. Cependant, il faut tenir compte du fait que moins de 3% des protéines de l'homogénat sont récupérées dans la fraction lumineale et près de 90% dans la seconde fraction, pour mesurer l'activité totale de chaque fraction. De cette façon, on constate que moins de 5% de l'activité pulmonaire totale est associée à la surface lumineale. La grande majorité de l'activité totale du poumon (87%) est retrouvée dans la fraction dépourvue des membranes lumineales appelée "Reste".

Tableau IV
Distribution de l'ECA dans le poumon de rat
déterminée par l'activité enzymatique

	Protéines totales (mg)	Activité spécifique (mU/mg)	Activité totale (U)	Inhibition par Lysinopril (%)
Poumon non-perfusé (Hom)	85.18 ± 3.12	107.16 ± 16.40	9.13 ± 0.05	—
Poumon perfusé sans silice (Hom)	78.29 ± 2.24	117.41 ± 15.33	9.19 ± 0.03	—
Poumon perfusé avec silice (Hom)	76.04 ± 1.26 (100%)	114.80 ± 24.21	8.73 ± 0.03 (100%)	90%
Reste	65.97 ± 2.99 (87%)	115.10 ± 31.64	7.59 ± 0.09 (87%)	—
P₂	1.89 ± 0.27 (2.5%)	201.47 ± 62.42	0.38 ± 0.02 (4.5%)	—

N=32

1U d'ECA = 1µmole d'acide hippurique libérée à partir du substrat
(Hip-His-Leu) par minute à 37°C

Toutefois, ces rapports d'activités totales, bien qu'ils puissent être une indication de la localisation de l'enzyme dans le poumon, peuvent être faussés par une activation de l'enzyme dépendante de sa localisation. Pour déterminer la localisation de l'enzyme, il faut évaluer la présence de l'ECA de façon à ne pas tenir compte de son état d'activation.

4.5.4. Immunobuvardage

Pour avoir la capacité de localiser l'enzyme de conversion de l'angiotensine, nous avons quantifié la présence des molécules d'ECA dans chaque fraction. Nous avons utilisé la technique d'immunobuvardage en utilisant notre anticorps anti-ECA le 11B10. Après les incubations avec les anticorps et la révélation des bandes par chimiluminescence, nous voulions mesurer l'intensité des bandes obtenues en utilisant un lecteur de densité optique. Toutefois, avant d'utiliser cette approche pour comparer les quantités d'enzymes entre les différentes fractions, nous avons dû s'assurer de la linéarité de la relation entre la densité optique et la quantité d'enzyme de conversion présente.

Pour ce faire, des quantités croissantes d'homogénat de poumon ont été mises sur gels, transférées sur une membrane et incubées avec l'anticorps 11B10. Par la suite, nous avons mesuré l'intensité des bandes à l'aide d'un lecteur de densité optique. Les résultats démontrent que la densité optique est linéaire en fonction de la quantité de matériel mise sur le gel (Fig.24). Le temps d'exposition qui nous offre la meilleure linéarité de développement des bandes par ECL est de 1minute (avec un 2^e anticorps dilué 1/20 000).

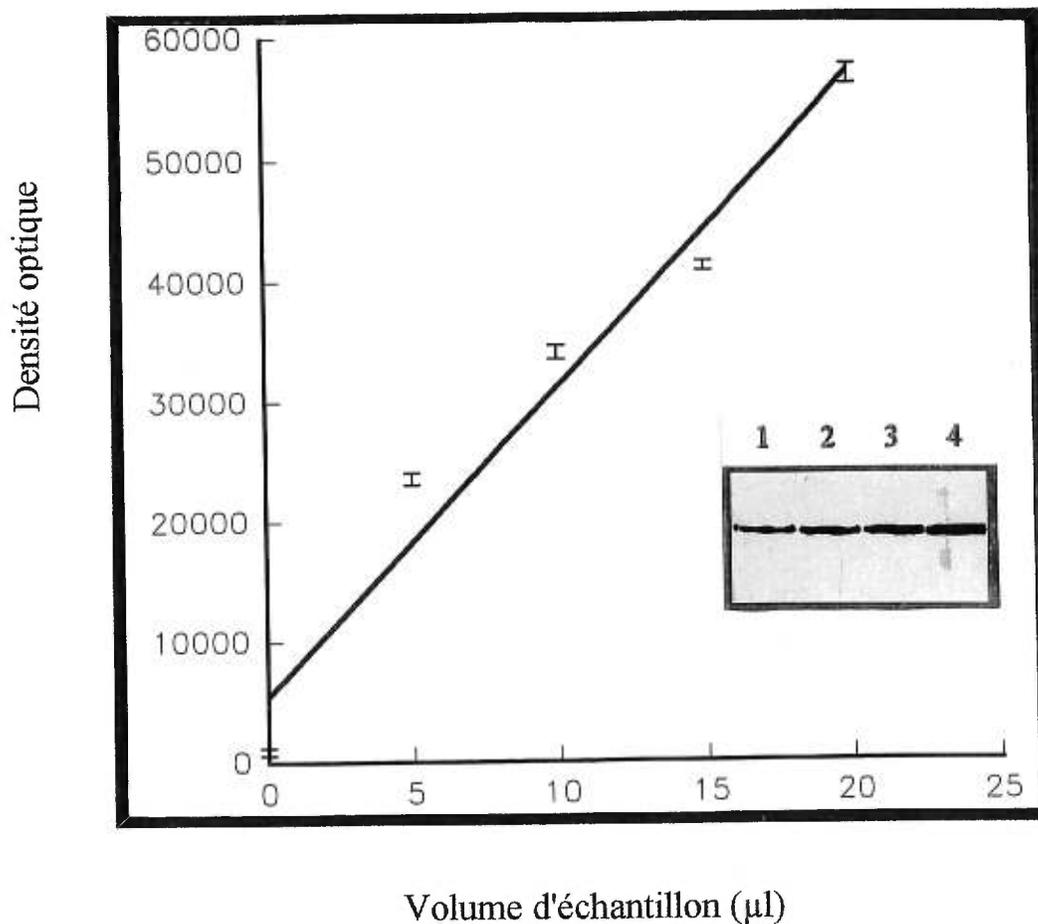


Fig. 24. Graphique linéaire entre la densité optique et la quantité de matériel mis sur gel d'acrylamide.

À l'aide de ce graphique, nous avons eu l'assurance de pouvoir comparer de façon quantitative la présence de l'ECA dans chaque fraction en se basant sur la densité optique. Le tableau V donne les valeurs des densités optiques obtenues suite à l'immunobuvardage effectué en utilisant deux approches différentes. Les bandes dont l'intensité a été mesurée sont montrées à la figure 25. La première approche d'immunobuvardage a été faite en utilisant la même quantité de protéines de chaque

fraction (35 μ g). Les résultats de cette approche sont présentés à la première ligne du tableau V et de la figure 25. Ces résultats reflètent la concentration d'enzyme dans chaque fraction. Ils nous indiquent que la concentration d'ECA dans la fraction luminale est de 3 à 4 fois plus grande que celle de l'homogénat et du reste du tissu pulmonaire. Ils démontrent que la surface luminale des cellules endothéliales pulmonaires permet l'enrichissement de l'enzyme de conversion de l'angiotensine.

Cependant, la seconde approche permet de mesurer la quantité relative de molécules d'ECA dans chaque fraction en rapport avec la quantité totale d'ECA pulmonaire. Les résultats de cette approche se retrouvent à la deuxième ligne du tableau V et de la figure 25. Il s'agit d'une comparaison isovolumétrique dans laquelle les trois échantillons ont été amenés au même volume et un volume identique pour chacun a été mis sur le gel d'acrylamide. Cette approche, démontre que la quantité relative d'ECA dans la fraction P₂, contenant 90% des membranes lumineales totales du poumons est tellement faible que le signal est sous le seuil de détection. Contrairement à ce résultat, le même signal est retrouvé au niveau de l'homogénat et de la fraction dépourvue des membranes lumineales.

Tableau V
Distribution de l'ECA dans le poumon de rat
déterminée par immunobuvardage

	Homogénat	Reste	P₂
Même quantité de protéines (35µg)	14 790 ± 1 042	14 217 ± 1 125	49 129 ± 1 627
Isovolumentrique	8 383 ± 381	8 058 ± 351	_____

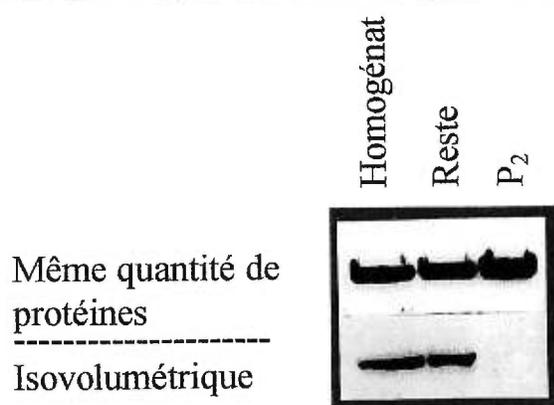


Fig. 25. Comparaison quantitative de la présence d'ECA dans chaque fraction selon une approche utilisant la même quantité de protéines ce qui reflète la concentration d'ECA dans chacune ou une approche isovolumentrique qui reflète la quantité de l'enzyme pulmonaire dans chaque fraction relativement à la quantité totale.

En combinaison avec les résultats des essais enzymatiques, ces résultats confirment que malgré un enrichissement important de l'enzyme à la surface luminale des cellules endothéliales pulmonaires, très peu est associée et active à ce site relativement à la quantité totale d'ECA dans les poumons. Cette conclusion nous

amène à nous poser maintenant la question de la localisation réelle de l'enzyme de conversion dans les poumons chez le rat.

