

LAURE GIBOT

**MICROVASCULARISATION D'UN SUBSTITUT
CUTANÉ RECONSTRUIT PAR GÉNIE TISSULAIRE**
Mise au point et application à la recherche clinique et
fondamentale

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en Biologie cellulaire et moléculaire
pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph. D)

DÉPARTEMENT DE CHIRURGIE
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2010

© Laure Gibot, 2010

Résumé

Le réseau vasculaire est composé non seulement des vaisseaux sanguins mais aussi des vaisseaux lymphatiques. Les premiers assurent l'approvisionnement des cellules en nutriments et oxygène et la récolte de leurs déchets métaboliques tandis que les seconds collectent les fluides, macromolécules et cellules immunitaires extravasés dans les tissus interstitiels pour les ramener à la circulation sanguine.

Au cours de ces travaux de recherche, nous avons mis au point un substitut cutané reconstruit par génie tissulaire, contenant un réseau sanguin fonctionnel, exempt de toute matière exogène et potentiellement autologue.

Ses applications cliniques sont particulièrement prometteuses puisque l'une des raisons majeures d'échec des greffes de peau sur les patients grands brûlés par exemple est la nécrose du greffon. Au cours d'une étude *in vivo*, nous avons démontré que le réseau contenu dans notre substitut cutané est fonctionnel, s'inoscule en moins de quatre jours avec le réseau vasculaire de l'hôte et qu'il apporte un avantage à la néovascularisation par rapport à un substitut non microvascularisé.

Un substitut cutané microvascularisé tumoral a ensuite été développé pour étudier la biologie du mélanome. Notre modèle est particulièrement pertinent et complet pour ce type d'étude puisque les cellules cancéreuses interagissent avec les trois principaux types cellulaires du derme et de l'épiderme et évoluent au sein d'une matrice extracellulaire sécrétée par ces cellules. Ainsi, il a été vérifié que les cellules cancéreuses conservent le même type de comportement, tant au niveau du potentiel invasif que du potentiel pro-angiogénique, dans notre modèle tridimensionnel de peau qu'*in situ* chez les patients.

Les capillaires lymphatiques fournissent une voie privilégiée pour le processus métastatique de cancers comme les mélanomes, c'est pourquoi nous travaillons à ajouter un réseau lymphatique à notre substitut cutané microvascularisé. Jusque là, nous avons démontré que les cellules endothéliales lymphatiques s'organisent spontanément en réseau dans un substitut 3D de tissu conjonctif.

Abstract

The vascular network in our body consists of not only blood vessels, but also of lymphatic vessels. The first one supplies nutrients and oxygen, removes metabolites and CO₂ while the second one collects fluids, macromolecules, and immune cells extravasated in interstitial tissue in order to bring them back to blood circulation.

In our research, we developed a tissue-engineered skin substitute devoid of any exogenous material, potentially autologous, incorporating a functional microvascular blood network.

Its clinical applications are exciting since necrosis is one of the major reasons of skin transplantation failure in burn patients.

An *in vivo* study demonstrated that our skin substitute's microvascular network is functional, inoscules by 4 days post transplantation with the host's vascular network and improves the neovascularization process compared to non-microvascularized substitute.

We developed a tumor microvascularized skin substitute to investigate melanoma biology. Our model is particularly complete and relevant since cancerous cells interact with the three main dermal and epidermal cell types and develop within their secreted extracellular matrix. Thus, melanoma cells seem to behave the same way within our tridimensional tumor skin substitute and *in situ* in patients. Indeed, their invasive and pro-angiogenic potentials appear to be identical.

Lymphatic capillaries also provide an important pathway for metastasis, especially for melanoma, which is why we are incorporating them into our model. Until now, we have demonstrated that lymphatic endothelial cells spontaneously organized in a network into a 3D connective tissue substitute.

Avant-Propos

Mes remerciements les plus sincères vont à mon directeur de recherche, le Dr François A. Auger, pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire, pour son soutien indéfectible et pour la confiance qu'il m'a accordée tout au long de cette aventure. Je remercie également le Dr Huot pour sa disponibilité et ses remarques pertinentes sur mes travaux. Je tiens aussi à remercier Dan Lacroix qui m'a grandement simplifié la vie avant et pendant mon doctorat.

J'ai une pensée particulière pour Nathalie Tremblay qui m'a appris tous les secrets du génie tissulaire et qui m'a donné de belles leçons de vie avec son énergie inépuisable et sa bonne humeur perpétuelle ! Un grand merci à Todd Galbraith pour ses conseils pratico-pratiques et pour m'avoir fait bénéficier de son expérience. De même je remercie Stéphane Chabaud, Rina Guinard, Véronique Racine et toute l'équipe du LOEX (présente et passée) pour leur aide précieuse et leurs judicieux conseils.

Je n'aurais pas réussi à boucler ce doctorat « au bout du monde » sans le soutien et la force de ma famille qui m'a supportée contre vents et marées, dans les bons moments comme dans les mauvais. Je n'ai pas vraiment l'occasion de vous le dire d'habitude parce que je suis une grande timide, mais merci beaucoup pour tout ce que vous avez fait pour moi...

Et enfin, les filles, et ça vaut aussi bien pour les troupes en Amérique que pour les troupes en Europe, merci pour votre énergie, votre soutien, vos idées farfelues, votre sagesse, vos courriers, nos fous rires, nos voyages, nos projets...

Aux girls, aux princesses et aux momos

Table des matières

Résumé	i
Abstract	ii
Avant-Propos	iii
Table des matières	v
Liste des tableaux	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations	x
Chapitre 1 : Introduction	1
1. Histoire naturelle des capillaires	1
1.1. Contexte évolutif.....	1
1.1.1. La pression partielle en oxygène	1
1.1.2. Augmentation du rapport volume/surface des organismes	3
1.1.3. Découverte historique des capillaires.....	4
1.2. Structures et fonctions des capillaires	6
1.2.1. Organisation au sein du système circulatoire sanguin et lymphatique.....	6
1.2.2. Structures des capillaires	10
1.2.3. Fonctions d'échanges	17
1.3. Mise en place du réseau capillaire.....	19
1.3.1. Développement embryonnaire	19
1.3.1.1. Vasculogenèse	19
1.3.1.2. Lymphangiogenèse.....	20
1.3.2. Chez l'adulte : Angiogenèse et lymphangiogenèse.....	22
1.3.2.1. Définition et processus	22
1.3.2.2. Conditions physiologiques	26
1.3.2.3. Conditions pathologiques : l'exemple du mélanome cutané.....	28
1.3.3. Cibles thérapeutiques	36
2. Pourquoi microvasculariser un tissu <i>in vitro</i> ?	39
2.1. Visées cliniques.....	39
2.1.1. Processus de revascularisation d'un greffon et nécrose	39
2.1.2. Problèmes de contraction et d'élasticité du greffon	42
2.1.3. Greffe de tissus plus épais	43
2.2. Visées fondamentales	44
2.2.1. Modèle d'étude de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse	44
2.2.2. Évaluation de médicaments.....	46
2.2.3. Modèle d'étude du processus de cicatrisation	47
3. Comment microvasculariser un tissu?.....	49
3.1. Ingénierie tissulaire <i>in vivo</i>	49
3.1.1. Incubation <i>in vivo</i>	49
3.1.2. Boucle artério-veineuse.....	52
3.2. Ingénierie tissulaire <i>ex vivo</i>	53
3.2.1. Incorporation de facteurs de croissance dans la matrice	53
3.2.2. Modification génétique des cellules	56
3.2.3. Incorporation de cellules endothéliales organisées	58
4. Mise en contexte.....	63

4.1.	La peau normale humaine	63
4.1.1.	Fonctions	63
4.1.2.	Structure	65
4.1.3.	Réseaux microvasculaires	68
4.2.	La technique d'auto-assemblage	71
4.2.1.	Principe.....	71
4.2.2.	Avantages et limites	73
4.3.	Objectifs	74
Chapitre 2 : La présence d'un réseau microvasculaire favorise la revascularisation <i>in vivo</i> d'un substitut cutané microvascularisé reconstruit par génie tissulaire.....		78
1.	Résumé	79
2.	Article.....	80
2.1.	Abstract	81
2.2.	Introduction	81
2.3.	Materials and Methods	83
2.4.	Results	86
2.5.	Discussion	94
2.6.	Acknowledgments	97
2.7.	Author Disclosure Statement.....	97
2.8.	References	97
2.9.	Reprint author.....	100
Chapitre 3 : Développement d'un substitut cutané humain 3D microvascularisé pour étudier la biologie des mélanomes		101
1.	Résumé	102
2.	Article.....	103
2.1.	Abstract	104
2.2.	Introduction	104
2.3.	Results	106
2.4.	Discussion	111
2.5.	Materials and Methods	113
2.6.	Conflict of interest.....	116
2.7.	Acknowledgments	116
2.8.	References	116
2.9.	Supplementary material.....	118
Chapitre 4 : Cellules endothéliales lymphatiques humaines, résultats préliminaires		121
1.	Extraction et purification.....	121
1.1.	Principe.....	121
1.2.	Protocole.....	121
2.	Caractérisation.....	122
2.1.	Caractérisation morphologique	122
2.2.	Caractérisation phénotypique	123
3.	Ensemencement dans un tissu conjonctif 3D	125
3.1.	Protocole de culture.....	125
3.2.	Résultats	126
4.	Perspectives	127
Chapitre 5 : Discussion générale		129
Bibliographie		136

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les différents phénotypes de capillaires sanguins, leur distribution et leurs fonctions (<i>mb</i> : membrane basale, <i>js</i> : jonctions serrées, <i>f</i> : fenêtres, <i>p</i> : pores).....	13
Tableau 2 : Différences morphologiques entre les capillaires lymphatiques et les capillaires sanguins.....	16
Tableau 3 : Maladies caractérisées ou causées par une déficience d'angiogenèse ou une régression vasculaire.....	29
Tableau 4 : Maladies caractérisées ou causées par une angiogenèse anormale ou excessive.....	29

Liste des figures

Figure 1 : Diagramme représentant la distribution de l'oxygène (O ₂) dans un cylindre de tissu vivant de rayon 100 µm, 145 µm et 300 µm.....	2
Figure 2 : Modèle fractal de l'arbre bronchique. Tous les points terminaux sont à la même distance de l'origine.....	4
Figure 3 : Relation entre les circulations sanguines et lymphatiques. Les flèches indiquent le sens de circulation du sang (rouge : riche en O ₂ , bleu : pauvre en O ₂) et de la lymphe (vert).....	6
Figure 4 : Représentation schématique de l'interrelation et de la complémentarité entre les plexus sanguins et lymphatiques dans un tissu interstitiel.....	9
Figure 5 : Interactions des principaux composants de la membrane basale des capillaires.....	11
Figure 6 : Microscopie électronique à balayage d'un péricyte recouvrant la surface d'un capillaire.	12
Figure 7 : Représentation de la structure d'un capillaire lymphatique en fonction de la pression interstitielle.....	15
Figure 8 : Paramètres physiques dans les différents compartiments du système circulatoire sanguin.	17
Figure 9 : Complémentarité fonctionnelle entre les systèmes sanguins et lymphatiques.	17
Figure 10 : Schéma du processus de vasculogenèse lors de l'embryogenèse.....	20
Figure 11 : Schéma du processus de développement de la vasculature lymphatique chez les mammifères.	21
Figure 12 : Représentation schématique des quatre mécanismes potentiels d'angiogenèse : le bourgeonnement, l'intussusception, l'élongation et l'incorporation de progéniteurs endothéliaux circulants (PEC).....	23
Figure 13 : Schéma du processus d'angiogenèse par bourgeonnement.....	23
Figure 14 : Comparaison de la structure d'un pseudo-capillaire à celle d'un capillaire sanguin.....	33
Figure 15 : Représentation schématique des différents processus de revascularisation selon le type de tissu greffé.	41
Figure 16 : Vue dorsale d'un patient 3 semaines après l'implantation <i>in vivo</i> , pour maturation, du substitut mandibulaire.....	50
Figure 17 : Schéma du modèle de boucle artério-veineuse (AV)..	53
Figure 18 : Représentation schématique de la technologie d'impression biologique (<i>Bioprinting</i>).....	58
Figure 19 : Représentation schématique de la microvascularisation d'un tissu reconstruit autour d'un lit microvasculaire explanté (LME).....	59
Figure 20 : Cellules endothéliales bovines transférées sur du Matrigel TM après avoir étéensemencées sur un support photolithographié en motif réticulaire.	60
Figure 21 : Les HUVECs, transduites avec la <i>red fluorescence protein</i> (RFP), s'organisent spontanément en réseau capillaire lorsqu'elles sont cultivées pendant 7 jours en présence de fibroblastes dans un gel de fibrine.	62
Figure 22 : Schéma de la structure de la peau normale humaine.....	63

Figure 23 : Peau normale humaine provenant d'une réduction mammaire, colorée au trichrome de Masson	66
Figure 24 : Représentation schématique de l'architecture vasculaire cutanée avec ses deux plexus parallèles à la surface.	69
Figure 25 : Interactions entre les réseaux capillaires sanguins et lymphatiques dans la peau.	69
Figure 26 : Schématisation d'une coupe transversale d'un réseau de tubes interconnectés.	71
Figure 27 : Principe de la technique d'auto-assemblage.	71
Figure 28 : Schéma d'un substitut cutané reconstruit par auto-assemblage.	77
Figure 29 : Photographies en microscopie à contraste de phase d'un pool de cellules endothéliales microvasculaires, contenant des sous-populations de cellules sanguines et de cellules lymphatiques.	122
Figure 30 : Caractérisation des cellules endothéliales lymphatiques en culture 2D par immunofluorescence.	123
Figure 31 : Marquage par immunofluorescence de cellules endothéliales microvasculaires cultivées une semaine sur un feuillet de fibroblastes.	124
Figure 32 : Schéma du protocole de culture d'un tissu conjonctif endothélialisé avec des cellules endothéliales microvasculaires, à la fois sanguines (CEMV) et lymphatiques (CEMVL).	126
Figure 33 : Marquage par immunofluorescence de PECAM-1 (en vert) et de LYVE-1 (en rouge) dans des tissus conjonctifs 3D endothélialisés avec des cellules endothéliales microvasculaires sanguines (CEMV) et lymphatiques (CEMVL)	127

Liste des abréviations

2D : Deux dimensions
3D : Trois dimensions
ARNm : Acide ribonucléique messenger
AV : Artério-veineux
bFGF : Basic fibroblast growth factor
BMP-7 : bone morphogenic protein-7
CEMV : Cellules endothéliales microvasculaires
CEMVL : Cellules endothéliales microvasculaires lymphatiques
CES : Cellule endothéliale sanguine
CO₂ : Dioxyde de carbone
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
E-Cadhérine : Epithélial-Cadhérine
E-sélectine : Endothelial leukocyte adhesion molecule-1
EGM-2 : Endothelial growth medium-2
FGF-2 : Fibroblast growth factor-2
GFP : Green fluorescence protein
HIF-1 α : Hypoxia Inducible Factor 1 α
HMVEC : Human microvascular endothelial cell
HUVEC : Human umbilical vein endothelial cell
ICAM-1 : Intercellular adhesion molecule-1
LYVE-1 : Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor
MEC : Matrice extracellulaire
mmHg : Millimètre de mercure
O₂ : Dioxygène
PECAM-1 : Platelet endothelial adhesion molecule-1
PLGA : poly(lactic-co-glycolic acid)
PMA : Phorbol 12-myristate 13-acetate
PPO₂ : Pression partielle en oxygène
PRM : Peau reconstruite microvascularisée
PROX-1 : Prospero-related homeobox 1
PVA : Poly(vinyl alcohol)
PXE : Pseudoxanthoma elasticum
RFP : Red fluorescence protein
SCID : Severe combined immunodeficient
TSP-1 : Thrombospondine-1
UEA-1 : Ulex Europaeus Agglutinine 1
 μ m : Micromètres
UV : Ultra-violets
VCAM-1 : Vascular cell adhesion molecule-1
VE-Cadhérine : Vascular Endothélial Cadhérine
VEGF : Vascular endothelial growth factor
VEGFR-3 : Vascular endothelial growth factor receptor-3

Chapitre 1 : Introduction

Le génie tissulaire englobe actuellement l'utilisation de cellules et de biomatériaux pour le maintien, la réparation ou la reconstruction de tissus et d'organes ainsi que la création et la validation de modèles d'études *in vitro*. La microvascularisation de ces substituts tissulaires consiste à y introduire une composante microvasculaire, à savoir des capillaires.

La première partie fera le point sur la notion de capillaire. Dans un deuxième temps, les intérêts de microvasculariser ces substituts tissulaires seront décrits, puis les différentes approches utilisées actuellement pour y parvenir seront détaillées dans une troisième partie. Enfin, la mise en contexte, les hypothèses et les objectifs seront exposés à la lumière des informations précédentes.

1. Histoire naturelle des capillaires

1.1. Contexte évolutif

1.1.1. La pression partielle en oxygène

Même si les protozoaires et certains métazoaires inférieurs comme les vers plats sont capables de survivre par simple diffusion de l'oxygène de l'environnement, il n'en reste pas moins que la pression partielle en oxygène (PPO_2) de l'atmosphère affecte l'évolution et le développement de la vie sur Terre (1). Ainsi, au carbonifère et au permien, soit il y a environ 300 millions d'années, la PPO_2 atmosphérique était deux fois plus importante que celle d'aujourd'hui. C'est un des épisodes de l'évolution où le phénomène de gigantisme s'est développé dans plusieurs groupes d'arthropodes (2). L'envergure de certaines libellules pouvait atteindre 70 cm, celle des éphémères allait de 8,5 à 45 cm alors que les millepattes pouvaient mesurer jusqu'à un mètre de long. L'augmentation de la PPO_2 atmosphérique a directement augmenté la capacité de diffusion de l' O_2 , autorisant le gigantisme de ces classes d'animaux inférieurs.

Les organismes plus complexes ne peuvent pas simplement compter sur la diffusion de l'oxygène pour survivre. Plusieurs laboratoires ont mis au point des modèles mathématiques de la diffusion de l'oxygène dans les tissus vivants. La

plupart de ces approches sont basées sur le modèle de diffusion cylindrique instauré par August Krogh en 1919 (3). Une revue récente décrit l'état actuel des connaissances dans ce domaine (4).

D'un point de vue plus biologique, en 1955, en étudiant des coupes histologiques de tissus cancéreux pulmonaires, Thomlinson et son équipe ont noté que les cellules ne peuvent survivre si elles sont situées à plus de 200 micromètres d'un capillaire (5). Il s'agit de la limite de diffusion de l'oxygène dans un tissu vivant (Figure 1), au-delà de cette distance, les cellules meurent par nécrose.

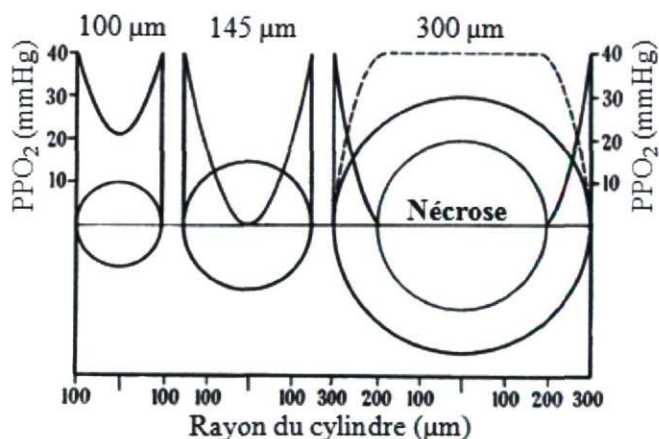


Figure 1 : Diagramme représentant la distribution de l'oxygène (O_2) dans un cylindre de tissu vivant de rayon 100 μm , 145 μm et 300 μm . PPO₂ : pression partielle en oxygène, mmHg : millimètres de mercure. La ligne pointillée indique la distribution des catabolites. Adapté de (5).

Ce principe a été vérifié *in vitro* en 1973 par Folkman (6). En effet, des cellules cancéreuses qui prolifèrent dans un environnement 3D sur des billes d'agar meurent par nécrose si elles sont situées à plus de 150-200 μm de la surface de la construction. L'équipe de cet auteur avait déjà démontré en 1972 l'importance de la néovascularisation dans la prolifération tumorale *in vivo* (7). En effet, lorsqu'une tumeur solide n'est pas vascularisée, elle entre dans une phase de « dormance » et sa taille ne peut excéder 1 à 2 mm de diamètre ou un volume de 1 mm^3 . Ces tumeurs non vascularisées adoptent une morphologie particulière qui se retrouve *in vitro*, à savoir que la zone périphérique est constituée de cellules en prolifération alors que la zone centrale est nécrotique.

Il est donc important de retenir que la viabilité cellulaire n'est maintenue qu'en deçà d'une distance de 150-200 μm par rapport à un capillaire ou tout autre type d'apport d'oxygène et de nutriments.

1.1.2. Augmentation du rapport volume/surface des organismes

La simple diffusion est inadéquate pour assurer l'approvisionnement en oxygène dans des organismes plus gros. La question est donc comment les organismes pluricellulaires ont-ils réussi à relever le défi que représentait l'apport en oxygène et nutriments aux tissus ?

La réponse se trouve dans la mise en place de structures internes hautement ramifiées, spécialisées dans le transport et l'échange de matières. Le transport par convection s'est développé aussi bien avec les systèmes respiratoires qu'avec les systèmes circulatoires internes (8). La ventilation à travers les poumons ou les branchies permet à l'organisme de prélever l'oxygène à partir du milieu extérieur, respectivement, l'air et l'eau. La circulation, ou convection des fluides à l'intérieur de l'organisme, distribue cet oxygène et autres nutriments aux cellules de l'organisme.

Chez les mammifères, un organe hautement spécialisé assure la liaison entre ces deux transports par convection : le poumon. En 2004, le Pr Ewald Weibel, spécialiste de l'appareil respiratoire, a écrit un bel éditorial sur la morphométrie du poumon, considérant aussi bien les voies aériennes que les vaisseaux sanguins qui lui sont étroitement associés (9). Il y explique les lois biophysiques comme la loi de Fick qui régissent la diffusion des gaz et précise qu'une haute capacité de diffusion de l'oxygène dépend d'une large surface d'échange, d'un réseau capillaire dense et d'une barrière très fine. Chez un homme d'environ 75 kilos, la surface alvéolaire pulmonaire est de $130 \pm 12 \text{ m}^2$ et la surface capillaire pulmonaire est de $115 \pm 12 \text{ m}^2$, soit à peu près la surface des trois quarts d'un court de tennis (10). La mise en place de ces grandes surfaces d'échange est rendue possible par le déploiement fractal de l'arbre bronchique et de l'arbre vasculaire, parallèlement l'un à l'autre. Les bronches et les artères se divisent par dichotomie et à chaque embranchement la dimension des tuyaux diminue d'un facteur 0,85 (11). Le déploiement fractal de ces structures anatomiques assure que tous les points terminaux sont à la même distance du point

d'entrée, à savoir l'origine de la trachée (Figure 2). C'est cette propriété structurelle fondamentale qui forme la base pour l'homogénéité de la ventilation et de la diffusion des gaz.

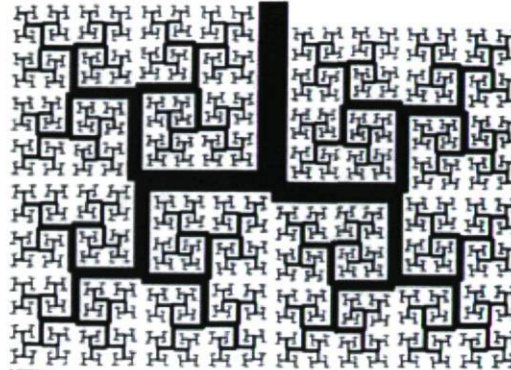


Figure 2 : Modèle fractal de l'arbre bronchique. Tous les points terminaux sont à la même distance de l'origine. Tiré de (12).

Dans son livre intitulé « L'arbre vasculaire » et publié en 2008, Dr Pierre Corvol décrit l'importance de la hiérarchisation, de la ramification et du bon fonctionnement du réseau vasculaire dans la survie de l'organisme (13).

1.1.3. Découverte historique des capillaires

Entre les années 1489 et 1515, Léonard de Vinci développe ses connaissances anatomiques en disséquant des cadavres de criminels à l'hôpital de Santa Maria Nuova à Florence. Pour préserver les structures anatomiques, il injecte de la cire dans les vaisseaux sanguins (14). Il fut ainsi le premier à observer des capillaires sanguins, sans toutefois connaître leur fonction.

Le concept de circulation sanguine a été introduit en 1628 par un médecin anglais du nom de William Harvey. Cependant, selon lui, le sang des artères se déversait dans les tissus comme s'il traversait une éponge, puis diffusait jusqu'à la circulation veineuse avant de revenir au cœur (15). Il lui manquait la notion de capillaires sanguins.

Au XVIIème siècle, en Italie, Marcello Malpighi étudie des poumons de grenouilles en utilisant un tout nouvel outil : le microscope. Il découvre ainsi en 1661

l'existence des capillaires sanguins et suppose que ces structures sont le lien physique entre les artères et les veines, assurant ainsi le retour du sang au cœur (16).

Dès l'avènement de l'ère de la microscopie, les découvertes s'enchaînent (15) : Ruysch (1638-1731) déclare que la vasculature est ubiquitaire dans le corps humain, Schwann (1810-1882) remarque que les tissus sont composés de cellules et que les capillaires ont des parois, Von Recklinghausen (1833-1910) montre que les parois des capillaires sont constituées de cellules. Enfin, His (1831-1904) donne le nom d'endothélium à la paroi des capillaires sanguins.

L'histoire de la découverte des capillaires lymphatiques a été décrite par Rusznyak en 1967 (17). Hippocrate, dès l'antiquité, observe des structures contenant des fluides incolores qu'il nomme sang blanc dont la fonction lui était inconnue. Cette découverte est tombée dans l'oubli pendant plus de 2000 ans puis finalement, en 1622, en Italie, un professeur d'anatomie et de chirurgie nommé Aselli les observe de nouveau dans le mésentère de chiens grassement nourris. Il appela ces tubes remplis d'un liquide blanc des « veines laiteuses » (*lacteis venis*). Aselli pensait que la lymphe contenue dans ces vaisseaux rejoignait le foie où elle était transformée en sang.

En 1651, Jean Pecquet découvre le canal thoracique et son entrée dans les veines : il devient le premier à décrire correctement le retour de la lymphe au sang.

La dénomination « lymphatique » apparaît en 1653 à Copenhague grâce à Thomas Bartolin. Cet homme, ainsi que Olaus Rudbeck à Uppsala, suggère que les vaisseaux lymphatiques pourraient être impliqués dans la convection des fluides filtrés à partir du sang.

En 1746, William Hunter, un professeur d'anatomie à Londres, démontre que le système lymphatique est constitué de vaisseaux « absorbants ». À la fin du XVIIIème siècle, l'anatomie de la vasculature lymphatique est connue, mais il faut attendre 1862 et les travaux de Recklinghausen pour connaître les détails de la structure des capillaires lymphatiques.

Alors que Starling a prouvé que les protéines passent à travers les capillaires sanguins, Drinker a démontré, au XXème siècle, que le système lymphatique a pour

fonction principale de retourner à la circulation sanguine les fluides et protéines qui se sont échappés du sang.

1.2. Structures et fonctions des capillaires

1.2.1. Organisation au sein du système circulatoire sanguin et lymphatique

Le système cardiovasculaire est un système fermé composé de deux types de circulations : la petite circulation, ou circulation pulmonaire, et la circulation systémique, toutes deux organisées autour d'une pompe, le cœur (18) (Figure 3). La petite circulation, responsable des échanges gazeux avec l'extérieur, véhicule du sang pauvre en oxygène et riche en dioxyde de carbone (CO_2) depuis le ventricule droit du cœur jusqu'aux poumons.

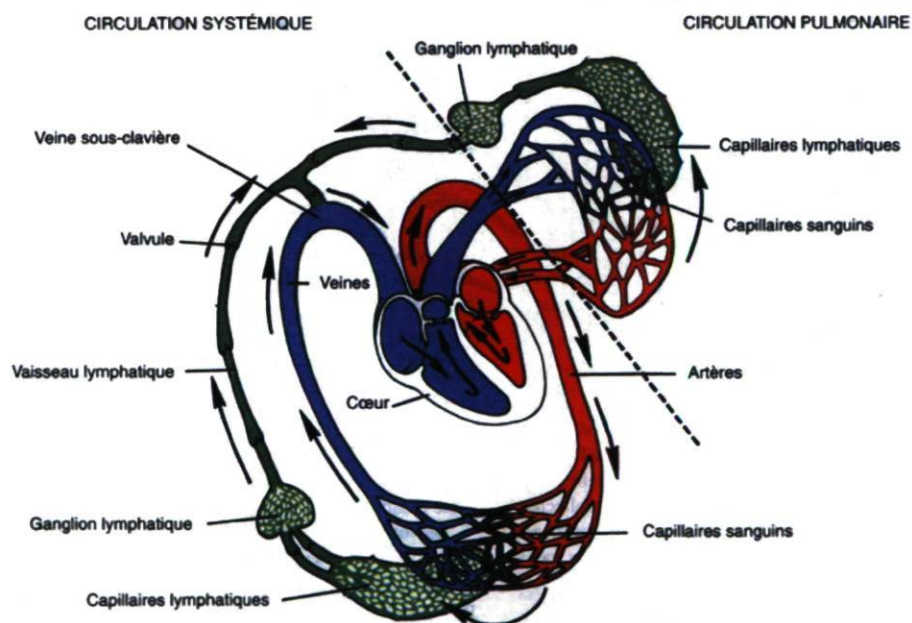


Figure 3 : Relation entre les circulations sanguines et lymphatiques. Les flèches indiquent le sens de circulation du sang (rouge : riche en O_2 , bleu : pauvre en O_2) et de la lymphe (vert). Tiré de (19).

De retour au cœur, le sang riche en O_2 provenant des poumons est propulsé par le ventricule gauche dans la circulation systémique et sera conduit jusqu'aux organes par les vaisseaux sanguins. Ils sont divisés en trois grandes catégories distinctes : les artères, les capillaires et les veines. Leurs propriétés

respectives ne seront pas détaillées dans ce texte. Il faut cependant noter que toutes les structures vasculaires voient leur lumière tapissée d'un endothélium aux multiples propriétés. Ce tissu atteint chez un adulte une masse d'environ 110 g mais recouvre une surface de plus de 350 m² (20). Il est activement impliqué dans plusieurs fonctions vitales du système cardio-vasculaire comme la régulation de la perfusion, des échanges de fluides et de soluté, de l'hémostasie et de la coagulation, de la réponse inflammatoire.

Le compartiment qui nous intéresse est celui de la microcirculation. Il est divisé en 3 sections aux structures et aux fonctions différentes: les artérioles, les capillaires et les veinules (21). Les premières, entourées de cellules musculaires lisses, régulent localement la perfusion sanguine des tissus environnants. Les capillaires, dont la paroi est très fine, assurent les échanges entre le sang et les tissus. Les veinules, dont l'organisation est généralement similaire à celle des artérioles, drainent le sang provenant des capillaires et le retournent vers le cœur.

Le système lymphatique est avant tout un réseau vasculaire de capillaires lymphatiques qui drainent les fluides, molécules et cellules depuis les espaces interstitiels jusqu'aux vaisseaux collecteurs (22, 23). Contrairement aux petits vaisseaux collecteurs, les vaisseaux collecteurs lymphatiques plus larges sont entourés d'une tunique contractile de cellules musculaires lisses, d'une adventice, d'une membrane basale et munis de valves, comme les veines dans la circulation sanguine, pour prévenir le reflux de la lymphe (24-26).

La lymphe rejoint la circulation veineuse à la base du cou, à la jonction entre les plus grands vaisseaux collecteurs de l'organisme, le canal thoracique et le canal lymphatique droit, et respectivement la veine sous-clavière gauche et droite (17) (Figure 3).

En plus de ses structures vasculaires, le système lymphatique comprend des tissus lymphoïdes organisés, comme les ganglions lymphatiques, les amygdales, la rate, le thymus, les plaques de Peyer au niveau des intestins et des tissus lymphoïdes diffus, dans les poumons, le foie et une partie de la moelle osseuse (18, 27). Ces

organes lymphoïdes jouent un rôle dans la réponse immunitaire de l'organisme. Les antigènes étrangers sont concentrés par les cellules dendritiques et présentés aux lymphocytes dans ces tissus spécialisés, conduisant à une réponse immunitaire adéquate (28). Il est intéressant de remarquer que les lymphocytes circulent entre les réseaux vasculaires sanguins et lymphatiques. Les lymphocytes circulant dans la lymphe entrent dans les ganglions lymphatiques *via* les vaisseaux lymphatiques afférents alors que les lymphocytes circulant dans le sang accèdent aux ganglions lymphatiques en passant à travers la paroi de veinules post-capillaires. Ils retournent finalement à la circulation sanguine lorsque la lymphe se déverse dans le sang au niveau du canal thoracique.

Dans la communauté scientifique des années 1950/1960, il existait un débat concernant la possible existence de communications diffuses entre le système lymphatique et le système veineux (29-32). En 1958, Patterson et son équipe ont injecté de l'albumine radioactive dans un vaisseau lymphatique de la patte d'un chien et ont quantifié à différents intervalles la concentration en albumine radioactive dans le canal thoracique lymphatique et dans le sang (33). Selon eux, moins de 3% de l'albumine injectée rejoint la circulation sanguine par une voie autre que l'anastomose du système lymphatique et veineux au niveau du canal thoracique. Les résultats de cette expérience font penser que le seul lien fonctionnel entre ces deux systèmes se situe à la jonction du canal thoracique et des veines sous-clavières.

À l'inverse du système vasculaire sanguin, la vasculature lymphatique n'est pas incluse dans un système circulatoire. En effet, la lymphe est transportée de façon unidirectionnelle des tissus vers la circulation sanguine (34). Contrairement aux vertébrés inférieurs, les mammifères ne possèdent pas de cœur spécialisé dans la mise en circulation de la lymphe (35). Chez l'homme, l'énergie nécessaire pour assurer le déplacement unidirectionnel de la lymphe dans le système lymphatique a deux origines (36, 37). La contractilité intrinsèque, ou active, est générée par la contraction spontanée des muscles lymphatiques. Elle a pour origine les contractions rythmées, coordonnées et rapides de la tunique de cellules musculaires lisses qui entoure les vaisseaux lymphatiques (38-40). De ces contractions résulte une réduction du

diamètre de la lumière du vaisseau, une diminution de la compliance lymphatique, une augmentation locale de la pression, la fermeture des valves en amont, l'ouverture de celles en aval et enfin l'éjection de la lymphe dans le lymphangion suivant. La contractilité extrinsèque, ou passive, provient des forces et pressions exercées par la formation de la lymphe, les pulsations artérielles, la contraction des muscles squelettiques adjacents, le péristaltisme gastro-intestinal et les mouvements respiratoires (41). La contractilité extrinsèque semble être le mécanisme prédominant de mise en mouvement de la lymphe pour les vaisseaux lymphatiques du cœur, des muscles squelettiques, du thorax et de la paroi intestinale, alors que la contractilité intrinsèque est essentielle pour tous les autres lits lymphatiques.

Bien que le système lymphatique et le système sanguin soient généralement complémentaires dans les tissus (Figure 4), la densité du plexus lymphatique n'est pas toujours aussi importante que celle du plexus sanguin. Il n'y a pas de capillaire lymphatique dans le système nerveux central, la moelle épinière et dans les tissus avasculaires comme la cornée, l'épiderme et les cartilages.



Figure 4 : Représentation schématique de l'interrelation et de la complémentarité entre les plexus sanguins et lymphatiques dans un tissu interstitiel. Les flèches indiquent la collecte par les capillaires lymphatiques borgnes des fluides et molécules extravasées des capillaires sanguins. Adapté de (18).

Les vaisseaux lymphatiques ne pénètrent pas aussi profondément dans certains organes que les vaisseaux sanguins (35). Ainsi, les capillaires lymphatiques sont uniquement situés à la périphérie des organes lobulaires comme le foie ou les glandes mammaires. Dans les muscles striés squelettiques, ils sont confinés dans le

fascia. Les tissus en contact avec l'environnement extérieur comme la muqueuse gastro-intestinale, le tractus respiratoire ou la peau sont plus exposés aux infections ; ils sont particulièrement riches en réseau lymphatique (35).

Les systèmes vasculaires sanguins et lymphatiques sont intimement connectés. En effet, le liquide interstitiel provenant de la filtration du plasma par les capillaires sanguins est collecté par les capillaires lymphatiques avant d'être retourné à la circulation sanguine générale au niveau de l'anastomose entre le canal thoracique et les veines sous-clavières droites et gauches. Cependant, alors que le système vasculaire sanguin est très bien étudié, le système lymphatique reste comparativement très peu connu. Cela est dû au fait que les chercheurs ne disposaient que de très peu d'outils spécifiques pour étudier le réseau endothélial lymphatique. Des découvertes récentes de marqueurs spécifiques offrent désormais la possibilité d'isoler plus facilement des populations pures de cellules endothéliales lymphatiques, et donc d'étudier la biologie lymphatique plus en détail, tant *in vitro* qu'*in vivo* (42, 43).

1.2.2. Structures des capillaires

Les capillaires sanguins mesurent en moyenne 200 à 500 μm de long, leur diamètre est de 5 à 10 μm et l'épaisseur de leur paroi est d'environ 0,5 μm (44, 45). Il est important de rappeler que les globules rouges ont un diamètre de 7,5 μm . Les contacts entre hématies et paroi endothéliale sont donc étroits. D'un point de vue histologique, les capillaires sont composés d'un mince endothélium reposant en monocouche sur une membrane basale composée principalement de collagène de type IV, de laminines, de nidogènes et de protéoglycans comme le perlecan (46).

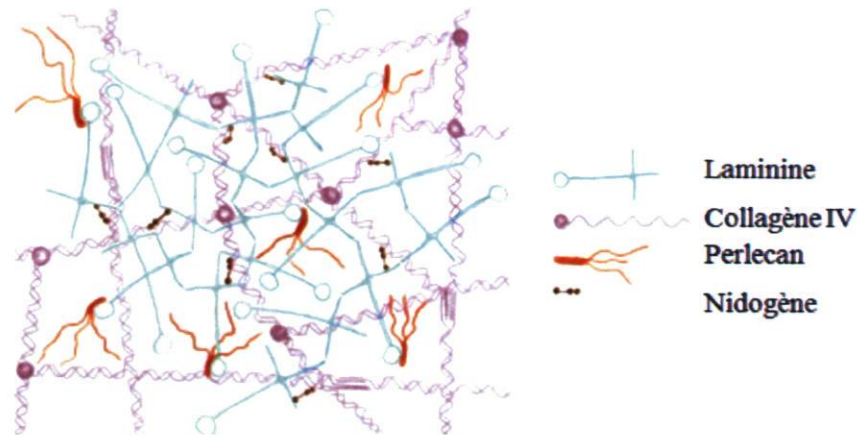


Figure 5 : Interactions des principaux composants de la membrane basale des capillaires. Tiré de (47).

Dans les tissus adultes, la membrane basale forme un feuillet protéique continu de 50 nm d'épaisseur (Figure 5) qui fournit un support physique à l'adhésion des cellules endothéliales et à la séparation des différents compartiments (47). La membrane basale intervient aussi dans la fonction de barrière des capillaires en limitant le mouvement des molécules chargées ou de haut poids moléculaire et des cellules comme les leucocytes (48) ou les cellules tumorales métastatiques (49).

Les interactions des cellules endothéliales avec les différents composants de la membrane basale jouent un rôle important dans le maintien de l'intégrité de la paroi vasculaire et le contrôle de la perméabilité des capillaires. Il semble que durant le développement cette membrane fournisse des informations spatiales pour aider à la prolifération, la migration et la maturation des cellules endothéliales.

Les capillaires et les veinules post-capillaires ne sont matures que lorsqu'ils co-localisent avec un autre type cellulaire : les péricytes. Ces cellules sont accolées à la surface abluminale des cellules endothéliales, intégrées dans un carcan de membrane basale sécrétée en partie par elles-mêmes (50). La perméabilité vasculaire est augmentée par la discontinuité de ce recouvrement par les péricytes. Ils ont un noyau rond et proéminent (Figure 6) et de nombreux prolongements qui entourent la surface abluminale du capillaire.

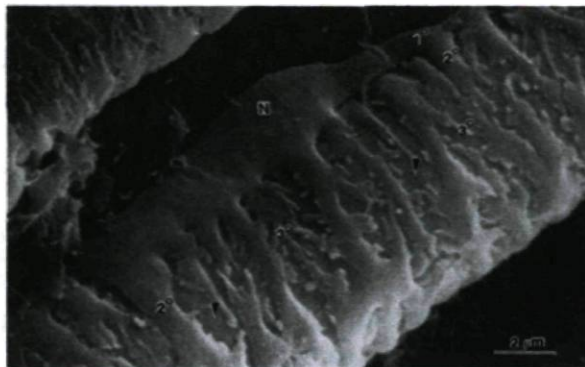


Figure 6 : Microscopie électronique à balayage d'un péricyte recouvrant la surface d'un capillaire. Notez le noyau arrondi (N), les prolongements de premier ordre (1°), parallèles à l'axe du capillaire, les prolongements de deuxième ordre (2°) encerclant le capillaire à angle droit par rapport à ceux du premier ordre, et enfin les prolongements de troisième ordre (3°) qui rayonnent à partir des 2°. Les flèches indiquent la surface abluminale des cellules endothéliales. Tiré de (51) d'après les travaux de Buchanan et Wagner.

Ils jouent un rôle important dans la fonctionnalité des capillaires (51, 52). Par exemple, d'un point de vue architectural, ils supportent et stabilisent les capillaires (53). Ce serait particulièrement le cas dans les veinules post-capillaires pour éviter leur collapsus à cause de la faible pression sanguine dans ce compartiment. Leur morphologie, leur positionnement autour et le long des capillaires et leur contenu riche en fibres d'actine suggèrent que les péricytes sont des cellules contractiles impliquées dans la régulation locale du flux sanguin du lit capillaire (54, 55).

Les interactions cellules-cellules, cellules-membrane basale et les facteurs solubles sécrétés par les tissus environnants influencent le développement de capillaires aux phénotypes différents (56, 57). Ces phénotypes sont classés par rapport à la morphologie des capillaires, corrélée à leur perméabilité. Il en existe trois types dans l'organisme adulte (Tableau 1).

Les capillaires continus, abondants dans la peau et les muscles lisses et squelettiques, sont les plus répandus dans l'organisme. Les cellules endothéliales forment un revêtement uni et ininterrompu à la perméabilité très sélective. Les membranes lumineales et ablumineales des cellules endothéliales fusionnent uniquement aux jonctions serrées. C'est par ces jonctions que se réalisent les échanges d'eau, de glucose, d'urée et d'autres molécules hydrophiles. Par

conséquent, la structure des jonctions serrées est le déterminant majeur de la perméabilité vasculaire dans les capillaires continus, comme par exemple dans la microcirculation cérébrale (58).

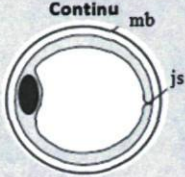
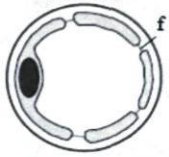
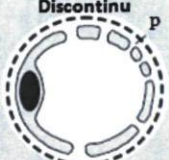
Phénotype	Organes	Fonctions
<p>Continu</p> 	Système nerveux central, peau, ganglions lymphatiques, muscles	Barrière hémato-encéphalique, circulation des lymphocytes, échanges métaboliques
<p>Fenestré</p> 	Glandes endocrines, tractus gastro-intestinal, plexus choroïde, glomérules rénaux	Secrétion, absorption, filtration
<p>Discontinu</p> 	Foie, moelle osseuse, rate	Échanges de particules, hématopoïèse, filtration des cellules sanguines

Tableau 1 : Les différents phénotypes de capillaires sanguins, leur distribution et leurs fonctions (*mb* : membrane basale, *js* : jonctions serrées, *f* : fenêtres, *p* : pores). Adapté de (20).

Les capillaires fenestrés se retrouvent dans les organes ou tissus impliqués dans la filtration, la sécrétion et l'absorption comme les reins, les glandes endocrines et l'intestin grêle (59). Ils sont plus perméables que les capillaires continus, à l'eau et aux molécules hydrophiles et de faible poids moléculaire, car leur endothélium est percé de pores ovales, ou fenestrations, de 50 à 60 nm de diamètre reposant sur une membrane, ou diaphragme, très mince (7 nm) (60). Dans le cas du rein, il semble que la sécrétion de VEGF, autrefois dénommé VPF pour *vascular permeability factor*, par les podocytes soit responsable de la perméabilisation de l'endothélium des glomérules rénaux (61-63).

Les capillaires sinusoides, ou discontinus, se situent dans le foie, la moelle osseuse et la rate. Leur diamètre est plus grand que celui des autres types de capillaires, leur lumière est irrégulière, la membrane basale est incomplète voire

absente et l'endothélium est troué par des pores de 80 à 200 nm de diamètre (64). Ces pores subissent des changements dynamiques sous le contrôle du cytosquelette d'actine des cellules endothéliales hépatiques (65). Leur perméabilité est très élevée, tant pour les grosses molécules que pour les cellules sanguines qui peuvent donc passer du sang aux tissus environnants et vice versa. En effet, dans ce type de capillaire, l'absence de membrane basale et les larges pores de l'endothélium concourent à l'absence de fonction de barrière de l'endothélium (66). Les composants moléculaires du plasma et les cellules baignent directement les cellules du parenchyme hépatique.

Il est intéressant de noter que les phénotypes des cellules endothéliales sont réversibles. En effet, des cellules endothéliales cultivées en présence de matrice extracellulaire sécrétée par une lignée épithéliale rénale formeront des fenestrations (67). De même, *in vivo*, elles acquièrent la morphologie des cellules endothéliales locales lorsqu'elles sont transplantées à un autre endroit dans l'organisme (67, 68).

Les capillaires sanguins et lymphatiques forment chacun un réseau de tubes tapissés d'un endothélium continu, cependant, leur fonction et donc leur structure diffèrent sur plusieurs aspects. Les observations suivantes proviennent de la synthèse de plusieurs études et revues (69-72).

La lumière des capillaires lymphatiques est large, irrégulière et aplatie par rapport à celles de capillaires sanguins. Ainsi, dans la peau et plus précisément dans le derme papillaire, le diamètre externe des capillaires sanguins est généralement compris entre 17 et 22 μm alors que le diamètre des capillaires lymphatiques peut atteindre 60 μm (73).

Contrairement aux capillaires sanguins, les capillaires lymphatiques ne sont pas stabilisés par des péricytes, leur membrane basale est incomplète voire inexistante et le cytoplasme des cellules qui composent l'endothélium lymphatique est très mince, excepté autour du noyau (74).

Les molécules d'adhésion cellulaire Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) et E-sélectine, communément exprimées dans l'endothélium vasculaire ne sont pas exprimées par l'endothélium lymphatique (75). Les rares molécules d'adhésion exprimées le sont

localement, en des points focaux, et non de façon continue sur toute la surface de la membrane. Les jonctions intercellulaires sont constituées par le chevauchement des membranes des cellules adjacentes, créant ainsi des fentes le long des capillaires lymphatiques. Toutes ces caractéristiques concourent à rendre l'endothélium lymphatique plus lâche que l'endothélium sanguin.

L'extrémité de ces capillaires, qui se terminent en cul-de-sac, est ouverte pour laisser entrer facilement les fluides et particules du milieu interstitiel.

Les cellules endothéliales lymphatiques sont intimement liées aux fibres de collagène du tissu adjacent par des microfibrilles de 40 à 110 Å de largeur, individuelles ou en faisceaux, riches en groupements disulfides (76-78). Ces filaments d'ancrage sont attachés à la membrane abluminale des cellules et se lient aux fibres de collagène et au réseau de fibres élastiques du tissu conjonctif environnant (Figure 7). La taille et la forme de la lumière du capillaire dépendent de la pression interstitielle dans le tissu (71). Lorsqu'elle augmente, à cause de l'arrivée de fluides dans le tissu par exemple, les fibres se tendent et augmentent la taille du lumen. Les jonctions intercellulaires qui jusque là se chevauchaient, s'ouvrent, formant des canaux intercellulaires, et facilitent le passage des fluides et des macromolécules vers l'intérieur du capillaire.

