

N° d'ordre : 1108

50376
1983
123

50376
1983
123

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

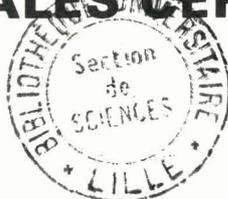
DOCTEUR EN BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES

(3ème cycle)

par

Henry BLOUIN

**LA BARRIERE HEMO-ENCEPHALIQUE
IN VITRO : ETUDE DE POTENTIALITES ENZYMATIQUES
SPECIFIQUES DES CELLULES
ENDOTHELIALES CEREBRALES**



Soutenu le 29 novembre 1983 devant la Commission d'Examen

Président
Rapporteur
Examineurs

M. ROUSSEAU J.P.
M. DELORME P.
Mlle SENSENBRENNER
M. GUILBAULT P.

Professeur à l'Université de Lille 1
Professeur à l'Université de Lille 1
Maître de Recherche CNRS Strasbourg
Professeur à l'Université de Lille 1

Travail réalisé au Laboratoire de Neurobiologie Fonctionnelle de
l'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE, Laboratoire associé au
C.N.R.S. n° 308

SOMMAIRE GENERAL

INTRODUCTION GENERALE	1
PREMIERE PARTIE : ISOLEMENTS ET CULTURES CELLULAIRES	7
SECONDE PARTIE : ETUDE DES ACTIVITES MONO-AMINE-OXYDASIQUES	64
CONCLUSION GENERALE	110
BIBLIOGRAPHIE	112

AVANT-PROPOS

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Neurobiologie Fonctionnelle de l'Université des Sciences et Techniques de LILLE, où Monsieur le Professeur P. DELORME a bien voulu m'accueillir. Après m'avoir confié ce travail de recherche, il a su, à tout moment, m'apporter une aide précieuse et efficace. Je l'en remercie sincèrement.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur J.P. ROUSSEAU qui, malgré ses lourdes tâches au sein du laboratoire associé, a accepté la présidence de ce jury. Je veux ici rendre hommage à la haute qualité des enseignements qu'il m'a dispensés pendant toutes mes études de physiologie.

Je ne voudrais, ni ne pourrais commencer ce mémoire sans remercier Mademoiselle le Docteur M. SENSENBRENNER. Spécialiste de la culture cellulaire, elle m'a reçu chaleureusement dans son laboratoire du Centre de Neurochimie du C.N.R.S. à Strasbourg et a bien voulu accepter d'examiner ce travail. Je lui en exprime toute ma reconnaissance.

Je remercie particulièrement Monsieur le Professeur P. GUILBAULT d'avoir accepté de juger ce travail. Bien que sa problématique scientifique soit éloignée de la mienne, il a toujours su me conseiller efficacement et très amicalement. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude.

Je tiens également à remercier :

- Madame J. BERNARD, technicienne dans le laboratoire. Son expérience, ses conseils et sa gentillesse m'ont toujours été précieux, principalement pendant la phase expérimentale de ce travail. Que ce mémoire soit pour elle le gage de ma reconnaissance et de mon amitié ;

- Madame Y. DODEY qui a assuré avec beaucoup d'efficacité, de soin, de patience et aussi de gentillesse la dactylographie de ce travail, je lui en suis profondément reconnaissant ;

- Monsieur J.F. DUBREMETZ et Madame E. FERREIRA. Leur grande expérience des techniques biologiques et biochimiques m'a été indispensable. Ils n'ont jamais hésité à consacrer de larges parties de leur temps pour m'aider dans certaines manipulations délicates. Je les en remercie sincèrement ;

- Mademoiselle le Docteur R. GUILLOT de la Faculté de Médecine de PARIS. Son aide me fut précieuse pour mener à bien ce travail et pour interpréter certains résultats ;

- Tous les membres des laboratoires de Physiologie et de Biologie Animales qui m'ont autorisé à utiliser le matériel de leurs unités de recherche.

Je remercie de même tous les membres du laboratoire associé qui, pendant ces deux ans, m'ont apporté aide, sympathie et amitié.

Je tiens à accorder une place privilégiée dans ces remerciements à mes parents et à ma femme. Leur soutien matériel et affectif ne m'a jamais manqué. C'est grâce à leur courage et à leur amour que j'ai pu effectuer des études supérieures et mener à bien ce travail.

ABREVIATIONS UTILISEES DANS LE TEXTE

A.C.E.	: Enzyme de conversion de l'angiotensine I en angiotensine II
A.R.	: Aller-retour
B.H.E.	: Barrière hémocéphalique
c.p.m.	: Coups par minute
D.D.S.A.	: Anhydride dodécényl succinique
D.M.P. 30	: 2-4-6 triphénol (Diméthylaminométhyle)
D.O.	: Densité optique
d.p.m.	: Désintégrations par minute
E.D.T.A.	: Acide éthylène diamine tétracétique
F.A.D.	: Flavine adénine dinucléotide
Fig.	: Figure
H.E.P.E.S.	: Acide N-2-Hydroxy éthylpipérazine-N-2-éthane sulphonique
L.C.R.	: Liquide céphalo-rachidien
M.A.O.	: Mono-amine oxydase
M.E.M.	: Milieu essentiel minimum
M.N.A.	: Anhydride méthyl nadique
P.	: Protéines
P.O.P.O.P.	: 1,4-bis [5-Phényl-2-oxazolyl]-benzene
P.P.O.	: 2,5-Diphényloxazole
Réf.	: Référence
S	: Substrat
S.A.B.	: Sérum albumine bovine
S.N.C.	: Système nerveux central
S.V.F.	: Sérum de veau foetal
T°	: Température en degrés CELSIUS
V	: Vitesse
λ	: Longueur d'onde

INTRODUCTION GENERALE

Le concept d'un phénomène particulier régissant les échanges sang-cerveau tire son origine des travaux publiés par EHRLICH en 1885.

Celui-ci remarque en effet que les colorants acides, injectés dans la circulation systémique, se retrouvent dans tous les tissus de l'organisme, hormis dans ceux du système nerveux central.

Il faut attendre les travaux de ROUX et BORREL (1898) qui démontrent que l'anti-toxine tétanique injectée par voie sanguine ne parvient pas à l'encéphale et ceux de BIEDL et KRAUS (1898) sur l'imperméabilité des vaisseaux cérébraux aux sels biliaires, pour envisager l'existence d'un filtre sélectif à ce niveau.

Pour LEWANDOWSKY (1900), le liquide céphalo-rachidien représente un intermédiaire indispensable pour le passage des substances entre le sang et le parenchyme nerveux. Ceci est confirmé par GOLDMANN (1913) qui obtient des résultats similaires à ceux d'EHRLICH (1885) en utilisant du bleu trypan mais qui, de plus, remarque que ce colorant, injecté dans l'espace sous-arachnoïdien se retrouve alors dans le système nerveux central.

Cependant, ce sont les travaux de STERN et GAUTIER (1922) et de STERN et PEYROT (1927) qui font apparaître pour la première fois en français le terme de barrière hémato-encéphalique défini comme *"un mécanisme spécial réglant le passage de diverses substances du sang dans le liquide céphalo-rachidien et dans les centres nerveux cérébraux spinaux..."* (Fig. 1). Mais les expérimentations rigoureuses de SPATZ (1933) et de WALTER (1933) vont faire perdre progressivement sa pré-éminence au liquide céphalo-rachidien et localiser la barrière hémato-encéphalique à trois niveaux (Fig. 2) :

- entre le sang et le L.C.R.
- entre le L.C.R. et le parenchyme nerveux.
- entre le sang et le parenchyme nerveux.

Des études ultrastructurales, basées à la fois sur l'utilisation de coupes sériées examinées au microscope électronique (REESE et KARNOVSKY,

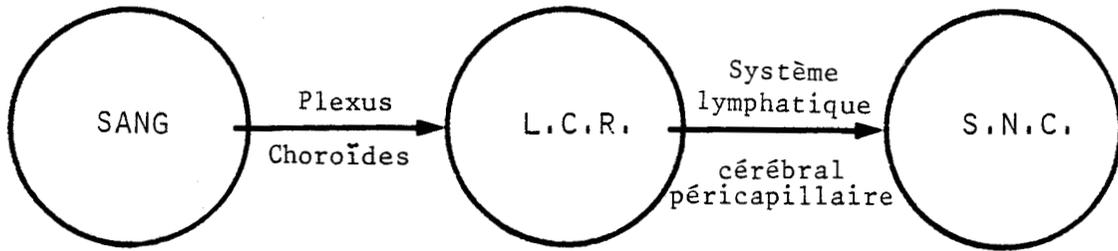


Figure 1 : Le concept de barrière hémato-encéphalique selon LEWANDOWSKY, GOLDMANN, STERN et GAUTIER (Barrière hémato-liquidienne)

Tiré de "La barrière hémato-encéphalique" par J. POIRIER, 1976

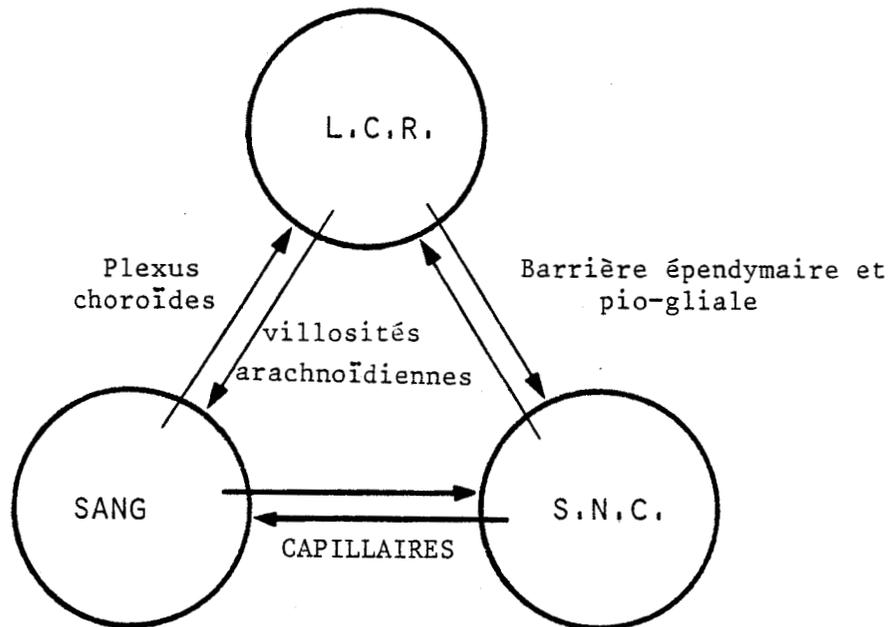


Figure 2 : La barrière hémato-encéphalique au sens large, selon la conception moderne

Tiré de "La barrière hémato-encéphalique" par J. POIRIER, 1976

1967) et sur l'emploi de traceurs extrinsèques comme la peroxydase du Raifort (DELORME et al., 1970 ; DELORME, 1971), démontrent le rôle prépondérant de la barrière hémotissulaire située au niveau de la paroi capillaire, au sein de la barrière hémocéphalique. Ces techniques permettent en effet de mettre en évidence l'existence de jonctions étanches, de type "Zonula occludens" entre les cellules endothéliales des capillaires cérébraux (REESE et KARNOVSKY, 1967) et la rareté des vésicules de pinocytose dans ces mêmes cellules (MAJNO, 1965). La lame basale continue et la couche de pieds astrocytaires n'entravent pas le passage des traceurs utilisés (BRIGHTMAN et REESE, 1969 ; DELORME et al., 1975).

Cependant, l'étude de la participation de la micro-vascularisation cérébrale dans le phénomène de la barrière hémocéphalique et des mécanismes spécifiques s'y rapportant, reste difficile à évaluer par des expérimentations "in vivo" : ceci à cause de l'influence concomitante des autres structures cérébrales : plexus choroïdes, liquide céphalo-rachidien, glie, structures nerveuses, environnement chimique complexe...

La création de modèles expérimentaux "in vitro" s'impose alors.

C'est grâce, tout d'abord à des isollements de micro-vaisseaux cérébraux (JOÓ et KARNUSHINA, 1973 ; BRENDEL et al., 1974 ; GOLDSTEIN et al., 1975 ; MRSULJA et al., 1976) puis à la mise en culture de leur endothélium (DeBAULT et al., 1979 ; SPATZ et al., 1980) que le métabolisme de ce type cellulaire peut enfin être exploré spécifiquement.

Par la conjonction de recherches "in vivo" et "in vitro", il est montré que les molécules circulant dans le sang ne peuvent atteindre le parenchyme nerveux que par l'un ou l'autre des deux mécanismes suivants (PARDRIDGE, 1983) :

* Par liposolubilité ou diffusion libre à travers la membrane plasmique de la cellule endothéliale : c'est le cas de la majorité des substances liposolubles (KATZMAN et PAPPUS, 1973), des stéroïdes (PARDRIDGE, 1981), de l'eau (BRADBURY, 1979) ou de substances faiblement ionisées (BRODIE et al., 1960) ;

* Par transport par molécules spécialisées, de type enzymatique, très spécifiques et localisées dans le plasmalemma endothélial : c'est le

cas de nombreux ions (GREENBERG et al., 1943 ; EISENBERG et SUDDITH, 1979), des amino-acides (LAJTHA, 1968 ; BETZ et GOLDSTEIN, 1980) ou encore des hexoses (BETZ et al., 1979).

De plus, bien qu'il soit démontré depuis les travaux de WEIL-MALHERBE et al. (1961) et de BERTLER et al. (1963) que les neurotransmetteurs monoaminergiques et leurs précurseurs ne traversent pas la barrière hémocéphalique, ce sont BERTLER et al. (1966) puis LAI et al. (1975), HARDEBO et OWMAN (1980) et SPATZ et al. (1981) qui localisent ce type de barrière particulier à l'intérieur même des cellules des micro-vaisseaux cérébraux : ces auteurs y mettent en effet en évidence des activités enzymatiques très importantes dégradant les monoamines. Ces activités sont principalement de type mono-amine oxydasiques, mais il existe aussi des catéchol-O-méthyl transférases, des dopamine β -hydroxylases, des DOPA-décarboxylases, pour ne citer que les plus importantes.

La notion d'une barrière enzymatique, localisée principalement à l'interface sang-cerveau, apparaît donc, barrière capable de détruire rapidement les substances neuro-actives.

o
o o

De cet ensemble de données, deux conclusions principales peuvent être tirées :

* En premier, le substratum de la barrière hémocéphalique peut être actuellement considéré comme étant situé au niveau de la paroi capillaire elle-même. Ce phénomène, d'abord expliqué par la présence de structures cellulaires particulières, s'est également révélé mettre en jeu des systèmes enzymatiques complexes et puissants ;

* En second, la nécessité quasi-absolue d'isoler les divers protagonistes de cette barrière par des techniques de séparations et de cultures cellulaires, afin de mieux connaître les mécanismes physiologiques spécifiques entrant en jeu.

Nous nous proposons ici, afin d'apporter une preuve supplémentaire

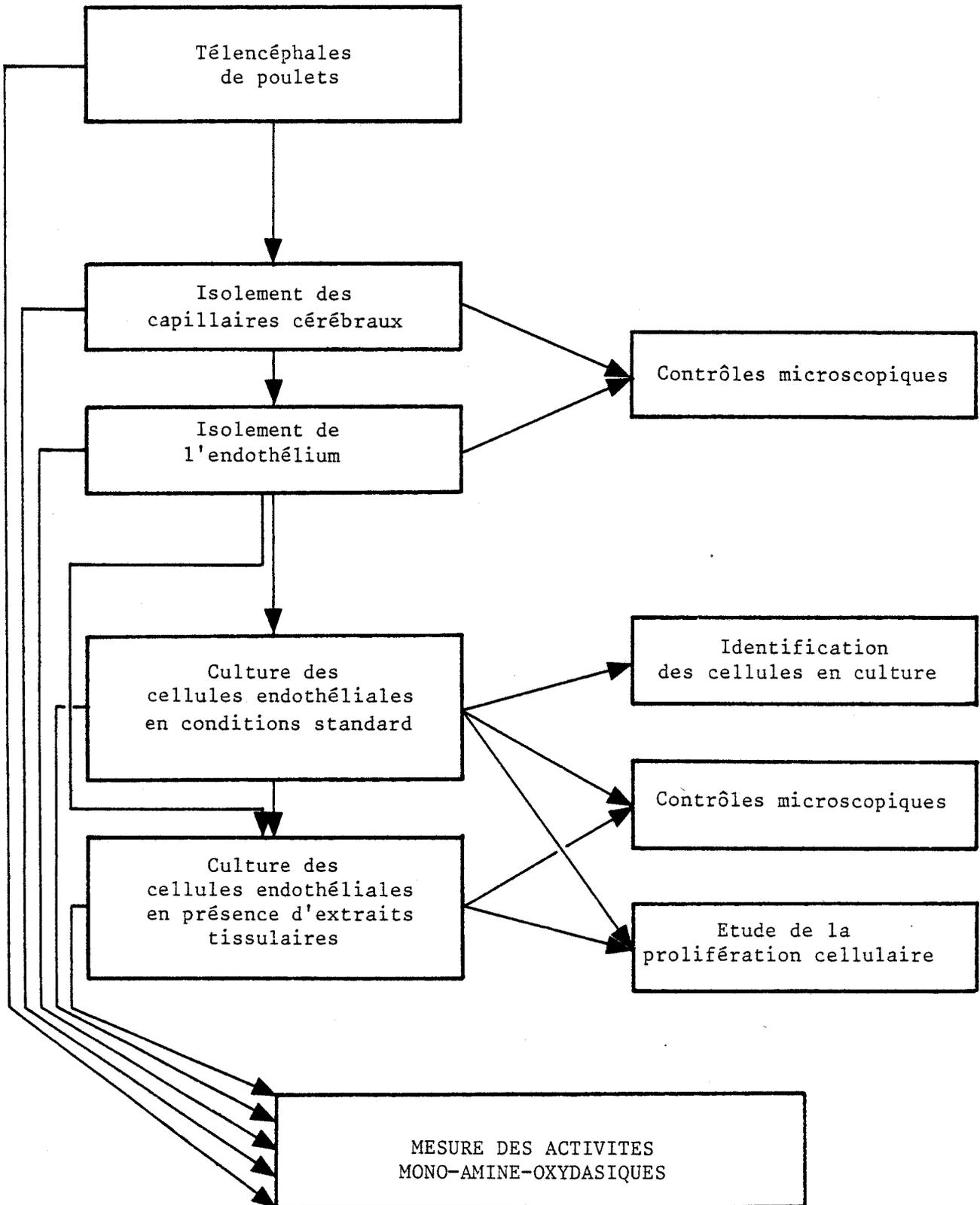


Figure 3 : Résumé des grandes étapes du protocole expérimental.

à ces données, de créer et d'étudier des modèles "in vitro" de cette barrière hémencéphalique chez le Poulet.

Au cours de cette étude, il nous faudra donc (*Fig. 3*) :

* Dans un premier temps, réaliser des isolements sélectifs de capillaires télencéphaliques suivis, ou non, d'un isolement et d'une mise en culture de leur endothélium. Contrôles et caractérisations des fractions cellulaires seront effectués à tous les stades ;

* Dans un deuxième temps, mesurer les activités mono-amine oxydasiques présentes dans tous les isolements cellulaires effectués.

Dans le cadre de notre expérimentation, il est en effet primordial que l'endothélium isolé et/ou cultivé, conserve son "identité cérébrale" "in vitro": ceci est une condition indispensable pour que nous puissions utiliser les fractions et les cultures de cellules endothéliales comme modèle de la barrière hémencéphalique.

Or, la M.A.O. est, avec la DOPA-décarboxylase, une enzyme spécifique de la cellule endothéliale des micro-vaisseaux du cerveau. Elle est, de plus, profondément impliquée dans le phénomène important et particulier qu'est la barrière enzymatique au niveau de la circulation cérébrale. C'est pourquoi nous l'avons choisie pour tester les potentialités de l'endothélium cérébral "in vitro" et pour vérifier sa capacité de réponse à des stimuli spécifiques. L'intérêt de la culture cellulaire devient alors évident : cette technique nous permettra, simplement par l'adjonction au milieu des cultures de différents extraits tissulaires, de qualifier et de quantifier la réponse de la cellule endothéliale vis-à-vis d'environnements spécifiques.

PREMIERE PARTIE :

ISOLEMENTS ET CULTURES CELLULAIRES

PLAN DETAILLE DE LA PREMIERE PARTIE

INTRODUCTION A LA PREMIERE PARTIE	7
A - ISOLEMENT DES CAPILLAIRES TELEENCEPHALIQUES	8
I - ANALYSE DE LA LITTERATURE ET CHOIX DE LA TECHNIQUE	8
II - MATERIEL ET METHODES	10
1. ANIMAUX UTILISES	10
2. TECHNIQUES	10
a) Conditions générales des manipulations	
b) Techniques de manipulations aseptiques	
c) Protocole expérimental	
- Prélèvement des hémisphères cérébraux	
- Homogénéisations et tamisages	
- Centrifugation	
d) Contrôles microscopiques des isolements de capillaires	
- Microscopie optique en contraste de phase	
- Microscopie électronique	
III - RESULTATS	19
1. CONTROLE DE L'ISOLEMENT DES CAPILLAIRES EN MICROSCOPIE OPTIQUE	19
2. CONTROLE DE L'ISOLEMENT DES CAPILLAIRES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	19
IV - DISCUSSION	19
B - CULTURE DES CELLULES ENDOTHELIALES	21
I - ANALYSE DE LA LITTERATURE ET CHOIX DE LA TECHNIQUE	21
1. PREMIERS TRAVAUX	21
2. TRAVAUX RECENTS	23
a) Culture de l'endothélium	
b) Milieux de culture	
c) Sous-cultures	
3. CULTURE DE L'ENDOTHELIUM MICRO-VASCULAIRE	25
II - METHODES	26
1. ISOLEMENT ET CULTURE DES CELLULES ENDOTHELIALES	26
a) Digestion enzymatique des capillaires cérébraux	
b) Lavage	
c) Centrifugation en gradient de densité	
- Etablissement de gradients de densité continus de PERCOLL	

- Passage du matériel cellulaire sur le gradient de densité	
- Récupération des cellules	
d) Mise en culture	
- Préparation du milieu de culture standard complet	
- Ensemencement	
- Traitement ultérieur	
- Sous-cultures	
2. CONTROLES MICROSCOPIQUES	33
a) Microscopie optique	
- Observation du matériel	
- Mesure de la viabilité des cellules	
b) Microscopie électronique	
- Fractions cellulaires	
- Cultures cellulaires	
III - RESULTATS	34
1. DIGESTION DES CAPILLAIRES PAR LA COLLAGENASE	34
a) Microscopie optique	
b) Microscopie électronique	
c) Conclusion	
2. GRADIENTS DE PERCOLL	37
a) Gradients	
b) Microscopie	
- Zone de densité 1,117 g/ml	
- Zone de densité 1,048 à 1,052 g/ml	
- Zone de densité 1,015 à 1,040 g/ml	
3. CULTURES CELLULAIRES	40
a) Mise en culture de la phase supérieure du gradient	
b) Mise en culture de la phase centrale du gradient	
- Après 24 heures de culture	
- De 2 à 8 jours de culture	
- Suite de la culture	
4. EXAMEN DES CULTURES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	44
a) Cas de cultures "jeunes"	
b) Cas de cultures "âgées"	
IV - DISCUSSION	45
1. OBTENTION DES CELLULES ENDOTHELIALES	45
2. PURIFICATION DES CELLULES	47
3. CULTURE CELLULAIRE	47
C - CARACTERISATION DES CELLULES ENDOTHELIALES EN CULTURE	50
I - INTRODUCTION	50
1. APPORTS DE LA MICROSCOPIE OPTIQUE	50
2. INSUCES DE METHODES COURAMMENT UTILISEES POUR CARACTERISER LES CELLULES ENDOTHELIALES EN CULTURE	52

a) Marqueurs ultrastructuraux	
b) Antigène du Facteur VIII (Facteur anti-hémophilique)	
3. AUTRES METHODES	53
a) Non-adhérence plaquettaire	
b) Production de prostacycline (Prostaglandine I ₂)	
II - METHODE D'IDENTIFICATION INDIRECTE DE L'ENDOTHELIUM EN CULTURE	54
1. PRINCIPE	54
2. TECHNIQUES UTILISEES	55
a) Gradients de densité en PERCOLL	
b) Mesure de l'activité de l'A.C.E.	
c) Dosage des protéines	
III - RESULTATS	57
1. GRADIENTS DE PERCOLL	57
2. ACTIVITE DE L'A.C.E.	59
IV - DISCUSSION	60
CONCLUSION DE LA PREMIERE PARTIE	63

INTRODUCTION A LA PREMIERE PARTIE

La première phase de notre travail consiste en la mise au point de méthodes d'isolements, spécifiques à notre matériel.

Une description détaillée des techniques d'isolement des capillaires télencéphaliques et de leur endothélium, ainsi que de la culture de cet endothélium fera suite à une analyse approfondie de la littérature concernant l'endothélium "in vitro".

Les résultats exposés et discutés nous démontreront la pureté des fractions obtenues.

A - ISOLEMENT DES CAPILLAIRES TELENCEPHALIQUES

I - ANALYSE DE LA LITTERATURE ET CHOIX DE LA TECHNIQUE

Une analyse de la bibliographie (*Tableau I*) nous permet d'effectuer un classement rapide des méthodes utilisées dans le but d'obtenir des fractions purifiées de micro-vaisseaux à partir de différents tissus animaux.

Nous pouvons en déduire trois "lignées protocolaires" principales :

* Certains auteurs (*Tableau I_A*) préparent un homogénat tissulaire auquel ils font subir toute une série de centrifugations.

* DEL VECCHIO et al. (1977) ou WILLIAMS et al. (1980) se contentent d'une longue digestion enzymatique, suivie d'une purification du matériel selon divers procédés (*Tableau I_B*).

* Mais la plupart des auteurs (*Tableau I_C*) utilisent d'une façon combinée homogénéisations, tamisages et, éventuellement, centrifugations différentielles.

Alors que les premières méthodes demandent des temps de manipulation longs et une mise en oeuvre de moyens lourds et complexes, la troisième technique présente pratiquement, plusieurs avantages :

* La manipulation est rapide. Ce gain de temps est appréciable lorsque l'on destine les éléments isolés à un dosage enzymatique ou à une mise en culture.

* Les contraintes techniques imposées sont de faible importance.

* Les moyens mis en oeuvre sont simples et donc peu onéreux.

Notons enfin que ce sont des techniques d'isolements par tamisages qui sont utilisées lorsque les éléments micro-vasculaires sont ensuite introduits dans un système de culture organotypique (BUZNEY et MASSICOTTE, 1979 ; DeBAULT et al., 1979 ; FRANK et al., 1979 ; GIMBRONE et al., 1979) : la viabilité des éléments cellulaires isolés paraît donc bien préservée par les conditions peu drastiques de ces méthodes.

AUTEURS	ANNEES	MATERIELS	TECHNIQUES
---------	--------	-----------	------------

A

SIKOTOS et al.	1968	Cerveau d'homme ou de boeuf	Homogénéisation + centrifugations (DIF + GD) + passage sur colonnes de billes de verre
JOÓ et KARNUSHINA	1973	Cortex cérébral de rat	Hachage + tamisages + centrifugations (DIF + GD)
ORLOWSKI et al.	1974	Cortex cérébral de boeuf	Homogénéisations + centrifugations (DIF + GD)
MRSULJA et al.	1976	S.N.C. de lapin	Homogénéisations + centrifugations (DIF + GD)
SESSA et al.	1976	S.N.C. de boeuf	Homogénéisations + centrifugations (DIF + GD)
HUANG et DRUMMOND	1979	Cortex cérébral de cobaye	Homogénéisation + centrifugations (DIF + GD) + passage sur colonnes de billes de verre
SPATZ et al.	1980	Cerveau de rat	Homogénéisation + centrifugations (DIF + GD)
BRADBURY et al.	1982	Cortex cérébral de rat	Homogénéisations + centrifugations (DIF + GD)
JOÓ et al.	1982	Moëlle épinière de porc	Homogénéisation + centrifugations (DIF + GD)

B

DEL VECCHIO et al.	1977	Surrénales de rat	Digestion enzymatique + centrifugation (DIF)
WILLIAMS et al.	1980	Cerveau de rat	Hachage + digestion enzymatique + flottaison sur albumine + centrifugations (DIF) + passage sur colonnes de billes de verre

C

BRENDEL et al.	1974	Cortex cérébral de boeuf	Homogénéisations + tamisages
MEEZAN et al.	1974	Rétine de boeuf	Homogénéisations + tamisages
GOLDSTEIN et al.	1975	S.N.C. de rat	Hachage + tamisages + centrifugations (DIF) + passage sur colonnes de billes de verre
LAI et al.	1975	S.N.C. de rat	Homogénéisations + tamisages
BUZNEY et MASSICOTTE	1979	Rétine de foetus de veau	Homogénéisations + tamisages
DeBAULT et al.	1979	S.N.C. de rat	Homogénéisations + tamisages
FRANK et al.	1979	Rétine de chat	Homogénéisations + tamisages
GIMBRONE et al.	1979	Cortex cérébral de boeuf	Homogénéisations + tamisages
WHITE et al.	1979	Rétine de boeuf	Homogénéisations + tamisages
BLOUIN	1980	Téleencéphale de poulet	Homogénéisations + tamisages + centrifugation (DIF)
CECCELLI	1980	Téleencéphale de poulet	Homogénéisations + tamisages + centrifugation (DIF)
DIGLIO et al.	1982	Cerveau de rat	Homogénéisations + tamisages + centrifugations + passages sur colonnes de billes de verre

TABEAU I : Récapitulation des principaux travaux d'isollements de micro-vaisseaux effectués de 1968 à 1982. Trois "lignées protocolaires" sont dégagées. Dans chacune d'elles, le classement est effectué par ordre chronologique.
 DIF : Différentielle GD : En gradient densité



II - MATERIEL ET METHODES

1 - ANIMAUX UTILISES

Nos manipulations sont réalisées sur des poulets de race WYANDOTTE, des deux sexes et tous originaires du même élevage (BUISSETTE à Allennes-les-Marais, Nord).

Ces animaux nous sont livrés dès l'éclosion, maintenus en éleveuse à l'animalerie du laboratoire et nourris à la semoulette "Chair-croissance" (DUQUESNE-PURINA) jusqu'à l'âge de trente jours (+2).

2 - TECHNIQUES

a) Conditions générales des manipulations

Deux cas sont à envisager :

* Les capillaires sont destinés à un dosage enzymatique immédiat : l'isolement est alors réalisé en chambre froide à 4°C.

* L'isolement des capillaires est effectué en vue d'une mise en culture de leur endothélium : la manipulation se réalise alors en milieu stérile et à température ambiante.

b) Techniques de manipulations aseptiques

L'isolement des capillaires (ainsi que l'ensemencement des cultures et les changements de milieux) se fait sous hotte à flux laminaire horizontal (GELMAN - Type GELAIRE - Class 100).

Tout le matériel utilisé est préalablement lavé au détergent FRZ 33 (BOURSEUIL S.A.), rincé abondamment à l'eau bidistillée, séché et stérilisé suivant plusieurs procédés :

* La verrerie et les instruments de dissection sont passés au four PASTEUR à 160°C pendant une heure.

Prélèvement des télencéphales



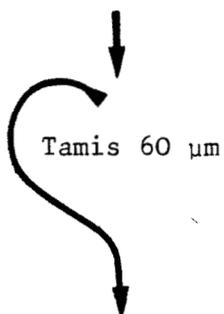
1ère homogénéisation :
Clearance élevée. 20 A.R.



Tamis 180 μm



2ème homogénéisation :
Clearance faible. 15 A.R.



Tamis 60 μm

Centrifugation 1 400 g/10 minutes



Culot de capillaires cérébraux



Figure 4 : Résumé de la technique d'isolement des capillaires.

* Les objets en NYLON, TEFLON ou caoutchouc, sont autoclavés trente minutes à 115°C.

* Les solutions et les milieux, quant à eux, sont stérilisés par passage sur filtre MILLIPORE 0,22 µm.

c) Protocole expérimental (Fig. 4)

- Prélèvement des hémisphères cérébraux

Immédiatement après le sacrifice de l'animal par décapitation, le crâne est entièrement mis à nu par dépeçage.

la voûte crânienne est alors découpée suivant le croquis ci-dessous :



Les flèches numérotées indiquent le sens et l'ordre des sections de la voûte crânienne.

Les deux volets crâniens soulevés, les hémisphères cérébraux sont délicatement prélevés et plongés immédiatement dans un béccher contenant 30 à 40 ml de milieu de MEEZAN (MEEZAN et al., 1974).

La composition de cette solution est la suivante :

116 mM	NaCl
16 mM	KCl
1 mM	NaH ₂ PO ₄ , H ₂ O
0,8 mM	MgSO ₄ , 7 H ₂ O

5,6 mM	Glucose (D+)
1,8 mM	CaCl ₂
28 mM	Tampon H.E.P.E.S.
+ 0,01 %	S.A.B.
+ 50 mg	pénicilline G
+ 50 mg	streptomycine - sulfate
+ 100 000 U.I.	mycostatine

Elle est ajustée à pH 7,4, stérilisée et oxygénée par un mélange 95 % O₂ - 5 % CO₂ (débit de 0,2 litre/minute) avant et pendant la manipulation.

Avec des animaux âgés de trente jours, quinze à vingt télencéphales sont ainsi prélevés.

- Homogénéisations et tamisages

Après dissection minutieuse des méninges, les hémisphères cérébraux isolés sont transvasés dans un homogénéiseur à main KONTES de 40 ml, contenant 15 ml de solution de MEEZAN.

Vingt aller-retours sont effectués avec un piston de clearance 254 µm.

L'homogénat ainsi obtenu est déposé lentement sur un tamis de NYLON à mailles de 180 µm de côté (Toile à bluter - Fabrique Zurichoise S.A.).

Ce tamis est lavé abondamment et puissamment avec de la solution de MEEZAN, ceci à l'aide d'une pissette à bout très effilé.

La totalité du filtrat est ensuite reprise dans un homogénéiseur KONTES de 100 ml. Quinze aller-retours sont effectués avec le piston de clearance 140 µm.

Ce second homogénat est versé sur un tamis dont les mailles font 60 µm de côté.

Le lavage du NYLON est cette fois très léger mais très abondant.

Si le passage sur le premier tamis a pour but de retenir essentiellement les gros vaisseaux et les fragments tissulaires non dilacérés, la toile à mailles de 60 µm, quant à elle, retient une majorité de capillaires ainsi

séparés de l'ensemble du tissu nerveux.

- Centrifugation

La récupération de ces capillaires est ensuite rapide : il suffit de retourner le tamis au-dessus d'une capsule et de le laver puissamment à la solution de MEEZAN.

La suspension obtenue est alors répartie dans des tubes à centrifuger coniques.

Une centrifugation de dix minutes à 1 400 g (Centrifugeuse JANETZKI T32c ou centrifugeuse CHRIST réfrigérée) permet d'obtenir des culots de capillaires cérébraux.

d) *Contrôles microscopiques des isollements de capillaires*

Ils sont réalisés suivant deux méthodes différentes :

- Microscopie optique en contraste de phase

Cette technique d'observation immédiate de l'isolement de capillaires nous permet facilement d'en apprécier le degré de pureté.

Il suffit, sur une lame de verre, de remettre en suspension une fraction de capillaires isolés dans une goutte de solution physiologique et d'observer. L'appareil utilisé est un microscope inversé à contraste de phase (LEITZ - Type DIAVERT), équipé d'un appareil photographique (LEITZ). Il permet des grossissements allant de 100 à 320 fois.

