

LAURIE MARTINEAU

**CONDITIONS OPTIMALES À INDUIRE UNE
ANGIOGÉNÈSE DANS DES SYSTÈMES DE CULTURES
TRIDIMENSIONNELLES**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en biologie cellulaire et moléculaire
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)

FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2007

RÉSUMÉ

L'angiogénèse consiste en la formation de vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Une des limites du génie tissulaire est la néovascularisation de l'implant assurant la survie des cellules incorporées dans le biomatériau. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés, dans un premier temps, à la création d'un système vasculaire dans des masses de taille de plus en plus volumineuse composées de fibrine et de collagène cultivées dans un bioréacteur. Les cellules endothéliales incorporées dans la masse ont formé quelques micro-vaisseaux de manière aléatoire. Afin d'orienter ces vaisseaux, nous avons essayé d'une part, d'incorporer des fibroblastes dans une masse centrale et d'autre part, de créer une hypoxie au centre. L'utilisation d'une telle matrice «composite» n'a pas permis de créer d'hypoxie dans le centre de la masse. Les fibroblastes situés au centre ont colonisé la périphérie de la masse inhibant ainsi les cellules endothéliales à former une angiogénèse. Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés aux interactions cellules-cellules dans un environnement tridimensionnel au cours de l'angiogénèse. Les cellules étaient soit dispersées dans une matrice de fibrine, soit ensemencées à la surface de micro-billes (Cytodex) ou de macro-billes (billes de collagène). Concernant les cellules isolées, nous avons déterminé qu'il fallait une densité d'au moins de 4×10^4 cellules/ml pour induire une angiogénèse. En revanche, pour une densité cellulaire similaire, la surface angiogénique a augmenté de 5 et 3 fois respectivement, pour les micro- et macro-billes. Un réseau angiogénique a pu se former entre les micro-billes contrairement aux macro-billes. Au vue des résultats obtenus, les micro-billes sembleraient être une bonne alternative pour la néovascularisation d'implants et permettraient de réduire le nombre de cellules endothéliales lors de l'ensemencement.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr. Charles Doillon pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire pendant ma maîtrise et de m'avoir fourni un projet varié et enrichissant. Je le remercie de m'avoir partagé ses connaissances scientifiques. Je tiens à lui témoigner ma reconnaissance pour sa gentillesse, sa compréhension, sa disponibilité, sa patience et sa bonne humeur tout au long de ces deux années de maîtrise.

Je tiens ensuite à remercier Renée Paradis pour sa formation pratique, ses conseils techniques et pour son amitié.

Je voudrais également remercier le Dr. Catherine Gerard pour ses précieux conseils tant au niveau professionnel qu'au niveau personnel. Je tiens aussi à la remercier pour son aide à la correction de ce manuscrit, pour son soutien et sa grande amitié.

Je tiens à remercier mes parents, ma sœur et Maxime pour leur patience et soutien de tous les jours.

TABLES DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	II
REMERCIEMENTS	III
TABLE DES MATIÈRES	IV
LISTE DES TABLEAUX	VI
LISTE DES FIGURES	VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	IX
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	1
1.1. VASCULOGENÈSE ET ANGIOGENÈSE	1
1.1.1. Cellules formant les vaisseaux sanguins	4
1.1.1.1. Cellules endothéliales	4
1.1.1.2. Cellules murales	4
1.1.2. Matrice extracellulaire	6
1.1.2.1. Fibrinogène et fibrine	7
1.1.3. Intégrines	9
1.1.3.1. $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 5$	9
1.1.3.2. Autres intégrines	11
1.1.4. Facteurs pro- et anti-angiogéniques	12
1.1.4.1. VEGF	12
1.1.4.2. Système angiotensin II/Tie 2	13
1.1.4.3. FGF-2	13
1.1.4.4. Facteurs anti-angiogéniques	14
1.1.5. Cadhérines	15
1.1.5.1. VE-cadhérine	15
1.1.5.2. N-cadhérine	16
1.1.6. L'hypoxie dans l'angiogénèse	16
1.2. MODÈLES D'ANGIOGENÈSE	17
1.2.1. Modèles <i>in vitro</i> en 2-dimensions	18
1.2.2. Modèles tridimensionnels <i>in vitro</i>	19
1.2.2.1. Culture d'organes	19
1.2.2.2. Culture de cellules endothéliales sans support	20
1.2.2.3. Culture de cellules endothéliales avec support	21
1.3. GÉNIE TISSULAIRE, BIOMATÉRIAUX ET ANGIOGENÈSE	23
1.4. OBJECTIFS DE TRAVAIL	25

CHAPITRE 2 :	26
INDUCTION D'ANGIOGÉNÈSE DANS DES SPHÈRES BIOLOGIQUES À L'AIDE D'UN BIORÉACTEUR	
2.1. INTRODUCTION	26
2.2. MATÉRIELS ET MÉTHODES	28
2.2.1. Cellules et cultures	28
2.2.2. Modèle d'angiogénèse 3D <i>in vitro</i>	28
2.2.3. Incorporation du Dil-Ac-LDL	30
2.2.4. Fixation au zinc	31
2.2.5. Immunohistochimie : Marquage au CD-31	31
2.2.6. Histologie	32
2.3. RÉSULTATS	32
2.4. DISCUSSION	36
CHAPITRE 3 :	38
RÉPONSE ANGIOGÉNIQUE <i>IN VITRO</i> DES CELLULES ENDOTHÉLIALES ENSEMENCÉES DISPERSÉES OU SUR DES BILLES DANS DES GELS DE FIBRINE	
3.1. AVANT-PROPOS	38
3.2. RESUMÉ DE L'ARTICLE	39
3.3. TITRE DE L'ARTICLE	40
3.4. AUTEURS	40
3.5. ABSTRACT	40
3.6. INTRODUCTION	41
3.7. MATERIALS AND METHODS	43
3.8. RESULTS	48
3.9. DISCUSSION	50
3.10. ACKNOWLEDGMENTS	54
3.11. TABLES	55
3.12. FIGURES	56
3.13. FIGURE LEGENDS	61
3.14. REFERENCES	63
CHAPITRE 4 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	66
RÉFÉRENCES	71

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Détermination du nombre de cellules sur les micro- et macro-billes.	55
Tableau 2 : Corrélation entre la densité de billes et le nombre de cellules.	55

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma représentatif de la balance angiogénique favorisant le bourgeonnement lors du mécanisme de l'angiogénèse et les trois étapes principales de l'angiogénèse par bourgeonnement.	3
Figure 2 : Schéma représentant la membrane basale vasculaire en relation avec les cellules endothéliales situées à l'intérieur du vaisseau et les péricytes situés à l'extérieur	5
Figure 3 : Structure et transformation du fibrinogène en fibrine.	8
Figure 4 : Intégrines des cellules endothéliales et leurs ligands dans de la matrice extracellulaire	11
Figure 5 : Inhibition <i>trans</i> -dominante des intégrines pro-angiogéniques.	12
Figure 6 : Monocouche semi-confluente de cellules endothéliales et formation de cordes.	18
Figure 7 : Schéma représentant différents types de modèles tridimensionnels d'angiogénèse <i>in vitro</i> .	22
Figure 8 : Schéma expérimental de conception du modèle 3D d'angiogénèse.	30
Figure 9 : Sphère de fibrine et de collagène contenant des HUVECs observée en contraste de phase et en coupe histologique.	32
Figure 10 : Surface d'une sphère constituée de fibrine et de collagène contenant des HUVECs après 7 jours de culture.	33
Figure 11 : Sphère de fibrine et collagène contenant des HUVECs ayant été incubée 14 jours dans un bioréacteur.	34

Figure 12 : Micro-vaisseau observé à la surface d'une sphère de collagène après 14 jours de culture dans un bioréacteur	34
Figure 13 : Masse de fibrine et collagène (diamètre ~ 2cm) contenant des HUVECs après 14 jours d'incubation dans un bioréacteur.	35
Figure 14 : Morphology of beads prior to endothelial cell seeding and cell seeding efficiency on beads	56
Figure 15: Angiogenic-like structures and methods of quantification.	57
Figure 16: Observation and quantification in the dispersed endothelial cell model after 14 days.	58
Figure 17: Microscopic observations and quantification in the micro-bead model.	59
Figure 18: Microscopic observations in the macro-bead model and quantification.	60

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

2D	Bidimensionnel
3D	Tridimensionnel
Ang-1	Angiopoïétine-1
Ang-2	Angiopoïétine-2
aFGF	acidic Fibroblast growth factor (FGF-1)
bFGF	basic Fibroblast growth factor (FGF-2)
CE	Cellule endothéliale
CMLV	Cellules musculaires lisses vasculaires
CO ₂	Dioxyde de carbone
CoCl ₂	Chlorure de cobalt
Dil-Ac-LDL	Acetylated low-density lipoprotein
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
ECGS	Endothelial cell growth supplements
FBS	Foetal bovine serum
FGF	Fibroblastic growth factor
FGFR-1	Fibroblastic growth factor receptor-1
H ₂ O	Eau
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HBSS	Hank's balanced salt solution
HCl	Chlorure d'hydrogène
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HES	Hématoxyline éosine safran
HIF-1	Hypoxia inducible factor-1
HRP	Horseradish peroxidase
HSPG	Heparan sulfate proteoglycan
HUVEC	Human umbilical vascular endothelial cell
IL-8	Interleukine-8
KCl	Chlorure de potassium
KH ₂ PO ₄	Phosphate de potassium
M199	Milieu 199
MEC	Matrice extracellulaire
MMP-2	Métalloprotéinase-2
Na ₂ HPO ₄	Phosphate de sodium
NaCl	Chlorure de sodium
NaHCO ₃	Bicarbonate de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
NOS	Nitric oxyde synthase
PA	Plasminogen activator
PBS	Tampon phosphate
PDGF	Platelet-derived growth factor
PVA	Poly(vinyl) alcool
RGD	Arginine-glycine-asparagine
ROI	Region of interest

SDS	Sodium dodecyl sulphate
TEP	Tomographie d'émission de photons
TBS	Tris buffer saline
TGF- α	Transforming growth factor- α
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
TNF- β	Tumor necrosis factor- β
tPA	tissue Plasminogen activator
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR-1	Vascular endothelial growth factor receptor-1
VEGFR-2	Vascular endothelial growth factor receptor-2
VEGFR-3	Vascular endothelial growth factor receptor-3

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

Ce chapitre est consacré à une revue de la littérature sur différents éléments nécessaires à la compréhension de mon projet de recherche. La première partie comprend la description du processus d'angiogénèse dans son ensemble de même qu'une brève mention plus détaillée de ces composants. La deuxième partie décrit de façon générale les modèles d'angiogénèse *in vitro* utilisés jusqu'à présent. La troisième partie porte sur le génie tissulaire et les biomatériaux. La dernière partie est consacrée à la description des objectifs qui ont menés aux différents travaux de mon étude.

1.1. VASCULOGÉNÈSE ET ANGIOGÉNÈSE

L'apport d'oxygène et de nutriments est primordial pour le bon fonctionnement des organes chez tous les vertébrés et s'effectue grâce au système vasculaire. L'initiation de ce système est définie par la formation d'un réseau primitif chez l'embryon, ce qui représente la vasculogénèse. Pendant l'embryogénèse, l'hémangioblaste se différencie en précurseurs hématopoïétiques et en angioblastes, qui donneront naissance aux cellules sanguines et aux cellules endothéliales respectivement (Carmeliet, 2005; 2000). Ce n'est que récemment que l'on parle de vasculogénèse chez l'adulte. En effet, des cellules progénitrices sont présentes dans le sang périphérique et peuvent se différencier en cellules endothéliales lors d'une réponse physiologique ou pathologique (Asahara et Kawamoto, 2004). Subséquemment, le plexus vasculaire s'élargit progressivement par remodelage et par bourgeonnement pendant la période fœtale. Cette étape, connue sous le nom d'angiogénèse, contribue aussi au développement des organes après la naissance. Chez l'adulte, la majorité des vaisseaux sanguins demeurent quiescents. Cependant, l'angiogénèse est un phénomène qui se produit naturellement lors du cycle menstruel, de la gestation, et de la cicatrisation. Par contre, elle

peut devenir pathologique, par exemple, lors du développement des tumeurs, de la formation de métastases, du psoriasis, de l'arthrite rhumatoïde, et d'autres maladies (Carmeliet, 2005; 2003; 2000).

De manière générale, l'angiogénèse se définit comme étant la formation de vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Elle peut se produire par un mécanisme de bourgeonnement (Carmeliet, 2000) et par la division longitudinale de vaisseaux préexistants, phénomène nommé «intussusception» résultant en deux tubes parallèles et évoluant indépendamment (Burri et al., 2004; Djonov et al., 2003). Le mécanisme le mieux caractérisé jusqu'à maintenant, le bourgeonnement angiogénique, est divisé en trois grandes étapes séquentielles (Levine et al., 2001). La première étape implique la vasodilatation du vaisseau parent, une conséquence de l'activation de certaines cellules endothéliales localement. Elles se déforment et deviennent ainsi plus sensibles aux facteurs pro-angiogéniques. En effet, pour stimuler l'angiogénèse par bourgeonnement, il faut un changement au niveau de l'équilibre entre les facteurs naturels pro- et anti-angiogéniques, un équilibre important dans la régulation de la stabilité du vaisseau (Figure 1a) (Bergers et Benjamin, 2003). Ces cellules endothéliales activées vont sécréter des protéinases telles que les activateurs du plasminogène (PA, plasminogen activator) (Liekens et al., 2001) et des métalloprotéinases (par exemple la collagénase) afin de dégrader localement la membrane basale des vaisseaux, et la matrice interstitielle environnante. Cette dégradation induit la libération d'autres facteurs de croissance pro-angiogéniques. Lors de la seconde étape, les cellules migrent grâce à des récepteurs membranaires (les intégrines) en direction de la zone critique et commencent à se diviser dans l'espace interstitiel, formant ainsi un bourgeonnement. La dernière étape correspond à la formation d'un lumen et la maturation du vaisseau naissant en un vaisseau fonctionnel. Les cellules endothéliales se différencient en tube en se liant aux cellules avoisinantes. Ce vaisseau est stabilisé par le recrutement de cellules murales péri-vasculaires ou mésenchymateuses telles que les péricytes au niveau des capillaires et les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) au niveau des vaisseaux de plus grandes tailles. Les cellules endothéliales redeviennent quiescentes et peuvent demeurer dans cet état durant

une certaine période grâce à la régulation exercée par des facteurs anti-angiogéniques localement présents (Figure 1b).

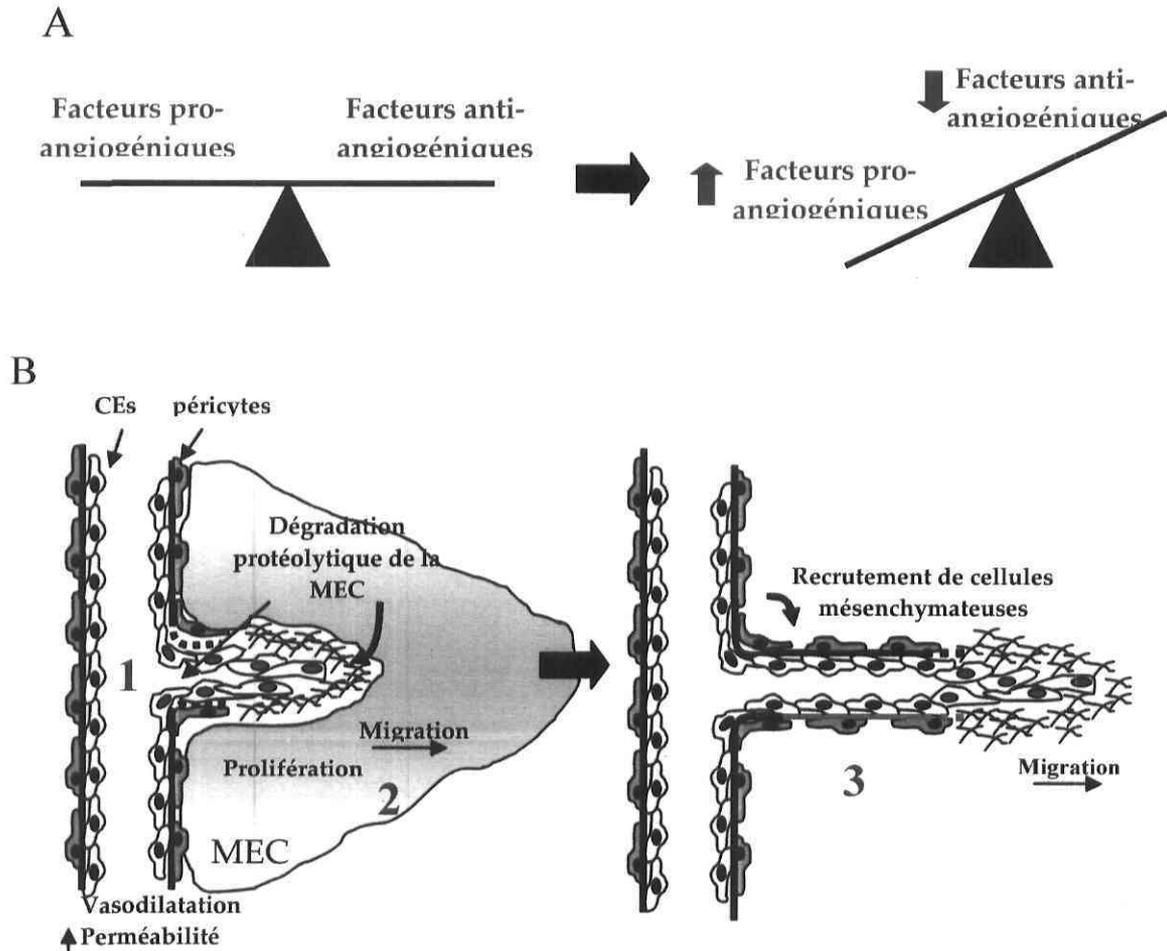


Figure 1 : A : Schéma représentatif de la balance angiogénique favorisant le bourgeonnement lors du mécanisme de l'angiogénèse. B : Les trois étapes principales de l'angiogénèse par bourgeonnement (CEs : cellules endothéliales, MEC : matrice extracellulaire).

1.1.1. CELLULES FORMANT LES VAISSEAUX SANGUINS

1.1.1.1. CELLULES ENDOTHÉLIALES

Les cellules endothéliales sont les cellules clés pour l'équilibre de l'homéostasie et pour l'apport en oxygène et nutriments dans tous les organes vascularisés. Elles constituent le tissu que l'on nomme endothélium vasculaire. L'endothélium régule une variété de réponses biologiques et physiologiques (Bachetti et Morbidelli, 2000). Les cellules endothéliales occupent plusieurs fonctions au sein de l'organisme, ayant souvent même des fonctions spécialisées dépendamment du tissu. Par exemple, elles régulent la coagulation, elles présentent les antigènes aux lymphocytes T; les leucocytes et les cellules tumorales s'y adhèrent et transmigrent, elles contrôlent le transport des macromolécules à travers le plasma et les fluides interstitiels, etc. En somme, ces cellules sont caractérisées par leur hétérogénéité au niveau de leur aspect morphologique (artères versus veines; micro- versus macro-vaisseaux), au niveau de leurs fonctions (Cleaver et Melton, 2003), de même qu'au niveau des espèces (Staton et al., 2004). Ceci représente un élément important à considérer pour le choix des cellules lors d'expériences. De plus, les cellules endothéliales qui sont normalement quiescentes *in vivo*, sont amenées à proliférer *in vitro*.

1.1.1.2. CELLULES MURALES

Pour obtenir la formation complète des vaisseaux sanguins, il faut deux types cellulaires; les cellules endothéliales et les cellules murales constituées de péricytes et de CMLV. Les CMLV entourent les artères et les veines sous forme d'une seule couche ou de plusieurs couches. Ces cellules sont séparées de la membrane basale vasculaire et composent à elles seules une couche connue sous le nom de *media* (Armulik et al., 2005), se distinguant ainsi des péricytes. Cet emplacement permet aux CMLV d'induire une vasodilatation ou une contraction des macro-vaisseaux. Les péricytes, quant à eux, sont intégrés dans la membrane basale entourant les capillaires (Figure 2). Ils sont en contact direct avec les cellules endothéliales à certains endroits définis comme étant des «peg-socket contacts», représentant des emplacements où la membrane basale est absente

(Armulik et al., 2005). Par ce fait même, les péricytes facilitent la communication entre les cellules et sont aussi d'importants régulateurs du développement vasculaire, de la stabilisation, de la maturation et du remodelage des capillaires.

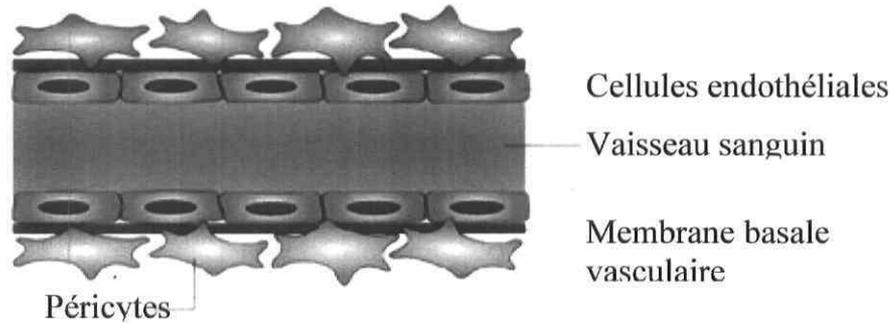


Figure 2 : Schéma représentant la membrane basale vasculaire en relation avec les cellules endothéliales situées à l'intérieur du vaisseau et les péricytes situés à l'extérieur (adapté de Kalluri, 2003).

Les fibroblastes, un autre type de cellules mésenchymateuses, sont des composants intégraux de tous les tissus. Ils contribuent à l'architecture des tissus en sécrétant les protéines de la matrice extracellulaire qui sont essentielles au maintien du système vasculaire (Velazquez., et al., 2002). De plus, les fibroblastes sont une source riche de facteurs de croissance. En effet, les fibroblastes activés peuvent produire des facteurs tels que le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (vascular endothelial growth factor ou VEGF), le facteur de croissance fibroblastique basique (basic fibroblasts growth factor ou bFGF) et le facteur dérivé des plaquettes (platelet-derived growth factor ou PDGF) stimulant de manière paracrine l'angiogénèse (Montesano et al., 1993; Pinney et al., 2000; Velazquez et al., 2002). C'est pourquoi on retrouve des fibroblastes dans certains modèles tridimensionnels *in vitro* afin d'étudier l'angiogénèse (Griffith et al., 2005; Nakatsu et al., 2003a, 2003b; Velazquez et al., 2002; Pinney et al., 2000; Nehls et al., 1998; Nehls et Drenckhahn, 1995; Hehls et al., 1994). Cependant, il a été démontré que les fibroblastes inhibent la formation de branchements lors de contacts directs avec les cellules endothéliales (Nehls et al., 1998; Wenger et al., 2005). Ainsi, les fibroblastes jouent un rôle stimulant en sécrétant des facteurs, mais peuvent aussi jouer un rôle régulateur lors de contact direct avec les cellules endothéliales.