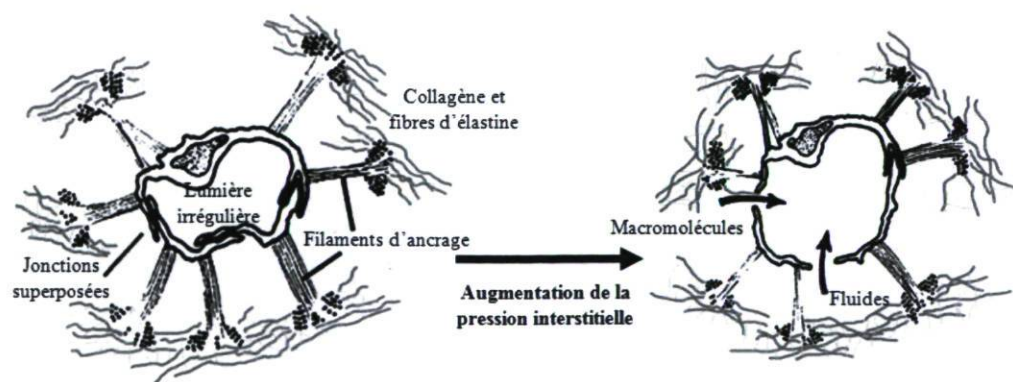


Figure 7 : Représentation de la structure d'un capillaire lymphatique en fonction de la pression interstitielle. Adapté de (72).

D'un point de vue morphologique, les différences entre les capillaires sanguins et lymphatiques sont résumées dans le Tableau 2.

	Capillaires sanguins	Capillaires lymphatiques
Lumière	Régulière, étroite	Irrégulière, large
Cytoplasme	Abondant	Peu
Valves	-	-
Jonctions cellulaires	Serrées	Lâches
Invaginations membranaires et vésicules cytoplasmiques	Peu nombreuses	Abondantes
Membrane basale	Présente	Souvent absente
Péricytes	+	-
Filaments d'ancrage	-	+
Sang	+	-

Tableau 2 : Différences morphologiques entre les capillaires lymphatiques et les capillaires sanguins. Adapté de (79), d'après les données de (80-82).

Du point de vue du microenvironnement, les microvasculatures capillaires et lymphatiques sont constamment soumises à des contraintes d'écoulement provenant des fluides qu'elles transportent. L'endothélium des capillaires sanguins subit des forces de cisaillement sur la face luminale des cellules mais ne subit peu ou pas du tout de flux trans-endothélial puisque le capillaire est peu perméable et que de nombreuses jonctions serrées lient les cellules, particulièrement dans le cas des capillaires continus. Au contraire, l'endothélium des capillaires lymphatiques est exposé à un flux de liquide interstitiel intercellulaire car il est très perméable et que ses jonctions intercellulaires sont lâches (82).

D'un point de vue génomique, des analyses sur des micropuces ont montré qu'environ 300 gènes étaient différentiellement exprimés entre les cellules endothéliales sanguines et lymphatiques, la plupart sous le contrôle du facteur de transcription Prospero-related homeobox 1 (PROX-1), spécifiquement exprimé dans les cellules lymphatiques (83).

1.2.3. Fonctions d'échanges

Les paramètres physiques au sein des capillaires sanguins en font un compartiment bien à part dans le système circulatoire général (Figure 8). Du fait de la grande section transversale offerte par les capillaires, la vitesse du flux et la pression sanguine sont très basses, facilitant ainsi les échanges de substances par diffusion entre le plasma et le milieu interstitiel.

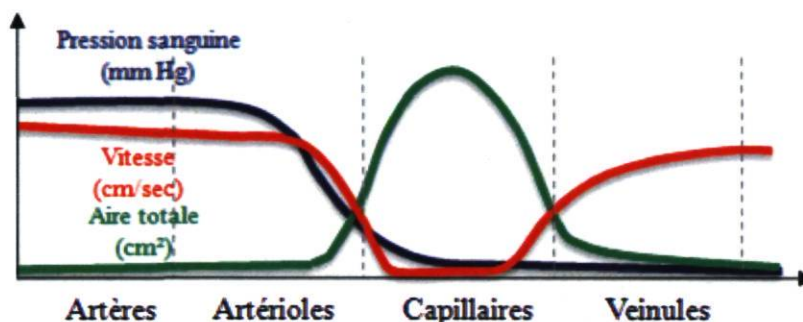


Figure 8 : Paramètres physiques dans les différents compartiments du système circulatoire sanguin. Adapté de (84).

Les lois biophysiques régissant le transport des fluides et des solutés à travers l'endothélium ne seront pas abordées dans ce chapitre mais peuvent être consultées à partir d'autres sources (85).

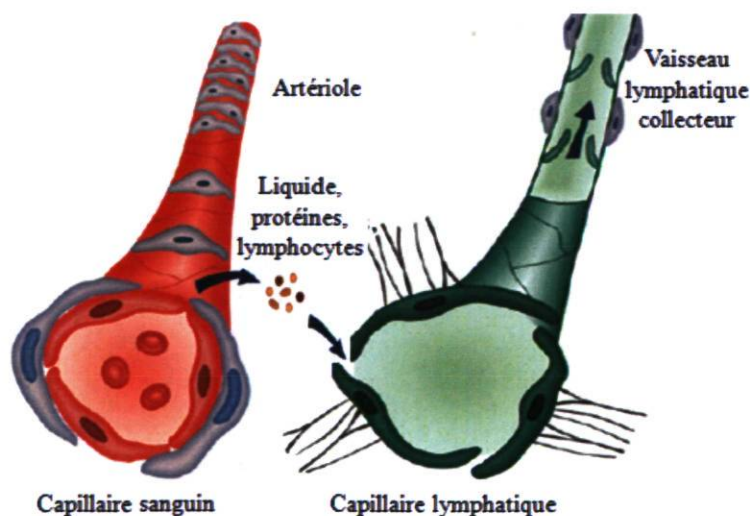


Figure 9 : Complémentarité fonctionnelle entre les systèmes sanguins et lymphatiques. La structure des capillaires lymphatiques est adaptée à la collecte des fluides, des lipides, des macromolécules et des cellules du milieu interstitiel, extravasés de la circulation sanguine. Adapté de (86).

La microcirculation assure non seulement l'approvisionnement des tissus en nutriments et la collecte de leurs déchets métaboliques, mais elle joue aussi un rôle important dans les échanges liquidiens entre le sang, les tissus et la lymphe, le transport des hormones depuis les glandes qui les produisent jusqu'aux cellules cibles, la continuité entre les organes de synthèse ou de stockage de molécules et enfin, elle constitue une ligne de défense contre les agents pathogènes (85). Afin d'assurer toutes ces fonctions, les microvasculatures sanguines et lymphatiques interagissent, échangent et se complètent (Figure 9).

Les échanges des gaz respiratoires et des nutriments/déchets métaboliques sont régis par la diffusion. La diffusion se fait toujours selon un gradient de concentration, du compartiment le plus concentré vers le compartiment le moins concentré. L'oxygène et les nutriments sortent du compartiment sanguin pour atteindre les cellules des tissus environnants alors que le CO₂ et les déchets métaboliques suivent le chemin inverse.

En 1896, Starling a démontré que les échanges liquidiens à travers la paroi des capillaires sont déterminés par la balance des pressions hydrostatiques et colloïdales du plasma et du tissu interstitiel (87). La perméabilité capillaire, influencée indirectement par l'oxyde nitrique, module aussi les échanges de fluides et de solutés dans la microcirculation sanguine (88). Le réseau lymphatique assure le maintien de l'homéostasie des fluides au sein de l'organisme. Ainsi, les protéines, les solutés et l'eau extravasés des capillaires sanguins et présents dans le milieu interstitiel sont captés par les capillaires lymphatiques et transportés jusqu'à la circulation sanguine générale (22).

Les capillaires lymphatiques jouent aussi un rôle majeur dans l'absorption et le transport des graisses alimentaires, sécrétées sous forme de micelles lipidiques, ou chylomicrons, par les entérocytes. Ainsi, plus de 90% des lipides alimentaires sont absorbés au niveau de l'intestin par ce mécanisme (86).

Le retour dans la circulation sanguine des fluides et des molécules extravasées est d'une importance cruciale pour le maintien du volume plasmatique

et pour prévenir l'augmentation de la pression interstitielle et la formation d'œdèmes (89). De plus, la clairance adéquate des fluides interstitiels assure la nutrition optimale des cellules en conservant une distance minimale entre celles-ci et les capillaires.

La notion de fonction d'échange des capillaires inclut aussi les cellules. Ainsi, les cellules du système immunitaire circulent dans les capillaires et migrent à travers leur paroi. Le phénomène de transmigration endothéliale de ces cellules lors du processus inflammatoire, ou diapédèse, implique le roulement des leucocytes sur l'endothélium, puis leur adhésion, leur migration à travers celui-ci et finalement leur déplacement jusqu'au site de l'inflammation (90). Les lymphocytes et les cellules dendritiques présentatrices d'antigènes migrent des tissus vers les capillaires lymphatiques, puis sont transportés par la lymphe jusqu'aux ganglions lymphatiques où les réponses immunitaires cellulaires adaptées seront initiées (91). Enfin, les cellules cancéreuses peuvent aussi transiter par les capillaires, lymphatiques ou sanguins, lors du processus métastatique (92).

1.3. Mise en place du réseau capillaire

1.3.1. Développement embryonnaire

1.3.1.1. Vasculogenèse

Le système cardiovasculaire est le premier système à se développer lors de l'embryogenèse des vertébrés. C'est au cours de la 3^{ème} semaine de développement que prend place le processus de vasculogenèse, première étape de la formation des vaisseaux (Figure 10). Ce processus est bien documenté dans plusieurs revues à ce sujet (93-95).

Brièvement, au sein de l'embryon, des cellules mésenchymateuses se différencient en hémangioblaste sous l'action du *fibroblast growth factor-2* (FGF-2) via la signalisation de la protéine kinase C (96). Un hémangioblaste est une cellule à double polarité qui se retrouve aussi bien à l'état embryonnaire qu'à l'état adulte (97, 98). D'un côté il est capable de se différencier en angioblastes, ou précurseurs de cellules endothéliales. D'un autre côté, il est à l'origine des cellules souches

hématopoïétiques, qui donneront par la suite les différentes lignées cellulaires sanguines circulantes comme les globules rouges et blancs et les plaquettes. Les hémangioblastes migrent dans le sac vitellin et se différencient au sein d'îlots sanguins en angioblastes et cellules souches hématopoïétiques. Les cellules endothéliales primitives sont situées sur le pourtour de ces îlots alors que les précurseurs des cellules hématopoïétiques sont au centre. Suite à l'action paracrine du VEGF sécrété par l'endoderme (99, 100), ces îlots vont fusionner et créer des tubes tapissés de cellules endothéliales. Ce réseau vasculaire forme le plexus capillaire primitif.

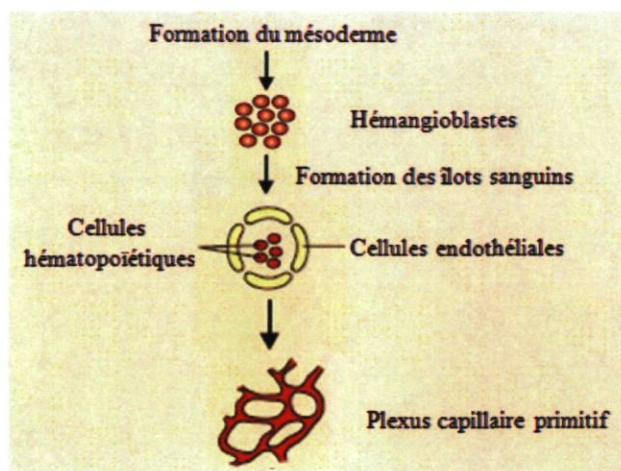


Figure 10 : Schéma du processus de vasculogenèse lors de l'embryogenèse. Adapté de (101).

1.3.1.2. Lymphangiogenèse

Au début du XX^{ème} siècle, Sabin suggère que des sacs lymphatiques initiaux émergent des veines embryonnaires par bourgeonnement, et que ces cellules lymphatiques primitives se dispersent dans le corps pour former le réseau lymphatique (102, 103). Plusieurs marqueurs spécifiques des cellules endothéliales lymphatiques comme le VEGFR-3, le LYVE-1 et le facteur de transcription PROX-1 sont effectivement exprimés par les cellules endothéliales qui composent le sac lymphatique bourgeonnant chez les embryons de souris (28, 104-106). L'analyse de modèles de souris génétiquement modifiées a conduit à décrire les différentes étapes du développement lymphatique embryonnaire au cours duquel une sous-population

de cellules endothéliales embryonnaires veineuses subit une différenciation lymphatique (107-109). Le processus de lymphangiogenèse embryonnaire est décrit à la

Figure 11. Il se déroule en quatre étapes distinctes : la compétence, l'engagement, la spécification et la maturation lymphatique (110).

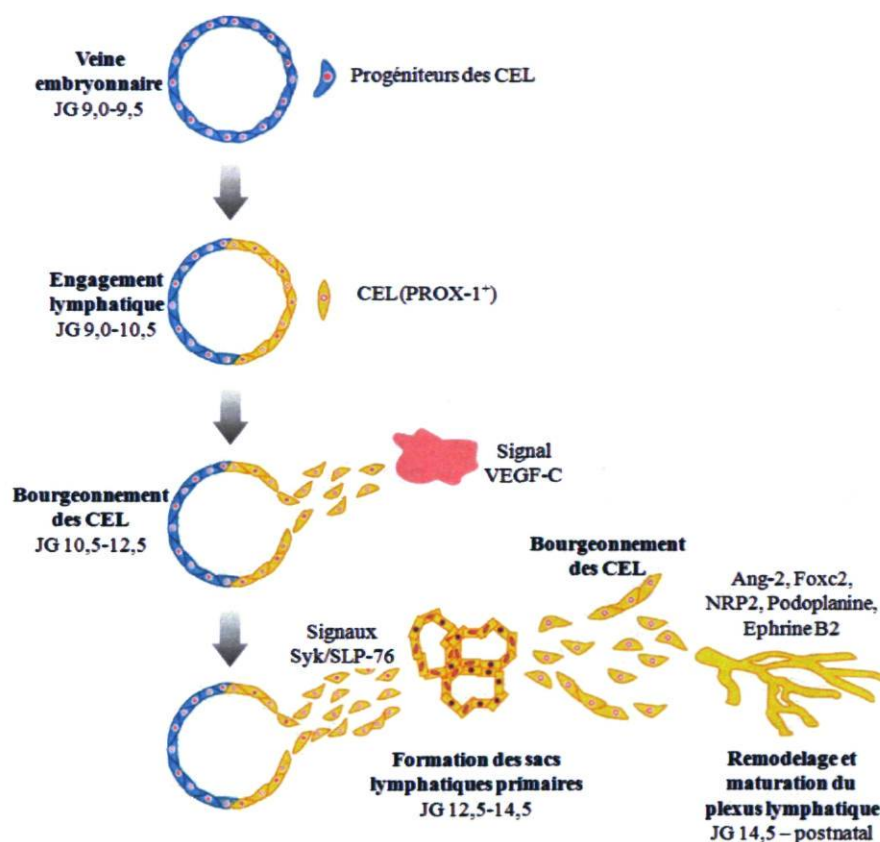


Figure 11 : Schéma du processus de développement de la vasculature lymphatique chez les mammifères. Rapidement lors du développement embryonnaire de la souris (Jour de gestation (JG) 9,0-9,5), PROX-1 commence à être exprimé dans les progéniteurs des cellules endothéliales lymphatiques (CEL), situés dans la veine cardinale antérieure. Suite à l'expression de ce facteur de transcription, les progéniteurs acquièrent un phénotype endothélial lymphatique et bourgeonnent de façon polarisée. Ce bourgeonnement, dépendant d'un signal VEGF-C provenant du microenvironnement mésenchymateux, mène à la formation des sacs lymphatiques primaires. Au cours de ce processus, les systèmes veineux et lymphatiques sont séparés par un mécanisme qui implique la voie de signalisation Syk/SLP-76. Le bourgeonnement des LEC est ensuite initié. Enfin, la maturation des vaisseaux lymphatiques et leur remodelage interviennent d'une manière progressive, conduisant à la formation d'un réseau lymphatique complet. Adapté de (22).

La compétence lymphatique correspond au stade où toutes les cellules endothéliales de la veine cardinale embryonnaire possèdent le potentiel de répondre à un signal encore inconnu qui induit la différenciation lymphatique. Suite à ce signal émis par le microenvironnement mésenchymateux, une sous-population de ces cellules endothéliales compétentes commence à exprimer le facteur de transcription PROX-1 : c'est l'engagement lymphatique (111). Les précurseurs des cellules endothéliales lymphatiques vont progressivement se différencier au cours de la phase de spécification et exprimer des marqueurs de cellules endothéliales lymphatiques comme la podoplanine. Parallèlement, l'expression de marqueurs de cellules endothéliales vasculaires comme le CD34, la laminine et le collagène de type IV vont diminuer (106, 112). Enfin, les précurseurs vont migrer dans le milieu environnant et s'assembler en sacs lymphatiques primaires. La phase de maturation commence dès que des cellules endothéliales lymphatiques bourgeonnent de ces sacs primaires et se répandent dans l'embryon. L'organisation et la maturation du plexus capillaire lymphatique s'achèvent quelques jours après la naissance. Peu après celle-ci, le réseau lymphatique mature exprime le profil complet des marqueurs lymphatiques retrouvé chez l'adulte (107).

1.3.2. Chez l'adulte : Angiogenèse et lymphangiogenèse

1.3.2.1. Définition et processus

Judas Folkman, considéré comme le père de l'angiogenèse, l'a définie en 1971 comme la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants (113). Cependant, ce fut August Krogh, prix Nobel de physiologie et de médecine en 1920, qui démontra dans sa thèse intitulée « Échanges respiratoires des animaux » qu'il existe une forte corrélation entre la densité des capillaires musculaires et les besoins en oxygène de diverses espèces (114). Il fut le premier à imaginer que l'angiogenèse est contrôlée par la demande métabolique en oxygène des tissus.

La Figure 12 illustre les différents mécanismes d'angiogenèse.

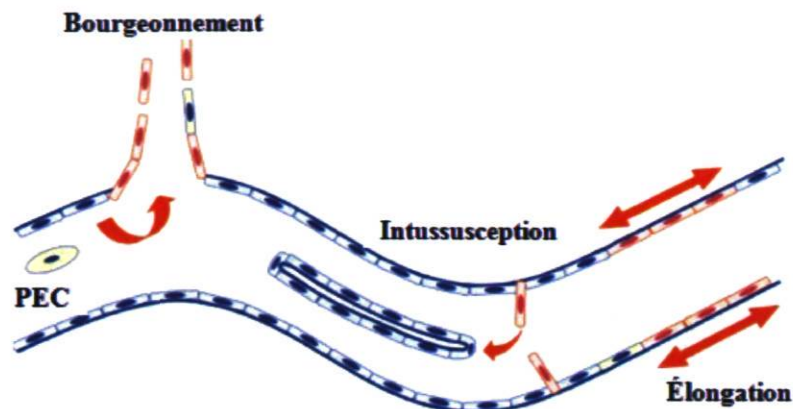


Figure 12 : Représentation schématique des quatre mécanismes potentiels d'angiogenèse : le bourgeoisement, l'intussusception, l'élongation et l'incorporation de progéniteurs endothéliaux circulants (PEC). Les cellules endothéliales quiescentes sont représentées en bleu, les prolifératives en rouges et les progéniteurs endothéliaux circulants en jaune clair. Adapté de (115).

L'angiogenèse par bourgeoisement est caractérisée par plusieurs étapes impliquant principalement l'endothélium des capillaires (Figure 13).

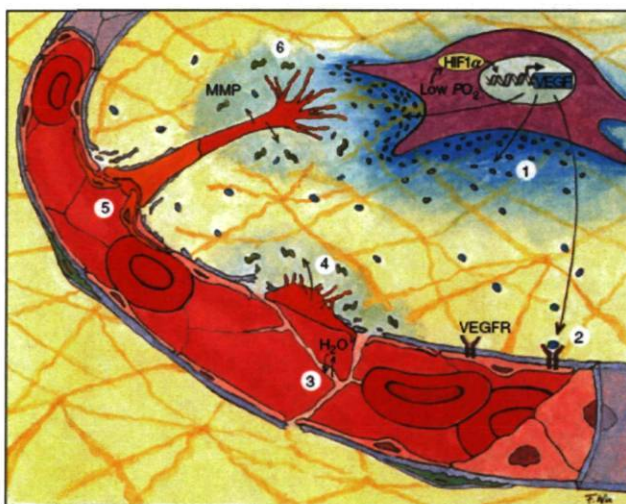


Figure 13 : Schéma du processus d'angiogenèse par bourgeoisement. 1) L'*hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1 α) est synthétisé par des cellules en hypoxie. Il active la transcription et la sécrétion du VEGF. 2) Le VEGF se lie à son récepteur (VEGFR) à la surface des cellules endothéliales des capillaires environnants. 3) La perméabilité vasculaire augmente. 4) Une cellule endothéliale « éclairée » (*tip cell* en anglais) commence à digérer la membrane basale du capillaire. 5) Les cellules endothéliales prolifèrent derrière elle. 6) Les cellules endothéliales à la pointe du bourgeon migrent vers l'origine du stimulus en sécrétant des métalloprotéinases (MMP) qui digèrent la matrice extracellulaire environnante. Tiré de (116).

Ce processus est particulièrement bien décrit et développé dans plusieurs livres et revues (13, 117-119). Brièvement, lors de la phase d'initiation, les cellules endothéliales répondent à des facteurs de croissance comme le VEGF, libérés localement par des cellules en hypoxie (120). L'interaction du VEGF avec son récepteur sur la surface de l'endothélium induit la surexpression de protéinases extracellulaires (121, 122). Celles-ci vont digérer la membrane basale sous-jacente. La lame basale des capillaires est elle-même un réservoir de facteurs de croissance puisqu'elle a une grande affinité pour le VEGF et le FGF-2 par exemple (123). Les cellules endothéliales vont ensuite migrer et proliférer vers l'origine du stimulus à travers la membrane basale et la matrice extracellulaire adjacente digérées par les protéinases. Elles s'organiseront finalement sous forme de capillaire, déposeront une nouvelle membrane basale et recruteront des cellules murales comme les péricytes pour maintenir leur architecture.

La croissance microvasculaire par intussusception a été décrite pour la première fois en 1986 par Caduff et ses collègues lors du développement post-natal du réseau capillaire pulmonaire (124). Au cours de la troisième semaine de vie des rats et lors des deux premières années de vie des humains, la microvasculature pulmonaire est très largement remodelée, au même titre que la structure des poumons elle-même. Au cours de cette période, le volume pulmonaire augmente de plus de 20 fois chez le rat, et le volume capillaire de plus de 35 fois (125). Lors de son étude par microscopie électronique, Caduff a observé la séparation longitudinale de la lumière des capillaires en deux par la formation d'un pilier tissulaire formé par des cellules endothéliales opposées migrant les unes vers les autres.

Étant donné que le processus d'angiogenèse dépend à l'origine de la prolifération cellulaire pour pallier un manque d'irrigation, il peut être relativement long à se mettre en place. Le délai de mise en place de l'intussusception est de quelques minutes à quelques heures, elle assure donc l'expansion rapide du réseau capillaire. Le phénomène d'intussusception a été découvert dans le poumon, mais il intervient probablement dans le développement de nombreux lits capillaires, cependant, les mécanismes impliqués dans son contrôle et sa régulation restent très mal caractérisés (126).

Le processus d'élongation intervient dans les tissus soumis à un constant remodelage de leur microvasculature en réponse à des demandes métaboliques variables des cellules environnantes. Il est aussi connu sous le nom de remodelage ou d'élagage (119). Une étude récente a démontré que le phénomène d'élongation est induit par la diminution des forces de cisaillements sur la paroi endothéliale lors d'une chute de pression au sein du réseau vasculaire (127).

Une faible proportion de cellules mononucléaires circulantes a été identifiée comme étant des progéniteurs endothéliaux circulants ayant la capacité de s'incorporer dans les capillaires en croissance (128, 129). En effet, l'équipe d'Asahara a démontré que l'administration de VEGF *in vivo* recrute des précurseurs de cellules endothéliales de la moelle osseuse, augmente la densité de progéniteurs endothéliaux circulants et favorise la néovascularisation de la cornée.

La maturation de ces capillaires nouvellement formés requiert le recrutement de cellules murales, la synthèse d'une matrice extracellulaire spécifique, à savoir une membrane basale, et la modification phénotypique de la paroi vasculaire pour répondre aux besoins de l'organe (130).

Le processus de lymphangiogenèse chez l'adulte est beaucoup moins étudié que l'angiogenèse, principalement à cause du manque de marqueurs spécifiques aux cellules endothéliales lymphatiques. En effet, la recherche de marqueurs spécifiques et la mise au point de techniques d'analyse et d'imagerie *in vivo* ont été un véritable défi. Il reste donc jusqu'à aujourd'hui beaucoup de questions sans réponses, la plupart abordées par Jain en 2002 (131). Par exemple, quels sont les mécanismes moléculaires impliqués? Le développement tumoral nous apprend que le VEGF-C et le VEGF-D stimulent la lymphangiogenèse par l'activation de voies de signalisation induites par leur liaison à leur récepteur VEGFR-3 sur les cellules endothéliales lymphatiques. Il semblerait que le processus de lymphangiogenèse puisse impliquer des mécanismes identiques à ceux de l'angiogenèse comme l'intussusception, le bourgeonnement ou l'intégration de précurseurs lymphatiques circulants. Une importante question reste l'identification du signal moléculaire ou mécanique qui

induit la lymphangiogenèse. Étant donné que les vaisseaux lymphatiques maintiennent la balance des fluides dans les tissus, l'augmentation de la pression hydrostatique pourrait être ce signal.

1.3.2.2. Conditions physiologiques

Contrairement à la plupart des lits vasculaires adultes qui conservent une structure et une fonction quiescente tout au long de la vie, l'utérus, et plus particulièrement l'endomètre, subissent cycliquement une angiogenèse physiologique (115, 132). En effet, l'angiogenèse normale intervient au cours de trois stades du cycle menstruel : tout d'abord lors de la réparation du lit vasculaire suite aux menstruations (133), ensuite pendant la phase proliférative afin d'assurer la croissance rapide de la partie fonctionnelle de l'endomètre (134) et enfin lors de la phase sécrétoire quand les artérioles en spirale grandissent et s'enroulent sous l'influence de la progestérone (135).

À l'inverse, la lymphangiogenèse n'est pas stimulée lors du cycle menstruel. Au contraire, non seulement la densité de vaisseaux et capillaires lymphatiques n'est pas augmentée dans la partie fonctionnelle de l'endomètre au cours du cycle (136), mais en plus elle est quatre à cinq fois moins élevée que celle de la partie basale de l'endomètre (137). La réduction de la surveillance immunitaire qui en découle est contrebalancée par la perte de l'endomètre fonctionnel à chaque cycle, ce qui limite l'exposition à des pathogènes étrangers ou à des infections.

D'autre part, l'angiogenèse se déroule régulièrement lors de chaque cycle de vie du cheveu, composés de 4 phases successives : la phase anagène, la phase catagène, la phase telogène et la phase de latence (138). Lors de la phase de pousse du cheveu (la phase anagène), les follicules pileux sont très vascularisés alors qu'au cours de la phase catagène, lorsque les kératinocytes du bulbe dégèrent et meurent, la plupart des capillaires s'effondrent et disparaissent (139, 140). L'angiogenèse observée autour du follicule pileux lors de la phase anagène est accompagnée par la surexpression du VEGF par les cellules externes de la gaine de la racine (141). À l'inverse, la régression de ce réseau capillaire lors de la phase catagène est associée à

la diminution de l'expression du VEGF par ces mêmes cellules. La diminution de la vascularisation du follicule pileux lors de la transition anagène/catagène s'explique aussi par l'expression d'un inhibiteur de l'angiogenèse, la thrombospondine-1 (TSP-1), par les cellules du follicule et de la papille dermique (142).

Le processus d'angiogenèse est aussi observé lors d'un entraînement physique intense. Déjà démontré en 1967 chez le rat (143), Andersen et Henriksson ont montré en 1977 chez l'homme que l'entraînement cardio-vasculaire est un puissant stimulus de la prolifération capillaire dans le muscle strié squelettique (144). En effet, après des entraînements de 40 minutes par jour, 4 fois par semaine, pendant 8 semaines, ils ont noté une augmentation de 20% de la densité capillaire dans le quadriceps des sujets de l'étude (144). Ce type de résultat est aussi retrouvé chez l'homme par Ingjer en 1978 (145). Le VEGF pourrait être un des médiateurs de cette angiogenèse. En effet, il a été démontré que l'exercice physique induit chez l'homme une augmentation des ARNm du VEGF et de HIF-1 β dans le muscle, corrélée à l'augmentation de la concentration plasmatique de lactate dans la veine fémorale (146).

L'angiogenèse et la lymphangiogenèse participent activement à la réponse physiologique de l'organisme lors d'une blessure. Le processus de cicatrisation est habituellement découpé en trois phases : inflammatoire, proliférative puis remodelage (147). L'angiogenèse intervient principalement lors de la phase proliférative, environ 4 jours après la lésion, mais ces découpages sont arbitraires, la cicatrisation étant un processus continu (148). Au cours de la réparation tissulaire, les macrophages, fibroblastes et cellules endothéliales interagissent spatialement et temporellement au site de la blessure (149). Les macrophages secrètent des cytokines qui stimulent la prolifération fibroblastique et l'angiogenèse. Les fibroblastes synthétisent de la matrice extracellulaire informative qui supportera la migration et l'organisation des cellules endothéliales en capillaires. Ces capillaires sanguins apporteront aux autres types cellulaires l'oxygène et les nutriments indispensables à leur survie et à leur activité métabolique (150). Plus spécifiquement, la migration des cellules

endothéliales dans le site lésé est régulée par la matrice temporaire du tissu de granulation, riche en fibrine et fibronectine. En effet, ces deux composants régulent positivement l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans les cellules de l'extrémité du bourgeonnement capillaire et favorisent leur migration (151, 152). La majorité des capillaires sanguins nouvellement formés dégènera par apoptose lorsque le tissu de granulation provisoire sera remodelé en tissu cicatriciel riche en collagène.

Lors d'une blessure cutanée, les nouveaux capillaires lymphatiques proviennent du bourgeonnement de capillaires plus larges situés dans la zone sous-cutanée profonde et sur les marges de la plaie (153). La lymphangiogenèse suit, dans le temps et dans l'espace, le processus actif d'angiogenèse qui a lieu dans le derme et le tissu de granulation en formation (154, 155). De plus, la pression du liquide interstitiel est indispensable à l'organisation des cellules endothéliales lymphatiques en capillaires fonctionnels (156, 157). Il semble que les capillaires lymphatiques qui bourgeonnent au sein du tissu lésé jouent un rôle important dans le drainage des particules et des protéines. Ils seraient donc essentiels pour la réduction de l'œdème et la cicatrisation de la plaie.

1.3.2.3. Conditions pathologiques : l'exemple du mélanome cutané

L'angiogenèse est associée, soit par son défaut (Tableau 3) soit par son excès (Tableau 4), à de nombreuses maladies chez l'humain.

Organe	Maladies
Système nerveux	Maladie d'Alzheimer, sclérose latérale amyotrophique, neuropathie diabétique, attaque
Vaisseaux sanguins	Athérosclérose, hypertension, diabète, resténose
Système gastro-intestinal	Ulcères gastriques ou oraux, maladie de Crohn
Peau	Alopécie, purpura cutané, télangiectasie
Système reproducteur	Pré-éclampsie, ménorragie
Poumons	Détresse respiratoire néonatale, fibrose pulmonaire, emphysème
Reins	Néphropathie
Os	Ostéoporose, défaut de guérison lors d'une fracture

Tableau 3 : Maladies caractérisées ou causées par une déficience d'angiogenèse ou une régression vasculaire. Tiré de (118).

Organe	Maladies
Nombreux organes	Cancers, maladies infectieuses, désordres auto-immuns
Vaisseaux sanguins	Malformations vasculaires, syndrome de DiGeorge, hémangiome caveux, télangiectasie hémorragique héréditaire
Tissu adipeux	Obésité
Peau	Psoriasis, verrues, dermatite allergique, cicatrice chéloïde, maladies à cloques, sarcome de Kaposi chez les patients atteints du SIDA
Œil	Syndrome persistant d'hyperplasie du vitré, rétinopathie, néovascularisation choroïdale
Poumons	Hypertension pulmonaire primaire, asthme, polypes nasaux
Intestins	Maladie inflammatoire de l'intestin, ascites, adhésions péritonéales
Appareil reproducteur	Endométriose, saignements utérins, kystes ovariens, hyperstimulation ovarienne
Os, articulations	Arthrite, synovite, ostéomyélite, formation d'ostéophytes

Tableau 4 : Maladies caractérisées ou causées par une angiogenèse anormale ou excessive. Tiré de (118).

Seule l'angiogenèse pathologique associée au développement de cancers sera abordée dans cette partie. Nous traiterons d'un exemple particulièrement étudié : l'angiogenèse associée au développement du mélanome cutané.

Le mélanome cutané est la conséquence d'une transformation maligne des mélanocytes dans l'épiderme. Bien que ne représentant environ que 5% de tous les cancers de la peau, il en est la forme la plus grave. Environ 4 000 nouveaux cas de mélanomes sont diagnostiqués chaque année au Canada¹. Toutes les données qui suivent sont extraites d'un rapport de l'*American Cancer Society* sur les différents types de cancers aux États-Unis en 2009 (158). Dans ce pays, mais la tendance est aussi constatée dans le reste du monde, les mélanomes cutanés ont une prévalence particulière dans la population blanche par rapport à la population afro-américaine puisqu'elle est dix fois plus élevée. L'incidence des mélanomes cutanés a régulièrement augmenté au cours des trente dernières années, particulièrement récemment chez les jeunes femmes blanches (augmentation de 3,8% depuis 1995 dans la catégorie 15-34 ans). Ceci s'explique par les changements de comportements quant à l'exposition au soleil, devenue une activité récréative. Les facteurs de risques incluent l'historique familial, l'exposition solaire excessive, la sensibilité aux coups de soleil, l'utilisation des cabines de bronzage et les maladies supprimant le système immunitaire. S'ils sont détectés lors de la phase précoce du développement de la maladie, les mélanomes sont curables, la plupart du temps par excision chirurgicale. Cependant ce type de cancer est particulièrement agressif et a une forte propension à métastaser dans le reste de l'organisme, principalement dans le foie et les os. La survie à 5 ans et 10 ans pour des patients atteints de mélanome est respectivement de 91% et 90%. En effet, environ 80% des mélanomes sont diagnostiqués lors de la phase précoce de la maladie. Cependant, les patients dont le cancer a métastasé n'ont une survie à 5 ans que de 16%. Il est donc primordial d'améliorer la compréhension, la détection et le traitement de ce type de cancer.

Les cellules cancéreuses sont capables de détourner des processus physiologiques à leur avantage.

¹ www.santepublique.gc.ca

Ainsi, lors de l'angiogenèse tumorale, les cellules endothéliales répondent à un stimulus émis par les cellules cancéreuses en stress. L'émission de ce signal peut avoir différentes origines (159, 160). Il peut s'agir d'un stress métabolique comme une hypoxie, un faible pH ou une hypoglycémie ; un stress mécanique comme la pression générée par les cellules en prolifération ; une réponse immune/immunitaire si des cellules immunitaires ont infiltré le tissu ; ou des mutations génétiques touchant le contrôle de la production de facteurs pro-angiogéniques.

Tout comme les capillaires normaux, les capillaires tumoraux se développent par bourgeonnement ou intussusception. Des précurseurs endothéliaux circulants, arrachés à la paroi vasculaire ou mobilisés dans la moelle osseuse, peuvent aussi contribuer à l'angiogenèse tumorale (161, 162). Les mécanismes cellulaires et moléculaires de l'angiogenèse tumorale sont particulièrement bien étudiés et décrits (118, 163).

Les capillaires tumoraux ont des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles qui diffèrent de celles des capillaires normaux. La plupart des capillaires tumoraux ne sont pas associés à des péricytes et ne bénéficient donc pas de leurs propriétés contractiles pour répondre adéquatement aux besoins métaboliques des tissus environnants (164). La microvasculature tumorale est hautement désorganisée et ramifiée et ses capillaires sont tortueux, dilatés et possèdent un diamètre inégal (165). Les parois des capillaires ont de nombreuses ouvertures, des jonctions intercellulaires lâches, une membrane basale discontinue voire absente et des cellules endothéliales qui sont capables de proliférer les unes sur les autres (166, 167). L'endothélium tumoral est donc hautement perméable. Enfin, l'endothélium des capillaires tumoraux n'est pas toujours formé d'une couche homogène de cellules endothéliales. En effet, il existe au sein des tumeurs des capillaires mosaïques décrits pour la première fois par Hammersen en 1985 (168). Les capillaires mosaïques sont des capillaires sanguins qui fournissent un apport sanguin à une tumeur dont la paroi est composée à la fois de cellules endothéliales et de cellules cancéreuses. Ce phénomène est rencontré dans plusieurs types de tumeurs agressives comme les mélanomes et le cancer du colon (169, 170).

Le processus d'apparition des capillaires mosaïques reste peu clair, et plusieurs possibilités sont envisagées (171). Tout d'abord, il se peut que la migration et la prolifération endothéliale qui se produisent lors de la phase de croissance rapide des capillaires tumoraux ne soient pas suffisamment efficaces pour tapisser la totalité du nouveau capillaire, laissant des cellules cancéreuses exposées dans la lumière. Ensuite, des cellules endothéliales peuvent décrocher de l'endothélium, exposant ainsi les cellules cancéreuses sous-jacentes. Une autre possibilité est que des cellules cancéreuses migrent et envahissent l'endothélium. Enfin, il est envisagé que certaines cellules endothéliales perdent des marqueurs spécifiques lors de la progression tumorale et ne soient, par conséquent, plus détectées lors des analyses.

Folkman a suggéré que l'incorporation de cellules cancéreuses dans les capillaires mosaïques pourrait augmenter la dispersion métastatique étant donné qu'elles sont directement en contact avec le flux sanguin (172).

Les cellules cancéreuses agressives comme le sont celles des mélanomes sont capables de mimer des comportements d'autres types cellulaires, à savoir des cellules endothéliales, afin de promouvoir leur survie. En 1999, Andrew Maniotis et son équipe ont remarqué qu'*in vivo* des cellules cancéreuses de mélanomes agressifs étaient capables de s'assembler pour former des canaux vasculaires, ou pseudo-capillaires, contenant des globules rouges (173). Ils ont nommé ce phénomène la pseudo-vasculogénèse. Il faut cependant noter, comme le remarquent McDonald et Jain en 2000 dans un commentaire passionné à propos de l'article de Maniotis publié dans le même journal (174), que la notion de cellules cancéreuses participant à la formation de vaisseaux sanguins intra-tumoraux existe depuis les années 40. Elle a été tout d'abord introduite par Willis dans son livre « Pathology of Tumors » (175), puis reprise et étoffée par de nombreux auteurs sans toutefois qu'ils la nomment pseudo-vasculogénèse (168, 176-178).

Lors de ce processus, les cellules cancéreuses agressives forment des canaux assurant la perfusion de la tumeur indépendamment de l'angiogénèse tumorale et facilitant la dispersion métastatique. Dans cette même publication, Maniotis et ses

collaborateurs ont démontré que des cellules de mélanome uvéal agressif conservent, *in vitro*, la capacité de s'organiser en pseudo-capillaire dans un gel de collagène.

Comme le montre la Figure 14, la structure des pseudo-capillaires diffère de celle des capillaires sanguins sur des aspects essentiels. Leur lumière n'est pas tapissée par des cellules endothéliales, mais est délimitée par une fine lame basale et bordée, à l'extérieur, par des cellules cancéreuses (173). Cette matrice extracellulaire, secrétée par les cellules cancéreuses sus-jacentes, est positive à la coloration histologique à l'acide périodique de Schiff car elle est riche en mucopolysaccharides, glycoprotéines et autres glycolipides.

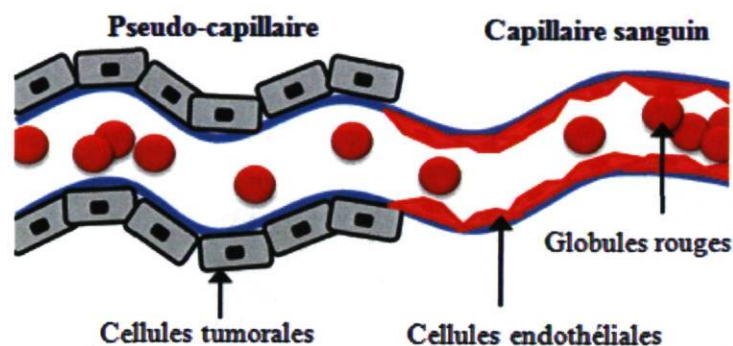


Figure 14 : Comparaison de la structure d'un pseudo-capillaire à celle d'un capillaire sanguin. Les pseudo-capillaires, produits lors du processus de pseudo-vasculogénèse, sont tapissés à l'extérieur par des cellules cancéreuses alors que les capillaires sanguins sont tapissés à l'intérieur par des cellules endothéliales. Inspiré de (179).

Ce phénomène n'est pas propre aux mélanomes agressifs. En effet, la pseudo-vasculogénèse a été observée dans d'autres tumeurs agressives comme les cancers de la prostate, du sein ou gastro-intestinaux (180-182). De plus, il s'avère que dans le cas du cancer colorectal (183) ou des adénocarcinomes gastriques (184), la présence de pseudo-capillaires au sein de la tumeur joue un rôle d'indicateur de pronostic quant à la survie du patient.

Il est intéressant de noter qu'il existe un type cellulaire autre que les cellules endothéliales capable, dans un contexte physiologique cette fois, de participer à l'établissement d'une microcirculation à l'intérieur de structures tubulaires. Il s'agit des cytotrophoblastes. Ces cellules, d'origine embryonnaire, sont directement impliquées dans les processus biologiques indispensables à l'établissement, au

maintien et au développement d'une grossesse que sont l'implantation du blastocyste dans la paroi utérine, la tolérance immunitaire de l'allogreffe, le développement et la croissance fœto-placentaire (185). Afin de fournir un approvisionnement sanguin adéquat à l'embryon en cours de développement, les cytotrophoblastes s'assemblent en structures tubulaires creuses et vont par la suite envahir les artérioles du myomètre, allant jusqu'à remplacer l'endothélium maternel, créant un système microvasculaire hybride (186, 187). Ces cellules sont capables, au cours de l'invasion de l'utérus, de transformer leur phénotype de récepteur d'adhésion cellulaire et expriment des marqueurs typiques des cellules endothéliales comme par exemple VE-Cadherine, la E-Cadherine, et PECAM-1 (188)

Une équipe chinoise a étudié en 2006 l'évolution de la microvasculature au sein de la tumeur lors du développement d'un mélanome dans un modèle de souris (189). Leurs résultats montrent que la microvasculature tumorale évolue en fonction du temps et de la taille du cancer. La pseudo-vasculogénèse est la structure dominante aux stades précoces du développement rapide de la tumeur. Une fois que la tumeur a grossi, les cellules endothéliales prolifèrent et se mêlent aux cellules cancéreuses pour former transitoirement des vaisseaux mosaïques. Finalement, l'angiogénèse tumorale devient la composante principale d'apport sanguin à la tumeur dans les stades plus tardifs de la croissance tumorale. Il semble que les capillaires tumoraux qui nécessitent le recrutement des cellules endothéliales normales du microenvironnement ne soient pas mis en place suffisamment rapidement pour soutenir la croissance rapide de la tumeur lors des phases initiales.

La présence de capillaires lymphatiques fonctionnels dans les masses cancéreuses a été mise en question à cause de la forte pression interstitielle qui règne au sein de la plupart des tumeurs (190). En effet, au sein de la tumeur, la pression oncotique plasmatisque et la pression interstitielle sont proches de l'équilibre à cause de la grande perméabilité de la paroi des capillaires sanguins, ce qui pourrait empêcher les capillaires lymphatiques de pénétrer dans le stroma tumoral (191, 192). Effectivement, dans les mélanomes cutanés, pas ou peu de capillaires lymphatiques

sont observés au sein même de la tumeur (193, 194). Cependant, l'identification récente des facteurs de croissance lymphatiques que sont le VEGF-C et le VEGF-D ainsi que leur récepteur, VEGFR-3, et de marqueurs spécifiques à ce type cellulaire a fourni de nouveaux outils pour étudier la lymphangiogenèse tumorale (108). Ainsi, Skobe et ses collaborateurs ont démontré la présence de capillaires lymphatiques intratumoraux et la présence de capillaires lymphatiques dilatés à la périphérie de la tumeur lors d'une greffe sous-cutanée à une souris nue de cellules de mélanomes surexprimant le VEGF-C (195). De plus, le VEGF-C semble coordonner, dans le cas des mélanomes cutanés humains, la régulation de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse. Ces divergences d'observations entre les tumeurs *in situ* et les tumeurs injectées aux souris peuvent s'expliquer par le piégeage de capillaires lymphatiques préexistants lors de la phase de croissance rapide des xénogreffes.

Ces résultats indiquent cependant que les cellules cancéreuses de mélanome sont capables d'induire, dans des modèles d'étude, la lymphangiogenèse tumorale. À l'inverse, il est intéressant de noter que les capillaires lymphatiques sont aussi capables d'attirer activement ces cellules tumorales et de promouvoir leur dispersion métastatique lymphatique (196). En effet, les cellules lymphatiques de la peau expriment constitutivement la cytokine CCL21 dont le récepteur CCR7 est exprimé par les lignées de mélanome (197, 198).

En conclusion, les tumeurs de type mélanome sont un bon exemple pour illustrer la complexité de la vasculature tumorale. L'instabilité génétique et l'hétérogénéité biologique des cellules cancéreuses au sein de la tumeur sont la principale cause d'échec des thérapies anti-tumorales systémiques. Les nouvelles approches thérapeutiques doivent donc cibler la vasculature tumorale, composante indispensable à la survie, à la croissance et à la propagation des cellules cancéreuses.

1.3.3. Cibles thérapeutiques

La promotion thérapeutique de l'angiogenèse pour traiter des maladies ischémiques est parvenue au stade des essais cliniques (199, 200). Il existe aussi des recherches visant à induire la lymphangiogenèse dans le traitement de cas de lymphoedèmes héréditaires ou causés par une chirurgie (201). Cependant, dans ce paragraphe nous nous intéresserons plus particulièrement aux thérapies anti-angiogéniques appliquées dans le cadre du traitement des cancers. En effet, l'étude et la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires complexes qui régulent la croissance des vaisseaux au sein d'une tumeur permettent de développer des thérapies anti-vasculaires efficaces et appropriées à chaque tumeur.

Plusieurs revues complètes et bien documentées sur les différentes stratégies adoptées pour cibler d'un point de vue thérapeutique l'endothélium tumoral ont récemment été publiées (202, 203). La famille du VEGF et de ses récepteurs est un des acteurs principaux lors du processus d'angiogenèse, même s'ils n'agissent pas seuls (204). Le VEGF est une glycoprotéine aux propriétés mitogéniques sur les cellules endothéliales. Plus spécifiquement, l'activation de la voie des récepteurs des VEGFs promeut la croissance, la migration, la différenciation et la survie de ces cellules. Cette molécule et ses récepteurs ont donc été rapidement ciblés lors de la mise au point des premiers traitements anti-angiogéniques (205, 206). L'arsenal thérapeutique développé par les compagnies pharmaceutiques inclut aussi bien des anticorps humanisés monoclonaux contre le VEGF comme le bevacuzimab (Avastin, Genentech) ou contre le récepteur 2 au VEGF (VEGF-R2) (IMC-1121b, ImClone) que des petites molécules inhibitrices du VEGF-R2 (Vatalanib, Novartis-Schering). Des études cliniques ont démontré que les thérapies anti-VEGF sont efficaces dans la réduction de la taille des tumeurs, des métastases et de la formation de nouveaux capillaires et améliorent la survie des patients, notamment dans le cas de cancers du colon avec métastases (207).