4.5.5. Immunocytochimie post-enrobage

En vue de répondre à cette nouvelle question, nous avons tenté d'effectuer des essais d'immunocytochimie post enrobage en utilisant notre anticorps anti-ECA 11B10 conjugué à des nanoparticules d'or colloïdal et rendus visibles par une étape d'amplification à l'argent. L'avantage de la technique post-enrobage est de permettre à l'anticorps d'avoir accès aux sites antigéniques à la surface entière de la coupe. Les résultats de la technique d'incubations pré-enrobage sont influencés par la capacité des anticorps à pénétrer dans le tissu. Cette caractéristique peut expliquer l'absence de marquage dans le milieu interstitiel dans les études immunocytochimiques jusqu'à présent d'où la localisation présumée de l'enzyme aux membranes lumineales. C'est la première fois que la technique post-enrobage est utilisée pour localiser l'enzyme de conversion de l'angiotensine.

La figure 26 montre une coupe de poumon passant dans un septum alvéolaire. Cette coupe permet de voir deux alvéoles et un capillaire pulmonaire séparés par les parois alvéolaires. À ce grandissement, on peut observer un marquage dans les parois

alvéolaires et un marquage beaucoup plus dense dans le milieu interstitiel. À plus fort grossissement (Fig.27), on observe un marquage au niveau des membranes des cellules endothéliales (◀). Toutefois, le marquage est très faible en comparaison au marquage que l'on retrouve dans certaines régions du milieu interstitiel (*). Cependant, le marquage du milieu interstitiel est très hétérogène. La lame basale (★) est faiblement marquée alors que dans certaines régions, le marquage est très intense. Cette distribution hétérogène du marquage dans le milieu interstitiel peut être le reflet de la distribution hétérogène du liquide interstitiel ou d'une adsorption sélective d'ECA sur certains composants de la matrice extracellulaires. Il faut aussi noter un marquage au niveau de l'épithélium et une absence de marquage sur les fibroblastes.

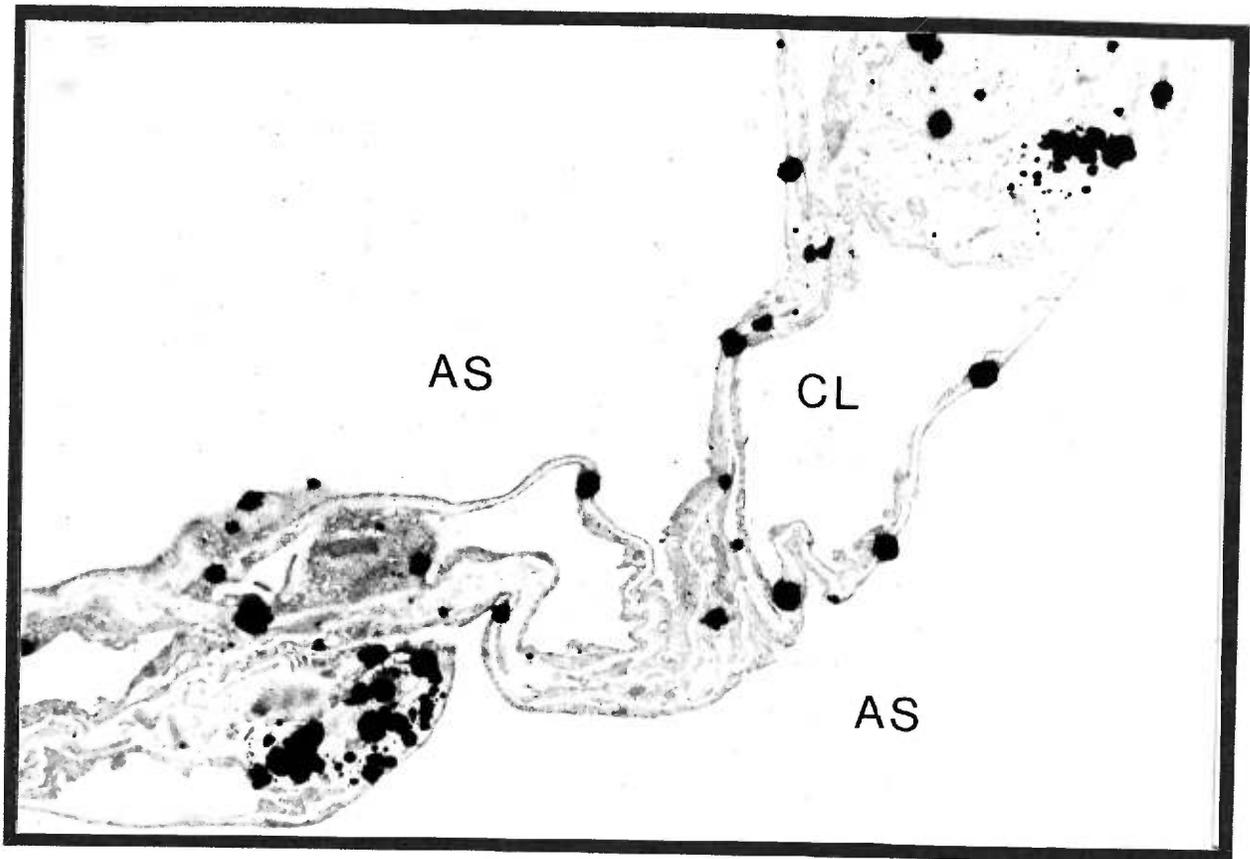


Fig. 26. Immunocytochimie post-enrobage d'une coupe de poumon avec des anticorps 11B10 conjugués à des nanoparticules d'or colloïdal et amplifiés à l'argent. Agrandissement permettant de voir le marquage au niveau des parois alvéolaires. Toutefois, ce dernier est moins dense que celui retrouvé dans le milieu interstitiel. AS : espace alvéolaire ; CL : lumière du capillaire pulmonaire.

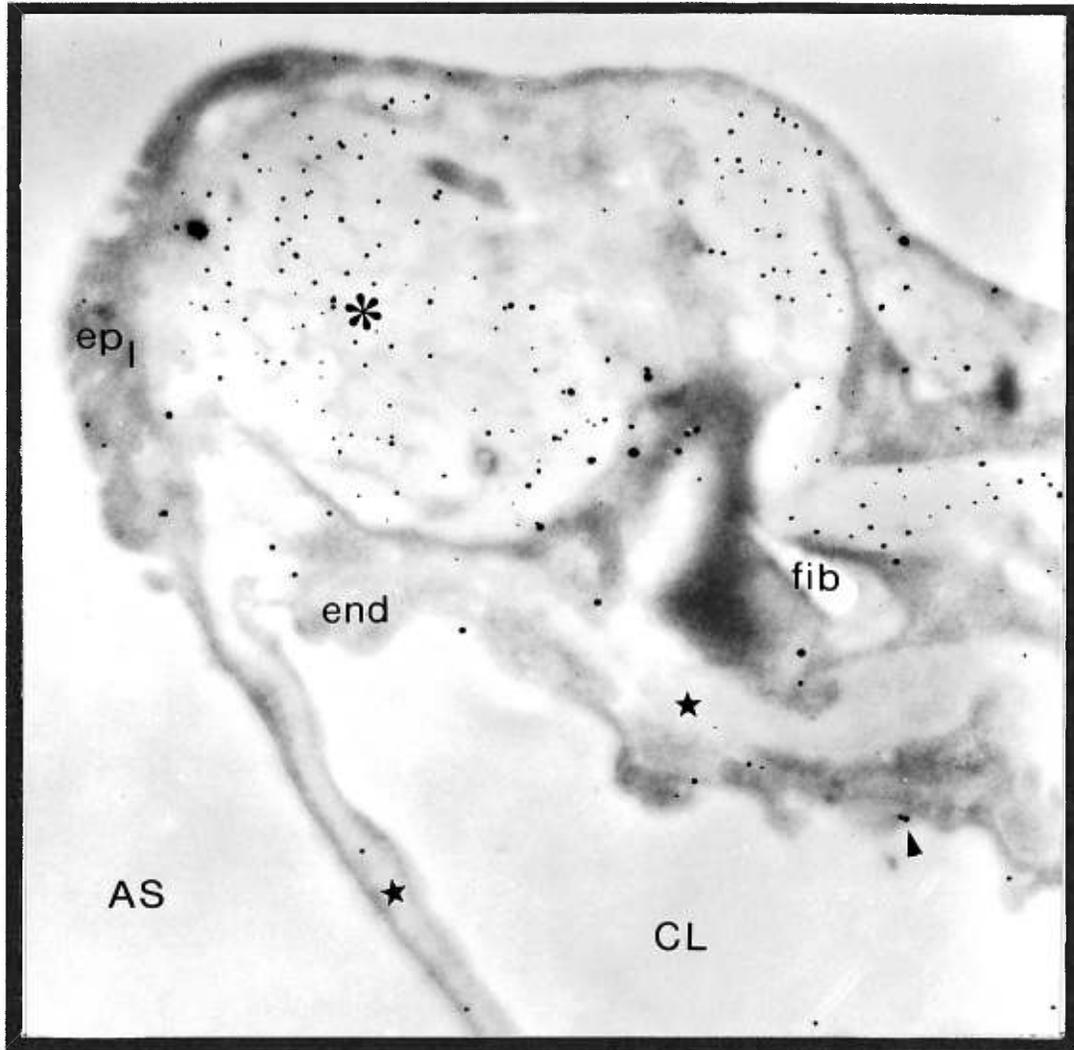


Fig. 27. Immunocytochimie post-enrobage sur une coupe de poumon avec des anticorps 11B10 conjugués à des nanoparticules d'or colloïdal et amplification à l'argent. Photo à plus fort grossissement permettant de voir le marquage spécifique des membranes endothéliales (▲). Marquage très important dans certaines régions du milieu interstitiel (*) et moins dans d'autres dont la lame basale (★). As : espace alvéolaire ; CL : lumière des capillaires pulmonaires ; end : endothélium (marqué) ; ep1 : épithélium de cellule pneumocytaire de type 1 (marqué) ; fib : fibroblaste (non marqués).