- Microscopie électronique

Bien qu'exigeant une préparation longue et complexe des tissus, cette technique permet une observation très fine des types cellulaires contenus dans nos isollements et de leurs ultrastructures.

Le protocole de la préparation des échantillons est le suivant (Fig. 5) :

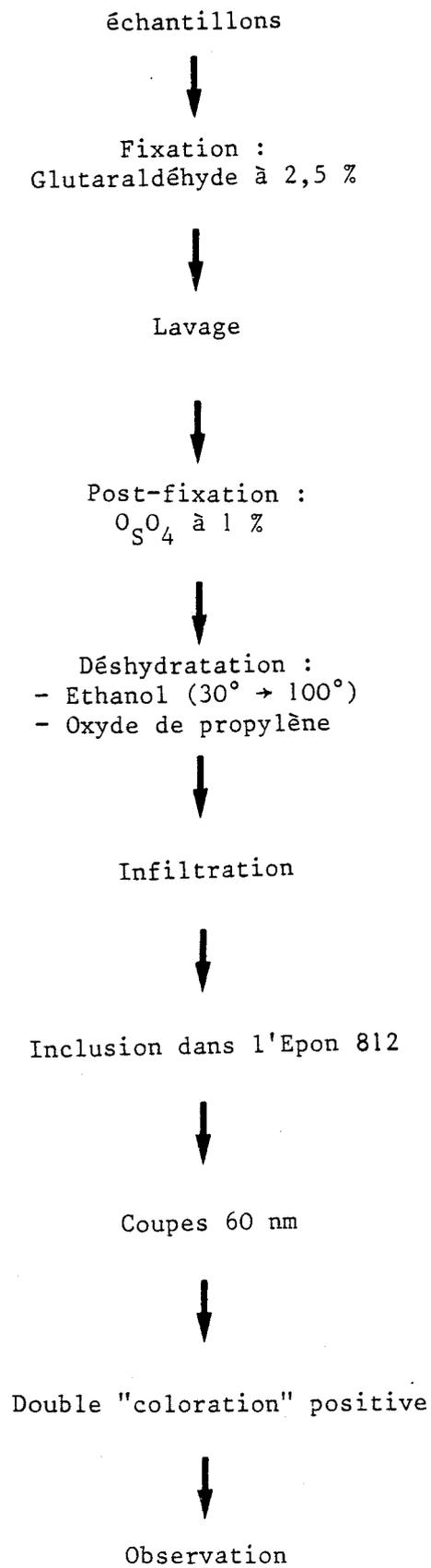


Figure 5 : Grandes étapes de la préparation des échantillons pour la microscopie électronique.

Fixation

Une technique de double fixation, décrite par DELORME (1971) est utilisée ici.

Cette fixation se doit de préserver la totalité des structures à l'échelle moléculaire.

Les capillaires isolés sont en premier lieu immergés dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5 % en tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 7,2 pendant une heure. Ce premier fixateur, de type aldéhydique, réagit avec les protéines mais n'a pratiquement pas d'action sur les lipides.

Le matériel subit ensuite trois lavages avec une solution de saccharose 0,18 M en tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 7,2. La durée de ces lavages est de douze à vingt heures au total.

La post-fixation des lipides est assurée par un bain d'une heure dans une solution de tétr oxyde d'osmium à 1 % en tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 7,2. Une agitation fréquente est nécessaire, l'acide osmique pénétrant très mal les tissus.

Déshydratation

Les échantillons sont plongés successivement dans des bains d'éthanol de degrés croissants : 30, 50, 70, 80, 90, 100 puis dans l'oxyde de propylène. L'immersion dure cinq minutes pour chacun des cinq premiers bains et une heure (3 x 20 minutes) pour chacun des deux derniers.

Inclusion

Elle se fait, selon la méthode décrite par LUFT (1961) dans une résine aliphatique ; c'est l'EPON 812 qui est utilisée.

Cette résine est en fait une solution complexe (appelée solution C) et composée de :

- Epon 812	44,12 %
- D.D.S.A.	30,39 %
- M.N.A.	23,53 %
- D.M.P. 30	1,96 %

Avant l'inclusion proprement dite, les tissus fixés et déshydratés sont infiltrés pendant une heure par un mélange constitué de 50 % d'oxyde de propylène et de 50 % de solution C.

Ils sont ensuite placés dans la solution C et y séjournent douze à vingt heures à température ambiante.

Ce délai écoulé, l'inclusion définitive dans la solution C se réalise dans un moule de silicone (LADD) permettant à la fois l'orientation et la numérotation des échantillons.

L'ensemble est laissé à température ambiante six heures puis mis à polymériser en étuve à 55°C. La polymérisation totale demande soixante-douze heures.

Coupe

Les blocs de résine contenant les échantillons sont débités en coupes fines d'une épaisseur d'environ soixante nano-mètres. Cette opération est effectuée sur un ultramicrotome automatique (REICHERT, OMU 3). Les coupes obtenues sont récupérées sur grilles.

Double coloration positive

Selon les techniques décrites par HUXLEY et ZUBAY (1961) et par REYNOLDS (1963), des atomes de métaux lourds sont fixés sur certaines structures de façon à obtenir une image contrastée en microscopie électronique.

Les coupes sur grilles sont dans un premier temps mises en contact d'acétate d'uranyle à 1 % en tampon maléate de sodium, pH 5,2 puis soumises pendant quinze minutes à l'action du nitrate de plomb dans la solution de REYNOLDS (1963).

Les grilles, lavées une seconde fois à l'eau bidistillée et séchées à l'abri de la poussière, sont alors prêtes pour l'observation.

Examen en microscopie électronique

Il se fait sur un ELMISKOP 1A de SIEMENS.



Figure 6 : Isolement purifié de capillaires télencéphaliques en microscopie optique. Les éléments cellulaires sont viables car ils ne sont pas color es par le bleu trypan présent dans le milieu.

(Gross. : x 600)

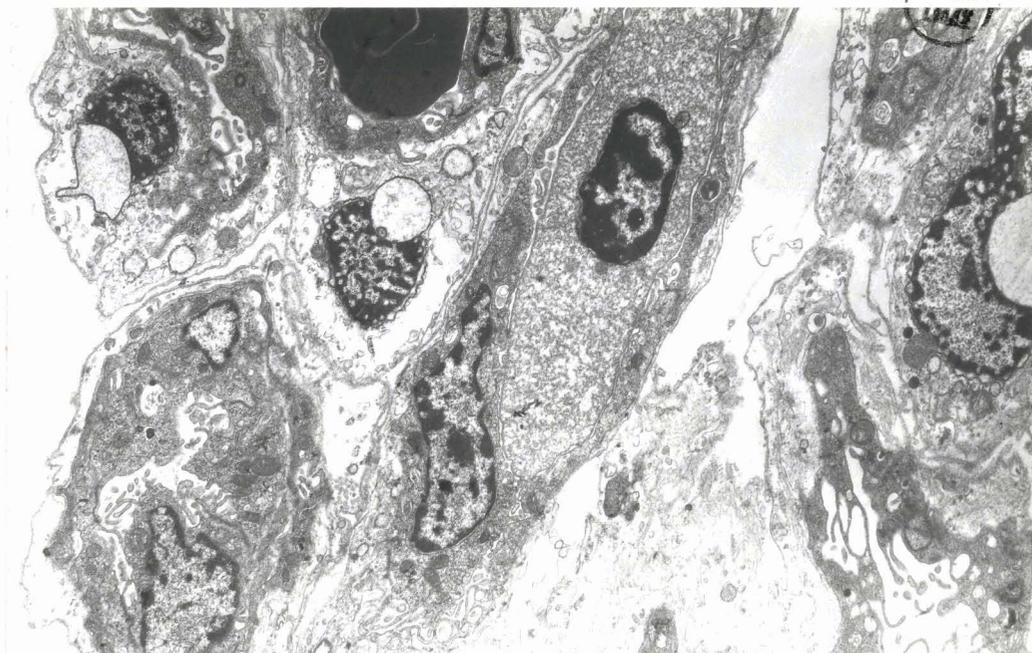


Figure 7 : Fraction microvasculaire isolée de télencéphaliques de poulets de trente jours, observée en microscopie électronique.

(Gross. : x 6000)

III - RESULTATS

1 - CONTROLE DE L'ISOLEMENT DES CAPILLAIRES EN MICROSCOPIE OPTIQUE

(Fig. 6)

De nombreux examens à faible grossissement révèlent la qualité de nos isollements de micro-vaisseaux.

Les éléments isolés par notre technique sont en grande majorité des fragments vasculaires très fins et plus ou moins branchus. Sont également parfois rencontrés mais en proportions minimales, quelques érythrocytes et des vaisseaux sanguins d'un diamètre supérieur.

Nous pouvons donc estimer à 85-90 % la proportion de capillaires dans nos isollements. De plus, ces éléments n'apparaissent aucunement détériorés.

2 - CONTROLE DE L'ISOLEMENT DES CAPILLAIRES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE (Fig. 7)

Ces observations confirment et complètent celles effectuées en microscopie optique.

Les coupes montrent un agrégat de vaisseaux de faible diamètre, coupés longitudinalement, transversalement ou obliquement. Bien que présentes dans nos échantillons, artérioles et veinules sont peu nombreuses et la proportion de capillaires précédemment évaluée est vérifiée.

L'ultrastructure des cellules endothéliales est bien préservée. Rarement, quelques citernes d'ergastoplasme paraissent légèrement dilatées.

Les éléments non vasculaires sont, soit des érythrocytes enfermés dans la lumière vasculaire, soit des éléments gliaux, de type pieds astrocytaires, très abîmés, restés accolés à certains microvaisseaux.

IV - DISCUSSION

MEEZAN et al. (1974) et BRENDÉL et al. (1974) sont les premiers à utiliser des tamis pour isoler des fractions purifiées de micro-vaisseaux

rétiniens et cérébraux. Par comparaison avec les techniques antérieures (SIAKOTOS et al., 1968 ; JOÓ et KARNUSHINA, 1973), la simplicité de leur méthode et le gain de temps sont indéniables. Mais leurs échantillons contiennent à la fois artérioles, veinules et capillaires.

Leur protocole est adapté par CECHELLI (1980) au poulet de trente jours, en vue de l'obtention de capillaires télencéphaliques. C'est cette procédure expérimentale que nous reprenons, moyennant plusieurs modifications : CECHELLI (1980) utilise en effet pour les tamisages des toiles à mailles de 212 μm pour le premier et à mailles de 90 μm pour le second. De plus, lors de la centrifugation finale qu'il effectue à basse accélération (3 000 g), il ne recueille que la pellicule surnageante. Bien qu'obtenant ainsi un isolement capillaire de grande pureté, les pertes de matériel sont importantes et le rendement de la manipulation est faible.

Ceci s'annonce gênant pour une mise en culture, où la quantité de matérielensemencée doit être élevée.

Notre objectif était donc l'augmentation de la quantité de l'isolement, sans détérioration de son degré de pureté et de la viabilité des tissus.

Récemment, BUZNEY et MASSICOTTE (1979) et FRANK et al. (1979) substituent un tamis à mailles de 53 μm de côté au second tamis à mailles de 90 μm de côté, avec une réelle augmentation des quantités de capillaires isolés. C'est ainsi qu'après tâtonnements, l'adoption d'une taille de mailles de 60 μm de côté pour la seconde filtration nous permet de doubler la quantité de nos isolements.

De même, en effectuant la première filtration sur un tamis à mailles de 180 μm de côté et en augmentant considérablement le volume de solution de MEEZAN servant à laver le second tamis, l'élimination d'éléments cellulaires indésirables dans l'isolement final est considérablement accrue : les observations microscopiques démontrent en effet que la qualité de l'isolement des capillaires télencéphaliques n'est pas détruite par l'accroissement de rendement obtenu.

B - CULTURE DES CELLULES ENDOTHELIALES

I - ANALYSE DE LA LITTERATURE ET CHOIX DE LA TECHNIQUE

1 - PREMIERS TRAVAUX

LOEB (1897), en réussissant à maintenir en vie des cellules sanguines et conjonctives à l'extérieur de l'organisme dont elles étaient issues, fut certainement le premier à réaliser une culture de tissu animal.

En 1921, LEWIS observe pour la première fois la croissance "in vitro" de cellules endothéliales issues d'explants embryonnaires de foie de Poulet.

Pendant les trente années qui suivent, une multitude de travaux se succèdent (MAXIMOW, 1925 ; SILBERBERG, 1930 ; SHIBUYA, 1931 ; WHITE et PARSHLEY, 1951). Mais tous les chercheurs utilisent la méthode de l'explant, avec ses limitations : faibles rendements, identifications difficiles et hétérogénéité des types cellulaires.

Le problème est alors de classer ces cellules cultivées en différents types. Par des procédés de "clonage" (LAZZARINI - ROBERTSON, 1961) ou histologiques (POLLAK et KASAI, 1964), les auteurs arrivent à séparer et à cultiver sélectivement le type "endothelial". La limitation de ces techniques reste néanmoins toujours le faible nombre de cellules.

Un progrès important est accompli par MARUYAMA (1963) puisqu'il obtient un rendement supérieur en cellules endothéliales.

Pour cela, il dissocie l'intima de veines ombilicales humaines par trypsinisation, lave les cellules ainsi obtenues et les met en culture. Ces cellules tendent alors à former des tapis épithéliaux, viables deux à trois semaines. L'identification de ces cellules est basée uniquement sur la démonstration histologique de leur origine, en observant l'absence du revêtement endothelial des vaisseaux traités. Cependant, plusieurs problèmes

AUTEURS - ANNEES	MATERIEL	PRINCIPE DE BASE UTILISE POUR L'OBTENTION DES CELLULES	COMPOSITION DE BASE DU MILIEU DE CULTURE
MARUYAMA (1963)	Veine ombilicale humaine	Digestion par trypsine	Milieu Y.L.H. + 20 % sérum d'homme ou de cheval
POMERAT et SLICK (1963)	Aorte de lapin	Digestion par trypsine	Milieu d'EAGLE + 10 % S.V.F.
JAFTE et al. (1973)	Veine ombilicale humaine	Digestion par collagénase	Milieu 199 + 20 % S.V.F.
LEWIS et al. (1973)	Veine ombilicale humaine	Raclage mécanique et digestion par trypsine	Milieu 199 + 10 % S.V.F.
GIMBRONE et al. (1974)	Veine ombilicale humaine	Digestion par collagénase	Milieu 199 + 20 % S.V.F. + tampon H.E.P.E.S.
HAUDENSCHILD et al. (1975)	Veine ombilicale humaine	Digestion par collagénase	Milieu 199 + 20 % S.V.F. + tampon H.E.P.E.S.
GIMBRONE (1976)	Veine ombilicale humaine	Digestion par collagénase	Milieu 199 + 20 % S.V.F.
MACARAK et al. (1977)	Aorte de veau	Digestion par collagénase	Milieu 199 + 20 % S.V.F.
ESKIN et al. (1978)	Aorte et saphène de boeuf	Digestion par collagénase	Milieu de McCOY 5a + 10 % S.V.F.
RYAN et al. (1978)	Artère pulmonaire de boeuf	Digestion par collagénase	Milieu 199 + 30 % S.V.F.
SCHWARTZ (1978)	Aorte de boeuf	Digestion par collagénase	Milieu de WAYMOUTH + 30 % S.V.F.
CHRISTOFINIS et al. (1979)	Aorte de lapin - Veine ombilicale humaine	Digestion par trypsine	Milieu 199 + 20 % S.V.F.
JONES (1979)	Artère pulmonaire de boeuf	Raclage mécanique	Milieu M.E.M. + 10 % S.V.F. + 2 % bouillon tryptose-phosphate
DAVISON et al. (1980)	Veine marginale de lapin	Digestion par trypsine	Milieu M.E.M. + 10 % sérum de lapin
MERRILEES ET SCOTT (1981)	Aortes de rat et de porc	Digestion par collagénase	Milieu 199 + 10 % S.V.F.
NEES et al. (1981)	Coronaire de cobaye	Digestion par collagénase et trypsine	Milieu 199 + 20 % S.V.F.
GLASSBERG et al. (1982)	Artère iliaque humaine	Digestion par collagénase	Milieu 199 + 20 % sérum humain + tampon H.E.P.E.S. + 2 µg/ml α thrombine

TABLEAU II : Récapitulation sommaire des travaux les plus récents de mise en culture de cellules endothéliales. Le classement est effectué par ordre chronologique.

demeurent :

* Ces cellules endothéliales, bien que viables, semblent incapables de se multiplier en culture (MARUYAMA, 1963).

* Au contraire, certaines cellules contaminantes de type fibroblastique, se développent rapidement (POMERAT et SLICK, 1963). Elles envahissent ainsi les cultures endothéliales, les rendant inutilisables.

2 - TRAVAUX RECENTS

a) Culture de l'endothélium (Tableau II)

Comme les isolements endothéliaux réalisés avec la trypsine (MARUYAMA, 1963) donnent des cultures contaminées et incapables de proliférer, JAFFE et al. (1973), GIMBRONE et al. (1974), GIMBRONE (1976) ont l'idée de lui substituer la collagénase. Ils obtiennent ainsi des cultures primaires d'endothélium homogènes et sous-cultivables à moyen terme.

Depuis, de nombreux auteurs (*voir Tableau II*) ont adapté cette technique à une multitude de tissus, dans le but d'isoler l'endothélium de leurs vaisseaux. Tous ces travaux ont pour effet de mieux définir les conditions de la digestion enzymatique et celles de la culture, afin de préserver la viabilité des cellules et de limiter les contaminations.

LEWIS et al. (1973) et JONES (1979) obtiennent également des cultures endothéliales, simplement en curetant la surface interne de gros vaisseaux.

b) Milieux de culture

De 1910 à 1959, de nombreux milieux de cultures synthétiques ont été décrits et utilisés (CARREL et BURROWS, 1910 ; LEWIS et LEWIS, 1912 ; EAGLE, 1955 ; WILLMER, 1958 ; PUCK et al., 1958 ; McCOY et al., 1959). Les études sur des additions d'extraits biologiques, hormonaux, vitaminiques ou autres aux milieux de culture se sont succédées (MARUYAMA, 1963 ; LEWIS et al., 1973 ; TAPPER et al., 1981 ; FENSELAU et al., 1981 ; BENSCH et al., 1983).

AUTEURS	ANNEES	MATERIEL	TECHNIQUE DE BASE	COMPOSITION DE BASE DU MILIEU
DEL VECCHIO et al.	1977	Surrénales de rat	Hachage - Digestion totale par collagénase - Mise en culture	Milieu 199 + 20 % S.V.F.
PHILLIPS et al.	1979	Substance blanche de rat ou de boeuf	Hachage - Digestion totale par trypsine - Mise en culture	Milieu 199 + 20 % S.V.F.
DAVISON et al.	1980	Prépuce humain	Digestion par trypsine et EDTA (totale) - Raclage des cellules endothéliales - Mise en culture	Milieu M.E.M. + 10 % sérum humain
SHERER et al.	1980	Prépuce humain	Digestion par dispase et collagénase (totale) - Isolement de l'endothélium - Mise en culture	Milieu F-12 K + 5 à 20 % S.V.F. ou sérum humain
BJÖRNTORP et al.	1983	Bourrelet graisseux de l'épididyme de rat	- Digestion totale par la collagénase - Mise en culture	Milieu 199 + 20 % S.V.F. + insuline
WAGNER et MATTHEWS	1975	Bourrelet de l'épididyme de rat	- Isolement de capillaires - Mise en culture	Milieu 199 + 20 % S.V.F.
BUZNEY et MASSICOTTE	1979	Rétine de fœtus de veau	- Isolement de capillaires - Mise en culture	Milieu de HAM F-12 + 20 % S.V.F.
DeBAULT et al.	1979	Cerveau de souris	- Isolement de capillaires - Mise en culture	Milieu 199 + 20 à 30 % S.V.F.
FRANK et al.	1979	Rétine de chat	- Isolement de micro-vaisseaux - Mise en culture	Milieu de HAM F-12 + 10 % S.V.F.
FOLKMAN et al.	1979	Surrénales de boeuf	- Digestion totale par collagénase - Isolement des capillaires - Mise en culture	Milieu de DULBECCO + 10 % S.V.F.
BLOUIN	1980	Téleencéphale de poulet	- Isolement de capillaires - Digestion par collagénase - Mise en culture	Milieu 199 + 20 % S.V.F. + tampon H.E.P.E.S.
SPATZ et al.	1980	Cerveau de rat	- Isolement de micro-vaisseaux - Digestion par trypsine-collagénase - Mise en culture	Milieu 199 + 30 % S.V.F.
DIGLIO et al.	1982	Cerveau de rat	- Isolement de micro-vaisseaux - Digestion par collagénase - Mise en culture	Milieu DULBECCO + 20 % S.V.F.
BOWMAN et al.	1981	Cerveau de rat	- Isolement de capillaires - Digestion par collagénase-dispase - Purification sur gradient de densité - Mise en culture	Milieu HAM F-12 + 10 à 20 % S.V.F.
BOWMAN et al.	1982	Rétine de boeuf	- Isolement de capillaires - Digestion par collagénase-dispase - Purification sur gradient de densité - Mise en culture	1/2 milieu de HAM F-12 + 1/2 milieu DULBECCO + 10 % S.V.F. + tampon H.E.P.E.S.

TABLEAU III : Récapitulation des travaux de mise en culture de cellules endothéliales de micro-vaisseaux.
Les trois procédures expérimentales exposées dans le texte sont dégagées.
Le classement est chronologique.



C'est ainsi que, dans le cas de l'endothélium, des résultats reproductibles peuvent être obtenus avec des milieux standards riches, tel le milieu 199 (*Tableau IV*) et que des concentrations fortes en séra homo- ou hétérologues apparaissent nécessaires pour une croissance optimale.

EAGLE (1971) a, en outre, démontré l'effet néfaste des variations de pH. Il recommande, à la fois l'utilisation de tampons, tels le bicarbonate et l'H.E.P.E.S. et l'enrichissement de la teneur en CO₂ atmosphérique, surtout pour de petites cultures.

c) Sous-cultures

Ce type de propagation est important, en particulier à cause du faible nombre de cellules disponibles en culture primaire. L'opération consiste en une fragmentation d'une culture confluyente, afin d'ensemencer de nouvelles fioles avec la population cellulaire obtenue. Plusieurs méthodes de division ont été décrites, parmi lesquelles nous citerons :

- * Raclages mécaniques (LEWIS et al., 1973)
- * Collagénase - E.D.T.A. (JAFTE et al., 1973)
- * Trypsine (SLATER et SLOAN, 1975)
- * Trypsine - E.D.T.A. (GIMBRONE, 1976).

3 - CULTURE DE L'ENDOTHELIUM MICRO-VASCULAIRE

Actuellement et, comme en témoigne la bibliographie précédemment exposée (*Tableau II*), l'isolement et la culture de l'endothélium de gros troncs vasculaires sont devenus des techniques de routine.

Il en va tout autrement pour les endothélia micro-vasculaires. Il est en particulier remarquable que peu d'essais de mise en culture d'endothélia capillaires aient été réalisés (*Tableau III*). Les difficultés rencontrées lors de la culture de ce type d'endothélium sont en fait de trois ordres :

- * La séparation des cellules endothéliales de leur environnement tissulaire est très délicate.
- * La viabilité des isollements cellulaires obtenus est faible et la

prolifération des cellules "in vitro" est lente.

* La contamination des cultures endothéliales par d'autres types de cellules est importante.

L'examen de la bibliographie sur la culture des endothélia micro-vasculaires (*Tableau III*) dénote une certaine évolution des techniques :

* Plusieurs auteurs, tels DEL VECCHIO et al. (1977), PHILLIPS et al. (1979), SHERER et al. (1980), DAVISON et al. (1980), BJÖRNTORP et al. (1983) provoquent une attaque enzymatique de la totalité du tissu étudié. La culture est ensuite directementensemencée avec la suspension cellulaire obtenue. Bien que contenant une forte population endothéliale, ces cultures sont contaminées par de nombreux autres types cellulaires (*Tableau III_A*).

* La solution de ce problème est alors évidente : il suffit d'isoler les micro-vaisseaux avant de les introduire en culture. C'est ce que réalisent WAGNER et MATTHEWS (1975), BUZNEY et MASSICOTTE (1979), DeBAULT et al. (1979) et FRANK et al. (1979). Ces résultats sont encore améliorés par une digestion des micro-vaisseaux isolés, avant l'ensemencement (FOLKMAN et al., 1979 ; BLOUIN, 1980 ; SPATZ et al., 1980 ; DIGLIO et al., 1982) (*Tableau III_B*).

* Il faut néanmoins attendre les travaux de BOWMAN et al. (1981, 1982) pour obtenir une purification poussée des cellules endothéliales isolées et donc des cultures dénuées de cellules contaminantes (*Tableau III_C*).

II - METHODES

1 - ISOLEMENT ET CULTURE DES CELLULES ENDOTHELIALES (*Fig. 8*)

Le protocole expérimental est une modification de celui décrit par BOWMAN et al. (1981).

a) *Digestion enzymatique des capillaires cérébraux*

Après la dernière centrifugation, nous avons obtenu un culot

Capillaires télencéphaliques



Digestion enzymatique
par la collagénase



Lavage



Passage sur gradient
de PERCOLL



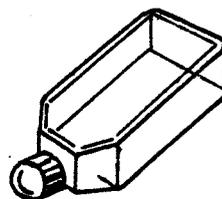
Récupération
des bandes cellulaires



+ Milieu de culture complet



Boîte FALCON de 25 cm²



Incubateur 39°C
97 % Air + 3 % CO₂



Figure 8 : Résumé du protocole expérimental utilisé pour l'obtention et la mise en culture des cellules endothéliales.

de capillaires télencéphaliques. Ce culot est transvasé dans un erlenmeyer de 50 ml, muni d'un bouchon à vis et contenant 15 ml du milieu de digestion suivant :

- 100 ml de milieu 199 avec sels de HANKS
- + 6 ml de S.V.F. (EUROBIO)
- + 1 ml de tampon H.E.P.E.S. 1 M
- + 0,4 ml de L-glutamine 200 mM
- + 30 000 U.I. de pénicilline
- + 30 mg de streptomycine
- + 500 µg de fungizone
- + 81 mg de collagénase C.L.S. II (WORTHINGTON BIOCH. CORP.)

ajusté à pH 7,1 et stérilisé.

Il s'agit en fait d'un milieu de culture complet, tamponné par de l'H.E.P.E.S., enrichi en antibiotiques et en antifongiques et contenant 0,75 mg/ml de collagénase. L'erlenmeyer est placé pendant seize à dix-sept heures dans un bain-marie (SALVIS) à 39°C et agité à 50 A.R./min.

Ce milieu de digestion et les conditions de la manipulation ont été déterminés expérimentalement au laboratoire par de nombreux essais suivis d'observations microscopiques.

b) Lavage

A la fin de cette période de digestion, la suspension est centrifugée à 250 g pendant dix minutes (Centrifugeuse JANETZKI T 32c). Elle est ensuite lavée avec 10 ml de milieu 199 contenant 5 % de S.V.F. et centrifugée à nouveau.

c) Centrifugation en gradient de densité

Le PERCOLL (PHARMACIA F. Chem.) est une solution colloïdale de microbilles de silice recouvertes de polyvinylpyrrolidone. Il a été spécialement mis au point pour permettre des séparations cellulaires et infra-cellulaires en gradients de densité isotoniques. Ne pénétrant pas dans l'espace intracellulaire, il est dénué de toute toxicité.

		Concentrations en mg/l			Concentrations en mg/l	
	- L-Arginine	70,00		- Vitamine A	0,10	
	- L-Cysteine, HCl	0,10	<i>Vitamines liposolubles</i>	- Vitamine D (Calciférol)	0,10	
	- L-Cystine	20,00		- Vitamine E (α -Tocophérol)	0,01	
	- L-Glutamine	100,00		- Vitamine K (Ménadione)	0,01	
	- L-Histidine	20,00				
	- D-L-Isoleucine	40,00	<i>Hydrates de carbone et dérivés</i>	- Acétate de Na - 3 H ₂ O	50,00	
	- D-L-Leucine	120,00		- Désoxyribose	0,50	
	- L-Lysine	70,00		- Glucose	1 000,00	
<i>Acides aminés essentiels</i>	- D-L-Méthionine	30,00		- Ribose-D	0,50	
	- D-L-Phénylalanine	50,00				
	- D-L-Thréonine	60,00				
	- D-L-Tryptophane	20,00				
	- L-Tyrosine	40,00		- Adénine	10,00	
	- D-L-Valine	50,00		- A.T.P. (Adénosine triphosphate) (Sel de Na)	1,00	
			<i>Dérivés d'acides nucléiques</i>	- Guanine	0,30	
	- D-L- α -Alanine	50,00		- Hypoxanthine	0,30	
	- D-L-Acide aspartique	60,00		- Thymine	0,30	
	- D-L-Acide glutamique - H ₂ O	150,00		- Uracile	0,30	
<i>Acides aminés non-essentiels</i>	- Glycine	50,00		- Xanthine	0,30	
	- L-Proline	40,00				
	- D-L-Sérine	50,00				
			<i>Lipides et dérivés</i>	- Cholestérol	0,20	
	- Acide adénylique	0,20		- Choline chlorure	0,50	
<i>Dérivés d'acides aminés</i>	- Glutathion	0,05		- i-Inositol	0,05	
	- L-Hydroxy-Proline	10,00				
			<i>Eléments minéraux</i>	Sels de la solution saline équilibrée de EARLE ou de la solution saline équilibrée de HANKS (TABLEAU V)		
	- Acide ascorbique	0,05				
	- D-Biotine	0,01				
	- Acide folique	0,01				
	- Acide Para-Amino-Benzoïque	0,05				
<i>Vitamines hydrosolubles et coenzymes</i>	- Acide nicotinique	0,025	<i>Autres composants</i>	- Nitrate ferrique	0,10	
	- Nicotinamide	0,025		- Rouge de Phénol	10,00	
	- Pantothénate-D-Ca	0,01		- Tween 80	5,00	
	- Pyridoxine-HCl	0,025				
	- Pyridoxal-HCl	0,025				
	- Riboflavine	0,010				
	- Thiamine	0,010				

TABLEAU IV : Composition du Milieu 199 (Documentation EURO BIO).



		Solution saline équilibrée de EARLE g/l	Solution saline équilibrée de HANKS g/l
Sels	- NaCl	6,800	8,000
	- KCl	0,400	0,400
	- CaCl ₂ - 2 H ₂ O	0,266	0,186
	- MgSO ₄ - 7 H ₂ O	0,200	0,100
	- MgCl ₂ - 6 H ₂ O	-	0,100
	- NaH ₂ PO ₄ - H ₂ O	0,125	-
	- Na ₂ HPO ₄ - 7 H ₂ O	-	0,090
	- KH ₂ PO ₄	-	0,060
	- NaHCO ₃	2,200	0,350
Autres composants	- Glucose	1,000	1,000
	- Rouge de Phénol	0,010	0,010

TABLEAU V : Composition des solutions salines équilibrées de EARLE
et de HANKS.

(Documentation EUROBIO)



- Etablissement de gradients de densité continus
de PERCOLL

Le PERCOLL, livré sous la forme d'une solution stérile à 23 % et de densité 1,13 g/ml, est dilué de la façon suivante :

* Neuf volumes de PERCOLL sont mélangés à un volume de milieu 199 avec sels de HANKS concentré dix fois.

* Puis on ajoute au PERCOLL rendu ainsi isotonique, dix volumes de milieu 199 avec sels de HANKS et contenant 10 % de S.V.F.

: Un milieu isotonique de PERCOLL à 50 %, de densité 1,064 g/ml et contenant 5 % de S.V.F. est ainsi obtenu.

Il est réparti dans des tubes de 13,5 ml en nitrate de cellulose (BECKMAN).

A l'un de ces tubes est ajouté un échantillonnage de billes marqueuses de densité (PHARMACIA F. Chem.), afin de calibrer les gradients qui seront obtenus.

Ceux-ci sont formés simplement par ultra-centrifugation (Ultra-centrifugeuse BECKMAN L5-65) à 26 000 g pendant 45 minutes en rotor à angle fixe de 26° (BECKMAN Type 40) et à une température de 4°C.

- Passage du matériel cellulaire sur le gradient de densité

Après ultra-centrifugation, 400 µl sont prélevés à la partie supérieure des gradients. Ils sont remplacés par :

- 400 µl de milieu 199 + 5 % de S.V.F. pour le tube contenant les billes marqueuses ;
- le matériel cellulaire digéré et resuspendu dans 300 µl de milieu 199 + 5 % de S.V.F., pour les autres tubes.

Une centrifugation de dix minutes à 1 000 g en rotor à godets oscillants (Centrifugeuse HERAEUS - CHRIST MINIFUGE) suffit pour que le matériel

cellulaire se fixe au niveau du gradient correspondant à sa densité.

- Récupération des cellules

La bande correspondant à l'endothélium (et éventuellement les autres bandes) est alors prélevée à la pipette, diluée par un volume égal de milieu 199 + 5 % de S.V.F. et centrifugée à 500 g pendant dix minutes (Centrifugeuse JANETZKI T 32c). Aucun lavage des cellules n'est nécessaire car le PERCOLL n'est pas toxique et n'adhère pas aux membranes cellulaires.

d) *Mise en culture*

- Préparation du milieu de culture standard complet

A 100 ml de milieu 199 avec sels de HANKS, sont ajoutés 20 ml de S.V.F., 1 ml d'H.E.P.E.S. 1 M, 0,4 ml de L-glutamine 200 mM, 20 000 U.I. de pénicilline, 20 mg de streptomycine et 250 µg de fungizone.

- Ensemencement

Le culot cellulaire est resuspendu dans 12 à 24 ml de milieu de culture et, après agitation douce, la suspension obtenue est répartie dans 2 à 4 fioles de culture en plastique (FALCON réf. 3013 F - 25 cm²) (Fig. 6), à raison de 6 ml par fiole.

Celles-ci sont placées dans un incubateur dont la température est réglée à 39°C et dont l'atmosphère est constituée de 3 % de CO₂ et de 97 % d'air. Les fioles sont laissées rigoureusement immobiles.

- Traitement ultérieur

Au bout de trente heures, le premier milieu est éliminé, l'intérieur de la fiole est lavé trois fois avec du milieu de culture complet mais ayant cette fois comme base les sels de EARLE.

Il est ensuite renouvelé régulièrement tous les trois jours.

- Sous-cultures

En six à huit jours (suivant la quantité de l'ensemencement), la mono-couche cellulaire formée est confluyente. La prolifération des cellules est alors ralentie par inhibition de contact et le tapis cellulaire risque le décollement.

Le contenu de la fiole est alors moissonné par une solution saline de HANKS sans Ca^{++} ni Mg^{++} , contenant 0,05 % de trypsine (WORTHINGTON BIOCH. CORP.) et 0,02 % d'E.D.T.A. (SIGMA). Lorsque les cellules sont détachées de la surface de culture, 10 ml de milieu 199 complet sont ajoutés et la moitié de la suspension est transvasée dans une seconde fiole FALCON. Les deux fioles sont replacées en incubateur.

2 - CONTROLES MICROSCOPIQUES

a) *Microscopie optique*

- Observation du matériel

Comme nous l'avons précédemment décrit, c'est la microscopie à contraste de phase qui, ici encore, nous permet un contrôle immédiat des isolements et des cultures de cellules.