1.1.2. MATRICE EXTRACELLULAIRE

L'environnement entourant les vaisseaux, la matrice extracellulaire (MEC), contribue essentiellement au support de l'endothélium vasculaire. La MEC est composée de deux parties distinctes : la membrane basale et la matrice interstitielle (Iivanainen et al., 2003). La membrane basale est toujours en contact avec des cellules et elle est située entre les cellules endothéliales et les péricytes/CMLV (Figure 2). Elle est composée principalement de collagène de type IV, de laminine et d'héparane-sulfate (HSPG) tel que le perlecane (Kalluri, 2003) de même que d'autres composants mineurs tels que le collagène type XV et type XVIII. La matrice interstitielle, quant à elle, entoure l'endothélium vasculaire de même que les cellules murales. Elle est constituée de collagène de type I et III et de glycoprotéines comme la fibronectine (Iivanainen et al., 2003; Brooke et al., 2003).

La MEC constitue une composante importante pour le support structural de tous les vaisseaux sanguins et pour la régulation de l'angiogénèse. En effet, l'adhésion des cellules endothéliales sur la MEC est indispensable pour la prolifération, la migration, la morphogénèse, la survie et la stabilisation des vaisseaux sanguins (Davis et Senger, 2005). Les cellules endothéliales reconnaissent spécifiquement la MEC via des molécules d'adhésion, les intégrines (voir section 1.1.3.). Les HSPG sont aussi des molécules de surface et servent de récepteurs aux cellules endothéliales pour se fixer sur la MEC (Iivanainen et al., 2003). Ces interactions fonctionnent de concert avec les intégrines. Un autre élément important concernant la régulation de l'angiogénèse via la MEC est la modification de celle-ci grâce à des protéinases telles que les métalloprotéinases et les plasmines. Ces protéinases permettent la libération de facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF et le bFGF pendant l'initiation de l'angiogénèse. Lors du bourgeonnement, les cellules endothéliales migrent en direction de la source angiogénique. Pour ce faire, la MEC doit subir des changements de conformation pour permettre aux cellules de migrer dans les tissus environnants. Cependant, durant la maturation du nouveau vaisseau, les protéinases vont cliver la MEC afin de rendre accessible des fragments anti-angiogéniques,

par exemple l'endostatine et l'angiostatine, (Sanz et Álvarez-Vallina, 2003) pour arrêter toute activité dans les cellules endothéliales.

1.1.2.1. FIBRINOGENÈ ET FIBRINE

La fibrine qui provient de la polymérisation du fibrinogène représente une MEC en tant que telle. La fibrine joue un rôle important dans les mécanismes de coagulation sanguine, dans la cicatrisation et dans le cancer (Laurens et al., 2006; Mosesson, 2005). Le fibrinogène est une glycoprotéine soluble faisant partie du plasma sanguin. Son poids moléculaire se situe entre 330 et 304 kDa et se compose d'un dimère de trois peptides différents (α , β , et γ) reliés par des ponts disulfures (Mosesson, 2005). En contact avec de la thrombine, une enzyme protéolytique, le fibrinogène devient insoluble et forme un réseau de fibrilles sous forme d'un gel (Figure 3A) (Weisel, 2005). En effet, la thrombine en présence de calcium, enlève deux fibrinopeptides A et B au fibrinogène qui devient ainsi un monomère de fibrine. Ces monomères de fibrine s'agglomèrent entre-eux résultant en un gel insoluble de polymères de fibrine (Figure 3A et B). Ces liens croisés entre polymères de fibrine sont stabilisés par une transglutaminase (facteur XIIIa) activée par la thrombine lors de la polymérisation de la fibrine (Figure 3C) (Laurens et al., 2006). Par la suite, la fibrine est dégradée par un processus nommé fibrinolyse, par exemple, lors de la cicatrisation. Le plasminogène, une enzyme circulant dans le sang, se lie à la fibrine. Cette enzyme est activée par l'activateur de plasminogène de type tissulaire (tissue plasminogen activator, tPA) qui se lie aussi à la fibrine. Ainsi, la cellule endothéliale peut sécréter du tPA pour éviter la formation d'un caillot. Le plasminogène activé devient alors du plasmine et clive la fibrine à des sites spécifiques (Weisel, 2005). La structure de la fibrine peut se caractériser par sa porosité, sa perméabilité, l'épaisseur des fibres et le nombre de nœuds. Ces caractéristiques peuvent différer tout dépendamment des conditions de polymérisation de la fibrine. Par exemple, la fibrine polymérisée à un pH plus acide (pH 6.8) devient opaque, poreuse et rigide tandis qu'à pH plus basique (pH 7.4), la fibrine devient plus transparente, dense et malléable (Nehls et Herrmann, 1995).

Par exemple, pendant la cicatrisation, la fibrine représente le premier échafaudage pour les cellules en voie de migration pour la reconstruction du tissu lésé. Parmi ces cellules, les cellules endothéliales adhèrent à la fibrine pendant leur migration, permettant ainsi la formation de nouveaux capillaires. Ces capillaires nourriront le tissu primitif cicatriciel au fur et à mesure de sa réparation. La fibrine contient aussi des sites RGD exposés lors de sa polymérisation. Pendant l'angiogénèse, la fibrine sert de support d'adhésion pour les cellules endothéliales permettant ainsi leur migration tandis que la dégradation de la fibrine, la fibrinolyse, produit des fragments agissant comme inhibiteurs d'angiogénèse (Laurens, 2006). Le potentiel angiogénique des cellules endothéliales ne dépend pas que de la présence de facteurs de croissance mais aussi des interactions avec la MEC modulées par les intégrines.

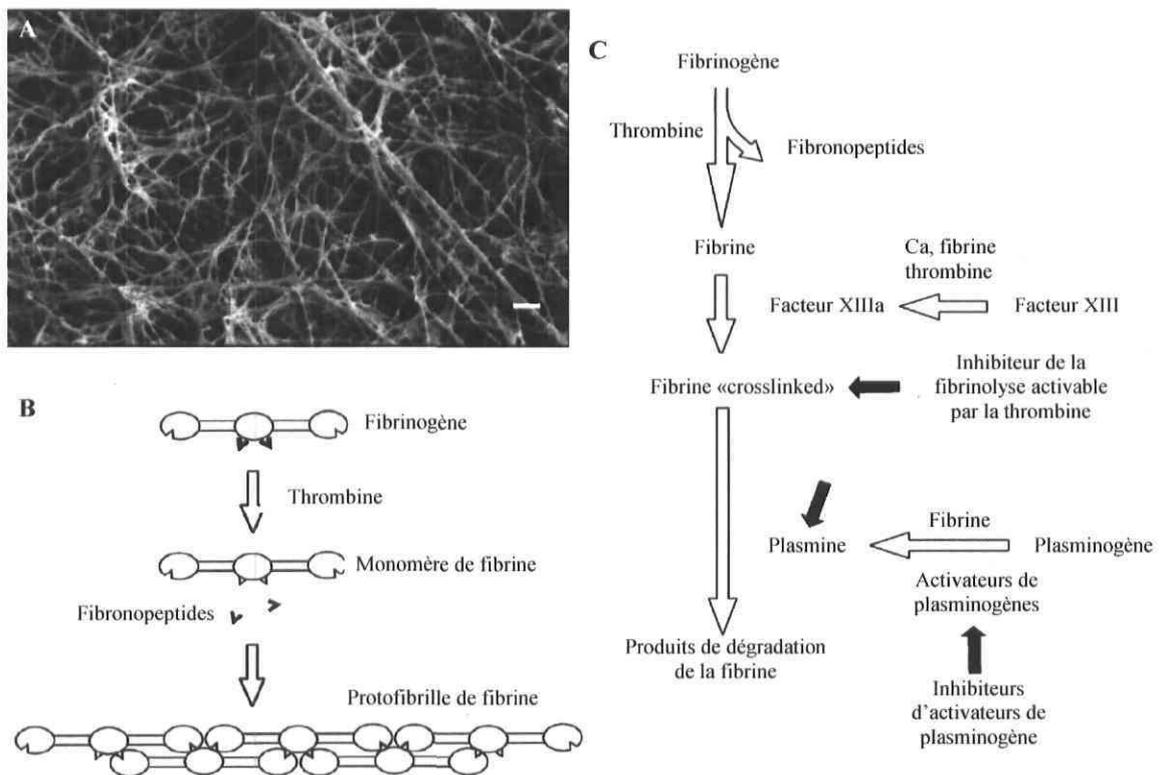


Figure 3 : Structure et transformation du fibrinogène en fibrine. A : Image prise par microscopie électronique à balayage de la fibrine (Kaijzel et al., 2006). Barre = 1µm. B : Schéma représentant les sites de liaisons lors de la polymérisation de la fibrine. C : Diagramme de la polymérisation et de la fibrinolyse de la fibrine (B et C, adapté de Weisel, 2005).

1.1.3. INTÉGRINES

Les cellules endothéliales expriment à leur surface des intégrines, des molécules d'adhésions qui sont responsables des interactions entre cellules-cellules mais principalement entre cellules-MEC. Ces hétérodimères font partis d'une famille de glycoprotéines transmembranaires. Les intégrines sont formées de deux sous-unités, une sous-unité α et une sous-unité β . Chez les mammifères, il existe 8 différents types de sous-unités β et 18 types de sous-unités α pouvant s'assembler en au moins 24 intégrines distinctes connues à ce jour (Figure 4A) (Hodivala-Dike, 2003). Parmi ces 24 intégrines, 9 sont impliquées dans le développement des vaisseaux sanguins : $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 8$ et $\alpha 6\beta 4$ (Serini et al., 2006). Les cellules endothéliales expriment continuellement des intégrines. En revanche, les intégrines servant à la migration sont dans un état inactif ou peu exprimées lorsque les cellules sont quiescentes. Lors de l'angiogénèse, ces intégrines sont exprimées et activées (Figure 4B). Les types d'intégrines exprimées sur les cellules endothéliales varient donc en fonction de l'état de celles-ci. Les cellules endothéliales adhèrent à la MEC grâce aux intégrines. Chaque intégrine s'attache spécifiquement à un ligand de la MEC. Par exemple, le ligand RGD, un peptide formé de trois acides aminés, arginines-glycine-asparagine, est caché à l'intérieur de la molécule entière de collagène. Lorsque cette protéine est dégradée par des collagénases, les séquences RGD sont exposées et les cellules endothéliales peuvent progresser en liant ces séquences, pendant l'angiogénèse par exemple (Hodivala-Dilke, 2003). Les cellules endothéliales quiescentes ont besoin de certaines intégrines actives ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, et $\alpha 5\beta 1$) pour se maintenir sur la membrane basale et pour maintenir leur polarité et leur homéostasie.

1.1.3.1. $\alpha v\beta 3$ / $\alpha v\beta 5$

Parmi toutes les intégrines étudiées jusqu'à ce jour, les molécules d'adhésion $\alpha v\beta 3$ et $\alpha v\beta 5$ ont retenu beaucoup d'attention auprès des chercheurs. $\alpha v\beta 3$ est la molécule la plus polyvalente des intégrines (Stuparck and Cheresh, 2004). En plus de reconnaître plusieurs protéines intactes de la MEC, $\alpha v\beta 3$ lie aussi plusieurs composantes clivées et dénaturées

présentes durant l'angiogénèse comme le démontre la figure 4C. Cette diversité de ligands a la caractéristique de pouvoir être pro-angiogénique (tel que les fragments du collagène type IV) et d'être aussi anti-angiogénique (tel que l'angiostatine). De plus, $\alpha\beta3$ peut interagir avec des récepteurs des facteurs de croissance (appelé « cross-talk ») afin d'en augmenter la réponse cellulaire (Hodivala-Dike, 2003). $\alpha\beta5$ est très proche de $\alpha\beta3$, mais ces 2 molécules ont des réponses préférentielles : $\alpha\beta3$ module l'angiogénèse induite par le VEGF tandis que $\alpha\beta5$ module l'angiogénèse induit par le bFGF (Hodivala-Dilke et al., 2003). Des antagonistes de ces 2 intégrines ont démontré une diminution de l'angiogénèse dans différents essais *in vitro* et *in vivo*. Cependant, des souris $\beta5^{-/-}$ et/ou $\beta3^{-/-}$ présentaient une augmentation des masses tumorales et de l'angiogénèse. De même, des souris $\alpha v^{-/-}$ montraient une angiogénèse excessive. En somme, les intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ sont essentielles dans la régulation tant positive que négative de l'angiogénèse exerçant leurs fonctions à des temps spécifiques (Hynes, 2002).

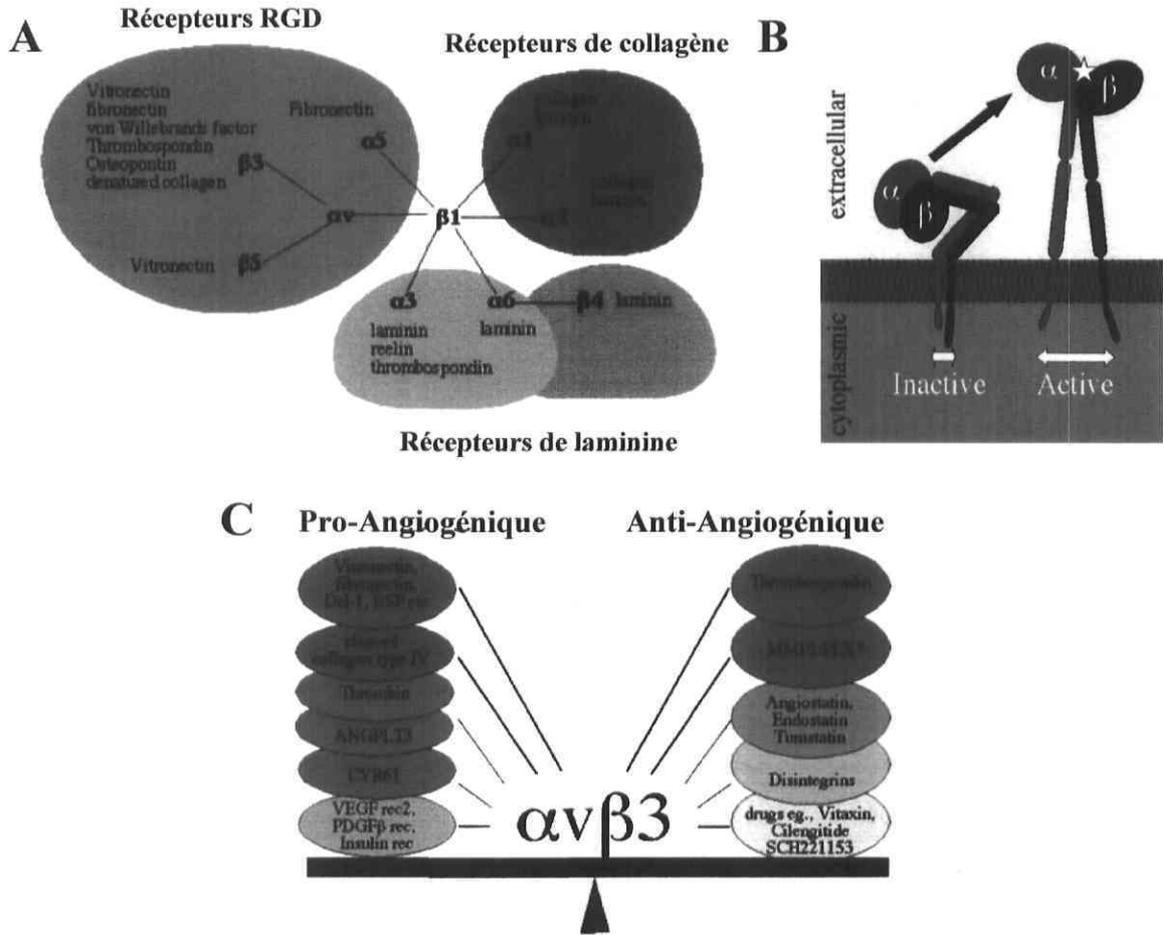


Figure 4 : A : Intégrines des cellules endothéliales et leurs ligands dans de la matrice extracellulaire. B : Changements de conformation d’une intégrine. La partie extracellulaire de l’intégrine est repliée sur elle-même en phase inactive. Lors de l’activation, la partie extracellulaire s’étire exposant le site de liaison à la matrice extracellulaire (étoile). C : Différentes molécules pouvant s’attacher à l’intégrine $\alpha v \beta 3$ (adapté de Hodivala-Dike et al., 2003).

1.1.3.2. AUTRES INTÉGRINES

Toutes les intégrines $\beta 1$ sont cruciales pour l’angiogénèse, car des embryons de souris ne possédant pas le gène $\beta 1$ meurent précocement (Hodivala-Dilke et al., 2003). Ainsi, les intégrines $\alpha 1 \beta 1$ et $\alpha 2 \beta 1$ régulent positivement l’angiogénèse alors que $\alpha 5 \beta 1$ joue un rôle vital durant l’angiogénèse. Lorsque les cellules endothéliales sont quiescentes, les intégrines $\alpha v \beta 3$ et $\alpha v \beta 5$ exercent une inhibition *trans*-dominante des intégrines pro-

angiogéniques (Figure 5) (Hynes, 2002). Ces dernières permettent donc à la cellule de demeurer en place, ancrée aux protéines de la MEC.

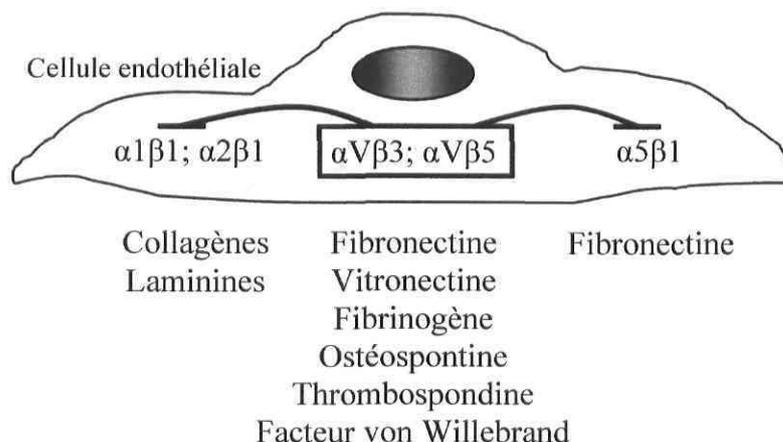


Figure 5 : Inhibition trans-dominante des intégrines pro-angiogéniques (adapté de Hynes, 2002).

1.1.4. FACTEURS PRO- ET ANTI-ANGIOGÉNIQUES

L'existence des facteurs contrôlant l'angiogénèse a été initialement suggérée suite à la transplantation de tumeurs qui provoquaient une forte réponse néovasculaire. Par la suite, plusieurs molécules ont été identifiées comme étant des stimulateurs de l'angiogénèse. On retrouve entre autre le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (vascular endothelial growth factor ou VEGF), le facteur de croissance fibroblastique basique (basic fibroblasts growth factor ou bFGF), les angiopoïétines, le facteur de croissance transformant- α (transforming growth factor- α ou TGF- α), le facteur de nécrose de tumeur- β (tumor necrosis factor- β ou TNF- β) et l'interleukine-8 (IL-8) (Ferrara et al., 2003).

1.1.4.1. VEGF

Au cours des dernières années, le VEGF (aussi nommé VEGFA) fut le premier facteur pro-angiogénique à être identifié, et fut la source de recherches intenses. En effet, le VEGF est la molécule la plus importante requise lors de l'initiation de la formation des vaisseaux immatures par la vasculogénèse et lors des bourgeonnements angiogéniques (Yancopoulos et al., 2000). Les cellules endothéliales expriment deux récepteurs

spécifiques pour le VEGF, le VEGFR-1 (ou Flt-1) et le VEGFR-2 (ou Flk-1) qui sont des récepteurs à tyrosine kinase, modulant une réponse différente. VEGFR-2 est le médiateur majeur pour la survie et la mitose des cellules endothéliales, l'angiogénèse, de même que la perméabilité vasculaire. Par contre, le rôle du VEGFR-1 reste encore à définir. Il existe aussi un troisième récepteur VEGF, le VEGFR-3 (ou FLT-3) qui est majoritairement associé au système lymphatique (Ferrara et al., 2003). Le VEGF est aussi connu comme un facteur vasculaire de perméabilité car il peut induire une fuite vasculaire. Étant un puissant peptide mitotique, le VEGF est essentiel pour la prolifération des cellules endothéliales. De plus, le VEGF représente un facteur de survie pour les cellules endothéliales en induisant l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Li et al., 2003). Plusieurs types cellulaires ont la capacité de produire du VEGF, tels que les fibroblastes et les cellules endothéliales.

1.1.4.2. SYSTÈME ANGIOPOIÉTINE 1/TIE-2

Puisque le VEGF intervient dans les premières étapes de la formation des vaisseaux tant au niveau du développement embryonnaire qu'au niveau de l'angiogénèse chez l'adulte, un autre système régulateur doit assurer la fin du processus. Le système angiopoïétine 1 (Ang-1) et son récepteur Tie-2 sont donc requis pour la maturation des vaisseaux nouvellement formés. Ce système n'est pas encore bien défini (Bogdanovic et al., 2006), mais plusieurs études de délétions/surexpressions ont permis de certifier que Ang-1 est nécessaire lors de la maturation et la stabilisation des vaisseaux sanguins (Thurston, 2003). La cellule endothéliale exprime le récepteur Tie-2 spécifiquement et Ang-1 et Ang-2 sont connus comme étant des ligands de ce récepteur. Cependant, Ang-2 agirait comme antagoniste naturel de Ang-1 (Liekens et al., 2001).