Cependant, des effets inattendus sont survenus lors de tests précliniques de thérapies anti-VEGF. Dans leur étude de 2004, Willett et ses collaborateurs ont étudié l'effet du bevacuzimab sur la vasculature tumorale au sein d'un cancer rectal (208). Certes ils observent une régression encourageante de la perfusion tumorale, du

volume vasculaire, de la densité microvasculaire, de la pression interstitielle et du nombre de progéniteurs endothéliaux circulants viables, cependant, ils ont aussi noté une augmentation de la stabilisation par des péricytes des capillaires tumoraux résiduels.

L'équipe de Jain a observé dans un modèle animal de carcinome mammaire qu'un traitement anti-VEGF-R2 induisait dans un premier temps une régression des capillaires et une hypoxie, puis, dans un second temps, une reprise de la croissance capillaire, une augmentation de la consommation d'O₂ de la tumeur et de la PPO₂ en son sein (209). Ces observations semblent *a priori* aller à l'encontre de l'effet recherché pour ce type de traitement, cependant elles pourraient expliquer les effets bénéfiques notés lors de la combinaison d'un traitement anti-angiogénique avec une radiothérapie (210). En effet, l'efficacité des radiations ionisantes utilisées en radiothérapie dépend directement de la PPO₂ du tissu visé et elle sera moindre en condition hypoxique (211).

L'existence d'une microcirculation alternative à celle découlant de l'angiogenèse tumorale pose un défi majeur aux thérapies anti-angiogéniques classiques. Parvin propose en 2002 que les pseudo-capillaires et les vaisseaux mosaïques soient aussi ciblés dans les nouvelles thérapies anti-angiogéniques (212).

En 2004, Sood et son équipe ont démontré que les métalloprotéinases, en particulier la MMP-2, jouent un rôle important lors du processus de pseudo-vasculogénèse des cancers agressifs ovariens (213). En inhibant la MMP-2, ils ont été capables d'inhiber la pseudo-vasculogénèse *in vitro*.

Une approche particulièrement astucieuse pour cibler les pseudo-capillaires de cancer de la prostate a été développée par Liu et son équipe (214). Le domaine extracellulaire du facteur tissulaire, un acteur de la cascade de coagulation, a été couplé à une molécule reconnaissant un marqueur membranaire des cellules prostatiques cancéreuses tapissant les pseudo-capillaires. Cette construction thrombogène induit *in vivo* une nécrose locale et sélective dans les tumeurs de la prostate chez le rat lorsqu'elle est injectée par voie intraveineuse à l'animal.

La croissance de nouveaux capillaires lymphatiques favorise la dispersion métastatique des tumeurs c'est pourquoi la lymphangiogenèse tumorale est une nouvelle cible des thérapies anti-angiogéniques. L'intérêt pour ce domaine de recherche est très récent, c'est pourquoi peu de molécules sont disponibles sur le marché.

Un anticorps anti-VEGFR-3 empêchant la liaison du VEGF-C à son récepteur a été développé et testé *in vivo* par une équipe américaine en 2005 (215). Il inhibe complètement et spécifiquement la lymphangiogenèse tumorale induite par une tumeur mammaire humaine, sans avoir aucune incidence sur la survie ou la fonctionnalité des vaisseaux lymphatiques préexistants.

Les médicaments qui ciblent spécifiquement les vaisseaux lymphatiques péri-tumoraux pourraient être utiles pour limiter la dispersion métastatique *via* ce réseau. Cependant, la destruction de ces vaisseaux et l'absence de drainage qui en résulterait pourrait augmenter davantage la pression interstitielle au sein de la tumeur. Ce phénomène est connu non seulement pour interférer avec la distribution des molécules anticancéreuses mais pourrait aussi faciliter l'entrée de cellules cancéreuses dans les capillaires sanguins (131).

En conclusion, la compréhension de la dynamique du microenvironnement tumoral est un pré-requis essentiel pour la planification optimale des modalités de traitements thérapeutiques.

Le contenu de cette partie expose pourquoi et comment les tissus sont microvascularisés *in vivo*. Par la suite, nous expliquerons l'intérêt de microvasculariser un tissu *in vitro*.

2. Pourquoi microvasculariser un tissu *in vitro*?

2.1. Visées cliniques

La transplantation de cellules ou d'organes humains est devenue l'un des meilleurs traitements, voire le seul, pour une large variété de maladies, fatales ou non. Cependant, cette pratique soulève de nombreux problèmes techniques et éthiques. Il s'agit notamment de faire face à la pénurie mondiale de matériels humains, au phénomène croissant du « tourisme de transplantation », et de s'assurer de la qualité, de l'innocuité et de l'efficacité de la procédure et de la transparence dans ce domaine².

Le génie tissulaire peut, en partie, pallier certains de ces problèmes, notamment l'approvisionnement en organes. En ce qui concerne la peau, les greffes les plus courantes concernent le recouvrement, permanent ou temporaire, des lésions des patients grands brûlés et le traitement des ulcères cutanés.

2.1.1. Processus de revascularisation d'un greffon et nécrose

Plusieurs chercheurs ont supposé que le délai à la revascularisation des greffons était à l'origine de leur nécrose et des échecs de transplantation. En 1996, Young et ses collaborateurs ont précisément étudié les processus de revascularisation qui interviennent lors de la greffe de peau humaine sur un modèle animal de souris nue (216).

Dans le cas d'un recouvrement de la plaie avec de la peau autologue ou de la peau de cadavre cryopréservée, le greffon survit par imbibition lors des 48 premières heures, c'est-à-dire que les nutriments et l'oxygène vont diffuser depuis le lit de la plaie à travers le greffon. Entre le 2^{ème} et le 4^{ème} jour post-transplantation, les capillaires du lit de la plaie vont s'anastomoser avec ceux contenus dans le greffon. Ce phénomène, appelé inosculation, assure la circulation précoce d'un flux sanguin dans toute la greffe. La néovascularisation, c'est-à-dire la colonisation du greffon par les cellules endothéliales provenant du lit de la plaie ne commence qu'une semaine post-greffe (Figure 15 A). Si l'inosculation ne se déroule pas durant la période critique des premiers jours post-transplantation, par exemple à cause d'un

² www.who.int/transplantation/en/

mouvement du greffon et d'une séparation physique avec le lit de la plaie, la survie du greffon est compromise.

Dans le cas d'une greffe avec un substitut cutané contenant un derme et un épiderme, le greffon survit par imbibition pendant les 15 premiers jours post-transplantation, jusqu'à ce que la néovascularisation assure la circulation d'un flux sanguin (Figure 15 B) (217). Le phénomène d'imbibition n'est souvent pas suffisant pour assurer la survie d'un substitut bilamellaire, c'est-à-dire constitué d'un derme et d'un épiderme.

Étant donné que l'inosculation joue un rôle majeur dans la survie des greffons, il devient intéressant de développer un substitut cutané contenant déjà un réseau capillaire afin d'améliorer le pourcentage de survie des greffes (Figure 15 C). C'est ce qu'a fait notre laboratoire en 2004, en produisant un substitut cutané à partir d'un modèle d'éponge de collagène-chitosane-glycoaminoglycanes, contenant un réseau de capillaires dans sa partie dermique (218). L'analyse de son remodelage une fois greffé sur une souris nue a montré que le réseau capillaire murin du lit de la plaie s'anastomose en 4 jours avec le réseau capillaire humain contenu dans la greffe.

De plus, lorsque le phénomène d'inosculation garantit la perfusion précoce du greffon, le processus de néovascularisation devient moins primordial pour assurer la survie du greffon. Cette constatation prend tout son sens lorsqu'il s'agit de patients aux capacités d'angiogenèse réduites comme les personnes âgées ou diabétiques.

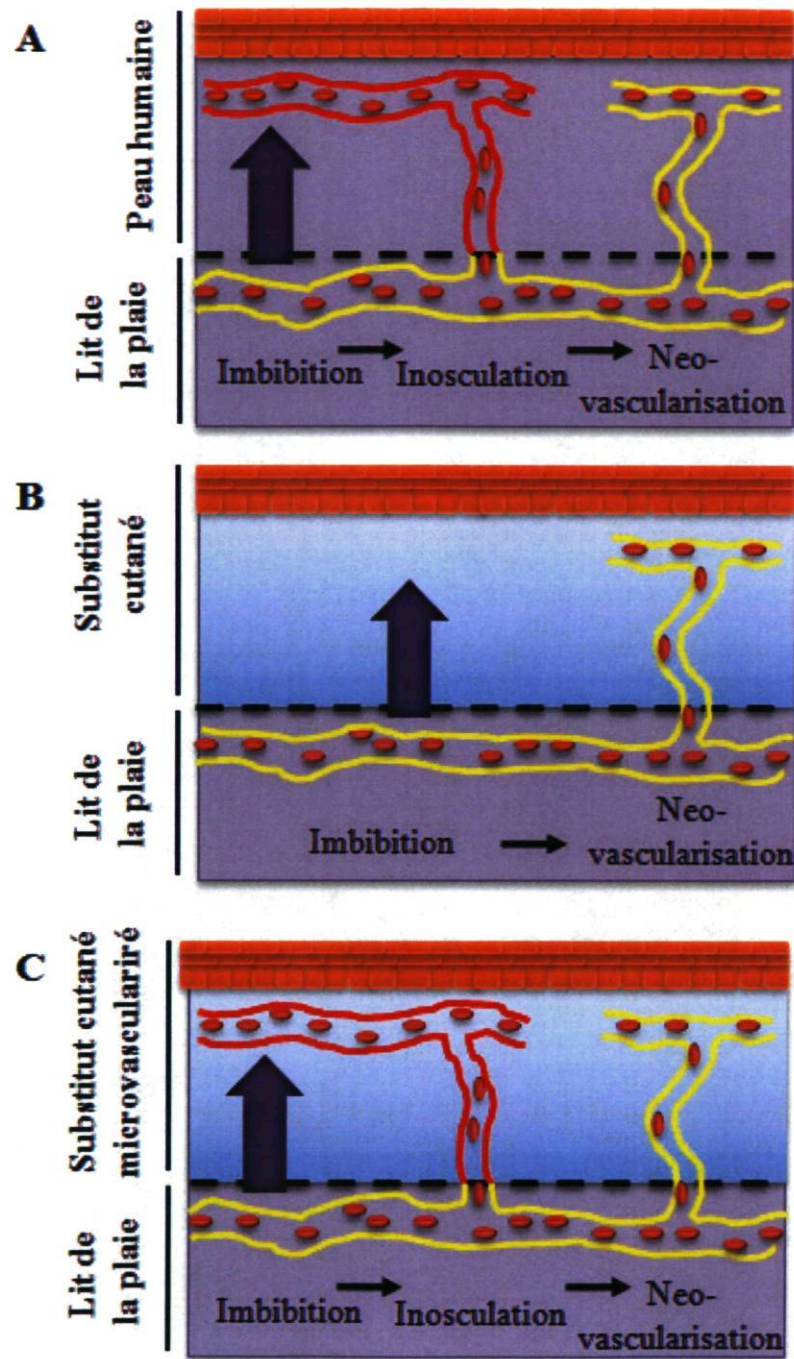


Figure 15 : Représentation schématique des différents processus de revascularisation selon le type de tissu greffé. A, le tissu greffé est de la peau autologue ou de la peau de cadavre cryopréservée. B, le greffon est un substitut cutané composé d'un derme et d'un épiderme. C, le greffon est un substitut cutané microvascularisé. Les cellules contenues dans le greffon peuvent survivre par imbibition, à savoir la diffusion des nutriments et de l'oxygène depuis le lit de la plaie (flèche violette), par inosculation, c'est-à-dire l'anastomose du réseau capillaire du lit de la plaie (jaunes) avec les capillaires contenus dans le greffon (rouges), ou enfin par néovascularisation, c'est-à-dire la colonisation du greffon par des capillaires émanant du lit de la plaie (jaunes). Adapté de (218).

2.1.2. Problèmes de contraction et d'élasticité du greffon

Le remodelage du compartiment dermique des plaies recouvertes avec des feuillets épidermiques est un processus très lent (219, 220). Une contraction de la plaie et la formation de cicatrices sont souvent observées lors d'une mauvaise régénération dermique ; c'est pourquoi certaines équipes ont reconstruit *in vitro* un substitut cutané composé à la fois d'un compartiment dermique et épidermique qui accélère et améliore le remodelage dermique et donc la qualité de la cicatrisation (220-223). Il est important de faciliter le processus de guérison et de prévenir la formation de cicatrices car celles-ci peuvent être préjudiciables au tissu tant d'un point de vue anatomique que d'un point de vue fonctionnel (224).

Cependant, l'utilisation d'un substitut cutané composé d'un compartiment dermique et épidermique, donc plus épais, augmente son délai de revascularisation et son risque de nécrose.

En 1995, Boyce et son équipe ont démontré que l'application topique de nutriments sur des substituts cutanés non vascularisés greffés sur des souris nues limite leur contraction et améliore leur prise (225). Leur substitut cutané humain est constitué de fibroblastes dermiques ayant colonisé une éponge de collagène-glycoaminoglycanes recouverte de kératinocytes. Ces greffes sont irriguées pendant 14 jours après l'opération, et le pourcentage de contraction est évalué 6 semaines après l'opération. Les substituts cutanés greffés et irrigués ont la même surface que les contrôles positifs de greffe de peau autologue de souris, alors qu'ils sont significativement moins contractés que les substituts non irrigués. Selon eux, l'irrigation topique avec du milieu a deux effets sur la greffe, l'un direct et l'autre indirect. Tout d'abord, les nutriments agissent directement sur la survie et la viabilité des kératinocytes. Ensuite, de façon indirecte, ces kératinocytes viables relâchent des composés pro-angiogéniques qui vont accélérer la néovascularisation de la greffe. La prise de la greffe est donc améliorée et la contraction est limitée.

Cependant, l'irrigation topique d'une greffe cutanée comporte un risque non négligeable de promouvoir des infections bactériennes sur le site de la plaie et présente une complexité non adaptée au domaine clinique. Ce concept d'irrigation précoce des kératinocytes afin d'améliorer la prise de la greffe et de limiter sa

contraction serait applicable s'il utilisait une source intrinsèque de nutriments, à savoir la présence d'un réseau microvasculaire dans la greffe, plutôt qu'extrinsèque.

2.1.3. Greffe de tissus plus épais

Chaque année, plus d'un million d'opérations de chirurgie plastique et reconstructrice sont effectuées aux États-Unis (226). Certaines d'entre elles, comme la résection chirurgicale de tumeurs telles les cancers de la peau par exemple, les mastectomies partielles ou totales et la réparation de lacérations, conduisent à un déficit en tissus mous (227).

Trois principaux types de matériaux de comblement sont utilisés en chirurgie plastique, reconstructrice et cosmétique pour combler ces déficits tissulaires (228-230). Les matériaux synthétiques incluent l'acide poly-L-lactique, le polyméthylméthacrylate (ou Plexiglas) et le silicone. Les sources et compositions des matériaux allogéniques sont très diversifiées. Ainsi, sont utilisés des collagènes bovins et de l'acide hyaluronique issu de plumes de coq, de derme de cochon d'Inde ou de cultures bactériennes. Une équipe américaine propose d'utiliser des matrices de soie contenant des fibroblastes dermiques pour combler les déficits en tissus mous (231). Les matériaux allogènes et autologues sont par exemple du collagène humain extrait de peau de cadavres ou provenant du patient lui-même. Une équipe turque propose aux patients qui nécessitent à la fois un remodelage de leur cicatrice et une augmentation de volume de tissus mous de coupler les opérations et d'utiliser le tissu cicatriciel pour combler ce déficit (232).

Dans le cas de chirurgie reconstructrice, les chirurgiens tendent à privilégier des sites donneurs autologues pour fournir des tissus mous de comblement puisque cela évite les problèmes d'allergies, de réactions inflammatoires ou de rejet associés à l'utilisation de matériaux xenogéniques (233). Cependant, une nouvelle lésion est créée au site donneur, ce qui augmente le temps de récupération après la chirurgie, le risque d'infection et possiblement de perte de fonction.

Il semble donc évident que d'un point de vue clinique, la demande en tissus mous autologues, aux dimensions et épaisseurs contrôlées, reconstruits par génie tissulaire est très importante.

Les tissus reconstruits actuellement utilisés dans le domaine clinique sont limités aux tissus avasculaires et fins de quelques centaines de micromètres d'épaisseur comme l'épiderme, le cartilage et la cornée (234-236). Ils reçoivent leurs nutriments par simple diffusion à partir des capillaires des tissus conjonctifs environnants, c'est le phénomène d'imbibition. Dans le cas du cartilage il s'agit des capillaires du périchondre alors que pour l'épiderme c'est le rôle du réseau microvasculaire dermique sous-jacent. La cornée reçoit ses nutriments par diffusion de l'humeur aqueuse.

Les tissus plus complexes, aussi bien structurellement que fonctionnellement, ne peuvent pas survivre par simple diffusion (237). En effet, les cellules au centre d'un tissu épais (de l'ordre de quelques millimètres) risquent de nécroser à cause du manque d'approvisionnement en oxygène et nutriments le temps que la néovascularisation se fasse par ses marges. Afin d'éviter ce problème, une vascularisation complète du tissu doit se réaliser rapidement. Il faut donc intégrer une composante microvasculaire à ces tissus afin de promouvoir leur survie, une fois greffés. La diffusion de l'oxygène n'étant pas limitante *in vitro*, cela autorise hypothétiquement la reconstruction de tissus microvascularisés plus épais et plus complexes (238).

Ainsi, la microvascularisation des tissus permettrait d'augmenter l'épaisseur et la diversité de l'offre de substituts reconstruits *in vitro* et donc d'améliorer les possibilités des traitements cliniques.

2.2. Visées fondamentales

2.2.1. Modèle d'étude de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse

Malgré les nombreux progrès dans la compréhension du processus d'angiogenèse, plusieurs questions restent sans réponse. Est-ce que les facteurs pro-angiogéniques doivent être présents continuellement ou ponctuellement ? Quel processus moléculaire fait passer une cellule cancéreuse à un phénotype pro-angiogénique ? Quels sont les rôles relatifs des facteurs cellulaires par rapport aux facteurs matriciels dans l'angiogenèse ? (239). Pour répondre à toutes ces questions,

de nombreux modèles d'études de l'angiogenèse ont été développés dans les laboratoires, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* (239-241).

Les modèles *in vivo* d'étude de l'angiogenèse utilisent classiquement trois approches différentes. Tout d'abord, l'analyse de la microvascularisation peut se faire directement sur les animaux, principalement les rongeurs et le poulet. La greffe de chambres transparentes dans l'oreille, le dos ou sur le crâne de rongeurs comme les souris, rats et lapins permet de visualiser « en direct » l'effet de molécules contenues dans un gel inséré entre les fenêtres de la chambre sur la formation de capillaires sanguins. Lorsque l'espèce du poulet est utilisée comme modèle, une éponge ou un gel de collagène contenant la molécule d'intérêt sont déposés sur la membrane chorioallantoïque de l'œuf et va induire, ou non, le processus d'angiogenèse. L'étude peut être réalisée *in situ* dans un tissu avasculaire comme la cornée, chez les souris, rats et lapins. Ensuite, l'étude de l'angiogenèse peut aussi passer par l'observation et la quantification du processus de vascularisation d'une matrice ou d'un polymère biocompatible implanté en sous-cutané à un modèle animal. Enfin, des tissus humains ou animaux vascularisés, cancéreux ou non, peuvent être excisés et maintenus *in vitro* en culture sous forme d'explants.

Plusieurs modèles ont également été développés *in vitro* mais ne reproduisent pour la plupart que quelques étapes de l'angiogenèse, comme par exemple la prolifération ou la migration des cellules endothéliales. Certains s'intéressent cependant à la mise en place de structures tubulaires par ces cellules. Il existe ainsi le modèle de culture organotypique d'aorte de rat dans un gel de fibrine ou dans du milieu sans sérum, et les modèles de culture de cellules endothéliales murines ou bovines sur plastique, gélatine ou MatrigelTM, une matrice extracellulaire produite par un sarcome murin. Le principal inconvénient de ces modèles est qu'ils sont constitués de cellules endothéliales animales qui, contrairement aux cellules endothéliales humaines, semblent avoir un besoin en facteurs de croissance moins important et forment spontanément des réseaux tubulaires lorsqu'elles sont cultivées dans un environnement bi ou tridimensionnel. Les seuls modèles utilisant des cellules endothéliales humaines microvasculaires ou extraites de cordons ombilicaux nécessitent l'addition, en plus du sérum de veau fœtal, de facteurs de croissance

exogènes pour survivre et se multiplier en culture. De plus, pour induire la formation de structures en forme de corde, sans véritable lumière, ces cellules doivent être cultivées avec un agent promoteur de tumeur comme le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) ou dans du Matrigel™. Enfin, les cellules endothéliales humaines s'organisent en ces structures en l'espace de quelques heures, avant de dégénérer au-delà de 72 h de culture, ce qui ne permet pas de faire des études à long terme sur les cellules. L'extrapolation des résultats obtenus avec ces modèles dans des conditions très particulières et loin de la physiologie semble donc risquée.

Il est donc indispensable de mettre au point un modèle humain d'étude de l'angiogenèse *in vitro* dans une matrice extracellulaire humaine, tridimensionnelle et physiologique, assurant la mise en place d'interactions cellules-matrice et cellules-cellules pertinentes, notamment avec des fibroblastes et des cellules murales.

Ce type de modèle devra permettre une analyse quantitative des capillaires en mesurant par exemple leur longueur, leur surface, leur volume, leur nombre ou leur degré de ramification. Une mesure qualitative de la fonctionnalité de ces capillaires devra aussi être réalisable, comme par exemple en vérifiant la synthèse d'une membrane basale complète, la présence d'une lumière, la perméabilité vasculaire. Un tel modèle devra permettre d'acquérir ces données de façon non invasive, fiable, reproductible et sur le long terme.

Il n'existe actuellement, à notre connaissance, aucun modèle de réseau microvasculaire lymphatique *in vitro* (242). Pourtant, un tel modèle s'avèrerait être un puissant outil pour améliorer notre connaissance du processus de lymphangiogenèse et des événements cellulaires et moléculaires intervenant lors de la colonisation lymphatique par les cellules cancéreuses.

2.2.2. Évaluation de médicaments

Nous avons vu que l'angiogenèse chez l'adulte intervenait principalement au cours de processus pathologiques comme le développement de la rétinopathie, de la leucémie, de l'arthrite rhumatoïde, du psoriasis, d'ulcères et lors du développement tumoral (163). Étant donné que l'angiogenèse est une composante importante lors de

ces processus pathologiques, il est cliniquement pertinent de comprendre cette modulation microvasculaire, d'identifier les facteurs qui la stimulent ou l'inhibent et enfin d'élucider les mécanismes d'action de ces médicaments potentiels.

Certaines équipes, dont la nôtre, ont mis au point un modèle d'angiogenèse dans un tissu conjonctif microvascularisé supporté par une éponge de collagène/chitosane/glycoaminoglycane qui sera détaillé dans la partie suivante. Ce modèle pertinent peut être appliqué au criblage de nouvelles molécules thérapeutiques ou à l'analyse, quantitative et qualitative, de l'influence de médicaments pro- ou anti-angiogéniques *in vitro* afin d'en comprendre les mécanismes (243, 244).

Il nous apparaît que la prochaine étape de raffinement des modèles d'angiogenèse serait la création d'un modèle animal hybride humanisé où le réseau microvasculaire fonctionnel du modèle reconstruit *in vitro* se reconnecterait à la circulation de l'animal. Cette situation permettrait d'étudier *in vivo* l'effet sur l'angiogenèse de médicaments injectés dans la circulation systémique dans un contexte dynamique, complexe et proche de la physiologie humaine.

La mise au point d'un modèle *in vitro* de lymphangiogenèse permettrait de découvrir ou de tester l'efficacité de nouvelles molécules pour traiter des maladies liées au système lymphatique, comme l'hypoplasie lymphatique menant au développement d'œdèmes.

2.2.3. Modèle d'étude du processus de cicatrisation

La majorité du temps la guérison d'une plaie se réalise rapidement, discrètement et totalement. Cependant, il existe certains cas où les cicatrices résultantes sont excessives ou alors la plaie ne parvient pas à se refermer totalement et se transforme en plaie chronique, comme dans les ulcères veineux ou diabétiques par exemple. Ce type de plaie conduit à une perte de fonctionnalité du tissu, une douleur persistante et à une diminution de la qualité de vie en général (245). Les

thérapies biotechnologiques mises en place actuellement pour traiter ces plaies chroniques ne sont pas de simples pansements et regroupent le recouvrement avec des tissus biologiques comme des substituts cutanés ou des matrices acellulaires et des approches basées sur l'application de facteurs de croissance pro-angiogéniques. Cependant, les voies moléculaires dysfonctionnelles impliquées dans la persistance de cette pathologie ne sont pas clairement identifiées. Il serait donc intéressant de disposer d'un modèle cutané de cicatrisation pour étudier, comprendre et améliorer le soin des plaies chroniques. Les chercheurs utilisent plusieurs modèles animaux de cicatrisation, mais il faut se rappeler qu'aucun d'eux n'est une réplique exacte des situations cliniques chez l'homme (246). Par exemple, bien que la souris soit l'animal le plus employé dans la communauté scientifique pour modéliser la cicatrisation, il faut savoir que, contrairement à l'homme, elle utilise principalement le processus de contraction pour refermer ses plaies. Les cochons semblent cicatriser suivant le même processus que l'homme, mais les coûts et la logistique associés à la mise en place des expériences sur ces animaux sont limitants.

Pour pallier ces limites, plusieurs équipes à travers le monde ont cherché à mettre au point des substituts cutanés tridimensionnels pour étudier *in vitro* le processus de cicatrisation. Les modèles classiques reposent sur l'ensemencement de dermes acellulaires humains avec des kératinocytes et des fibroblastes dermiques (247). Geer et ses collaborateurs ont développé un modèle hybride de cicatrisation *in vivo* qui consiste à greffer ce type de substitut cutané reconstruit par génie tissulaire sur une souris nue (248). Le substitut greffé est lésé et la ré-épithélialisation, la différenciation du nouvel épiderme et la néovascularisation du derme sont ensuite évalués. Récemment, Herman et Leung ont choisi d'intégrer une composante microvasculaire à leur matrice 3D de collagène et de MatrigelTM afin d'étudier plus finement le rôle de l'angiogenèse dans la cicatrisation (249). Il semble que le meilleur modèle de cicatrisation serait la combinaison de ces trois approches.

Un tel modèle cutané microvascularisé permettrait d'améliorer la compréhension de la régulation de la réparation tissulaire en se concentrant particulièrement sur les mécanismes cellulaires et moléculaires qui contrôlent la

morphogénèse microvasculaire lors de la cicatrisation. Il serait également utile dans l'évaluation préclinique de nouvelles thérapies.

Les avantages qu'apporte l'ajout d'une composante microvasculaire à un tissu reconstruit *in vitro* ayant été détaillés, nous allons maintenant décrire comment l'introduire d'un point de vue plus technique.

3. Comment microvasculariser un tissu?

L'ingénierie tissulaire vise à développer des substituts biologiques qui vont restaurer, maintenir ou améliorer la fonction des tissus. La régénération tissulaire peut s'effectuer aussi bien *in situ*, c'est-à-dire *in vivo*, qu'*in vitro*, à partir de cellules et de biomatériaux.

Les principales approches existantes pour microvasculariser un substitut reconstruit par génie tissulaire seront discutées dans cette partie. Pour plus de détails, de nombreuses revues complètes sont accessibles (250-253).

La découverte de marqueurs spécifiques aux cellules endothéliales lymphatiques étant très récente, peu de laboratoires ont eu l'opportunité jusqu'à aujourd'hui d'essayer de fabriquer *in vitro* un réseau de capillaires lymphatiques (242, 254). La littérature concernant ce sujet novateur est exhaustivement décrite ici.

3.1. Ingénierie tissulaire *in vivo*

3.1.1. Incubation *in vivo*

La reconstruction *in vivo* par génie tissulaire de tissus autologues utilise différentes parties du corps du patient ou d'un animal comme un bioréacteur pour fabriquer ou différencier de greffes autologues « prêtes à l'emploi ».

Un des enjeux majeurs de la recherche sur la transplantation osseuse est d'éviter de créer un second défaut osseux au lieu du prélèvement d'un greffon. L'incubation *in vivo* est donc adaptée à ces contraintes. En effet, après avoir prouvé le concept chez des porcs miniatures (255), un groupe allemand de recherche en

reconstruction maxillo-faciale a utilisé l'incubation *in vivo* chez l'homme pour différencier et vasculariser un substitut autologue de la mandibule inférieure, sans prélever d'os à un site donneur (256). Brièvement, une structure en titane a tout d'abord été remplie avec un facteur de croissance (la *human bone morphogenic protein-7, BMP-7*) et de la moelle osseuse du patient, riche en cellules souches mésenchymateuses, puis greffée dans son muscle grand dorsal pour 7 semaines et enfin transplantée à la place du défaut osseux à combler à la mâchoire (Figure 16). Leur étude indique que l'incubation *in vivo* a assuré un remodelage osseux, une minéralisation et la vascularisation du greffon.



Figure 16 : Vue dorsale d'un patient 3 semaines après l'implantation *in vivo*, pour maturation, du substitut mandibulaire. Les flèches indiquent la zone d'implantation dans le muscle grand dorsal (256).

Une équipe australienne a développé, par incubation *in vivo* dans la cavité péritonéale de rats et de lapins, des substituts vasculaires autologues destinés à être utilisés lors des pontages artériels (257). Des tubes en silicones de longueur et de diamètres adaptés aux besoins de la chirurgie artérielle sont implantés dans la cavité péritonéale pour 2 semaines, période au cours de laquelle ils sont recouverts par plusieurs couches de myofibroblastes, de matrice de collagène et par une couche de mésothélium. Une fois retournés, ils miment la structure d'un vaisseau avec une « intima » de cellules mésothéliales non thrombotiques remplaçant les cellules endothéliales, une « media » contractile de myofibroblastes et un « adventice » riche en collagène³. Cette même équipe a implanté dans la cavité péritonéale de rats et lapins des supports de composition et de forme variées pour produire des substituts

³ Les guillemets viennent des auteurs eux-mêmes.

autologues de vessie, de canaux déférents et d'utérus (258). Ces supports, après 2 à 3 semaines d'incubation *in vivo*, étaient encapsulés dans un tissu riche en myofibroblastes, ultérieurement greffé sur les mêmes animaux.

Hayashida et ses collègues ont développé, en utilisant l'incubation *in vivo*, un prototype de substitut valvulaire cardiaque vascularisé et autologue (259). Pour cela ils ont implanté en sous-cutané à des lapins un moule en polyuréthane ayant une forme de valves. Après 4 semaines d'incubation *in vivo*, cette structure était totalement recouverte de tissu conjonctif richement vascularisé. Cependant, dans un commentaire de cet article, Sievers s'interroge, entre autre, sur le processus mis en jeu lors de la colonisation de ce greffon (260). S'agit-il d'un vrai processus développemental ou plutôt d'une réaction de l'organisme à un corps étranger visant à encapsuler ce matériau artificiel?

Cette remarque démontre que la technique d'incubation *in vivo* présente certains inconvénients non négligeables. Le patient pourrait subir, au site de l'incubation, des dommages anatomiques suite à l'extraction de l'implant profondément intégré et vasculairement lié aux tissus environnants. De même, si le greffon devient préjudiciable ou nuisible pour l'organe hôte, il ne peut pas, de par sa nature diffuse, être facilement excisé. Enfin, la plupart des études menées utilisent comme support à la croissance tissulaire des matériaux physiques non biodégradables comme le titane qui risquent d'être considérés par l'organisme comme des corps étrangers.

Il existe une autre approche pour favoriser la microvascularisation *in vivo* d'un substitut, qui ne nécessite pas l'extraction du tissu par la suite. Des cellules endothéliales peuvent être directement implantées *in vivo* dans le substitut tissulaire afin d'accélérer sa vascularisation, sans aucune maturation *in vitro*. Cependant, le temps que les capillaires mettront à se former *in situ* peut compromettre la survie du substitut implanté.

L'équipe de Polverini a démontré que des cellules endothéliales microvasculaires humainesensemencées sur une matrice immédiatement greffée à

une souris SCID s'organisent en 5 jours en un réseau capillaire qui deviendra fonctionnel, c'est-à-dire connecté à la vasculature de l'hôte et perfusé, 7 à 10 jours post-greffe. Ce réseau capillaire humain recrutera des cellules musculaires lisses murines dès le 21^{ème} jour (261). Ce modèle d'angiogenèse humaine dans une souris SCID permettra par exemple d'étudier le développement des capillaires ou l'angiogenèse tumorale.

En 2004 Koike et ses collaborateurs ont prouvé que la co-implantation chez une souris d'HUVECs avec des précurseurs mésenchymateux dans un gel de collagène/fibronectine, sans aucune maturation *in vitro*, assure la formation d'un réseau de capillaires (262). Les cellules endothéliales humaines vont s'organiser *in situ* en un réseau capillaire qui devient fonctionnel après le 10^{ème} jour de greffe. Ce réseau, stabilisé par des cellules murales, est maintenu *in vivo* pendant plus d'un an.

3.1.2. Boucle artério-veineuse

À l'origine, cette méthode a été mise au point par Erol et Spira dans les années 70 afin de microvasculariser des tissus comme de la peau en la plaçant au cœur d'une boucle artério-veineuse (263, 264). Pour la protéger, cette construction chirurgicale est placée au sein d'une chambre en polycarbonate solide (Figure 17), elle-même insérée à l'intérieur du corps.

Un tissu situé au centre de la boucle va être colonisé par les cellules endothéliales de la boucle lors du processus d'angiogenèse. Ce mode de vascularisation est nommé vascularisation extrinsèque étant donné que le réseau microvasculaire de la greffe provient alors de l'environnement.

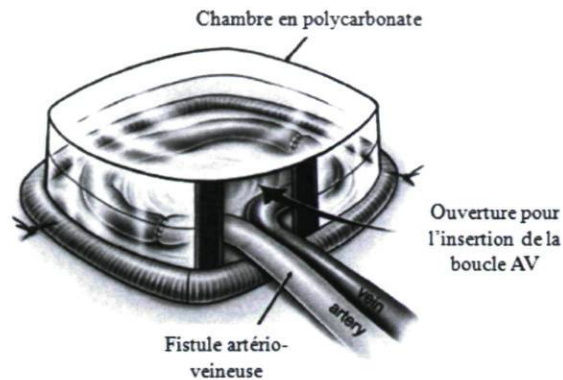


Figure 17 : Schéma du modèle de boucle artério-veineuse (AV). L'artère fémorale est anastomosée avec le greffon veineux, lui-même suturé à la veine fémorale, créant une boucle vasculaire, placée dans une chambre en polycarbonate. L'angiogenèse se déroulera au cœur de cette boucle. Tiré de (265).

Cette technique a déjà été appliquée à la microvascularisation de derme artificiel (266), d'un tissu osseux (267), de muscle squelettique (268) et de matrice exogène de fibrine (269). Cependant, il faut noter qu'une boucle artério-veineuse laissée vide synthétisera, en quelques semaines, sa propre matrice extracellulaire et remplira la chambre d'un tissu conjonctif mature vascularisé (265, 270).

Même si le modèle de boucle artério-veineuse demande des compétences chirurgicales élevées pour être mis en œuvre et peut être considéré comme invasif, ses avantages sont multiples. Tout d'abord, la chambre en plastique rigide offre un large espace qui ne s'effondrera pas, dans lequel de nouveaux tissus vascularisés peuvent croître. Sa taille peut être adaptée aux besoins en tissus. Enfin, elle facilite la manipulation et la récolte du tissu nouvellement microvascularisé et minimise la déformation du site donneur.

3.2. Ingénierie tissulaire *ex vivo*

Les deux composantes indispensables d'un substitut tissulaire sont les cellules et la matrice sur/dans laquelle elles vont proliférer et s'organiser.

3.2.1. Incorporation de facteurs de croissance dans la matrice

Des supports à la croissance cellulaire, appelés matrices ou *scaffolds* en anglais, sont couramment utilisés en génie tissulaire. Le plus souvent il s'agit de

polymères, synthétiques ou biologiques, préférentiellement biodégradables. Une approche empruntée par plusieurs équipes pour favoriser l'angiogenèse dans leurs substituts produits par génie tissulaire est d'incorporer dans la matrice des facteurs de croissance ou des facteurs pro-angiogéniques et de contrôler leur relargage (155).

L'équipe de Mooney travaille avec des matrices poreuses d'acide poly(lactico-glycolique) (PLGA). Ce polymère, biodégradable et biocompatible, est couramment utilisé en génie tissulaire. Du VEGF peut être incorporé à ce type de matrice. Il sera alors libéré de manière homogène et continue et favorisera le processus d'angiogenèse au site de la greffe sur un modèle animal (271). En effet, la transplantation à une souris SCID d'une matrice de PLGA riche en VEGF etensemencée de cellules endothéliales microvasculaires humaines augmente de 160% la densité de capillaires humains au sein du greffon comparativement au contrôle sans VEGF. De même, l'implantation de matrice de PLGA riche en VEGF sans aucune cellule, augmente de 260% la densité de capillaires murins dans le greffon. Dans une publication dans Nature en 2000, cette même équipe démontre que des hydrogels d'alginate contenant du VEGF sont mieux vascularisés, une fois greffés chez la souris, que leur contrôle sans VEGF (272). Cette publication apporte aussi l'information que la stimulation mécanique module les taux de relargage des facteurs de croissance liés dans l'hydrogel en question. D'un point de vue physiologique, cela signifie que l'application d'un stress mécanique sur un tissu peut augmenter le relargage de facteurs de croissance piégés dans la matrice extracellulaire. Il s'agirait d'un moyen de communication entre tissus stressés et tissus environnants qui n'avait jamais été envisagé jusque là.

En 2006, un groupe de recherche a étudié l'influence de la composition d'une matrice liant du VEGF sur l'organisation des cellules endothéliales microvasculaires sanguines et lymphatiques humaines (273). Les résultats montrent que les cellules endothéliales lymphatiques s'organisent au mieux dans une matrice de fibrine alors que l'endothélium vasculaire préfère une matrice contenant du collagène. Les structures observées sont différentes : les cellules endothéliales lymphatiques tendent

à former un fin réseau se chevauchant avec une mince lumière alors que les cellules endothéliales sanguines forment un épais réseau branché à large lumière.

Tabata et ses collègues ont imprégné une éponge poreuse de *poly(vinyl alcohol)* (PVA) avec des microsphères de gélatine contenant du *basic fibroblast growth factor* (bFGF). Trois jours après l'implantation sous-cutanée de ces éponges à des souris, ils observent une augmentation de la vascularisation dans et autour de l'éponge, ainsi qu'une amélioration de la croissance tissulaire et du dépôt de tissu fibreux, comparativement aux éponges contrôles ne contenant pas de bFGF (274).

Des matrices poreuses d'alginate, imprégnées de microsphères riches en bFGF, ont aussi démontré une amélioration de la revascularisation une fois greffées dans la cavité intra-péritonéale de rats. En effet, Perets et son équipe ont mesuré une densité capillaire 4 fois plus importante dans les matrices riches en bFGF que dans les contrôles négatifs (275).

Il est important de préciser que l'utilisation de matrices, quelle que soit leur nature, comme support à la croissance cellulaire a des conséquences sur le comportement du substitut une fois greffé *in vivo*. Par exemple, sur les polymères à base d'acide hyaluronique, les chondrocytes ne conservent pas totalement leur état de différenciation (276). Les matrices de PLGA ensemencées de chondrocytes autologues porcins conduisent, *in vivo*, à une accumulation non physiologique de matrice extracellulaire (277). D'autres polymères synthétiques utilisés en génie tissulaire comme le polytetrafluoroéthylène (PTFE) (aussi connu sous le nom de Gore-Tex©) peuvent augmenter, *in vivo*, le développement d'infections et la formation excessive de tissu cicatriciel (278, 279). Dans le cas des matrices biologiques d'origine allogénique ou xénogénique, les risques de réaction du système immunitaire inné et acquis de l'hôte sont souvent négligés (280). Cependant, aujourd'hui les matrices d'origine allogénique sont privilégiées car elles limitent le risque de transmission de virus entre la barrière des espèces et diminuent l'incidence des rejets immunologiques (281).

3.2.2. Modification génétique des cellules

Le génie génétique est une voie utilisée par certaines équipes pour améliorer ou assurer la revascularisation de leur substitut. Deux principales approches sont privilégiées : l'utilisation de cellules génétiquement modifiées surexprimant des facteurs pro-angiogéniques pour stimuler la croissance des cellules endothéliales ou alors l'utilisation de cellules endothéliales génétiquement modifiées pour surexprimer des gènes de survie.

Eming et ses collaborateurs ont noté que la surexpression de *platelet-derived growth factor A chain* (PDGF-A) par des kératinocytes humains ensemencés sur un derme acellulaire provenant de peau de cadavre cryopréservée puis greffés à une souris athymique améliore la prise de la greffe, réduit sa contraction et augmente sa vascularisation (282). L'équipe de Boyce a vérifié la persistance de l'expression du PDGF-A dans des substituts cutanés contenant des kératinocytes ou des fibroblastes humains génétiquement modifiés par une transduction rétrovirale (283). Après 2 semaines de culture *in vitro* puis 2 semaines de greffe sur une souris, les substituts cutanés expriment toujours le PDGF-A.

En 2000, Supp et Boyce ont démontré que la transplantation, à une souris athymique, d'un substitut cutané composé d'une éponge de collagène/glycoaminoglycane ensemencée avec des fibroblastes dermiques humains et des kératinocytes modifiés génétiquement pour surexprimer le VEGF accélère sa vitesse de vascularisation et augmente le nombre de capillaires dermiques (284). En 2002 ils ont démontré avec ce même substitut que la prise de la greffe est meilleure et que sa contraction est significativement réduite comparativement au contrôle (285). Dans une étude subséquente en 2004, cette équipe a ajouté à ce même substitut cutané des cellules endothéliales microvasculaires humaines (286). La surexpression du VEGF par les kératinocytes n'a, *in vitro*, aucun effet bénéfique sur la prolifération ou l'organisation des cellules endothéliales. De même, *in vivo* après une greffe chez la souris, les cellules endothéliales humaines contenues dans le substitut ne prolifèrent pas plus, contrairement aux cellules endothéliales murines, sur lesquelles la surexpression du VEGF a un effet positif notable. Selon eux, pour que les cellules

endothéliales humaines contenues dans le substitut avant la greffe participent activement à sa microvascularisation post-greffe il faudrait améliorer leur persistance et leur organisation *in vitro*. L'absence de réponse des cellules endothéliales humaines à la seule surexpression du VEGF *in vitro* suggère que d'autres facteurs, comme des facteurs de croissance ou des composants de la matrice extracellulaire, sont requis pour augmenter la persistance, la prolifération et l'organisation des cellules endothéliales dans le substitut cutané.

Les cellules endothéliales peuvent être modifiées génétiquement pour augmenter leur survie à la fois *in vitro* et *in vivo*. Le groupe de Pober a montré que des HUVECs cultivées dans un gel 3D de collagène/fibronectine s'organisent, en 24h, en structure ressemblant à des cordes, puis meurent par apoptose. Ces mêmes cellules, transduites avec le gène de Bcl-2, peuvent survivre *in vitro* jusqu'à 7 jours. Les cellules endothéliales surexprimant Bcl-2 contenues dans ce gel, une fois greffées en sous-cutané à une souris, s'organisent en capillaires dans lesquels circulent des globules rouges murins et recrutent des cellules mésenchymateuses qui remodelent ces capillaires (287). Dans une étude ultérieure, ils ont utilisé un modèle de substitut cutané à base de derme acellularisé provenant de peau de cadavre sur lequel ils ontensemencé des cellules endothéliales surexprimant Bcl-2. Une fois le substitut greffé sur une souris athymique, la densité capillaire observée dans le derme est deux fois plus élevée dans le substitut contenant des cellules endothéliales génétiquement modifiées comparativement au contrôle (288).

Bien que les résultats de ces différentes études puissent sembler prometteurs, il ne faut néanmoins pas négliger le fait que l'incorporation à des tissus destinés à un usage clinique de cellules génétiquement modifiées peut comporter des risques potentiels. Par exemple, ces cellules, transduites avec des rétrovirus, risquent de produire elles-mêmes des rétrovirus infectieux. De même, étant donné que leur matériel génétique a été modifié, les cellules pourraient subir une transformation cancéreuse, risque d'autant plus élevé lorsque le gène intégré participe à la fine régulation du processus d'apoptose.

3.2.3. Incorporation de cellules endothéliales organisées

La microvascularisation d'un substitut reconstruit par génie tissulaire avant son implantation se nomme la prévascularisation. L'intérêt de ce concept repose sur l'hypothèse qu'un réseau capillaire déjà formé accélèrera la mise en place d'une vasculature fonctionnelle dès l'implantation et améliorera donc la survie du substitut *in vivo*. L'application de ce concept fait aussi bien intervenir les sciences biologiques que physiques.

La technique d'impression biologique, ou *bioprinting* en anglais, consiste à imprimer des organes en injectant différents types cellulaires aux endroits désirés dans un hydrogel (289). La superposition des feuilles ainsi bio-imprimées forme un organe en 3D (Figure 18).

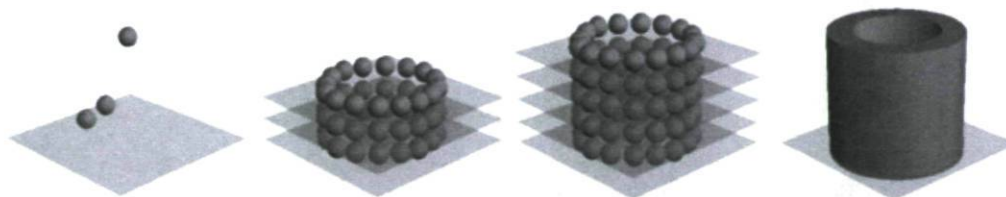


Figure 18 : Représentation schématique de la technologie d'impression biologique (*Bioprinting*). Les agrégats cellulaires sont disposés, couche après couche, dans un hydrogel. La fusion de ces agrégats formera une structure tubulaire en 3D. Tiré de (290).

L'objectif de cette branche du génie tissulaire est de fabriquer des tissus vivants fonctionnels et des organes disponibles pour la greffe dans un délai raisonnable. Cette technique offre la possibilité d'organiser les cellules dans un environnement 3D à une densité locale, une fonctionnalité et une forme anatomique prédéterminées, mimant leur distribution native dans les organes. Un arbre vasculaire complexe pourrait alors être intégré à un organe complet lors de son impression. De tels organes seraient alors immédiatement perfusables, dès leur construction. Il existe cependant des limites biologiques à cette approche. En effet, les cellules doivent survivre aux forces de cisaillement qui leur sont appliquées lors de l'éjection du système d'impression et lors de l'impact de la goutte sur le substrat. De plus, les constructions assemblées doivent être capables de rapidement évoluer et mûrir en un tissu cohésif et mécaniquement stable, sous peine de désagrégation.

En 2009, une équipe américaine a fabriqué *in vitro* un réseau microvasculaire en utilisant la technologie d'impression à jet d'encre thermique (291). Ils ont montré que l'impression simultanée de cellules endothéliales microvasculaires humaines (HMVEC) et d'une matrice de fibrine en forme de tube favorise la prolifération des HMVEC et la formation d'un réseau microvasculaire.

