



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Contribution à l'étude de l'athérogenèse I. mise en culture de cellules endothéliales aortiques bovines et influence de facteurs de croissance sur leur prolifération

Matagne, Alain

Award date:
1984

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

1984



FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTÉ DES SCIENCES

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'ATHEROGENESE
I. MISE EN CULTURE DE CELLULES
ENDOTHELIALES AORTIQUES BOVINES ET
INFLUENCE DE FACTEURS DE CROISSANCE
SUR LEUR PROLIFERATION.

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques
par

MATAGNÉ
Alain

Au terme de ce travail, je remercie

Madame M.F. RONVEAUX-DUPAL, promoteur de ce mémoire, pour m'avoir prodigué tout au long de cette année aide et conseils.

Madame R. THIBAUT-VERCRUYSEN pour sa disponibilité.

Mesdames M. MARTIN-VAN STEENBRUGGE, N. PAULUS-NINANE, N. FIEVET-HENRY pour leur efficace collaboration et leurs encouragements.

Madame M.TH. SERVAIS-HENNIN, Messieurs Y. POUMAY, E. DELAIVE pour leur aide amicale.

Messieurs J. COLLET, B. LOTIN pour la réalisation des documents photographiques.

Marie-Bénédicte pour son amicale collaboration.

Le personnel de l'Unité interfacultaire de Microscopie Electronique.

Le personnel de l'abattoir de Namur.

TABLE DES MATIERES

	Pages
I. INTRODUCTION	1
1. Généralités	
2. L'endothélium en tant que tissu	2
3. Culture de cellules endothéliales	5
a) Historique	
b) Cellules endothéliales	7
1° Structure et caractérisation	
2° Mode de croissance	9
c) Facteurs de croissance	10
d) Propriétés des cellules endothéliales en culture	12
4. But du travail	16
II. MATERIEL ET METHODES	17
1. Technique de culture	
2. Immunofluorescence	20
3. Préparation des chromosomes	21
4. Préparation pour la microscopie électronique à transmission	22
5. Préparation du facteur de croissance	23
III. RESULTATS ET DISCUSSION	25
A. Culture des cellules	
1. Mise au point de la technique de culture	
2. Effet du temps précédant la mise en culture	28
B. Caractérisation des cellules endothéliales bovines	31
1. Microscopie en contraste de phase	
2. Microscopie électronique à transmission	34
1° Ultrastructure d'une cellule endothéliale	
2° Variations individuelles	36
3. Facteur VIII	37
4. Chromosomes	39
5. Discussion	40

C. Influence du facteur de croissance	46
1. Préparation du facteur de croissance	
2. Effet du facteur de croissance	52
a) Effet de la fraction	
1° Microscopie en contraste de phase	
2° Microscopie électronique à transmission	55
b) Effet de la dose	56
1° Microscopie en contraste de phase	
2° Microscopie électronique à transmission	59
3. Discussion	60
IV. CONCLUSIONS	62
ANNEXE	64
BIBLIOGRAPHIE	65

I. INTRODUCTION

1. Généralités

L'option nouvelle du laboratoire, à savoir l'étude de certains aspects du problème de l'athérogenèse, a orienté sans hésitation le choix de la première étape de cette recherche vers l'obtention de cultures pures de cellules endothéliales.

En effet, les cellules endothéliales et leurs produits de synthèse sont les constituants principaux de l'intima des vaisseaux sanguins. Cette couche, la plus interne de la paroi vasculaire qui en comporte trois (intima, média, adventice), est directement impliquée dans les processus athérosclérotiques.

Bien que le rôle de l'endothélium dans l'athérogenèse ait été reconnu depuis l'époque de Rokitansky (1852) et Virchow (1856), les divers aspects de sa biologie et pathobiologie ont été longtemps méconnus et/ou sous-estimés. En effet, les recherches dans le domaine de l'athérosclérose étaient axées principalement sur deux voies: celle de l'hypothèse lipidique et celle de l'hypothèse thrombogénique. (Duguid, 1946 ; Ross and Glomset, 1978 ; Davignon, 1978)

De plus, la confusion entre artériosclérose, processus physiopathologique lié à l'âge et athérosclérose, processus pathologique favorisé entre autres par l'âge, contribuait à ce manque d'intérêt. Actuellement, cette erreur semble corrigée puisque l'étude biologique de la cellule endothéliale progresse à grands pas et que notre conception de l'endothélium évolue rapidement de celle d'une barrière anatomique passive à celle d'un constituant fonctionnellement actif de la paroi vasculaire.

Le développement et l'application à grande échelle de méthodes de culture des cellules endothéliales vasculaires *in vitro* ont constitué le facteur le plus important de ce renouveau ou de ce regain d'intérêt. De telles cultures permettent l'étude directe des propriétés métaboliques, synthétiques et physiologiques dans des conditions bien contrôlées, impossibles à réaliser "*in vivo*".

2. L'endothélium en tant que tissu

L'endothélium vasculaire est l'épithélium simple le plus répandu de tout l'organisme. Formé d'une assise unicellulaire pavimenteuse, il tapisse intérieurement les systèmes circulatoires sanguin et lymphatique. Sa localisation à l'interface entre le sang circulant d'une part, la paroi vasculaire et les tissus interstitiels voisins d'autre part, implique des propriétés et des fonctions hautement spécialisées. La mesure de sa surface totale chez l'homme adulte représente plusieurs centaines de mètres carrés, tandis que son épaisseur dépasse à peine quelques micromètres.

La structure géométrique de cette "membrane" ultrafine est donc bien adaptée aux échanges de molécules entre les divers constituants que nous venons de citer. Cependant, elle pourrait favoriser une certaine fragilité, un moindre degré de résistance vis à vis de traumatismes, lésions...

Il y a au moins deux fonctions vitales de la "barrière endothéliale" qui sont directement liées à sa continuité : la perméabilité sélective aux macromolécules et la propriété de thromborésistance, c'est-à-dire sa non-réactivité à l'état normal avec les plaquettes sanguines et les facteurs de coagulation.

L'endothélium assure un rôle de barrière sélective pour le transfert de substances entre le sang et les tissus. La pénétration des molécules plasmiques par pinocytose ou au niveau des jonctions intercellulaires dépend des propriétés de perméabilité des cellules.

Le mécanisme de la thromborésistance de l'endothélium intact n'est pas connu avec certitude. Certaines hypothèses ont été émises pour expliquer cette propriété très importante pour le maintien d'un flux sanguin adéquat. Elles font état de répulsion électrostatique par les surfaces chargées négativement, de présence de fibronectine à la surface cellulaire, de synthèse de prostacycline (PGI_2) par la cellule endothéliale empêchant l'adhésion plaquettaire, de présence de matériel "héparine-like" à la surface cellulaire. (Thorgeirsson et Robertson, 1978).

On peut prédire que des lésions même microscopiques de cette barrière (fussent-elles de la taille d'une cellule endothéliale) auront des effets locaux.

Par ailleurs, l'organisation de l'endothélium en une vaste monocouche sert à amplifier son impact en tant que tissu métaboliquement actif. En effet, chaque cellule endothéliale peut entrer en contact avec tout le sang circulant. C'est dire que les substrats transportés par le sang sont en contact direct avec les cétoenzymes de la face luminale de la cellule endothéliale et que les métabolites peuvent soit diffuser dans le voisinage soit être transportés à distance par la circulation.

De même, les substances synthétisées et sécrétées par les cellules endothéliales peuvent avoir des effets locaux et systémiques.

Enfin, tous les matériaux traversant, dans un sens ou dans l'autre, la paroi du vaisseau sanguin, peuvent subir des altérations biochimiques lors de leur transit endothélial.

Les cellules endothéliales élaborent, entre autres, des glycoprotéines, des glycosaminoglycans, plusieurs types de collagène, des microfibrilles... Au niveau des capillaires, elles participent au métabolisme lipidique par fixation membranaire de la lipoprotéine lipase. Cet enzyme hydrolyse les triglycérides et les diglycérides contenus dans les chylomicrons et les VLDL (very low density lipoproteins).

Vu ces nombreux rôles, on comprend aisément que des altérations dans la structure et/ou les fonctions de la barrière endothéliale contribuent à la genèse de processus pathologiques tels que l'athérosclérose, la thrombose, l'inflammation ou la tumeur vasculaire. L'élucidation et la compréhension des mécanismes impliqués dans ces processus normaux ou pathologiques résultent d'études *in vivo* et *in vitro*.

Dans le cas de l'athérosclérose par exemple, la découverte de modèles animaux développant des lésions athéromateuses, spontanément ou après un régime approprié, a permis d'étudier l'action de divers facteurs athérogéniques et de tester l'efficacité de certaines thérapeutiques.

Cependant des problèmes comme l'identification des caractéristiques moléculaires des lésions ou la découverte de facteurs favorisant la prolifération de certains types cellulaires (fibroblastes, cellules musculaires lisses, plaquettes, cellules endothéliales) nécessitent des recherches plus spécifiques sur les cellules concernées.

Enfin, bien que les cellules endothéliales d'un même lit vasculaire se ressemblent morphologiquement, on distingue des différences régionales. En ultrastructure, on peut observer deux types fondamentaux d'endothélium : l'endothélium "continu" des artères, veines et capillaires musculaires et l'endothélium fenêtré, caractéristique de capillaires viscéraux. A l'intérieur de ces catégories, on pourra noter des variations cytologiques dans le nombre et/ou la distribution des vésicules de pinocytose, des organites cytoplasmiques, des éléments du cytosquelette, voire même des jonctions intercellulaires. De plus, il semblerait que d'importantes spécialisations dans la fonction endothéliale existent au niveau régional et probablement même cellulaire.

Par exemple, des médiateurs de l'inflammation tels que l'histamine induisent sélectivement la contraction dans l'endothélium de la veinule postcapillaire, augmentant ainsi la perméabilité au niveau capillaire; les lymphocytes du sang adhèrent et traversent l'endothélium des veinules du ganglion lymphatique ; enfin, l'activité de plusieurs enzymes associés aux cellules endothéliales (tels que l'activateur du plasminogène, la prostaglandine synthétase, la phosphatase alcaline et la lipoprotéine lipase) varie dans les endothéliums artériel, veineux et capillaire.

On doit donc s'attendre, au vu de cette hétérogénéité structurale et fonctionnelle, à une réponse non uniforme de la barrière endothéliale aux divers stimuli pathophysiologiques. Cependant, il est tout aussi probable que certaines caractéristiques essentielles de l'endothélium, se produisant tôt dans l'adaptation évolutive de ce tissu à son rôle de bordure vasculaire, sont exprimées de manière plus générale. Les mécanismes de base de la compatibilité sanguine (thromborésistance) la perméabilité sélective et la régénération en sont probablement des exemples.

3. Culture de cellules endothéliales

La possibilité de cultiver des populations pures de cellules endothéliales pendant des périodes prolongées a fourni un système modèle permettant l'étude des propriétés structurales, métaboliques et fonctionnelles de l'endothélium vasculaire dans des conditions expérimentales définies.

a) Historique

Avant 1950, la littérature scientifique ne mentionne que très peu d'articles traitant de cultures de cellules endothéliales. Elles sont toutes réalisées à partir de fragments tissulaires provenant de spécimens chirurgicaux ou d'autopsie. Les limites de ces techniques sont évidentes: faible rendement, identification cytologique difficile. Cependant, dès la fin des années 50, Lazzarini - Robertson (1961) commence à cloner des populations de cellules séparées à partir d'"explants" artériels et à étudier la capture des lipides par ces cellules. Ces expériences représentent la première tentative d'étude biologique de l'endothélium en culture pure. Un pas en avant fut réalisé grâce à Maruyama (1963) qui obtint un rendement accru de cellules endothéliales suite à la dissociation enzymatique de l'intima de la veine du cordon ombilical humain. Des coupes histologiques de vaisseaux traités montraient que la bordure endothéliale avait été ôtée de manière sélective, préservant la lame élastique interne. Les cellules restaient viables pendant 14 à 21 jours et les cultures étaient plus homogènes que celles obtenues à partir de fragments tissulaires. Maruyama observa des cellules d'aspect fibroblastique dans les vieilles cultures et il attribua leur présence à la "transformation" des cellules endothéliales. Des études au microscope électronique ont montré plus tard qu'il s'agissait en fait d'une contamination des cellules initiales par des cellules musculaires lisses.

Fryer and al. (1966) ont adopté la méthode de Maruyama et l'ont appliquée aux cultures de l'intima artériel du cordon. Ils obtinrent des résultats similaires à ceux des cultures de l'intima veineux. Cependant, l'artère ombilicale, qui ne possède pas une lame élastique bien structurée, fut souvent à l'origine de mélanges de cellules endothéliales et de cellules d'aspect fibroblastique. Les cellules endothéliales se détérioraient progressivement après 2 à 5 semaines et ne pouvaient être sous-cultivées. Par contre, les contaminants d'aspect fibroblastique croissaient continuellement.

Grâce à des progrès dans les trois directions suivantes, la culture de cellules atteignit le sommet actuel.

1° progrès dans les méthodes d'isolement spécifique.

2° amélioration des conditions de culture.

3° identification des cellules cultivées par des critères fiables.

Les méthodes actuelles d'isolement nous permettent d'obtenir des cellules endothéliales viables à partir des gros vaisseaux sanguins soit par détachement mécanique de la surface luminale soit par dissociation de l'intima par des enzymes protéolytiques. (Jaffe and al. , 1973 ; Gimbrone and al. , 1974 ; Booyse and al. , 1975)

La perfusion de segments de vaisseaux sanguins avec de la collagénase bactérienne fournit des quantités de cellules endothéliales viables sans contamination appréciable par d'autres types cellulaires.

Elles proviennent pour une part importante des cordons ombilicaux humains. Mais on cultive également avec succès des cellules endothéliales artérielles provenant d'aorte bovine, porcine...

En ce qui concerne les conditions de culture, les cellules endothéliales se distinguent des autres types de cellules diploïdes par un besoin accru en sérum (Gimbrone and al. , 1976). De plus, la croissance cellulaire requiert une densité optimale de cellules lors de la mise en culture, car souvent des petites quantités de cellules ne s'attachent pas au support (Gimbrone and al. , 1976). Ceci représentait évidemment un handicap pour l'établissement de clones cellulaires. Un très grand progrès a été réalisé par Gospodarowicz and al. , 1977 , qui ont réussi à cloner et à cultiver de manière prolongée des cellules endothéliales de l'aorte bovine en utilisant un facteur de croissance (Fibroblast Growth Factor ou FGF).

Maciag and al. (1979) ont pu obtenir la stimulation de la croissance endothéliale in vitro à l'aide d'un facteur de croissance isolé de l'hypothalamus bovin et qui semble différent du FGF.

Quant à l'identification des cellules en culture, les cellules endothéliales possèdent certaines caractéristiques structurelles et fonctionnelles qui permettent de les distinguer des autres types de cellules dérivés de la paroi vasculaire à savoir les fibroblastes et les cellules musculaires lisses.

Cependant, la modulation du phénotype au cours de cultures prolongées est chose très fréquente dans toute culture cellulaire.

L'évaluation objective de ce phénomène en ce qui concerne les cellules endothéliales est nécessaire si l'on veut aboutir à des interprétations physiologiques significatives.

b) Cellules endothéliales

1° Structure et caractérisation

Les cellules endothéliales en culture prennent un aspect polygonal. Elles possèdent un noyau ovoïde avec deux ou trois nucléoles.

La microscopie électronique à transmission révèle la présence au niveau cytoplasmique de nombreuses mitochondries, de saccules de reticulum endoplasmique lisse et rugueux, d'un appareil de Golgi important et souvent périnucléaire, de ribosomes libres, de corps multivésiculaires... Ces organites ainsi que les vésicules d'endocytose et de sécrétion (50 - 100 nm) témoignent de l'activité métabolique intense de ces cellules.

Au niveau du cytosquelette, on distingue des microtubules (25 nm de diamètre) et des microfilaments (diamètres de 10 nm et 6-8 nm) surtout abondants en périphérie cellulaire.

En plus de tous ces éléments qui se retrouvent dans le cytoplasme d'autres types cellulaires, les cellules endothéliales contiennent des inclusions spécifiques: les corps de Weibel - Palade. Ces granules ovoïdes (0.1 x 3 µm), limités par une membrane, sont constitués de faisceaux parallèles de structures tubulaires d'un diamètre de 15 nm (Weibel and Palade , 1964).

Ils sont localisés en périphérie du cytoplasme ou à proximité du Golgi. Sengel et Stoebner (1969) suggèrent l'assemblage et peut-être la synthèse des corps de Weibel - Palade au niveau de l'appareil de Golgi. On possède peu d'informations sur le rôle de ces granules.

Cependant, Wagner and al. (1982) montrent le stockage de la protéine de Von Willebrand au niveau des corps de Weibel - Palade. Ils pourraient intervenir dans sa fabrication.

La synthèse du facteur VIII ou de Von Willebrand est également une propriété spécifique des cellules endothéliales.

Les techniques d'immunofluorescence ont permis de localiser le facteur VIII uniquement dans l'endothélium des vaisseaux. (Hoyer and al. , 1973) Sa distribution est cytoplasmique et granulaire. Il n'est pas détecté dans les cellules musculaires lisses et les fibroblastes.

L'incorporation dans cette protéine d'acides aminés radioactifs a fourni la preuve de sa synthèse par la cellule endothéliale. (Jaffe and al. , 1973). Le facteur VIII est une glycoprotéine du plasma (PM : $1.12 \cdot 10^6$) synthétisée par les mégakaryocytes et les cellules endothéliales.

Elle possède trois propriétés constitutionnelles:

- . le facteur VIII anti-hémophilique ($VIII_{AHF}$) qui intervient dans la coagulation sanguine.
- . le facteur de Von Willebrand ($VIII_{VWF}$) qui participe à l'adhésion des plaquettes au collagène du sub-endothélium.
- . l'antigène du facteur VIII ($VIII_{Ag}$).

L'action anti-hémophilique dépend de la séquence des acides aminés dans la chaîne peptidique tandis que l'adhésion au collagène dépend de la glycosylation (Kao and al. , 1980)

Les cellules endothéliales en culture produisent l'antigène du facteur VIII et le facteur de Von Willebrand. L'activité anti-hémophilique n'est pas détectée dans les milieux de post-culture. (Jaffe , 1977).

La structure des cellules endothéliales présente peu de variations interspécifiques.

La comparaison entre les cellules bovines et les cellules humaines montre, outre des dimensions cellulaires différentes: $30 \times 50 \mu\text{m}$ pour

les cellules humaines contre $40 \times 60 \mu\text{m}$ pour les cellules bovines, un changement dans la répartition des corps de Weibel - Palade. Ils figurent en grand nombre dans les cellules endothéliales humaines. (Jaffe and al. , 1973 ; Henriksen and al. , 1975 ; Haudenschild and al. , 1975).

Pour Schwartz (1978) et Folkman and al. (1979) , les cellules endothéliales de l'aorte et des capillaires bovins ne possèdent pas cet organite caractéristique. Il est cependant signalé dans les cellules endothéliales de l'aorte bovine par Booyse and al. (1975) et Eskin and al. (1978).

A part cette différence, les cellules humaines et les cellules bovines se ressemblent au niveau de la composition cytoplasmique, de la présence du facteur VIII ...

De plus, les caractéristiques de la structure in vivo des cellules de l'endothélium tant humain que bovin sont conservées in vitro. (Jaffe and al. , 1973 ; Booyse and al. , 1975)

2° Mode de croissance

La croissance des cellules endothéliales in vitro se fait selon un modèle très régulier. Elles prolifèrent en une monocouche de cellules polygonales étroitement accolées.

Ceci les distingue des cultures de cellules musculaires lisses et de fibroblastes, cellules fusiformes qui se disposent en couches superposées.

A l'opposé des fibroblastes, les cellules endothéliales présentent un contrôle de croissance rigoureux. Dans les cultures à confluence, la stimulation de la synthèse du DNA des fibroblastes est proportionnelle à la concentration en sérum.

Dans les mêmes conditions, les cellules endothéliales ne répondent pas aux facteurs de croissance du sérum, elles arrêtent leurs divisions. (Haudenschild and al. , 1976).

Rem. La confluence correspond à la rencontre des diverses colonies cellulaires d'une même boîte.

Les études autoradiographiques de Gimbrone and al. (1974) ont d'ailleurs montré une corrélation entre la synthèse du DNA et la densité des cellules endothéliales. Il y a diminution des noyaux marqués à la thymidine tritiée quand la densité cellulaire augmente.

Pour les cellules endothéliales, l'arrêt des divisions est le résultat d'un contact physique entre cellules voisines, suggérant que des récepteurs sur la surface cellulaire sont impliqués dans la réception et la transmission du signal d'arrêt.

L'inhibition de la croissance dépendante de la densité et l'inhibition de mouvement due aux contacts entre les cellules sont deux propriétés importantes de l'endothélium in vivo. Elles permettent le maintien d'une assise endothéliale unicellulaire malgré la stimulation continue par les facteurs de croissance circulant dans le sang. Ces cellules conservent toutefois leur capacité de division. Des stimuli pathologiques et physiologiques peuvent induire les mitoses et une reprise de la croissance cellulaire.

Le mouvement cellulaire semble nécessaire pour l'initiation du retour en croissance.

L'inhibition de la réparation des lésions de l'endothélium par la cytochalasine B est à l'origine de cette suggestion. (Schwartz and al. 1979). En effet, la cytochalasine est un inhibiteur du mouvement cellulaire qui agit principalement au niveau des microfilaments d'actine.

c) Facteurs de croissance

Les facteurs de croissance protéiques permettent de maintenir en vie, de stimuler la croissance et de retarder la dégénérescence des cellules en culture.

Bien que le sérum utilisé pour promouvoir la culture d'une grande variété de types cellulaires soit considéré comme la source commune de ces facteurs, ils existent également dans des extraits tissulaires (cerveau, hypothalamus, glande pituitaire), dans les milieux conditionnés par des cellules tumorales...

Gospodarowicz and al. (1976 , 1977) ont montré l'action du "fibroblast growth factor" (FGF) sur la prolifération des cellules endothéliales bovines. Ce facteur, extrait soit de la glande pituitaire soit du cerveau bovin, était connu pour son action sur la croissance des fibroblastes. L'addition du FGF favorise la prolifération des cellules endothéliales bovines ensemencées à faible densité (8 cellules/cm²). Son utilisation a également permis la production de lignées cellulaires clonées.

La comparaison des réponses des cellules bovines et humaines au FGF a suggéré l'existence de variations au niveau des facteurs de contrôle de la croissance de l'endothélium des deux espèces. (Gospodarowicz and al. , 1978).

En effet, l'activation par la thrombine de la réponse des cellules humaines au FGF ne se vérifie pas pour les cellules bovines.

L'action de la thrombine n'est pas clairement définie, elle pourrait agir sur certains récepteurs de la membrane.

Il faut cependant signaler que l'action du FGF sur les cellules endothéliales peut être modifiée dans certaines conditions précises selon le mode de préparation. (Maciag and al. , 1979 ; Lemmon and al. , 1982 ; Gospodarowicz and al. , 1983).

Pour établir des cultures à long terme de cellules endothéliales humaines, Maciag and al. (1979 , 1981) utilisent un "endothelial cell growth factor" (EcGF) isolé à partir d'un extrait d'hypothalamus bovin. EcGF favorise la survie et la croissance des cultures de cellules endothéliales de faible densité. Son addition au milieu de culture permet de réduire les besoins en sérum. Cette observation suggère que l'EcGF agit en collaboration avec des hormones et des facteurs contenus dans le sérum. Etant donné l'importance expérimentale de ce facteur protéique, Maciag and al. (1982) ont poursuivi sa caractérisation. EcGF existe sous deux formes possédant une activité biologique similaire, l'une de poids moléculaire élevé (PM > 70000) , l'autre de poids moléculaire plus faible (PM compris entre 17000 et 25000).

En plus de son action sur les cellules endothéliales, l'EcGF peut stimuler la synthèse du DNA des fibroblastes en culture confluente. La relation entre l'EcGF et le FGF isolé du cerveau bovin par Gospodarowicz and al. (1978) n'est pas encore clairement définie. Cependant Maciag and al. suggèrent que ces deux facteurs appartiennent à la même famille, FGF pourrait être une forme protéique modifiée du facteur de faible poids moléculaire.

King and Buschwald (1984) ont caractérisé à partir des plaquettes un facteur capable de stimuler la synthèse du DNA et la croissance des cellules endothéliales humaines. Cet Endo - GF diffère du "platelet derived growth factor" (PDGF), un autre facteur extrait des plaquettes humaines, qui favorise la croissance des fibroblastes et des cellules musculaires lisses.

La présence de l'Endo - GF dans les plaquettes permet de les associer aux processus de croissance et de réparation de l'endothélium.

King and al. (1984) ont purifié, à partir d'un chondrosarcome, un facteur (PM 18000) qui stimule la prolifération des cellules endothéliales des capillaires, phénomène important de l'angiogenèse. Les cellules endothéliales des macrovaisseaux répondent différemment aux facteurs de croissance extraits de tumeurs. Cela peut être mis en relation avec les différences fonctionnelles qui existent entre les micro- et les macrovaisseaux.

d) Propriétés des cellules endothéliales en culture

Les cellules endothéliales produisent un matériel extracellulaire composé principalement de collagène et assimilé à une membrane basale. Elles sont intimement liées à cette matrice qui les entoure, à laquelle elles sont attachées et sur laquelle elles migrent, prolifèrent et se différencient. Les cellules endothéliales synthétisent la fibronectine et l'incorporent au substrat fibrillaire. (Jaffe and Mosher, 1978 ; Birdwel and al., 1978).

La fibronectine est une glycoprotéine de la surface cellulaire, elle joue un rôle important dans la morphologie de la cellule, dans l'agrégation entre les cellules voisines et dans l'adhésion au substrat. En utilisant des anticorps anti-fibronectine fluorescents, Jaffé and Mosher ont observé une diminution du nombre de granules intracellulaires fluorescents et une extension du marquage dans le réseau fibrillaire extracellulaire lors de l'augmentation de la densité cellulaire jusqu'à la confluence.

Etant donné ses propriétés d'adhésion, la fibronectine est incorporée aux substrats de culture. Maciag and al. (1981) utilisent, en plus de l'EcGF, un substrat de fibronectine pour leurs cultures de cellules endothéliales humaines.

La fibronectine a permis également d'améliorer la prolifération des cellules endothéliales des microvaisseaux (Bensch and al. , 1983). Les cellules endothéliales produisent le collagène, principal composant de la matrice extracellulaire. Le collagène de type III prédomine sur les autres types. Ceci est en corrélation avec la synthèse in vivo. Tseng and al. (1982) décrivent l'action du FGF sur la synthèse de collagène par les cellules endothéliales bovines.

En présence de FGF dans le milieu, elles expriment leur phénotype normal. Elles synthétisent en premier le collagène de type III plus du collagène des types IV et V. En absence de FGF, la synthèse de collagène est augmentée et les cellules produisent en supplément du collagène de type I.

L'apparition du type I au niveau du substrat entraîne des changements dans le phénotype des cellules qui adoptent un mode de croissance de type fibroblastique.

Ces modifications de la matrice extracellulaire et l'apparition du collagène de type I sont des éléments que l'on retrouve au niveau de la formation de la plaque athéroscléreuse. (Ross and Glomset , 1973). En plus de son rôle de support, la matrice extracellulaire intervient dans la régulation de la synthèse et du dépôt du collagène.

Les cellules endothéliales bovines en croissance sur une matrice préformée produisent moins de collagène et cette synthèse est plus efficace.

Le collagène est déposé principalement au niveau de la couche cellulaire même en début de culture.

Par contre les cellules en croissance sur le plastique avec FGF produisent plus de collagène dans le milieu. Son dépôt au niveau de la surface basale des cellules s'effectue à un stade avancé de la culture.

Le mécanisme par lequel les cellules détectent et répondent au substrat n'est pas encore élucidé. (Tseng and al. 1983).

L'apparition d'un comportement similaire pour les cellules en culture et les cellules in situ peut être atteint si une matrice extracellulaire appropriée est présente.

Pour y arriver, deux voies sont possibles : soit on fournit une matrice préformée, soit on stimule sa production par l'addition de facteur de croissance.

Gospodarowicz and al. (1978) et Schwartz (1978) ont observé, dans des cultures post-confluentes de cellules endothéliales bovines, des cellules en prolifération sous la monocouche.

La nature endothéliale de ces cellules est démontrée par la présence de l'antigène du facteur VIII.

Schwartz suggère l'analogie avec le processus initial de la néovascularisation.

Daniel (1982) décrit une phase de croissance similaire dans des cultures de cellules endothéliales humaines.

L'incidence et l'extension de ce phénomène est semblable pour des cultures sur plastique, sur verre et sur substrat de collagène.

Au sein d'une même culture, toutes les cellules ne participent pas à cette nouvelle phase de croissance. Certaines conservent la disposition régulière typique d'une culture endothéliale. (Schwartz, 1978).

Hahn and Polgar (1984) établissent une relation entre l'augmentation significative de la production des prostaglandines, en particulier la prostacycline, et l'apparition de cellules phénotypiquement différentes dans des cultures de cellules endothéliales bovines.

La nature de l'activation de la synthèse de PGI₂, associée à cette phase de croissance reste inconnue.

Avant d'atteindre la confluence, les cellules endothéliales bovines en culture peuvent se lier aux plaquettes. Elles perdent cette capacité au moment de la confluence. (Feder and al. , 1983 cités par Hahn and Polgar , 1984).

En tenant compte de ces observations, Hahn and Polgar émettent l'hypothèse de l'inhibition du dépôt des plaquettes dans les cultures post-confluentes suite à l'augmentation du taux de prostacycline liée à la présence de ces cellules particulières.

Il reste cependant à établir l'analogie avec les processus développés in vivo.

Maciag and al. (1982) ont étudié l'apparition de structures organisées dans les cultures de cellules endothéliales humaines. Les cellules peuvent passer d'une phase de prolifération à une phase d'organisation suite à un changement des conditions de culture. En supprimant les facteurs de croissance (EcGF et fibronectine), on diminue le potentiel de prolifération. Dans ce cas, les cellules n'atteignent pas la confluence mais s'organisent en structures tubulaires. Ces tubes sont constitués de cellules attachées entre elles par des complexes jonctionnels et arrangées de façon à former une lumière. Cette lumière contient des débris amorphes, fibrillaires et et granulaires.

Ils distinguent plusieurs stades dans ce développement.

- . stade I après 2 semaines : apparition des cellules migratrices.
- . stade II après 3 semaines : organisation de ces cellules en fins canaux.
- . stade III après 4 semaines : alignement de ces cellules pour la croissance des canaux dans lesquels une lumière apparaît.
- . stade IV après 5 à 6 semaines : formation d'un réseau organisé semblable à un tissu.
- . stade V après 7 semaines : élongation des structures tubulaires flottantes attachées au substrat par les extrémités.

A ce niveau, les cellules présentent un état de différenciation non terminal.

En effet, la rupture de ces structures par un traitement à la trypsine permet le retour des cellules en phase de prolifération si le milieu de culture contient les facteurs de croissance.

Cette capacité d'organisation des cellules endothéliales en culture présente un grand intérêt pour l'étude de l'angiogenèse.

4. But du travail

Comme nous l'avons mentionné au début, nous souhaitons obtenir des cultures pures de cellules endothéliales à partir de segments d'aorte bovine obtenus à l'abattoir. Après avoir mis au point la technique de culture propre à nos cellules, nous pensons caractériser de manière spécifique les cellules endothéliales. Cela nécessitera probablement une mise au point des techniques appropriées utilisées dans la littérature. Enfin, nous pensons tester l'effet de l'adjonction de facteurs de croissance aux milieux de culture de nos cellules. Après avoir préparé différentes fractions, extraites de cerveau bovin et susceptibles de contenir différents types de facteurs de croissance, nous en vérifierons l'effet qualitatif (effet de la fraction) et l'effet quantitatif (effet de la dose) sur la croissance des cellules endothéliales bovines.

Notre travail ne pourra être que qualitatif: c'est en effet une recherche nouvelle qu'entreprend l'ensemble de l'unité de cytologie; elle entraînera sans doute beaucoup de contretemps. Ce premier travail nous semble cependant utile sinon important pour la planification des expériences ultérieures.

II. MATERIEL ET METHODES

1. Technique de culture

Nous utilisons pour mettre en culture les cellules endothéliales de l'aorte bovine une technique proche de celle proposée par Booyse and al. en 1975.

L'aorte (20 cm environ), obtenue dans un délai de deux heures après la mort de l'animal, est immédiatement stockée dans une solution tampon à 4° C.

(0.14 M. NaCl, 0.004 M. KCl, 0.001 M. tampon phosphate pH 7.4, 0.011 M. glucose).

Nous pouvons diviser la mise en culture en cinq étapes.

- 1° Suturer les artérioles puis perfuser l'aorte avec du PBS contenant les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} (Dulbecco's phosphate buffered saline) pour éliminer le sang.
- 2° Fermer une extrémité et remplir le vaisseau avec 20-40 ml d'une solution de collagénase 0.1 % (CLS, Worthington) dans du PBS. Fermer l'autre extrémité et incuber dans un bain à 37° C. pendant 15 minutes.
- 3° Après l'incubation, écarter le contenu et remplir l'aorte avec 20-40 ml de milieu.
Cette étape permet l'élimination des restes de la solution de collagénase, des cellules sanguines et des cellules abîmées. Répéter l'opération une fois.
- 4° Après ces rinçages, verser dans l'aorte 20 ml de milieu contenant 20 % de sérum de veau nouveau-né, (Flow laboratories). Fermer les extrémités et agiter lentement plusieurs fois dans le sens longitudinal pour détacher les cellules endothéliales.
- 5° Récolter le contenu et le répartir dans quatre boîtes 60x15 mm (Miles laboratories, Naperville) à raison de 5 ml / boîte; les boîtes étant au préalable recouvertes d'un film de gélatine. Placer les boîtes dans l'incubateur à 37° C. ventilé par un mélange 95 % air - 5 % CO_2 .
Changer le milieu de culture tous les trois jours.

Le milieu de culture utilisé contient, en plus du milieu 199 (Flow laboratories) dont la composition est donnée au tableau I, 350 mg / litre NaHCO₃, 2 mM L-glutamine, 15 mM HEPES, 0.2 mg / ml Streptomycine, 200 U. / ml Pénicilline, 2.5 U. /ml Nystatin et 20 % sérum de veau nouveau-né. Le pH est ajusté à 7.1 - 7.2.