- Mesure de la viabilité des cellules

Le test simple d'exclusion du bleu trypan décrit par MANFORDK et PATTERSON (1979) est utilisé. Le principe en est simple et rapide : si des cellules, placées dans une solution physiologique contenant 0,04 % de bleu trypan ne sont pas colorées au bout de cinq minutes, elles sont viables.

b) *Microscopie électronique*

- Fraction cellulaires

La préparation des échantillons est identique à celle utilisée pour les isolements de capillaires.

- Cultures cellulaires

Le protocole est modifié de façon à permettre l'inclusion "en place" des cellules en culture dans la fiole FALCON en plastique :

* La fixation et la déshydratation jusque l'alcool 100 se font dans la boîte de culture.

* L'oxyde de propylène dissolvant le plastique, le passage dans ce produit est remplacé par un bain supplémentaire de trente minutes dans l'alcool absolu.

* Le mélange d'infiltration est alors constitué pour 50 % d'alcool absolu et pour 50 % de solution C.

* La face supérieure de la boîte FALCON est découpée et une épaisseur de 5 mm de solution C est coulée sur le tapis cellulaire.

* Après polymérisation (six heures à 20°C, douze heures à 37°C et soixante-douze heures à 55°C), le plastique est décollé et la résine découpée en petits blocs.

* La suite des opérations est inchangée.

* Il convient cependant de signaler que les coupes sont, dans ce cas, récupérées sur des grilles à mailles plus grandes, recouvertes d'une membrane de PARLODION.

III - RESULTATS

1 - DIGESTION DES CAPILLAIRES PAR LA COLLAGENASE

a) *Microscopie optique*

Un examen à faible grossissement nous montre la transformation qu'ont subie, sous l'action de la collagénase, les capillaires isolés.

L'architecture observée avant la digestion enzymatique (*Fig. 6*) est détruite (*Fig. 9*) : à la place des fragments de vaisseaux, ne se rencontrent plus dans le milieu que des cellules arrondies, soit isolées, soit groupées par deux, trois ou par paquets beaucoup plus importants.

Sont également visibles des érythrocytes, reconnaissables à leur forme ovale, en nombre beaucoup plus important que dans les isolements de capillaires.

L'exclusion du bleu trypan ajouté dans le milieu, par pratiquement

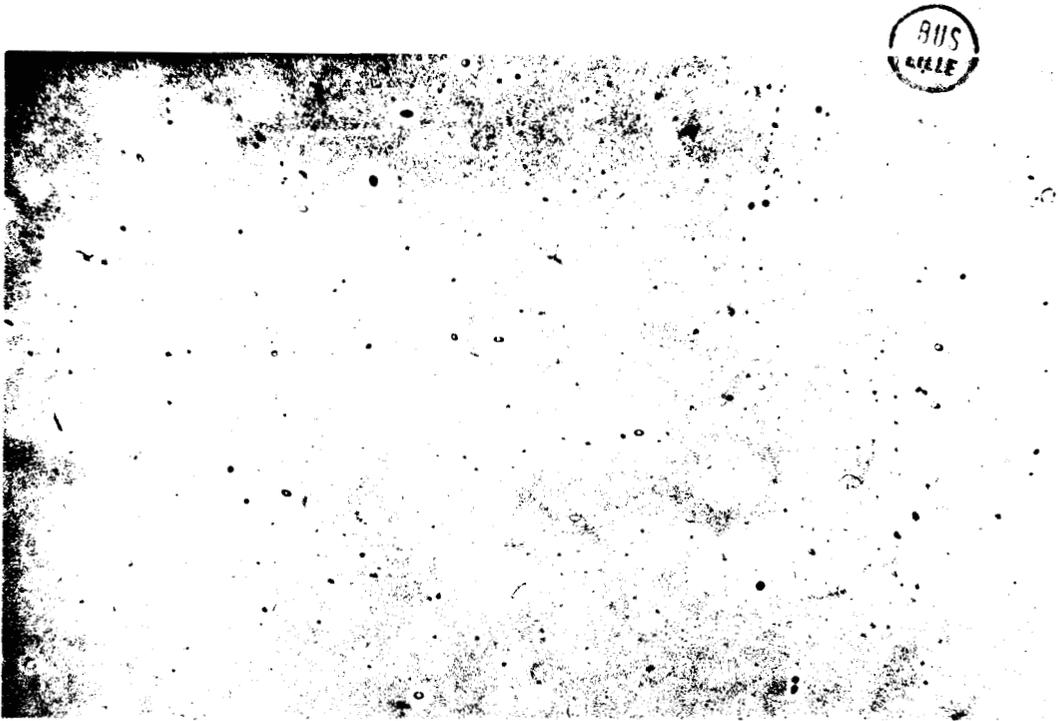


Figure 9 : Suspension cellulaire obtenue après digestion des capillaires par la collagénase.

(Gross. : x 300)

tous ces éléments cellulaires, démontre leur viabilité. Par contre, de minuscules éléments non identifiables à ces grossissements présentent parfois une coloration bleue intense.

b) Microscopie électronique

L'observation de la suspension cellulaire, obtenue après digestion de seize heures des capillaires par la collagénase, en microscopie électronique permet d'identifier précisément les éléments qui la composent.

Ce sont :

* De nombreux débris cellulaires, principalement des résidus de pieds astrocytaires, des fragments membranaires et également des cellules altérées.

* Des cellules libres ou encore groupées entre elles par des systèmes jonctionnels. Leur ultrastructure est bien préservée. Elles constituent la majorité de la population de cette fraction.

* D'autres types cellulaires tels que :

- des érythrocytes, très nombreux, maintenant libérés de la lumière vasculaire.
- des cellules musculaires lisses et vraisemblablement des péricytes.

c) Conclusion

Nous obtenons donc, après une nuit de digestion, un ensemble très hétérogène contenant certainement une forte proportion de cellules endothéliales mais aussi de nombreux déchets, des érythrocytes et des cellules de types différents.

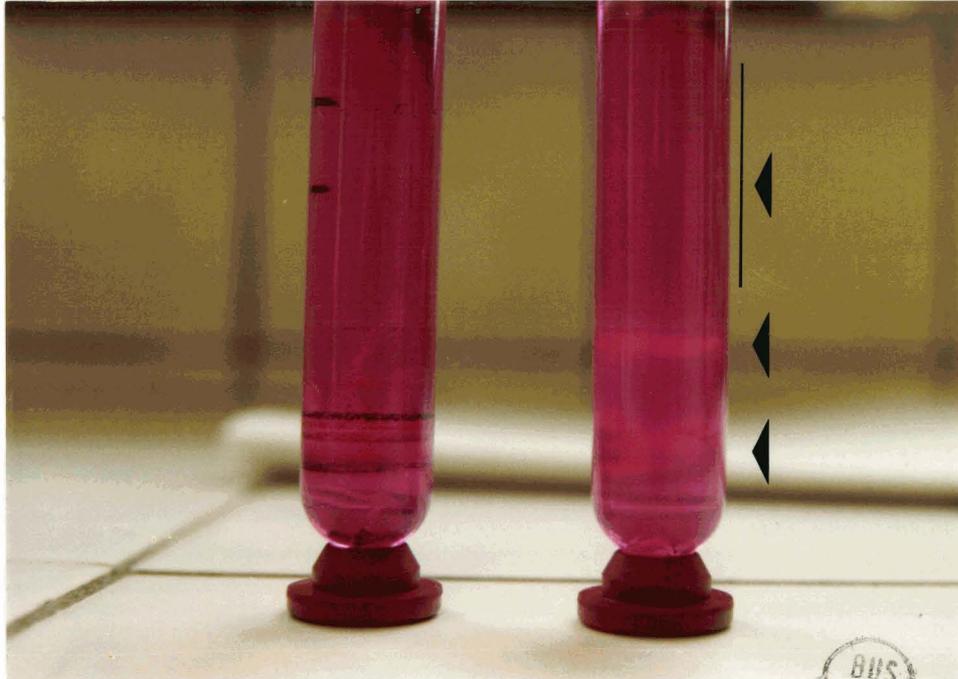


Figure 10 : Fractionnement obtenu après passage des capillaires digérés par la collagénase sur gradient continu de PERCOLL. Le tube de gauche contient les billes marqueuses de densité, celui de droite les éléments cellulaires (Flèches).

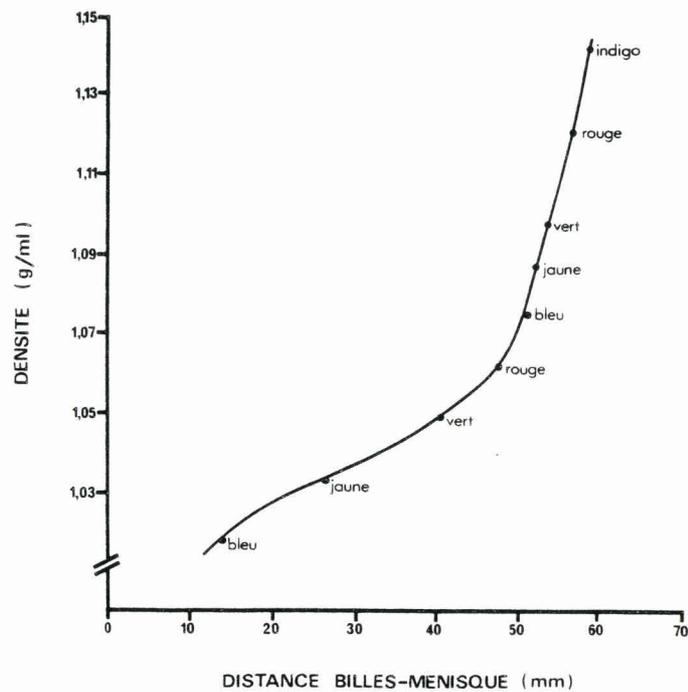


Figure 11 : Profil du gradient de densité de PERCOLL, obtenu à l'aide des billes marqueuses.

2 - GRADIENTS DE PERCOLL

a) Gradients (Fig. 10 et 11)

La figure 10 nous montre le résultat de la purification de l'endothélium capillaire sur gradient de densité :

* Le tube de gauche contient les billes marqueuses qui, après centrifugation, se sont réparties à leurs densités respectives. Le profil du gradient de densité (Fig. 11) est ainsi déduit très précisément. Il sert donc d'étalon pour le tube contenant le matériel cellulaire, la préparation et les conditions de centrifugation des deux tubes étant les mêmes.

* Le tube de droite (Fig. 10'), quant à lui, nous indique de quelle façon s'est répartie, dans le gradient, la suspension obtenue après digestion du matériel capillaire. Trois bandes de matériel y sont délimitables de bas en haut :

- une première, très fine, de teinte carminée et de densité 1,117 g/ml ;
- une seconde, plus épaisse, de teinte blanche et de densité comprise entre 1,048 et 1,052 g/ml ;
- une troisième, beaucoup plus diffuse et occupant pratiquement toute la partie supérieure du gradient c'est-à-dire entre des densités de 1,015 et 1,040 g/ml.

b) Microscopie

Après prélèvement, chacune de ces zones cellulaires peut être observée en microscopie optique en contraste de phase et en microscopie électronique à transmission.

- Zone de densité 1,117 g/ml (Fig. 12)

Elle contient une majorité d'éléments cellulaires ovales et nucléés. La microscopie électronique nous montre que cette phase cellulaire de densité élevée est en fait une fraction purifiée d'érythrocytes (Fig. 12).

Figure 14 :

Zone de faible densité
= débris cellulaires

Gross. : x 3200

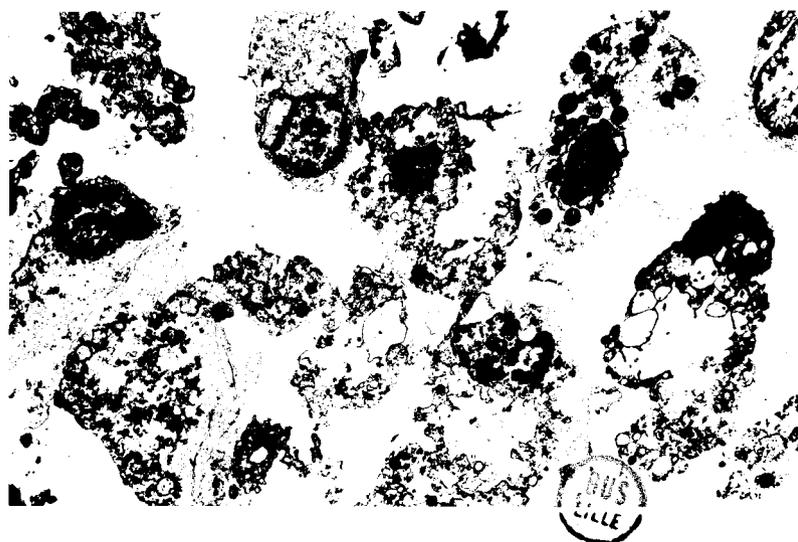


Figure 13 :

Zone de densité moyenne
= cellules endothéliales

Gross. : x 4500

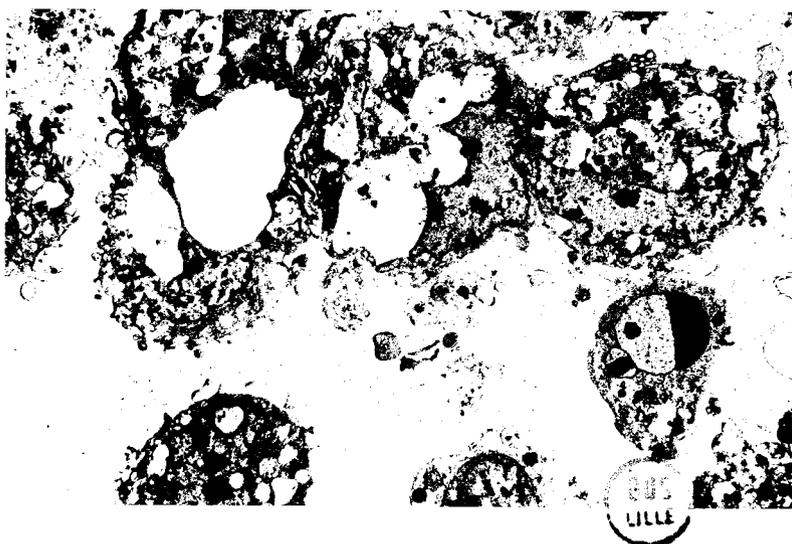


Figure 12 :

Zone de densité élevée
= érythrocytes

Gross. : x 3800



Figures 12, 13, 14 : Observation en microscopie électronique des trois bandes obtenues par passage des capillaires digérés sur gradient de PERCOLL.

- Zone de densité 1,048 à 1,052 g/ml (Fig. 13)

Nous retrouvons dans cette zone les petites cellules arrondies isolées ou groupées en paquets plus ou moins importants qui constituaient la majorité des éléments cellulaires rencontrés après digestion des capillaires (Fig. 9). Le test du bleu trypan démontre que 90 à 95 % de ces cellules sont viables.

Des coupes examinées en microscopie électronique (Fig. 13) montrent un agrégat cellulaire, formé soit de cellules isolées, soit de cellules encore réunies entre elles par des systèmes de jonctions étanches.

Certaines associations cellulaires rappellent même l'architecture vasculaire précédemment décrite.

Notons aussi que la lame basale est maintenant absente et que les résidus de pieds astrocytaires ont pratiquement disparu. La population cellulaire semble, comme dans le cas des érythrocytes, très uniforme et un examen de l'ultrastructure cellulaire montre une légère vacuolisation des cellules. Remarquons enfin que la quantité de matériel rassemblée dans cette zone est extrêmement importante.

- Zone de densité 1,015 à 1,040 g/ml (Fig. 14)

Dès la première observation, cette fraction ne semble être formée que d'éléments non identifiables aux faibles grossissements et pratiquement tous colorés par le bleu trypan. Quelques cellules, de teinte bleue elles aussi, se rencontrent parfois : la viabilité des éléments isolés est donc cette fois réduite à quelques pour-cent seulement.

La microscopie électronique (Fig. 14) nous montre un ensemble de cellules très altérées, fréquemment déchirées et une énorme proportion de pieds astrocytaires. Quelques cellules d'un type différent, en apparence, peuvent également se rencontrer dans cette fraction.

En résumé, les éléments regroupés dans cette zone sont, hormis quelques cellules entières, des déchets cellulaires.

3 - CULTURES CELLULAIRES

Par passage sur gradient de densité des capillaires digérés, trois phases cellulaires sont donc obtenues :

* La zone érythrocytaire : elle ne présente aucun intérêt dans le cadre de cette étude et est donc éliminée ;

* La zone supérieure contenant quelques rares cellules et la zone centrale regroupant la grande majorité des cellules obtenues par digestion des capillaires cérébraux, seront mises en culture.

De façon à en contrôler la croissance et à y déceler précocement une éventuelle contamination microbienne, un examen quotidien des cultures est nécessaire : celui-ci ne peut être effectué qu'au microscope inversé et à contraste de phase.

a) Mise en culture de la phase supérieure du gradient

Après vingt-quatre heures de culture dans les conditions standard précédemment énoncées, aucune structure cellulaire ne s'est fixée sur la surface de culture. L'altération de l'ensemencement est totale et définitive en quarante-huit à soixante-douze heures. Cette expérience prouve donc l'altération irréversible des éléments cellulaires de cette fraction.

b) Mise en culture de la phase centrale du gradient

(Fig. 15 à 18)

Comme nous pouvions le présumer et comme nous allons le découvrir, cet isolement cellulaire est en fait le seul à présenter un intérêt pour la culture cellulaire.

- Après vingt-quatre heures de culture

A ce stade, deux grandes modifications sont à noter :

* Le milieu de culture contient en suspension de très nombreux débris cellulaires, de petites tailles, ressemblant le plus souvent à des cellules

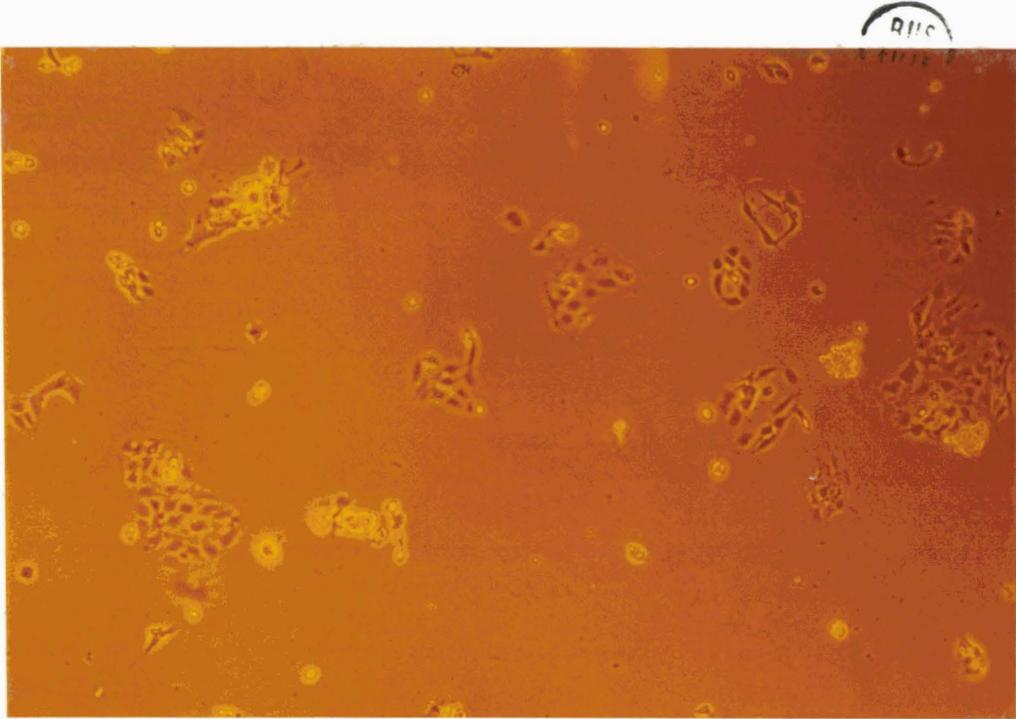


Figure 15 : Aspect d'une culture de cellules endothéliales vingt-quatre heures après l'ensemencement.

(Gross. : x 300)

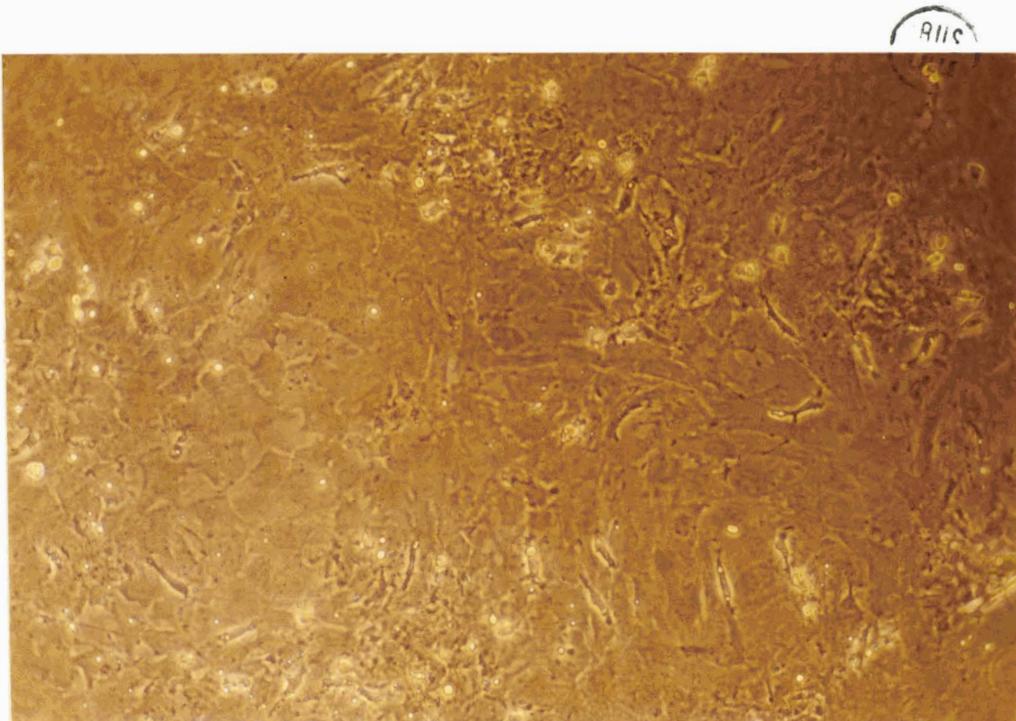


Figure 16 : Aspect d'une culture de cellules endothéliales de huit jours.

(Gross. : x 300)

mortes ou à des fragments membranaires. La proportion de ces déchets peut être estimée à 60 - 70 % de l'ensemencement primaire.

* Des colonies cellulaires (*Fig. 15*), de forme circulaire, se sont fixées et étalées sur la surface de culture. Leurs cellules sont polygonales et possèdent un noyau central peu dense et un cytoplasme mince et peu granuleux, sauf dans la région périnucléaire. Le contact inter-cellulaire dans ces colonies est très intime. Quelquefois, un amas plus dense, correspondant à une structure vasculaire rétractée peut être identifié.

A noter également que, parfois, certaines cellules, isolées ou groupées par deux ou trois, se referment sur elles-mêmes (*Fig. 15*) : la structure obtenue rappelle alors l'architecture vasculaire "in vivo", avec délimitation d'une "pseudo-lumière".

- De deux à huit jours de culture (*Fig. 16*)

La prolifération de ces colonies est très rapide. Par accroissement de la population et par migration des cellules de colonies adjacentes, la surface de culture est progressivement occupée et, en cinq à huit jours, le tapis cellulaire est totalement confluent. Les cellules polygonales sont alors parfaitement jointives et l'image obtenue (*Fig. 16*) est celle d'une mosaïque cellulaire dans laquelle se retrouvent les traces des îlots cellulaires primitifs.

Parfois, des cellules fusiformes semblent se développer sur le tapis cellulaire ainsi obtenu mais leur nombre reste extrêmement réduit.

- Suite de la culture (*Fig. 17 et 18*)

Lorsque la surface de la fiole est totalement couverte par le tapis cellulaire, la population est partiellement divisée à l'aide de trypsin - E.D.T.A. Une seconde boîte est ainsiensemencée.

La prolifération cellulaire reprend alors et, en quelques jours, les cultures filles sont, elles aussi, confluentes. L'image de leur tapis cellulaire est la même que celle obtenue avec la culture primaire. Il est possible d'effectuer ainsi une à trois sous-divisions.

BUS



Figure 17 : Aspect d'une culture de cellules endothéliales de trois semaines.

(Gross. : x 320)

BUS

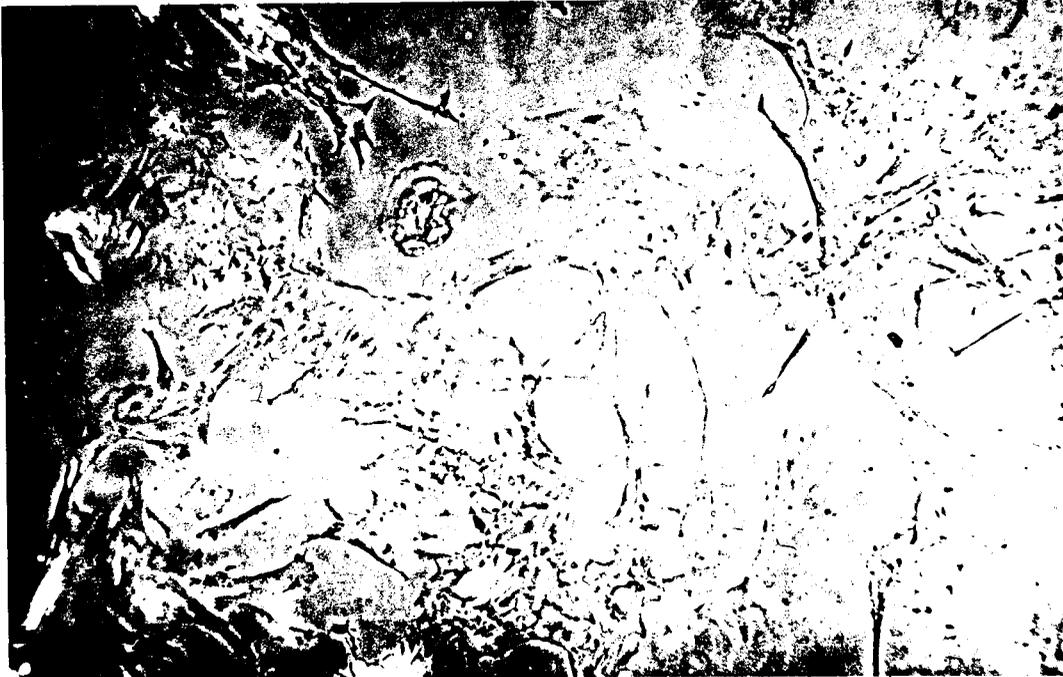


Figure 18 : Aspect d'une culture de cellules endothéliales de deux mois.

(Gross. : x 320)

Mais au bout d'une période, variable selon les cultures, correspondant en moyenne à deux ou trois semaines de culture au total, les cellules prennent rapidement un aspect altéré (*Fig. 17*). Le nombre des mitoses diminue considérablement et la prolifération devient extrêmement lente. Les cellules s'élargissent anormalement, se chevauchent parfois et prennent souvent des formes amiboïdes. Une vacuolisation importante apparaît en même temps. Il est néanmoins possible de conserver ces cellules "maladives" en culture pendant plusieurs mois. Les cellules restent cependant dans un état stable, sans plus jamais donner de couche confluente, puis meurent peu à peu (*Fig. 18*).

4 - EXAMEN DES CULTURES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Les coupes sont ici effectuées perpendiculairement à la surface de culture.

a) Cas de cultures "jeunes"

Les cellules apparaissent très étalées, extrêmement fines à la périphérie et réparties en une couche mono-cellulaire.

Les principaux organites intra-cytoplasmiques, très nombreux (mitochondries, appareil de GOLGI, ergastoplasme) ont une architecture visiblement intacte. Aucun autre organite particulier n'est observable dans nos échantillons.

b) Cas de cultures "âgées"

L'aspect des préparations est fondamentalement différent :

Les cellules sont réparties en plusieurs couches : il n'est pas rare d'observer trois à quatre strates cellulaires dans une coupe transversale.

Les organites intra-cellulaires sont très altérés. En particulier, des vésicules du réticulum et de nombreuses mitochondries sont très gonflées et dilatées, donnant à la cellule son aspect vacuolisé caractéristique de la sénescence.

Ces observations confirment donc totalement celles réalisées en microscopie optique.

IV - DISCUSSION

1 - OBTENTION DES CELLULES ENDOTHELIALES

Les deux méthodes d'obtention de ces cellules sont en fait directement induites par le matériel choisi :

* La première technique, la plus utilisée, consiste à "décaper" l'intima d'une voie sanguine de fort diamètre en perfusant le vaisseau avec une solution enzymatique (trypsine ou collagénase).

C'est ainsi que de grandes quantités de cellules endothéliales sont obtenues à partir d'aortes (POMERAT et SLICK, 1963 ; MACARAK et al., 1977 ; ESKIN et al., 1978 ; SCHWARTZ, 1978 ; MERRILEES et SCOTT, 1981), d'artères pulmonaires (RYAN et al., 1978 ; JONES, 1979), coronaires (NEES et al., 1981), ou iliaques (GLASSBERG et al., 1982), ou très souvent, de veines ombilicales humaines (MARUYAMA, 1963 ; JAFFE et al., 1973 ; LEWIS et al., 1973 ; GIMBRONE et al., 1974 ; HAUDENSCHILD et al., 1975 ; CHRISTOFINIS et al., 1979).

* Lorsqu'il s'agit de micro-vaisseaux, le protocole général est différent.

- Certains auteurs dissocient le tissu et le mettent directement en culture (DEL VECCHIO et al., 1977 ; PHILLIPS et al., 1979 ; BJÖRNTORP et al., 1983). Ils obtiennent alors des cultures endothéliales impures et pas uniquement originaires de capillaires.
- WAGNER et MATTHEWS (1975), puis BUZNEY et MASSICOTTE (1979) et DeBAULT et al. (1979) sont les premiers à réaliser un isolement préalable des micro-vaisseaux, avant leur mise en culture. Les isolements obtenus n'en sont pas moins impurs et restent difficilement identifiables.

Nos travaux, visant à dissocier la paroi capillaire de façon à obtenir une fraction de cellules endothéliales libres, fraction qui sera

ensuite purifiée, sont donc parmi les premiers de ce genre.

Les cellules endothéliales des capillaires cérébraux sont étroitement réunies entre elles par des systèmes jonctionnels très élaborés (DELORME et al., 1970 ; DELORME, 1971) et l'action de la collagénase pendant un temps bref ne suffit pas à rompre ces jonctions (BLOUIN, 1980). Il nous a donc fallu mettre au point un milieu particulier, de façon à préserver la viabilité des cellules pendant une attaque enzymatique de longue durée. La mise au point de cette technique nous a demandé de très nombreux essais, tels que :

- * L'essai de différentes enzymes, collagénase, trypsine, dispase ou encore d'E.D.T.A. et des combinaisons de ceux-ci ;
- * La recherche de la concentration optimale de la collagénase dans le milieu ;
- * L'étude de différents milieux physiologiques, plus ou moins élaborés.

Pourtant, malgré les conditions drastiques de cette digestion, la séparation des cellules endothéliales, les unes des autres, n'est pas totalement obtenue, vraisemblablement à cause de l'énorme résistance des "zonulae occludentes" les réunissant entre elles.

Néanmoins, l'objectif principal est atteint : séparer l'endothélium des autres structures du micro-vaisseau c'est-à-dire dissocier endothélium, lame basale, péricytes, résidus de pieds astrocytaires et éventuellement, cellules musculaires lisses.

Il apparaît donc inutile, dans le cadre de cette expérimentation, d'augmenter encore la puissance de la digestion, ce qui ne se traduirait sans doute que par une altération de la viabilité des cellules.

Par contre, il devient alors nécessaire et suffisant d'extraire la population endothéliale de l'ensemble hétérogène obtenu après digestion.

2 - PURIFICATION DES CELLULES

BOWMAN et al. (1981) sont les premiers à purifier, d'une façon pratiquement absolue, l'endothélium obtenu après digestion de capillaires cérébraux de Rat. Ils utilisent pour cela du PERCOLL et forment avec ce composé des gradients permettant la séparation d'éléments cellulaires dont les densités ne diffèrent que de quelques milligrammes par millilitre.

Nous avons également utilisé ce procédé avec le même succès.

Il suffit de partir d'une densité de PERCOLL voisine de celle du matériel à isoler et d'étaler fortement le gradient dans cette zone. Ces conditions réalisées, la purification du matériel est alors optimale : ceci est vérifié par toutes nos observations, en microscopie optique ou électronique.

Les éléments cellulaires qui nous intéressent, se fixent à une densité de 1,050 g/ml (\pm 0,002). Cette valeur est identique à celle trouvée par BOWMAN et al. (1981) pour l'endothélium isolé de capillaires cérébraux de Rat.

A titre d'information, indiquons que des capillaires non digérés, fraîchement isolés de télencéphales de Poulet, se fixent à une densité de 1,039 g/ml, valeur également obtenue par BOWMAN et al. (1981) pour leur matériel.

3 - CULTURE CELLULAIRE

Ce sont des milieux comparativement riches, tel le milieu 199, additionnés de 20 % de sérum de veau foetal qui constituent habituellement la base de culture pour l'endothélium des micro-vaisseaux (WAGNER et MATTHEWS, 1975 ; DEL VECCHIO, 1977 ; DeBAULT et al., 1979 ; PHILLIPS et al., 1979 ; SPATZ et al., 1980 ; BJÖRNTORP et al., 1983). De plus, la culture se fait toujours en atmosphère enrichie en CO₂.

Nos manipulations se réalisent donc dans des conditions standard optimales.

Malgré ceci, seulement 30 à 40 % de l'isolement cellulaire, pourtant viable à 90 - 95 % se fixe et prolifère sur le plastique. Cette mortalité cellulaire importante à la mise en culture est observée par pratiquement tous les auteurs et en particulier par GIMBRONE (1976). BOWMAN et al. (1981)

recouvrent la surface de culture avec du collagène et réussissent ainsi à obtenir une meilleure fixation des cellules lors de l'ensemencement primaire. Le même résultat est obtenu en substituant la fibronectine au collagène (BOWMAN et al., 1982). L'attachement des cellules, dont la membrane plasmique est probablement "décapée" par l'attaque de la collagénase, serait donc favorisé par la présence de molécules particulières fixées au plastique de la surface de culture.

Lors de précédents essais (BLOUIN, 1980), nous avons tenté la mise en culture de capillaires intacts ou très peu digérés. La fixation et la prolifération des cellules étaient alors réduites, probablement freinées par la lame basale encore intacte et les cultures endothéliales étaient fortement contaminées par d'autres types cellulaires, en particulier des péricytes. C'est pourquoi lors de ce travail, l'accent a été mis sur la qualité et la pureté du matériel ensemencé.

De plus, GIMBRONE et al. (1974) et GIMBRONE (1976) affirment que des ensemencements primaires inférieurs à $3 \cdot 10^5$ cellules endothéliales par fiole de 25 cm^2 ont peu de chances de donner des cultures reproductibles. C'est pour rester bien au-delà de cette limite, qu'à partir d'un isolement de capillaires, le plus important possible, nous n'ensemencions que deux à quatre cultures primaires.

Le nombre de cellules par boîte, difficilement mesurable à l'hématimètre de MALASSEY à cause des paquets de cellules plus ou moins importants, peut être estimé, à l'ensemencement entre $5 \cdot 10^5$ et 10^6 cellules.

