VALÉRIE HUDON

APPLICATIONS CLINIQUES ET *IN VITRO* D'UNE PEAU RECONSTRUITE ENDOTHELIALISEE PRODUITE PAR INGENIERIE TISSULAIRE

Mémoire
présenté
à la Faculté des études supérieures
de l'Université Laval
pour l'obtention
du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

Programme de biologie cellulaire et moléculaire
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL

JANVIER 2001

© Valérie Hudon, 2001

National Library of Canada
Acquisitions and Bibliographic Services
395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale du Canada
Acquisitions et services bibliographiques
395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-65408-7

Canada

À ma petite Juliette, qui a partagé malgré elle la majorité des étapes de la rédaction de ce mémoire

À Marc et à mes parents, qui m'ont encouragée et démontré énormément de patience pendant ces 3 années

RÉSUMÉ

Nous avons développé un modèle de peau reconstruite endothélialisée (PRE) dans lequel les cellules endothéliales forment spontanément des tubules ressemblant à des capillaires. Nous avons développé à partir de la PRE un modèle permettant d'analyser l'influence de différentes molécules sur l'angiogenèse. L'activation des PRE avec des molécules angiogéniques a induit la formation d'un nombre plus élevé de capillaires, ayant une surface et un diamètre plus importants que le témoin. Par contre, le traitement avec un agent angiostatique a produit des effets inverses. Notre modèle *in vitro* est approprié pour l'étude des modulateurs de l'angiogenèse car il réagit adéquatement aux molécules étudiées.

Nous avons ensuite étudié le processus de revascularisation d'une PRE après greffe chez la souris afin de vérifier si la présence de capillaires dans le greffon permettait d'augmenter la vitesse de revascularisation par anastomose entre ses capillaires et ceux de l'hôte. Nos résultats indiquent que la greffe d'une PRE induirait une accélération du processus de revascularisation. Ces résultats ouvrent des perspectives considérables pour le génie tissulaire où la vascularisation est souvent un obstacle à l'utilisation en clinique de tissu produit *in vitro.*

Dr François A. Auger Valérie Hudon

AVANT-PROPOS

En premier lieu, je tiens à remercier le Docteur François Auger et la Docteur Lucie Germain de m'avoir accueillie au LOEX et de m'avoir permis de travailler sur un projet qui m'a vraiment passionnée. Je voudrais aussi les remercier pour leur patience et leur grande compréhension face à ma situation.

Je souhaite remercier le Docteur François Berthod et la Docteur Annie Black pour leur soutien, leurs encouragements et leurs précieux conseils tout au long de ma maîtrise. Je vous en suis reconnaissante.

Je ne pourrais oublier de remercier la Docteur Odile Damour de m'avoir si bien accueillie dans son laboratoire à Lyon. Merci de m'avoir fait vivre une expérience des plus enrichissante tant personnellement que professionnellement.

Je voudrais également remercier le Docteur Jacques Huot pour avoir accepté d'examiner mon mémoire et pour ses commentaires.

Merci, merci, merci à Danielle L., Patrick, Danielle B., Marie-Hélène, Rina, Nathalie T., Kathleen, Julie T., Éric, Stéphane ainsi que toutes les personnes que j'ai côtoyées durant ces années pour votre aide, votre amitié, nos conversations et votre soutien.

Un merci tout particulier à ma petite Juliette qui m'a fait découvrir une autre facette de la vie...

TABLE DES MATIÈRES

Résumé iii

Avant-Propos iv

Table des Matières v

Figures et Tableaux viii

Liste des Abréviations ix

I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 1

A. Introduction 2

b) La peau humaine

4

1. L'épiderme 5

a) Les cellules de l'épiderme 6

b) Les couches de l'épiderme 8

i) Le *stratum germinativum* (couche basale) 8

ii) Le *stratum spinosum* (couche épineuse) 9

iii) Le *stratum granulosum* (couche granuleuse) 9

iv) Le *stratum lucidum* (couche claire) 10

v) Le *stratum corneum* (couche cornée) 10

2. La jonction dermo-épidermique 10

3. Le derme 11

a) Le derme papillaire 12

b) Le derme réticulaire 13

c) Les annexes cutanés 14

d) La microcirculation cutanée 15

4. L'hypoderme 17

5. Les fonctions cutanées 18

6. Les brûlures 19

7. Les méthodes de recouvrement des brûlures 21

a) Les feuillets épidermiques autologues 22

b) Les substituts dermo-épidermiques 23

i) Les modèles de gel de collagène 24

ii) Les modèles d'éponge 26

iii) Les modèles de polymères synthétiques 29

iv) Les dermes acellulaires dé-épidermisés 31

v) Le modèle par auto-assemblage 32

C. Les cellules endothéliales 33

1. Hétérogénéité des cellules endothéliales 35

2. Les marqueurs des cellules endothéliales 36

3. Les molécules d'adhésion cellulaire des cellules endothéliales 38

a) PECAM-1 (Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1) 39

b) ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1) 40

c) *VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1)* 41
d) *VE-cadhérine (Vascular-Endothelial cadherin)* 41
e) *Les intégrines des cellules endothéliales* 42
4. Les fonctions des cellules endothéliales 44
D. *Le développement du système vasculaire* 49
1. La vasculogenèse 49
2. L'angiogenèse 52
a) *Le mécanisme* 53
i) L'activation des cellules endothéliales 54
ii) La migration 56
iii) La division cellulaire 57
iv) La formation des capillaires 58
v) La stabilisation des nouveaux vaisseaux 60
vi) Évolution des néovaisseaux 62
b) *L'angiogenèse dans la peau* 62
c) *L'angiogenèse tumorale* 63
3. Les facteurs de régulation de l'angiogenèse 66
a) *Les facteurs de croissance angiogéniques* 67
i) Le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) 69
ii) Les FGFs (Fibroblast Growth Factors) 73
iii) Les angiopoïétines 75
iv) Le PDGF (Platelet Derived Growth Factor) 77
v) L'angiogénine 78
vi) Le TGF-β (Transforming Growth Factor β) 79
vii) Le CTGF (Connective Tissue Growth Factor) 80
b) *Les molécules angiostatiques* 80
i) La thrombospondine-1 (TSP-1) 82
ii) Les stéroïdes angiostatiques 83
iii) Les analogues de la fumagilline 83
iv) L'angiostatine 84
v) Les facteurs dérivés du cartilage 85
4. Les autres cellules impliquées dans l'angiogenèse 86
5. Les changements de la MEC durant l'angiogenèse 88
6. Les autres modulateurs de l'angiogenèse 89
a) *Les molécules de type héparine* 89
b) *Les syndécanes* 90
c) *Les protéinases* 90
7. Les modèles d'étude *in vivo* 94
a) *Les chambres transparentes* 94
b) *Le modèle de néovascularisation cornéale* 95
c) *La membrane chorioallantoïque de l'embryon de poulet* 96
d) *Le mésentère* 97
e) *Les modèles de pochettes* 98
8. Les modèles d'études *in vitro* 99
a) *Le modèle d'angiogenèse spontanée* 100
b) *Les modèles de co-culture* 100
c) *Les modèles de gel en 3 dimensions* 101

i) Le collagène de type I 101
ii) Le Matrigel ™ 102
d) Le modèle de l'aorte 103
e) La membrane amniotique humaine 104
f) La peau reconstruite endothélialisée 104

CHAPITRE II. PROBLEMATIQUE 107

CHAPITRE III. DEVELOPPEMENT D'UN MODELE D'ANGIOGENESE *IN VITRO* A PARTIR D'UN DERME RECONSTRUIT POUR L'ETUDE DE DIFFERENTES MOLECULES ANGIOGENIQUES ET ANGIOSTATIQUES 115

A) *Résumé* 116
B) Abstract 118
C) Introduction 119
D) *Materials and methods* 121
1. Human dermal fibroblast isolation 121
2. Human umbilical vein endothelial cell isolation 121
3. Collagen/ glycosaminoglycan/chitosan biopolymer preparation 122
4. Endothelialized reconstructed dermis preparation 123
5. Immunostaining 123
6. Confocal laser scanning microscopy 124
7. Quantification of the capillary-like structures 125
E) Results 125
F) Discussion 136

CHAPITRE IV. PEAU RECONSTRUITE ENDOTHÉLIALISÉE HUMAINE GREFFÉE SUR DES SOURIS ATHYMIQUES: ANASTOMOSE DU RÉSEAU DE TUBULES ENDOTHÉLIAUX AVEC LES CAPILLAIRES DU LIT DE LA PLAIE 141

A) Résumé 142
B) Abstract 143
C) Introduction 144
D) Material and Methods 146
1. Human keratinocyte and dermal fibroblast isolation 146
2. Human umbilical vein endothelial cell isolation 146
3. Collagen/ glycosaminoglycan/ chitosan biopolymer preparation 147
4. Reconstructed skin and endothelialized reconstructed skin preparation 148
5. Animals and surgical manipulations 148
6. Histological analysis 149
E) Results 149
F) Discussion 152

CHAPITRE V. DISCUSSION GENERALE 158

CHAPITRE VI. RÉFÉRENCES 171

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure 1	La peau humaine	5
Figure 2	Le derme réticulaire	14
Figure 3	La microcirculation cutanée	17
Figure 4	Classification des différents degrés de brûlures	21
Figure 5	Préparation d'une peau reconstruite endothélialisée à partir d'une éponge de collagène/ chitosane/ glycosaminoglycans	29
Figure 6	Le processus de vasculogenèse	50
Figure 7	Les étapes de l'angiogenèse	54
Figure 8	Représentation schématique de la formation du lumen	60
Figure 9	Processus de revascularisation lors d'une greffe de peau humaine	111
Figure 10	Processus de vascularisation lors d'une greffe de PR traditionnelle	112
Figure 11	Processus probable de vascularisation lors d'une PRE	113
Figure 12	Immunohistochemical characterization of the tubular structures	126
Figure 13	Confocal images of the endothelial structures present in the ERD	128
Figure 14	Three-dimensionnal reconstructed images of the tubules	129
Figure 15	Histological cross-sections of the ERD after 20 days of culture in the presence of angiogenic or angiostatic agents	131
Figure 16	Capillary-like density of the ERD after 20 days of treatment	132
Figure 17	Mean surface occupied by CLS in cross-sections measured per field (0.21 mm^2) after 20 days of treatment	134
Figure 18	Mean diameter of the CLS after 20 days of treatment	135
Figure 19	RS, ERS and human skin histology before transplantation	150
Figure 20	Vascularization of human skin grafted on athymic mice	151
Figure 21	Vascularization of RS and ERS 7 days after grafting	152
Figure 22	Processus probable de vascularisation d'une PRE	165
Tableau 1	Propriétés variables des cellules endothéliales	36
Tableau 2	Les marqueurs des cellules endothéliales	37
Tableau 3	Les molécules angiogéniques rapportées dans la littérature.	68
Tableau 4	Les inhibiteurs de l'angiogenèse rapportés dans la littérature	81

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACE	Enzyme de Conversion de l'Angiotensine
aFGF	acidic Fibroblast Growth Factor
Ang	Angiopoïétine
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
CAM	Membrane Chorioallantoïque du Poulet (ChorioAllantoïc Membrane)
CE	Cellule Endothéliale
CLS	Capillary-Like Structure
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
DRE	Derme Reconstruit Endothélialisé
DTAF	Dichlorotriazine Fluorescein
EC	Endothelial Cell
ECM	Extracellular Matrix
EDCF	Endothelium-Derived Constricting Factor
EDRF	Endothelium-Derived Relaxing Factor
EGF	Endothelial Growth Factor
ELAM-1	Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1
eNOS	Endothelium Nitric Oxyde Synthase
ERD	Endothelialized Reconstructed Dermis
ERS	Endothelialized Reconstructed Skin
ESAF	Endothelial cell Stimulating Angiogenesis Factor
ET-1	Endothelin-1
FCS	Fetal Calf Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
GCSF	Granulocyte-Stimulating Factor
GFP	Green Factor Protein
HGF	Hepatocyte Growht Factor
HGF/SF	Hepatocyte Growht Factor/ Scatter Factor
HIP	Hypoxia Inductible Factor
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IGF	Insulin Growth Factor
IL	Interleukin
MC	Mastocyte
MEC	Matrice Extracellulaire
MMP	Métalloprotéinases
NCAM	Neural Adhesion Molecule

NO	Nitric Oxyde
PA	Plasminogen Activator
tPA	Tissue Plasminogen Activator
PAF	Platelet-Activating Factor
PAI	Plasminogen Activator Inhibiteur
PAr	Plasminogen Activator receptor
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PECAM-1	Platelet-Endothelial Cellular Adhesion Molecule
PF-4	Platelet Factor-4
PGI_2	Prostacycline
PIGF	Placenta Growth Factor
PKC	Protéine Kinase C
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
PR	Peau Reconstruite
PRE	Peau Reconstruite Endothélialisée
RD	Reconstructed Dermis
RS	Reconstructed Skin
SF/HGF	Scatter Factor/ Hepatocyte Growth Factor
SMA	Smooth Muscle Actin
SPARC	Protéine acide sécrétée riche en cystéines
TF	Tissu Factor
TGF	Transforming Growth Factor
TIMP	Tissue Inhibiteur of Metalloproteinases
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-α
TSP-1	Thrombospondine-1
VCAM-1	Vascular Adhesion Molecule-1
VE-cadhérine	Vascular-Endothelial cadherin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VIP	Vasoactive Intestinal Polypeptide
VLA-4	Very Late Activation antigen-4
vWF	von Willebrand factor
W-P	Weibel-Palade

CHAPITRE I

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I. Étude bibliographique

A. Introduction

L'angiogenèse, la formation de capillaires par bourgeonnement à partir de vaisseaux pré-existants, est un événement majeur durant l'embryogenèse et divers processus physiologiques et pathologiques chez l'adulte. Ce processus implique plusieurs étapes comprenant l'activation, la migration et la prolifération des cellules endothéliales (CE) et finalement, la formation de nouveaux capillaires. Ces étapes sont rigoureusement régulées par un équilibre précis de molécules angiogéniques et angiostatiques.

Dans la peau, le phénomène d'angiogenèse est normalement quiescent, mais une néovascularisation peut être initiée lors de plusieurs pathologies cutanées incluant la réparation tissulaire, l'inflammation et les néoplasies. Par ailleurs, ce processus revêt une grande importance lors de greffes de peaux chez les grands brûlés car il est primordial que la peau (ou les substituts cutanés) reçoivent les nutriments transportés dans la circulation sanguine pour éviter la nécrose du greffon.

Les molécules qui modulent l'angiogenèse ouvrent de nombreuses perspectives thérapeutiques, notamment en dermatologie pour le traitement du psoriasis, de mélanomes et de tumeurs épithéliales ou lymphomateuses. Afin d'être en mesure d'étudier les facteurs qui modulent l'angiogenèse et d'approfondir notre compréhension des processus cellulaires et moléculaires impliqués dans la formation de capillaires, de nombreux modèles d'étude de l'angiogenèse *in vivo* et *in vitro* ont été développés. Bien que ces derniers aient permis

d'éclaircir de nombreux mécanismes de l'angiogenèse, il est nécessaire de développer de nouveaux modèles plus sophistiqués qui correspondent davantage aux conditions retrouvées *in vivo* afin que l'étude du processus d'angiogenèse soit adéquate.

B. La peau humaine

La peau recouvre entièrement l'organisme et protège ce dernier de différents agents extérieurs. La peau n'est pas uniforme puisqu'elle varie en apparence et en épaisseur par rapport à son site anatomique : chez l'adulte, sa superficie varie entre 1,5 et 2 m^2 et son épaisseur entre 1 et 8 mm (Asmussen, 1986).

D'un point de vu structural, la peau est constituée de deux parties principales : l'épiderme et le derme (figure 1). L'épiderme, la partie superficielle, est composé d'un mince épithélium et tient lieu de principale structure protectrice du corps. L'épiderme est attaché à la partie plus profonde de la peau, le derme, qui est principalement formé d'un tissu conjonctif. Une fine couche, la membrane basale, sépare le derme de l'épiderme. Finalement, on retrouve sous le derme le tissu sous-cutané, ou hypoderme, qui est constitué de tissus conjonctifs aréolaires et adipeux.

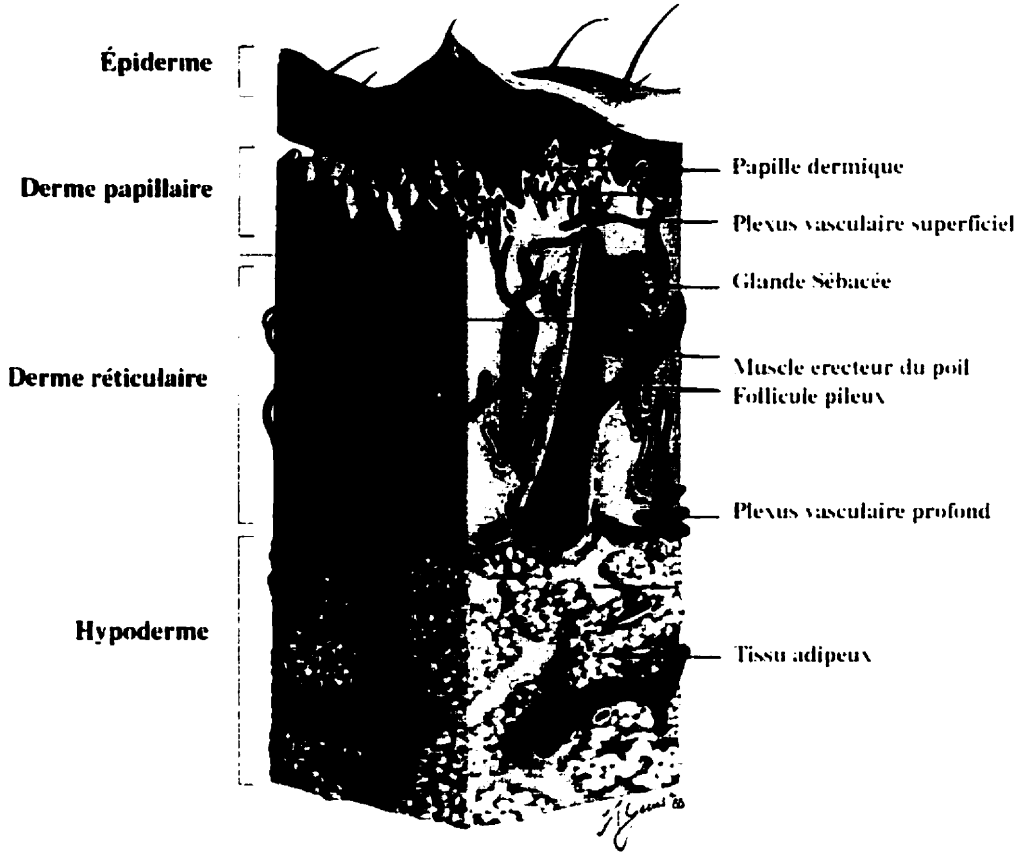

Figure 1. **La peau humaine** (Tiré de Geras, 1990)

1. L'épiderme

L'épiderme, la couche protectrice de la peau, est continuellement en contact avec le milieu extérieur. Il est formé d'un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé. L'épiderme contient quatre types de cellules et cinq couches différentes. L'homéostasie de l'épiderme, un tissu en renouvellement continu, est maintenue par un équilibre entre la prolifération, la différenciation

et la mort des kératinocytes. L'apoptose joue un rôle essentiel dans le maintien de l'épaisseur du tissu et de la prévention de maladies.

a) Les cellules de l'épiderme

L'épiderme contient plusieurs types de cellules dont environ 90 % de celles-ci sont des kératinocytes. Le rôle principal des kératinocytes est la production de protéines, les kératines. Les filaments de kératine traversent le cytoplasme, autour des noyaux, jusqu'aux hémidesmosomes et desmosomes (Bowden *et al.*, 1987). Les kératinocytes sont soudés les uns aux autres par des structures nommées desmosomes. Ces derniers comprennent des composantes intra- et extracellulaires qui interviennent dans les adhésions cellule-cellule et pour l'attachement des filaments de kératine dans la cellule (Schwartz *et al.*, 1990). Des cellules basales situées dans la couche basale de l'épiderme se divisent continuellement pour donner les kératinocytes. Tout en migrant vers la surface de l'épiderme, les kératinocytes produisent la kératine et subiront une mort programmée. Une fois que ces cellules atteignent les couches supérieures, elles ne sont plus que des membranes plasmiques remplies de kératine. L'épaisseur de l'épiderme se maintient puisque la production de kératinocytes compense la perte de cellules due à la desquamation. Le renouvellement de l'épiderme peut prendre de 25 à 50 jours.

Les mélanocytes, qui comptent pour environ 500 à 2000 cellules par mm^2 d'épiderme, sont des cellules épithéliales spécialisées qui produisent un pigment appelé mélanine (Tortora *et al.* 1994). Ces cellules sont situées dans la couche basale de l'épiderme et au niveau du bulbe des follicules pileux. Les mélanocytes possèdent de nombreux prolongements qui leur permettent d'entrer en contact avec les kératinocytes et de leurs transférer la mélanine contenue dans des

granules, les mélanosomes. Une fois que les kératinocytes ont absorbé les grains de mélanine, ces cellules se colorent et confèrent ainsi à la peau une coloration variant du jaune pâle au noir. Les granules de mélanine se regroupent sur la face superficielle des noyaux et forment un voile protecteur pour le matériel génétique contre les effets nocifs des rayons ultraviolets. Des interactions cellulaires spécifiques entre les mélanocytes et les kératinocytes seraient fondamentales pour la régulation de la mélanogenèse et de la pigmentation de la mélanine (Nakazawa *et al*, 1998).

Un troisième type cellulaire connu est la cellule de Langerhans. Ces cellules représentent de 2 à 8 % des cellules épidermiques. Elles se retrouvent dans l'épiderme et dans les follicules pileux, plus particulièrement dans les couches suprabasales et au niveau de l'infundibulum. Les cellules de Langerhans seraient produites à partir des précurseurs hématopoïétique CD34+ de la moelle qui migreraient ensuite vers l'épiderme. Ces cellules participent à l'activation du système immunitaire en interagissant avec les cellules T auxiliaires (Foster et Holbrook, 1987 ; Moresi et Horn, 1997).

Finalement, on retrouve de très rares cellules de Merkel dans la couche basale de l'épiderme qui représentent moins de 1% des cellules (Germain *et al.*, 1997) et dans la région de l'infundibulum des follicules pileux (Tortora *et al*, 1994). Leur origine est encore incertaine : certains croient qu'elles proviendraient de la crête neurale lors du développement embryonnaire. Depuis qu'on a découvert que ces cellules possédaient des polypeptides de kératines, on pense plutôt à une origine épidermique (Tachibana, 1995). Si telle est leur origine, elles pourraient dériver des mêmes cellules souches que les kératinocytes (Germain *et al.*, 1997). Les cellules de Merkel sont rattachées aux kératinocytes par des desmosomes. Ces cellules de forme hémisphérique sont en contact avec la terminaison d'une neurofibre sensitive

appelée disque de Merkel. Cette dernière aurait un rôle de récepteur sensoriel dans la mécanoréception.

b) Les couches de l'épiderme

L'épiderme est organisé en quatre ou cinq couches de cellules. Lorsqu'il est exposé à une friction importante, dans le cas des paumes des mains et des pieds, l'épiderme mesure de 1 à 2 mm d'épaisseur et comprend cinq couches. Pour ce qui est de la peau qui recouvre le reste du corps, cette dernière est plus mince, soit environ 0,1 mm d'épais, et ne comporte que quatre couches (Tortora *et al*, 1994)

i) Le *stratum germinativum* (couche basale)

Le *stratum germinativum*, la couche la plus profonde de l'épiderme, est composé d'une seule couche de kératinocytes cubiques ou cylindriques. Ces cellules sont attachées entre elles par des desmosomes et à la membrane basale sous-jacente par des hémidesmosomes. Cette couche de cellules comprend des cellules basales qui ont la capacité de se diviser constamment permettant ainsi un renouvellement constant des kératinocytes. Ces cellules basales sont responsables de la régénération physiologique normale des cellules superficielles de la peau. D'autres cellules de l'épiderme migrent au niveau du derme où elles produisent des glandes sébacées et sudoripares de même que les follicules pileux (Tortora *et al*, 1994). La couche basale contient également des mélanocytes et des cellules de Merkel.

ii) Le *stratum spinosum* (couche épineuse)

La couche épineuse contient 3 à 4 strates de cellules présentant un gradient de dimension, d'orientation, de forme et de structure du cytoplasme (Holbrook, 1994). Ces dernières renferment des tonofilaments qui sont en fait d'épais faisceaux de kératine. Ces cellules à épines sont reliées par un système de ponts intercellulaires constitués de petites projections de la surface cellulaire se terminant par un desmosome. Lorsque les cellules basales se différentient, elles diminuent l'expression des kératines 5 et 14 et induisent l'expression de kératines associées à la différentiation (Fuchs et Green, 1980; Moll *et al*, 1982) telles que les kératines 1 et 10 (Fuchs, 1995). On retrouve aussi dans cette couche de nombreuses cellules de Langerhans et des prolongements des mélanocytes qui s'infiltrent parmi les kératinocytes.

iii) Le *stratum granulosum* (couche granuleuse)

La troisième couche de l'épiderme est constituée de 3 à 5 rangées de cellules aplaties qui produisent des granules contenant une protéine, la kératohyaline. Ce composé est un précurseur de la kératine. De plus, la couche granuleuse contient de nombreux tonofilaments et des kératinosomes ou grains d'Odland qui produisent un complexe de glycophospholipides jouant un rôle dans l'imperméabilisation de la peau. On verra la membrane plasmique des kératinocytes s'épaissir et leur noyau se dégénérer. Au fur et à mesure que les cellules transitent à ce niveau, elles commencent à mourir. Les organites cytoplasmiques des cellules seront digérés par des lysosomes.

iv) Le *stratum lucidum* (couche claire)

Cette couche de l'épiderme, qui n'apparaît que dans les peaux épaisses, est formée de trois à cinq rangées de cellules mortes et aplaties. On observe dans les cellules composant le *stratum lucidum* la formation d'une liaison entre les granules de kératohyaline et les tonofilaments (Tortora *et al*, 1994). Cette association donne naissance au précurseur des fibrilles de kératine.

v) Le *stratum corneum* (couche cornée)

La couche la plus superficielle de l'épiderme est composée de 25 à 30 rangées de cellules mortes, complètement remplies de fibrilles de kératine (Tortora *et al*, 1994) et entourées d'une matrice extracellulaire (MEC) de lipides (Potts et Francour, 1991). Ces cellules sont continuellement éliminées et remplacées par les cellules des couches inférieures. Ces kératinocytes sont composés jusqu'à 85 % de kératine (Holbrook, 1994). La couche cornée possède plusieurs fonctions importantes : le *stratum corneum* constitue une barrière efficace contre l'abrasion et les agressions de l'environnement, la perte d'eau, la pénétration d'agents chimiques ou de bactéries.

2. La jonction dermo-épidermique

La couche basale de l'épiderme est fortement liée au derme par un système de liaison complexe, la jonction dermo-épidermique. Cette dernière est une région importante puisqu'elle sert à empêcher la séparation du derme et de l'épiderme par les forces de cisaillement. Si ces liens se brisent, de sérieuses pathologies en résulteront comme

l'épidermolyse bulleuse dystrophique (Fine *et al*, 1993). En microscopie électronique, on remarque que la jonction dermo-épidermique est formée de quatre composants : la membrane plasmique des cellules basales, la *lamina lucida*, la *lamina densa* et la *sublamina densa*. On retrouve des filaments d'ancrage composés en majorité de laminine 1 et 5 (Timpl et Brown, 1994; Rousselle *et al.*, 1991). On retrouve 7 différentes isoformes de la laminine. Ces derniers sont en fait des hétérotrimères constitués de sous-unités α, β et γ. On connaît jusqu'à présent 9 sous-unités (Uitto *et al.*, 1996). La jonction dermo-épidermique contient aussi différentes formes de collagènes. Les collagènes retrouvés majoritairement dans la jonction dermo-épidermique sont de type IV, VII et XVII. Le collagène de type IV est le plus abondant. Le collagène de type VII est retrouvé principalement dans les jonction dermo-épidermiques d'épitélium stratifiés comme la peau, la membrane muqueuse et la cornée (Burgeson, 1993; Wetzels *et al.*, 1991). Finalement, des fibrilles d'ancrage joignent la *lamina densa*, la portion inférieure de la membrane basale, avec la partie supérieure du derme papillaire et sont associées avec des structures nommées plaques d'ancrage (Burgeson *et al.*, 1990).

3. Le derme

Le derme est constitué d'un tissu conjonctif comprenant des fibres de collagène, d'élastine, de fibrilline et de réticuline. Ces fibres confèrent résistance et souplesse à la peau. Les cellules du derme sont peu nombreuses et comprennent des fibroblastes, des macrophages et parfois, des mastocytes et des globules blancs. Les fibroblastes, les principales cellules du derme, possèdent de nombreux rôles particulièrement la formation et la dégradation de la MEC. Le derme contient beaucoup de fibres nerveuses, de vaisseaux sanguins et lymphatiques. La majorité des follicules pileux, des glandes sudoripares et sébacées sont situées dans le derme. Tout comme l'épiderme, l'épaisseur du derme peut varier en fonction des individus et des

régions du corps. Plusieurs fonctions importantes sont associées au derme : la nutrition, le soutien, l'élasticité et la thermorégulation. Le derme peut être divisé en deux parties : le derme papillaire et le derme réticulaire.

Le collagène, le principale constituant protéique de la MEC et des tissus conjonctifs, est sécrété en majeure partie par les fibroblastes. Les collagènes interstitiels, I, II, III, V et XI sont synthétisés sous forme de précurseurs qui sont ensuite clivés. Les collagènes s'assemblent pour formés des fibrilles hétéropolymériques composées de divers types de collagènes (Henkel et Glanville, 1982; Birk *et al.*, 1988; Mendler *et al.*, 1989). Les collagènes de type V et XI représenteraient la portion centrale alors que les types I, II et III seraient responsables principalement de la masse des fibrilles (Eckes *et al.*, 1993).

a) Le derme papillaire

Cette mince portion du derme est la plus superficielle et est liée très étroitement avec l'épiderme et contient une proportion élevée de collagène de type IV (Holbrook, 1989). Le derme papillaire est formé d'un tissu conjonctif lâche dont les fibres d'élastine sont disposées perpendiculairement à l'épiderme. Quant à elles, les fibres de collagène sont disposées en réseaux de treillis. La surface du derme papillaire est augmentée grâce à des petites éminences appelées papilles dermiques. Plusieurs d'entre-elles contiennent des boucles de capillaires tandis que d'autres renferment des corpuscules de Meissner qui agissent comme des terminaisons nerveuses (Tortora *et al*, 1994).

b) Le derme réticulaire

Le derme réticulaire est composé d'un tissu conjonctif dense irrégulier dans lequel les fibroblastes sont entourés par une matrice de fibres de collagène, élastiques et réticulées (figure 2). Le derme réticulaire est délimité du derme papillaire par un plexus horizontal subpapillaire d'artérioles et de veinules (Smith *et al*, 1982). Le tissu conjonctif est formé de faisceaux de fibres plus épaisses et plus grossières que celles qui sont retrouvées dans le derme papillaire. La présence de fibres de collagènes, principalement de type I, et élastiques dans la couche réticulaire procure à la peau résistance et élasticité. Cette partie du derme contient divers appendices qui s'étendent même au-dessus au travers de l'épiderme. Les cryptes des follicules pileux revêtent une grande importance car elles sont en continuité avec l'épiderme et peuvent ainsi être une source de régénération de l'épiderme.