Les cellules arrivées à confluence sont repiquées de la façon suivante:

- . Laver les cellules deux fois avec du tampon HEPES.
- . Incuber dans une solution de BSA/EDTA (0.5 % / 0.02 %) / collagénase 0.1 % dans du tampon HEPES (1/1) pendant 10 minutes à 37° C.
- . Racler la boîte avec un "rubber policeman" et récolter le contenu dans un tube à centrifuger cône.
- . Rincer la boîte une fois et centrifuger le tout 5 minutes à 1000 rpm.
- . Répartir le culot dans le nombre de boîtes désiré.

Toutes ces manipulations doivent s'effectuer dans des conditions strictes de stérilité.

Ingredient	mg/litre	Ingredient	mg/litre
L-Alanine	25.00	p-Aminobenzoic acid	0.05
L-Arginine HCl	70.00	Pyridoxal HCl	0.025
L-Aspartic acid	30.00	Pyridoxine HCl	0.025
L-Cysteine HCl	0.0987	Riboflavin	0.01
L-Cystine, disodium salt	23.66	Thiamin HCl	0.01
L-Glutamic acid	66.82	DL- α Tocopherol phosphate, disodium salt	0.01
L-Glutamine	100.0	Vitamin A acetate	0.1147
Glutathione	0.05	CaCl ₂ .2H ₂ O	185.5
Glycine	50.00	Fe(NO ₃) ₃ .9H ₂ O	0.10
L-Histidine HCl .H ₂ O	21.88	KCl	400.0
L-Hydroxyproline	10.00	KH ₂ PO ₄	60.00
L-Isoleucine	20.00	MgSO ₄ .7H ₂ O	200.0
L-Leucine	60.00	NaCl	8000
L-Lysine HCl	70.00	NaHCO ₃	350.0
L-Methionine	15.00	NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	
L-Phenylalanine	25.00	Na ₂ HPO ₄	47.50
L-Proline	40.00	Adenine sulphate	10.00
L-Serine	25.00	5'-AMP	0.20
L-Threonine	30.00	ATP, disodium salt	10.00
L-Tryptophan	10.00	Cholesterol	0.20
L-Tyrosine disodium salt	49.72	2-Deoxyribose	0.50
L-Valine	25.00	D-Glucose	1000
L-Abscorbic acid	0.05	Guanine HCl	0.30
Biotin	0.01	Hypoxanthine	0.30
Calciferol	0.10	D-Ribose	0.50
D-Calcium pantothenate	0.01	Sodium acetate	36.71
Choline chloride	0.50	Phenol red sodium salt	17.00
Folic acid	0.01	Thymine	0.30
i-Inositol	0.05	Tween 80	5.00
Menaphthone sodium bisulphite 3H ₂ O	0.019	Uracil	0.30
Nicotinic acid	0.025	Xanthine	0.30
Nicotinamide	0.025		

Tableau I : Composition du milieu de culture M 199.
(Flow laboratories)

2. Immunofluorescence

L'immunofluorescence nous permet de mettre en évidence l'antigène du facteur VIII sur les cellules endothéliales bovines.

Le marquage est réalisé sur des cellules en phase de croissance sur couvre-objet.

- . Immerger le couvre-objet dans du PBS, effectuer trois rinçages dans ce même PBS.
- . Fixer les cellules avec une solution de formaldéhyde (paraformaldéhyde 3% dans du PBS, 10 μ l. CaCl_2 1 M. et 10 μ l. MgCl_2 1 M. pour 100 ml de solution) pendant 20 minutes.
- . Rincer (trois fois) avec du PBS.
- . Dans une chambre humide, déposer sur des morceaux de parafilm 25 μ l. d'antisérum de lapin anti-facteur VIII humain. (Behringwerke A.G. , W. Germany). Renverser le couvre-objet sur l'antisérum et laisser incuber 20 minutes.
- . Laver deux fois dans du PBS/gélatine 0.2%.
- . Procéder de la même façon avec le second anticorps à savoir les γ -globulines anti-lapin de chèvre conjuguées à la fluorescéine.
- . Laver deux fois dans du PBS/gélatine.
- . Monter le couvre-objet sur une lame dans une goutte de glycérol-PBS

Toutes ces manipulations se font à température ambiante.

Remarque: pour obtenir un marquage interne, perméabiliser les cellules après l'étape de fixation dans une solution de Triton X 100 0.1% dans du PBS pendant 4 minutes.

3. Préparation des chromosomes

Nous utilisons pour étaler les chromosomes des cultures en phase de croissance exponentielle afin d'obtenir un nombre appréciable de plaques métaphasiques.

- . Incuber les cellules avec 0.06 µg de colchicine / ml de milieu pendant 18 heures.
- . Les détacher avec une solution de trypsine (0,25 % trypsine dans PBS, 0.01 % EDTA (1/1) pendant 3 minutes.
- . Soumettre les cellules à un choc hypotonique durant 20 minutes (1 volume de milieu pour 3 volumes d'eau).
- . Racler la boîte et centrifuger 10 minutes à 1200 rpm.
- . Resuspendre le culot dans le fixateur (1 volume d'acide acétique glacial et 3 volumes de méthanol), laisser agir 10 minutes.
- . Centrifuger (10' , 1200 rpm) et recommencer une fixation.
- . Resuspendre dans 1 ml de fixateur.
- . Plonger une lame dans du méthanol 40% glacé, déposer sur cette lame une goutte de suspension cellulaire et laisser sécher.
- . Colorer 3 à 5 minutes avec de l'orcéine acétique (2 % orcéine dans acide acétique 45 %).
- . Rincer, sécher et monter au DPX.

4. Préparation pour la microscopie électronique à transmission

- . Fixer les cellules avec la glutaraldéhyde 2.5% dans du tampon cacodylate 0.1 M. pH 7.4 pendant 2 heures à 4° C.
- . Rincer avec le tampon cacodylate 3 x 1 minute à 4° C.
- . Post-fixer avec le tétroxyde d'osmium 2% dans du tampon cacodylate 0.1 M. pH 7.4 durant 1 heure à 4° C.
- . Réaliser trois rinçages d'1 minute avec le tampon cacodylate à 4° C.
- . Déshydrater avec de l'éthanol 70°: 3 x 2 minutes à 4° C, puis avec de l'éthanol 90°: 3 x 2 minutes à 4° C et enfin avec de l'éthanol 100°: 3 x 10 minutes à la température ambiante.
- . Enrober dans de l'épon et laisser polymériser trois jours à 60° C.

Les coupes fines sont obtenues avec un couteau de diamant, à l'ultramicrotome (Ultratome LKB) puis contrastées pendant 30 minutes avec une solution d'acétate d'uranyle 1% suivie du citrate de plomb selon la technique de Reynolds pendant 10 minutes.

Les grilles sont examinées au microscope électronique Philips EM 301.

5. Préparation du facteur de croissance

Gordon and al. (1983) ont purifié un "endothelial cell growth factor" à partir du cerveau bovin. Ce facteur de croissance permet la prolifération des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine. Afin de tester ce facteur sur les cellules endothéliales de l'aorte bovine, nous le préparons en suivant le mode opératoire mis au point par ces auteurs.

- . Homogénéiser les cerveaux frais de boeuf dans 1 à 2 litres de sulfate d'ammonium pendant 1 minute.
- . Mélanger l'homogénat pendant 60 minutes à 4° C, ensuite ajuster le pH à 4.66 avec HCl 6 N.
- . Centrifuger à une vitesse de 8000 rpm pendant 30 minutes à 4° C, récolter le surnageant et ajuster le pH à 6.74 avec NaOH 1 M.
- . Soumettre le surnageant à deux précipitations successives avec du sulfate d'ammonium.
 - 1° 220 g. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ / litre de surnageant, mélanger à 4° C pendant 10 minutes puis centrifuger (8000 rpm, 30 minutes).
 - 2° 500 g. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ / litre de surnageant, mélanger puis centrifuger (8000 rpm, 30 minutes).
- . Resuspendre le culot dans 100-200 ml d'eau distillée, dialyser contre H_2O pendant 24 à 48 heures puis lyophiliser.
- . Dissoudre le matériel lyophilisé dans du tampon phosphate de sodium 0.1 M. pH 6 à une concentration de 20 mg protéine / ml.
- . Déposer cet échantillon sur une colonne échangeuse d'ions CM Séphadex C50 équilibrée et éluée avec le tampon phosphate de Na 0.1 M. pH 6.
- . Eluer le facteur de croissance avec un gradient de NaCl: 0.15 M. puis 1.0 M. NaCl dans le tampon phosphate de sodium 0.1 M. pH 6.
- . Récolter les fractions du second pic, dialyser contre H_2O à 4° C et lyophiliser.

- . Dissoudre le matériel lyophilisé dans 2-5 ml de carbonate d'ammonium 0.1 M. pH 8.5.
- . Déposer l'échantillon sur une colonne Séphadex G100 (tamis moléculaire) équilibrée et éluée avec le tampon carbonate d'ammonium 0.1 M. pH 8.5.
- . Récolter les fractions éluées, dialyser contre H₂O à 4° C et lyophiliser.
Stocker à -20° C.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

A. Culture des cellules

1. Mise au point de la technique de culture

Dans le cadre de notre travail, nous avons effectué quinze mises en culture de cellules endothéliales provenant de l'aorte bovine. Au cours des premières expériences, quelques modifications sont apportées au protocole présenté par Booyse and al. en 1975.

. Choix du segment d'aorte

Nous décidons de travailler sur l'aorte abdominale car celle-ci présente des avantages pratiques par rapport à l'aorte thoracique. Elle possède un diamètre d'environ 1.5 à 2 cm (au lieu de 3 à 4 cm pour la portion thoracique), sa couche musculo-élastique est nettement moins épaisse, les collatérales sont moins nombreuses et disposées plus régulièrement.

Ces caractéristiques facilitent sa manipulation avant et pendant l'incubation.

. Isolement des cellules

Pour détacher les cellules de la bordure interne du vaisseau, nous utilisons la collagénase. Cette enzyme, produite par les cellules du tissu conjonctif, provoque la dégradation physiologique du collagène. Elle est active au pH du tissu conjonctif.

Certaines bactéries, du genre Clostridium, responsables de la gangrène gazeuse, produisent aussi la collagénase. L'enzyme favorise le pouvoir d'invasion des microorganismes.

L'avantage de la collagénase réside dans son action au-dessus de la membrane basale. De plus, à la différence de la trypsine et d'autres protéases non spécifiques, la collagénase n'attaque pas la membrane cellulaire et se révèle donc moins toxique pour l'isolement des cellules.

Cependant avec cette technique, le contrôle de la concentration enzymatique et du temps de digestion est important afin de détacher les cellules de la couche endothéliale d'une part et d'autre part d'éviter l'attaque de la membrane basale ce qui pourrait entraîner l'isolement concomitant de cellules musculaires lisses.

Pour choisir une concentration adéquate, nous incubons, à 37° C. pendant 15 minutes, des fragments d'aorte avec des solutions de collagénase 0.05% , 0.1% et 0.2%.

Les observations sont présentées dans le tableau II.

Concentration en collagénase	Observations après 2 jours de culture
0.05 mg / ml	<ul style="list-style-type: none"> . 3 ou 4 colonies d'environ 50 cellules.
0.1 mg / ml	<ul style="list-style-type: none"> . quelques cellules dispersées. . 9 à 10 colonies de 20 à plusieurs centaines de cellules.
0.2 mg / ml	<ul style="list-style-type: none"> . plus de 10 colonies de 20 à plusieurs centaines de cellules. . présence de cellules musculaires lisses.

Tableau II : Composition des boîtesensemencées après incubation de l'aorte avec 3 solutions de concentration différente en collagénase. (2 boîtes par test).

Pour limiter l'apparition des cellules musculaires lisses et augmenter le nombre de cellules endothéliales, nous décidons lors de nos expériences ultérieures d'incuber l'aorte avec la concentration de 0.1 mg / ml.

L'action de la collagénase est nettement visualisée en microscopie optique sur des coupes d'aorte fixées, après le traitement enzymatique, dans le mélange de Bouin, enrobées dans la paraffine et colorées en H.E.S.

L'aorte normale possède une bordure endothéliale continue (fig. 1). Après le traitement avec une solution de collagénase 0.05%, les cellules endothéliales persistent encore en de nombreux endroits (fig.2). Par contre, le vaisseau traité avec une solution de collagénase 0.2% ne possède plus de couche endothéliale (fig. 3).

. Substrat de la culture

La dernière modification apportée concerne le substrat de culture. Dans les premières expériences, nous déposons la suspension cellulaire sur le plastic de la boîte de culture.

Lors du premier changement de milieu, après 24 h., qui permet d'éliminer les cellules mortes et les globules rouges encore présents, nous perdions des cellules vivantes non attachées au substrat.

L'utilisation d'un substrat de gélatine permet d'accroître l'efficacité de l'ensemencement. Une solution de gélatine 0.2%, autoclavée, est déposée dans la boîte à la température ambiante pendant 1 à 2 h. puis l'excès est retiré de façon à ne laisser subsister qu'une fine couche uniforme de ces protéines.

Sur ce substrat, les cellules présentent un taux d'adhésion supérieur ainsi qu'un étalement favorable à la prolifération.

Jaffe E. (1980) avait signalé le rôle favorisant de la gélatine pour l'adhésion des cellules au substrat de la culture sans en donner la moindre explication. Il s'agissait dans ce cas de cultures de cellules endothéliales humaines.

Nous supposons que la gélatine agit grâce à sa structure présentant des sites d'attache pour les protéines membranaires.

Planche I

Fig. 1 Coupe transversale dans une aorte bovine. L'intima du vaisseau est limitée par une couche de cellules endothéliales. Ces cellules pavimenteuses ne peuvent être identifiées que par leur noyau (flèche) qui fait saillie dans la lumière vasculaire (L). Noter la présence de nombreuses fibres élastiques dans la média (tête de flèche).
Coloration H.E.S. x 840.

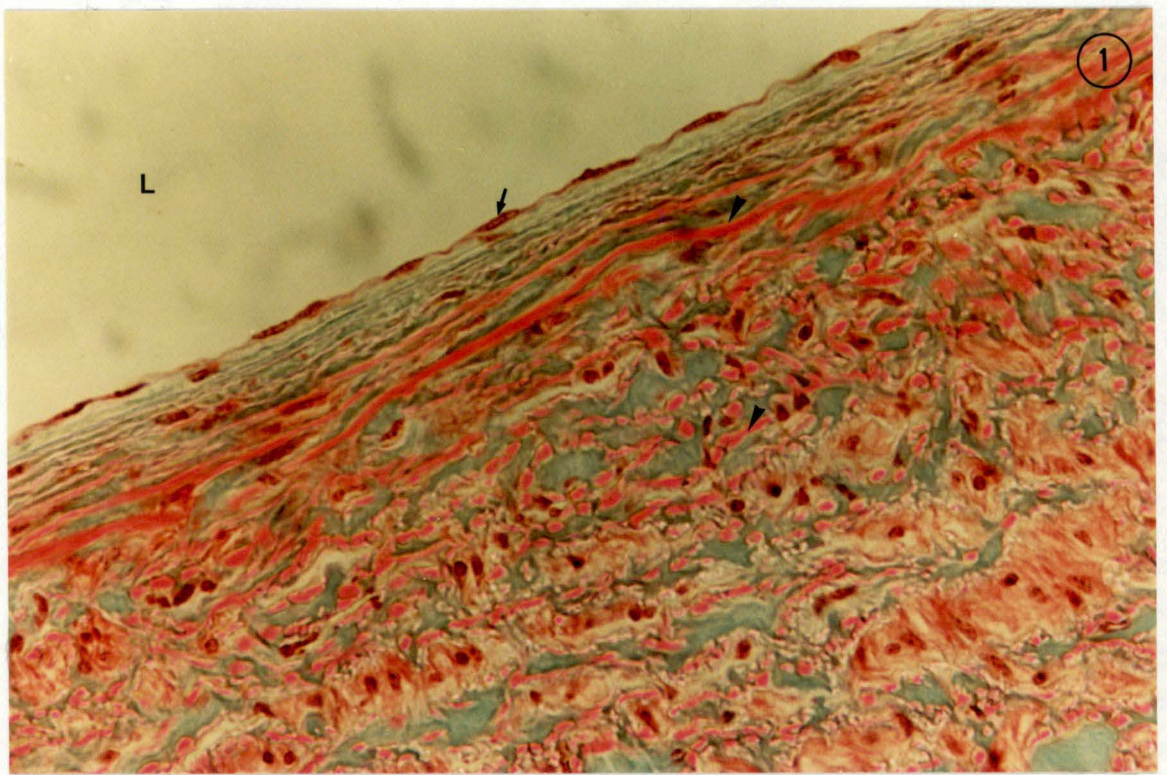


Planche II

Fig. 2 Coupe transversale dans une aorte incubée avec une solution de collagénase 0.05%. La bordure endothéliale persiste mais elle est moins régulière.

Ce traitement enzymatique permet de détacher quelques cellules endothéliales (flèche).

L : lumière vasculaire.

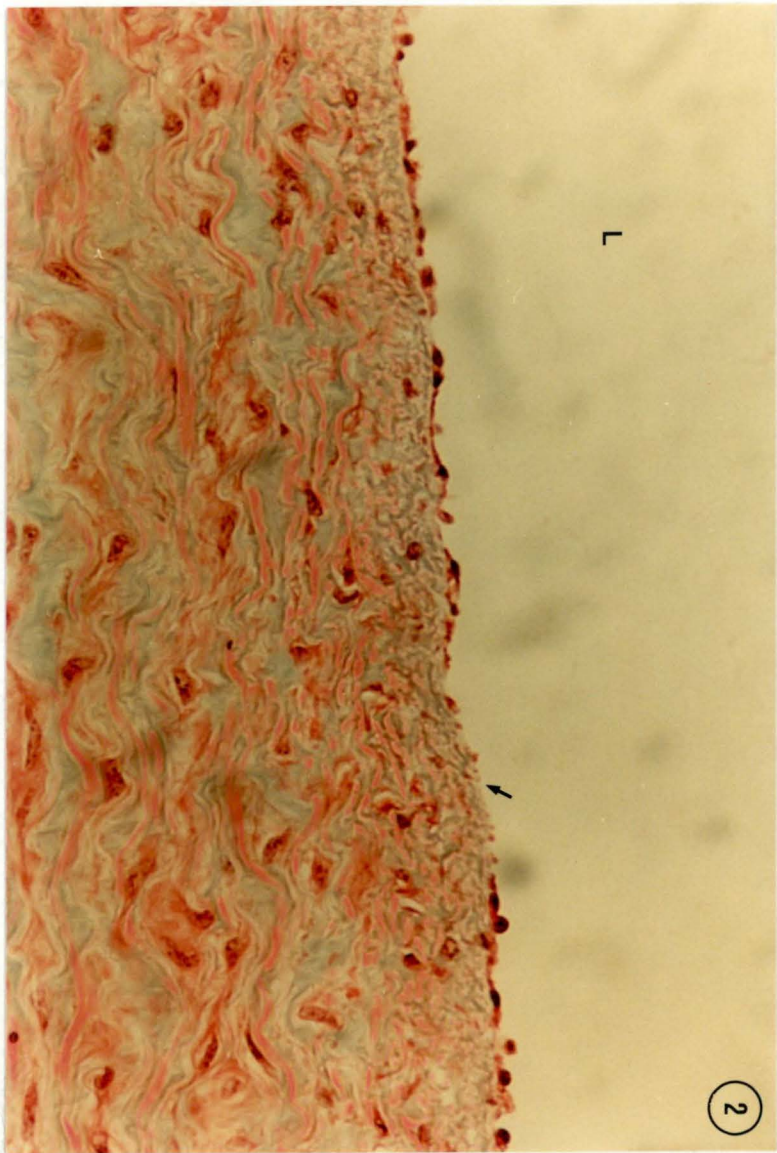
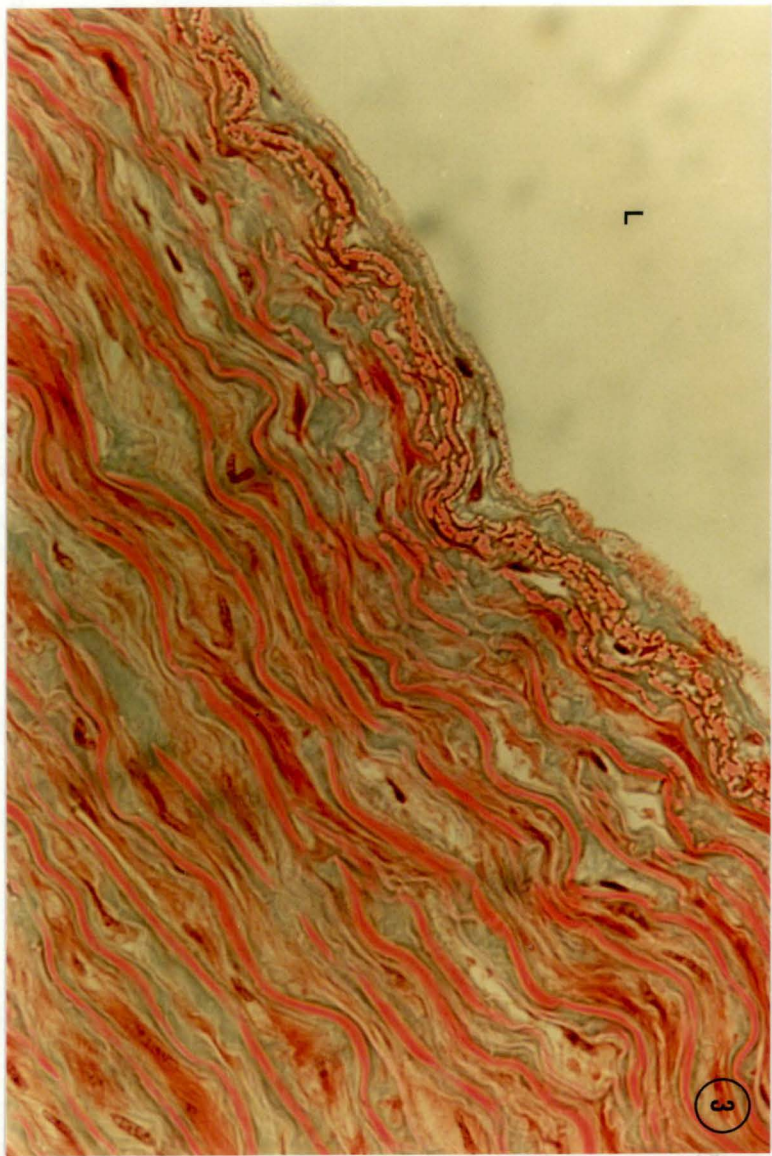
Coloration H.E.S. x 840.

Fig. 3 Coupe transversale dans une aorte incubée avec une solution de collagénase 0.2%.

Ce traitement enzymatique permet de détacher l'ensemble de la couche endothéliale.

L : lumière vasculaire.

Coloration H.E.S. x 840.



2. Effet du temps précédant la mise en culture

Dans la technique de culture, nous citons un délai de 2 heures maximum entre la mort de l'animal et le prélèvement de l'aorte. Ce laps de temps correspond à la durée nécessaire à la préparation de la bête à l'abattoir.

L'aorte n'est accessible que lorsque la cavité abdominale est entièrement vidée. Ce délai ne semble pas affecter les cellules mises en culture.

A ce sujet, une publication de Balconi and al. (1983) a retenu notre attention. Pour ces auteurs, la mise en route d'une culture dépend des conditions de culture (milieu, sérum, facteur de croissance) mais aussi de facteurs précédant le prélèvement des cellules.

Ils ont montré sur les cellules endothéliales humaines un effet du temps entre le prélèvement du cordon ombilical et la mise en culture. Contrairement à toute attente, un délai long (de 5 à 24 h) entre le prélèvement du cordon et l'ensemencement des cellules assure un pourcentage de succès des cultures de cellules endothéliales important.

Afin de vérifier ces observations sur les cellules endothéliales bovines, nous avons effectué au départ de la même aorte des mises en culture 2 heures, 4 heures, 6 heures et 24 heures après la mise à mort de l'animal.

Avant l'expérimentation, les morceaux d'aorte sont conservés dans la solution tampon déjà mentionnée, à 4° C.

Nous ensemençons 2 boîtes pour chaque temps avec le même nombre de cellules par boîte pour toute la série (10^4 cellules / ml)

L'expérience est réalisée deux fois pour les délais de 2, 4 et 6 heures et une fois pour le délai de 24 heures.

Les résultats sont présentés dans le tableau III.

Temps	Observations
2 heures	. plusieurs colonies de cellules polygonales, étroitement accolées. . confluence après 7 jours.
4 heures	. même morphologie. . confluence après 7 jours.
6 heures	. même morphologie. . croissance plus lente : confluence après 10 jours.
24 heures	. les cellules n'adhèrent pas au substrat. . croissance nulle.

Tableau III. Effet du temps entre la mise à mort de l'animal et la mise en culture des cellules endothéliales.

Nous pouvons tirer de ces observations deux conclusions.

1° Un délai de 2 heures paraît compatible avec la mise en culture des cellules endothéliales bovines. En effet, nous constatons qu'après un délai de 4 et 6 heures, la croissance et la morphologie cellulaire sont semblables. Nous ne pouvons cependant exclure ce facteur temps pour expliquer les altérations observées dans certaines cultures.

2° Nous ne sommes pas en mesure de confirmer les travaux de Balconi and al. dans le cas des cellules endothéliales bovines. Le rendement de nos cultures diminue après 6 heures, il est nul après 24 heures.

Deux paramètres pourraient être à l'origine de cette divergence des résultats.

- soit une variation interspécifique.

Ces variations sont décrites. Par exemple, la survie des cellules endothéliales bovines semble supérieure à celle des cellules endothéliales du cordon ombilical humain (Longenecker and al. , 1983 ; Gordon and al. , 1983)

La réponse de ces cellules à l'"epidermal growth factor" (EGF), nous fournit un autre exemple.

EGF stimule la croissance des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine, il n'agit pas sur celle des cellules endothéliales bovines.

Des études de "binding" montrent l'absence de récepteurs vis-à-vis de EGF pour les cellules endothéliales bovines (Gospodarowicz and al. , 1978 a).

- soit l'origine des cellules : foetale ou adulte.

Gospodarowicz and al., (1978 b), lorsqu'ils testaient l'effet mitogénique du FGF sur des cellules endothéliales bovines, n'ont observé aucune différence en ce qui concerne le comportement et la croissance de ces cultures, pour des cellules endothéliales provenant de territoires vasculaires aussi différents que le coeur, l'aorte et la veine ombilicale. Ils signalent néanmoins une différence entre les cellules endothéliales adultes et foetales en ce sens qu'avec FGF, les cellules d'origine foetale, à l'opposé des cellules d'origine adulte, continuent à proliférer après la confluence.

Cependant, il faut observer que les résultats obtenus par différents auteurs proviennent, en général, d'expériences réalisées dans des conditions fort différentes parfois (milieux, sérums, etc..) et que nous ne pouvons tirer des conclusions de façon formelle de la comparaison de leurs observations.

De plus, nos résultats allant dans le sens qui nous était le plus favorable (plus de cellules en moins de temps), nous n'avons pas répété l'expérience plus de deux fois.

B. Caractérisation des cellules endothéliales bovines

1. Microscopie en contraste de phase

Les cellules sont observées régulièrement, tous les 2 ou 3 jours, à partir de la mise en culture jusque la confluence.

Lors de l'ensemencement, deux possibilités se présentent: soit les cellules sont assemblées en amas d'environ 10 - 20 cellules, soit elles sont isolées.

Les cellules isolées possèdent de fins prolongements cytoplasmiques dans toutes les directions. Le départ de la croissance semble être plus lent dans ce cas.

Par contre, à partir des amas cellulaires, les processus de croissance démarrent de suite. La colonie cellulaire s'accroît de façon radiaire, les cellules proches du centre sont légèrement fusiformes avec un noyau ovale et une fine bordure cytoplasmique.

Ensuite, les cellules prennent un aspect polygonal avec le noyau central contenant 2 à 4 nucléoles nettement visibles.

Comme les cellules isolées, les cellules en périphérie des colonies possèdent des prolongements cytoplasmiques. Ces cellules se divisent abondamment, nous observons fréquemment la séparation de cellules-filles.

Au fur et à mesure de la croissance, les diverses colonies d'une boîte se rapprochent pour atteindre la confluence après 7 à 12 jours. Le temps mis pour atteindre la confluence étant influencé par le nombre de cellules au départ, ces valeurs ne peuvent être comparées d'une expérience à l'autre.

Le nombre de cellules ensemencées dans une culture varie selon les besoins, il est cependant identique pour les boîtes d'une même expérience.

La disposition en une monocouche régulière est une caractéristique des cellules endothéliales en culture (fig. 4, 5, 6, 14 et 15). Mais nous observons aussi des cellules un peu en fuseau disposées soit en faisceaux soit en tourbillons. Elles forment dans le tapis cellulaire des zones moins homogènes (fig. 5 et 7).

Les dimensions cellulaires sont comprises entre $20 \times 30 \mu\text{m}$ et $40 \times 50 \mu\text{m}$.

Nous estimons la densité cellulaire à confluence par comptage en chambre de Burker.

Les valeurs sont comprises entre $1.5 \cdot 10^5$ et $2.5 \cdot 10^5$ cellules / cm^2 .

Après quelques jours de culture, nous observons dans certaines cellules polygonales la présence de granulations denses généralement périnucléaires ainsi que des vésicules claires (fig. 5 et 9).

Ces cellules ne sont pas localisées à un endroit particulier de l'amas cellulaire en croissance.

Nous ne pouvons généraliser ces observations, certaines cellules conservent un cytoplasme homogène, d'autres par contre contiennent un plus grand nombre de vésicules claires.

Deux séries furent suivies régulièrement, l'une pendant 40 jours (4 repiquages) et l'autre durant 77 jours (7 repiquages).

. La monocouche régulière de cellules polygonales est conservée au cours du temps. Cependant, avec les repiquages, nous constatons l'apparition de cellules fusiformes plus nombreuses.

. Avec l'augmentation du nombre de jours en culture, nous observons un accroissement de la taille des cellules ou du moins de la surface d'adhésion sur le substrat.

. Nous notons aussi la présence de grandes cellules (fig. 8 et 9). Elles existent en périphérie des colonies et sont bordées de cellules de taille normale.

Elles sont parfois binucléées, le cytoplasme homogène en périphérie contient des granulations et des vésicules claires dans la région périnucléaire.

Remarques

Dans des cultures post-confluentes (12 jours) nous avons pu observer des zones de "sprouting" c'est-à-dire de prolifération cellulaire sous la monocouche (fig. 10).

Ces cellules sont plus allongées, elles se rejoignent au niveau des prolongements cytoplasmiques.

En début de culture, nous remarquons la présence de cellules dont le cytoplasme est entièrement rempli de vésicules sombres (fig. 11). Ces cellules, polygonales ou plus ovales, sont groupées par 2 - 3 jusque une dizaine par boîte.

Elles ne semblent pas se diviser.

Dans certaines cultures, ces cellules disparaissent après 5 - 6 jours. On peut en retrouver après l'un ou l'autre repiquage.

L'Oil Red O colore les lipides hydrophobes en rouge. L'utilisation de cette technique nous permet de révéler la présence de vésicules lipidiques dans l'entièreté du cytoplasme de certaines cellules (fig. 12 et 13).

Nous pensons qu'il pourrait s'agir de cellules semblables à celles contenant des vésicules sombres.

Cependant, l'absence d'investigations en cette matière sur les cellules avec des vésicules claires ne permet aucune affirmation.

Planche III

Fig. 4 Monocouche confluyente de cellules endothéliales en première culture.

Noter la régularité du tapis cellulaire.

Contraste de phase x 330.

Fig. 5 Monocouche confluyente de cellules endothéliales en première culture.

Des cellules en fuseau forment une zone moins régulière.

Noter la présence de granulations denses et de vésicules claires dans certaines cellules.

Contraste de phase x 330.

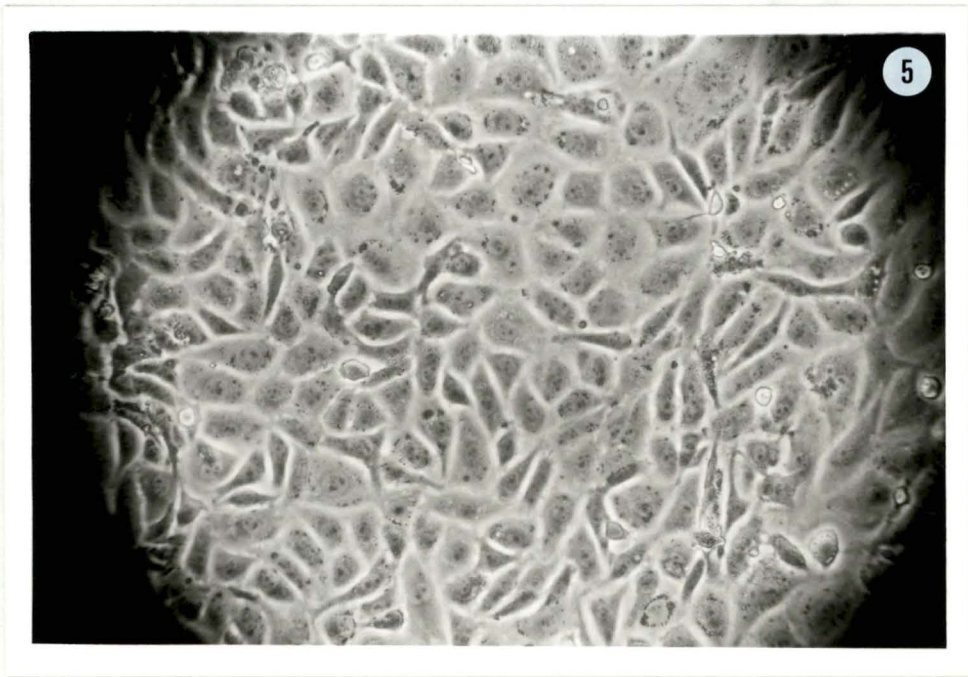
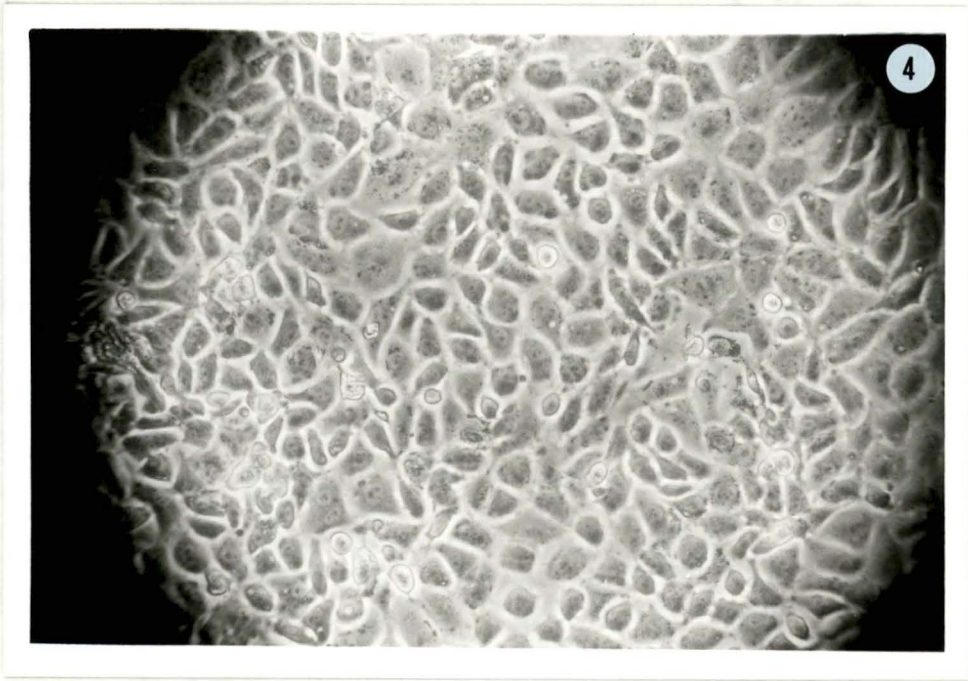


Planche IV

Fig. 6 Monocouche confluyente de cellules endothéliales en première culture.