4.5.6. Distribution des formes hydrophile et membranaire de l'ECA dans le poumon de rat

La séquence et la structure de l'ECA de poumon de rat sont très bien connues (Fig.15). La molécule somatique possède un large domaine extracellulaire qui représente environ 96% de la molécule, un court segment de 17 acides aminés à caractère hydrophobe, qui permet l'insertion unique de l'enzyme dans la membrane plasmique, et un court segment cytoplasmique. En plus de cette forme membranaire, il est aussi connu qu'il existe une forme soluble de l'enzyme. Cette espèce d'ECA est retrouvée dans le plasma sanguin, dans le liquide céphalo-rachidien, le liquide séminal et dans l'urine.

La forme soluble de l'enzyme semble provenir de la forme membranaire (88). Il est connu que des protéines hydrolytiques, appelées sécrétases, coupent l'ECA membranaire à un site situé entre les acides aminés 1173-1174 (ECA humaine). La flèche (▼) à la figure 15 indique le site potentiel de coupure de l'ECA de rat par la sécrétase (23). Cette sécrétase est une métalloprotéase, sensible à la présence d'EDTA et colocalisée avec l'ECA dans plusieurs tissus. Elle est solidement associée aux membranes plasmiques. Elle est très active à des pH entre 8.0 et 8.5 (optimal à 8.3) et dans une température de 37°C (89,90,91).

Après avoir obtenu un marquage tellement important dans le milieu interstitiel,

nous avons voulu vérifier l'importance de ce métabolisme de l'ECA dans le poumon qui serait responsable de la sécrétion de l'enzyme dans le sang et aussi dans le milieu interstitiel. Nous avons donc comparé les quantités de la forme soluble et membranaire de l'enzyme dans un homogénat de poumon (Tableau VI et Figure 28). L'homogénat de poumon a été solubilisé d'abord dans un tampon 50mM carbonate pH = 11.2 pour extraire les protéines hydrophiles et faiblement associées aux membranes. Par la suite, nous avons extrait les protéines membranaires, du même échantillon, à l'aide d'un tampon HEPES en présence de 1% Triton X-100, un détergent non-ionique. Les deux extractions se sont faites sur glace pendant une heure avec des agitations mécaniques à toutes les dix minutes. Après chaque extraction, nous avons récupéré les protéines solubilisées dans le tampon par une centrifugation de 30 minutes à 100 000g. Les surnageants, extrait en carbonate et extrait en Triton, sont conservés et les culots resuspendus dans les tampons appropriés ou jetés après la dernière extraction. Enfin, les puits ont été chargés avec le même volume d'échantillon pour la détection par immunobuvardage isovolumétrique. L'extraction séquentielle permet de solubiliser la totalité de l'ECA pulmonaire puisque la solubilisation en SDS après celle en Triton ne montre pas la présence d'une quantité supplémentaire d'ECA (Fig.28).

Les lectures de la densité optique démontrent que la moitié de l'ECA pulmonaire est sous une forme hydrophile puisque solubilisée par le tampon aqueux. L'autre

moitié est membranaire puisqu'extraite seulement en présence de détergent et qu'une deuxième extraction en carbonate ne permet pas d'extraire cette forme d'ECA. Ces résultats sont obtenus si on utilise des tampons aqueux de pH ou de concentration ionique différente lors de l'extraction de la forme hydrophile. Des conditions plus douces d'homogénéisation montre la présence de l'enzyme dans la fraction carbonate.

Tableau VI
Distribution de la forme hydrophile et de la forme membranaire de l'ECA dans le poumon de rat

Échantillon	Homogénat	Carb1	Carb2	Triton	SDS
Densité optique	35 816 ± 1 865	22 242 ± 2 019	2 349 ± 899	22 274 ± 1 495	0

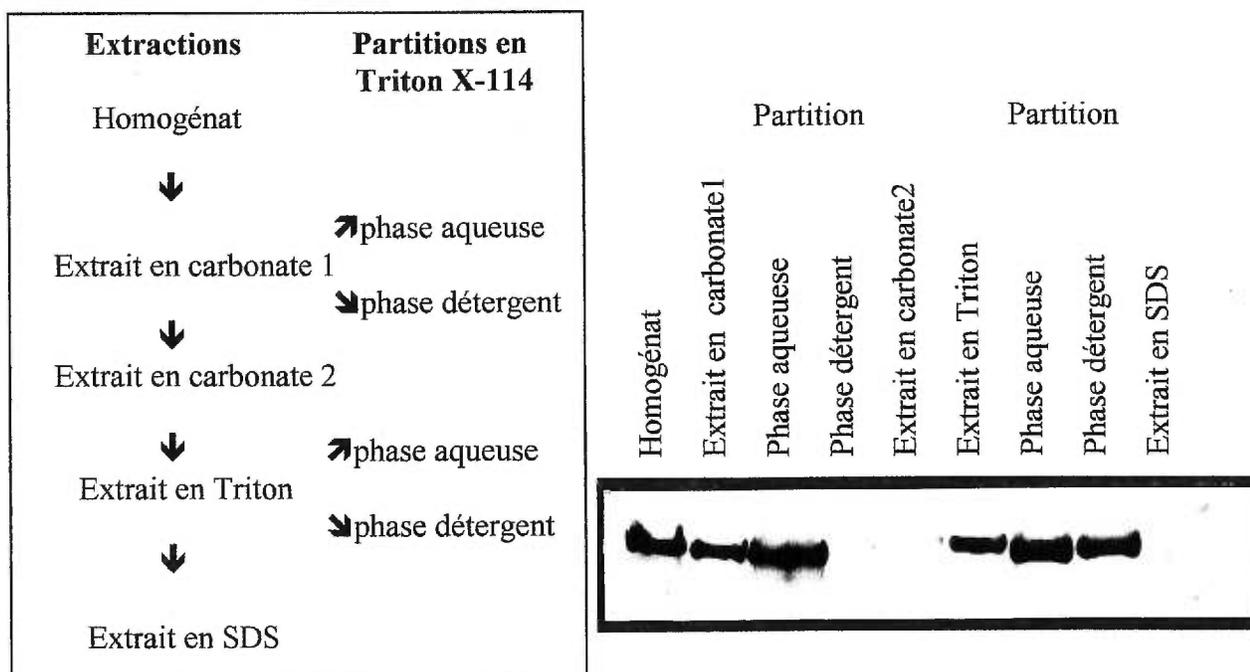


Fig. 28. Distribution des formes hydrophile et membranaire de l'ECA du poumon de rat et schéma de l'origine des fractions.

Enfin, une technique de partition en Triton X-114 qui permet de séparer les molécules d'un échantillon selon leur caractère hydrophile ou hydrophobe a été faite pour conclure cette étude de distribution. Le TX-114 a un point de condensation relativement bas ce qui permet aux protéines hydrophobes de précipiter au fond du tube sans être trop affectées par la haute température. Après un certain temps à 37°C, on obtient, par centrifugation à très faible vitesse, deux phases distinctes. La couche inférieure riche en détergent et la couche supérieure aqueuse. Les résultats (Fig.28) démontrent que l'ECA présente dans la fraction soluble en carbonate est réellement une protéine hydrophile puisqu'elle se retrouve uniquement dans la phase aqueuse. L'ECA de la fraction soluble en Triton se partage entre la phase aqueuse et la phase détergent. La présence de la forme membranaire dans la phase aqueuse est due au fait que plus de 95% de la molécule est hydrophile.

4.5.7. Importance du développement du nouvel anticorps anti-ECA 11B10 pour cette étude sur la localisation de l'ECA dans le poumon de rat

Cette étude sur la localisation de l'ECA a été permise grâce à la production de notre anticorps 11B10. En effet, plusieurs anticorps monoclonaux anti-ECA sont spécifiques à l'extrémité C-terminale de l'ECA membranaire. Or, cette portion de la protéine membranaire est absente de la forme hydrophile. De tels anticorps ne peuvent reconnaître la forme sécrétée de l'ECA. Comme le démontre la figure 29, l'anticorps

11B10 peut suivre la forme hydrophile de l'enzyme. Un gel d'acrylamide a été chargé avec des quantités isovolumétriques d'homogénat, d'extrait en carbonate, d'extrait en Triton et en SDS. Une portion de la membrane a été incubée avec le 11B10 et l'autre portion avec l'anticorps anti-ECA reconnu spécifique à l'extrémité C-terminale. Cette figure démontre que notre anticorps permet de constater qu'environ 50% de l'enzyme pulmonaire est hydrophile alors que 50% est sous forme membranaire. Par contre, l'anti-ECA C-ter, alors qu'il montre la même efficacité de marquage de la forme membranaire (dans l'extrait en Triton) que le 11B10 permet très peu de marquage dans la fraction soluble en carbonate.