1.1.4.3. FGF-2

Le bFGF, ou FGF-2, vient d'une famille de 20 membres dont les deux premiers, le FGF-1 (aFGF) et le FGF-2 sont impliqués dans l'angiogénèse et sont sécrétés par plusieurs types cellulaires jouant un rôle dans la néovascularisation (Li et al., 2003). Ces facteurs, en

particulier le FGF-2, lorsque relâchés par la MEC agissent de manière paracrine sur les cellules endothéliales et de manière autocrine lorsqu'ils sont sécrétés par les cellules endothéliales elles-mêmes. Le FGF-2 induit fortement la migration, la prolifération et la différenciation des cellules endothéliales durant la cicatrisation. En effet, le FGF-2 induit la production du plasminogène activateur de type urokinase (Montesano et al., 1986) permettant la dégradation de la fibrine et l'invasion des cellules. Même si le FGF-2 n'est pas un facteur de croissance essentiel pour l'angiogénèse, il peut stimuler la formation de vaisseaux dans des modèles animaux *in vivo* (Sottile, 2004; Auguste et al., 2003). Le FGF-2 stimule aussi la formation de tubules *in vitro* (Gagnon et al., 2002; Montesano et al., 1986). Il permet aux cellules endothéliales d'envahir la MEC et de s'assembler pour former des tubes ressemblant à des capillaires *in vitro*. En somme, le FGF-2 utilisé *in vitro* peut stimuler des étapes spécifiques de l'angiogénèse comme celles *in vivo*.

1.1.4.4. FACTEURS ANTI-ANGIOGÉNIQUES

Il existe aussi d'autres molécules inhibitrices d'angiogénèse qui sont toutes aussi importantes puisqu'elles permettent d'arrêter le processus angiogénique et de maintenir à long terme la stabilité des vaisseaux, évitant ainsi une néovascularisation excessive. Il existe des molécules qui agissent naturellement comme les facteurs anti-angiogéniques et qui font partie de la structure de la MEC. On retrouve, entre autre, les thrombospondines 1 et 2. La thrombospondine-1 inhibe l'angiogénèse en induisant l'apoptose chez les cellules endothéliales tandis que la thrombospondine-2 inhibe la croissance cellulaire. Les fragments de la MEC peuvent aussi exercer un effet négatif sur l'angiogénèse. Un exemple de ce type de fragment est l'endostatine. C'est une molécule qui provient du collagène XVIII et qui est largement étudiée (Sottile, 2004). Il existe néanmoins un vaste nombre de fragments agissant comme inhibiteurs. Les protéases de la MEC peuvent aussi moduler des effets négatifs sur les cellules endothéliales. Par exemple, la métalloprotéinase-2 (MMP-2) est reconnue pour cliver l'ectodomaine du FGFR1 empêchant tout signal dans la cellule (Rundhaug, 2005). Les inhibiteurs des plasminogènes activateurs et des collagénases (TIMPSs) agissent indirectement en modulant l'activité des protéinases correspondantes.

1.1.5. CADHÉRINES

Les cadhérines sont des protéines structurales essentielles des jonctions adhérentes et sont dépendantes du calcium. Elles interagissent avec les autres cadhérines des cellules voisines jouant ainsi un rôle important dans l'intégrité et la croissance cellulaire. Les cadhérines sont exprimées dans différents types de tissus avec une certaine spécificité. Par exemple, E-cadhérine est majoritairement exprimée sur les cellules épithéliales; N-cadhérine dans le système nerveux, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes et les cellules endothéliales et l'endothéliale vasculaire (VE)-cadhérine est spécifique à l'endothélium. On retrouve donc deux différentes classes de cadhérines exprimées majoritairement sur les cellules endothéliales, mais d'autres sont aussi présentes sur l'endothélium (Cavallaro et al., 2006).

1.1.5.1. VE-CADHÉRINE

La VE-cadhérine est spécifiquement exprimée sur les cellules endothéliales et est présente dans tous les types de vaisseaux. L'importance de cette cadhérine dans l'angiogénèse fut démontrée la première fois par l'inactivation du gène correspondant empêchant les embryons de survivre (Carmeliet et al., 1999). Les VE-cadhérines ont la propriété de maintenir une bonne adhésion des cellules endothéliales. Cependant, elles sont aussi impliquées dans la signalisation intracellulaire. VE-cadhérine est associée avec le VEGFR-2 et régule les chemins signalétiques de ce récepteur. L'expression de la VE-cadhérine dans des cellules endothéliales en confluence est accompagnée d'une réduction de la phosphorylation du VEGFR-2. Ceci a pour conséquence de réduire la réponse dans ces cellules lors d'une stimulation au VEGF, un phénomène nommé inhibition par contact. (Lampugnani et al., 2003). Un autre exemple d'implication à la signalisation intracellulaire, est la séquestration par la VE-cadhérine de la β -caténine à la membrane cellulaire, empêchant celle-ci de se rendre au noyau et d'agir comme facteur de transcription (Cavallaro et al., 2006).

1.1.5.2. N-CADHÉRINE

La N-cadhérine, connue aussi sous le nom de cadhérine-2, est exprimée abondamment dans les cellules endothéliales et se situe sur toute la surface de la cellule, contrairement à la VE-cadhérine (spécifiquement située aux jonctions adhérentes). La N-cadhérine est importante dans les interactions entre les cellules endothéliales et les cellules murales (péricytes et les CMLVs). Elle joue donc un rôle crucial lors de la dernière étape de l'angiogénèse : la maturation et la stabilisation des vaisseaux. Elle est aussi importante lors de la morphogénèse des vaisseaux (Cavallaro et al., 2006).

1.1.6. L'HYPOXIE DANS L'ANGIOGÉNÈSE

L'homéostasie de l'oxygène chez les mammifères est fortement régulée afin de maintenir un niveau suffisant d'oxygène pour le bon fonctionnement de tous les tissus de l'organisme. Il arrive parfois qu'il se produise une diminution d'apport en oxygène par rapport à la demande, il s'agit là d'un stress hypoxique. L'hypoxie peut se manifester en condition physiologique comme lors d'une blessure ou en haute altitude et en condition pathologique comme lors du développement d'une tumeur (Bracken et al., 2003). Lorsqu'il y a un manque en oxygène à combler, il en résulte aussitôt une réponse générale physiologique. Face à cela, le corps a développé toute une série de réponses comme l'augmentation du nombre de globules rouges dans le sang (érythropoïèse), l'augmentation du métabolisme anaérobie (glycolyse), et l'augmentation de la fréquence cardiaque et respiratoire pour combler ce manque d'oxygène et assurer la survie de l'individu.

Vu l'importance de la micro-vascularisation pour l'apport en oxygène et en nutriments de même que l'exportation des déchets, il n'est pas surprenant qu'un tissu ne peut atteindre une taille de plus de 1mm^3 sans approvisionnement vasculaire (Sieminski et al., 2005). De plus, les cellules *in vivo* sont rarement à plus d'une distance moyenne de $100\mu\text{m}$ d'un micro-vaisseau. Ce phénomène s'applique aussi lors de certaines pathologies, entre autre dans les tumeurs. Les cellules tumorales ont besoin d'activer l'angiogénèse si elles veulent proliférer et former des métastases.

Il est maintenant connu que l'hypoxie est aussi un régulateur de l'angiogénèse. Lorsqu'un site précis dans l'organisme subit un manque d'oxygène, les cellules cibles, comme les cellules tumorales, se mettent à sécréter des molécules stimulant l'angiogénèse. Le régulateur central de l'hypoxie, HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1), est un facteur de transcription clef dans la régulation de l'hypoxie. Lorsqu'un manque d'oxygène se produit, ce facteur est aussitôt stabilisé et dirigé vers le noyau de la cellule pour augmenter la transcription de gènes cibles. On retrouve entre autre comme gènes cibles le VEGF et son récepteur VEGFR-1, ainsi que le gène codant pour l'oxyde nitrique synthétase (NOS), servant aussi à induire la vasodilatation (Pugh and Ratcliffe 2003).

1.2. MODÈLES D'ANGIOGÉNÈSES

Toutes les informations disponibles sur la vasculogénèse et l'angiogénèse proviennent d'études réalisées *in vivo* et *in vitro* depuis les dernières décennies. Il est primordial de choisir le modèle approprié pour comprendre ce processus complexe et c'est un défi majeur que les chercheurs doivent surmonter (Auerbach et al., 2000). Même si les actions modulées par les cellules endothéliales sont au cœur de l'angiogénèse, il ne faut pas oublier les autres composantes toutes aussi importantes dans ce phénomène. Les cellules complémentaires (ex. péricytes, CMLV, fibroblastes, cellules tumorales), la MEC produite, de même que la circulation du sang dans les vaisseaux (hémodynamique) sont des éléments normalement présents dans l'organisme et jouant des rôles importants dans le développement des vaisseaux (Stanton et al., 2004). Même si les modèles *in vivo* rencontrent tous les éléments nécessaires, des limitations et des résultats contradictoires ont tout de même été observés (Stanton et al., 2004).

Il est évident que les modèles d'angiogénèse *in vitro* décrits jusqu'à présent ne reproduisent pas fidèlement ce phénomène complexe. En effet, il est difficile de reproduire réellement les effets indirects d'un composé produit par les autres cellules (Stanton et al., 2004). Cependant, plusieurs modèles s'en rapprochent et ils sont très souvent utilisés dans les expériences reportées dans la littérature. Les modèles d'angiogénèse *in vitro* permettent d'une part de limiter l'utilisation des animaux et d'autre part l'identification de composés

et/ou de concentrations influençant les cellules endothéliales et sont quantifiables (Auerbach et al., 2000). Le modèle *in vitro* idéal devrait tenir compte de toutes les étapes de l'angiogénèse *in vivo*, devrait être rapide, facile à utiliser, reproductible et facilement quantifiable (Vailhé et al., 2001).

1.2.1. MODÈLES *IN VITRO* EN 2-DIMENSIONS

La formation de structures capillaires *in vitro* fut observée pour la première fois par l'équipe de Folkman en 1980. En cultivant à long terme des cellules endothéliales en monocouche, ils ont observé la formation spontanée de structures représentant le premier modèle en 2-dimensions (2D) d'angiogénèse. Un modèle 2D est un modèle où les cellules endothéliales sont cultivées en monocouche sur une surface plane de plastique préalablement recouverte d'une membrane basale reconstituée (MatrigelTM) ou de gélatine pour faciliter l'attachement des cellules (Figure 6A).

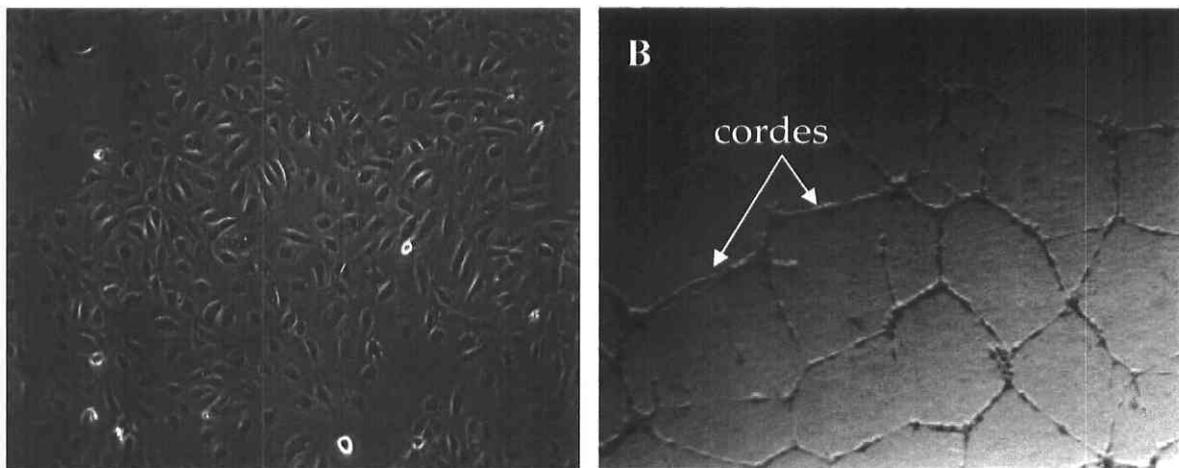


Figure 6 : A : Photo représentant une monocouche semi-confluente de cellules endothéliales vasculaires de cordon ombilical humain (HUVEC). B : Formation de cordes par des cellules endothéliales après quelques jours de culture. Les cordes sont un état dit primitif d'angiogénèse (grossissement 90X).

Les modèles en 2D sont largement utilisés pour l'étude des facteurs stimulants ou inhibant la prolifération et la migration des cellules endothéliales. De plus, en cultivant des cellules endothéliales en monocouche pendant plusieurs jours, la formation de cordes est

observée, c'est-à dire un alignement de cellules avec des très petits lumens (Figure 6B) (Haralabopoulos et al., 1994, 1997). Cet état est décrit comme un évènement primitif d'angiogénèse servant à tester des facteurs pro- et anti-angiogéniques et à quantifier facilement la réponse.

1.2.2. MODÈLES TRIDIMENSIONNELS *IN VITRO*

Les modèles *in vitro* où les cellules endothéliales envahissent la matrice environnante sont désignés comme étant des modèles tridimensionnels (3D). Les modèles 3D se rapprochent plus de la réalité *in vivo* que les modèles 2D car les cellules endothéliales prolifèrent, migrent, forment des embranchements, se différencient et dégradent la MEC, représentant ainsi la plupart des étapes de l'angiogénèse. Ces modèles sont utilisés pour faire l'étude des différentes étapes de ce processus (mécanistiques) et pour tester des inhibiteurs/stimulateurs d'angiogénèse (biomédicale, produits pharmacologiques). Les systèmes d'études 3D peuvent se classifier en trois catégories : culture d'organe et culture de cellules endothéliales avec ou sans support entourée d'une matrice biologique (Figure 7).

1.2.2.1. CULTURE D'ORGANES

Le principe de la culture d'organe consiste à incorporer un segment ou un disque d'un vaisseau, le plus fréquemment l'aorte, à l'intérieur d'un gel biologique (Figure 7A). Le test le plus fréquent est celui de l'anneau aortique provenant du rat (*rat aortic ring assay*). Par contre, l'aorte utilisée peut aussi provenir d'un autre animal, par exemple l'arche aortique de la poule (*chick aortic arch*), l'artère carotide du porc (*porcine carotid artery*) (Staton et al., 2004) et de la souris (Zhu et al., 2003). Ce modèle fut développé en 1982 par Nicosia et al. et amélioré quelques années plus tard (Nicosia et al., 2005; Zhu and Nicosia, 2002). Il se rapproche de l'environnement *in vivo* parce qu'il permet la préservation de l'architecture du vaisseau incluant ainsi des cellules autres que les cellules de l'endothélium (Vailhé et al., 2001). Ce modèle est aussi quantifiable. Cependant, il n'est pas facile de définir spécifiquement les rôles de chacun des types cellulaires présents et les

résultats varient tout dépendamment de l'origine de l'explant et de l'espèce utilisée (Vailhé et al., 2001; Auerback et al., 2000).

1.2.2.2. CULTURE DE CELLULES ENDOTHÉLIALES SANS SUPPORT

Une autre technique très utilisée pour faire l'étude de composantes distinctes dans le processus d'angiogénèse est l'incorporation de cellules endothéliales dans une matrice biologique telle que la fibrine, le collagène ou le Matrigel. Il existe quelques variantes différentes de cette technique. Tout d'abord, en ensemençant des cellules endothéliales sur le dessus d'un gel biologique, il a été possible d'étudier la morphogénèse des capillaires (Figure 7B) (Davis et al., 1996). Deuxièmement, le modèle «sandwich» développé par Montesano et al. en 1983 est représenté par une monocouche confluyente de cellules endothéliales comprise entre deux couches d'un gel. Un gel dans lequel des cellules endothéliales ont été mélangées peut aussi être déposé sur une monocouche confluyente de cellules endothéliales (Figure 7C) (Gagnon et al., 2002). Finalement, la formation spontanée de tubules peut être observée après le mélange de cellules endothéliales dispersées dans une matrice biologique (Davis and Camarillo, 1996).

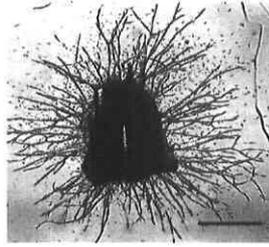
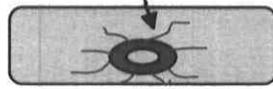
Ces différents modèles reproduisent plusieurs étapes de l'angiogénèse. En effet, la dégradation de la MEC, la prolifération, la migration, la formation de bourgeonnements, l'arrangement en structures capillaires et la formation de lumens sont observés. Ces modèles de culture sont très utiles pour étudier spécifiquement une étape de ce processus; les effets des cytokines, le rôle des métalloprotéinases et des molécules d'adhésion. Ils sont aussi utilisés pour l'étude d'évènements particuliers comme la fibrinolyse, l'apoptose et l'hypoxie (Vailhé et al., 2001). Toutefois, les résultats varient et se contredisent selon les études. Ceci peut s'expliquer par des conditions expérimentales différentes. En premier lieu, toutes les cellules endothéliales ne sont pas identiques tout dépendamment de leur provenance. Ces cellules sont très hétérogènes (voir section 1.1.1.1). Par la suite, les résultats peuvent varier en fonction de la nature de la MEC (fibrine, collagène, Matrigel) et des facteurs de croissance utilisés (VEGF, FGF-2, etc.).

1.2.2.3. CULTURE DE CELLULES ENDOTHÉLIALES AVEC SUPPORT

Il est aussi possible d'intégrer dans un gel des cellules endothélialesensemencées sur un micro-support sphérique ou regroupées en sphéroïdes. Le modèle utilisant des micro-supports fut développé en 1995 (Nehls and Drenckhan, 1995a, 1995b) et est encore utilisé aujourd'hui (Griffith et al., 2005). Ce modèle a cependant été modifié, parce qu'il ne supportait pas la différenciation des HUVECs en tubes (Nakatsu et al, 2003a, 2003b). Les cellules sont tout d'abordensemencées sur des Cytodex-3[®] (micro-billes constituées de dextran et recouverte de gélatine) à confluence. Ensuite, ces micro-billes sont mélangées dans la fibrine avant la polymérisation de celle-ci. Les cellules endothéliales forment des bourgeonnements radiaux autour de la bille en quelques jours de culture et forment des anastomoses formant un réseau entre les billes (Figure 7D). La technique des sphéroïdes développée plus récemment diffère légèrement de celle des Cytodex, car les amas cellulaires sphériques sont formées uniquement de cellules endothéliales agglomérées entre-elles (Figure 7E) (Korff and Augustin, 1998, 1999). Ce sont des modèles où l'analyse quantitative de cytokines/facteurs de croissance est possible (Xue and Greisler, 2002). De plus, il est possible d'effectuer une coculture avec des cellules osseuses (Wenger et al., 2004) ou fibroblastiques (Wenger et al., 2005) dans le but de développer des biomatériaux relevant du génie tissulaire. De même, pour étudier les rôles et les interactions des cellules mésenchymateuses avec les cellules endothéliales pendant l'angiogénèse, une coculture avec des cellules murales telles que les CMLV (Korff et al., 2001) ou les fibroblastes (Kunz-Schughart et al., 2006;) est utilisée.

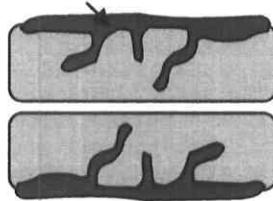
Culture d'organes

A Anneau d'aorte

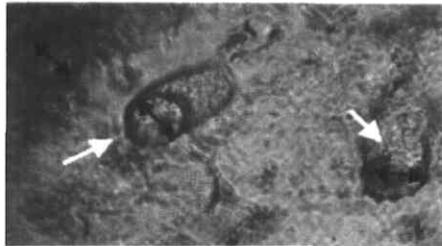
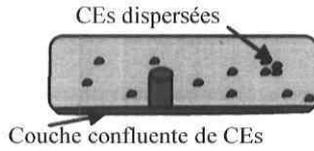


Culture de CEs sans support

B Couche confluente de CEs

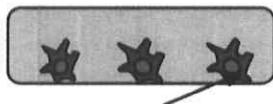


C CEs dispersées

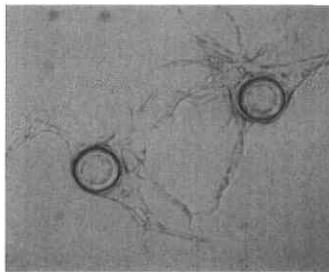


Culture de CEs avec support

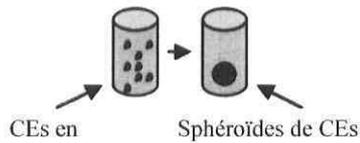
D



Cytodex + CEs



E



CEs en

Sphéroïdes de CEs

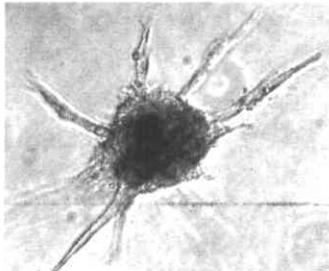


Figure 7 : Schéma représentant différents types de modèles tridimensionnels d'angiogénèse *in vitro*. A : Anneau d'aorte de rat introduit dans un gel biologique et observation microscopique (photo provenant de Nicosia et al., 2004). B : Couche confluente de cellules endothéliales (CEs) au dessus et en dessous du gel et observation microscopique (photo provenant de Davis et al., 2000). C : Couche confluente de cellules endothéliales en dessous d'un gel contenant des cellules endothéliales dispersées et observation microscopique (grossissement 25 X) (photo provenant de Gagnon et al., 2002). D : Cellules endothéliales ensemencées sur des micro-billes et incorporées dans un gel. (grossissement 90 X). E : Agglomération de cellules endothéliales formant une sphéroïde incorporée dans une matrice (photo provenant de Wenger et al., 2004).

1.3. GÉNIE TISSULAIRE, BIOMATÉRIAUX ET ANGIOGÉNÈSE

Le domaine du génie tissulaire est présentement en grande expansion depuis les dernières années. Le principe de base du génie tissulaire repose sur la reconstruction d'un tissu ou d'un organe biologiquement actif *in vitro* afin d'améliorer le tissu malade ou défectueux chez le patient. La vascularisation d'une homogreffe ou d'un tissu/organe *in vitro* contenant des cellules demeure une étape importante afin d'assurer la survie des cellules dans l'implant et son intégration dans le corps humain. La principale limite des tissus générés *in vitro* est l'épaisseur de ceux-ci (Kannan et al., 2005). Dans l'organisme, les micro-vaisseaux apportent l'oxygène et les nutriments et éliminent les déchets métaboliques de toutes les cellules. Ce n'est donc pas surprenant de constater qu'un tissu ne peut pas excéder une taille de 1 mm³ sans avoir d'apport sanguin et que *in vivo*, les cellules sont rarement à une distance moyenne de plus de 100 µm d'un vaisseau sanguin (Sieminski et al., 2005).