Toujours en 2009, une équipe américaine a privilégié une approche novatrice pour microvasculariser leur tissu. En effet, au lieu de construire un réseau microvasculaire au sein de leur tissu, ils ont construit leur tissu autour d'un réseau préexistant provenant d'un lit microvasculaire explanté (292). Un lit microvasculaire contenant une unique artère afférente et une unique veine efférente est prélevé chez un rat. Ce lit est perfusé *ex vivo* à l'aide d'un bioréacteur pendant 24h, ensemencé avec des cellules souches capables de migrer et de proliférer dans le tissu du parenchyme puis greffé à l'animal avec une anastomose chirurgicale (Figure 19).

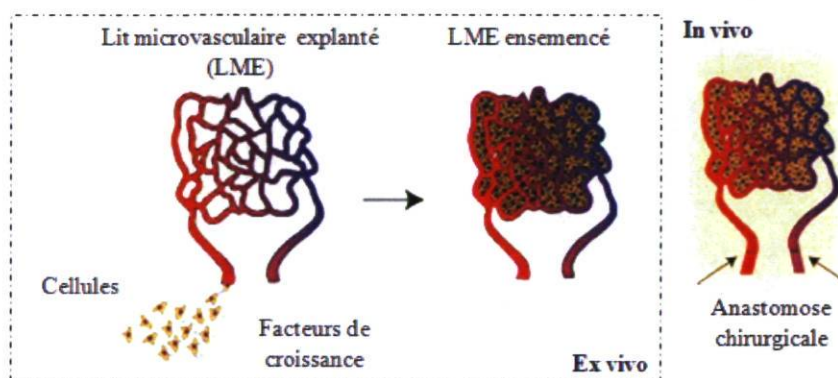


Figure 19 : Représentation schématique de la microvascularisation d'un tissu reconstruit autour d'un lit microvasculaire explanté (LME). Cette technique utilise un lit microvasculaire, prélevé sur le corps d'un patient, comme une matrice biologique autologue déjà microvascularisée dans laquelle vont proliférer les cellules ensemencées. Adapté de (292).

Cette approche est prometteuse car elle utilise un réseau microvasculaire fonctionnel, autologue et facilement accessible et manipulable. Elle pourrait s'avérer être un bon support pour la thérapie génique, dans le sens où elle assure une implantation localisée de cellules souches ou de cellules génétiquement modifiées pour corriger un défaut ponctuel. Cependant, étant donné que la survie de l'explant

n'est pas assurée au-delà de 24 h *ex vivo*, il n'est pas envisageable de reconstruire *in vitro* des tissus complexes avant de les greffer au patient.

En 2007 une équipe japonaise a reconstruit *in vitro* un réseau capillaire fonctionnel en utilisant la technique de lithographie optique (293). Cette technique permet de réaliser des motifs dans une résine photosensible par projection d'un rayonnement UV à travers un masque en contact avec l'échantillon (294). Les cellules endothéliales, microvasculaires humaines ou artérielles bovines, sontensemencées sur cette surface au motif réticulé pour 16 h. Elles sont ensuite mises en contact pour 24 h avec du Matrigel™ ou une membrane amniotique, dans lesquels elles vont migrer et acquérir une morphologie de capillaires (Figure 20).

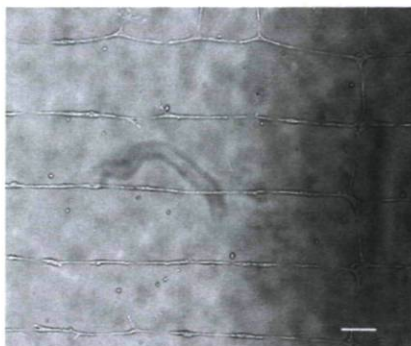


Figure 20 : Cellules endothéliales bovines transférées sur du Matrigel™ après avoir été ensemencées sur un support photolithographié en motif réticulaire. Barre d'échelle 100 μm . Modifié de (293).

Ce tissu peut être greffé *in vivo* dans la cavité abdominale de souris nues, et s'inoscule en 5 jours avec le réseau vasculaire de l'hôte. L'avantage principal de cette approche est que l'ensemencement, la culture sur les motifs réticulés, le transfert sur un substrat et l'organisation des cellules endothéliales en capillaires se réalisent en moins de 48 h. Cependant, l'épaisseur du tissu microvascularisé reste très limitée.

L'environnement biophysique a aussi une grande importance dans la formation et la stabilisation de réseaux de cellules endothéliales sanguines et dans l'organisation des cellules endothéliales lymphatiques (295). En effet, les cellules endothéliales microvasculaires sanguines ensemencées dans un gel de collagène de type I et cultivées avec du PMA, soumises à un flux interstitiel physiologique pendant

6 jours s'organisent en un réseau ramifié contenant une lumière. Dans les mêmes conditions, des cellules endothéliales lymphatiques ne s'organisent pas en réseau mais forment de grandes vacuoles et projettent de longues extensions cellulaires.

Notre laboratoire a été le premier au monde à démontrer que des cellules endothéliales humaines placées *in vitro* dans un contexte proche de la physiologie sont capables de s'organiser spontanément en réseau capillaire, sans ajout de facteurs de croissance autres que ceux contenus dans le milieu commercial de culture, ni d'inducteur comme le PMA.

En effet, Annie Black a observé en 1998 que des HUVECs co-cultivées, dans une éponge de collagène/chitosane/glycoaminoglycanes, avec des fibroblastes dermiques humains sécrétant de la matrice extracellulaire s'organisent spontanément en capillaires (296). Ces capillaires possèdent une lumière définie, secrètent une lame basale riche en collagène IV et en laminine. Les cellules endothéliales qui les composent sont liées par des jonctions intercellulaires spécifiques et présentent des caractéristiques propres à la microvasculature native comme la présence de corps de Weibel-Palade. En 2004, Pierre-Luc Tremblay a démontré dans notre laboratoire que le réseau capillaire spontanément formé *in vitro* par les cellules endothéliales humaines dans un substitut cutané est fonctionnel et s'anastomose avec le réseau vasculaire murin seulement 4 jours après l'implantation sur une souris athymique (218).

Plus récemment, en 2009, une équipe californienne a démontré que des HUVECs co-cultivées avec des fibroblastes dans un gel de fibrine sont capables de s'organiser spontanément en réseau capillaire en 7 jours de culture *in vitro* (Figure 21) (297). Lors d'une greffe sous cutanée à une souris athymique, le réseau microvasculaire contenu dans le gel de fibrine est capable de s'anastomoser en 5 jours avec le réseau vasculaire de l'hôte. De plus, la prévascularisation semble stimuler l'activité cellulaire et le remodelage tissulaire.

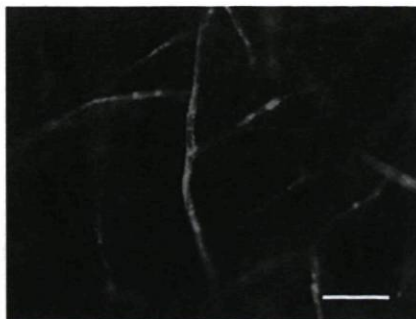


Figure 21 : Les HUVECs, transduites avec la *red fluorescence protein* (RFP), s'organisent spontanément en réseau capillaire lorsqu'elles sont cultivées pendant 7 jours en présence de fibroblastes dans un gel de fibrine. Échelle : 100 μ m. Tiré de (297).

La prévascularisation d'un substitut diminue les temps d'inosculation avec le réseau vasculaire de l'hôte. En effet, alors que l'anastomose des deux réseaux semble intervenir aux environs du 5^{ème} jour pour un substitut microvascularisé *in vitro*, les délais sont d'au moins 10 jours dans le cas des substituts dans lesquels les cellules endothéliales ne sont pas préalablement organisées en réseau (261, 262).

La prévascularisation des greffons semble donc être un pré-requis indispensable pour améliorer la prise de la greffe lors de cette période critique que sont les premiers jours postopératoires.

La majorité des modèles décrits dans cette partie sont des substituts cutanés. La reconstruction de cet organe est l'objet de recherches actives car ses applications sont nombreuses. En effet, d'un point de vue clinique, la greffe de substituts cutanés de plus en plus sophistiqués et complets améliore la survie et la vie des patients grands brûlés. D'un point de vue fondamental, c'est un modèle de choix pour étudier des pathologies typiques variées. Nous allons donc faire le point sur les caractéristiques structurales et fonctionnelles de cet organe avant de décrire nos hypothèses et objectifs de recherche.

4. Mise en contexte

4.1. La peau normale humaine

4.1.1. Fonctions

La peau est composée de deux compartiments, l'épiderme et le derme, qui reposent sur le tissu graisseux sous-cutané (Figure 22). Sa surface et son poids en font l'organe le plus lourd du corps humain. La peau a une surface d'environ 2 m² chez l'adulte et un poids de 4,5 à 5 kg. Son épaisseur varie entre 0,5 mm sur les paupières et 3 mm sous les talons ; elle est de 1 à 2 mm sur la majeure partie du corps (298).

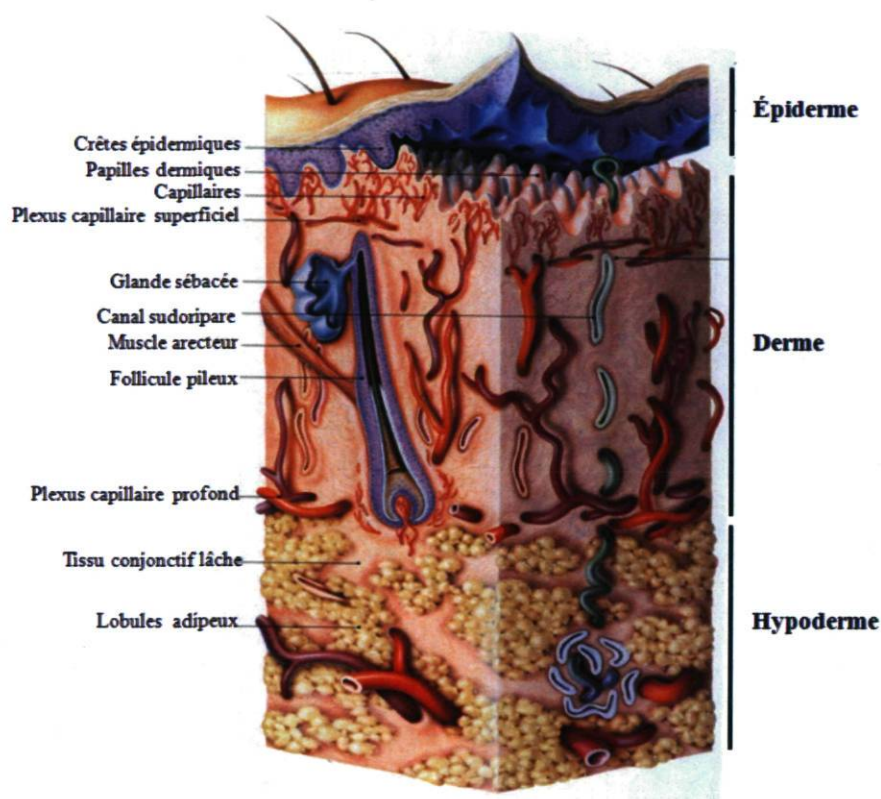


Figure 22 : Schéma de la structure de la peau normale humaine. Adapté de (144).

La peau protège notre organisme des agressions mécaniques, physiques, chimiques ou microbiennes du milieu extérieur, entre autres, grâce à ses propriétés d'imperméabilité, de résistance et de souplesse et à des mécanismes immunologiques. Cette fonction de barrière est principalement remplie par l'épiderme et plus particulièrement par le produit de sa différenciation terminale : la couche cornée. La peau peut aussi être considérée comme un organe immunitaire (299). Les cellules

immunitaires du derme et de l'épiderme participent à la défense de l'organisme contre les pathogènes, en particulier grâce à de nombreuses cellules dendritiques cutanées qui jouent un rôle central dans la détection du danger et l'initiation de la réponse immunitaire innée et acquise. Il y a deux populations principales de cellules dendritiques dans la peau normale humaine : les cellules de Langerhans situées dans la couche basale de l'épiderme qui sont de puissantes cellules présentatrices d'antigènes, et les cellules dendritiques du derme qui ont le potentiel d'internaliser des antigènes, de migrer et d'interagir avec les lymphocytes T.

Sous l'action des UVB, les mêmes rayonnements solaires qui induisent la plupart des cancers cutanés, la peau synthétise de la vitamine D (300). L'énergie thermique apportée par les UVB convertit le 7-deshydrocholestérol contenu dans la peau en pré-vitamine D₃. Cette pré-vitamine passera dans la circulation sanguine et rejoindra le foie où elle sera hydroxylée en vitamine D. Pour l'homme, il existe deux sources de vitamine D : les radiations solaires UVB et l'alimentation. Cependant, malgré l'enrichissement de certains aliments comme le lait, le jus d'orange et les céréales aux États-Unis ou les margarines en Europe, l'apport alimentaire reste faible (301). Une carence en vitamine D a de nombreux effets néfastes pour l'organisme, comme le développement des maladies cardiovasculaires, des problèmes osseux, de l'hypertension, des diabètes, des scléroses multiples, de l'arthrite rhumatoïde, de la dégénérescence maculaire et des maladies mentales (302).

La peau contient de nombreuses annexes cutanées que sont les poils et follicules pileux, les ongles et les glandes, aussi bien sudoripares que sébacées. L'excrétion de la sueur par les glandes sudoripares assure non seulement la régulation de la température corporelle mais aussi l'élimination de substances nocives comme l'urée ou l'ammoniaque (19). Chez l'humain, le sébum produit par les glandes sébacées remplit plusieurs fonctions comme la photoprotection, une activité antimicrobienne et la libération d'antioxydants sur la surface de l'épiderme (303, 304). La peau contient aussi des terminaisons nerveuses qui en font un organe sensoriel (305). En effet, les neurones sensitifs du système nerveux périphérique

projettent des fibres afférentes dans la peau. Elles passent à travers le derme, pénètrent la membrane basale pour innerver les cellules de l'épiderme ou restent libres et assurent la réception des stimuli tactiles, thermiques et nociceptifs.

Le derme, séparé de l'épiderme par une membrane basale, est riche en réseaux microvasculaires, aussi bien sanguins que lymphatiques. La microcirculation sanguine fournit les cellules en nutriments et O₂, notamment à celles de l'épiderme avasculaire, et élimine leurs déchets métaboliques et le CO₂. Cependant, elle assure aussi d'autres fonctions au niveau de la peau. La régulation du flux sanguin dans la microcirculation cutanée assure le contrôle de l'homéostasie thermique à l'échelle de l'organisme (306). Ainsi, lors d'une hyperthermie, le flux sanguin cutané peut atteindre 6 à 8 litres par minute (307). Lors d'une exposition des extrémités au froid, la microcirculation cutanée s'adapte rapidement, en moins de dix minutes, et répond par une vasodilatation afin de protéger l'extrémité des doigts d'une lésion locale potentielle (308). De plus, les sujets qui sont souvent exposés aux variations thermiques, comme les pêcheurs en haute mer par exemple, développent une vasodilatation induite par le froid plus rapide et efficace. Stephen et son équipe ont démontré en 2009 que la perfusion sanguine cutanée et la couleur de la peau qui en découle influencent la perception de l'état de santé chez l'être humain et donc son choix de partenaire sexuel (309, 310).

L'hypoderme, aussi appelé tissu conjonctif sous-cutané, est un tissu graisseux plus ou moins abondant en fonction des individus et des parties du corps. Il constitue un important réservoir énergétique et fournit une isolation thermique à l'organisme mais aussi mécanique aux structures sous-jacentes (18).

4.1.2. Structure

La Figure 23 est une coloration au trichrome de Masson d'une biopsie cutanée récoltée après une réduction mammaire. Elle illustre bien l'histologie de cet organe.

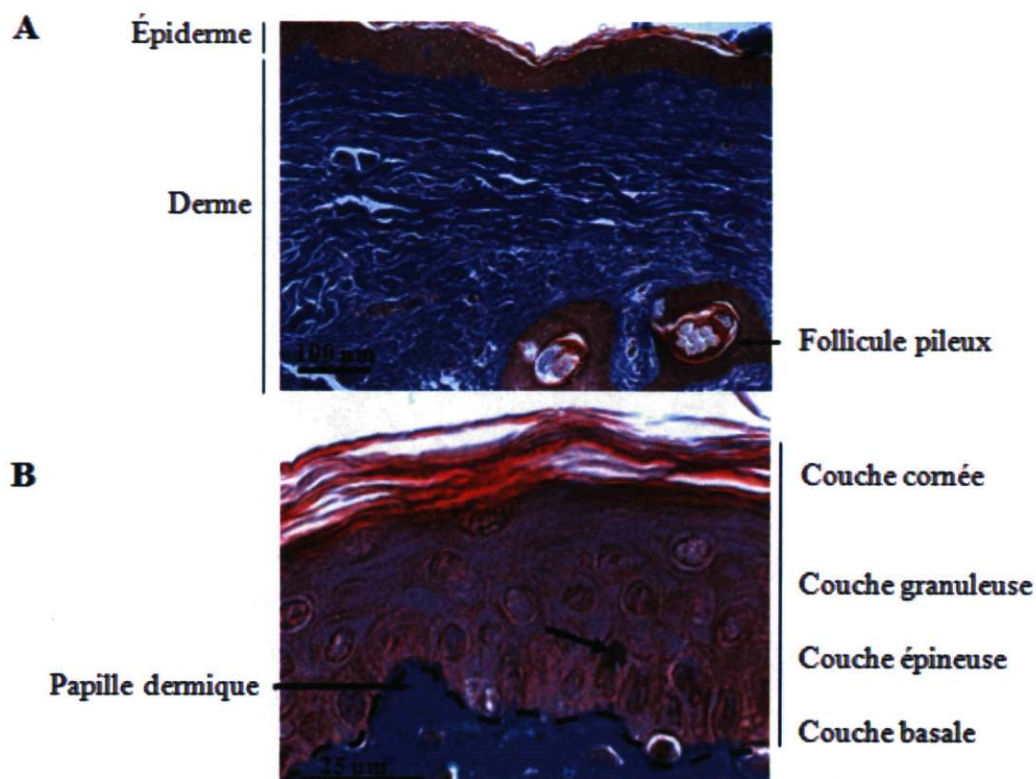


Figure 23 : Peau normale humaine provenant d'une réduction mammaire, colorée au trichrome de Masson. A. Épiderme recouvrant le derme qui contient les annexes cutanées comme les poils. B. L'épiderme différencié repose sur la jonction dermo-épidermique (ligne pointillée). La flèche noire indique un mélanocyte dans la couche basale de l'épiderme. En bleu : les collagènes, en rose : les cellules.

L'épiderme est un épithélium stratifié squameux kératinisé avasculaire. Les kératinocytes subissent une différenciation terminale en s'éloignant de la jonction dermo-épidermique. De la plus profonde à la plus superficielle, les strates de l'épiderme sont la couche basale, la couche épineuse, la couche claire, la couche granuleuse et la couche cornée (18, 311, 312). Au fil de leur différenciation, les kératinocytes synthétisent et sécrètent des lipides dans les espaces intercellulaires.

La couche basale, ou couche germinative, est liée mécaniquement au derme par la membrane basale, riche en laminines et collagène de type VII, qui constitue la jonction dermo-épidermique. Les kératinocytes qui la composent, mitotiquement très actifs, assurent le renouvellement des cellules qui se différencient et donc régénèrent l'épiderme.

Les cellules de la couche épineuse ont une forme irrégulière et hérissée. C'est dans cette strate que sont disséminés des granules de mélanines et des macrophages.

Dans la couche granuleuse, les kératinocytes s'aplatissent, leurs noyaux et leurs organites commencent à se désintégrer et ils accumulent des granules de kératohyaline, d'où le nom de cette strate. Les cellules épidermiques situées au-dessus de cette couche relativement imperméable meurent par manque de diffusion des nutriments.

La couche claire n'est présente que dans la peau épaisse, c'est-à-dire sur la paume des mains, le bout des doigts et la plante des pieds.

La couche cornée est composée de cornéocytes, ou kératinocytes morts, enrichis en protéines comme les kératines et d'une matrice intercellulaire riche en lipides comme les céramides. Elle constitue la principale composante de la barrière épidermique. Cependant, les couches sous-jacentes y contribuent aussi par la présence de jonctions serrées et adhérentes, de desmosomes et d'éléments du cytosquelette.

Environ 90% des cellules qui composent l'épiderme sont des kératinocytes, mais il contient aussi d'autres types cellulaires. Ainsi, les cellules de Langerhans sont localisées dans les couches basales et supra-basales de l'épiderme. Elles représentent entre 2 à 4% de la population cellulaire totale de ce compartiment et interviennent dans l'immunité cutanée (299). Les cellules de Merkel sont des cellules neuroendocrines retrouvées dans la couche basale de l'épiderme des vertébrés (305, 313). Elles synthétisent de nombreux neuropeptides à l'intérieur de granules de sécrétion, sont étroitement associées à des fibres nerveuses sensibles et interviennent dans la mécanoréception. Un mélanocyte et environ 36 kératinocytes voisins forment une unité épidermique de mélanisation. Les mélanines sont synthétisées dans les mélanosomes, guidées dans les dendrites des mélanocytes et transférées aux kératinocytes où elles vont former une sorte de bouclier protecteur autour de leur noyau pour limiter l'impact néfaste des rayonnements solaires ultra-violets (UV) (314).

Le derme, riche en capillaires sanguins, lymphatiques et en récepteurs sensoriels, contient la plupart des annexes cutanées comme les follicules pileux ou les glandes. C'est un tissu conjonctif caractérisé par une abondante matrice extracellulaire synthétisée principalement par les fibroblastes (315). Cette matrice est composée de fibres de collagène, de fibres élastiques et de la substance fondamentale amorphe. Les collagènes sont principalement de type I, III et V qui représentent respectivement environ 70%, 20% et 3% de l'ensemble des collagènes dermiques. La principale fonction des fibres de collagène est de donner au derme son épaisseur et sa résistance aux forces de traction. Celle des fibres élastiques est de donner à la peau son élasticité. La substance fondamentale amorphe, qui contient essentiellement de l'acide hyaluronique qui est un glycoaminoglycane, forme un gel partiellement compressible, permettant la circulation de l'eau et des molécules dissoutes. La matrice extracellulaire dermique joue aussi un rôle de réservoir de facteurs de croissance. La zone superficielle du derme contient les papilles dermiques qui sont à l'origine des crêtes épidermiques produisant les empreintes digitales (316).

4.1.3. Réseaux microvasculaires

La microcirculation cutanée sanguine est organisée en deux plexus vasculaires horizontaux aux fonctions spécifiques (Figure 24) (317).

Le premier, superficiel, est situé dans le derme papillaire à 1 à 2 mm sous la surface de la peau. Il se ramifie verticalement en formant des boucles capillaires dans les papilles dermiques qui assurent les échanges d'oxygène et de nutriments pour les tissus environnants (318).

Le second, plus profond, est localisé à la jonction dermo-hypodermique. Il contribue à hauteur de 85% environ à la circulation sanguine cutanée totale, offrant ainsi une grande surface pour la thermorégulation (306).

Des artérioles ascendantes couplées à des veinules descendantes relient les deux plexus. À la jonction dermo-hypodermique, des veines à valves bicuspidées collectent le sang et préviennent son reflux.

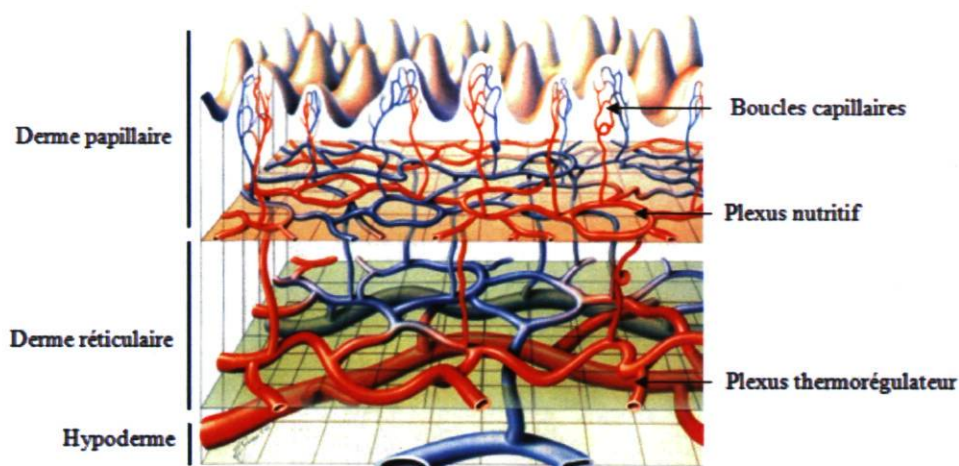


Figure 24 : Représentation schématique de l'architecture vasculaire cutanée avec ses deux plexus parallèles à la surface. L'épiderme n'est pas illustré pour alléger le dessin. Adapté de (319).

De même, les capillaires lymphatiques forment deux plexus parallèles, associés aux plexus sanguins (Figure 25).

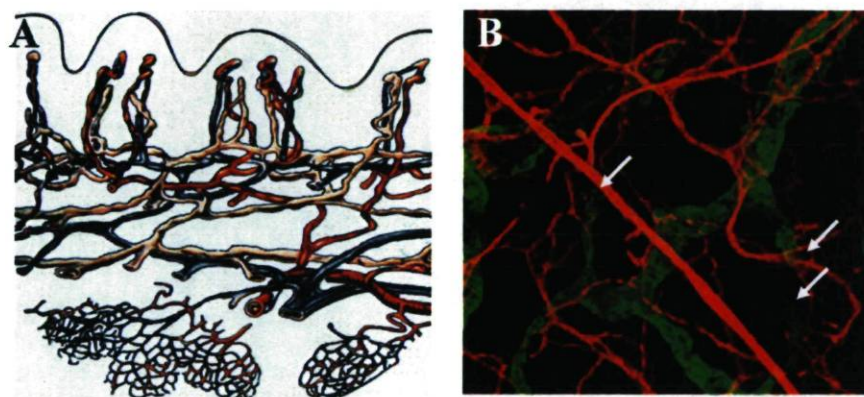


Figure 25 : Interactions entre les réseaux capillaires sanguins et lymphatiques dans la peau. A. Schéma des relations entre ces réseaux dans le derme. Les vaisseaux lymphatiques sont en blanc, les artérioles en rouge et les veines en bleu. Tiré de (72). B. Immunodétection, par microscopie confocale, des capillaires sanguins (en rouge) et lymphatiques (en vert) dans une peau d'oreille de souris. Les capillaires sanguins sont marqués avec PECAM-1 et les capillaires lymphatiques avec LYVE-1. Remarquez les extrémités en cul-de-sac des capillaires lymphatiques (flèches blanches). Adapté de (320).

Le plexus superficiel, composé de vaisseaux sans valve, s'étend dans le derme papillaire (103). Alors que l'essentiel du réseau capillaire sanguin est situé immédiatement sous l'épiderme, les capillaires lymphatiques sont plus éloignés. Le plexus superficiel se ramifie verticalement en vaisseaux lymphatiques plus larges

jusqu'au derme inférieur et à la jonction dermo-hypodermique (321). Le plexus lymphatique profond est situé sous le plexus sanguin profond. Tout comme les veinules collectrices du derme inférieur, les vaisseaux lymphatiques profonds contiennent de nombreuses valves. Alors que les vaisseaux sanguins sont retrouvés à la jonction dermo-hypodermique et à l'intérieur même de l'hypoderme, les vaisseaux lymphatiques ne pénètrent pas dans l'hypoderme (322).

Bien que les plexus sanguins et capillaires soient souvent directement superposés, ils ne s'anastomosent jamais (323).

Ryan et son équipe ont vérifié par immunohistochimie, dans de la peau humaine de scrotum riche en réseaux capillaires et lymphatiques, qu'il existe des différences significatives d'expression de marqueurs microvasculaires entre ces deux types endothéliaux (74). Les marqueurs typiques des cellules endothéliales sanguines comme PAL-E et le facteur de Von Willebrand ne sont que très peu exprimés dans les cellules lymphatiques. En ce qui concerne les molécules d'adhésion cellulaire classiquement exprimées par les cellules endothéliales sanguines comme la E-sélectine, ICAM-1 et VCAM-1, elles ne sont pas retrouvées dans l'endothélium lymphatique. Seule PECAM-1 est exprimée. Enfin, la membrane basale des capillaires lymphatiques n'est pas continue, ne contient pas d'héparane sulfate protéoglycane mais du collagène de type IV. Enfin, les capillaires lymphatiques ne sont pas stabilisés par des péricytes car il n'y a pas de cellules positives à l'*alpha-smooth muscle actin* (α -SMA) autour d'eux.

Reynolds et ses collaborateurs ont démontré récemment, grâce à l'étude de nombreux résultats de lymphoscintigraphies réalisées dans le cadre de traitements de mélanome cutanés, que le drainage lymphatique de la peau est très variable entre les patients (324, 325). Leurs résultats sont de première importance car ils indiquent que le drainage lymphatique cutané réel diffère des descriptions anatomiques classiques utilisées par les cliniciens pour prédire la localisation des ganglions sentinelles à biopsier pour décider de la suite du traitement du mélanome cutané.

Afin d'interpréter plus facilement les résultats présentés plus loin dans ce mémoire, il est important de comprendre que des sections planes d'un réseau 3D de tubes interconnectés apparaîtront en 2D sous forme de cercles, d'ellipses ou de section longitudinales de cylindres (Figure 26).

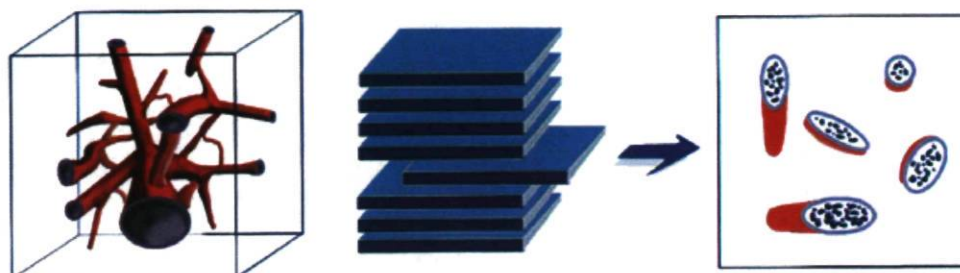


Figure 26 : Schématisation d'une coupe transversale d'un réseau de tubes interconnectés. La figure montre, à gauche un réseau 3D qui pourrait correspondre à un réseau microvasculaire et à droite les ellipses résultant d'une section transversale de ce réseau. Tiré de (174)

4.2. La technique d'auto-assemblage

4.2.1. Principe

Notre laboratoire a développé la technique d'auto-assemblage dont le principe est de stimuler les cellules avec de l'acide ascorbique (ou vitamine C) pour qu'elles synthétisent et secrètent leur propre matrice extracellulaire (Figure 27).

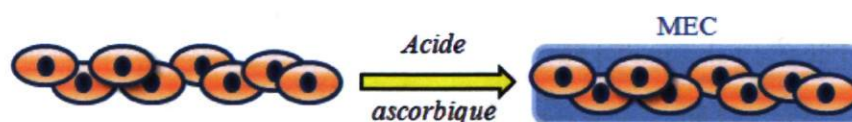


Figure 27 : Principe de la technique d'auto-assemblage. Les cellules, stimulées par la présence d'acide ascorbique dans le milieu, créent leur propre microenvironnement en secrétant de la matrice extracellulaire (MEC), jusqu'à former un feuillet manipulable.

En effet, l'acide ascorbique est l'un des cofacteurs des prolyl-hydroxylases et lysyl-hydroxylases. Ces enzymes catalysent l'hydroxylation de la proline et de la lysine respectivement en hydroxyproline et en hydroxylysine grâce aux électrons libérés par l'interconversion de la vitamine C entre la forme ascorbate et deshydroascorbate (326, 327).

Ces hydroxylases, localisées dans le réticulum endoplasmique des cellules, sont indispensables à l'assemblage intracellulaire de la triple hélice de collagène. En effet, les résidus hydroxyprolines de la séquence du procollagène se lient par des ponts hydrogènes pour assurer la structure tertiaire en triple hélice propre au collagène mature. Plus de 35% des résidus prolines du procollagène doivent être hydroxylés pour que la conformation en triple hélice du collagène soit conservée à la température physiologique de 37°C (328). L'hydroxylation de la lysine est nécessaire à l'organisation des fibres de collagène (329).

L'acide ascorbique a des effets directs sur l'hydroxylation et la stabilisation de la triple hélice de collagène, mais aussi sur sa sécrétion. En effet, Lyons et Schwarz puis Schwarz tout seul ont démontré que l'acide ascorbique augmente le taux de sécrétion du collagène, en particulier dans des cultures primaires de cellules de tendon de poulet en présence de 50 µM de vitamine C, où ils notaient une augmentation de 6 fois de son taux de sécrétion (330, 331). L'acide ascorbique intervient aussi au niveau de l'expression génétique en augmentant la transcription du gène de collagène I (330). De plus, Davidson et son équipe ont démontré en 1997 que dans des fibroblastes dermiques porcins cultivés avec 50 µM d'acide ascorbique, l'ARNm du collagène I (COL1A2) était stabilisé, avec un temps de demi-vie passant de 7h sans acide ascorbique à 33 h avec (332).

L'acide ascorbique concoure donc, par ces multiples effets, à augmenter la synthèse de collagènes et de matrice extracellulaire par les cellules.

Une carence en acide ascorbique entraîne une maladie nommée scorbut ou maladie des marins, décrite il y a plusieurs siècles par Lind. Cette maladie se manifeste initialement par une fatigue intense, puis par des œdèmes dans les bras et les jambes, une perte d'intégrité des tissus conjonctifs et une fragilité des vaisseaux sanguins, des gencives, des tendons et de la peau (333). Cette maladie très répandue chez les marins du XV^{ème} au XVII^{ème} siècle fut combattue grâce à l'introduction dans leur régime d'aliments très riches en vitamine C comme la choucroute et le citron. Une fois arrivée au Canada, les colons ont pu utiliser la bière d'épinette pour combattre le scorbut (334).

4.2.2. Avantages et limites

Le principal avantage de la technique d'auto-assemblage est que les substituts tissulaires qui en résultent ne contiennent absolument aucun biomatériau ou matière exogène. Cette caractéristique garantit une totale biocompatibilité du tissu lors d'une greffe. Son intégration sera donc plus rapide et évitera la phase de résorption qui caractérise l'utilisation clinique de substituts reconstruits à l'aide de matrice exogène qui conduisent généralement à une réaction inflammatoire (280).

La matrice extracellulaire sécrétée par les cellules correspond à leurs besoins, ce qui assure la mise en place d'interactions cellules-cellules et cellules-matrice totalement physiologiques, habituellement perdues lors de la culture classique en 2D sur du plastique (335).

De plus, à partir d'une unique biopsie de peau, nous sommes capables d'extraire les trois types cellulaires utilisés lors de la reconstruction d'un substitut cutané microvascularisé, à savoir les kératinocytes, les fibroblastes dermiques et les cellules endothéliales microvasculaires (244). D'un point de vue clinique, le prélèvement d'une biopsie cutanée n'est pas considéré comme invasif, nous sommes donc capables de reconstruire pour des patients des substituts totalement autologues. Cette propriété a une conséquence d'une extrême importance pour la vie du patient puisque cela signifie qu'il n'y aura pas de rejet de la greffe et qu'il n'aura pas à prendre un traitement immunosuppresseur durant le reste de sa vie. Il faut savoir que l'immunosuppression iatrogène à long terme, le corollaire inévitable d'une greffe d'organe non autologue, a de nombreux effets délétères suivant la classe du médicament utilisé, comme une augmentation des risques d'infection, une hypersensibilité, l'apparition de diabète, des retards de croissance, de l'hirsutisme et surtout l'apparition de cancers cutanés multiples (336-339).

L'équipe de Boyce a démontré, à la fois *in vitro* et *in vivo*, l'effet bénéfique de l'acide ascorbique sur les propriétés biologiques et physiques de son substitut cutané (340). D'après leur étude, les substituts cutanés cultivés avec addition de vitamine C au milieu ont, *in vitro*, une meilleure viabilité cellulaire, une jonction dermo-épidermique plus physiologique et une fonction de barrière épidermique améliorée comparés aux substituts cultivés sans vitamine C. De plus, la culture avec de l'acide

ascorbique limite la contraction du substitut après la transplantation sur la souris et favorise la prise de la greffe.

La limite majeure de l'approche par auto-assemblage est liée à sa principale qualité. Étant donné qu'aucune matrice exogène n'est utilisée, l'épaisseur des tissus reconstruits reste à l'échelle cellulaire. En effet, l'épaisseur moyenne de deux feuillets de fibroblastes dermiques superposés est de $83,6 \pm 16,3 \mu\text{m}$ (341).

Enfin, il faut aussi noter le temps que mettent les cellules à synthétiser leur matrice extracellulaire. En effet, il faut entre 21 et 28 jours à des fibroblastes dermiques pour synthétiser un feuillet de matrice suffisamment dense pour être manipulable (342). Les feuillets de kératinocytes appliqués sur des patients grands brûlés sont plus rapides à obtenir. Ainsi, à partir d'une biopsie cutanée de 1 cm^2 , la culture *in vitro* permet d'obtenir une surface de 6000 cm^2 d'épiderme en environ 14 jours (343).

4.3. Objectifs

Une étude précédente menée par Annie Black en 1998 au laboratoire a démontré que dans un modèle de peau reconstruite dans une éponge de collagène/chitosane/glycoaminoglycanes, les cellules endothéliales humaines s'organisent spontanément en un réseau capillaire, avec la présence d'une lumière et la synthèse d'une lame basale (296). Cependant, comme nous l'avons démontré au cours de cette partie, il apparaît que les applications cliniques de ce type de modèle sont limitées du fait de la présence de matériaux exogènes comme les collagènes bovins, le chitosane provenant de la carapace de crevettes et les glycoaminoglycanes extraits de la cloison nasale de mouton (344).

Dans un premier temps, nous avons souhaité étudier le comportement des cellules endothéliales dans un substitut cutané reconstruit par auto-assemblage afin de vérifier leur organisation spontanée en réseau microvasculaire. Avec ce modèle de substitut cutané microvascularisé plus physiologique que celui de l'éponge de collagène, les applications cliniques comme le soin des grands brûlés ou le traitement

des ulcères cutanés seraient plus rapidement envisageables. Le chapitre 2 expose donc la mise au point de ce modèle, aussi bien avec des cellules endothéliales d'origine microvasculaire cutanée que d'origine ombilicale. Il nous a semblé primordial de vérifier la fonctionnalité de ce réseau microvasculaire reconstruit *in vitro*. Aussi, nous décrivons le remodelage du réseau microvasculaire contenu dans notre substitut cutané lorsqu'il est greffé *in vivo* sur un modèle animal qu'est la souris nue.

Face à l'absence de modèles d'études des mélanomes physiologiquement pertinents, nous avons décidé, dans un troisième temps, de mettre au point un modèle de substitut cutané tumoral humain composé à la fois d'un épiderme et d'un derme microvascularisé. Cette composante microvasculaire est absente de la plupart des modèles actuels, ce qui nous semble être un manque flagrant puisque l'angiogenèse tumorale joue un rôle majeur dans le développement et la croissance de la plupart des tumeurs. En premier lieu, nous avons essayé de mettre au point ce substitut cutané microvascularisé tumoral à partir du modèle largement caractérisé et utilisé au laboratoire qu'est l'éponge de collagène/chitosane/glycoaminoglycanes. Cependant, nous avons observé qu'une des lignées humaines métastatiques de mélanome avec laquelle nous travaillions enclenchait un processus de mort cellulaire une fois ensemencée sur ce substrat.

Finalement, dans le chapitre 3 nous décrivons la mise au point d'un modèle tridimensionnel d'étude *in vitro* de la progression du mélanome à partir de la technique d'auto-assemblage. L'objectif est que les différentes lignées de mélanomes humains avec lesquelles nous travaillons, qu'elles soient issues d'un site métastatique ou d'un site primaire de lésion, conservent leurs propriétés d'agressivité et reproduisent les mêmes comportements qu'*in situ* chez les patients dont elles ont été extraites.

Enfin, il a été observé sur des coupes paraffinées de tumeurs humaines que les cellules agressives de mélanomes fusionnent avec la membrane cytoplasmique des cellules endothéliales lymphatiques, la détruisent et finalement accèdent à la lumière

du capillaire (345). En effet, étant donné que les capillaires lymphatiques ont peu ou pas de membrane basale et que leurs jonctions intercellulaires sont plus lâches que celles des cellules endothéliales sanguines, les cellules cancéreuses semblent préférentiellement choisir cette voie pour métastaser (346, 347). L'envahissement des ganglions lymphatiques est un des facteurs les plus importants pour juger de l'agressivité de la tumeur. Afin d'augmenter la puissance et la pertinence de notre modèle de substitut cutané microvascularisé tumoral, nous nous sommes donc intéressés à l'idée d'y introduire une composante lymphatique. Le chapitre 4 décrit la stratégie que nous avons adoptée et nos résultats préliminaires concernant l'extraction et la purification de cellules endothéliales lymphatiques à partir de biopsies cutanées. Nous supposons qu'une foisensemencées dans notre substitut cutané elles s'organiseront spontanément en réseau, comme c'est le cas des cellules endothéliales sanguines. À notre connaissance, il s'agirait de la toute première reconstruction *in vitro* de capillaires lymphatiques par génie tissulaire au monde.

La Figure 28 schématise les différents objectifs de nos travaux de recherche de doctorat visant à introduire un réseau microvasculaire, aussi bien sanguin que lymphatique, dans un substitut cutané reconstruit par génie tissulaire par la technique d'auto-assemblage, dans des conditions saines et dans des conditions tumorales.

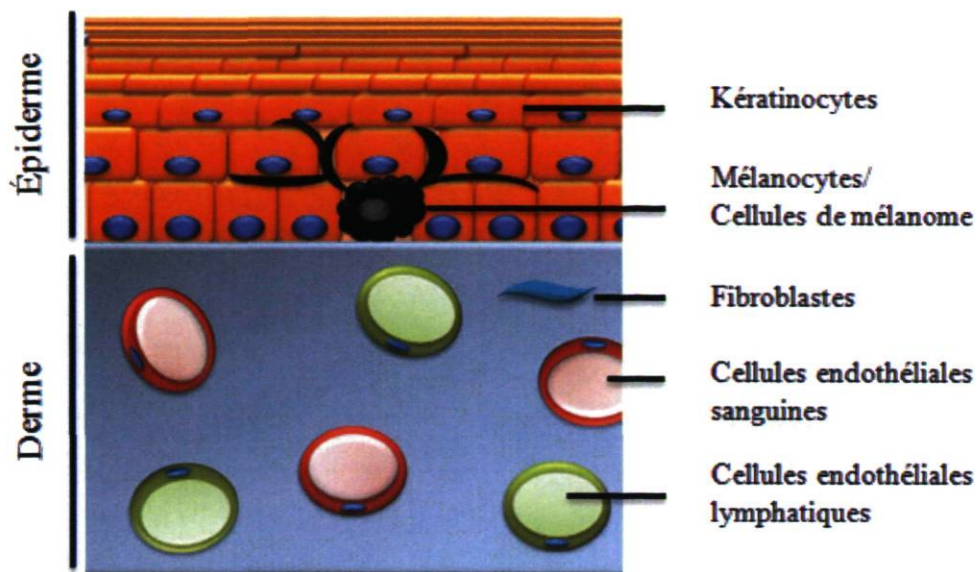


Figure 28 : Schéma d'un substitut cutané reconstruit par auto-assemblage. Les différents types cellulaires présents *in vivo* dans la peau interagissent *in vitro* les uns avec les autres pour créer un environnement proche de la physiologie normale ou tumorale.

Chapitre 2 : La présence d'un réseau microvasculaire favorise la revascularisation *in vivo* d'un substitut cutané microvascularisé reconstruit par génie tissulaire

Ce chapitre fait l'objet d'un manuscrit accepté par Tissue Engineering Part A le 21 Mai 2010 et constitue la version finale telle que publiée dans ce journal. La totalité de cet article a été écrit à partir de mes travaux. J'ai développé le projet et le modèle, structuré et écrit le document. Todd Galbraith a réalisé la quantification de l'activité luciférase contenue dans les biopsies et a rédigé la partie « matériels et méthodes » s'y rapportant. Drs Auger et Huot ont relu ce manuscrit.

1. Résumé

Le manque ou l'absence de vascularisation est la principale cause d'échec des greffes cutanées sur des patients souffrant de blessures étendues. Pour ces victimes de traumatismes, la meilleure alternative à une greffe de peau pleine-épaisseur serait le recouvrement de la plaie avec une peau autologue reconstruite *in vitro*, composée à la fois d'un épiderme et d'un derme microvascularisé correctement. Nous avons mis au point, avec la technique d'auto-assemblage, une peau reconstruite microvascularisée (PRM) qui est générée à partir de culture de cellules autologues, sans ajout de facteur de croissance ou de support matriciel. L'inosculation du réseau microvasculaire contenu dans la PRM avec celui de l'hôte intervient en moins de quatre jours après la greffe sur des souris athymiques. Nous avons, dans le même temps, observé une colonisation active de la partie dermique de nos substituts par les capillaires de l'hôte, bourgeonnant depuis le lit de la plaie. Ainsi, le réseau microvasculaire reconstruit *in vitro* contenu dans notre substitut cutané 3D développe non seulement des anastomoses fonctionnelles avec les vaisseaux murins mais favorise aussi, par rapport au contrôle non endothélialisé, une vascularisation rapide, complète et optimale du substitut implanté. Notre modèle offre donc des perspectives d'applications cliniques intéressantes, notamment en médecine régénératrice en menant à une revascularisation plus rapide des greffons. De plus, la PRM pourra être un modèle utile d'étude du processus d'angiogenèse *in vitro*.

2. Article

A preexisting microvascular network benefits *in vivo* revascularization of a microvascularized tissue-engineered skin substitute

Laure Gibot¹, Todd Galbraith¹, Jacques Huot², François A. Auger^{1†}

¹ Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale/LOEX, Centre de recherche FRSQ du CHA Universitaire de Québec, Département de Chirurgie, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec, Canada

² Le Centre de recherche en cancérologie de l'Université Laval, L'Hôtel-Dieu de Québec, 9 rue McMahon, Québec, G1R 2J6, Canada.

† corresponding author

Running title

Transplanted microvascularized reconstructed skin

Key words

Transplantation, vascularized skin, angiogenesis, tissue engineering, self-assembly

2.1. Abstract

Delayed or absence of vascularization is one of the major reasons for skin engraftment failure in patients with extensive burns. For such trauma victims, the best alternative to a split-thickness graft would be wound coverage with an autologous *in vitro* reconstructed skin (RS) combining dermis and epidermis with an appropriate microvascularization. We have developed an endothelialized reconstructed skin (ERS) based on our self-assembly approach, which is generated from autologous cultured cells without any exogenous angiogenic growth factor or scaffold. After transplantation in athymic mice, an early inosculation between the graft and host vasculatures occurred within 4 days. We also concurrently detected an active invasion of the dermis by host capillaries sprouting from the wound bed. Thus, the microvascular network constructed *in vitro* within our 3D skin substitute did not only develop functional anastomoses with the host's blood vessels but also promoted a rapid, complete and optimal vascularization of the implanted tissues by exerting an angiogenic effect compared to control RS. Our model may bring about interesting possibilities for regenerative medicine by leading to faster vascularization in clinical applications. In addition, the ERS can be a useful *in vitro* angiogenesis model.

2.2. Introduction

Tissue defects created by acute traumas such as burns or chronic wounds like skin ulcers may be repaired using biological substitutes. Current research strives to develop new skin substitutes with reduced engraftment failure combined with superior physiological appearance and function of skin after wound healing.