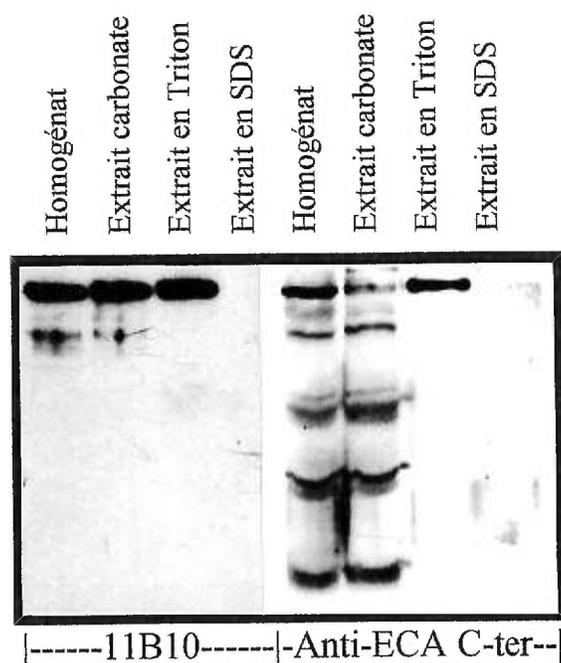


Fig. 29. Capacité de l'anticorps 11B10 de reconnaître l'ECA hydrophile. De cette façon, il peut suivre le métabolisme de l'enzyme contrairement aux anticorps spécifiques à son extrémité C-terminale absente de la forme hydrophile.

5. Discussion

Le choix de l'antigène pour réaliser ce travail s'est fait en fonction de la qualité de la réaction entre l'antigène et l'anticorps, c'est-à-dire en fonction de la haute spécificité et de l'intensité du signal obtenu lors de l'immunodétection. De plus, la gp170, reconnue par l'anticorps 11B10, était fortement exprimée dans le tissu pulmonaire du rat. En plus de facilité sa purification et son identification, l'expression importante de cette protéine dans les poumons de rat suscitait de la curiosité sur ses caractéristiques et les fonctions dont elle pouvait être responsable dans ce tissu. Enfin, les études préliminaires de caractérisation donnaient un caractère de nouveauté à cette protéine ce qui la rendait très attrayante pour notre projet.

Le corps de ce travail s'est déroulé en deux parties. D'abord, nous avons procédé à l'identification de l'antigène dans le but de vérifier la nouveauté de cette protéine endothéliale pulmonaire. Ensuite, la protéine a été caractérisée à l'aide de plusieurs approches afin de connaître ses caractéristiques biochimiques, son métabolisme et son site d'expression.

La première partie de ce travail, l'identification de la gp170, a nécessité deux étapes : sa purification et son séquençage. La purification de la protéine par la chromatographie d'affinité avec la lectine Concanavalline A immobilisée a été une

méthode simple, rapide, performante et reproductible. À cause du type de glycosylation de la gp170, riche en résidu mannose, la colonne avait une grande affinité pour notre antigène ce qui a permis la rétention quantitative de ce dernier. Ainsi, sa grande efficacité à retenir notre antigène a permis d'obtenir une préparation contenant suffisamment de matériel pour séquencer la protéine d'intérêt. Cependant, étant donné que la gp170 n'était pas la seule glycoprotéine mannosylée du poumon, la purification de la protéine a nécessité une étape supplémentaire de purification ; l'électrophorèse sur gel d'acrylamide en présence de SDS. Le fait que le poids moléculaire de l'antigène était élevé (170KDa) a facilité l'isolation de la glycoprotéine par électrophorèse puisque peu de protéines du poumon retenues par la colonne de Con A avaient un poids moléculaire voisin de celui de notre antigène. La bande correspondante à la gp170 a donc été coupée et envoyée pour être soumise aux différentes étapes visant l'identification de sa séquence d'acides aminés.

Le séquençage de la protéine a été fait par la digestion de l'extrémité N-terminale suivie de l'identification des acides aminés par chromatographie dans le cadre d'une collaboration avec le Dr John Leszyk de la Worcester Foundation For Biomedical Research à Shrewsbury au Massachusetts. Cette étape a permis de déterminer les séquences de trois fragments différents, obtenus suite à la digestion de la gp170 par la trypsine. La comparaison de la séquence de ces fragments et celles retrouvées dans les

banques de données nous a démontré que la gp170 était l'enzyme de conversion de l'angiotensine.

Toutefois, le profil de digestion par la trypsine de la gp170 montrait la présence de fragments différents de ceux attendus par la digestion de l'ECA par la trypsine. La différence dans le profil de digestion à la trypsine entre les deux protéines est sans doute due à la digestion de la gp170 par la trypsine sur des sites non-spécifiques. Pour confirmer l'identification de la gp170, des essais ont été effectués pour vérifier et comparer les caractéristiques physiques de l'antigène avec celles de l'ECA. Les marquages obtenus suite à l'utilisation d'anticorps anti-ECA reconnus étaient identiques à ceux obtenus avec notre anticorps tant au niveau du poids moléculaire qu'au niveau du point isoélectrique des deux protéines. Enfin, la présence des deux antigènes dans les mêmes tissus et dans les mêmes proportions a permis d'avoir l'assurance que l'anticorps développé dans notre laboratoire était spécifique à l'enzyme de conversion de l'angiotensine.

La seconde partie du travail, la caractérisation de l'enzyme de conversion de l'angiotensine a été faite dans le but de déterminer sa localisation dans le poumon de rat en utilisant le nouvel anticorps anti-ECA (11B10) comme outil. Ce travail a été rendu possible grâce aux avantages que nous a apportés la nouvelle technique de purification des membranes lumineales endothéliales. D'une part, la perfusion et

l'adhérence de la silice cationique aux surfaces lumineales endothéliales nous a permis d'obtenir une préparation très pure de membranes du front luminal sans la contamination de la part des autres éléments cellulaires et tissulaires. Cela nous a assuré que ce que nous retrouvions dans cette préparation appartenait à l'aspect luminal des membranes endothéliales des poumons de rat. Ensuite, l'étude morphométrique, basée sur la présence des particules de silice collées à la surface de la membrane lumineale de l'endothélium comme marqueur, nous a donné l'assurance que la fraction purifiée contenait la quasi-totalité de ce type membranaire (90% de rendement). De cette façon, la localisation de l'ECA dans les poumons de rat a pu être évaluée par la comparaison de la quantité d'ECA présentes dans la fraction contenant les membranes lumineales et dans la fraction dépourvue de celles-ci.

La présence de l'ECA dans les deux fractions a été déterminée par la mesure qualitative et quantitative de l'enzyme dans chacune. L'aspect qualitatif a été évalué par la mesure de l'activité spécifique de l'ECA associée à chaque fraction. Il est apparu que moins de 5% de l'activité totale pulmonaire d'ECA était associée au front luminal et ce, malgré une activité spécifique deux fois supérieure dans cette fraction comparée à l'activité spécifique retrouvée dans l'homogénat de poumon et dans la fraction dépourvue des membranes lumineales.

Les résultats obtenus par la mesure de l'activité spécifique de l'ECA ont été

appuyés par la mesure quantitative du nombre relatif de molécules d'ECA dans les deux fractions. La quantification a été possible grâce à la détermination, par la mesure de la densité optique, de l'intensité des marquages obtenus par immunobuvardage avec notre anticorps anti-ECA sur des extraits provenant des deux fractions. Ces essais d'immunobuvardage ont démontré que malgré un enrichissement important de l'enzyme à la surface luminale de l'endothélium pulmonaire, une très faible proportion de l'ECA totale du poumon se trouve à cet endroit. Ainsi, la très grande proportion de l'enzyme pulmonaire (95%) se retrouve ailleurs dans le poumon, dans la fraction dépourvue des membranes lumineales endothéliales.

Afin de déterminer le site prédominant de la localisation de l'ECA pulmonaire, une étude en immunocytochimie post-enrobage avec l'utilisation de notre anticorps anti-ECA (11B10) conjugué aux nanoparticules d'or colloïdal a été faite. Cette approche a permis de constater que le marquage prédominant est retrouvé dans le milieu interstitiel du poumon de rat. Elle a également démontré qu'il y avait un marquage d'ECA au niveau de la membrane luminale endothéliale, mais quantitativement peu importante en comparaison à la quantité totale de cette enzyme dans le poumon de rat.

Le marquage au niveau du milieu interstitiel est distribué de façon inégale à certains endroits du tissu pulmonaire. Cette hétérogénéité du marquage dans le milieu

interstitiel peut s'expliquer par une distribution inégale du liquide interstitiel dans la matrice extracellulaire. La présence de poches peut favoriser la rétention du liquide dans certains endroits. Il est également possible que l'ECA soit absorbée de façon sélective à certaines composantes du milieu interstitiel d'où sa localisation préférentielle dans certaines régions plutôt qu'à d'autres.

En comparant nos résultats avec les données de la littérature, nous avons constaté qu'il y avait une différence majeure au niveau de la localisation de l'enzyme de conversion dans les poumons de rat. Contrairement à nos résultats, certains groupes de chercheurs, grâce à des approches en immunocytochimie pré-enrobage, ont localisé l'ECA exclusivement à la surface luminale de l'endothélium pulmonaire. Cette localisation de l'enzyme de conversion de l'angiotensine dans le poumon est toujours acceptée dans le milieu scientifique. Cette image de la localisation de l'ECA à la surface luminale explique de manière simple son mécanisme d'action puisque de cette façon, elle est accessible aux substrats en circulation dans le sang ce qui facilite leur métabolisme. Toutefois, il est possible que ce métabolisme ne soit pas aussi simple que ce qui était cru jusqu'à maintenant. C'est ce que pourrait avancer nos résultats en démontrant que la localisation principale de l'ECA est en fait le milieu interstitiel pulmonaire.