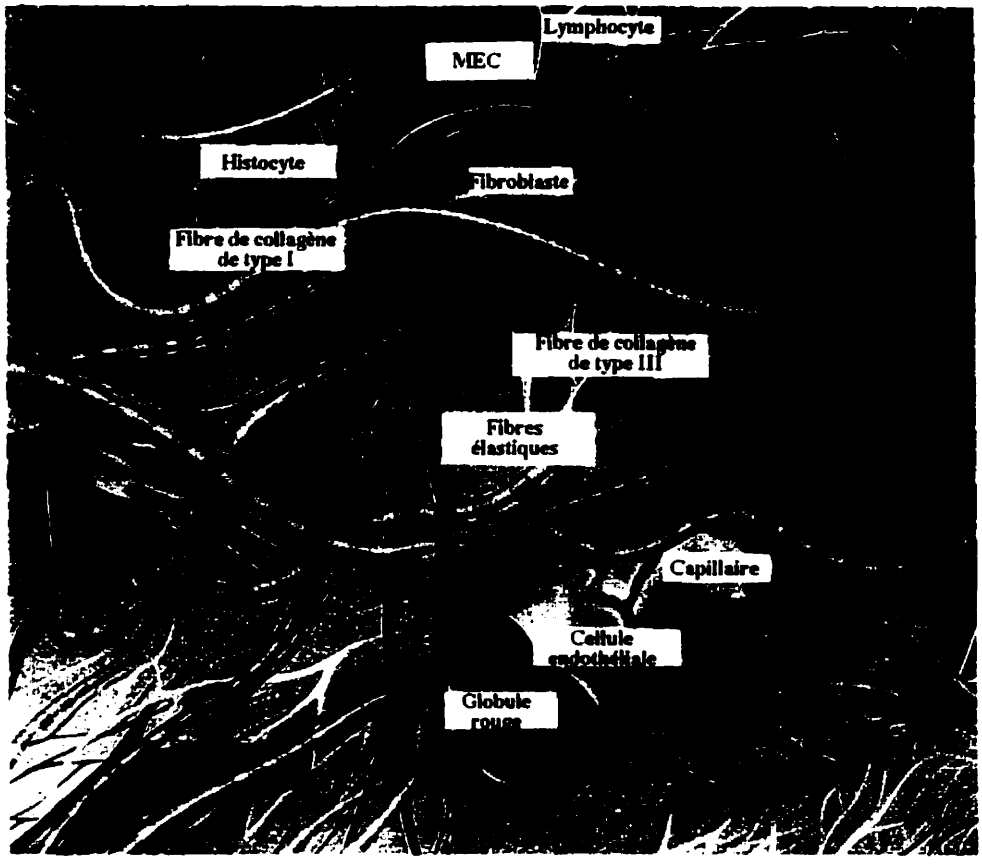

Figure 2. **Le derme réticulaire** (Tiré de Geras, 1990)

c) Les annexes cutanées

Les annexes cutanées - poils, glandes et ongles - sont issues de l'épiderme embryonnaire. Le poil est une structure produite par le follicule pileux et est principalement constitué de cellules mortes kératinisées soudées les unes aux autres. La fonction principale des poils est la perception tactile. Divers types de glandes sont présentes dans la peau : sébacées, sudoripares, cérumineuses et mammaires (Tortora *et al*, 1994). Les glandes sécrètent diverses substances qui auront principalement pour fonction de protéger l'organisme et de maintenir

l'homéostasie. Les ongles, formés de kératine dure, proviennent de modifications de cellules de l'épiderme formant un revêtement de protection dur sur la face dorsale de l'extrémité des doigts et des orteils. Les ongles servent de protection contre des traumatismes éventuels aux bouts des doigts.

d) La microcirculation cutanée

La microcirculation cutanée est organisée en 2 plexus horizontaux (figure 3). Le premier est situé à 1-1,5 mm sous la surface de la peau (le plexus superficiel) et le second (le plexus profond) se trouve près de la jonction dermo-hypodermique. Des artérioles ascendantes et des veinules descendantes connectent les 2 plexus et sont toujours retrouvées en paires. À partir du plexus superficiel, des anses de capillaires montent dans les papilles dermiques juste sous la membrane basale dermo-épidermique. Ces capillaires représentent la composante nutritive de la circulation (Braverman, 1997). Aucun vaisseau sanguin ne pénètre l'épiderme.

Le capillaire dermique possède une paroi constituée d'une seule couche de CE. Il est recouvert d'une membrane basale qui englobe en même temps les péricytes adjacents. On pense que les péricytes seraient nécessaires pour maintenir l'intégrité des capillaires. Ces capillaires ont un diamètre de 5 à 10 µm et une paroi de 2 à 3 µm d'épaisseur (Simionescu et Simionescu, 1988). La portion intra-papillaire du capillaire est de type artériel i.e. avec une membrane basale homogène sans fenestrations. Le segment ascendant de la portion extra papillaire du capillaire est de type artériel tandis que la portion descendante est de type veineux i.e. avec une membrane basale multicouche avec fenestrations. On retrouve aussi des capillaires de type veineux près des glandes sudoripares eccrines et des bulbes pileux.

La microcirculation cutanée assure la régulation thermique et participe au contrôle la tension artérielle grâce à la vasomotricité. De plus, elle répond à différents stimuli nerveux. Lorsqu'il y a stimulation de l'arc réflexe sous la dépendance de diverses substances pharmacologiques, la vasodilatation qui en résulte provoque l'érythème du segment artériolaire et l'œdème du segment veineux. La peau constitue un réservoir sanguin d'une grande importance qui peut être facilement mobilisé lors d'agressions thermiques ou de modifications tensorielles. La microcirculation est en mesure de nourrir l'épiderme et les annexes cutanées grâce à la diffusion et aux structures qui favorisent les échanges entre le plasma et les liquides extra-vasculaires. La microcirculation cutanée intervient aussi dans l'induction d'un état d'hypersensibilité retardée, le rejet de greffe, les vascularités leucocytaires et la sclérodermie (Claudy, 1987).

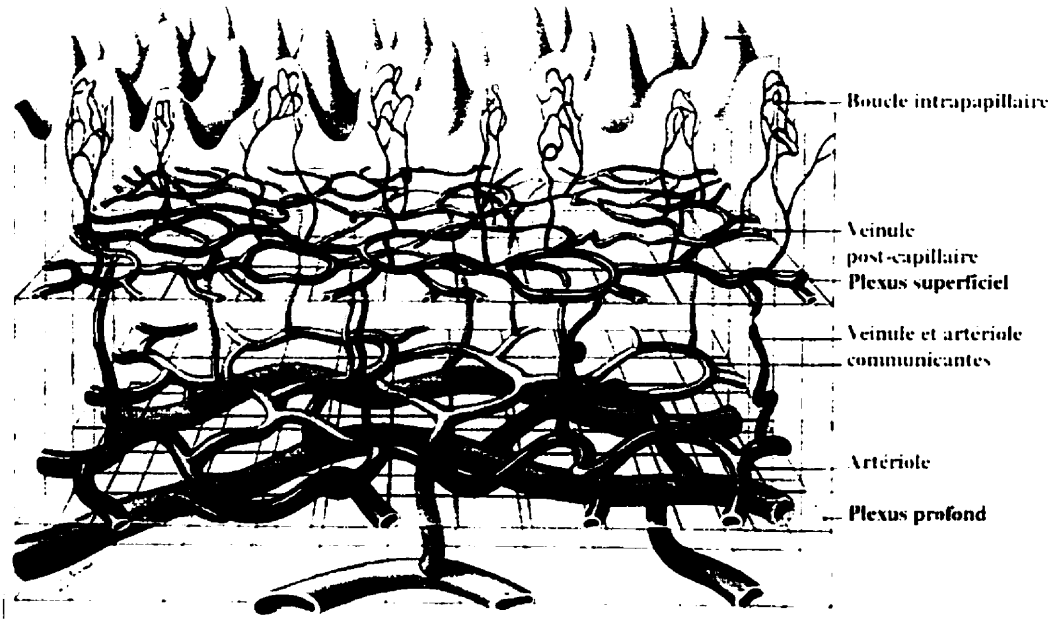

Figure 3. **La microcirculation cutanée** (Tiré de Geras, 1990)

4. L'hypoderme

L'hypoderme est constitué d'un tissu adipeux séparé par des cloisons fibreuses. Plus profond que le derme, ce tissu est directement apposé au fascia. Il rattache donc le derme aux organes sous-jacents. De plus, il contient les principaux vaisseaux sanguins et nerfs destinés au derme sus-jacent. Sa composition en tissu adipeux lui permet d'absorber les chocs, d'isoler les tissus plus profonds et de servir de réserve de nutriments. L'hypoderme contient une variété de

cellules : adipocytes, fibroblastes, histiocytes, lymphocytes et mastocytes. Tout comme les cellules dendritiques du derme, plusieurs de ces cellules sont impliquées dans le processus de présentation d'antigènes. Cette couche contient également des terminaisons nerveuses sensibles à la pression, les corpuscules de Pacini.

5. Les fonctions cutanées

La peau ne doit pas être considéré uniquement comme une enveloppe. Outre sa fonction de barrière contre les agents externes, la peau possède de nombreuses fonctions essentielles pour l'homéostasie. Par le biais de la transpiration, l'organisme est en mesure d'excréter de faibles quantités de sels et d'autres composés organiques comme les déchets azotés. La peau possède plusieurs récepteurs et terminaisons nerveuses qui lui permettent de percevoir les stimuli liés à la douleur, à la chaleur, au toucher et à la pression. Certaines cellules présentes dans l'épiderme ont un rôle important au niveau du système immunitaire ce qui permet d'assurer une protection efficace contre les corps étrangers.

On considère que le derme joue un rôle de réservoir sanguin : son réseau de vaisseaux sanguins contiennent de 8 à 10 % du sang en circulation chez un adulte au repos. Ainsi, lors d'un exercice important, les vaisseaux sanguins se contractent et une partie du sang qu'ils contiennent est dérivé vers la circulation systémique afin d'être disponible pour les muscles en contraction. De plus, le flux sanguin peut se modifier afin de réguler la température corporelle : lorsque la température corporelle augmente, le flux sanguin s'accélère et les vaisseaux se dilatent pour dissiper la chaleur. L'évaporation de la sueur sur la peau aide aussi à ramener la température corporelle à la normale dans une telle situation. Lorsque la température externe est plus basse, une réaction inverse a lieu.

Finalement, on retrouve dans les cellules de l'épiderme des molécules de cholestérol modifiées qui, lorsqu'elles sont exposées aux rayons ultraviolets, se transforment en vitamine D. Une fois transformée en sa forme la plus active par des enzymes du foie et des reins, la vitamine D sera distribuée dans tout l'organisme. Elle jouera alors différents rôles notamment dans le métabolisme du calcium.

6. Les brûlures

Lorsque les brûlures détruisent la couche protectrice de l'organisme, on observe un bouleversement interne de l'homéostasie. Peu importe la cause, la base physiopathologique du traumatisme cutané de tous les brûlés est similaire (Allwood, 1995). En endommageant la peau, les brûlures entraînent la perte de liquide et favorisent l'entrée de divers microbes. Les brûlures peuvent causer des effets systémiques importants tels que : 1) un état de choc occasionné par la perte importante d'eau, de plasma et de protéines plasmatiques ; 2) une ou des infections microbiennes ; 3) une baisse de la circulation sanguine ; 4) une diminution de la production d'urine ; 5) une diminution de la réponse immunitaire.

Les brûlures sont classées en trois niveaux : premier, deuxième et troisième degré (Figure 4) (MacMillan, 1984). Dans le cas des brûlures du premier degré, seul l'épiderme est touché. Ces brûlures se manifestent par un érythème localisé et elles sont en mesure de se guérir par elles-mêmes en 2 à 3 jours. Les coups de soleil sont un exemple de brûlures de cette catégorie (Berthod et Rouhabbia, 1997).

Les brûlures du deuxième degré peuvent induire la perte de certaines fonctions cutanées. On peut subdiviser ces brûlures en 2 catégories : superficielles et profondes. Les brûlures superficielles endommagent en grande partie l'épiderme et une portion du derme papillaire. Il reste cependant un nombre suffisant de cellules basales de l'épiderme pour permettre une guérison spontanée de la plaie. Les symptômes observés sont alors l'érythème, la formation de vésicules, l'œdème et la douleur. Ce type de brûlure prend 7 à 10 jours de guérison et peut former une légère cicatrice. Des soins médicaux sont nécessaires puisqu'il y a risque d'infections. Lorsqu'une portion substantielle du derme est détruite, on parle de brûlures profondes du deuxième degré. La guérison spontanée peut avoir lieu grâce aux cellules épidermiques des follicules pileux, mais ce phénomène doit être évité car il peut engendrer des cicatrices hypertrophiques et des contractions.

Finalement, lors de brûlures du troisième degré, on observe une destruction de toute l'épaisseur de la peau : l'épiderme, le derme et les annexes épidermiques. Une guérison spontanée est impossible. Bien que l'œdème soit important, le site de la brûlure est indolore car les terminaisons nerveuses ont été détruites à cet endroit. On sait qu'une régénération de la peau à partir des bordures de la brûlure est minime soit moins de 1 ou 2 cm. On ne peut attendre que cette prolifération ait lieu à cause des risques d'infections et des pertes de liquides. On a donc généralement recourt à une greffe de peau et ce, même lorsque l'étendue de la brûlure n'est présente que sur 10 % de la surface corporelle (Berthod et Rouhabbia, 1997).

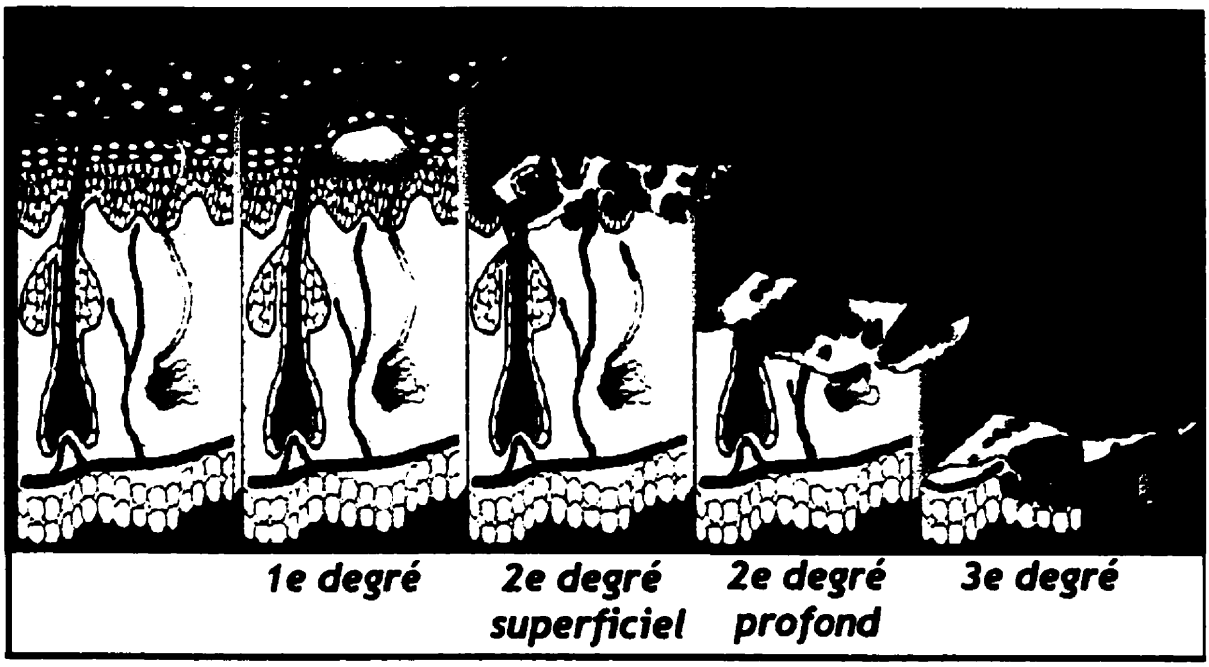

Figure 4. **Classification des différents degrés de brûlures** (Avec la permission du Dr. F. Berthod)

7. Les méthodes de recouvrement des brûlures

Une brûlure profonde de grande surface nécessite une autogreffe afin d'être en mesure de cicatriser. Toutefois, un individu recouvert à plus de 50 % de brûlures du troisième degré ne sera pas en mesure d'être traité complètement par cette méthode par manque de sites donneurs (Schlotterer, 1997). On aura donc recourt à divers moyens (pansements, greffes de peau de cadavre...) afin de recouvrir le plus rapidement possible les plaies causées par de telles brûlures. Cela permettra de veiller à la conservation des fluides, à la régulation de la température et à la protection contre les infections (Auger *et al*, 1988). Depuis les 30 dernières années, plusieurs modèles de substituts cutanés ont été développés afin de restaurer et de

maintenir la structure et les fonctions de la peau afin d'améliorer le traitement des grands brûlés.

a) Les feuillets épidermiques autologues

L'autogreffe de peau est le premier choix lorsqu'il est question de recouvrir de façon permanente les plaies chez les grands brûlés. Cependant, l'emploi de ce type de recouvrement est limité par le nombre de sites donneurs chez certains patients. Pour contourner cette limitation, Rheinwald et Green ont développé une technique de culture de kératinocytes humains *in vitro* en feuillets épidermiques pouvant êtres greffés (Rheinwald et Green, 1975 ; Rheinwald, 1977). À partir d'une biopsie de peau (4-8 cm^2), l'épiderme est séparé du derme puis les kératinocytes sont isolés les uns des autres grâce à une combinaison d'enzymes notamment la thermolysine (Germain *et al*, 1993). Les kératinocytes sont ensuite cultivés sur un lit nourricier de fibroblastes murins 3T3 irradiés qui libèrent des facteurs de croissance dans le milieu de culture. La découverte de la dispase, une enzyme qui digère les molécules qui retiennent les kératinocytes au substrat de plastique sans détruire les liens qui les unissent (Green *et al*, 1979 : Pomahac *et al*, 1998), a permis l'utilisation des feuillets de kératinocytes autologues chez des patients (Gallico, 1984). Cette enzyme permet, une fois que la confluence est atteinte, de décoller le feuillet formé du flacon de culture et de l'attacher à une gaze vaselinée servant de support lors de la manipulation des feuillets (Auger, 1988 ; Germain *et al*, 1993). Cette technique permet d'obtenir jusqu'à 10 000 fois la surface de la biopsie initiale. Ce type de greffe comporte un risque très bas de transmission infectieuse et n'entraîne aucun rejet puisqu'elle est de nature autologue.

Malheureusement, cette méthode comprend plusieurs contraintes. Outre les coûts élevés reliés à la production ou à l'achat des feuillets épidermiques (Epicel, Genzyme Inc., Cambridge, Mass.), un des inconvénients de cette méthode est le délai obligatoire de 2 à 3 semaines pour obtenir un nombre suffisant de feuillets épidermiques pour débuter la transplantation. De plus, le taux de prise de greffe peut varier de 20 à 90 % selon l'équipe chirurgicale et l'état du patient. Finalement, l'absence de derme entraîne parfois une rétraction importante du lit de greffe ce qui nuit aux résultats fonctionnels et esthétiques de la peau ainsi reconstruite. On a donc orienté la recherche vers le développement d'une composante dermique afin d'améliorer les greffons (Pomahac *et al*, 1998 ; Schlotterer, 1997).

b) Les substituts dermo-épidermiques

Les fibroblastes, élément cellulaire principal du derme, produisent la MEC. Cette dernière est composée de glycosaminoglycannes qui sont liés de façon covalente à une protéine centrale pour former les protéoglycannes, des protéines fibreuses (les collagènes) et des glycoprotéines (fibronectine, laminine). Le derme joue plusieurs rôles mécaniques : (1) support mécanique pour les cellules ; (2) procure l'élasticité et la résistance à la traction ; (3) fonction d'ancrage pour les glandes épithéliales et les appendices cutanés. Durant le processus de guérison de la peau, la présence du derme induit une réépithélisation plus rapide, inhibe la contraction de la plaie et améliore les résultats esthétiques (Pomahac, 1998). Donc l'ajout d'un derme aux équivalents ne pourra qu'améliorer leur qualité thérapeutique.

Les peaux reconstruites sont donc obtenues par la culture de kératinocytes à la surface de dermes reconstruits ou analogues (Bell *et al.*, 1981; Boyce *et al.*, 1990; Shahabeddin *et al.*, 1990; Saintigny *et al.*, 1993; Auger *et al.*, 1995). On peut classer les substituts dermo-

épidermiques en fonction des matériaux utilisés pour reconstruire la structure de la peau. On retrouve principalement les modèles de gel de collagène, les modèles d'éponge, les modèles de polymères synthétiques, les dermes acellulaires dé-épidermisés, et le modèle d'auto-assemblage de cellules.

Afin de pouvoir utiliser le derme reconstruit en clinique, ce dernier devra être flexible et résistant, minimiser la perte de fluides et diminuer les cicatrices et les contractions. Outre les applications cliniques, les substituts cutanés peuvent être utilisés comme méthode alternative à l'expérimentation animale. Jusqu'à présent, les différents modèles ont été utilisés dans des études pharmacologiques ou toxicologiques, de réponses immunologiques *in vitro* et de mécanismes de guérison de plaies (Auger *et al*, 1998).

i) Les modèles de gel de collagène

Le premier modèle d'équivalent dermique a été développé par l'association des constituants cellulaires et protéiques principaux du derme soient les fibroblastes et le collagène respectivement (Karasek et Charlton, 1971; Bell *et al*, 1979). On peut remarquer une réorganisation de la matrice de cet équivalent comparable au derme humain (Bell *et al*, 1981). Cependant, on observe une contraction du derme proportionnelle au nombre de cellules et inversement proportionnelle à la concentration du gel. On peut même observer une perte allant même de 80 % à 96 % de la surface initiale (Berthod *et al*, 1993). Afin de contrer ce problème de contraction qui peut être un inconvénient considérable pour une application clinique, un modèle d'ancrage a été développé. Ce modèle consiste à ensemencer le gel de collagène dans un anneau de papier poreux, permettant ainsi à la matrice collagénique de s'attacher dans les interstices. La superficie initiale est ainsi conservée et le gel de collagène ne se contracte qu'en

épaisseur (Lopez-Valle *et al*, 1992 : Michel *et al*, 1993 ; Auger *et al*, 1995 ; Germain *et al*, 1995). Ce modèle a montré de fortes ressemblances avec le derme humain en histologie et peu de cellules sont nécessaire pour sa réalisation.

Afin d'obtenir une peau reconstruite, une suspension de kératinocytes est ensemencée à la surface du derme reconstruit permettant ainsi d'obtenir un épiderme. L'équivalent sera ensuite porté à l'interface air-liquide pour amener les kératinocytes à se différentier et à former un épithélium stratifié comprenant desmosomes, tonofilaments et hémidesmosomes (Bell *et al*, 1981 ; Pruniéras *et al*, 1983). Des éléments nutritifs fournis par la matrice de collagène contribuent à cette différenciation (Benathan et Labidi-Ubaldi, 1998). Toutefois, ce modèle possède une faible résistance aux collagénases et l'utilisation de collagène d'origine animale pour fabriquer le derme est susceptible de transmettre des prions.

La compagnie Organogenesis Inc. a développé une peau reconstruite, APLIGRAF (anciennement GRAFTSKIN ™), composée de fibroblastes néonataux de prépuce incorporés dans une matrice de collagène de type I. Une fois le néoderme formé, des kératinocytes néonataux sont ensemencés à sa surface où ils vont être en mesure de proliférer et de se différencier. Des expériences de greffe de ces peaux reconstruites sur des souris athymiques ont montré un excellent taux de prise de greffe (Hansbrough *et al*, 1994). De plus, ces substituts cutanés sont efficaces dans le traitement d'ulcères veineux réfractaires ou de plaies graves et ils ne semblent pas êtres cliniquement rejetés (Trent et Kirsner, 1998 ; Kirsner, 1998). Cependant, leur utilisation entraîne des coûts très élevés.

ii) Les modèles d'éponge

Dans ces modèles, le collagène est associé à des glycosaminoglycannes pour former une structure de type éponge pouvant être colonisée par des fibroblastes. Ce type de structure est formé grâce à la lyophilisation du mélange des composants. De plus, l'ajout d'aldéhydes provoquant la formation des liaisons covalentes entre les 2 composants de la peau reconstruite, permet de diminuer la dégradation du collagène par les collagénases.

Le premier modèle d'éponge a été développé par l'équipe de Yannas et Burke (Burke *et al*, 1981). La matrice dermique est obtenue en lyophilisant un gel de collagène bovin et de chondroïtines-6-sulfate. Ces 2 composants sont maintenus par des liens covalents avec du glutaraldéhyde. Integra Life Science a mis sur le marché une éponge de collagène bovin et chondroïtines-6-sulfate recouverte d'une membrane de silicone (INTEGRA ™). Cette couche de silicone agit comme feuillet de protection externe pour empêcher l'invasion bactérienne et l'évaporation de l'eau. L'éponge INTEGRA ™ peut être utilisée dans le traitement de brûlures en fournissant une matrice qui permet de développer un néoderme et de donner au patient une couverture temporaire sur ses plaies. Une fois mise en place sur la plaie, la matrice adhère à la surface et permet l'invasion de fibroblastes et de CE du patient qui formeront le néoderme. Après 2 à 3 semaines, la membrane de silicone est enlevée et l'on pourra placer un épiderme autologue ultra fin à la surface. Ce type de peau reconstruite a donné de bons résultats jusqu'à présent dans plusieurs études (Sheridan et Tompkins, 1999). Cependant, son emploi nécessite plusieurs lavages afin d'éliminer toutes traces de glutaraldéhyde, une molécule toxique pour les cellules, et exige deux gestes opératoires.

Boyce et Hansbrough ont amélioré le modèle d'éponge en produisant une peau reconstruite complètement biologique. Ils ont ensemencé des kératinocytes à la surface d'un néoderme

produit par la culture de fibroblastes dans une éponge de collagène et chondroïtines-4,6-sulfates (Boyce *et al*, 1988 ; Hansbrough *et al*, 1989). La structure obtenue est similaire à celle de la peau humaine. Ces derniers ont par la suite ajouté des mélanocytes à leurs peaux reconstruites. Après avoir greffé ces équivalents sur des modèles animaux, on peut observer la régénération de l'épiderme et la repigmentation de la peau avec le temps (Boyce *et al*, 1988, 1993a ; Harriger *et al*, 1995). Lors d'une étude de greffe effectuée chez des patients, ils ont observé après 3 mois une bonne incorporation de la matrice dans la plaie, une membrane basale bien formée, des fibrilles d'ancrage d'apparence normale et l'expression d'antigènes propre à la peau (Boyce *et al*, 1993b). Toutefois, la survie de la portion épidermique exige des pansements complexes afin d'irriguer la surface des greffes sinon il y a nécrose.

Un autre type d'éponge a été développé en liant ioniquement du collagène bovin à des chondroïtines par du chitosane, un polysaccharide non toxique contrairement au glutaraldhéhyde utilisé précédemment (Shahabeddin *et al*, 1990 ; Saintigny *et al*, 1993 ; Berthod *et al*, 1993 ; Damour *et al*, 1994). Les liaisons ioniques entre le chitosane et les autres composantes sont responsables des bonnes propriétés mécaniques de l'éponge (Berthod *et al*, 1993). Puisque le réseau de collagène de ces éponges prévient la contraction en diamètre, on peut obtenir une production plus reproductible. Un avantage majeur de ce modèle est la production d'importantes quantités de MEC par les fibroblastes ensemencés dans l'éponge. Cette néosynthèse peut être augmentée par l'ajout de vitamine C dans le milieu de culture qui stimule la synthèse de collagène par les fibroblastes (Hata et Senoo, 1989). On retrouve aussi divers phénomènes de remodelage de la MEC par les fibroblastes : maturation du collagène, fibrillogenèse et organisation des fibres de collagène en paquets perpendiculaires les uns aux autres. Cette MEC mature favorise la différenciation épidermique et la formation d'une jonction dermo-épidermique bien organisée. Lorsque des kératinocytes sont ensemencés à la surface du derme reconstruit, on observe un épiderme multicouche stratifié exprimant les

principales protéines de la jonction dermo-épidermique (Shahabeddin *et al*, 1990 ; Saintigny *et al*, 1993 ; Sahuc *et al*, 1996 ; Black *et al*, 2001, en préparation).

Ce modèle fait présentement l'objet d'études cliniques chez les brûlés (Damour *et al*, 1994). On a aussi montré que cette peau reconstruite pouvait être un outil très pratique pour évaluer l'irritation cutanée, la phototoxicité, la photoprotection et pour effectuer des tests de molécules cosmétiques et de produits finis (Damour *et al*, 1998). Bien que ce modèle possède de nombreux avantages et montre des perspectives intéressantes, il ne faut pas oublier qu'il nécessite un nombre élevé de cellules et que l'utilisation de collagène bovin comporte des risques de contamination par les prions et de réactions immunologiques.

Un des principaux obstacles aux greffes de substituts cutanés chez les grands brûlés est l'épaisseur trop importante du derme qui peut ralentir le processus de revascularisation du greffon. Le retard de vascularisation peut diminuer le taux de prise de greffe et provoquer la nécrose de l'épiderme par manque d'apport nutritif. Nous avons récemment mis au point au LOEX une peau reconstruite endothélialisée dans laquelle les CE humaines forment spontanément des tubules ressemblant à des capillaires (figure 5) (Black *et al*, 1998). Cet équivalent permettra sans doute d'accélérer le processus de revascularisation des greffons et fournira un outil intéressant pour l'étude de l'angiogenèse et de ses facteurs (Black *et al*, 1999).

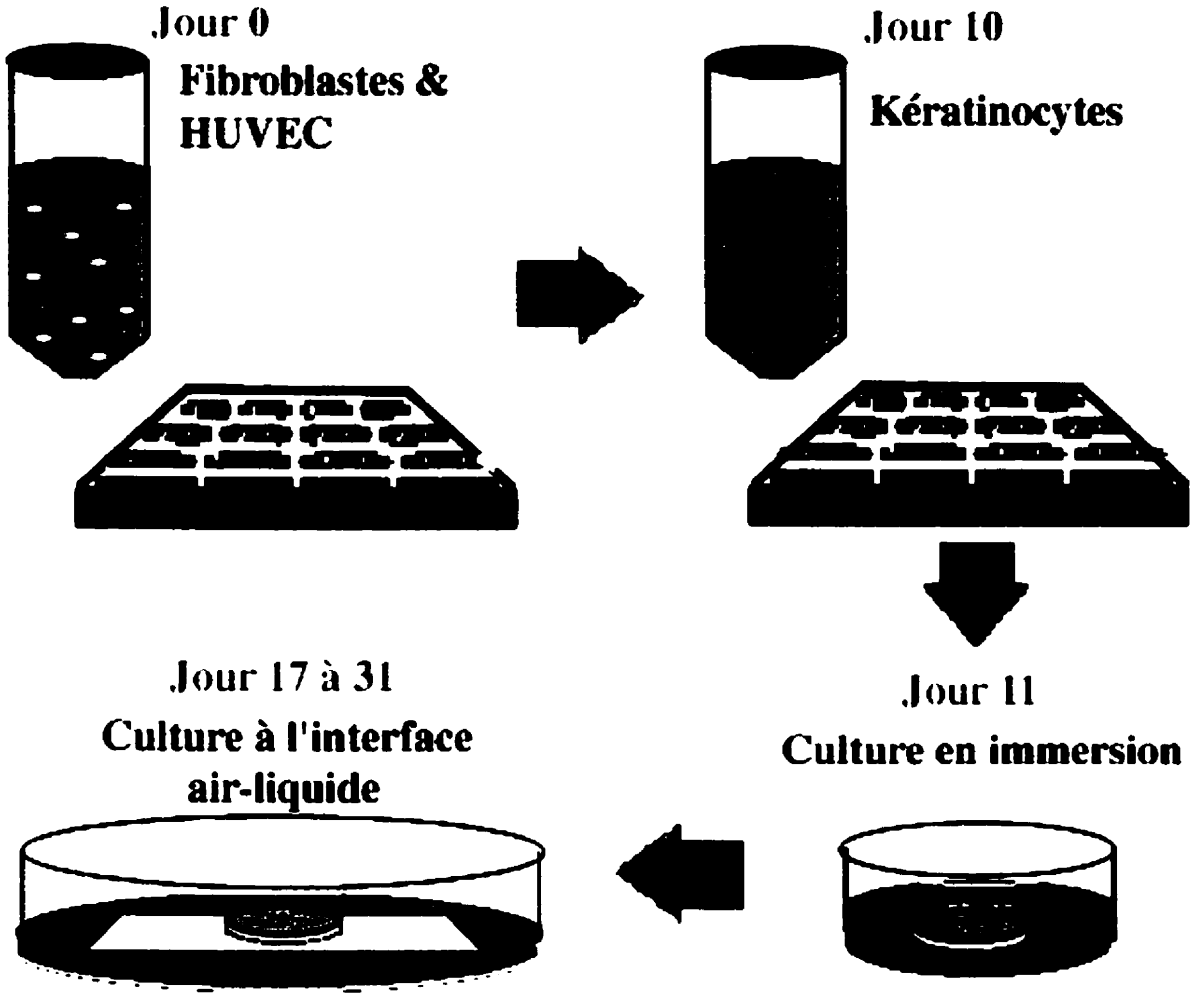

Figure 5. **Préparation d'une peau reconstruite endothélialisée à partir d'une éponge de collagène/ chitosane/ glycosaminoglycans.** (Modèle utilisé lors de nos expérimentations)

iii) Les modèles de polymères synthétiques

Le développement de supports dermiques a amené l'utilisation de matériaux alternatifs résorbables comme l'acide polyglycolique. Ces derniers sont plus résistants à la dégradation enzymatique ce qui permet à la matrice d'être colonisée par davantage de fibroblastes avant

qu'elle soit résorbée (Cooper et Hansbrough, 1991). DERMAGRAFT ™ (Advanced Tissue Sciences, La Jolla, CA, USA) est un exemple de substituts dermiques dérivés de ce type de matériaux. Il est testé cliniquement et disponible commercialement. Ce modèle est composé de fibroblastes dermiques humains cultivés dans un support de fibres d'acide polyglycolique (Vicryl®). Lorsque ce substitut dermique est greffé sur des patients brûlés puis recouvert par de fines greffes de peau autologue ajourée, on n'observe pas de signes de réactions inflammatoires contre les fibres ou les fibroblastes allogéniques. On remarque aussi une invasion évidente de capillaires dans le néoderme et la formation d'une membrane basale (Freedlander, 1998). De plus, les fibres de Vicryl® disparaissent entre 14 et 28 jours. Après une année, des fibres élastiques ont été détectées dans le derme (Hansbrough *et al*, 1992). L'équipe de Hansbrough a modifié ce modèle en recouvrant le derme avec des kératinocytes cultivés. Seulement la moitié des greffes fut réussie sur des souris athymiques, mais une diminution de contraction de la plaie a été observée (Hansbrough *et al*, 1993).