Plusieurs possibilités pour contourner cette limite d'épaisseur des implants ont été proposées. Parmi ces stratégies, l'ajout local de molécules pro-angiogéniques telles que le VEGF et le PDGF tout en contrôlant la dose et le taux de libération (Richardson et al., 2001) et l'ajout de cellules endothéliales pourraient éventuellement former des micro-vaisseaux dans ces biomatériaux avant leur implantation (Schechner et al., 2003, 2000; Black et al., 1998).

Les biomatériaux naissant du génie tissulaire servent de support temporaire aux cellules implantées et peuvent aider à la néovascularisation. Après l'implantation, le biomatériau va éventuellement être remplacé par de la MEC nouvellement synthétisée par les cellules. Un biomatériau idéal devrait être biocompatible, poreux, non-immunogénique et éventuellement biodégradable (Kannan et al., 2004). Les biomatériaux disponibles peuvent être de nature synthétique (ex. polyester) ou naturelle (ex. alginate). Le collagène, la fibrine et le Matrigel sont les matrices naturelles les plus utilisées pour l'étude de l'angiogénèse *in vitro* (voir la section 1.2.) et *in vivo*. La fibrine et le collagène sont des protéines naturelles de la MEC et peuvent être facilement dégradés par des PAs et des métalloprotéinases, respectivement. De plus, les cellules endothéliales y adhèrent, migrent et se différencient en micro-vaisseaux (Hall et al., 2001; Urech et al., 2005, Davis et al., 2000). Un autre paramètre important à considérer lors du choix d'un biomatériau est sa porosité. La taille des pores constitue un élément majeur quant à la revascularisation de l'implant. Les macro-pores (environ 500 μ m) optimisent l'ensemencement de tous les types de cellules, les méso-pores (20-30 μ m) permettent aux micro-vaisseaux de s'infiltrer dans le biomatériau, et les micro-pores (< 10 μ m) assurent le transport de molécules (Kannan et al., 2005). Cependant, les effets de la porosité sur l'angiogénèse peuvent varier d'un biomatériau à un autre. Par exemple, une taille de pores de 60 μ m a été définie comme étant la porosité optimale permettant d'induire une vascularisation dans des éponges de poly(vinyl) alcool (PVA) (Sharjawy et al., 1999). En revanche, l'angiogénèse est optimisée dans le collagène où les pores ont une taille d'environ 100 μ m (Choki et al., 1999).

Cependant, pour employer ces techniques, il faut dépenser beaucoup de matériel tel que des facteurs de croissance et des cellules endothéliales en grande quantité. De plus, le temps de préparation est souvent très long, un facteur important à prendre en considération si on veut induire une revascularisation rapide. Il serait donc intéressant de produire un réseau de capillaires au moment de l'implantation afin que les vaisseaux se connectent rapidement avec celui de l'hôte tel qu'observé avec des autogreffes (Ito et al., 2005) tout en diminuant la quantité de molécules angiogéniques et la densité cellulaire utilisée.

1.4. OBJECTIFS DE TRAVAIL

Dans le but d'induire rapidement une vascularisation dans un environnement 3D, nous nous sommes basés, dans un premier temps, sur les principes de l'ischémie. Nous nous sommes par la suite intéressés à la distribution spatiale des cellules endothéliales et aux interactions cellules-cellules. L'angiogénèse étant un processus complexe, il est important de considérer le maximum de variables afin d'optimiser celle-ci *in vitro* dans un environnement tridimensionnel. L'hypoxie étant un stimulateur naturel de l'angiogénèse, nous avons incorporé cette variable dans l'un de nos modèles expérimentaux. D'autre part, considérant que la distribution des cellules endothéliales à l'intérieur d'une matrice peut jouer un rôle déterminant dans le déclenchement de l'angiogénèse, différents types de distribution des cellules endothéliales dans des matériaux biologiques (cellules dispersées versus cellules confluentes sur des micro- ou macro-billes) ont été comparées dans le but de favoriser la vascularisation d'un implant.

CHAPITRE 2

INDUCTION D'ANGIOGÉNÈSE DANS DES SPHÈRES BIOLOGIQUES À L'AIDE D'UN BIORÉACTEUR

2.1. INTRODUCTION

L'angiogénèse est définie comme étant la formation de nouveaux capillaires par des cellules endothéliales à partir de vaisseaux préexistants. La néovascularisation permet la croissance des cellules, entre autre tumorales, en fournissant un apport en oxygène et en nutriments.

Il existe présentement plusieurs modèles de cultures tridimensionnelles (3-D) permettant de reproduire l'angiogénèse *in vitro* afin d'en étudier les mécanismes. Les modèles 3-D peuvent remplacer un système *in vivo* car ils reproduisent plusieurs étapes de l'angiogénèse et de plus, ils réduisent l'utilisation des animaux. Le principe de base est de placer des cellules endothéliales en présence d'une matrice extracellulaire reconstituée formée soit de gel de collagène, de fibrine ou de Matrigel et de stimuler l'angiogénèse à l'aide de facteurs de croissance.

L'angiogénèse peut être déclenchée par une hypoxie qui se produit, par exemple lorsqu'une tumeur cancéreuse progresse. Une masse de cellules cancéreuses ne peut dépasser une taille critique de 1 mm^3 sans un apport sanguin. De plus, il est rare d'observer des cellules se situant à plus de $100 \mu\text{m}$ de distance d'un micro-vaisseau (Sieminski et al., 2005). Ce phénomène d'hypoxie au centre d'une masse représente aussi une limitation majeure pour le développement des biomatériaux en génie tissulaire. Une des solutions

serait de créer un système vasculaire fonctionnel à l'intérieur du biomatériau. Plusieurs techniques ont été développées comme l'ensemencement de cellules endothéliales à l'intérieur du biomatériau et/ou l'addition locale de facteurs de croissance. Parallèlement à la culture de cellules traditionnelle, la culture en bioréacteur permet de faire pousser un grand nombre de cellules et d'augmenter les échanges gazeux et nutritionnels. Ces bioréacteurs sont aussi utilisés par certains pour le développement de biomatériaux (Martin et Vermette, 2005). Par exemple, des substituts vasculaires ont aussi été développés dans un bioréacteur par incorporation de CMLVs et de cellules endothéliales (Ratcliffe, 2000). Les bioréacteurs sont utilisés dans le domaine du génie tissulaire pour les fonctions suivantes : (1) permettre d'assurer une distribution uniforme sur le biomatériau, (2) maintenir un niveau de gaz et de nutriments à la concentration désirée dans le milieu, (3) fournir un transfert de masse suffisante pour le tissu en développement et (4) exposer le tissu aux stimuli physiologiques (Freed et Vunjak-Novakovic, 2000).

Basé sur le principe de la limite de diffusion, notre concept consistait à développer graduellement un réseau de capillaires en utilisant des sphères de taille croissantes composées de collagène et de fibrine grâce à l'utilisation d'un bioréacteur. Ainsi, notre hypothèse supposait que des nouveaux capillaires pourraient s'orienter allant de la périphérie vers le centre de la masse cultivée dans un bioréacteur. Ces micro-vaisseaux permettraient, dans ce cas, une distribution uniforme des nutriments et des facteurs de croissance dans un environnement physiologique. De plus, le bioréacteur participerait à la conservation de la forme sphérique des masses.

2.2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

Deux types de cellules ont été cultivés soit en même temps, soit séparément en les intégrant dans les sphères, basé sur les possibles interactions entre fibroblastes et cellules endothéliales.

2.2.1. CELLULES ET CULTURES

Des cellules provenant de cordons ombilicaux humains (HUVEC) ont été utilisées entre les 3^e et 6^e passages. Le milieu de culture pour les cellules endothéliales se compose de Medium 199 (M199, Sigma-Aldrich, Inc., St-Louis, MO) additionné de 10% de sérum de bovin fœtal (FBS, Invitrogen Co., Burlington, Ontario), de suppléments de croissance pour cellules endothéliales (ECGS, 20µg/ml, BD Biosciences, Bedford, MA), d'héparine (90µg/ml, Sigma-Aldrich), de L-glutamine (2mM, Sigma-Aldrich) et d'antibiotiques/antifongiques (Invitrogen Co.). Des fibroblastes provenant de prépuces humains ont été utilisés entre les passages 10 et 25. Pour les passages, du milieu (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM, Sigma Chemical Co.) additionné de 5% FBS, 2mM de L-glutamine et antibiotiques/antifongiques a été utilisé. Les cellules furent incubées à 37°C dans une atmosphère saturée d'eau et en présence de 5% CO₂.

2.2.2. MODÈLE D'ANGIOGÉNÈSE 3D *IN VITRO*

Trois mélanges de matrices ont été préparé : 1) fibrine seule constitué de 3mg/ml de fibrinogène (fraction I; type I-S provenant du plasma de bovin; Sigma Chemical Co.) mélangé avec du «Hank's balanced salt solution» (HBSS), 2) collagène seul 20% DMEM 5X, 10% FBS, 10% NaHCO₃ 0,26M, 0,4% NaOH 1M, 2% H₂O, 40% de collagène type I de queue de rat à 3mg/ml et 17,6% de suspension cellulaire à 1,46x10⁶ cellules/ml ou 3) fibrine et collagène (3mg/ml de fibrinogène ont été mélangés au DMEM 5X du mélange de collagène). Des HUVECs ou des fibroblastes ont été mélangés avec ces mélanges et un volume 200µl a été distribué par puits dans une plaque à 96 puits, correspondant à une densité cellulaire de 5x10⁴ cellules/200µl. Après la polymérisation du gel, les sphères ont

été transférées dans 1 ml de M199 jusqu'à ce que les cellules soient confluentes à la surface (environ 4-5 jours). La confluence fut déterminée par une coloration des noyaux au Hoechst 33342. Brièvement, 10µg/ml de Hoechst 33342 (Invitrogen Co.) a été ajoutée au milieu pour une période de 30 min. Les noyaux ont été observés sous épifluorescence avec un filtre d'excitation de 365 nm et d'émission de 450 nm. Par la suite, une petite sphère a été incorporée à l'intérieur de 2 ml d'une solution de fibrine et de collagène avec une densité de $2,5 \times 10^5$ cellules/ml dans chacun des puits d'une plaque de 24 puits. Après la polymérisation du gel, du milieu M199 a été ajouté et les gels ont été incubés toute la nuit dans les puits pour permettre aux cellules de s'habituer à leur nouvel environnement. Ces dernières sphères ont été par la suite transférées dans une plaque de 12 puits avec 4ml par puits d'une solution de fibrine et collagène avec une densité de $2,5 \times 10^5$ cellules/ml et incubées toute la nuit à 37°C, 5% CO₂. Le lendemain, ces masses ont été transférées dans un bioréacteur et cultivées durant 14 jours dans du milieu contenant 200 ml de M199 + 20µg/ml ECGS + 50 ng/ml bFGF (BD Biosciences). La rotation dans le bioréacteur a été réglée à une vitesse de 30 rpm (voir Figure 8). Le milieu a été changé en remplaçant la moitié du volume par du milieu frais contenant les facteurs de croissance tous les 2-3 jours.

Cependant, les expériences avec les masses de fibrine seule n'ont pas été poursuivies du fait de la difficulté d'effectuer des observations microscopiques et à cause d'une forte rétraction des masses.

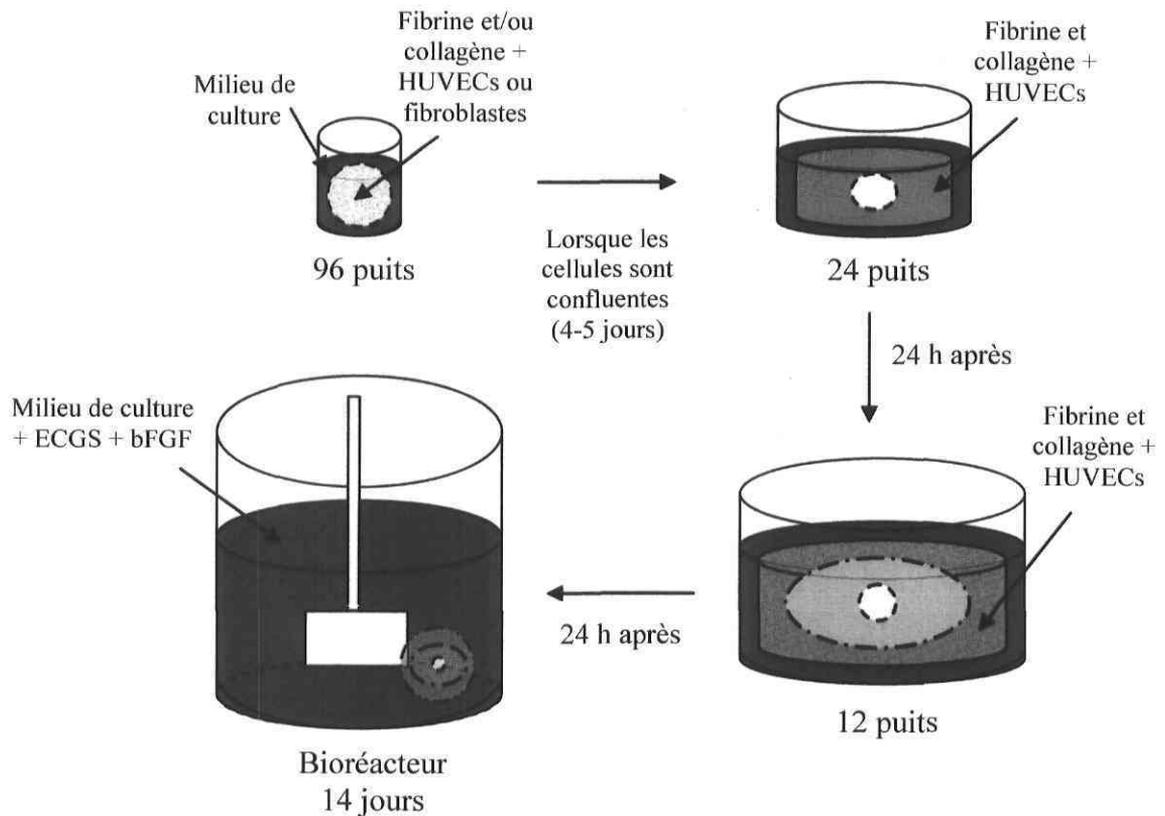


Figure 8 : Schéma expérimental de conception du modèle 3D d'angiogénèse.

2.2.3. INCORPORATION DU Dil-Ac-LDL

Afin de mettre en évidence les cellules endothéliales sur et dans les sphères et afin de les distinguer des fibroblastes, la méthode d'incorporation du Dil-Ac-LDL (acetylated low-density lipoprotein; marqueur spécifique aux cellules endothéliales et aux macrophages) a été utilisée. Une concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$ de Dil-Ac-LDL (Biomedical Technologies Inc.) a été ajoutée au milieu de culture des masses pendant 4 heures à 37°C. Ensuite, le milieu a été remplacé par du milieu frais. Les masses ont été observées au microscope à fluorescence avec un filtre à la rhodamine.

2.2.4. FIXATION AU ZINC

Après 14 jours, les sphères ont été fixées dans un tampon à base de zinc (0,1 M Tris buffer pH 7.4, 0,5 g d'acétate de calcium, 0,5 g d'acétate de zinc, 5,0 g de chlorure de zinc) afin de mieux préserver les sites antigéniques des cellules. Pour cela, les sphères ont été rincées 2X au PBS (2,7 mM KCl, 1,8 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 10,1 mM Na₂HPO₄). Elles ont été incubées toute la nuit dans du fixatif de zinc, à température pièce puis rincées dans de l'éthanol 50% pendant 45 min, et dans de l'éthanol 70% à 4°C jusqu'à utilisation.

2.2.5. IMMUNOHISTOCHEMIE : Marquage au CD-31

Nous avons utilisé le protocole d'immunohistochimie fourni avec la trousse «Blood vessel staining kit» (Chemicon; no. ECM590). Un anticorps monoclonal développé chez la souris et dirigé contre le CD-31 humain est utilisé dans cette trousse. Brièvement, les lames ont été déparaffinées comme suit : toluène 2x 10 min, éthanol 100% 2x 2 min, peroxyde d'hydrogène 3% (H₂O₂) dans méthanol 1x 10 min, H₂O 2x 5 min, tampon de rinçage (TBS : 137 mM NaCl, 2,7 mM KCL, 25 mM Tris/Tris-HCl) 1x 5 min. Ensuite, du H₂O₂ 3% a été déposé sur les lames durant 30 min puis celles-ci ont été rincées 2x 5 min avec du tampon de rinçage. Les différentes étapes d'incubation ont été réalisées en chambre humide. Pour l'étape du blocage, du réactif bloquant (déjà préparé) a été déposé sur les lames et incubé pendant 30 min. Par la suite, le 1^{er} anticorps contre CD31 à une dilution 1 :200 a été déposé sur les lames et incubé à température pièce durant 2h, puis celles-ci ont été rincées 3x 5 min avec du tampon de rinçage. Les lames ont par la suite été incubées avec le 2^e anticorps biotiné (chèvre anti-souris, (dilution 1 :50) pour une période de 15 min, puis rincées 3x 5 min avec du tampon de rinçage. Une solution de streptavidine-HRP est déposée sur les lames pendant 15 min et rincées 3x 5 min avec du tampon de rinçage. Pour terminer, du réactif chromogène (A :Diaminobenzidine dilué dans du TBS mélangé avec B : peroxyde d'hydrogène dilué dans du TBS contenant du Tween®20) a été déposé sur les lames de 2 à 10 min. La réaction a été arrêtée avec de l'eau. Par la suite les sections ont été recouvertes d'une lamelle et observées au microscope en contraste de phase (Diaphot, Nikon, Canada).

2.2.6. HISTOLOGIE

Les échantillons ont été inclus en bloc de paraffine et les coupes histologiques (6 μ m d'épaisseur) ont été colorées avec un mélange hématoxyline-éosine-safran (HES) au service de microscopie de l'université Laval.

2.3. RÉSULTATS

Dans un premier temps, des petites sphères (environ 5-6 mm de diamètre) formées de collagène contenant des cellules endothéliales ont été mises en culture pendant une semaine dans un bioréacteur afin de conserver leur forme sphérique (Figure 9A). Après une semaine, nous avons observé l'arrangement des cellules à l'intérieur de la sphère à l'aide de coupes histologiques (Figure 9B), de même que la confluence des cellules autour de la sphère par une coloration des noyaux au Hoechst (Figure 10). Ces données nous montrent que les cellules endothéliales sont réparties de manière homogène à l'intérieur de la sphère et qu'elles forment également une couche confluyente à la surface de celle-ci (Figure 9B).

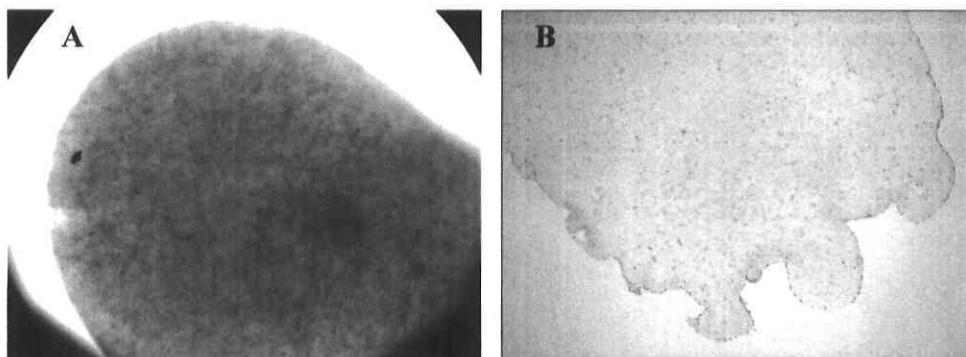


Figure 9 : Sphère de collagène contenant des HUVECs observée en contraste de phase (A; grossissement 35X) et en coupe histologique avec coloration HES (B; grossissement 35X).

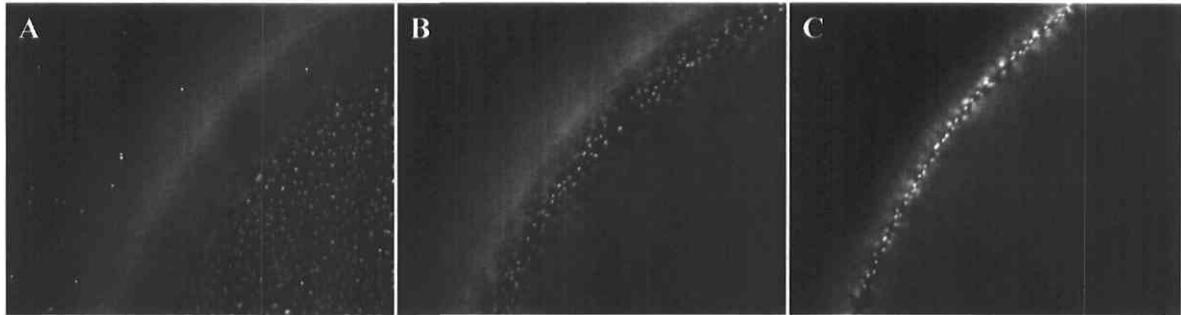


Figure 10 : Surface d'une sphère constituée de collagène contenant des HUVECs après 7 jours de culture. Observation après coloration des noyaux cellulaires au Hoechst 33342. (A-C; grossissement 130X) Vue à différentes profondeurs à la surface de la sphère.

Nous avons décidé de continuer les expériences avec des masses formées d'un mélange de fibrine et de collagène afin d'avoir le plus d'angiogénèse possible.

Dans un deuxième temps, la taille des petites sphères a été augmenté par l'incorporation de celles-ci à l'intérieur de sphères plus volumineuses pour atteindre un diamètre final d'environ 2 cm Ces grosses masses ont été incubées pendant 14 jours dans un bioréacteur avec le milieu M199 en présence de FGF-2 (50ng/ml) (Figure 11). À la fin de la période de culture de 14 jours, les sphères ont été colorées au Hoechst et au Dil-Ac-LDL (marqueur spécifique aux cellules endothéliales) pour mieux visualiser ces cellules. Nous avons pu observer quelques micro-vaisseaux à la surface d'une sphère (Figure 12). Étant donné l'épaisseur de la masse, il était impossible de bien visualiser l'ensemble de l'intérieur de la sphère.