Nos résultats divergeants de ceux de la littérature peuvent s'expliquer de

quelques façons. D'abord, à notre connaissance, c'est la première fois qu'une tentative de localisation de l'enzyme est faite par la technique d'immunocytochimie post-enrobage. Jusqu'alors, la localisation de l'enzyme de conversion de l'angiotensine avait été démontrée en immunocytochimie pré-enrobage seulement. Or, cette approche est sensible à la capacité de l'anticorps conjugué à son marqueur (enzyme ou or colloïdal) de pénétrer à l'intérieur du tissu. Contrairement à cela, la préparation post-enrobage rend accessible toutes les molécules à la surface de la coupe ce qui permet à l'anticorps de marquer des régions qui autrement ne seraient pas exposés à celui-ci.

La seconde explication est liée aux caractéristiques des différents anticorps anti-ECA utilisés pour les différentes études. Il est déjà connu que l'ECA se retrouve sous deux formes, la forme membranaire et une forme hydrophile présente dans le sang et le liquide séminal. L'existence d'une enzyme capable d'hydrolyser l'ECA membranaire est connue depuis quelques années. Cette enzyme fait partie d'une classe de protéines ancrées à la membrane qui portent le nom générique de sécrétases. De façon générale, elles sont solidement associées aux membranes plasmiques car elles demeurent présentes malgré le lavage exhaustif de la surface luminale.

Il y a plusieurs protéines membranaires qui se retrouvent à un moment ou à un autre sous une forme soluble dans les différents liquides de l'organisme. L'hydrolyse qui les libère de la membrane se fait très près de la face extracellulaire de la membrane

cellulaire et permet ainsi le relâchement de la protéine, initialement membranaire intrinsèque de type I ou II, sous une forme hydrophile. Le rôle de ce mécanisme physiologique est incertain, mais il pourrait permettre de réguler la présence de ces molécules à la surface cellulaire.

Cependant, bien que ce mécanisme de sécrétion soit physiologique, il apparaît souvent dans des cas pathologiques. Cette protéolyse post-transcriptionnelle est observée dans la maladie d'Alzheimer où la protéine précurseur amyloïde membranaire est scindée par certaines sécrétases. Il en est de même pour le TGF- α (transforming growth factor- α), le ligand du facteur de nécrose tumorale, certains récepteurs de cytokines et l'enzyme de conversion de l'angiotensine. Ces protéines sont impliquées dans de nombreuses pathologies comme la neurodégénérescence, l'apoptose, l'oncogénèse et l'inflammation (92).

La sécrétase responsable de l'hydrolyse de l'ECA a été caractérisée en 1993 par Hooper et Oppong (89). Dans leurs expériences, ils ont démontré un enrichissement de l'activité de la sécrétase responsable de l'hydrolyse de l'ECA dans les préparations membranaires. L'activité optimale de la sécrétase qui libère l'ECA est optimale à une température de 37°C et à un pH de 8.4. Cette enzyme n'est pas affectée par les inhibiteurs de protéases des groupes sérine, thiol ou aspartique. Elle serait une métalloprotéase puisque la présence d'agent chélateur comme l'EDTA et la 1,10-

phénanthroline diminuent la relâche d'ECA. Elle serait également dépendante du magnésium puisque son activité est retrouvée par l'ajout de ce cation. Enfin, la coupure de l'ECA membranaire par la sécrétase spécifique se fait très près de son site d'insertion dans la membrane. De cette façon, les formes hydrophile et membranaire de l'enzyme de conversion ne diffèrent que de 40 aa représentant environ 10KD de différence de poids moléculaire. La portion C-terminale de l'enzyme membranaire est donc absente de la forme hydrophile.

Certains anticorps anti-ECA sont spécifiques à l'extrémité C-terminale de la molécule de sorte que ces anticorps ne peuvent reconnaître la forme hydrophile de l'enzyme sécrétée dans les liquides. De tels anticorps ne peuvent reconnaître la forme hydrophile et donc ne peuvent contribuer au marquage de l'enzyme présente dans le milieu interstitiel. Or, l'hydrolyse de l'ECA ne l'empêche pas d'être reconnue par notre anticorps monoclonal anti-ECA 11B10. Nous avons démontré que notre anticorps reconnaissait l'enzyme solubilisée dans le tampon carbonate ce qui démontre qu'il est spécifique au domaine extracellulaire de l'enzyme membranaire et non à son domaine intracellulaire C-terminal. Cette caractéristique de notre anticorps lui permet de reconnaître la forme sécrétée de l'enzyme ce qui nous permet de suivre la molécule tout au long de son métabolisme. Il est donc possible que la spécificité de notre anticorps soit responsable de la différence des marquages en immunocytochimie entre les

données de la littérature et les résultats présentés dans ce travail.

Malgré cette différence importante, certains résultats que nous avons obtenus sont en accord avec la littérature. Nous avons démontré l'enrichissement de l'ECA au niveau de la membrane luminale de l'endothélium, démontré l'importance quantitative de la forme hydrophile de l'enzyme dans les poumons et démontré par immunobuvardage sa présence dans plusieurs tissus. Notre travail peut donc s'appuyer sur des bases solides permettant de valider les approches utilisées lors de cette l'étude.

Les différentes approches que nous avons utilisées sont très différentes l'une de l'autre ce qui a permis d'évaluer différents paramètres donc de limiter les erreurs d'interprétation. Chaque approche confirme, appuie ou valide les résultats obtenus à partir des autres expériences. De plus, il est à noter que ces approches ont été utilisées régulièrement dans d'autres études de caractérisation de protéine. Par exemple, la caractérisation de la sécrétase responsable de l'hydrolyse de l'ECA a été faite en déterminant la quantité d'ECA dans les fractions pauvre et riche en détergent obtenues par la technique de partition en Triton X-114. La présence de l'ECA dans ces fractions a été mesurée par immunobuvardage et par la mesure de son activité spécifique associée à chaque fraction. Ce sont les mêmes approches que nous avons utilisées, lors de notre travail, pour évaluer la localisation de l'ECA et pour mesurer les quantités relatives d'ECA de la forme hydrophile et membranaire dans les poumons de rat.

Enfin, nous croyons que les résultats que nous présentons dans ce travail lancent une idée nouvelle et intéressante sur la localisation de l'enzyme dans les poumons. Notre travail suscite plusieurs questions sur les motifs d'une localisation tellement importante de l'enzyme dans le milieu interstitiel. La localisation de l'enzyme dans le milieu interstitiel plutôt qu'à la surface luminale endothéliale éloigne l'enzyme de ses substrats ce qui nécessite une révision de ces mécanismes d'action. D'une part, est-ce que la faible proportion de l'ECA pulmonaire exprimée à la surface luminale est suffisante pour le métabolisme efficace de ces substrats ? Est-ce que ce métabolisme se fait uniquement à la surface luminale ou s'il se fait également dans le milieu interstitiel ? Dans ce cas, quels sont les mécanismes qui permettent l'absorption des substrats du sang vers le milieu interstitiel ?

D'un autre côté, est-ce que le milieu interstitiel sert uniquement de réservoir pour l'entreposage de l'ECA ou s'il y joue un rôle physiologique important ? Un article paru en 1992 a démontré que le métabolisme des substrats de l'ECA augmentait de façon importante durant l'exercice. Les auteurs ont suggéré qu'il existait un mécanisme d'entreposage responsable de cette augmentation (93). Quel pourrait être le mécanisme d'activation des molécules "entreposées" ? Dans le cas où l'ECA jouerait un rôle physiologique dans le milieu interstitiel, de quoi s'agirait-il ? Existe-t-il un métabolisme encore inconnu sur d'autres substrats ? De plus en plus, des chercheurs découvrent la

présence de l'enzyme dans d'autres tissus et dans des lignées cellulaires autres que les cellules endothéliales dont les cellules épithéliales et les macrophages. De plus, certains auteurs ont démontré l'existence de plusieurs isoformes de l'enzyme dans un même tissu, par exemple, le cerveau. Chaque isoforme est localisée dans une région spécifique avec des activités et des rôles différents pour chacune (94). Est-ce que notre anticorps reconnaît une isoforme particulière de l'enzyme de conversion pulmonaire fortement exprimée dans le milieu interstitiel et ayant un rôle spécifique ? Est-il possible que la gp170 reconnue par notre anticorps soit la même que l'enzyme caractérisée depuis longtemps, mais que les caractéristiques du nouvel anticorps anti-ECA permettent de retracer l'enzyme malgré son métabolisme.

Malgré toutes ces questions que suscite ce travail, il explique les résultats que certains chercheurs ont obtenus lors de leurs travaux. À cause de l'importance du débit sanguin pulmonaire, l'importante quantité d'ECA dans ce tissu et sa localisation présumée majoritairement à la surface luminale de l'endothélium, plusieurs groupes de recherche ont tenté de se servir de cette molécule pour cibler des médicaments vers les poumons. Ils n'ont cependant jamais obtenu les résultats escomptés. Le présent travail pourrait fournir une partie des raisons pour lesquelles ces travaux de ciblage ont échoués. La quantité d'enzyme présente à la surface luminale est trop faible pour qu'un tel ciblage soit efficace.

6. Conclusion

La production des anticorps monoclonaux est un outil très important pour la recherche. Dans ce travail, ils devaient permettre l'identification et la caractérisation d'un nouveau marqueur de l'endothélium différencié des poumons de rat. Au lieu de cela, notre anticorps s'ajoute à la liste de plusieurs autres spécifiques à une enzyme essentielle au bon fonctionnement de l'organisme, l'enzyme de conversion de l'angiotensine. Comme il a été démontré dans ce travail, malgré que cette enzyme ait été découverte il y a longtemps et fortement étudiée depuis, le nouvel anticorps monoclonal anti-ECA a permis de découvrir des éléments nouveaux.