Advanced Tissue Sciences a aussi développé un substitut cutané en cultivant des fibroblastes néonataux humains dans un treillis de Nylon. Ce modèle ne contient aucun collagène exogène puisque les fibroblastes synthétisent eux-mêmes le collagène, les protéines de la MEC et les facteurs de croissance dans le treillis. Des kératinocytes sont ensuite ensemencés à la surface du substitut dermique. Afin d'obtenir un épiderme différencié et cornifié, les équivalents sont ensuite transférés dans un insert de culture, MILLICELL ™, puis élevés à l'interface air liquide (Whalen *et al*, 1994). On a réalisé des tests d'absorption cutanée, de viabilité, de phototoxicité et de métabolisme de médicaments à l'aide de ce modèle (Whalen *et al*, 1994). Malheureusement, la compagnie a cessé en 1996 la commercialisation de ce type de substitut cutané pour la pharmacotoxicologie.

iv) Les dermes acellulaires dé-épidermisés

Contrairement aux cellules épidermiques allogéniques, un derme décellularisé allogénique semble pouvoir être transplanté sans rejet significatif puisque les composants non cellulaires du derme possèdent une faible immunogénicité. Ce modèle de substitut dermique à partir d'un derme acellulaire dé-épidermisé a été développé par Régnier et Pruniéras dans un but expérimental exclusif chez l'Oréal (Régnier *et al*, 1986 ; Pruniéras *et al*, 1983). Cette technique consiste à incuber pour 5 jours une peau humaine ou animale dans une solution aqueuse tamponnée ne contenant aucune substance nutritive. Ainsi, les cellules du derme meurent et l'épiderme original est enlevé. On peut ensuite ensemencer des kératinocytes et des fibroblastes autologues à l'intérieur du derme acellulaire (Freedlander, 1998). L'équivalent sera ensuite élevé à l'interface air-liquide pour assurer une différenciation adéquate de l'épiderme. Puisque la membrane basale est conservée, la croissance et la différenciation des kératinocytes nouvellement ensemencés sont favorisées. Cette matrice dermique est très résistante aux collagénases, mais son origine allogénique pourrait induire des réactions immunologiques (Berthod *et al*, 1997). Grâce à des expériences de greffes sur des souris athymiques, on a constaté que ces peaux reconstruites montraient, un mois après la greffe, une kératinisation, un profil lipidique et des propriétés de barrière normales (Higounec *et al*, 1994).

La compagnie LifeCell Corporation (The Woodlands, TX, U.S.A.) a commercialisé ALLODERM®, un derme humain dé-épidermisé. Ce modèle est produit à partir de peau humaine par un processus contrôlé qui permet d'enlever l'épiderme et les cellules du derme sans altérer la structure de la MEC et la membrane basale (Wainwright, 1995). Ce matériel est ensuite appliqué sur le lit de la plaie et recouvert d'une fine autogreffe épidermique. On observe ainsi une prise élevée du derme et de l'autogreffe. Lorsque ALLODERM® est

appliqué sur des plaies, on remarque l'invasion des fibroblastes, la néovascularisation et la croissance des kératinocytes (Pomahac *et al*, 1998). Une récente étude a montré que cette méthode de greffe donne des résultats comparables à la conventionnelle autogreffe de peau (Freedlander, 1998).

v) Le modèle par auto-assemblage

Un nouveau modèle par auto-assemblage a récemment été développé dans notre laboratoire (Michel *et al*, 1999). Contrairement aux modèles décrits précédemment, ce modèle est produit uniquement à partir de cellules et ne contient aucun matériel synthétique. En effet, les fibroblastes sont cultivés dans un flacon en présence d'acide ascorbique jusqu'à ce qu'ils forment un feuillet épais. Plusieurs feuillets sont empilés les uns sur les autres afin de former la portion dermique. Les kératinocytes sont ensuite ensemencés sur le derme reconstruit et ces derniers formeront un épiderme exprimant des marqueurs de différenciation. Puisqu'il ne contient aucun matériel synthétique, ce modèle pourra être envisagé pour les greffes chez les grands brûlés.

C. Les cellules endothéliales

L'endothélium a longtemps été perçu comme une membrane inerte dont la fonction principale était de maintenir la perméabilité des vaisseaux. Cependant, les connaissances acquises au fil des années concernant les CE nous permettent de regarder l'endothélium comme étant un organe dynamique qui possède des fonctions vitales dans la régulation de l'homéostasie. L'endothélium vasculaire est une couche simple de cellules qui tapisse la couche interne de tous les vaisseaux sanguins. Il est formé par des cellules d'origine mésenchymateuse, les CE. La membrane des CE est habituellement asymétrique avec une portion thromborésistante enrichie en héparane sulfate du côté du flux sanguin. La surface de CE chez un adulte humain est composée d'environ 1 à $6X10^{13}$ cellules, pèse environ 1 kg et couvre une aire de 1 à 7 m^2 (Augustin *et al*, 1994). Les vaisseaux sanguins sont présents dans tous les organes.

L'étude des fonctions des CE est devenu possible grâce au développement de techniques de culture des CE *in vitro* dans les années 1970 (Jaffe *et al*, 1973 ; Lewis *et al*, 1973 ; Folkman *et al*, 1979). Du sérum et des facteurs de croissance sont nécessaires afin d'obtenir des conditions de culture idéales pour ces cellules. Puisque la croissance des CE sur une surface de plastique n'est pas optimale, on doit les cultiver sur des équivalents de la membrane basale, gélatine ou fibronectine. Elles possèdent une croissance rapide et elles sont facilement reconnaissables par leur forme de pavé caractéristique qu'elles adoptent en monocouche. Cependant, la culture en monocouche comporte des limitations importantes : les CE passent d'un état quiescent *in vivo* (0,1 % réplications par jour) à un état activé (1 à 10 % réplications par jour) et elles peuvent perdre des fonctions spécialisées associées aux divers vaisseaux ou organes (Cines *et al*, 1998). Des systèmes de culture plus complexes sont maintenant disponibles pour étudier les

CE dans un environnement plus près de la réalité. L'isolement de CE provenant de conditions pathologiques, comme la sclérodermie ou l'arthrite rhumatoïde, pourrait nous permettre de mieux comprendre la pathologie de certaines maladies (Kraling *et al*, 1994 ; Abbot *et al*, 1992).

Situé à l'interface entre le flot sanguin et les tissus, l'endothélium est exposé à des stimuli à la fois biochimiques et biomécaniques pouvant induire son activation (Gimbrone, 1995). On connaît deux principaux phénotypes pour les CE: le phénotype constitutif, qui varie en fonction de l'organe et du microenvironnement immédiat des cellules, et le phénotype activé, qui est observé lorsque les CE ont été stimulées (Libby et Birinyi, 1986). Les médiateurs biochimiques qui peuvent induire l'activation des CE incluent les cytokines, les facteurs de croissance, les hormones et les produits bactériens. Ces médiateurs sont acheminés via le sang et/ou produits localement par les CE ou d'autres types cellulaires. Ces molécules vont ensuite agir de manière autocrine ou paracrine. Par ailleurs, les CE sont constamment exposées à des forces hémodynamiques générées par la circulation sanguine. Ces forces incluent les pressions hydrostatiques et les stress de cisaillements de la paroi. Ces stimuli biomécaniques peuvent influencer directement la structure et les fonctions des CE, chroniquement ou non. Les changements remarqués chez les CE comprennent des modifications de la forme des cellules, de l'architecture du cytosquelette et de l'alignement. On remarque aussi des changements plus subtils de déformations de la membrane et du taux de division (Resnick et Gimbrone, 1995). Les 2 types de stimuli mentionnés ci-dessus peuvent générer une modification de l'expression de gènes chez les CE (Gimbrone *et al*, 1997).

1. Hétérogénéité des cellules endothéliales

Il n'est plus surprenant d'entendre parler d'hétérogénéité chez les CE. En effet, de nombreuses études ont démontré que les CE possèdent une variabilité remarquable d'une espèce à l'autre ainsi que d'un individu à l'autre à l'intérieur d'une même espèce (McClure, 1921 ; Majno, 1965). Cette hétérogénéité peut même être observée au niveau des différents tissus chez un individu et même d'un organe. Ces variations se manifestent pour plusieurs propriétés des CE (Tableau 1). St. Croix *et al* ont récemment comparé les profils d'expression de gènes pour différents endothéliums dérivants de tissus normaux et tumoraux (2000). Ils ont démontré que ces profils d'expression variaient et qu'en général, les endothéliums étaient différents les uns des autres.

Tableau 1. Propriétés variables des cellules endothéliales (Reproduit de Thorin et Shreeve, 1998)

Phénotype
Taille des cellules
Prolifération cellulaire
Expression d'antigène
Fonctions
☙ sécrétion de facteurs vasoactifs : NO ; ET-1 ; prostacycline
☙ réponses des cellules en fonction du flot sanguin
☙ vasodilatation induite par EDRF ; diminution en EDCF
☙ vasoconstriction induite par ET-1 ou prostaglandines
☙ interactions modulées par les récepteurs des cellules endothéliales : up-regulation de l'urokinase et de la protéine-Gai3 ; réponse des cellules à t-PA, VIP et ET-1
Prédisposition pour différentes maladies
☙ arthérosclérose
☙ hyperlipidémie
☙ hypertension
Changements des protéines-G lors de certaines pathologies
☙ arthérosclérose
☙ obésité

EDCF, endothelium-derived constricting factor ; EDRF, endothelium-derived relaxing factor ; ET-1, endothelin-1 ; NO, nitric oxyde ; t-PA, tissue plasminogen activator ; VIP, vasoactive intestinal polypeptide

2. Les marqueurs des cellules endothéliales

Les CE expriment des marqueurs spécifiques qui permettent de les identifier *in vivo* et *in vitro*. Certains marqueurs sont exprimés de façon continue sur la majorité des endothéliums alors que d'autres nécessitent l'activation des CE par des facteurs de croissance ou d'autres molécules. Bien entendu, l'hétérogénéité des CE se reflète dans l'expression des marqueurs. Le tableau 2 regroupe la majorité des marqueurs des CE. Plusieurs d'entre-eux sont exprimés

à la fois sur les CE et les cellules souches hématopoïétiques ou cellules sanguines matures renforçant ainsi l'idée d'un précurseur commun (Risau, 1995).

Tableau 2. Les marqueurs des cellules endothéliales (Tiré de Garlanda et Dejana, 1997)

Marqueurs constitutifs	Marqueurs inductibles
Facteur VIII	ICAM-1/ CD54
PECAM-1/ CD31	CD106
Enzyme de conversion de l'angiotensine	E-sélectine/ CD62E
AcLDL	P-sélectine/ CD62P
Agglutinine *Ulex europaeus I*	KDR/ *flk-1* (VEGFR-2)
Lectine *Bandeirea simplicifolia*	Flt-1 (VEGFR-1)
Agglutinine *Griffonia simplicifolia*	Tie-1
Corps de Weibel-Palade	Tie-2
VE-cadhérine	
CD34	
ICAM-2/ CD102	
CD51/ 61 (récepteur vitronectine)	
Endogline/ CD105	
CD36	
CD73/ VAP 2	
Thrombomoduline	
Sca-1	
AAMP	

AAMP, Angio-Associated Migratory Cell Protein ; AcLDL, Acetylated Low Density Lipoprotein ; ICAM, Intercelllular Adhesion Molecule ; PECAM-1, Platelet-Endothelial Cellular Adhesion Molecule-1 ; VAP, Vascular Adhesion Protein ; VE-cadherin, Vascular-Endothelial cadherin ; VEGFR, Vascular Endothelial Growth Factor Receptor.

Le facteur de von Willebrand (vWF) et les corps de Weibel-Palade (W-P) sont les seuls marqueurs qui permettent l'identification des CE et qui sont présents de façon caractéristique chez l'homme (Fajardo, 1989). Les corps de W-P sont des organelles intracytoplasmiques et servent à entreposer le vWF (Wagner *et al*, 1982). Ces corps de W-P peuvent relâcher rapidement le vWF. Ils sont utilisés comme marqueur des CE en microscopie électronique. Le

vWF est le principal marqueur des CE et il est utilisé abondamment en immunofluorescence. Le vWF est une glycoprotéine multimérique de haut poids moléculaire qui contient un nombre variable de sous-unités (2 à 100) formées de 2050 acides aminés (Ruggeri et Ware, 1993). Cette protéine est synthétisée majoritairement par les CE et les mégacaryocytes. Elle possède 2 fonctions principales : 1) elle est impliquée dans l'adhésion des plaquettes et dans la formation de caillots lors de dommage vasculaire ; 2) elle sert à transporter dans la circulation sanguine le facteur VIII, un procoagulant, sous forme de complexe vWF-facteur VIII. Les CE doivent atteindre un stade avancé de différenciation pour être en mesure de synthétiser le vWF. Le vWF est produit en quelques étapes : synthèse des sous-unités primaire, libération du peptide signal, ajout de chaînes glycosylées et assemblage en multimères (Wagner et Marder, 1984). Ce dernier n'est pas uniquement entreposé dans les corps de W-P puisqu'on le retrouve aussi dans le plasma normal, les plaquettes et la matrice sous-endothéliale (Handin et Wagner, 1989).

3. Les molécules d'adhésion cellulaire des cellules endothéliales

Il y a quelque temps, l'endothélium était considéré comme une couche non-adhésive dans les vaisseaux sanguins qui prévenait la coagulation du sang et séparait l'espace vasculaire des tissus. Or, les CE expriment de nombreuses molécules d'adhésion qui jouent des rôles dans les interactions entre ces cellules et la MEC ou les cellules avoisinantes. Morphologiquement, 3 types d'organelles constituent les jonctions des CE (Dejana *et al*, 1995). Sur la face apicale des cellules, des jonctions serrées sont présentes afin de sceller les cellules entre-elles. Des "gap junction", qui peuvent être intercalées avec des jonctions serrées, permettent l'échange d'ions et de petites molécules entre les cellules adjacentes. Les jonctions adhérentes, localisées dans une position plus basale, permettent les contacts entre les cellules et servent d'ancrage

pour le cytosquelette d'actine. En plus de ces protéines, les CE expriment au niveau de leur jonction des protéines spécifiques à ce type cellulaire comme PECAM-1 et VE-cadhérine.

Les molécules d'adhésion exprimées à la surface des CE peuvent être constitutives ou inductibles. Les premières, appelées aussi adressines vasculaires, servent de signaux de reconnaissance pour les différentes cellules qui circulent dans le système sanguin (Claudy, 1997). Les membres de la deuxième catégorie de molécules d'adhésion apparaissent lorsque la cellule est stimulée. La superfamille des immunoglobulines, les sélectines P et E ainsi que les intégrines font partie des molécules d'adhésion inductibles. Voici quelques exemples des molécules d'adhésion exprimées par les CE.

a) PECAM-1 (Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1)

PECAM-1 (ou CD31), membre de la superfamille des immunoglobulines, est exprimé à la surface des plaquettes, des monocytes, des neutrophiles et de certaines cellules T. Cette molécule d'adhésion est aussi une composante majeure des jonctions intercellulaires des CE (Albelda *et al*, 1990 ; Newman *et al*, 1990). Distribuée sur les membranes latérales, cette protéine participe à des interactions homophiliques ou hétérophiliques avec d'autres composants de la surface cellulaire, notamment l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Ces interactions sont médiées par la portion N-terminale du domaine extracellulaire de la protéine. Cette molécule participe aux cascades d'adhésion menant à l'extravasation des leucocytes durant les processus inflammatoires (Muller *et al*, 1993). En effet, le traitement de monocytes ou de neutrophiles avec des anticorps spécifiques à PECAM-1 inhibe leur migration au travers d'une monocouche de CE. Grâce à ses interactions homophiliques, PECAM-1 est en mesure de moduler la migration transendothéliale des leucocytes tout en maintenant la barrière établie

par la monocouche de CE. Cette molécule d'adhésion contribue à la transduction de signaux à l'intérieur de la cellule via son domaine cytoplasmique. Lors de l'angiogenèse, PECAM-1 semble être nécessaire pour la migration des CE et pour leur association cellule-cellule afin de former des réseaux de structures capillaires (Schimmenti *et al*, 1992 ; Yang *et al*, 1999). Les interactions de PECAM-1 avec les filaments d'actine sont aussi requises pour former des capillaires (Matsumura *et al*, 1997). Par ailleurs, cette molécule pourrait contribuer dans les premiers événements du développement du système cardiovasculaire. Finalement, PECAM-1 participe à des interactions cellulaires impliquées dans certaines maladies inflammatoires, thrombotiques et immunologiques.

b) ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1)

ICAM-1 (CD54) est exprimée continuellement par les CE présentes dans la peau normale. Cette molécule peut servir de récepteur d'entrée pour certains pathogènes comme le rhinovirus (Greve *et al*, 1989). Plusieurs études ont montré que les kératinocytes exprimaient ICAM-1 lors de certaines dermatoses. L'expression d'ICAM-1 par les kératinocytes et d'autres types cellulaires est induite par la production locale d'IFN et TNF-α. Des études sur l'inflammation cutanée ont montré que l'induction d'ICAM-1 ne serait pas un événement initial de ce phénomène mais plutôt une réponse aux cytokines produites localement. ICAM-1 est une des molécules qui modulent l'adhésion des leucocytes aux vaisseaux et à leur extravasation, des étapes importantes dans les réponses aux infections et aux bris tissulaires.

c) VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1)

VCAM-1, une glycoprotéine exprimée par les CE activées, appartient à la superfamille des immunoglobulines (Osborn *et al*, 1989). VCAM-1 a pour ligand VLA-4 (Very Late Activation antigen-4 ou intégrine β_1/α_4). Ce dernier est présent à la surface de différentes cellules (lymphocytes, monocytes et cellules de mélanomes) et peut servir de récepteur pour la fibronectine. L'expression de VCAM-1 est induite par des cytokines impliquées dans l'inflammation telles que IL-β et TNF-α. Il faut noter que l'expression de VCAM-1 n'est pas restreinte à l'endothélium activé puisque les macrophages et les leucocytes peuvent aussi l'exprimer. VCAM-1 ressemble à une autre molécule d'adhésion des CE, ELAM-1 (Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1), sauf pour l'induction par IL-4 et la capacité de se lier aux lymphocytes.

d) VE-cadhérine (Vascular-Endothelial cadherin)

VE-cadhérine est une molécule d'adhésion cellulaire spécifique aux CE qui possède plusieurs rôles importants dans la biologie de ces dernières. Cette molécule d'adhésion homophilique et dépendante du Ca^{2+}, semble transférer de l'information intracellulaire via un réseau de molécules de signalisation et du cytosquelette. La portion intracellulaire est liée à 3 protéines du cytoplasme : β-caténine, plakoglobine et p120. La β-caténine et la plakoglobine lient l'α-caténine qui, à son tour, permet de joindre le complexe au cytosquelette d'actine. VE-cadhérine est habituellement localisée aux bordures latérales des cellules, mais elle est distribuée de manière diffuse lorsque les cellules sont en migration. L'expression de cette molécule est requise pour contrôler la perméabilité et l'intégrité vasculaire (Dejana *et al*, 1999). Lors de l'angiogenèse, VE-cadhérine serait nécessaire pour les interactions CE-CE,

mais semble aussi jouer un rôle dans le processus de vacuolisation ou de la fusion de vacuoles qui permet la formation du lumen intercellulaire (Yang *et al*, 1999). De plus, cette molécule modulerait l'organisation des CE en structures tubulaires via des interactions avec l'actine (Matsumura *et al*, 1997). Finalement, VE-cadhérine prend part au processus de différenciation des CE puisque les cellules embryonnaires souches dépourvues de VE-cadhérine ne peuvent se différencier dans la voie des CE (Vittet *et al*, 1997).

e) Les intégrines des cellules endothéliales

Les intégrines sont des molécules de surface impliquées dans la liaison des cellules à différents substrats et qui peuvent induire des changements morphologiques en réponse à divers stimuli. La famille des intégrines est composée de 15 sous-unités alpha et 8 bêta qui sont retrouvées dans plus de 20 combinaisons hétérodimériques à la surface des CE. Les différentes intégrines permettent aux cellules de reconnaître et de répondre à une grande variété de protéine de la MEC : fibronectine, laminine, collagènes, vitronectine, fibrinogène et thrombospondine. Ces récepteurs sont des molécules multifonctionnelles capables de transmettre les signaux de la MEC jusqu'à l'intérieur de la cellule. En fait, la portion cytoplasmique des intégrines peut interagir avec des composants du cytosquelette incluant l'α-actinine, la taline et la vinculine (Miyamoto *et al*, 1995). Plusieurs études ont démontré l'expression sur les CE de membres de la sous-famille des intégrines β_1 incluant $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_6\beta_1$ (Polverini, 1996). Certains membres des sous-familles β_3, β_4 et β_5 sont aussi exprimés sur les CE. L'expression des intégrines peut être constitutive ou induite par des facteurs de croissance.

Différentes expériences ont montré l'importance des intégrines β_1 dans l'angiogenèse. En effet, des anticorps dirigés contre le récepteur β_1 de la laminine arrête la différenciation des CE et la formation de structures capillaires *in vitro* (Davis et Camarillo, 1995). De plus, des anticorps dirigés contre les sous-unités α_2 ou β_1 du récepteur du collagène $\alpha_2\beta_1$ enrayent la formation de vacuoles et de lumen *in vitro* (Davis et Camarillo, 1996). Finalement, des antagonistes des intégrines β_1 injectés dans des embryons ont provoqué l'interruption du développement vasculaire et de la formation de lumen. Donc, β_1 possède également un rôle critique dans la vasculogenèse.

En plus des intégrines β_1, le récepteur de la vitronectine, $\alpha_v\beta_3$, est aussi impliqué dans le phénomène d'angiogenèse. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est un récepteur jouant un rôle dans l'adhésion, la migration et les réponses des cellules aux protéines de la MEC qui possèdent le tripeptide Arg-Gly-Asp : vitronectine, fibronectine, fibrinogène, laminine, collagène, facteur von Willebrand, ostéopontine et thrombospondine. Au niveau des vaisseaux normaux, l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est minimale, mais, elle est augmentée de façon significative sur les CE dans les tumeurs, dans les tissus de granulation ou en réponse à certains facteurs de croissance *in vitro*. $\alpha_v\beta_3$ est alors localisée à l'extrémité des CE des vaisseaux qui bourgeonnent. Son expression diminuera après la maturation des vaisseaux (Clark *et al* ,1996). Elle aurait aussi un rôle dans les interactions avec les protéines impliquées durant la dégradation de la matrice. En effet, $\alpha_v\beta_3$ colocalise avec une forme active de la MMP-2 dans les vaisseaux en croissance et il est possible d'observer une interaction spécifique entre les deux (Brooks, 1996).

Son rôle dans la vasculogenèse a été déterminé par la microinjection d'anticorps neutralisants dans des embryons en développement (Drake *et al*, 1995). Chez ces embryons, l'aorte bien que située correctement, n'était pas en mesure de former un lumen. De plus, ces embryons

présentaient des discontinuités dans la longueur de l'aorte et une organisation abhérente des plexus vasculaires adjacents.

Les interactions entre l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et la MEC ont été identifiées comme étant le système de survie le plus important pour les vaisseaux en formation (Varner *et al*, 1995). Si on interfère dans les interactions que possède $\alpha_v\beta_3$ avec ses différents substrats, il y a induction d'apoptose chez les CE (Brooks *et al*, 1994a). Cette intégrine est présente en plus grande quantité sur les CE activées où elle supprime les activités de p53 et de l'inhibiteur du cycle cellulaire inductible par p53, $p21^{WAF1/CIP1}$. De plus, elle augmente le ratio Bcl-2 :Bax procurant ainsi un effet anti-apoptotique (Stromblad *et al*, 1996). Donc le cycle cellulaire et les cascades de signalisation apoptotique sont équilibrés par cette intégrine.

On a démontré que les CE impliquées dans la vascularisation des tumeurs exprimeraient $\alpha_v\beta_3$ (Brooks *et al*, 1994a ; 1994b). Ainsi, des antagonistes de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ pourraient êtres efficaces dans le traitement d'une variété de maladies humaines dites angiogéniques. En effet, des antagonistes d' $\alpha_v\beta_3$, peptides cycliques RGD ou anticorps, sont en mesure de bloquer l'angiogenèse induite par bFGF, TNF-α et différentes tumeurs humaines (Brooks *et al*, 1994a ; Brooks *et al*, 1995). Ces derniers agissent sur les CE de vaisseaux en formation et non pas sur les vaisseaux quiescents. Ces résultats ne sont pas surprenants puisque cette intégrine n'est exprimée que sur les vaisseaux en croissance (Brooks *et al*, 1994b).

4. Les fonctions des cellules endothéliales

La fonction la plus évidente de l'endothélium est l'échange de métabolites et de produits de sécrétion entre le sang et les tissus avoisinants. En fonction du degré d'échange requis, les CE

vont se joindre de manière discontinue/fenestrée (très perméable) ou continue (moins perméable). L'endothélium agit aussi comme un tissu sécrétoire de type endocrine/paracrine qui participe à la régulation de plusieurs phénomènes tant pharmacologiques, inflammatoires que cancéreux.

Les CE participent au phénomène de coagulation où elles tiennent des rôles procoagulants et anticoagulants. Les CE sécrètent constitutivement le facteur de vWF, une glycoprotéine qui transporte une molécule de coagulation, le facteur VIII. Le vWF est aussi un cofacteur important pour l'adhésion des plaquettes à l'endothélium. Lorsque la voie de coagulation sanguine est initiée, les CE procurent une surface favorable pour coordonner plusieurs réactions : elles lient les facteurs IXa, Xa et VIIIa, synthétisent et présentent le facteur Va, activent le facteur XIIa et expriment des phospholipides. Ces derniers pourront activer à leur tour le facteur X et la prothrombine en thrombine (Rodgers *et al.* 1983). Puisque les CE n'expriment pas normalement le TF (Tissue Factor ou thromboplastine), elles ne peuvent déclencher par elles-mêmes une voie de coagulation extrinsèque (Pearson, 1991). Les CE expriment TF en réponse à la thrombine et cette expression sera augmentée par l'exposition à IL-1 ou TNFα. Ces cytokines vont aussi diminuer la sécrétion de tPA et augmenter l'expression de PAI-1 pour ainsi favoriser la formation d'un caillot sanguin. Le TF va réagir avec le facteur VIII et le Ca^{2+} de manière à accélérer l'activation du facteur X.

Normalement, les CE présentent une surface non coagulante et nonthrombique à la circulation sanguine. Ainsi, elles inhibent l'adhésion des cellules sanguines aux parois des vaisseaux assurant le maintien de la circulation sanguine. Une protéine à la surface des CE, la thrombomoduline, augmente la capacité de la thrombine à activer la protéine C qui sera en mesure de supprimer les facteurs Va et VIIIa par protéolyse (Jaffe, 1987). Les CE relâchent des enzymes, tPA et uPA, dans la circulation sanguine en réponse à divers stimuli (Van

Hinsbergh, 1988). Le tPA agit à la surface de la fibrine polymérisée afin de cliver le plasminogène en plasmine active. Cette dernière initiera la dissolution des caillots sanguins. L'endothélium produit aussi l'inhibiteur des PAs, PAI-1, afin de réguler cette digestion enzymatique. Les propriétés antithrombiques des CE proviennent aussi de la sécrétion de 2 médiateurs de faible masse moléculaire : PGI_2 (prostacycline) et EDRF. Ces 2 molécules sont des inhibiteurs de l'agrégation des plaquettes, mais elles peuvent agir aussi sur le tonus vasculaire (Pearson, 1991).

Les CE offrent habituellement une barrière permettant le passage sélectif de certains constituants du plasma vers les tissus extravasculaires et prévenant l'entrée d'agents nuisibles. Lorsque des lésions surviennent dans la paroi d'un vaisseau, une réponse inflammatoire est induite et les CE augmentent leur prolifération afin de réparer ces lésions. L'adhésion des leucocytes à l'endothélium est une étape importante de l'inflammation. Ce phénomène est régulé par des forces physiques, comme les charges en surface, mais aussi par les récepteurs présents sur la membrane des cellules impliquées. Des cytokines comme Il-1, TNF-α et IFNγ, vont induire l'expression de ces récepteurs à la surface des CE. Ces derniers serviront à lier les cellules de la circulation sanguine impliquées dans le phénomène d'inflammation (monocytes) et à moduler la migration transendothélilale de certaines d'entre-elles vers les tissus (lymphocytes). Les cytokines induiront aussi la synthèse par les CE de diverses substances impliquées dans la réponse immunitaire (Jaffe, 1987). Par ailleurs, les CE contiennent les antigènes du système ABO et le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II (Turner *et al*, 1987). L'expression du CMH peut être induite par diverses cytokines. Les CE peuvent être impliquées dans des phénomènes de réponse immunitaire puisqu'elles peuvent servir de cellules présentatrices d'antigènes et qu'elles sont en mesure de phagocyter sous certaines conditions (Folkman, 1982). On croit que l'activation des CE jouerait un rôle important dans le rejet de xénogreffe.

Les CE contribuent à la régulation du flot sanguin en modulant la contraction des cellules musculaires lisses grâce à la sécrétion de substances vasoactives. Les CE semblent percevoir les variations du flot sanguin à l'aide de mécanorécepteurs (Lansman, 1988). Afin d'induire la relaxation des cellules musculaires lisses, les CE vont synthétiser l'EDRF, le PGI_2 et /ou la NO (Furchgott et Zawadski, 1980 ; Moncada *et al*, 1976). Le NO est un puissant vasodilatateur synthétisé par les CE grâce à une enzyme, la NO synthase. L'apoptose des CE peut être inhibé par la synthèse d'oxyde nitrique (NO) grâce à l'enzyme eNOS (endothelium nitric oxide synthase). Le NO endogène maintien l'expression fonctionnelle de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, un médiateur de l'angiogenèse, la migration et la survies des CE (Murohara *et al*, 1999). Lorsque les CE sont endommagées ou excessivement activées, elles peuvent relâcher des facteurs vasoconstricteurs, ET-1 (Endothelin-1) ou PAF (Platelet-Activating Factor) (Yanagisawa *et al*, 1988 ; Zimmerman *et al*, 1990). Les CE expriment l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE), qui convertit l'angiotensine I en angiotensine II, un autre vasoconstricteur (Jaffe, 1987). ACE inactive aussi la bradykinine, un vasodilatateur qui augmente la perméabilité vasculaire.

Un dérangement du système complexe de régulation qui contrôle la croissance des CE et leur différenciation peut induire la prolifération et la néovascularisation dans différentes conditions pathologiques. Bien que le renouvellement des CE soit habituellement lent, les cellules conservent la capacité de migrer et de proliférer rapidement en réponse à des stimuli angiogéniques (Pearson, 1991). Ainsi, les CE peuvent développer et remodeler le réseau vasculaire. Deux propriétés des CE sont essentielles pour l'organisation en trois dimensions des cellules : elles possèdent une polarité intrinsèque qui leur permet de former une boucle fermée et elles sont en mesure de former des jonctions serrées avec les autres CE permettant ainsi d'allonger la boucle. Par ailleurs, les CE sécrètent les composants de leur membrane

basale incluant la laminine, les collagènes IV et V, l'élastine, la fibronectine, la thrombospondine (Pepper et Montesano, 1990). Les CE activées peuvent aussi sécréter des collagénases capables de digérer certains composants de sa lame basale donnant ainsi la possibilité aux CE de remodeler leur environnement (Folkman, 1982).

D. Le développement du système vasculaire

L'établissement d'un système vasculaire est nécessaire pour l'apport de nutriments, l'évacuation de déchets et les échanges gazeux dans la plupart des tissus. Il n'est donc pas surprenant que le système cardiovasculaire soit le premier système d'organes à se développer et à atteindre un état fonctionnel lors du développement embryonnaire. La croissance de l'embryon et sa différenciation repose sur le transport de nutriments et de déchets mais aussi sur l'influence des forces hémodynamiques des battements du cœur sur certains événements morphogéniques. Deux processus distincts sont responsables du développement des vaisseaux sanguins : la vasculogenèse et l'angiogenèse.

1. La vasculogenèse

La vasculogénèse se définit comme étant le mécanisme de détermination et de différenciation des cellules hémangioblastiques et leur assemblage en un plexus vasculaire primitif (figure 6) (Flamme *et al*, 1997).