Noter la forme polygonale de ces cellules et la présence du noyau en position centrale.

Contraste de phase x 660.

Fig. 7 Cellules endothéliales disposées en faisceau dans une première culture confluyente.

Contraste de phase x 660.

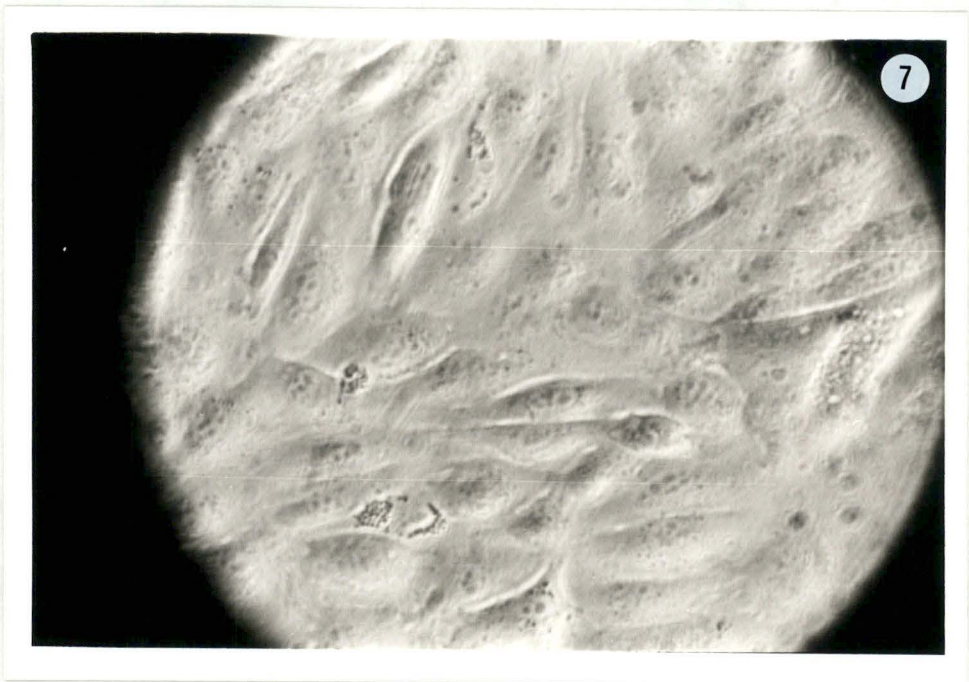
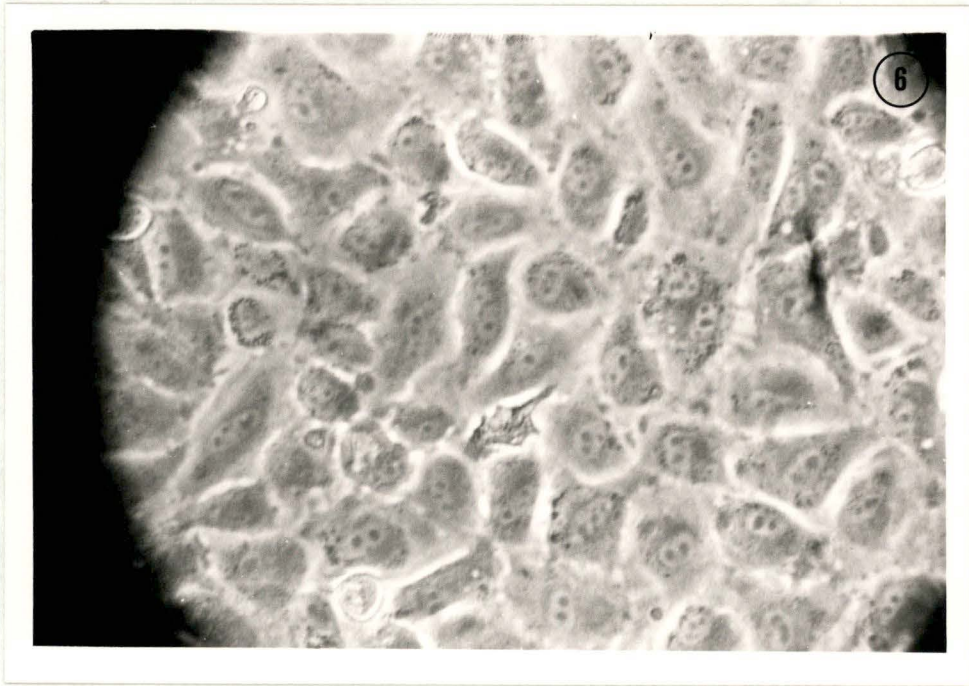


Planche V

Fig. 8 Grande cellule binucléée dans une culture confluyente de cellules endothéliales (troisième repiquage).
Noter l'accumulation de vésicules claires dans une cellule polygonale (tête de flèche).
Contraste de phase x 660.

Fig. 9 Grandes cellules dans une culture confluyente de cellules endothéliales (troisième repiquage).
Elles possèdent 1 ou 2 noyaux et un cytoplasme assez homogène.
Contraste de phase x 660.

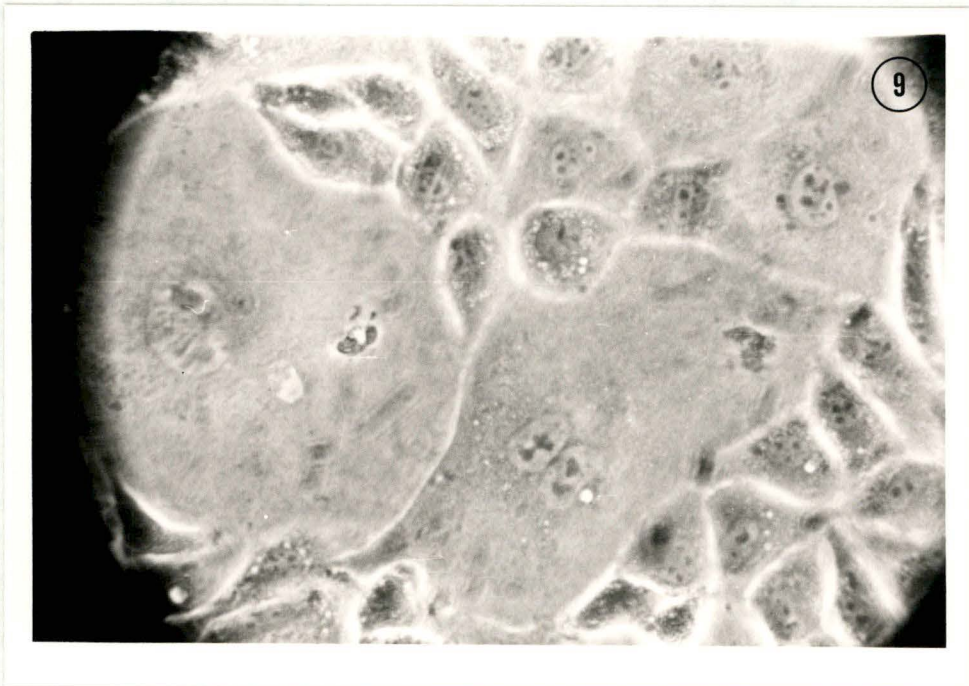


Planche VI

Fig. 10 Prolifération cellulaire sous la monocouche d'une culture post-confluente (13 jours) de cellules endothéliales (troisième repiquage).

Noter les contacts entre les prolongements cytoplasmiques de ces cellules.

Contraste de phase x 660.

Fig. 11 Cellules dont le cytoplasme est rempli de vésicules sombres dans une première culture de cellules endothéliales. (flèche).

Contraste de phase x 660.

Fig. 12 et 13 Ces cellules provenant d'une première culture de cellules endothéliales contiennent de nombreuses vésicules lipidiques colorées en rouge par un Oil Red O x 760.

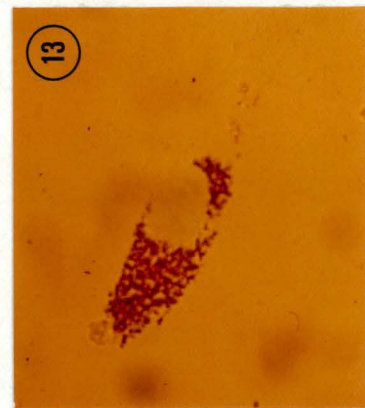
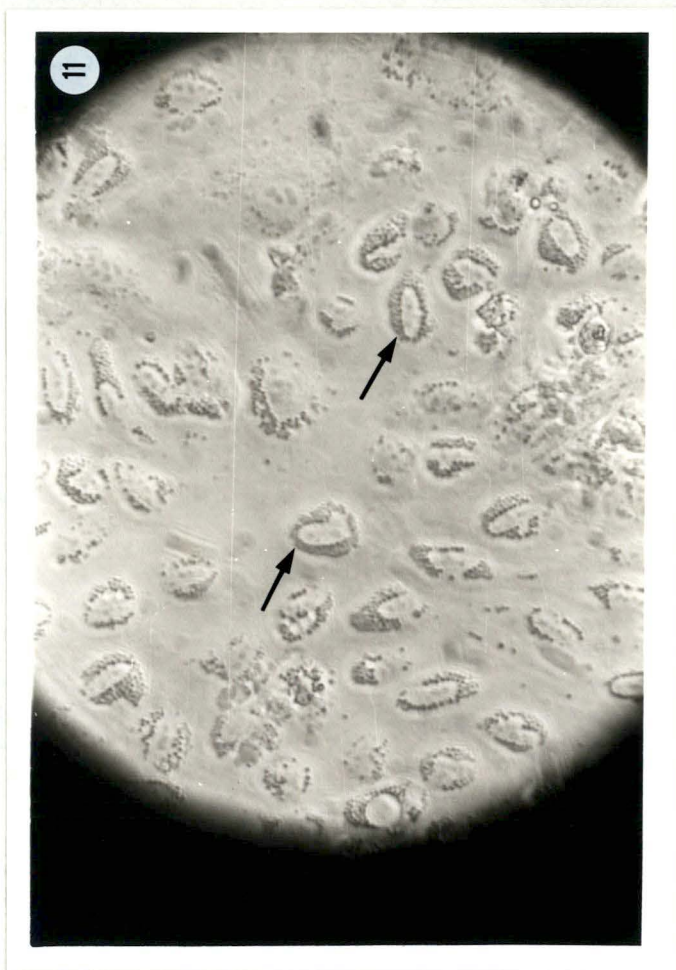
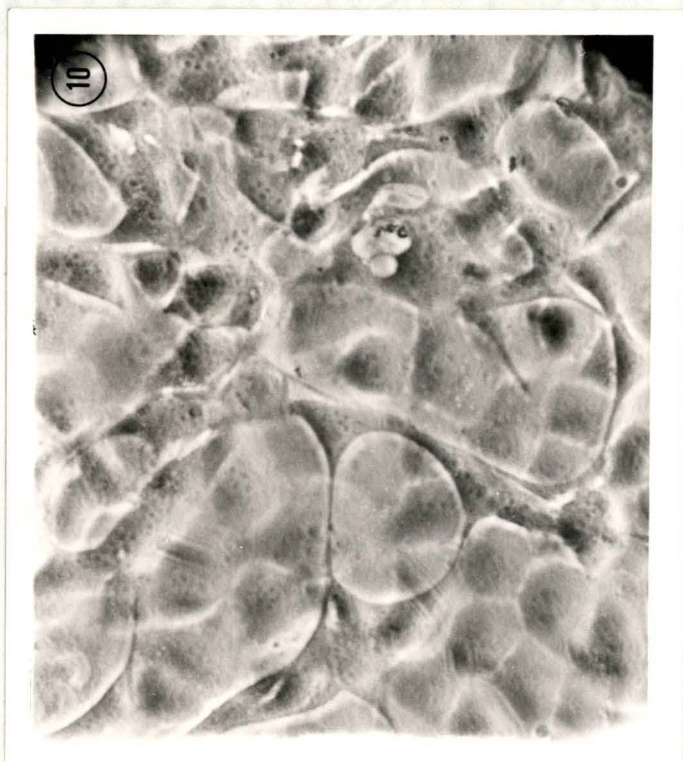


Planche VII

Fig. 14 Monocouche presque confluente de cellules endothéliales en première culture.

Noter la régularité du tapis cellulaire.

Contraste d'interférence x 350.

Fig. 15 Monocouche confluente de cellules endothéliales en première culture.

Noter la présence de grandes cellules et de cellules fusiformes.

Contraste d'interférence x 350.



2. Microscopie électronique à transmission

Les observations en microscopie électronique constituent une part importante dans la caractérisation des cellules endothéliales bovines en culture. La fixation et l'enrobage des cellules a lieu après la confluence.

Nous décrivons en premier lieu l'ultrastructure des cellules les plus représentées pour signaler ensuite certaines variations individuelles. La morphologie générale de ces cellules soit en monocouche soit isolées est montrée en figures 16, 17, 18 et 19.

1° Ultrastructure d'une cellule endothéliale.

. Noyau: généralement ovale, il est situé en position centrale; le nucléoplasme contient 2 à 5 nucléoles et une fine bordure de chromatine périphérique.

. Mitochondries: elles sont nombreuses et réparties dans l'entièreté du cytoplasme (fig. 20).

A l'état orthodoxe, elles peuvent être assez allongées et présenter des crêtes transversales très nettes (fig. 21).

. Réticulum endoplasmique rugueux: il est abondant et réparti dans tout le cytoplasme (fig. 22 et 23).

Les citernes du système canaliculaire contiennent du matériel protéique moyennement dense aux électrons.

. Appareil de Golgi: il est généralement composé d'un seul dictyosome situé dans la région périnucléaire (fig. 24, 25 et 26).

Le dictyosome contient un empilement de 2 à 5 saccules de taille moyenne et assez plats.

Au niveau de la face de maturation, nous observons des vésicules de sécrétion (fig. 25) ainsi que des petites vésicules "coatées" (fig. 24).

Dans la région périnucléaire, nous trouvons également du réticulum endoplasmique lisse et des corps multivésiculaires (fig. 24 et 31).

Nous distinguons trois types de vacuoles dans les cellules endothéliales.

- . des autophagosomes contenant des débris d'éléments du cytoplasme assez denses aux électrons (fig. 32 et 33).
- . des vacuoles contenant des débris peu denses aux électrons en faible quantité (fig. 37).
- . des vacuoles claires (fig. 36).

Une technique cytochimique mettant en évidence la phosphatase acide permet de montrer la fusion de vacuoles contenant des débris peu denses aux électrons avec des lysosomes (fig. 34).

Nous ne possédons aucune indication sur les vacuoles claires.

La périphérie cellulaire comporte de nombreuses vésicules d'endocytose ainsi qu'un cytosquelette important.

Les microtubules sont généralement orientés vers la membrane cellulaire (fig. 40 et 43).

Un réseau de microfilaments fins (6 - 8 mm) borde la membrane plasmique (fig. 39 et 40). Aux endroits de contact entre la cellule et son substrat, la densité des microfilaments augmente.

Dans le cytoplasme, nous observons de nombreux filaments intermédiaires (10 mm) arrangés en faisceaux parallèles ou dispersés librement entre les organites (fig. 41 et 42).

Des corps tubulaires assimilés aux corps de Weibel - Palade ne sont observés que dans 10% des cellules (fig. 28, 29 et 30).

Enfin, notons que dans les cellules fixées en début de croissance, nous observons de nombreux polysomes (fig. 38).

Leur présence peut être mise en rapport avec des synthèses protéiques abondantes à ce stade.

Les cellules endothéliales en culture conservent leur ultrastructure au cours des différents repiquages.

La comparaison entre des cellules en début de culture et des cellules ayant subi 5, 6 et 7 repiquages permet cette affirmation. La grande majorité des cellules examinées présentent un aspect conforme à la description donnée précédemment. Toutefois, nous observons un nombre plus important de cellules vacuolisées dans les cultures plus âgées.

2° Variations individuelles

. Certaines cellules possèdent un appareil de Golgi très développé. Plusieurs dictyosomes avec des saccules longs et assez dilatés se situent dans la même région du cytoplasme (fig. 27). De nombreuses vésicules s'associent à ces structures.

Des corps de Weibel - Palade sont fréquemment observés à proximité de ces dictyosomes.

. D'autres cellules contiennent de nombreuses vésicules claires. Celles-ci, déjà observées en microscopie à contraste de phase peuvent fusionner en vacuoles plus grandes.

. Nous remarquons également l'accumulation dans le cytoplasme de certaines cellules de filaments intermédiaires disposés parallèlement en une sorte de faisceau (fig. 42).

. L'ultrastructure des grandes cellules observées dans nos cultures est similaire à celle des cellules endothéliales de taille normale. Elles contiennent, outre les organites cités précédemment, un nombre plus grand de vacuoles d'autophagie ainsi que des zones importantes de filaments intermédiaires (fig. 44, 45 et 46).

Planche VIII

Fig. 16 Coupe longitudinale dans une monocouche confluyente de cellules endothéliales provenant d'une première culture.

D'importantes zones de contact existent entre les cellules voisines (flèche).

N : noyau.

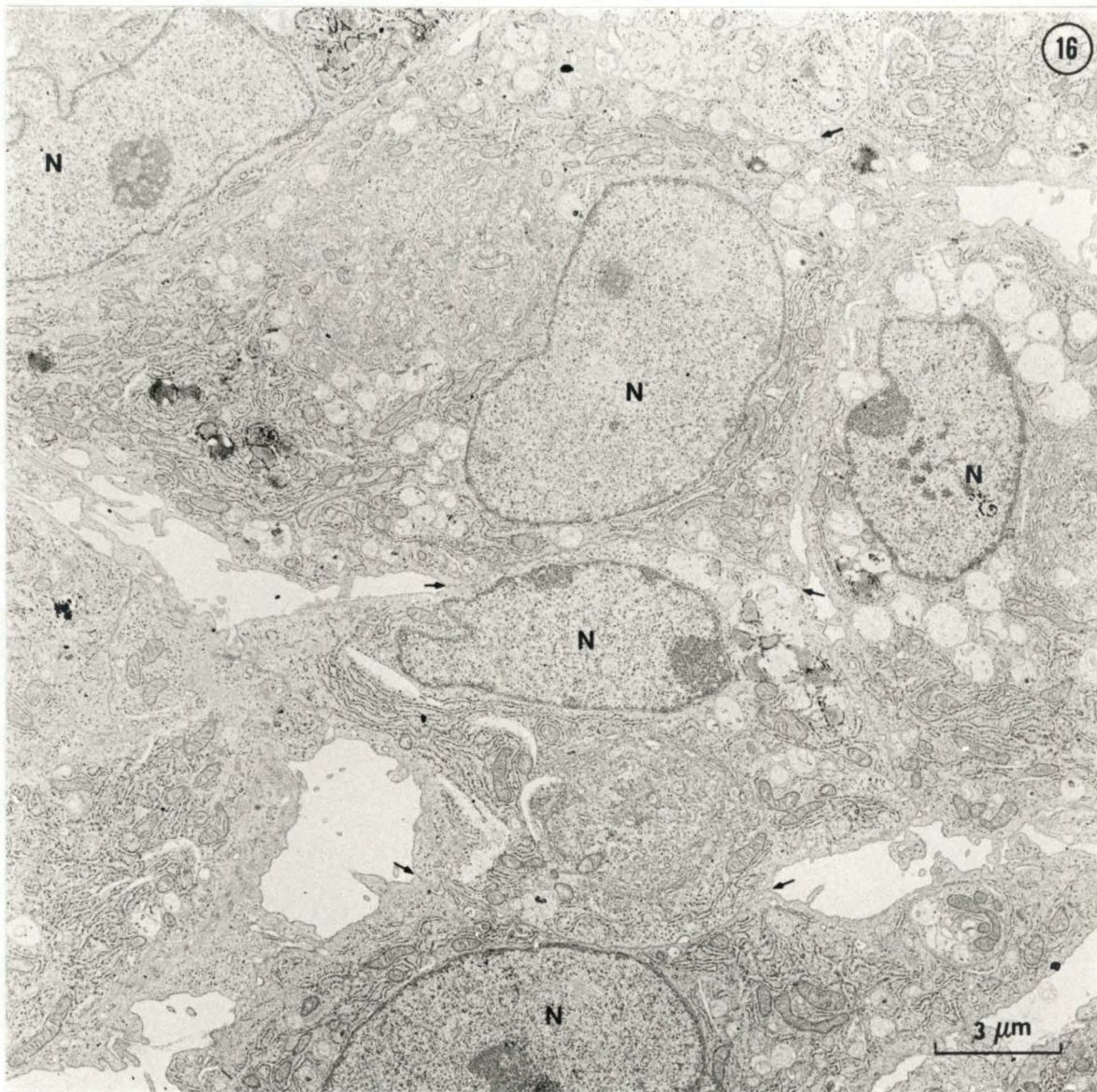


Planche IX

Fig. 17 Aspect général d'une cellule endothéliale provenant d'une première culture (8 jours).

N : noyau.

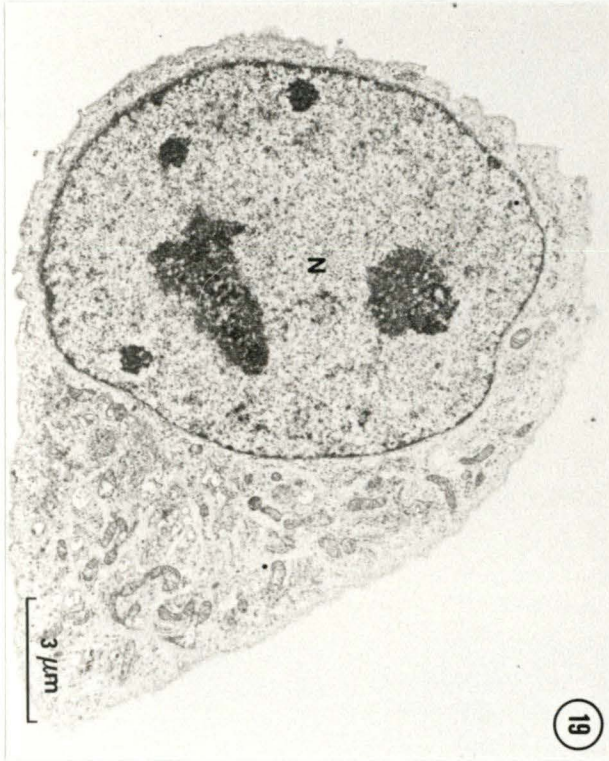
Fig. 18 Aspect général d'une cellule endothéliale provenant d'une culture de 50 jours (4 repiquages).

Noter la présence de prolongements cytoplasmiques dirigés vers une cellule proche (flèche).

N : noyau.

Fig. 19 Aspect général d'une cellule endothéliale provenant d'une culture de 70 jours (6 repiquages).

N : noyau.



19



18



17

Planche X

Fig. 20 Coupe dans une cellule endothéliale provenant d'une première culture.

Cette micrographie illustre la répartition cytoplasmique des mitochondries (M).

N : noyau

G : dictyosomes de l'appareil de Golgi.

Fig. 21 Nous distinguons sur cette coupe de mitochondrie (M):
la membrane externe (me), la membrane interne (mi) dont les replis forment des crêtes (flèche) et la matrice (ma).
Dans cette portion de cellule endothéliale, nous notons également la présence d'une vacuole avec des débris peu denses aux électrons (Vd) ainsi que 2 vésicules lipidiques.
(Li).

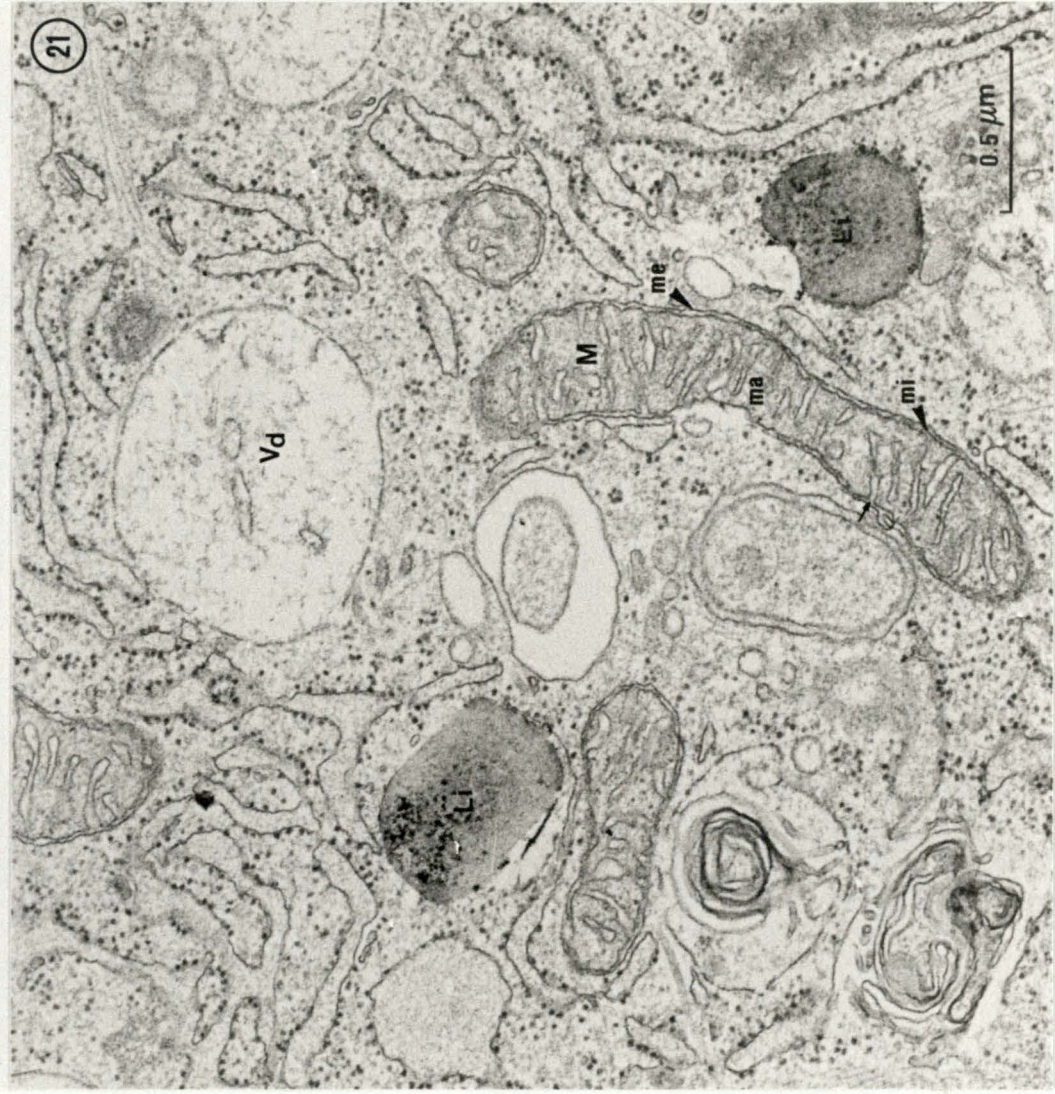


Planche XI

Fig. 22 Coupe dans une cellule endothéliale provenant d'une première culture illustrant la répartition en reticulum endoplasmique rugueux (RER).

N : noyau.

M : mitochondrie.

Fig. 23 Citernes du reticulum endoplasmique rugueux dans une cellule endothéliale provenant d'une première culture.

N : noyau.

G : dictyosomes de l'appareil de Golgi.

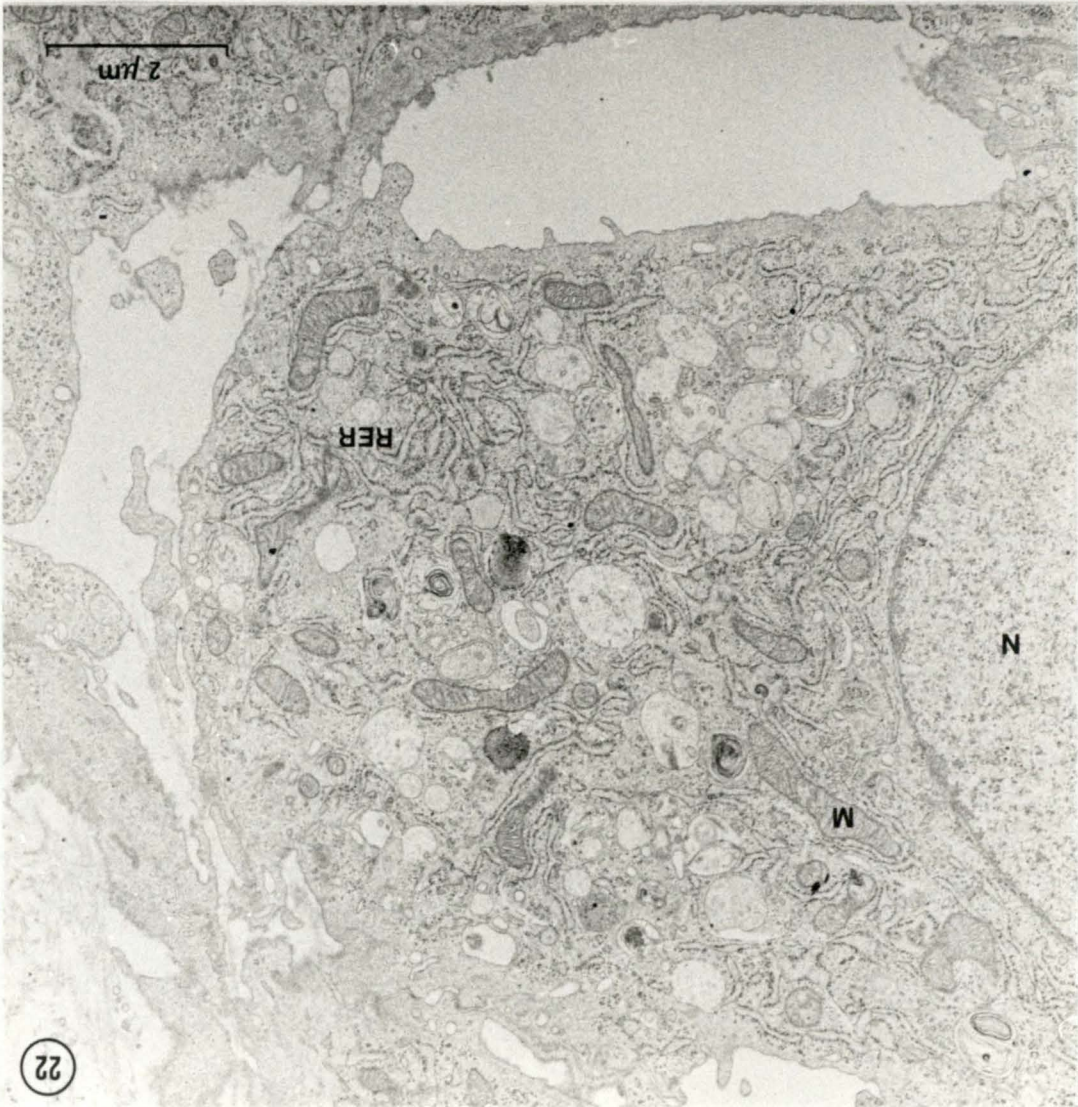
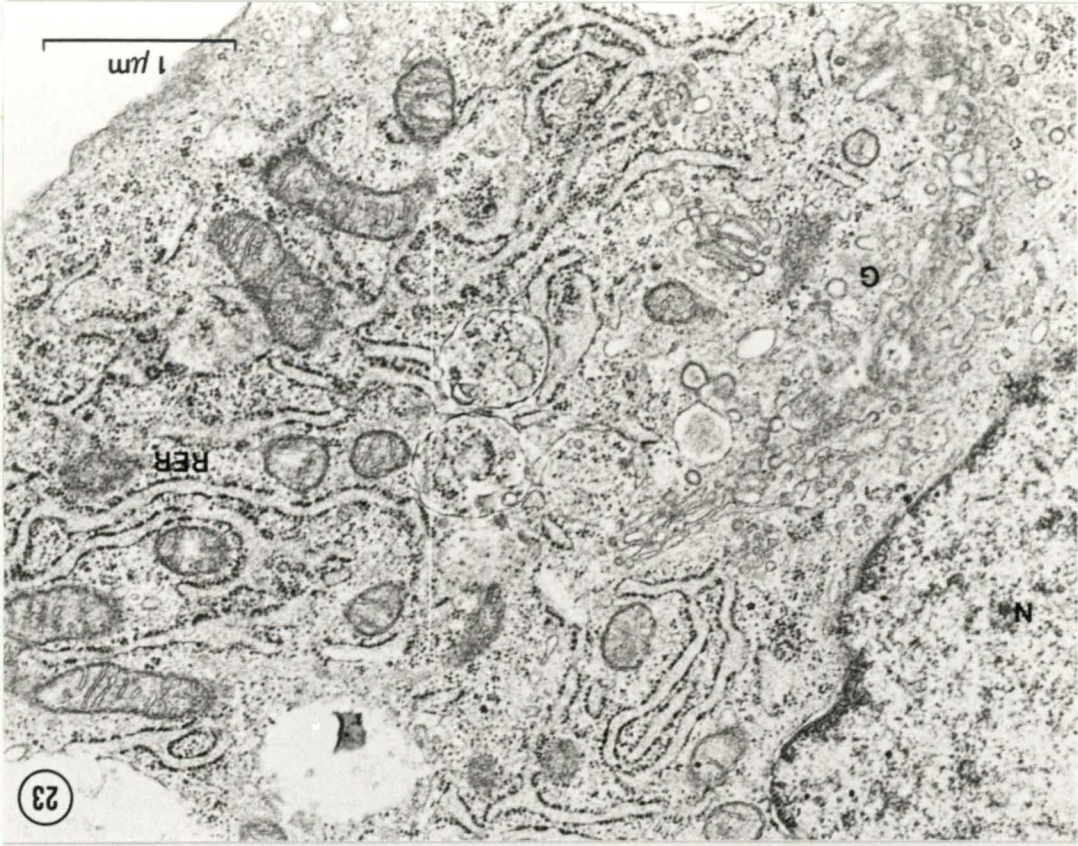


Planche XII

Fig. 24 Coupe dans une cellule endothéliale provenant d'une première culture. Cette micrographie nous montre un dictyosome de l'appareil de Golgi (G), composé d'un ensemble de 3 à 5 saccules, situé dans la région périnucléaire. Nous remarquons plusieurs vésicules "coatées" (flèche) à proximité des saccules ainsi que la présence de corps multi-vésiculaires (tête de flèche) dans cette portion du cytoplasme. N : noyau.