Ainsi, les résultats qui ont été obtenus au cours de ce projet lancent une nouvelle idée sur la localisation de l'enzyme de conversion de l'angiotensine. La variété des approches utilisées pour déterminer et démontrer la localisation de l'enzyme dans le milieu interstitiel pulmonaire tend à confirmer cette nouvelle localisation de l'enzyme. Toutefois, il demeure de nombreuses questions sans réponse qui devront être étudiées et résolues pour comprendre davantage les fonctions et les mécanismes d'action de cette enzyme importante.

Références

- 1-Marieb, É.N. : *Anatomie et physiologie humaine*. Saint-Laurent, Éditions du Renouveau Pédagogique Inc., 1993. Pages 633-637.
- 2-Simionescu, M. et Simionescu N. : Ultrastructure of the microvascular wall : fonctionnal correlations dans *Handbook of physiology - The cardiovascular system IV*. Edited by Bethesda (Md) : American physiological society, 1984. Chapitre 3 : pages 41-101.
- 3-Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. et Watson, J.D. : *Biologie moléculaire de la cellule (2^e édition)*. Paris, Flammarion Médecine Sciences, 1986. Pages 297-298, 324-335, 461-468.
- 4-Kinne, R.K.H. : Endothelial and epithelial cells : general principles of selective vectorial transport. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.*, 1997 Oct. ; 17(5) : 223-230. Review
- 5-Kirkpatrick, C.J., Wagner, M., Hermanns, I., Klein, C.L., Kohler, H., Otto, M, van Kooten, T.G. et Bittinger, F. : Physiology and cell biology of the endothelium: a dynamic interface for cell communication. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.*, 1997 Oct. ; 17(5) : 231-240. Review.
- 6-Copley, A.L. : Hemorheological aspects of the endothelium-plasma interface. *Microvasc. Res.*, 1974 Sep. ; 8(2) : 192-212. Review.
- 7-Horvat, R., Hovorka, A., Dekan, G., Poczewski, H. et Kerjaschki, D. : Endothelial cell membranes contain podocalyxin--the major sialoprotein of visceral glomerular epithelial cells. *J. Cell Biol.*, 1986 Feb. ; 102(2) : 484-491.

- 8-Simionescu, M., Simionescu, N., Silbert, J.E. et Palade, G.E. : Differentiated microdomains on the luminal surface of the capillary endothelium. II. Partial characterization of their anionic sites. *J. Cell. Biol.*, 1981 Sep. ; 90(3) : 614-621.
- 9-Simionescu, N. : The microvascular endothelium : segmental differentiations, transcytosis, selective distribution of anionic sites dans *Advanced in Inflammation Research*. New York : Raven, edited by G. Weissman, B., Samuelson and R. Paoletti, 1979. Pages 61-70.
- 10-Simionescu, M., Simionescu, N. et Palade, G.E. : Sulfated glycosaminoglycans are major components of the anionic sites of fenestral diaphragms in capillary endothelium (Abstract). *J. Cell. Biol.*, 1979 ; 83(part2) : 78a.
- 11-Buonassisi, V. : Sulfated mucopolysaccharide synthesis and secretion in endothelial cell cultures. *Exp. Cell. Res.*, 1973 Feb. ; 76(2) : 363-368.
- 12-Buonassisi, V. et Root, M. : Enzymatic degradation of heparin-related mucopolysaccharides from the surface of endothelial cell cultures. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1975 Mar. 14 ; 385(1) : 1-10.
- 13-Simionescu, M., Simionescu, N. et Palade, G.E. : Differentiated microdomains on the luminal surface of capillary endothelium: distribution of lectin receptors. *J. Cell. Biol.*, 1982 Aug. ; 94(2) : 406-413.
- 14-Bignon, J., Jaubert, F. et Jaurand, M.C. : Plasma protein immunocytochemistry and polysaccharide cytochemistry at the surface of alveolar and endothelial cells in the rat lung. *J. Histochem. Cytochem.*, 1976 Oct. ; 24(10) : 1076-1084.

- 15-Stein, O., Chajek, T. et Stein, Y. : Ultrastructural localization of Concanavalin A in the perfused rat heart. *Lab. Invest.*, 1976 Aug. ; 35(2) : 103-110.
- 16-De Bruyn, P.P. et Michelson, S. : Changes in the random distribution of sialic acid at the surface of the myeloid sinusoidal endothelium resulting from the presence of diaphragmed fenestrae. *J. Cell. Biol.*, 1979 Sep. ; 82(3) : 708-714.
- 17-De Bruyn, P.P., Michelson, S. et Becker, R.P. : Nonrandom distribution of sialic acid over the cell surface of bristle-coated endocytic vesicles of the sinusoidal endothelium cells. *J. Cell. Biol.*, 1978 Aug. ; 78(2) : 379-389.
- 18-Latta, H., Johnston, W.H. et Stanley, T.M. : Sialoglycoproteins and filtration barriers in the glomerular capillary wall. *J. Ultrastruct. Res.*, 1975 Jun. ; 51(3) : 354-376.
- 19-Charm, S.E. et Kurland, G.S. : *Blood flow and microcirculation*. New York : Wiley, A bio-medical health publication, 1974. Pages 129-130.
- 20-Palade, G.E. : Blood capillaries of the heart and other organs. *Circulation*, 1961 ; 24 : 368-384.
- 21-Simionescu, N. : Transcytosis and traffic of membranes in the endothelial cell dans *International Cell Biology*. Berlin : springer-Verlag, edited by H.G. Schweiger, 1981. Pages 657-672.
- 22-Simionescu, N. et Simionescu, M. : The cardiovascular system dans *Histology* (5th ed.). New York : Elsevier, edited by L. Weiss, 1983. Pages 371-433.
- 23-De Bruyn, P.P., Michelson, S. et Becker, R.P. : Endocytosis, transfer tubules, and lysosomal activity in myeloid sinusoidal endothelium. *J. Ultrastruct. Res.*, 1975 Nov. ; 53(2) : 133-151.

- 24-Vasile, E., Nistor, A., Nedelcu, S., Simionescu, M. et Simionescu, N. : Dual pathway of low density lipoprotein transport through aortic endothelium and vasa vasorum *in situ* (Abstract). *Eur. J. Cell. Biol.*, 1980 ; 22 : 181. (Int. Congr. Cell Biol 2nd).
- 25-Palade, G.E., : Transport in quanta across the endothelium of blood capillaries (Abstract). *Anat. Rec.*, 1960 ; 136 : 254.
- 26-Palade, G.E. et Bruns, R.R. : Structural modulations of plasmalemmal vesicles. *J. Cell. Biol.*, 1968 ; 37 ; 633-649.
- 27-Schnitzer, J.E., Liu, J. et Oh, P. : Endothelial caveolae have the molecular transport machinery for vesicle budding, docking, and fusion including VAMP, NSF, SNAP, annexins, and GTPases. *J. Biol. Chem.*, 1995 Jun. 16 ; 270(24) : 14 399-14 404.
- 28-Gowans, J.L. et Simionescu, M.: Structural and functional differentiation of microvascular endothelium dans *Blood cells and vessel walls : functional interactions : in honour of Dr. J. L. Gowans, FRS*. Amsterdam ; New York : Elsevier, Excerpta Medica, 1980. Collection : Ciba Foundation symposium. New series; 71. Pages 39-60.
- 29-Bruns, R.R. et Palade, G.E. : Studies on blood capillaries. II. Transport of ferritin molecules across the wall of muscle capillaries. *J. Cell. Biol.*, 1968 May ; 37(2) : 277-299.
- 30-Clough, G. et Michel, C.C. : The sequence of labelling of endothelial cell vesicles with ferritin in the frog. *J. Physiol. (Lond.)*, 1979 Jul. ; 292 : 61P-62P.
- 31-Anderson, R.G.W. : Potocytosis of small molecules and ions by caveolae. *Trends in Cell Biology*, 1993 Mar ; 3 : 69-72.
- 32-Fujimoto, T. : Calcium pump of the plasma membrane is localized in caveolae. *J. Cell. Biol.*, 1993 Mar. ; 120(5) : 1147-1157.

- 33-Simionescu, D. et Simionescu, M. : Differentiated distribution of the cell surface charge on the alveolar-capillary unit. Characteristic paucity of anionic sites on the air-blood barrier. *Microvasc. Res.*, 1983 Jan. ; 25(1) : 85-100.
- 34-Simionescu, N., Simionescu, M. et Palade, G.E. : Differentiated microdomains on the luminal surface of the capillary endothelium. I. Preferential distribution of anionic sites. *J. Cell. Biol.*, 1981 Sep. ; 90(3) : 605-613.
- 35-Belloni, P.N. et Nicolson, G.L. : Differential expression of cell surface glycoproteins on various organ-derived microvascular endothelia and endothelial cell cultures. *J. Cell. Physiol.* 1988 Sep. ; 136(3) : 398-410.
- 36-Schnitzer, J.E., Shen, C.P. et Palade, G.E. : Lectin analysis of common glycoproteins detected on the surface of continuous microvascular endothelium in situ and in culture: identification of sialoglycoproteins. *Eur. J. Cell. Biol.*, 1990 Aug. ; 52(2) : 241-251.
- 37-Augustin-Voss, H.G., Johnson, R.C. et Pauli, B.U. : Modulation of endothelial cell surface glycoconjugate expression by organ-derived biomatrices. *Exp. Cell. Res.*, 1991 Feb. ; 192(2) : 346-351.
- 38-Barbera-Guillem, E., Rocha, M., Alvarez, A. et Vidal-Vanaclocha, F. : Differences in the lectin-binding patterns of the periportal and perivenous endothelial domains in the liver sinusoids. *Hepatology*, 1991 Jul. ; 14(1) : 131-139.
- 39-Vecchi, A., Garlanda, C., Lampugnani, M.G., Resnati, M., Matteucci, C., Stoppacciaro, A., Schnurch, H., Risau, W., Ruco, L., Mantovani, A., et Dejana, E. : Monoclonal antibodies specific for endothelial cells of mouse blood vessels. Their application in the identification of adult and embryonic endothelium. *Eur. J. Cell. Biol.*, 1994 Apr. ; 63(2) : 247-254.
- 40-Orlowski, M., Sessa, G. et Green, J.P. : Gamma-glutamyl transpeptidase in brain capillaries: possible site of a blood-brain barrier for amino acids. *Science*, 1974 Apr. 5 ; 184(132) : 66-68.