On peut détecter les cellules précurseurs des angioblastes et des cellules hématopoïétiques parmi les cellules épiblastiques qui s'invaginent durant le processus de gastrulation pour former le mésoderme. Les cellules mésodermiques adjacentes à l'endoderme vont s'agréger pour former les îlots sanguins ou groupes de cellules mésenchymateuses. Les cellules souches hématopoïétiques destinées à générer des cellules hématopoïétiques sont situées au centre de ces îlots sanguins. Les cellules précurseurs des CE, ou angioblastes, sont localisées à la périphérie des îlots sanguins. Les angioblastes s'aplatissent et se différencient ensuite en CE

(Gonzalez Crussi, 1971 ; Kessel et Fabian, 1985). Par la suite, un lumen et une membrane basale vont se former. Finalement, les différents îlots sanguins vont se fusionner pour former un plexus primaire de capillaires (Hirakow et Hiruma, 1981). Puisque les CE sont associées très étroitement avec les cellules sanguines dans les îlots sanguins, on a présumé que les 2 populations cellulaires dérivaient d'un même précurseur, l'hémangioblaste (His, 1900 ; Sabin, 1920 a et b). Outre cette association spatiale, les cellules souches hématopoïétiques et les angioblastes partagent certains antigènes : *flk-1*, Tie-2, CD34 et PECAM-1 (Risau et Flamme, 1995). Ces caractéristiques viennent appuyer l'existence d'un précurseur commun pour ces 2 types cellulaires.

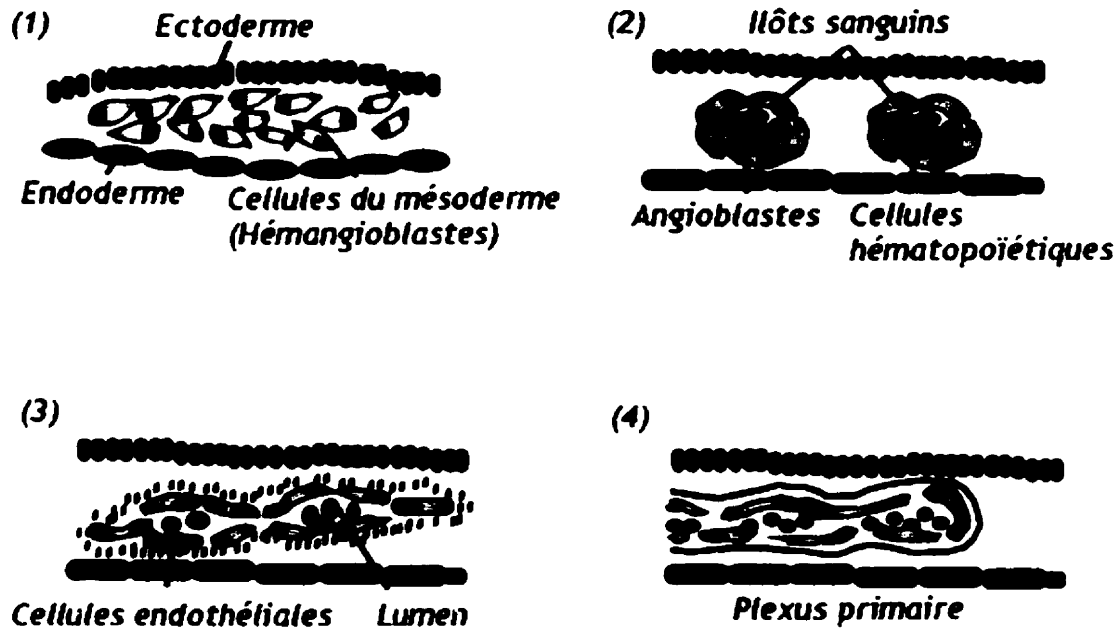

Figure 6. **Le processus de vasculogénèse** (tiré de Risau et Flamme, 1995)

Deux facteurs de croissance seraient responsables de l'initiation de la vasculogenèse. Le premier, le bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), serait le seul en mesure de conduire à la différenciation de cellules précurseurs pluripotentes en hémangioblastes via une voie de signalisation de protéines kinases C (PKC). De plus, il induirait *in vitro* la formation d'îlots sanguins donc initierait la vasculogénèse (Flamme et Risau, 1992). Le deuxième facteur connu, le VEGF, est spécifique pour les CE et est détecté très tôt dans l'embryon murin. Un récepteur de haute affinité pour le VEGF, *flk-1*, est induit 1 heure après exposition au bFGF. *Flk-1* est retrouvé dans les îlots sanguins et sert de marqueur *in vivo* pour les cellules hémangioblastiques.

Des molécules d'adhésion cellulaire sont exprimées rapidement chez les premiers angioblastes : VE-cadhérine, PECAM-1 et CD34 (Risau et Flamme, 1995). VE-cadhérine et PECAM-1 sont probablement impliquées dans l'adhésion homotypique des CE. De plus, elles semblent prendre part à la formation des jonctions inter endothéliales qui sont importantes pour la formation du lumen, la polarité cellulaire et la perméabilité vasculaire. La fonction de CD34 n'est pas connue jusqu'à ce jour.

Une fois établi par la vasculogénèse, le plexus vasculaire s'étend et se propage rapidement par la génération de bourgeons à partir des vaisseaux déjà présents i.e. par angiogenèse (Sabin, 1920 a et b). Il existe un autre mécanisme d'expansion du réseau vasculaire dans certains organes comme les poumons et les muscles squelettiques (Burri et Tarek, 1990 ; Hansen-Smith *et al*, 1996). Lors de ce processus, les vaisseaux sanguins se divisent et deviennent dichotomiques par croissance à partir du tissu avoisinant. Ce mode de croissance vasculaire se nomme croissance *intussusceptive*. On peut retrouver ces 2 phénomènes, l'*intussusception* et le bourgeonnement, dans quelques organes comme le "sac yolk" (Flamme et Risau, 1992).

On pensait que le phénomène de vasculogénèse était réservé à l'embryon, mais des résultats nous laisse supposer que ce dernier peut être présent chez l'adulte. Des angioblastes et même des CE ont été isolés dans la circulation sanguine chez l'adulte (Asahara *et al*, 1997 ; Boyer *et al*, 2000). Ces derniers ont injecté des cellules sanguines humaines (CD34+) ou murines (*flk-1*+) chez la souris et ont observé des CE provenant de ces cellules dans une patte qu'ils avaient rendue ischémique avant l'injection. Cette même équipe a déterminé l'origine et le rôle de ces angioblastes grâce à des expériences de greffe de moelle osseuse (Asahara *et al*, 1999). Ainsi, ils ont pu déterminer que les angioblastes circulaient à partir de la moelle osseuse et prenaient part à la néovascularisation postnatale à la fois physiologique et pathologique, ce qui est en accord avec l'existence de phénomène de vasculogénèse postnatal. De plus, on sait que la colonisation simultanée de la moelle osseuse embryonnaire par des cellules souches hématopoïétiques et endothéliales est possible (Caprioli *et al*, 1998). On peut donc penser que ces cellules colonisatrices seraient bien des hémangioblastes, progéniteurs communs pour ces 2 types de cellules.

2. L'angiogenèse

L'angiogenèse, la formation de vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants, est un processus complexe qui est au centre de plusieurs phénomènes. Durant le développement embryonnaire, l'angiogenèse permet l'expansion du réseau vasculaire établi par la vasculogénèse alors que les CE prolifèrent et migrent dans l'embryon. Chez l'adulte, le phénomène d'angiogenèse est habituellement quiescent, mais il peut être crucial pour plusieurs processus physiologiques incluant l'ovulation, les changements des glandes mammaires associés à la lactation et la formation des os.

Lorsqu'elle devient incontrôlée, l'angiogenèse devient une composante importante de plusieurs processus pathologiques comme l'inflammation chronique, la guérison de plaies, le développement de circulation collatérale, la néoplasie et certaines maladies dites "angiogéniques" caractérisées par une croissance anormale de capillaires (Folkman, 1985). Parmi ces maladies "angiogéniques", on retrouve la rétinopathie diabétique, l'arthrite rhumatoïde, les hémangiomes infantiles et le psoriasis. Afin de se procurer les nutriments et les facteurs de croissance nécessaires qui lui permettront de croître de façon anarchique, une tumeur doit établir un réseau de capillaires (Folkman, 1995). La dépendance de la croissance tumorale sur l'angiogenèse est bien documentée. Cette relation a été démontrée pour plusieurs types de tumeurs comme pour le cancer du sein (Weidner *et al*,1991) et le carcinome de la prostate (Weidner *et al*, 1993).

Notre compréhension de ce phénomène s'est grandement améliorée grâce au développement de modèle *in vivo* et *in vitro* permettant l'étude de ce processus. Diverses cytokines et facteurs de croissance peuvent induire la formation de nouveaux vaisseaux *in vivo* en ayant un effet direct ou indirect sur les CE. L'amélioration de la compréhension des mécanismes entourant ce phénomène a amené le développement de nouvelles thérapies pour le traitement de maladies inflammatoires et néoplasiques de la peau.

a) Le mécanisme

L'angiogenèse comporte plusieurs étapes comprenant des phénomènes cellulaires et moléculaires (Figure 7). Ces phénomènes sont modulés par des combinaisons complexes de signaux qui sont à la fois pro- et anti-angiogéniques. Les cellules qui sont principalement impliquées dans la formation des nouveaux vaisseaux sanguins sont les CE.

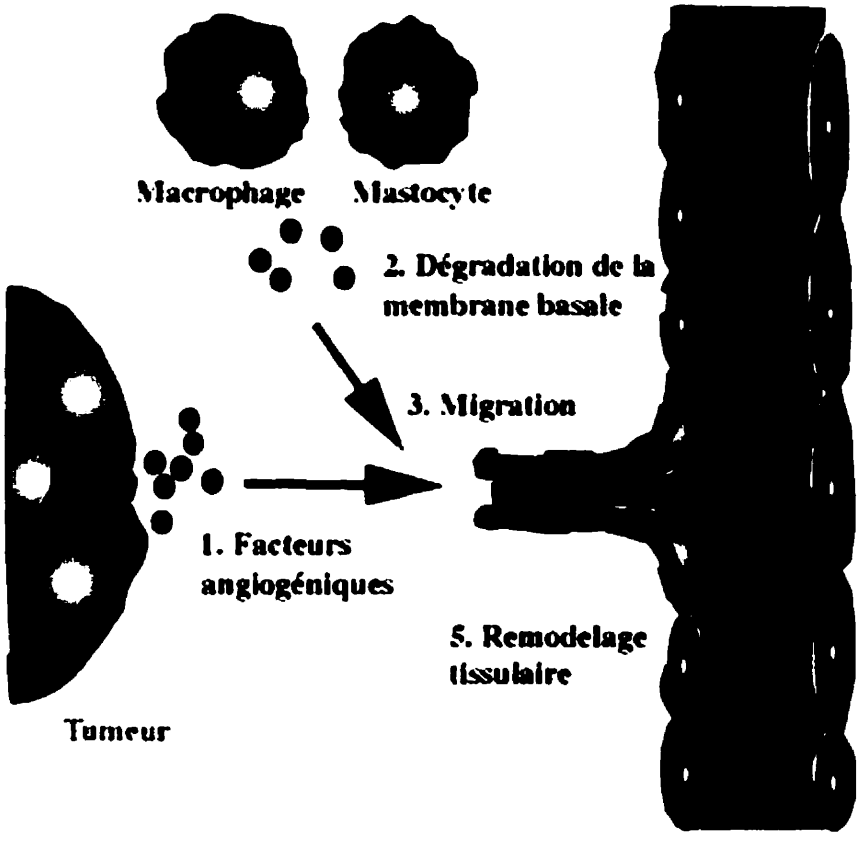

Figure 7. **Les étapes de l'angiogenèse** (tiré de Gingras et Béliveau, 1997)

i) L'activation des cellules endothéliales

Les CE peuvent être activées en réponse à des changements qui surviennent dans le microenvironnement de la cellule. Il existe divers événements, comme le développement de tumeurs ou la guérison des plaies, qui provoquent ces transformations responsables de l'induction de l'angiogenèse. Deux voies distinctes peuvent activer les CE et ainsi induire l'angiogenèse : une voie est modulée par bFGF et TNF-α (Tumor Necrosis Factor-α) et requiert des interactions avec $\alpha_v\beta_3$, l'autre nécessite VEGF-A et $\alpha_v\beta_5$ (Friedlander *et al*, 1995).

La liaison du facteur de croissance implique des récepteurs spécifiques, des molécules accessoires (les syndécanes) et l'héparine, un polymère hautement négatif (Poliverini, 1996). Les syndécanes, de concert avec l'héparane sulfate, augmentent l'affinité des récepteurs pour leurs ligands. Une fois qu'elles ont été stimulées, les CE subissent de nombreuses variations morphologiques. Les premiers changements morphologiques des CE consistent en l'hypertrophie du lumen vasculaire, l'augmentation de la synthèse d'ADN et du volume du noyau, l'augmentation du nombre d'organelles et la formation de projections à leur surface. Les cellules libèrent ensuite diverses enzymes comme les métalloprotéinases, les urokinases, les activateurs du plasminogène (PA) et un de leur inhibiteur (PAI-1). Ces enzymes permettent de mobiliser les facteurs de croissance liés à la matrice et de dégrader la lame basale du vaisseau mère et la MEC qui entoure le vaisseau. Une dégradation complète de la lame basale a lieu du côté du stimulus angiogénique. Cette dégradation protéolytique est une étape essentielle du phénomène d'angiogenèse puisqu'elle permet aux CE de quitter le vaisseau sanguin d'origine et de migrer à travers la MEC. Par ailleurs, il y a interruption des voies angiostatiques, production d'angiostatine et de PF-4 (Platelet Factor-4), et une diminution de l'adhésion entre les CE.

Bien que je parle uniquement des CE, il est à noter que plusieurs autres cellules, comme les macrophages, participent à la production de facteurs de croissance et aux modifications de la MEC qui modulent le phénomène d'angiogenèse. De plus, les péricytes deviennent activés en même temps que les CE et certaines caractéristiques morphologiques des péricytes se modifient (Diaz-Flores *et al*, 1992). Les premiers changements ultrastructuraux incluent la diminution de leurs prolongements et l'augmentation du nombre de polyribosomes cytoplasmiques.

ii) La migration

Lorsque la membrane basale est fragmentée, une population de CE commence à migrer dans l'espace périvasculaire. Les CE migrent à partir du vaisseau d'origine en direction d'un stimulus angiogénique présent dans leur environnement immédiat ou provenant d'une source externe d'agents pouvant induire la migration. Les facteurs responsables de l'induction de la migration endothéliale comprennent une grande variété de cytokines isolées à partir de tumeurs, de plaies et de macrophages.

La migration des CE est modulée par divers événements. Tout d'abord, les cellules répondent à différents facteurs solubles comme bFGF, PDGF (Platelet Derived Growth Factor) et TGF-β (Transforming Growth Factor-beta). On a déterminé que bFGF était associé aux changements phénotypiques des CE en migration (Mignatti *et al*, 1992). De plus, ce facteur de croissance peut stimuler la migration des CE et induire l'expression des PAs et de leur récepteur de haute affinité (PAr). L'inhibition du bFGF à l'aide d'anticorps inhibe la migration et la production des PAs et de PAr. PAI-1, l'inhibiteur des PAs, est aussi exprimé par les CE qui initient la migration. Ceci suggère qu'il doit y avoir une expression régulée des protéases et de leurs inhibiteurs pour obtenir une dégradation contrôlée de la MEC près des cellules au bout des bourgeons ménageant ainsi un passage aux cellules.

Outre les facteurs de croissance, les interactions entre les CE et la MEC sont aussi primordiales dans le contrôle de la migration. La migration des CE est modulée par la composition et l'organisation de la MEC via les interactions d'intégrines comme $\alpha_2\beta_1$ et $\alpha_4\beta_3$ (Madri *et al*, 1988c ; Leavesley, 1993). Certains composants de la MEC amènent des organisations spécifiques d'intégrines à la surface des CE tandis que les facteurs solubles qui modulent la migration altèreraient spécifiquement les motifs d'expression d'intégrines

(Basson *et al*, 1990). Il existe donc une dynamique entre les facteurs solubles, la MEC et les intégrines lors de la migration.

Finalement, les interactions entre les CE sont importantes dans la régulation de la migration. Les CE expriment à leur surface des molécules d'adhésion cellulaire qui interviennent dans la migration et dans les interactions CE-CE. PECAM-1 est une molécule d'adhésion exprimée constitutivement à la surface des CE. PECAM-1 est localisée sur les bordures latérales des cellules. Lorsque les CE sont amenées à migrer, la localisation de PECAM-1 est modifiée : PECAM-1 se retrouve alors sur toute la surface des cellules qui forment le front de migration suggérant un rôle pour cette molécule dans la régulation de la migration. Certaines molécules connues pour inhiber la migration des CE agissent en stabilisant la localisation latérale de PECAM-1 (Schimmenti *et al*, 1992).

iii) La division cellulaire

La prolifération des CE est une autre étape indispensable à l'angiogenèse. Toutefois, les opinions diffèrent au sujet du site et du moment précis du début de la division des CE. Certains auteurs pensent que la division est concomitante au bourgeonnement des capillaires. Par contre, la plupart croient que les cellules migrent puis prolifèrent (Diaz-Flores *et al*, 1994). Plusieurs études ont permis d'élucider la relation temporelle entre les 2 premiers événements associés à l'angiogenèse, la prolifération et la migration. Il a été observé que certaines CE migrent vers un stimulus angiogénique et l'on observe des cellules en mitose dans une portion plus distale du nouveau capillaire (Ausprunk et Folkman, 1977). Grâce à l'utilisation d'hôtes irradiés, Sholley *et al* ont démontré que les étapes initiales de l'angiogenèse pourraient avoir lieu en absence de division cellulaire lors des 4 premiers jours et semblent être médiées par

l'élongation et la migration de l'endothélium (Sholley *et al*, 1984). La zone de réplication des CE dans le bourgeon se situerait près du vaisseau d'origine.

La prolifération des CE durant l'angiogenèse est un processus contrôlée et limitée à une population spécifique dans le bourgeon (Madri et Pratt, 1988). Les CE qui migrent en tête ne semblent pas se diviser, alors que celles à l'arrière entrent en phase S et prolifèrent. La réponse proliférative est médiée par différents stimuli comme les facteurs solubles autocrines et paracrines, la composition et l'organisation de la MEC et finalement, les interactions CE-CE.

La synthèse et le dépôt de la MEC durant l'angiogenèse sont différents tout au long du bourgeon angiogénique. Les modifications de la MEC moduleraient des changements dans l'expression de récepteurs de surface amenant ainsi des variations dans les réponses des cellules envers les facteurs de croissance (Wang *et al*, 1993). Par exemple, des CE cultivées en monocouche prolifèrent suite à une stimulation à PDGF-BB et –AB alors que lorsque les mêmes cellules sont placées dans un environnement 3-D, elles ne répondent plus à ces isoformes (Marx *et al*, 1994). Ceci pourrait expliquer les différences des taux de prolifération de populations de CE locales dans le bourgeon.

iv) La formation des capillaires

La formation de tubes est un processus complexe qui implique des interactions cellule-cellule et cellule-MEC. Les CE doivent se reconnaître et former des interactions stables entre-elles afin de former un réseau de capillaires. Lorsque les CE débutent la formation des tubules, elles expriment à leur surface des molécules d'adhésion cellulaires (PECAM-1) et de substrats spécifiques (intégrines β_1 et β_3) (Albelda et Buck,1990). PECAM-1 jouerait un rôle dans les

premiers contacts cellule-cellule durant la formation des tubules puisque des anticorps contre cette protéine inhibe la formation de structures tubulaires *in vitro* (Madri *et al*, 1992 ; Yang *et al*, 1999). Par ailleurs, des anticorps dirigés contre l'intégrine β_1 et le peptide RGD inhibent les étapes initiales et tardives de la formation des tubules en interférant probablement avec les interactions CE-MEC nécessaire pour la formation des contacts CE-CE initiaux, la stabilisation des contacts CE-CE formés et la formation de jonctions serrées. Il semble que les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et/ou $\alpha_2\beta_1$ doivent être inhibées lors de la formation des structures tubulaires afin de promouvoir la différenciation des tubules en stabilisant les interactions médiées par d'autres molécules d'adhésion. Le dépôt, l'organisation et le maintien de MEC sont aussi des facteurs critiques pour la stabilisation des nouveaux vaisseaux (Ment *et al*, 1992).

La formation du lumen résulte de mécanismes à la fois intra- et inter-cellulaires. Deux processus ont été décrits pour expliquer la formation du lumen dans les vaisseaux en formation : 1) par vacuolisation intracellulaire dans le cytoplasme des CE suivit d'une connexion des vacuoles entre les cellules adjacentes menant ainsi à la formation d'une canalisation intercellulaire (Sabin, 1920 a et b) ; 2) par canalisation intercellulaire des prolongements des CE adjacentes par courbure des CE. La première hypothèse semble la plus probable puisque différentes études *in vivo* et *in vitro* ont montré la présence de vacuoles chez les CE durant la formation de tubules. Les vacuoles formées résulteraient d'un processus de pinocytose régulé par l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ (Davis et Camarillo, 1996). Donc, la formation du lumen aurait lieu par la formation de vacuoles, la coalescence de ces dernières et finalement, par la fusion directionnelle des vacuoles avec la membrane plasmique (figure 8) (Meyer *et al*, 1997).

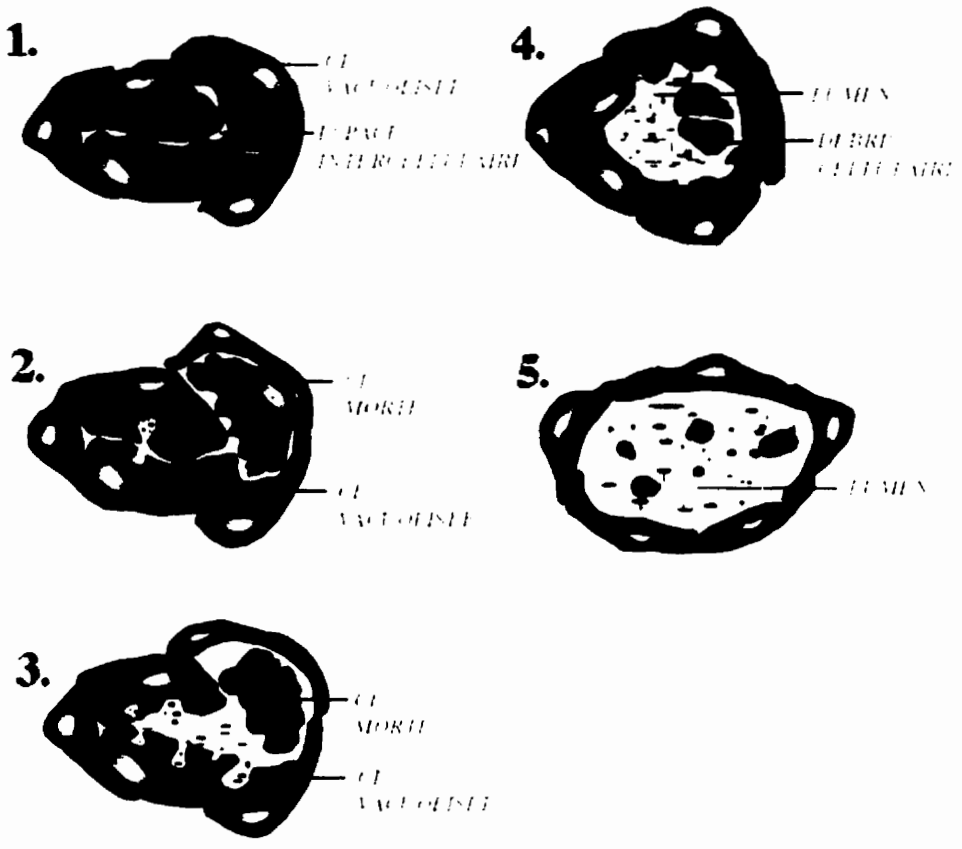

Figure 8. **Représentation schématique de la formation du lumen** (Tiré de Meyer, 1997).

v) La stabilisation des nouveaux vaisseaux

La maturation des nouveaux bourgeons est initiée suite au retrait du stimulus angiogénique et à la diminution du niveau de facteurs de croissance présents dans l'environnement. On observe aussi une augmentation du niveau de molécules angiostatiques : thrombospondine-1 (TSP-1), angiostatin (produit de dégradation du plasminogène) et SPARC (protéine acide sécrétée riche

en cystéine). De plus, il y a inhibition de l'expression d'intégrines α_v et de la production d'activateur du plasminogène réduisant ainsi le clivage protéolytique de la MEC. Les CE produisent de nouveaux composants de la membrane basale : collagène IV et V, tenascine, laminine et héparane sulfate. Les facteurs de croissance libres sont séquestrés à nouveau dans la matrice néosynthétisée. Le contact entre les CE est réaugmenté et il y a recrutement des péricytes. Les CE s'engageront vers un phénotype différencié et l'endothélium retournera à un état quiescent. Finalement, on assistera à l'organisation en vaisseaux à calibre plus important soit par remodelage des nouveaux capillaires et/ou par anastomose de ces capillaires avec des vaisseaux déjà présents (Diaz-Flores *et al*, 1994). Les néovaisseaux vont se différencier en fonction de la spécificité du tissu où ils se sont formés et ils seront modelés en fonction des forces engendrées par la circulation.

Le TGF-β et l'angiopoïétine-1 (Ang-1) seraient les premières molécules impliquées dans la maturation des vaisseaux. Des mutations dans la protéine TGF-β provoquent une dilatation anormale de veinules et la disparition des capillaires. Par ailleurs, des souris déficientes en Ang-1 ou ses récepteurs montrent un remodelage vasculaire anormal et l'absence du recrutement des précurseurs des péricytes et des cellules musculaires lisses (Suri *et al*, 1996 ; Sato *et al*, 1995). Le facteur tissulaire, un activateur de la coagulation, est aussi important dans la stabilisation des vaisseaux puisque des souris n'ayant plus cette protéine présentent des défauts importants dans leur réseau vasculaire comme l'absence de péricytes et la présence de vaisseaux fragiles (Carmeliet, 1996).

vi) Évolution des néovaisseaux

À la fin du processus d'angiogenèse, on peut observer le remodelage ou l'involution du réseau vasculaire. Donc, les dernières étapes de l'angiogenèse sont réversibles afin de pouvoir remodeler le réseau pour être en mesure de limiter l'expansion des vaisseaux ou même de faire disparaître complètement les vaisseaux. Lors de l'involution, on peut observer l'apoptose chez les CE. Cette apoptose peut provoquer la régression du lit néovasculaire tout en maintenant le vaisseau d'origine qui avait donné ce lit transitoire. Un exemple d'involution est la maturation de la matrice germinale durant les semaines 24 à 32 lors du développement humain (Ment *et al*, 1992). Le contrôle de l'apoptose des CE n'est pas encore défini. On pense que l'apoptose serait induite suite à la perte des interactions spécifiques avec la membrane basale adjacente (Meredith *et al*, 1993). L'apoptose des CE impliquée dans ce remodelage réversible est un nouveau sujet d'étude fort prisé (Moreau *et al*, 1997).

b) L'angiogenèse dans la peau

L'angiogenèse est un processus important dans le développement de la peau lors de l'embryogenèse. Au contraire, chez l'adulte, le réseau vasculaire cutané est normalement quiescent sauf pour l'angiogenèse impliquée dans la phase anagène du cycle du poil. La peau humaine conserve le potentiel d'initier rapidement une réponse de néovascularisation suite à un stimuli angiogénique. Ce type d'angiogenèse est présent dans plusieurs maladies de la peau comme le psoriasis et diverses néoplasies, ou lors de phénomènes physiologiques comme la réparation tissulaire.

Plusieurs évidences suggèrent que les stimulus angiogéniques dans la peau proviendraient de l'épiderme et non pas du derme (Malhotra *et al*, 1989). L'épiderme avasculaire possèderait des mécanismes pour augmenter son apport sanguin via le derme afin de répondre à ses besoins métaboliques croissants associés avec certaines pathologies.

Le VEGF semble être la principale molécule angiogénique provenant de l'épiderme humain. Le VEGF secrété par les kératinocytes est mitogène pour les endothéliales du derme. (Detmar *et al*, 1995). En effet, des souris transgéniques surexprimants le VEGF montrent une augmentation de vascularisation cutanée particulièrement près des régions où le transgène est exprimé.

La matrice du derme, principalement la membrane basale, semble fonctionner comme un inhibiteur naturel de l'angiogenèse assurant ainsi la quiescence des vaisseaux de la peau. La TSP-1, une protéine de la matrice produite par les CE microvasculaires, fonctionne en tant qu'inhibiteur physiologique de l'angiogenèse cutanée. La TSP-1 s'accumule dans la membrane basale des vaisseaux quiescents, mais elle est absente des capillaires en formation (Wight *et al*, 1985). D'autres macromolécules de la membrane basale (la laminine ou le collagène de type IV) contribueraient aussi au maintien des CE dans un état quiescent.

c) L'angiogenèse tumorale

Durant sa période avasculaire ou prévasculaire, une tumeur ne peut avoir un diamètre de plus de 2 mm. L'apport sanguin est critique pour une tumeur non seulement pour l'apport de nutriments et d'oxygène ou l'élimination de déchets, mais aussi pour les CE qui sécrètent des facteurs de croissance paracrines essentiels pour les cellules tumorales. De plus, un

approvisionnement vasculaire adéquat permet de freiner l'apoptose et d'autres formes de nécroses, contribuant ainsi à la croissance tumorale. Lorsque le stade vasculaire est atteint, l'expansion rapide de la population tumorale amène la croissance illimitée de la tumeur (Folkman, 1971, 1985 et 1995). Les mécanismes qui contrôlent le passage d'un phénotype non-angiogénique à angiogénique ne sont pas encore bien compris.

Les cellules tumorales peuvent stimuler l'angiogenèse directement en sécrétant des facteurs de croissance spécifiques pour les CE. Par ailleurs, elles peuvent induire indirectement ce phénomène : a) Par recrutement de cellules, comme les macrophages, et l'activation de ces dernières afin qu'elles sécrètent des facteurs de croissance ; b) Par sécrétion d'enzymes qui lysent la MEC et permettent la libération de facteurs de croissance ; c) Par libération d'un facteur qui augmente la perméabilité des CE et permet la fibrinolyse de fuite. Contrairement aux formes physiologiques analogues, l'angiogenèse tumorale ne possède pas de limite de temps, mais continue jusqu'à l'éradication de la tumeur ou la mort de l'hôte.

À mesure que les tumeurs grossissent, les cellules situées au centre de la masse tumorale se retrouvent privées d'oxygène car la distance avec les vaisseaux sanguins augmente. Ainsi, il y a formation de régions hypoxiques à l'intérieur des tumeurs. Les cellules tumorales situées dans ces régions produiront des facteurs de croissance, principalement le VEGF, afin d'activer l'angiogenèse. Il semble que l'angiopoïétine-2 (Ang-2) et le VEGF sécrétés dans les tumeurs reprennent le rôle qu'ils tiennent habituellement durant le remodelage vasculaire des tissus normaux i.e. la régulation de l'équilibre entre la régression et la croissance vasculaire (Holash *et al*, 1999).

Les vaisseaux qui irriguent les tumeurs sont différents des vaisseaux normaux. Leur membrane basale est interrompue ou absente et les CE peuvent même être défaillantes : ceci

entraîne une augmentation de la perméabilité des vaisseaux et l'extravasation d'hématies. L'arbre vasculaire présente des ramifications sinueuses ressemblant aux capillaires retrouvés pendant les premières étapes de l'angiogenèse physiologique. De plus, le taux de prolifération des CE est souvent bien plus élevé. Il semble que ces caractéristiques découlent du microenvironnement dans lequel ces vaisseaux se développent.

L'analyse de la densité des microvaisseaux sur des coupes histologiques de tumeurs et la quantification de peptides angiogéniques dans le sérum et autres fluides corporels sont des données valables pour les pronostiques de plusieurs cancers. La vascularisation d'une tumeur peut aussi prédire la probabilité d'observer des métastases puisqu'il existe une corrélation entre la densité de microvaisseaux d'une tumeur et l'apparition de métastases (Weinder *et al*, 1991). En effet, la lame basale fragmentée et les enzymes sécrétées par les CE rendent ces vaisseaux plus perméables que les vaisseaux matures augmentant ainsi la chance que les cellules tumorales pénètrent dans la circulation.

Folkman a émis l'hypothèse que l'on pourrait inhiber la croissance tumorale en bloquant la formation du réseau de capillaires (Folkman *et al*, 1971 ; Folkman, 1971 ; 1972 ; 1985). La recherche d'agents anti-angiogéniques efficaces en mesure d'interférer avec une ou des étapes requises pour la formation de vaisseaux sanguins a depuis ce temps connu un essor considérable. De nombreuses molécules angiostatiques sont maintenant testées cliniquement. Bien que les essais cliniques des inhibiteurs de l'angiogenèse ne comportent qu'une seule molécule à la fois, il serait plus efficace de les utiliser avec les thérapies conventionnelles (Folkman et D'Amore, 1996).

3. Les facteurs de régulation de l'angiogenèse

Le phénomène d'angiogenèse est modulé grâce à une balance entre des molécules simulatrices et inhibitrices. Bien que la plupart de ces molécules soient des facteurs de croissance, plusieurs substances normalement présentes dans la MEC, comme l'hyaluronane, divers collagènes et des produits de dégradation de la fibrine, peuvent aussi influencer la réponse angiogénique. Les molécules qui modulent la néovascularisation agissent de différentes manières : (1) Augmentation de l'expression de facteurs de croissance et de cytokines ; (2) Synthèse d'enzymes qui relâchent les facteurs liés à la MEC ; (3) Stimulation des CE microvasculaires et des cellules adjacentes afin qu'elles expriment des enzymes dégradant la membrane basale et la MEC ; (4) Interruption de la synthèse et de l'expression locale d'inhibiteurs de l'angiogenèse (phases précoces) puis restimulation de leur synthèse (phases tardives).