When the dermal layer has been destroyed, the application of an epidermal substitute is not enough to ensure optimal healing. In such a case, the development of a bilayered substitute of adequate thickness is preferred. The epidermal layer is essential to restore control of fluid loss, body temperature and protection against bacteria, while the dermal layer gives the skin its elasticity and strength. Currently, numerous products are commercially available for wound treatment. Some of them are tissue-engineered products, with or without living cells (1). An important limitation during treatment with large three-dimensional (3D) skin substitutes for

extensive permanent wound coverage is whether they will rapidly become vascularized, thus preventing necrosis and the ensuing loss of the protective epithelial barrier. Indeed, cells require oxygen and nutrients for their survival and are therefore located within 100 to 200 μm of blood vessels, which is the diffusion limit for oxygen (2). Long-term survival and function of such 3D substitutes depend on rapid development of new blood vessels that will provide nutrients and oxygen to the cells, not only at the margin, but also in the center of the tissue grafts.

Thus, pre-microvascularization of skin substitutes will significantly enhance the efficacy and quality of wound healing. Different approaches are currently used to improve vascularization of skin substitutes before or after transplantation (3-6). The use of growth factors via absorption or incorporation into natural or synthetic scaffolds triggers their localized and sustained delivery and thus promoting vascularization (for review see (7)). A sustained release of vascular endothelial growth factor (VEGF) was observed for over 70 days from copolymers of lactic and glycolic acid (PLGA) sponges (8). Basic fibroblast growth factor (bFGF) enhances the vascularization into a poly(vinyl alcohol) porous sponge (9) or in porous alginate scaffolds (10). Transplanted cells can also be genetically modified to produce angiogenic proteins that promote better and faster vascularization. For example, Boyce et al., built skin substitutes with keratinocytes that were genetically modified to overexpress platelet-derived growth factor (PDGF) (11) or VEGF (12-14). Another approach is to modify endothelial cells with a caspase-resistant Bcl-2 protein in order to enhance their survival (15, 16). Although angiogenic growth factor release seems safer and more clinically applicable than the use of genetically modified cells, tissue constructs which comprise synthetic or xenogenic components are liable to initiate adverse immune reaction.

Experimental results previously published by our laboratory indicate that endothelial cells can spontaneously assemble into capillary-like structures and microvascular networks when co-cultured with fibroblasts in skin substitutes produced in vitro with biological biomaterials (17). We have also shown that after grafting such substitutes on nude mice, this network will inosculate with the host's own vascular system within 4 days instead of the 14 days needed for complete

vascularization with non vascularized skin substitutes (18). In this study, we present a new model of ERS in which the angiogenic process takes place without the addition of any exogenous modulator-like growth factors, except those present in the commercially available culture media we used, and without any exogenous scaffold. We describe here the *in vivo* remodeling of a tissue-engineered microvascular network within a human skin substitute, which was grown *in vitro* and transplanted onto nude mice.

2.3. Materials and Methods

Human cell isolation. Human keratinocytes and fibroblasts were isolated from human skin biopsies after breast reductive surgeries as previously described (19, 20). Human microvascular endothelial cells (HMVEC) were purified from the foreskin of a healthy baby using Dynabeads CD31 (DynaL Biotech, NY, USA); human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were obtained from the umbilical cord of healthy newborn by enzymatic digestion as previously described (21). These two types of endothelial cells were transduced by lentiviral vectors to provide stable luciferase and green fluorescent protein (GFP) expression (22, 23). Transductions were graciously performed in Dr. J.A. Medin's laboratory (Ontario Cancer Institute, Toronto, Canada).

Reconstructed skin and endothelialized reconstructed skin preparation. The self-assembly approach (24, 25) was used to produce two different tissues : the control, reconstructed skin (RS) and the endothelialized reconstructed skin (ERS). Schematically, the dermal layer of the tissue-engineered skin was composed of three sheets of fibroblasts. The two inferior sheets were plated with or without HUVEC while a superior third sheet was seeded with keratinocytes to provide the epidermal layer. Fibroblasts were seeded at a concentration of 15,000 cells/cm² in the presence of a paper anchor and grown for three weeks in Dulbecco-Vogt modification of Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (HyClone, Logan, UT, USA), 100 U/mL penicillin (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), 25 µg/mL gentamicin (Schering, Pointe

Claire, Canada) and 50 µg/mL of ascorbic acid (Sigma) in 8% CO₂ and at 37°C. After 21 days, HUVEC or HMVEC were plated on two sheets of the ERS at a concentration of 12,000 cells/cm². Both were cultured for seven days in a medium of 1:1 ratio of EGM-2 medium (Cambrex Bio Science Baltimore, Inc., USA) and DMEM supplemented with 10% FCS and 50 µg/mL of ascorbic acid. Concomitantly, on day 21, keratinocytes were plated on the last sheet at a concentration of 50,000 cells/cm² and grown in a 3:1 DMEM-Ham's F-12 medium (Invitrogen) supplemented with 5% newborn calf serum (NCS) (FetalCLone II, HyClone), 0.4 µg/mL hydrocortisone (Calbiochem, La Jolla, CA, USA), 5 µg/mL bovine insulin (Sigma), 10 ng/mL human epidermal growth factor (Austral, San Ramon, CA, USA), 10⁻¹⁰ M cholera toxin (ICN, St-Laurent, Canada), 50 µg/ml ascorbic acid and antibiotics. Then, on day 28, cell sheets were stacked, attached with ligating clips (Ethicon Endo-Surgery, Cincinnati, USA) and tissues were elevated to the air-liquid interface for two weeks in media described above, without epidermal growth factor. Media were changed three times a week.

Animal and surgical manipulations. All animal procedures were performed using protocols approved by the Canadian Council on Animal Care. To prevent infections, adult male athymic nu/nu mice (42 days old) (Charles River Laboratories, Lasalle, Canada) were injected with ceftazidime (3 mg/mouse, Glaxo, Toronto, Canada) 24h before surgery, during the surgery and 24h after. Animals were anesthetized by inhalation of 3% Isoflurane USP (Schein Pharmaceutical, Etobicoke, Canada). Graft sites on the backs of adult male athymic nu/nu mice (42 days old) (Charles River Laboratories, Lasalle, Canada) were prepared by first removing a 2 cm² piece of mouse skin and underlying panniculus carnosus. A silicone Fusenig's chamber was then sutured into the defect (26). Tissue-engineered skins were deposited directly on the mouse dorsal muscle. A cap was used to close the chamber for two weeks after grafting. Three animals were used for each group (RS or ERS) and each timepoint. Mice were euthanized and grafts were harvested for analysis at 2, 4, 7, 14, and 30 days post-transplantation. At the time of implant retrieval, no signs of infection were detected and inflammation was minimal.

Histological analysis. In order to conserve GFP inside human endothelial cells, sections of each graft were fixed in 3.7% formol at room temperature for 2 h, then placed in PBS 10% sucrose at 4° C and finally overnight in PBS 30% sucrose at 4° C as previously described (27). Biopsies were then paraffin-embedded for staining with Masson's trichrome.

Immunohistochemical analysis. A section of each biopsy, fixed as described above, was embedded in OCT compound (Somengen, Edmonton, Canada) and stored at -80°C. Immunohistochemical analysis of harvested tissue were realized on frozen 5 µm or 25 µm sections permeabilized in 100% acetone at -20° C. Primary antibodies reactive with mouse CD31 (1/800, BD Pharmingen, Mississauga, Canada), human CD31 (1/800, Chemicon, Montreal, Canada), mouse red blood cells (1/800, Cedarlane, Hornby, Canada), laminin (1/100, Abcam, Cambridge, MA, USA) or collagen VII (1/200, Chemicon, Montreal, Canada) were used for characterization of vascular and basal membranes profiles. An Alexa-594 or -488 secondary antibody (1/800, Molecular Probes, Eugene, OR, USA), mixed with Hoechst 33258 (1/100) (Sigma) to stain the cell nuclei, was used to detect the primary antibody. Control incubations (replacement of primary antibody with PBS BSA 1%) were performed. All controls were negative. Sections were examined using a Nikon Eclipse E600 fluorescence microscope (Nikon, Melville, NY, USA) or a Nikon C1 laser scanning confocal microscope (Nikon, Mississauga, Canada).

Murine endothelial cell neovascularization evaluation. Murine vascular profiles in the dermal compartment of the skin substitutes were characterized by positive staining with mouse CD31. A total of 3 biopsies per condition were taken on days 2, 4, and 7. Two samples, with the mean of two slides per sample, were analyzed for each triplicate of each group. The grafted dermis's height colonized by murine endothelial cell was measured using Adobe Photoshop CS3 software (Adobe Systems, San Jose, CA, USA) on digital microphotographs taken in 3 random high-power fields.

Human endothelial cell density quantification. RS and ERS samples were weighed, snap frozen and stored at -80°C until use. A 20% homogenate (weight/volume) was prepared using a polytron probe (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) in 4°C cell lysis buffer containing 250 mM Tris (BioRad, Mississauga, ON, Canada) with 0.5% triton X-100 (BioRad) and protease inhibitors (Roche, Mississauga, ON, Canada). After 3 snap freeze thaw cycles, samples were centrifuged at 13,000 g and 20 μl of cleared cell lysate was assayed in triplicate along with a standard curve of firefly luciferase enzyme (Sigma). An Orion II microplate luminometer (Berthold Detection Systems, Pforzheim, Germany) injected 100 μl of D-luciferin substrate (Promega, Madison, WI, USA) with each sample and luminescence was captured over 10 seconds. Data is expressed as relative light units (RLUs) and shows quantitative levels of luciferase activity, which correlates to the human endothelial cell density in each skin equivalent.

Statistical analysis. Differences between values were assessed by bilateral Student's t-test. All data were expressed as mean \pm standard deviation (SD), and overall statistical significance was set at $p < 0.05$. Statistics and graphics were performed using Microsoft Office Excel 2007 software (Microsoft corporation, Issy-les-Moulineaux, France).

2.4. Results

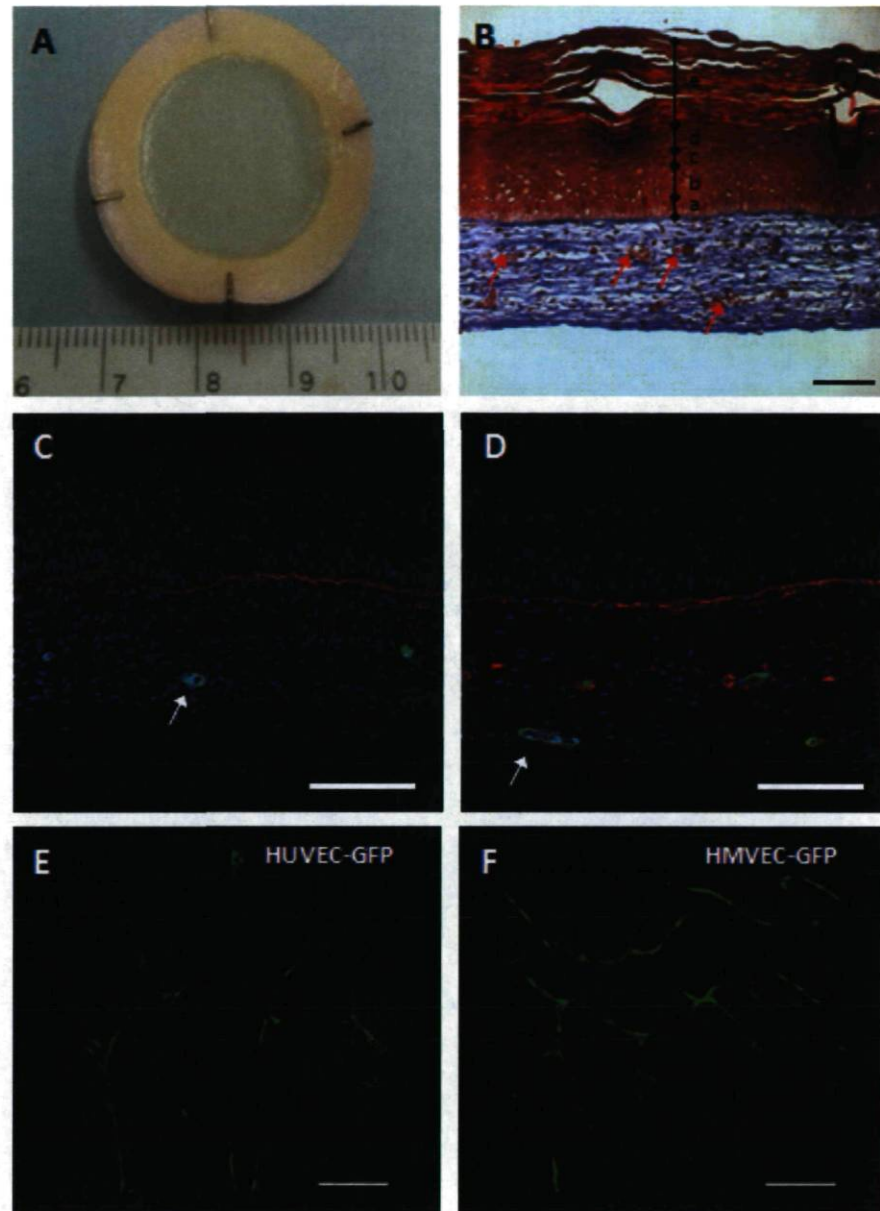


Figure 1. Human ERS characterization before transplantation. A. Macroscopic view of ERS, graduations are in cm. B. Histochemical staining with Masson's trichrome of ERS shows a well-stratified epidermis: stratum basal (a), stratum spinosum (b), stratum granulosum (c), stratum lucidum (d) and stratum corneum (e). Red arrows indicate capillary-like structures (CLS) formed by endothelial cells in a rich collagen dermis. In C + D, dermal and epidermal nuclei are stained in blue by Hoechst, immunohistochemical staining (red) indicates the dermal-epidermal junction in C with collagen VII staining and in (D) basement membranes with laminin staining. White arrows indicate CLS lumen surrounded by GFP+ (green) human endothelial cells. HUVEC (E) or HMVEC (F), in green, were organized in a branched microvascular network parallel to the ERS surface when observed by confocal microscopy. Pictures are representative of two independent experiments, each performed in triplicate. Scale bar = 100 μ m.

Endothelialized reconstructed skin characterization. Transplanted reconstructed skin (without anchorage) had a surface of 2.68 cm² (Fig. 1A) and a thickness of approximately 300 μ m, with an avascular epidermis of 100 μ m (Fig. 1B). After 4 weeks of culture in vitro, the reconstructed skin exhibited a homogeneous, well-developed, stratified and cornified human epidermis (Fig. 1B). The basement membrane components (collagen VII and laminin) were detected at the dermal-epidermal junction, showing a continuous line after maturation in vitro (Fig. 1C,D). In our model, human endothelial cells spontaneously formed capillary-like structures (CLS), as described previously (17, 28). These can be observed in transverse sections of ERS stained with Masson's trichrome (Fig. 1B) and are associated with the expression of basement membrane components like laminin (Fig. 1D) and collagen IV (data not shown), visualized by immunofluorescence analysis. Lumens are well-defined in transverse sections of the ERS (Fig. 1D). Reconstructed skin endothelialized with either HUVEC-GFP⁺ or HMVEC-GFP⁺ both showed the organization of CLS into a complex microvascular network with a branching morphology that seems to be more ramified with microvascular endothelial cells (Fig. 1E,F).

Remodeling of human microvascular network within 4 days after transplantation and development of functional anastomoses between the two microvascular networks. While the ERS included its own intrinsic microvascular system before implantation, the RS is considered as the negative control since it did not contain any human endothelial cell. A complete take of all grafts was observed only 2 days after transplantation. Macroscopically, both RS and ERS appeared to have adhered into underlying murine tissues 4 days after transplantation, but the bottom-side is much more vascularized in the ERS than in the RS (Fig. 2A). Within the graft, human capillaries had a physiological diameter varying between 15 and 20 μ m (Fig. 2B, C, D), forming a horizontal vascular plexus on the dermis. We showed that on day 4, microvessels lined with GFP⁺ human endothelial cells transported murine red blood cells (Fig. 2B). The presence of these cells in human capillaries is a clear demonstration of their functional anastomoses with the host's blood vessels

(inosculation) between 3 and 4 days post-transplantation. This observation was done in all grafted ERS. These human blood-containing vessels were homogeneously distributed in the graft both in the superficial zone of the dermis and in its deeper zone, ensuring an adequate perfusion of the whole graft. The inosculation phenomenon is a physical connection between two functional microvascular networks. Thus, we observed a well-defined co-localization between human and mouse endothelial cells inside the same capillary, often named a chimeric microvessels (29) (Fig. 2C). At the same time, we observed a regression of non-perfused human blood capillaries, apparently due to apoptosis, as indicated by fragmented nuclei detected with Hoechst 33258 staining (30-32). Human endothelial cell nuclei, in non-perfused capillaries, demonstrated a chromatin distribution characteristic of apoptosis (Fig. 2D).

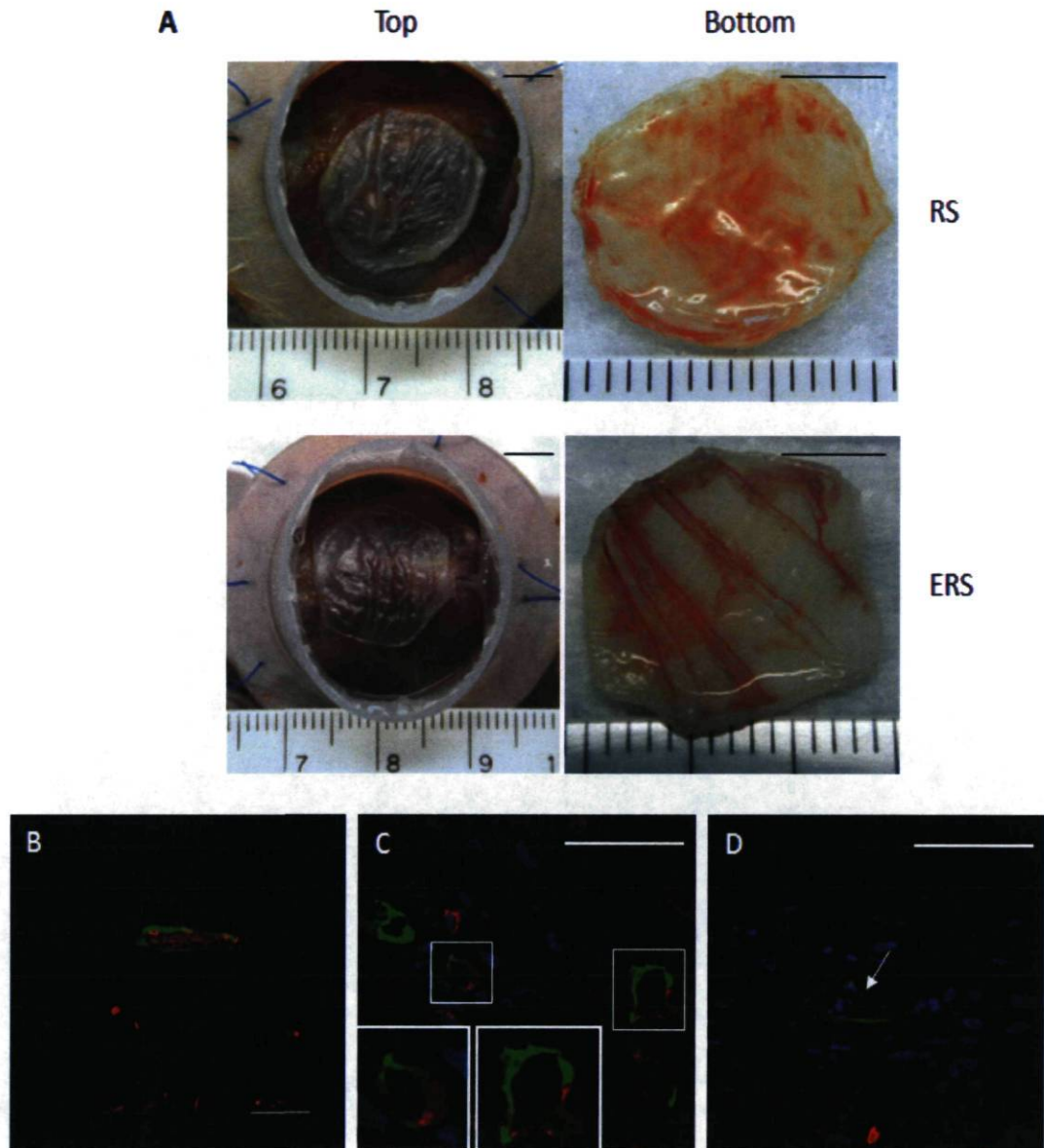


Figure 2. Vascular remodeling characterization of ERS on day 4. **A.** Macroscopic view of both sides of RS and ERS. Note the microvascular network filled with blood on the bottom side of the ERS. Scale bar = 500 μ m. **B.** Inosculation between human and murine vasculatures was verified with the presence of murine red blood cells (red) in CLS surrounded by HUVEC-GFP+ (green). **C.** The functional link between the two microvascular networks involved chimeric microvessels: composed of both murine endothelial cells immunostained with a specific antibody against murine CD31 (red) and HUVEC-GFP+ (green). Nuclei are blue. **D.** Murine red blood cells are stained in red, HUVEC-GFP+ are green and nuclei are stained in blue by Hoechst 33258. The white arrow in the empty human capillary indicates condensed nuclei which is a typical indicator of apoptosis. Due to the level of magnification, B, C and D only display the dermal compartment of ERS. Pictures are representative of two independent experiments, each performed in triplicate. Scale bar = 50 μ m.

Medium-term regression of human endothelial cells. Human endothelial cells stably expressing luciferase allowed for quantitative analysis of endothelial cell density in biopsies harvested over time. Remodeling of the human microvascular network was analyzed over a 1 month period. Luciferase assay values from RS samples yielded background levels throughout this whole period. A significant decrease of the ERS luciferase values was observed between samples taken at the time of transplantation and those taken 2 days after, indicating a 7-fold reduction in the total number of living human endothelial cells present in the graft between these 2 time-points (Fig. 3; $p = 0.0006$). Total endothelial cell number, as evaluated by luciferase assay values, stayed stable for the first week and began to decrease with a complete loss of detection after one month post-surgery. These results were supported by in situ fluorescence, since human endothelial cells also stably expressed GFP and by immunostaining using a specific antibody against human CD31.

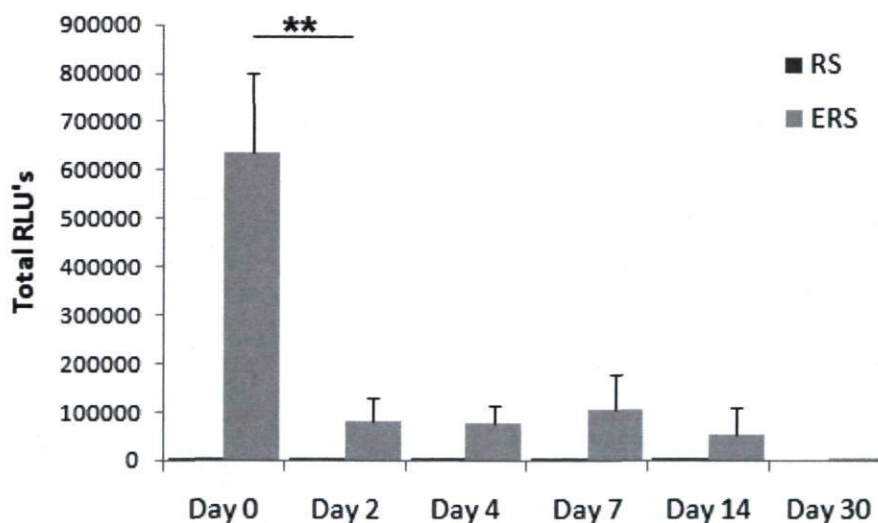


Figure 3. Quantification of human endothelial cell density in skin substitutes over time. HUVEC stably expressed luciferase. Luciferase activity of biopsies ($n=3$) from each group (RS and ERS) were quantified using a luminometer. Luciferase activity was reported as total relative light units (Total RLU's). Values are given as means \pm SD. **: $p < 0.001$.

Neovascularization of the human skin substitute by host endothelial cells.

Neovascularization was quantified by image analysis of biopsy sections, by measuring the dermal thickness colonized by murine endothelial cells visualized with a murine specific marker, CD31. Epidermal thickness was not taken into account in data collection because it is an avascular compartment. We found that 2 days after transplantation, no murine endothelial cells could be detected in the implants, for both RS and ERS (Fig. 4A). The process of neovascularization took more than 2 days to occur in the skin substitute (Fig. 4B). However, after day 4, approximately 80% of ERS dermis thickness was colonized by murine microvessels, whereas this proportion was reduced to approximately 50% in RS, $p < 0.001$. Neovascularization started with the process of capillary growth in the lowermost portion of the dermis from the vascular bed of the wound. Indeed, murine endothelial cells mostly invaded the wound site from its bed but not at the margin, ensuring an adequate perfusion of the entire surface of the graft. These newly developed vessels were oriented toward the graft's epidermal layer and ascended linearly with almost no mutual intersections for ERS, covering the area up to the superficial zone of the dermis, whereas they partly formed serpentine vascular networks in RS and covered only up to the intermediate zone. One week after transplantation the entire thickness of the dermal layer exhibited a dense and complex network of newly formed microvessels for both RS and ERS and in the case of ERS grafts integrated human endothelial capillaries. Quantitative analysis of immunohistochemical data demonstrated that our model of ERS increased the neovascularization speed of murine CD31-positive vessels in the dermal layer of the grafts compared to control RS, although after 1 week both RS and ERS were similarly colonized.

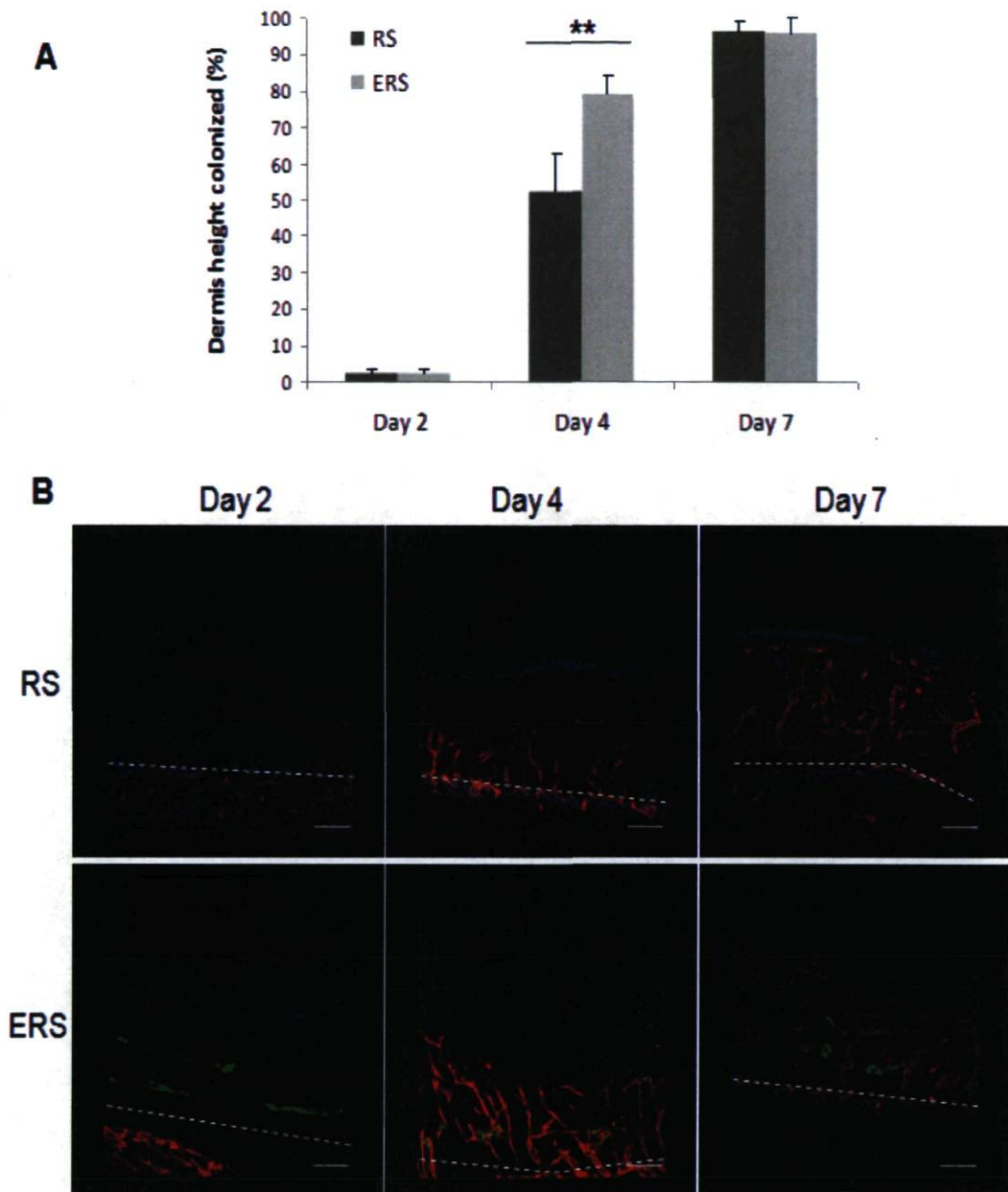


Figure 4. ERS promotes neovascularization of the human skin substitute by murine endothelial cells compared to control RS. **A.** Dermis thickness colonized by murine endothelial cells was measured on RS and ERS for 1 week. Results were expressed as a percentage of dermis height colonized. **: $p < 0.001$ **B.** Both murine and human vascular profiles were visualized over time by confocal microscopy of RS and ERS after immunohistochemical staining of murine endothelial cells with a specific antibody against murine CD31 (red). HUVEC-GFP are green and nuclei stained with hoechst are blue. White dotted lines indicate the substitute-mouse tissue junction. Scale bar = 100 μm .

2.5. Discussion

Most of the time, transplantations fail because of the lack of microvascularization. Vascularized grafts would contribute to a better engraftment, long-term survival and functionality of tissue substitutes.

Previous work conducted in our laboratory led to the development of the first endothelialized human tissue-engineered skin onto a collagen biopolymer in which a network of capillary-like tubes was formed (17). In this present study, our aim was to develop an easy to handle model of endothelialized reconstructed skin that promotes the spontaneous *in vitro* formation of a capillary-like network exclusively by co-culture of human dermal fibroblasts, endothelial cells (HUVEC or HMVEC) and keratinocytes without any extrinsic scaffold or biomaterial, different from our previous model. Besides, our substitutes could be totally autologous for clinical application. In our model, cells secrete their own extracellular matrix (ECM), creating a physiological microenvironment in which 3D cell-cell and cell-ECM interactions led to a homogenous distribution of endothelial cells which organized into a microvascular network throughout a large 350-400 μm thick substitute. As it is, this substitute's thickness can be compared to native human skin split-thickness grafts used in the clinical arena, which can be categorized as thin (thin (130-300 μm), intermediate (300-460 μm) or thick (460-760 μm).

We assumed that creating a tissue-engineered skin substitute comprising its own intrinsic blood supply would improve graft vascularization after transplantation. Thus, our study presents its *in vivo* evaluation after grafting them on athymic mice. Foremost, the rapid and high quality take for all transplants, endothelialized or not, is to be noted. Then, the human microvascular network generated *in vitro*, formed with GFP-positive endothelial cells, rapidly became functionally continuous with the host's vasculature in less than 96h post-surgery. Red blood cells were found in the lumen of capillaries lined by human cells and indicate the beginning of efficacious blood circulation. The establishment of a blood supply in the graft appears to depend on the growth of host vessels into the graft's dermis, thus establishing observable chimeric endothelial channels as early as day 4, as has been established by other studies with human skin when grafted on athymic mice (33, 34). It can be assumed

that a delay is needed for the murine vessels to cross through the human dermis and develop functional links with its microvascular network. Complete neovascularization of our reconstructed skin is similar with previous results from our laboratory with another endothelialized skin (18), but much faster than observed in other models. Until now, numerous studies have demonstrated that over a period of several weeks host blood vessels invaded engineered tissues composed of synthetic biodegradable polymers (35-39).

The persistence of human endothelial cells was studied via the stable expression of luciferase and thus we obtained a quantitative evaluation of the vascular remodeling of our capillary-like network after transplantation visualized with human endothelial cells GFP expression. The density of human endothelial cells in ERS drastically decreased between 0 and 2 days, which may be due to a degeneration of supernumerary vessels to reach a physiological density. A clear decrease in human endothelial cell density was displayed during the first week post-surgery, but a statistically significant difference was not observed. Observations suggested that numerous capillary sprouts from the wound bed formed functional anastomoses with most of human capillaries. However, we had noted a regression by apoptosis of rare non-perfused capillaries. Actually, although initially independent of the circulation, our microvascular system is later shaped by forces, such as shear stress, generated by circulation (40). Our observations are consistent with other data indicating that reduction or absence of shear stress is associated with endothelial cell apoptosis leading to vessel regression (41-44). Finally, 1 month post-surgery, human endothelial cells had totally disappeared.

Complete replacement of donor graft vasculature by endothelial cells from the recipient along preexisting channels is a key mechanism for skin graft revascularization. Our skin substitute was neovascularized and remodeled with the host's own endothelial cells. Murine angiogenic blood vessels originated in the wound bed and were directed linearly towards the epidermal layer of the graft. The period required for the ingrowth of new host blood vessels into the ERS was dramatically shortened compared to RS. Although no murine endothelial cells were found in the transplanted human dermis, neither in RS nor ERS at day 2 post-surgery,

50% of the RS human dermis was neovascularized by murine endothelial cells versus almost 80% in the ERS at day 4. One week post-transplantation, 100% of the dermis was colonized by host endothelial cells, in both RS and ERS. Thus, the adequate perfusion of the graft was faster in the ERS due to the prefabricated microvascular network. A number of studies have shown that cultured endothelial cells exerted an angiogenic effect *in vivo* at the graft site and promoted wound healing (45, 46). Thus, we may assume that human endothelial cells contained in our substitute secreted cytokines and growth factors that had paracrine functions, leading to murine endothelial cell proliferation, elongation and orientation.

In summary, we have demonstrated that graft revascularization was achieved by a dual process of direct connection between the graft/host vasculatures and ingrowth of host vessels into the graft. The angiogenic effect induced by an intrinsic microvascular network constructed *in vitro* in the skin substitute promoted faster vascularization of the graft. In our case, our dermis thickness was only 200 μm , so the beneficial angiogenic effect was limited. However, in the case of thicker skin substitutes, the advantage will be considerable and will result in a more rapid and reliable engraftment.

Clinical application perspectives are very exciting for our ERS since our model also paves the way to engineer larger and thicker tissues thanks to their pre-vascularization. Our endothelialized reconstructed tissues, with more physiologically relevant complexity, will enhance the success of transplantations used to treat deep burns, ulcers and other tissue loss due to disease or trauma.

Finally, the possibility to build *in vitro* relevant models of vascularized tissues closer to physiological reality provides an interesting and effective tool for pre-clinical assays of pharmaceutical agents and for fundamental research studies on physiologic and physiopathologic vasculatures. The investigation of angiogenesis induced by skin cancer during its progression is another avenue where our ERS could be a powerful tool.

2.6. Acknowledgments

We wish to thank Mrs Anne-Marie Moisan and Nathalie Tremblay for their excellent technical assistance, and Dr Dan Lacroix for his careful reading of this manuscript. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (MOP-14364).

2.7. Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

2.8. References

1. Auger, F.A., Lacroix, D., and Germain, L. Skin substitutes and wound healing. *Skin Pharmacol Physiol* 22, 94, 2009.
2. Folkman, J., and Hochberg, M. Self-regulation of growth in three dimensions. *J Exp Med* 138, 745, 1973.
3. Laschke, M.W., Harder, Y., Amon, M., Martin, I., Farhadi, J., Ring, A., Torio-Padron, N., Schramm, R., Rucker, M., Junker, D., Haufel, J.M., Carvalho, C., Heberer, M., Germann, G., Vollmar, B., and Menger, M.D. Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes. *Tissue Eng* 12, 2093, 2006.
4. Cassell, O.C., Hofer, S.O., Morrison, W.A., and Knight, K.R. Vascularisation of tissue-engineered grafts: the regulation of angiogenesis in reconstructive surgery and in disease states. *Br J Plast Surg* 55, 603, 2002.
5. Kannan, R.Y., Salacinski, H.J., Sales, K., Butler, P., and Seifalian, A.M. The roles of tissue engineering and vascularisation in the development of micro-vascular networks: a review. *Biomaterials* 26, 1857, 2005.
6. Rivron, N.C., Liu, J.J., Rouwkema, J., de Boer, J., and van Blitterswijk, C.A. Engineering vascularised tissues in vitro. *Eur Cell Mater* 15, 27, 2008.
7. Bouhadir, K.H., and Mooney, D.J. Promoting angiogenesis in engineered tissues. *J Drug Target* 9, 397, 2001.
8. Sheridan, M.H., Shea, L.D., Peters, M.C., and Mooney, D.J. Bioabsorbable polymer scaffolds for tissue engineering capable of sustained growth factor delivery. *J Control Release* 64, 91, 2000.
9. Tabata, Y., Miyao, M., Yamamoto, M., and Ikada, Y. Vascularization into a porous sponge by sustained release of basic fibroblast growth factor. *J Biomater Sci Polym Ed* 10, 957, 1999.
10. Perets, A., Baruch, Y., Weisbuch, F., Shoshany, G., Neufeld, G., and Cohen, S. Enhancing the vascularization of three-dimensional porous alginate scaffolds by incorporating controlled release basic fibroblast growth factor microspheres. *J Biomed Mater Res A* 65, 489, 2003.

11. Supp, D.M., Bell, S.M., Morgan, J.R., and Boyce, S.T. Genetic modification of cultured skin substitutes by transduction of human keratinocytes and fibroblasts with platelet-derived growth factor-A. *Wound Repair Regen* 8, 26, 2000.
12. Supp, D.M., and Boyce, S.T. Overexpression of vascular endothelial growth factor accelerates early vascularization and improves healing of genetically modified cultured skin substitutes. *J Burn Care Rehabil* 23, 10, 2002.
13. Supp, D.M., Karpinski, A.C., and Boyce, S.T. Vascular endothelial growth factor overexpression increases vascularization by murine but not human endothelial cells in cultured skin substitutes grafted to athymic mice. *J Burn Care Rehabil* 25, 337, 2004.
14. Supp, D.M., Supp, A.P., Bell, S.M., and Boyce, S.T. Enhanced vascularization of cultured skin substitutes genetically modified to overexpress vascular endothelial growth factor. *J Invest Dermatol* 114, 5, 2000.
15. Schechner, J.S., Crane, S.K., Wang, F., Szeglin, A.M., Tellides, G., Lorber, M.I., Bothwell, A.L., and Pober, J.S. Engraftment of a vascularized human skin equivalent. *FASEB J* 17, 2250, 2003.
16. 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. In vivo formation of complex microvessels lined by human endothelial cells in an immunodeficient mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9191, 2000.
17. Black, A.F., Berthod, F., L'Heureux, N., Germain, L., and Auger, F.A. In vitro reconstruction of a human capillary-like network in a tissue-engineered skin equivalent. *FASEB J* 12, 1331, 1998.
18. Tremblay, P.L., Hudon, V., Berthod, F., Germain, L., and Auger, F.A. Inosculation of tissue-engineered capillaries with the host's vasculature in a reconstructed skin transplanted on mice. *Am J Transplant* 5, 1002, 2005.
19. Auger, F.A., Lopez Valle, C.A., Guignard, R., Tremblay, N., Noel, B., Goulet, F., and Germain, L. Skin equivalent produced with human collagen. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 31, 432, 1995.
20. Germain, L., Rouabhia, M., Guignard, R., Carrier, L., Bouvard, V., and Auger, F.A. Improvement of human keratinocyte isolation and culture using thermolysin. *Burns* 19, 99, 1993.
21. Tremblay, P.L., Berthod, F., Germain, L., and Auger, F.A. In vitro evaluation of the angiostatic potential of drugs using an endothelialized tissue-engineered connective tissue. *J Pharmacol Exp Ther* 315, 510, 2005.
22. Ramezani, A., Hawley, T.S., and Hawley, R.G. Lentiviral vectors for enhanced gene expression in human hematopoietic cells. *Mol Ther* 2, 458, 2000.
23. Yoshimitsu, M., Sato, T., Tao, K., Walia, J.S., Rasaiah, V.I., Sleep, G.T., Murray, G.J., Poeppl, A.G., Underwood, J., West, L., Brady, R.O., and Medin, J.A. Bioluminescent imaging of a marking transgene and correction of Fabry mice by neonatal injection of recombinant lentiviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16909, 2004.
24. Auger, F.A., Remy-Zolghadri, M., Grenier, G., and Germain, L. A truly new approach for tissue engineering: the LOEX self-assembly technique. *Ernst Schering Res Found Workshop*, 73, 2002.

25. Auger, F.A., Remy-Zolghadri, M., Grenier, G., and Germain, L. Review: The Self-Assembly Approach for Organ Reconstruction by Tissue Engineering. *e-biomed: The Journal of Regenerative Medicine* 1, 75, 2000.
26. Worst, P.K., Valentine, E.A., and Fusenig, N.E. Formation of epidermis after reimplantation of pure primary epidermal cell cultures from perinatal mouse skin. *J Natl Cancer Inst* 53, 1061, 1974.
27. Kusser, K.L., and Randall, T.D. Simultaneous detection of EGFP and cell surface markers by fluorescence microscopy in lymphoid tissues. *J Histochem Cytochem* 51, 5, 2003.
28. Hudon, V., Berthod, F., Black, A.F., Damour, O., Germain, L., and Auger, F.A. A tissue-engineered endothelialized dermis to study the modulation of angiogenic and angiostatic molecules on capillary-like tube formation in vitro. *Br J Dermatol* 148, 1094, 2003.
29. Nor, J.E., Peters, M.C., Christensen, J.B., Sutorik, M.M., Linn, S., Khan, M.K., Addison, C.L., Mooney, D.J., and Polverini, P.J. Engineering and characterization of functional human microvessels in immunodeficient mice. *Lab Invest* 81, 453, 2001.
30. Nagata, S. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* 256, 12, 2000.
31. Robertson, J.D., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. Review: nuclear events in apoptosis. *J Struct Biol* 129, 346, 2000.
32. Saraste, A. Morphologic criteria and detection of apoptosis. *Herz* 24, 189, 1999.
33. Boyce, S.T., and Warden, G.D. Principles and practices for treatment of cutaneous wounds with cultured skin substitutes. *Am J Surg* 183, 445, 2002.
34. Young, D.M., Greulich, K.M., and Weier, H.G. Species-specific in situ hybridization with fluorochrome-labeled DNA probes to study vascularization of human skin grafts on athymic mice. *J Burn Care Rehabil* 17, 305, 1996.
35. Ishihara, T., and Ono, T. Analysis of the vascularity of an atelocollagen sponge substitute dermis in the human. *J Dermatol* 28, 360, 2001.
36. Krejci, N.C., Cuono, C.B., Langdon, R.C., and McGuire, J. In vitro reconstitution of skin: fibroblasts facilitate keratinocyte growth and differentiation on acellular reticular dermis. *J Invest Dermatol* 97, 843, 1991.
37. Mikos, A.G., Sarakinos, G., Lyman, M.D., Ingber, D.E., Vacanti, J.P., and Langer, R. Prevascularization of porous biodegradable polymers. *Biotechnol Bioeng* 42, 716, 1993.
38. Mooney, D.J., Kaufmann, P.M., Sano, K., McNamara, K.M., Vacanti, J.P., and Langer, R. Transplantation of hepatocytes using porous, biodegradable sponges. *Transplant Proc* 26, 3425, 1994.
39. Supp, D.M., Wilson-Landy, K., and Boyce, S.T. Human dermal microvascular endothelial cells form vascular analogs in cultured skin substitutes after grafting to athymic mice. *FASEB J* 16, 797, 2002.
40. Langille, B.L. Arterial remodeling: relation to hemodynamics. *Can J Physiol Pharmacol* 74, 834, 1996.
41. Dimmeler, S., and Zeiher, A.M. Endothelial cell apoptosis in angiogenesis and vessel regression. *Circ Res* 87, 434, 2000.

42. Fulton, D., Gratton, J.P., McCabe, T.J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T.F., Papapetropoulos, A., and Sessa, W.C. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399, 597, 1999.
43. Hermann, C., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. Shear stress inhibits H₂O₂-induced apoptosis of human endothelial cells by modulation of the glutathione redox cycle and nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 3588, 1997.
44. Resnick, N., and Gimbrone, M.A., Jr. Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression. *FASEB J* 9, 874, 1995.
45. Soejima, K., Negishi, N., Nozaki, M., and Sasaki, K. Effect of cultured endothelial cells on angiogenesis in vivo. *Plast Reconstr Surg* 101, 1552, 1998.
46. Chen, X. [Influence of mixed grafting of vascular endothelial cells and fibroblasts on the angiogenesis of artificial dermis]. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi* 22, 452, 2006.

2.9. Reprint author

Dr François A. Auger

CMDGT/LOEX, Aile-R

Centre hospitalier affilié universitaire de Québec

1401, 18e rue

Québec, QC G1J 1Z4

Canada

Phone : 418 990 8255 #1662

Fax : 418 990 8248

francois.auger@chg.ulaval.ca

Chapitre 3 : Développement d'un substitut cutané humain 3D microvascularisé pour étudier la biologie des mélanomes

Ce chapitre reproduit le texte intégral d'un article soumis au *Journal of Investigative Dermatology* en juin 2010. J'ai développé le projet et le modèle, structuré et écrit le document. Todd Galbraith a réalisé la quantification de l'activité luciférase contenue dans les biopsies et a rédigé la partie du matériel et méthodes s'y rapportant. Drs Auger et Huot ont relu ce manuscrit.

1. Résumé

Les mélanomes cutanés sont très agressifs et capables de métastaser à distance où ils deviennent classiquement résistants à l'arsenal chimiothérapeutique actuellement disponible. Les déterminants moléculaires précis responsables de leur progression et de leurs propriétés de résistance ne sont pas encore connus, notamment en raison de l'absence de modèles expérimentaux qui miment correctement la biologie humaine des mélanomes. Nous avons donc mis au point un modèle de peau reconstruite humaine microvascularisée, dépourvue de matériau exogène, dans laquelle l'organisation tridimensionnelle (3D) de la peau native est reproduite. Ce modèle assure la mise en place d'interactions complexes entre les cellules cancéreuses et leur environnement 3D, à la fois cellulaire et matriciel. Des lignées cellulaires humaines de mélanomes issus de sites primaires ou de sites métastatiques ont été ajoutées à ce modèle 3D. Nos résultats démontrent que les profils de croissance et d'invasion ainsi que l'organisation histologique et le potentiel invasif de ces lignées correspondent à ceux observés *in situ* chez l'humain. Ainsi, la capacité des cellules cancéreuses à traverser la jonction dermo-épidermique est corrélée avec leur potentiel métastatique. De plus, un puissant effet pro-angiogénique a été détecté pour une lignée métastatique agressive sécrétant du VEGF. Notre modèle *in vitro* de substitut cutané humain microvascularisé promet d'être un modèle polyvalent et efficace pour étudier la progression cancéreuse, mais aussi pour cribler des médicaments potentiellement anticancéreux.

2. Article

Development of a tridimensional microvascularized human skin substitute to study melanoma biology

Laure Gibot¹, Todd Galbraith¹, Jacques Huot², François A. Auger^{1†}

¹ Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale/LOEX, Centre de recherche FRSQ du CHA Universitaire de Québec, Département de Chirurgie, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec, Canada

² Le Centre de recherche en cancérologie de l'Université Laval, and CRCHUQ, L'Hôtel-Dieu de Québec, 9 rue McMahon, Québec, G1R 2J6, Canada.