- 41-Jefferies, W.A., Brandon, M.R., Hunt, S.V., Williams, A.F., Gatter, K.C. et Mason, D.Y. : Transferrin receptor on endothelium of brain capillaries. *Nature*, 1984 Nov. 8-14 ; 312(5990) : 162-163.
- 42-Boado, R.J. et Pardridge, W.M. : The brain-type glucose transporter mRNA is specifically expressed at the blood-brain barrier. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1990 Jan. 15 ; 166(1) : 174-179.
- 43-Cordon-Cardo, C., O'Brien, J.P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J.L., Melamed, M.R. et Bertino, J.R. : Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1989 Jan. ; 86(2) : 695-698.
- 44-Schneeberger, E.E. : Interaction of plasma proteins with negatively charged sites on the pulmonary capillary endothelium of the rat. *Cell. Tissue Res.*, 1988 Feb. ; 251(2) : 417-423.
- 45-Becker, C.G. et Harpel, P.C. : Alpha2-Macroglobulin on human vascular endothelium. *J. Exp. Med.*, 1976 Jul. 1 ; 144(1) : 1-9.
- 46-Bignon, J., Chahinian, P., Feldmann, G. et Sapin, C. : Ultrastructural immunoperoxidase demonstration of autologous albumin in the alveolar capillary membrane and in the alveolar lining material in normal rats. *J. Cell. Biol.*, 1975 Feb. ; 64(2) : 503-509.
- 47-Ryan, U.S. : Pulmonary endothelium: a dynamic interface. *Clin. Invest. Med.*, 1986 ; 9(2) : 124-132. Review.
- 48-Michel, C.C., Mason, J.C., Curry, F.E., Tooke, J.E. et Hunter, P.J. : A development of the Landis technique for measuring the filtration coefficient of individual capillaries in the frog mesentery. *Q. J. Exp. Physiol. Cogn. Med. Sci.*, 1974 Oct. ; 59(4) : 283-309.

- 49-Curry, F.E., Michel, C.C. et Mason, J.C. : Osmotic reflexion coefficients of capillary walls to low molecular weight hydrophilic solutes measured in single perfused capillaries of the frog mesentery. *J. Physiol. (Lond.)*, 1976 Oct. ; 261(2) : 319-336.
- 50-Maher, F., Vannucci, S.J. et Simpson, I.A. : Glucose transporter proteins in brain. *FASEB J.*, 1994 Oct. ; 8(13) : 1003-1011. Review.
- 51-Goetz, D.J., el-Sabban, M.E., Hammer, D.A. et Pauli, B.U. : Lu-ECAM-1-mediated adhesion of melanoma cells to endothelium under conditions of flow. *Int. J. Cancer.*, 1996 Jan. 17 ; 65(2) : 192-199.
- 52-Girard, J.P. et Springer, T.A. : Modulation of endothelial cell adhesion by hevin, an acidic protein associated with high endothelial venules. *J. Biol. Chem.*, 1996 Feb. 23 ; 271(8) : 4511-4517
- 53-Belloni, P.N. et Tressler, R.J. : Microvascular endothelial cell heterogeneity: interactions with leukocytes and tumor cells. *Cancer Metastasis Rev.*, 1990 Feb. ; 8(4) : 353-389. Review.
- 54-Baudin, B., Berard, M., Carrier, J.L., Legrand, Y. et Drouet, L. : Vascular origin determines angiotensin I-converting enzyme expression in endothelial cells. *Endothelium*, 1997 ; 5(1) : 73-84.
- 55-Garlanda, C. et Dejana, E. : Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1997 Jul. ; 17(7) : 1193-1202. Review.
- 56-Ripka, J.E., Ryan, J.W., Valido, F.A., Chung, A.Y., Peterson, C.M. et Urry, R.L. : N-glycosylation of forms of angiotensin converting enzyme from four mammalian species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993 Oct. 29 ; 196(2) : 503-508.
- 57-Duijvestijn, A.M., Kerkhove, M., Bargatze, R.F. et Butcher, E.C. : Lymphoid tissue- and inflammation-specific endothelial cell differentiation defined by monoclonal antibodies. *J Immunol.*, 1987 Feb. 1 ; 138(3) : 713-719.

- 58-Duijvestijn, A.M., van Goor, H., Klatter, F., Majoor, G.D., van Bussel, E. et van Breda Vriesman, P.J. : Antibodies defining rat endothelial cells: RECA-1, a pan-endothelial cell-specific monoclonal antibody. *Lab, Invest.* 1992 Apr. ; 66(4) : 459-466.
- 59-Rorvik, M.C., Allison, D.P., Hotchkiss, J.A., Witschi, H.P. et Kennel, S.J. : Antibodies to mouse lung capillary endothelium. *J. Histochem Cytochem.*, 1988 Jul. ; 36(7) : 741-749.
- 60-Zhu, D.Z. et Pauli, B.U. : Generation of monoclonal antibodies directed against organ-specific endothelial cell surface determinants. *J. Histochem. Cytochem.*, 1991 Aug. ; 39(8) : 1137-1142.
- 61-Winzer-Serhan, U.H., Schafer, H. et Friedl, P. : Isolation and characterization of mouse monoclonal antibodies against a human vascular endothelial cell-specific antigen. *Eur. J. Cell. Biol.*, 1993 Feb. ; 60(1) : 42-47.
- 62-Jacobson, B.S., Schnitzer, J.E., McCaffery, M. et Palade, G.E. : Isolation and partial characterization of the luminal plasmalemma of microvascular endothelium from rat lungs. *Eur. J. Cell. Biol.*, 1992 Aug. ; 58(2) : 296-306.
- 63-Ghitescu, L.D., Crine, P. et Jacobson, B.S. : Antibodies specific to the plasma membrane of rat lung microvascular endothelium. *Exp. Cell. Res.*, 1997 Apr. 10 ; 232(1) : 47-55.
- 64-Schaffner, W. et Weissmann, C. : A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Anal. Biochem.*, 1973 Dec. ; 56(2) : 502-514.
- 65-Campbell, A.M. : *Laboratory techniques in Biochemistry and Molecular biology - Monoclonal antibodies and immunosensor technology.* Departement for Physiological Chemistry, University of Utrecht, Amsterdam, Elsevier Science, Publishers B.V., 1991 vol. 23. Pages 1-50, 123-127, 139-156, 277-301.
- 66-Freund, J. et McDermott, K. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 49, 548, 1942.

- 67-de St Groth, S.F. et Scheidegger, D. : Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J. Immunol. Methods*, 1980 ; 35(1-2) : 1-21. Review.
- 68-Eshhar, Z. : *Hybridomas Technology in the Biosciences and Medecine* (T.A. Springer, T.A. Ed) New York, Plenum Publishing Co., 1985. Page 3041.
- 69-Poliquin, L. et Shore, G.C. : A method for efficient and selective recovery of membrane glycoproteins from concanavalin A-Sepharose using media containing sodium dodecyl sulfate and urea. *Anal. Biochem.*, 1980 Dec. ; 109(2) : 460-465.
- 70-Lotan, R., Beattie, G., Hubbell, W. et Nicolson, G.L. : Activities of lectins and their immobilized derivatives in detergent solutions. Implications on the use of lectin affinity chromatography for the purification of membrane glycoproteins. *Biochemistry*, 1977 May 3 ; 16(9) : 1787-1794.
- 71-Allen, G. : *Laboratory techniques in Biochemistry and Molecular biology - Sequencing of proteins and peptides*, north Holland, Elsevier Science, North Holland Biochemical Press, 1981 vol 9. Pages 43-236.
- 72-Danilov, S., Sakharov, I., Martynov, A., Faerman, A., Muzykantov, V., Klibanov, A. et Trakht I : Monoclonal antibodies to angiotensin-converting enzyme: a powerful tool for lung and vessel studies. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1989 Feb. ; 21 Suppl 1 : 165-170.
- 73-Skeggs, L.T., Marsh, W.H., Kahn, J.R. et Shumway, N.P. : *J Exp Med*, 1954 ; 99 : 275.
- 74-Ng, K.K. et Vane, J.R. : Conversion of angiotensin I to angiotensin II. *Nature*, 1967 Nov. 25 ; 216(117) : 762-766.
- 75-Ng, K.K. et Vane, J.R. : Fate of angiotensin I in the circulation. *Nature*, 1968 Apr. 13 ; 218(137) : 144-150.