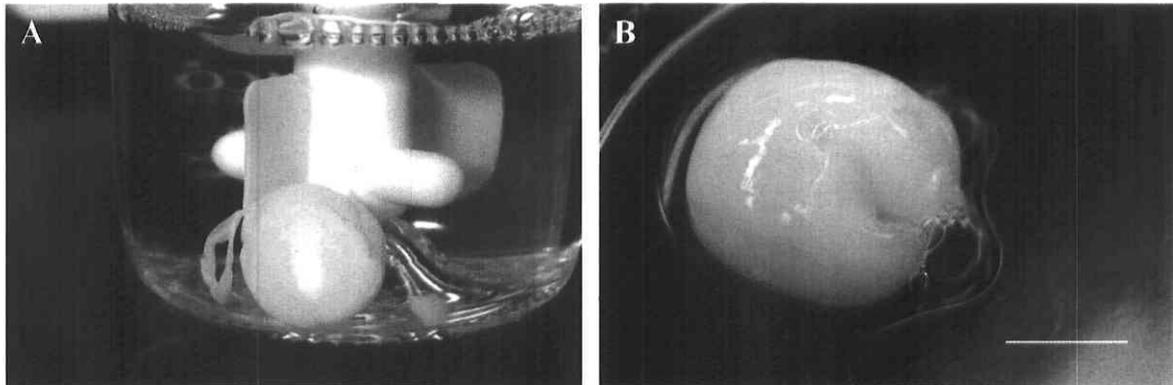


Figure 11 : A : Sphère de fibrine et collagène contenant des HUVECs ayant été incubée 14 jours dans un bioréacteur sous faible rotation (30rpm). B : Image macroscopique de la sphère. Barre = 1cm.

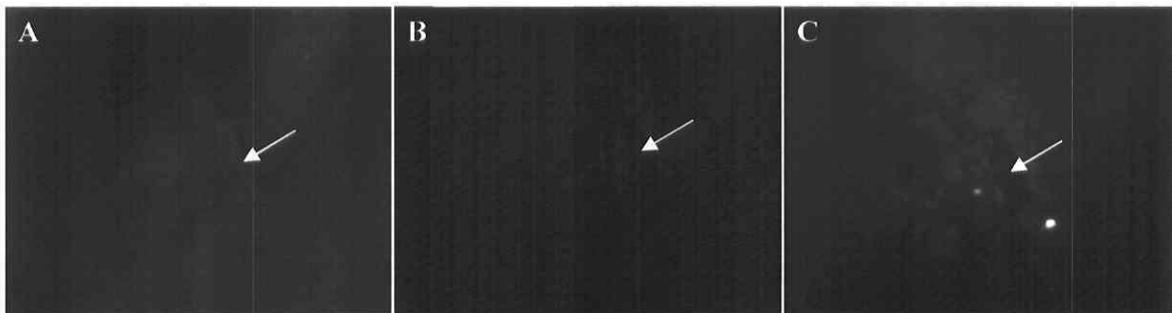


Figure 12 : Micro-vaisseau observé à la surface d'une sphère de fibrine et de collagène après 14 jours de culture dans un bioréacteur. A : Observation en contraste de phase. B : Observation avec une coloration au Hoechst 33342. C : Observation après incorporation de Dil-Ac-LDL par les cellules. La flèche représente l'ouverture du micro-vaisseau (grossissement 90X).

Des coupes histologiques nous permettent de visualiser les petites masses à l'intérieur d'une masse plus volumineuse (Figure 13A). De plus, dans les grosses sphères contenant uniquement des cellules endothéliales, nous avons observé la présence de micro-cavités après 14 jours d'incubation. En effet, l'alignement parallèle de cellules endothéliales avec des régions caractérisées comme étant des lumières nous permettent d'affirmer l'activation du processus d'angiogénèse (Figure 13B). Cependant, ces vaisseaux n'étaient pas formés de manière régulière à travers la masse et ils étaient orientés aléatoirement. L'immunohistochimie effectuée à l'aide d'un anticorps spécifique aux cellules endothéliales, le CD-31, sur les masses contenant les cellules endothéliales

démontre bien la répartition des cellules à l'intérieur de la masse et le réarrangement de certaines d'entre elles en petits tubes (figure 13 C-D).

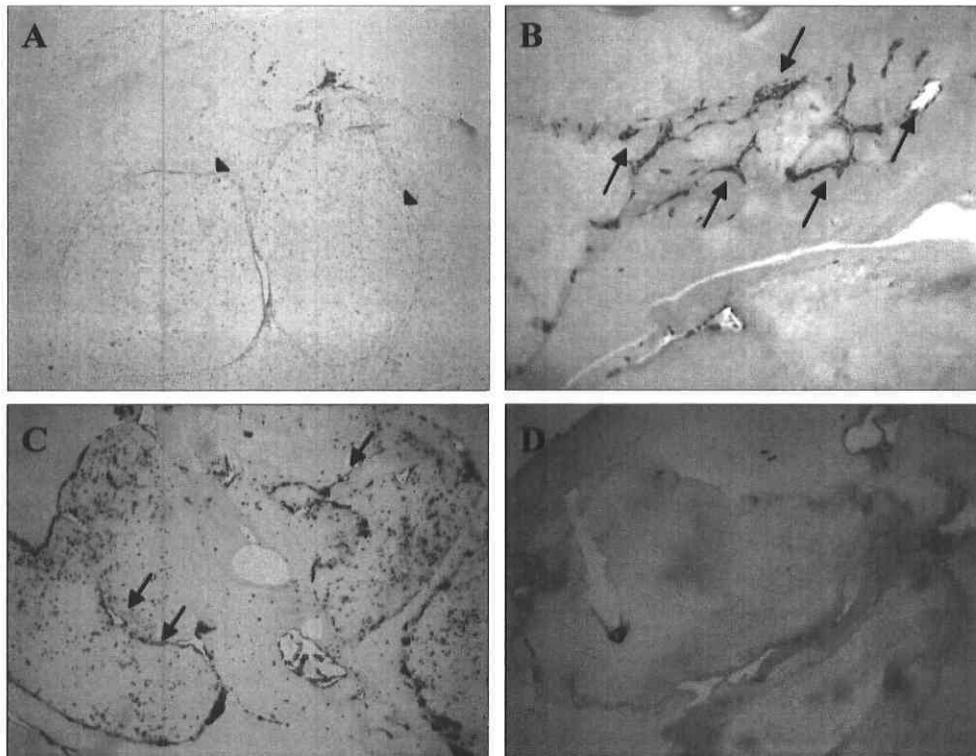


Figure 13 : Masse de fibrine et collagène (diamètre ~ 2cm) contenant des HUVECs après 14 jours d'incubation dans un bioréacteur. A et B: Coupes histologiques colorées au HES. C et D : Immunohistochimie au CD-31 (anticorps spécifique aux cellules endothéliales et aux macrophages). A : Visualisation de 2 petites sphères au centre de la masse (têtes de flèche) (grossissement 35X). B : Microvaisseaux formés dans la masse par les cellules endothéliales (flèches) (grossissement 90X). C : Marquage au CD31 des cellules endothéliales contenues dans la masse démontrant la dispersion des HUVECs dans la masse (grossissement 35X). D : Contrôle négatif de l'immunohistochimie (grossissement 35X).

Dans d'autres expériences, nous avons remplacé les HUVECs contenues dans les petites sphères par des fibroblastes afin de recréer le phénomène d'initiation d'angiogénèse par une région attractive et/ou hypoxique comme *in vivo*. Les fibroblastes sécrétant une variété de facteurs pro-angiogéniques (Wenger et al., 2005), nous nous attendions à observer la formation d'un réseau de capillaires orientés de la périphérie vers le centre. Cependant, les fibroblastes ont pris une forme allongée et ont envahis la masse supérieure

contenant les cellules endothéliales (données non montrées). Aucune angiogénèse n'a pu être observée.

2.4. DISCUSSION

Puisque la diffusion de l'oxygène et des nutriments à l'intérieur d'une masse tissulaire n'est plus possible au-delà d'une taille de 1mm^3 , l'implantation de biomatériau de taille plus volumineuse chez un individu est plus difficile. Pour contrer ce problème, plusieurs techniques ont été développées entre autre, l'incorporation de cellules endothéliales et/ou de facteurs de croissance dans le biomatériau. Dans cette étude, nous avons développé un système de sphères constituées de matériaux biologiques augmentant en masse dans le but d'y reproduire un réseau de micro-vaisseaux. Pour ce faire, nous avons utilisé une matrice de fibrine et de collagène mélangée avec des cellules endothéliales, augmentant en taille et incubée durant 14 jours en présence de FGF-2 dans un bioréacteur.

Nous avons pu observer la formation de micro-vaisseaux à l'intérieur de ces sphères. Il est donc possible d'induire une angiogénèse à partir de ce modèle. Cependant, les micro-vaisseaux formés étaient peu nombreux et isolés à l'intérieur de la sphère. Nous avons ainsi introduit une source de facteurs pro-angiogéniques sous forme d'une petite sphère de fibroblastes au centre de la masse, afin de stimuler l'angiogénèse dans la masse périphérique contenant les HUVECs et d'orienter celle-ci vers le centre. Nous avons aussi essayé de créer une zone centrale hypoxique ou morte. Nous nous attendions à ce que les fibroblastes soient dans un environnement hypoxique et manquent de nutriments, ainsi, ils auraient sécrété des facteurs stimulant l'angiogénèse (Gray et al., 2005). Toutefois, nous avons observé la migration des fibroblastes vers les cellules endothéliales. Aucune formation de structures angiogéniques n'a pu être montrée en contraste de phase ni par histologie/immunohistochimie dans le cas des fibroblastes vivants. Il a été démontré que des fibroblastes en contact direct avec les cellules endothéliales régulent de façon négative la formation de tubules dans une matrice (Wenger et al., 2005; Nehls et al., 1998). Lorsque le

contact direct entre ces deux types cellulaires est évité, une augmentation de formation de branchements est obtenue (Nakatsu et al., 2003^{ab}; Wenger et al., 2005), suggérant la présence de facteurs solubles sécrétés par les fibroblastes et stimulant l'angiogénèse de façon paracrine.

De plus, il apparaissait au cours des expériences, que la matrice utilisée permettait une diffusion de l'oxygène et des nutriments adéquate. En effet, il a été montré récemment qu'il n'y a pas de limite de diffusion d'oxygène dans la fibrine *in vitro* (Griffith et al., 2005). Il était difficile de centrer les plus petites sphères à l'intérieur des grosses masses. Les sphères avaient le temps de descendre par gravité au fond du puits avant la polymérisation complète de la matrice. Ceci entraînait parfois des pertes de petites sphères dans le bioréacteur. C'est pourquoi nous nous sommes orientés vers un autre modèle d'angiogénèse 3D *in vitro* afin de comparer le comportement des cellules endothéliales dans différentes distributions spatiales, ceci dans le but d'optimiser la formation d'angiogénèse lors de la vascularisation d'un biomatériau (voir chapitre suivant).

CHAPITRE 3

RÉPONSE ANGIOGÉNIQUE *IN VITRO* DES CELLULES ENDOTHÉLIALES ENSEMENCÉES DISPERSÉES OU SUR DES BILLES DANS DES GELS DE FIBRINE

3.1. AVANT-PROPOS

L'article présenté dans ce chapitre décrit la majorité des manipulations et des travaux effectués lors de ma deuxième année de maîtrise pour répondre aux objectifs énoncés dans le chapitre 1, concernant l'étude de comparaison de l'organisation spatiale des cellules endothéliales dans un modèle tridimensionnel d'angiogénèse. Les résultats obtenus y sont analysés et discutés.

J'ai effectué seule l'ensemble des manipulations décrites ci-dessous et rédigé cet article. Le Dr. Charles Doillon, en tant que directeur de recherche, a ensuite relu attentivement le manuscrit afin de le modifier de façon positive. L'article a été soumis au journal «Biomaterials» le 12 décembre 2006.

3.2. RÉSUMÉ DE L'ARTICLE

L'induction d'un réseau micro-vasculaire dans l'implant pourrait être une alternative à considérer pour augmenter la survie d'un tissu implanté. Trois conditions d'ensemencement et de distribution cellulaire dans un environnement tridimensionnel ont été développées. Des cellules endothéliales ont été (1) dispersées dans la fibrine ou (2) subconfluentes sur des micro-billes (Cytodex®) et (3) sur des «macro-billes». Des cellules fibroblastiques humaines ont aussi été déposées sur le dessus du gel ainsi que l'ajout de facteurs de croissance dans le milieu afin d'optimiser l'angiogénèse. Au bout de 14 jours, une densité de plus de 4×10^4 cellules/ml de fibrine fut nécessaire pour l'induction de structures angiogéniques (bourgeonnements, cordes, tubes et/ou cavités) dans le modèle de cellules dispersées. Les cellules endothéliales sur les micro-billes ont induit des structures angiogéniques formant des anastomoses avec les billes voisines particulièrement à fortes densités. Des structures de types radiales furent observées autour des macro-billes, mais sans connexion avec les billes voisines. Les tailles des structures angiogéniques étaient plus importantes sur les billes comparativement à celles trouvées dans le modèle de cellules dispersées. Ainsi, une grande densité cellulaire était requise pour induire l'angiogénèse lorsque les cellules étaient isolées dans le gel, tandis que l'association des cellules endothéliales sur la surface de billes réduisait significativement la densité cellulaire utilisée. De plus, les micro-billes étaient plus efficaces que les macro-billes pour former un réseau angiogénique connectant les billes voisines, et une grande densité cellulaire lors de l'ensemencement ne s'est pas avérée nécessaire pour favoriser la formation d'angiogénèse. Les micro-sphères peuvent être des structures à considérer pour un produit issu du génie tissulaire avec des cellules endothéliales ou pour améliorer le concept d'un implant sous forme d'échafaudage.

3.3. TITRE DE L'ARTICLE

In vitro angiogenic response of endothelial cells seeded dispersed or on beads in fibrin gels

3.4. AUTEURS

Laurie Martineau et Charles J. Doillon

3.5. ABSTRACT

Induction of a microvessel network within a substitute may be an alternative to improve the success rate of tissue survival. Three conditions of endothelial cell seeding density and distribution were considered in a 3-D angiogenesis culture system. Cells were dispersed in fibrin or subconfluent on micro-beads (Cytodex®) and on “macro-beads”. Human fibroblasts and growth factors were introduced to optimize angiogenesis. By 14 days, a density more than 4×10^4 cells/ml of fibrin was necessary to induce angiogenic-like structures (i.e., sprouting, cord-, tube- and/or cavity-like structures) in the dispersed cell model. Endothelial cells on micro-beads exhibited also angiogenic-like structures that were interconnected to neighbouring beads particularly at high bead density. Radial angiogenic-like structures were observed on macro-beads, but delayed and without any connection to adjacent macro-beads. The sizes of the angiogenic-like structures were larger on beads compared to that found in the dispersed cell model. High cell density was needed towards angiogenesis when cells were seeded separately, whereas the association of endothelial cells on bead surfaces reduced significantly the cell density used. Moreover, small beads were more efficient to form an interconnecting angiogenic network than large beads, and increasing the bead density was not necessary to facilitate angiogenic formation. Micro-spheres may be the structures to consider for tissue engineered devices with endothelial cells and for improving the design of scaffold implants.

Keywords: angiogenesis, fibrin, endothelial cells, *in vitro* test, image analysis.

3.6. INTRODUCTION

Vascularisation of an allograft or a cell-seeded tissue engineered substitute remains an important issue to improve the success rate of cell survival in the implant and its tissue integration after replacement of diseased or damaged tissues. Induction of a functional microvascular network may be required to enhance oxygen and nutrient exchanges into tissue-engineered substitutes, flaps, and grafts. Different strategies have been proposed, amongst them, the local delivery of angiogenic molecules such as VEGF and PDGF [1], and/or the seeding of endothelial cells (ECs) that should subsequently form microvessels *in situ* [2, 3]. However, to achieve these procedures a large amount of expensive growth factors, as well as a high EC seeding density are needed. Moreover, it might be desirable to develop, prior to implantation, a vascular network that can connect to the host vasculature system as observed with tissue autografts (e.g., bone and skin grafts) [4, 5].

Angiogenesis is a multistep process that involves the formation of new capillaries from pre-existing vessels (sprouting angiogenesis), from the splitting of pre-existing vessels (intussusception), or fusion of adjacent blood vessels (anastomoses) [6, 7]. Thus, the angiogenesis process involves multiple cell-cell and cell-extracellular matrix interactions which are triggered by paracrine and autocrine molecules expressed in a temporo-spatial manner [8].

A variety of *in vitro* models of angiogenesis have been developed mainly to investigate the response to antiangiogenic and angiogenic compounds. These models used either dispersed ECs seeded on plates coated with extracellular matrix components (i.e., monolayer cultures) or in a three-dimensional (3-D) culture system to closely mimic the *in vivo* environment [9-13]. Another approach has been to integrate EC-seeded micro-beads (Cytodex®) in an extracellular matrix gel and to introduce mural cells or equivalents (e.g., fibroblasts) in order to induce and measure the angiogenic response [14, 15].

The aim of our study was (i) to compare the behaviour of ECs dispersed in a fibrin gel with those seeded on two distinct sizes of supportive beads, and (ii) to investigate the effects of different cell and bead densities in order to determine the efficacy of inducing microvessel networks *in vitro*. In the present study, we demonstrate that high EC density was needed when cells were seeded dispersed, whereas the tight association of ECs on beads reduced significantly the cell density used. We also show that small beads were more efficient towards angiogenesis than large beads and that a high micro-bead density was not necessary to facilitate a vascular network.

3.7. MATERIALS AND METHODS

Cells and Cultures

Human ECs derived from umbilical cord veins (HUVECs) [16] were used between passage 3 and 6. Cell passages were maintained in Medium 199 (M199, Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen Co., Burlington, Ontario), in the presence of endothelial cell growth supplement (ECGS, 20µg/ml, BD Biosciences, Bedford, MA), heparin (90µg/ml, Sigma-Aldrich), L-glutamine (2 mM, Sigma-Aldrich), and antibiotics/antimycotic (Penicillin/Streptomycin and Amphotericin B solution, Invitrogen Co). Human fibroblasts were derived from foreskins and used at passages between 10 and 25. They were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma Chemical Co.) containing 5% FBS, 2mM L-glutamine, and antibiotics/antimycotic. Cell cultures were incubated at 37°C in a water-saturated atmosphere containing 5% CO₂.

3-D Angiogenesis System

Three models were designed as following. ECs were embedded in fibrin gel either dispersed in gel, the dispersed cell model, or seeded on two different size beads that were then embedded in fibrin, the micro-bead model and the macro-bead model.

Dispersed Endothelial Cell Model

A fibrinogen solution (fraction I; type I-S from bovine plasma; Sigma Chemical Co.) at 3 mg/ml was prepared with Hank's balanced salt solution (HBSS) and filtered at 0.22 µm. HUVECs were mixed in the fibrinogen solution at different densities of 1×10^4 , 2×10^4 , 4×10^4 , 7×10^4 and 1×10^5 cells per ml of fibrinogen solution. One ml of the cell suspension was deposited in each well of 12-well plates, and 30 µl of thrombin (Warner-Lambert Canada Inc., Scarborough, Ontario) solution was promptly added to each well (1.75 mg/ml at a ratio fibrinogen:thrombin at 1:0.03 v/v) which was incubated for 15 min at 37° C to polymerize fibrinogen into a gel. Cell-seeded fibrin gels were then covered with 1 ml of medium containing 2×10^4 fibroblasts that adhered and form a cell monolayer on the top surface of gels. EC-seeded fibrin gels without fibroblasts were also incubated as control

conditions. Fibrin gels with those cells were incubated in the FBS-supplemented medium M199, as described earlier, with the addition of FGF-2 (50 ng/ml, BD Biosciences) and aprotinin (50 U/ml, Trasylol®, Bayer Inc., Etobicoke, Ontario). Medium was changed every other day.

Micro-bead Model

Cytodex-3® microcarrier beads (Sigma Chemical Co.) with an average diameter of 175 µm (Figure 1A) were prepared in sterile conditions according to the supplier's instructions. The method of cell seeding on Cytodex® was based on those previously reported [15, 17]. HUVECS were mixed with microbeads considering a density of 200 cells per micro-bead. The mixture was performed in a standing up culture flask containing 5 ml of M199 to maximize cell-bead contacts. The standing up flask was gently shaken every 30 min for a 4 h period of incubation. Micro-beads coated with HUVECs were then transferred in a new culture flask and incubated overnight in a standard cell culture position to eliminate free cells. The micro-bead model consisted of mixing different micro-bead densities per ml of fibrinogen in each well of 12-well plates following a procedure similar to that reported in the dispersed cell model, using the same culture medium and conditions of incubation. 100, 250, 500, 1000, 2000, and 3500 micro-bead densities were tested.

Macro-bead Model

Macro-beads were made of bovine collagen and coated with gelatin to reproduce the protein coating as found on Cytodex-3®. Briefly, a 1% (w/v) collagen dispersion in acidic water solution (pH 3.0) was introduced in a syringe and then dripped through a 25GX5/8" needle into a container filled with liquid nitrogen to form frozen spherical masses which were freeze-dried. Dried beads were sterilised by immersion in 70% isopropanol for 15 minutes, followed by a NaCl-HEPES buffer rinse (0.05M HEPES in 0.1M NaCl), and a medium rinse. They were then soaked in a 0.5% (w/v) gelatin solution for 15 min at room temperature and stored at 4°C until utilization. Gelatin-coated macro-beads presented an average diameter of 2.25 mm (Figure 1B). Each gelatin-coated macro-bead was incubated in 150 µl of culture medium containing a dispersion of HUVECs at cell density of 1×10^5 per macro-bead in each well of 96-well plates. Culture medium was gently agitated every

30 min for 4 h. Each bead was then transferred into a 24-well plate containing 1 ml of culture medium and incubated overnight to eliminate free cells. Beads were mixed with the fibrinogen solution as reported earlier. One, five or ten macro-beads per ml of fibrinogen were placed in respective wells of 12-well plates, and the fibrinogen solution was polymerized by thrombin. They were incubated in culture medium in a similar condition as for the micro-bead model.

Cell Number Determination on Beads

In order to compare between each of the three models and to determine the effect of cell density, the number of cells present on micro-beads and macro-beads were determined by the Hoechst staining assay and the cell proliferation assay kit (CyQuant®, Molecular Probe, Oregon). Four hours after cell seeding, beads were washed twice in PBS. The Hoechst staining consisted to incubate beads in 200 µl of trisodium citrate solution in the presence of 0.02% SDS for 1 h, and then reacted with Hoechst 33258 (0.5 µg/ml). Fluorescence was quantified in fluorocytometric plates using a BioTek FL-600 fluorometer (excitation 365 nm / emission 450 nm). The Cyquant assay kit was processed according to the supplier's instruction. In both methods a standard curve of known cell concentration was run in parallel to correlate with the optical densities found with cell-seeded beads. Six batches of 100 micro-beads (n=600) and six batches of individual macro-beads (n=6) were investigated by the two assays.