Fig. 25 Dictyosome de l'appareil de Golgi (G) dans une cellule endothéliale provenant d'une première culture. Des vésicules de sécrétion sont présentes à la face de maturation (flèche). N : noyau.

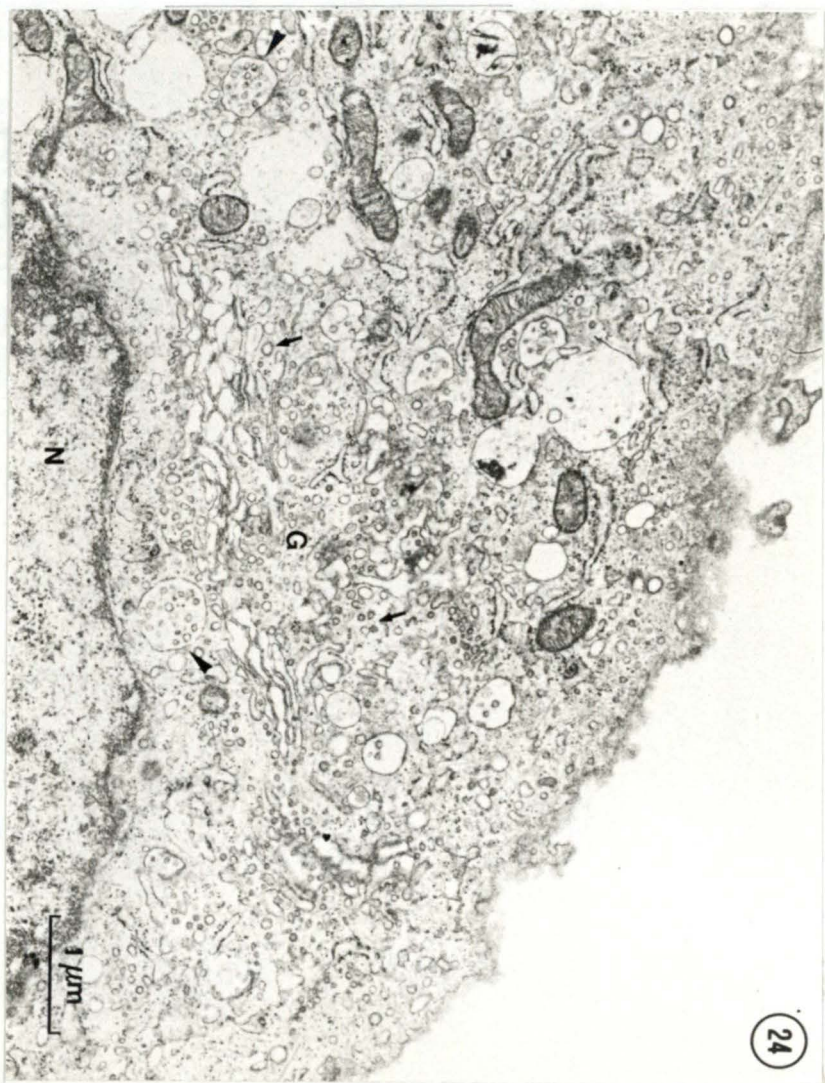


Planche XIII

Fig. 26 Coupe dans une cellule endothéliale provenant d'une première culture illustrant à nouveau les saccules de l'appareil de Golgi (G) situé à proximité du noyau (N).

Fig. 27 Coupe dans une cellule endothéliale provenant d'une culture de 40 jours (3 repiquages).

Cette portion du cytoplasme contient plusieurs dictyosomes bien développés (flèche).

Noter la présence de nombreux corps de Weibel-Palade, organites spécifiques des cellules endothéliales (tête de flèche).

N : noyau.

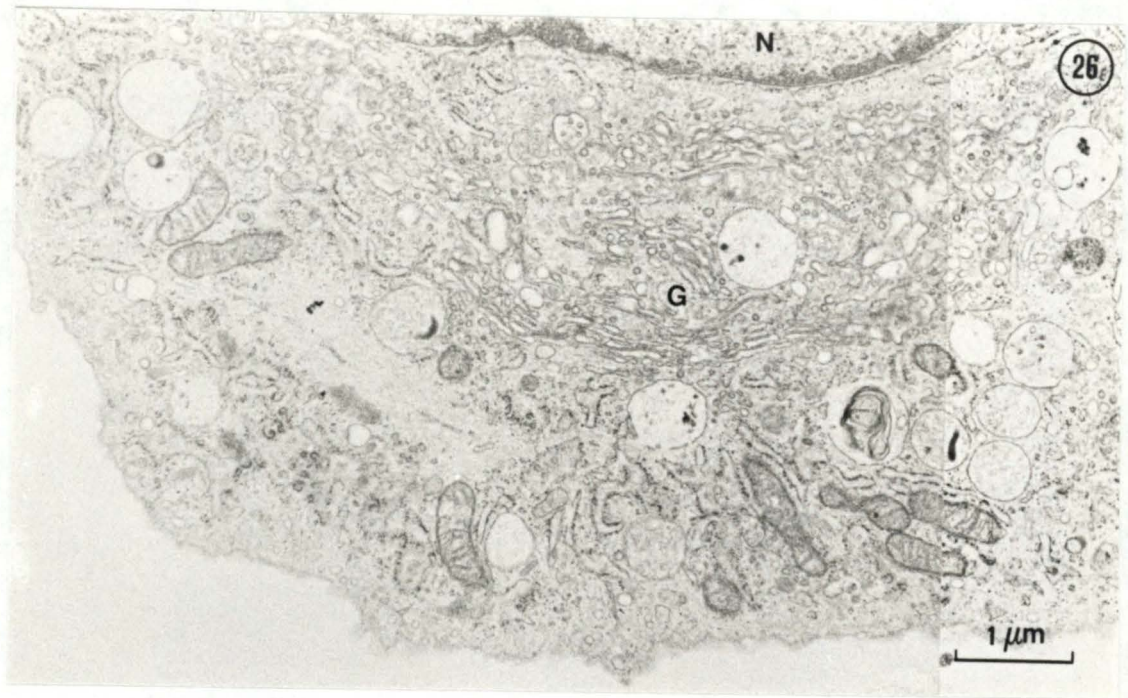


Planche XIV

Fig. 28 et 29 Agrandissement des corps de Weibel - Palade de la figure 27 (WPB).

Ces corps tubulaires sont limités par une membrane unique, ils sont allongés et denses aux électrons.

Les flèches signalent la présence d'un "coat" à l'extrémité de cette structure ainsi que la fusion probable avec une vésicule "coatée".

Fig. 30 Coupe dans une cellule endothéliale provenant d'une première culture.

Cette portion cytoplasmique contient plusieurs corps de Weibel - Palade (WPB) en section longitudinale (flèche) et transversale (tête de flèche).

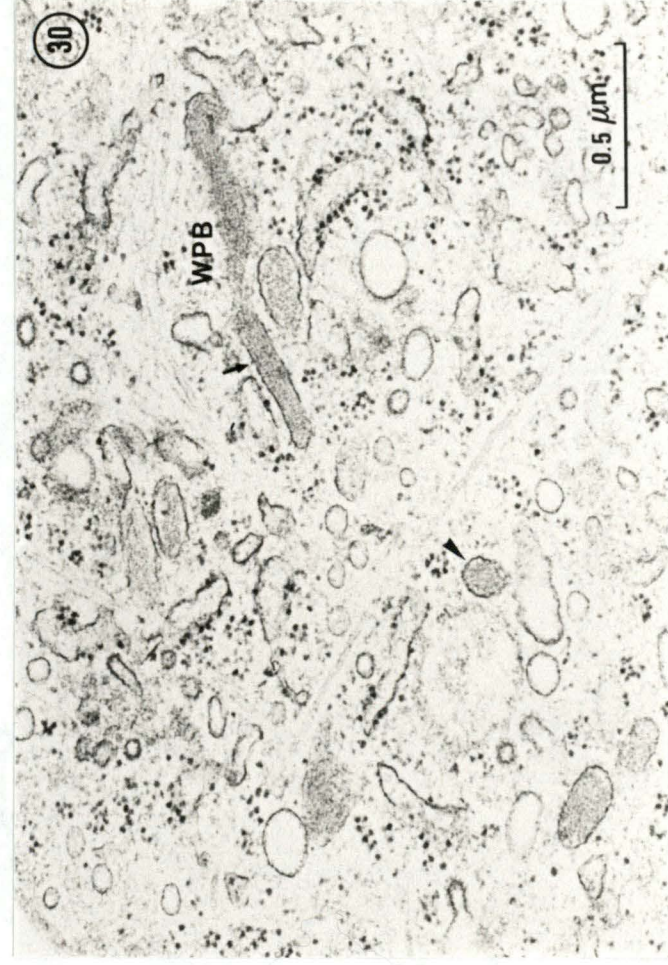
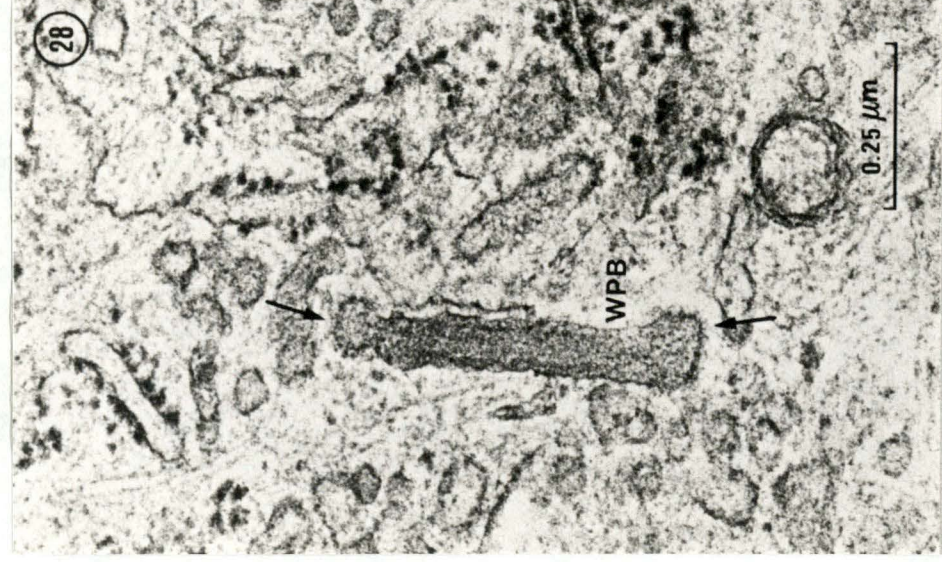


Planche XV

Fig. 31 Détail d'un corps multivésiculaire (Cmv).

Noter la présence de petites vésicules "coatées" (tête de flèche) dans la structure et à l'extérieur à proximité de sa membrane.

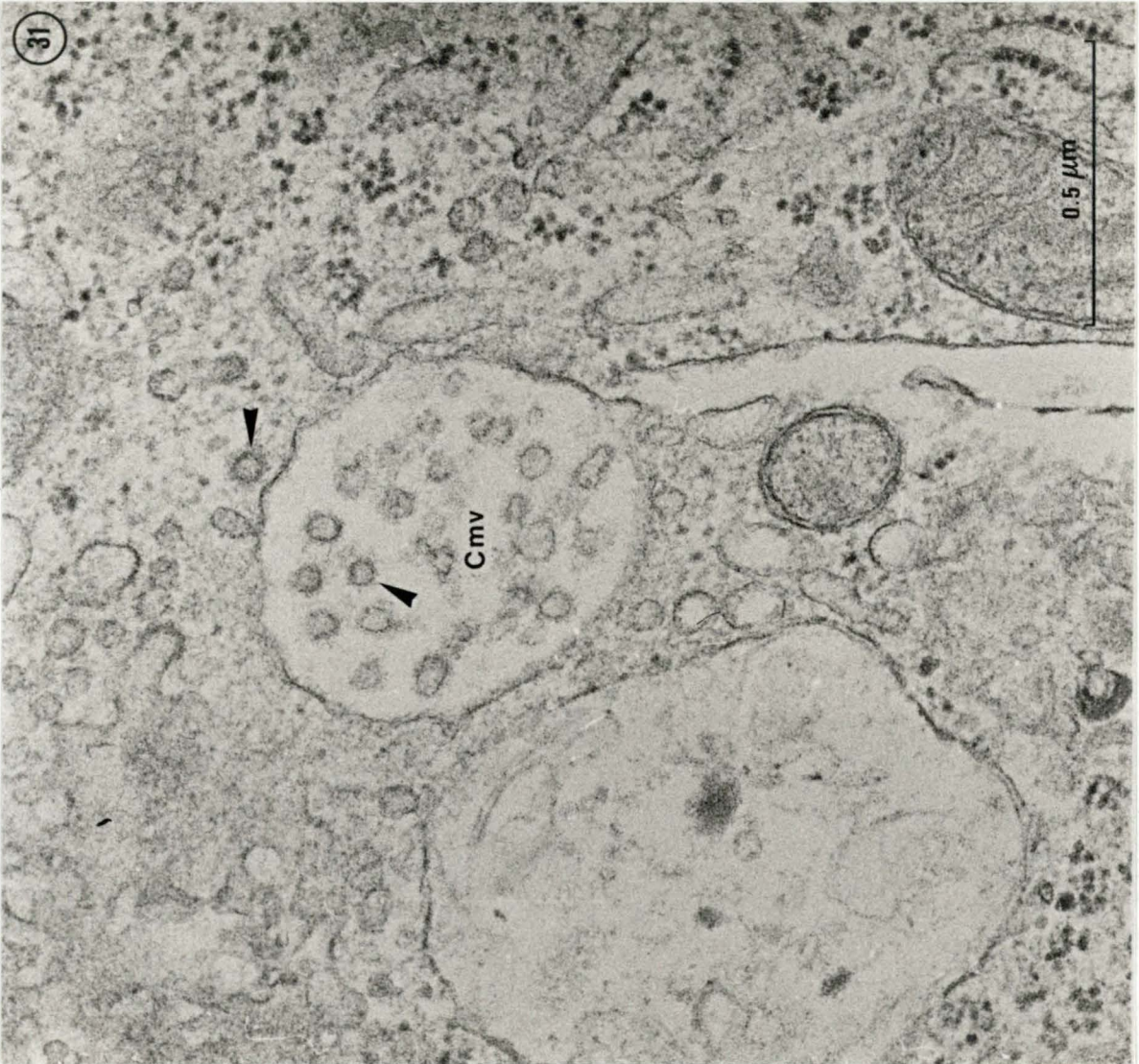


Planche XVI

Fig. 32 Coupe dans une cellule endothéliale provenant d'une culture de 25 jours (2 repiquages).

Cette portion du cytoplasme contient plusieurs autophagosomes (Va) dans lesquels on distingue des débris de mitochondries et de réticulum.

N : noyau.

Fig. 33 Autophagosomes (Va) dans une cellule endothéliale provenant d'une première culture.

Noter la présence d'un début d'enroulement myélinique (tête de flèche).

N : noyau.

G : dictyosome de l'appareil de Golgi.

Fig. 34 Cytochimie mettant en évidence la phosphatase acide dans des vacuoles contenant du matériel peu dense aux électrons (flèche).

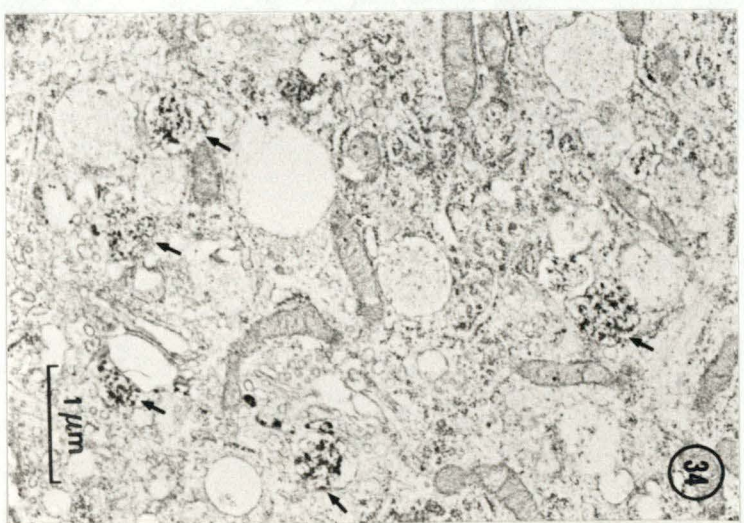
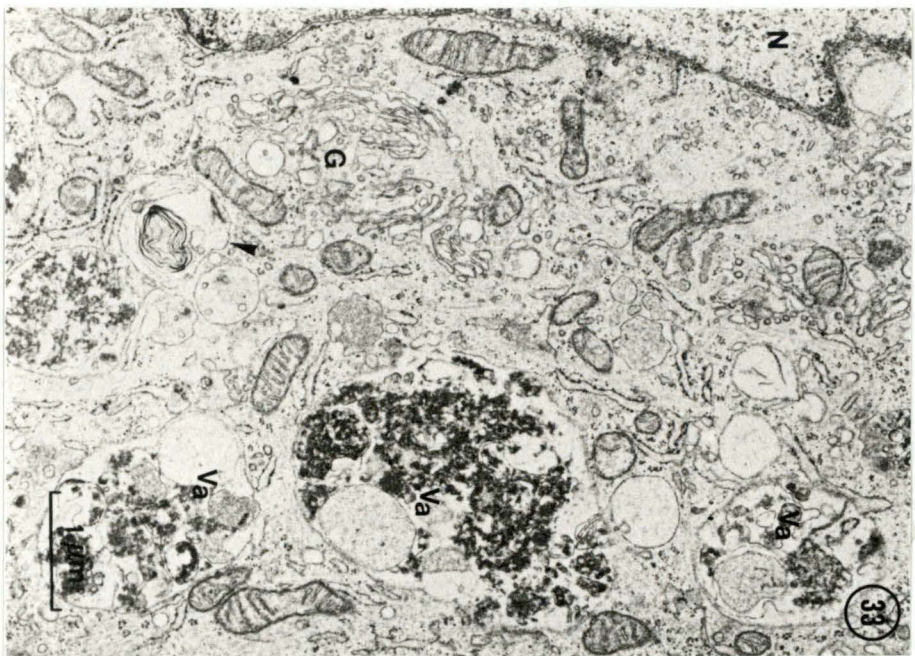


Planche XVII

Fig. 35 Aspect général de cellules endothéliales provenant d'une culture de 28 jours (2 repiquages). Les vacuoles, plus abondantes dans une cellule, se localisent aux pôles cellulaires.

N : noyau.

Fig. 36 Vacuoles claires (Vc) et vacuoles contenant du matériel peu dense aux électrons (Vd) dans une cellule endothéliale provenant d'une culture de 67 jours (6 repiquages).

Fig. 37 Vacuoles contenant du matériel peu dense aux électrons (Vd) dans une cellule endothéliale provenant d'une culture de 16 jours (1 repiquage).

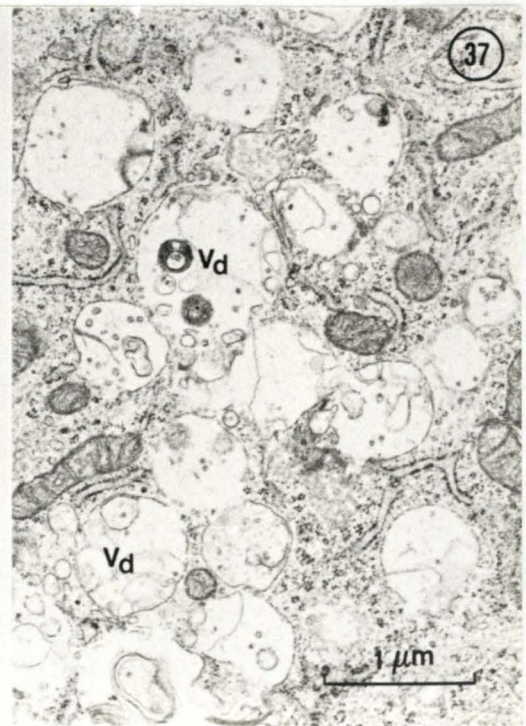
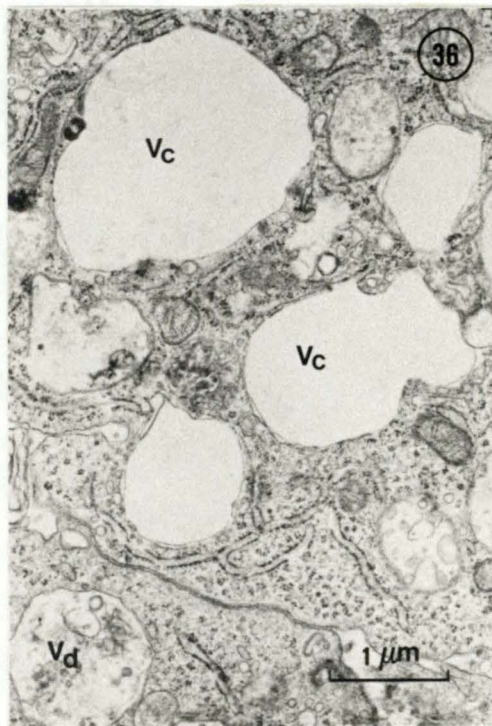


Planche XVIII

Fig. 38 Nombreux polysomes (P) dans une cellule endothéliale provenant d'une culture fixée au cours de la phase de croissance.

M : mitochondrie.

Cmv : corps multivésiculaire.

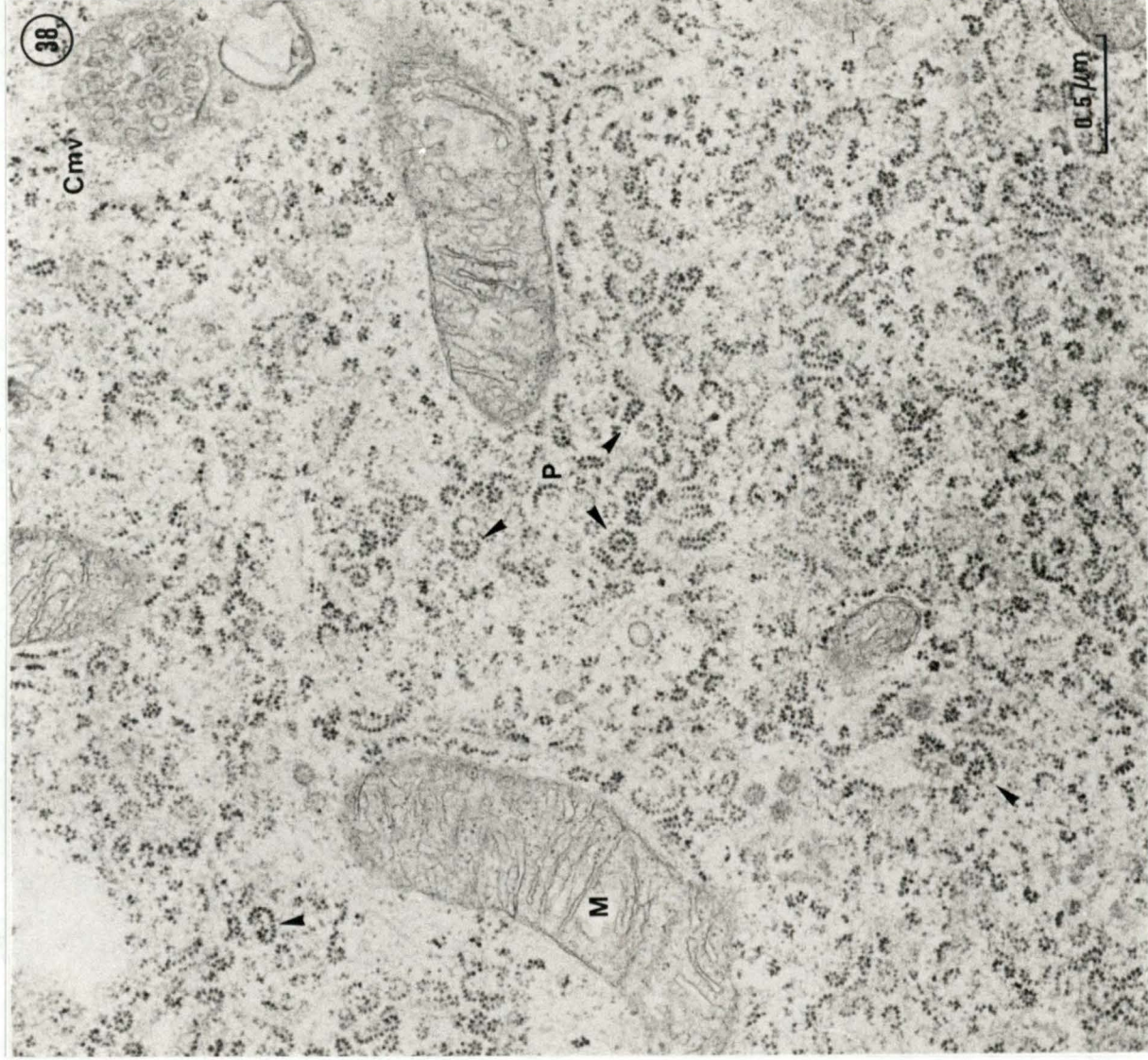


Planche XIX

Fig. 39 Faisceaux de microfilaments fins (ff) dans une cellule endothéliale provenant d'une culture de 56 jours (5 repiquages). Ils sont situés en périphérie de la cellule et orientés parallèlement à l'axe du prolongement. Noter la présence de microtubules (mt) et d'un matériel extracellulaire fibrillaire (Me).

Fig. 40 Dans cette cellule endothéliale provenant d'une première culture, les faisceaux de microfilaments fins (ff) sont situés en périphérie cellulaire et aux endroits de contact de la cellule avec son substrat. Les microtubules (mt) sont orientés vers la membrane. Noter la présence d'un matériel extracellulaire fibrillaire (Me).

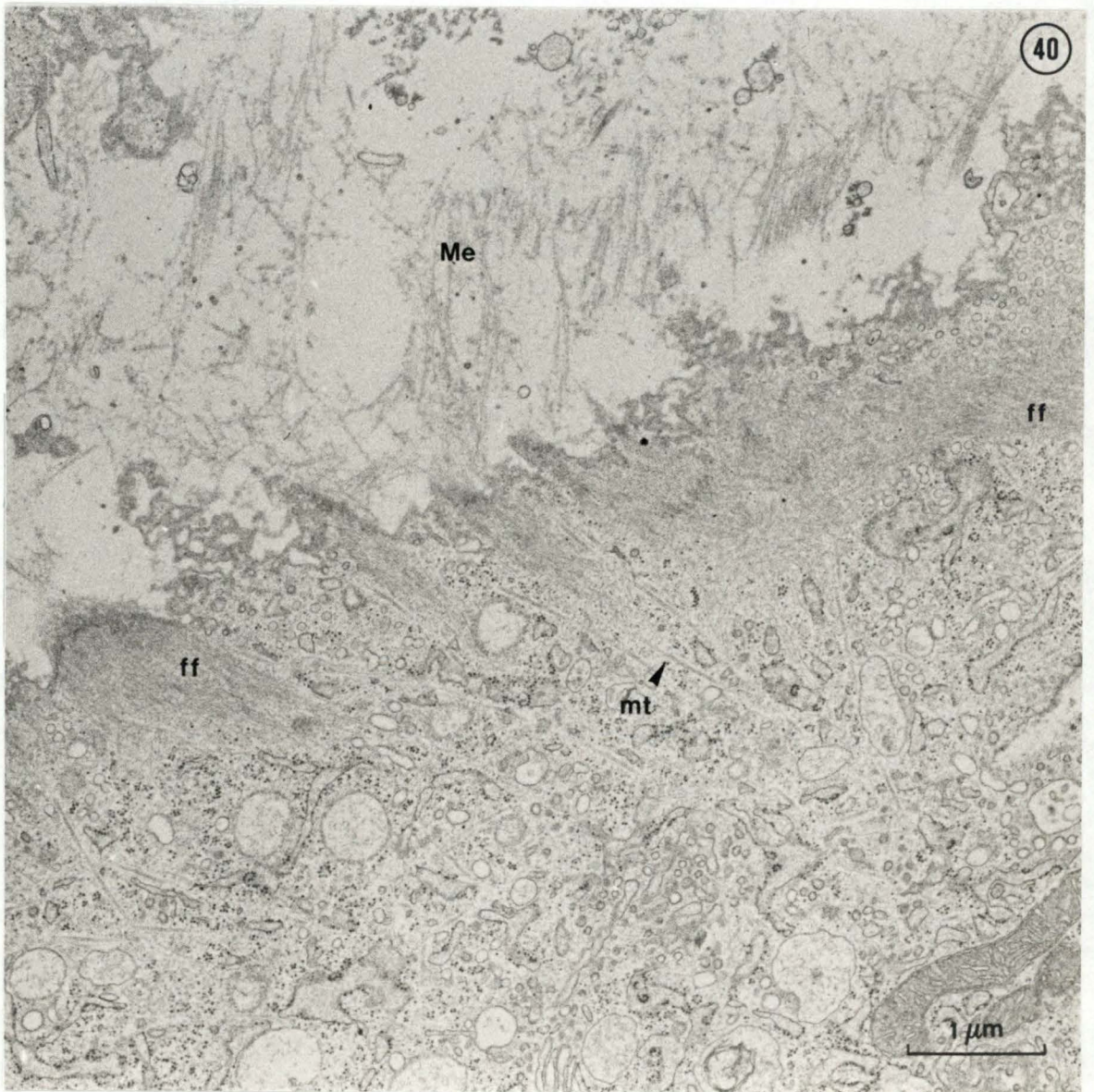
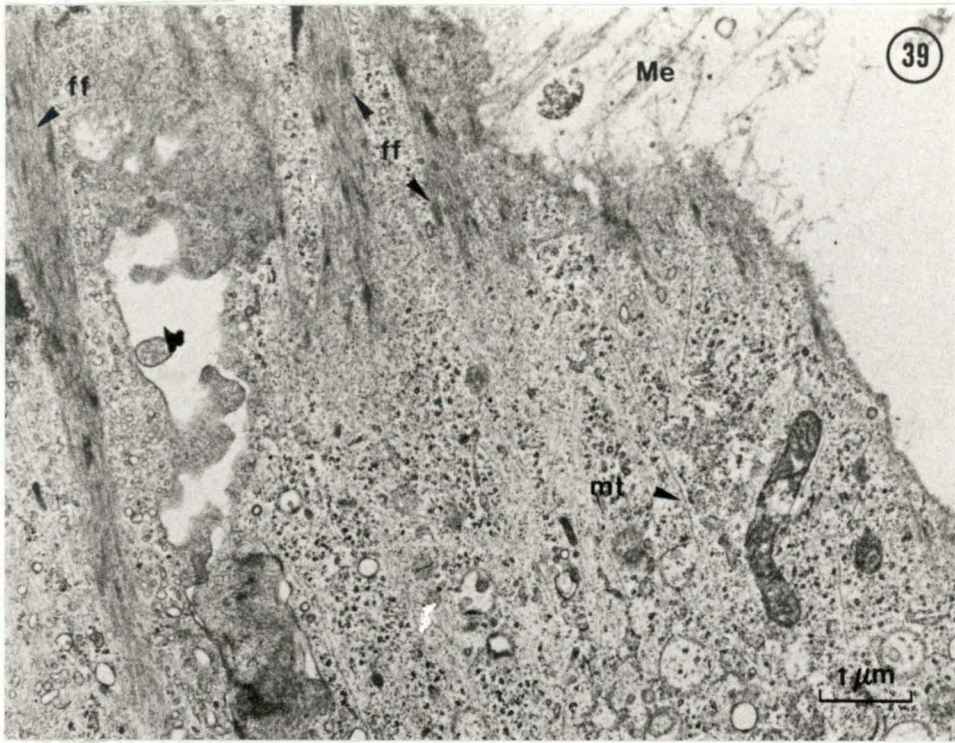


Planche XX

Fig. 41 Filaments intermédiaires (fi) dispersés dans le cytoplasme d'une cellule endothéliale provenant d'une culture de 67 jours (6 repiquages).

M : mitochondrie.

Fig. 42 Filaments intermédiaires (fi) assemblés parallèlement en une sorte de faisceau dans une cellule endothéliale provenant d'une première culture.