Notons également que le choix de poulets d'un âge de trente jours, comme matériel expérimental, est dicté par nos manipulations : en effet plus les cellules sont jeunes, mieux elles prolifèrent "in vitro" (BLOUIN, 1980 ; JAFFE, 1980). Mais dans le cadre de nos recherches, il est indispensable que leurs potentialités enzymatiques soient établies. Un âge de trente jours, qui correspond à un état de maturité proche de celui de l'adulte, est donc un bon compromis.

Cependant, les cultures obtenues s'altèrent en quelques semaines. Des changements de milieu, plus ou moins fréquents, ou un enrichissement du milieu 199 par 25 ou 30 % de sérum de veau foetal, ne freinent pas ce

processus de dégénérescence. De même, un remplacement du milieu 199 par du milieu M.E.M., du milieu F.12 de HAM ou du milieu de DULBECCO n'apporte aucune amélioration. Cette sénescence des cultures est également observée, à plus ou moins long terme, par la totalité des auteurs travaillant sur l'endothélium "in vitro", quelle que soit l'origine de cet endothélium.

LEVINE et MUELLER (1979) n'hésitent d'ailleurs pas à considérer l'endothélium vasculaire comme un modèle pour l'étude de la sénescence cellulaire, prise au sens général. GOSPODAROWICZ (1980) remarque également ce phénomène de sénescence dans des cultures d'endothélium cornéen et y remédie par l'addition de facteurs de croissance.

Mais, comme nous le découvrirons dans la suite de ce travail, nos cultures sont néanmoins parfaitement utilisables pour atteindre les objectifs que nous nous sommes fixés.

C - CARACTERISATION DES CELLULES ENDOTHELIALES EN CULTURE

A la suite de cette première série de manipulations, il apparaît logique de conclure que les cellules qui prolifèrent dans nos cultures sont des cellules endothéliales. C'est d'ailleurs ce que nous avons souvent admis dans la discussion précédente.

Mais, de façon à conserver une parfaite rigueur expérimentale, une démonstration exacte de l'identité de ces cellules s'impose maintenant. Dans cette partie du travail, nous passerons d'abord en revue les éléments acquis, puis nous élaborerons une technique destinée à caractériser les cellules endothéliales en culture.

I - INTRODUCTION

1 - APPORTS DE LA MICROSCOPIE OPTIQUE

L'observation de nos cultures permet de relever plusieurs particularités :

* Dans les heures qui suivent l'ensemencement, les cellules qui se fixent à la surface de culture forment toujours des colonies circulaires de trois à vingt-cinq cellules (*Fig. 19*).

Ces cellules sont si étroitement apposées que les limites intercellulaires sont indistinctes. Puis ces colonies s'accroissent et forment une monocouche cellulaire incomplète, puis confluyente (*Fig. 16*). Cette évolution morphologique, décrite par POMERAT et SLICK (1963), GIMBRONE et al. (1974) et GIMBRONE (1976) est une caractéristique de l'endothélium en culture. Elle n'est, en particulier, jamais mise en évidence dans les cultures de fibroblastes ou de cellules musculaires lisses (DAVISON et al., 1980).

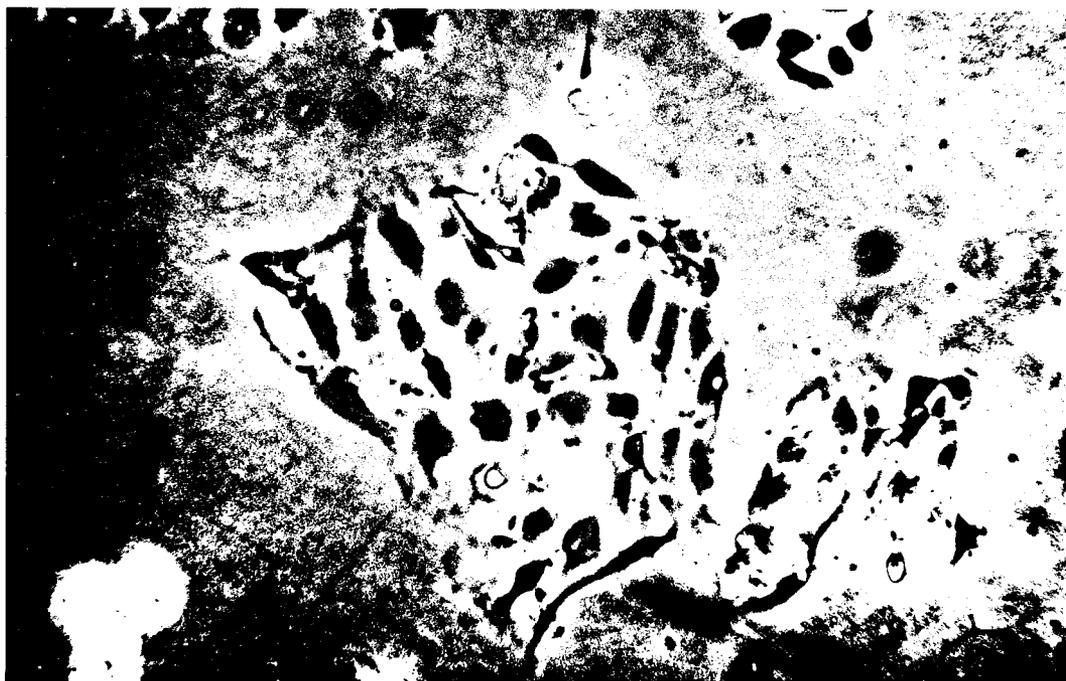


Figure 19 : Colonie de cellules endothéliales dans une culture de vingt-quatre heures.

(Gross. : x 1000)



Figure 20 : Organisation des cellules endothéliales en une structure tridimensionnelle caractéristique. Culture de vingt heures.

(Gross. : x 1000)

* Fréquemment, les cellules endothéliales, isolées de capillaires et mises en culture, sont capables de s'organiser en structures tubulaires tri-dimensionnelles, structures identiques à celles présentées par les capillaires "in vivo" (FOLKMAN et al., 1979). De telles associations cellulaires se rencontrent fréquemment dans nos cultures (*Fig. 20*). Elles n'ont été, à ce jour, observées que dans des cultures d'endothélium et uniquement d'endothélium micro-vasculaire.

* Les cellules de nos cultures possèdent une granulation cytoplasmique très importante dans la région périnucléaire, alors qu'elle semble absente au niveau des prolongements (*Fig. 17*). Ceci est une particularité de l'endothélium capillaire, relevée pour la première fois par ROUGET (1873).

II - INSUCCES DES METHODES COURAMMENT UTILISEES POUR CARACTERISER LES CELLULES ENDOTHELIALES EN CULTURE

a) *Marqueurs ultrastructuraux*

En 1964, WEIBEL et PALADE mentionnent la présence d'organites en forme de baguettes et limités par une membrane unitaire, dans les cellules endothéliales artérielles. Bien que la fonction de ces corpuscules soit encore aujourd'hui inconnue, leur présence en fait des marqueurs spécifiques de l'endothélium des gros vaisseaux. Mais ils n'ont jamais été rencontrés au niveau d'endothelia capillaires à maturité (FOLKMAN et al., 1979) et sont absents de nos échantillons. Aucun autre organite spécifique n'est observable dans nos cellules en culture.

b) *Antigène du facteur VIII (Facteur anti-hémophilique)*

Cet antigène peut être mis en évidence dans les cellules endothéliales, les plaquettes et les mégacaryocytes (JAFFE et al., 1973). Il est considéré comme étant le marqueur endothélial le plus sûr et est généralement détecté au niveau des cellules en culture par des techniques d'immunofluorescence par double marquage.

Mais les anticorps anti-facteur VIII de mammifère commercialisés ne sont pas utilisables chez l'oiseau : fabriqués chez le lapin contre des antigènes humains, ils ne se fixent pas sur les antigènes de poulet.

La vérification a été effectuée au laboratoire sur des coupes de cerveaux de rat et de poulet : un marquage spécifique de l'antigène du facteur VIII de l'endothélium vasculaire est obtenu chez le rat mais pas chez le poulet.

III - AUTRES METHODES

Elles sont essentiellement basées sur les interactions de l'endothélium avec les plaquettes du sang.

a) Non-adhérence plaquettaire

Une des fonctions principales de l'intima vasculaire est en effet d'empêcher l'adhérence des plaquettes. Cette propriété est conservée par les cellules endothéliales "in vitro" (BOWMAN et al., 1981).

b) Production de prostacycline (Prostaglandine I₂)

Les cellules endothéliales facilitent l'écoulement sanguin par production d'un agent, la prostacycline, qui empêche l'agrégation plaquettaire (MONCADA et al., 1976). L'endothélium cultivé synthétise également ce composé (WEKSLER et al., 1977 ; CHRISTOFINIS et al., 1979).

Mais ces méthodes n'ont pas été mises en oeuvre au laboratoire pour les raisons suivantes :

- * Elles demandent la mise au point de techniques lourdes : isolements purifiés de plaquettes ou estimation de la quantité de prostacycline formée par des dosages complexes.

- * La réussite de l'application de ces méthodes chez l'oiseau est incertaine.

* Ces procédés sont longs et coûteux. Nous leurs avons préféré une technique combinée mise au point au laboratoire et que nous allons décrire maintenant.

II - METHODE D'IDENTIFICATION INDIRECTE DE L'ENDOTHELIUM EN CULTURE

1 - PRINCIPE

L'enzyme de conversion de l'angiotensine I en angiotensine II (A.C.E.) est localisée spécifiquement à la face luminale de la cellule endothéliale (CALDWELL et al., 1976 ; RYAN et al., 1976) et dans certains épithélia rénaux (WARD et al., 1976).

Cette enzyme dont les rôles physiologiques les plus importants sont l'inactivation de la bradykinine et la scission de l'angiotensine I en His-Leu et en angiotensine II (le plus puissant des vasopresseurs connus), se retrouve dans les cultures d'endothélia vasculaires isolés de gros ou de micro-vaisseaux de divers tissus (RYAN et al., 1976).

Mais le fait de détecter et de mesurer cette activité enzymatique dans une culture de cellules obtenue à partir de capillaires télencéphaliques, ne suffit pas à démontrer que cette culture *EST* une culture de cellules endothéliales. La seule conclusion alors possible est qu'il existe bien des cellules endothéliales dans cet échantillon mais dans une proportion indéterminable.

Par contre, s'il est possible de démontrer que la population cellulaire contenue dans la culture n'est formée que d'un seul type cellulaire, puis de mettre en évidence une activité A.C.E. au niveau de cette population cellulaire, la caractérisation de la culture comme *ETANT* une culture endothéliale est alors réalisée.

Voici donc énoncées les deux phases de notre protocole expérimental :

* La démonstration d'une population cellulaire unique dans les cultures se fera à l'aide de gradients de densité.

* L'activité de l'A.C.E. sera mesurée par un dosage spectrofluorimétrique.

2 - TECHNIQUES UTILISEES

a) Gradients de densité en PERCOLL

Le protocole utilisé pour former et calibrer les gradients de PERCOLL et pour séparer les éléments cellulaires sur ces gradients est rigoureusement identique à celui décrit point par point précédemment. Signalons simplement que pour cette manipulation, les cellules cultivées sont moissonnées à l'aide de la solution trypsine - E.D.T.A., puis lavées trois fois avec le tampon sodium-potassium, pH 8,3 (composition ci-dessous).

b) Mesure de l'activité de l'A.C.E.

Dans ce dosage fluorométrique très sensible, c'est l'hydrolyse d'un substrat tripeptidique Hip-His-Leu qui est mesurée, par détection du dipeptide His-Leu libéré par la réaction (FRIEDLAND et SILVERSTEIN, 1976). Nous nous sommes volontairement désintéressés des techniques radioisotopiques, trop lourdes à mettre en oeuvre pour ce dosage, effectué dans un but de contrôle.

L'échantillon cellulaire est resuspendu dans 0,5 ml de tampon sodium-potassium, pH 8,3 et homogénéisé dans un vase de BRAUN-MELSUNGEN muni d'un piston de téflon denté, entraîné à 1 500 t/min.

La composition du tampon sodium-potassium est la suivante (FRIEDLAND et SILVERSTEIN, 1976) :

K_2HPO_4	0,5 M
NaCl	1,5 M

Il est ajusté à pH 8,3 par HCl M.

Le milieu d'incubation se compose de :

50 μ l	Tampon Na-K	pH 8,3
50 μ l	de substrat Hip-His-Leu	25 mM (SIGMA)
50 μ l	de broyat cellulaire	
100 μ l	H ₂ O	

L'incubation dure quinze minutes à 37°C, sous agitation (Bain-marie SALVIS). Elle est arrêtée par l'addition de 1,45 ml de NaOH 0,28 M.

Cent micro-litres de O-Phtaldéhyde à 2 % dans le méthanol sont alors aussitôt ajoutés, suivis, dix minutes plus tard exactement, par deux cents micro-litres d'HCl 3 M.

L'échantillon est alors centrifugé pendant dix minutes à 1 000 g (Centrifugeuse CHRIST). Trente à quatre-vingt-dix minutes d'attente sont nécessaires avant la lecture au spectrofluorimètre (FARRAND), ceci afin que la fluorescence soit totalement établie. La longueur d'onde de la lumière d'excitation est de 370 nm et celle de la lumière de fluorescence est réglée à 500 nm.

A chaque dosage, sont également réalisés :

* Une gamme d'étalonnage, constituée à partir d'une solution d'His-Leu (SIGMA) 1 μ M ;

* Un témoin blanc, obtenu en arrêtant la réaction avant l'addition du broyat cellulaire.

c) Dosage des protéines

Il est effectué dans le but de pouvoir calculer l'activité enzymatique spécifique de nos échantillons.

La technique utilisée est adaptée de celle de LOWRY et al. (1951), basée sur la réduction d'un complexe cuivre-protéine, formé en milieu alcalin, par le réactif phosphomolybdique - phosphotungstique de FOLIN-CIOCALTEU.

A 0,35 ml de soude 1 M, sont ajoutés 0,05 ml de broyat cellulaire. L'ensemble est porté à ébullition cinq minutes et est laissé au repos une heure à température ambiante.

Ce délai écoulé, 2 ml de la solution suivante sont ajoutés :

{ 50 ml de Na_2CO_3 à 2 %
 { +1 ml du mélange 1 : 1
 { $\text{CuSO}_4 - 5 \text{H}_2\text{O}$ à 1 %
 { Tartrate double de Na-K à 20 %

La formation du complexe cuivre-protéine demande dix minutes. Puis 200 μl de réactif de FOLIN-CIICALTEU (MERCK) dilué de moitié par de l'eau, sont ajoutés.

Le développement de la coloration nécessite un délai de trente minutes à l'obscurité. La densité optique des tubes est lue au spectrophotomètre (PERKIN-ELMER 55E), à une longueur d'onde de 750 nm.

Avant chaque dosage, un témoin blanc et une gamme étalon de sérum albumine bovine de 10 à 100 $\mu\text{g}/0,05 \text{ ml}$, sont préparés en tampon sodium-potassium pH 8,3.

III - RESULTATS

1 - GRADIENTS DE PERCOLL (Fig. 21)

Le passage des cultures sur gradient de PERCOLL n'entraîne aucune séparation de la population cellulaire de celles-ci : la totalité du matériel se retrouve en effet sous la forme d'une unique bande de densité moyenne 1,050 g/ml.

Notons simplement le fait suivant :

* Si la culture est jeune, la couche que forment les cellules dans le gradient est très fine : l'écartement de la densité de la population cellulaire

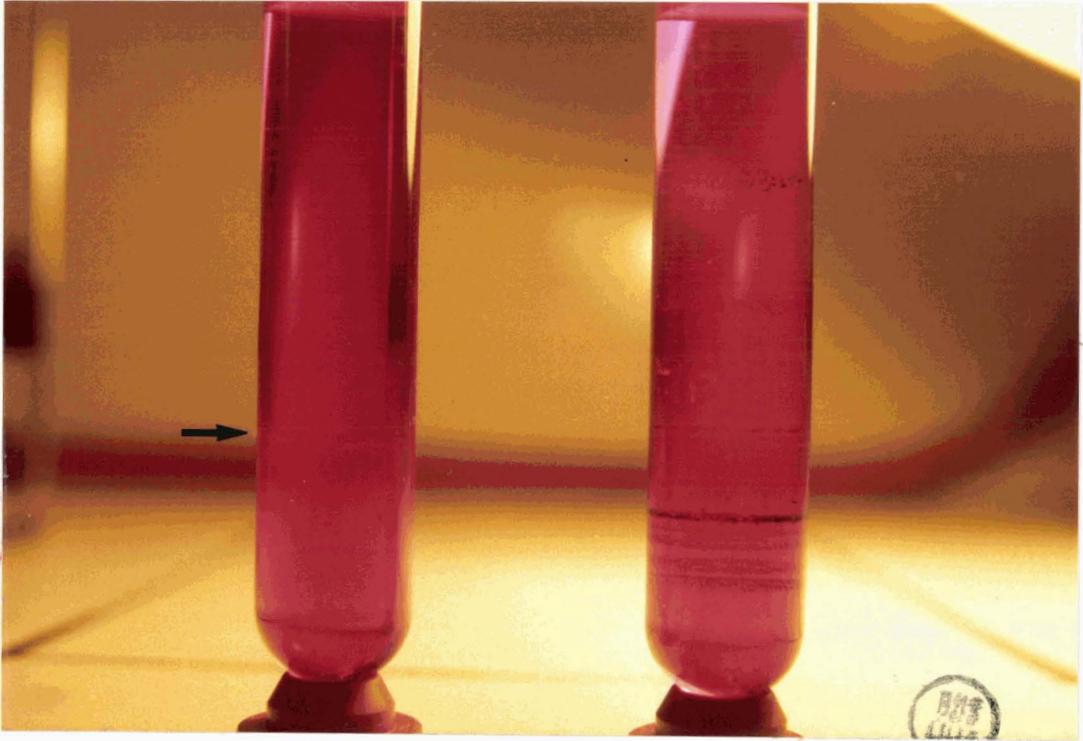


Figure 21 : Résultat obtenu après passage d'une culture de cellules endothéliales âgée de sept jours sur gradient continu de PERCOLL. Le tube de gauche contient les éléments cellulaires (→), celui de droite les billes marqueuses de densité.

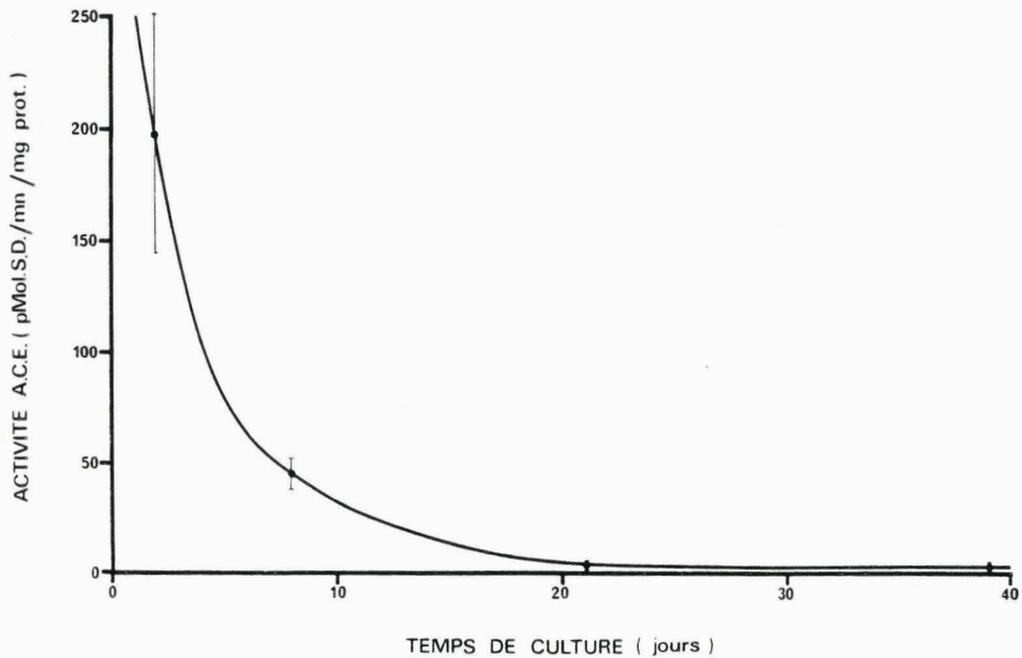


Figure 22 : Activité de l'A.C.E. mesurée dans des cultures endothéliales de différents âges, après passage sur PERCOLL. Les moyennes et les écarts-types sont calculés à partir de cinq expériences.

par rapport à la densité moyenne annoncée est donc insignifiant (de l'ordre de $\pm 0,001$ g/ml).

* Si la culture est sénescence, elle forme toujours une bande unique dans le gradient mais cette bande est beaucoup plus diffuse. La densité du matériel est toujours 1,050 g/ml en moyenne mais cette fois répartie de 1,042 à 1,058 g/ml.

Des examens microscopiques ne révèlent aucune différence dans les populations cellulaires de cultures passées ou non sur ces gradients de densité.

2 - ACTIVITE DE L'A.C.E.

La *figure 22* nous donne l'activité de l'A.C.E., mesurée dans des cultures cellulaires à différents stades de croissance : cette activité enzymatique, marqueuse de l'endothélium, est donc bien présente dans nos cultures, c'est principalement ce qu'il fallait démontrer. Mais si l'activité spécifique est de l'ordre de 2 nMol. de substrat dégradé par minute et par milligramme de protéines (1 971,6 pMol.S.d./min/mgP.) pour une culture très jeune, elle tombe à une valeur pratiquement 85 fois plus faible (= 23,5 pMol.S.d./min/mgP.) pour une culture très vieille.

Cette diminution de l'activité spécifique de l'A.C.E. est surtout très rapide lors des premiers jours de culture.

A titre de comparaison, ce dosage a également été effectué sur des homogénats télencéphaliques totaux et sur des isoléments de capillaires télencéphaliques. Les valeurs mesurées sont respectivement de $226,2 \pm 69,7$ pMol.S.d./min/mgP. et de $2\ 245,6 \pm 218,9$ pMol.S.d./min/mgP.

Comparée au télencéphale pris dans son ensemble, la fraction de capillaires isolés présente donc un enrichissement de l'activité enzymatique étudiée de l'ordre de dix fois.

L'endothélium ne conserve cette activité élevée que lors des tout premiers stades de sa culture seulement.

Signalons enfin que l'activité enzymatique s'accroît linéairement avec des temps d'incubation de 0 à 30 minutes et avec des concentrations en protéines de 0 à 40 µg par incubat.

IV - DISCUSSION

La démonstration directe de l'identité endothéliale de nos cultures étant impossible avec notre matériel, seule restait possible une méthode combinée. DeBAULT et al. (1979, 1981) semblent s'être, eux aussi, heurtés aux mêmes problèmes avec des cultures de cellules endothéliales dérivées de micro-vaisseaux cérébraux de souris. Cela les a conduits à mettre au point une méthode très complexe, consistant à fabriquer des anticorps "anti-membranes de cellules endothéliales", pour pouvoir caractériser des cellules "in vitro".

Notre démarche expérimentale est plus simple et plus rapide :

L'A.C.E. est localisée "in vivo" à la face luminale de l'endothélium (CALDWELL et al., 1976). Mais les auteurs travaillant sur l'endothélium "in vitro" négligent souvent ce marqueur pour d'autres, plus aisés à mettre en évidence, tels que l'antigène du facteur VIII ou les corpuscules de WEIBEL-PALADE (ZETTER, 1981). Mesurer cette activité de l'A.C.E. dans le but de caractériser l'endothélium en culture demande en effet une démonstration préalable : ce n'est que dans le cas où la culture ne contient qu'une seule et unique population cellulaire, qui montre une activité de l'A.C.E., que l'on pourra affirmer son identité endothéliale.

C'est ce que nous avons réalisé et nos résultats sont les tout premiers de ce genre.

Soulignons d'emblée l'homogénéité des résultats obtenus avec le PERCOLL : en effet, la densité des cellules cultivées est identique à celle mesurée lors de l'ensemencement du matériel. Cette valeur de 1,050 g/ml est également identique à celle trouvée par BOWMAN et al. (1981) pour l'endothélium des capillaires cérébraux de rat.

Afin d'expliquer le phénomène de dispersion de la densité des cellules sénescents par rapport à leur densité moyenne, nous émettons deux hypothèses :

* Nous avons tout d'abord pensé que la culture, homogène au départ, pouvait se trouver peu à peu envahie par des cellules d'un, ou de plusieurs types différents. Cette hypothèse nous paraît cependant peu vraisemblable car, comme le montre l'observation microscopique de cultures sénescents, la prolifération de la culture est stoppée totalement. La culture présente un aspect stable pendant un temps très long et dégénère lentement, sans être visiblement submergée par des cellules morphologiquement différentes.

De plus, comme nous l'avons vu lors de nos premiers isolements, les cellules contaminantes se trouvent principalement dans la zone de densité comprise entre 1,015 et 1,040 g/ml et non, comme c'est le cas des cellules obtenues en culture, dans la zone de densité moyenne 1,050 g/ml.

* La seconde hypothèse est directement déduite des observations microscopiques de cultures sénescents. Les cellules âgées ont en effet une morphologie très différente de celle des cellules jeunes : elles sont beaucoup plus étalées et très souvent vacuolisées. Leur multiplication est arrêtée. Il est probable que ces cellules, plus ou moins vacuolisées, altérées et différenciées, aient des densités s'écartant de celle d'une cellule jeune et en parfait état.

Cette notion de vieillissement se retrouve d'ailleurs intégralement lors du dosage de l'activité de l'A.C.E. En effet, les mesures que nous avons réalisées mettent en évidence la décroissance extrêmement rapide de ce marqueur en fonction du temps de culture. Nous avons vu précédemment que l'altération des cultures était définitive en deux à trois semaines, ce qui correspond exactement à la disparition de 98 % de l'activité de l'A.C.E. La décroissance, en fonction du temps, de cette activité enzymatique dans les cultures de cellules endothéliales est observée par tous les auteurs travaillant sur ce matériel et a fait l'objet d'une étude approfondie par DEL VECCHIO et SMITH (1982). Il nous est difficile de comparer nos résultats avec les valeurs relevées dans la bibliographie, celles-ci étant extrêmement disparates. Pour ne citer que deux exemples, cette activité est, pour des cellules en culture

bien entendu, de 34,6 nMol.S.d./min/mgP. pour l'endothélium d'artère pulmonaire de boeuf (DEL VECCHIO et SMITH, 1982) et de 0,29 nMol.S.d./min/mgP. pour l'endothélium de l'aorte du même animal (MENSELSON et KACHEL, 1981). En fait, les auteurs se contentent très souvent de qualifier la culture dosée de "jeune" ou de "vieille" sans en préciser l'âge exact. De plus, cette activité enzymatique présente une grande variation selon les animaux et les tissus étudiés.

Les activités moyennes de l'A.C.E. que nous dosons pour les capillaires isolés (2,25 nMol.S.d./min/mgP.) et le télencéphale (0,22 nMol.S.d./min/mgP.) sont elles, tout à fait comparables à celles que mesurent GIMBRONE et al. (1979) dans le cerveau de boeuf et qui sont de 2,8 nMol.S.d./min/mgP. pour les micro-vaisseaux et de 0,10 nMol.S.d./min/mgP. pour le cortex.

Nous avons volontairement limité cette étude sur l'A.C.E. En effet :

* Une simple détermination de la présence de cette activité enzymatique dans le matériel isolé est nécessaire et suffisante pour résoudre le problème posé : la caractérisation de nos cultures de cellules endothéliales.

* Il aurait pourtant été intéressant d'utiliser le modèle de la culture cellulaire pour étudier d'une façon approfondie cette activité de l'A.C.E. et ses variations en fonction de différents facteurs. Mais ces investigations sortent alors du cadre de ce travail sur la barrière hémato-encéphalique, cette enzyme n'y jouant, apparemment, aucun rôle spécifique.

CONCLUSION DE LA PREMIERE PARTIE

Dans cette première partie de notre travail, deux objectifs devaient être absolument atteints :

- Obtenir une fraction purifiée de capillaires télencéphaliques de Poulet ;
- Réaliser des cultures de leurs cellules endothéliales.

Pour cela, de nombreuses techniques biologiques, cytologiques et biochimiques ont dues être mises en oeuvre.

* En ce qui concerne les fractions de capillaires cérébraux, leur purification a due être poussée le plus loin possible mais tout en préservant leur viabilité et le rendement de la manipulation.

* En ce qui concerne les cultures de cellules endothéliales, il nous a fallu, là aussi, purifier le matérielensemencé. Mais en plus, il s'est vite avéré obligatoire de prouver l'identité endothéliale des cultures. Ceci a demandé la mise au point d'une méthode indirecte, mais sûre, de caractérisation de l'endothélium en culture, méthode fortement appuyée par les observations microscopiques.

SECONDE PARTIE :

ETUDE DES ACTIVITES MONO-AMINE OXYDASIQUES

PLAN DETAILLE DE LA SECONDE PARTIE

INTRODUCTION A LA SECONDE PARTIE	64
A - MESURE DE L'ACTIVITE MONO-AMINE OXYDASIQUE DES ECHANTILLONS	65
I - INTRODUCTION	65
1. GENERALITES	65
2. CHOIX DE LA TECHNIQUE	66
a) Premières techniques	
b) Techniques récentes	
II - METHODES	69
1. MESURE DE L'ACTIVITE DE LA M.A.O.	69
2. DOSAGE DES PROTEINES	70
III - RESULTATS	70
1. CORRECTIONS ET CALCULS	70
a) Rendement du compteur à scintillation	
b) Extraction de la phase organique	
c) Affaiblissement lumineux (Quenching)	
d) Calcul de l'activité enzymatique	
2. MESURES	73
a) Manipulations préliminaires	
- Etude de la vitesse de la réaction en fonction de la concentration en protéines de l'incubat	
- Etude de la vitesse de la réaction en fonction de la durée d'incubation	
- Etude de la vitesse de la réaction en fonction de la concentration en substrat	
b) Activités mono-amine oxydasiques des échantillons	
- Télencéphale total et capillaires isolés	
- Cultures cellulaires et milieux de culture	
- Activités mono-amine oxydasiques mesurées pendant l'isolement des cellules endothéliales	
IV - DISCUSSION	82
B - INFLUENCE D'EXTRAITS PHYSIOLOGIQUES SUR LES ACTIVITES MONO-AMINE OXYDASIQUES	87
I - INTRODUCTION	87
II - METHODES	87
1. OBTENTION OU FABRICATION DES SERA ET DES EXTRAITS	87

2. INCORPORATION AU MILIEU DE CULTURE	88
3. MESURES	88
III - RESULTATS	89
1. MANIPULATIONS PRELIMINAIRES	89
a) Expression des résultats	
b) Age des cultures	
c) Milieu de fabrication des extraits de cerveau	
d) Moment de l'addition	
2. MESURES	91
a) Action du sérum de poulet	
b) Influence de l'extrait total d'embryons	
- Sur la morphologie et la prolifération cellulaire	
- Sur l'activité de la M.A.O.	
- Conclusion	
c) Influence des extraits de cerveaux	
- Extraits de cerveaux d'embryons	
- Extraits de cerveaux de poulets de différents âges	
- Conclusion	
d) Influence combinée de l'extrait total d'embryons et de l'extrait de cerveaux d'embryons	
- Influence sur la morphologie et la prolifération cellulaires	
- Influence sur l'activité de la M.A.O.	
- Conclusion	
IV - DISCUSSION	105
CONCLUSION DE LA SECONDE PARTIE	109

INTRODUCTION A LA SECONDE PARTIE

Nous voici donc en possession "in vitro" du substratum de la barrière héméo-encéphalique : l'endothélium des capillaires cérébraux. Mais encore faut-il que ce modèle soit utilisable . C'est-à-dire que les cellules endothéliales en culture doivent, non seulement proliférer, mais également conserver les potentialités enzymatiques spécifiques de leur origine cérébrale.

Nous nous proposons donc de mesurer, dans cette seconde partie du travail, l'activité de la mono-amine oxydase dans les modèles créés. Cette enzyme étant spécifique de l'interface sang-cerveau, elle va nous permettre d'estimer les potentialités enzymatiques et la capacité de réponse à certains facteurs de nos isolements et cultures.

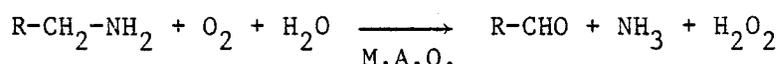
A - MESURE DE L'ACTIVITE MONO-AMINE OXYDASIQUE

DES ECHANTILLONS

I - INTRODUCTION

1 - GENERALITES

Dans la cellule, la mono-amine oxydase (M.A.O.) catalyse la désamination oxydative d'une vaste variété d'amines, selon la réaction générale suivante :



Cette enzyme est en fait une flavoprotéine à cofacteur F.A.D. (TIPTON, 1968) et ses substrats sont des amines primaires, secondaires et tertiaires (TIPTON, 1973).

La M.A.O. se rencontre dans tous les tissus des vertébrés et particulièrement dans le rein, le foie, l'intestin, l'estomac (TIPTON, 1973), dans les plaquettes sanguines (COLLINS et SANDLER, 1971) et -ce qui nous intéresse particulièrement- au niveau de tout le réseau cardio-vasculaire, principalement au niveau des capillaires du système nerveux central (BERTLER et al., 1966).

La localisation subcellulaire de cette enzyme est également connue : il s'agit de la membrane mitochondriale externe (ERNSTER et KUYLENSTIERNA, 1970).

C'est JOHNSTON (1968) qui fut le premier à suggérer l'existence de deux formes de M.A.O., dénommées A et B :

- La M.A.O. de type A, surtout rencontrée dans les tissus nerveux, a comme substrats principaux la sérotonine et la noradrénaline. Elle est inhibée par de faibles doses de clorgyline.

- La M.A.O. de type B, quant à elle, métabolise principalement la β -Phényléthylamine et la benzylamine. Le déprényl et la pargyline en sont les inhibiteurs principaux et la clorgyline n'inhibe ce type de M.A.O. qu'à très forte dose.

L'existence de ces deux formes de M.A.O., dont les spécificités varient fortement d'un matériel à l'autre (SUZUKI et al., 1981), est actuellement très controversée : de nombreux travaux (HOUSLAY et TIPTON, 1973 ; HOUSLAY et al., 1976 ; FOWLER et CALLINGHAM, 1978 ; SCHURR, 1982) tendent en effet à démontrer que cette enzyme serait une entité moléculaire unique, possédant des sites de liaison multiples et dont le fonctionnement serait influencé par l'environnement membranaire (HOUSLAY et TIPTON, 1973).

Il existe cependant des substrats communs à ces deux formes de M.A.O. Ce sont principalement la tyramine, la tryptamine et la dopamine (FOULER et CALLINGHAM, 1978 ; FOWLER et TIPTON, 1981).

Signalons enfin qu'il existe aussi des activités amine oxydasiques distinctes des activités mono-amine oxydasiques. Elles sont résistantes à l'action de la clorgyline ou à celle du déprényl mais sont inhibées par les semi-carbazides, composés qui n'affectent pas les activités mono-amine oxydasiques. Leur substrat préférentiel est la benzylamine et ces activités sont qualifiées de benzyl-amine oxydasiques (BLASCHKO, 1974).

Comme nous l'avons déjà signalé, les activités que nous étudions au niveau de la barrière hémocéphalique seront les activités monoamines oxydasiques globales.