Image Analyses and Quantification

The cell behaviour in the three models was periodically observed on an inverted and phase contrast microscope (Diaphot, Nikon Canada). After a period of 14 days of incubation digitalized images of angiogenic-like structures were captured through the fibrin gels with a video camera (Q-Imaging, Burnaby, British Columbia) connected to the microscope. Angiogenic-like structures were defined as sprouting processes, cord- (i.e., cell strand) and tube- (i.e., with lumen) like structures that were formed in the gel of the dispersed cell model, and around beads of the bead models (Figure 2). Moreover, the angiogenic-like structures were far below the fibroblast monolayer. Structures were determined in the dispersed cell model by going through the three-quarter thickness of the

fibrin gel, starting at the bottom. Images were focused specifically on the angiogenic-like structures formed by endothelial cells which appeared in a planar view at their maximum spreading following their observations at different focuses. The planar views included mostly the surface of the micro-beads. Although the macro-bead represented a large sphere compared to micro-beads, the majority of the angiogenic-like structures were found at their most extended areas, close to the equator of the beads, and considered most representatives for the quantitative assessments.

Minimal distances between dispersed cells and between micro-beads were measured with the Image J program (Scion Corporation, NIH) using the straight line tool from the periphery of each item of interest. In the case of the dispersed cell model, minimal distances between individual cells were measured at day 0 of the cell culture. In the micro-bead model, minimal distances between beads were measured at day 14, only on the beads that had angiogenic-like structures (about 80% of the beads). Distances were not measured in the macro-bead model because of the absence of connecting vascular network. In addition, the surface occupied by each of the angiogenic-like structures was also measured by tracing their contours that enclosed cells and micro-beads, but not the macro-beads as shown in Figure 2. Regions of interest such as distances and angiogenic-like structures were selected randomly through the gel as described earlier. More than nine regions of interest for each condition were considered in triplicate experiments.

Nuclei Stain and Histological Tissue Sections

Cultures were incubated for 30 min with Hoechst 33342 (10 μ g/ml, Invitrogen Co.) diluted in medium. Staining nuclei with Hoechst 33342 was useful to visualize the living cells on bead surfaces as shown in Figure 1C and D. After 14 days of culture, cell nuclei were stained with Hoechst particularly to position each of the individual cells forming a lumen in the tube-like structures using halt-tone between phase contrast and epifluorescence (filter excitation of 365 nm and emission of 450 nm). Furthermore, specimens from each of the three models were fixed in formaldehyde and processed for routine paraffin tissue sections (6 μ m) through the fibrin gel and histological sections were stained with hematoxylin eosin saffron (HES).

Statistic Analyses

Comparisons of the values of surface areas and distances were performed using one way ANOVA analysis with the SigmaStat program (Systat Software, Inc., Point Richmond, CA) and set at a p value ≤ 0.05 . At least 9 specimens for each condition were considered and repeated in triplicate.

3.8. RESULTS

Determination of Cell Densities on Micro- and Macro-Beads

After EC seeding, HUVECS adherent to micro- and macro-beads spread evenly and were confluent within 24 hrs as observed after Hoechst staining (Figure 1). Indirect measurements of the number of adherent cells present on beads indicated an estimated average number of 66 cells per micro-bead and 15,993 cells per macro-bead as determined by pooling the values found with the Cyquant and Hoechst assays (Table I). From this estimated number, cell densities were calculated as equivalent cell number by reporting to those of dispersed cells in order to establish a comparison (Table II).

Dispersed Endothelial Cell Model

By 14 days, some stellar-shape structures appeared in a form of a cord- and tube-like network observed only with high cell densities (Figures 2B and 3A). Lumens can be seen very distinctively on histological sections (Figure 3B). Amongst the five cell densities tested, the minimal cell density to induce angiogenic-like structures was 7×10^4 cells/ml of fibrinogen. Moreover, fibroblasts were required to support the formation of distinct capillary-like structures. In the absence of fibroblasts, ECs formed clumps or remained isolated. The minimal distances measured between individual endothelial cells 1hr after cell seeding (Figure 2A) decreased exponentially as a function of cell densities (Figure 3C). For cell densities of 7×10^4 and 1×10^5 cells/ml the distances between cells as measured on day 0 were found at 58 and 51 μm , respectively. The average surface occupied by angiogenic-like structures was 0.0351 mm^2 at 7×10^4 cells/ml and 0.0718 mm^2 at 1×10^5 cells/ml (Figure 3D). There was no significant correlation between distance and angiogenic surface values in the dispersed cell model.

Micro-bead model

The formation of angiogenic-like structures in the presence of EC-seeded Cytodex® occurred by 14 days in all tested micro-bead densities (from 100 to 3,500 beads/ml). ECs sprouted out from the micro-bead surface into fibrin to form elongated cell strands and tube-like structures (Figures 2C and 4A). Angiogenic-like structures were connected to

those sprouting from neighbouring beads, more specifically between close beads, to form a complex network. Phase contrast and Hoechst staining showed in the angiogenic-like structures several cells which were aligned in parallel forming a lumen as confirmed by histology (Figure 4A & B). The presence of fibroblasts was also necessary to induce angiogenic-like structures with lumens compared to similar culture conditions without fibroblasts. The minimal distances measured between individual beads by day 14 decreased exponentially as a function of cell densities (Figure 4C). Surfaces occupied by the angiogenic-like structures increased as a function of the bead densities, except a plateau was found between 500 and 2000 micro-beads/ml (Figure 4D). The surface value at 3500 micro-beads/ml was significantly higher (0.628 mm^2) than those at the plateau ($0.395 - 0.467 \text{ mm}^2$). Moreover, the surfaces of angiogenic-like structures correlated exponentially with the distances between micro-beads.

Macro-bead model

Although the whole surface of the macro-beads was covered by ECs after 24 hrs of culture, sprouting was not visible in the fibrin gel after a 7 day culture period. At that time, ECs appeared to aggregate to each other in randomly organized cell strands (i.e., cord-like structures) on the bead surface as observed with Hoechst staining (Figure 5A). By 14 days, sprouting was observed from all the macro-beads (Figure 5B). In some beads, small size tube-like structures invaded the fibrin. In addition, ECs seemed to detach from the bead surface and formed cavity-like structures lined with ECs which expended out and from which some sprouting emerged (Figures 2D and 5B). These cavities and capillary-like structures can be also seen on histological sections (Figure 5C & D). However, the formation of a connecting angiogenic network was not observed between two or more beads, even after 21 days of culture. The surface areas occupied by sprout- and cavity-like structures increased in the presence of 5 beads, and then a plateau was observed with 10 beads (Figure 5E). In the absence of fibroblasts, cavity and capillary-like structure were not formed.

3.9. DISCUSSION

In the goal to enhance angiogenesis in a tissue engineered device or implant, the design of a scaffold and the method of introducing ECs may depend on how cells are presented within the 3-D environment. Cell densities and confluence state may play an important role as well. In the present study, ECs incorporated in fibrin were introduced either in a dispersed manner or confluent on two different size beads, resulting in angiogenic-like structures with three distinct sizes and behaviours. A large number of dispersed cells was necessary to form angiogenic-like structures. Whereas, the surfaces occupied by angiogenic-like structures increased as a function of the density of beads or cell number equivalent. Increasing the number of micro-beads was not necessary to obtain a complex network connecting beads. The distance values between dispersed cells and those between micro-beads were also the determinant factors to induce angiogenic-like structures. Moreover, the presence of fibroblasts in our co-culture system was necessary to optimize growth conditions of ECs and lumen formation.

Vascular ECs derived from human umbilical veins (HUVECs) are largely used in cultures and were chosen because of their availability and their potential to form angiogenic network in a variety of 3-D models using collagen, basement membrane-like matrix (Matrigel®) or fibrin gels as supportive matrices [13, 15, 17, 18]. In addition, it has been shown that the model using Cytodex-3® did not support the sprouting of human endothelial cells, compared to animal endothelial cells, even in the presence of growth factors, unless fibroblasts were introduced on the top of the fibrin gel [15]. This optimal co-culture condition was used for all of the three models investigated in our study. Fibroblasts provide important factors to support vessel maturation *in vitro* as previously demonstrated [19, 20]. However, it appears that fibroblasts and ECs do not need to be in direct contact to induce ECs to sprout. This observation has been recently demonstrated using spheroids containing a mixture of ECs with fibroblasts or smooth muscle cells which resulted in reduction of sprouting, compared to separated-cell co-cultures [19, 21]. In addition, FGF-2 was added in the medium since it is known to stimulate VEGF expression by ECs and support angiogenesis *in vitro* [22, 23].

In the cell dispersed model, dispersed ECs have to be relatively close to each other to trigger an angiogenic phenotype. A maximal distance of 50-60 μm (Figure 3C) may be the limit for ECs to interact. Although high cell density increased the expansion of angiogenic-like structures in the dispersed cell model, direct EC-EC contacts may not be necessary. This phenomenon was also observed by others using high cell density ($\geq 1 \times 10^6$ cells/ml) in collagen gel [24, 25]. Although the effects of different cell densities have not been previously investigated, their observation supports our results. Furthermore, we often observed that the angiogenic-like structures were formed close to the bottom of the well than close to the fibroblast monolayer on the top of the fibrin gel. This event suggests that ECs situated at the lower part of the fibrin gel may be exposed to low nutrient supply following a gradient. Although fibrin is a highly micro-porous and hydrated matrix network compared to collagen gel, dispersed ECs that percolated at the bottom may be more prone to an angiogenic switch than those on the upper part of the gel. In addition, the fibroblast monolayer on the top of gel may contribute to diminish nutrients and oxygen supply to ECs. Furthermore, strong cell-cell interactions through paracrine and/or autocrine factors may be largely involved as well as a temporo-spatial concentration gradient. Another 3-D angiogenesis system was developed without the presence of fibroblasts in which fibrin containing dispersed ECs was laid on a confluent EC monolayer set at the bottom of well [13]. In that system, the dispersed ECs close to that monolayer first agglomerated in some areas and later became tube- and branch-like network by invading vertically the fibrin. This also suggests that the presence of confluent cells in contact with an appropriate matrix such as fibrin may facilitate angiogenesis-like process. Thus, confluent cell monolayer can be presented differently, such as on spherical supports (i.e., microcarrier beads) in order to increase the surface of endothelial cell covering and subsequent sprouting for vascularisation of tissue engineered devices and scaffolds.

Indeed, the two models with beads have interesting features towards the strategy to vascularise an implant, specifically by using small size spheres such as the Cytodex-3® on which endothelial cells adhere well. Except for a critical distance of 900 μm between micro-beads, ECs on a bead can interact on another bead(s) via multiple connections within the newly formed angiogenic-like structures as seen by 14 days, resembling to an

anastomotic angiogenesis process. Moreover, the size of angiogenic-like structures in the presence of micro-beads is significantly increased in comparison to that with dispersed cells. More importantly, the equivalent number of cells to be seeded is significantly reduced in the micro-bead model than that of dispersed cells. The determination of equivalent cell numbers on beads is more likely to be realistic of cell density since the values of the two bio-assays came close in both conditions (Table I).

The presence of mesenchymal cells such as fibroblasts is likely to enhance the formation of new capillaries as observed in the three reported models. A direct contact with fibroblast monolayer may be possible in the dispersed cell model compared to the two bead models. However, on one hand, the percolation of ECs and obviously beads during fibrin polymerization and on the other hand, the fibroblast monolayer on the top of polymerized fibrin resulted in two distinct entities. This was confirmed by phase contrast observation at different focuses through the gel thickness under microscope, and by the histological sections. Therefore no direct contact between fibroblasts and ECs was possible. Another experimental model in which EC-coated micro-beads were mixed with dispersed ECs in fibrin (data not shown) did not result in further angiogenesis in the absence of fibroblast monolayer. Fibroblasts play definitively a role in triggering EC-EC interactions present on micro-beads, probably by paracrine factors since mixing fibroblasts and ECs together into spheroids reduced angiogenic sprouting [19].

The macro-bead model was designed to see whether a larger spherical surface covered with ECs may increase the efficacy to form angiogenesis compared to micro-beads. An interesting observation with the macro-bead model is the important sprouting processes that extended in the fibrin matrix to a certain limit in time, and occasionally form capillaries. In addition, cord-like structures appeared on the surface of macro-beads resembling to those observed with a confluent EC monolayer on Matrigel® [10]. However, the occurrence of vascular structures was delayed, the formation of a network connection between beads was inexistent, and the spreading out of the angiogenic-like structures remains limited even by increasing the number of macro-beads compared to that seen in the micro-bead model. All of these observations suggest that ECs on each macro-bead are self-

sufficient without interaction with those present on neighbouring beads. Because of a large number of ECs present on the surface of the macro-beads, there may be a limiting factor or an inhibitory effect between cells in contact to each other (e.g. contact inhibition) in a large spherical environment as demonstrated previously with epithelial-type cell monolayer [26]. The formation of cord-like structures on the surface of the bead is another example on how ECs can behave by dying (probably apoptosis) and/or by retracting together to form microcapillaries as previously reported [10]. In the mean time, the presence of fibrin around beads may trigger radial sprouting from these cords with no possibility to further extend. Furthermore, the quantification of areas occupied by angiogenic-like structures as used did not reflect entirely the structures present on the spherical surfaces of the macro-beads, due to the difficulty to visualize and subsequently quantify these structures around an opaque macro-sphere. This was not the case with micro-beads, due to their smaller size. Although the macro-beads were not fully covered by ECs at 7-14 days due to the formation of cord-like structures, we can speculate that the size of the angiogenic-like structures is much higher than that in the planar view. Thus, the angiogenic structures may be similar or larger than those measured in the micro-bead model.

In conclusion, our study shows that maximizing capillary-like structures can be accomplished by seeding relatively small number of ECs on carriers and by co-culturing, but separately, in the presence of fibroblasts. ECs on micro-beads and macro-beads induced large angiogenic-like structures compared to those in the dispersed cell model. However, micro-beads exhibited numerous angiogenic characteristics and in particular the formation of a network. The distance between the micro-beads does not have to be very close to induce anastomotic tube-like structures, and it is not necessary to have a high micro-bead density. Thus, the use of micro-sphere can be an interesting method to consider in order to switch adherent ECs (probably quiescent) towards an angiogenic phenotype characterized not only by the formation of tube-like structures, but also by anastomoses. The latter is a very important concept that can provide adequate blood supply capability in the interior of an implant. Using a relatively small number of ECs and fibroblasts at proximity, this design can be applied to induce new vascularisation network in tissue engineered devices. In addition, the development of a scaffold presenting micro-spherical structures in its interior

may assist cell invasion and angiogenic process. Further investigations with intermediate size beads may be interesting to develop in order to determine a critical diameter of the spherical supports.

3.10. ACKNOWLEDGMENTS

We are thankful to Mrs. Renée Paradis for technical assistance and Catherine Gérard for scientific advices. LM is recipient of a studentship from the Fonds de recherche sur la nature et les technologies (FQRNT). This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC, strategic project; CJD).

3.11. TABLES

TABLE I. Determination of the cell numbers on micro-beads and macro-beads using the cell growth assay with Hoechst and the cell proliferation assay (CyQuant®). Micro-beads (n=600) and macro-bead (n=6) were analysed 4 hrs after cell seeding. Values represent means and SEM.

	Micro-beads	Macro-beads
Cell growth assay	46 ± 6	14,781 ± 786
CyQuant®	79 ± 6	17,004 ± 818
Overall average	66 ± 7	15,993 ± 635

TABLE II. Corresponding numbers of micro- and macro-beads (i.e., equivalent cell numbers) based on the results obtained in Table I as a function of the number of cells tested in the dispersed model.

Number of dispersed cells/ml	10,000	20,000	40,000	70,000	100,000
Equivalent cell number of micro-bead	151	303	606	1.060	1.515
Equivalent cell number of macro-bead	0.62	1.25	2.50	4.37	6.25