La recherche sur l'angiogenèse moléculaire effectuée depuis quelques années a permis d'ouvrir de nouvelles perspectives de thérapies. Les molécules angiostatiques sont attrayantes pour le traitement de tumeurs et de maladies caractérisées par une croissance incontrôlée de vaisseaux sanguins. L'angiogenèse thérapeutique est intéressante pour les maladies nécessitant le développement de vaisseaux collatéraux comme l'ischémie ou dans les cas où la croissance vasculaire est insuffisante. Les thérapies à la fois angiogéniques et angiostatiques font actuellement l'objet de recherche tant au niveau du développement de molécules qu'au niveau clinique. Je me contenterai de décrire certains modulateurs de l'angiogenèse étant donné que la liste de ces derniers est très longue (Tableau 3 et 4).

a) Les facteurs de croissance angiogéniques

On peut classer les facteurs angiogéniques en 2 catégories selon leur mode d'action : 1) Action directe : stimuler la prolifération et la motilité des CE en se liant à leur récepteur (FGF et VEGF) ; 2) Action indirecte : induire certaines cellules à sécréter des facteurs de croissance agissant directement sur les CE (PDGF, TGF-β, TNF-α) (Folkman et Klagsburn, 1987). L'action des facteurs de croissance peut être très complexe. Un facteur de croissance peut induire des activités simulatrices ou inhibitrices sur une même cellule s'il est en présence ou non d'un autre peptide. Par exemple, en présence de PDGF, TGF-β stimule la prolifération de fibroblastes, mais inhibe la croissance de ces derniers en présence d'EGF. De plus, un facteur peut altérer l'affinité de liaison d'un récepteur pour un autre facteur de croissance. C'est ainsi que PDGF diminue l'affinité du récepteur du FGF pour le FGF (Sporn et Roberts, 1988). Une étude récente a montré que les molécules angiogéniques modulent différemment les étapes de l'angiogenèse et que chacune d'entre-elles serait nécessaire mais insuffisante en elle-même pour établir un réseau vasculaire viable (Kumar *et al*, 1998) (Tableau 3).

Molécules angiogéniques	
acidic Fibroblast Growth Factor, (aFGF)	(Folkman et Klasburn, 1987)
Angiogénine	(Strydom, 1998)
Angiopoïétine	(Suri *et al*, 1996)
basic Fibroblast Growth Factor, (bFGF)	(Folkman et Klasburn, 1987)
Endothelial cell Stimulating Angiogenesis Factor, (ESAF)	(Weiss et McLaughlin, 1998)
Granulocyte-stimulating factor, (GCSF)	(Sunderkotter *et al*, 1991)
Haptoglobine	(Dobryszycka *et al*, 1997)
Haptoglobine	(Cid *et al*, 1993)
Hyaluronan oligosaccharides	(Montesano *et al*, 1996)
Insulin-like Growth Factor, (IGF-1)	(Arthur *et al*, 1998)
Interleukine-15, (Il-15)	(Angiolillo *et al*, 1997)
Interleukine-4, (Il-4)	(Fukushi *et al*, 1998)
Interleukine-6, (Il-6)	(Sunderkotter *et al*, 1991)
Interleukine-8, Il-8)	(Yoshida *et al*, 1997)
Midkine	(Choudhuri *et al*, 1997)
Okadaic acid	(Suganumu *et al*, 1988)
Phorbol ester	(Montesano et Orci, 1985)
Placenta Growth Factor, (PlGF)	(Barillari *et al*, 1998)
Pléiotrophine	(Choudhuri *et al*, 1997)
Scatter factor/hepathocyte growth factor, (SF/HGF)	(Van Belle *et al*, 1998)
Thymidine phosphorylase (PD-ECGF) et ses produits de dégradation	(Moghaddam *et al*, 1995)
Thymosine α 1	(Malinda *et al*, 1998)
Transforming Growth Factor α, (TGFα)	(Schreiber *et al*, 1986)
Transforming Growth Factor β1, (TGFβ1)	(Roberts *et al*, 1986)
Tumor Necrosis Factor α, (TNFα)	(Seghezzi *et al*, 1998)
Epidermal growth factor	(Norrby, 1997)
Interleukin-1 (Il-1)	(Norrby, 1997)
Proliferin	(Norrby, 1997)
Prostaglandines (PGE_1 et PGE_2)	(Benazra, 1978)
Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor, (VEGF/VPF)	(Nicosia *et al*, 1997)

Tableau 3 : Les molécules angiogéniques rapportées dans la littérature. Ces molécules agissent directement ou indirectement sur les cellules endothéliales afin de moduler les différentes étapes du processus de l'angiogenèse. Reproduit d'après Black *et al*., 1999 et avec la permission de Cell Biology and Toxicology.

i) Le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)

Le VEGF a été caractérisé comme étant un mitogène hautement spécifique pour les CE (Gospodarowicz *et al*, 1989 ; Ferrara et Henzel, 1989). Ce facteur de croissance est une protéine dimérique possédant une masse moléculaire de 45 kDa et comprenant une seule séquence N-terminale. Le VEGF peut se lier à l'héparine et dispose d'un signal peptidique qui lui permet d'agir comme médiateur paracrine. Il est produit par de nombreuses cellules incluant les kératinocytes, les macrophages et les cellules musculaires lisses. De plus, le VEGF est exprimé par plusieurs tumeurs où il peut avoir un effet sur la néovascularisation tumorale et sur la dissémination des métastases. Cette protéine est hautement conservée à travers les espèces et possède une homologie de séquences significative avec les chaînes A et B du PDGF (Leung *et al*, 1989).

On connaît jusqu'à ce jour 5 isoformes du VEGF-A produit par épissage alternatif de l'ARNm d'un seul gène: 121, 145, 165, 189 ou 206. Ces isoformes se distinguent par leur poids moléculaire et par différentes caractéristiques. Les trois formes sécrétées de VEGF, VEGF $_{121}$, VEGF $_{145}$ et VEGF $_{165}$, induisent la prolifération des CE et l'angiogenèse *in vivo*. Les deux autres formes possèdent une séquence de 24 acides aminés qui leur permet d'être liées à la membrane cellulaire et aux protéoglycanes de la MEC. Afin d'être en mesure d'utiliser le $VEGF_{189}$ et le $VEGF_{206}$, des protéases devront cliver et relarguer un fragment soluble de 110 acides aminés (VEGF $_{110}$) qui sera actif (Plouet *et al*, 1997). Les 5 isoformes possèdent les mêmes activités biologiques, mais diffèrent par leur localisation tissulaire. La plupart des cellules produisent plusieurs forment de VEGF à la fois. Le $VEGF_{165}$ et $VEGF_{121}$ sont les formes les plus abondantes. On a découvert des homologues de VEGF-A : VEGF-B (Olofsson *et al*, 1996), VEGF-C (Joukov *et al*, 1996) et VEGF-D (Yamada *et al*, 1997).

L'ARNm du VEGF est présent dans tous les tissus vascularisés et l'on observe une augmentation de son expression durant la prolifération des capillaires. L'expression du VEGF est régulée par une multitude de molécules qui stimulent indirectement l'angiogenèse via le contrôle de l'expression du VEGF (PDGF, TGF-α, TNFα, HGF/SF et IGF-I). On observe une augmentation de l'expression du VEGF dans le psoriasis et la guérison de plaies, 2 conditions dans lesquelles le TGF-α et son ligand, le récepteur du facteur de croissance épidermique, sont surexprimés. Le TGF-α induit l'expression de VEGF par les kératinocytes et semble jouer un rôle dans l'augmentation de la perméabilité. Le facteur de croissance pléiotrophique HGF/SF (Hepatocyte Growth Factor/ Scatter Factor) augmente l'expression du VEGF et de PAI-1 par les kératinocytes et initie par le fait même l'angiogenèse. De plus, le HGF/SF augmente l'expression d'un récepteur du VEGF, *flk-1*, sur les CE humaines (Wojta *et al*, 1999). Par ailleurs, on a découvert que l'insuline stimulait la croissance et la formation de tubules de CE par induction autocrine du VEGF et ce, en augmentant le niveau d'ARNm codant pour les formes sécrétées du VEGF (Yamagishi *et al*, 1999). L'hypoxie et l'hypoglycémie sont aussi des inducteurs importants du VEGF. L'hypoxie induirait la transcription de l'ARNm du VEGF par la liaison du HIF-1 (Hypoxia-Inductible Factor) sur un site de liaison situé sur le promoteur du VEGF (Levy *et al*, 1995). De plus, l'hypoxie stabiliserait l'ARNm du VEGF. Diverses études ont montré que la production de VEGF induite par l'hypoxie serait un stimulateur majeur de l'angiogenèse lors du développement.

Les différentes formes de VEGF se fixent principalement à 2 récepteurs transmembranaires tyrosine kinase, VEGFR-1 (*flt-1*) et VEGFR-2 (*KDR/flk-1*) (Devries *et al*, 1992 ; Terman *et al*, 1992). Ils sont exprimés principalement sur les CE et possèdent un poids moléculaire de 190 et 160 kDa respectivement (Viac *et al*, 1997). Les VEGFR-1 et –2 sont probablement activés par toutes les isoformes de VEGF, mais le domaine de liaison n'est pas le même dans les 2 cas. La transduction du signal induite lorsque le VEGF se lie sur ces récepteurs diffère également :

l'activation de VEGFR-2 induit la prolifération et la migration des CE tandis que l'activation de VEGFR-1 ne provoque que la migration. De plus, l'activation de ces récepteurs induit la sécrétion de protéinases et l'expression d'intégrines spécifiques requises pour l'angiogenèse. On a identifié un troisième récepteur tyrosine kinase, le VEGFR-3 (*flt4*), exprimé sur les vaisseaux lymphatiques (Jussila *et al*, 1998). Ces 3 récepteurs forment une sous-famille caractérisée par la présence de 7 domaines de type immunoglobuline dans leur portion extracellulaire et de domaines tyrosine kinase dans leur portion intracellulaire. On a découvert que les CE expriment 2 autres récepteurs qui ne sont pas de même nature que les précédents : neutrophiline-1 et –2 (Soker *et al*, 1998). Le $VEGF_{165}$ est la seule forme qui peut se lier à ces corécepteurs. Cependant, la liaison aux neutrophilines ne semble pas induire de réponses biologiques. La présence de récepteurs tyrosine kinase serait requise. La liaison du VEGF sur ses récepteurs provoque une entrée rapide de Ca^{2+} à l'intérieur des CE. Cette entrée de Ca^{2+} stimule l'expression et la libération du facteur von Willebrand, l'activation de la phospholipase C et la formation de seconds messagers par hydrolyse d'inositols.

Le VEGF est un modulateur principal des phénomènes d'angiogenèse et de vasculogenèse. Il agit directement ou non sur toutes les étapes du phénomène d'angiogenèse. Le VEGF provoque la prolifération, l'expression de protéinases et la migration des CE permettant ainsi l'induction de l'angiogenèse. Lors de la vasculogenèse, le développement du système cardiovasculaire dépend de l'expression du VEGF mais aussi de ses récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2. L'absence de ces gènes lors du développement embryonnaire provoque des anomalies chez les vaisseaux sanguins pouvant être létales (Shalaby *et al*, 1995). On a récemment découvert que le VEGF possédait un rôle dans la néovascularisation postnatale grâce à son action sur la mobilisation de précurseurs de CE provenant de la moelle osseuse. En effet, une augmentation de ces précurseurs en circulation est observée suite à l'administration de VEGF *in vivo* (Asahara *et al*, 1999).

Outre le fait qu'il induit l'angiogenèse, le VEGF est aussi en mesure de perméabiliser les vaisseaux sanguins. De plus, l'expression constitutive du VEGF contribue au maintien de l'intégrité vasculaire et de la différenciation des vaisseaux. C'est en stimulant l'expression ou l'activité de la NO synthase endothéliale que le VEGF protège la paroi vasculaire (Hood *et al*, 1998). Par ailleurs, le VEGF agit comme facteur de survie pour les CE. On croit que l'activité angiogénique attribuée au VEGF serait due en partie à sa capacité à augmenter la survie des CE et ce, par induction de l'expression du gène Bcl-2 reconnu pour sa fonction de suppression de l'apoptose (Nör *et al*, 1999).

Le VEGF n'agit pas exclusivement sur les CE. En effet, il a un effet chimiotactique sur les monocytes et il induit la différenciation des ostéoblastes, des cellules musculaires et adipeuses. De plus, on a découvert que le VEGF possède une activité neutrophique, qu'il stimule la croissance des axones et la prolifération des cellules de Schwann (Sondell *et al*, 1999). On a aussi montré que ce facteur de croissance jouait un rôle critique dans la néphrogenèse et ce, en stimulant la différenciation des CE, la formation de capillaires et la tubulogenèse par les cellules de l'épithélium (Tufro *et al*, 1999).

L'angiogenèse induite par le VEGF est impliquée dans le développement de différentes maladies caractérisées par un phénomène d'angiogenèse anormal notamment la croissance tumorale. En effet, une augmentation du niveau de VEGF est observée dans plusieurs cancers. Le VEGF sera produit par les cellules tumorales si ces dernières sont en situation d'hypoxie, si elles sont stimulées par des facteurs de croissance ou s'il y a inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs comme p53 (Kieser, 1994). Il est donc possible d'inhiber le développement de plusieurs types de tumeurs en inhibant la signalisation du VEGF à l'aide

d'anticorps neutralisants ou par l'introduction de récepteurs dominants négatifs du VEGF à l'intérieur des CE associées aux tumeurs.

Les propriétés angiogéniques du VEGF sont exploitées *in vivo* pour le traitement de différentes maladies dont l'apport sanguin est insuffisant. Il est possible d'induire la croissance de vaisseaux collatéraux pour des maladies cardiaques ischémiques grâce au VEGF libéré directement sous forme de protéine ou par une approche de thérapie génique. Dans une telle approche, le VEGF est transféré dans des plasmides contenant l'ADNc de la protéine ou dans un virus recombinant (Walder *et al*, 1996). Des expériences de thérapies géniques ont donné des résultats encourageants chez des patients atteints d'ischémie au niveau des membres inférieurs.

ii) Les FGFs (Fibroblast Growth Factors)

Jusqu'à présent, la famille des FGFs compte 16 membres : FGF-1 à FGF-16 (Miyake *et al*, 1998). Bien que ces facteurs de croissance aient été nommés pour leurs effets sur les fibroblastes, ils sont en mesure d'agir sur différentes cellules (Folkman et Klagsburn, 1987). Ils se distinguent des autres facteurs par l'absence de séquence signal leur permettant d'emprunter la voie normale de sécrétion. Les FGFs pourraient être exportés par un mécanisme de sécrétion inhabituel ou par diffusion suite à la mort des cellules. Quatre membres de cette famille possèdent un effet mitogène sur les CE : FGF-1 (acidique ou aFGF), FGF-2 (basic ou bFGF), FGF-4 et FGF-5. Le aFGF et le bFGF sont les facteurs les mieux caractérisés. Ce sont des monomères pouvant se lier à l'héparine et possédant une masse moléculaire de 16,4 et 18 kDa respectivement. Le aFGF est retrouvé principalement dans les tissus normaux et musculaires lisses tandis que le bFGF possède une distribution étendue : le

cerveau, la rétine, le *corpus luteum*, les reins, le placenta, les macrophages et la prostate. Ces facteurs de croissance se lient habituellement à l'héparane sulfate dans la MEC. Cette réserve de facteurs de croissance peut être mobilisée rapidement lors d'un processus angiogénique grâce à la production d'enzymes par les CE. La liaison du bFGF et du aFGF aux héparanes sulfates augmente leurs activités paracrine et autocrine, fournie une protection contre la protéolyse et améliore la présentation à leurs récepteurs.

Les FGF a et b se lient à des récepteurs transmembranaires tyrosine kinase qui possèdent une faible affinité et à des sites de haute affinité (Partanen *et al* ,1992). Ces derniers, au nombre de 4 (FGFR-1, 2, 3 et 4), font parties de la super famille des immunoglobulines. Ces récepteurs tyrosine kinase ont été isolés sur les cardiomyocytes, les CE et musculaires lisses (Hughes et Hall, 1993). Le FGFR-1 et 2 fixent aFGF et bFGF avec la même affinité. FGFR-1 s'exprime de façon diffuse dans le mésenchyme alors que FGFR-2 se retrouve dans les épithélium des embryons de souris (Peters, 1992). Le FGFR-1 est le plus ubiquitaire et la perte de ce récepteur est létale pour les souris transgéniques (Yamaguchi *et al*, 1994).

Les FGF a et b stimulent l'angiogenèse *in vivo* et *in vitro* en induisant la prolifération des CE et la formation des capillaires. De plus, ils induisent l'expression de protéinases par les CE facilitant ainsi la pénétration de la membrane basale et la migration de ces dernières (Gospodarowicz *et al*, 1987). Le bFGF est aussi produit par les CE afin de recruter les péricytes (Hirshi et D'Amore, 1996). Par ailleurs, le bFGF participerait au processus de différenciation des cellules mésenchymateuses de l'embryon en hémangioblastes (Risau et Flamme, 1995). En effet, le bFGF serait un inducteur essentiel dans l'apparition des cellules *flk-1*+. Il semble que l'aFGF agisse plus spécifiquement au niveau du cœur et stimulerait la prolifération et la formation de capillaires lors du développement (Engleman *et al*, 1992).

Le bFGF est produit par plusieurs types de tumeurs, incluant des tumeurs cérébrales, cutanées et des fibrosarcomes. Le bFGF semble jouer un rôle essentiel pour l'angiogenèse de ces tumeurs (Bikfalvi, 1999). En plus de sécréter ce facteur, les cellules tumorales possèdent un niveau élevé d'héparanase, une enzyme qui digère l'héparane sulfate et qui permet de libérer le bFGF lié à la membrane basale. Il est possible d'inhiber le développement de tumeurs *in vivo* en administrant des anticorps neutralisant le bFGF (Matsuzaki *et al*, 1989). On a observé des homologies dans la séquence du bFGF et de certains oncogènes. Des fibroblastes transfectés avec le bFGF ont subi une transformation néoplasique ce qui laisse supposer un double rôle pour ce facteur dans le développement de tumeurs : agent transformant puis facteur angiogénique (Rogelj, 1988).

L'utilisation des FGFs dans différentes maladies a montré des résultats bénéfiques. Par exemple, dans des cas d'ischémie post-myocardiale, on a noté une augmentation du développement de la circulation collatérale après avoir effectué l'occlusion de l'artère coronaire (Unger *et al*, 1994). De plus, le FGFa permet d'accélérer la guérison d'ulcères gastriques induits chez le rats grâce à l'augmentation de la croissance de vaisseaux sanguins (Fitzpatrick *et al*, 1992).

iii) Les angiopoïétines

Cette nouvelle classe de facteurs de croissance comprend 2 protéines, l'angiopoïétine-1 (Ang-1) et l'angiopoïétine-2 (Ang-2), composées de 498 et 296 acides aminées respectivement. Ce sont les seuls facteurs de croissance, avec les membres de la famille du VEGF, qui sont essentiellement spécifiques pour les CE. L'Ang-1 et -2 coordonneraient, de concert avec le VEGF, le remodelage vasculaire en se liant à leurs récepteurs, Tie-1 et Tie-2.

Tie-1 et Tie-2 sont des récepteurs tyrosine kinase exprimés sur les CE et leurs précurseurs. Des études d'inactivation de gènes ont montré que ces récepteurs n'étaient pas essentiels pour le début de la vasculogenèse, mais qu'ils étaient requis pour la formation d'une couche intacte de CE. Les angiopoïétines et leurs récepteurs semblent impliqués dans les stades plus tardifs du développement du système vasculaire i.e. lors de la segmentation du réseau de capillaires en vaisseaux de différents calibres (Suri *et al*, 1996) et du recrutement des cellules mésenchymateuses. Tie-1 et -2 sont aussi requis pour le maintien de l'intégrité du système vasculaire mature et pour la survie des CE (Hayes *et al*, 1999).

L'Ang-1 induit la phosphorylation de Tie-2 en se fixant à la surface des CE. Cette liaison n'induit ni la prolifération, ni la formation de structures tubulaires par les CE. Des embryons déficients en Ang-1 présentent un défaut d'étalement et d'apposition des CE sur la MEC sous-jacente et une défaillance en cellules péri-endothéliales dans les régions de bourgeonnement. Le couple Ang-1/ Tie-2 semble stabiliser les interactions des CE avec la MEC et les péricytes lors de la mise en place des vaisseaux sanguins.

L'Ang-2 est aussi un ligand pour Tie-2, mais elle ne l'est pas pour Tie-1 contrairement à l'Ang-1. L'Ang-2 bloque la phosphorylation de Tie-2 induite par l'Ang-1. L'Ang-2 agirait en tant qu'antagoniste de l'Ang-1 et pourrait contrôler l'activité de cette dernière à certains stades de la formation des vaisseaux. Les transcrits de l'Ang-2 s'expriment uniquement dans les tissus où une angiogenèse importante a lieu alors que les transcrits d'Ang-1 se retrouvent dans plusieurs tissus. L'Ang-2 agirait avec le VEGF pour induire l'angiogenèse en empêchant que l'Ang-1 maintienne l'intégrité et la quiescence de l'endothélium. En absence de VEGF, l'inhibition de l'Ang-1 par l'Ang-2 provoquerait le détachement des CE de la MEC et des péricytes, leur mort et la régression des vaisseaux sanguins. En présence de VEGF, l'Ang-2

provoquerait le relâchement des interactions entre les CE, la MEC et les péricytes, rendant ainsi les CE sensibles à l'action du VEGF. Tout comme le PDGF, l'Ang-1 contribuerait au recrutement des cellules mésenchymateuses vers le capillaire. Le TGF-β1, activé lors de contacts entre les CE et les cellules mésenchymateuses, induit la différenciation de ces dernières en péricytes. Le TGF-β1 inhibe aussi la prolifération vasculaire et stimule la production de MEC. L'Ang-1 contribuerait ensuite à la stabilisation des interactions entre les différentes cellules et la MEC (Hanahan, 1997). Une surexpression de l'Ang-1 produit des vaisseaux plus gros, plus nombreux et présentant plus d'embranchements. Ce facteur pourrait donc être utilisé pour promouvoir l'angiogenèse thérapeutique (Suri *et al*, 1998).

iv) Le PDGF (Platelet Derived Growth Factor)

Les PDGF A et B sont des sous-unités homologues de 17 et 14kDa qui se dimérisent sous forme d'homodimères et d'hétérodimères. La famille du PDGF comprend donc 3 isoformes (PDGF-AA, BB et AB). Le PDGF est synthétisé par les plaquettes, les CE et les cellules musculaires lisses. Son expression est stimulée par le TGF-β1 chez plusieurs types cellulaires.

Les récepteurs du PDGF, a et b, doivent se dimériser pour êtres fonctionnels et ce, de façon homologue ou hétérologue. Il existe des motifs de liaison pour les différentes formes de PDGF sur leurs récepteurs : le PDGF-AA lie uniquement le récepteur aa, le PDGF-AB les récepteurs aa et ab tandis que le PDGF-BB peut se lier à toutes les formes de récepteurs. Ces récepteurs sont présents sur les fibroblastes, les cellules musculaires lisses et les cellules gliales.

Le PDGF détient plusieurs activités biologiques. Il est mitogène pour certaines cellules d'origine mésenchymateuse comme les fibroblastes et les cellules musculaires lisses. Puisque

ce facteur est emmagasiné dans des granules alpha des plaquettes sanguines, il peut être libéré directement dans les sites de guérison durant le processus de coagulation. Ainsi, il pourra induire l'angiogenèse en activant les macrophages afin qu'ils synthétisent du bFGF ou du TGF-β1. Ces facteurs pourront ensuite amener les CE à se répliquer (Pierce, 1990). Le PDGF augmente aussi la production de bFGF et de VEGF par les cellules musculaires lisses. Le PDGF sécrété par les CE participe à la différenciation des précurseurs des CE et au recrutement des péricytes durant le processus de maturation du réseau vasculaire (Hirshi et D'Amore, 1996). En effet, des souris déficientes en PDGF présentent des anomalies dans leur réseau vasculaire notamment l'absence de cellules entourant les structures tubulaires endothéliales.

v) L'angiogénine

Cette protéine de 14 kDa a été identifiée pour la première fois dans les cellules HT29 d'un adénocarcinome (Fett *et al*, 1985). On la retrouve également dans plusieurs tissus normaux. L'angiogénine se lie spécifiquement aux CE pour être ensuite endocytée. Par la suite, une translocation nucléaire est observée. Ce phénomène est observé aussi avec les FGFs et l'EGF ce qui suggère une voie commune pour ces facteurs dans l'angiogenèse. Le mécanisme d'action principale de l'angiogénine semble être sa capacité à induire la polymérisation de l'actine. Un tel événement peut induire des changements dans la forme de la cellule et son détachement, 2 événements qui précèdent habituellement la prolifération et la migration. On a observé une telle réorganisation de l'actine durant la formation de l'endothélium cornéen (Klagsbrun et D'Amore, 1991). Puisque l'angiogénine ne peut agir ni sur la prolifération, ni sur la migration des CE *in vitro*, on croit que son action sur l'angiogenèse *in vivo* se ferait plutôt indirectement.

vi) Le TGF-β (Transforming Growth Factor β)

Le TGF-β est un homodimère de 25 kDa qui existe en 5 isoformes : TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β1.2 et TGF-β1.3. Puisqu'il est impliqué dans plusieurs processus cellulaires, le TGF-β1 est la forme la mieux caractérisée. Ce dernier est exprimé dans les reins, le placenta, les plaquettes sanguines et certaines tumeurs. Le TGF-β1 est sécrété sous forme latente par les cellules et nécessite une activation par la plasmine. Ce facteur provoque l'angiogenèse *in vivo* et induit la formation de tubules par les CE cultivées dans un gel de collagène (Roberts *et al*, 1986 ; Madri *et al*, 1988). Cependant, la prolifération et la migration des CE sont inhibées par le TGF-β1 dans d'autres systèmes (Heinmark *et al*, 1986 ; Frater-Schroder *et al*, 1986). Étant donné que le TGF-β1 est chimiotactique pour les macrophages, on pense que la néovascularisation qu'il induit découlerait des facteurs de croissance synthétisés par ces cellules. Outre son action sur l'angiogenèse via les macrophages, le TGF-β1 induit l'expression du PDGF par les CE, du VEGF et du bFGF par les cellules musculaires lisses. Par ailleurs, leTGF-β1 montre des effets chimiotactiques sur les monocytes, fibroblastes et cellules musculaires lisses. Ce facteur soluble peut se lier sur 3 récepteurs : type I, type II et type III (bétaglycan). Les types I et II sont des sérine/thréonine kinases. Le récepteur de type I modulerait la synthèse de MEC chez les CE microvasculaires tandis que le type II contrôlerait la réponse inhibitrice de prolifération par le TGF-β1 chez ces cellules. On pense que le TGF-β1 se lierait au récepteur de type III pour être ensuite présenté aux 2 autres formes de récepteurs (Iwasaki *et al*, 1995).

vii) Le CTGF (Connective Tissue Growth Factor)

Le CTGF est une nouvelle protéine riche en cystéines possédant un potentiel angiogénique *in vivo* et *in vitro*. Le CTGF agit sur différentes étapes du phénomène d'angiogenèse : elle induit l'adhésion, la prolifération et la migration des CE. De plus, ce nouveau facteur angiogénique permet d'induire la formation de tubules composés de CE (Shimo *et al*, 1999).

b) Les molécules angiostatiques

Nos connaissances toujours plus approfondies du phénomène d'angiogenèse ont amené le développement de multiples approches visant à inhiber ce processus pour le traitement de différentes pathologies où l'angiogenèse est incontrôlée (Tableau 4). Les inhibiteurs de l'angiogenèse ciblent une variété de processus comme la prolifération, la migration, la production de la matrice ou la reconnaissance CE-CE. Certaines de ces molécules agissent à plusieurs niveaux.

Molécules angiostatiques			
1,25-dihydroxyvitamin D3 associé à des rétinoides	(Majewski *et al*, 1996)	**Interleukin-2, (Il-2)**	(Sakkoula *et al*, 1997)
5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid (DMXAA)	(Ching *et al*, 1998)	**Irsogladine**	(Ono *et al*, 1996)
AGM-1470 (TNP-470)	(Ingber *et al*, 1990)	**L-azetidine-2-carboxylic acide (LACA)**	(Ingber et Folkman, 1988)
a-guaiaconic acid (dérivés synthétiques)	(Ito *et al*, 1993)	**Linomide**	(Kallard, 1986)
Angiostatin	(Cao *et al*, 1998)	**Marimastat, (BB-2516)**	(Wojtowicz-Praga *et al*, 1997)
Anticorps anti-integrin αvβ3	(Brooks *et al*, 1994)	**Medroxyprogestérone**	(Okada *et al*, 1996)
Batimastat (BB-94)	(Wojtowicz-Praga *et al*, 1997)	**Néomycine**	(Hu *et al*, 1998)
Bryostatins	(Wojtowicz-Praga *et al*, 1997)	**PD173074**	(Mohammadi *et al*, 1998)
Captopril	(Volpert *et al*, 1996)	**Pentosan polysulfate**	(Herbert *et al*, 1988)
Carboxy-amidotriazole	(Kohn *et al*, 1995)	**Platelet factor 4, (PF4)**	(Tanaka *et al*, 1997)
CM101	(Wamil *et al*, 1997)	**Prolactine 16 kD**	(Clapp *et al*,1993)
Endostatine	(O'Reilly *et al*, 1997)	**Protamine**	(Cockerill *et al* 1995)
Genestein (herbimycin A)	(Cockerill *et al*, 1995)	**SB220025**	(Jackson *et al*, 1998)
Héparane sulfate suleparoide	(Benelli *et al*, 1998)	**Somatostatine (analogues)**	(Woltering *et al*, 1997)
Héparinase I et III	(Sasisekharan *et al*, 1994)	**Suramine (analogues hétérocycliques)**	(Manetti *et al*, 1998)
Hyaluronane	(Deed *et al*, 1997)	**Tecogalan sodium (DS-4152)**	(Sakamoto *et al*, 1995)
Hydrocortisone	(Folkman *et al*, 1989a,b)	**Thalidomide**	(Kruse *et al*, 1998)
Interféron α et g, (IFN α et g)	(Dinney *et al*, 1998)	**Thrombospondin-1**	(Good *et al*, 1990)
Interleukin-12, (Il-12)	(Voest *et al*, 1995, Coughlin *et al*, 1998)	**VEGI (Vascular endothelial growth inhibitor)**	(Zhai, 1999)
Interleukin-18, (Il-18)	(Coughlin *et al*, 1998)	**TNF-IFNγ en combinaison**	(Ruegg *et al*, 1998)

Tableau 4 : Les inhibiteurs de l'angiogenèse rapportés dans la littérature. Ces molécules contrôlent ou inhibent la formation de nouveaux vaisseaux de manière directe ou indirecte (Black *et al*, 1999). Reproduit d'après Black *et al*., 1999 et avec la permission de Cell Biology and Toxicology.

i) La thrombospondine-1 (TSP-1)

La TSP-1, une glycoprotéine de 450 kDa, est un des constituant principal des granules alpha des plaquettes et est sécrétée dans la MEC par différentes cellules dont les CE. Elle joue un rôle important dans l'adhésion des plaquettes, l'inflammation et l'angiogenèse. La TSP-1 ne possède qu'un seul récepteur spécifique cystéine-sérine-valine-thréonine-cystéine-glycine (CSVTCG) qui peut être présent sur les CE. L'équipe de Good a identifié pour la première fois la TSP-1 comme étant un inhibiteur de l'angiogenèse (Good *et al*, 1990). Ils ont montré que la TSP-1 pouvait arrêter la néovascularisation et inhiber la chimiotaxie de CE vers différents facteurs angiogéniques. Cette activité angiostatique fut démontrée par une étude antérieure qui montrait que la TSP-1 était présente à proximité des vaisseaux quiescents et absente de l'environnement des bourgeons en croissance (O'Shea et Dixit, 1988). Le mécanisme d'action de la TSP-1 n'est pas complètement défini. On pense qu'il est relié à la modulation d'interactions impliquées dans l'adhésion et la croissance car la TSP-1 peut médier certaines interactions CE-CE et CE-MEC. Toutefois, on sait que la TSP-1 empêche la prolifération des CE induite par le bFGF *in vitro* en se fixant sur ce dernier. Il existe une corrélation entre un faible niveau d'expression de la protéine TSP-1 et de son ARNm avec un potentiel métastatique élevé chez certaines lignées de cellules tumorales (Zabrenetzky *et al*, 1994). Une autre forme de thrombospondine est connue, la trombospondine-2 (Bornstein *et al*, 1991 ; Laherty *et al*, 1992). Cette forme de TSP présente aussi des propriétés anti-angiogéniques (Streit *et al*, 1999).

ii) Les stéroïdes angiostatiques

L'angiogenèse est un phénomène impliqué dans le cycle menstruel et la grossesse chez la femme. On a démontré que différents stéroïdes jouant un rôle dans le fonctionnement normal du système reproducteur féminin, pouvaient avoir une activité anti-angiogénique. La liaison covalente d'un dérivé de l'héparine avec un stéroïde angiostatique, le cortisol, a généré une molécule considérablement plus efficace que les stéroïdes employés seuls et en mesure de se concentrer à l'intérieur des CE (Folkman et Ingber, 1987). La fraction héparine permet de cibler un récepteur sulfate à la surface cellulaire. Les conjugués sont ensuite endocytés et le cortisol est libéré à l'intérieur de la cellule. On ne connaît pas les mécanismes avec lesquels les stéroïdes inhibent l'angiogenèse sauf pour le 2-méthoxyoestradiol : ce dérivé de l'œstradiol se lie à la tubuline et inhibe l'assemblage de cette protéine du cytosquelette (D'Amato *et al*, 1994). La progestérone est un autre exemple de stéroïde angiostatique. La progestérone est une hormone progestative secrétée par le corps jaune de l'ovaire durant le cycle menstruel et la grossesse. Lors du cycle ovulatoire, la progestérone interrompt la prolifération de la muqueuse utérine. On a montré que la progestérone produit une dégénérescence significative de microvaisseaux dans une période de temps déterminé. Son effet inhibiteur sur la croissance de microvaisseaux est comparable à celui que l'on obtient avec des stéroïdes anti-angiogéniques connus (Jaggers *et al*, 1996). Cependant, le mécanisme par lequel la progestérone freine l'angiogenèse est inconnu jusqu'à ce jour.

iii) Les analogues de la fumagilline

La fumagilline a été isolée suite à l'observation que le contaminant d'une culture de CE, *Aspergillus fumigatus*, perturbait la croissance de ces dernières. La fumagilline a été identifiée

comme étant le métabolite responsable de l'inhibition. Cependant, les quantités requises pour obtenir une inhibition lors de différents essais étaient toxiques. On a donc développé des dérivés de la fumagilline moins toxique et plus efficace que comme le fumagello! (AGM-1470). Ce dernier engendre aussi moins d'effets secondaires *in vivo*. L'AGM-1470 est en mesure d'inhiber la prolifération des CE *in vitro* mais ne parvient pas à inhiber la croissance de cellules tumorales. La fumagilline ou son analogue, l'AGM-1470, empêchent la croissance des CE en se fixant sur la méthionine aminopeptidase et en inhibant son activité. La méthionine contrôlerait la stabilité des protéines intervenant dans le cycle cellulaire ou interviendrait dans la localisation des protéines des voies de signalisation (Sin *et al*, 1997). Un autre analogue, le TNP-470, a été développé. Ce dernier est en mesure d'enrayer la croissance tumorale *in vivo* (Ingber *et al*, 1990) via son action inhibitrice de la croissance des CE (Kusaka *et al*, 1994). Des essais cliniques sont présentement en cours afin d'évaluer l'efficacité des analogues de la fumagilline dans le traitement du sarcome de Kaposi.

iv) L'angiostatine

Cet inhibiteur endogène est un fragment protéolytique de 38 kDa du plasminogène qui a été isolé à partir de carcinomes du poumon Lewis chez la souris (O'Reilly, 1994). En plus de maintenir les métastases dans un état quiescent, l'angiostatin peut inhiber la croissance de différents types de tumeurs dans des modèles murins *in vivo* (O'Reilly *et al* ,1996). La croissance de tumeurs de cancer du sein a été retardée de 95 %, de carcinomes du colon de 97 % et de carcinomes de la prostate de près de 100 %.