2 - CHOIX DE LA TECHNIQUE

a) Premières techniques

C'est ZELLER qui, en 1951, donne une description des techniques utilisées alors pour doser l'activité de la M.A.O. Ces mesures ont comme bases la disparition du substrat, la consommation d'oxygène ou la production d'ammoniac et de peroxyde. Compte tenu de l'imprécision de ces procédés,

ils ont été rapidement abandonnés.

b) Techniques récentes (Tableau VI)

Une première évolution est accomplie par la mise au point de techniques fluorométriques. Ces méthodes, apparues en 1970 avec les travaux de SOURLES, sont encore très utilisées (SUZUKI et al., 1978 ; BANDYOPADHYAY et al., 1981 ; SUZUKI et al., 1981) mais présentent certains inconvénients :

* Les risques d'erreurs dus à la manipulation fluorimétrique sont importants et souvent provoqués par les produits chimiques utilisés eux-mêmes.

* Les dosages ne peuvent se faire que sur des masses tissulaires minimales de l'ordre du milligramme.

* La manipulation est fastidieuse si le nombre d'échantillons est élevé, de nombreux intervalles de temps successifs devant être scrupuleusement respectés.

En permettant la mesure d'activités spécifiques de l'ordre de la pMole de substrat dégradé par minute et par milligramme de protéines (pMol.S.d./min/mgP.), sur des quantités de tissus secs pouvant être réduites à 5 µg, les techniques radio-isotopiques s'imposent rapidement. C'est principalement à WURTMAN et AXELROD (1963) et à OTSUKA et KOBAYASHI (1964) que l'on doit leur mise au point. Ces deux méthodes, publiées à quelques mois d'intervalle, sont pratiquement identiques mais OTSUKA et KOBAYASHI (1964) utilisent la ^{14}C -Tyramine comme substrat pour la M.A.O., tandis que WURTMAN et AXELROD (1963) utilisent la ^{14}C -Tryptamine.

La particularité de ces techniques réside dans l'extraction extrêmement facile et rapide des métabolites radioactifs formés par l'action de la M.A.O., de type aldéhydique : une simple séparation de phase aqueuse-organique suffit.

Vu leur facilité de mise en oeuvre, leur sensibilité, leur spécificité et la précision des résultats, ce sont ces deux méthodes qui sont aujourd'hui à la base de nombreuses mesures de l'activité de la M.A.O.

C'est une modification de la méthode d'OTSUKA et KOBAYASHI (1964)

METHODES	AUTEURS	ANNEES	MATERIELS	SUBSTRAT
R A D I O I S O T O P I Q U E S	WURTMAN et AXELROD	1963	Coeur et foie de rat	Trypt.
	OTSUKA et KOBAYASHI	1964	Plasma humain	Tyr.
	McCAMAN et al.	1965	Cerveau de lapin	5-H.T., Tyr.
	GODIRIS et NEFF	1971	Mitochondries de tissus de rat	5-H.T., Tyr.
	CALLINGHAM et LAVERTY	1973	Coeur de rat	D.A., 5-H.T., Tyr., Bz
	YANG et NEFF	1974	Cerveau de rat	5 H.T., P.E.A., D.A.
	LAI et al.	1975	Cerveau et micro-vaisseaux de cerveau de rat	Tyr.
	PARVEZ et al.	1976	Tissus de rat	Trypt.
	LAI et al.	1978	Cerveau et coeur de rat	Tyr.
	LYLES	1978	Tissus de rat	5 H.T., Tyr., Bz
	FOWLER et ORELAND	1980	Cerveau humain	5 H.T., Bz
	LINDWALL et OWMAN	1980	Plexus choroïdes de lapin	Tyr.
	LYLES et CALLINGHAM	1980	Tissus de rat	5 H.T., D.A., Bz
	ANDREE et CLARKE	1981	Système vasculaire de cerveau de rat	Bz
	FOWLER et TIPTON	1981	Mitochondries de foie de rat	Tyr.
	HAENICK et al.	1981	Micro-vaisseaux de cerveau d'homme et de rat	P.E.A., 5 H.T.
	PROPPING et al.	1981	Plaquettes de sang humain	Trypt.
	TREVETHICK et al.	1981	Cellules endothéliales et cellules musculaires lisses (aorte et veine cave de porc)	5 H.T., P.E.A., Bz
	FOWLER et al.	1981	Cerveaux de boeuf, élan et renne	5 H.T., Tyr., P.E.A., Trypt., Adr., N.A., Ky
	KOBAYASHI et al.	1981	Foie et cerveau de grenouille	Tyr., 5 H.T., P.E.A., Bz
U O R O M E T R I Q U E S	SUZUKI et al.	1978	Cerveau de poulet	P.E.A.
	BANDYOPADHYAY et al.	1981	Tissus de porc	Tyr.
	SUZUKI et al.	1981	Mitochondries de cerveau et de foie de 8 espèces animales	P.E.A.

TABLEAU VI : Quelques mesures d'activités mono-amine-oxydasiques publiées de 1963 à 1981.
On notera principalement → la dominance des méthodes radioisotopiques
→ la diversité des substrats utilisés.

Adr : Adrénaline
Bz : Benzylamine
D.A. : Dopamine
5 H.T. : Sérotonine
Ky : Kynuramine

N.A. : Noradrénaline
P.E.A. : B-Phényléthylamine
Trypt. : Tryptamine
Tyr. : Tyramine



par FOWLER et TIPTON (1981) que nous avons utilisée pour doser cette activité enzymatique dans nos échantillons. La tyramine est utilisée comme substrat : c'est donc l'activité mono-amine oxydasique totale (M.A.O. de type A + M.A.O. de type B) qui est mesurée.

II - METHODES

1 - MESURE DE L'ACTIVITE DE LA M.A.O.

Les fractions télencéphaliques, les capillaires isolés ou les cellules extraites des cultures, sont homogénéisés dans un tube de BRAUN-MELSUNGEN muni d'un piston de TEFLON tournant à 1 500 tours/minute. Cette homogénéisation est réalisée dans du tampon phosphate de potassium 0,1 M - pH 7,2, la quantité de tampon étant calculée de façon à obtenir des fractions contenant de 0,5 à 2 mg de protéines/ml.

Dans des fioles à scintillation en plastique (L.E.S.), sont introduits successivement :

- 200 à 280 μ l de tampon phosphate de potassium 0,1 M - pH 7,2
- 20 à 100 μ l d'homogénat tissulaire
(Volume de tampon + volume d'homogénat =
300 μ l au total)
- 50 μ l d' H_2O
- 50 μ l de substrat, constitués par :
 - . 25 μ l de $7-^{14}C$ Tyramine - HCl (Amersham Int. Lim.)
correspondant à 1,25 μ Ci = 22,3 nMoles
 - . 25 μ l de tyramine - HCl 0,892 mM (Sigma)
correspondant également à 22,3 nMoles.

L'incubation dure vingt minutes à 37°C, sous agitation (bain-marie SALVIS) et sous oxygénation du milieu.

La réaction enzymatique est arrêtée par addition de 100 μ l d'acide

citrique 2M. Les témoins blancs sont, eux, obtenus par addition de l'acide avant celle du substrat.

Cinq millilitres du mélange de scintillation suivant :

1 volume de toluène
 1 volume d'acétate d'éthyle
 + 0,6 % P.P.O. (P/v)
 + 0,01 % P.O.P.O.P. (P/v)

sont alors ajoutés au contenu de chaque fiole et l'ensemble est agité vigoureusement pendant cinq minutes. Puis les fioles sont placées à -20°C . En deux à trois heures, la phase aqueuse est gelée et il est aisé de transvaser la phase organique contenant les métabolites de la réaction, dans une fiole de scintillation neuve. La radioactivité extraite est mesurée par un compteur L.K.B. (RACK BETA).

2 - DOSAGE DES PROTEINES

Il est effectué selon la modification de la technique de LOWRY et al. (1951) précédemment décrite. Témoin blanc et gamme étalon sont préparés en tampon phosphate de potassium 0,1 M - pH 7,2.

III - RESULTATS

1 - CORRECTIONS ET CALCULS

a) Rendement du compteur à scintillation

Si un échantillon radioactif contenant A d.p.m. est introduit dans un compteur à scintillation liquide, l'appareil d'enregistrera pas A c.p.m. mais, du fait de pertes à la lecture, un nombre B de c.p.m., B étant inférieur à A. Le rendement $\frac{\text{cpm}}{\text{dpm}}$ est donc inférieur à 1 et varie avec l'isotope, le liquide scintillant, les fioles, l'appareil....

Il est donc important de connaître ce rendement.

Pour cela, on compte une quantité parfaitement connue de d.p.m. de ^{14}C -Toluène dans 5 ml du cocktail scintillant précédemment décrit et dans des fioles L.E.S.

Dans ces conditions, pour $46\ 081\ \text{dpm} \pm 563$, l'appareil (compteur L.K.B., RACK BETA) enregistre $39\ 988\ \text{cpm} \pm 418$, soit un rendement moyen de 86,78 %.

b) Extraction de la phase organique

Au cours de notre manipulation, après avoir placé les fioles à -20°C , la phase organique, contenant les métabolites formés sous l'action de la M.A.O., est transvasée dans une fiole neuve pour être comptée.

Des erreurs se produisent alors. Cependant, elles sont facilement chiffrables, les conditions expérimentales étant identiques pour chaque échantillon. Ces erreurs ont deux origines :

* Une fraction de la phase organique est absorbée par le plastique de la première fiole ou reste sur les parois de celle-ci. Ainsi, si l'on introduit dans une fiole 5 ml de liquide scintillant et les $46\ 081 \pm 563$ dpm de ^{14}C -Toluène, après congélation, transvasement et comptage, on n'enregistre que $36\ 988\ \text{cpm} \pm 409$ au lieu des $39\ 988$ attendus, soit une perte moyenne de 7,5 % des cpm.

* Une partie du substrat, en surplus après la réaction, constituée pour moitié de tyramine marquée et pour moitié de tyramine froide, est également extraite avec les métabolites. C'est pourquoi un témoin blanc est réalisé parallèlement à chaque échantillon. Les mesures montrent que la quantité de tyramine extraite n'excède pas 0,8 % de la quantité totale.

c) Affaiblissement lumineux (Quenching)

Cet affaiblissement lumineux, intervenant lors du comptage est, quand il existe, le plus souvent dû au milieu d'incubation ou d'extraction et entraîne une modification du spectre d'énergie de l'isotope radioactif,

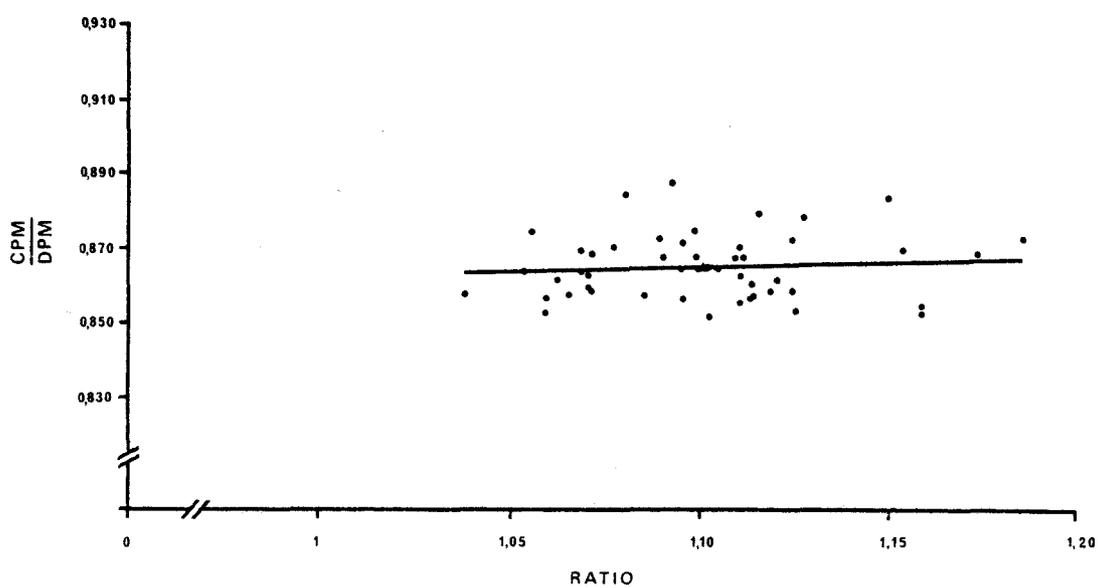


Figure 23 : Courbe d'étalonnage du rendement de lecture ($\frac{cpm}{dpm}$) en fonction de l'affaiblissement lumineux (Ratio).
L'évolution du rendement est décrite par une droite de régression, calculée à partir de quarante points de mesure.

modification variable pour chaque fiole.

Il est donc indispensable d'établir des gammes de concentrations croissantes en tampon, homogénats ou acide, contenant une quantité fixe et connue de l'élément radioactif utilisé.

Les variations du spectre énergétique nous sont données directement par le compteur L.K.B., sous la forme d'un nombre appelé "ratio".

Comme l'indique la représentation graphique du rendement de lecture en fonction de cette valeur de ratio (*Fig. 23*), l'affaiblissement lumineux dans nos échantillons peut être négligé. En effet, pour un ratio variant de 1,038 à 1,18, le rendement moyen reste compris entre 0,864 et 0,867. Cette absence d'affaiblissement lumineux se comprend aisément : les seuls composés introduits dans le liquide scintillant sont, théoriquement, les métabolites de la réaction.

d) Calcul de l'activité enzymatique

Ayant calculé les différents rendements, il est aisé de convertir les cpm en dpm, donc en pCi. Connaissant l'activité spécifique de la tyramine, et sachant que le substrat est constitué pour moitié de tyramine froide, on en déduit le nombre de Pico-Moles de substrat dégradé pendant la réaction. Les teneurs en protéines étant mesurées parallèlement, l'activité spécifique de la M.A.O. est exprimée en Pico Moles de Substrat dégradé par minute et par milligramme de protéines, donc sous la forme d'une vitesse.

2 - MESURES

a) Manipulations préliminaires

Les conditions de l'incubation sont dictées, comme dans toute mesure d'activité enzymatique quelle qu'elle soit, par certaines manipulations préliminaires.

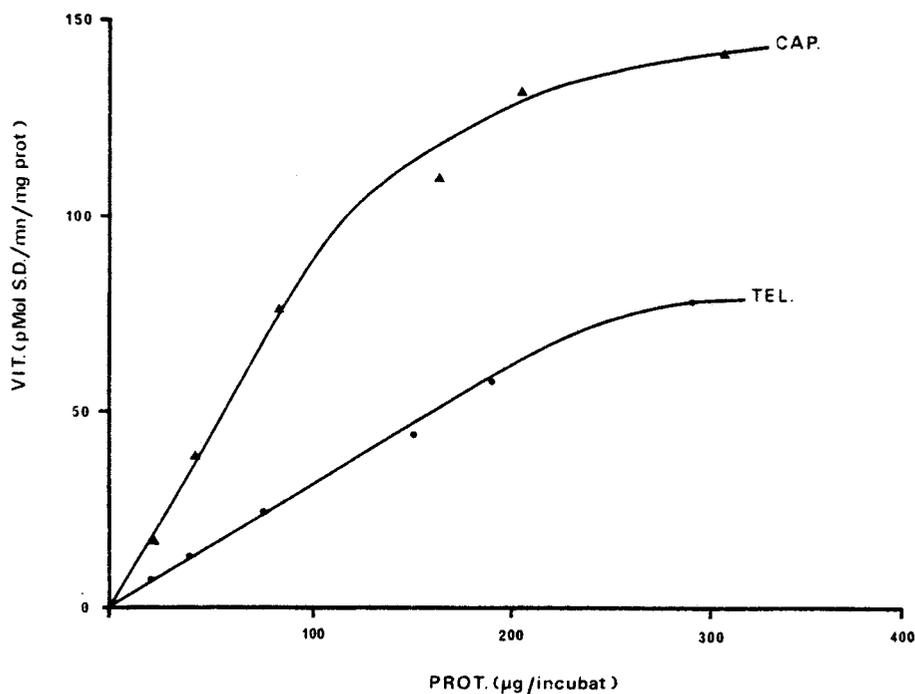


Figure 24 : Courbe d'évolution de la vitesse de réaction enzymatique en fonction de la concentration en protéines de l'incubat. Le temps d'incubation est de vingt minutes. Les points représentent les valeurs moyennes.
 ▲ = CAP : homogénat de capillaires
 ● = TEL : homogénat télencéphalique

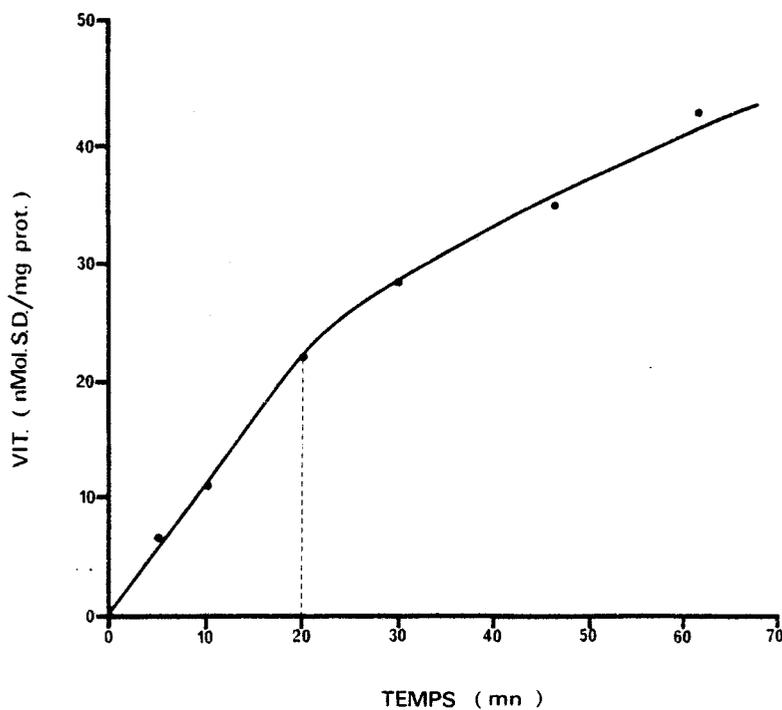


Figure 25 : Etude cinétique de l'activité de la M.A.O. L'expérience est réalisée avec l'homogénat de capillaires télencéphaliques. La concentration en protéines est de 80 μg par incubat. Les points représentent les valeurs moyennes.

- Etude de la vitesse de la réaction en fonction de la concentration en protéines de l'incubat

Comme le montre la figure 24, la vitesse de la réaction enzymatique augmente linéairement (de 0 à 80 pMol.S.d./min.) jusqu'à une concentration protéique de 90 µg par incubat pour les capillaires et de 200 µg par incubat pour le télencéphale (vitesse linéaire de 0 à 65 pMol.S.d./min.). C'est pourquoi nos incubations seront toujours réalisées avec des concentrations en protéines inférieures à ces valeurs.

- Etude de la vitesse de la réaction en fonction de la durée d'incubation (Fig. 25)

Cette étude cinétique de l'activité de la M.A.O. est réalisée en vue de déterminer la durée optimale de l'incubation. La mesure d'une activité enzymatique doit se faire à vitesse initiale (Fig. 25), lorsque la quantité de substrat désaminé augmente linéairement (de 0 à 22 179,34 pMol.S.d./mgP.) en fonction du temps (0 à 20 minutes).

Afin d'avoir une précision maximale, toutes nos mesures sont réalisées avec un temps d'incubation de vingt minutes.

- Etude de la vitesse de la réaction en fonction de la concentration en substrat (Fig. 26)

Cette étude permet de déterminer les deux principaux paramètres de l'activité enzymatique étudiée : sa vitesse maximale et son Km, ou constante de MICHAELIS-MENTEN.

Déterminées précisément par la courbe $1/V = f(1/[S])$ (Fig. 26), ces valeurs sont :

$$K_m = 16,389 \mu M$$

$$V_{max} = 1\,299,067 \text{ pMol.S.d./min/mgP.}$$

Tout dosage enzymatique doit être réalisé avec une concentration en substrat au moins égale à $K_m \times 3$, l'idéal étant $K_m \times 10$. Nous travaillons

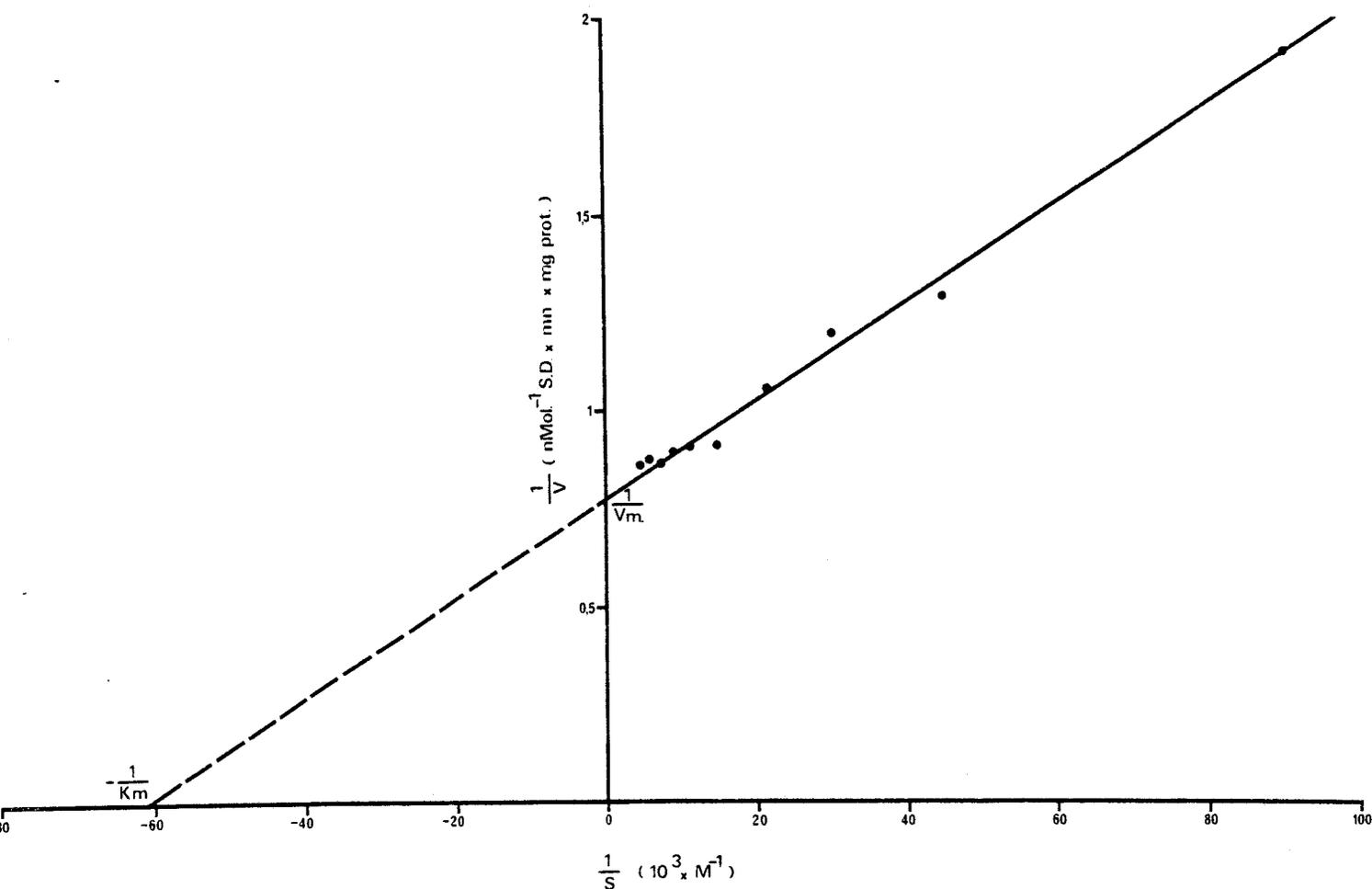


Figure 26 : Relation de LINEWEAVER-BURK liant la vitesse de la réaction enzymatique à la concentration en substrat.

Les points correspondent aux valeurs moyennes expérimentales.

L'expérience est réalisée selon les conditions de référence avec l'homogénat de capillaires.



avec 44,6 nMoles de tyramine par incubat de 400 μ l, donc à Km x 6,8. Une concentration en tyramine supérieure à cette valeur n'entraîne pas d'augmentation sensible de la vitesse de réaction mesurée. C'est pourquoi nous nous sommes tenus à cette quantité de substrat dans nos incubats.

*b) Activités mono-amine oxydasiques des échantillons
(Fig. 27 à 29)*

- Téleencéphale total et capillaires isolés

L'activité de la M.A.O. déterminée à partir de vingt expériences pour chaque préparation est illustrée (Fig. 27).

L'activité spécifique trouvée au niveau des capillaires, immédiatement après leur isolement (1 113,04 pMol.S.d./min/mgP.), est donc 3,2 fois plus élevée que celle trouvée au niveau de l'homogénat télencéphalique (350,99 pMol.S.d./min/mgP.).

- Cultures cellulaires et milieux de culture (Fig. 28)

Dès les premiers jours de culture, les cellules endothéliales montrent une nette diminution de leur activité mono-amine oxydasique.

L'activité spécifique d'une culture de cinq jours (268,60 pMol.S.d./min/mgP) est en effet déjà 4,1 fois moins forte que celle relevée au niveau des capillaires (1 113,04 pMol.S.d./min/mgP.).

La vitesse de décroissance de l'activité mono-amine oxydasique est particulièrement rapide pendant les dix à quinze premiers jours de la culture (L'activité spécifique est de 187,26 pMol.S.d./min/mgP. à douze jours de culture, soit une diminution de 5,9 fois par rapport aux capillaires). Puis, elle devient beaucoup plus lente dans les cultures sénescents : une activité de 104,02 pMol.S.d./min/mgP. est encore présente dans des cultures de soixante-neuf jours. La diminution de l'activité de la M.A.O. du 12^{ème} au 69^{ème} jour de vie "in vitro" n'est plus que de 1,8 fois.

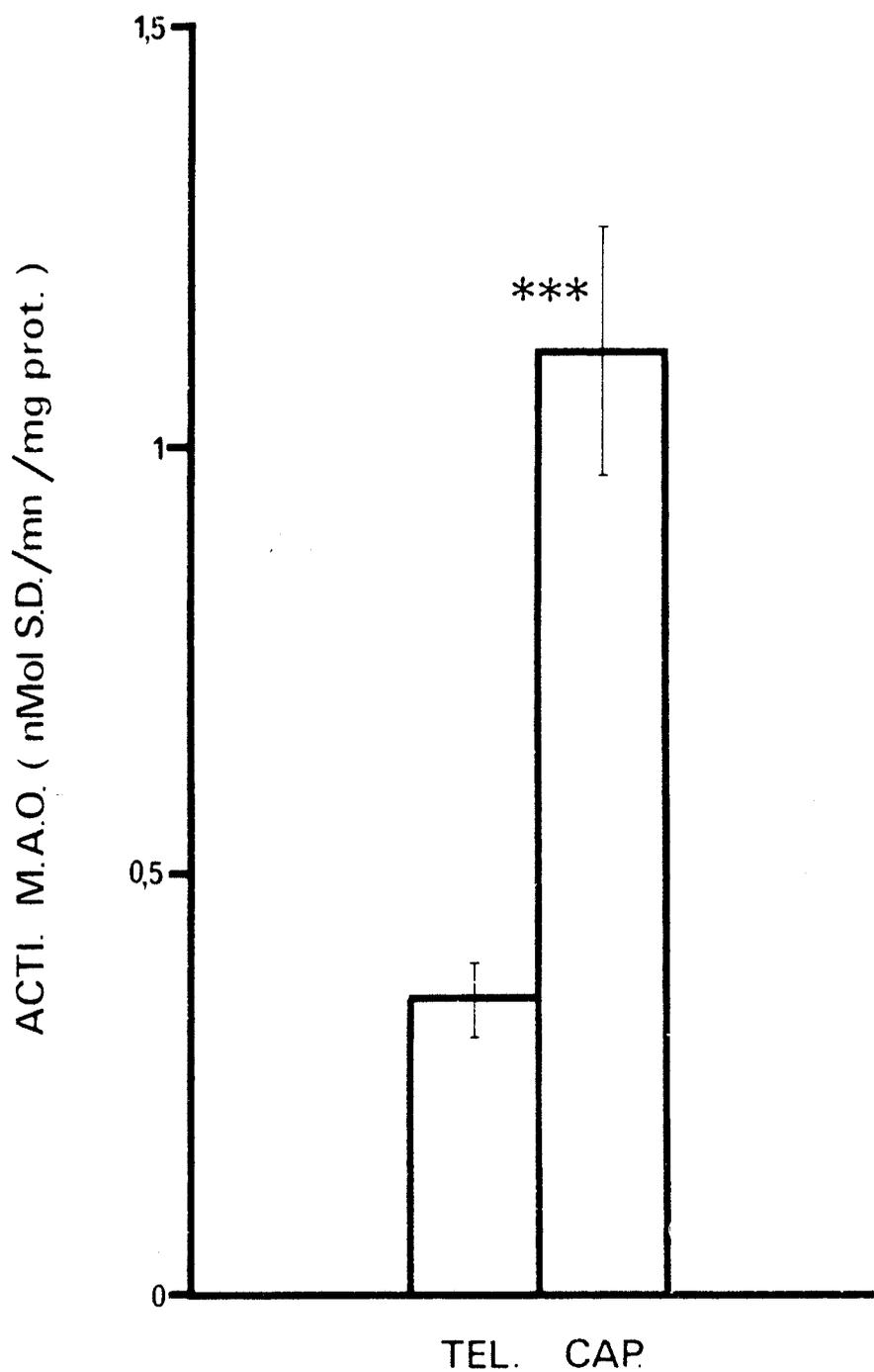


Figure 27 : Etude comparative de l'activité mono-amine oxydasique dans l'homogénat télencéphalique (TEL) et dans les capillaires cérébraux (CAP).

Les valeurs moyennes et les écarts-types sont représentés. (***) : $p < 0,001$.

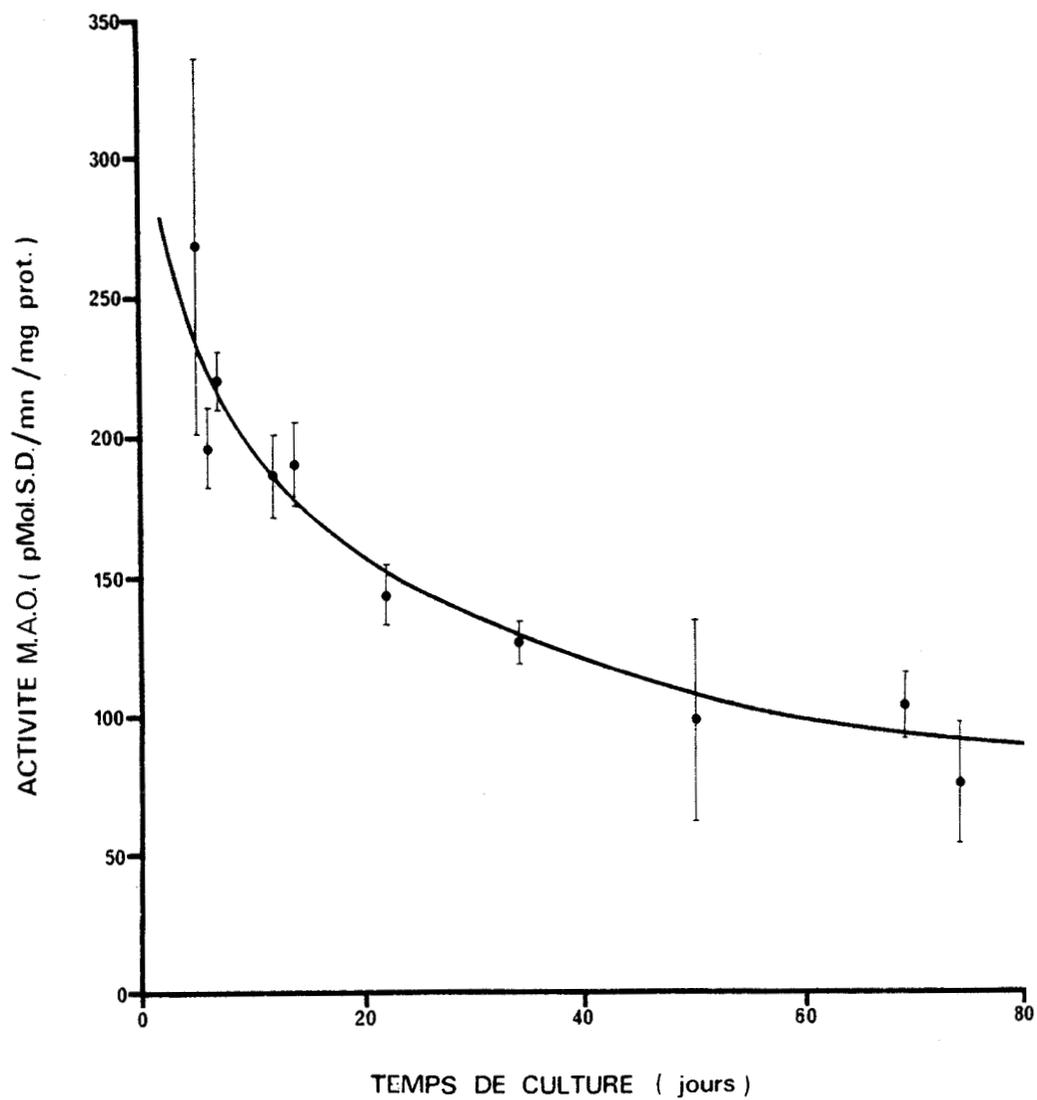


Figure 28 : Activité de la M.A.O. dans des cultures de cellules endothéliales âgées de 5 jours à 74 jours.

Les points représentent la moyenne et l'écart-type.

Quel que soit le stade de croissance de la culture dosée, aucune activité mono-amine oxydasique n'est décelable dans son milieu de culture et, de même, aucune activité de ce type n'est mesurable dans du milieu de culture neuf contenant du sérum de veau foetal.

- Activités mono-amine oxydasiques mesurées pendant
l'isolement des cellules endothéliales (Fig. 29)

Devant cette diminution rapide de l'activité spécifique mise en évidence aux premiers stades de la culture cellulaire, l'hypothèse d'une altération des cellules endothéliales due à la technique d'isolement elle-même était à envisager.

Cependant, il apparaît que la phase endothéliale isolée sur le gradient de PERCOLL, phase correspondant au matériel ensemencé, donc au temps zéro de la culture, possède une activité mono-amine oxydasique (1 102,9 pMol/S.d./min/mgP.) très proche de celle des capillaires fraîchement isolés (1 113,04 pMol.S.d./min/mgP.).

De même, le fait de passer le matériel capillaire, digéré ou non, sur gradient de PERCOLL, n'altère pas de façon significative son activité mono-amine oxydasique (respectivement de 1 102,9 pMol.S.d./min/mgP ou de 970,76 pMol.S.d./min/mgP.) qui reste très proche de celle des capillaires fraîchement isolés (1 113,04 pMol.S.d./min/mgP.).

De plus, les activités de la M.A.O. mesurées au niveau du matériel cellulaire, après une nuit de digestion par la collagénase (1 066,46 pMol.S.d./min/mgP.), ou après une nuit d'incubation dans le milieu 199 sans collagénase (1 015,30 pMol.S.d./min/mgP.) ne sont pas significativement différentes de l'activité des capillaires.

Remarquons enfin que si l'activité de la M.A.O. est extrêmement faible dans la fraction érythrocytaire (68,97 pMol.S.d./min/mgP.), elle est très élevée dans la phase supérieure du gradient de PERCOLL (919,04 pMol.S.d./min/mgP.), phase dans laquelle les observations microscopiques mettent en évidence une très forte proportion de déchets cellulaires et de cellules altérées.