3.12. FIGURES

FIGURE 14

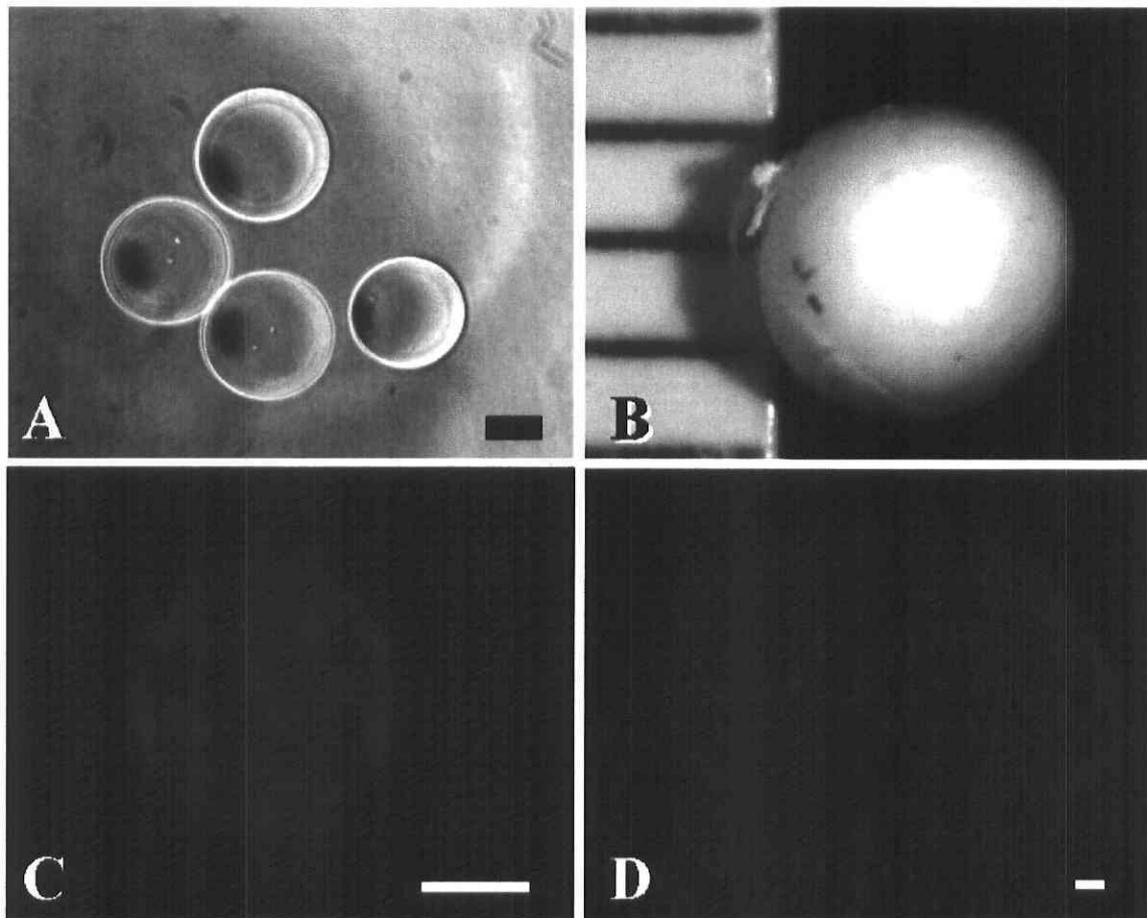


FIGURE 15

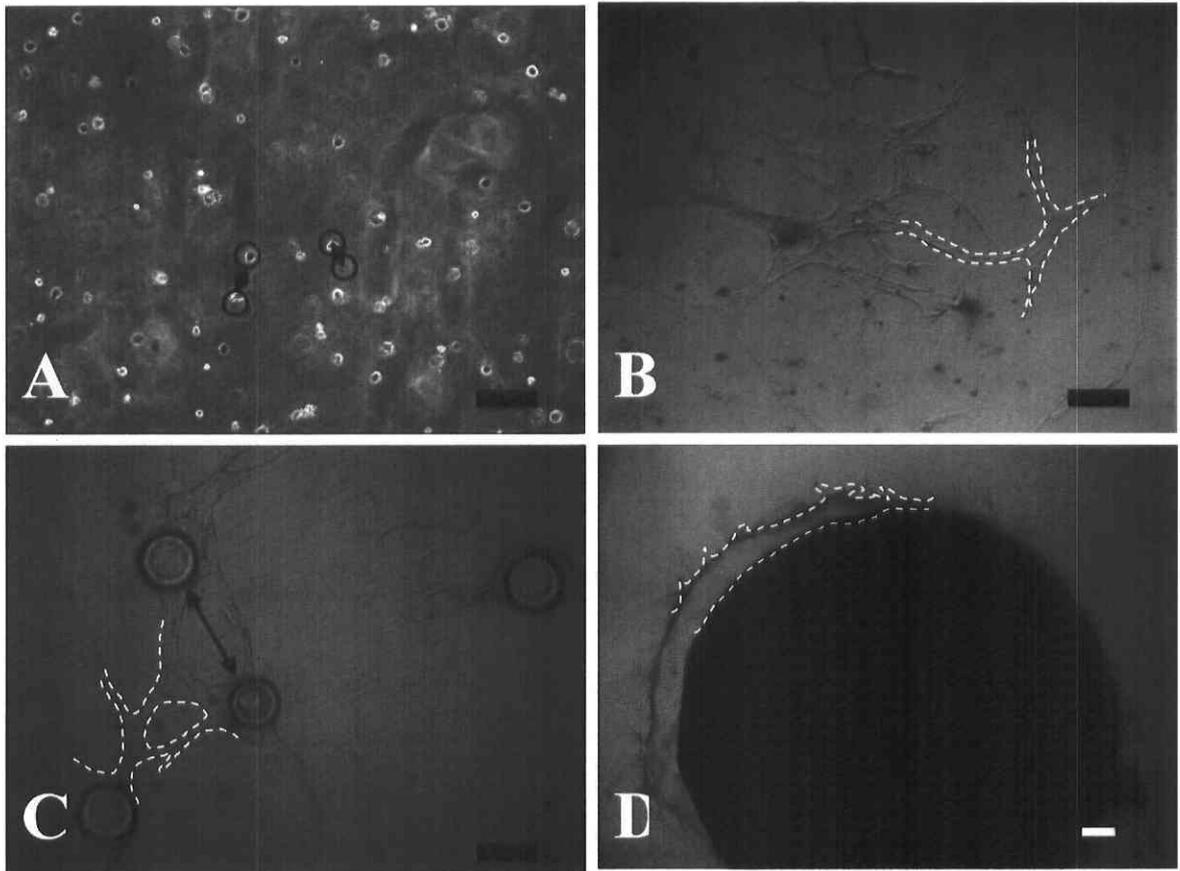


FIGURE 16

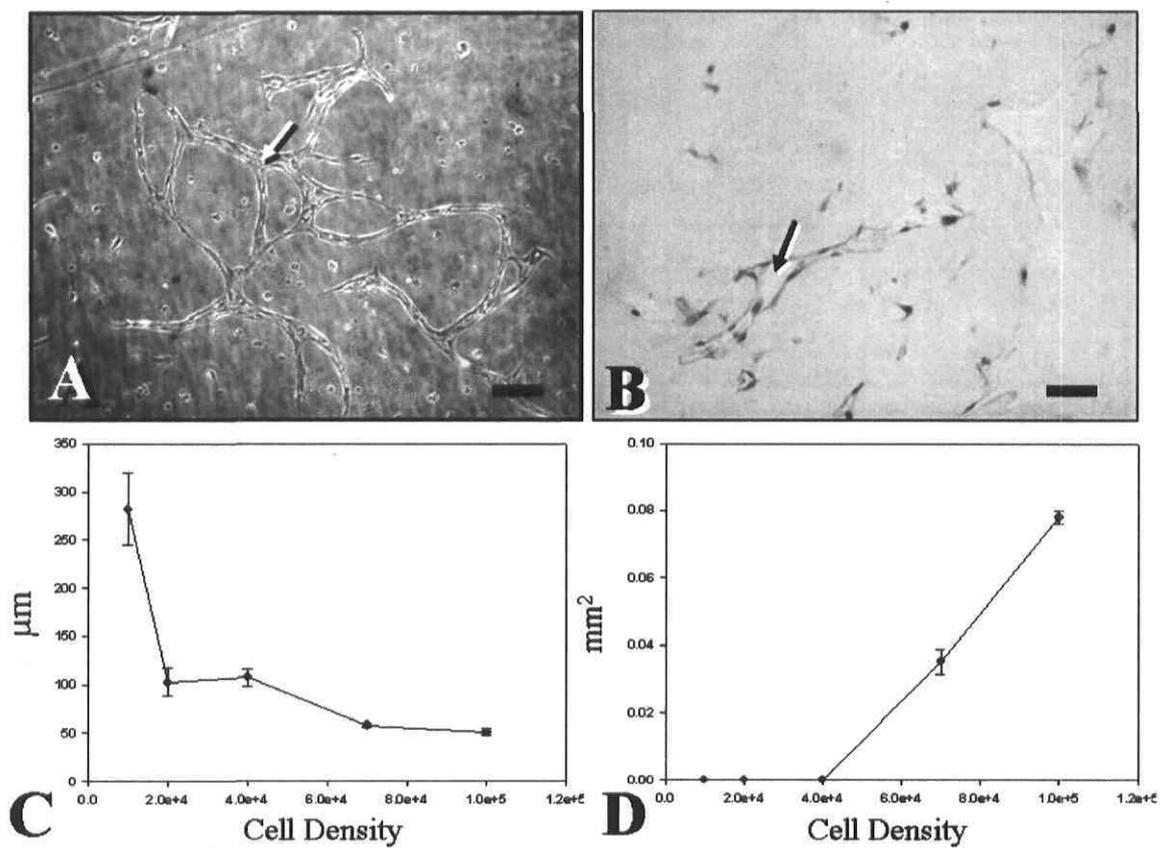


FIGURE 17

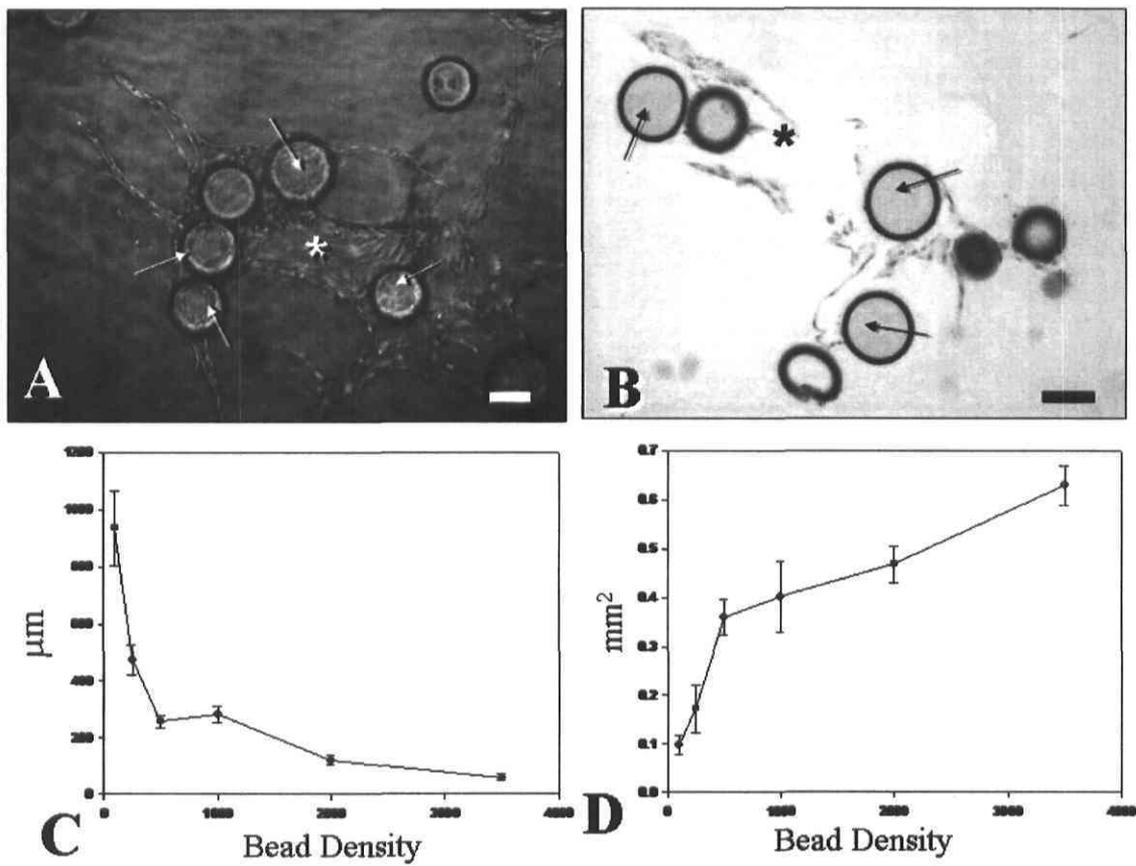
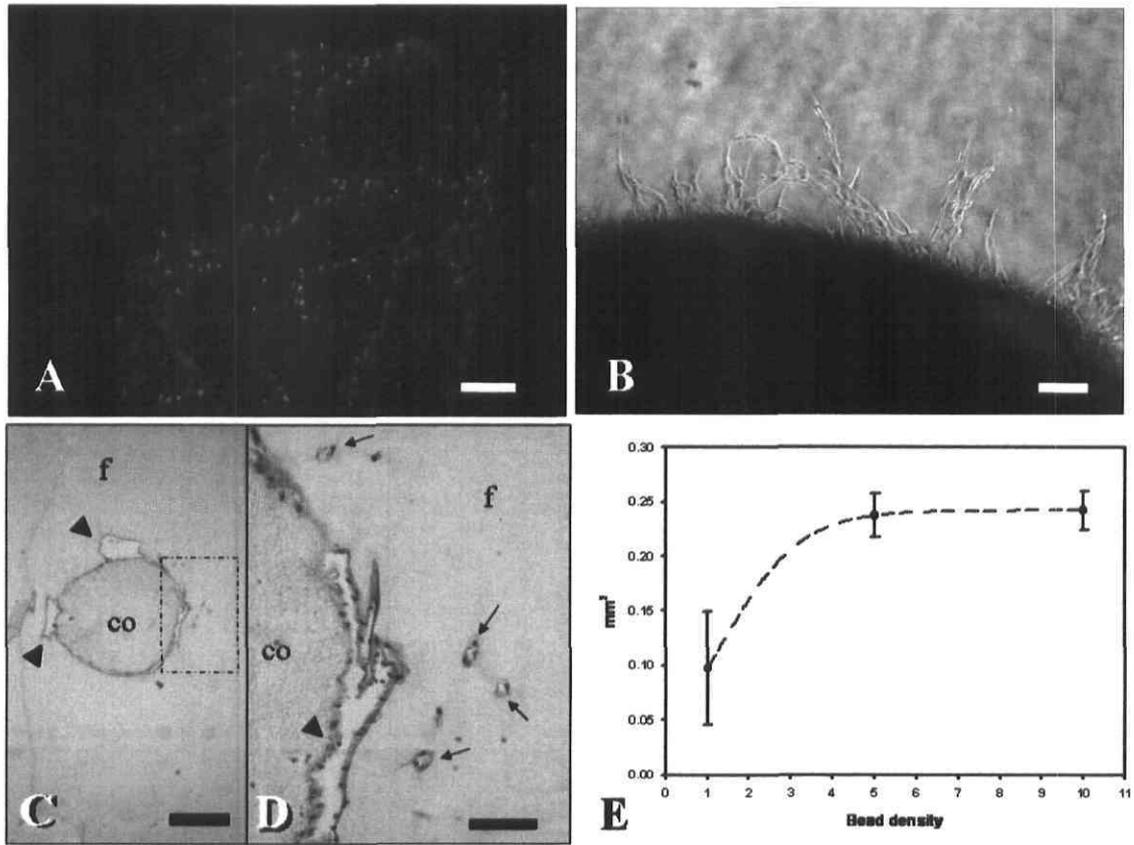


FIGURE 18



3.13. FIGURE LEGENDS

Figure 14. Morphology of beads prior to endothelial cell seeding and cell seeding efficiency on beads. Micro-beads (Cytodex-3®) have an average diameter of 175 μm (A, bar = 100 μm). The average diameter of gelatin-coated macro-beads was 2.25 mm (B, line intervals = 1 mm). Endothelial cell seeding was then proceeded as described in Materials and Methods section. The nuclei of endothelial cells were stained with Hoechst 33342 to visualize the adherent cells and their distribution on micro-beads (C) and macro-beads (D) after few hours post-seeding. Bars = 100 μm .

Figure 15. Angiogenic-like structures and methods of quantification. In the dispersed cell model, the minimal distances (double-headed arrows) were measured between cells a few hrs after cell seeding in fibrin gel (A). After a 14 day culture period, the surface areas occupied by angiogenic-like structures were determined by outlining the projected 3-D structures in the dispersed cell model (B), in the micro-bead model (C), and in the macro-bead model (D). Distances between micro-beads were also measured at 14 days (C). In the dispersed cell model and the micro-bead model stellar-like shape networks were observed (B and C); while in the macro-bead models cavities with some sprouting were observed (D). Bars = 100 μm .

Figure 16. Observation and quantification in the dispersed endothelial cell model after 14 days. Angiogenic-like structures (A) were present in the fibrin when endothelial cells were seeded at high cell density (1×10^5 cells per ml of fibrin) as observed by phase contrast (A) and on histological sections (B). Arrows pointed at the lumens. Bars = 100 μm . Minimal distances (μm) between endothelial cells as measured at day 0 decreased as a function of cell density (C). Angiogenic-like structure areas (mm^2) measured after a culture period of 14 days were reported to the cell seeding densities (D). Means \pm SEM are represented.

Figure 17. Microscopic observations and quantification in the micro-bead model. Tube-like structures emerged from the micro-beads (arrows) forming a complex network with a lumen (asterisk) as observed by merging phase contrast and epifluorescence after staining

with Hoechst 33342 (A), and on histological sections (B). These structures presented lumens as observed at different focuses through the thickness of fibrin gel and connected between neighbouring beads. Bars = 100 μ m. Minimal distances (μ m) between micro-beads (C) and the areas (mm^2) occupied by the angiogenic-like structure areas (D) were measured after 14 days of culture, as a function of the micro-bead density (i.e., beads per ml of fibrinogen). Equivalent cell number densities are reported in Table II. Means \pm SEM are represented.

Figure 18. Microscopic observations in the macro-bead model and quantification. After 7 days of culture, endothelial cells on the macro-bead surface formed a network of cell strands or cord-like structures as underlined by staining nuclei with Hoechst 33342 (A; bar = 100 μ m). Sprouting from the macro-bead surface was observed by phase contrast at day 14 (B; bar = 100 μ m). Histological sections revealed cavity-like structures (arrowheads) close to the collagen bead (co) surface, which expanded in the fibrin (f) (C; bar = 500 μ m). High magnification (corresponding to the dashed lined rectangle in C) shows a cavity (arrowheads) and capillaries (arrows) in the fibrin (D; bar = 100 μ m). In graph E, the surface areas (mm^2) occupied by the angiogenic-like structures around the macro-beads are presented as function of bead density (bead/ml). Equivalent cell number densities are reported in Table II. Means \pm SEM are represented.

3.14. REFERENCES

1. Richardson TP, Peters MC, Ennett AB, Mooney DJ. Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat Biotechnol* 2001; 19:1029-1034.
2. Soejima N, Negishi N, Nozaki M, Sasaki K. Effect of cultured endothelial cells on angiogenesis in vivo. *Plast Reconstr Surg* 1998; 101:1552-1560.
3. Schechner JS, Crane SK, Wang F, Szeglin AM, Tellides G, Lorber MI, Bothwell AL, Pober JS. Engraftment of a vascularised human skin equivalent. *FASEB J* 2003; 17:2250-2256.
4. Kannan RY, Salacinski HJ, Sales K, Butler P, Seifalian AM. The roles of tissue engineering and vascularisation in the development of micro-vascular networks: a review. *Biomaterials* 2005; 26:1857-1875.
5. Ito K, Yamada Y, Nagasaka T, Baba S, Ueda M. Osteogenic potential of injectable tissue-engineered bone: a comparison among autogenous bone, bone substitute (Bio-oss), platelet-rich plasma, and tissue-engineered bone with respect to their mechanical properties and histological findings. *J Biomed Mater Res A* 2005; 73:63-72.
6. Carmeliet P. Mechanism of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000; 6:389-395.
7. Bergers G and Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev* 2003; 3:401-410.
8. Breier G, Risau W. The role of vascular endothelial growth factor in blood vessel formation. *Trends Cell Biol* 1996; 6:454-456.
9. Folkman J and Haudenschild C. Angiogenesis in vitro. *Nature* 1980; 288:551-556.
10. Haralabopoulos GC, Grant DS, Kleinman HK, Maragoudakis ME. Thrombin promotes endothelial cell alignment in Matrigel in vitro and angiogenesis in vivo. *Am J Physiol* 1997; 273:C239-C245.
11. Vailhé B, Vittet D and Feige JJ. In vitro models of vasculogenesis and angiogenesis. *Lab Invest* 2001; 81:439-452.

12. Davis GE, Black SM, Bayless KJ. Capillary morphogenesis during human endothelial cell invasion of three-dimensional collagen matrices. *In vitro Cell Dev Biol Anim* 2000; 36:513-519.
13. Gagnon E, Cattaruzzi P, Griffith M, Muzakare L, LeFlao K, Faure R, Béliveau R, Hussain SN, Koutsilieris M, Doillon CJ. Human vascular endothelial cells with life spans: *In vitro* cell response, protein expression, and angiogenesis. *Angiogenesis* 2002; 5:21-33.
14. Nehls V, Drenckhahn D. A novel, microcarrier-based *in vitro* assay for rapid and reliable quantification of three-dimensional cell migration and angiogenesis. *Microvasc Res* 1995; 50:311-322.
15. Nakatsu MN, Sainson RCA, Aoto JN, Taylor KL, Aitkenhead M, Pérez-del-Pulgar S, Carpenter PM, Hughes CCW. Angiogenic sprouting and capillary lumen formation modeled by human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) in fibrin gels: the role of fibroblasts and Angiopoietin-1. *Micro Res* 2003; 66:102-112.
16. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973; 52:2745-2756.
17. Griffith CK, Miller C, Sainson RC, Calvert JW, Jeon NL, Hughes CC, George SC. Diffusion limits of an *in vitro* thick prevascularized tissue. *Tissue Eng* 2005; 11:257-266.
18. Kunz-Schughart LA, Schroeder JA, Wondrak M, Rey F, Lehle K, Hofstaedter F, Wheatley DN. Potential of fibroblasts to regulate the formation of three-dimensional vessel-like structures from endothelial cells *in vitro*. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290:C1385-C1398.
19. Wenger A, Kowalewski N, Stahl A, Mehlhorn AT, Schmal H, Stark GB, Finkenzeller G. Development and characterization of a spheroidal coculture model of endothelial cells and fibroblasts for improving angiogenesis in tissue engineering. *Cells Tissues Organs* 2005; 181: 80-88.
20. Pinney E, Liu K, Sheeman B, Mansbridg J. Human three-dimensional fibroblast cultures express angiogenic activity. *J Cell Physiol* 2000; 183:74-82.
21. Korff T, Kimmina S, Martiny-Baron G, Augustin HG. Blood vessel maturation in a 3-dimensional spheroidal coculture model: direct contact with smooth muscle cells regulates endothelial cell quiescence and abrogates VEGF responsiveness. *FASEB J* 2001; 15:447-457.

22. Seghezzi G, Patel S, Ren CJ, Gualandris A, Pintucci G, Robbins ES, Shapiro RL, Galloway AC, Rifkin DB, Mignatti P. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *J Cell Biol* 1998; 141:1659-1673.
23. Villaschi S, Nicosia RF. Angiogenic role of endogenous basic fibroblast growth factor released by rat aorta after injury. *Am J Pathol* 1993; 143:181-190.
24. Davis GE, Camarillo CW. An alpha 2 beta 1 integrin-dependent pinocytic mechanism involving intracellular vacuole formation and coalescence regulates capillary lumen and tube formation in three-dimensional collagen matrix. *Exp Cell Res* 1996; 224:39-51.
25. Ilan N, Mahooti S, Madri JA. Distinct signal transduction pathways are utilized during the tube formation and survival phases of in vitro angiogenesis. *J Cell Sci* 1998; 111:3621-3631.
26. Cavallaro U, Liebner S, Dejana E. Endothelial cadherins and tumor angiogenesis. *Exp Cell Res* 2006; 312:659-667.

CHAPITRE 4

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le concept classique du génie tissulaire est basé sur l'isolement, l'expansion et par la suite, l'ensemencement de cellules autologues ou allogéniques dans un biomatériau avant l'implantation chez l'individu. Cependant, pour les greffes et implants volumineux, la limite de diffusion de l'oxygène et des nutriments ($\leq 1\text{mm}^3$) est largement dépassée représentant ainsi un défi majeur dans le développement d'implants de grandes tailles. En effet, il doit y avoir suffisamment d'oxygène et de nutriments pour assurer la survie des cellules à l'intérieur de l'implant pendant la période qui sépare l'implantation et l'envahissement du tissu cicatriciel ou au fur et à mesure de son intégration dans le tissu lésé. Une des solutions serait de favoriser le développement d'une vascularisation au sein du biomatériau avant son implantation. Cet objectif est l'un des plus explorés dans le domaine du génie tissulaire (Wenger et al., 2005; Griffith et al., 2005).

Basé sur le principe de la limite de diffusion, nous voulions développer une masse composée de matrice biologique (fibrine et collagène) et imprégnée de cellules endothéliales afin de provoquer la formation d'un réseau micro-vasculaire. Nous avons aussi développé un système permettant d'augmenter la taille des masses tissulaires reconstituées, en les cultivant dans un bioréacteur. Ainsi, nous avons obtenu des masses d'environ 2 cm de diamètre en incorporant au départ une petite masse dans une plus volumineuse, qui à son tour était incorporée dans une plus grosse masse. En incubant ces masses dans un bioréacteur et avec l'ajout de FGF-2 pendant 14 jours, nous avons pu observer la présence de quelques structures angiogéniques (chapitre 2). Cependant, ces structures étaient peu nombreuses et réparties de façon aléatoire. Une prolongation du temps de cultures favorisait la fibrinolyse causée par l'action des protéases sécrétées par les cellules.

De telles étapes successives peuvent être créées pour développer un implant ou un substitut de grande taille vascularisé par des techniques de génie tissulaire. Nous pourrions proposer de créer tout d'abord une petite masse contenant des cellules endothéliales qui serait par la suite intégrée dans une plus grosse masse. Comme nous l'avons remarqué, les cellules endothéliales avaient tendance à former une couche confluyente sur la petite masse. Nous nous attendions à ce que les cellules bourgeonnent et forment des micro-vaisseaux aussi bien vers l'intérieur que vers la périphérie des masses combinées entre-elles.

Dans un autre cadre d'idées, nous pourrions nous aider des conséquences de l'hypoxie. Sachant que des fibroblastes sous hypoxie sécrètent des facteurs pro-angiogéniques, nous avons pensé qu'en incorporant une petite masse de fibrine/collagène avec des fibroblastes au centre d'une masse plus volumineuse sans cellules, il y aurait au centre une diminution d'oxygène, de nutriments de même qu'une diminution du pH résultant en une mort cellulaire. Lorsqu'en incorporant des cellules endothéliales dans la masse périphérique, nous espérons que les fibroblastes altérés au centre attireraient la formation de capillaires de l'extérieur vers le centre afin d'assurer la survie des fibroblastes. Cependant, les résultats obtenus ne correspondaient pas à nos attentes. En effet, les fibroblastes avaient tendance à migrer et proliférer en périphérie (chapitre 2). Des fibroblastes irradiés pourraient éviter une migration et prolifération tout en maintenant un taux adéquat de sécrétion de facteurs de croissances. De plus, comme avait souligné Wenger et al., 2005, le contact direct entre les fibroblastes et les cellules endothéliales n'était pas nécessaire pour la formation de branchements vasculaires. Cela note l'importance de bien agencer ces cellules dans l'espace tridimensionnel d'un biomatériau afin de favoriser au maximum la formation d'angiogénèse en évitant les inhibitions naturelles dues aux contacts entre des cellules de différents types. Il est possible, dans des cultures tridimensionnelles, de réaliser une coculture avec des fibroblastes et des cellules endothéliales sans contact direct. La matrice extracellulaire permettrait la diffusion des facteurs pro-angiogéniques sécrétés par les fibroblastes. Notre chapitre 3 propose une possibilité.