Fig. 43 Nombreux microtubules (mt) présents dans le cytoplasme d'une cellule endothéliale provenant d'une culture de 56 jours (5 repiquages).

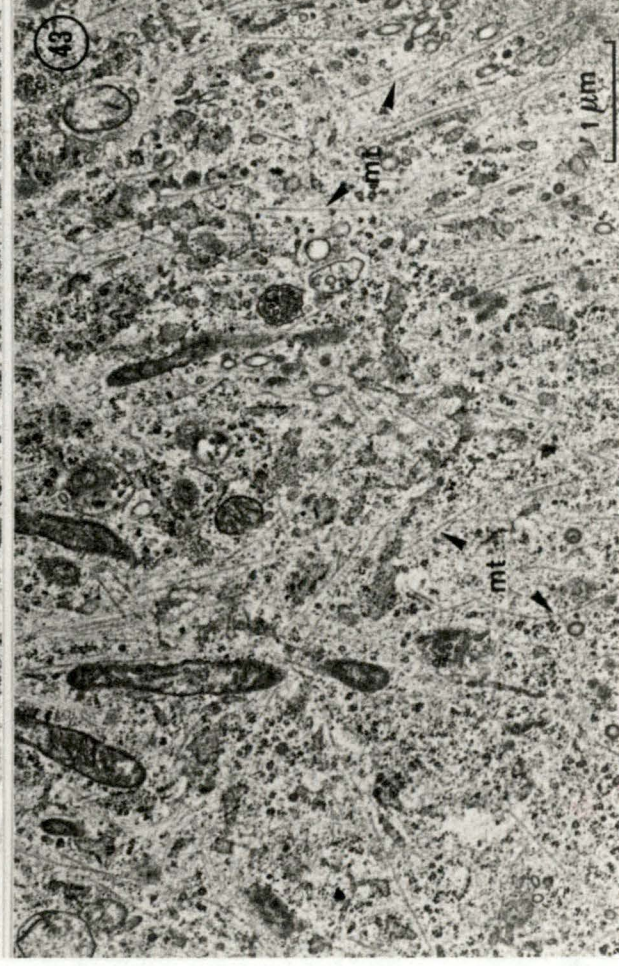
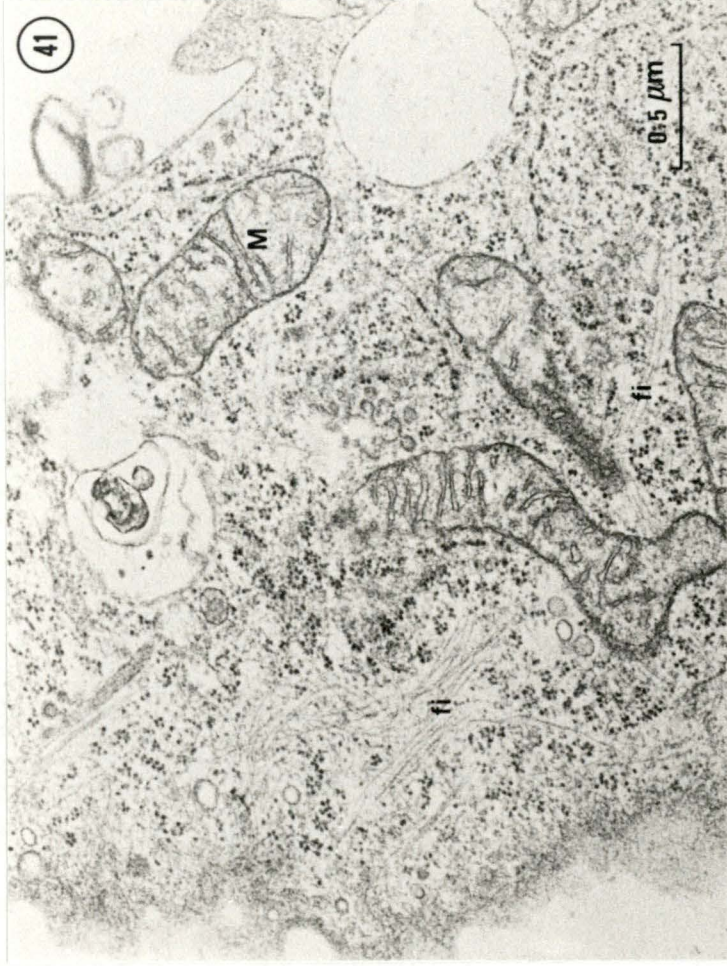


Planche XXI

Fig. 44 Aspect général d'une grande cellule observée dans une culture de cellules endothéliales (2 repiquages).

N : noyau

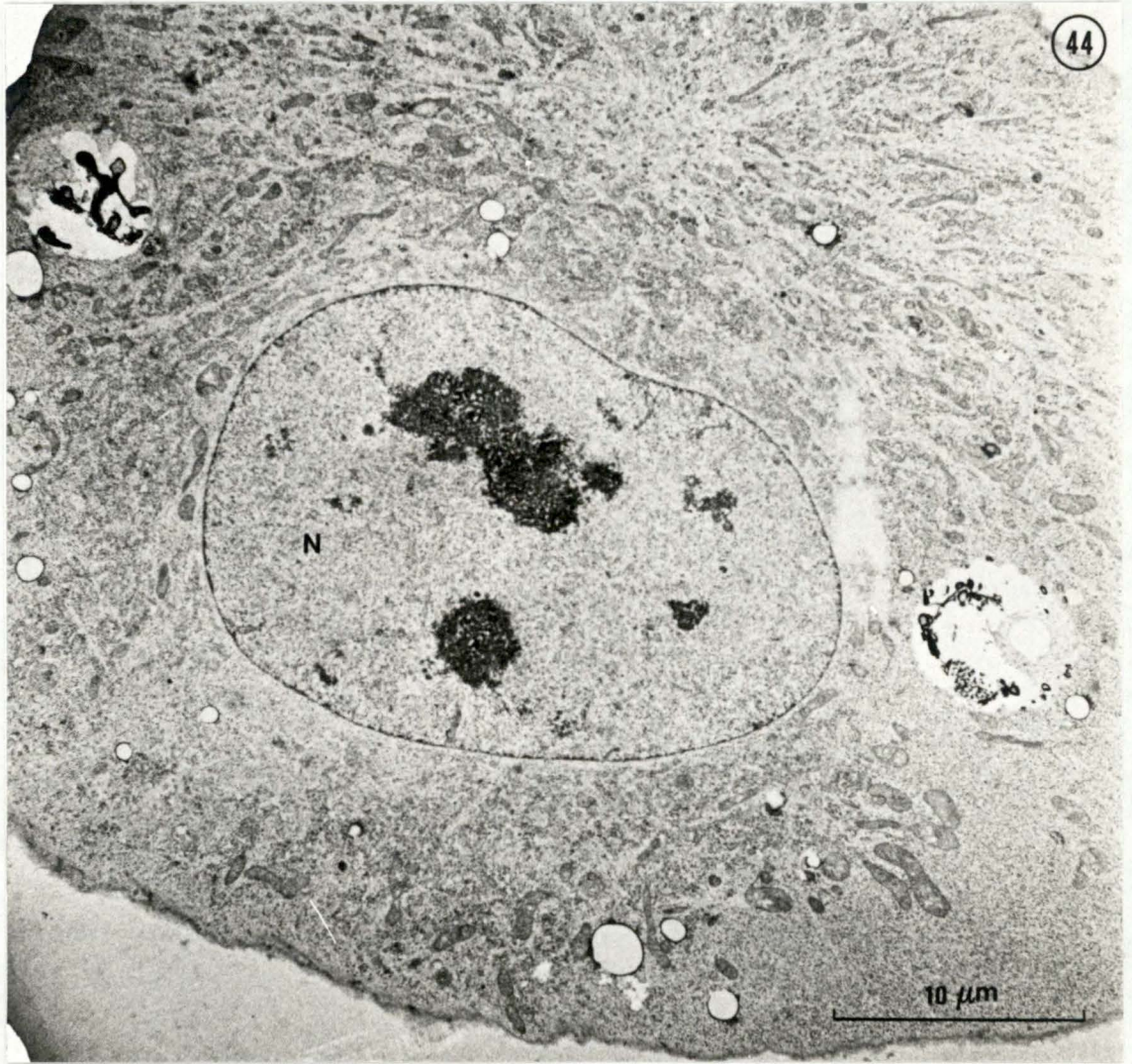


Planche XXII

Fig. 45 Portion du cytoplasme d'une grande cellule provenant d'une première culture de cellules endothéliales.

Noter la présence de nombreuses vacuoles contenant des débris (Vd).

M : mitochondrie.

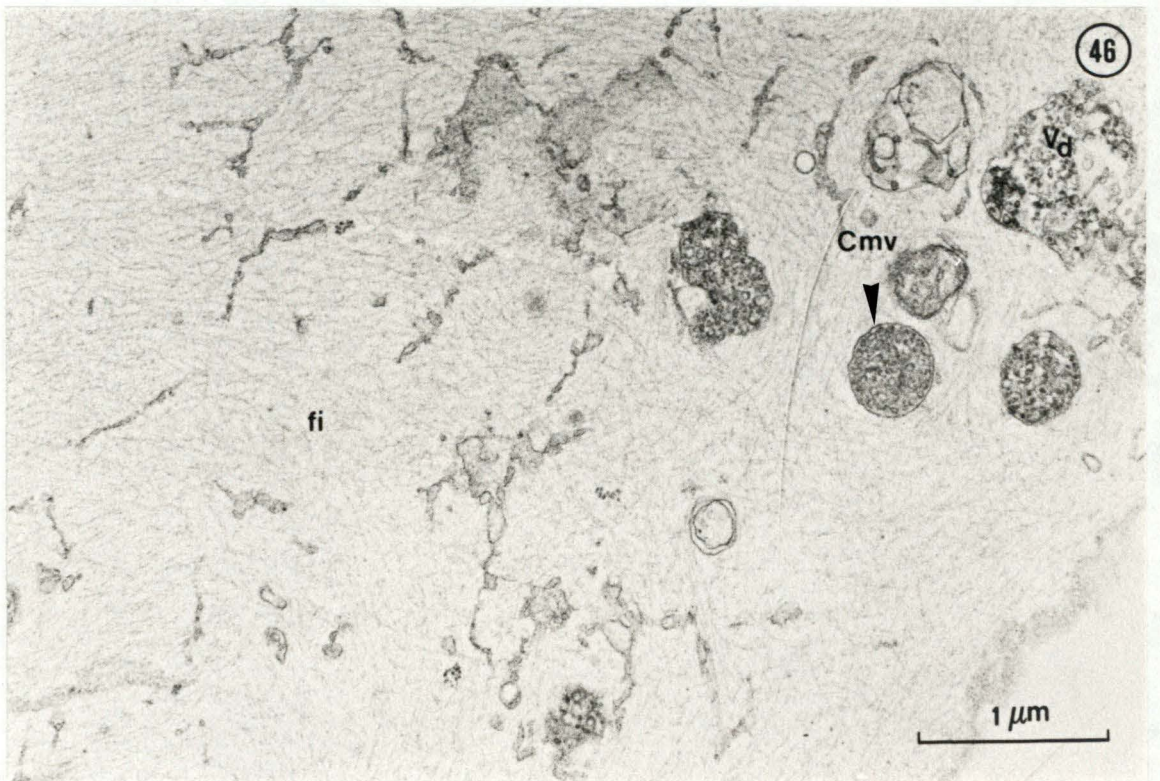
RER : reticulum endoplasmique rugueux.

G : dictyosome de l'appareil de Golgi.

Fig. 46 Filaments intermédiaires (fi) abondants dans une grande cellule provenant d'une première culture de cellules endothéliales.

Vd : vacuole contenant des débris.

Cmv : corps multivésiculaire.



3. Facteur VIII

Les cellules endothéliales possèdent trois propriétés spécifiques principales : - elles forment une monocouche de cellules polygonales en culture.

- elles contiennent les corps de Weibel - Palade visualisés en microscopie électronique.

-elles possèdent l'antigène du facteur VIII.

L'immunofluorescence nous permet de mettre en évidence cette protéine et ainsi d'apporter une preuve supplémentaire à la nature endothéliale de nos cellules.

Nous utilisons comme premier anticorps un antisérum de lapin anti-facteur VIII humain. Le marquage est réalisé par des γ -globulines de chèvre anti-lapin conjuguées à la fluorescéine.

Après avoir testé plusieurs dilutions, nous choisissons une dilution 1/50 pour les deux anticorps.

Nous les centrifugeons avant de les déposer sur les cellules afin d'éliminer les grains de précipité obtenus lors des premiers essais.

Nous travaillons avec deux témoins :

un témoin PBS où le PBS remplace le premier anticorps.

un témoin Ig G où les Ig G d'un lapin non immunisé remplacent ce premier anticorps. Les témoins PBS sont toujours négatifs.

Par contre, les témoins Ig G sont marqués très légèrement et uniformément. La différence d'intensité nous permet de distinguer entre la fluorescence spécifique et non spécifique.

Les tests sont effectués sur les cellules endothéliales bovines en première culture et après 1, 2 et 4 repiquages.

Ces observations concordent pour ces diverses expériences.

La fluorescence est répartie uniformément dans tout le cytoplasme avec en plus des points intenses localisés en certains endroits.

Les noyaux ne sont pas marqués (fig. 47 et 48).

Avec les cellules perméabilisées au Triton x 100, l'intensité du marquage augmente légèrement mais nous ne distinguons plus le noyau non marqué de ces cellules.

Toutes les cellules endothéliales polygonales mais aussi les grandes cellules signalées à diverses reprises présentent cette fluorescence spécifique.

Le marquage est néanmoins plus faible pour ces dernières.

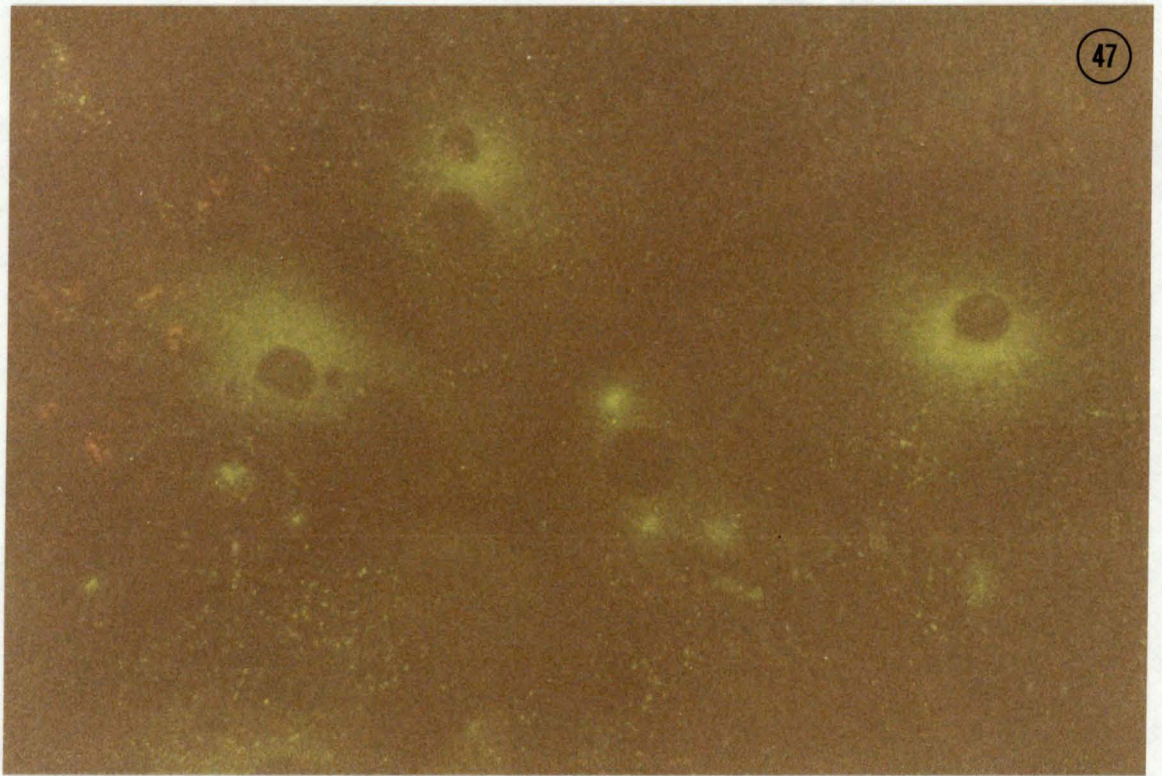
Après plusieurs essais pour optimiser la photographie de la fluorescence, nous obtenons les épreuves présentées dans ce travail.

Elles ne transmettent qu'une partie de l'intensité de la fluorescence observée au microscope.

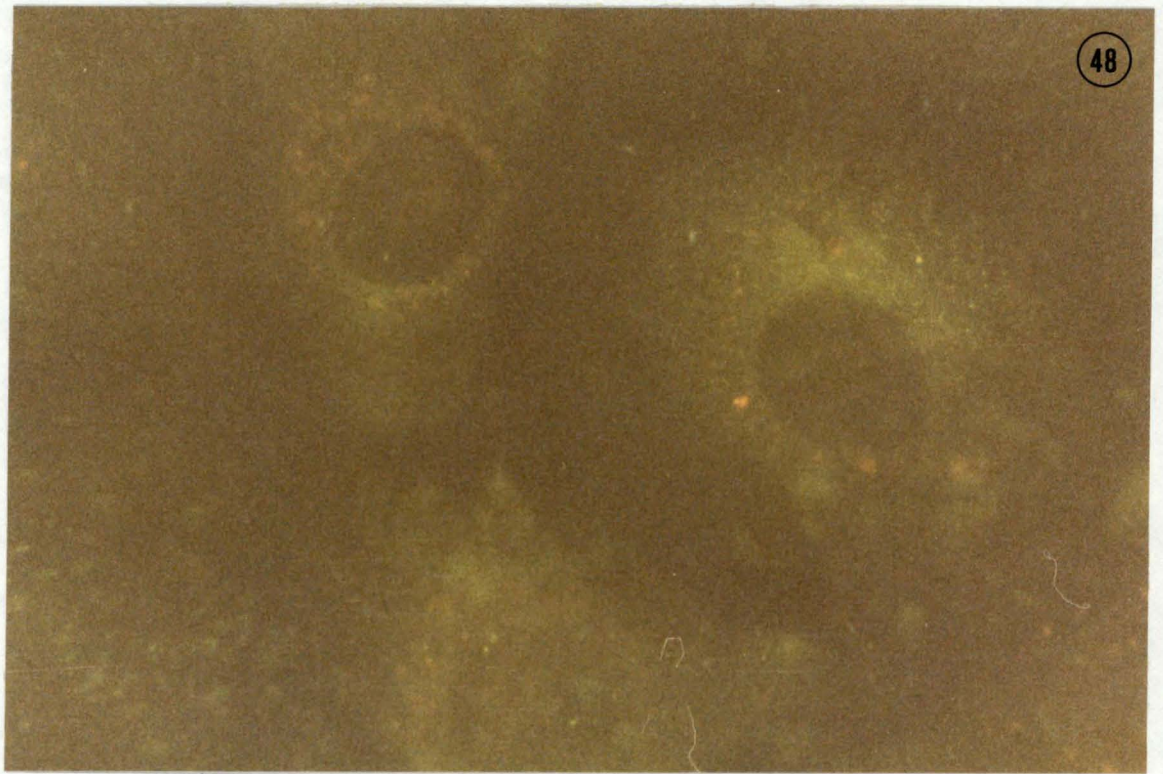
Planche XXIII

Fig. 47 Détection de l'antigène du facteur VIII par immunofluorescence dans une culture de cellules endothéliales (2 repiquages).
x 880.

Fig. 48 Détection de l'antigène du facteur VIII par immunofluorescence dans une culture de cellules endothéliales (2 repiquages).
x 2200.



47



48

4. Chromosomes

La constitution chromosomique est un critère important pour déterminer la nature des cellules en culture.

Cependant, *in vitro*, certaines lignées cellulaires ne conservent pas un nombre diploïde de chromosomes.

Ne pouvant négliger cette éventualité, nous isolons les chromosomes des cellules endothéliales bovines en première culture et après deux repiquages.

Le boeuf (*Bos taurus*) possède 60 chromosomes ($2n = 60$) dont 58 autosomes télocentriques ou acrocentriques et 2 chromosomes sexuels submétacentriques.

Dans une culture exponentielle, une faible proportion de cellules se trouve en mitose, il est nécessaire d'augmenter ce nombre par l'addition de colchicine qui bloque les cellules en mitose.

Après avoir déterminé la durée nécessaire du traitement de colchicine et la force du choc hypotonique, nous obtenons des plaques métaphasiques suffisamment étalées pour permettre la numération des chromosomes (fig. 49). Le nombre chromosomique des cellules déterminé en première culture et après repiquage est égal à $2n = 60$.

Les cellules endothéliales bovines maintiennent leur nombre chromosomique normal en culture.

La netteté de nos préparations ne permet pas cependant le classement des autosomes selon leur taille en toute certitude (figure 49').

(relative)

Planche XXIV

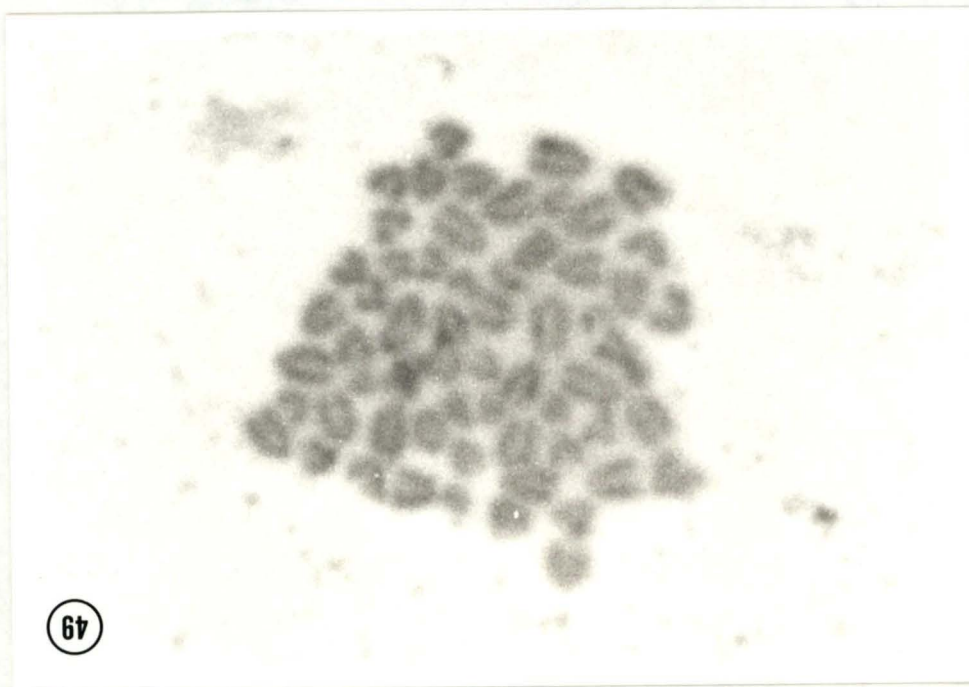
Fig. 49 Chromosomes métaphasiques d'une cellule endothéliale bovine
provenant d'une première culture.

Nombre de chromosomes $2n = 60$.

x 3200.

Fig. 49' Caryotype d'une cellule endothéliale bovine provenant d'une
première culture.

Nombre de chromosomes $2n = 60$.



5. Discussion

Caractérisation des cultures de cellules endothéliales

La caractérisation des cellules endothéliales de l'aorte bovine en culture porte sur trois propriétés spécifiques de ce type cellulaire.

. La disposition en une monocouche régulière des cellules endothéliales polygonales permet de les distinguer nettement des types cellulaires contaminants. Cette monocouche caractéristique de la culture primaire à confluence est décrite par de nombreux auteurs (Jaffe and al. , 1973, Booyse and al. , 1975, Gospodarowicz and al. , 1976, Maciag and al. , 1981).

Les principaux contaminants des cultures endothéliales sont:

- les fibroblastes, cellules allongées, très étendues, d'aspect totalement différent et bien connu.

- les cellules musculaires lisses, cellules assez grandes formant souvent des "monts et vallées" c'est-à-dire des régions où les cellules s'empilent les unes sur les autres entrecoupées de zones où les cellules restent en monocouche (Ross , 1971).

. La présence des corps de Weibel - Palade constitue le second élément. Cependant comme ces structures ne sont observées que dans 10% de nos cellules, ce critère d'identification paraît moins fiable.

Nos observations confirment celles de la littérature.

Retrouvés par certains auteurs mais en faible pourcentage dans leurs cultures de cellules endothéliales bovines (Ryan and al. , 1978), l'absence des corps décrits par Weibel et Palade (1964) est soulignée par d'autres (Schwartz and al. , 1978).

. Afin de disposer d'une technique sûre de caractérisation, nous utilisons l'immunofluorescence pour mettre en évidence l'antigène du facteur VIII, antigène spécifique des cellules endothéliales (Jaffe and al. , 1973).

Les cellules sont positives dans tous les cas. Cette technique permet d'affirmer la nature endothéliale des cellules mises en culture à partir de l'aorte bovine.

Il est intéressant de noter que Rosen and al. (1981) ont retrouvé un marquage positif pour cet antigène durant toute la durée de vie de cultures de cellules endothéliales bovines.

En plus de la localisation cellulaire, cet antigène semble associé au matériel fibrillaire inclus dans la matrice péricellulaire (Hormia and al. , 1983).

Morphologie des cellules endothéliales en ultrastructure

La structure fine de la cellule endothéliale du cordon ombilical humain a été bien étudiée par Haudenschild and al. (1975).

La cellule endothéliale de l'artère pulmonaire du veau a été remarquablement illustrée en microscopies optique et électronique par Ryan and al. (1978).

Nos résultats ultrastructuraux correspondent en général à ces descriptions.

Quelques variations sont cependant à noter concernant :

- . la localisation des filaments intermédiaires.

Ces filaments sont situés de manière prédominante dans la région périnucléaire des cellules endothéliales (Haudenschild and al. , 1975 ; Savion and al. , 1982).

Dans nos cellules, nous les observons dispersés ou arrangés en faisceaux, dans la région périnucléaire mais aussi ailleurs dans le cytoplasme, par exemple en périphérie.

Leur nature est déterminée par la présence de vimentine, protéine majeure des filaments intermédiaires des cellules d'origine mésenchymateuse. Les filaments - contenant la prékératine - caractéristiques des cellules épithéliales et ceux possédant la desmine observés dans les cellules d'origine myogénique n'existent pas dans les cellules endothéliales (Franke and al. , 1979).

Les extrémités des faisceaux de microfilaments correspondent aux points d'attache de la cellule au substrat.

Ces amas, limités dans la région basale, sont fréquemment observés en microscopie électronique dans des sections parallèles au substrat.

Savion and al. (1982) ont décrit les éléments du cytosquelette de cellules endothéliales aortiques bovines en culture en croissance et à confluence et ils en ont analysé par électrophorèse sur gel à deux dimensions et en immunofluorescence les constituants à savoir l'actine, la tubuline et la vimentine. Ils ont noté qu'à la confluence des cellules, il se produit une accumulation intracellulaire de vimentine ainsi qu'une redistribution des filaments intermédiaires. Tandis que dans les cultures de cellules en croissance, la vimentine apparaît sous forme de fins filaments; dans les cultures confluentes elle s'organise en filaments épais, ondulés, localisés dans la région périnucléaire.

. l'absence de membrane basale.

Une membrane basale similaire à celle observée sous l'endothélium des vaisseaux est absente dans nos cultures. Cependant, nous remarquons occasionnellement la présence d'un matériel fibrillaire à proximité de nos cellules.

Toutes nos cellules sont coupées parallèlement au substrat, or pour observer ce matériel, les sections perpendiculaires au substrat sont préférables.

A ce point de vue, nos observations sont en accord avec celles de Haudenschild and al. (1975).

. l'aspect des corps de Weibel-Palade qui semble un peu différent de celui des cellules endothéliales du cordon ombilical humain. La structure tubulaire de ces granules paraît moins nette dans le cas des cellules endothéliales bovines.

. la présence d'un appareil de Golgi important dans certaines cellules. Nous pensons qu'il pourrait s'agir de cellules avec un métabolisme important peut-être en relation avec la synthèse de nombreux corps de Weibel-Palade.

. la présence de vacuoles claires et de vacuoles contenant un matériel peu dense aux électrons.

Leur existence est mentionnée par de nombreux auteurs (Haudenschild and al. , 1975; Schwartz and al. , 1978) qui signalent leur augmentation lors du vieillissement des cultures. Ces vacuoles apparaissent surtout quand les cellules approchent de la confluence. Duthu and Smith (1980) les ont observées dans leurs cultures de cellules endothéliales bovines.

Ils obtiennent des résultats négatifs lors des tests d'Oil Red O (mise en évidence des lipides) et de bleu d'Alcian (mise en évidence des mucopolysaccharides) sur ces vacuoles.

Ils montrent l'incorporation de matériel fluorescent dans ces vacuoles et donc leur origine dans les vésicules de pinocytose.

Pour expliquer leur apparition, nous émettons deux hypothèses :

. soit une mauvaise osmolarité du milieu. Cependant toutes les cellules ne contiennent pas ces vacuoles. Il faut alors envisager une réaction différente au milieu des cellules selon leur état; par exemple les cellules en croissance (division, synthèses...) opposées aux cellules dont la croissance est stoppée par l'inhibition de contact.

Ces dernières contiendraient les vacuoles.

. soit une mauvaise homéostasie de la cellule qui vieillit et ne maintient pas la perméabilité de sa membrane plasmique.

Evolution qualitative des cultures

Nous conservons des populations homogènes de cellules endothéliales bovines en culture pendant deux mois (7 repiquages) sans changement évident dans la morphologie cellulaire et les caractéristiques de croissance. Néanmoins, ces cultures peuvent être maintenues pendant plusieurs mois; 12 à 14 mois selon Booyse and al. (1975).

Les données de la littérature indiquent une variabilité considérable en ce qui concerne la prolifération et la durée de vie des cellules endothéliales en culture. Mais ceci dépasse l'objet de notre étude.

Nous observons quelques grandes cellules dans nos cultures de cellules endothéliales. Fryer (1966) les a observées dans des cultures de cellules endothéliales humaines mais il les prenait pour des macrophages. Leur présence est décrite par Haudenschild and al. (1975). Elles ne possèdent pas les corps de Weibel - Palade mais contiennent tous les autres organites contenus dans les cellules endothéliales. Nous pouvons affirmer que ce ne sont pas des cellules musculaires lisses puisqu'elles sont positives lors de la mise en évidence du facteur VIII en immunofluorescence.

Il pourrait s'agir d'une sous-population de cellules plus grandes qui s'accroît avec le temps. Repin and al. (1984) signalent la présence de cellules endothéliales géantes dans l'aorte humaine. Elles représentent de 25 à 41 % de la population cellulaire totale d'une aorte adulte. Ces cellules constitueraient une sous-population de cellules endothéliales sénescents.

La relation entre l'augmentation de la taille des cellules et le vieillissement en culture est bien connue.

Rosen and al. (1981) décrivent l'augmentation de la surface et du volume cellulaire dans des clones de cellules endothéliales âgées provenant de l'aorte bovine foetale.

Ces cellules conservent la capacité d'expression de l'antigène du facteur VIII. Cette augmentation de taille est en corrélation avec la diminution du taux de réplication.

Ces changements observés dans les cellules plus âgées peuvent contribuer à la genèse de l'athérosclérose.

Nous pensons que les quelques grandes cellules observées dans nos cultures peuvent provenir d'une sous-population de cellules plus grandes de l'aorte. L'aorte est prélevée sur des bovins de 18 mois à 3 ans environ. Par contre, ces cellules peuvent avoir subi des altérations par exemple l'apparition d'une formule chromosomique anormale ou bien la perte de la propriété d'inhibition de croissance par les contacts entre les cellules voisines.

Nous signalons la présence de cellules avec des vésicules sombres visualisées en microscopie à contraste de phase. Nous excluons la possibilité qu'il s'agisse de cellules sanguines puisqu'elles apparaissent également après les repiquages. Nous pensons à l'existence de cellules contenant de nombreuses vésicules lipidiques comme le montre la coloration Oil Red O. Un bleu de Trypan aurait pû nous renseigner sur leur viabilité. Cependant, nous ne sommes pas en mesure d'expliquer leur apparition et la raison de l'accumulation de vésicules lipides dans ces quelques cellules.

C. Influence du facteur de croissance

1. Préparation du facteur de croissance

Nous utilisons quatre cerveaux de boeuf d'un poids égal à 1 Kg. Après les étapes d'homogénéisation et de précipitation-centrifugation (cf. technique de préparation), le culot final en suspension dans H₂O est dialysé puis lyophilisé.

Nous récoltons 1.463 g de protéines lyophilisées. Ces protéines en solution dans un tampon phosphate de Na sont déposées sur une colonne CM Séphadex C 50.

L'éluion se fait en augmentant la force ionique grâce à un gradient en NaCl.

Nous obtenons deux pics, un après 0.15 M NaCl et l'autre après 1.0 M NaCl.