- 76-Dorer, F.E., Kahn, J.R., Lentz, K.E., Levine, M. et Skeggs, L.T. : Purification and properties of angiotensin-converting enzyme from hog lung. *Circ. Res.*, 1972 Sep. ; 31(3) : 356-366.
- 77-Ryan, J.W., Ryan, U.S., Schultz, D.R., Whitaker, C. et Chung, A. : Subcellular localization of pulmonary antiotensin-converting enzyme (kininase II). *Biochem. J.*, 1975 Feb. ; 146(2) : 497-499.
- 78-Ryan, J.W., Day, A.R., Schultz, D.R., Ryan, U.S., Chung, A., Marlborough, D.I. et Dorer, F.E. : Localization of angiotensin converting enzyme (kininase II). I. Preparation of antibody-hemeoctapeptide conjugates. *Tissue Cell.*, 1976 ; 8(1) : 111-124.
- 79-Cushman, D.W. et Cheung, H.S. : Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.*, 1971 Jul. ; 20(7) : 1637-1648.
- 80-Cushman, D.W. et Cheung, H.S. : Concentrations of angiotensin-converting enzyme in tissues of the rat. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1971 Oct. ; 250(1) : 261-265.
- 81-Bernstein, K.E., Martin, B.M., Edwards, A.S. et Bernstein, E.A. : Mouse angiotensin-converting enzyme is a protein composed of two homologous domains. *J. Biol. Chem.*, 1989 Jul. 15 ; 264(20) : 11 945-11 951.
- 82-Naim, H.Y. : Angiotensin-converting enzyme of the human small intestine. Subunit and quaternary structure, biosynthesis and membrane association. *Biochem. J.*, 1992 Sep. 1 ; 286 (Pt 2) : 451-457.
- 83-Sibony, M., Gasc, J.M., Soubrier, F., Alhenc-Gelas, F. et Corvol, P. : Gene expression and tissue localization of the two isoforms of angiotensin I converting enzyme. *Hypertension*, 1993 Jun. ; 21(6 Pt 1) : 827-835.

- 84-Rix, E., Ganten, D., Schull, B., Unger, T. et Taugner, R. : Converting-enzyme in the choroid plexus, brain, and kidney: immunocytochemical and biochemical studies in rats. *Neurosci. Lett.*, 1981 Mar. 10 ; 22(2) : 125-130.
- 85-Erdos, E.G., Johnson, A.R. et Boyden, N.T. : Hydrolysis of enkephalin by cultured human endothelial cells and by purified peptidyl dipeptidase. *Biochem. Pharmacol.*, 1978 Mar. 1 ; 27(5) : 843-848.
- 86-Strittmatter, S.M., Thiele, E.A., Kapiloff, M.S. et Snyder, S.H. : A rat brain isozyme of angiotensin-converting enzyme. Unique specificity for amidated peptide substrates. *J. Biol. Chem.*, 1985 Aug. 15 ; 260(17) : 9825-9832.
- 87-Juillerat-Jeanneret, L., Aubert, J.D. et Leuenberger, P. : Peptidases in human bronchoalveolar lining fluid, macrophages, and epithelial cells: dipeptidyl (amino)peptidase IV, aminopeptidase N, and dipeptidyl carboxy)peptidase (angiotensin-converting enzyme). *J. Lab. Clin. Med.*, 1997 Dec. ; 130(6) : 603-614.
- 88-Hooper, N.M., Keen, J., Pappin, D.J. et Turner, A.J. : Pig kidney angiotensin converting enzyme. Purification and characterization of amphipathic and hydrophilic forms of the enzyme establishes C-terminal anchorage to the plasma membrane. *Biochem. J.*, 1987 Oct. 1 ; 247(1) : 85-93.
- 89-Oppong, S.Y. et Hooper, N.M. : Characterization of a secretase activity which releases angiotensin-converting enzyme from the membrane. *Biochem. J.*, 1993 Jun. 1 ; 292(Pt 2) : 597-603.
- 90-Connolly, C., Oppong, S.Y., Turner, A.J. et Hooper, N.M. : Purification and characterization of the angiotensin converting enzyme secretase. *Biochem. Soc. Trans.*, 1995 Nov. ; 23(4) : 551S.
- 91-Hooper, N.M., Oppong, S.Y. et Turner, A.J. : Identification of the site of cleavage in angiotensin converting enzyme by its secretase. *Biochem. Soc. Trans.*, 1995 Nov. ; 23(4) : 552S.

92-Hooper, N.M., Karran, E.H. et Turner, A.J. : Membrane protein secretases.

Biochem. J., 1997 Jan. 15 ; 321(Pt 2) : 265-279. Review.

93-Dupuis, J., Goresky, C.A., Ryan, J.W., Rouleau, J.L. et Bach, G.G. : Pulmonary angiotensin-converting enzyme substrate hydrolysis during exercise. *J.*

Appl. Physiol., 1992 May ; 72(5) : 1868-1886.

94-Strittmatter, S.M. et Snyder, S.H. : Angiotensin converting enzyme immunohistochemistry in rat brain and pituitary gland: correlation

of isozyme type with cellular localization. *Neuroscience*, 1987 May ; 21(2) : 407-420.

Remerciements

Les études de maîtrise sont le premier contact que les étudiants ont avec le milieu de la recherche. De plus, elles constituent un carrefour duquel plusieurs options peuvent se présenter à eux. Ils ont la possibilité de poursuivre leur cheminement aux Études Supérieures vers le Doctorat et atteindre le Post-Doctorat ou ils peuvent choisir de se diriger vers le marché du travail où ils se verront offrir de plus en plus de responsabilités tout en poursuivant leur apprentissage dans un domaine différent. Quel que soit la route choisie par ces étudiants, l'excellence de leur formation leur assuront le succès mérité en vertu de leurs efforts. Par conséquent, les gens qui contribuent de près ou de loin à cette formation sont en grande partie responsable de la qualité et du succès de ces étudiants. Afin de leur témoigner toute ma reconnaissance, je consacre cette section aux personnes qui, par leur participation dans ce projet, le partage de leur expérience, leur dévouement, leur ferveur et leur affection, ont permis l'aboutissement de ce travail.

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de mémoire, le Docteur Lucian Ghitescu, pour qui j'ai le plus grand respect. Malgré ses nombreuses tâches professionnelles, le Dr Ghitescu s'est toujours montré disponible tout au cours de mon projet de maîtrise. En plus de m'initier au travail de laboratoire, il m'a permis

d'acquérir une habileté pour la recherche en m'offrant la possibilité d'apprendre un large éventail de techniques utilisées dans le cadre de ce projet ou en partageant ses autres activités de recherche. En plus des aspects pratiques, il a également cru important de me montrer une vue d'ensemble de ce métier, à partir de la demande de fond jusqu'à la rédaction d'articles scientifiques, présentation d'un séminaire scientifique et la rédaction de ce mémoire. Il a participé de façon importante au développement et à la réussite de ce projet en y apportant une contribution importante tant au niveau du travail pratique qu'au niveau des idées. Je le remercie également pour les nombreuses discussions que nous avons échangées sur des sujets variés durant lesquels il a partagé bien volontiers ses expériences professionnelles et personnelles qui ont bien souvent suscité une certaine réflexion. Enfin, pour sa cordialité, pour le dévouement dont il fait preuve à la fois envers les étudiants, ses confrères et sa passion qu'est la recherche, je tiens à lui rendre hommage et à tout simplement lui dire Merci Lucian.

En second lieu, je tiens à remercier Mme Rozica Bolovan, à la fois pour son aide durant ma maîtrise que pour sa gentillesse à mon égard. C'est une personne courageuse et attachante avec qui j'ai eu plaisir à travailler. Un merci particulier également à M Michel Lauzon qui non seulement m'a appris les rudiments de la microscopie électronique, mais également à toujours été disposé à rendre service,

dépassant les obligations liées à son travail, afin d'aider les étudiants dans leur travaux. Il a une part active dans ce projet en utilisant son expertise pour la préparation des échantillons et leur analyse en microscopie électronique. Il a également développé le programme informatique qui a permis et surtout facilité l'étude morphométrique effectuée pour déterminer le rendement de la technique de purification des membranes lumineuses en mesurant le pourcentage d'association avec la silice. Michel, grâce à sa personnalité, son exubérance et son dévouement est devenu un ami avec lequel j'ai eu plaisir à discuter philosophie, politique, sport, éducation etc...

Je remercie les membres du laboratoire du Dr Bouvier du Département de Biochimie de l'Université de Montréal, en particulier Mme Linda Adams, pour son aide lors de l'utilisation de leur appareil de mesure de la densité optique ainsi qu'au Dr John Leszyk de la Worcester Foundation For Biomedical Research à Shrewsbury au Massachusetts qui a collaboré avec nous afin de séquencer notre antigène, la gp170, ce qui a permis son identification.

Je m'en voudrait d'oublier toutes les personnes du Département, professeurs et personnel de soutien académique, spécialement les personnes liées au désormais ancien Département d'anatomie qui ont également manifesté un dévouement fort apprécié. Ces personnes à la fois accessibles et agréables ont été d'une aide essentielle lors de certaines démarches entreprises au cours de la maîtrise. Parmi ces personnes, un merci

particulier à Mesdames Chantal Joseph, Monique Leroux et Johanne Chainey pour leur aide et surtout leur amitié. Merci aussi à tous les étudiants et amis du Département pour l'entraide et la complicité qui c'est développé entre nous.

En terminant, je tiens à remercier les personnes importantes de ma vie qui m'ont soutenues et encouragées à aller jusqu'au bout. Merci à ma copine Amélie qui par amour m'a apporté son soutien, son aide et sa compréhension dans les moments difficiles. Grâce à ses talents en informatique, elle m'a évité bien des crises de nerfs durant la rédaction de ce mémoire. Enfin, merci surtout à mes parents sans qui je ne serais jamais parvenu là où je suis présentement. Les nombreux sacrifices qu'ils ont faits, leur amour, leur amitié et l'aide qu'ils m'ont apporté au cours de toutes ces années m'ont permis d'évoluer dans un milieu sain, de me développer et de devenir quelqu'un de responsable. Merci de votre soutien, de vos encouragements à développer mes goûts, mes intérêts et à me dépasser. Merci à ma sœur Martine qui m'a toujours apporté son aide lorsque j'en ai ressenti le besoin. À vous tous, merci du fond du cœur, vous occupez maintenant et à jamais une place importante dans ma vie.