À noter que le développement de ces masses avait aussi pour but de valider une exploration par tomographie d'émission de photons (TEP) avec du glucose radioactif qui permet de mesurer indirectement l'activité métabolique des cellules. Nos essais préliminaires avec des masses contenant des cellules ont montré que les cellules au centre étaient encore vivantes et métaboliquement actives. Les cellules semblaient récupérer facilement puisqu'il n'y avait pas de limite de diffusion du milieu dans les matrices utilisées malgré que le volume des masses était au-delà de la limite décrite de 1 mm^3 (la taille des masses étant d'environ de 2 cm de diamètre, soit un volume de $4,2 \text{ cm}^3$). Ce qui expliquerait pourquoi des fibroblastes mis au centre d'une sphère envahissaient la masse périphérique tel qu'observé (chapitre 2). Cependant, des expériences ultérieures montraient aussi une captation du glucose radioactif par la matrice (fibrine + collagène) ce qui rendait difficile l'interprétation des résultats. Cette étude n'a pas été poursuivie.

Afin de contrer ce problème de diffusion, il faudrait développer des masses qui seraient moins poreuses permettant de créer une hypoxie au centre, se rapprochant ainsi de l'environnement *in vivo*. Une autre possibilité serait de mettre directement les sphères dans un environnement hypoxique ou bien d'utiliser du chlorure de cobalt (CoCl_2), un composé chimique imitant les effets d'hypoxie (Poulios et al., 2006) ou bien de mettre en contact les cellules avec de l'éthanol pour induire une mort cellulaire. Ainsi, les fibroblastes dans des conditions hypoxiques et de nécrose/apoptose devraient sécréter des facteurs stimulant fortement les cellules endothéliales à former des vaisseaux. La technologie du PET pourrait permettre par la suite de visualiser tout l'intérieur de ces sphères vivantes en comparant la viabilité des fibroblastes avec ou sans cellules endothéliales.

Présentement, il existe peu d'informations concernant les interactions entre les cellules endothéliales dans un environnement tridimensionnel lors de l'angiogénèse. Ces informations pourraient être utiles pour l'optimisation d'une angiogénèse à l'intérieur des biomatériaux ou greffes avant leur implantation. Ainsi, nous avons développé trois modèles tridimensionnels de cultures de cellules endothéliales pour déterminer des conditions optimales à induire des structures angiogéniques *in vitro*. Nous avons comparé le comportement des cellules endothéliales dans ces 3 conditions qui étaient des cellules

dispersées versus cellules confluentes sur des micro- et macro-billes (chapitre 3). Lorsque les cellules sont dispersées les unes des autres dans un gel de fibrine, il faut un minimum de 7×10^4 cellules/ml (équivalent à une distance minimale d'environ $58 \mu\text{m}$) pour induire la formation de micro-vaisseaux correspondant à une surface de 0.0351 mm^2 . En revanche, pour l'équivalent du même nombre de cellules, mais confluentes sur des micro-billes, la surface angiogénique augmente de 5 fois. Par contre, une augmentation de la surface des billes ne conduit pas à une augmentation d'angiogénèse. Ainsi, nous avons observé une diminution de la surface angiogénique de même qu'une absence de connection entre les macro-billes. Nous pouvons donc conclure que le modèle de micro-billes est le plus efficace pour l'optimisation d'une angiogénèse tout en réduisant le nombre de cellules endothéliales requis.

Dans cette direction, il serait intéressant de considérer l'utilisation de billes de tailles intermédiaires. Ceci permettrait de déterminer quelle est le nombre maximal de cellules endothéliales à ensemercer sur un support sphérique afin d'obtenir le maximum d'angiogénèse. De plus, il serait intéressant de comprendre pourquoi les cellules endothéliales en faible densité comme les micro-billes forment facilement des micro-vaisseaux, alors qu'en plus grand nombre (macro-billes), ce phénomène est moins favorisé. Pour ce faire, il faudrait comparer, par exemple, l'expression des différentes cadhérines sur les différents types de billes puisque ces molécules sont au cœur du phénomène d'inhibition par contact.

L'ajout obligatoire des fibroblastes peut limiter l'utilisation de ce modèle pour vasculariser des biomatériaux, puisqu'il faut éviter le contact direct de ces cellules avec les cellules endothéliales. Cependant, ces contacts sont nécessaires lors de la maturation et la stabilisation des micro-vaisseaux nouvellement formés. Par exemple, afin de déterminer la stabilité des micro-vaisseaux, il pourrait être envisagé de vérifier la composition de la matrice nouvellement déposée par les cellules endothéliales par immunohistochimie avec des anticorps contre le collagène de type IV et contre la laminine. Identifier les facteurs sécrétés par les fibroblastes qui joueraient un rôle important dans ces interactions serait un travail exhaustif. L'isolation de milieux conditionnés à partir de cultures de fibroblastes sur

des gels pourrait être une avenue à considérer. Cependant, des études menées antérieurement dans le laboratoire n'ont pas permis de démontrer un effet positif dans ces conditions. Il faudrait peut-être mettre les deux types cellulaires en présence du même milieu, mais séparés par une membrane permettant ainsi l'échange de facteurs exprimés aussi bien par les cellules endothéliales que les fibroblastes et en évitant le contact direct de ces 2 types cellulaires. Nous pourrions penser à une membrane biodégradable qui permettrait par la suite le contact direct entre les cellules endothéliales et les fibroblastes lors de la stabilisation des micro-vaisseaux.

REFERENCES

- Armulik A., Abramsson A., and Betsholtz C. (2005). Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* 97, 512-523.
- Asahara T., and Kawamoto A. (2004). Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 287, C572-C579.
- Auerbach R., Akhtar N., Lewis R.L., and Shinnars B.L. (2000). Angiogenesis assays: Problems and pitfalls. *Cancer Metastasis Rev* 19, 167-172.
- Auguste P., Javerzat S., and Bikfalvi A. (2003). Regulation of vascular development by fibroblast growth factors. *Cell Tissue Res* 314, 157-166.
- Bachetti T., and Morbidelli L. (2000). Endothelial cells in culture: a model for studying vascular functions. *Pharmacol Res* 42(1), 9-19.
- Bergers G., and Benjamin L.E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3, 401-410.
- Black A.F., Berthod F., L'Heureux N., Germain L., and Auger F.A. (1998). *In vitro* reconstruction of a human capillary-like network in a tissue-engineered skin equivalent. *FASEB J* 12(13), 1331-1340.
- Bogdanovic E., Nguyen V.P., and Dumont D.J. (2006). Activation of Tie2 by angiopoietin-1 and angiopoietin-2 results in their release and receptor internalization. *J Cell Sci* (pub ahead of print)
- Bracken C.P., Whitelaw M.L., and Peet D.J. (2003). The hypoxia-inducible factors: key transcriptional regulators of hypoxic responses. *Cell Mol Life Sci* 60, 1376-1393.
- Brooke B.S., Karnik S.K., and Li D.Y. (2003). Extracellular matrix in vascular morphogenesis and disease: structure versus signal. *Trends Cell Biol* 13(1), 51-56
- Burri P.H., Hlushchuk R., and Djonov V. (2004). Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev Dyn* 231(3), 474-488.
- Carmeliet P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6(3), 389-395.
- Carmeliet P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 9(6), 653-660.
- Carmeliet P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438, 932-936.

Carmeliet P., Lampugnamie M.G., Moons L., Breviaro F., Comernolle V., Bono F., Balconi G., Spagnuolo R., Oostuyse B., Dewerchin V., Zanetti A., Angellilo A., Mattot V., Nuyens D., Lutgens E., Clotman F., de Ruiter M.C., Gittenberger-de Groot A., Poelmann R., Lupu F., Herbert J.M., Collen D., and Dejana E. (1999). Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* 98, 147-157.

Cavallaro U., Liebner S., and Dejana E. (2006). Endothelial cadherins and tumor angiogenesis. *Exp Cell Res* 312, 659-667.

Choki I., Gagnon E., Cattaruzzi P., Janvier R., Griffith M., and Doillon C.J. *In vitro* model of angiogenesis: applications to biomaterials and growth factor delivery system. Abstract. Society for Biomaterials, 25th Annual Meeting, Providence, RI, USA, April 28-May 2, 1999

Cleaver O., Melton D.A. (2003). Endothelial signaling during development. *Nat Med* 9(6), 661-668.

Davis G.E., Bayless K.J. and Mavila A. (2002). Molecular basis of endothelial cell morphogenesis in three-dimensional extracellular matrices. *Anat Rec* 268, 252-275.

Davis G.E., Black S.M., and Bayless K.J. (2000). Capillary morphogenesis during human endothelial cell invasion of three-dimensional collagen matrices. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 36, 513-519.

Davis G.E., and Camarillo C.W. (1996). An $\alpha 2\beta 1$ integrin-dependent pinocytic mechanism involving intracellular vacuole formation and coalescence regulates capillary lumen and tube formation in three-dimensional collagen matrix. *Exp Cell Res* 224, 39-51.

Davis G.E., and Senger D.R. (2005). Endothelial extracellular matrix: Biosynthesis, remodelling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circ Res* 97(11), 1093-1107.

Djonov V., Baum O., and Burri P.H. (2003). Vascular remodelling by intussusceptive angiogenesis. *Cell Tissues Res* 314, 107-117.

Ferrara N., Gerber H., and LeCouter J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9(6), 669-676.

Folkman J., and Haudenschild C. (1980). Angiogenesis in vitro. *Nature* 288, 551-556.

Freed L.E., and Vunjak-Novakovic G. (2000). Tissue engineering bioreactors. *Principles of Tissue Engineering* (2^e édition) 13, 143-156.

Gagnon E., Cattaruzzi P., Griffith M., Muzakare L., LeFlao K., Faure R., Béliveau R., Hussain S.N., Koutsilieris M., and Doillon C.J. (2002). Human vascular endothelial cells with extended life spans: *In vitro* cell response, protein expression, and angiogenesis. *Angiogenesis* 5, 21-33.

Griffith C.K., Miller C., Sainson R.C., Calvert J.W., Jeon N.L., Hughes C.C., and George S.C. (2005). Diffusion limits on an *in vitro* thick prevascularized tissue. *Tissue Eng* 11(1/2), 257-266.

Gray M.J., Zhang J., Ellis L.M., Semenza G.L., Evans D.B., Watowich S.S., and Gallick G.E. (2005). HIF-1 α , STAT3, CBP/p300 and Ref-1/APE are components of a transcriptional complex that regulates Src-dependent hypoxia-induced expression of VEGF in pancreatic and prostate carcinomas. *Oncogene* 24, 3110-3120.

Haralabopoulos G.C., Grant D.S., Kleinman H.K., Lelkes P.I., Papaioannou S.P., and Maragoudakis M.E. (1994). Inhibitors of basement membrane collagen synthesis prevent endothelial cell alignment in matrigel *in vitro* and angiogenesis *in vivo*. *Lab Invest* 71(4), 575-582.

Haralabopoulos G.C., Grant D.S., Kleinman H.K., and Maragoudakis. (1997). Thrombin promotes endothelial cell alignment in Matrigel *in vitro* and angiogenesis *in vivo*. *Am J Physiol* 273, C239-C245.

Hall H., Baechi T., and Hubbell J.A. (2001). Molecular properties of fibrin-based matrices for promotion of angiogenesis *in vitro*. *Microvasc Res* 62(3), 315-326.

Hodivala-Dike K.M., Reynolds A.R., and Reynolds L.E. (2003). Integrins in angiogenesis: multitasking molecules in a balancing act. *Cell Tissue Res* 314, 131-144.

Hynes R.O. (2002). A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nat Med* 8(9), 918-921.

Iida T., Mine S., Fujimoto H., Suzuki K., Minami Y., and Tanaka Y. (2002). Hypoxia-inducible factor-1 α induces cell cycle arrest of endothelial cells. *Genes to Cells* 7, 143-149.

Iivanainen E., Kähäri V., Heino J., and Elenius K. (2003). Endothelial cell-matrix interactions. *Microsc Res Tech* 60(1), 13-22.

Ito K., Yamada Y., Nagasaka t., Baba s., and Ueda M. (2005). Osteogenic potential of injectable tissue-engineered bone: a comparison among autogenous bone, bone substitute (Bio-oss), platelet-rich plasma, and tissue-engineered bone with respect to their mechanical properties and histological findings. *J Biomed Mater Res A* 73, 63-72.

Kaijzel E.L., Koolwijk P., Van Erck M.G., Van Hinsbergh V.W., and De Maat M.P. (2006). Molecular weight fibrinogen variants determine angiogenesis rate in a fibrin matrix *in vitro* and *in vivo*. *J Thromb Haemos* 4, 1975-1981.

- Kalluri R. (2003). Basement membranes: structure, assembly and role in tumor angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 3(6), 422-433.
- Kannan R.Y., Salacinski H.J., Sales K., Bulter P., and Seifalian A.M. (2005). The roles of tissue engineering and vascularisation in the development of micro-vascular networks: a review. *Biomaterials* 26(14), 1857-1875.
- Korff T., and Augustin H.G. (1998). Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. *J Cell Biol* 143(5), 1341-1352.
- Korff T., and Augustin H.G. (1999). Tensional forces in fibrillar extracellular matrices control directional capillary sprouting. *J Cell Sci* 112, 3249-3258.
- Korff T., Kimmina S., Martiny-baron G., and Augustin H.G. (2001). Blood vessel maturation in a 3-dimensional spheroidal coculture model: direct contact with smooth muscle cells regulates endothelial cell quiescence and abrogates VEGF responsiveness. *FASEB J* 15, 447-457.
- Kunz-Schughart L.A., Schroeder J.A., Wondrak M., Rey, F.V., Lehle K., Hofstaedter F., and Wheatley D.N. (2006). Potential of fibroblasts to regulate the formation of three-dimensional vessel-like structures from endothelial cells *in vitro*. *Am J Physiol Cell Physiol* 290, C1385-C1398.
- Lampugnani M.G., Zanetti A., Corada M., Takahashi T., Balconi G., Breviario F., Orsenigo F., Cattelino A., Kemler R., Daniel T.O. and Dejana E. (2003). Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin, β -catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148. *J Cell Biol* 161(4), 793-804.
- Laurens N., Koolwijk P., and De Maat P.M. (2006). Fibrin structure and wound healing. *J thromb haemost* 4, 932-939.
- Levine H.A., Sleeman B.D., and Hamilton M.N. (2001). Mathematical modeling of the onset of capillary formation initiating angiogenesis. *J Math Biol* 42, 195-238.
- Li J., Zhang Y.P., and Kirsner R.S. (2003). Angiogenesis in wound repair: Angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microsc Res Tech* 60, 107-114.
- Liekens S., De Clercq E., and Neyts J. (2001). Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol* 61, 253-270.
- Martin Y., and Vermette P. (2005). Bioreactors for tissue mass culture: Design, characterization, and recent advances. *Biomaterials* 26(35), 7481-7503.
- Montesano R., Orci L., and Vassalli P. (1983). *In vitro* rapid organization of endothelial cells into capillary-like networks is promoted by collagen matrices. *J Cell Biol* 97, 1648-1652.

Montesano R., Pepper M.S., and Orci L. (1993). Paracrine induction of angiogenesis *in vitro* by 3T3 fibroblasts. *J Cell Sci* 105, 1013-1024.

Montesano R., Vassalli J.D., Baird A., Guillemin R., and Orci L. (1986). Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 7297-7301.

Mosesson M.W. (2005). Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J thromb haemost* 3, 1894-1904.

Nakatsu M.N., Sainson R.C., Aoto J.N., Taylor K.L., Aitkenhead M., Pérez-del-Pulgar S., Carpenter P.M., and Hughes C.C. (2003a). Angiogenic sprouting and capillary lumen formation modeled by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in fibrin gels: the role of fibroblasts and angiopoietin-1. *Microvas Res* 66, 102-112.

Nakatsu M.N., Sainson R.C., Pérez-del-Pulgar S., Aoto J.N., Aitkenhead M., Taylor K.L., Carpenter P.M., and Hughes C.C. (2003b). VEGF₁₂₁ and VEGF₁₆₅ regulate blood vessel diameter through vascular endothelial growth factor receptor 2 in an *in vitro* angiogenesis model. *Lab Invest* 83(12), 1873-1885.

Nehls V., Drenckhahn D. (1995a). A novel, microcarrier-based *in vitro* assay for rapid and reliable quantification of three-dimensional cell migration and angiogenesis. *Microvasc Res* 50, 311-322.

Nehls V., Drenckhahn D. (1995b). A microcarrier-based cocultivation system for the investigation of factors and cells involved in angiogenesis in three-dimensional fibrin matrices *in vitro*. *Histochem Cell Biol* 104, 459-466.

Nehls V., Herrmann R., and Hühnen M. (1998). Contact-dependent inhibition of angiogenesis by cardiac fibroblasts in three-dimensional fibrin gels *in vitro*: implications for microvascular network remodelling and coronary collateral formation. *Cell Tissue Res* 193, 479-488.

Nehls V., Schuchardt E., Drenckhahn D. (1994). The effect of fibroblasts, vascular smooth muscle cells, and pericytes on sprout formation of endothelial cells in a fibrin gel angiogenesis system. *Microvas Res* 48, 349-363.

Nicosia R.F., T'chao R., and Leighton J. (1982). Histotypic angiogenesis *in vitro*: light microscopic, ultrastructural, and radioautographic studies. *In vitro* 18, 538.

Nicosia R.F., Zhu W.H., Fogel E., Howson K.M., and Aplin A.C. (2005). A new *ex vivo* model to study venous angiogenesis and arterio-venous anastomosis formation. *J Vasc Res* 42, 111-119.

Peters K., Schmidt H., Unger R.E., Kamp G., Pröls F., Berger B.J., and Kirkpatrick C.J. (2005). Paradoxical effects of hypoxia-mimicking divalent cobalt ions in human endothelial cells *in vitro*. *Mol Cell Biochem* 270, 157-166.

- Pinney E., Liu K., Sheeman B., and Mansbridge J. (2000). Human three-dimensional fibroblasts cultures express angiogenic activity. *J Cell Physiol* 183, 74-82.
- Poulios E., Trougakos I.P., and Gonos E.S. (2006). Comparative effects of hypoxia on normal and immortalized human diploid fibroblasts. *Anticancer Res* 26(3A), 2165-2168.
- Pugh C.W., and Ratcliffe P.J. (2003). Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 9(6), 677-684.
- Ratcliffe A. (2000). Tissue engineering of vascular grafts. *Matrix Biol* 19(4), 353-357.
- Richardson T.P., Peters M.C., Ennett A.B., and Mooney D.J. (2001). Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat Biotechnol* 19, 1029-1034.
- Rundhaug J.E. (2005). Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 9(2), 267-285.
- Sanz L., and Álvarez-Vallina L. (2003). The extracellular matrix: a new turn-on-the-screw for anti-angiogenic strategies. *Trends Mol Med* 9(6), 256-262.
- Schechner J.S., Crane S.K., Wang F., Szeling A.M., Tellides G., Lorber M.I., Bothwell A.L., and Pober J.S. (2003). Engraftment of a vascularized human skin equivalent. *FASEB J* 17(15), 2250-2256.
- Schechner J.S., Nath A.K., Zheng L., Kluger M.S., Hughes C.C., Sierra-Honigmann M.R., Lorber M.I., Tellides G., Kashgarian M., Bothwell A.L., and Pober J.S. (2000). *In vivo* formation of complex microvessels lined by human endothelial cells in an immunodeficient mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(16), 9191-9196.
- Serini G., Valdembrì D., and Bussolino F. (2006). Integrins and angiogenesis: A sticky business. *Exp Cell Res* 312(5), 651-658.
- Shakawy A.A., Klitzman B., Truskey G.A., and Reichert W.M. (1999). Engineering the tissue which encapsulated subcutaneous implants. II. Plasma tissue exchange properties. *J Biomed Mat Res* 40, 586-597.
- Sieminski A.L., Hebbel R.P., and Gooch K.J. (2005). Improved microvascular network *in vitro* by human blood outgrowth endothelial cells relative to vessel-derived endothelial cells. *Tissue Eng* 11(9/10), 1332-1345.
- Sottile J. (2004). Regulation of angiogenesis by extracellular matrix. *Biochim Biophys Acta* 1654(1), 13-22.
- Staton C.A., Stribbling S.M., Tazzyman S., Hughes R., Brown N.J., and Lewis C.E. (2004). Current methods for assaying angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Int J Exp Path* 85, 233-248.

Stupack D.G., and Cheresh D.A. (2004). Integrins and angiogenesis. *Curr Top Dev Biol* 64, 207-238.

Thurston G. (2003). Role of angiopoiétins and Tie receptor tyrosine kinases in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Cell Tissue Res* 314, 61-68.

Urech L., Bittermann A.G., Hubbell J.A., and Hall H. (2005). Mechanical properties, proteolytic degradability and biological modifications affect angiogenic process extension into native and modified fibrin matrices. *Biomaterials* 26(12), 1369-1379.

Vailhé B., Vittet D., and Feige J.J. (2001). *In vitro* models of vasculogenesis and angiogenesis. *Lab Invest* 81(4), 439-452.

Velazquez O.C., Snyder R., Liu Z.J., Fairman R.M., and Herlyn M. (2002). Fibroblast-dependent differentiation of human microvascular endothelial cells into capillary-like, three-dimensional networks. *FASEB J* 16(10), 1316-1318.

Vengellur A., and LaPres J.J. (2004). The role of hypoxia inducible factor 1 α in cobalt chloride induced cell death in mouse embryonic fibroblasts. *Toxicol Sci* 82, 638-646.

Weisel J.W. (2005). Fibrinogen and fibrin. *Adv Protein Chem* 70, 247-299.

Wenger A., Kowalewski N., Sthl A., Mehlhorn A.T., Schmal H., Stark G.B., and Finkenzeller G. (2005). Development and characterization of a spheroidal coculture model of endothelial cells and fibroblasts for improving angiogenesis in tissue engineering. *Cells Tissues Organs* 181, 80-88.

Wenger A., Stahl A., Weber H., Finkenzeller G., Augustin H.G., Stark G.B., and Kneser U. (2004). Modulation on *in vitro* angiogenesis in a three-dimensional spheroidal coculture model for bone tissue engineering. *Tissue Eng* 10 (9/10), 1536-1547.

Xue L., and Greisler H.P. (2002). Angiogenic effect of fibroblast growth factor-1 and vascular endothelial growth factor and their synergism in a novel *in vitro* quantitative fibrin-based 3-dimensional angiogenesis system. *Surgery* 132(2), 259-267.

Yancopoulos G.D., Davis S., Gale N.W., Rudge J.S., Wiegand S.J., and Holash J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407, 242-248.

Zhu W.H., Iurlaro M., MacIntyre A., Fogel E., and Nicosia R.F. (2003). The mouse aorta model: influence of genetic background and aging on bFGF- and VEGF-induced angiogenic sprouting. *Angiogenesis* 6, 193-199.

Zhu W.H., and Nicosia R.F. (2002). The thin prep rat aortic ring assays: A modified method for the characterization of angiogenesis in whole mounts. *Angiogenesis* 5, 81-86.