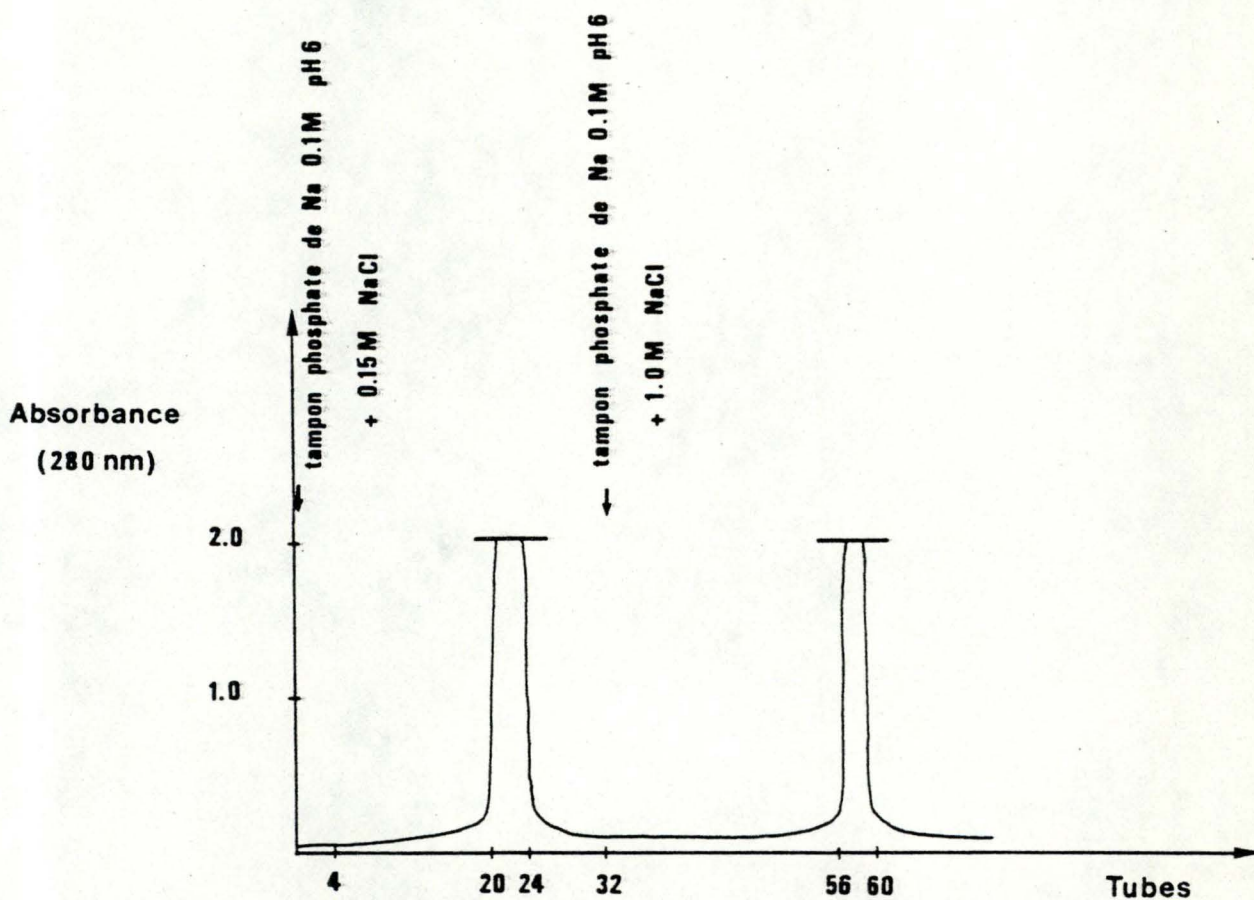


Fig. a : Profil d'éluion de la colonne CM Séphadex C 50.

Tubes 1 → 31 : 9 ml / tube

32 → fin : 6.5 ml / tube

Le contenu des tubes 56 → 59 (second pic) est dialysé contre H₂O puis lyophilisé. Les protéines lyophilisées, en solution dans le tampon carbonate d'ammonium, sont déposées sur une colonne Séphadex G 100. La figure b représente le profil d'élution de cette colonne. Nous le divisons en quatre pics principaux.

A : tubes 33 → 39

B : tubes 40 → 54

C : tubes 55 → 66

D : tubes 67 → 91

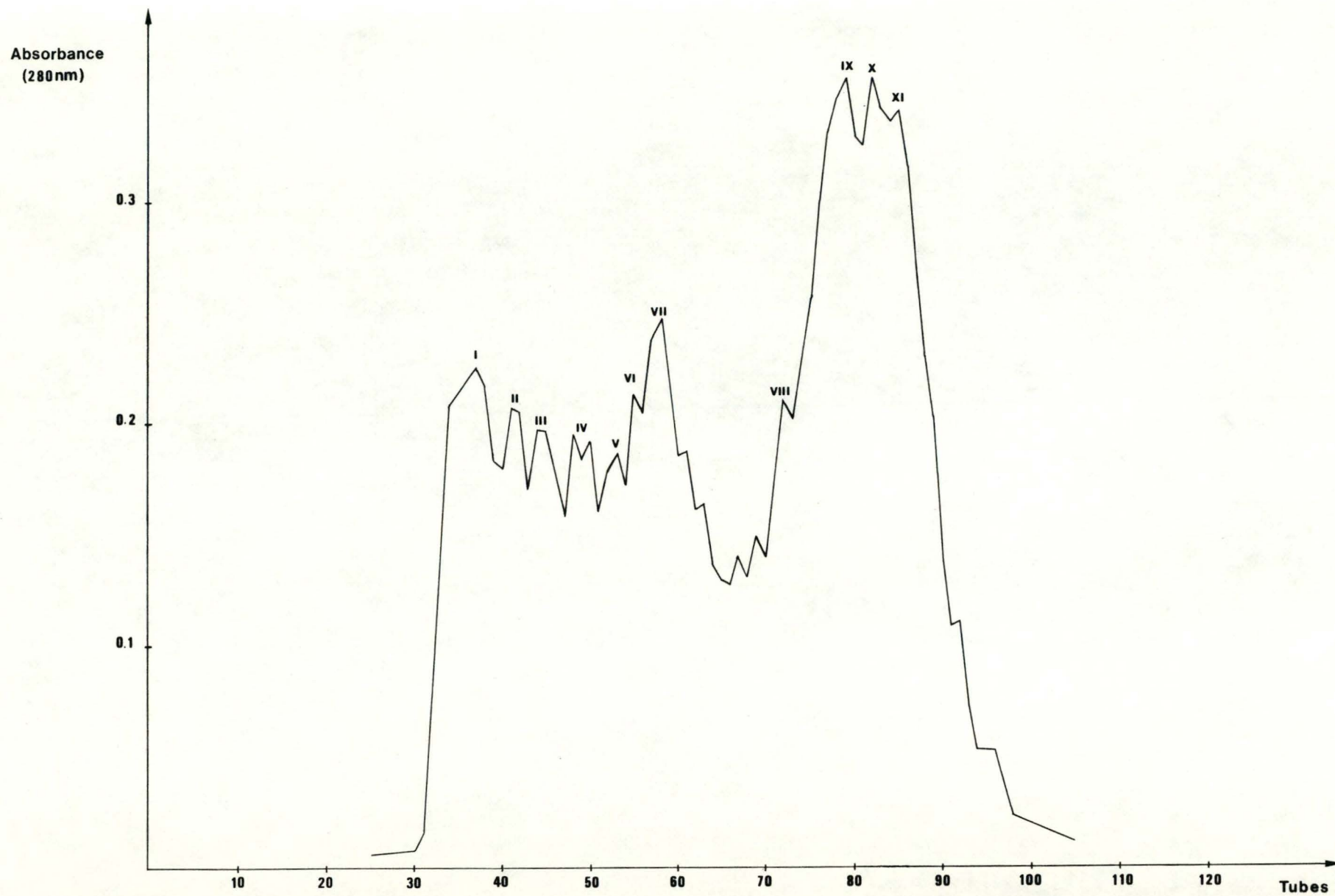
Le contenu des tubes est rassemblé et les quatre fractions sont dialysées.

Nous obtenons après lyophilisation.

<u>Fraction</u>	<u>mg protéines</u>
A	6
B	3
C	7
D	33

Ces protéines sont stockées au congélateur.

Fig. b : Profil d'élution de la colonne Séphadex G 100 (2.1 ml / tube)



Afin de rechercher des similitudes avec les résultats décrits dans la littérature, il convient d'estimer le poids moléculaire des différentes protéines de ce facteur.

. Estimation du poids moléculaire par chromatographie sur tamis moléculaire.

La figure c donne la droite d'étalonnage de la colonne Séphadex G 100. Nous pouvons subdiviser le profil d'élution de cette colonne en 11 sommets. (fig. b)

		K_{AV}	log PM	PM
A	I	0.032	5.12	130850
B	II	0.098	5.03	107150
	III	0.147	4.97	93300
	IV	0.229	4.85	70790
	V	0.295	4.77	58890
C	VI	0.328	4.72	52480
	VII	0.377	4.66	45700
D	VIII	0.607	4.36	22900
	IX	0.722	4.20	15840
	X	0.772	4.14	13800
	XI	0.821	4.07	11750

. Estimation du poids moléculaire par électrophorèse sur gel de SDS polyacrylamide. (Fig. 50)

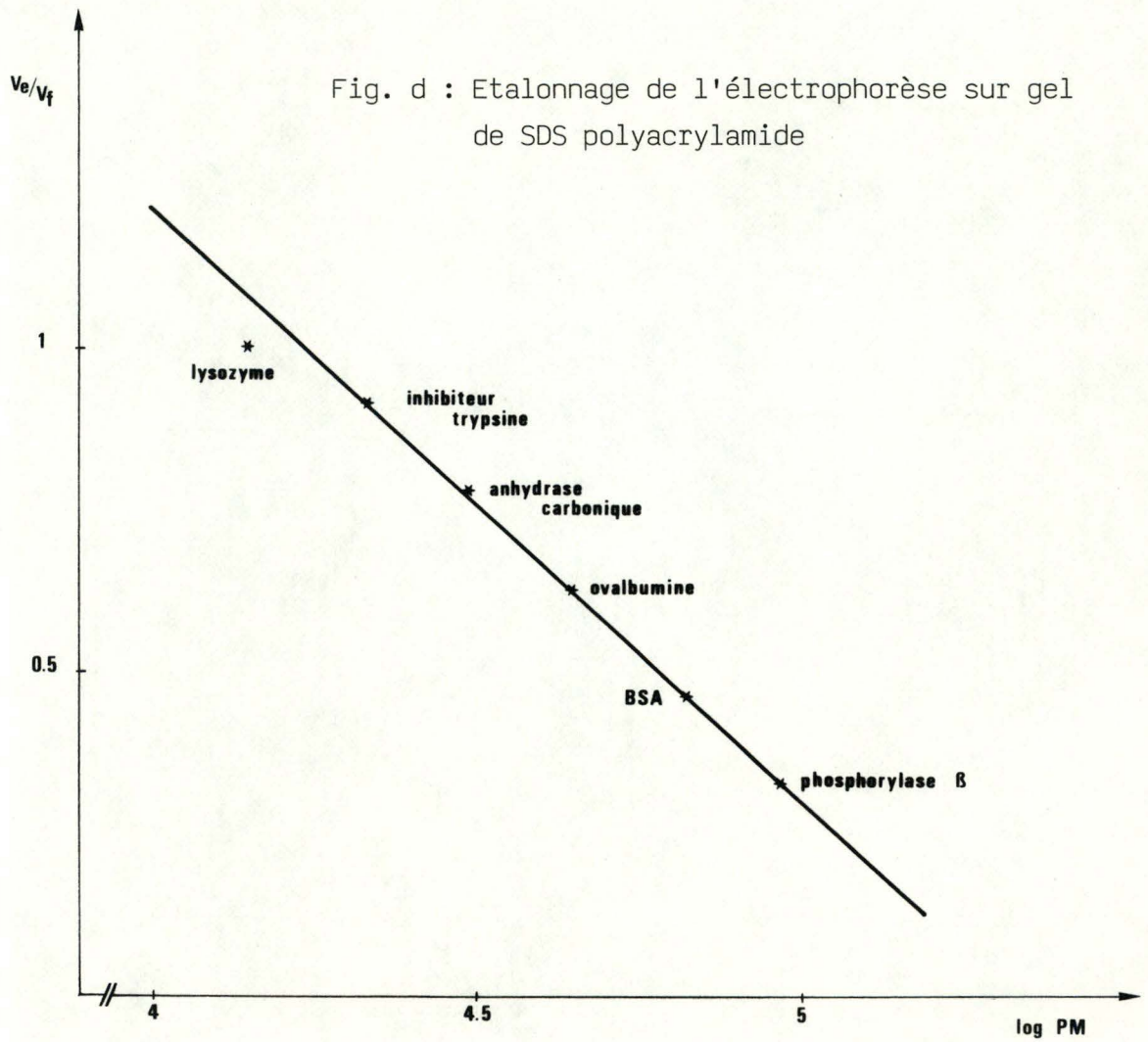
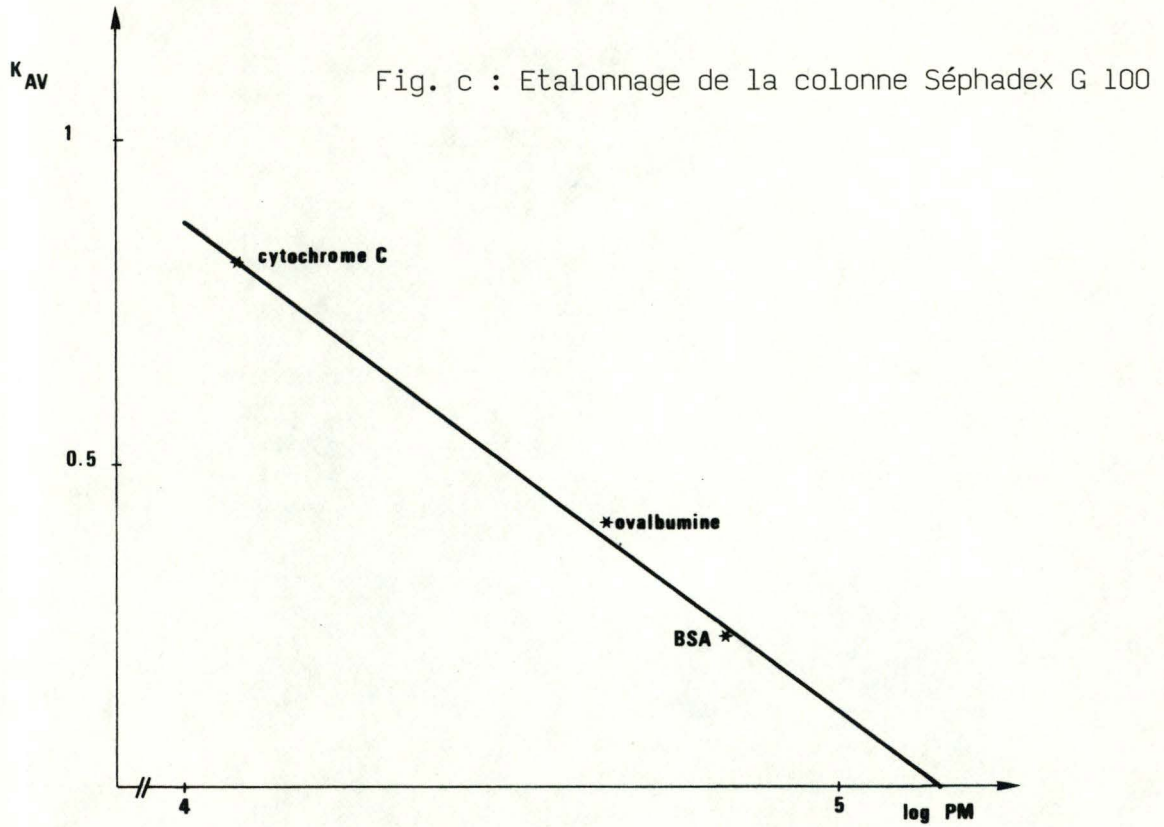
La figure d donne la droite d'étalonnage.

Nous ne disposions plus, au moment de la réalisation de cette électrophorèse, des protéines de la fraction B.

		V_c/V_f	PM	
A	2 bandes	0.193	140485	
		0.398	80423	
C	2 bandes	0.682	37134	
		0.773	28989	bande principale
D	4 bandes	0.670	38367	
		0.898	20631	
		0.943	18253	
		1.079	12642	bande principale

T : étalonnage
A : fraction A
C : fraction C
D : fraction D





2. Effet du facteur de croissance

a. Effet de la fraction

1° Microscopie en contraste de phase

Après avoir isolé le facteur de croissance, nous comparons l'action des fractions A, B, C et D sur les cellules endothéliales bovines en première culture, après un premier et un second repiquage.

La concentration en facteur est de 5 µg / ml de milieu.

Nous disposons approximativement $2 \cdot 10^5$ cellules par boîte.

Les tableaux IV, V et VI reprennent les observations faites lors de la confluence. Les caractéristiques observées en cours de croissance étant similaires à celles décrites précédemment, elles ne figurent plus dans ce paragraphe.

	Confluence	Forme des cellules	Aspect général de la boîte
Fraction A.	12 jours	petites polygonales	monocouche homogène
Fraction B.	12 jours	petites polygonales	monocouche homogène
Fraction C.	12 jours	petites polygonales fusiformes	monocouche avec des faisceaux de cellules fusiformes
Fraction D.	12 jours	polygonales fusiformes	monocouche avec des faisceaux de cellules fusiformes
Témoin	12 jours	polygonales	monocouche homogène

Tableau IV : Comparaison de l'action des fractions A, B, C, D sur les cellules endothéliales en première culture.

	Confluence	Forme des cellules	Aspect général de la boîte
Fraction A.	11 jours	petites polygonales	monocouche homogène
Fraction B.	11 jours	polygonales	monocouche homogène avec 1-2 zones cellules en fuseau
Fraction C.	11 jours	polygonales fusiformes	monocouche peu homogène tourbillons de cellules en fuseau
Fraction D.	11 jours	polygonales	monocouche homogène
Témoin	11 jours	polygonales fusiformes	monocouche avec faisceaux cellules fusiformes

Tableau V : Comparaison de l'action des fractions A, B, C, D sur les cellules endothéliales après un repiquage.

	Confluence	Forme des cellules	Aspect général de la boîte
Fraction A.	13 jours	polygonales	monocouche homogène
Fraction B.	13 jours	petites polygonales	monocouche homogène avec faisceaux de cellules allongées
Fraction C.	13 jours	polygonales cellules avec prolongements	monocouche peu homogène, beaucoup de tourbillons de cellules fusiformes
Fraction D.	13 jours	polygonales fusiformes	monocouche homogène avec faisceaux de cellules en fuseau
Témoin	14 jours	polygonales fusiformes	monocouche assez homogène avec faisceaux de cellules fusiformes

Tableau VI : Comparaison de l'action des fractions A, B, C, D sur les cellules endothéliales après deux repiquages.

Les figures 51 à 55 montrent une zone de la monocouche endothéliale de cultures sans facteur de croissance (fig. 51) et avec les fractions A, B, C et D de ce facteur (fig. 52, 53, 54, 55). Les cellules des différentes boîtes se ressemblent, le facteur additionné au milieu de culture ne semble pas modifier la morphologie cellulaire.

Après deux repiquages, nous remarquons la présence de plusieurs grandes cellules dans les boîtes contenant du facteur de croissance et dans les boîtes témoins. Elles sont situées principalement en périphérie des colonies. Elles possèdent 1 ou 2 noyaux; le cytoplasme, homogène en périphérie, contient des vésicules claires dans la région péri-nucléaire.

De telles vésicules existent également dans le cytoplasme de certaines cellules polygonales. Cependant, le facteur de croissance ne semble avoir aucune influence sur leur fréquence.

La densité cellulaire des boîtes additionnées de facteur de croissance nous apparaît supérieure à celle des boîtes sans facteur. La densité estimée par comptage en chambre de Burker après un repiquage est de 3.5 à $5.4 \cdot 10^5$ cellules / cm^2 .

Planche XXV

Fig. 51 Monocouche confluyente de cellules endothéliales en première culture (12 jours).

Contraste de phase x 660.

Fig. 52 Monocouche confluyente de cellules endothéliales en première culture, avec la fraction A du facteur de croissance (12 jours).

Contraste de phase x 660.

Fig. 53 Monocouche confluyente de cellules endothéliales en première culture, avec la fraction B du facteur de croissance (12 jours).

Contraste de phase x 660.

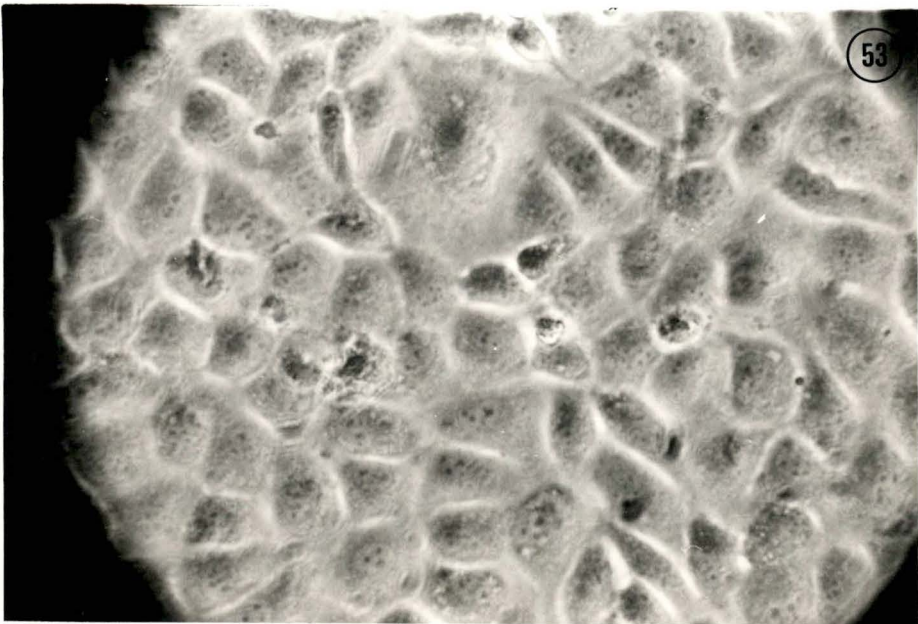
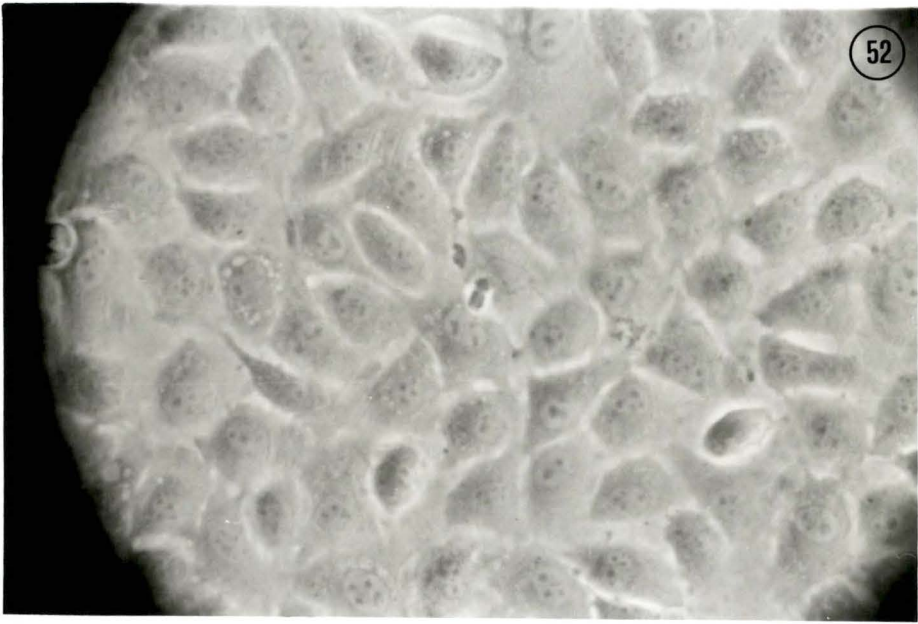
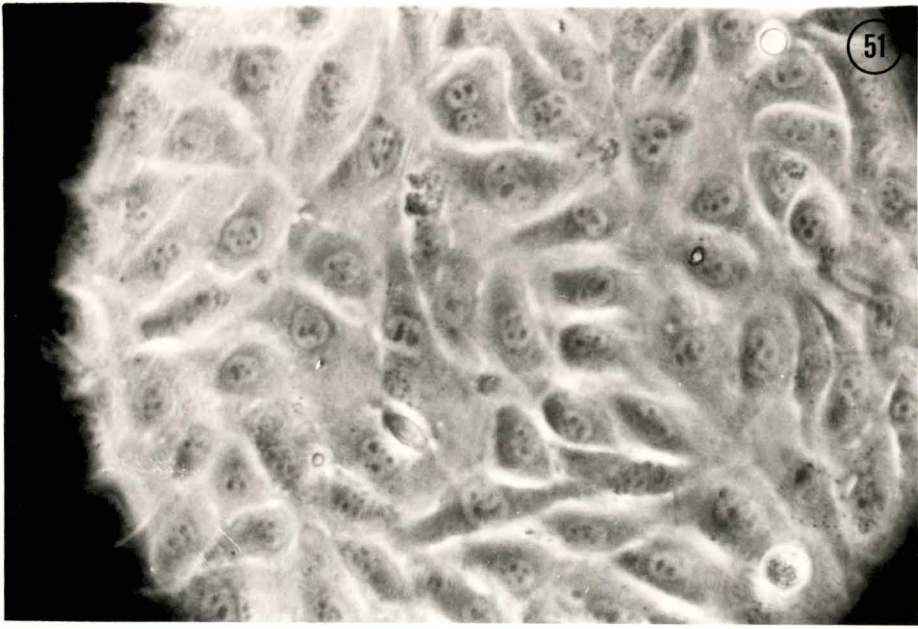


Planche XXVI

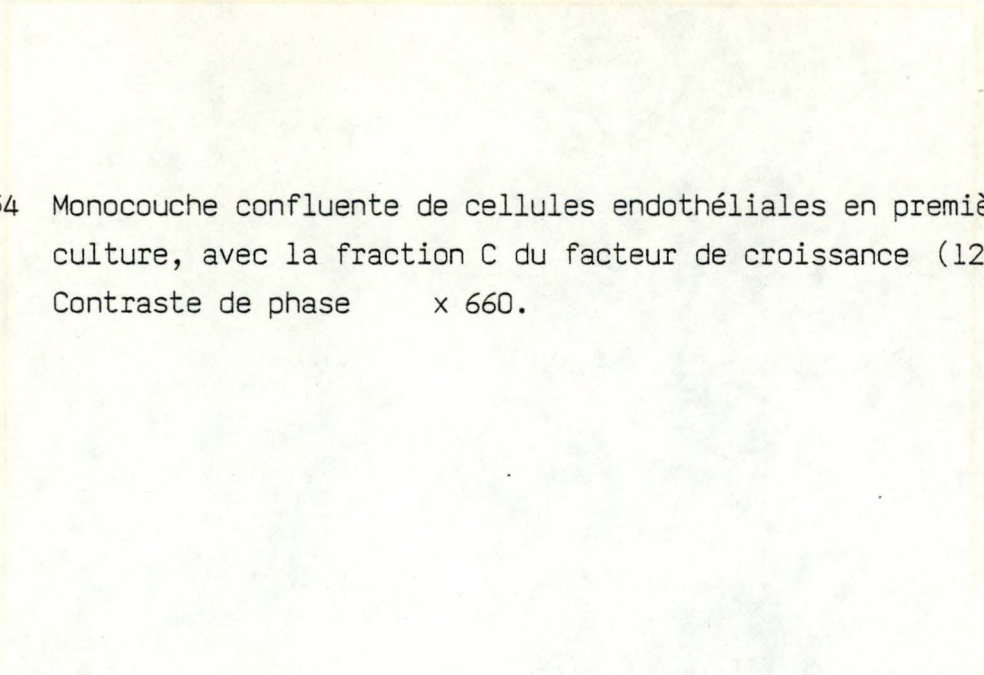
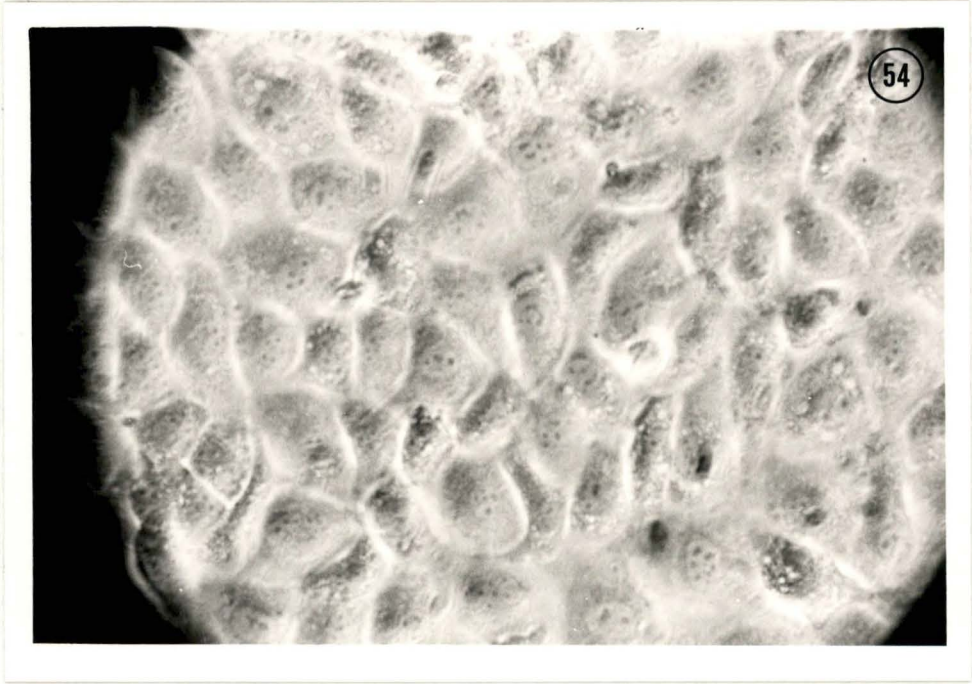


Fig. 54 Monocouche confluyente de cellules endothéliales en première culture, avec la fraction C du facteur de croissance (12 jours).
Contraste de phase x 660.

Fig. 55 Monocouche confluyente de cellules endothéliales en première culture, avec la fraction D du facteur de croissance (12 jours).
Contraste de phase x 660.



2° Microscopie électronique à transmission

Nous étudions en microscopie électronique l'effet des fractions A, B, C, D du facteur de croissance sur deux séries de cellules endothéliales en première culture dans le but de déceler certaines modifications ultrastructurales en rapport avec son addition. L'observation des cellules traitées avec chaque fraction permet de les assimiler à celles décrites dans le paragraphe III B 2. (fig. 56 et 57).

Aucune corrélation n'a pu être établie entre l'addition du facteur de croissance et la représentation des corps de Weibel - Palade. Par contre, nous observons des cellules qui présentent certaines modifications des organites cytoplasmiques. Ces variations concernent l'abondance du réticulum endoplasmique rugueux (fig. 58, 59 et 60), l'étendue de l'appareil de Golgi : dictyosomes avec des saccules longs et peu dilatés (fig. 61, 62, 63 et 64) et le cytosquelette : augmentation des microfilaments intermédiaires (fig. 65, 66, 67 et 68). Le tableau VII donne une idée des variations observées dans ces cellules.

	Mitochondries	RER	Dictyosomes	Vacuoles	Cytosquelette
Fraction A	N	++	+	N→+	++++
Fraction B	N	++	N→+	N	+++
Fraction C	N → +	N→+	+	N	++++
Fraction D	N → +	N	N→+	N	++

Tableau VII : Variations dans l'ultrastructure de cellules endothéliales en culture avec le facteur de croissance.

(N : comparable aux cellules endothéliales déjà décrites).

Planche XXVII

Fig. 56 Coupe dans une cellule endothéliale provenant d'une première culture, sans facteur de croissance (témoin).

N : noyau.

M : mitochondrie.

G : dictyosome de l'appareil de Golgi.

mt : microtubule.

Fig. 57 Coupe dans une cellule endothéliale provenant d'une première culture, sans facteur de croissance (témoin).

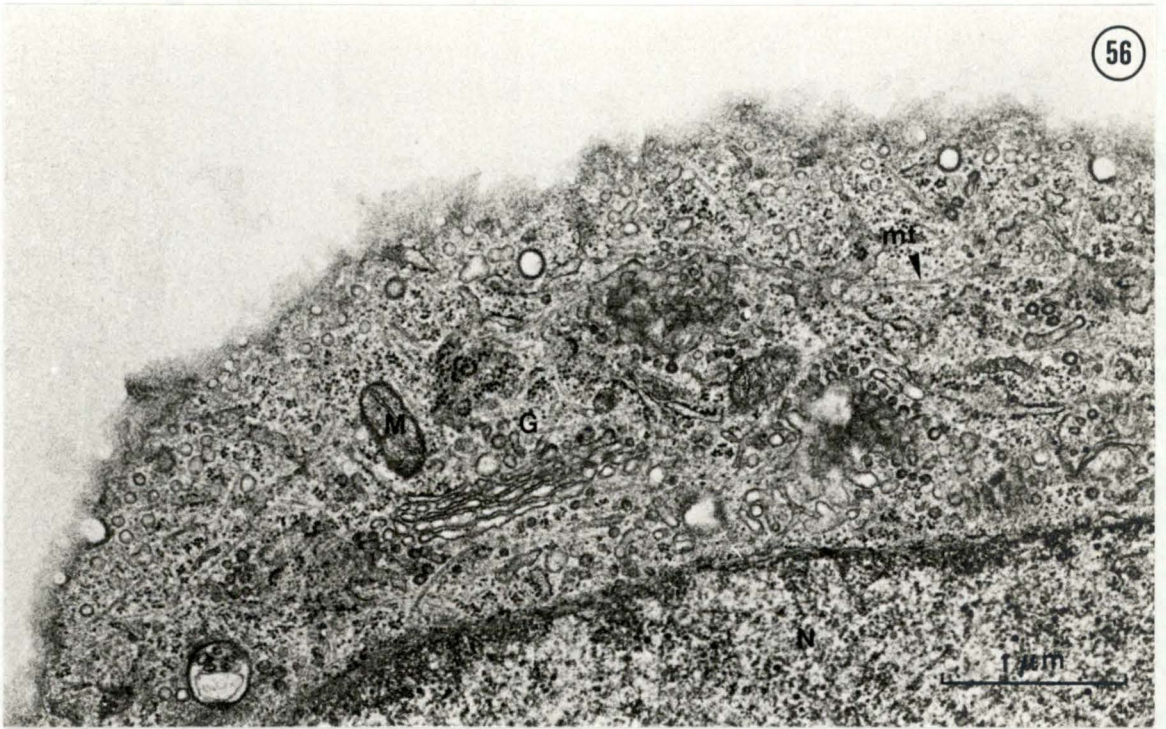
N : noyau.

M : mitochondrie.

VA : vacuole d'autophagie.

fi : microfilament intermédiaire.