† Corresponding author

Dr François A. Auger

CMDGT/LOEX, Aile-R

Centre hospitalier affilié universitaire de Québec

1401, 18e rue

Québec, QC G1J 1Z4

Canada

Phone : 418 990 8255 #1662

Fax : 418 990 8248

francois.auger@chg.ulaval.ca

Short title

Melanoma development in human skin substitute

Abbreviations

3D: Three-dimensional; BM: Basement membrane; ECM: Extracellular matrix; MRS: Microvascularized reconstructed skin; TMRS: Tumor microvascularized reconstructed skin

2.1. Abstract

Cutaneous malignant melanomas are highly invasive. They metastasize to distant sites and are typically resistant to available therapy. The precise molecular determinants responsible for melanoma progression and chemo-resistance are not yet known, in part due to lack of pertinent experimental models that mimic human melanoma progression. Accordingly, we developed a complex human microvascularized reconstructed skin substitute devoid of any exogenous material in which the organized 3D architecture of the native skin is reproduced. This model provides the structure that enables the interactions between cancer cells and their three-dimensional (3D) micro-environment. Human melanoma cell lines derived from primary or metastatic sites were added to this 3D model. Our results demonstrate that growth, invasiveness, histological features and aggressiveness of melanoma cells applied in our skin substitute model closely correspond to those that occur in patients. In particular, the ability of melanoma cells to cross the dermal-epidermal junction correlates with their metastatic potential. In addition, a potent angiogenic effect was detected for an aggressive metastatic cell line that produces VEGF. We conclude that the in vitro human tumor microvascularized reconstructed skin substitute promises to be a versatile and efficient model to investigate cancer progression and to screen new anticancer drugs.

2.2. Introduction

Melanoma incidence increased dramatically during the last 30 years, mainly because of intense sun exposure and use of tanning booth for leisure purpose. An estimated 8,650 deaths from melanoma had occurred in 2009 in the USA and new cases were approximately 68,720 (American Cancer Society, 2009). Metastatic melanomas are particularly aggressive since the five-year relative survival rates is only 15.5%. Understanding the stepwise progression from primary melanoma to metastases requires new models allowing experimental investigations of its etiology and biology (Herlyn and Fukunaga-Kalabis, 2010).

Melanoma is currently studied in vitro using cell cultures and in vivo using mammals or non vertebrate animals that include zebrafish (Patton et al., 2005) and

genetically modified or not mice (Zaidi et al., 2008). Obviously, the flat and hard plastic or glass substrates that are commonly used in 2D cell culture are not representative of the cellular environment found in whole organisms. Tissue-specific architecture, mechanical and biochemical cues and cell–cell communication are lost under such simplified conditions and may lead to highly biased conclusions (Pampaloni et al., 2007). In fact, the role of dimensionality is critical for cellular phenotype and function. Non-transgenic approaches have been developed using subcutaneous, orthotopic, intra-veinous, intra-cardiac xenografts of melanoma cells, human skin biopsies and reconstructed skin (Becker et al., 2009; Satyamoorthy et al., 1999). Transgenic approaches consist in specifically modifying the animal genome to interfere directly with signaling pathways that are implicated in melanomagenesis. These models allow to investigate the role of physical or chemical induction in animals carrying pre-determined genetic alterations. Nevertheless, it should be kept in mind that the mouse skin is not identical to the human skin.

Organotypic 3D cell cultures represent an alternative to animal models to study the mechanisms underlying melanoma progression in a relevant human context. Moreover, these 3D models can reduce the number of animals used for drug screening by pharmaceutical industry, which is a plus value for both ethical and economical reasons.

In our laboratory, we previously developed a 3D model of human microvascularized reconstructed skin (MRS) substitute devoid of any exogenous material (Gibot et al., 2010). In this model, the cells secreted their own extracellular matrix (ECM), promoting heterotypic interactions in a physiological context between keratinocytes, dermal fibroblasts and endothelial cells. In addition, keratinocytes formed a well-differentiated epidermis, separated from the dermis containing a functional microvascular network by a complex dermo-epidermal junction. In this work, we describe a modified MRS that constitutes a physiologically relevant 3D model of tumor microvascularized reconstructed human skin substitute (TMRS) allowing to study the biology and behavior of melanoma cells derived from both primary and metastatic sites.

2.3. Results

Typical histological features and invasive potential of primary and metastatic melanoma cells lines are maintained in 3D human tumor microvascularized reconstructed skin substitute. After 2 weeks of culture at the air/liquid interface, A375 and SK MEL 28 melanoma cells derived from primary sites formed respectively large compact and small aggregates within the basal layer of the reconstructed epidermis. However, they do not spread into the dermis (Figure 1A). Interestingly, histological sections of A375 TMRS stained with hematoxylin and eosin showed morphological cellular shapes characteristic of necrosis all over the large and compact cysts (Figure 2A). In addition, apoptosis took place within these cysts (Figure 2B). Strikingly, these processes were uniformly distributed throughout the tumor sections and not localized in central area of the nest. A375 cells had an important proliferation rate (Figure S1) thus their metabolism is particularly active. As *in vivo*, necrosis and apoptosis could be due to mass transport restriction, toxic metabolites accumulation and lack of nutrient penetration through the whole large cyst formed by these highly proliferative cells. These phenomena were not observed in smaller cysts made of less proliferative SK MEL 28 cells (data not shown). Importantly and in contrast with non-metastatic melanomas, metastatic melanoma cells RPMI 7951 and Malme 3M scattered as single cells not visually detectable within the 3D TMRS. In the absence of melanoma cells, continuous immunostaining of type VII collagen contained in the dermo-epidermal junction confirmed the presence of an intact, preserved basement membrane (Figure 1B). Similar results were obtained in the presence of non-metastatic melanoma cells, where intra-epidermally growing cysts were bordered by an intact basement membrane but did not disintegrate it. In contrast, the ability of metastatic melanoma cells to cross the epidermal basement membrane coincided with a local degradation of native collagen type VII, leading to a vertical invasion and migration through the surrounding dermis. This model reflects the anatomical structure encountered in cutaneous melanoma *in vivo* and mimics the well-defined invasion steps of melanomas. In addition, cellular morphology and proliferative properties of these melanoma cell lines were shown to be adequately modulated by their interactions with adjacent skin cells, basement

membrane components and extracellular matrix in the 3D culture in TMRS, which was not the case in 2D culture on plastic dishes (Supplementary Materials).

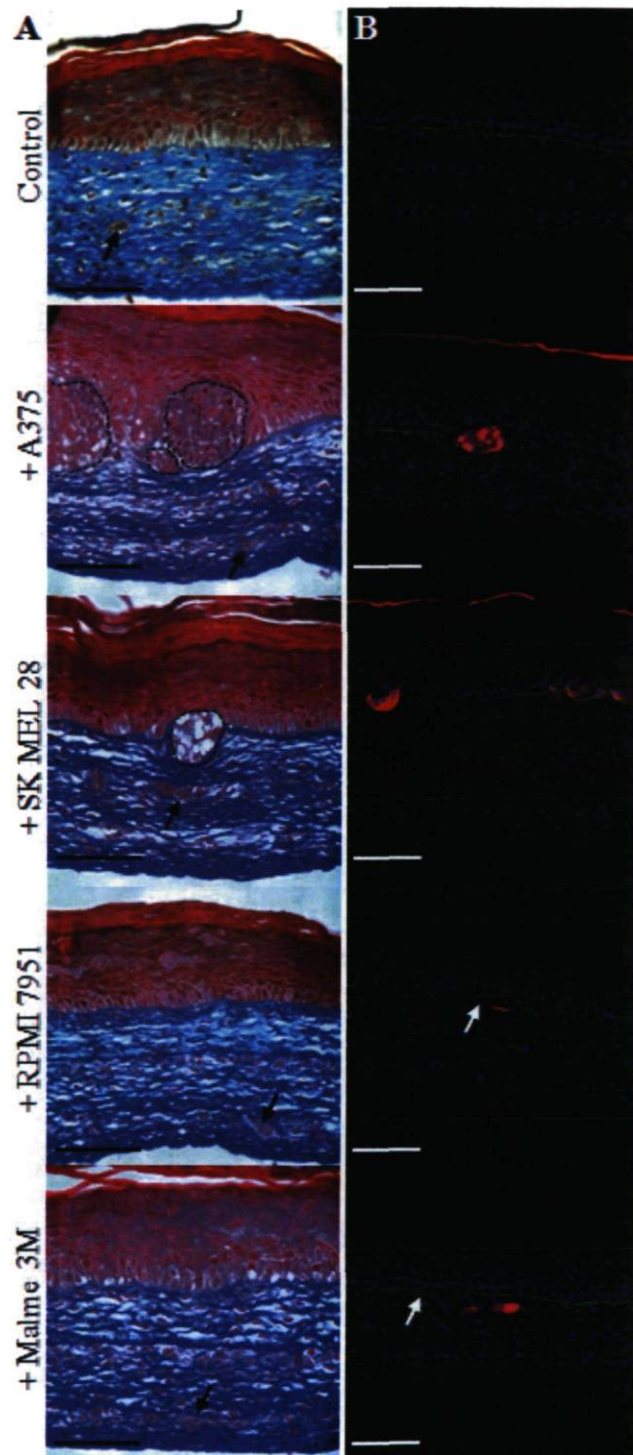


Figure 1. Histological features of melanoma grown in 3D tumor microvascularized reconstructed skin substitute. A. Histological staining with Masson's trichrome of MRS (Control) and TMRS shows a well-stratified epidermis and capillary-like structures, indicated by black arrows, formed by

endothelial cells in a rich collagen dermis. Cells are stained in red and collagens in blue. Melanoma cells derived from primary sites (A375, SK MEL 28) proliferate in expanding cysts, indicated by black dotted lines, whereas melanoma cells derived from metastatic site are not visible (RPMI 7951, Malme 3M). **B.** Cross-section of MRS and TMRS are observed by confocal microscopy. Nuclei are blue, immunohistochemical staining (green) indicates the collagen VII in dermo-epidermal junction while Ds Red⁺ melanoma cells are red. White arrows indicate local degradation of the basement membrane by invasive metastatic melanoma cells. Scale bar = 100 μm . Pictures are representative of three independent experiments, each performed in triplicate.

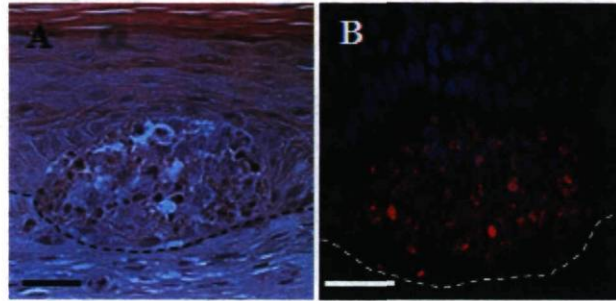


Figure 2. Cell death detection in large A375 cysts. **A.** Histological sections stained with Hematoxylin and Eosin reveal necrosis in A375 cyst. **B.** DNA cleavage and chromatin condensation associated with apoptosis are detected in A375 cells undergoing programmed cell death (red). Nuclei are stained in blue by Hoechst. Pictures are representative of three independent experiments, each performed in triplicate. Scale bar = 50 μm . Dotted lines indicate the dermo-epidermal junction.

RPMI 7951 metastatic melanoma cell line, a high VEGF producer, exerts a potent pro-angiogenic effect. Since the 3D TMRS developed by our laboratory contained a functional microvascular network, we were able to characterize tumor angiogenesis induced by non-invasive and invasive melanoma cell lines. As endothelial cells stably expressed luciferase their density was quantify within the microvascularized reconstructed skin using enzymatic activity of this protein (Figure 3A). Aggressive metastatic melanoma cell line RPMI 7951 displayed a potent and statistically significant pro-angiogenic effect on normal human endothelial cells. The others melanoma cell lines did not possess pro- or anti-angiogenic notable effect on the microvascular network since its density was not different from the MRS. The RPMI 7951 melanoma cell line pro-angiogenic effect could be explained by the fact that this cell line produces a high level of VEGF as determined by ELISA assays (Figure 3B). On the other hand, the other metastatic melanoma cell line did not express significant VEGF levels.

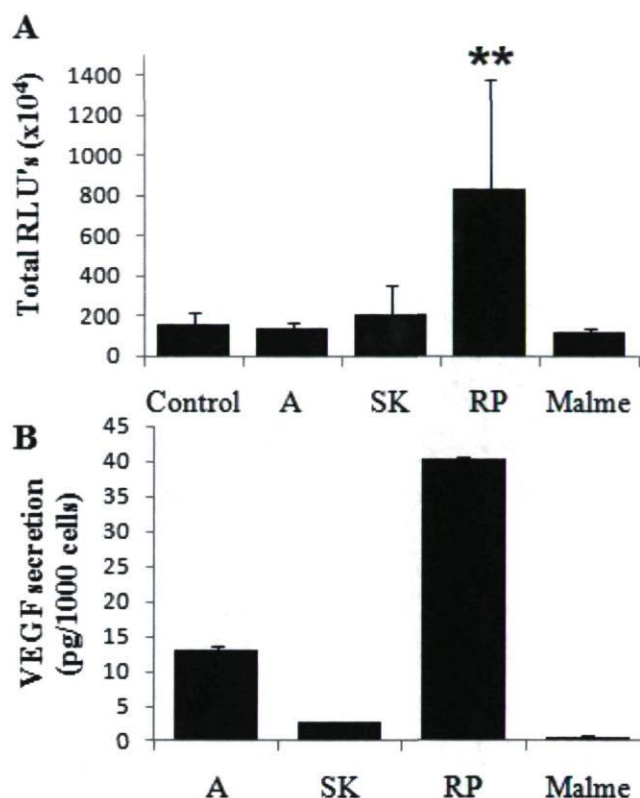


Figure 3. RPMI 7951 metastatic melanoma cell line, a high VEGF producer, exerts a potent pro-angiogenic effect in tumor microvascularized reconstructed skin substitute. **A.** Quantification of human endothelial cell density in TMRS. Control = MRS, A = A375, SK = SK MEL 28, RP = RPMI 7951, Malme = Malme 3M. HUVEC stably expressed luciferase. Luciferase activity was reported as total relative light units (Total RLU's). **B.** VEGF melanoma cells secretion was assayed using an ELISA assay and normalized to 1000 cells. The amount of VEGF in pg was calculated from a human recombinant VEGF standard curve, with a sensitivity of 16 pg/ml. Values are given as means \pm SD. **: $p < 0.001$. Data are representative of three independent experiments, each performed in triplicate.

RPMI 7951 metastatic melanoma cell line pro-angiogenic effect is associated with microvascular network re-organization. Given that endothelial cells incorporated in TMRS expressed GFP, we were able to visualize their organization within the model (Figure 4A). We found that in control condition, endothelial cells were organized onto a 3D microvascular network parallel to the MRS surface. The addition of melanoma did not modify this basic organization. However, the microvascular network within RPMI 7951 TMRS was more complex, branched, dense and chaotic. Distance between forks was smaller than in control and seemed more dilated. Cross-section of RPMI 7951 TMRS allowed us to visualize

endothelial cells migrating toward a single metastatic melanoma cell within the dermis (Figure 4B). These results indicate that the TMRS allows to visualize the pro-angiogenic effect of high VEGF producing melanoma cells and to ascertain the interactions between them and endothelial cells of the normal microvascular network.

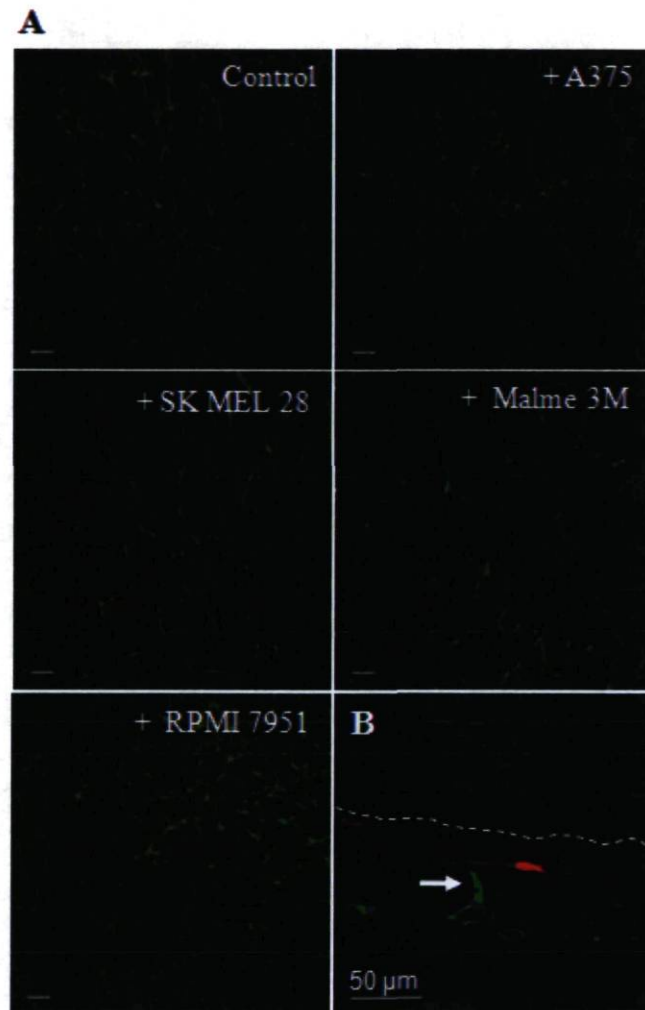


Figure 4. RPMI 7951 metastatic melanoma cell line, but not other melanoma cell lines, modulates microvascular network organization in tumor microvascularized reconstructed skin substitute. A. GFP+ HUVEC (green) are organized in a branched microvascular network parallel to the MRS surface when observed by confocal microscopy. Scale bar = 100 μ m. **B.** Cross-section of Ds Red+ RPMI 7951 TMRS. Nuclei are blue, metastatic melanoma cells are red and GFP+ HUVEC are green. White dotted lines indicate the dermo-epidermal junction. White arrow indicates normal endothelial cells migrating toward metastatic melanoma cell. Scale bar = 50 μ m. Pictures are representative of three independent experiments, each performed in triplicate.

2.4. Discussion

We generated a human microvascularized reconstructed skin substitute that is original and unique since it is composed of a well-differentiated epidermis and a dermal layer, devoid of any exogenous scaffold, containing a functional microvascular network. To our knowledge, this model is the only one to offer the possibility to study tumor angiogenesis in a physiologically relevant context. The tissue-specific architecture, mechanical and biochemical signals, heterotypic cell–cell communications and cell-matrix interactions are maintained in this model. Accordingly, we took advantages of the unique properties of this complete and complex skin model to study melanoma biology and progression.

Structurally, the extracellular matrix (ECM) and the basement membranes (BM) function to connect, bind, integrate, and physically support cells whereas chemically they regulate cellular function and morphology (Schindler et al., 2006). Many attempts were led to more accurately model the physical and chemical properties of the growth environment of the ECM and BM and thereby to promote more physiological structure and function for cells *in vitro*. In order to acquire tissue-like phenotypes and differentiated functions, cells were classically cultured in collagen gels, on fibrillar collagen surfaces or onto basement membrane-like biomatrix like Matrigel™ (Rhee, 2009; Schmeichel and Bissell, 2003; Shin et al., 2003). Some researchers used natural ECMs denuded of cells to provide a 3D surface for cell culture (Cukierman et al., 2001). In our skin model based on self-assembly method, physical and chemical properties of the ECM and BM have not to be mimicked since the three distinct skin cell types, keratinocytes, dermal fibroblasts and endothelial cells, secreted their own physiological ECM. Thus melanoma cells added to the model are completely surrounded by organized ECM, what is highly representative of the 3D environment experienced by these cells *in vivo*.

Melanoma progression is characterized by three phases (Miller and Mihm, 2006). During the radial growth phase (RGP), melanoma cells confined as single cells acquire the ability to proliferate to the different strata of the epidermis. When RGP melanoma converts into vertical growth phase (VGP) melanoma because of

spontaneous DNA mutations or epigenetic modulations, cells acquire aggressive growth forming expanding nests within the dermal-epidermal junction and then gain ability to invade the dermis. Metastatic melanoma cells display aggressive phenotype and destroy basement membrane, dissociate from primary tumor, migrate deep in the dermis as single cells, invade blood vessels or lymphatics and spread to distant sites.

In our study, we compared the phenotypes and the behavior of melanoma cells derived from primary and metastatic sites. A375 and SK MEL 28 are primary, vertical growth cell lines whereas RPMI 7951 and Malme 3M derive respectively from a lymph node and a lung metastatic site. In contrast to standard 2D systems (Fig S1, S2), we demonstrated that in the TMRS 3D model, these cell lines conserved their major characteristics such as specific histological features, invasiveness and aggressiveness. In addition, our model not only allows demonstrating an active attraction of endothelial cells toward aggressive melanoma metastatic RPMI 7951 cells, but also allows detecting a potent pro-angiogenic effect exerted by these ones. This effect is probably associated with the secretion of growth factors such VEGF. Indeed, Malme 3M, another metastatic cell line that does not secrete VEGF, does not induce pro-angiogenic effect in TMRS. Incidentally, *in vivo*, metastasis to the regional lymph nodes is one of the most important indicators of tumor aggressiveness, especially in melanomas (Karpanen and Alitalo, 2001; Pepper, 2001). In the avian chorioallantoic membrane model, VEGF-C-positive A375 cell line induces tumor lymphangiogenesis whereas VEGF-C-negative Malme 3M melanoma cell line does not (Papoutsi et al., 2000). By introducing a lymphatic network within our model, it could become useful to dissect the metastatic process and to study interactions of tumor cells with lymphatic endothelial cells.

The importance of micro-environmental conditions on the quality and the establishment of an efficient tumor model was underlined in our human tumor microvascularized skin substitute. This consideration is especially important since an emerging view is that associations between cancer cells and their local ECM/BM may lead to decreased sensitivity to chemotherapeutic drugs (Mazzoleni et al., 2009). In conclusion, in addition to aiding in the investigating cancer progression, we believe

that the TMRS model can lead to important therapeutic breakthroughs. Indeed, explorations and drug-testing approaches using this tissue engineered model may lead to the identification of new therapeutic targets and more effective treatment options for cancer.

2.5. Materials and Methods

Cell culture. Human keratinocytes and fibroblasts were isolated from human skin biopsies after breast reductive surgeries as previously described (Auger et al., 1995; Germain et al., 1993). Fibroblasts were grown in Dulbecco-Vogt modification of Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen, Burlington, Canada) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (HyClone, Logan, UT), 100 U/mL penicillin (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada), 25 µg/mL gentamicin (Schering, Pointe Claire, Canada). Keratinocytes were grown in a 3:1 DMEM-Ham's F-12 medium (DH) (Invitrogen) supplemented with 5% newborn calf serum (NCS) (FetalCLone II, HyClone), 0.4 µg/mL hydrocortisone (Calbiochem, La Jolla, CA), 5 µg/mL bovine insulin (Sigma), 10 ng/mL human epidermal growth factor (Austral, San Ramon, CA), 10⁻¹⁰ M cholera toxin (ICN, St-Laurent, Canada) and antibiotics. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were obtained from the umbilical cord of healthy newborn by enzymatic digestion as previously described (L'Heureux et al., 1998) and grown in endothelial growth medium 2 (EGM-2) (Cambrex Bioscience, Baltimore, MD). HUVEC were transduced by lentiviral vectors to provide stable luciferase and green fluorescent protein (GFP) expression. Transductions were graciously performed in Dr. J.A. Medin's laboratory (Ontario Cancer Institute, Toronto, Canada). The study was approved by the Laval University research ethical committee; participants gave their written, informed consent. Melanoma cell lines were all purchased from A.T.C.C. The A375 (ATCC # CRL-1619) and the SK MEL 28 (ATCC # HTB-72) are primary melanoma and derived from skin, whereas RPMI 7951 (ATCC # HTB-66) and Malme 3M (ATCC # HTB-64) are derived from a metastatic site. All cells were grown in same medium as fibroblasts. All cells were grown at 37°C in 8% CO₂ atmosphere.

Production of lentiviral particles and melanoma transduction. The TOPO TA® cloning kit was purchased from Invitrogen. DsRed sequence was directly inserted into this plasmid vector and DsRed lentivirus (LV/DsRed) were produced by transient transfection of 293FT cells with four plasmids kindly provided by Dr Sylvain Guérin (Oncology and Molecular Endocrinology Research Center, CHUL, Quebec City, Canada): pLP1, pLP2, pLPVSVG and either LV/DsRed. Transfections of 293FT cells were performed according to manufacturer's instructions using lipofectamine2000 kit (Invitrogen). Viral supernatants were collected 48 h after transfection and filtered using a 0.22 µm filter unit (Millipore). They were then used a single time at an MOI of 10 to transduce semi-confluent cultured melanoma cells in DMEM medium in 6 well plates. Transduced cells were expanded in culture and flow cytometric analyses using a FACScalibur (BD Biosciences, San Jose, CA) were performed 2 passages later to examine DsRed stable expression by the vector-transduced melanoma cells. Data were analyzed using Cell Quest (BD Biosciences). More than 98% of cells were transduced for each cell line (data not shown).

Skin substitute preparation. Like previously described (Gibot et al., 2010), microvascularized reconstructed skins (MRS) were prepared by seeding 15,000 cells/cm² fibroblasts in 6-well plates for 4 weeks in DMEM supplemented with ascorbic acid 50 µg/ml in order to form manipulable sheet of extracellular matrix. On day 21, HUVEC, luciferase+ and GFP+ or not, were seeded at a density of 12,000 cells/cm² onto 2 fibroblasts sheets in DMEM : EGM-2 while keratinocytes were seeded at a density of 50,000 cells/cm² onto another one in DH supplemented with all additives. On day 28, these 3 sheets were stacked, lifted to the air-liquid interface for epidermis differentiation and cultured in keratinocyte medium described above, without epidermal growth factor. For tumor microvascularized reconstructed skins (TMRS), melanoma cells, DsRed+ or not, were seeded at a density of 2,000 cells/cm² with keratinocytes on day 21. Media supplemented with ascorbic acid were changed three times a week.

Immunohistochemical analysis. In order to conserve GFP and DsRed inside cells, sections of each substitute were fixed in 3.7% formal at room temperature for 2 h, then placed in PBS 10% sucrose at 4° C and finally overnight in PBS 30% sucrose at 4° C as previously described (Kusser and Randall, 2003). A section of each biopsy was embedded in OCT compound (Somengen, Edmonton, Canada) and stored at -80° C. Immunohistochemical analyses were realized on frozen 25 µm sections permeabilized in 100% acetone at -20° C. Primary antibody reactive with collagen VII (Chemicon, Montreal, Canada) was used for characterization of dermal-epidermal junction membrane. An Alexa-594 (Molecular Probes, Eugene, OR), mixed with Hoechst 33258 (1/100) (Sigma) to stain the cell nuclei, was used to detect the primary antibody. Control incubations (replacement of primary antibody with PBS BSA 1%) were performed. All controls were negative. A Nikon C1 laser scanning confocal microscope (Nikon, Mississauga, Canada) was used to examine sections or the surface of TMRS and MRS.

Histological analysis. A section of each biopsy, fixed as described above, was paraffin-embedded for staining with Masson's trichrome.

Necrosis and apoptosis detection. Frozen sections of TMRS and MRS were analyzed using the ApopTag Red In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, Montreal, Canada) that label morphologically and identifiable nuclei and apoptotic bodies. Necrosis was detected on paraffin-embedded section stained with hematoxylin/eosin.

Endothelial cell density quantification. MRS and TMRS samples were weighed, snap frozen and stored at -80°C until use. A 20% homogenate (weight/volume) was prepared using a polytron probe (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) in 4°C cell lysis buffer containing 250 mM Tris (BioRad, Mississauga, ON, Canada) with 0.5% triton X-100 (BioRad) and protease inhibitors (Roche, Mississauga, ON, Canada). After 3 snap freeze thaw cycles, samples were centrifuged at 13,000 g and 20 µl of cleared cell lysate was assayed in triplicate along with a standard curve of firefly luciferase

enzyme (Sigma). An Orion II microplate luminometer (Berthold Detection Systems, Pforzheim, Germany) injected 100 μ l of D-luciferin substrate (Promega, Madison, WI) with each sample and luminescence was captured over 10 seconds. Data is expressed as relative light units (RLUs) and shows quantitative levels of luciferase activity, which correlates to the human endothelial cell density in each skin substitute.

ELISA assay. For detection of vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion, melanoma cell lines were grown in DMEM. Supernatants were collected, centrifuged and VEGF expression was determined by ELISA detection kit according to the manufacturer's instructions (PeproTech, Rocky Hill, NJ).

Statistical analysis. Differences between values were assessed by bilateral Student's t-test. All data were expressed as mean \pm standard deviation (SD), and overall statistical significance was set at $p < 0.05$. Statistics and graphics were performed using Microsoft Office Excel 2007 software (Microsoft corporation, Issy-les-Moulineaux, France).

2.6. Conflict of interest

The authors state no conflict of interest.

2.7. Acknowledgments

We would like to thank Sébastien Larochelle for its technical support concerning melanoma cell lines transduction. This study was supported by the Canadian Institutes of Health Research (#MOP-14364).

2.8. References

American Cancer Society (2009) Cancer Facts & Figures 2009. Atlanta: American Cancer Society.

Auger FA, Lopez Valle CA, Guignard R, Tremblay N, Noel B, Goulet F, *et al.* (1995) Skin equivalent produced with human collagen. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 31:432-439.

Becker JC, Houben R, Schrama D, Voigt H, Ugurel S, Reisfeld RA (2009) Mouse models for melanoma: a personal perspective. *Exp Dermatol* 19:157-164.

Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM (2001) Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* 294:1708-1712.

Germain L, Rouabhia M, Guignard R, Carrier L, Bouvard V, Auger FA (1993) Improvement of human keratinocyte isolation and culture using thermolysin. *Burns* 19:99-104.

Gibot L, Galbraith T, Huot J, Auger FA (2010) A preexisting microvascular network benefits in vivo revascularization of a microvascularized tissue-engineered skin substitute. *Tissue Eng Part A*, in press.

Herlyn M, Fukunaga-Kalabis M (2010) What is a good model for melanoma? *J Invest Dermatol* 130:911-912.

Karpanen T, Alitalo K (2001) Lymphatic vessels as targets of tumor therapy? *J Exp Med* 194:F37-42.

Kusser KL, Randall TD (2003) Simultaneous detection of EGFP and cell surface markers by fluorescence microscopy in lymphoid tissues. *J Histochem Cytochem* 51:5-14.

L'Heureux N, Paquet S, Labbe R, Germain L, Auger FA (1998) A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J* 12:47-56.

Mazzoleni G, Di Lorenzo D, Steimberg N (2009) Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research? *Genes Nutr* 4:13-22.

Miller AJ, Mihm MC, Jr. (2006) Melanoma. *N Engl J Med* 355:51-65.

Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH (2007) The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:839-845.

Papoutsi M, Siemeister G, Weindel K, Tomarev SI, Kurz H, Schachtele C, et al. (2000) Active interaction of human A375 melanoma cells with the lymphatics in vivo. *Histochem Cell Biol* 114:373-385.

Patton EE, Widlund HR, Kutok JL, Kopani KR, Amatruda JF, Murphey RD, et al. (2005) BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. *Curr Biol* 15:249-254.

Pepper MS (2001) Lymphangiogenesis and tumor metastasis: myth or reality? *Clin Cancer Res* 7:462-468.

Rhee S (2009) Fibroblasts in three dimensional matrices: cell migration and matrix remodeling. *Exp Mol Med* 41:858-865.

Satyamoorthy K, Meier F, Hsu MY, Berking C, Herlyn M (1999) Human xenografts, human skin and skin reconstructs for studies in melanoma development and progression. *Cancer Metastasis Rev* 18:401-405.

Schindler M, Nur EKA, Ahmed I, Kamal J, Liu HY, Amor N, *et al.* (2006) Living in three dimensions: 3D nanostructured environments for cell culture and regenerative medicine. *Cell Biochem Biophys* 45:215-227.

Schmeichel KL, Bissell MJ (2003) Modeling tissue-specific signaling and organ function in three dimensions. *J Cell Sci* 116:2377-2388.

Shin H, Jo S, Mikos AG (2003) Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials* 24:4353-4364.

Zaidi MR, Day CP, Merlino G (2008) From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse. *J Invest Dermatol* 128:2381-2391.

2.9. Supplementary material

Supplementary Materials and Methods

Melanoma cell density quantification in 2D and 3D. In 2D experiments, DsRed melanoma cells were plated and cultivated for one week on 5 different plates, corresponding to each point of the growth curve. In 3D experiments, a 8mm punch was taken on each TMRS and MRS, cut into pieces into phosphate buffer saline (PBS) and sonicated on ice three time 5 seconds. Briefly, sonicated skin samples or plates in PBS were flash-frozen at -80°C, thawed and distributed in black 96-well microplates. Fluorescence was read with a Varioskan fluorometer (Thermo Scientific, Milford, MA). Proportional relation between fluorescence and number of cells was verified using serial-dilutions of a known cell number.

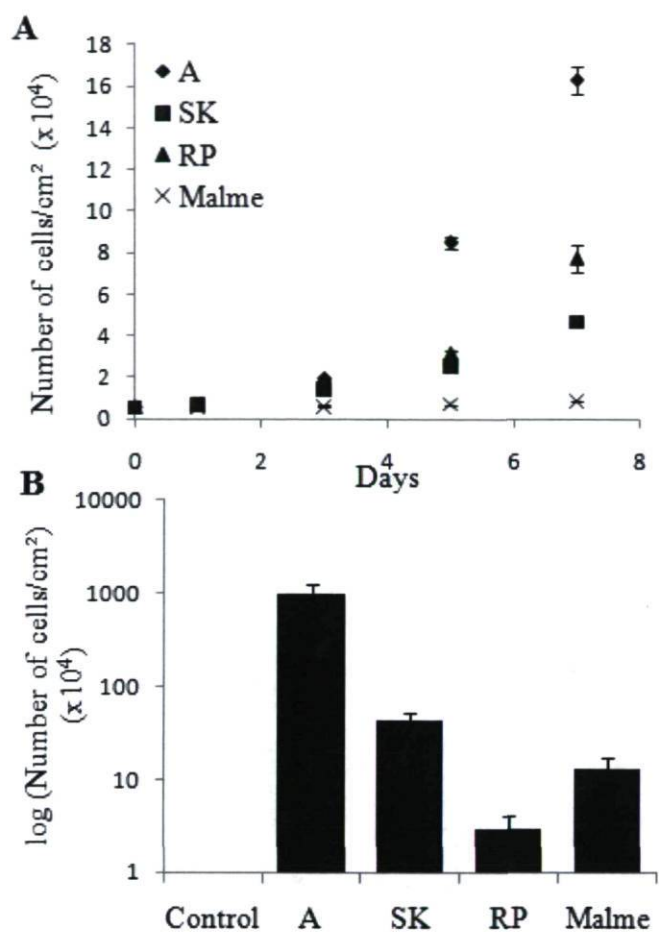


Figure S1. Differential cellular behavior between 2D and 3D cultures. Control = MRS, A = A375, SK = SK MEL 28, RP = RPMI 7951, Malme =Malme 3M. **A.** The growth curve of melanoma cells grown on 2D plastic substrate was performed over 7 days. **B.** Ds Red⁺ melanoma cells density grown for 3 weeks within our TMRS was measured using a fluorometer. Note the logarithmic scale. Data are representative of three independent experiments, each performed in triplicate.

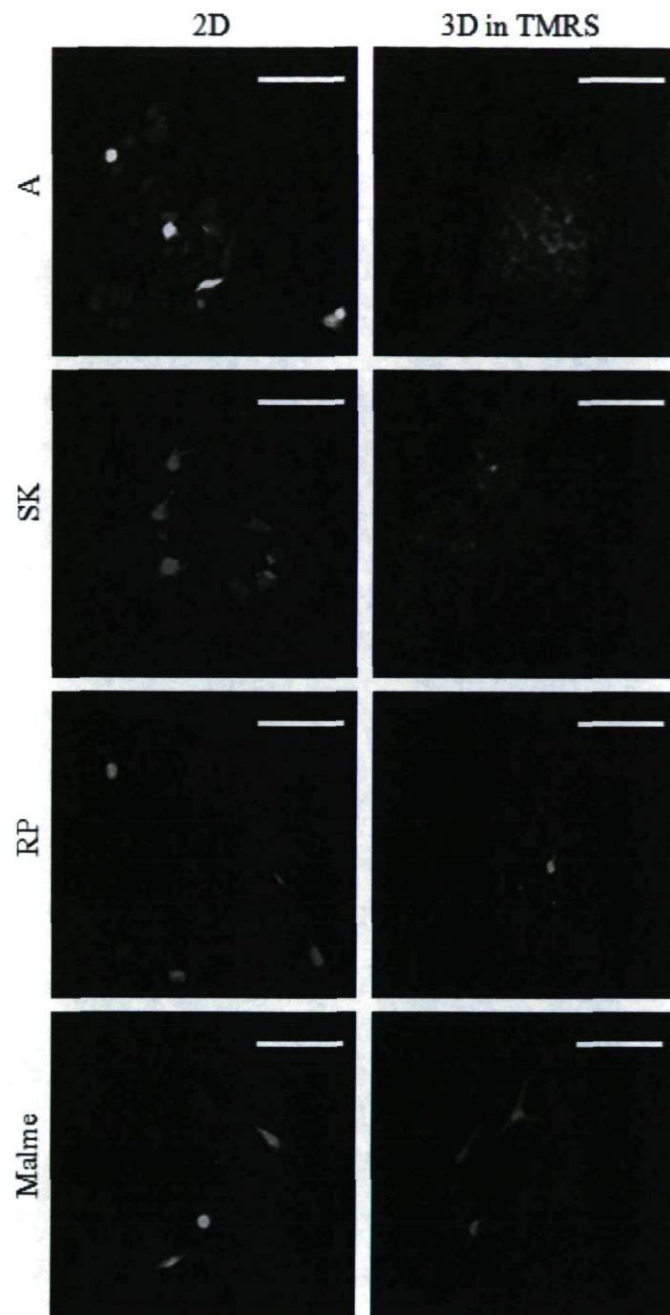


Figure S2. Differential cellular morphology between 2D and 3D cultures. Comparison between Ds Red⁺ melanoma cells morphology growing on 2D plastic substrate or in 3D TMRS, observed by fluorescence microscopy. Control = MRS, A = A375, SK = SK MEL 28, RP = RPMI 7951, Malme = Malme 3M. Scale bar = 100 μ m.

Chapitre 4 : Cellules endothéliales lymphatiques humaines, résultats préliminaires

Ce chapitre décrit les résultats préliminaires que nous avons obtenus lors de la culture de cellules endothéliales lymphatiques humaines, en deux dimensions et en trois dimensions, dans des tissus conjonctifs reconstruits par la technique d'auto-assemblage. Les cellules utilisées dans cette partie proviennent d'une collaboration avec le Dr Mihaela Skobe de la Mount Sinai School of Medicine à New-York (USA).

1. Extraction et purification

1.1. Principe

Il existe dans la littérature quelques protocoles d'extraction et de purification des cellules endothéliales lymphatiques à partir de biopsies de peau, de prépuce ou de tissus lymphoïdes comme les amygdales (348-350). Le principe est simple, il s'agit d'une extraction qui peut être suivie d'une purification. La première étape est une extraction cellulaire par digestion enzymatique qui permet de récolter les cellules endothéliales, sanguines et lymphatiques, qui sont PECAM-1 positives ou qui lient l'Ulex Europaeus Agglutinin 1 (UEA-1). À partir de ce pool cellulaire, les cellules endothéliales lymphatiques exprimant des marqueurs spécifiques qui ne se retrouvent pas dans les cellules endothéliales sanguines, comme la podoplanine, LYVE-1, la neuropiline-2 ou Prox-1 peuvent être purifiées sur des billes magnétiques pour en faire une banque.

1.2. Protocole

Le protocole utilisé par nos collaborateurs a été bien décrit par le Dr Podgrabinska dans un article de 2002 (351). Brièvement, à partir d'un prépuce de nouveau né, les cellules endothéliales microvasculaires sanguines (CEMV) et lymphatiques (CEMVL) sont extraites par digestion enzymatique et pression mécanique, puis sélectionnées avec des billes magnétiques recouvertes avec un

anticorps anti-PECAM-1 humain. Nous disposons donc d'un pool de cellules endothéliales microvasculaires que nous pouvons cultiver et étendre dans des flacons gélatinés, dans du milieu de culture pour cellules endothéliales (EGM-2), vendu commercialement par LONZA. Nous avons ainsi réalisé une banque de cellules PECAM+ en passage 7.

2. Caractérisation

2.1. Caractérisation morphologique

Du point de vue de la morphologie, en microscopie à contraste de phase, les cellules endothéliales microvasculaires lymphatiques (CEMVL) ne sont pas morphologiquement distinctes des CEMV (Figure 29).

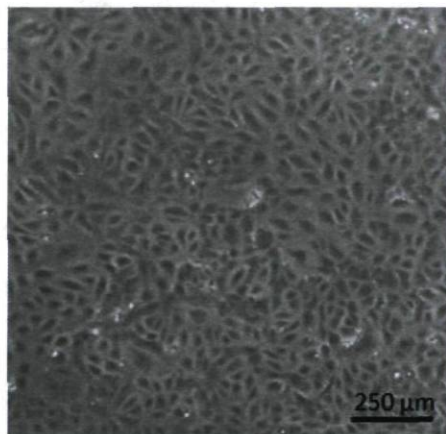


Figure 29 : Photographies en microscopie à contraste de phase d'un pool de cellules endothéliales microvasculaires, contenant des sous-populations de cellules sanguines et de cellules lymphatiques. Barre de mesure : 250 μm.

L'absence de différences morphologiques entre ces deux sous-populations correspond aux observations publiées par les équipes travaillant avec des CEMVL en culture (348, 349). Selon elles, les cellules endothéliales sanguines et lymphatiques ont la même morphologie, avec pour seule différence une prééminence du noyau dans les cellules endothéliales lymphatiques. Ainsi, l'équipe de Kriehuber n'observe pas d'altération de leur morphologie en culture, et ce après 7 passages. Il en va de même pour Garrafa et ses collègues qui les cultivent jusqu'au 10^{ème} passage sans que leur morphologie ne change.

2.2. Caractérisation phénotypique

Afin de s'assurer de la présence de CEMVL au sein du pool de cellules endothéliales microvasculaires obtenu auprès de nos collaborateurs, nous avons vérifié l'expression par certaines cellules de ce pool de marqueurs spécifiques aux lymphatiques.

Nous avons donc réalisé, sur des cellules cultivées sur des lamelles de verre gélatinées, un marquage par immunofluorescence de la molécule LYVE-1, spécifiquement exprimée par les CEMVL (Figure 30).

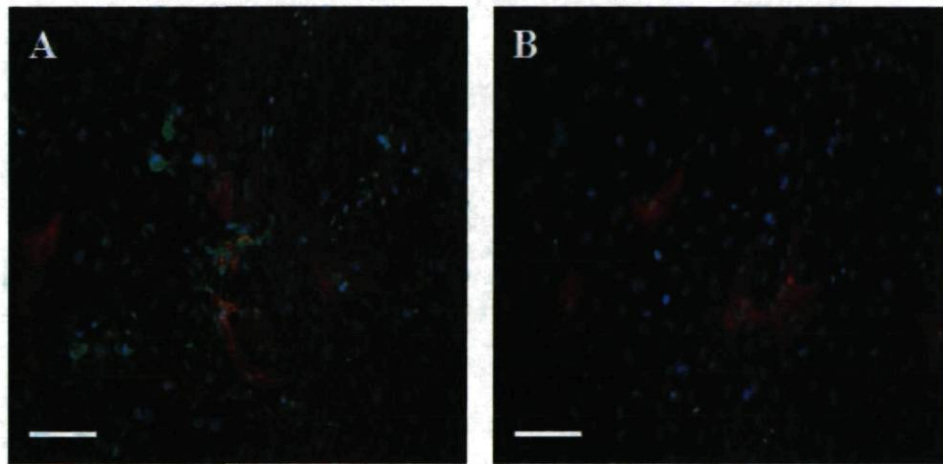


Figure 30 : Caractérisation des cellules endothéliales lymphatiques en culture 2D par immunofluorescence. En A, les cellules endothéliales microvasculaires sont marquées avec un anticorps dirigé contre PECAM-1 (en vert) et contre LYVE-1 (en rouge). En B, seules les cellules LYVE-1+ (en rouge) sont marquées au sein de la population de cellules endothéliales microvasculaires. Barre de mesure : 100 μ m.

Une faible fraction des cellules endothéliales microvasculaires expriment un marqueur spécifique aux CEMVL. De plus, cette sous-population n'a pas le même aspect morphologique que les CEMV. En effet, au lieu d'être petites, polygonales et très jointives, les CEMVL sont très étalées, isolées et semblent se développer au-dessus des CEMV.

La Figure 31 illustre le comportement des cellules endothéliales microvasculaires à la fois sanguines (PECAM-1+/LYVE-1-) et lymphatiques (PECAM-1+/LYVE-1+) lorsqu'elles sont cultivées une semaine dans un

environnement 2D physiologique, à savoir sur un feuillet mature de fibroblastes ayant secrétés leur propre matrice extracellulaire.

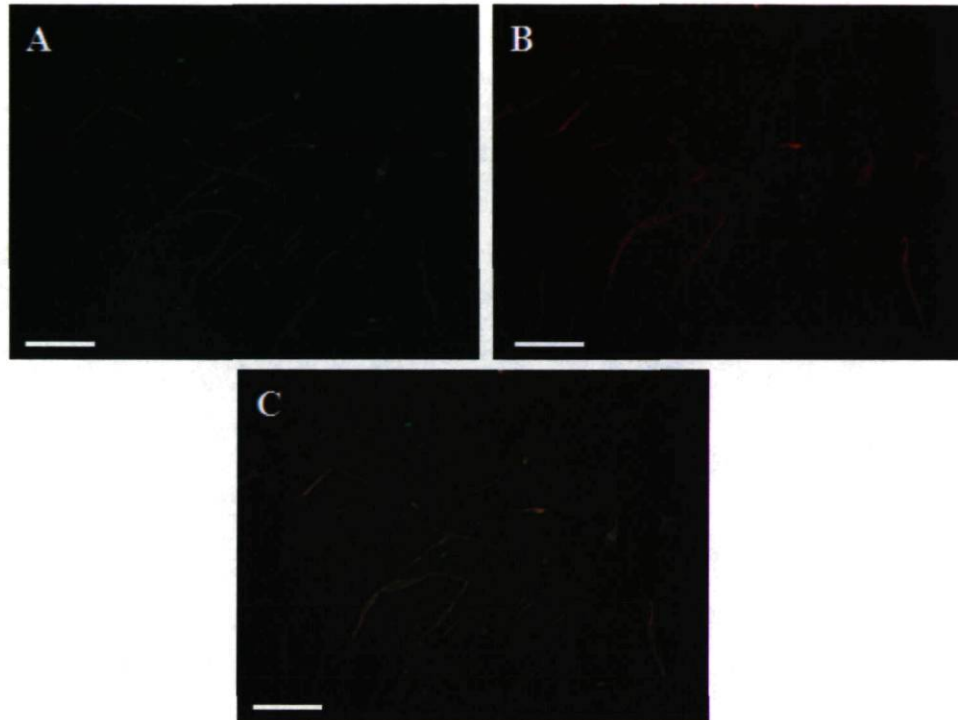


Figure 31 : Marquage par immunofluorescence de cellules endothéliales microvasculaires cultivées une semaine sur un feuillet de fibroblastes. A. Détection des CEMV et CEMVL grâce à l'expression de PECAM-1 (en vert). B. Détection des CEMVL grâce à l'expression de LYVE-1 (en vert). C. Superposition de A et B. Barre de mesure : 200 μm .

Il est intéressant d'observer que bien que les CEMVL ne représentent qu'une faible fraction des cellules microvasculaires totales lorsque cultivées *in vitro* sur du plastique gélatiné, elles semblent proliférer plus rapidement que les CEMV sur un feuillet de matrice extracellulaire. En effet, les proportions entre les CEMV et les CEMVL semblent être égales après une semaine de culture.