L'angiostatine inhibe l'invasion des CE et diminue leur prolifération. L'invasion est un processus qui implique la protéolyse, l'adhésion et la migration des cellules, tous des

phénomènes qui ont été reliés à la signalisation de ERK (Redlitz *et al*, 1999). L'angiostatin inhiberait l'activation de ERK faite par le bFGF et le VEGF en diminuant de façon transitoire la phosphorylation des protéines kinases ERK-1 et -2 dans les cellules microvasculaires. Par ailleurs, cette protéine partage une homologie structurale avec le HGF (Hepatocyte Growth Factor), une glycoprotéine agissant comme médiateur paracrine de l'angiogenèse. L'angiostatine pourrait entrer en compétition avec le HGF pour son récepteur, c-met, afin d'inhiber l'angiogenèse (Tsarfaty *et al*, 1992).

v) Les facteurs dérivés du cartilage

Puisque le cartilage est un des seul tissu avascularisé, on peut facilement concevoir qu'il contient des molécules angiostatiques. Une protéine présentant des homologies de séquences avec la région N-terminale d'un inhibiteur de collagénase a été purifiée à partir de cartilage bovin (Moses *et al*, 1990). Cette protéine peut inhiber la prolifération et la migration des CE *in vitro* et l'angiogenèse *in vivo*. La présence d'inhibiteurs de collagénases dans le cartilage expliquerait sa résistance à l'invasion et à la vascularisation puisque la dissolution des collagènes est une étape importante de l'angiogenèse. Un groupe de recherche a effectué une étude clinique qui consistait à administrer oralement des extraits de cartilage liquides à des humains (Berbari *et al*, 1999). Un composant angiostatique présent dans ces extraits était biodisponible. En effet, le groupe d'individus ayant reçu le cartilage liquide présentait une diminution de la densité de CE présentes dans une éponge implantée sous-cutané comparativement au groupe ayant reçu un placebo.

4. Les autres cellules impliquées dans l'angiogenèse

Lors de la formation des vaisseaux, l'endothélium recruterait des cellules mésenchymateuses non différentiées et orienterait leur différenciation en péricytes chez les microvaisseaux ou en cellules musculaires lisses chez les vaisseaux de plus gros calibre. Les péricytes entourent l'endothélium des capillaires et des veinules avec leurs processus dendritiques. Les corps cellulaires et les prolongements cytoplasmiques des péricytes sont enveloppés par la même lame basale que les CE sauf aux endroits où les 2 types cellulaires ont des contacts directs. Plusieurs facteurs de croissance sont impliqués dans le recrutement des péricytes. Le PDGF-B est nécessaire pour la migration et la prolifération des précurseurs des péricytes lors de l'angiogenèse (Hellstrom *et al*, 1999). Le VEGF peut aussi agir sur les péricytes de façon paracrine et autocrine, et peut promouvoir le recrutement des péricytes en stimulant leur migration (Yamagishi *et al*, 1999). L'angiopoïétine-2 serait aussi impliquée dans le recrutement des péricytes.

Les péricytes possèdent des caractéristiques se situant entre celles des fibroblastes et des cellules musculaires lisses. Tout comme les cellules musculaires lisses, les péricytes possèdent de l'α-actine (α-smooth muscle actin), des caveolae et une membrane basale (Sims, 1986). L'origine des péricytes n'est pas encore clairement déterminée. Certains pensent que les péricytes proviendraient d'une sous-population de cellules musculaires lisses localisées dans les couches intimales/subintimales de l'aorte (Nicosia et Villaschi, 1995). Mais la plupart croient plutôt à une origine mésenchymateuse. Une expérience de greffe à permis d'observer la présence de nombreux capillaires hybrides composés de CE de l'hôte et de péricytes provenant du greffon. Ces résultats soutiennent l'idée que les péricytes microvasculaires pourraient dériver des fibroblastes périvasculaires (Stein *et al*, 1996). Une hypothèse soutient que les fibroblastes pourraient être à l'origine de tous les éléments cellulaires des vaisseaux

sanguins i.e. CE, péricytes et cellules musculaires lisses (Kon et Fujiwara, 1994). Ce phénomène serait similaire à celui qui est observé durant la vasculogenèse où les cellules mésenchymateuses sont elles-mêmes à l'origine de ces 3 types cellulaires. D'après ces auteurs, il serait possible de moduler l'angiogenèse en manipulant la densité des fibroblastes.

On observe des différences dans la morphologie et la distribution des péricytes parmi les lits vasculaires ce qui laisse supposer des fonctions variables en fonction des différents tissus. En se basant sur la localisation et la présence de protéines du cytosquelette complémentaires des muscles, on pense que les péricytes participeraient à la régulation de la circulation sanguine. Des études *in vitro* ont montré que les péricytes avaient des propriétés contractiles, supportant ainsi cette hypothèse. On a suggéré que les péricytes *in situ* serviraient de réservoir de cellules précurseurs capables de donner naissance à de multiples lignées de cellules incluant les ostéoblastes, les chondrocytes, les adipocytes et les fibroblastes (Doherty et Canfield, 1999). Lors de l'angiogenèse, les péricytes contribueraient à la régulation des fonctions et de la croissance des microvaisseaux. On sait que les péricytes exercent un effet inhibiteur sur la prolifération des CE *in vitro* et que le retrait des péricytes a lieu avant la prolifération des CE durant la croissance de capillaires *in vivo*. Ainsi, les péricytes pourraient jouer un rôle permissif dans le contrôle de l'angiogenèse *in vivo*. La communication entre les CE et les péricytes peut s'établir sous plusieurs formes : facteurs de croissance, "gap junction" et molécules d'adhésion. PDGF et TGF-β semblent intervenir dans l'influence qui s'exerce entre ces 2 types cellulaires. En cocultivant des péricytes et des CE, on observe une activation de TGF-β modulant la croissance et la différenciation des CE. La communication entre ces cellules est centrale pour l'assemblage de vaisseaux, la croissance cellulaire et d'autres fonctions (Hirschi et D'Amore, 1997). Finalement, les péricytes ont été impliqués dans le développement de différentes pathologies comprenant l'hypertension, la sclérose en plaques et l'angiogenèse tumorale.

En plus des CE et des péricytes, 2 autres types de cellules sont reconnues pour leurs rôles dans le phénomène d'angiogenèse de tissus tumoraux ou non : les macrophages et mastocytes (MC). Les macrophages peuvent promouvoir l'angiogenèse associée à la guérison et aux tumeurs. On a remarqué *in vitro* que les macrophages produisaient plus de 20 médiateurs pouvant agir sur la prolifération et la migration des CE. De plus, ils modulent l'angiogenèse en modifiant la MEC soit par production de certains de ses composants, soit par production de protéases modifiant ces derniers (Polverini, 1995). Les MC sont normalement retrouvées près des microvaisseaux. On a décrit pour la première fois en 1986 que l'activation sélective des MC *in situ* pouvait induire l'angiogenèse (Norrby *et al*, 1986). Les MC peuvent synthétiser des facteurs de croissance, des cytokines et des modulateurs de l'angiogenèse, mais un MC ne peut produire tous ces médiateurs à la fois.

5. Les changements de la MEC durant l'angiogenèse

Les cellules reconnaissent spécifiquement les différents composants de la MEC via les intégrines afin de régulariser des événements cellulaires précis durant l'angiogenèse. Les changements de la MEC lors de l'angiogenèse ont des effets importants sur les CE et induisent des variations morphologiques et fonctionnelles chez ces dernières (Madri et Pratt, 1986 ; Nicosia et Madri, 1987 ; Ingber et Folkman, 1989 ; Madri, 1997 ; Vernon et Sage, 1999). Les protéines de la lame basale facilitent la différenciation des CE en structures tubulaires tandis que les collagènes interstitiels stimulent la migration et prolifération des CE. Ces phénomènes sont associés à des changements intracellulaire du cytosquelette.

Lorsque les microvaisseaux sont quiescents, la membrane basale est composée de laminine, fibronectine, entactine, héparane sulfate, collagène type IV et V. Les enzymes sécrétées par les CE activées changent considérablement ces composants durant l'angiogenèse. Dans les stades initiaux du développement des microvaisseaux, la fibronectine est la composante principale de la matrice provisoire. Progressivement, les dépôts de fibronectine diminueront tandis que ceux de laminine et de collagène IV seront de plus en plus importants. Finalement, durant les dernières étapes de l'angiogenèse, on observera des quantités plus importantes de collagène de type I et III dans l'espace périvasculaire.

6. Les autres modulateurs de l'angiogenèse

a) Les molécules de type héparine

Les molécules de type héparine que l'on retrouve dans la MEC et à la surface des cellules agissent comme cofacteurs pour certains facteurs de croissance. Les molécules présentent à la surface cellulaire augmentent la disponibilité des facteurs de croissance en empêchant la liaison de ces derniers à la MEC et en les protégeant de la protéolyse (Folkman *et al*, 1988). De plus, elles peuvent induire un changement conformationnel de ces facteurs permettant ainsi une interaction avec leur récepteur respectif. D'autres activités de l'héparine peuvent faciliter la néovascularisation : elle stimule la migration des CE *in vitro*, protège le aFGF et le bFGF de l'inactivation et augmente l'activité du aFGF. Il semble que l'interaction entre un facteur de croissance, son récepteur proprement dit et un récepteur héparane sulfate de faible affinité soit requise pour la prolifération des CE (Folkman et Shing, 1992). Finalement, l'héparine permet d'emmagasiner plusieurs facteurs de croissance en les liant à la MEC. Ces derniers pourront êtres libérés lors de l'angiogenèse grâce à différentes enzymes.

b) Les syndécanes

Les gènes codant pour les syndécanes sont régularisées lors du développement et de la guérison de plaies. Les syndécanes servent de corécepteurs pour les facteurs de croissance en augmentant leur affinité pour leur récepteur spécifique. Quatre syndécanes ont été clonés et le syndécane-1, le plus abondamment distribué, peut se lier à la fibronectine, à divers collagènes et au bFGF. L'expression du syndécane-1 est induite au début de la guérison de plaies, mais disparaît une fois que la réparation est terminée (Elenius *et al*, 1990). L'expression des autres membres de cette famille est limitée à certains tissus et leurs fonctions précises sont encore inconnues.

c) Les protéinases

La dégradation de la MEC par différentes enzymes est essentielle pour le remodelage tissulaire durant le développement, et durant des processus physiologiques ou pathologiques. Les protéinases qui dégradent la MEC par clivage peuvent êtres classées en 3 catégories : 1) protéinases sérine ; 2) métalloprotéinases (MMPs) ; 3) cathepsines (Mignatti *et al*, 1996). Les protéinases sérine et les métalloprotéinases jouent des rôles importants dans les processus impliquant un remodelage tissulaire.

Les activateurs du plasminogène (PAs) sont les enzymes qui constituent principalement la première catégorie. Le terme PA est restreint à 2 enzymes qui sont très efficaces en tant qu'activateur : PA de type urokinase (uPA) et PA de type tissulaire (tPA). Les PAs sont

sécrétés sous forme inactive et doivent être convertis sous forme active par protéolyse. Les PAs convertissent le plasminogène, une protéine plasmatique ubiquitaire, en plasmine. Cette dernière peut dégrader divers composants de la MEC incluant la fibronectine, la laminine, les protéoglycanes, les gélatines et certaines formes de collagène. Par ailleurs, la plasmine peut activer certaines prométalloprotéinases et l'élastase latente.

L'activité des PAs est contrôlée par des mécanismes complexes qui agissent à la fois au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. Le contrôle de l'activité des PAs peut être exercé par des protéines spécifiques présentes dans les tissus, principalement les inhibiteurs de PA de type 1 (PAI-1) et de type 2 (PAI-2). PAI-1 est une protéine présente dans les plaquettes et le plasma tandis que PAI-2 est exprimé principalement par les monocytes et macrophages. PAI-1 et -2 se lient aux formes actives de uPA et tPA et forment rapidement un complexe 1 :1. Après avoirs liés PAI et formés un complexe inactif, uPA et tPA sont rapidement internalisés. On connaît d'autres inhibiteurs des PAs : protéase nexine-1 et PAI-3 (Heeb *et al.* 1987).

En plus d'être impliqués dans la dégradation de la MEC, les PAs participent au contrôle du remodelage tissulaire par 2 mécanismes : 1) Mobilisation et activation de facteurs de croissance associés aux composants de la MEC ; 2) Activation de cytokines comme HGF/SH et TGF-β (Mignatti *et al.* 1996). Ces facteurs peuvent induire l'angiogenèse et moduler l'expression de protéinases chez d'autres types cellulaires. Les PAs sont impliqués dans l'inflammation, la formation de tissu de granulation, l'élaboration de la matrice, la réépithélisation et certaines étapes de la guérison des plaies.

Les MMPs forment une famille d'enzymes qui ont la capacité de dégrader tous les composants de la matrice. La superfamille des MMPs comprend 14 membres qui possèdent une homologie

de 40 % de leurs acides aminés. Ces enzymes sont catégorisées en fonction de leur spécificité de substrat, propriété qui leur est conférée par leurs domaines structuraux : on retrouve les collagénases, les gélatinases, les stromélysines, la matrilysine et la métalloélastase. On connaît 3 collagénases interstitielles : collagénase-1, -2 et –3. Elles semblent en mesure de cliver uniquement le collagène de type I. Elles sont produites par différentes cellules et sont associées au développement de certains cancers.

Les gélatinases possèdent la même spécificité de substrat, mais elles sont contrôlées par des mécanismes distincts. La gélatinase A (MMP-2) de 72 kDa est probablement la MMP la plus répandue. Elle est exprimée continuellement par la majorité des cellules des tissus conjonctifs incluant les chondrocytes, les fibroblastes et les CE. Contrairement aux autres MMPs, son expression n'est pas régularisée par les cytokines, les facteurs de croissance ou les hormones à l'exception de TGF-β1 (Overall *et al*, 1991). À l'aide de la gélatinase B (MMP-9), MMP-2 joue un rôle important dans les changements du collagène de type IV dans la membrane basale. La gélatinase B (92 kDa) est exprimée par les éosinophiles, les monocytes, les macrophages et les cellules épithéliales. Ces 2 métallogélatinases dégradent les collagènes, les membranes basales, la fibronectine et l'élastine.

Dans la plupart des tissus ou cellules, la production de MMPs dépend d'une induction par les facteurs de croissance ou cytokines, des éléments de la matrice ou via des contacts membranaires avec d'autres cellules. Ainsi, les CE vont produire des MMPs en réponse à certains facteurs angiogéniques et à la migration (Cornelius *et al*, 1995). Les MMP sont importantes pour l'invasion des CE et des cellules tumorales *in vivo* et *in vitro*. Cependant, le répertoire et le niveau d'expression des enzymes par les cellules en culture diffèrent considérablement de ce qui est observé *in vivo*. La détection *in situ* des différentes enzymes serait nécessaire afin de déterminer le rôle spécifique de chacune.

Toutes les MMPs sont sécrétées sous formes inactives. La latence dépend de l'interaction entre un résidu Cys du domaine proenzyme avec le site actif Zn^{2+}. La déstabilisation de cette association provoque le clivage de l'enzyme et le retrait du pro-domaine. *In vivo*, l'activation des MMPs peut avoir lieu par un mécanisme dépendant de la cascade plasmine/ uPA ou par des interactions avec d'autres MMPs activées. Dans tous ces cas, la cellule est en mesure de régulariser efficacement l'activation des pro-enzymes, qu'ils soient sur ou près de la surface cellulaire, permettant ainsi une dégradation locale de la MEC.

Habituellement, les MMPs ne sont pas exprimées continuellement *in vivo*, mais elles sont plutôt induites par différents facteurs. La régulation des MMPs est spécifique aux différents types cellulaires et est effectuée à différents niveaux incluant des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels. Les MMPs peuvent être inhibées de façon non spécifique par l'inhibiteur de protéinases a_2-macroglobuline et spécifiquement par les TIMPs (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases). Les TIMPs forment une petite famille de gènes : TIMP-1, -2 et -3. Le TIMP-1 est une glycoprotéine qui forme des complexes de haute affinité avec diverses MMPs de manière non covalente. En plus d'inhiber l'activité de dégradation de la matrice des MMPs, le TIMP-1 peut inhiber leur activation. Le TIMP-2 semble plus spécialisé puisqu'il interagit sélectivement avec la MMP-2 (Goldberg *et al*, 1989). Cependant, les TIMP-1 et –2 peuvent aussi former des complexes avec les formes latentes des MMP-9 et 2 respectivement. L'activité inhibitrice des TIMP-1 et –2 est contenue dans la portion N-terminale de ces 2 protéines, avec laquelle elles forment des complexes 1 :1 avec le site actif de l'enzyme. Il semblerait que la portion C-terminale serait plutôt impliquée dans la liaison spécifique des formes latentes des gélatinases. Par ailleurs, les TIMPs pourraient aussi prévenir les interactions entre les enzymes et empêcher l'autodégradation des enzymes actives.

Le TIMP-3, inhibiteur de 24 kDa, n'a pas encore été bien caractérisé. On sait toutefois qu'il est préférentiellement lié à la MEC (Leco *et al*, 1994).

Puisque les MMPs sont associées à la croissance tumorale et à l'angiogenèse, ces enzymes représentent des cibles potentielles pour le traitement de cancers et d'autres maladies. Récemment, un inhibiteur spécifique pour les MMPs a été développé, un peptide synthétique nommé CTTHWCFTLC, et ouvre des perspectives thérapeutiques intéressantes : il supprime la migration des CE et des cellules tumorales *in vitro*, il cible spécifiquement les vaisseaux sanguins *in vivo* et il prévient la croissance de tumeurs chez les souris (Koivunen *et al*, 1999).

7. Les modèles d'étude *in vivo*

Afin d'étudier les facteurs qui influencent l'angiogenèse et pour comprendre davantage les processus cellulaires impliqués dans la formation de capillaires, il fut essentiel de développer plusieurs modèles d'étude du phénomène d'angiogenèse. Les modèles décrits dans la littérature se divisent en 2 catégories soit les modèles *in vivo* et *in vitro*.

a) Les chambres transparentes

En 1928, Sandison a présenté le premier modèle d'étude d'angiogenèse. On pouvait observer la formation de nouveaux vaisseaux autour d'une chambre placée dans l'oreille d'un lapin en réponse à la plaie causée par son implantation (Sandison, 1928). On a par la suite modifié ce modèle en implantant un fragment de tumeur entre 2 filtres Millipore dans une chambre sous-cutanée. On a pu observer la croissance de néovaisseaux de l'hôte jusqu'à l'intérieur

d'implants qui contenaient des fragments tumoraux. Aucune néovascularisation n'était détectable dans les implants contenants des fragments cardiaques ou de la glande thyroïde. Cette méthode permet d'observer des vaisseaux à long terme chez des animaux non-anesthésiés. Cependant, le fait que l'angiogenèse est induite par la guérison de la plaie causée par l'implantation de la chambre, il y a superposition de ce phénomène et des effets provoqués par la substance ou le tissu testé (Ribatti *et al*, 1991).

b) Le modèle de néovascularisation cornéale

Dans ces essais, l'induction d'une réaction angiogénique est une vraie démonstration de néovascularisation puisque la cornée n'est pas vascularisée (Henkin, 1978). On utilise ce modèle pour déterminer si un facteurs angiogénique potentiel, placé dans une incision au milieu de la cornée, peut attirer et provoquer la croissance de vaisseaux à partir du limbe jusque dans le stroma avasculaire de la cornée. La transparence relative de la cornée permet d'observer facilement la croissance des nouveaux vaisseaux. (Ribatti *et al*, 1991). On peut aussi étudier la libération de facteurs angiogéniques ou angiostatiques par différents tissus en insérant un fragment de ces derniers entre la tumeur et les vaisseaux limbiques. La quantification des vaisseaux est maintenant possible grâce à l'utilisation d'une caméra vidéo permettant l'acquisition de données et l'analyse d'images par ordinateur (Conrad *et al*, 1994).

Les techniques microchirurgicales employées pour l'implantation de fragments requièrent une grande habileté. Une réponse inflammatoire non spécifique est associée à l'application de cette technique, ce qui peut interférer avec la réponse induite par le composé testé. Puisque la cornée est avasculaire, le phénomène d'angiogenèse induit pourrait être différent de ce qui est observé normalement (Wilting et Christ, 1992). Néanmoins, la sensibilité et la fiabilité de cette

méthode en font un essai de choix pour une simple détermination d'activité angiogénique *in vivo*.

c) La membrane chorioallantoïque de l'embryon de poulet (Chicken Chorioallantoic Membrane ou CAM)

La chorioallantoïde est une membrane extraembryonnaire formée au 4^{e} jour d'incubation par la fusion du chorion et de l'allantoïde. Puisque l'embryon de poulet précoce ne possède pas de système immunitaire, ce modèle est particulièrement intéressant pour des études de greffe de tissus xénogéniques. De plus, la vascularisation des greffons se fait rapidement dans ce modèle. Pour réaliser ce modèle, on incube pour 72 heures des œufs fertilisés auxquels on enlève assez d'albumine pour faciliter la greffe. On coupe une fenêtre rectangulaire dans la coquille afin de placer et accéder au greffon sur la CAM. Après 3-4 jours de greffe, on peut observer la formation de vaisseaux matures directement sous le greffon. Outre les greffes de tissus, on peut tester le potentiel angiogénique ou angiostatique de différentes substances que l'on incorpore dans différents disques de polymères. Ces disques sont ensuite placés à la suface CAM *in ovo* ou *in vitro* et l'on observe ensuite à l'aide d'un stéréomicroscope le réseau de capillaires dans la région autour de l'implant. De plus, il est possible d'injecter à l'aide d'une microseringue les produits testés directement dans les vésicules allantoïdes. Ainsi, on s'assure que la molécule affecte uniformément et continuellement tous les vaisseaux de l'allantoïde, pas uniquement ceux qui sont présents dans l'environnement immédiat du polymère (Ribatti *et al*, 1991). On a pu améliorer ce modèle grâce au développement de méthodes de culture *in vitro* des embryons (Auerbach *et al*, 1974). Le contenu de l'œuf est transféré dans un pétri où le développement se poursuit. Cette modification permet d'effectuer plusieurs greffes à la fois et simplifie la quantification de l'angiogenèse puisque la CAM *in*

vitro est en 2 dimensions. On demeure tout de même plus près d'un animal entier que d'un essai *in vitro* car l'embryon et sa membrane demeurent intactes.

Autrefois réalisée par observation, la quantification de l'angiogenèse est maintenant effectuée par analyses informatiques. Cependant, la quantification pose toujours des problèmes à cause de l'interférence occasionnée par les faux positifs. Ces derniers proviennent de réponses angiogéniques engendrées par les phénomènes de guérison de plaies ou d'irritation qui sont activés suite aux manipulations des étapes initiales. Par ailleurs, ce modèle est sensible à différents facteurs comme le pH ou le contenu en gaz (Cockerill *et al*, 1995). Cette méthode a été fréquemment utilisée pour analyser rapidement et avec un coût moindre le potentiel d'une grande variété de molécules angiogéniques et angiostatiques.

d) Le mésentère

Ce modèle permet d'étudier les effets de molécules sur des tissus normalement vascularisés. Il consiste à placer une membrane transparente dans la peau de l'abdomen d'un animal. Le phénomène d'angiogenèse observé est induit par les mastocytes autologues. Ces derniers sont activés lors de guérisons de plaies, d'inflammation et chez plusieurs tumeurs et sont alors amenés à sécréter des substances angiogéniques (Enerback et Norrby, 1989). Ce modèle est adéquat pour analyser quantitativement l'angiogenèse. En plus du nombre de vaisseaux par unité de tissu et l'aire vascularisée, ce modèle permet de quantifier la densité vasculaire, la quantité totale de vaisseaux et permet de mesurer le type d'embranchements (Jakobsson et Norrby, 1991). Puisque le tissu étudié est naturellement vascularisé et qu'il ne possède pas d'angiogenèse physiologique significative, il permet pour la première fois de faire une étude quantitative d'angiogenèse *de novo*.

e) Les modèles de pochettes

Les modèles de la joue de hamster et de la chambre antérieure de l'œil sont considérés comme des sites privilégiés puisque l'on peut y pratiquer des greffes allogéniques ou xénogéniques sans induire de réponse immunitaire. Ces modèles ont permis d'étudier la néovascularisation en incorporant des cellules tumorales prénéoplasiques ou en greffant des tumeurs (Folkman *et al*, 1989b ; Auerbach *et al*, 1976). La quantification de ce modèle est réalisée par analyses morphométriques de préparations histologiques.

Dans cette catégorie de modèles, on retrouve aussi le sac d'air dorsal développé en 1953 par Selye qui permet d'observer la vascularisation de greffe de tumeurs (Selye, 1953). Ces sacs dorsaux sont créés en injectant de l'air dans le dos de rats. Le modèle fût modifié par l'insertion d'une fenêtre transparente dans la peau à travers de laquelle on peut observer le processus d'angiogenèse. On a ainsi pu étudier l'angiogenèse induite par l'injection de cellules tumorales ou endothéliales en réponse à différents agents (Sakamoto *et al*, 1991 ; Schweigerer *et al*, 1992).

Une méthode d'implantation de disque sous-cutané fait aussi partie de cette catégorie de modèles. Ce modèle, développé par Fajardo, consiste à implanter une éponge d'acétate de polyvinyle (Fajardo *et al*, 1988). Le centre de ces éponges contient la substance. Les éponges sont recueillies après 1 à 3 semaines. On peut quantifier la néovascularisation en estimant la croissance centripète de vaisseaux en histologie, la grandeur de l'aire de croissance fibrovasculaire et la quantité de thymidine-H^3 incorporée dans le disque. La réponse de la substance incorporée dans les implants peut être grandement influencée par le stroma, les CE,

les cellules inflammatoires et immunitaires activées présentes dans le tissu de granulation. Cette méthode permet d'étudier l'angiogenèse dans une situation qui ressemble aux réponses de guérison de plaies.

Les travaux réalisés sur les modèles *in vivo* ont permis d'introduire le concept d'angiogenèse et d'étudier certains mécanisme qui régulent le phénomène. La difficulté de mettre en œuvre ces modèles, leur variabilité, leur coût et la réponse non-spécifique de l'hôte limitent l'utilisation des modèles *in vivo* dans l'étude de l'angiogenèse et nous fait prendre conscience de la difficulté que représente l'étude de ce phénomène (Auerbach *et al*, 1991).

8. Les modèles d'étude *in vitro*

Le développement de techniques de culture à long terme pour les CE fût une avance majeure dans la recherche sur l'angiogenèse car on a pu ainsi étudier ce phénomène *in vitro* (Jaffe *et al*, 1973 ; Lewis *et al*. 1973 ; Folkman *et al*, 1979). Par la suite, plusieurs systèmes de culture en 2 et 3 dimensions ont été développés. Les modèles d'angiogenèse *in vitro* les plus répandus sont le modèle de l'aorte, la membrane amniotique humaine, l'angiogenèse spontanée *in vitro*, le modèle *in vitro* en 3 dimensions et le modèle en coculture. Tous ces modèles représentent différents aspects de l'angiogenèse. Afin d'étudier la totalité des effets d'une molécule, on doit en combiner plusieurs.

a) Le modèle d'angiogenèse spontanée

Lorsque des CE humaines sont maintenues en culture à confluence pour une période prolongée sans renouvellement de milieu de culture, on peut observer la formation spontanée de vaisseaux (Folkman *et al*, 1979). Les cellules qui forment ces structures proviennent d'une petite portion de cellules différenciées qui adhèrent peu au flacon de culture, qui ne forment pas de monocouche et qui sont majoritairement mortes. Lorsqu'on utilise des CE bovines, la formation des tubules débute par le bourgeonnement d'une sous-population de cellules suivi de la formation d'un réseau de vaisseaux sur une monocouche (Maciag *et al*, 1982). Pour les CE humaines, on ne peut observer ce processus initial que lorsque ces dernières sont cultivées en présence de collagène de type I et de PMA (Phorbol Myristate Acetate) (Jackson et Jenkins, 1991).