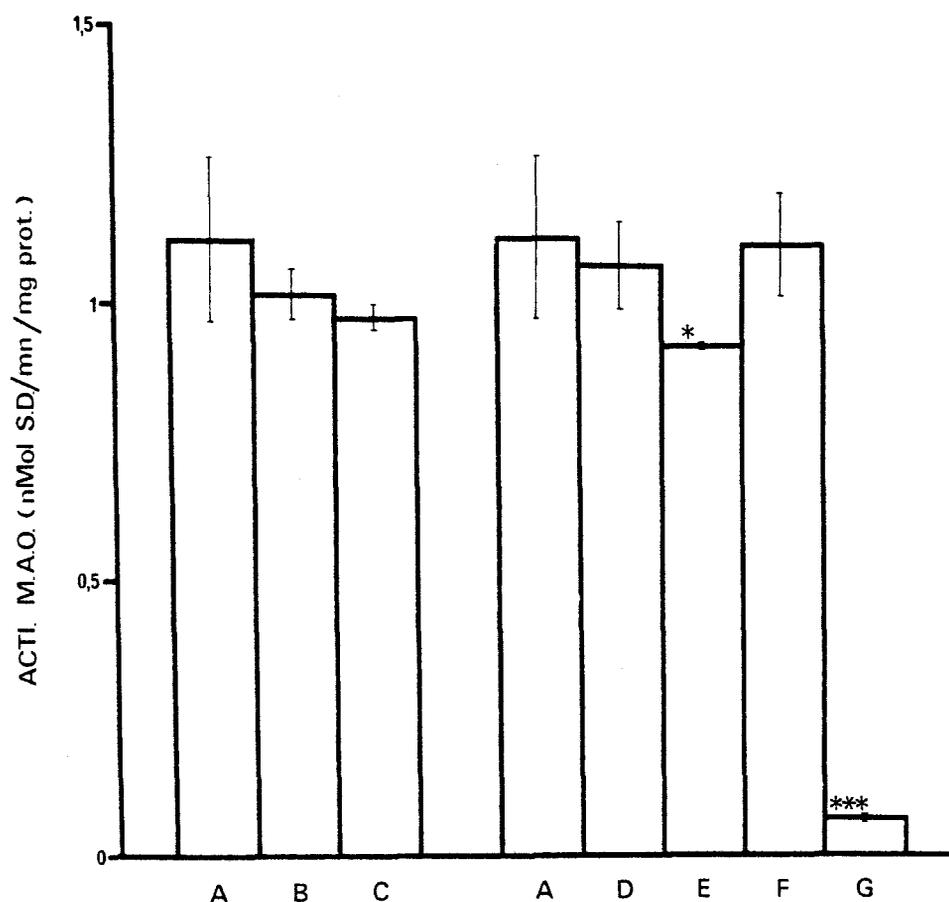


Figure 29 : Activité de la M.A.O. mesurée dans différentes fractions. Les valeurs moyennes et les écarts-types sont représentés.

- A : capillaires fraîchement isolés
 B : capillaires ayant séjourné une nuit dans le milieu 199 sans collagénase
 C : capillaires ayant séjourné une nuit dans le milieu 199 sans collagénase et passés sur gradient de PERCOLL
 D : capillaires digérés une nuit par la collagénase
 E : phase supérieure du gradient
 F : phase endothéliale du gradient
 G : phase érythrocytaire du gradient

* $p < 0,05$

*** $p < 0,001$

IV - DISCUSSION

La méthode de base du dosage de l'activité de la M.A.O. que nous utilisons (OTSUKA et KOBAYASHI, 1964) est employée dans des travaux très récents (LINDWALL et OWMAN, 1980 ; FOWLER et TIPTON, 1981). Ses deux principaux atouts, comparés aux autres procédés, sont évidents :

* Bien qu'utilisée pour doser l'activité mono-amine oxydasique globale, cette technique permet également de mesurer séparément les activités de type A et B, en utilisant des inhibiteurs sélectifs (FOWLER et TIPTON, 1981).

* L'extraction des métabolites formés par la réaction enzymatique est simple, rapide et efficace (OTSUKA et KOBAYASHI, 1964 ; FOWLER et ORELAND, 1980).

Le premier résultat obtenu par cette méthode de dosage est la mesure du K_m de la M.A.O., dans nos échantillons et avec la tyramine comme substrat. La valeur de K_m (16,4 μM) que nous obtenons est du même ordre que celles obtenues par FOWLER et al. en 1981 lors d'une étude comparative des activités mono-amine oxydasiques de cerveaux de boeuf ($K_m = 15 \mu\text{M}$), d'élan ($K_m = 6 \mu\text{M}$) et de renne ($K_m = 17 \mu\text{M}$). Par contre, elle est beaucoup plus faible que celle obtenue sur des préparations mitochondriales isolées à partir de foie de rat ($K_m = 313 \mu\text{M}$) (FOWLER et TIPTON, 1981) ou à partir de foie et de cerveau de grenouille (Respectivement 333 μM et 455 μM) (KOBAYASHI et al., 1981).

Les variations dues à l'espèce animale, à l'organe, au tissu et même à la fraction cellulaire, apparaissent donc d'emblée très importantes.

Cette notion de disparité se retrouve également au niveau de la mesure de la vitesse de la réaction enzymatique. A ce jour, l'étude comparative de l'activité de la M.A.O. au niveau du télencéphale, des capillaires télencéphaliques et de cultures de leurs cellules endothéliales, n'a jamais été effectuée. Les résultats que nous obtenons chez le poulet sont donc les premiers.

LAI et al. (1975) sont les premiers à mettre en évidence un enrichissement de l'activité mono-amine oxydasique dans une fraction micro-vasculaire, où $V = 7,09 \text{ nMol.S.d./min/mgP}$. obtenue à partir de cerveau de rat, où

$V = 2,9 \text{ nMol.S.d./min/mgP.}$: cet enrichissement est de l'ordre de 2,4 fois. L'activité spécifique que nous obtenons à partir des capillaires télencéphaliques de Poulet (1,113 nMol.S.d./min/mgP.) est plus faible que celle rapportée par LAI et al. (1975) pour les micro-vaisseaux de cerveau de Rat (7,09 nMol.S.d./min/mgP). Les activités de la M.A.O. que nous mesurons pour le télencéphale total (350,99 pMol.S.d./min/mgP.) ne peuvent être que comparées globalement à des valeurs obtenues pour le cerveau entier. LAI et al. (1975) mesurent une vitesse de 2,9 nMol.S.d./min/mgP. dans le cerveau de Rat, FOWLER et al. (1981), une vitesse de 557 pMol.S.d./min/mgP. pour le cerveau de Boeuf, de 313 pMol.S.d./min/mgP. pour le cerveau d'Elan et de 281 pMol.S.d./min/mgP. pour le cerveau de Renne.

Les valeurs de l'activité mono-amino oxydasique qui ont été relevées chez le Poulet (SUZUKI et al., 1978 ; ALI et BARTLET, 1980 ; RONDINA et al., 1981) sont malheureusement exprimées en fonction du poids de tissu, frais ou sec, et ne sont donc pas comparables aux nôtres sans risque d'erreur.

L'enrichissement de l'activité de la M.A.O. dans la fraction capillaire, comparée au télencéphale total est de 3,17 fois pour notre matériel. Notons ici que dans le télencéphale, l'activité mono-amino oxydasique a principalement une origine nerveuse et non vasculaire, comme c'est le cas des capillaires. Ces valeurs d'enrichissement confirment donc les travaux de LAI et al. (1975) chez le Rat et différent de ceux de HAENICK et al. (1981) qui trouvent une activité mono-amino oxydasique sensiblement identique dans les micro-vaisseaux et dans l'homogénat total de cerveau de Rat.

Cependant, ces énormes différences d'activités spécifiques de la M.A.O. peuvent s'expliquer :

* Les résultats sont souvent obtenus à partir d'animaux d'espèces ou de souches différentes. L'importance de ce facteur est démontrée par les travaux de SUZUKI et al. (1981) qui, en utilisant les mêmes conditions, mesurent des activités mono-amino oxydasiques différentes chez huit espèces animales.

* Tous les auteurs n'utilisent pas le même substrat pour effectuer la réaction enzymatique (*Tableau VI*). En utilisant le même principe de dosage radioisotopique, l'activité de la M.A.O. globale peut en effet être mesurée

en utilisant comme substrat, soit la tryptamine (Technique de WURTMAN et AXELROD, 1963), soit la tyramine (Technique d'OTSUKA et KOBAYASHI, 1964). Mais FOWLER et al. (1981) montrent que, dans le cerveau de boeuf, l'activité spécifique de la M.A.O. avec comme substrat la tryptamine n'est que 39,7 % de celle mesurée avec comme substrat la tyramine.

* Les conditions de l'incubation varient selon les auteurs (Durée et température d'incubation, tampon, pH, présence ou non d'oxygénation forcée...).

* Et surtout, la préparation des échantillons tissulaires et le degré de pureté des isolements sont extrêmement variables. Dans l'exemple qui nous intéresse, les auteurs mesurent l'activité de la M.A.O. dans des isolements de micro-vaisseaux (LAI et al., 1975 ; HAENICK et al., 1981) et non dans des fractions purifiées de capillaires. La présence, parmi les cellules endothéliales, de cellules musculaires lisses en particulier et des terminaisons nerveuses qui leur sont associées, modifie vraisemblablement le résultat final d'une façon significative.

C'est à ce stade qu'intervient la technique de la culture cellulaire car elle seule permet d'étudier l'activité de la M.A.O. sur des cellules endothéliales pures, obtenues à partir de capillaires télencéphaliques et ceci dans un environnement parfaitement connu.

Cette première série de dosages a uniquement pour but de mesurer les activités spécifiques de la M.A.O. de cellules endothéliales obtenues à partir de capillaires cérébraux et cultivées en conditions standard.

Nous constatons tout d'abord que la technique utilisée pour obtenir une fraction purifiée de cellules endothéliales, n'altère pas de façon significative l'activité enzymatique étudiée. En effet, le matériel endothélial digéré par la collagénase et récupéré dans le gradient de PERCOLL possède une activité mono-amine oxydasique de 1 102,9 pMol.S.d./min/mgP., alors que l'activité spécifique des capillaires fraîchement isolés est de 1 113,04 pMol.S.d./min/mgP., donc du même ordre. Notons qu'en isolant les capillaires cérébraux, nous recueillons également des éléments cellulaires non endothéliaux : péricytes, cellules musculaires lisses, éléments figurés du sang, pieds astrocytaires. Comme l'activité mono-amine oxydasique de la fraction endothéliale

purifiée est identique à celle de cette fraction de capillaires, alors qu'elle devrait lui être supérieure, nous pouvons donc en déduire que la purification de la phase endothéliale est contre-balançée par une très légère altération de l'activité enzymatique étudiée. Et comme l'activité des capillaires, après un séjour d'une nuit dans le milieu de culture, passe de 1 113,04 pMol.S.d./min/mgP. à 1 015,30 pMol.S.d./min/mgP., cette légère altération semble essentiellement fonction du temps et non de la technique elle-même. Le fait que la phase supérieure du gradient possède une activité mono-amine oxydase égale à 919,04 pMol.S.d./min/mgP. s'explique : la M.A.O. étant localisée dans les mitochondries et cette zone contenant principalement des débris cellulaires, donc des mitochondries, il est normal d'y trouver une activité spécifique aussi élevée.

Par contre, une altération rapide et importante de l'activité mono-amine oxydase se produit en culture : l'activité spécifique des cellules endothéliales, qui n'est déjà plus que de 268,60 pMol.S.d./min/mgP. au bout de cinq jours "in vitro", soit 4,1 fois moins que lors de l'ensemencement (1 102,9 pMol.S.d./min/mgP.), diminue en effet progressivement en fonction du temps. TREVETHICK et al. (1981) rapportent également la décroissance de l'activité de la M.A.O. en fonction de l'âge dans des cultures de cellules endothéliales d'aorte de porc. Mais leurs résultats, obtenus sur ce matériel, par une technique d'"uptake", très différente de la nôtre, avec des substrats autres que la tyramine et, de plus, exprimés en fonction du nombre de cellules, ne sont pas comparables à ceux que nous obtenons.

En réponse à ces observations sur la décroissance de l'activité de la M.A.O. dans les cultures endothéliales, nous émettons plusieurs hypothèses :

* Cette diminution est à replacer dans le contexte général de la sénescence des cultures. Le rapprochement est en effet évident entre les résultats de ce dosage et ceux obtenus lors du dosage de l'activité de l'A.C.E. Les observations microscopiques de la morphologie cellulaire étayent ces données. Ce vieillissement cellulaire morphologique et métabolique est remarqué par tous les auteurs travaillant sur l'endothélium "in vitro".

* Peut-être l'activité de M.A.O. décroît-elle parce que dans le milieu de culture, il n'y a pas de substrat pour cette enzyme ? La cellule cesserait alors de fabriquer une enzyme devenue inutile.

* GOSPODAROWICZ (1980) démontre que la présence de certains facteurs, appelés facteurs de croissance, est indispensable dans le milieu de culture pour préserver l'intégrité morphologique et métabolique des cellules endothéliales "in vitro" à très long terme. Se trouve donc posé le problème du rôle de l'environnement cellulaire. La question est de savoir si certaines molécules présentes dans l'organisme et/ou le télencéphale peuvent, lorsqu'elles sont ajoutées au milieu de culture, influencer sur le processus de la sénescence de l'endothélium capillaire cérébral "in vitro" et donc sur l'intégrité de ce modèle de la barrière hémato-encéphalique : c'est ce sujet qui va être abordé dans la dernière partie de ce travail.

Notons enfin, pour terminer, que l'activité de la M.A.O. n'est pas mesurable, par la technique utilisée, dans le milieu de culture, quelle qu'aît été la durée de contact entre celui-ci et les cellules endothéliales. Ceci rejoint les travaux de BLASCHKO (1962) et ceux de OTSUKA et KOBAYASHI (1964) qui constatent que cette activité enzymatique est très faible, voire nulle dans le plasma sanguin.

B - INFLUENCE D'EXTRAITS PHYSIOLOGIQUES SUR LES ACTIVITES

MONO-AMINE OXYDASIQUES

I - INTRODUCTION

Au cours de cette dernière phase du travail, est étudié le rôle éventuel que peuvent avoir différents environnements sur la morphologie de l'endothélium des capillaires télencéphaliques en culture et sur son activité mono-amine oxydasique.

En nous permettant de disposer de cellules endothéliales pures, cultivées en dehors de l'organisme dans un milieu facilement modifiable et contrôlable, la technique de la culture cellulaire se prête parfaitement à de telles recherches.

Seront successivement étudiés :

* Le remplacement du S.V.F. du milieu de culture standard par du sérum de poulet ;

* Le remplacement de ce S.V.F. par de l'extrait total d'embryons de poulet ;

* L'addition au milieu de culture standard d'extraits de cerveaux d'embryons de poulet et de poulets de 1 jour et de 30 jours ;

* L'action combinée de l'extrait d'embryon total et de l'extrait de cerveaux d'embryons.

II - METHODES

1 - OBTENTION OU FABRICATION DES SERA ET DES EXTRAITS

* L'extrait total d'embryons de Poulet nous est fourni, tout comme le S.V.F., par les laboratoires EURO BIO.

* Le sérum de Poulet est obtenu par coagulation totale, en quatre à six heures, du sang recueilli lors du sacrifice des animaux. Le sérum exsudé est alors recueilli et centrifugé à 3 000 g pendant quinze minutes (Centrifugeuse CHRIST réfrigérée à 4°C). Le sérum surnageant est alors stérilisé par passage sur filtre MILLIPORE et peut, ou non, être inactivé à 56°C pendant trente minutes (Technique communiquée par R. GUILLOT).

* Les extraits de cerveaux sont préparés selon une modification de la technique de PETTMANN et al. (1981) :

Après décapitation des embryons ou des poulets, les cerveaux entiers sont prélevés, lavés et homogénéisés dans deux volumes de milieu 199 avec sels de HANKS (EUROBIO) à l'aide d'un vase de BRAUN-MELSUNGEN à piston de TEFLON tournant à 1 500 t/min. L'homogénat obtenu est centrifugé à 105 000 g pendant une heure et à 4°C (Ultracentrifugeuse BECKMAN L5-65). Le surnageant est recueilli, stérilisé par passage sur filtre MILLIPORE et sa concentration en protéines y est mesurée selon la modification de la technique de LOWRY et al. (1951) décrite précédemment.

2 - INCORPORATION AU MILIEU DE CULTURE

* L'extrait total d'embryons ou le sérum de Poulet sont incorporés au milieu de culture standard en remplacement de 30 ou de 60 % de son S.V.F.

* Les extraits de cerveaux sont simplement ajoutés au milieu de culture standard à chaque changement de ce milieu. La concentration finale est comprise entre 0,3 et 2 mg de protéines d'extrait pour 1 ml du milieu.

3 - MESURES

L'influence de ces différents extraits sera étudiée selon trois axes :

* Activité de la M.A.O. des cultures qui sera mesurée selon les techniques déjà exposées ;

* Morphologie des cellules en culture qui sera appréciée en microscopie optique ;

* Prolifération des cellules. La technique la plus couramment utilisée est le dénombrement de la population cellulaire à l'aide de l'hématimètre de MALASSEY. Nous lui avons préféré une méthode qui consiste à mesurer la quantité de protéines totale, contenue dans la fiole de culture, selon la technique de LOWRY et al. (1951).

En effet, lorsque nous moissonnons une de nos cultures à l'aide de solution trypsine-E.D.T.A., les cellules se détachent par paquets plus ou moins importants et non individuellement, ce qui entraîne de fortes erreurs lors d'un comptage à l'hématimètre. Notons que cette mesure de la teneur en protéines est toujours effectuée avant que le tapis cellulaire ne soit arrivé à confluence, de façon à éviter un arrêt de la prolifération des cellules par inhibition de contact.

III - RESULTATS

1 - MANIPULATIONS PRELIMINAIRES

a) Expression des résultats

Lors de la mise en culture, deux à quatre fioles sontensemencées avec une quantité rigoureusement égale de la suspension de cellules endothéliales.

Les lots de milieu, sérum, fioles et les conditions sont les mêmes pour toutes les cultures correspondant à un ensemencement. Une de ces cultures sert de témoin en milieu standard, tandis que les autres sont soumises à l'action de différents extraits.

De façon à éliminer les variations individuelles, inhérentes aux différences d'âges du matériel et des cultures, à l'état général de celles-ci et à la quantité de l'ensemencement, les résultats des dosages sont exprimés en écarts de pourcentage par rapport à la culture témoin. L'activité spécifique de la M.A.O. et la teneur en protéines de cette culture témoin se

voient alors attribuer, arbitrairement, la valeur 100 %.

b) Age des cultures

De façon à travailler sur des cultures à la fois bien établies, en état de proliférer, et possédant des potentialités enzymatiques encore élevées, les dosages portent généralement sur des cultures d'un âge variant de quatre à huit jours. De plus, vérification a été faite, lors des premières expériences, qu'aucune variation, tant du point de vue morphologique, que du point de vue de l'activité de la M.A.O. ou de celui de la teneur en protéines, n'avait lieu lorsque les extraits sont ajoutés à une culture déjà sénescence, c'est-à-dire d'un âge supérieur à quinze jours.

De même, comme nous le verrons lors de l'expression des résultats, le processus de sénescence se manifeste toujours, que les cellules endothéliales soient, ou non, cultivées en présence des extraits physiologiques étudiés. Seule varie parfois la latence d'apparition de ce vieillissement, qui peut alors atteindre 20 à 25 jours.

c) Milieu de fabrication des extraits de cerveau

PETTMANN et al. (1981) utilisent la solution saline de TYRODE pour fabriquer leurs extraits de cerveau. L'addition à nos cultures de cellules endothéliales d'extraits de cerveaux ayant comme base cette solution de TYRODE provoque une légère vacuolisation des cellules, apparaissant en moyenne 48 heures après addition de l'extrait. Cette altération cellulaire ne se produit pas lorsque les extraits sont fabriqués dans du milieu 199 et c'est la raison pour laquelle nous utilisons ce milieu à la place d'une solution saline équilibrée qui provoque peut-être une dilution trop forte de certains constituants de la base de culture standard.

d) Moment de l'addition

* L'extrait total d'embryons et le sérum de poulet sont incorporés dans le milieu de culture dès l'ensemencement du matériel cellulaire.

* Par contre, lorsque l'extrait de cerveaux, qu'il soit obtenu à partir d'embryons de Poulet ou de poulets de 1 jour ou de 30 jours et quelle que soit sa concentration, est ajouté au milieu de culture standard dès l'ensemencement des cultures, un effet toxique est observé : les cellules ne se fixent pas à la surface de culture et l'ensemble de la population est mort en 36 heures en moyenne. Pareil effet est observé lorsqu'une culture parvenue à confluence est divisée : les cultures-filles dégénèrent de la même façon si l'extrait de cerveaux est présent dans le milieu dès le ré-ensemencement.

Par contre, cette toxicité ne s'observe pas, bien au contraire lorsque les extraits cérébraux sont ajoutés au milieu de culture 24 heures après l'ensemencement, c'est-à-dire lors du premier rinçage de la boîte, quand la majorité des cellules endothéliales s'est fixée à la surface de culture et a commencé sa prolifération.

2 - MESURES

a) Action du sérum de Poulet

La *figure 30* suffit à résumer l'effet toxique d'un remplacement partiel du S.V.F. par du sérum de Poulet.

Dans le cas présent, 30 % seulement de la quantité totale de S.V.F. du milieu de culture ont été remplacés par du sérum de Poulet.

Vingt-quatre heures après cette substitution, apparaissent, dans pratiquement toutes les cellules, de petites vacuoles arrondies, très réfringentes. En deux à trois jours, la prolifération des cellules endothéliales est stoppée. Les cellules accusent une vacuolisation considérable et leur morphologie est caractéristique de la sénescence.

Cet effet toxique se manifeste quel que soit l'âge de la culture et que le sérum de Poulet ait été inactivé à la chaleur ou non.

Devant une telle altération des cellules, il nous a paru tout à fait inintéressant de mesurer l'activité de la M.A.O. et la teneur en protéines des cultures, les valeurs obtenues étant vraisemblablement aberrantes.



Figure 30 : Altération et vacuolisation considérable des cellules endothéliales cultivées en présence de sérum de poulet. Culture de 7 jours.

(Grossissement : x 1000)

b) *Influence de l'extrait total d'embryons*

- Sur la morphologie et la prolifération cellulaire

(Fig. 31_B)

Pendant toute la durée de la culture, que 30 ou 60 % du S.V.F. contenus dans le milieu aient été remplacés par de l'extrait total d'embryons, la morphologie des cellules "traitées" n'apparaît pas différente de celle des cellules "témoin".

Cependant, le tapis cellulaire, même non confluent, prend plus rapidement un aspect de mosaïque endothéliale en présence d'extrait embryonnaire. Mais, comme dans le cas du milieu de culture standard, les cellules prennent un aspect sénescant en deux à trois semaines.

Si la prolifération des cellules est accélérée en présence de 30 % d'extrait total d'embryons (161,32 %), en présence de 60 % d'extrait, la différence entre l'endothélium "traité" (93,60 %) et l'endothélium témoin (100 %) n'est plus significative.

- Sur l'activité de la M.A.O. (Fig. 31_A)

Le même phénomène se rencontre lors de la mesure de l'activité spécifique de la M.A.O.

En effet, si l'incorporation de 30 % d'extrait total d'embryons élève significativement l'activité enzymatique étudiée (136,02 %), l'incorporation de 60 % de cet extrait entraîne au contraire une chute de cette activité de la M.A.O. à 75,76 % de la valeur du témoin seulement.

- Conclusion

Une influence positive sur la prolifération des cellules endothéliales en culture et sur leur activité mono-amine oxydasique est donc mise en évidence lorsque de l'extrait total d'embryons de Poulet est incorporé au milieu de culture.

Mais la concentration de cet extrait semble très importante : en

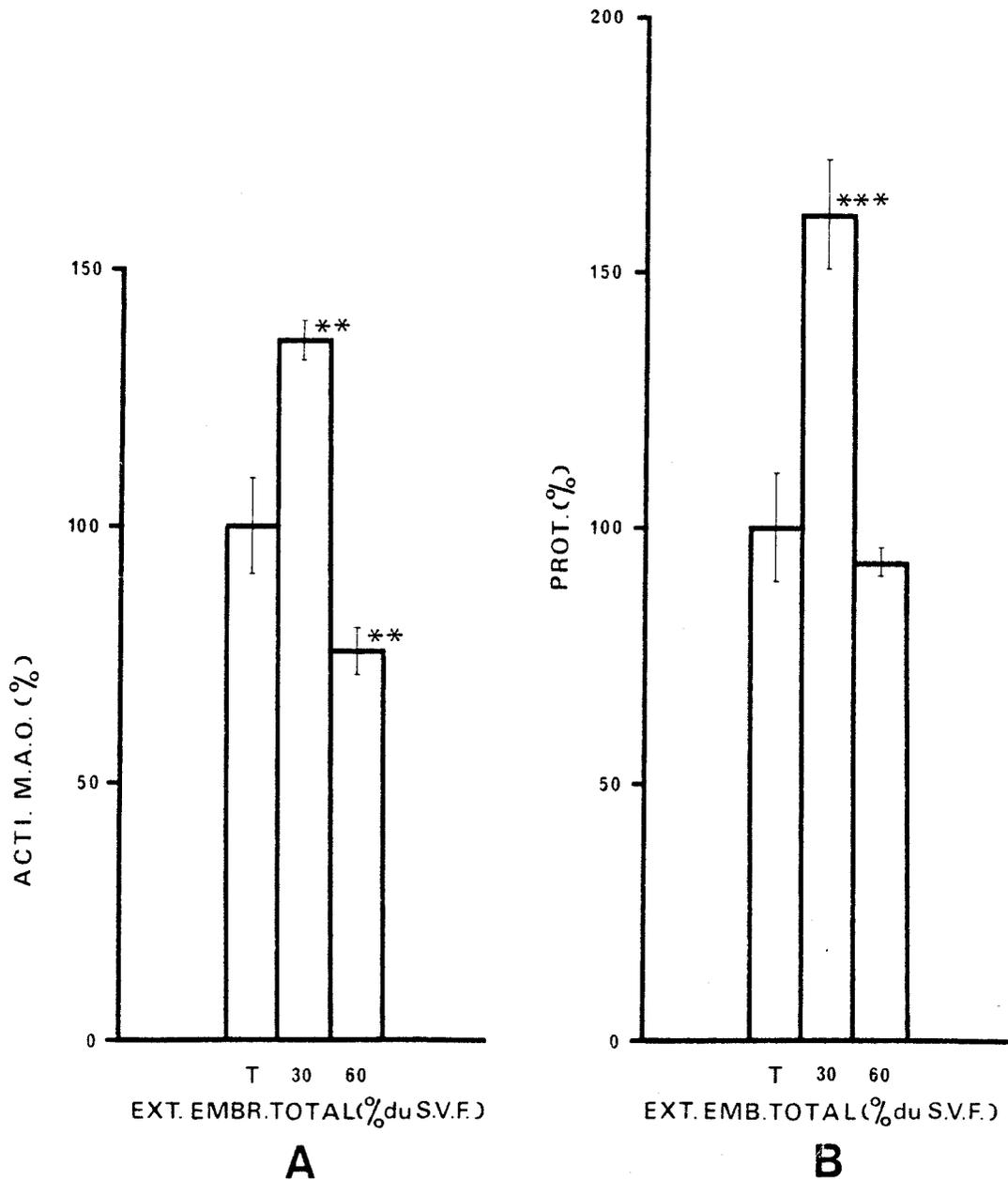


Figure 31 : Influence de l'extrait total d'embryons sur l'activité de la M.A.O. (A) et sur la teneur en protéines (B) des cultures endothéliales. Chaque valeur représente la moyenne et l'écart-type obtenus à partir de quatre expériences.

T : témoin

30 : remplacement de 30 % du S.V.F. par de l'extrait embryonnaire total

60 : remplacement de 60 % du S.V.F. par de l'extrait embryonnaire total

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$



effet, si une augmentation se manifeste au niveau des phénomènes métaboliques étudiés, avec le remplacement de 30 % du S.V.F. par de l'extrait embryonnaire, c'est l'effet inverse, donc une toxicité, qui apparaît lorsque cette proportion d'extrait est portée à 60 % de la quantité de S.V.F.

Notons enfin que le vieillissement cellulaire s'établit malgré la présence de cet extrait embryonnaire homologue.

C) Influence des extraits de cerveaux

- Extrait de cerveaux d'embryons

Cette étude avait pour but la détermination d'une concentration optimale d'extrait de cerveaux. Nous avons donc incorporé au milieu de culture des doses d'extrait comprises entre 0 et 2 mg de protéines par millilitre de milieu standard.

Influence sur la morphologie et la prolifération cellulaires (Fig. 32_B à 35)

Comme en témoignent les figures 32_B et 33, une augmentation de + 93,93 % de la teneur en protéines des cultures est déjà provoquée par l'addition de 0,33 mgP. d'extrait par millilitre. Cette augmentation atteint + 266,67 % pour 0,66 mgP. d'extrait par millilitre et se stabilise vers cette valeur pour des concentrations d'extrait allant jusqu'à 2 mgP. d'extrait par millilitre (soit + 251,25 %).

La microscopie confirme et vérifie ce résultat. Les figures 34 et 35 montrent deux cultures résultant du même ensemencement. L'une (Fig. 34) est cultivée en milieu standard, l'autre (Fig. 35) en milieu standard contenant 1 mgP. d'extrait de cerveaux d'embryons par millilitre de milieu. Bien que ces cultures contiennent toutes deux des cellules en excellent état, la prolifération de la population cellulaire "traitée" est beaucoup plus intense : le tapis cellulaire constitué dans cette culture par des cellules endothéliales étroitement accolées les unes aux autres est déjà pratiquement confluent, alors que la multiplication et l'étalement cellulaires ne semblent que commencer dans la culture "témoin".

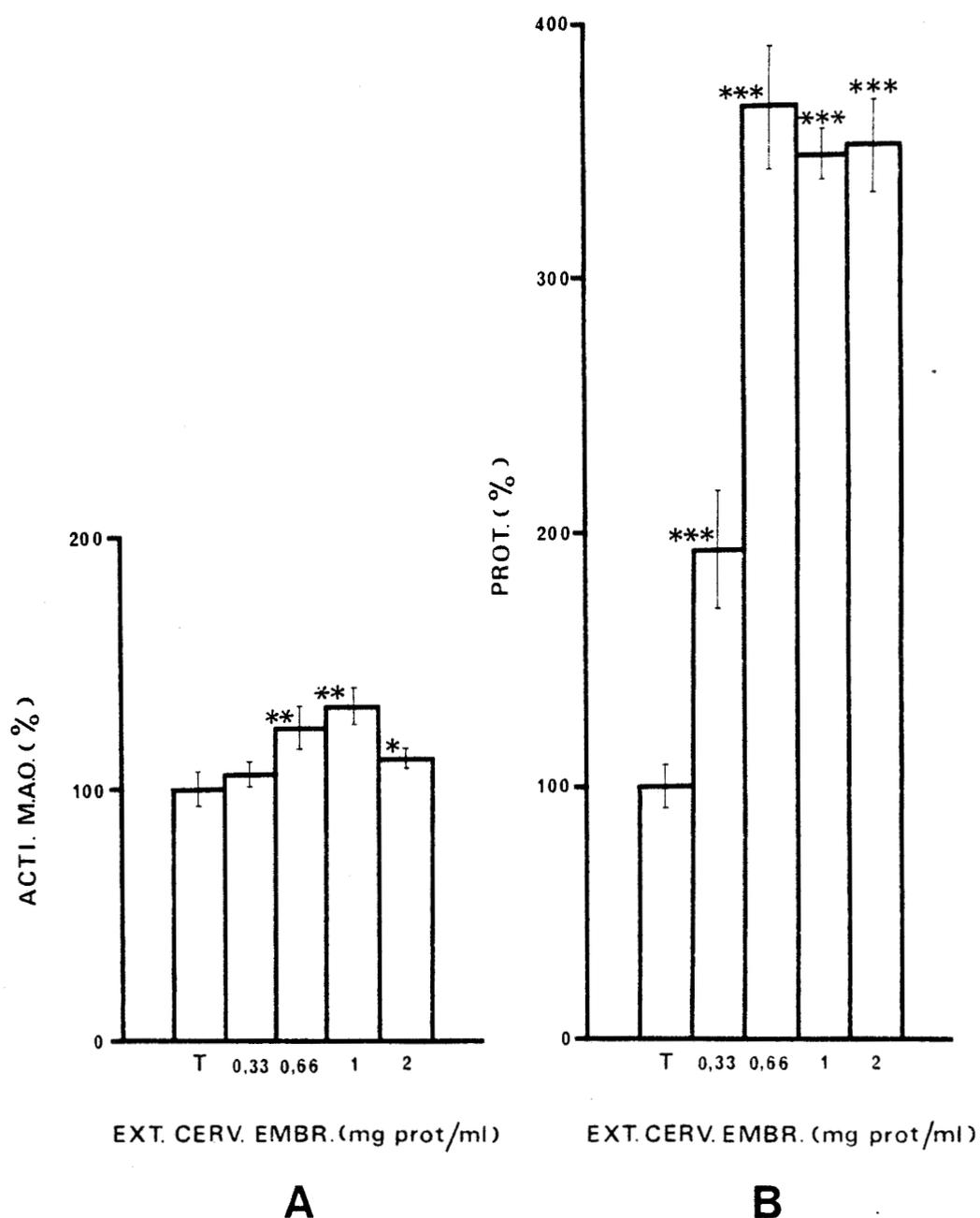


Figure 32 : Influence de l'extrait de cerveaux d'embryons sur l'activité de la M.A.O. (A) et la teneur en protéines (B) des cultures endothéliales.

Chaque valeur représente la moyenne et l'écart-type obtenus à partir de quatre expériences.

