

CEREBRAL CIRCULATION AND METABOLISM

Circulation et Métabolisme du

CERVEAU

VOLUME 9 NUMERO 2

JUIN 1992

Organe Officiel de la
Société de Circulation et
Métabolisme du Cerveau

JL John Libbey
EUROTEXT

Caractérisation des sites récepteurs pour les endothélines et les facteurs natriurétiques exprimés par les cellules endothéliales des microvaisseaux du cerveau

C. Frélin, P. Vigne

Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS, 660, route des Lucioles, Sophia Antipolis, 06560 Valbonne, France

Les cellules endothéliales de microvaisseaux du cerveau expriment deux types de récepteurs pour les endothélines. Un récepteur présentant une forte affinité pour Et-1 et une faible affinité pour Et-3. Ce récepteur, majoritaire, est couplé positivement à la phospholipase C et négativement à l'adénylate cyclase. Un second récepteur présente une forte affinité pour Et-1 et Et-3. Son occupation conduit à une activation de l'échangeur Na/H indépendante de la protéine kinase C. Ce récepteur n'apparaît pas être couplé à la phospholipase C. Les astrocytes qui sont étroitement associés aux cellules endothéliales des microvaisseaux pour former la barrière hématoencéphalique expriment un récepteur pour les endothélines présentant une forte affinité pour Et-1 et Et-3. Ce récepteur est couplé de manière positive à la phospholipase C et négativement à l'adénylate cyclase.

Les cellules endothéliales de microvaisseaux du cerveau expriment deux types de récepteurs pour les facteurs natriurétiques, des sites de «clearance» et des sites présentant une forte affinité pour le CNP. Ces sites sont associés à une activité guanylate cyclase.

L'ensemble des résultats suggèrent que les endothélines et les facteurs natriurétiques d'origine cérébrale jouent un rôle important dans le fonctionnement de la barrière hématoencéphalique.

Cellules endothéliales immortalisées de microvaisseaux cérébraux de rat

I. Expression de marqueurs de la barrière hématoencéphalique pendant l'angiogenèse

F.S. Roux*, J.-M. Bourre*, O. Durieu-Trautmann**, A.D. Strosberg**, P.-O. Couraud**

**INSERM U 26, Hôpital Fernand Widal, 200, rue du Faubourg Saint-Denis, 75010 Paris, France*

***ICGM, 22, rue Méchain, 75014 Paris, France*

Les cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux de rat présentent en culture, après trois ou quatre passages, des signes de sénescence, se traduisant par une diminution du taux de prolifération et la perte de l'état différencié. Pour faciliter l'étude *in vitro* des pro-

priétés de la barrière hématoencéphalique (BHE), il semble donc nécessaire de développer des lignées stables de cellules immortalisées qui aient conservé certaines des caractéristiques structurales et physiologiques des cellules endothéliales de la BHE.

Des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de rat, repiquées deux fois, ont été immortalisées par transfection avec le plasmide pE1A-neo, contenant la région précoce de l'adénovirus E1A et le gène de résistance à la généticine. L'un des clones (RBE4) a été sélectionné : les cellules sont sensibles au facteur de croissance des fibroblastes basique (bFGF) et forment une monocouche à confluence ; elles présentent les marqueurs spécifiques des cellules endothéliales, le Facteur VIII, l'enzyme de conversion de l'angiotensine et le site de liaison de la lectine Griffonia Simplicifolia Agglutinine.

Les cellules RBE4, lorsqu'elles sont cultivées sur matrice de collagène et en présence de bFGF, infiltrent la matrice et s'associent pour former des tubules de type capillaire. Les activités de deux enzymes spécifiques de la BHE, la gamma-glutamyl transpeptidase et la phosphatase alcaline, peuvent être mises en évidence par histochimie dans ces structures tubulaires, alors qu'elles ne peuvent être observées dans les cellules de la monocouche.

Plusieurs modèles de cocultures ont été réalisés : les cellules endothéliales sont soit traitées par du milieu conditionné ou des membranes isolées d'astrocytes primaires de rat ou de cellules gliales tumorales C6, soit cultivées sur des filtres disposés dans des microtitres dont le fond est tapissé d'astrocytes. Le traitement par des membranes induit la formation de tubules de type capillaire, en l'absence de bFGF, et augmente l'expression de ces structures, en présence de bFGF ; cette réponse angiogénique est moins marquée lorsque les cellules sont traitées par du milieu conditionné ou cultivées en présence d'astrocytes. Les activités de la gamma-glutamyl transpeptidase et de la phosphatase alcaline mises en évidence dans les tubules sont plus marquées dans les cocultures, quel que soit le modèle étudié. L'addition d'agents qui augmentent le taux d'AMPc intracellulaire inhibe cette réponse angiogénique et induit une activité phosphatasique alcaline dans les cellules de la monocouche des différentes cocultures.

Comme Laterra *et al.* [1] l'ont démontré dans des cultures primaires de cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de bœuf, les cellules endothéliales immortalisées RBE4 peuvent se différencier en présence de facteurs d'origine gliale, en formant des structures de type capillaire. Certaines enzymes spécifiques de la BHE ne seraient induites qu'après expression de cette première étape de différenciation des cellules endothéliales ; des agents augmentant le taux intracellulaire d'AMPc permettraient l'induction de ces enzymes, sans qu'il y ait formation de tubules de type capillaire.

II. Caractérisation pharmacologique

O. Durieu-Trautmann, N. Foignant-Chaverot, F. Roux*,
A.D. Strosberg, P.O. Couraud

CNRS 0415, ICGM et *INSERM U 26, Hôpital F. Widal, Paris, France

Des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de rat ont été immortalisées et un clone, nommé RBE4, a été caractérisé vis-à-vis de l'expression de certains marqueurs enzymatiques caractéristiques de la barrière hématoencéphalique (présentation I, F. Roux *et al.*). Dans le cadre d'une caractérisation phénotypique et pharmacologique de ces cellules, les sumageants de culture ont été dosés pour la présence de prostaglandines : un taux élevé de PGE2 a été détecté, alors que la concentration de prostacycline était en dessous du seuil de détection du test immunoenzymatique utilisé. Ce résultat est en accord

avec l'origine microvasculaire de ces cellules. Les cellules RBE4 sécrètent de l'endothéline et cette sécrétion est notamment stimulée par le serum et la thrombine. Sachant que les astrocytes expriment des récepteurs de l'endothéline, il est ainsi permis de penser que ce peptide, sécrété par l'endothélium au niveau de la barrière hématoencéphalique, puisse réguler de manière paracrine l'activité astrocytaire.

Les cellules RBE4 expriment des récepteurs β -adrénergiques positivement couplés à l'adénylyl-cyclase ainsi que des récepteurs / guanylyl-cyclase des peptides natriurétiques. En outre, ces cellules sont sensibles à l'interféron- γ qui induit l'expression de molécules d'histocompatibilité de classe II et stimule celle des molécules de classe I.

Ces cellules immortalisées exprimant un phénotype non transformé constituent un modèle potentiel d'étude fonctionnelle de la barrière hématoencéphalique, tant sur le plan toxicologique que neuro-immunologique.

1. LATERRA J. *et al.* (1990) : J Cell Physiol, 144 : 204-215.