Les méthodes de culture conventionnelles ont une limitation importante : les CE sont cultivées sur un substrat artificiel en bidimension alors que l'angiogenèse a lieu dans un environnement tridimensionnel. Afin de se rapprocher de la situation *in vivo*, des systèmes de culture en trois dimensions ont été élaborés afin de rétablir les interactions normales entre les CE et la MEC. De plus, les processus de néovascularisation peuvent être modulés et analysés dans des conditions *in vitro* bien définies.

b) Les modèles de co-culture

L'angiogenèse *in vivo* se déroule rarement dans un environnement dénué de tous autres types cellulaires. Le microenvironnement des autres cellules possède une grande influence sur la formation des microvaisseaux et sur l'expression de propriétés spécifiques aux différents

tissus. Les modèles de co-culture sont produits en cultivant des CE dans un gel de collagène déposé sur une monocouche de cellules tumorales ou de kératinocytes (Okamura *et al*, 1992). Puisque les 2 types de cellules baignent dans le même milieu, les facteurs relargués par la monocouche permettent d'induire le phénomène d'angiogenèse. Grâce à ce type de modèle, on a démontré que les cellules astrogliales étaient aptes à induire l'angiogenèse par des CE de capillaires du cerveau (Lattera *et al*, 1990). Ce modèle fournit un bon outil pour étudier le développement de microvaisseaux cérébraux et le fonctionnement de la barrière hémato-encéphalique. De plus, on a montré que l'angiogenèse ne pouvait être induite que lorsque les cellules avaient un contact direct car sans contacts, aucune néovascularisation n'avait lieu. Plusieurs autres modèles de coculture ont été décrits, mais ces derniers utilisent des cellules d'origine animale.

c) Les modèles de gel en 3 dimensions

Divers modèles de gel pour l'étude de l'angiogenèse *in vitro* ont été développés incluant : le gel de collagène de type I (Montesano et Orci, 1985 ; Montesano *et al*, 1986), fibrine (Montesano et Orci, 1987), fibronectine (Ingber et Folkman, 1989) et Matrigel ™ (Kubota *et al*, 1988).

i) Le collagène de type I

Premièrement développé par Montessano, ce modèle tridimensionel consiste à ensemencer des CE à la surface d'un gel de collagène et à les recouvrir ensuite d'une couche de collagène. Les CE vont être conduites à former un réseau en 3-D de tubules ressemblant à des capillaires qui

se ramifient et s'anastomosent. L'invasion cellulaire de la matrice qui est observée mime les premiers événements de l'angiogenèse *in vivo* (Cockerill *et al*, 1995). L'ajout de PMA, un promoteur tumoral, de bFGF ou bien de ces 2 composés est nécessaire pour que des CE envahissent la matrice de collagène et qu'elles forment des structures tubulaires (Montesano et Orci, 1985 ; Montesano *et al*, 1986 ; Khan *et al*, 2000). Ces deux substances stimulent la sécrétion de protéinases qui dégradent la matrice. L'ajout de PMA implique la participation de la protéine kinase C dans le processus d'angiogenèse (Montesano et Orci, 1987). La quantification des néovaisseaux est difficile dans ce type de modèle car les structures tubulaires se forment à travers tout le gel.

ii) Le Matrigel ™

Le Matrigel ™ est formé d'extraits de membrane basale du sarcome murin Englebreth-Holm-Swarm. Ce gel est principalement composé de laminine, collagène de type IV, entactine-nidogène, héparane sulfate, protéoglycanes et de facteurs de croissance (Kleinman *et al*, 1982 ; Taub *et al*, 1990). L'équipe de Kubota fût la première à l'utiliser pour l'étude de l'angiogenèse (Kubota *et al*, 1988). On observe la formation d'un réseau de cellules alignées 1 heure après avoir ensemencées les CE. Après 2 heures, les cellules commencent à s'aplatir puis elles formeront un réseau de structures tubulaires à la surface du gel après 12 à 18 heures. Ces structures possèdent un lumen bien défini. Contrairement au modèle de collagène, la majorité des cellules présentent dans le Matrigel™ se différencient et participent dans le processus d'angiogenèse. La rapidité avec laquelle les cellules se différencient sur le Matrigel™ a été attribuée au fait que les cellules n'ont pas besoin de synthétiser une membrane basale, comme dans le cas du gel de collagène, car elle est déjà présente (Grant *et al*, 1989). La formation de structures tubulaires est dépendante de la densité du gel et de l'alignement des cellules

(Cockerill *et al*, 1995). Cependant, plusieurs types de cellules peuvent s'aligner sans toutefois former des structures avec un lumen. Ceci indique que l'alignement est nécessaire mais non suffisant pour permettre la formation de tubules (Emondard *et al*, 1987). L'alignement des CE ne requiert pas l'expression de gènes ou la synthèse de protéines (Bauer *et al*, 1992). Toutefois, pour qu'il y ait formation de tubules, l'expression de certains gènes est requise durant l'alignement des cellules. Comme pour le modèle de gel de collagène, la mobilisation de PKC (Protein Kinase C) est nécessaire dans ce modèle. Cependant, l'activation de PKC n'amène pas une invasion du gel dans ce cas-ci ce qui suggère que l'équilibre d'enzymes protéolytiques est différente dans les 2 modèles. Le modèle conçu à partir de Matrigel ™ représente davantage les événements tardifs de l'angiogenèse *in vivo*. Finalement, le Matrigel ™ est en mesure d'induire la différenciation de plusieurs types de cellules comme les cellules épithéliales mammaires et les cellules de Sertoli (Hadley *et al*, 1990 ; Seeley et Aggeler, 1991).

La production de Matrigel ™ est sujette à des variations. Il est reconnu que de petites variations des composantes de l'environnement peuvent affecter l'adhésion cellulaire, la motilité, la prolifération et la différenciation des CE sur Matrigel ™. La quantification de l'angiogenèse est plus facile à réaliser avec ce modèle puisque les structures se forment généralement à la surface du gel (Grant *et al*, 1989).

d) Le modèle de l'aorte

Ce modèle consiste à incorporer des sections d'aorte dans un gel de collagène ou de fibrine en trois dimensions et à observer à l'aide d'un microscope la croissance radiale de microvaisseaux à partir du segment d'aorte (Nicosia et Ottinetti, 1990). Les structures

tubulaires formées peuvent être analysées en histologie pour des études morphométriques. Lorsque l'on inclut une section d'aorte de rat, la croissance radiale peut être observée en absence de facteurs de croissance exogènes.

e) La membrane amniotique humaine

La membrane basale de l'enveloppe amniotique humaine peut être utilisée comme substrat pour l'endothélium microvasculaire (Madri et Williams, 1983). Les CE se différencient lorsqu'elles sont cultivées sur cette membrane mais elles ne sont pas en mesure de l'envahir.

f) La peau reconstruite endothélialisée

Nous avons développé un nouveau modèle d'étude de l'angiogenèse *in vitro* à partir d'une peau reconstruite (Black *et al*, 1998). Cette peau reconstruite endothélialisée (PRE) est composée de kératinocytes, de fibroblastes et de CE humaines cultivées dans une éponge de collagène/ chitosane/ glycosaminoglycans (figure 5). Ce modèle permet la formation spontanée de structures tubulaires endothéliales dans un environnement contenant de la MEC et des facteurs de croissance néosynthétisés. Les structures tubulaires observées dans le modèle présentent des caractéristiques propres aux microvaisseaux *in vivo* incluant le dépôt de composants de la membrane basale et la formation de jonctions intercellulaires. Contrairement aux modèles mentionnés précédemment, la PRE permet d'étudier les interactions qui existent entre plus de deux types de cellules.

Ce modèle devrait permettre plusieurs applications intéressantes. Il pourrait être utilisé dans l'étude de différentes molécules angiogéniques ou angiostatiques pour le traitement de diverses maladies. De plus, l'incorporation de cellules cancéreuses permettrait d'étudier dans un environnement contrôlé la croissance tumorale de même que les interactions entre ces cellules et les CE. Par ailleurs, la PRE pourrait permettre une étude plus complète du mécanisme d'inflammation et ainsi constituer un outil de choix pour différents tests pharmacotoxicologiques (Black *et al*, 2000). Bien entendu, l'application clinique du modèle pour le traitement des brûlures est envisagée. La présence de structures tubulaires pourrait permettre l'amélioration de la vascularisation des greffons. Finalement, on peut penser à utiliser ce modèle en thérapie génique en ajoutant à la peau reconstruite des CE modifiées génétiquement (Black *et al*, 1999).

Les techniques de culture se sont sophistiquées durant les dernières années. Cependant, la source des cellules utilisées est très importante puisque la réponse cellulaire varie considérablement en fonction des différentes origines (Hudlicka *et al*, 1998). Les CE de capillaires sont considérées comme les cellules optimales pour les études de l'angiogenèse puisque ce sont ces cellules qui engendrent le phénomène normalement. Les changements phénotypiques encourus par les CE lorsqu'elles sont en culture sont un désavantage majeur des modèles *in vitro*. Les résultats doivent donc être interprétés avec attention (Risau *et al*, 1991).

Afin d'avoir une évaluation plus valable des molécules agissant sur l'angiogenèse, il est important de développer des modèles *in vitro* plus sophistiqués représentant davantage la réalité. Une meilleure compréhension des facteurs qui altèrent le milieu extracellulaire et l'expression de gènes durant les événements initiaux de l'angiogenèse permettra le

développement de molécules qui modulent l'angiogenèse pour le traitement de diverses pathologies.

CHAPITRE II

PROBLÉMATIQUE

Chapitre II. Problématique

L'angiogenèse, soit le développement de nouveaux vaisseaux par bourgeonnement à partir d'un vaisseau préexistant, est un processus impliqué dans le développement embryonnaire et dans plusieurs phénomènes chez l'adulte tant physiologiques que pathologiques (Folkman 1985 ; Weinder *et al*, 1991 ; Weinder *et al*, 1993 ; Folkman 1995). L'angiogenèse se déroule selon diverses étapes comprenant l'activation des CE, leur migration à travers la MEC vers le stimulus, leur prolifération et la formation de nouveaux capillaires. Ces étapes sont modulées par des molécules tant angiogéniques que angiostatiques. Ces molécules ont suscité beaucoup d'intérêt car on a vu la possibilité d'utiliser ces dernières à diverses fins thérapeutiques.

L'intérêt grandissant pour les molécules impliquées dans la régulation de l'angiogenèse a conduit au développement de nombreux modèles tant *in vivo* qu'*in vitro* (Cockerill *et al*, 1995 ; Ribatti et Vacca, 1999). Les travaux réalisés sur les modèles *in vivo* ont permis d'introduire le concept d'angiogenèse et d'étudier divers mécanismes impliqués dans la régulation de ce phénomène (Cockerill *et al*, 1995). Cependant, la variabilité des échantillons, les « faux positifs » engendrés par l'inflammation de la plaie, leur coût et la difficulté de les mettre en œuvre limitent l'utilisation des modèles *in vivo* dans l'étude de l'angiogenèse. La plupart des modèles *in vitro* d'angiogenèse connus jusqu'à ce jour sont souvent produits avec des CE d'origine animale (Maciag *et al*, 1982 ; Nicosia et Ottinetti, 1990 ; Cockerill *et al*, 1995 ; Chen *et al*,1997 ; Vernon et Sage, 1999) qui ont parfois de réponses différentes par rapport aux cellules humaines. Contrairement aux CE d'origine animale qui ont la capacité de former des structures tubulaires spontanément, les CE humaines ont besoin d'être mis en présence avec de grande quantité de facteurs de croissance ou d'agents promoteurs tumoraux

(PMA) afin de former de telles structures dans un modèle *in vitro* (Montesano et Orci, 1985 ; Montesano *et al*, 1986). De plus, ces modèles ne contiennent jamais plus de 2 types cellulaires ce qui n'est pas représentatif de la situation *in vivo* (Cockerill *et al*, 1995).

Le LOEX a récemment développé un modèle de PRE composé de 3 types de cellules humaines soit kératinocyte, fibroblaste et CE (Black *et al*, 1998). Il est possible d'observer la formation spontanée de structures tubulaires composées de CE humaines et ce, sans ajout de concentrations importantes de facteurs de croissance ou d'agents tumoraux. Ce phénomène a été attribué entre autres à une coopération entre les cellules co-cultivées et à la production de facteurs de croissance par ces dernières (Villaschi et Nicosia, 1994). De plus, la grande quantité de MEC sécrétée par les cellules ensemencées dans l'éponge contient des protéines sous une forme mature (Berthod *et al*, 1993 ; 1996), qui semblent favoriser la formation des structures endothéliales puisqu'il est connu que les composants de la MEC influencent les fonctions des CE (Kubota *et al*, 1988 ; Ingber et Folkman, 1989 ; Fournier et Doillon, 1992 ; Hoying et Williams, 1996). Ce modèle devrait nous permettre d'étudier divers aspects reliés au phénomène d'angiogenèse et ce, dans un environnement contrôlé se rapprochant de la situation *in vivo* (Black *et al*, 1999).

Lors de ce projet, nous avons voulu poursuivre la caractérisation du modèle PRE. Dans un premier temps, nous avons effectué des doubles marquages immunohistochimiques, pour confirmer la nature des structures présentes dans la PRE. Par la suite, nous avons réalisé des analyses en microscopie confocale, afin de déterminer si les structures apparaissant dans la PRE forment un réseau avec de multiples ramifications et de vérifier s'il s'agit bien de structures avec lumen.

Par la suite, nous avons voulu optimiser un modèle *in vitro* pour étudier, qualitativement et quantativement, l'influence de différentes molécules sur l'angiogenèse pour le traitement de diverses maladies comme méthode alternative aux expérimentations animales. Puisque les CE cultivées dans l'éponge parviennent à former des structures tubulaires dans des conditions "pauvres", il y a peu de risques d'interférences avec les molécules étudiées.

Dans un autre ordre d'idées, nous avons voulu vérifier si l'application clinique du modèle de PRE permettrait d'améliorer l'état des greffes de PR sur les plaies profondes. En effet, lors de brûlures profondes et étendues, on doit avoir recourt à des méthodes alternatives de recouvrement (Schlotterer, 1997). Puisque la greffe de feuillets épidermiques présente plusieurs désavantages reliés principalement à l'absence d'une composante dermique, la recherche s'est plutôt orientée vers le développement de PR i.e. constituée d'un épiderme et d'un derme (Schlotterer, 1997 ; Pomahac *et al*, 1998). Cependant, la greffe des divers modèles de PR a souvent conduit à des résultats décevants : taux faibles de prise de greffe, taux variable de prises de greffe et nécrose de l'épiderme (Heimbach *et al*, 1988 ; Young et Mathes, 1993 : Boyce *et al*, 1993b). Ces résultats décevants peuvent êtres expliqués entre autres par une revascularisation inadéquate car on sait que la vascularisation est un phénomène déterminant pour la prise de greffe.

L'équipe de Young a décrit le processus de revascularisation lors de greffes de peau humaine pleine épaisseur sur des souris athymiques (figure 9) (Young *et al*, 1996) à partir de 2 mécanismes proposés comme étant responsable de la vascularisation : l'inosculation et la néovascularisation (Converse et Ballantyne, 1962 ; Haller et Billingham, 1967 ; Lambert, 1971 ; Dermachez *et al*, 1987). Lors des premiers jours suivant la greffe, les greffons survivent grâce à l'imbibition ou la diffusion de nutriments du lit de la greffe jusqu'au greffon. La

revascularisation survient 2 à 4 jours après la greffe grâce à un processus nommé inosculation. Ce phénomène est en fait une anastomose entre les capillaires du greffon et ceux du lit de la plaie. L'établissement de la circulation sanguine survient durant les 2 à 5 jours qui suivent le moment de la greffe. La néovascularisation, la croissance de néovaisseaux à partir du lit de la greffe vers l'intérieur du greffon, a lieu au minimum 1 semaine après la greffe soit au moment où les CE de souris commencent à apparaître. Si la vascularisation ne survient pas durant la période critique i.e. durant les premiers jours suivant la greffe, la survie du greffon est compromise tel qu'observé cliniquement lors de greffe d'os ou de graisse par exemple.

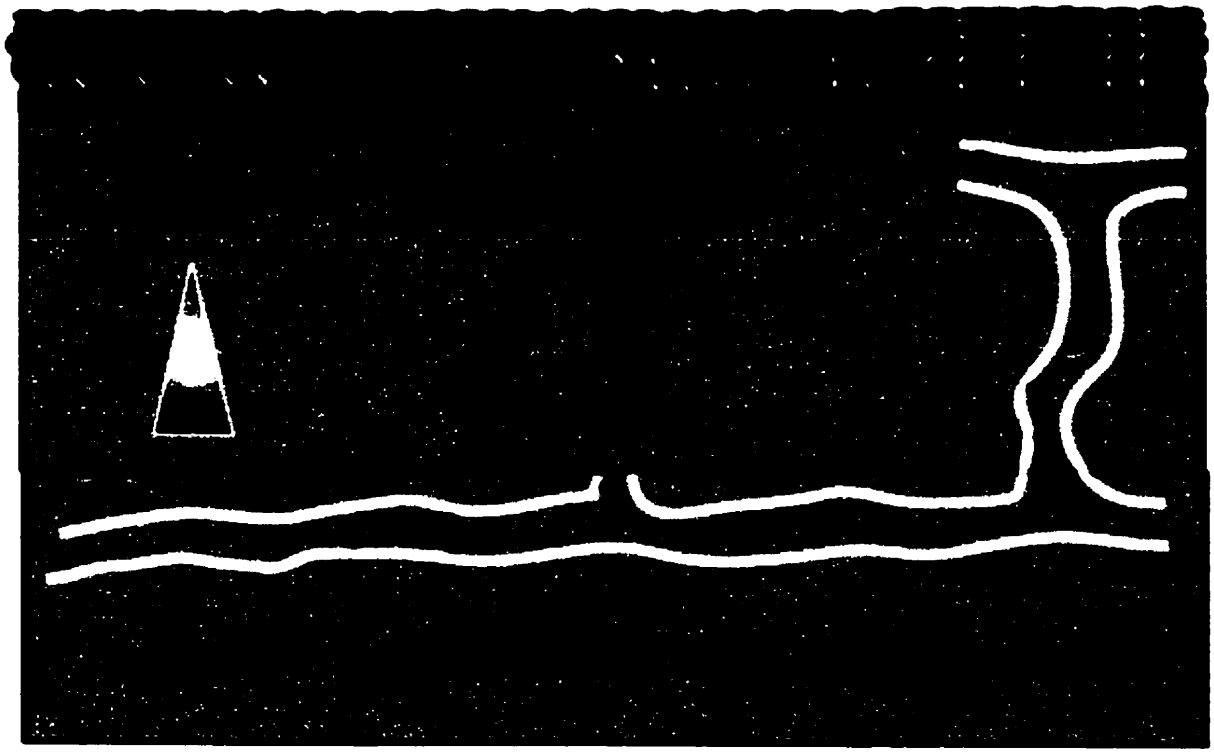

Figure 9. **Processus de revascularisation lors d'une greffe de peau humaine** (selon Young *et al*, 1996).

Puisque les PR traditionnelles ne contiennent pas de réseaux de capillaires, elles ne peuvent se vasculariser de la même manière que les greffons de peau humaine (figure 10). En effet, ces dernières sont limitées au phénomène de néovascularisation et elles doivent survivre uniquement par imbibition qui souvent est inefficace pour garder l'épiderme vivace au-delà de quelques jours.

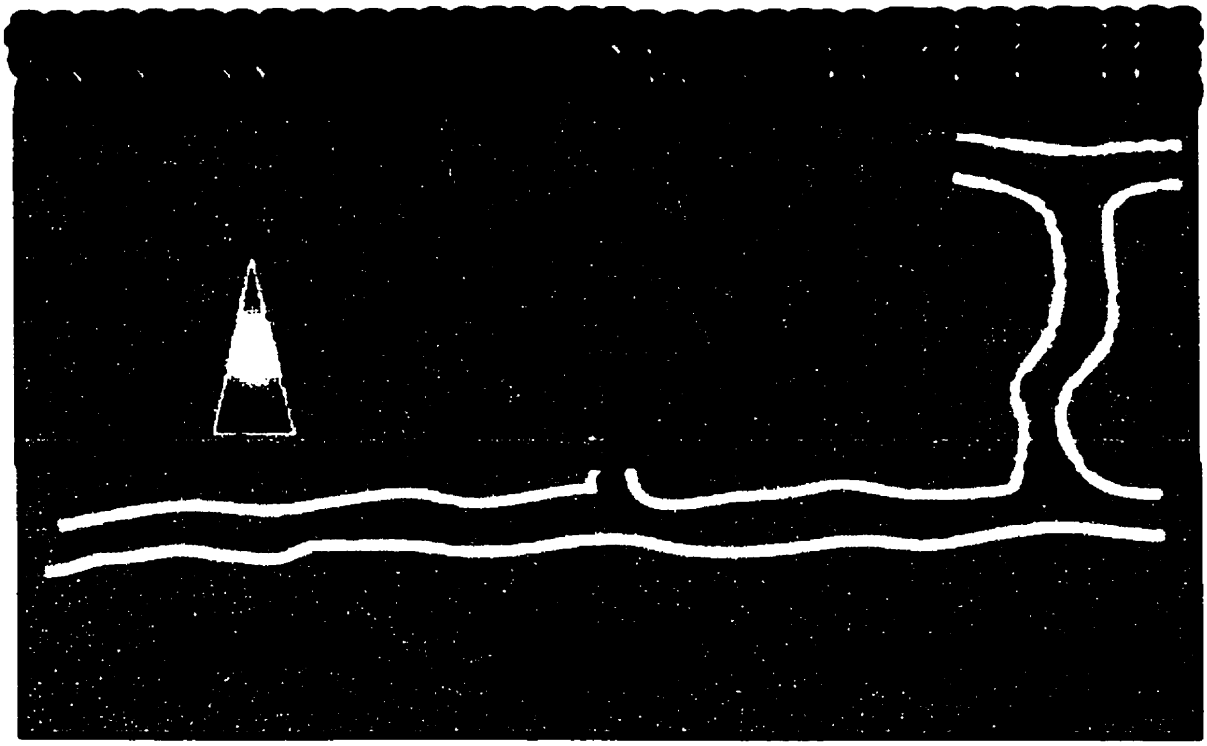

Figure 10. **Processus de vascularisation d'une greffe de PR traditionnelle** (selon Young *et al*, 1996).

Nous avons donc postulé l'hypothèse que la présence d'un réseau vasculaire à l'intérieur des PR permettrait de remédier au problème de vascularisation. En effet, une telle PR pourrait être

en mesure de reproduire le même processus de vascularisation observée lors de la greffe de peau humaine et ainsi accélérer le temps d'apparition d'une circulation sanguine (figure 11).

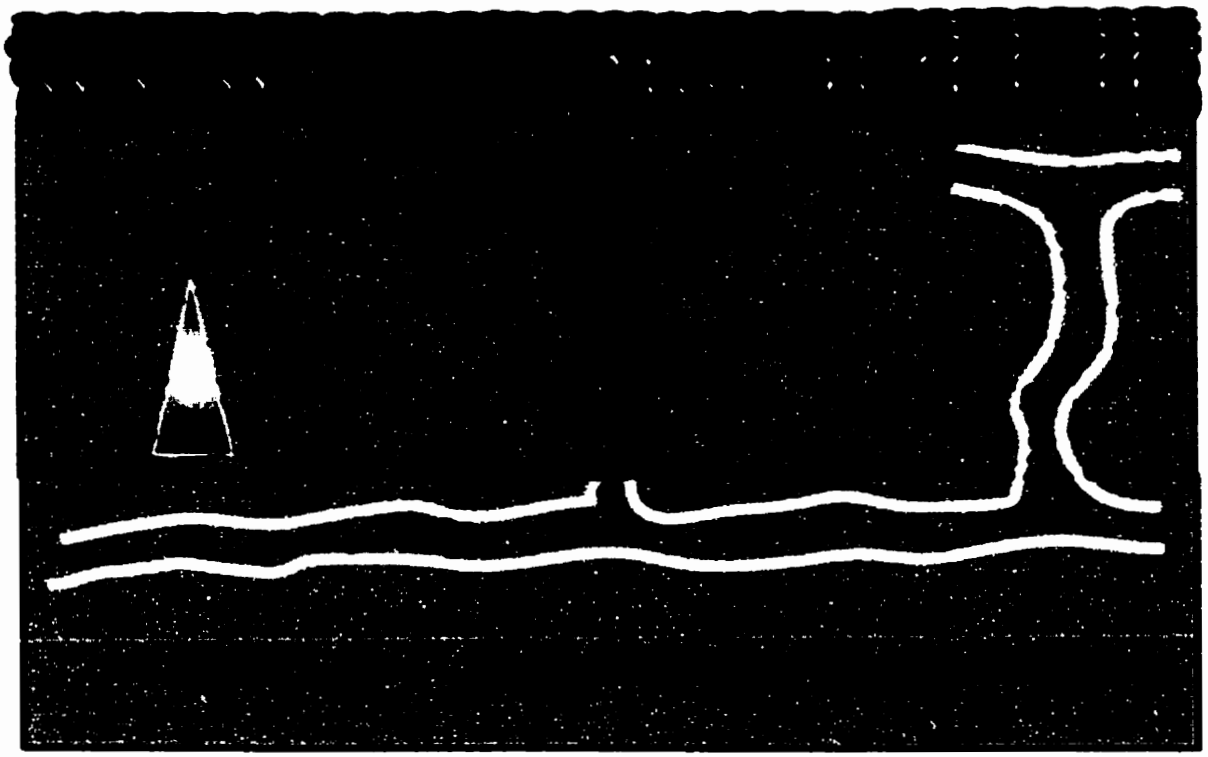

Figure 11. **Processus probable de vascularisation d'une PRE** (selon Young *et al*, 1996).

Puisque nous sommes en mesure de produire un tel modèle, nous avons tenté d'observer lors de greffe de PRE chez la souris athymique l'hypothèse concernant le processus de vascularisation proposée dans la littérature (Young *et al*, 1996). Nous avons aussi voulu démontrer que la présence d'un réseau de structures tubulaires endothéliales dans les PR permettrait d'accélérer le processus de vascularisation de ces dernières et ainsi procurer un apport nutritionnel plus rapide menant à de meilleurs taux de prise des substituts cutanés.

Le présent projet consistait donc à vérifier l'applicabilité du modèle de PRE cliniquement et expérimentalement :

- ⇨ La recherche clinique avec l'application du modèle cutané endothélialisé pour le traitement des grands brûlés
- ⇨ Le développement d'un modèle *in vitro* pouvant servir comme méthode alternative à l'expérimentation animale.

CHAPITRE III

DÉVELOPPEMENT D'UN MODÈLE D'ANGIOGENÈSE *IN VITRO* À PARTIR D'UN DERME RECONSTRUIT ENDOTHÉLIALISÉ POUR L'ÉTUDE DE DIFFÉRENTES MOLÉCULES ANGIOGÉNIQUES ET ANGIOSTATIQUES

Chapitre III. Développement d'un modèle d'angiogenèse *in vitro* à partir d'un derme reconstruit pour l'étude de différentes molécules angiogéniques et angiostatiques

Development of an *in vitro* angiogenesis model within an endothelialized reconstructed dermis to study angiogenic and angiostatic molecules

Valérie Hudon[1], François Berthod[1], Annie F. Black[1,2], Odile Damour[2], Lucie Germain[1], and François A. Auger[1]

[1] Laboratoire d'Organogenèse Expérimentale, Hôpital St-Sacrement and Département de chirurgie, Faculté de médecine, Université Laval, Québec Canada; [2]Banque de Tissus et Cellules, HCL, Laboratoire des Substituts Cutanés, CNRS-UPR 412, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France

A. Résumé

L'angiogenèse est la formation de nouveaux capillaires par bourgeonnement de vaisseaux préexistants. Puisque l'angiogenèse est un événement majeur durant de nombreux processus physiologiques et pathologiques, il est essentiel d'identifier les molécules qui stimulent ou inhibent ce processus et de comprendre leurs modes d'actions. De nombreux modèles *in vitro* ont été développés afin de reproduire les conditions dans lesquelles l'angiogenèse se déroule *in vivo* et d'identifier les agents qui affectent la néovascularisation. Nous avons développé un modèle d'équivalent cutané dans lequel nous observons la formation spontanée de capillaires. Ce processus a lieu en absence de concentrations extra physiologiques de molécules angiogéniques ou d'agents tumoraux. Le but de ce projet était de développer un modèle *in*

vitro permettant d'évaluer qualitativement et quantitativement l'influence de différentes molécules sur l'angiogenèse pour le traitement de diverses maladies.

Les structures présentes dans le derme reconstruit endothélialisé (DRE) ont été visualisées en trois dimensions grâce à la microscopie confocale. Ainsi, nous avons pu vérifier que ces structures n'étaient pas des alignements de cellules endothéliales mais bien des capillaires avec un lumen bien défini. De plus, ces structures étaient organisées en réseaux complexes de capillaires qui se ramifient. Lorsque le modèle *in vitro* a été stimulé par des molécules angiogéniques, comme le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (10 ng/ml) ou le basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) (10 ng/ml), la présence d'un nombre plus élevé de capillaires a été observée comparativement au témoin. Par ailleurs, les DRE stimulés présentaient des structures ayant une surface plus importante que les contrôles. Au contraire, les DRE traités avec un inhibiteur de l'angiogenèse, la progestérone (10 µg/ml), montraient un nombre inférieur de capillaires comparativement au témoin.

Ces résultats montrent que notre modèle pourrait être utilisé efficacement par l'industrie pharmaceutique. Ce modèle *in vitro* est particulièrement approprié pour l'étude du potentiel angiogénique ou angiostatique de molécules puisque i) la formation des capillaires est obtenue dans des conditions de culture minimales (évitant ainsi toutes interférences avec la réponse des molécules pharmacologiques étudiées) et, ii) il réagit physiologiquement aux différentes molécules étudiées.

B. Abstract

Angiogenesis is the formation of new capillaries by sprouting from pre-existing vessels. Since angiogenesis is a major feature of different physiological and pathological situations, it is of clinical relevance to identify factors that stimulate or inhibit these processes and to elucidate their mode of action. Several *in vitro* models have been developed in order to reproduce the conditions in which angiogenesis occurs *in vivo* and to screen agents affecting this process. We have produced a new model of reconstructed skin that promotes the spontaneous formation of a human capillary-like network in its dermal component. This angiogenesis process occurs in the absence of extra-physiological concentrations of angiogenic molecules or tumor promoting agents. The aim of the present project was to develop an *in vitro* model to analyze, quantitatively and qualitatively, the influence of drugs on angiogenesis for the treatment of various diseases such as cancer or psoriasis.

The three-dimensional visualization of the structures present in the endothelialized reconstructed dermis (ERD) by confocal microscopy showed that the endothelial structures where not cord-like but rather capillary-like structures (CLS) with well-defined lumen. Moreover, these tubules were organized in a complex network of branching CLS. When angiogenic factor such as VEGF (10 ng/ml) or bFGF (10 ng/ml) were added to the *in vitro* model, more capillaries were observed compared to the control. In addition, the surface occupied by the CLS was larger. In contrast, when the ERD was treated with progesterone (10 µg/ml), the number of tubules was reduced and they occupied a smaller surface than the control.

These results suggest that this model could be efficiently used by the pharmaceutical industry. The ERD is very well suited to study the angiogenic or angiostatic potential of drugs *in vitro*

since i) it promotes capillary-like formation in minimal culture condition (consequently avoiding any interference) and, ii) it reacts physiologically to different drugs.

C. Introduction

Angiogenesis is the formation of new capillaries by sprouting from pre-existing blood vessels. It is a complex process involving activation, migration and proliferation of endothelial cells (EC) and functional maturation (Ausprunk and Folkman, 1977; Wilting and Christ, 1996; Risau, 1997). A balance between angiogenic and angiostatic molecules modulates these steps (Klagsburn and D'Amore, 1991; Folkman and Klagsburn, 1987). Regulated growth of new capillaries occurs in adults during wound healing, development of the *corpus luteum*, and formation of collateral blood vessels. On the other hand, uncontrolled angiogenesis is a feature of pathological processes such as rheumatoid arthritis, diabetic retinopathy, psoriasis and tumor growth (Folkman and Klagsbrun, 1987; Folkman and Shing, 1992; Risau, 1995). Since angiogenesis is such an important feature of these physiological and pathological processes, it is of clinical relevance to understand vascular morphogenesis, to identify factors that stimulate or inhibit these processes and to elucidate their mode of action (Black *et al*, 1999).

Several angiogenesis models have been developed in order to investigate the mechanisms of angiogenesis under well-defined *in vitro* conditions, and to screen angiogenesis modulating agents (Cockerill *et al*, 1995). The most common *in vitro* models are the three-dimensional gel assays which are produced by the culture of EC in gels made of various extracellular matrix (ECM) compound such as type I collagen (Montesano and Orci, 1985; 1987; Montesano *et al*, 1987), fibrin (Montesano *et al*, 1987), fibronectin (Ingber and Folkman, 1989), basement membrane extracts, or Matrigel™ (Kubota *et al*, 1988). The interactions of EC with their

surrounding ECM are known to be essential to modulate neovascularization *in vivo* and *in vitro* (Madri and Pratt, 1986; Ingber and Folkman, 1989; Madri, 1997; Vernon and Sage, 1999). Unfortunately, the models have some limitations. They do not permit the study of interactions between different types of cells although these interactions are known to be involved in the regulation of angiogenesis *in vivo* and *in vitro* (Klagsburn and D'Amore, 1991; Montesano *et al*, 1993; Villaschi, 1994; Hirschi and D'Amore, 1996; 1997). In addition, the majority of models are produced with animal EC (Cockerill *et al*, 1995; Chen *et al*, 1997; Vernon and Sage, 1999) even if the response from cells of different origin vary considerably (Hudlicka *et al*, 1998). Many of the angiogenesis *in vitro* models present the formation of cord-like structures instead of capillary-like ones. When the structures show a lumen, it is often not present in the entire length of the tubules and can present a basement membrane on the lumen side (Nicosia and Ottinetti, 1990b; Bikflavi *et al*, 1991; Sage and Vernon, 1994).

Previously, we established a model of reconstructed skin that promoted the spontaneous formation of a capillary-like network by coculture of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) with dermal fibroblasts in a collagen biopolymer (Black *et al*, 1998; 1999). Contrarily to the majority of *in vitro* angiogenesis models produced with human EC (Cockerill *et al*, 1995), this angiogenesis process takes place without the addition of specific growth factors or tumor promoting agents like PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate). This phenomenon has been attributed to cooperation between the EC and the fibroblasts and the presence of a complex ECM composed of collagens and glycoproteins which are synthesized by the fibroblasts (Berthod *et al*, 1996).