56



57

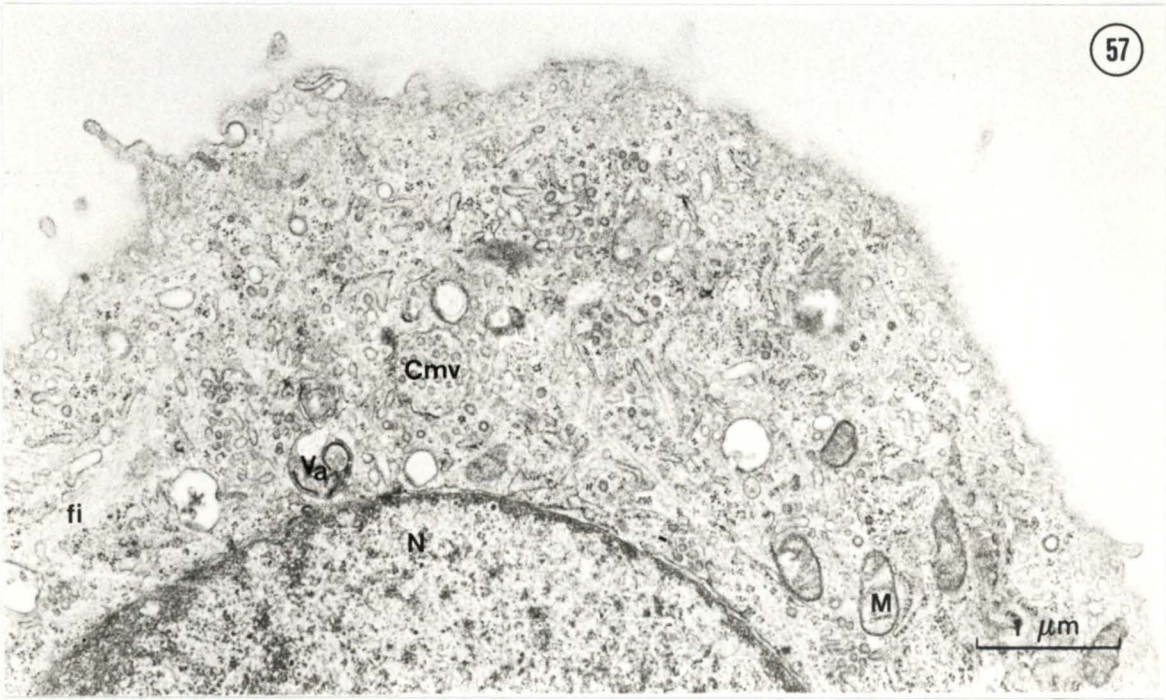


Planche XXVIII

Fig. 58 Reticulum endoplasmique rugueux (RER) abondant dans une cellule endothéliale provenant d'une première culture, avec la fraction A du facteur de croissance.

Remarquer la présence de vacuoles contenant du matériel peu dense aux électrons (Vd) et un amas de microfilaments intermédiaires (fi).

N : noyau.

M : mitochondrie.

Fig. 59 Reticulum endoplasmique rugueux (RER) abondant dans une cellule endothéliale provenant d'une première culture, avec la fraction B du facteur de croissance.

N : noyau.

Va : vacuole d'autophagie.

Fig. 60 Reticulum endoplasmique rugueux (RER) dans une cellule endothéliale provenant d'une première culture, avec la fraction C du facteur de croissance.

Remarquer la présence d'un amas de microfilaments intermédiaires (fi)

N : noyau.

G : dictyosome de l'appareil de Golgi.

Vd : vacuole de matériel peu dense aux électrons.



Planche XXIX

Fig. 61 Dictyosomes de l'appareil de Golgi (G) dans une cellule endothéliale provenant d'une première culture, avec la fraction A du facteur de croissance.

Les saccules sont assez longs et peu dilatés.

N : noyau.

Fig. 62 Dictyosome de l'appareil de Golgi (G) dans une cellule endothéliale provenant d'une première culture, avec la fraction B du facteur de croissance.

M : mitochondrie.

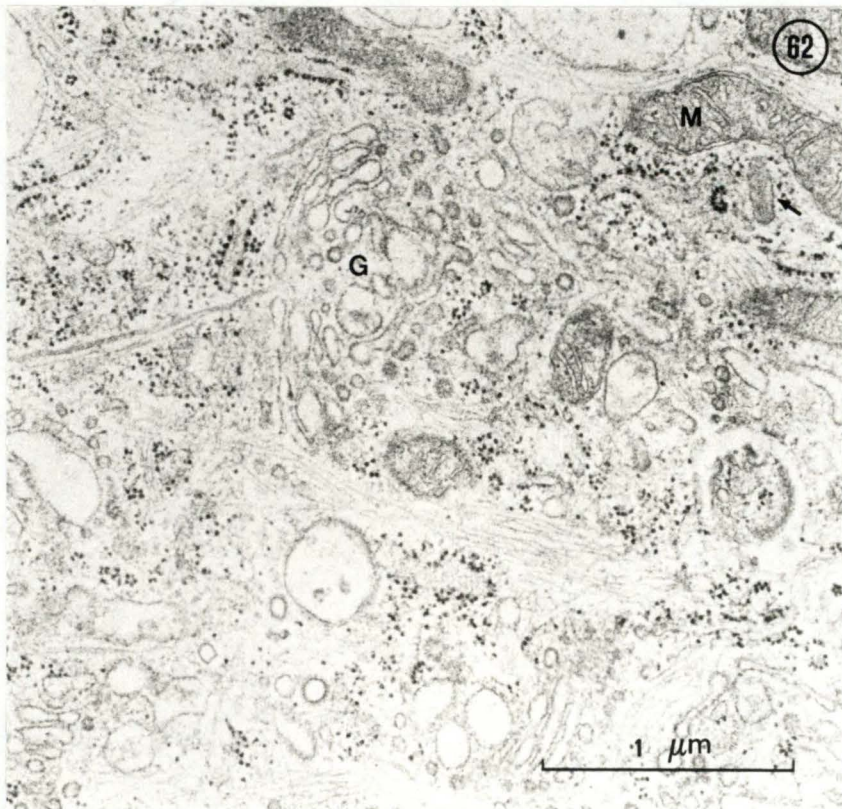
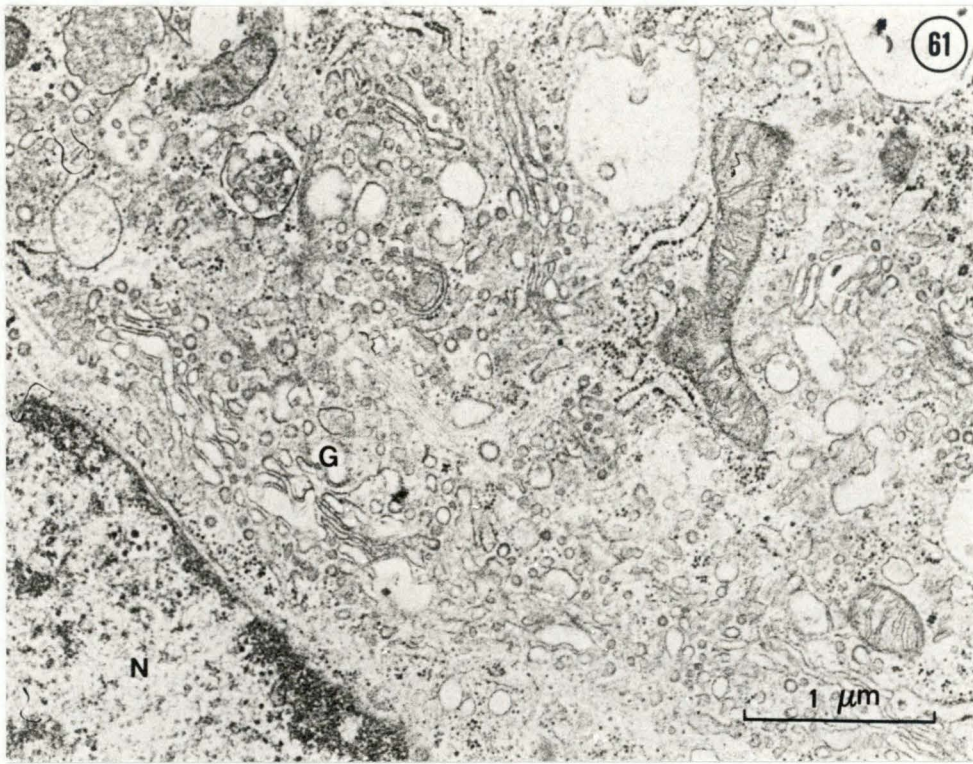


Fig. 63 Dictyosomes de l'appareil de Golgi (G) dans une cellule endothéliale provenant d'une première culture, avec la fraction C du facteur de croissance.

Les saccules sont allongés et peu dilatés.

N : noyau.

Fig. 64 Dictyosomes de l'appareil de Golgi (G) dans une cellule endothéliale provenant d'une première culture, avec la fraction D du facteur de croissance.

Les saccules sont assez longs et peu dilatés. La flèche indique le réticulum endoplasmique rugueux.

N : noyau.

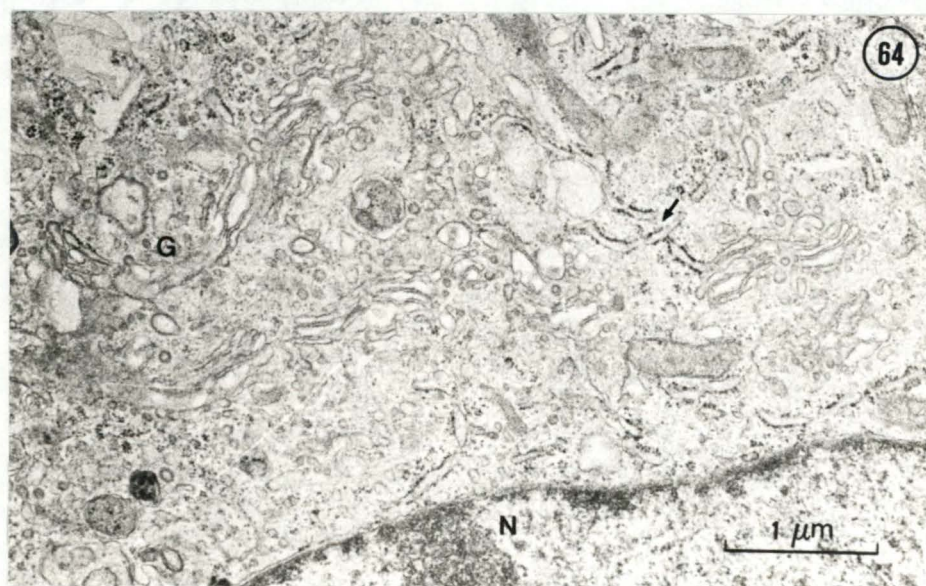


Planche XXXI

Fig. 65 Portion du cytoplasme d'une cellule endothéliale provenant d'une première culture, avec la fraction A du facteur de croissance.

Remarquer l'abondance de microfilaments fins (mf) en bordure, la présence de microtubules (mt) et de microfilaments intermédiaires (fi).

La flèche indique un corps de Weibel - Palade.

Fig. 66 Microfilaments intermédiaires (fi) dispersés dans le cytoplasme d'une cellule endothéliale provenant d'une première culture, avec la fraction B du facteur de croissance.

mt : microtubule.

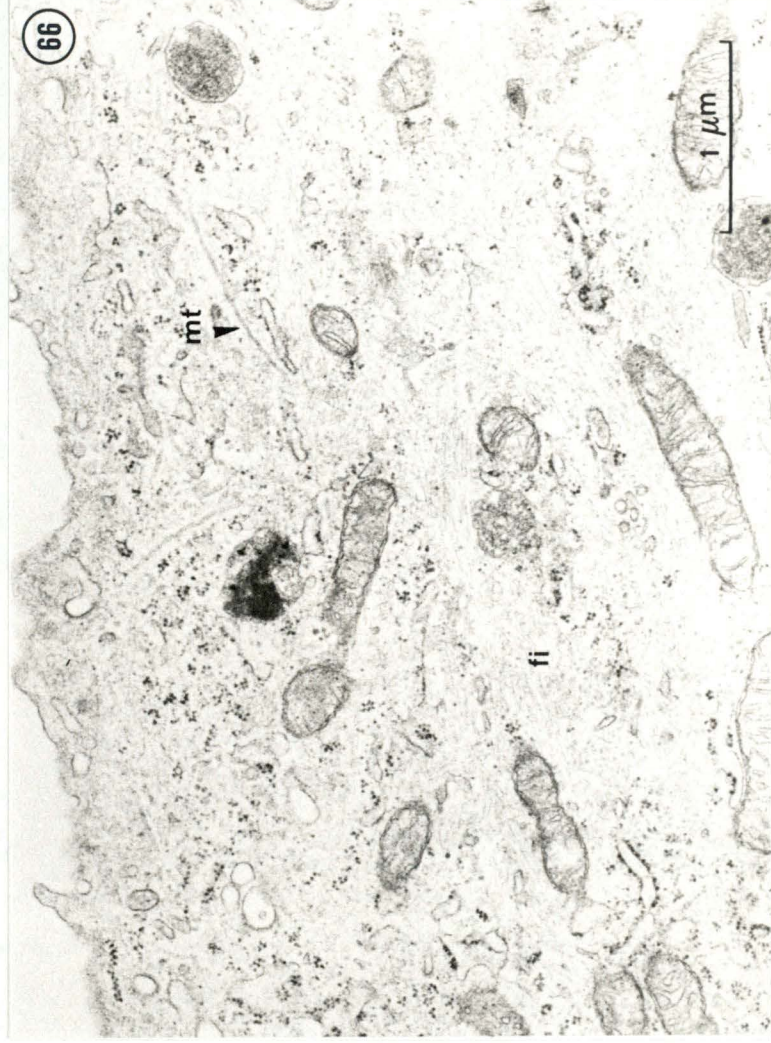
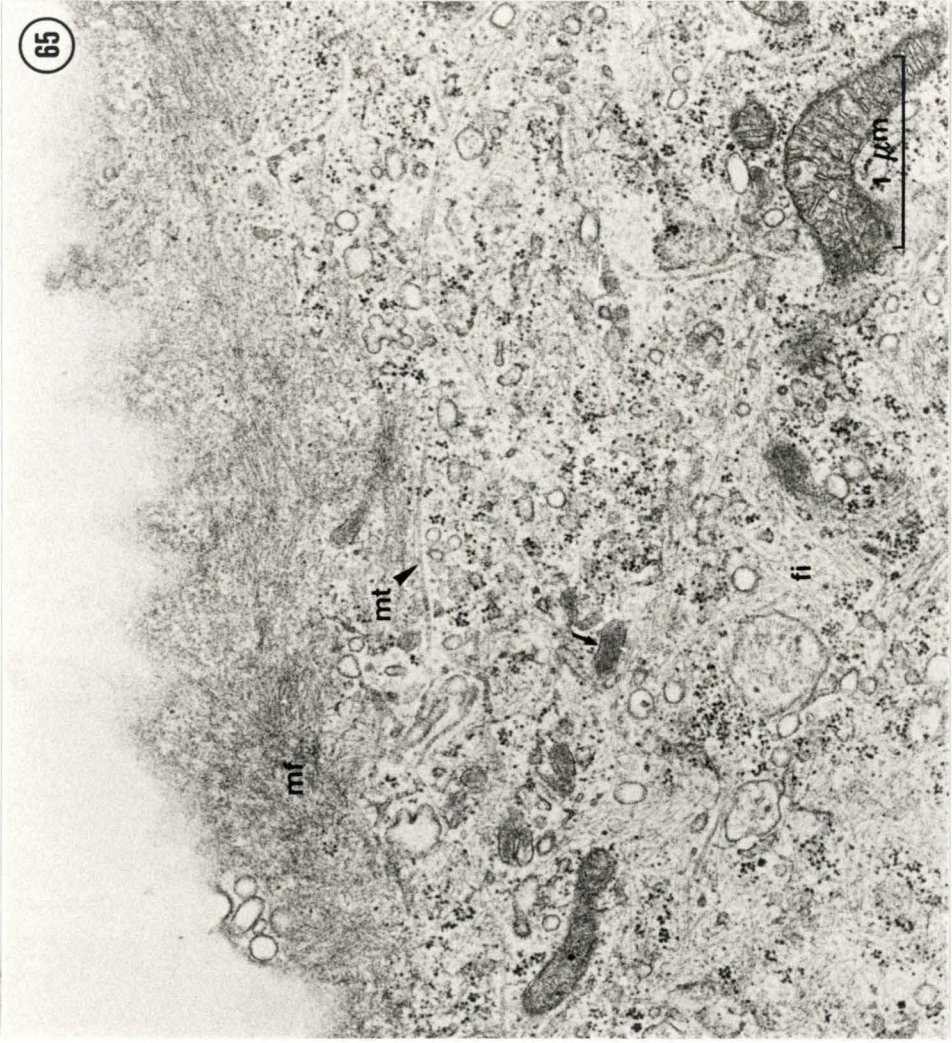


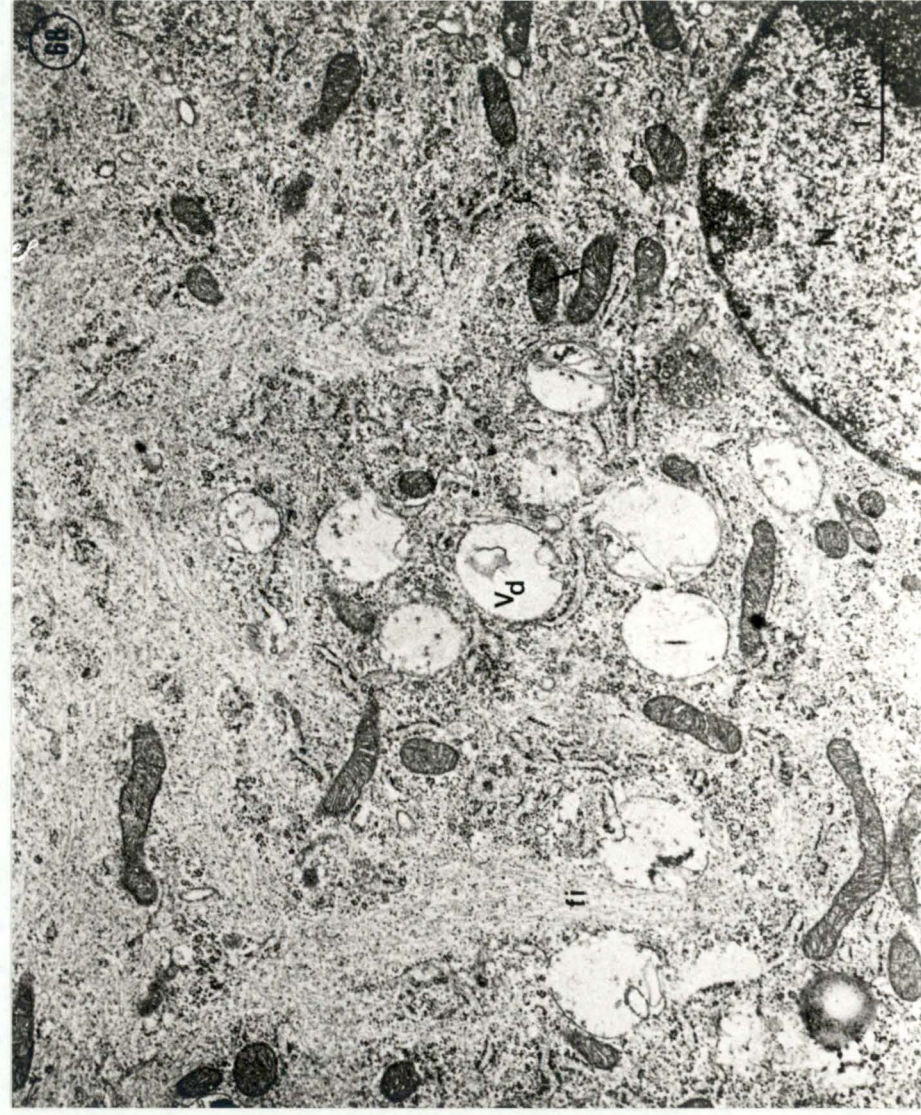
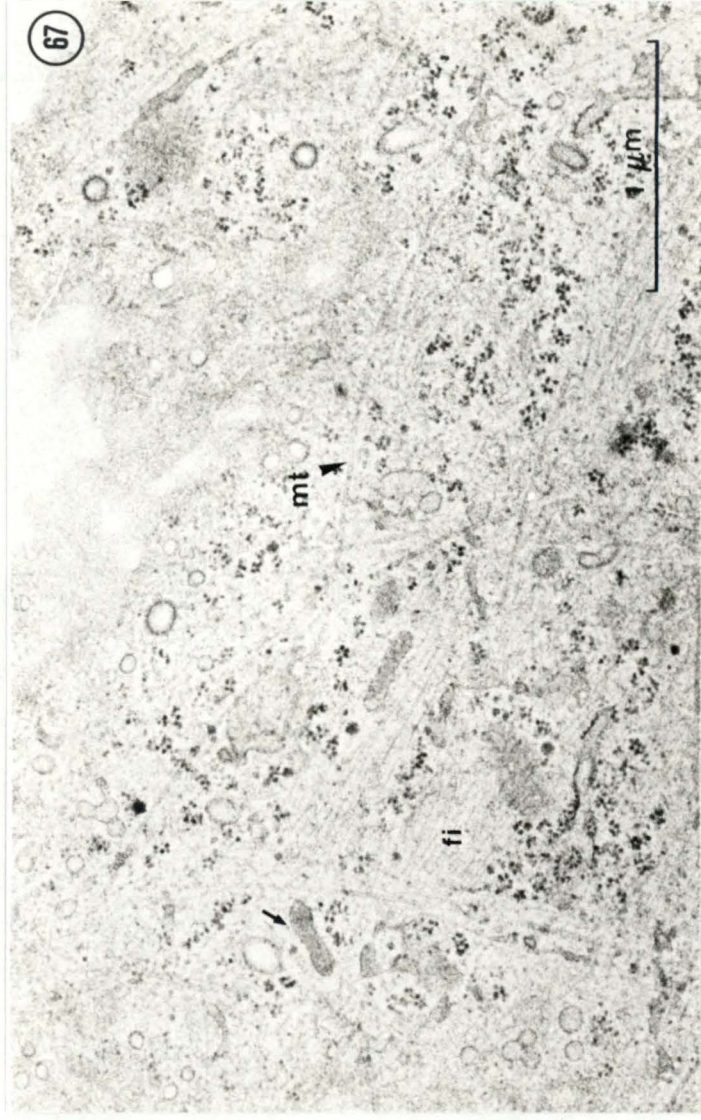
Planche XXXII

Fig. 67 Microfilaments intermédiaires nombreux (fi) et microtubules (mt) dans le cytoplasme d'une cellule endothéliale en première culture, avec la fraction C du facteur de croissance. La flèche indique un corps de Weibel - Palade.

Fig. 68 Microfilaments intermédiaires (fi) dans le cytoplasme d'une cellule endothéliale en première culture, avec la fraction D du facteur de croissance.

N : noyau.

Vd : vacuole contenant du matériel peu dense aux électrons.



b. Effet de la dose1° Microscopie en contraste de phase

Après l'étude de l'effet des quatre fractions du facteur de croissance sur les cellules endothéliales de l'aorte bovine, il nous paraît intéressant d'observer leur réponse à des doses croissantes en chaque fraction. Le choix des concentrations de 5, 10 et 50 $\mu\text{g/ml}$ est arbitraire.

Cette expérience est réalisée sur des cellules en culture depuis 34 jours (3 repiquages) en présence de facteur de croissance à raison de 5 $\mu\text{g/ml}$ de la fraction considérée.

Nous reprenons des critères d'observation identiques à ceux utilisés lors de l'étude de l'effet de la fraction.

Les caractéristiques de croissance sont également similaires à celles décrites précédemment.

Les observations sont présentées dans les tableaux VIII, IX, X et XI.

	Confluence	Forme des cellules	Aspect général de la boîte
Fraction A. 5 $\mu\text{g/ml}$	10 jours	petites polygonales	monocouche homogène
10 $\mu\text{g/ml}$	10 jours	petites polygonales fusiformes	monocouche assez homogène
50 $\mu\text{g/ml}$	10 jours	polygonales cellules très allongées	monocouche peu homogène avec zones cellules avec prolongements
Témoin	12 jours	polygonales fusiformes	monocouche assez homogène

Tableau VIII : Effet de concentrations croissantes en fraction A sur les cellules endothéliales après 3 repiquages.

	Confluence	Forme des cellules	Aspect général de la boîte
Fraction B.			
5 µg/ml	8 jours	polygonales	monocouche très homogène
10 µg/ml	8 jours	polygonales cellules plus allongées	monocouche homogène avec zones en faisceaux
50 µg/ml	8 jours	polygonales fusiformes	monocouche peu homogène présence de faisceaux de cellules allongées
Témoin	10 jours	petites polygonales	monocouche homogène

Tableau IX : Effet de concentrations croissantes en fraction B sur les cellules endothéliales après 3 repiquages.

	Confluence	Forme des cellules	Aspect général de la boîte
Fraction C.			
5 µg/ml	8 jours	petites polygonales	monocouche très homogène
10 µg/ml	8 jours	polygonales	monocouche homogène
50 µg/ml	8 jours	petites polygonales fusiformes	monocouche assez homogène
Témoin	8 jours	polygonales	monocouche homogène

Tableau X : Etude de concentrations croissantes en fraction C sur les cellules endothéliales après 3 repiquages.

	Confluence	Forme des cellules	Aspect général de la boîte
Fraction D. 5 µg/ml	8 jours	polygonales fusiformes	monocouche peu homogène
10 µg/ml	8 jours	polygonales fusiformes	monocouche peu homogène
50 µg/ml	8 jours	polygonales fusiformes	monocouche peu homogène
Témoin	8 jours	polygonales	monocouche homogène

Tableau XI : Etude de concentrations croissantes en fraction D sur les cellules endothéliales après 3 repiquages.

Remarque

Dans toutes les boîtes de cette expérience, nous devons signaler la présence de grandes cellules semblables à celles observées précédemment.

2° Microscopie électronique à transmission

Les observations en microscopie électronique des cellules mises en culture avec des doses variables de chaque fraction du facteur de croissance ne nous apportent aucune information supplémentaire sur son action.

Pour toutes les fractions, avec les concentrations de 5, 10 et 50 µg/ml de milieu, les cellules peuvent être décrites de manière identique.

Nous observons - des cellules endothéliales normales.

(voir paragraphe III B 2).

- des cellules endothéliales allongées, un peu plus grandes avec la même composition en organites mais contenant un nombre plus important de vacuoles.

- des cellules endothéliales polygonales (ou ovales) avec un réticulum endoplasmique rugueux développé, des dictyosomes allongés et assez plats, des mitochondries en quantité normale, des microtubules et des microfilaments intermédiaires en assez grand nombre. Elles contiennent peu de vésicules claires.

Remarque : les cultures en présence de 50 µg / ml des fractions B et C contiennent une proportion importante de cellules caractérisées par un noyau très pâle montrant un début de lyse, de nombreuses vacuoles d'autophagie et des figures myéliniques (fig. 69, 70 et 71).

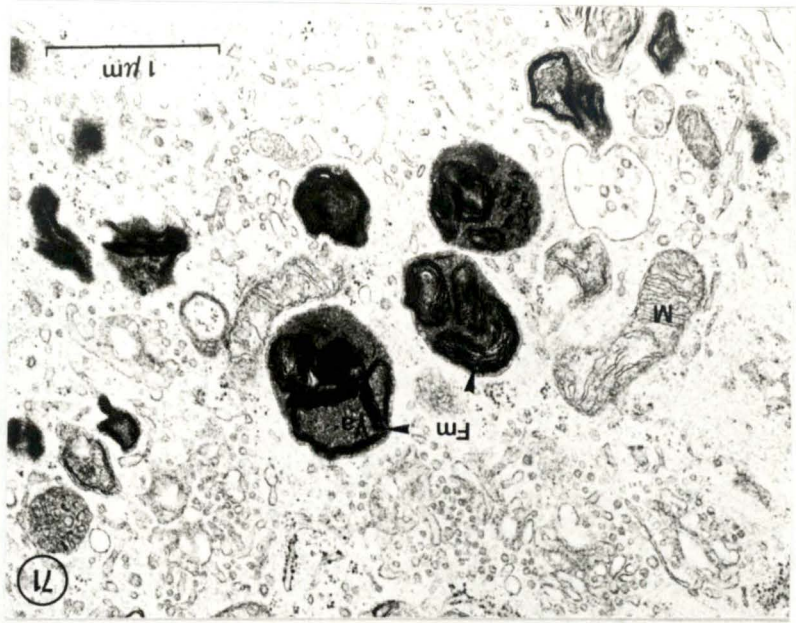
De telles cellules ne sont pas observées dans les témoins.

Planche XXXIII

Fig. 69 Vacuoles contenant des débris peu denses aux électrons (Vd) dans une cellule endothéliale provenant d'une culture en présence de 50 μg / ml de la fraction B du facteur de croissance (troisième repiquage).
Noter la dégradation d'une mitochondrie (tête de flèche).
M : mitochondrie.

Fig. 70 Nombreuses vacuoles d'autophagie (Va) dans une cellule endothéliale provenant d'une culture en présence de 50 μg / ml de la fraction B du facteur de croissance (troisième repiquage).
M : mitochondrie.

Fig. 71 Figures myéliniques (Fm) dans les vacuoles d'autophagie (Va) d'une cellule endothéliale provenant d'une culture en présence de 50 μg / ml de la fraction C du facteur de croissance (troisième repiquage).



3. Discussion

Le facteur de croissance préparé à partir du cerveau bovin semble stimuler la croissance des cellules endothéliales bovines en culture et permettre l'accroissement de la densité cellulaire à confluence.

Nos observations confirment celles de Gordon and al. (1983) sur les cellules endothéliales humaines.

Les observations en microscopie à contraste de phase montrent une réponse similaire des cellules aux diverses fractions du facteur protéique en ce qui concerne la croissance et la densité cellulaire. Cependant, nous remarquons que les fractions A et B favorisent un maintien plus strict de la monocouche endothéliale.

Les résultats concordent pour les cellules provenant de premières cultures et après 1 et 2 repiquages.

Les études effectuées en microscopie électronique à transmission montrent peu de variations au niveau de l'ultrastructure des cellules provenant de cultures en présence du facteur de croissance.

Cependant, nous notons, principalement avec les fractions A et B, une proportion plus grandes de cellules contenant un réticulum endoplasmique rugueux développé, des dictyosomes étendus et un plus grand nombre d'éléments du cytosquelette.

Ces caractéristiques pourraient être mises en relation avec un accroissement des synthèses protéiques et du métabolisme des cellules qui reçoivent le facteur protéique stimulant.

L'utilisation de concentrations différentes pour chaque fraction ne permet pas de compléter nos observations. Les cellules endothéliales conservent un modèle de croissance régulier préférentiellement avec les fractions A et B pour des doses de 5, 10 et 50 µg / ml.

Dans les dernières expériences, nous constatons une diminution de l'activité du facteur de croissance due au fait que nos milieux de culture sont décongelés lors de chaque changement.

Ceci est en accord avec les résultats de Gordon and al. (1983); ils ont observé une décroissance de l'activité du facteur de croissance d'environ 50 % après plusieurs cycles de congélation - décongélation.

En référence aux poids moléculaires donnés dans la littérature (Maciag and al. , 1981), nous situons l'activité de l'"endothelial cell growth factor" dans la fraction B. Mais les autres fractions agissent aussi sur nos cultures.

Pour expliquer ce fait, nous émettons trois suggestions:

1° la présence du facteur protéique dans les quatre fractions - mais préférentiellement dans la fraction B - due à l'incomplète purification.

2° la présence sur les cellules endothéliales de récepteurs différents pour plusieurs protéines du facteur de croissance.

3° l'action du facteur de croissance sur des récepteurs peu spécifiques des cellules endothéliales.

Heldin and Westermak (1984) proposent un mécanisme d'action des facteurs de croissance : il consiste en une fixation sur des récepteurs entraînant la production d'un système messager intracellulaire qui conduit à l'initiation de la synthèse du DNA et à la division cellulaire.

Les caractéristiques de ces interactions ne sont pas encore élucidées. D'autre part, Connolly and al. (1984) remarquent que l'addition d'un facteur de croissance favorise la formation des "coated pits", sites récepteurs dans l'incorporation d'hormones peptidiques et autres macromolécules.

IV. CONCLUSIONS

Notre but premier en commençant ce travail était la mise en culture et la caractérisation des cellules endothéliales de l'aorte bovine. Nous avons réussi, en modifiant légèrement les techniques décrites dans la littérature, à obtenir des cultures de cellules endothéliales typiques, susceptibles d'être repiquées et de conserver leur phénotype caractéristique pendant un certain temps.

La mise en évidence de l'antigène du facteur VIII en immunofluorescence est une méthode sûre et reproductible d'identification de ces cellules.

L'étude de l'ultrastructure nous paraît aussi très importante à réaliser pour suivre les modifications des organites intracellulaires. Nous gardons à ce sujet un point d'interrogation concernant les appareils de Golgi hyperdéveloppés observés à plusieurs reprises.

Il est évident que nous ne pouvons tirer aucune conclusion ferme des expériences concernant l'influence du facteur de croissance. Elles doivent être considérées tout au plus comme une indication de la non-toxicité du facteur isolé pour les cellules endothéliales aortiques bovines.

Par ailleurs, aucune des données concernant la densité des cellules n'est rigoureusement quantitative comme nous l'avons signalé dès le départ. Il serait intéressant de les confirmer en les répétant d'une part et d'autre part en essayant de comparer l'effet du substrat et celui du facteur de croissance isolément ou en combinaison.

Un des principaux effets de l'"endothelial cell growth factor" semble être sa capacité de prolonger la durée de vie in vitro des cellules endothéliales humaines (Maciag and al. , 1982).

Il pourrait donc se révéler très important dans l'étude du vieillissement des cellules endothéliales. De plus, en présence de ECGF, il semble que les besoins en sérum des cellules endothéliales humaines en croissance soient diminués, ce qui représente un autre avantage puisque ces besoins sont de l'ordre de 20 à 30 %.

Dans le cadre de la recherche du laboratoire, l'intérêt de la mise en culture des cellules endothéliales de l'aorte bovine parallèlement à celle des cellules endothéliales ombilicales humaines sous semble évident.

La veine ombilicale humaine représente un tissu trophoblastique extrafoetal qui est programmé avec son placenta pour une durée de vie fonctionnelle normale d'environ neuf mois.