T : témoin en milieu standard

0,33 - 0,66 - 1 - 2 : quantités d'extrait de cerveaux d'embryons ajoutées au milieu standard et exprimées en mg de protéines d'extrait par millilitre de milieu.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$



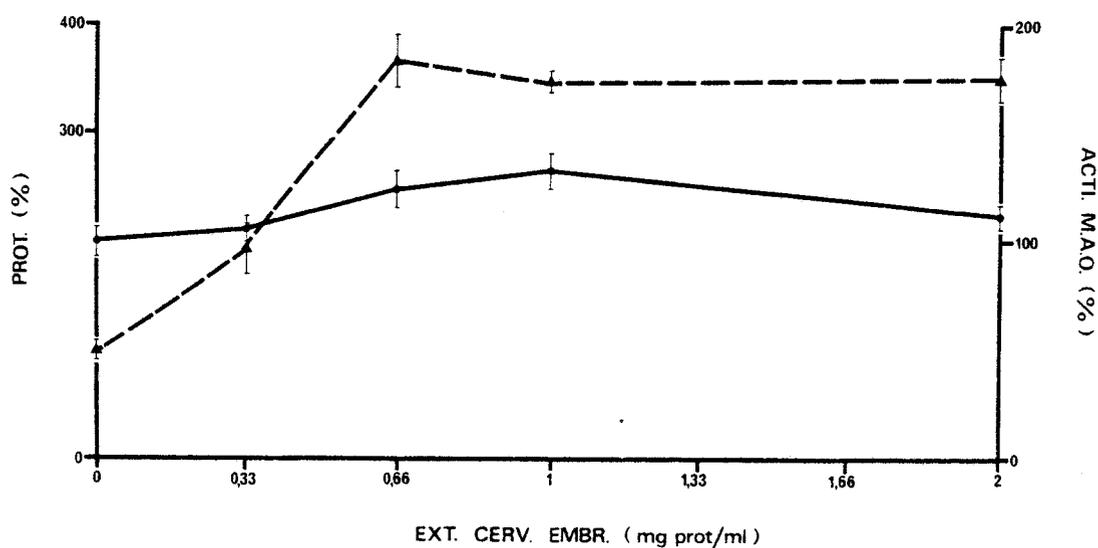
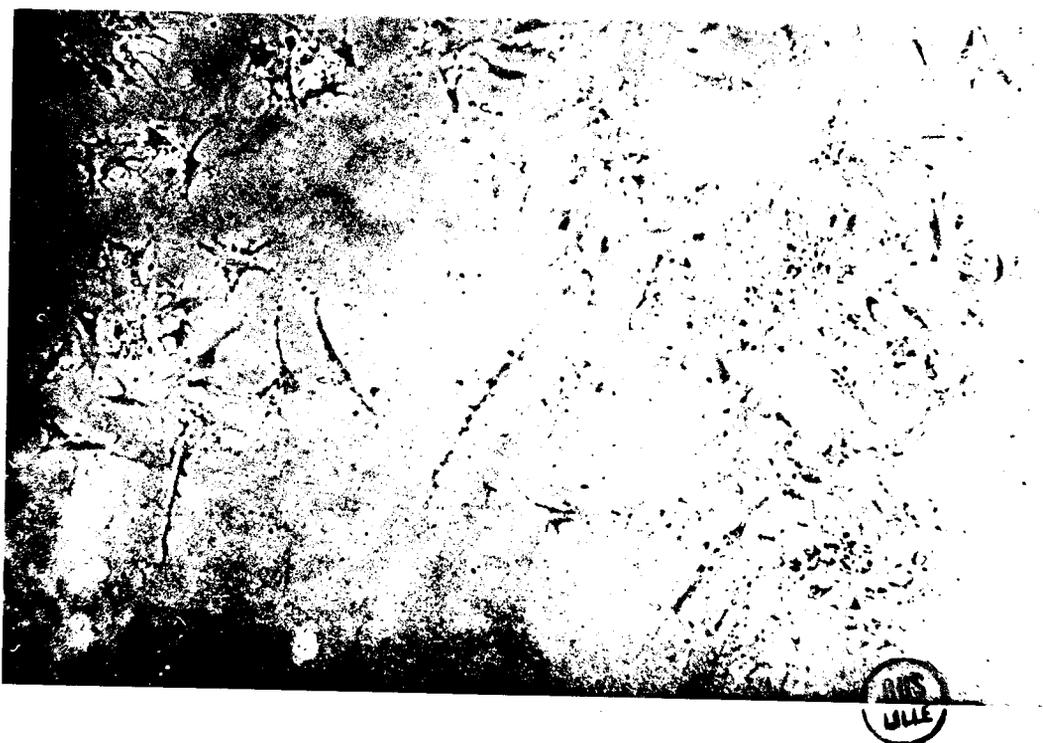


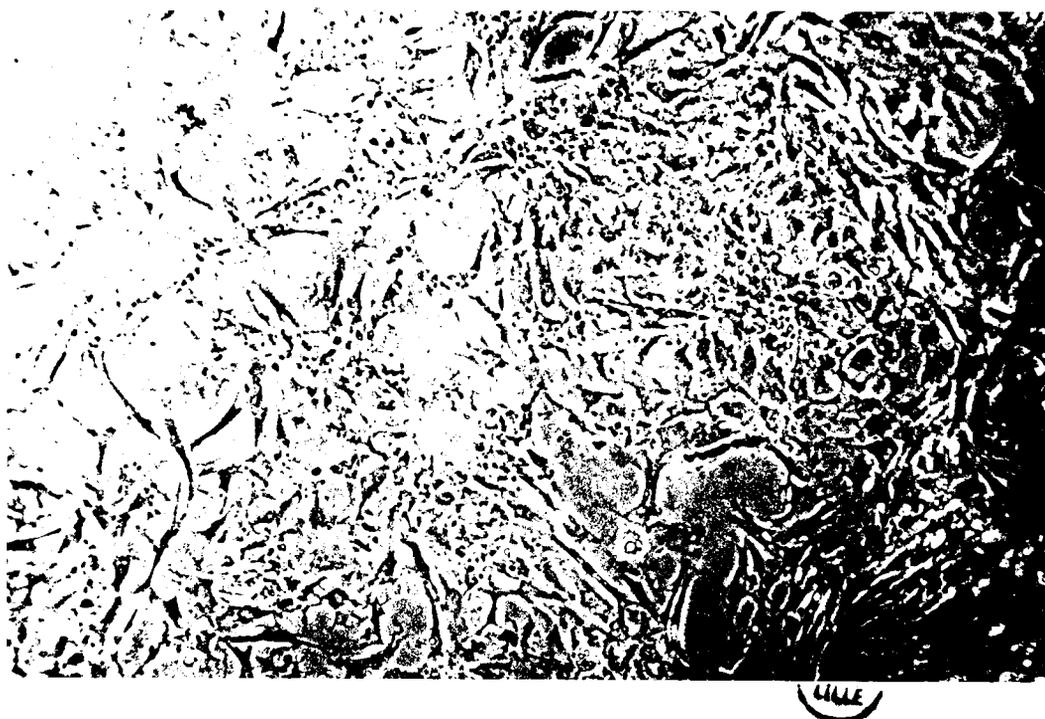
Figure 33 : Influence de l'extrait de cerveaux d'embryons sur l'activité de la M.A.O. (◆—◆) et sur la teneur en protéines (▲—▲) des cultures endothéliales. Ces courbes sont déduites des histogrammes de la figure 32 et permettent de déterminer la concentration optimale d'extrait. Les points représentent la valeur moyenne et l'écart-type.

Fig. 34

Gross. : x 320

Fig. 35

Gross. : x 320



Figures 34 et 35 : Trois jours après l'ensemencement, aspect de cellules endothéliales cultivées en milieu standard (Fig. 34) et en milieu contenant 1 mg de protéines d'extrait de cerveaux d'embryons par millilitre de milieu (Fig. 35).

Influence sur l'activité de la M.A.O.

Ce dosage (*Figures 32_A et 33*) confirme lui aussi l'influence positive de l'addition d'extrait de cerveaux d'embryons sur les cellules cultivées. Bien que moins démonstratives que les mesures de quantités de protéines, les valeurs trouvées montrent qu'une concentration d'extrait voisine de 1 mg de protéines par millilitre de milieu induit une augmentation optimale de l'activité de la M.A.O. (+ 33,74 %).

Par contre, une augmentation de + 12,00 % seulement de cette activité lorsque la concentration d'extrait de cerveaux d'embryons est de 2 mg de protéines par millilitre de milieu, nous laisse supposer là aussi une toxicité des fortes doses d'extrait sur cette activité enzymatique.

- Extraits de cerveaux de poulets de différents âges

Ainsi donc, une stimulation importante de la prolifération des cellules endothéliales en culture et de leur activité mono-amine oxydasique est provoquée lors de l'incorporation au milieu de culture d'extrait de cerveaux d'embryons.

A ce stade, nous nous sommes posé la question de savoir quel serait l'effet d'un extrait de cerveaux de poulets en croissance post-natale.

Nous avons donc fabriqué cet extrait à partir de cerveaux de poulets d'un jour, d'une part, et, d'autre part, de cerveaux de poulets de trente jours.

Son incorporation dans le milieu de culture se fait à la concentration de 1 mg de protéines par millilitre, concentration apportant, dans le cas d'extraits de cerveaux d'embryons, la stimulation de l'activité de la M.A.O. la plus forte.

Influence sur la prolifération cellulaire

Comme le montre la *figure 36_B*, l'influence de l'extrait de cerveaux sur la prolifération cellulaire diminue lorsque l'âge des poulets ayant servi



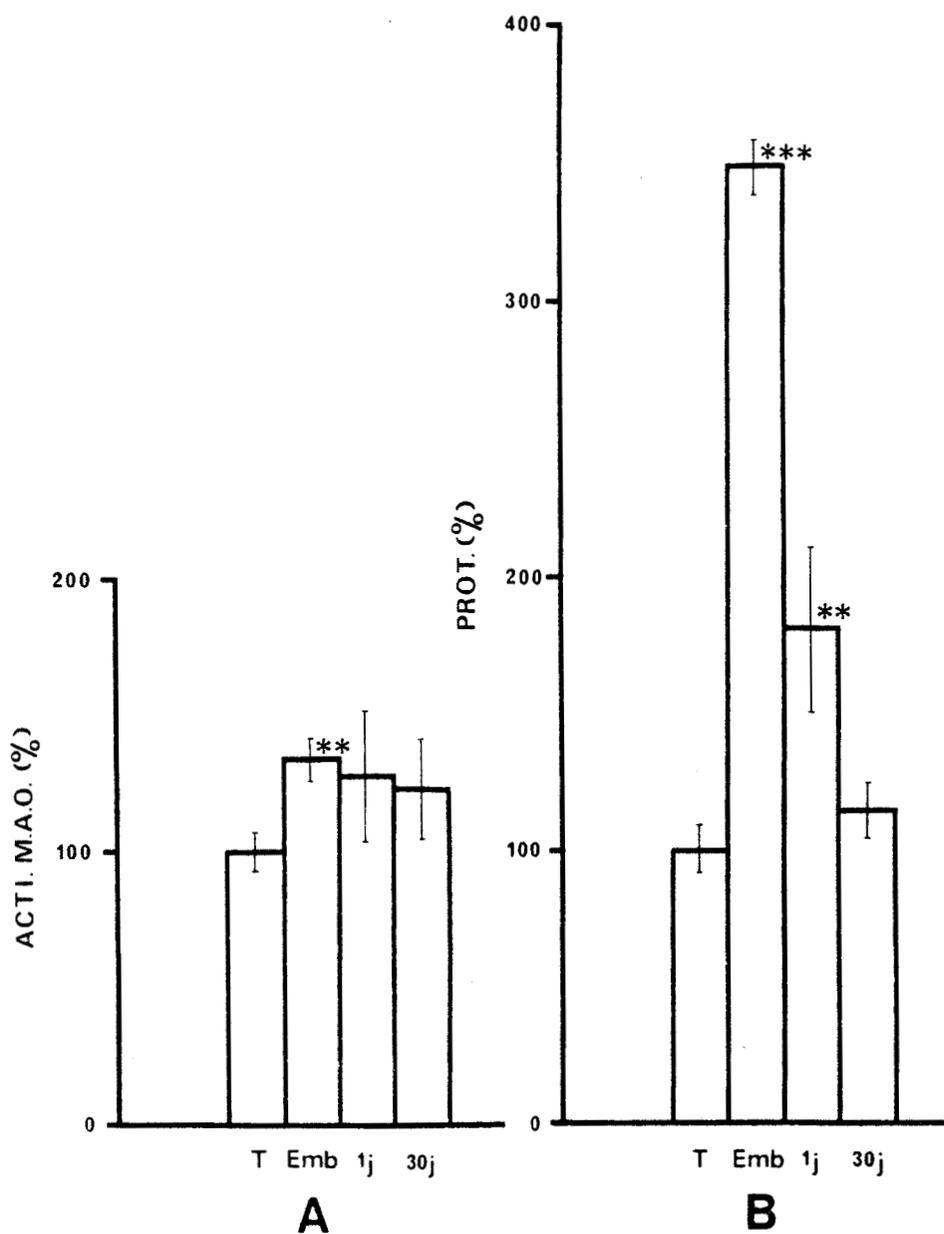


Figure 36 : Influence d'extraits de cerveaux obtenus à partir d'embryons de poulet (Emb), de poulets d'un jour (1 j) et de poulets de trente jours (30 j) sur l'activité de la M.A.O. (A) et sur la teneur en protéines (B) des cultures de cellules endothéliales.

Chaque valeur moyenne est représentée avec son écart-type
 La quantité d'extrait est de 1 mg de protéines par ml de milieu.
 (T : témoin en milieu standard, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$).

à préparer les extraits augmente. En effet, si l'accroissement de la prolifération cellulaire était de + 248,10 % avec de l'extrait de cerveaux d'embryons, il est pratiquement réduit de trois fois, soit + 80,20 % avec de l'extrait de cerveaux de poussins d'un jour et n'est plus que de 14,11 % avec de l'extrait de cerveaux de poulets de trente jours.

Influence sur l'activité de la M.A.O.

Le profil de la *figure 36_A* est tout à fait comparable avec celui de la *figure 36_B*. Bien que l'amplitude des variations soit moindre, la stimulation de l'activité spécifique de la M.A.O. est maximale avec de l'extrait de cerveaux préparé à partir d'embryons de poulets (+ 33,74 %) et n'est plus que de + 22,70 % avec de l'extrait de cerveaux de poulets de trente jours.

- Conclusion

Il apparaît donc très nettement qu'une stimulation de la prolifération cellulaire et de l'activité de la M.A.O. soit provoquée par l'addition, au milieu de culture standard, d'extraits de cerveaux de poulets. Cette influence est maximale lorsque cet extrait est préparé à partir d'embryons et lorsque sa concentration est d'un milligramme de protéines par millilitre de milieu. Si l'on se réfère aux résultats obtenus avec l'incorporation dans le milieu de 30 % d'extrait total d'embryons, on remarque que l'influence de ces deux fractions embryonnaires est pratiquement identique sur l'activité de la M.A.O. : en effet, la vitesse de la réaction enzymatique augmente de + 36,02 % en présence de 30 % d'extrait total d'embryons et de + 33,74 % en présence d'un milligramme de protéines par millilitre d'extrait de cerveaux d'embryon.

Par contre, l'influence de l'extrait total d'embryons sur l'augmentation de la prolifération cellulaire est beaucoup plus faible que celle de l'extrait de cerveaux d'embryons (+ 61,32 % contre + 248,10 %).

d) Influence combinée de l'extrait total d'embryons et de l'extrait de cerveaux d'embryons

Les résultats différents, obtenus selon l'origine des extraits embryonnaires (embryon total ou cerveau d'embryon), nous ont conduits à les

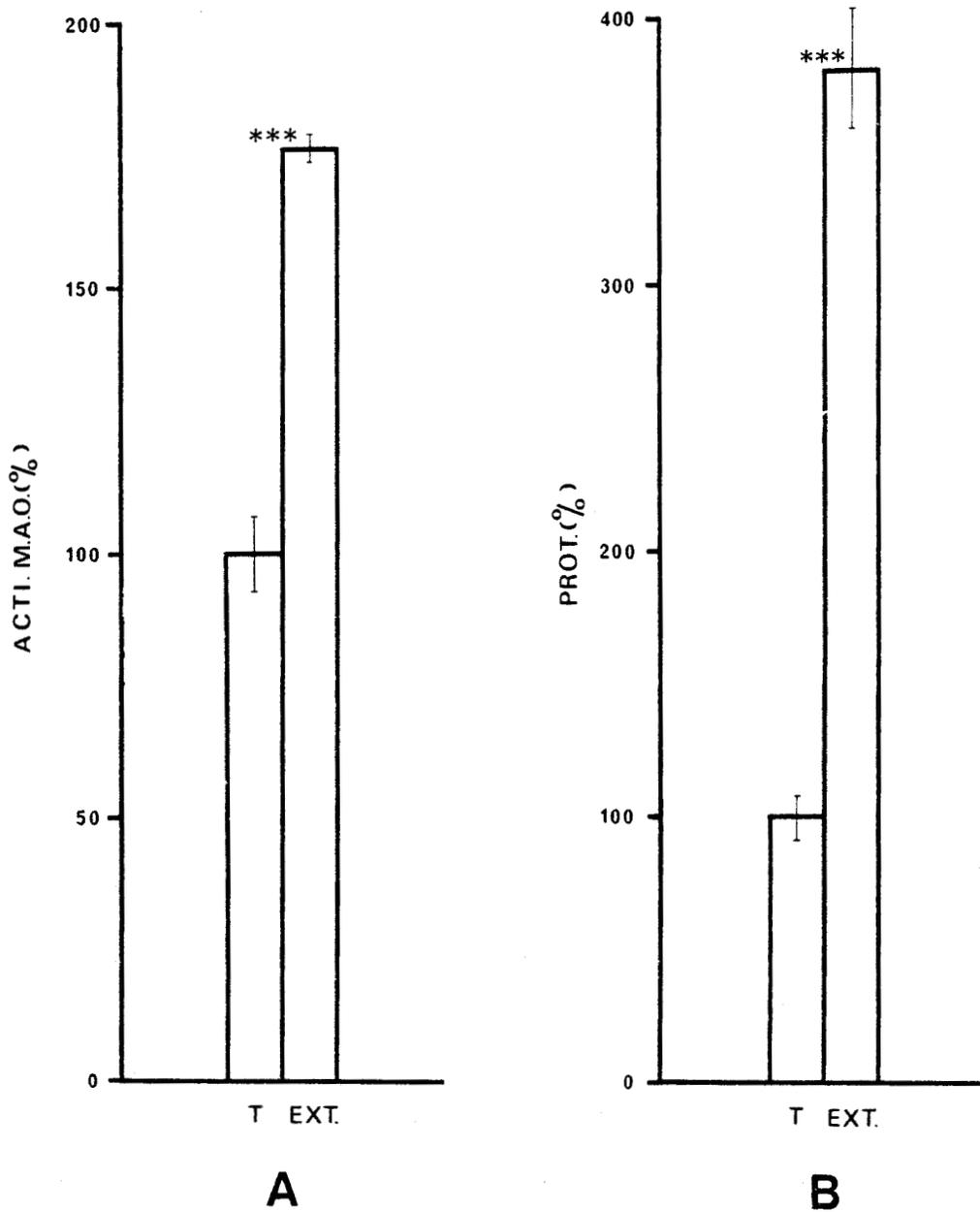


Figure 37 : Influence combinée de l'extrait total d'embryons et de l'extrait de cerveaux d'embryons sur l'activité de la M.A.O. (A) et la teneur en protéines (B) des cultures de cellules endothéliales.
Chaque valeur moyenne est représentée avec son écart-type.

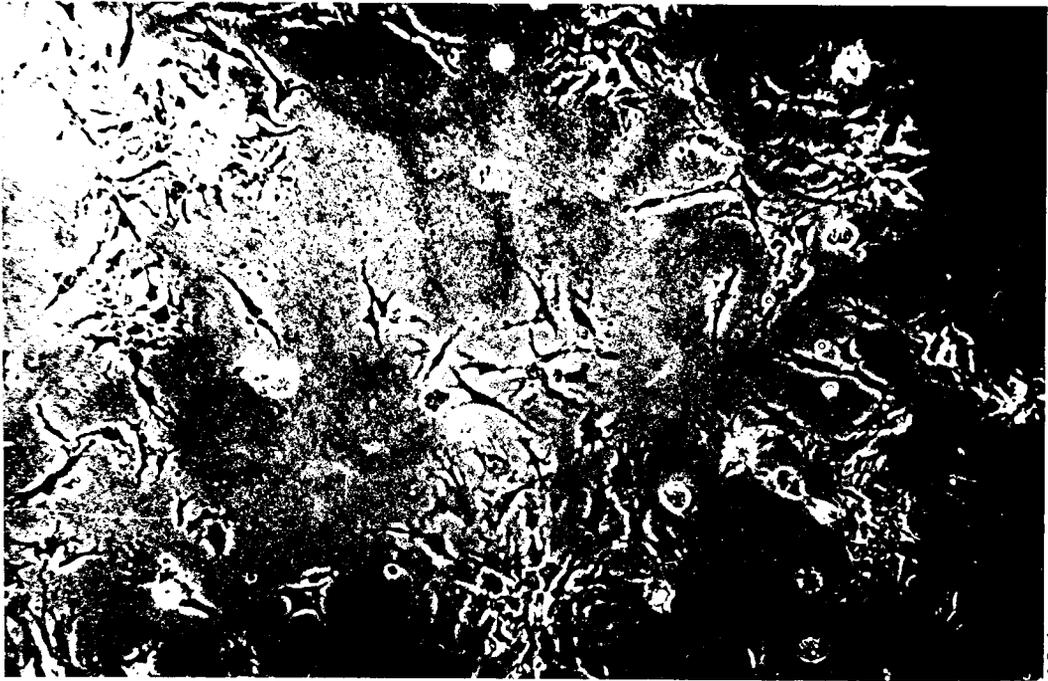
T : culture témoin en milieu standard

EXT : culture en milieu contenant 1 mg de protéines d'extrait de cerveaux d'embryons par millilitre de milieu et de l'extrait total d'embryons en remplacement de 30 % de son sérum de veau foetal

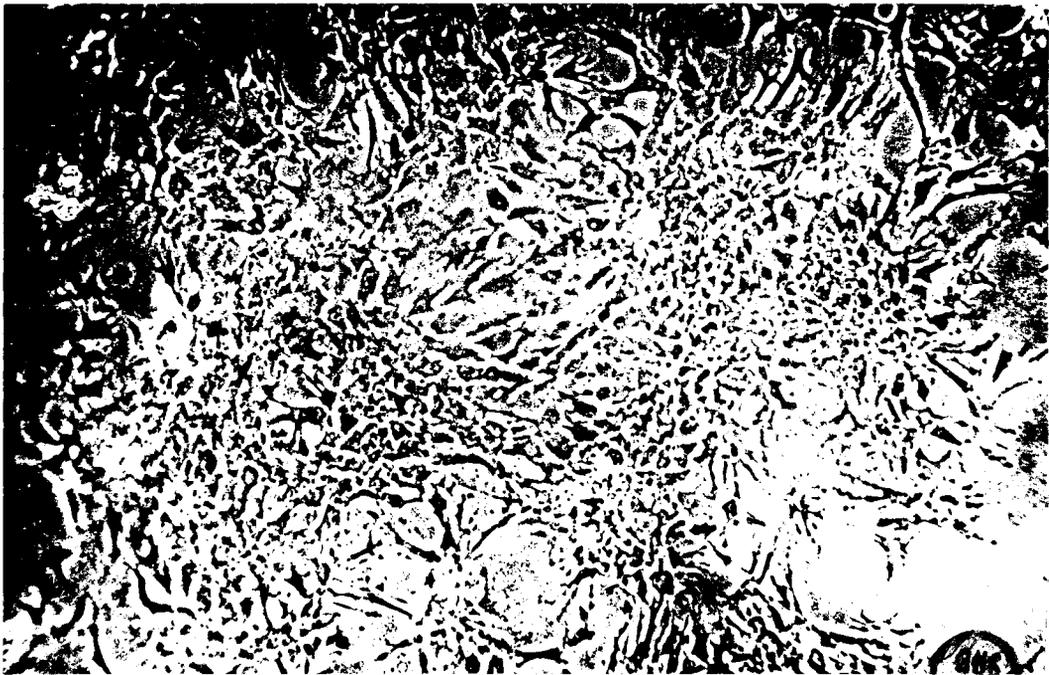
(*** : $p < 0,001$).

Fig. 38

Gross. : x 320

S
LILLEFig. 39

Gross. : x 320

S
LILLE

Figures 38 et 39 : Aspect de cellules endothéliales cultivées, depuis trois jours en milieu standard (Fig. 38) et en milieu contenant 1 mg de protéines d'extrait de cerveaux d'embryons par millilitre de milieu et de l'extrait total d'embryons en remplacement de 30 % de son sérum de veau foetal (Fig. 39).

incorporer tous deux au milieu de culture standard. Les concentrations sont d'un milligramme de protéines par millilitre pour l'extrait de cerveaux et de 30 % du S.V.F. pour l'extrait total.

- Influence sur la morphologie et la prolifération cellulaires (Fig. 37_B à 39)

L'augmentation de la prolifération cellulaire est la plus intense que nous ayons mesurée. Elle est en effet de + 280,80 % et cette valeur est donc légèrement supérieure à celle obtenue lors de l'incorporation au milieu de culture de l'extrait de cerveaux d'embryons seul (+ 248,10 %). Ceci est confirmé par l'observation des cultures en microscopie optique : la prolifération de la culture en milieu contenant à la fois ces deux extraits est beaucoup plus intense que celle de la culture "témoin". Les cellules se multiplient et s'étalent rapidement et l'aspect du tapis formé est une mosaïque caractéristique de l'endothélium "in vitro" (Fig. 39). Notons également qu'en incorporant à la fois de l'extrait de cerveaux d'embryons et de l'extrait total d'embryons, et uniquement dans ce cas, nous avons pu conserver des cultures contenant des cellules en parfait état et capables de proliférer pendant vingt à trente jours. Le vieillissement des cellules semble donc retardé, puisque dans la culture "témoin" en milieu standard, il apparaît en deux à trois semaines.

Cependant, l'addition simultanée de ces deux types d'extraits à des cellules devenues altérées en milieu standard n'a aucun effet : la prolifération ne reprend pas et elles conservent leur morphologie altérée : vacuoles, formes amiboïdes et chevauchements.

- Influence sur l'activité de la M.A.O. (Fig. 37_A)

C'est sans doute à ce niveau que l'influence combinée de l'extrait total d'embryons et de l'extrait de cerveaux d'embryons devient la plus manifeste : nous obtenons en effet une élévation significative de + 76,5 % de l'activité de la M.A.O., soit une augmentation pratiquement deux fois plus

importante que celles obtenues lors de l'addition séparée des deux extraits. Nous avons en effet mesuré + 33,74 % lors de l'addition d'extrait de cerveaux d'embryons et + 36,02 % lors de l'addition d'extrait embryonnaire total.

- Conclusion

Lorsque de l'extrait total d'embryons et de l'extrait de cerveaux d'embryons sont incorporés ensemble au milieu de culture standard et à leurs concentrations optimales, nous remarquons que :

* L'augmentation de la prolifération cellulaire reste du même ordre que celle obtenue par l'addition d'extrait de cerveaux embryonnaires seul.

* Une potentialisation ou une addition des effets apparaît au niveau de l'activité de la M.A.O.

IV - DISCUSSION

Lorsque du matériel cellulaire en culture devient sénescant à court ou à moyen terme, c'est-à-dire que certains de ses caractères morphologiques et biochimiques s'altèrent, l'expérimentateur incrimine le plus souvent le milieu dans lequel est cultivé ce matériel.

Dans notre cas et devant le vieillissement rapide des cultures de cellules endothéliales de capillaires cérébraux, nous nous sommes posé la question de savoir si le milieu de culture utilisé, bien que déjà très riche (*voir le tableau IV*) et contenant 20 % de sérum de veau foetal, était déficient en certains éléments. Cela nous a conduit à incorporer à ce milieu différents extraits physiologiques dans le but de :

* Ralentir le vieillissement des cellules, par l'influence d'extraits embryonnaires ;

* Reconstituer l'environnement "in vivo" de cet endothélium capillaire cérébral, par l'adjonction d'extraits de cerveaux et de sérum de Poulet.

Comme l'indiquent les résultats obtenus, ces extraits et principalement les extraits embryonnaires ont une influence positive très nette

mais limitée, à la fois sur la prolifération et la morphologie des cultures de cellules endothéliales et sur une activité enzymatique spécifique de la fonction de cet endothélium au sein de la barrière héméo-encéphalique.

Cependant, il faut noter que l'extrait de cerveaux et surtout de cerveaux d'embryons de poulet augmente beaucoup plus la prolifération des cellules (+ 248,10 % d'augmentation de la teneur en protéines) que l'activité de la M.A.O. (+ 33,74 %).

Par contre, l'extrait total d'embryons, bien qu'augmentant l'activité de la M.A.O. dans les mêmes proportions (+ 36,02 %) que l'extrait de cerveaux, influence beaucoup plus faiblement la prolifération cellulaire (+ 61,32 %).

Nous aurions en fait pu nous attendre à ce que :

- * Un extrait total d'embryons influence particulièrement le phénomène général qu'est la prolifération cellulaire ;

- * Un extrait de cerveaux, donc un ensemble de substances locales et spécifiques, agisse préférentiellement sur le phénomène particulier qu'est l'activité de la M.A.O. de l'endothélium cérébral.

L'influence sur la prolifération cellulaire de l'association extrait total d'embryons + extrait de cerveaux d'embryons est pratiquement (+ 280,80 %) équivalente à l'influence de l'extrait de cerveaux d'embryons seul (+ 248,10 %).

Mais l'activité de la M.A.O. est, dans ce cas, accrue de 76,50 % : soit une augmentation double de celle mesurée en présence de l'extrait total d'embryons seul (+ 36,02 %) ou de celle obtenue lors de l'action de l'extrait de cerveaux d'embryons seul (+ 33,74 %). Notons que la somme de ces deux accroissements (+ 36,02 % et + 33,74 %) de l'activité de la M.A.O. est pratiquement égale à l'accroissement de cette activité obtenu par l'action combinée des deux types d'extraits (76,50 %).

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces variations :

- * Nous fabriquons nos extraits de cerveaux, principalement à partir d'embryons d'un âge de dix-sept jours, correspondant à la période où les potentialités enzymatiques se développent fortement (DELORME, 1971). Par

contre, l'extrait total d'embryons de poulet fourni par les laboratoires EUROBIO est fabriqué à partir d'embryons d'un âge de neuf jours. Il serait donc possible que ces deux types d'extraits soient différents, tant par la qualité que par la quantité des facteurs moléculaires qu'ils renferment.

* Les influences de l'extrait total d'embryons et de l'extrait de cerveaux d'embryons semblent se sommer ou se potentialiser pour augmenter l'activité de la M.A.O. Ce phénomène ne se produit pas en ce qui concerne la prolifération cellulaire. Dans l'état actuel de nos manipulations, il est donc permis de penser que l'extrait total et l'extrait de cerveaux agiraient selon des processus différents mais potentialisables sur l'activité de la M.A.O. et selon un processus semblable et limité sur la prolifération cellulaire.

Nous remarquons de plus que les extraits embryonnaires que nous avons utilisés sont tout à fait impuissants pour enrayer le phénomène du vieillissement des cellules endothéliales "in vitro" et incapables de "rajeunir" une culture sénescence. Pourtant PETTMANN et al. (1981) démontrent que l'addition d'extraits de cerveaux d'embryons à des cultures d'astroblastes est capable de ramener les niveaux de certaines activités spécifiques à ceux mesurés dans l'organisme. SENSENBRENNER et al. (1980) avaient déjà montré que l'addition d'extraits embryonnaires de cerveaux, qu'ils soient de Poulet ou de Rat, stimulent la multiplication et la différenciation de cellules gliales en culture. De plus, SCHOR et al. (1980) et TAPPER et al. (1981) montrent que des substances tumorales peuvent avoir des effets positifs sur la migration ou la prolifération "in vitro" de cellules endothéliales de capillaires.

Existerait-il donc un ou des composés physiologiques capables de maintenir ou de restaurer les potentialités, tant morphologiques que métaboliques de cellules en culture ?

Nombre de ces facteurs sont déjà isolés et même commercialisés. GOSPODAROWICZ et MORAN (1976) et GOSPODAROWICZ (1980) ont été parmi les premiers à obtenir, par l'incorporation d'un facteur de croissance fibroblastique à des cultures sénescences d'endothélium cornéen, le rétablissement complet de toutes les caractéristiques spécifiques de l'endothélium. GAJDUZEK

et al. (1980) ont d'ailleurs montré que les cellules endothéliales d'aorte de boeuf synthétisent un facteur capable d'induire la croissance en culture de différents types cellulaires et, en particulier, de fibroblastes et de cellules musculaires lisses.

Mais, l'influence positive de ces différents types d'extraits peut, lorsque ces fractions physiologiques sont incorporés à de fortes concentrations dans le milieu de culture, laisser place à une influence toxique envers l'endothélium en culture.

Selon les modalités d'adjonction des extraits, cet effet toxique se manifeste en fait de deux façons :

* D'une part, il apparaît dans des cultures bien établies, lors du remplacement d'une partie du S.V.F. par, soit du sérum de Poulet, soit par de fortes doses d'extrait total d'embryons de Poulet : on note alors une diminution de l'activité de la M.A.O. et de la prolifération cellulaire, ainsi qu'une altération de la morphologie cellulaire.

* D'autre part, une toxicité se manifeste lorsque de l'extrait de cerveaux est incorporé au milieu de culture dès l'ensemencement. Dans ce cas, les cellules ne se fixent pas à la surface de culture et meurent rapidement. Ce même phénomène est remarqué par PETTMANN et al. (1981) lors d'une étude de l'influence d'extraits cérébraux de Poulets sur des cultures d'astroblastes.

En fait, il est probable que les extraits utilisés contiennent non seulement des facteurs influençant positivement le métabolisme cellulaire mais également des facteurs enzymatiques protéolytiques.

Ces enzymes seraient capables, à faibles concentrations, de détruire les molécules impliquées dans la fixation de la cellule sur son substrat et, à fortes concentrations, d'altérer le métabolisme cellulaire, peut-être par attaque du plasmalemme.

Cependant, cette toxicité se manifeste même lorsque le sérum de poulet est inactivé à la chaleur, donc lorsque les activités enzymatiques sont théoriquement détruites.

Peut-être faut-il alors soupçonner la présence de toxines dans ce sérum, toxines que la cellule accumulerait principalement dans ses vacuoles et qui perturberaient certaines réactions métaboliques ?

CONCLUSION DE LA SECONDE PARTIE

Un enrichissement important de l'activité de la M.A.O. est donc mis en évidence dans une fraction purifiée de capillaires télencéphaliques lorsque l'on compare cette phase microvasculaire à l'ensemble de l'organe dont elle est issue.

Preuve est également établie que certaines potentialités spécifiques de la cellule endothéliale du capillaire cérébral sont profondément influencées par des environnements particuliers.

L'étude que nous venons de réaliser démontre en effet que certains facteurs présents dans l'organisme et même dans l'organe duquel sont issues les cellules endothéliales sont indispensables au maintien de la différenciation physiologique de ces cellules introduites dans un système de culture.

CONCLUSION GENERALE

Au cours de cette étude, nous avons donc montré que l'endothélium des capillaires cérébraux pouvait, d'une part, être isolé et, d'autre part, être spécifiquement cultivé. La pureté de nos isollements a été démontrée à chaque étape du protocole expérimental.

Seul reste maintenant à mettre au point une technique directe d'identification de l'endothélium de Poulet en culture. L'isolement de l'antigène du facteur VIII, à partir de sang de Poulet et la fabrication des anticorps correspondants, nous permettraient de disposer d'un procédé de caractérisation de l'endothélium en culture beaucoup plus rapide et encore plus spécifique que la méthode, pourtant fiable, que nous avons élaborée.

Les fractions isolées, et principalement les capillaires télencéphaliques et les cellules endothéliales obtenues à partir de ces capillaires, se sont révélées comme étant métaboliquement actives : la mesure d'une activité mono-amine oxydasique très élevée au niveau de ces échantillons nous confirme le rôle important qui revient à la micro-circulation cérébrale dans la dégradation des mono-amines au sein de la barrière sang-cerveau enzymatique.

La création "in vitro" d'un modèle expérimental de cette barrière hémencéphalique est réalisée.

Cependant, les premières mesures effectuées au niveau de ce modèle ont mis en évidence une atténuation rapide de ses capacités métaboliques. De nombreux travaux récents mettent en évidence le rôle important des extraits de cerveaux d'embryons (SENSENBRENNER et al., 1980 ; PETTMANN et al., 1981 ; BARAKAT et al., 1982 ; PETTMANN et al., 1982) dans la stimulation de la prolifération cellulaire "in vitro" et dans la maturation et la différenciation de types cellulaires spécifiques. Ceci nous a conduit à mesurer l'influence de tels extraits physiologiques sur, d'une part, la morphologie et la prolifération en culture des cellules endothéliales de capillaires télencéphaliques et, d'autre part, sur une activité enzymatique spécifique de ces cellules au sein de la barrière hémencéphalique, l'activité de la M.A.O.