L'équipe du Dr Skobe a démontré en 2002 que la survie et la capacité proliférative est beaucoup plus importante pour des CEMVL que pour des CEMV ensemencées dans un gel de collagène de type I (351). Sachant que dans nos conditions expérimentales, les cellules endothéliales microvasculaires sont ensemencées sur une matrice extracellulaire riche en collagène de type I sécrétée par des fibroblastes dermiques, nos observations sont cohérentes avec celles

précédemment publiées par notre collaborateur. Pour tenter d'expliquer ce phénomène, il faut se rappeler qu'*in vivo*, les CEMV doivent, pour s'organiser, sécréter une matrice extracellulaire spécifique, à savoir une lame basale riche en collagène IV et en laminines, alors que les CEMVL sont en contact direct avec la matrice extracellulaire dermique riche en collagène I, III et V puisque la lame basale autour des capillaires lymphatiques est quasiment inexistante. Les CEMVL ont donc moins besoin que les CEMV de remodeler leur microenvironnement pour proliférer et s'organiser. Ceci pourrait expliquer une deuxième observation : les CEMVL semblent avoir une plus grande facilité que les CEMV à s'organiser en des structures longilignes après une semaine de culture.

Afin d'étudier le comportement de ces cellules lymphatiques dans un contexte tridimensionnel physiologique, nous les avonsensemencées sur des feuillets de matrice extracellulaire sécrétée par des fibroblastes dermiques, au sein d'un substitut de tissu conjonctif reconstruit par la méthode d'auto-assemblage.

3. Ensemencement dans un tissu conjonctif 3D

3.1. Protocole de culture

Brièvement, le tissu conjonctif endothélialisé est constitué de la superposition de trois feuillets de fibroblastes dermiques humains (Figure 32). Ceux-ci sont ensemencés dans des plaques 6 puits à jour 0 et cultivés avec 50 µg/ml d'acide ascorbique pendant quatre semaines, jusqu'à obtention d'un feuillet manipulable de matrice extracellulaire. Au jour 21, le pool de cellules endothéliales microvasculaires contenant les CEMV et les CEMVL est ensemencé sur les deux futurs feuillets inférieurs alors que le dernier, qui servira de feuillet supérieur, ne l'est pas. Nous espérons que, tout comme les CEMV, les CEMVL vont spontanément s'organiser en réseau dans ce contexte physiologique.

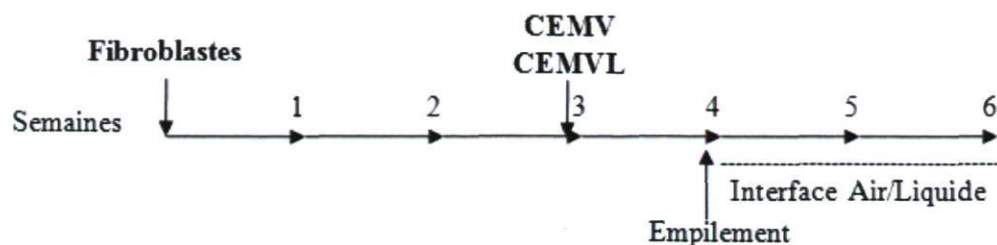


Figure 32 : Schéma du protocole de culture d'un tissu conjonctif endothélialisé avec des cellules endothéliales microvasculaires, à la fois sanguines (CEMV) et lymphatiques (CEMVL).

À la fin de la quatrième semaine, les trois feuillets sont empilés les uns sur les autres et placés à l'interface air/liquide afin que la gravité les fasse fusionner. Le tissu conjonctif 3D ainsi obtenu est cultivé pendant deux semaines supplémentaires dans ces conditions. Enfin, les tissus sont fixés pour être analysés.

3.2. Résultats

Les substituts de tissu conjonctif ainsi endothélialisés sont observés par microscopie confocale après un marquage par immunofluorescence des CEMV (PECAM-1+/LYVE-1-) et CEMVL (PECAM-1+/LYVE-1+). La Figure 33 montre qu'à la fois les cellules endothéliales sanguines et lymphatiques s'organisent spontanément en deux réseaux parallèles à la surface du substitut. Il est intéressant de remarquer que les structures formées par les CEMV et les CEMVL ont une morphologie distincte. En effet, alors que les capillaires formés par les CEMV sont fins et ont une bordure extérieure qui semble « épineuse » à cause des lamellipodes que projettent les cellules endothéliales sanguines, les structures bordées par les cellules endothéliales lymphatiques sont plus larges et plus « lisses ». Jusqu'à maintenant, nous n'avons pas été capables d'observer de connexion entre ces deux réseaux microvasculaires, ce qui est cohérent avec ce qui a été observé par d'autres équipes de recherche co-cultivant des cellules endothéliales microvasculaires sanguines et lymphatiques dans du MatrigelTM (349) ou sur un équivalent de lame basale (348).

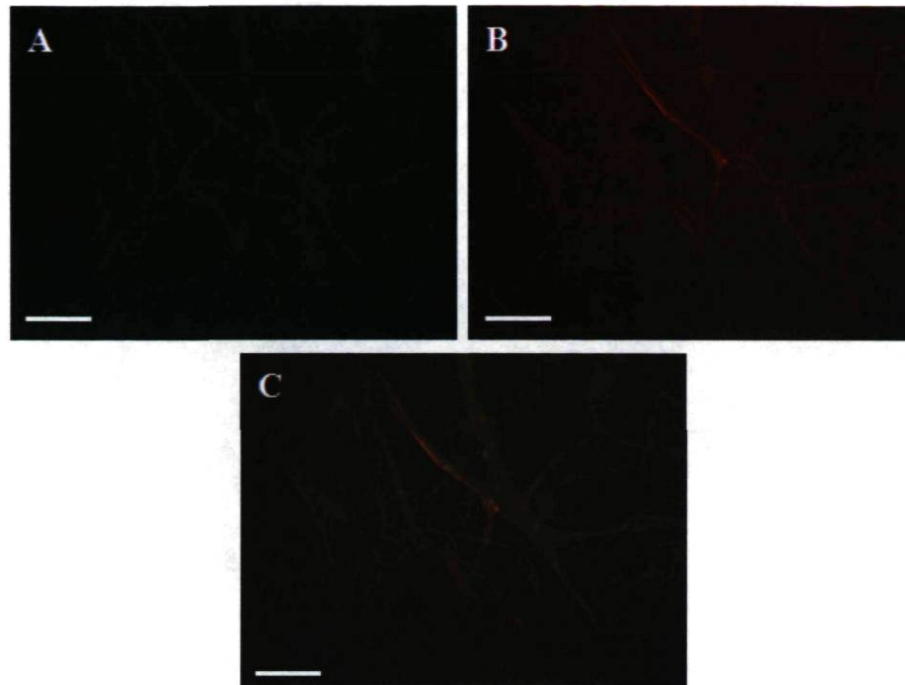


Figure 33 : Marquage par immunofluorescence de PECAM-1 (en vert) et de LYVE-1 (en rouge) dans des tissus conjonctifs 3D endothélialisés avec des cellules endothéliales microvasculaires sanguines (CEMV) et lymphatiques (CEMVL). A. Les CEMV et CEMVL expriment PECAM-1. B. Seules les CEMVL expriment LYVE-1. C. Superposition de A et B. Les CEMV et CEMVL s'organisent spontanément en réseaux parallèles à la surface du substitut. La morphologie des capillaires formés par les CEMV diffèrent de celle des structures formées par les CEMVL. Barre de mesure : 100 μm .

4. Perspectives

Dans notre tissu conjonctif 3D reconstruit par la technique d'auto-assemblage, il nous faudra vérifier par immunohistochimie avec d'autres marqueurs que LYVE-1 que les cellules qui bordent ces structures longilignes ramifiées observées par microscopie confocale sont des CEMVL. En 2002, Jain a expliqué la difficulté de trouver un marqueur qui serait spécifique aux cellules endothéliales lymphatiques (131). Ainsi, pendant plusieurs années, le VEGFR-3, le récepteur aux VEGF C et D, a été considéré comme un bon marqueur de cellules endothéliales lymphatiques adultes. Cependant, il a récemment été retrouvé sur des cellules endothéliales sanguines dans des capillaires fenestrés de tissus sains, et dans des capillaires tumoraux ou cicatriciels. De même, LYVE-1 est aussi exprimé par les cellules endothéliales des capillaires sinusoides hépatiques chez l'humain et la souris, et le

facteur de transcription Prox-1 s'exprime dans de nombreux types cellulaires, mais pas dans les cellules endothéliales sanguines.

L'étape suivante sera de vérifier, en coupe transversale, la présence de lumière au sein des structures formées par les CEMVL. De même, il faudra vérifier par immunofluorescence ou par microscopie électronique la présence discontinue d'une lame basale autour de ces structures et la présence de filaments d'ancrage reliant les CEMVL à la matrice extracellulaire environnante.

Dans le contexte de nos travaux précédents, les perspectives à long terme sont particulièrement riches, excitantes et prometteuses.

Tout comme pour le réseau microvasculaire que nous avons intégré dans nos substituts tissulaires, il nous faudra vérifier *in vivo* la fonctionnalité de ce réseau lymphatique. Ces études fonctionnelles mesureraient, une fois greffé, le transport de fluides, de macromolécules et de cellules par ce réseau reconstruit *in vitro*. Des techniques comme la micro-lymphangiographie ont été mises au point par d'autres équipes pour étudier la fonctionnalité lymphatique chez la souris (352). Cela consiste en l'injection dans le tissu d'une macromolécule fluorescente qui sera collectée par le réseau de capillaire lymphatique s'il est fonctionnel, et observée par microscopie.

Un tissu humain reconstruit *in vitro* contenant un réseau microvasculaire lymphatique fonctionnel serait un puissant outil dans l'étude du processus métastatique, notamment dans le cas des mélanomes cutanés. Ainsi, l'ajout d'une composante lymphatique à notre modèle tumoral de substitut cutané microvascularisé ajouterait de la valeur à sa pertinence physiologique et permettrait d'étudier la biologie du développement et de la progression du mélanome dans son ensemble.

Une compréhension accrue de la formation et de la fonction des capillaires lymphatiques associés aux tumeurs faciliterait non seulement le contrôle potentiel du processus métastatique mais aussi la distribution aux tumeurs des agents thérapeutiques.

Chapitre 5 : Discussion générale

L'intégration d'une composante microvasculaire aux substituts tissulaires reconstruits *in vitro* est une préoccupation qui intéresse toutes les équipes du domaine de l'ingénierie tissulaire, quel que soit le type de tissu en question. En effet, la première partie des travaux présentés ici a détaillé les bénéfices, tant d'un point de vue clinique que fondamental, qu'apporte la microvascularisation des tissus reconstruits.

Dans un premier temps, la mise au point d'un substitut cutané microvascularisé reconstruit par la technique d'auto-assemblage a été décrite. Suite à une greffe sur un modèle animal, l'inosculation qui s'effectue en moins de quatre jours après l'opération témoigne de la fonctionnalité de ce réseau microvasculaire reconstruit *in vitro*. Ces mêmes séries d'expériences ont permis d'observer que la présence de cellules endothéliales au sein du substitut cutané a un effet bénéfique sur la néovascularisation ou colonisation du greffon par le réseau microvasculaire de l'hôte. Ce remodelage rapide de la microvasculature du greffon améliore ses chances de survie.

La capacité que possèdent les cellules endothéliales, aussi bien d'origine ombilicale que microvasculaire, à s'organiser spontanément en réseau microvasculaire pourra être exploitée pour mettre au point un tissu conjonctif viable microvascularisé de plus de 500 μm d'épaisseur, ce qui est bien au-delà de la limite de diffusion de l'oxygène *in vivo* de 150-200 μm . Ce type de substitut tissulaire conjonctif microvascularisé épais aura de nombreuses applications en chirurgie plastique et réparatrice, notamment en tant que tissu de comblement suite à des résections de tumeurs comme les mélanomes par exemple.

Le modèle de substitut cutané microvascularisé reconstruit par auto-assemblage a aussi permis de mettre au point un modèle *in vitro* d'étude des mélanomes. Son originalité, au regard des modèles utilisés dans les autres laboratoires, est la co-culture de quasiment tous les types cellulaires cutanés, à savoir les kératinocytes, les fibroblastes dermiques et les cellules endothéliales, qui interagissent de façon homo- ou hétéro-typiques et synthétisent leur propre matrice

extracellulaire. Les cellules cancéreuses évoluent donc au sein d'une structure 3D complexe dont l'architecture recrée celle de la peau native, avec notamment une jonction dermo-épidermique complète. La richesse de notre modèle réside dans la possibilité d'observer et d'évaluer les interactions entre cellules endothéliales et cellules cancéreuses. D'un point de vue clinique, une foisensemencé avec des cellules cancéreuses de mélanome prélevées sur le patient, il pourrait être utilisé comme un outil pour confirmer le diagnostic sur l'agressivité de la tumeur. D'un point de vue plus fondamental, sa greffe sur un animal permettrait de créer un modèle hybride dans lequel les mélanomes évolueraient *in vivo* dans un environnement humanisé, plus proche de la réalité physiologique.

Enfin, bien que nos travaux concernant l'extraction et l'incorporation de cellules endothéliales microvasculaires lymphatiques au sein de ce substitut cutané tumoral n'en soient qu'à leurs prémices, ils sont très encourageants. En effet, les premiers résultats obtenus sont prometteurs quant à notre capacité à extraire et à cultiver ce type cellulaire. Nous sommes persuadés que la reconstruction par génie tissulaire d'un réseau microvasculaire lymphatique 3D dans notre modèle tumoral en ferait un outil sophistiqué d'étude *in vitro* du processus métastatique des mélanomes.

Le modèle de peau reconstruite par auto-assemblage (non microvascularisé) a été développé au laboratoire il y a plusieurs années et sa caractérisation morphologique et fonctionnelle a déjà été effectuée, c'est pourquoi nous ne nous y sommes pas attardés dans ces travaux de recherche. En effet, l'expression de molécules comme l'involucrine, la transglutaminase et les composants de la membrane basale à la jonction dermo-épidermique a été vérifiée pour s'assurer de la maturation et de la différenciation des kératinocytes (353, 354). De plus, des paramètres fonctionnels comme la présence du récepteur de la vitamine D3 dans la couche basale de l'épiderme sont maintenus *in vitro* (355). Cette même étude a démontré la présence de l'enzyme 4-prolyl-hydroxylase dans le compartiment dermique, ce qui indique l'état fonctionnel des fibroblastes dans ce modèle.

Notre modèle de substitut cutané microvascularisé reconstruit par auto-assemblage, d'une complexité biologique supérieure à ce qui se fait dans les autres laboratoires de recherche sur la peau, offre plusieurs avantages majeurs. En effet, il est totalement exempt de matières exogènes biologiques ou synthétiques ce qui diminue les problèmes de biocompatibilité s'il est appliqué dans le cadre clinique. De plus, étant donné que nous sommes capables d'extraire les trois types cellulaires qui le constituent (kératinocytes, fibroblastes et cellules endothéliales microvasculaires) à partir d'une unique biopsie cutanée non invasive, il peut être potentiellement totalement autologue.

De nombreux aspects restent cependant à étudier afin de s'assurer de la qualité de ce modèle. De même, plusieurs composantes prometteuses pourraient être intégrées afin d'augmenter sa pertinence biologique.

En 2008, Barai et ses collaborateurs ont comparé les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles de substituts cutanés cultivés avec ou sans ancrage (356). Leurs résultats démontrent que la viabilité cellulaire et la morphologie tissulaire sont identiques. Cependant, la fonction de barrière de l'épiderme est nettement améliorée lorsque les substituts sont cultivés avec ancrage comme c'est le cas avec notre modèle de peau reconstruite microvascularisée.

La peau humaine native est plus complexe que notre modèle puisqu'il n'est composé que de trois types cellulaires et ne possède aucune annexe cutanée. Au laboratoire, le Dr Julie Fradette a démontré en 2003 que la technique d'extraction enzymatique des kératinocytes permet aussi d'extraire des cellules de Merkel, impliquées dans la fonction du toucher et qui ont un rôle de mécanorécepteurs (357). Des unités pilosébacées complètes (follicule pileux et glande sébacée) peuvent être insérées dans des peaux reconstruites par auto-assemblage (353). En ajoutant des neurones sensitifs et des cellules de Schwann dans un modèle de peau reconstruite dans une éponge de collagène-chitosane-glycoaminoglycanes, une équipe de notre laboratoire a démontré une augmentation de la migration nerveuse mais aussi une amélioration de la formation des gaines de myéline *in vitro* et enfin une récupération de la fonction nerveuse *in vivo* (358).

Il est intéressant de noter que les processus d'innervation et d'angiogenèse sont liés. En effet, plusieurs études ont démontré que la néovascularisation précède et guide la croissance des fibres nerveuses dans des greffons cutanés chez l'animal (359, 360). La mise en place dans une greffe d'un réseau microvasculaire organisé et orienté promeut la régénération nerveuse et peut améliorer les résultats cliniques de réparation nerveuse (361).

L'aspect immunologique n'a pas du tout été abordé au sein de ces travaux. Pourtant, dans sa revue de 2008, Siemionow décrit les différentes cellules immunocompétentes présentes au sein de la peau humaine native, en particulier les cellules de Langerhans, et le rôle qu'elles jouent dans la défense immunitaire et lors des rejets des greffes cutanées (362). Nous n'avons pas vérifié la présence ou l'absence de ce type cellulaire au sein de notre substitut, parce que l'application potentielle de notre modèle au niveau clinique serait faite dans le cadre de greffes autologues donc cela ne pose pas de problème.

L'équipe de Boyce et Supp a démontré que les cellules de leurs substituts cutanés reconstruits dans une éponge de collagène-glycoaminoglycanes expriment des protéines antimicrobiennes comme S100A12 et les β -défensines 1 et 2, et expriment aussi des gènes antiviraux comme APOBEC3G (363, 364). Le profil d'expression de ces gènes indique que les peaux reconstruites utilisent des mécanismes innés de défense, similaires à ceux décrits pour la peau native. Les auteurs suggèrent que la stimulation des peaux reconstruites avec un cocktail de cytokines amplifierait les mécanismes d'immunité innée du substitut et diminuerait les risques d'infections bactériennes au site de la plaie lors de greffes sur des patients.

Il faut aussi noter l'absence de papilles dermiques au sein de notre substitut. Certaines équipes comme celle de Pins et Toner ont avancé l'hypothèse que l'utilisation d'un support matriciel microstructuré aiderait à la mise en place *in vitro* des interdigitations entre le derme et l'épiderme, ou *rete ridges* (365, 366). Selon eux, l'utilisation d'un support matriciel dont la microstructure mimerait la géométrie ondulée des *rete ridges* fournirait aux kératinocytes ensemencés *in vitro* des indices

topographiques similaires à ceux de la peau native, conduisant à la reconstruction de substituts cutanés plus fonctionnels. Pour tester leur hypothèse, ils ont créé une lame basale synthétique en laissant polymériser du collagène ou de la gélatine sur une surface en silicone ondulée à l'échelle du micromètre. Une foisensemencés sur cette surface, les kératinocytes s'adaptent à la conformation du substrat et montrent une meilleure stratification et une expression accrue de marqueurs de différenciation dans le creux des ondulations. Il est donc possible d'envisager de cultiver des feuilletts de fibroblastes sur des supports ondulés à l'échelle micrométrique afin de recréer les papilles dermiques dans notre substitut cutané.

Nos substituts tissulaires sont cultivés sous des conditions statiques alors que la pression et le flux interstitiels sont présents à différents degrés dans tous les tissus et constituent un environnement biophysique qui va modéliser les réseaux vasculaires. L'équipe de Melody Swartz a étudié le rôle spécifique du flux interstitiel sur la morphologie et l'organisation des cellules endothéliales sanguines et lymphatiques *in vitro* (295). Elle a démontré que la présence d'un flux interstitiel de l'ordre de 10 $\mu\text{m/s}$ pendant 6 jours aligne les deux types cellulaires et modifie leur morphologie : les cellules endothéliales sanguines forment un réseau branché de tubes multicellulaires avec une lumière alors que les cellules endothéliales lymphatiques s'allongent, forment de longues extensions et de grosses vacuoles. L'intérêt de cette étude est double : non seulement elle démontre l'importance du flux sur l'organisation et la stabilisation de la microvasculature, mais elle identifie aussi des différences notables entre les cellules endothéliales sanguines et lymphatiques dans leur réponse à l'environnement biophysique, reflétant quelques unes de leurs différences fonctionnelles *in vivo*. Nous travaillons donc actuellement à la mise au point d'un bioréacteur pour micro-perfuser nos substituts tissulaires microvascularisés et les cultiver ainsi dans un environnement biophysique plus proche de la réalité physiologique. Il s'agit d'une voie très prometteuse puisqu'une équipe américaine a développé cette année un bioréacteur qui favorise l'organisation et la stabilisation d'un réseau microvasculaire reconstruit *in vitro* dans un gel de collagène (367).

Notre modèle de peau reconstruite microvascularisée a été employé pour mettre au point un modèle de développement de mélanome *in vitro*, mais il pourra aussi être appliqué à l'étude de pathologies affectant la peau. Prenons l'exemple du *pseudoxanthoma elasticum* (PXE) : c'est un trouble héréditaire qui se manifeste par une minéralisation progressive des tissus conjonctifs et des fibres élastiques. Les tissus les plus touchés sont la peau, l'œil et le système cardio-vasculaire périphérique (368, 369). Une compréhension plus approfondie des mécanismes pathologiques sous-tendant ce processus de minéralisation permettrait de développer des thérapies moléculaires ciblées pour cette maladie actuellement intraitable.

De plus, la composante microvasculaire de notre modèle pourra être adaptée, avec ou sans épithélium, afin d'étudier des pathologies dans lesquelles le rôle du système vasculaire est primordial. Ainsi, en 1992, Abbot et ses collaborateurs ont réussi à isoler et à cultiver *in vitro* des cellules endothéliales de patients atteints d'arthrite rhumatoïde afin d'étudier le rôle de l'endothélium synovial dans cette pathologie (370). En 1994, Kräling et son équipe ont isolé des cellules endothéliales microvasculaires dermiques de patients souffrant de sclérose systémique afin d'étudier leur rôle spécifique dans cette maladie auto-immune (371).

Au laboratoire, une étudiante a récemment étudié les interactions, entre les cellules épithéliales et les cellules endothéliales, impliquées dans le processus d'angiogenèse *in vitro* (372). Ainsi, la présence d'un épithélium normal, à savoir des kératinocytes, module la taille et la morphologie des capillaires reconstruits *in vitro*.

Enfin, la mise au point d'un substitut cutané microvascularisé complexe et fonctionnel a des applications sur le plan économique et sur le plan éthique. En effet, en 1959, Russell et Burch ont développé dans leur livre intitulé « *The principles of humane experimental technique* » la règle des 3R qui est désormais érigée au rang de principe éthique au Canada mais aussi dans de nombreux pays (373). Cette règle intègre à la mise en place de protocoles expérimentaux à des fins scientifiques les notions de bien-être animal ainsi que la douleur ou la détresse que les animaux peuvent ressentir. Les 3R signifient Remplacement, Réduction et Raffinement. Notre modèle, dont la fonctionnalité a été vérifiée *in vivo*, semble être une méthode

alternative acceptable à l'utilisation des animaux de laboratoire dans le cadre d'une stratégie d'essais gradués qui permettrait de réduire le nombre d'animaux utilisés, par exemple lors de tests pharmacologiques ou de toxicité.

Bibliographie

1. Berner, R. A., Vandenbrooks, J. M., and Ward, P. D. (2007) Evolution. Oxygen and evolution. *Science* **316**, 557-558
2. Dudley, R. (1998) Atmospheric oxygen, giant Paleozoic insects and the evolution of aerial locomotor performance. *J Exp Biol* **201**, 1043-1050
3. Krogh, A. (1919) The number and distribution of capillaries in muscles with calculations of the oxygen pressure head necessary for supplying the tissue. *J Physiol* **52**, 409-415
4. Goldman, D. (2008) Theoretical models of microvascular oxygen transport to tissue. *Microcirculation* **15**, 795-811
5. Thomlinson, R. H., and Gray, L. H. (1955) The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer* **9**, 539-549
6. Folkman, J., and Hochberg, M. (1973) Self-regulation of growth in three dimensions. *J Exp Med* **138**, 745-753
7. Gimbrone, M. A., Jr., Leapman, S. B., Cotran, R. S., and Folkman, J. (1972) Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J Exp Med* **136**, 261-276
8. Schmidt-Nielsen, K. (1984) *Scaling, why is animal size so important?*, Press Syndicate of the university of Cambridge, Cambridge
9. Weibel, E. R. (2004) Beau poumon - bon poumon? Les bases morphométriques de la fonction pulmonaire. *Rev Mal Respir* **21**, 665-671
10. Gehr, P., Bachofen, M., and Weibel, E. R. (1978) The normal human lung: ultrastructure and morphometric estimation of diffusion capacity. *Respir Physiol* **32**, 121-140
11. Mauroy, B., Filoche, M., Weibel, E. R., and Sapoval, B. (2004) An optimal bronchial tree may be dangerous. *Nature* **427**, 633-636
12. Mandelbrot, B. (1983) *The Fractal Geometry of Nature*, Freeman, New York
13. Corvol, P., and Postel-Vinay, N. (2008) *L'arbre vasculaire. Les nouvelles voies de guérison*, Odile Jacob, Paris
14. Skalak, R., and Chien, S. (1981) Capillary flow: history, experiments and theory. *Biorheology* **18**, 307-330
15. Hwa, C., and Aird, W. C. (2007) The history of the capillary wall: doctors, discoveries, and debates. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**, H2667-2679
16. Pearce, J. M. (2007) Malpighi and the discovery of capillaries. *Eur Neurol* **58**, 253-255
17. Rusznayk, I., Foldi, M., and Szabo, G. (1967) *Lymphatics and Lymph Circulation*, Pergamon Press, Oxford
18. Marieb, E., and Lachaine, R. (2005) *Human Anatomy and physiology (6th Edition)*, Saint-Laurent, Qué. : Éd. du Renouveau pédagogique.
19. Tortora, G., and Derrickson, D. (2007) *Principes d'anatomie et de physiologie*, Saint-Laurent, Québec : Éditions du Renouveau pédagogique
20. Pries, A. R., and Kuebler, W. M. (2006) Normal endothelium. *Handb Exp Pharmacol*, 1-40

21. Johnson, P. (2008) Overview of the microcirculation. In *Microcirculation* (Tuma RF, D. W., Ley K, ed) pp. xi-xxiv, Academic Press
22. Oliver, G., and Alitalo, K. (2005) The lymphatic vasculature: recent progress and paradigms. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 457-483
23. Witte, M. H., Bernas, M. J., Martin, C. P., and Witte, C. L. (2001) Lymphangiogenesis and lymphangiodysplasia: from molecular to clinical lymphology. *Microsc Res Tech* **55**, 122-145
24. Albertine, K. H., Fox, L. M., and O'Morchoe, C. C. (1982) The morphology of canine lymphatic valves. *Anat Rec* **202**, 453-461
25. Eisenhoffer, J., Kagal, A., Klein, T., and Johnston, M. G. (1995) Importance of valves and lymphangion contractions in determining pressure gradients in isolated lymphatics exposed to elevations in outflow pressure. *Microvasc Res* **49**, 97-110
26. Takada, M. (1971) The ultrastructure of lymphatic valves in rabbits and mice. *Am J Anat* **132**, 207-217
27. Hong, Y. K., and Detmar, M. (2003) Prox1, master regulator of the lymphatic vasculature phenotype. *Cell Tissue Res* **314**, 85-92
28. Lohela, M., Saaristo, A., Veikkola, T., and Alitalo, K. (2003) Lymphangiogenic growth factors, receptors and therapies. *Thromb Haemost* **90**, 167-184
29. Heath, T. (1964) Pathways of Intestinal Lymph Drainage in Normal Sheep and in Sheep Following Thoracic Duct Occlusion. *Am J Anat* **115**, 569-579
30. Paldino, R. L., and Hyman, C. (1964) Relationship between Lymphatic and Blood Flow in Various Structures in the Abdominal Cavity. *Proc Soc Exp Biol Med* **117**, 904-910
31. Pressman, J. J., and Simon, M. B. (1961) Experimental evidence of direct communications between lymph nodes and veins. *Surg Gynecol Obstet* **113**, 537-541
32. Threefoot, S. A., Kent, W. T., and Hatchett, B. F. (1963) Lymphaticovenous and lymphaticolymphatic communications demonstrated by plastic corrosion models of rats and by postmortem lymphangiography in man. *J Lab Clin Med* **61**, 9-22
33. Patterson, R. M., Ballard, C. L., Wasserman, K., and Mayerson, H. S. (1958) Lymphatic permeability to albumin. *Am J Physiol* **194**, 120-124
34. Allen, L. (1967) Lymphatics and lymphoid tissues. *Annu Rev Physiol* **29**, 197-224
35. Yoffey, J., and Courtice, F. (1970) *Lymphatics, lymph and the lymphomyeloid complex.*, Academic Press, London
36. Muthuchamy, M., and Zawieja, D. (2008) Molecular regulation of lymphatic contractility. *Ann N Y Acad Sci* **1131**, 89-99
37. Zawieja, D. C. (2009) Contractile physiology of lymphatics. *Lymphat Res Biol* **7**, 87-96
38. Mislin, H. (1976) Active contractility of the lymphangion and coordination of lymphangion chains. *Experientia* **32**, 820-822
39. Ohhashi, T., and Azuma, T. (1979) Electrical activity and ultrastructure of bovine mesenteric lymphatics. *Lymphology* **12**, 4-6

40. Von der Weid, P. Y., Crowe, M. J., and Van Helden, D. F. (1996) Endothelium-dependent modulation of pacemaking in lymphatic vessels of the guinea-pig mesentery. *J Physiol* **493** (Pt 2), 563-575
41. Gashev, A. A. (2002) Physiologic aspects of lymphatic contractile function: current perspectives. *Ann N Y Acad Sci* **979**, 178-187; discussion 188-196
42. Breiteneder-Geleff, S., Soleiman, A., Kowalski, H., Horvat, R., Amann, G., Kriehuber, E., Diem, K., Weninger, W., Tschachler, E., Alitalo, K., and Kerjaschki, D. (1999) Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. *Am J Pathol* **154**, 385-394
43. Prevo, R., Banerji, S., Ferguson, D. J., Clasper, S., and Jackson, D. G. (2001) Mouse LYVE-1 is an endocytic receptor for hyaluronan in lymphatic endothelium. *J Biol Chem* **276**, 19420-19430
44. Smaje, L., Zweifach, B. W., and Intaglietta, M. (1970) Micropressures and capillary filtration coefficients in single vessels of the cremaster muscle of the rat. *Microvasc Res* **2**, 96-110
45. Yen, A., and Braverman, I. M. (1976) Ultrastructure of the human dermal microcirculation: the horizontal plexus of the papillary dermis. *J Invest Dermatol* **66**, 131-142
46. Timpl, R. (1989) Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur J Biochem* **180**, 487-502
47. Hallmann, R., Horn, N., Selg, M., Wendler, O., Pausch, F., and Sorokin, L. M. (2005) Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol Rev* **85**, 979-1000
48. Wondimu, Z., Geberhiwot, T., Ingerpuu, S., Juronen, E., Xie, X., Lindbom, L., Doi, M., Kortessmaa, J., Thyboll, J., Tryggvason, K., Fadeel, B., and Patarroyo, M. (2004) An endothelial laminin isoform, laminin 8 (alpha4beta1gamma1), is secreted by blood neutrophils, promotes neutrophil migration and extravasation, and protects neutrophils from apoptosis. *Blood* **104**, 1859-1866
49. Zhou, Z., Doi, M., Wang, J., Cao, R., Liu, B., Chan, K. M., Kortessmaa, J., Sorokin, L., Cao, Y., and Tryggvason, K. (2004) Deletion of laminin-8 results in increased tumor neovascularization and metastasis in mice. *Cancer Res* **64**, 4059-4063
50. Mandarino, L. J., Sundarraj, N., Finlayson, J., and Hassell, H. R. (1993) Regulation of fibronectin and laminin synthesis by retinal capillary endothelial cells and pericytes in vitro. *Exp Eye Res* **57**, 609-621
51. Shepro, D., and Morel, N. M. (1993) Pericyte physiology. *FASEB J* **7**, 1031-1038
52. Tilton, R. G. (1991) Capillary pericytes: perspectives and future trends. *J Electron Microscop Tech* **19**, 327-344
53. Rhodin, J. A. (1968) Ultrastructure of mammalian venous capillaries, venules, and small collecting veins. *J Ultrastruct Res* **25**, 452-500
54. Tilton, R. G., Kilo, C., and Williamson, J. R. (1979) Pericyte-endothelial relationships in cardiac and skeletal muscle capillaries. *Microvasc Res* **18**, 325-335

55. Tilton, R. G., Kilo, C., Williamson, J. R., and Murch, D. W. (1979) Differences in pericyte contractile function in rat cardiac and skeletal muscle microvasculatures. *Microvasc Res* **18**, 336-352
56. Aird, W. C., Edelberg, J. M., Weiler-Guettler, H., Simmons, W. W., Smith, T. W., and Rosenberg, R. D. (1997) Vascular bed-specific expression of an endothelial cell gene is programmed by the tissue microenvironment. *J Cell Biol* **138**, 1117-1124
57. Cleaver, O., and Melton, D. A. (2003) Endothelial signaling during development. *Nat Med* **9**, 661-668
58. Ballabh, P., Braun, A., and Nedergaard, M. (2004) The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis* **16**, 1-13
59. Levick, J. R., and Smaje, L. H. (1987) An analysis of the permeability of a fenestra. *Microvasc Res* **33**, 233-256
60. Adeagbo, A. S. (1997) Endothelium-derived hyperpolarizing factor: characterization as a cytochrome P450 1A-linked metabolite of arachidonic acid in perfused rat mesenteric prearteriolar bed. *Am J Hypertens* **10**, 763-771
61. Esser, S., Wolburg, K., Wolburg, H., Breier, G., Kurzchalia, T., and Risau, W. (1998) Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J Cell Biol* **140**, 947-959
62. Risau, W. (1998) Development and differentiation of endothelium. *Kidney Int Suppl* **67**, S3-6
63. Roberts, W. G., and Palade, G. E. (1995) Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci* **108** (Pt 6), 2369-2379
64. Rubanyi, G., and Risau, W. (2000) *Morphogenesis of Endothelium*, Amsterdam: Hartwood. 23-41
65. Braet, F., De Zanger, R., Jans, D., Spector, I., and Wisse, E. (1996) Microfilament-disrupting agent latrunculin A induces and increased number of fenestrae in rat liver sinusoidal endothelial cells: comparison with cytochalasin B. *Hepatology* **24**, 627-635
66. Bennett, H. S., Luft, J. H., and Hampton, J. C. (1959) Morphological classifications of vertebrate blood capillaries. *Am J Physiol* **196**, 381-390
67. Milici, A. J., Furie, M. B., and Carley, W. W. (1985) The formation of fenestrations and channels by capillary endothelium in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 6181-6185
68. Coomber, B. L., Stewart, P. A., Hayakawa, K., Farrell, C. L., and Del Maestro, R. F. (1987) Quantitative morphology of human glioblastoma multiforme microvessels: structural basis of blood-brain barrier defect. *J Neurooncol* **5**, 299-307
69. Casley-Smith, J. R., and Florey, H. W. (1961) The structure of normal small lymphatics. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci* **46**, 101-106
70. Daroczy, J. (1988) *The dermal lymphatic capillaries*, Springer-Verlag, Berlin
71. Leak, L. V. (1970) Electron microscopic observations on lymphatic capillaries and the structural components of the connective tissue-lymph interface. *Microvasc Res* **2**, 361-391

72. Skobe, M., and Detmar, M. (2000) Structure, function, and molecular control of the skin lymphatic system. *J Invest Dermatol Symp Proc* **5**, 14-19
73. Braverman, I. M. (1989) Ultrastructure and organization of the cutaneous microvasculature in normal and pathologic states. *J Invest Dermatol* **93**, 2S-9S
74. Ryan, T. J. (1989) Structure and function of lymphatics. *J Invest Dermatol* **93**, 18S-24S
75. Erhard, H., Rietveld, F. J., Brocker, E. B., de Waal, R. M., and Ruiters, D. J. (1996) Phenotype of normal cutaneous microvasculature. Immunoelectron microscopic observations with emphasis on the differences between blood vessels and lymphatics. *J Invest Dermatol* **106**, 135-140
76. Bock, P. (1978) Histochemical staining of lymphatic anchoring filaments. *Histochemistry* **58**, 343-345
77. Collin, H. B. (1969) The ultrastructure of conjunctival lymphatic anchoring filaments. *Exp Eye Res* **8**, 102-105
78. Leak, L. V., and Burke, J. F. (1968) Ultrastructural studies on the lymphatic anchoring filaments. *J Cell Biol* **36**, 129-149
79. Tammela, T., Petrova, T. V., and Alitalo, K. (2005) Molecular lymphangiogenesis: new players. *Trends Cell Biol* **15**, 434-441
80. Gnepp, D. R., and Green, F. H. (1979) Scanning electron microscopy of collecting lymphatic vessels and their comparison to arteries and veins. *Scan Electron Microsc*, 756-762
81. Nathanson, S. D. (2003) Insights into the mechanisms of lymph node metastasis. *Cancer* **98**, 413-423
82. Schmid-Schonbein, G. W. (1990) Microlymphatics and lymph flow. *Physiol Rev* **70**, 987-1028
83. Petrova, T. V., Makinen, T., Makela, T. P., Saarela, J., Virtanen, I., Ferrell, R. E., Finegold, D. N., Kerjaschki, D., Yla-Herttuala, S., and Alitalo, K. (2002) Lymphatic endothelial reprogramming of vascular endothelial cells by the Prox-1 homeobox transcription factor. *EMBO J* **21**, 4593-4599
84. Purves, W. (2004) *Life, the science of biology*, Freeman and Co., Gordonsville
85. Duran, W., Sanchez, F., and Breslin, J. (2008) Microcirculatory exchange function. In *Microcirculation* (Tuma RF DW, L. K., ed) pp. 81-124, Academic Press
86. Makinen, T., Norrmen, C., and Petrova, T. V. (2007) Molecular mechanisms of lymphatic vascular development. *Cell Mol Life Sci* **64**, 1915-1929
87. Starling, E. H. (1896) On the Absorption of Fluids from the Connective Tissue Spaces. *J Physiol* **19**, 312-326
88. Yuan, Y., Granger, H. J., Zawieja, D. C., and Chilian, W. M. (1992) Flow modulates coronary venular permeability by a nitric oxide-related mechanism. *Am J Physiol* **263**, H641-646
89. Taylor, A. E. (1990) The lymphatic edema safety factor: the role of edema dependent lymphatic factors (EDLF). *Lymphology* **23**, 111-123
90. Muller, W. A. (2009) Mechanisms of transendothelial migration of leukocytes. *Circ Res* **105**, 223-230
91. Pepper, M. S., and Skobe, M. (2003) Lymphatic endothelium: morphological, molecular and functional properties. *J Cell Biol* **163**, 209-213

92. Dong, C., Slattery, M. J., Rank, B. M., and You, J. (2002) In vitro characterization and micromechanics of tumor cell chemotactic protrusion, locomotion, and extravasation. *Ann Biomed Eng* **30**, 344-355
93. Conway, E. M., Collen, D., and Carmeliet, P. (2001) Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* **49**, 507-521
94. Risau, W. (1995) Differentiation of endothelium. *FASEB J* **9**, 926-933
95. Risau, W., and Flamme, I. (1995) Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**, 73-91
96. Krah, K., Mironov, V., Risau, W., and Flamme, I. (1994) Induction of vasculogenesis in quail blastodisc-derived embryoid bodies. *Dev Biol* **164**, 123-132
97. Choi, K., Kennedy, M., Kazarov, A., Papadimitriou, J. C., and Keller, G. (1998) A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* **125**, 725-732
98. Shi, Q., Rafii, S., Wu, M. H., Wijelath, E. S., Yu, C., Ishida, A., Fujita, Y., Kothari, S., Mohle, R., Sauvage, L. R., Moore, M. A., Storb, R. F., and Hammond, W. P. (1998) Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* **92**, 362-367
99. Breier, G., Clauss, M., and Risau, W. (1995) Coordinate expression of vascular endothelial growth factor receptor-1 (flt-1) and its ligand suggests a paracrine regulation of murine vascular development. *Dev Dyn* **204**, 228-239
100. Wilt, F. H. (1965) Erythropoiesis in the Chick Embryo: The Role of Endoderm. *Science* **147**, 1588-1590
101. Karkkainen, M. J., Makinen, T., and Alitalo, K. (2002) Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research. *Nat Cell Biol* **4**, E2-5
102. Sabin, F. (1902) On the origin of the lymphatic system from the veins and the development of the lymph hearts and thoracic duct in the pig. *American Journal of Anatomy* **1**, 367-389
103. Sabin, F. (1904) On the development of the superficial lymphatics in the skin of the pig. *American Journal of Anatomy* **3**, 183-195
104. Dumont, D. J., Jussila, L., Taipale, J., Lymboussaki, A., Mustonen, T., Pajusola, K., Breitman, M., and Alitalo, K. (1998) Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science* **282**, 946-949
105. Kaipainen, A., Korhonen, J., Mustonen, T., van Hinsbergh, V. W., Fang, G. H., Dumont, D., Breitman, M., and Alitalo, K. (1995) Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3566-3570
106. Wigle, J. T., and Oliver, G. (1999) Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* **98**, 769-778
107. Oliver, G. (2004) Lymphatic vasculature development. *Nat Rev Immunol* **4**, 35-45
108. Oliver, G., and Detmar, M. (2002) The rediscovery of the lymphatic system: old and new insights into the development and biological function of the lymphatic vasculature. *Genes Dev* **16**, 773-783
109. Shin, W. S., and Rockson, S. G. (2008) Animal models for the molecular and mechanistic study of lymphatic biology and disease. *Ann N Y Acad Sci* **1131**, 50-74

110. Nakamura, K., and Rockson, S. G. (2007) Biomarkers of lymphatic function and disease: state of the art and future directions. *Mol Diagn Ther* **11**, 227-238
111. Oliver, G., and Harvey, N. (2002) A stepwise model of the development of lymphatic vasculature. *Ann N Y Acad Sci* **979**, 159-165; discussion 188-196
112. Hong, Y. K., Shin, J. W., and Detmar, M. (2004) Development of the lymphatic vascular system: a mystery unravels. *Dev Dyn* **231**, 462-473
113. Folkman, J. (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* **285**, 1182-1186
114. Krogh, A. (1916) *The respiratory exchange of animals and man*, Longmans, Green and Co., London
115. Gargett, C. E., and Rogers, P. A. (2001) Human endometrial angiogenesis. *Reproduction* **121**, 181-186
116. Qutub, A. A., Mac Gabhann, F., Karagiannis, E. D., Vempati, P., and Popel, A. S. (2009) Multiscale models of angiogenesis. *IEEE Eng Med Biol Mag* **28**, 14-31
117. Bicknell, R. (1997) Mechanistic insights into tumour angiogenesis. In *Tumour angiogenesis* (Bicknell, R., and Ferrara, N., eds), Oxford university press
118. Carmeliet, P. (2003) Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* **9**, 653-660
119. Risau, W. (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**, 671-674
120. Semenza, G. L. (2004) Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda)* **19**, 176-182
121. Murphy, G., and Gavrilovic, J. (1999) Proteolysis and cell migration: creating a path? *Curr Opin Cell Biol* **11**, 614-621
122. Sottile, J. (2004) Regulation of angiogenesis by extracellular matrix. *Biochim Biophys Acta* **1654**, 13-22
123. Panayotou, G., End, P., Aumailley, M., Timpl, R., and Engel, J. (1989) Domains of laminin with growth-factor activity. *Cell* **56**, 93-101
124. Caduff, J. H., Fischer, L. C., and Burri, P. H. (1986) Scanning electron microscope study of the developing microvasculature in the postnatal rat lung. *Anat Rec* **216**, 154-164
125. Burri, P. H. (1974) The postnatal growth of the rat lung. 3. Morphology. *Anat Rec* **180**, 77-98
126. Gerritsen, M. (2008) Adaptation of the Vascular System. In *Microcirculation* (Tuma RF DW, L. K., ed) pp. 351-383, Academic Press
127. Owen, M. R., Alarcon, T., Maini, P. K., and Byrne, H. M. (2009) Angiogenesis and vascular remodelling in normal and cancerous tissues. *J Math Biol* **58**, 689-721
128. Asahara, T., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka, C., Pastore, C., Silver, M., Kearne, M., Magner, M., and Isner, J. M. (1999) Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* **85**, 221-228
129. Asahara, T., Takahashi, T., Masuda, H., Kalka, C., Chen, D., Iwaguro, H., Inai, Y., Silver, M., and Isner, J. M. (1999) VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J* **18**, 3964-3972

130. Jain, R. K. (2003) Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* **9**, 685-693
131. Jain, R. K., and Fenton, B. T. (2002) Intratumoral lymphatic vessels: a case of mistaken identity or malfunction? *J Natl Cancer Inst* **94**, 417-421
132. Demir, R., Yaba, A., and Huppertz, B. (2009) Vasculogenesis and angiogenesis in the endometrium during menstrual cycle and implantation. *Acta Histochem*
133. Markee, J. E. (1978) Menstruation in intraocular endometrial transplants in the Rhesus monkey. *Am J Obstet Gynecol* **131**, 558-559
134. Rogers, P. A., Au, C. L., and Affandi, B. (1993) Endometrial microvascular density during the normal menstrual cycle and following exposure to long-term levonorgestrel. *Hum Reprod* **8**, 1396-1404
135. Kaiserman-Abramof, I. R., and Padykula, H. A. (1989) Angiogenesis in the postovulatory primate endometrium: the coiled arteriolar system. *Anat Rec* **224**, 479-489
136. Rogers, P. A., Donoghue, J. F., and Girling, J. E. (2008) Endometrial lymphangiogenesis. *Placenta* **29 Suppl A**, S48-54
137. Donoghue, J. F., Lederman, F. L., Susil, B. J., and Rogers, P. A. (2007) Lymphangiogenesis of normal endometrium and endometrial adenocarcinoma. *Hum Reprod* **22**, 1705-1713
138. Mecklenburg, L., Tobin, D. J., Muller-Rover, S., Handjiski, B., Wendt, G., Peters, E. M., Pohl, S., Moll, I., and Paus, R. (2000) Active hair growth (anagen) is associated with angiogenesis. *J Invest Dermatol* **114**, 909-916
139. Borodach, G. N., and Montagna, W. (1956) Fat in skin of the mouse during cycles of hair growth. *J Invest Dermatol* **26**, 229-232
140. Ellis, R. A., and Moretti, G. (1959) Vascular patterns associated with catagen hair follicles in the human scalp. *Ann N Y Acad Sci* **83**, 448-457
141. Yano, K., Brown, L. F., and Detmar, M. (2001) Control of hair growth and follicle size by VEGF-mediated angiogenesis. *J Clin Invest* **107**, 409-417
142. Yano, K., Brown, L. F., Lawler, J., Miyakawa, T., and Detmar, M. (2003) Thrombospondin-1 plays a critical role in the induction of hair follicle involution and vascular regression during the catagen phase. *J Invest Dermatol* **120**, 14-19
143. Carrow, R. E., Brown, R. E., and Van Huss, W. D. (1967) Fiber sizes and capillary to fiber ratios in skeletal muscle of exercised rats. *Anat Rec* **159**, 33-39
144. Andersen, P., and Henriksson, J. (1977) Capillary supply of the quadriceps femoris muscle of man: adaptive response to exercise. *J Physiol* **270**, 677-690
145. Ingjer, F. (1979) Effects of endurance training on muscle fibre ATP-ase activity, capillary supply and mitochondrial content in man. *J Physiol* **294**, 419-432
146. Gustafsson, T., Puntchart, A., Kaijser, L., Jansson, E., and Sundberg, C. J. (1999) Exercise-induced expression of angiogenesis-related transcription and growth factors in human skeletal muscle. *Am J Physiol* **276**, H679-685
147. Eming, S. A., Brachvogel, B., Odorisio, T., and Koch, M. (2007) Regulation of angiogenesis: wound healing as a model. *Prog Histochem Cytochem* **42**, 115-170