Il nous paraissait donc nécessaire d'avoir la possibilité de vérifier les résultats obtenus avec ce type de cellules endothéliales par des contrôles réalisés sur un autre type de cellule endothéliale, à potentiel réplicatif plus élevé à savoir les cellules endothéliales aortiques bovines.

Les affections du système artériel - fréquentes et d'une grande importance clinique dans l'espèce humaine - sont rares et sans conséquence clinique connue chez les bovins.

L'absence d'athérogenèse chez ces animaux désigne les cultures de cellules endothéliales bovines comme contrôles vis-à-vis des cultures de cellules endothéliales humaines.

Il sera intéressant de comparer in vitro les réponses des cellules endothéliales humaines et bovines à certaines substances présentes in vivo dans les conditions normales et pathologiques.

ANNEXE

Stress fibers

Les stress fibers sont représentées par des faisceaux de filaments d'actine et de protéines associées.

Franke (1984) provoque l'apparition de fibres de stress dans des cellules endothéliales humaines en culture en soumettant ces dernières à des forces de cisaillement. Il montre que ces fibres contiennent de l'actine, elles sont visualisées par des marqueurs fluorescents. Leur rôle serait de protéger les cellules contre les dommages hydrodynamiques, et de ce fait la paroi vasculaire contre certains stimuli pathologiques - par exemple ceux qui interviennent dans l'initiation de l'athérosclérose.

En microscopie à contraste de phase, nous remarquons la présence de ces fibres dans les cellules endothéliales de nos préparations d'immunofluorescence.

Les cellules de lames manipulées selon cette technique mais sans ajouter les anticorps montrent les mêmes images.

Ne disposant pas d'anticorps anti-actine, nous ne pouvons affirmer qu'il s'agit bien de fibres de stress, mais leur disposition caractéristique nous paraît suffisante pour le supposer fortement.

Elles sont observées sans marquage particulier dans les cellules des zones où le milieu de montage s'est retiré (fig. 72 et 73).

Ces fibres sont plus nombreuses dans la périphérie du cytoplasme, elles parcourent l'entièreté de la cellule (fig. 74 et 75).

Elles sont présentes dans les cellules de toutes tailles.

Leur observation résulte soit de la rétraction des cellules lors de l'assèchement, soit d'une différence d'indice de réfraction entre les zones asséchées et les zones recouvertes de liquide.

Le contraste de phase pour l'examen des fibres de stress est une technique plus aisée que celles des marquages par immunofluorescence. C'est dans cet intérêt qu'il nous est paru intéressant de citer ces observations.

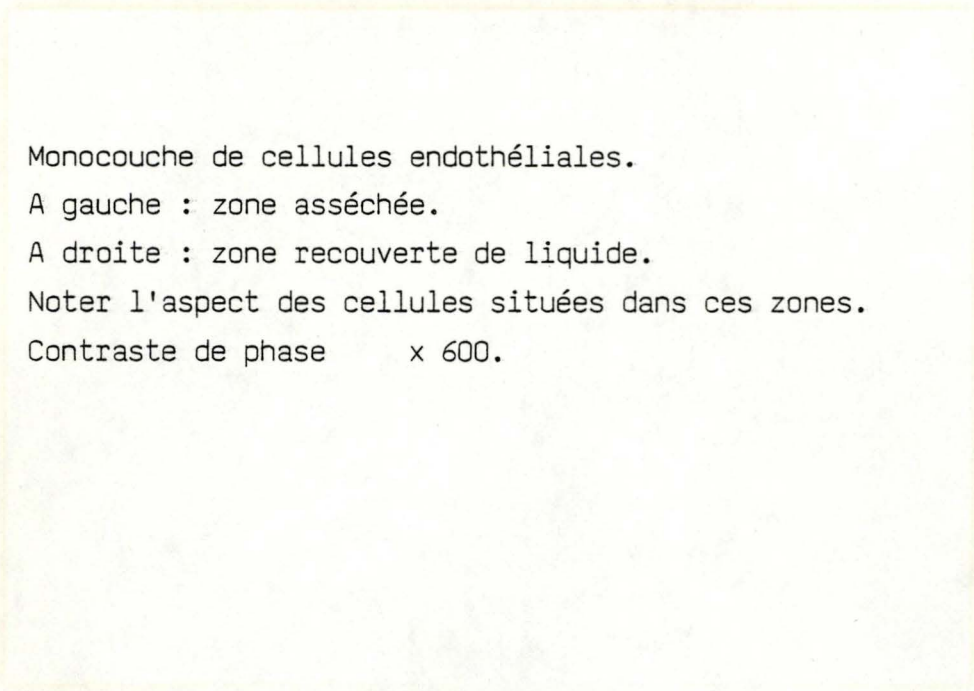


Fig. 72 Monocouche de cellules endothéliales.
A gauche : zone asséchée.
A droite : zone recouverte de liquide.
Noter l'aspect des cellules situées dans ces zones.
Contraste de phase x 600.

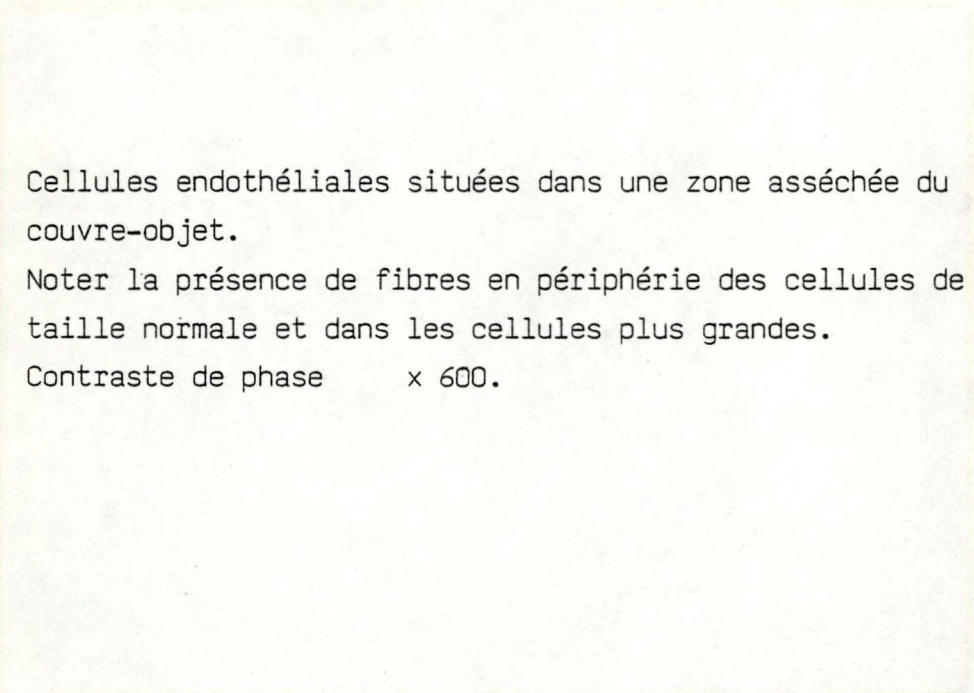


Fig. 73 Cellules endothéliales situées dans une zone asséchée du
couvre-objet.
Noter la présence de fibres en périphérie des cellules de
taille normale et dans les cellules plus grandes.
Contraste de phase x 600.

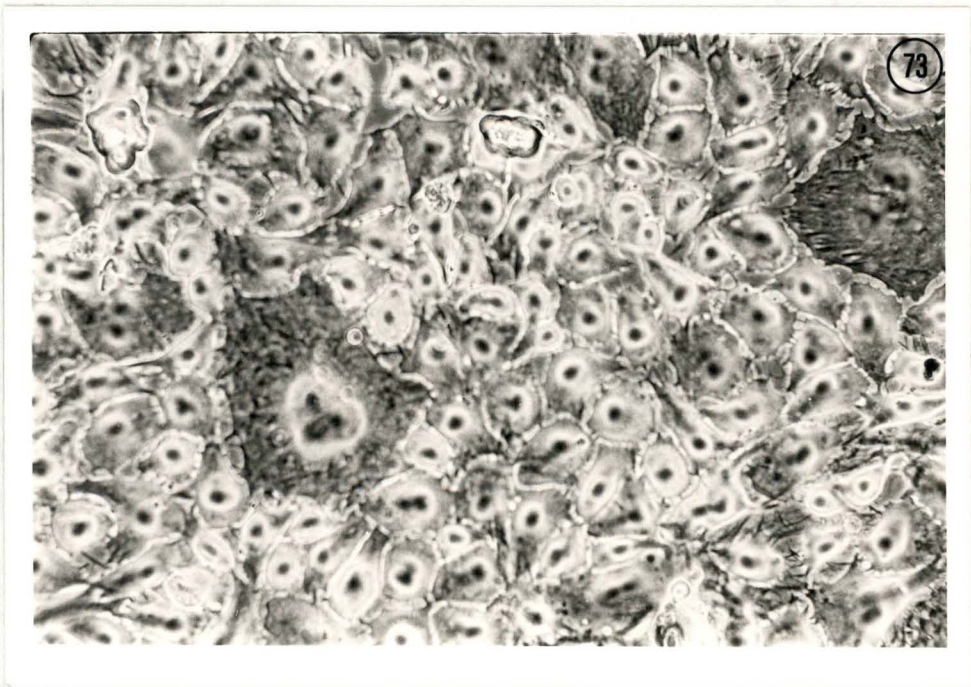
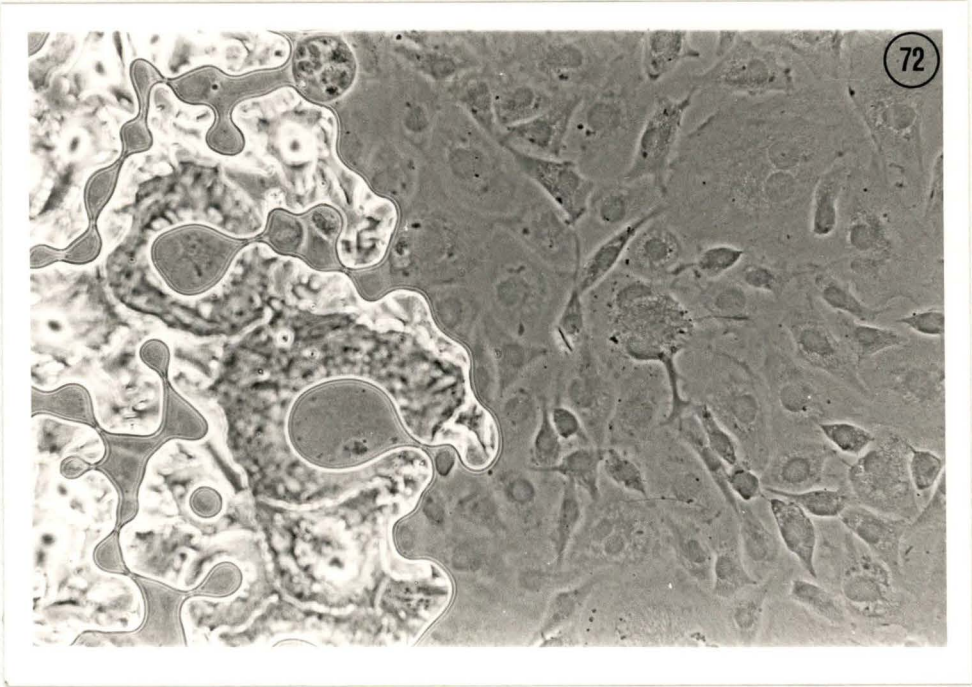


Planche XXXV

Fig. 74 Fibres de stress dans des cellules endothéliales. Le liquide de montage subsiste au niveau de la région nucléaire des cellules.

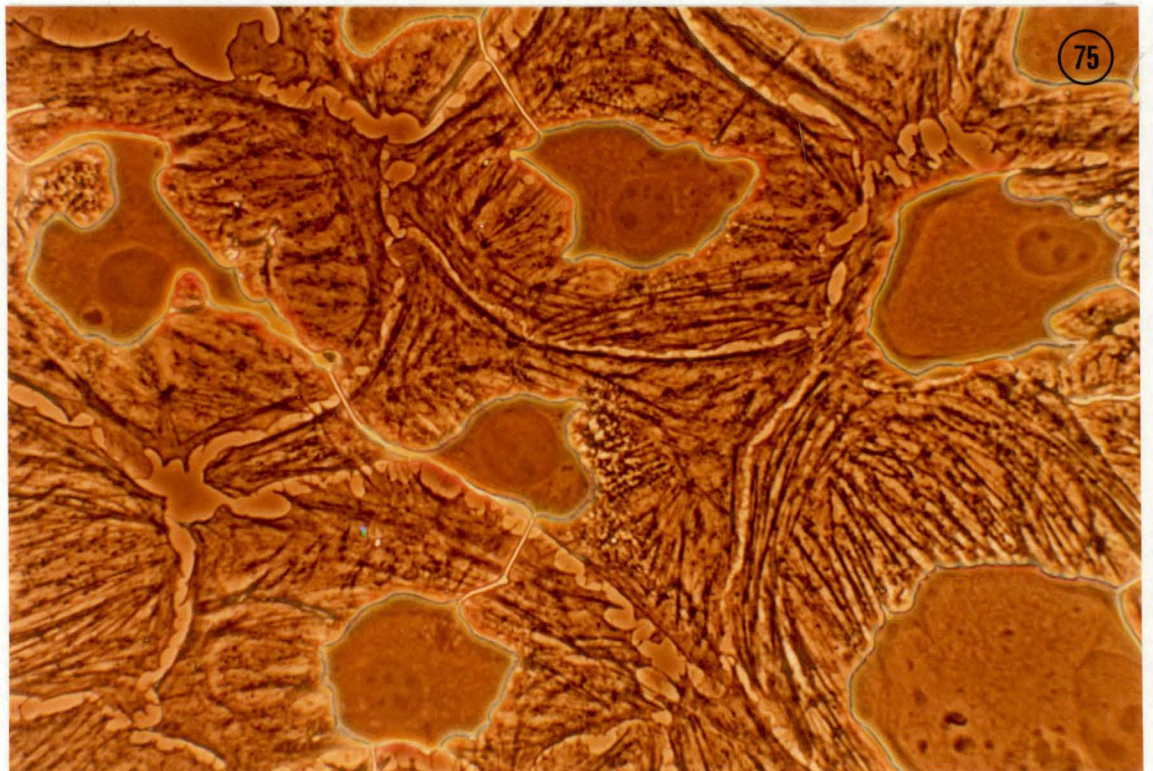
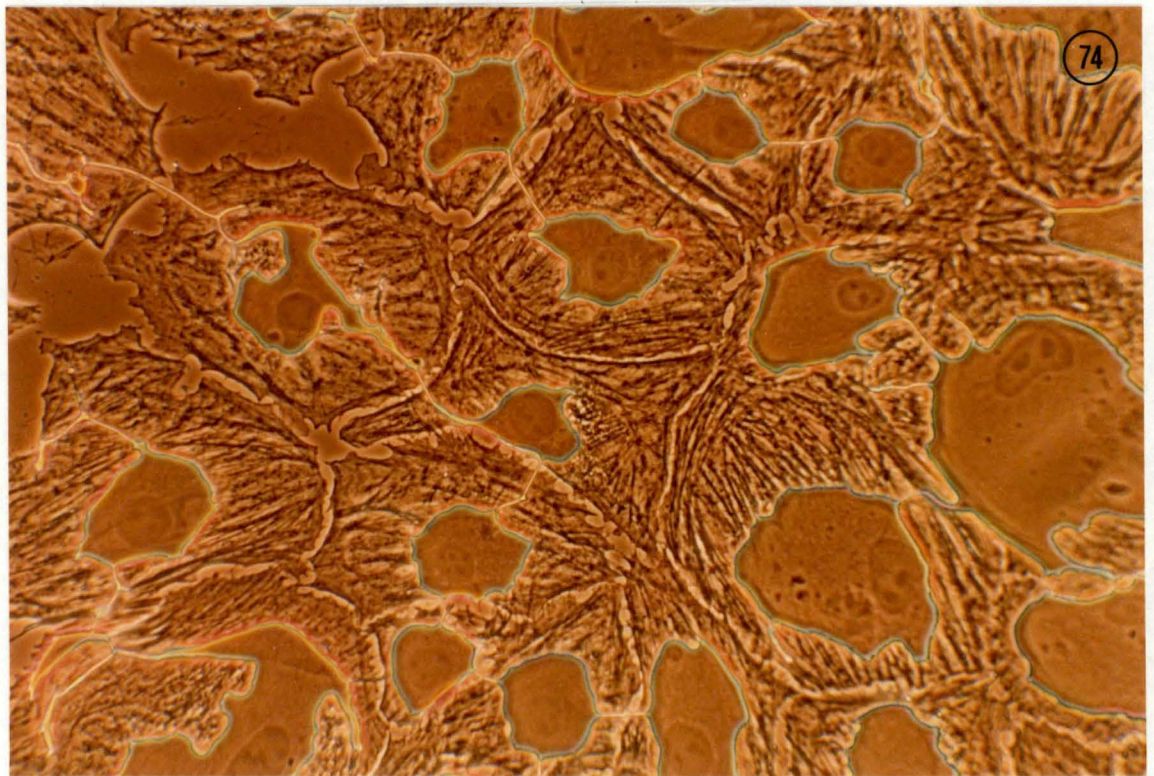
Noter l'orientation des fibres.

Contraste de phase x 770.

Fig. 75 Fibres de stress dans des cellules endothéliales (idem fig. 74).

Noter la bordure cellulaire découpée au niveau des points de contact de la cellule avec son substrat.

Contraste de phase x 1230.



BIBLIOGRAPHIE

- BALCONI G. , PIETRA A. , BUSACCA M. , DE GAETANO G. and DEJANA E.
Success rate of primary human endothelial cell culture from umbilical cords is influenced by maternal and fetal factors and interval from delivery.
IN VITRO , 19 : 807 - 810 , 1983.
- BENSCH K.G. , DAVISON P.M. and KARASEK M.A.
Factors controlling the in vitro growth pattern of human microvascular endothelial cells.
J. ULTRASTRUCT. RES. , 82 : 76 - 89 , 1983.
- BIRDWELL C. , GOSPODAROWICZ D. and NICOLSON G.L.
Identification, localization , and role of fibronectin in cultured bovine endothelial cells.
PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A. , 75 : 3273 - 3277 , 1978.
- BOOYSE F.M. , SEDLAK B.J. and RAFELSON M.E.
Culture of arterial endothelial cells.
Characterization and growth of bovine aortic cells.
THROMB. DIA. HAEMORRH. (Stuttg.) , 34 : 825 - 839 , 1975.
- CHESTERMAN C.N. , AGER A. and GORDON J.L.
Regulation of prostaglandin production and cetoenzymes activities in culture of aortic endothelial cells.
J. CELL. PHYSIOL. , 116 : 45 - 50 , 1983.
- CONNOLLY J.L. , GREEN S.A. and GREENE L.A.
Comparison of rapid changes in surface morphology and coated pit formation of P C 12 cells in response to nerve growth factor, epidermal growth factor, and dibutyryl cyclic AMP.
J. CELL BIOL. , 98 : 457 - 465 , 1984.

- DANIEL M. , HANCOCK A. , EDWARDS D. , MC EVOY F. and WALKER C.
Sprouting in cultures of endothelium from human umbilical veins.
EUR. J. CELL BIOL. , 31 : 14 , 1983.
- DAVIGNON J.
The lipid hypothesis. Physiopathological basis.
ARCH. SURG. , 113 : 28 , 1978.
- DAVISON P.M. and KARASEK M.A.
Human dermal microvascular endothelial cells in vitro : effect of cyclic AMP on cellular morphology and proliferation rate.
J. CELL. PHYSIOL. , 106 : 253 - 258 , 1981.
- DAY C. , PHILLIPS W.A. and SCHURR P.E.
Animal models for an integrated approach to the pharmacologic control of atherosclerosis.
ARTERY , 5 : 90 - 109 , 1979.
- DUGUID M.B.
Thrombosis as a factor in the pathogenesis of coronary atherosclerosis.
PATHOL. BACTERIOL. , 60 : 57 - 61 , 1946.
- DUTHU G.S. and SMITH J.R.
In vitro proliferation and lifespan of bovine aorta endothelial cells : Effect of culture conditions and fibroblast growth factor.
J. CELL. PHYSIOL. , 103 : 385 - 392 , 1980.
- ESKIN S.G. , SYBERS H.D. , TREVINO L. , LIE J.T. and CHIMOSKEY J.E.
Comparison of tissue-cultured bovine endothelial cells from aorta and saphenous vein.
IN VITRO , 14 : 903 - 910 , 1978.
- FEDER J. , MARSA J.C. and OLANDER J.V.
The formation of capillary-like tubes by calf aortic endothelial cells grown in vitro.
J. CELL. PHYSIOL. , 116 : 1 - 6 , 1983.

FOLKMAN J. , HAUDENSCHILD C.C. and ZETTER B.R.

Long-term culture of capillary endothelial cells.

PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A. , 76 : 5217 - 5221 , 1979.

FRANKE R.P. , GRAFE M. , SCHNITTLER H. , SEIFFGE D. and MITTERMAYER C.

Induction of human vascular endothelial stress fibers by fluid shear stress.

NATURE , 307 : 648 - 649 , 1984.

FRANKE W.W. , SCHMID E. , OSBORN M. and WEBER K.

Intermediate-sized filaments of human endothelial cells.

J. CELL BIOL. , 81 : 570 - 580 , 1979.

FRYER D.G. , BIRNBAUM G. and LUTTRELL C.N.

Human endothelium in cell culture.

J. ATHEROSCLER. RES. , 6 : 151 - 153 , 1966.

GIMBRONE M.A. , COTRAN R.S. and FOLKMAN J.

Human vascular endothelial cells in culture.

Growth and DNA synthesis.

J. CELL BIOL. , 60 : 673 - 684 , 1974.

GORDON P.B. , SUSSMAN I.I. and HATCHER V.B.

Long-term culture of human endothelial cells.

IN VITRO , 19 : 661 - 671 , 1983.

GOSPODAROWICZ D. , MORAN J.S. , BRAUN D.L. and BIRDWELL C.

Clonal growth of bovine vascular endothelial cells : fibroblast growth factor as a survival agent.

PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A. , 73 : 4120 - 4124 , 1976.

GOSPODAROWICZ D. , MORAN J.S. and BRAUN D.L.

Control of proliferation of bovine vascular endothelial cells.

J. CELL. PHYSIOL. , 91 : 377 - 386 , 1977.

GOSPODAROWICZ D. , BROWN K.D. , BIRDWELL C.R. and ZETTER B.R.

Control of proliferation of human vascular endothelial cells.
Characterization of the response of human umbilical vein endothelial cells to fibroblast growth factor, epidermal growth factor, and thrombin.

J. CELL BIOL. , 77 : 774 - 788 , 1978. a

GOSPODAROWICZ D. , GREENBURG G. , BIALECKI H. and ZETTER B.R.

Factors involved in the modulation of cell proliferation in vivo and in vitro : the role of fibroblast and epidermal growth factors in the proliferative response of mammalian cells.

IN VITRO , 14 : 85 - 118 , 1978. b

GOSPODAROWICZ D. , BIALECKI H. and GREENBURG G.

Purification of the fibroblast growth factor activity from bovine brain.

J. BIOL. CHEM. , 253 : 3736 - 3743 , 1978.

GOSPODAROWICZ D. , CHENG J. and LIRETTE M.

Bovine brain and pituitary fibroblast growth factor: comparison of their abilities to support the proliferation of human and bovine vascular endothelial cells.

J. CELL BIOL. , 97 : 1677 - 1685 , 1983.

HAHN G.L. and POLGAR P.R.

Prostaglandin production in phenotypically distinct cultured bovine pulmonary artery endothelium.

ATHEROSCLEROSIS , 51 : 143 - 150 , 1984.

HAM R.G. and MC KEEHAN N.L.

Development of improved media and culture conditions for clonal growth of normal diploid cells.

IN VITRO , 14 : 11 - 22 , 1978.

- HAUDENSCHILD C.C. , COTRAN R.S. , GIMBRONE M.A. and FOLKMAN J.
Fine structure of vascular endothelium in culture.
J. ULTRASTRUCT. RES. , 50 : 22 - 32 , 1975.
- HAUDENSCHILD C.C. , ZAHNISER D. , FOLKMAN J. and KLAGSBRUN M.
Human vascular endothelial cells in culture.
Lack of response to serum growth factors.
EXP. CELL. RES. , 98 : 175 - 183 , 1976.
- HELDIN C.H. and WESTERMAK B.
Growth factors : mechanism of action and relation to oncogenes
CELL , 37 : 9 - 20 , 1984.
- HENRIKSEN T. , EVENSEN S.A. , ELGJO R.F. and VEFLING A.
Human fetal endothelial cells in culture.
SCAND. J. HAEMATOL. , 14 : 233 - 241 , 1975.
- HORMIA M. , LEHTO V.P. and VIRTANEN I.
Factor VIII related Antigen.
A pericellular matrix component of cultured human endothelial cells.
EXP. CELL. RES. , 149 : 483 - 497 , 1983.
- HOYER L.W. , DE LOS SANTOS R.P. and HOYER J.R.
Antihemophilic factor antigen.
Localization in endothelial cells by immunofluorescent microscopy.
J. CLIN. INVEST. , 52 : 2737 - 2744 , 1973.
- JAFFE E.A. , NACHMAN R.L. , BECKER C.G. and MINICK C.R.
Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins.
J. CLIN. INVEST. , 52 : 2745 - 2756 , 1973.
- JAFFE E.A. , HOYER L.W. and NACHMAN R.L.
Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human
endothelial cells.
J. CLIN. INVEST. , 52 : 2757 - 2764 , 1973

JAFFE E.A. , HOYER L.W. and NACHMAN R.L.

Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells.

PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A. , 71 : 1906 - 1909 , 1974.

JAFFE E.A.

Endothelial cells and the biology of factor VIII.

N. ENGL. J. MED. , 296 : 377 - 383 , 1977.

JAFFE E.A. and MOSHER D.F.

Synthesis of fibronectin by cultured human endothelial cells.

J. EXP.MED. , 147 : 1779 - 1790 , 1978.

JAFFE E.A.

Culture of human endothelial cells.

TRANSPL. PROC. Vol XII , N°3 , Suppl. 1 : 49 - 53 , 1980.

KING G.L. , BUZNEY J.M. , KAHN C.R. , HETU N. , BUCHWALD S ,
MACDONALD S.G. and RAND L.I.

Differential responsiveness to insulin of endothelial and support cells from micro - and macrovessels.

J. CLIN. INVEST. , 71 : 974 - 979 , 1983.

KING G.L. and BUCHWALD S.

Characterization and partial purification of an endothelial cell growth factor from human platelets.

J. CLIN. INVEST. , 73 : 392 - 396 , 1984.

LAZZARINI - ROBERTSON A.

Effects of heparin on the uptake of lipids by isolated human and animal arterial endothelial type cells.

ANGIOLOGY , 12 : 525 - 534 , 1961.

LEMMON S.K. , RILEY M.C. , THOMAS K.A. , HOOVER G.A. , MACIAG T.
and BRADSHAW R.A.

Bovine fibroblast growth factor : comparison of brain and
pituitary preparations.

J. CELL BIOL. : 95 : 161 - 169 , 1982.

MACARAK E.J. and HOWARD P.S.

Adhesion of endothelial cells to extracellular matrix protein.

J. CELL. PHYSIOL. : 116 : 76 - 86 , 1983.

LONGENECKER J.P. , KILTY L.A. , RIDGE J.A. , MILLER D.C. and JOHNSON L.K.

Proliferative variability of endothelial clones derived from
adult bovine aorta : influence of fibroblast growth factor and
smooth muscle cell extracellular matrix.

J. CELL. PHYSIOL. , 114 : 7 - 15 , 1983.

MACIAG T. , CERUNDOLO J. , ILSLEY S. , KELLEY P.R. and FORAND R.

An endothelial cell growth factor from bovine hypothalamus:
identification and partial characterization.

PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A. , 76 : 5674 - 5678 , 1979.

MACIAG. T. , HOOVER G.A. , STEMERMAN M.B. and WEINSTEIN R.

Serial propagation of human endothelial cells in vitro.

J. CELL BIOL. , 91 : 420 - 426 , 1981.

MACIAG T. , KADISH J. , WILKINS L. , STEMERMAN M.B. and WEINSTEIN R.

Organizational behavior of human umbilical vein endothelial
cells.

J. CELL BIOL. , 94 : 511 - 520 , 1982.

MACIAG T. , HOOVER G.A. and WEINSTEIN R.

High and low molecular weight forms of endothelial cell growth
factor.

J. BIOL. CHEM. , 257 : 5333 - 5336 , 1982.

MANO Y. , SAWASAKI Y. , TAKAHASHI K. and GOTO T.

Cultivation of arterial endothelial cells from human umbilical cord.

EXPERIENTIA , 39 : 1144 - 1146 , 1983.

MARUYAMA Y.

The human endothelial cell in tissue culture.

Z. ZELLFORSCH , 60 : 69 - 79 , 1963.

MILLER R.C. , NICHOLS W.W. , POTTASH J. and ARONSON M.M.

In vitro aging. Cytogenetic comparison of diploid human fibroblast and epithelioid cell lines.

EXP. CELL. RES. , 110 : 63 - 73 , 1977.

PARRY E.W. and ABRAMOVICH D.R.

The ultrastructure of human umbilical vessel endothelium from early pregnancy to full term.

J. ANAT. , 111 : 29 - 42 , 1972.

RAES M. and REMACLE J.

Ageing of hamster embryo fibroblasts as the result of both differentiation and stochastic mechanisms.

EXP. GERONT. , 18 : 223 - 240 , 1983.

RAES M. , GEUENS G. , DE BRABANDER M. and REMACLE J.

Microtubules and microfilaments in ageing hamster embryo fibroblasts in vitro.

EXP. GERONT. , 18 : 241 - 254 , 1983.

REPIN V.S. , DOLGOV V.V. , ZAIKINA O.E. , NOVIKOV I.D. , ANTONOV A.S.
NIKOLAEVA M.A. and SMIRNOV V.N.

Heterogeneity of endothelium in human aorta.

ATHEROSCLEROSIS , 50 : 35 - 52 , 1984.

ROKITANSKY C.

A MANUAL OF PATHOLOGICAL ANATOMY , Vol 4.

LONDON , SYDENHAM , pp 261 - 273.

ROSEN E.M. , MUELLER S.N. , NOVERAL J.P. and LEVINE E.M.

Proliferative characteristics of clonal endothelial cell strains.

J. CELL. PHYSIOL. , 107 : 123 - 137 , 1981.

ROSS R.

The smooth muscle cell.

II. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers.

J. CELL BIOL. , 50 : 172 - 186 , 1971.

ROSS R. and GLOMSET J.A.

La pathogenèse de l'athérosclérose.

ARS MEDICI , 33 : 949 - 981 , 1978.

RYAN U.S. , CLEMENTS E. , HABLISTON D. and RYAN J.W.

Isolation and culture of pulmonary artery endothelial cells.

TISSUE AND CELL , 10 : 535 - 554 , 1978.

SAVION N , VLODAVSKY I., GREENBURG G. and GOSPODAROWICZ D.

Synthesis and distribution of cytoskeletal elements in endothelial cells as a function of cell growth and organization.

J. CELL. PHYSIOL. , 110 : 129 - 141 , 1982.

SCHWARTZ S.M.

Selection and characterization of bovine aortic endothelial cells.

IN VITRO , 14 : 966 - 980 , 1978.

SCHWARTZ S.M. , SELDEN S.C. and BOWMAN P.

Growth control in aortic endothelium at wound edges.

HORMONES AND CELL CULTURE.

SATO G.H. and ROSS R. , 593 - 610

COLD SPRING HARBOR LABORATORY , 1979.

SENGEL A. and STOEIBNER P.

Golgi origin of tubular inclusions in endothelial cells.

J. CELL BIOL. , 44 : 223 - 226 , 1970.

SHING Y. , FOLKMAN J. , SULLIVAN R. , BUTTERFIELD C. , MURRAY J and
KLAGSBRUN M.

Heparin affinity : purification of a tumor-derived capillary
endothelial cell growth factor.

SCIENCE , 223 : 1296 - 1298 , 1984.

THOMAS W.A. and KIM D.N.

Biology of disease : atherosclerosis as a hyperplastic and / or
neoplastic process.

LAB. INVEST. , 48 : 245 , 1983.

THOMAS K.A. , RIOS-CANDELORE M. and FITZPATRICK S.

Purification and characterization of acidic fibroblast growth
factor from bovine brain.

PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A. , 81 : 357 - 361 , 1984.

THORGEIRSSON G. and ROBERTSON A.L.

The vascular endothelium. Pathobiologic significance.

AM. J. PATHOL. , 93 : 803 - 848 , 1978.

TSENG S.C.G. , SAVION N. , STERN R. and GOSPODAROWICZ D.

Fibroblast growth factor modulates synthesis of collagen in
cultured vascular endothelial cells.

EUR. J. BIOCHEM. , 122 : 355 - 360 , 1982.

TSENG S.C.G. , SAVION N. , GOSPODAROWICZ D. and STERN R.

Modulation of collagen synthesis by a growth factor and by the
extracellular matrix : comparison of cellular response to two
different stimuli.

J. CELL BIOL. , 97 : 803 - 809 , 1983.

VESSELINOVITCH D.

Animal models of atherosclerosis , their contributions and pitfalls.

ARTERY , 5 : 193 - 206 , 1979.

VIRCHOW R.

Phlogose und thrombose in gefasssystem.

GESAMMELTE ABHANDLUNGEN ZUR WISSENSCHAFTLICHEN MEDICIN, MEIDINGER SOHN AND CO , FRANKFURT , p 458 , 1856.

WAGNER D. , OLMSTED J. and MARDER V.

Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells.

J. CELL BIOL. , 95 : 355 , 1982.

WATANABE K. and TANAKA K.

Influence of fibrin, fibrinogen and fibrinogen degradation products on cultured endothelial cells.

ATHEROSCLEROSIS , 48 : 57 - 70 , 1983.

WEIBEL E.R. and PALADE G.

New cytoplasmic components in arterial endothelia.

J. CELL BIOL. , 23 : 101 - 112 , 1964.

WISSLER R.W.

The emerging cellular pathobiology of atherosclerosis.

ARTERY , 5 : 409 - 423 , 1979.