Nous pouvons maintenant affirmer que les extraits testés, qu'ils soient obtenus à partir d'embryons de poulets entiers, à partir du seul cerveau de ces embryons ou de poulets après la naissance, sont capables, lorsqu'ils sont incorporés au milieu de culture à des concentrations optimales :

- * D'augmenter la prolifération cellulaire ;
- * De renforcer l'organisation des cellules en culture ;
- * De stimuler l'activité mono-amine oxydasique de ces cellules.

Bien que cette étude ait été volontairement limitée, nous pouvons, d'ores et déjà envisager quelques axes de recherche complémentaires :

* Dans un premier temps, il serait intéressant de "disséquer" l'activité mono-amine oxydasique importante mise en évidence au niveau des cellules endothéliales des capillaires télencéphaliques. L'action d'inhibiteurs sélectifs ou de substrats spécifiques des types de M.A.O. A et B permettrait de comprendre plus précisément les mécanismes de destruction des mono-amines et de leurs pré-curseurs au niveau de la B.H.E.

* Toujours dans cette optique et en utilisant le même modèle expérimental, la mesure d'autres activités enzymatiques importantes, telles celles de la DOPA-décarboxylase, de la dopamine β -hydroxylase, de la catéchol-O-méthyl transférase, nous paraît indispensable pour la compréhension des mécanismes généraux régissant l'ensemble des échanges moléculaires au niveau de l'interface sang-cerveau.

* L'influence positive de différents extraits physiologiques ayant été mise en évidence sur le métabolisme oxydatif de la cellule endothéliale, il serait particulièrement intéressant de réussir à isoler le ou les facteurs moléculaires responsables. Cela impliquerait la mise au point d'une technique de culture de la cellule endothéliale du capillaire cérébral en milieu "sans sérum" : il est en effet indispensable que la composition du milieu de culture soit totalement contrôlable pour permettre l'étude de l'action de fractions moléculaires.

BIBLIOGRAPHIE

- ALI, B.H. and BARTLET, A.L. (1980)
Inhibition of monoamine oxidase by furazolidone in the chicken and the influence of the alimentary flora thereon.
Brit. J. Pharmacol., 71, 219-224.
- ANDREE, T.H. and CLARKE, D.E. (1981)
The isolated perfused rat brain preparation in the study of monoamine oxidase and benzylamine oxidase.
Biochem. Pharmacol., 30, 959-965.
- BANDYOPADHYAY, S., BASU, P.S. and BANERJEE, S. (1981)
Plasma adrenaline and tissue monoamine oxidase of scorbutic guinea pigs.
Indian J. Exp. Biol., 19, 1091-1092.
- BARAKAT, I., SENSENBRENNER, M. and LABOURDETTE, G. (1982)
Stimulation of chick neuroblast proliferation in culture by brain extracts.
J. Neurosci. Res., 8, 303-314.
- BENSCH, K.G., DAVISON, P.M. and KARASEK, M.A. (1983)
Factors controlling the *in vitro* growth pattern of human microvascular endothelial cells.
J. Ultrastruct. Res., 82, 76-89.
- BERTLER, A., FALCK, B. and ROSENGREN, E. (1963)
The direct demonstration of a barrier mechanism in the brain capillaries.
Acta Pharmacol. Toxicol., 20, 317-321.
- BERTLER, A., FALCK, B., OWMAN, C. and ROSENGRENN, E. (1966)
The localization of monoaminergic blood-brain barrier mechanisms.
Pharmacol. Rev., 18, 369-385.
- BETZ, A.L., CSEJTEY, J. and GOLDSTEIN, G.W. (1979)
Hexose transport and phosphorylation by capillaries isolated from rat brain.
Amer. J. Physiol., 236, C96-C102.
- BETZ, A.L. and GOLDSTEIN, G.W. (1980)
Transport of hexoses, potassium and neutral amino acids into capillaries isolated from bovine retina.
Exp. Eye Res., 30, 593-605.
- BIEDL, A. und KRAUS, R. (1898)
Über eine bisher unbekannte toxische Wirkung der Gallensäuren auf das Centralnervensystem.
Innere Med., 47, 1185-1200 (cité par DELORME, 1971).
- BJÖRNTORP, P., HANSSON, G.K., JONASSON, L., PETERSSON, P. and SYPNIEWSKA, G. (1983)
Isolation and characterization of endothelial cells from the epididymal fat pad of the rat.
J. Lipid. Res., 24, 105-112.
- BLASCHKO, H. (1962)
In Advance Comp. Physiol. Biochem., 1, 68 (cité par OTSUKA et KOBAYASHI, 1964).
- BLASCHKO, H. (1974)
The natural history of amine oxidases.
Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., 70, 83-148.
- BLOUIN, H. (1980)
Mise au point d'une méthode de culture de cellules endothéliales obtenues à partir de capillaires isolés de télencéphales de poulets de un jour ou de onze jours.
D.E.A. Université Lille I, 44 p.
- BOWMAN, P.D., BETZ, A.L., AR, D., WOLINSKY, J.S., PENNEY, J.B., SHIVERS, R.R. and GOLDSTEIN, G.W. (1981)
Primary culture of capillary endothelium from rat brain.
In Vitro - J. Tissue Cult. Assn., 17, 353-362.

- BOWMAN, P.D., BETZ, A.L. and GOLDSTEIN, G.W. (1982)
Primary culture of microvascular endothelial cells from bovine retina : Selective growth using fibro-
nectin coated substrate and plasma derived serum.
In Vitro- J. Tissue Cult. Assn., 18, 626-632.
- BRADBURY, M. (1979)
The concept of blood-brain barrier.
New York, Wiley.
- BRADBURY, M.W.B., EUROPE-FINNER, N. and LIN, J.D. (1982)
An improved technique for isolation of cerebral microvessels.
Physiol. Society, D-3, 9 P.
- BRENDEL, K., MEEZAN, E. and CARLSON, E.C. (1974)
Isolated brain microvessels : A purified, metabolically active preparation from bovine cerebral cortex.
Science, 185, 953-955.
- BRIGHTMAN, M.W. and REESE, T.S. (1969)
Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain.
J. Cell. Biol., 40, 648-677.
- BRODIE, B.B., KURZ, H. and SCHANKER, L.S. (1960)
The importance of dissociation constant and lipid solubility in influencing the passage of drugs into
the cerebrospinal fluid.
J. Pharmacol., 130, 20-25.
- BUZNEY, S.M. and MASSICOTTE, S.J. (1979)
Retinal vessels : Proliferation of endothelium in Vitro.
Invest. Ophthalmol. and Visual Science, 18, 1191-1195.
- CALDWELL, P.R.B., SEEGAL, B.C., HSU, K.C., DAS, M. and SOFFER, R.L. (1976)
Angiotensin-converting enzyme : Vascular endothelial localization.
Science, 191, 1050-1051.
- CALLINGHAM, B.A. and LAVERTY, R. (1973)
Studies on the nature of the increased monoamine oxidase activity in the rat heart after adrenalectomy.
J. Pharm. Pharmacol., 25, 940-947.
- CARREL, A. and BURROWS, M.T. (1910)
Cultivation of adult tissues and organs outside the body.
J. Am. Med. Assn., 55, 1379-1381.
- CECHELLI, R. (1980)
Etude comparative des activités adénylcyclasiques et guanylcyclasiques des capillaires isolés à partir
du télencéphale et du myocarde du poulet de trente jours.
Thèse de 3e cycle, Université Lille I, 84 p.
- CHRISTOFINIS, G.J., MONCADA, S., BUNTIG, S. and VANO, J.R. (1979)
Prostacyclin release by rabbit aorta and human umbilical vein endothelial cells after prolonged
subculture.
In Prostacyclin, ed. by J.R. VANE and S. BERGSTRÖM, Raven Press, New-York, 77-84.
- COLLINS, G.G.S. and SANDLER, M. (1971)
Human blood platelet monoamine oxidase.
Biochem. Pharmacol., 20, 289-296.
- DAVISON, P.M., BENSCH, K. and KARASEK, M.A. (1980)
Growth and morphology of rabbit marginal vessel endothelium in cell culture.
J. Cell. Biol., 85, 187-198.
- DAVISON, P.M., BENSCH, K. and KARASEK, M.A. (1980)
Isolation and growth of endothelial cells from the microvessels of the newborn human foreskin in cell
culture.
J. Invest. Dermatol., 75, 316-321.

- DeBAULT, L.E., KAHN, L.E., FROMMES, S.P. and CANCELLA, P.A. (1979)
Cerebral microvessels and derived cells in tissue culture : Isolation and preliminary characterization.
In Vitro-J. Tissue Cult. Assn., 15, 473-487.
- DeBAULT, L.E., HENRIQUEZ, E., HART, M.N. and CANCELLA, P.A. (1981)
Cerebral microvessels and derived cells in tissue culture : II. Establishment, identification and preliminary characterization of an endothelial cell line.
In Vitro-J. Tissue Cult. Assn., 17, 480-494.
- DELORME, P., GRIGNON, G. et GAYET, J. (1970)
Etude en microscopie électronique de l'histogénèse des capillaires du télencéphale chez l'embryon de poulet et le poussin et de leur perméabilité à la peroxydase.
Bulletin de l'Association des Anatomistes, 149, 725-732.
- DELORME, P. (1971)
Etude ultrastructurale du développement des capillaires, de leur environnement et des modifications de leur perméabilité à la peroxydase du Raifort dans le télencéphale de poulet au cours de l'embryogénèse et de la croissance postnatale.
Thèse de Doctorat ès Sciences, Université de Nancy I, 232 p.
- DELORME, P., GAYET, J. and GRIGNON, G. (1975)
Diffusion of horseradish peroxidase perfused through the lateral ventricle of the chick telencephalon.
Cell.Tissue Res., 157, 535-540.
- DEL VECCHIO, P.J., RYAN, U.S. and RYAN, J.W. (1977)
Isolation of capillary segments from rat adrenal gland.
J. Cell. Biol., 75, 73a, CU041.
- DEL VECCHIO, P.J. and SMITH, J.R. (1982)
Aging of endothelium in culture : Decrease in angiotensin-converting enzyme activity.
Cell. Biol. Int. Rep., 6, 379-384.
- DIGLIO, C.A., GRAMMAS, P., GIACOMELLI, F. and WIENER, J. (1982)
Primary culture of rat cerebral microvascular endothelial cells.
Lab. Invest., 46, 554-563.
- EAGLE, H. (1955)
Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture.
Science, 122, 501.
- EAGLE, H. (1971)
Buffer combinations for mammalian cell culture.
Science, 174, 500-503.
- EHRlich, P. (1885)
Das sauerstoff - Bedürfniss des Organismus - Eine Farbenanalytische Studie.
A. HIRSCHWALD Ed., Berlin (cité par DELORME, 1971).
- EISENBERG, H.M. and SUDDITH, R.L. (1979)
Cerebral vessels have the capacity to transport sodium and potassium.
Science, 206, 1083-1085.
- ERNSTER, L. and KUYLENSTIERNA, B. (1970)
Membranes of mitochondria and chloroplasts.
In RACKER, E. Ed., VAN NOSTRAND REINHOLD, New-York, London, 172-212.
- ESKIN, S.G., SYBERS, H.D., TREVINO, L., LIE, J.T. and CHIMOSKEY, J.E. (1978)
Comparison of tissue-cultured bovine endothelial cells from aorta and saphenous vein.
In Vitro-J. Tissue Cult. Assn., 14, 903-910.
- FENSELAU, A., KAISER, D. and WALLIS, K. (1981)
Nucleoside requirements for the in Vitro growth of bovine aortic endothelial cells.
J. Cell. Physiol., 108, 375-384.

- FOLKMAN, J., HAUDENSCHILD, C.C. and ZETTER, B.R. (1979)
Long-term culture of capillary endothelial cells.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.-Biol. Sci., 76, 5217-5221.
- FOWLER, C.J., CALLINGHAM, B.A., MANTLE, T.J. and TIPTON, K.F. (1978)
Monoamine oxidase A and B : A useful concept ?
Biochem. Pharmacol., 27, 97-101.
- FOWLER, C.J. and ORELAND, L. (1980)
The nature of the substrate-selective interaction between rat liver mitochondrial monoamine oxidase and oxygen.
Biochem. Pharmacol., 29, 2225-2233.
- FOWLER, C.J., NORQVIST, A., ORELAND, L., SARAMIES, E. and WIBERG, A. (1981)
Monoamine oxidase activity in ox, elk and reindeer brains.
Comp. Biochem. Physiol., 68c, 145-149.
- FOWLER, C.J. and TIPTON, K.F. (1981)
Concentration dependence of the oxidation of tyramine by the two forms of rat liver mitochondrial monoamine oxidase.
Biochem. Pharmacol., 30, 3329-3332.
- FRANK, R.N., KINSEY, V.E., FRANK, K.W., MIKUS, K.P. and RANDOLPH, A. (1979)
In Vitro proliferation of endothelial cells from kitten retinal capillaries.
Invest. Ophthalmol. Visual Sci., 18, 1195-1200.
- FRIEDLAND, J. and SILVERSTEIN, E. (1976)
A sensitive fluorometric assay for serum angiotensin-converting enzyme.
Amer. J. Clin. Pathol., 66, 416-424.
- GAJDUSEK, C., DICORLETO, P., ROSS, R. and SCHWARTZ, S.M. (1980)
An endothelial cell-derived growth factor.
J. Cell. Biol., 85, 467-472.
- GIMBRONE, M.A., COTRAN, R.S. and FOLKMAN, J. (1974)
Human vascular endothelial cells in culture. Growth and DNA synthesis.
J. Cell. Biol., 60, 673-684.
- GIMBRONE, M.A. (1976)
Culture of vascular endothelium.
In Progress in hemostasis and thrombosis, SPAET Ed., vol. III, 1-28.
- GIMBRONE, M.A., MAJEAU, G.R., ATKINSON, W.J., SADLER, W. and CRUISE, S.A. (1979)
Angiotensin-converting enzyme activity in isolated brain microvessels.
Life Sci., 25, 1075-1084.
- GLASSBERG, M.K., BERN, M.M., COUGHLIN, S.R., HAUDENSCHILD, C.C., HOYER, L.W., ANTONIADES, H.N. and ZETTER, B.R. (1982)
Cultured endothelial cells derived from the human iliac arteries.
In Vitro- J. Tissue Cult. Assn., 18, 859-866.
- GODIRIS, C. and NEFF, N.H. (1971)
Evidence for a specific monoamine oxidase associated with sympathetic nerves.
Neuropharmacology, 10, 557-564.
- GOLDMANN, E.E. (1913)
Vitalfärbung am Zentralnervensystem. Beitrag zur Physiologie des Plexuschoroideus und der Hirnhäute.
Abh. Preuss. Akad. Wiss. Phys., Math. Kl., 1, 1-60 (cité par DELORME, 1971).
- GOLDSTEIN, G.W., WOLINSKY, J.S., CSEJTEY, J. and DIAMOND, I. (1975)
Isolation of metabolically active capillaries from rat brain.
J. Neurochem., 25, 715-717.

- GOSPODAROWICZ, D. and MORAN, J. (1976)
Growth factors in mammalian cell culture.
Annual Rev. Biochem., 45, 531-538.
- GOSPODAROWICZ, D. (1980)
Les facteurs de croissance.
La Recherche, 11, 676-686.
- GREENBERG, D.M., AIRD, R.B., BALTER, M.D.D., CAMPBELL, W.W., COHN, W.E. and MURAYAMA, M.M. (1943)
A study with radioactive isotopes of the permeability of blood-CSF barrier to ions.
Amer. J. Physiol., 140, 47-64.
- HAENICK, D.H., LADMAN, R.K., WEISS, J., BOEHME, D.H. and VOGEL, W.H. (1981)
Monoamine oxidase activities in human brain microvessels.
Experientia, 37, 764-765.
- HARDEBO, J.E. and OWMAN, C. (1980)
Barrier mechanisms for neurotransmitter monoamines and their precursors at the blood-brain interface.
Ann. Neurol., 8, 1-11.
- HAUDENSCHILD, C.C., COTRAN, R.S., GIMBRONE, M.A., FOLKMAN, J. (1975)
Fine structure of vascular endothelium in culture.
J. Ultrastruct. Res., 50, 22-32.
- HOUSLAY, M.D. and TIPTON, K.F. (1973)
The nature of the electrophoretically separable multiple forms of rat liver monoamine oxidase.
Biochem. J., 135, 173-186.
- HOUSLAY, M.D., TIPTON, K.F. and YODIM, M.B.H. (1976)
Multiple forms of monoamine oxidase : fact and artifact.
Life Sci., 19, 467-478.
- HUANG, M. and DRUMMOND, G.I. (1979)
Adenylate cyclase in cerebral microvessels : Action of guanine, nucleotides, adenosine and other agonists.
Mol. Pharmacol., 16, 462-472.
- HUXLEY, H.E. and ZUBAY, G.J. (1961)
Preferential staining of nucleic acid-containing structures for electron microscopy.
J. Biophys. Biochem. Cytol., 11, 273-296. (cité par DELORME, 1971).
- JAFFE, E.A., NACHMAN, R.L., BECKER, C.G. and MINICK, C.R. (1973)
Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins.
J. Clin. Invest., 52, 2745-2756.
- JAFFE, E.A., HOYER, L.W. and NACHMAN, R.L. (1973)
Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells.
J. Clin. Invest., 52, 2757-2764.
- JAFFE, E.A. (1980)
Culture of human endothelial cells.
Transplantation Proc., 12 (supp. 1), 49-53.
- JOHNSTON, J.P. (1968)
Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue.
Biochem. Pharmacol., 17, 1285-1297.
- JONES, P.A. (1979)
Construction of an artificial blood vessel wall from cultured endothelial and smooth muscle cells.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.-Biol. Sci., 76, 1882-1886.

- JOÓ, F. and KARNUSHINA, I. (1973)
A procedure for the isolation of capillaries from rat brain.
Cytobios, 8, 41-48.
- JOÓ, F., DUX, E. and SZÜCS, A. (1982)
Microvessels from the spinal cord : Isolation procedure and characterization of the fraction.
J. Neurochem., 39, 263-266.
- KARNOVSKY, M.J. (1967)
The ultrastructural basis of capillary permeability studied with peroxydase as a tracer.
J. Cell.Biol., 35, 213-236.
- KATZMAN, R. and PAPPUS, H.M. (1973)
Brain electrolytes and fluid metabolism.
BALTIMORE, WILLIAMS and WILKINS.
- KOBAYASHI, S., TAKAHARA, K. and KAMIJO, K. (1981)
Monoamine oxidase in frog liver and brain.
Comp. Biochem. Physiol., 69c, 179-183.
- LAI, F.M., UDENFRIEND, S. and SPECTOR, S. (1975)
Presence of norepinephrine and related enzymes in isolated brain microvessels.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.-Biol. Sci., 72, 4622-4625.
- LAJTHA, A. (1968)
Transport as control mechanism of cerebral metabolic levels.
Progr. Brain Res., 29, 201-218.
- LAZZARINI-ROBERTSON, A. (1961)
Effects of heparin on the uptake of lipids by isolated human and animal arterial endothelial type cells.
Angiology, 12, 525-534.
- LEVINE, E.M. and MUELLER, S.N. (1979)
Cultured vascular endothelial cells as a model system for the study of cellular senescence.
Int. Rev. Cytol., suppl. 10, 67-76.
- LEWANDOWSKY, M. (1900)
Zur Lehre von der Cerebrospinalflüssigkeit.
Z. Klin. Med., 40, 480-494 (cité par DELORME, 1971).
- LEWIS, L.J., HOAK, J.C., MACA, R.D. and FRY, G.L. (1973)
Replication of human endothelial cells in culture.
Science, 181, 453-454.
- LEWIS, W.H. and LEWIS, M.R. (1912)
The cultivation of chick tissue in media of known chemical composition.
Anat. Rec., 6, 207-211.
- LEWIS, W.H. (1921)
Smooth muscle and endothelium in tissue cultures.
Anat. Rec., 21, 72.
- LINDVALL, M. and OWMAN, C. (1980)
Evidence for the presence of two types of monoamine oxidase in rabbit choroid plexus and their role in breakdown of amines influencing cerebrospinal fluid formation.
J. Neurochem., 34, 518-522.
- LOEB, L. (1897)
Über die Entsehung von Bindegewebe, Leucocyten und roten Blutkörperchen aus Epithel und über eine Methode, isolierte Gewebsteile zu züchten.
M. STERN and Co., Chicago (cité par WILLMER, 1958).

- LOWRY, O.R., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J. (1951)
Protein measurements with the FOLIN phenol reagent.
J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- LUFT, J.H. (1961)
Improvements in epoxy resin embedding methods.
J. Biophys. Biochem. Cytol., 9, 409-414 (cité par DELORME, 1971).
- LYLES, G.A. (1978)
Effects of L-Dopa administration upon monoamine oxidase activity in rat tissues.
Life Sci., 22, 603-610.
- LYLES, G.A. and CALLINGHAM, B.A.
Short- and long-term effects of L-Dopa treatment upon monoamine oxidase : A comparative study in several rat tissues.
Eur. J. Pharmacol., 61, 363-372.
- MACARAK, E.J., HOWARD, B.V. and KEFALIDES, N.A. (1977)
Properties of calf endothelial cells in culture.
Lab. Invest., 36, 62-67.
- MAJNO, G. (1965)
Ultrastructure of the vascular membrane.
In *Handbook of Physiology - Section 2 : Circulation*, volume III, 2293-2375, Am. Physiol. Soc., ed. W.F. HAMILTON and P. DOW.
- MANFORD, K. and PATTERSON, J. (1979)
Measurement of growth and viability of cells in culture.
In *Methods in Enzymology*, vol. LVIII, Cell Culture, 141-151, Acad. Press, ed. JAKOBY W.B. and PASTAN I.H.
- MARUYAMA, Y. (1963)
The human endothelial cell in tissue culture.
Zeitsch. Zellforsch., 60, 69-79.
- MAXIMOW, A.A. (1925)
Behavior of endothelium of blood vessels in tissue cultures.
Anat. Rec., 29, 369 (cité par GIMBRONE, 1976).
- MCCAMAN, R.E., McCAMAN, M.W., HUNT, J.M. and SMITH, M.S. (1965)
Microdetermination of monoamine oxidase and 5-Hydroxytryptophan decarboxylase activities in nervous tissues.
J. Neurochem., 12, 15-23.
- MCCOY, T.A., MAXWELL, M., IRVINE, E. and SARTORELLI, A.C. (1959)
Two nutritional variants of cultured JENSEN sarcoma cells.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 100, 862.
- MEEZAN, E., BRENDDEL, K. and CARLSON, E.C. (1974)
Isolation of a purified preparation of metabolically active retinal blood vessels.
Nature, 251, 65-67.
- MENDELSON, F.A.O. and KACHEL, C. (1981)
Production of angiotensin converting enzyme by cultured bovine endothelial cells.
Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., 8, 477-481.
- MERRILEES, M.J. and SCOTT, L. (1981)
Culture of rat and pig aortic endothelial cells.
Atherosclerosis, 38, 19-26.

- MONDACA, S., GRYGLEWSKI, S., BUNTING, S. and VANE, J.R. (1976)
An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation.
Nature, 263, 663-665 (cité par ZETTER, 1981).
- MRSULJA, B.B., MRSULJA, B.J., FUJIMOTO, T., KLATZO, I. and SPATZ, M. (1976)
Isolation of brain capillaries : A simplified technique.
Brain Res., 110, 361-365.
- NEES, S., GERBES, A.L. and GERLACH, E. (1981)
Isolation, identification and continuous culture of coronary endothelial cells from guinea pig hearts.
Eur. J. Cell Biol., 24, 287-297.
- ORLOWSKI, M., SESSA, G. and GREEN, J.P. (1974)
 γ -Glutamyl transpeptidase in brain capillaries : Possible site of a blood-brain barrier for amino acids.
Science, 184, 66-68.
- OTSUKA, S. and KOBAYASHI, Y. (1964)
A radioisotopic assay for monoamine oxidase determinations in human plasma.
Biochem. Pharmacol., 13, 995-1006.
- PARDRIDGE, W.M. (1981)
Transport of nutrients and hormones through the blood-brain barrier.
Diabetologia, 20, 254-264.
- PARDRIDGE, W.M. (1983)
Neuropeptides and the blood-brain barrier.
Annu. Rev. Physiol., 45, 73-82.
- PARVEZ, H., GRIPOIS, D. and PARVEZ, S. (1976)
Corticosteroid influence in the postnatal development of monoamine oxidase activity in the young rats.
Biol. Neonate, 28, 326-335.
- PETTMANN, B., LABOURDETTE, G., DEVILLIERS, G. and SENSENBRENNER, M. (1981)
Effects of brain extracts from chick embryo on the development of astroblasts in culture.
Develop. Neurosci., 4, 37-45.
- PETTMANN, B., WEIBEL, M., DAUNE, G., SENSENBRENNER, M. and LABOURDETTE, G. (1982)
Stimulation of proliferation and maturation of rat astroblasts in serum-free culture by an astroglial growth factor.
J. Neurosci. Res., 8, 463-476.
- PHILLIPS, P., KUMAR, P., KUMAR, S. and WAGHE, M. (1979)
Isolation and characterization of endothelial cells from rat and cow brain white matter.
J. Anat., 129, 261-272.
- POIRIER, J. (1976)
La barrière hémato-encéphalique.
Ed. Lab. HOECHST, Puteaux.
- POLLAK, O.J. and KASAI, T. (1964)
Appearance and behavior of aortic cells in vitro.
Amer. J. Med. Sci., 248, 71-78.
- POMERAT, C.M. and SLICK, W.C. (1963)
Isolation and growth of endothelial cells in tissue culture.
Nature, 198, 859-861.
- PROPPING, P., REY, E.R., FRIEDL, W. and BECKMANN, H. (1981)
Platelet monoamine oxidase in healthy subjects : The "Biochemical high-risk paradigm" revisited.
Arch. Psychiat. Nervenkr., 230, 209-219.

- PUCK, T.T., MARCUS, P.I. and CIECIURIA, S.J. (1958)
Clonal growth of mammalian cells in vitro.
J. Exp. Med., 103, 273-284 (cité par GIMBRONE, 1976).
- REESE, T.S. and KARNOVSKY, M.J. (1967)
Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase.
J. Cell. Biol., 34, 207-217.
- REYNOLDS, E.S. (1963)
The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy.
J. Cell. Biol., 17, 208-212 (cité par DELORME, 1971).
- RONDINA, D.C., MASTRONARDI, I.O., CARBONE, S.E. and IZQUIERDO, J.A. (1981)
Monoamines and monoamine-oxidase in chick brain (Male and Female) under permanent light.
I.R.C.S. Med. Sci., 9, 972.
- ROUGET, C. (1873)
M moire sur les capillaires sanguins et lymphatiques.
Arch. Physiol., 603.
- ROUX, E. et BORREL, A. (1898)
T tanos cérébral et immunit  contre le t tanos.
Ann. Institut Pasteur, 12, 225-239.
- RYAN, U.S., RYAN, J.W., WHITAKER, C. and CHIU, A. (1976)
Localization of angiotensin-converting enzyme (Kininase II). II. Immunocytochemistry and immunofluorescence.
Tissue Cell., 8, 125-145.
- RYAN, U.S., CLEMENTS, E., HABLSTON, D. and RYAN, J.W. (1978)
Isolation and culture of pulmonary artery endothelial cells.
Tissue Cell., 10, 535-554.
- SCHOR, A.M., SCHOR, S.L., WEISS, J.B., BROWN, R.A., KUMAR, S. and PHILLIPS, P. (1980)
Stimulation by a low-molecular-weight angiogenic factor of capillary endothelial cells in culture.
Brit. J. Cancer, 41, 790-799.
- SCHURR, A. (1982)
Minireview = Monoamine oxidase : To B or not to B ?
Life Sci., 30, 1059-1063.
- SCHWARTZ, S.M. (1978)
Selection and characterization of bovine aortic endothelial cells.
In Vitro-J. Tissue Cult. Assn., 14, 966-980.
- SENSENBRENNER, M., LABOURDETTE, G., DELAUNOY, J.P., PETTMANN, B., DEVILLIERS, G., MOONEN, G. and BOCK, E. (1980)
Morphological and biochemical differentiation of glial cells in primary culture.
In Tissue Culture in Neurobiology, Ed. by E. GIACOBINI et al., Raven Press, New York, 385-395.
- SESSA, G., ORLOWSKI, M. and GREEN, J.P. (1976)
Isolation from bovine brain of a fraction containing capillaries and a fraction containing membrane fragments of the choroid plexus.
J. Neurobiol., 7, 51-61.
- SHERER, G.K., FITZHARRIS, T.P., FAULK, W.P. and LeROY, E.C. (1980)
Cultivation of microvascular endothelial cells from human preputial skin.
In Vitro-J. Tissue Cult. Assn., 16, 675-684.
- SHIBUYA, T. (1931)
On the pure cultivation of endothelial cells from aorta and their differentiation.
KITASATO Arch. Exp. Med., 8, 68-88 (cité par GIMBRONE, 1976).

- SIAKOTOS, A.N., ROUSER, G. and FLEISHER, S. (1968)
Isolation of highly purified human and bovine brain endothelial cells and nuclei and their phospholipid composition.
Lipids, 4, 234-239.
- SILBERBERG, M. (1930)
Endothel in der Gewebeskultur.
Arch. Exp. Zellforsch., 9, 36-53 (cité par GIMBRONE, 1976).
- SLATER, D.N. and SLOAN, J.M. (1975)
The porcine endothelial cell in tissue culture.
Atherosclerosis, 21, 259-272.
- SPATZ, H. (1933)
Die Bedeutung der vitalen Färbung für die Lehre von Stoffaustausch zwischen dem Zentralnervensystem und dem übrigen Körper. Das morphologische Substrat der Stoffwechselschranken im Zentralorgan.
Arch. Psychiat. Nervenkr., 101, 267-358 (cité par POIRIER, 1976).
- SPATZ, M., BEMBRY, J., DODSON, R.F., HERVONEN, H. and MURRAY, M.R. (1980)
Endothelial cell cultures derived from isolated cerebral microvessels.
Brain Res., 191, 577-582.
- SPATZ, M., ABE, T., RAUSCH, W.D., ABE, K., MERKEL, N. and MARUKI, C. (1981)
Studies on the nature and function of cerebral microvessel involvement in the blood-brain barrier for monoamines.
In *Cerebral microcirculation and metabolism*, Ed. CERVOS-NAVARRO J. et FRITSCHKA E., Raven Press, New-York, 23-28.
- STERN, L.S. et GAUTIER, R. (1922)
Les rapports entre le liquide céphalorachidien et les éléments nerveux de l'axe cérébrospinal.
Arch. Int. Physiol., 17, 391-448 (cité par DELORME, 1971).
- STERN, L.S. et PEYROT, P. (1927)
Le fonctionnement de la barrière hémato-encéphalique aux divers stades de développement chez les diverses espèces animales.
C.R. Soc. Biol., Paris, 96, 1124-1126 (cité par DELORME, 1971).
- SUZUKI, O., KATSUMATA, Y., OYA, M. and ASANO, M. (1978)
Multiple forms of monoamine oxidase in developing chick brain.
Develop. Neurosci., 1, 172-176.
- SUZUKI, O., KATSUMATA, Y. and OYA, M. (1981)
Oxidation of β -Phenylethylamine by both types of monoamine oxidase : Examination of enzymes in brain and liver mitochondria of eight species.
J. Neurochem., 36, 1298-1301.
- SUZUKI, O., MIZUTANI, S., KATSUMATA, Y. and OYA, M. (1981)
Identification of type A monoamine oxidase in mouse and rabbit liver mitochondria.
Experientia, 37, 18-19.
- TAPPER, D., SCHEINER, C., FRISSORA, H. and ZETTER, B. (1981)
The stimulation of capillary endothelial cell migration by aqueous humor.
J. Surg. Res., 30, 262-268.
- TIPTON, K.F. (1968)
The prosthetic groups of pig brain mitochondrial monoamine oxidase.
Biochim. Biophys. Acta., 159, 451-459.
- TIPTON, K.F. (1973)
Biochemical aspects of monoamine oxidase.
Brit. Med. Bull., 29, 116-122.

- TREVETHICK, M.A., OLVERMAN, H.J., PEARSON, J.D., GORDON, J.L., LYLES, G.A. and CALLINGHAM, B.A. (1981)
Monoamine oxidase activities of porcine vascular endothelial and smooth muscle cells.
Biochem. Pharmacol., 30, 2209-2216.
- WAGNER, R.C. and MATTHEWS, M.A. (1975)
The isolation and culture of capillary endothelium from epididymal fat.
Microvascular Res., 10, 286-297.
- WALTER, F.K. (1933)
Die allgemeinen Grundlagen des Stoffaustauscher zwischen dem Zentralnervensystem und dem
Übrigen Körper.
Arch. Psychiat. Nervenkr., 101, 195-230 (cité par POIRIER, 1976).
- WARD, P.E., ERDÖS, E.G., GEDNEY, C.D., DOWBEN, R.M. and REYNOLDS, R.C. (1976)
Isolation of membrane-bound renal enzymes that metabolize kinins and angiotensins.
Biochem. J., 157, 643-650.
- WEIBEL, E.R. and PALADE, G.E. (1964)
New cytoplasmic components in arterial endothelia.
J. Cell. Biol., 23, 101-112.
- WEIL-MALHERBE, L.G., WHITBY, H.G. and AXELROD, J. (1961)
The uptake of circulating [³H] norepinephrine by the pituitary gland and various areas of the brain.
J. Neurochem., 8, 55-64.
- WEKSLER, B.B., MARCUS, A.J. and JAFFE, E.A. (1977)
Synthesis of prostaglandin I₂ (Prostacyclin) by cultured human and bovine endothelial cells.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.-Biol. Sci., 74, 3922-3926 (cité par ZETTER, 1981).
- WHITE, J.F. and PARSHLEY, M.S. (1951)
Growth in vitro of blood vessels from bone marrow of adult chicken.
Amer. J. Anat., 89, 321-345 (cité par GIMBRONE, 1976).
- WHITE, R., CARLSON, E.C., BRENDEL, K. and MEEZAN, E. (1979)
Basement membrane biosynthesis by isolated bovine retinal vessels : Incorporation of precursors into
extracellular matrix.
Microvascular Res., 18, 185-208.
- WILLIAMS, S.K., GILLIS, J.F., MATTHEWS, M.A., WAGNER, R.C. and BITENSKY, M.W. (1980)
Isolation and characterization of brain endothelial cells : Morphology and enzyme activity.
J. Neurochem., 35, 374-381.
- WILLMER, E.N. (1958)
Cells and tissues in culture. Methods, biology and physiology.
Academic Press, London et New-York, trois volumes.
- WURTMAN, R.J. and AXELROD, J. (1963)
A sensitive and specific assay for the estimation of monoamine oxidase.
Biochem. Pharmacol., 12, 1439-1441.
- YANG, H.Y.T. and NEFF, N.H. (1974)
The monoamine oxidases of brain : Selective inhibition with drugs and the consequences for the meta-
bolism of the biogenic amines.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 189, 733-740.
- ZELLER, E.A. (1951)
The enzymes.
J.B. SUMNER and K. MYRBACK Eds., vol. 2, part, 1, Acad. Press, New-York.
- ZETTER, B.R. (1981)
The endothelial cells of large and small blood vessels.
Diabetes, 30 (suppl. 2), 24-28.