148. 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
149. Hunt, T. (1980) *Wound Healing and Wound Infection: Theory and Surgical Practice*, Appleton-Century-Crofts, New York
150. Tonnesen, M. G., Feng, X., and Clark, R. A. (2000) Angiogenesis in wound healing. *J Invest Dermatol Symp Proc* **5**, 40-46
151. Cheresch, D. A., Berliner, S. A., Vicente, V., and Ruggeri, Z. M. (1989) Recognition of distinct adhesive sites on fibrinogen by related integrins on platelets and endothelial cells. *Cell* **58**, 945-953
152. Clark, R. A., Tonnesen, M. G., Gailit, J., and Cheresch, D. A. (1996) Transient functional expression of alphaVbeta 3 on vascular cells during wound repair. *Am J Pathol* **148**, 1407-1421
153. Ji, R. C., Miura, M., Qu, P., and Kato, S. (2004) Expression of VEGFR-3 and 5'-nase in regenerating lymphatic vessels of the cutaneous wound healing. *Microsc Res Tech* **64**, 279-286
154. Paavonen, K., Puolakkainen, P., Jussila, L., Jahkola, T., and Alitalo, K. (2000) Vascular endothelial growth factor receptor-3 in lymphangiogenesis in wound healing. *Am J Pathol* **156**, 1499-1504
155. Whitaker, M. J., Quirk, R. A., Howdle, S. M., and Shakesheff, K. M. (2001) Growth factor release from tissue engineering scaffolds. *J Pharm Pharmacol* **53**, 1427-1437
156. Goldman, J., Conley, K. A., Raehl, A., Bondy, D. M., Pytowski, B., Swartz, M. A., Rutkowski, J. M., Jaroch, D. B., and Ongstad, E. L. (2007) Regulation of lymphatic capillary regeneration by interstitial flow in skin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**, H2176-2183
157. Rutkowski, J. M., Boardman, K. C., and Swartz, M. A. (2006) Characterization of lymphangiogenesis in a model of adult skin regeneration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**, H1402-1410
158. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2009. Atlanta: American Cancer Society; 2009.
159. Carmeliet, P. (1999) Developmental biology. Controlling the cellular brakes. *Nature* **401**, 657-658
160. Kerbel, R. S. (2000) Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* **21**, 505-515
161. Asahara, T., Kalka, C., and Isner, J. M. (2000) Stem cell therapy and gene transfer for regeneration. *Gene Ther* **7**, 451-457
162. Rafii, S. (2000) Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. *J Clin Invest* **105**, 17-19
163. Carmeliet, P., and Jain, R. K. (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**, 249-257
164. Benjamin, L. E., Golijanin, D., Itin, A., Pode, D., and Keshet, E. (1999) Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest* **103**, 159-165
165. Hashizume, H., Baluk, P., Morikawa, S., McLean, J. W., Thurston, G., Roberge, S., Jain, R. K., and McDonald, D. M. (2000) Openings between

- defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol* **156**, 1363-1380
166. Dvorak, H. F., Nagy, J. A., Feng, D., Brown, L. F., and Dvorak, A. M. (1999) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* **237**, 97-132
 167. Hobbs, S. K., Monsky, W. L., Yuan, F., Roberts, W. G., Griffith, L., Torchilin, V. P., and Jain, R. K. (1998) Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4607-4612
 168. Hammersen, F., Endrich, B., and Messmer, K. (1985) The fine structure of tumor blood vessels. I. Participation of non-endothelial cells in tumor angiogenesis. *Int J Microcirc Clin Exp* **4**, 31-43
 169. Chang, Y. S., di Tomaso, E., McDonald, D. M., Jones, R., Jain, R. K., and Munn, L. L. (2000) Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14608-14613
 170. Chen, X., Maniotis, A. J., Majumdar, D., Pe'er, J., and Folberg, R. (2002) Uveal melanoma cell staining for CD34 and assessment of tumor vascularity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**, 2533-2539
 171. di Tomaso, E., Capen, D., Haskell, A., Hart, J., Logie, J. J., Jain, R. K., McDonald, D. M., Jones, R., and Munn, L. L. (2005) Mosaic tumor vessels: cellular basis and ultrastructure of focal regions lacking endothelial cell markers. *Cancer Res* **65**, 5740-5749
 172. Folkman, J. (2001) Can mosaic tumor vessels facilitate molecular diagnosis of cancer? *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 398-400
 173. Maniotis, A. J., Folberg, R., Hess, A., Seftor, E. A., Gardner, L. M., Pe'er, J., Trent, J. M., Meltzer, P. S., and Hendrix, M. J. (1999) Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* **155**, 739-752
 174. McDonald, D. M., Munn, L., and Jain, R. K. (2000) Vasculogenic mimicry: how convincing, how novel, and how significant? *Am J Pathol* **156**, 383-388
 175. Willis, R. (1948) *Pathology of tumours.*, Butterworth & Co., London
 176. Konerding, M. A., Steinberg, F., and Streffer, C. (1989) The vasculature of xenotransplanted human melanomas and sarcomas on nude mice. II. Scanning and transmission electron microscopic studies. *Acta Anat (Basel)* **136**, 27-33
 177. Prause, J. U., and Jensen, O. A. (1980) Scanning electron microscopy of frozen-cracked, dry-cracked and enzyme-digested tissue of human malignant choroidal melanomas. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* **212**, 217-225
 178. Warren, B. (1979) The vascular morphology of tumors. In *Tumor Blood Circulation : Angiogenesis, Vascular Morphology and Blood Flow of Experimental and Human Tumors* (Peterson, H.-I., ed) pp. 1-48, CRC Press, Inc., Boca Raton
 179. Folberg, R., Hendrix, M. J., and Maniotis, A. J. (2000) Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol* **156**, 361-381
 180. Sharma, N., Seftor, R. E., Seftor, E. A., Gruman, L. M., Heidger, P. M., Jr., Cohen, M. B., Lubaroff, D. M., and Hendrix, M. J. (2002) Prostatic tumor cell

- plasticity involves cooperative interactions of distinct phenotypic subpopulations: role in vasculogenic mimicry. *Prostate* **50**, 189-201
181. Shirakawa, K., Wakasugi, H., Heike, Y., Watanabe, I., Yamada, S., Saito, K., and Konishi, F. (2002) Vasculogenic mimicry and pseudo-comedo formation in breast cancer. *Int J Cancer* **99**, 821-828
 182. Sun, B., Qie, S., Zhang, S., Sun, T., Zhao, X., Gao, S., Ni, C., Wang, X., Liu, Y., and Zhang, L. (2008) Role and mechanism of vasculogenic mimicry in gastrointestinal stromal tumors. *Hum Pathol* **39**, 444-451
 183. Baeten, C. I., Hillen, F., Pauwels, P., de Bruine, A. P., and Baeten, C. G. (2009) Prognostic role of vasculogenic mimicry in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* **52**, 2028-2035
 184. Li, M., Gu, Y., Zhang, Z., Zhang, S., Zhang, D., Saleem, A. F., Zhao, X., and Sun, B. (2009) Vasculogenic Mimicry: a New Prognostic Sign of Gastric Adenocarcinoma. *Pathol Oncol Res*
 185. Alsat, E., Malassine, A., Tarrade, A., Merviel, P., and Evain-Briond, D. (1999) The human cytotrophoblast: an overview of recent data. *Med Sci (Paris)* **15**, 1236-1243
 186. Damsky, C. H., and Fisher, S. J. (1998) Trophoblast pseudo-vasculogenesis: faking it with endothelial adhesion receptors. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 660-666
 187. Petty, A. P., Garman, K. L., Winn, V. D., Spidel, C. M., and Lindsey, J. S. (2007) Overexpression of carcinoma and embryonic cytotrophoblast cell-specific Mig-7 induces invasion and vessel-like structure formation. *Am J Pathol* **170**, 1763-1780
 188. Zhou, Y., Fisher, S. J., Janatpour, M., Genbacev, O., Dejana, E., Wheelock, M., and Damsky, C. H. (1997) Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J Clin Invest* **99**, 2139-2151
 189. Zhang, S., Guo, H., Zhang, D., Zhang, W., Zhao, X., Ren, Z., and Sun, B. (2006) Microcirculation patterns in different stages of melanoma growth. *Oncol Rep* **15**, 15-20
 190. Jain, R. K. (1989) Delivery of novel therapeutic agents in tumors: physiological barriers and strategies. *J Natl Cancer Inst* **81**, 570-576
 191. Boucher, Y., Leunig, M., and Jain, R. K. (1996) Tumor angiogenesis and interstitial hypertension. *Cancer Res* **56**, 4264-4266
 192. Roh, H. D., Boucher, Y., Kalnicki, S., Buchsbaum, R., Bloomer, W. D., and Jain, R. K. (1991) Interstitial hypertension in carcinoma of uterine cervix in patients: possible correlation with tumor oxygenation and radiation response. *Cancer Res* **51**, 6695-6698
 193. Clarijs, R., Ruiter, D. J., and de Waal, R. M. (2001) Lymphangiogenesis in malignant tumours: Does it occur? *J Pathol* **193**, 143-146
 194. de Waal, R. M., van Altena, M. C., Erhard, H., Weidle, U. H., Nooijen, P. T., and Ruiter, D. J. (1997) Lack of lymphangiogenesis in human primary cutaneous melanoma. Consequences for the mechanism of lymphatic dissemination. *Am J Pathol* **150**, 1951-1957
 195. Skobe, M., Hamberg, L. M., Hawighorst, T., Schirner, M., Wolf, G. L., Alitalo, K., and Detmar, M. (2001) Concurrent induction of

- lymphangiogenesis, angiogenesis, and macrophage recruitment by vascular endothelial growth factor-C in melanoma. *Am J Pathol* **159**, 893-903
196. Wiley, H. E., Gonzalez, E. B., Maki, W., Wu, M. T., and Hwang, S. T. (2001) Expression of CC chemokine receptor-7 and regional lymph node metastasis of B16 murine melanoma. *J Natl Cancer Inst* **93**, 1638-1643
 197. Gunn, M. D., Kyuwa, S., Tam, C., Kakiuchi, T., Matsuzawa, A., Williams, L. T., and Nakano, H. (1999) Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med* **189**, 451-460
 198. Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S. N., Barrera, J. L., Mohar, A., Verastegui, E., and Zlotnik, A. (2001) Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* **410**, 50-56
 199. Ferrara, N., and Alitalo, K. (1999) Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med* **5**, 1359-1364
 200. Isner, J. M., and Asahara, T. (1999) Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest* **103**, 1231-1236
 201. Jussila, L., and Alitalo, K. (2002) Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol Rev* **82**, 673-700
 202. Abdelrahim, M., Konduri, S., Basha, R., Philip, P. A., and Baker, C. H. (2009) Angiogenesis: an update and potential drug approaches (review). *Int J Oncol* **36**, 5-18
 203. Makrilia, N., Lappa, T., Xyla, V., Nikolaidis, I., and Syrigos, K. (2009) The role of angiogenesis in solid tumours: an overview. *Eur J Intern Med* **20**, 663-671
 204. Clover, A. J., and McCarthy, M. J. (2003) Developing strategies for therapeutic angiogenesis: vascular endothelial growth factor alone may not be the answer. *Br J Plast Surg* **56**, 314
 205. Greenberg, J. I., and Cheresch, D. A. (2009) VEGF as an inhibitor of tumor vessel maturation: implications for cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther* **9**, 1347-1356
 206. Veeravagu, A., Hsu, A. R., Cai, W., Hou, L. C., Tse, V. C., and Chen, X. (2007) Vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor inhibitors as anti-angiogenic agents in cancer therapy. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* **2**, 59-71
 207. Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., Ferrara, N., Fyfe, G., Rogers, B., Ross, R., and Kabbinavar, F. (2004) Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* **350**, 2335-2342
 208. Willett, C. G., Boucher, Y., di Tomaso, E., Duda, D. G., Munn, L. L., Tong, R. T., Chung, D. C., Sahani, D. V., Kalva, S. P., Kozin, S. V., Mino, M., Cohen, K. S., Scadden, D. T., Hartford, A. C., Fischman, A. J., Clark, J. W., Ryan, D. P., Zhu, A. X., Blaszkowsky, L. S., Chen, H. X., Shellito, P. C., Lauwers, G. Y., and Jain, R. K. (2004) Direct evidence that the VEGF-

- specific antibody bevacizumab has antivasular effects in human rectal cancer. *Nat Med* **10**, 145-147
209. Hansen-Algenstaedt, N., Stoll, B. R., Padera, T. P., Dolmans, D. E., Hicklin, D. J., Fukumura, D., and Jain, R. K. (2000) Tumor oxygenation in hormone-dependent tumors during vascular endothelial growth factor receptor-2 blockade, hormone ablation, and chemotherapy. *Cancer Res* **60**, 4556-4560
 210. Lee, C. G., Heijn, M., di Tomaso, E., Griffon-Etienne, G., Ancukiewicz, M., Koike, C., Park, K. R., Ferrara, N., Jain, R. K., Suit, H. D., and Boucher, Y. (2000) Anti-Vascular endothelial growth factor treatment augments tumor radiation response under normoxic or hypoxic conditions. *Cancer Res* **60**, 5565-5570
 211. Hockel, M., Schlenger, K., Mitze, M., Schaffer, U., and Vaupel, P. (1996) Hypoxia and Radiation Response in Human Tumors. *Semin Radiat Oncol* **6**, 3-9
 212. Parvin, J. (2002) Editor's corner: in this issue. *Cancer Biol Ther* (**1**), 595-596
 213. Sood, A. K., Fletcher, M. S., Coffin, J. E., Yang, M., Seftor, E. A., Gruman, L. M., Gershenson, D. M., and Hendrix, M. J. (2004) Functional role of matrix metalloproteinases in ovarian tumor cell plasticity. *Am J Obstet Gynecol* **190**, 899-909
 214. Liu, C., Huang, H., Donate, F., Dickinson, C., Santucci, R., El-Sheikh, A., Vessella, R., and Edgington, T. S. (2002) Prostate-specific membrane antigen directed selective thrombotic infarction of tumors. *Cancer Res* **62**, 5470-5475
 215. Pytowski, B., Goldman, J., Persaud, K., Wu, Y., Witte, L., Hicklin, D. J., Skobe, M., Boardman, K. C., and Swartz, M. A. (2005) Complete and specific inhibition of adult lymphatic regeneration by a novel VEGFR-3 neutralizing antibody. *J Natl Cancer Inst* **97**, 14-21
 216. Young, D. M., Greulich, K. M., and Weier, H. G. (1996) Species-specific in situ hybridization with fluorochrome-labeled DNA probes to study vascularization of human skin grafts on athymic mice. *J Burn Care Rehabil* **17**, 305-310
 217. Boyce, S. T., Greenhalgh, D. G., Kagan, R. J., Housinger, T., Sorrell, J. M., Childress, C. P., Rieman, M., and Warden, G. D. (1993) Skin anatomy and antigen expression after burn wound closure with composite grafts of cultured skin cells and biopolymers. *Plast Reconstr Surg* **91**, 632-641
 218. Tremblay, P. L., Hudon, V., Berthod, F., Germain, L., and Auger, F. A. (2005) Inosculation of tissue-engineered capillaries with the host's vasculature in a reconstructed skin transplanted on mice. *Am J Transplant* **5**, 1002-1010
 219. Compton, C. C., Butler, C. E., Yannas, I. V., Warland, G., and Orgill, D. P. (1998) Organized skin structure is regenerated in vivo from collagen-GAG matrices seeded with autologous keratinocytes. *J Invest Dermatol* **110**, 908-916
 220. Cooper, M. L., Andree, C., Hansbrough, J. F., Zapata-Sirvent, R. L., and Spielvogel, R. L. (1993) Direct comparison of a cultured composite skin substitute containing human keratinocytes and fibroblasts to an epidermal sheet graft containing human keratinocytes on athymic mice. *J Invest Dermatol* **101**, 811-819

221. Kangesu, T., Navsaria, H. A., Manek, S., Fryer, P. R., Leigh, I. M., and Green, C. J. (1993) Kerato-dermal grafts: the importance of dermis for the in vivo growth of cultured keratinocytes. *Br J Plast Surg* **46**, 401-409
222. Lamme, E. N., de Vries, H. J., van Veen, H., Gabbiani, G., Westerhof, W., and Middelkoop, E. (1996) Extracellular matrix characterization during healing of full-thickness wounds treated with a collagen/elastin dermal substitute shows improved skin regeneration in pigs. *J Histochem Cytochem* **44**, 1311-1322
223. Lamme, E. N., Van Leeuwen, R. T., Brandsma, K., Van Marle, J., and Middelkoop, E. (2000) Higher numbers of autologous fibroblasts in an artificial dermal substitute improve tissue regeneration and modulate scar tissue formation. *J Pathol* **190**, 595-603
224. Harrison, C. A., and MacNeil, S. (2008) The mechanism of skin graft contraction: an update on current research and potential future therapies. *Burns* **34**, 153-163
225. Boyce, S. T., Supp, A. P., Harriger, M. D., Greenhalgh, D. G., and Warden, G. D. (1995) Topical nutrients promote engraftment and inhibit wound contraction of cultured skin substitutes in athymic mice. *J Invest Dermatol* **104**, 345-349
226. American Society of Plastic Surgeons. 2000/2007/2008 National Plastic Surgery Statistics, Cosmetic and Reconstructive Procedure Trends. See http://www.plasticsurgery.org/Media/Statistics/2008_Statistics.html
227. American Society of Plastic Surgeons. 2008 Top Five Plastic Surgery Procedures Charts, Cosmetic and Reconstructive Procedure Trends. See http://www.plasticsurgery.org/Media/Statistics/2008_Statistics.html
228. Alster, T. S., and West, T. B. (2000) Human-derived and new synthetic injectable materials for soft-tissue augmentation: current status and role in cosmetic surgery. *Plast Reconstr Surg* **105**, 2515-2525; discussion 2526-2518
229. Eppley, B. L., and Dadvand, B. (2006) Injectable soft-tissue fillers: clinical overview. *Plast Reconstr Surg* **118**, 98e-106e
230. Johl, S. S., and Burgett, R. A. (2006) Dermal filler agents: a practical review. *Curr Opin Ophthalmol* **17**, 471-479
231. Etienne, O., Schneider, A., Kluge, J. A., Bellemin-Lapponnaz, C., Polidori, C., Leisk, G. G., Kaplan, D. L., Garlick, J. A., and Egles, C. (2009) Soft tissue augmentation using silk gels: an in vitro and in vivo study. *J Periodontol* **80**, 1852-1858
232. Sariguney, Y., Demir, Y. H., Yavuzer, R., Elmas, C., and Atabay, K. (2007) Scar tissue graft as a filler for soft tissue augmentation. *Aesthetic Plast Surg* **31**, 692-696
233. Lowe, N. J., Maxwell, C. A., and Patnaik, R. (2005) Adverse reactions to dermal fillers: review. *Dermatol Surg* **31**, 1616-1625
234. Obradovic, B., Carrier, R. L., Vunjak-Novakovic, G., and Freed, L. E. (1999) Gas exchange is essential for bioreactor cultivation of tissue engineered cartilage. *Biotechnol Bioeng* **63**, 197-205

235. Pellegrini, G., Traverso, C. E., Franzi, A. T., Zingirian, M., Cancedda, R., and De Luca, M. (1997) Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* **349**, 990-993
236. Rheinwald, J. G., and Green, H. (1975) Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* **6**, 331-343
237. Zandonella, C. (2003) Tissue engineering: The beat goes on. *Nature* **421**, 884-886
238. Griffith, C. K., Miller, C., Sainson, R. C., Calvert, J. W., Jeon, N. L., Hughes, C. C., and George, S. C. (2005) Diffusion limits of an in vitro thick prevascularized tissue. *Tissue Eng* **11**, 257-266
239. Jain, R. K., Schlenger, K., Hockel, M., and Yuan, F. (1997) Quantitative angiogenesis assays: progress and problems. *Nat Med* **3**, 1203-1208
240. Auerbach, R., Akhtar, N., Lewis, R. L., and Shinnars, B. L. (2000) Angiogenesis assays: problems and pitfalls. *Cancer Metastasis Rev* **19**, 167-172
241. Ucuzian, A. A., and Greisler, H. P. (2007) In vitro models of angiogenesis. *World J Surg* **31**, 654-663
242. Niklason, L. E., Koh, J., and Solan, A. (2002) Tissue engineering of the lymphatic system. *Ann N Y Acad Sci* **979**, 27-34; discussion 35-28
243. Hudon, V., Berthod, F., Black, A. F., Damour, O., Germain, L., and Auger, F. A. (2003) A tissue-engineered endothelialized dermis to study the modulation of angiogenic and angiostatic molecules on capillary-like tube formation in vitro. *Br J Dermatol* **148**, 1094-1104
244. Tremblay, P. L., Berthod, F., Germain, L., and Auger, F. A. (2005) In vitro evaluation of the angiostatic potential of drugs using an endothelialized tissue-engineered connective tissue. *J Pharmacol Exp Ther* **315**, 510-516
245. Rizzi, S. C., Upton, Z., Bott, K., and Dargaville, T. R. (2010) Recent advances in dermal wound healing: biomedical device approaches. *Expert Rev Med Devices* **7**, 143-154
246. Greenhalgh, D. G. (2005) Models of wound healing. *J Burn Care Rehabil* **26**, 293-305
247. Xie, Y., Rizzi, S. C., Dawson, R., Lynam, E., Richards, S., Leavesley, D. I., and Upton, Z. (2010) Development of a Three-Dimensional Human Skin Equivalent Wound Model for Investigating Novel Wound Healing Therapies. *Tissue Eng Part C Methods*
248. Geer, D. J., Swartz, D. D., and Andreadis, S. T. (2004) In vivo model of wound healing based on transplanted tissue-engineered skin. *Tissue Eng* **10**, 1006-1017
249. Herman, I. M., and Leung, A. (2009) Creation of human skin equivalents for the in vitro study of angiogenesis in wound healing. *Methods Mol Biol* **467**, 241-248
250. Bouhadir, K. H., and Mooney, D. J. (2001) Promoting angiogenesis in engineered tissues. *J Drug Target* **9**, 397-406
251. Cassell, O. C., Hofer, S. O., Morrison, W. A., and Knight, K. R. (2002) Vascularisation of tissue-engineered grafts: the regulation of angiogenesis in reconstructive surgery and in disease states. *Br J Plast Surg* **55**, 603-610

252. Laschke, M. W., Harder, Y., Amon, M., Martin, I., Farhadi, J., Ring, A., Torio-Padron, N., Schramm, R., Rucker, M., Junker, D., Haufel, J. M., Carvalho, C., Heberer, M., Germann, G., Vollmar, B., and Menger, M. D. (2006) Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes. *Tissue Eng* **12**, 2093-2104
253. Rivron, N. C., Liu, J. J., Rouwkema, J., de Boer, J., and van Blitterswijk, C. A. (2008) Engineering vascularised tissues in vitro. *Eur Cell Mater* **15**, 27-40
254. Hitchcock, T., and Niklason, L. (2008) Lymphatic tissue engineering: progress and prospects. *Ann NY Acad Sci* **1131**, 44-49
255. Terheyden, H., Knak, C., Jepsen, S., Palmie, S., and Rueger, D. R. (2001) Mandibular reconstruction with a prefabricated vascularized bone graft using recombinant human osteogenic protein-1: an experimental study in miniature pigs. Part I: Prefabrication. *Int J Oral Maxillofac Surg* **30**, 373-379
256. Warnke, P. H., Springer, I. N., Wiltfang, J., Acil, Y., Eufinger, H., Wehmoller, M., Russo, P. A., Bolte, H., Sherry, E., Behrens, E., and Terheyden, H. (2004) Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet* **364**, 766-770
257. Campbell, J. H., Efendy, J. L., and Campbell, G. R. (1999) Novel vascular graft grown within recipient's own peritoneal cavity. *Circ Res* **85**, 1173-1178
258. Campbell, G. R., Turnbull, G., Xiang, L., Haines, M., Armstrong, S., Rolfe, B. E., and Campbell, J. H. (2008) The peritoneal cavity as a bioreactor for tissue engineering visceral organs: bladder, uterus and vas deferens. *J Tissue Eng Regen Med* **2**, 50-60
259. Hayashida, K., Kanda, K., Yaku, H., Ando, J., and Nakayama, Y. (2007) Development of an in vivo tissue-engineered, autologous heart valve (the biovalve): preparation of a prototype model. *J Thorac Cardiovasc Surg* **134**, 152-159
260. Sievers, H. H. (2007) In vivo tissue engineering an autologous semilunar biovalve: can we get what we want? *J Thorac Cardiovasc Surg* **134**, 20-22, 22 e21
261. Nor, J. E., Peters, M. C., Christensen, J. B., Sutorik, M. M., Linn, S., Khan, M. K., Addison, C. L., Mooney, D. J., and Polverini, P. J. (2001) Engineering and characterization of functional human microvessels in immunodeficient mice. *Lab Invest* **81**, 453-463
262. Koike, N., Fukumura, D., Gralla, O., Au, P., Schechner, J. S., and Jain, R. K. (2004) Tissue engineering: creation of long-lasting blood vessels. *Nature* **428**, 138-139
263. Erol, O. O. (1976) The transformation of a free skin graft into a vascularized pedicled flap. *Plast Reconstr Surg* **58**, 470-477
264. Erol, O. O., and Sira, M. (1980) New capillary bed formation with a surgically constructed arteriovenous fistula. *Plast Reconstr Surg* **66**, 109-115
265. Mian, R., Morrison, W. A., Hurley, J. V., Penington, A. J., Romeo, R., Tanaka, Y., and Knight, K. R. (2000) Formation of new tissue from an arteriovenous loop in the absence of added extracellular matrix. *Tissue Eng* **6**, 595-603
266. Tanaka, Y., Tsutsumi, A., Crowe, D. M., Tajima, S., and Morrison, W. A. (2000) Generation of an autologous tissue (matrix) flap by combining an

- arteriovenous shunt loop with artificial skin in rats: preliminary report. *Br J Plast Surg* **53**, 51-57
267. Kneser, U., Polykandriotis, E., Ohnolz, J., Heidner, K., Grabinger, L., Euler, S., Amann, K. U., Hess, A., Brune, K., Greil, P., Sturzl, M., and Horch, R. E. (2006) Engineering of vascularized transplantable bone tissues: induction of axial vascularization in an osteoconductive matrix using an arteriovenous loop. *Tissue Eng* **12**, 1721-1731
268. Messina, A., Bortolotto, S. K., Cassell, O. C., Kelly, J., Abberton, K. M., and Morrison, W. A. (2005) Generation of a vascularized organoid using skeletal muscle as the inductive source. *FASEB J* **19**, 1570-1572
269. Polykandriotis, E., Tjiawi, J., Euler, S., Arkudas, A., Hess, A., Brune, K., Greil, P., Lametschwandtner, A., Horch, R. E., and Kneser, U. (2008) The venous graft as an effector of early angiogenesis in a fibrin matrix. *Microvasc Res* **75**, 25-33
270. Lokmic, Z., Stillaert, F., Morrison, W. A., Thompson, E. W., and Mitchell, G. M. (2007) An arteriovenous loop in a protected space generates a permanent, highly vascular, tissue-engineered construct. *FASEB J* **21**, 511-522
271. Peters, M. C., Polverini, P. J., and Mooney, D. J. (2002) Engineering vascular networks in porous polymer matrices. *J Biomed Mater Res* **60**, 668-678
272. Lee, K. Y., Peters, M. C., Anderson, K. W., and Mooney, D. J. (2000) Controlled growth factor release from synthetic extracellular matrices. *Nature* **408**, 998-1000
273. Helm, C. L., Zisch, A., and Swartz, M. A. (2007) Engineered blood and lymphatic capillaries in 3-D VEGF-fibrin-collagen matrices with interstitial flow. *Biotechnol Bioeng* **96**, 167-176
274. Tabata, Y., Miyao, M., Yamamoto, M., and Ikada, Y. (1999) Vascularization into a porous sponge by sustained release of basic fibroblast growth factor. *J Biomater Sci Polym Ed* **10**, 957-968
275. Perets, A., Baruch, Y., Weisbuch, F., Shoshany, G., Neufeld, G., and Cohen, S. (2003) Enhancing the vascularization of three-dimensional porous alginate scaffolds by incorporating controlled release basic fibroblast growth factor microspheres. *J Biomed Mater Res A* **65**, 489-497
276. Aigner, J., Tegeler, J., Hutzler, P., Campoccia, D., Pavesio, A., Hammer, C., Kastenbauer, E., and Naumann, A. (1998) Cartilage tissue engineering with novel nonwoven structured biomaterial based on hyaluronic acid benzyl ester. *J Biomed Mater Res* **42**, 172-181
277. Cao, Y., Rodriguez, A., Vacanti, M., Ibarra, C., Arevalo, C., and Vacanti, C. A. (1998) Comparative study of the use of poly(glycolic acid), calcium alginate and pluronics in the engineering of autologous porcine cartilage. *J Biomater Sci Polym Ed* **9**, 475-487
278. Mendelsohn, M., and Dunlop, G. (1998) Gore-tex augmentation grafting in rhinoplasty--is it safe? *J Otolaryngol* **27**, 337-341
279. Sclafani, A. P., Thomas, J. R., Cox, A. J., and Cooper, M. H. (1997) Clinical and histologic response of subcutaneous expanded polytetrafluoroethylene (Gore-Tex) and porous high-density polyethylene (Medpor) implants to acute and early infection. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **123**, 328-336

280. Badylak, S. F., and Gilbert, T. W. (2008) Immune response to biologic scaffold materials. *Semin Immunol* **20**, 109-116
281. Chaplin, J. M., Costantino, P. D., Wolpoe, M. E., Bederson, J. B., Griffey, E. S., and Zhang, W. X. (1999) Use of an acellular dermal allograft for dural replacement: an experimental study. *Neurosurgery* **45**, 320-327
282. Eming, S. A., Medalie, D. A., Tompkins, R. G., Yarmush, M. L., and Morgan, J. R. (1998) Genetically modified human keratinocytes overexpressing PDGF-A enhance the performance of a composite skin graft. *Hum Gene Ther* **9**, 529-539
283. Supp, D. M., Bell, S. M., Morgan, J. R., and Boyce, S. T. (2000) Genetic modification of cultured skin substitutes by transduction of human keratinocytes and fibroblasts with platelet-derived growth factor-A. *Wound Repair Regen* **8**, 26-35
284. Supp, D. M., Supp, A. P., Bell, S. M., and Boyce, S. T. (2000) Enhanced vascularization of cultured skin substitutes genetically modified to overexpress vascular endothelial growth factor. *J Invest Dermatol* **114**, 5-13
285. Supp, D. M., and Boyce, S. T. (2002) Overexpression of vascular endothelial growth factor accelerates early vascularization and improves healing of genetically modified cultured skin substitutes. *J Burn Care Rehabil* **23**, 10-20
286. Supp, D. M., Karpinski, A. C., and Boyce, S. T. (2004) Vascular endothelial growth factor overexpression increases vascularization by murine but not human endothelial cells in cultured skin substitutes grafted to athymic mice. *J Burn Care Rehabil* **25**, 337-345
287. 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**, 9191-9196
288. Schechner, J. S., Crane, S. K., Wang, F., Szeglin, 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**, 2250-2256
289. Mironov, V., Reis, N., and Derby, B. (2006) Review: bioprinting: a beginning. *Tissue Eng* **12**, 631-634
290. Mironov, V., Boland, T., Trusk, T., Forgacs, G., and Markwald, R. R. (2003) Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering. *Trends Biotechnol* **21**, 157-161
291. Cui, X., and Boland, T. (2009) Human microvasculature fabrication using thermal inkjet printing technology. *Biomaterials* **30**, 6221-6227
292. Chang, E. I., Bonillas, R. G., El-ftesi, S., Ceradini, D. J., Vial, I. N., Chan, D. A., Michaels, J. t., and Gurtner, G. C. (2009) Tissue engineering using autologous microcirculatory beds as vascularized bioscaffolds. *FASEB J* **23**, 906-915
293. Kobayashi, A., Miyake, H., Hattori, H., Kuwana, R., Hiruma, Y., Nakahama, K., Ichinose, S., Ota, M., Nakamura, M., Takeda, S., and Morita, I. (2007) In vitro formation of capillary networks using optical lithographic techniques. *Biochem Biophys Res Commun* **358**, 692-697

294. Nelson, C. M., and Tien, J. (2006) Microstructured extracellular matrices in tissue engineering and development. *Curr Opin Biotechnol* **17**, 518-523
295. Ng, C. P., Helm, C. L., and Swartz, M. A. (2004) Interstitial flow differentially stimulates blood and lymphatic endothelial cell morphogenesis in vitro. *Microvasc Res* **68**, 258-264
296. 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**, 1331-1340
297. Chen, X., Aledia, A. S., Ghajar, C. M., Griffith, C. K., Putnam, A. J., Hughes, C. C., and George, S. C. (2009) Prevascularization of a fibrin-based tissue construct accelerates the formation of functional anastomosis with host vasculature. *Tissue Eng Part A* **15**, 1363-1371
298. Lee, Y., and Hwang, K. (2002) Skin thickness of Korean adults. *Surg Radiol Anat* **24**, 183-189
299. Valladeau, J., and Saeland, S. (2005) Cutaneous dendritic cells. *Semin Immunol* **17**, 273-283
300. Young, A. R. (2010) Some light on the photobiology of vitamin D. *J Invest Dermatol* **130**, 346-348
301. Stroud, M. L., Stilgoe, S., Stott, V. E., Alhabian, O., and Salman, K. (2008) Vitamin D - a review. *Aust Fam Physician* **37**, 1002-1005
302. Cannell, J. J., Hollis, B. W., Zasloff, M., and Heaney, R. P. (2008) Diagnosis and treatment of vitamin D deficiency. *Expert Opin Pharmacother* **9**, 107-118
303. Picardo, M., Ottaviani, M., Camera, E., and Mastrofrancesco, A. (2009) Sebaceous gland lipids. *Dermatoendocrinol* **1**, 68-71
304. Zouboulis, C. C., Baron, J. M., Bohm, M., Kippenberger, S., Kurzen, H., Reichrath, J., and Thielitz, A. (2008) Frontiers in sebaceous gland biology and pathology. *Exp Dermatol* **17**, 542-551
305. Boulais, N., and Misery, L. (2008) The epidermis: a sensory tissue. *Eur J Dermatol* **18**, 119-127
306. Charkoudian, N. (2003) Skin blood flow in adult human thermoregulation: how it works, when it does not, and why. *Mayo Clin Proc* **78**, 603-612
307. Taylor, W. F., Johnson, J. M., O'Leary, D., and Park, M. K. (1984) Effect of high local temperature on reflex cutaneous vasodilation. *J Appl Physiol* **57**, 191-196
308. Daanen, H. A. (2003) Finger cold-induced vasodilation: a review. *Eur J Appl Physiol* **89**, 411-426
309. Stephen, I. D., Coetzee, V., Law Smith, M., and Perrett, D. I. (2009) Skin blood perfusion and oxygenation colour affect perceived human health. *PLoS One* **4**, e5083
310. Stephen, I. D., Law Smith, M. J., Stirrat, M. R., and Perrett, D. I. (2009) Facial Skin Coloration Affects Perceived Health of Human Faces. *Int J Primatol* **30**, 845-857
311. Nemes, Z., and Steinert, P. M. (1999) Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Exp Mol Med* **31**, 5-19
312. Proksch, E., Brandner, J. M., and Jensen, J. M. (2008) The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol* **17**, 1063-1072

313. Boulais, N., and Misery, L. (2007) Merkel cells. *J Am Acad Dermatol* **57**, 147-165
314. Seiberg, M. (2001) Keratinocyte-melanocyte interactions during melanosome transfer. *Pigment Cell Res* **14**, 236-242
315. Prost-Squarcioni, C., Fraitag, S., Heller, M., and Boehm, N. (2008) [Functional histology of dermis]. *Ann Dermatol Venereol* **135**, 1S5-20
316. Kucken, M., and Newell, A. C. (2005) Fingerprint formation. *J Theor Biol* **235**, 71-83
317. Braverman, I. M. (2000) The cutaneous microcirculation. *J Investig Dermatol Symp Proc* **5**, 3-9
318. Fagrell, B. (1995) Advances in microcirculation network evaluation: an update. *Int J Microcirc Clin Exp* **15 Suppl 1**, 34-40
319. Geras, A. (1990) *Dermatology: a medical artist's interpretation*, Basel, Switzerland: Sandoz Pharma
320. Saharinen, P., Tammela, T., Karkkainen, M. J., and Alitalo, K. (2004) Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation. *Trends Immunol* **25**, 387-395
321. Forbes, G. (1938) Lymphatics of the Skin, with a Note on Lymphatic Watershed Areas. *J Anat* **72**, 399-410
322. Braverman, I. M., and Keh-Yen, A. (1981) Ultrastructure of the human dermal microcirculation. III. The vessels in the mid- and lower dermis and subcutaneous fat. *J Invest Dermatol* **77**, 297-304
323. Clark, E., and Clark, E. (1937) Observations on living mammalian lymphatic capillaries-their relation to the blood vessels. *American Journal of Anatomy* **60**, 253-298
324. Reynolds, H. M., Dunbar, P. R., Uren, R. F., Blackett, S. A., Thompson, J. F., and Smith, N. P. (2007) Three-dimensional visualisation of lymphatic drainage patterns in patients with cutaneous melanoma. *Lancet Oncol* **8**, 806-812
325. Reynolds, H. M., Smith, N. P., Uren, R. F., Thompson, J. F., and Dunbar, P. R. (2009) Three-dimensional visualization of skin lymphatic drainage patterns of the head and neck. *Head Neck* **31**, 1316-1325
326. Kivirikko, K. I., and Myllyla, R. (1979) Collagen glycosyltransferases. *Int Rev Connect Tissue Res* **8**, 23-72
327. Padh, H. (1990) Cellular functions of ascorbic acid. *Biochem Cell Biol* **68**, 1166-1173
328. Rosenbloom, J., Harsch, M., and Jimenez, S. (1973) Hydroxyproline content determines the denaturation temperature of chick tendon collagen. *Arch Biochem Biophys* **158**, 478-484
329. Davidson, J. M., and Berg, R. A. (1981) Posttranslational events in collagen biosynthesis. *Methods Cell Biol* **23**, 119-136
330. Lyons, B. L., and Schwarz, R. I. (1984) Ascorbate stimulation of PAT cells causes an increase in transcription rates and a decrease in degradation rates of procollagen mRNA. *Nucleic Acids Res* **12**, 2569-2579
331. Schwarz, R. I. (1985) Procollagen secretion meets the minimum requirements for the rate-controlling step in the ascorbate induction of procollagen synthesis. *J Biol Chem* **260**, 3045-3049

332. Davidson, J. M., LuValle, P. A., Zoia, O., Quaglino, D., Jr., and Giro, M. (1997) Ascorbate differentially regulates elastin and collagen biosynthesis in vascular smooth muscle cells and skin fibroblasts by pretranslational mechanisms. *J Biol Chem* **272**, 345-352
333. Baron, J. H. (2009) Sailors' scurvy before and after James Lind--a reassessment. *Nutr Rev* **67**, 315-332
334. Bevillon, E. (1992) Jacques Cartier, le scorbut, et la bière de sapinette. In *Pharmacie*, Thèse de doctorat, faculté de Pharmacie, université de Nantes
335. Auger, F. A., Rémy-Zolghadri, M., Grenier, G., and Germain, L. (2000) Review: The Self-Assembly Approach for Organ Reconstruction by Tissue Engineering. *e-biomed: The Journal of Regenerative Medicine* **1**, 75-86
336. Euvrard, S., Kanitakis, J., and Claudy, A. (2003) Skin cancers after organ transplantation. *N Engl J Med* **348**, 1681-1691
337. Quatresooz, P., Pierard, G. E., Paquet, P., Blaise, G., and Pierard-Franchimont, C. (2007) [Cutaneous cancers after organ transplantation]. *Rev Med Liege* **62**, 663-668
338. Taylor, A. L., Watson, C. J., and Bradley, J. A. (2005) Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Crit Rev Oncol Hematol* **56**, 23-46
339. Urschel, S., Altamirano-Diaz, L. A., and West, L. J. (2010) Immunosuppression armamentarium in 2010: mechanistic and clinical considerations. *Pediatr Clin North Am* **57**, 433-457, table of contents
340. Boyce, S. T., Supp, A. P., Swope, V. B., and Warden, G. D. (2002) Vitamin C regulates keratinocyte viability, epidermal barrier, and basement membrane in vitro, and reduces wound contraction after grafting of cultured skin substitutes. *J Invest Dermatol* **118**, 565-572
341. Bellemare, J., Roberge, C. J., Bergeron, D., Lopez-Valle, C. A., Roy, M., and Moulin, V. J. (2005) Epidermis promotes dermal fibrosis: role in the pathogenesis of hypertrophic scars. *J Pathol* **206**, 1-8
342. L'Heureux, N., Paquet, S., Labbe, R., Germain, L., and Auger, F. A. (1998) A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J* **12**, 47-56
343. Green, H., Kehinde, O., and Thomas, J. (1979) Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 5665-5668
344. Berthod, F., Saintigny, G., Chretien, F., Hayek, D., Collombel, C., and Damour, O. (1994) Optimization of thickness, pore size and mechanical properties of a biomaterial designed for deep burn coverage. *Clin Mater* **15**, 259-265
345. Deutsch, A., Lubach, D., Nissen, S., and Neukam, D. (1992) Ultrastructural studies on the invasion of melanomas in initial lymphatics of human skin. *J Invest Dermatol* **98**, 64-67
346. Karpanen, T., and Alitalo, K. (2001) Lymphatic vessels as targets of tumor therapy? *J Exp Med* **194**, F37-42
347. Pepper, M. S. (2001) Lymphangiogenesis and tumor metastasis: myth or reality? *Clin Cancer Res* **7**, 462-468

348. Garrafa, E., Alessandri, G., Benetti, A., Turetta, D., Corradi, A., Cantoni, A. M., Cervi, E., Bonardelli, S., Parati, E., Giulini, S. M., Ensoli, B., and Caruso, A. (2006) Isolation and characterization of lymphatic microvascular endothelial cells from human tonsils. *J Cell Physiol* **207**, 107-113
349. Kriehuber, E., Breiteneder-Geleff, S., Groeger, M., Soleiman, A., Schoppmann, S. F., Stingl, G., Kerjaschki, D., and Maurer, D. (2001) Isolation and characterization of dermal lymphatic and blood endothelial cells reveal stable and functionally specialized cell lineages. *J Exp Med* **194**, 797-808
350. Nisato, R. E., Buser, R., and Pepper, M. S. (2009) Lymphatic endothelial cells: establishment of primaries and characterization of established lines. *Methods Mol Biol* **467**, 113-126
351. Podgrabinska, S., Braun, P., Velasco, P., Kloos, B., Pepper, M. S., and Skobe, M. (2002) Molecular characterization of lymphatic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 16069-16074
352. Leu, A. J., Berk, D. A., Lymboussaki, A., Alitalo, K., and Jain, R. K. (2000) Absence of functional lymphatics within a murine sarcoma: a molecular and functional evaluation. *Cancer Res* **60**, 4324-4327
353. Michel, M., L'Heureux, N., Pouliot, R., Xu, W., Auger, F. A., and Germain, L. (1999) Characterization of a new tissue-engineered human skin equivalent with hair. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **35**, 318-326
354. Pouliot, R., Larouche, D., Auger, F. A., Juhasz, J., Xu, W., Li, H., and Germain, L. (2002) Reconstructed human skin produced in vitro and grafted on athymic mice. *Transplantation* **73**, 1751-1757
355. Cvetkovska, B., Islam, N., Goulet, F., and Germain, L. (2008) Identification of functional markers in a self-assembled skin substitute in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **44**, 444-450
356. Barai, N. D., Boyce, S. T., Hoath, S. B., Visscher, M. O., and Kasting, G. B. (2008) Improved barrier function observed in cultured skin substitutes developed under anchored conditions. *Skin Res Technol* **14**, 418-424
357. Fradette, J., Larouche, D., Fugere, C., Guignard, R., Beauparlant, A., Couture, V., Caouette-Laberge, L., Roy, A., and Germain, L. (2003) Normal human Merkel cells are present in epidermal cell populations isolated and cultured from glabrous and hairy skin sites. *J Invest Dermatol* **120**, 313-317
358. Blais, M., Grenier, M., and Berthod, F. (2009) Improvement of nerve regeneration in tissue-engineered skin enriched with schwann cells. *J Invest Dermatol* **129**, 2895-2900
359. Gu, X. H., Terenghi, G., Kangesu, T., Navsaria, H. A., Springall, D. R., Leigh, I. M., Green, C. J., and Polak, J. M. (1995) Regeneration pattern of blood vessels and nerves in cultured keratinocyte grafts assessed by confocal laser scanning microscopy. *Br J Dermatol* **132**, 376-383
360. Kangesu, T., Manek, S., Terenghi, G., Gu, X. H., Navsaria, H. A., Polak, J. M., Green, C. J., and Leigh, I. M. (1998) Nerve and blood vessel growth in response to grafted dermis and cultured keratinocytes. *Plast Reconstr Surg* **101**, 1029-1038

361. Hobson, M. I., Brown, R., Green, C. J., and Terenghi, G. (1997) Interrelationships between angiogenesis and nerve regeneration: a histochemical study. *Br J Plast Surg* **50**, 125-131
362. Siemionow, M., and Nasir, S. (2008) Immunologic responses in vascularized and nonvascularized skin allografts. *J Reconstr Microsurg* **24**, 497-505
363. McFarland, K. L., Klingenberg, J. M., Boyce, S. T., and Supp, D. M. (2008) Expression of genes encoding antimicrobial proteins and members of the toll-like receptor/nuclear factor-kappaB pathways in engineered human skin. *Wound Repair Regen* **16**, 534-541
364. Supp, D. M., Karpinski, A. C., and Boyce, S. T. (2004) Expression of human beta-defensins HBD-1, HBD-2, and HBD-3 in cultured keratinocytes and skin substitutes. *Burns* **30**, 643-648
365. Downing, B. R., Cornwell, K., Toner, M., and Pins, G. D. (2005) The influence of microtextured basal lamina analog topography on keratinocyte function and epidermal organization. *J Biomed Mater Res A* **72**, 47-56
366. Pins, G. D., Toner, M., and Morgan, J. R. (2000) Microfabrication of an analog of the basal lamina: biocompatible membranes with complex topographies. *FASEB J* **14**, 593-602
367. Lee, E. J., and Niklason, L. (2010) A novel flow bioreactor for in vitro microvascularization. *Tissue Eng Part C Methods*
368. Li, Q., Jiang, Q., Pfendner, E., Varadi, A., and Uitto, J. (2009) Pseudoxanthoma elasticum: clinical phenotypes, molecular genetics and putative pathomechanisms. *Exp Dermatol* **18**, 1-11
369. Uitto, J., Li, Q., and Jiang, Q. (2010) Pseudoxanthoma elasticum: molecular genetics and putative pathomechanisms. *J Invest Dermatol* **130**, 661-670
370. Abbot, S. E., Kaul, A., Stevens, C. R., and Blake, D. R. (1992) Isolation and culture of synovial microvascular endothelial cells. Characterization and assessment of adhesion molecule expression. *Arthritis Rheum* **35**, 401-406
371. Kraling, B. M., Jimenez, S. A., Sorger, T., and Maul, G. G. (1994) Isolation and characterization of microvascular endothelial cells from the adult human dermis and from skin biopsies of patients with systemic sclerosis. *Lab Invest* **71**, 745-754
372. Rochon, M. H., Fradette, J., Fortin, V., Tomasetig, F., Roberge, C., Baker, K., Berthod, F., Auger, F. A., and Germain, L. (2009) Normal human epithelial cells regulate the size and morphology of tissue-engineered capillaries. *Tissue Eng Part A*
373. Russell, W., and Burch, R. (1959) *The Principles of Humane Experimental Technique*, Methuen, Londres