In this study, confocal microscopy was used to visualize in 3-D the endothelial structures presented in the reconstructed dermis (RD) in order to demonstrate that the structures shown

in our model were truly capillary-like. Also, we developed this *in vitro* endothelialized reconstructed dermis (ERD) model to analyze, quantitatively and qualitatively, the influence of drugs on angiogenesis for the treatment of various diseases. We demonstrated by confocal microscopy that the ERD supports the formation of capillary-like structures (CLS) with well-defined lumen instead of cord-like ones. Furthermore, the ERD reacted physiologically when treated with angiogenic or angiostatic molecules. We concluded that this ERD is a promising tool to evaluate molecules that modulate angiogenesis.

D. Materials and methods

1. Human dermal fibroblast isolation

Human fibroblasts were isolated from human skin biopsies after breast reductive surgeries as previously described (Germain *et al*, 1993; Auger *et al*, 1995). Fibroblasts were isolated from human dermis using 0.2 IU/ml collagenase H (Boehringer Mannhein, Montreal, Quebec, Canada). Cells were grown in DMEM (Dulbecco-Vogt modification of Eagle's medium) (Flow Laboratories, Mississauga, Canada) supplemented with 10% Fetal Calf Serum (FCS) (Immunocorp, Montreal, Canada), 100 U/ml penicillin and 25 µg/ml Gentamicin (Schering, Pointe-Claire, Canada) in 8% CO^2 at 37°C. The medium was changed twice a week. Fibroblast cultures from passages 3 to 6 were used in all experiments.

2. Human umbilical vein endothelial cell isolation

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were obtained from healthy newborns by enzymatic digestion with 0.153 IU/mg collagenase H (Boehringer Mannheim, Laval, Canada).

As previously described, veins were canulated at both ends and washed with calcium-free HEPES solution (Flow Laboratories, Mississauga, Canada) (L'Heureux *et al*, 1993; 1998). A collagenase solution was then injected to rinse and fill the vein and the cord was placed in HEPES with 5 mM $CaCl_2$ at 37°C. After a 15 min incubation, the veins were perfused with M199 medium (Sigma, Mississauga, Canada) containing 10% FCS clone II (Hyclone, Logan Utah) and antibiotics.

The endothelial cells were then centrifuged and suspended in M199 medium supplemented with 20% NCS, 2,28 mM glutamine, 25 000 IU/ml heparin (Leo Laboratories, Pickering, Canada), 19 µg/ml endothelial cell growth supplement (Sigma) and antibiotics (Gordon *et al*, 1983). HUVEC were plated on gelatin-coated tissue culture flasks. The culture medium was changed three times a week. Endothelial cell characterization was assessed as previously described (L'Heureux *et al*, 1993).

3. Collagen/ glycosaminoglycan/chitosan biopolymer preparation

Collagen/ glycosaminoglycan/ chitosan biopolymers were prepared using a technique previously described (Shahabeddin *et al*, 1990 ; Saintigny *et al*, 1993 ; Berthod *et al*, 1993 ; Damour *et al*, 1994). These sponge were obtained with type I, III bovine collagen, chitosan (95% deacetylated) (Laboratoire Perouse Implant, Chaponost, France), and chondroitin 4-6 sulfates (Laboratoire Perouse Implant, Chaponost, France) were dissolved in 0,1% acetic acid and mixed. After mixing, 1ml/well (3,8 cm^2) of the final solution was poured into 12 well plates (Becton Dickinson, Toronto, Canada) and frozen overnight at –70°C. The frozen plates were then lyophilized in a Genesis 12EL vacuum lyophilizer (Virtis, Gardiner, N.Y.),

submerged in 70% ethanol for 48h, rinsed and equilibrated in 3 ml of supplemented DMEM, and incubated at 37°C with 8% CO^2 for a minimum of 48h.

4. Endothelialized reconstructed dermis preparation

The ERD was prepared with a suspension of 1:1 ratio of human fibroblasts and HUVEC. A volume of 3 ml was seeded on the top of a chitosan/glycosaminoglycans/collagen sponge at a concentration of $2,1X10^5$ cells/cm^2 (Black *et al*, 1998). The cells were cultured under submerged conditions for 10 days and fed with 3 ml of a medium containing half DMEM with 10% FCS and half M199 with 20% NCS, 50 µg/ml ascorbic acid and antibiotics. The ERD was then elevated at the air-liquid interface for the remaining 20 days in DME-Ham's F12, supplemented with 10% FCS, 5 µg/ml insulin, 50 µg/ml ascorbic acid and antibiotics. Angiogenesis-inducing (VEGF 10 ng/ml or bFGF 10 ng/ml; both purchased from Sigma) or inhibiting agents (progesterone 10 µg/ml; Sigma) were then added in the medium for 20 additional days. The analyses were performed on biopsies taken after a total of 30 days.

5. Immunostaining

Frozen sections (4µm) were blocked in phosphate-buffered saline (PBS) containing 1% (w/v) bovine serum albumin (BSA). Double staining was performed by subsequent incubations with sets of first and second antibody. The primary antibodies used in this study are as follow: mouse monoclonal anti-human von Willebrand factor (vWf) antiboby (Chemicon, Montreal, Canada), mouse monoclonal anti-human Platelet-Endothelial Cellular Adhesion Molecule-1 (PECAM-1) antibody (Chemicon), rat monoclonal anti-mouse laminin (Immunotec) and, rabbit polyclonal anti-human type IV collagen antibody (Chemicon). The second antibody was

FITC (fluorescein isothiocyanate) -conjugated goat anti-rat IgG (Chemicon) or Rhodamine-conjugated goat anti-mouse IgG-IgM (Chemicon). Second antibodies were mixed with 0,1% Evans blue in order to reduce the nonspecific staining of the biopolymer network (Kieny and Mauger, 1984).

For the confocal microscopy, the ERD were cultured as described but no angiogenic or angiostatic molecules were added when the equivalents were elevated at the air-liquid interface. The ERD were cultured for a total of 30 days then sections (1 x 0,5 cm) were cut perpendicularly to the surface. The sections were fixed in acetone at -20°C and then washed in PBS 1X at 4°C. Immunohistochemistry was carried out by indirect immunofluorescence on free-floating sections to ensure penetration of the antibody through the entire section (as described in other skin preparation; Gu *et al*, 1995). The sections were placed in a multiwell-plate containing PBS-BSA (PBS with 1% (w/v) BSA) and incubated with anti-human vWF antibody, anti-human PECAM-1 and anti-mouse laminin antibody for 12h at 4°C. After rinsing in PBS, the sections were incubated with FITC-conjugated goat anti-rat IgG, DTAF (dichlorotriazine fluorescein) -conjugated goat anti-mouse IgG-IgM (Chemicon) or Rhodamine-conjugated goat anti-mouse IgG-IgM for 12h at 4°C. When the second antibody was conjugated with FITC or DTAF, it was also mixed with 0,1% Evans blue. The sections were preserved in PBS at 4°C until used.

6. Confocal laser scanning microscopy

Sections were observed on the MRC-1024 confocal laser scanning microscope (Bio-Rad Laboratories) mounted on a Nikon Diaphot-TMD. A 15mW Krypton/ Argon laser beam was used with excitation at both 488 and 568 nm. Images were acquired using a 20X or 60X oil

lenses with a 0,4 or 1,4 numerical aperture respectively. The microscope settings were as follows: 1 milliwatt laser power, zoom 1.0 or 1.2, 1 second per scan Kalman filter, and 4 frames per image. The measured resolution of the optical setting was 0,25 µm in the *x*-*y* plane and 0,5 µm along the *z*-axis. On each field, serial images were collected with 0,5 µm depth increments per section. Determination of the CLS distribution within the ERD was done by volume reconstruction using the EDIT3D version 2.0 software (Parazza & Usson, CNRS, Grenoble, France) running on a Silicon Graphics O_2^{TM} Workstation (Silicon Graphics, St-Laurent, Canada).

7. Quantification of the capillary-like structures

The equivalents were fixed with Bouin's solution, dehydrated and embedded in paraffin. Sections of 6 µm thick were cut, stained with Masson's trichrome and visualized on a Nikon Optiphot microscope. Three fields were selected randomly from each sample and all experiments were repeated at least three times. The photomicrographs were scanned and analyzed with the NIH image software. The data obtained were analyzed by bilateral Student t-test. $P<0.05$ was considered as significant.

E. Results

The initial objective of the studies reported in this paper was to pursue the characterization of the structures formed by the EC in the model. To this aim, sections of the ERD were stained with antibodies for specific EC markers and basement membrane components of capillaries *in vivo* (figure 12). Immunohistochemistry showed that the structures present in the ERD were

made of ECs as demonstrated by a positive staining for vWF (figure 12, B) that secreted their own basal membrane, laminin (figure 12, A) and collagen IV (Figure 12, C) as was shown previously (Black *et al*, 1998). Moreover, the structures stained positively for PECAM-1 (figure 12, D). PECAM-1 is a cell adhesion molecule located mainly to intercellular junctions of EC (Albelda *et al*, 1990; Newman *et al*, 1990; Newman, 1997). The double-staining method demonstrated that the EC of the capillary-like networks were surrounded by a basement membrane (figure 12, arrows).

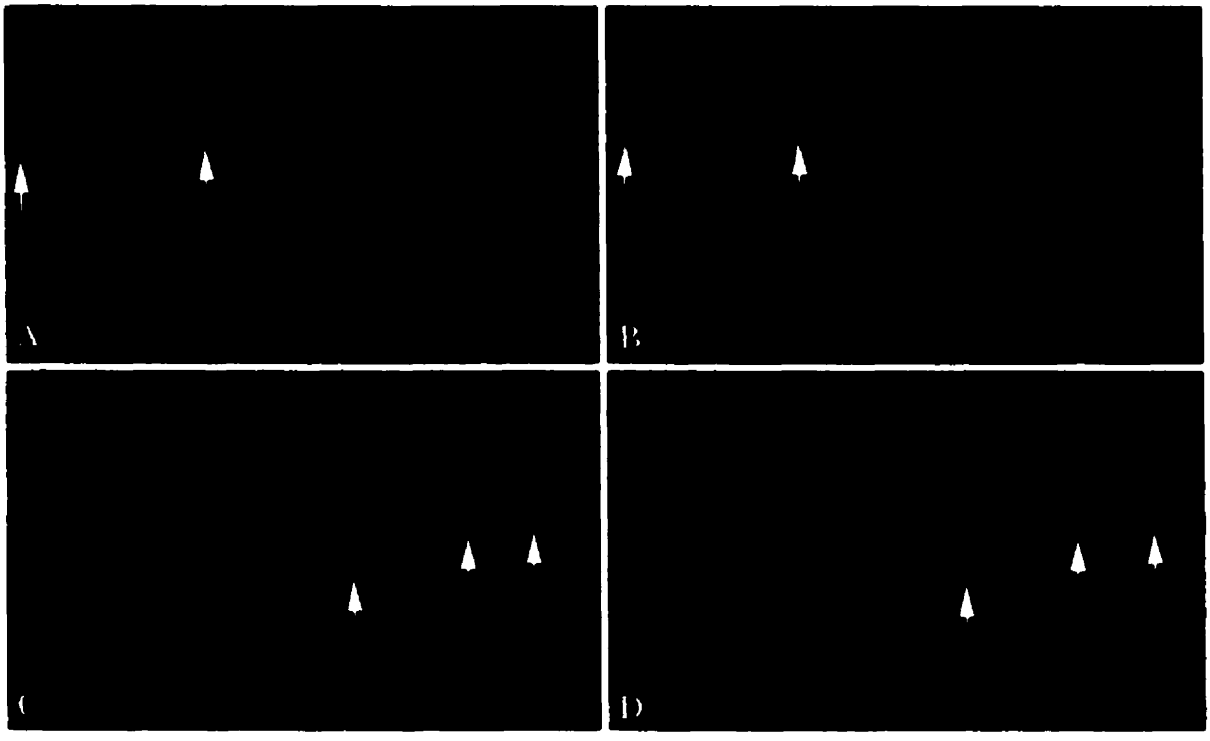

Figure 12. **Immunohistochemical characterization of the tubular structures.** ERD were produced by coculturing, for 30 days, HUVEC with fibroblasts as described in Materials and Methods. Frozen sections were double stained: vWF (B) colocalized with laminin (A) and PECAM-1 (D) with type IV collagen (C). The double staining of the frozen sections allowed the observation of both cellular and basement membrane components of the tubular structures (arrows). (Magnification: 20X).

Our group has demonstrated previously that the structures observed into the ERD were composed of ECs connected by numerous junctions (Black *et al*, 1998). Unfortunately, it was not possible with the ultrastructural observations of the structures to confirm that their lumen was present over their full length and that they were able to form a connecting network. Therefore, confocal laser scanning microscopy was performed in order to confirm that the endothelial structures did present capillary-like characteristics. vWF (figure 13; B), PECAM-1 (Figure 13; C and D) and laminin (Figure 13; A), revealed that the ECs were organized into capillary-like tubes that formed a network with several ramifications. The difference in the intensity of the staining suggest that this network extended over many levels (Figure 13; A, B and C). Moreover, the network was still in remodeling since some vascular sprouts were observed after 30 days of culture (Figure 13; A and C; arrows). At higher magnification (figure 13, D), PECAM-1 staining was shown to be located at the periphery of the ECs. Finally, the tubular structures were formed of many cells attached together in a tubular organization (figure 13, D) as previously observed using electronic microscopy (Black *et al*, 1998).

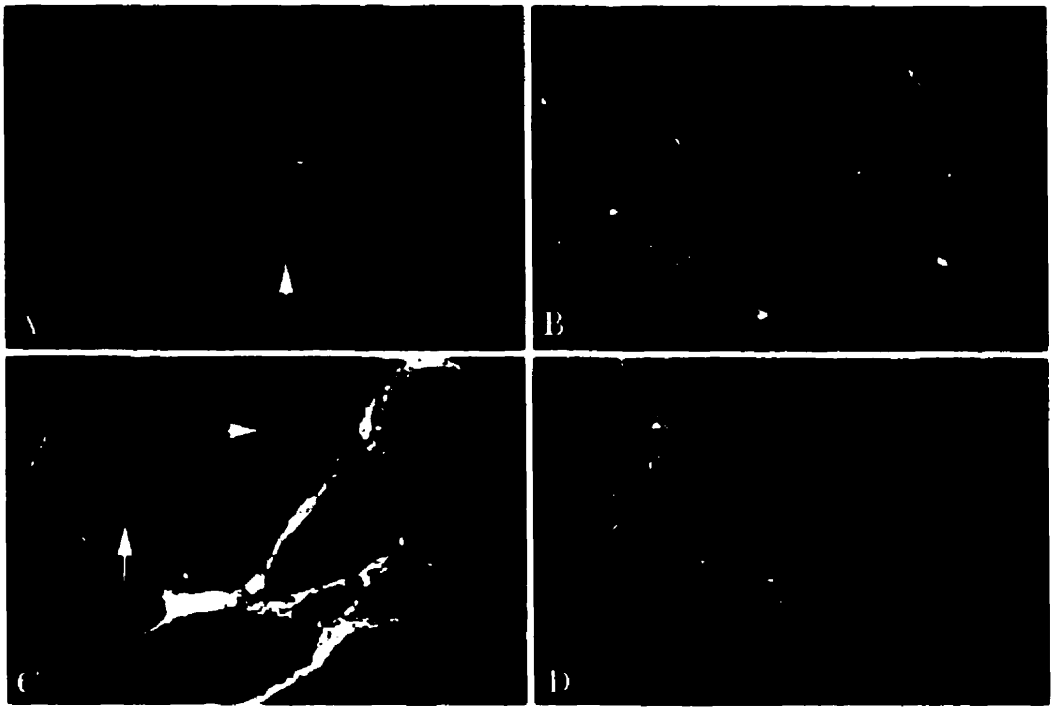

Figure 13. **Confocal images of the endothelial structures present in the ERD.** The structures were revealed with EC specific markers vWF (B), PECAM-1 (C and D) and basement membrane protein, laminin (A). The tubular structures formed a dense network with multiple connections between the capillary-like structures (A, B, C and D). Moreover, we observed the presence of developing sprouts (A and C, arrow). At higher magnification, we observed that the PECAM-1 staining was located on the endothelial cell membrane (D). (Magnification: 20X (A,B and C) and 60X (D)).

Three-dimensional reconstruction of the EC structures present in the ERD was performed to determine if the structures were real capillary-like ones (figure 14). Figure 3 A and B showed that the tubular structures did not remain at the surface of the ERD but tended to move down deeper in the ERD. Furthermore, the structures were anastomosing with one another and forming an extensive branching network (figure 14, A and B). The network was denser in the

superficial levels of the ERD compared to the network present in the deep levels of the ERD. Some branches of the upper portion of the ERD were orientated parallel to the surface (figure 14, A). A linear pattern of endothelial structures was observed perpendicular to the surface of the ERD. Finally, three-dimensional reconstruction confirmed that the structures were not cord-like ones but, real CLS. In fact, a well-defined lumen in the entire length of the tubules was observed (figure 14, C and D; arrows).

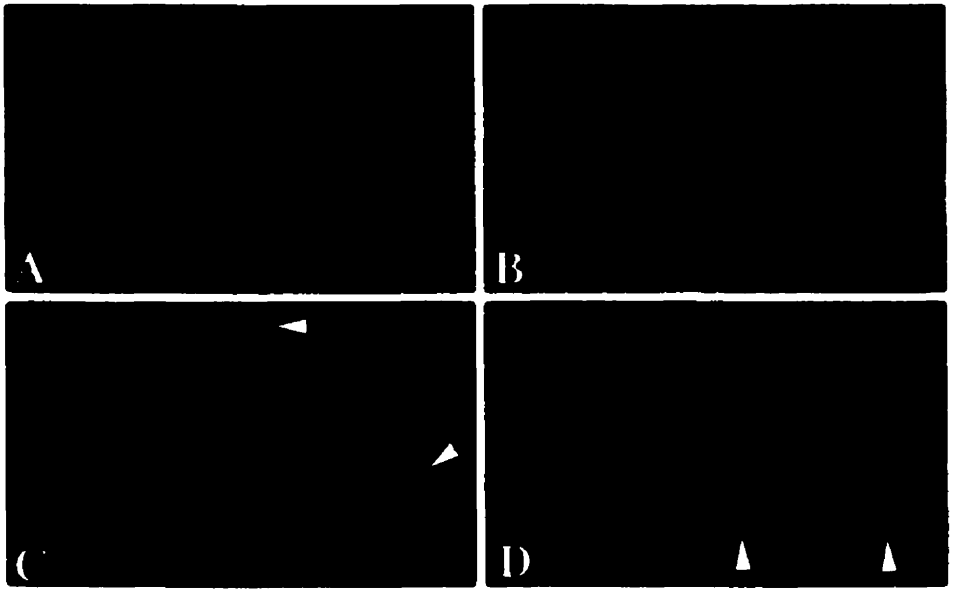

Figure 14. **Three-dimensional reconstructed images of the tubules.** The structures present in the ERD were stained with PECAM-1 and analyzed with CLSM. The tubular structures formed a dense network in the upper part of the DE, which was penetrating in the biopolymer (A). Moreover, the tubules showed an anastomosing pattern with multiple connections between the tubular structures (A, B). Figures (C) and (D), showed that the ERD contained CLS with a well-defined lumen rather than cord-like structures (arrows). This analysis confirmed the presence of real CLS in the ERD that formed a network with complex ramifications.

The ERD contained a branching network of true CLS. We demonstrated the potential of this model for the screening of different angiogenic and angiostatic molecules. To do so, we used angiogenic molecules, bFGF (Shing *et al*, 1984) and VEGF (Ferrara and Henzel, 1989), two proven angiogenic and mitogenic factors which are able to induce angiogenesis *in vivo* and the formation of tube-like structures *in vitro* (Pepper *et al*, 1990 and 1991; Montesano, 1992). Progesterone was used as an angiostatic factor, a steroid implicated in the control of angiogenesis that occurs during *corpus luteum* formation of the ovary (Jaggers *et al*, 1996). By observing histological cross-sections, it was noted that when the ERD was treated with one of the angiogenic molecules (Figure 15, C and D), the number of CLS was higher than in the control (figure 15, A). In addition, the tubules present in the ERD activated by VEGF or bFGF seemed larger than the control ones. On the other hand, the ERD treated with progesterone (Figure 15, B), showed fewer structures that seemed much smaller than control.

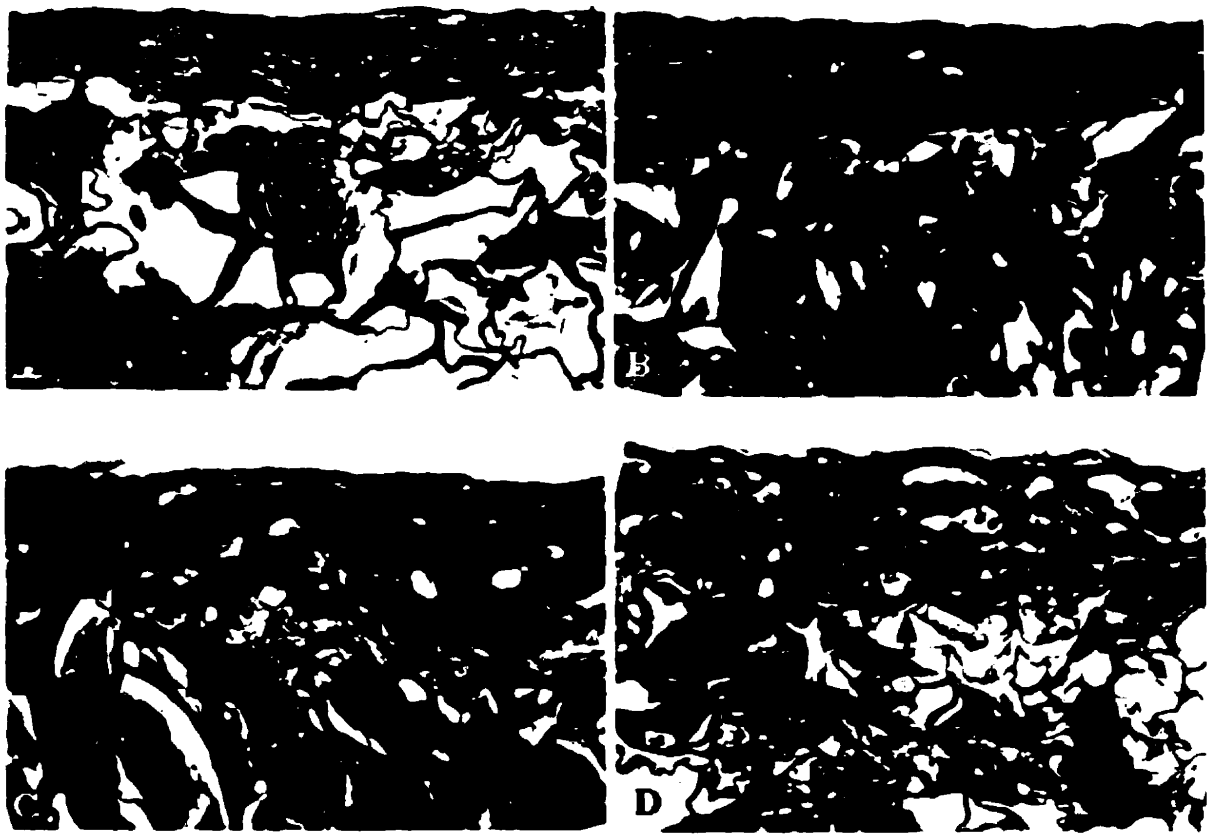

Figure 15. **Histological cross-section of the ERD after 20 days of culture in the presence of angiogenic or angiostatic agents.** Sections were stained with Masson's trichrome: the structure of the sponge is stained in dark blue, the neosynthetised ECM in blue, and the cells in pink. Note that when the *in vitro* model was treated with an angiogenic factor, VEGF (C) or bFGF (D), it showed more capillaries than the control (A). The number of cells seems also greater in the ERD stimulated with an angiogenesis-inducing agent (C, D). In contrast, when the ERD was treated with progesterone (B), the ERD showed a reduced number of CLS compared to the control (A). (Magnification: 20X)

Histological analysis of the ERD determined qualitatively the effect of the different molecules tested. Since some molecules can give ambiguous results, it is important to be able to quantify

the effects of the molecules tested to confirm their efficacy. Thus, microphotographs of the ERD were used to quantify different parameters of the tubules and to determine if the structures present in the ERD treated were significantly different from the control.

First, the vascular density of the ERD was determined by calculating the mean number of CLS per field for the different treatments (figure 16). When the ERD were stimulated with an angiogenic molecule, it showed more CLS (bFGF: 15,5 +/- 1,9; VEGF: 18,2 +/- 2,8) than the control (10,7 +/- 2,7) ($p= 8^{E-04}$ and 4^{E-05} respectively). On the other hand, the ERD treated with progesterone presented significantly fewer structures (4,4 +/-1,3) than the control ($p= 6^{E-05}$).

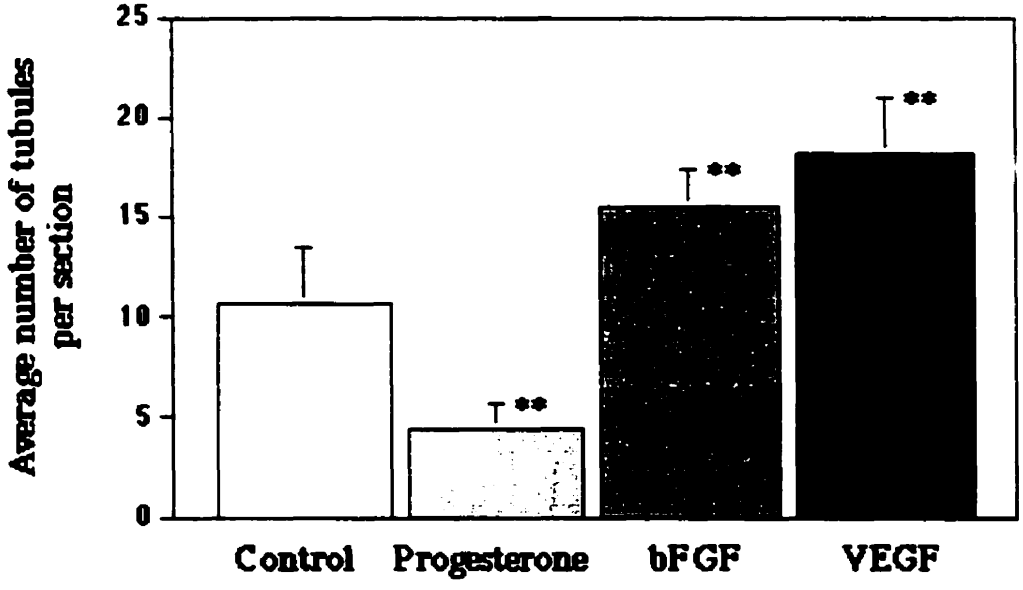

Figure 16. **Capillary-like density of the ERD after 20 days of treatment.** Values are expressed as the mean of the number of CLS counted per field of 0,21 mm^2 +/- SD. Results are from three random photographic fields per sample. Three separate experiments were

performed. Significant differences (**p< 0.01; bFGF and progesterone n=8, control and VEGF n=9) were observed between the number of CLS of the treated ERD and the control.

Furthermore, the mean area occupied by the CLS per field was calculated to determine if the products had any effect on the dimension of the structures (figure 17). The structures that had been stimulated with bFGF (315,7 +/- 45,4 μm^2) or VEGF (364,9 +/- 130,7 μm^2) were significantly larger than the control (240,7 +/- 79,5 μm^2) (p= 0,03 in both case) while the ERD treated with progesterone (78,2 +/- 23,3 μm^2) was smaller than the control (p= 2^E-04). Statistically significant results (p< 0,05) were obtained when the mean diameter of the CLS after the treatments was measured (figure 18).

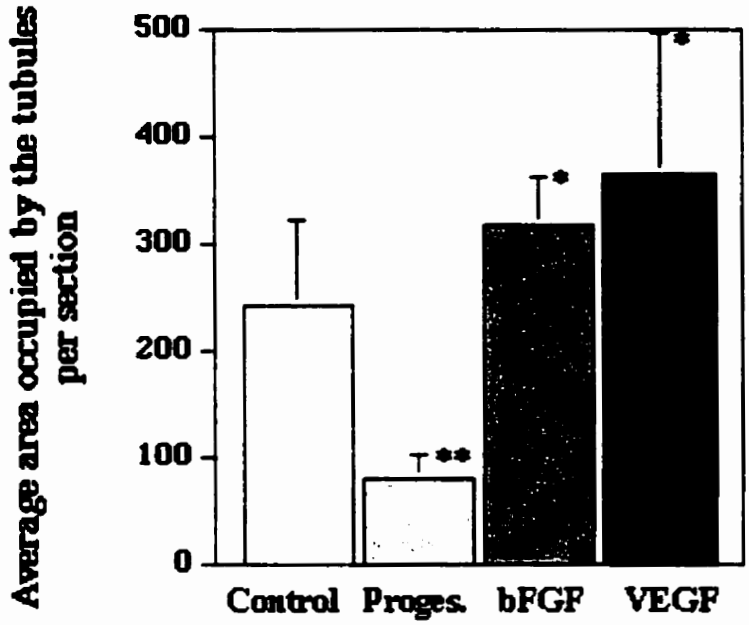

Figure 17. **Mean surface occupied by CLS in cross-section measured per field (0,21 mm^2) after 20 days of treatment.** The mean tubule area was measured with NIH image software and expressed in µm^2. Note that the mean area occupied by the CLS in the ERD cultured in the presence of an angiogenic or angiostatic agent compared with the control was statistically different. Student *t* test versus control: **p< 0,01, *p< 0,05; n=8 (progesterone and bFGF) or 9 (control and VEGF).

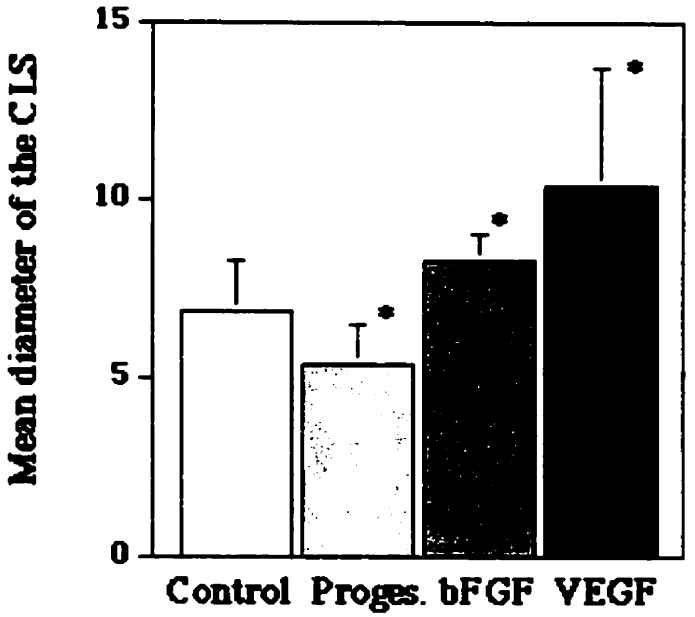

Figure 18. **Mean diameter of the CLS after 20 days of treatment.** The diameter of the VEGF (10,3 +/- 3,2 µm) and bFGF (8,3 +/- 0,7 µm) treated ERD were larger then the control (6,8 +/- 1,4 µm) while the samples incubated with progesterone were smaller (5,3 +/- 1,1 µm). Note that the mean diameter of capillaries *in vivo* is between 5 to 10 µm (Simionescu and Simionescu, 1988). Student *t* test versus control: *p< 0,05; n=8 (progesterone and bFGF) or 9 (control and VEGF).

F. Discussion

In this paper, we have pursued the characterization of an *in vitro* angiogenesis model. The endothelial nature of the structures present in the ERD and the presence of basement membrane components within the same structure were confirmed by a double immunofluorescence staining with specific markers to vessels *in vivo*. PECAM-1 staining was observed in periphery of the EC. This observation is consistent with the fact that PECAM-1 is a cell adhesion molecule located mainly to intercellular junctions of EC and that it is essential in the establishment of endothelial cell-cell interactions and the initial formation of tubules (Schimmenti *et al*, 1992 ; Newman, 1997 ; Yang *et al*, 1999). The presence of basement membrane proteins revealed that the structures had reached a certain degree of differentiation. Furthermore, we have demonstrated, with CLSM, that the tubules observed in the ERD were real CLS. In other models described in the literature (Nicosia and Ottinetti, 1990b; Bikflavi *et al*, 1991; Sage and Vernon, 1994), the structures formed by EC are cords were lumen are rarely found. In cases were lumen have been described, basement membrane proteins were found on apical and basal endothelial surface. Contrarily to those models, the ERD showed CLS with a well-formed lumen present in the entire length of the tubules, basement membrane proteins on the basal side of the ECs and the organization into a complex network with branching morphology.

We have also shown that when the ERD was stimulated by angiogenic compounds (VEGF or bFGF) it presented significantly more CLS than the control and were also larger in terms of diameter and surface occupied. In contrast, when the ERD was treated with progesterone, the CLS had limited growth, reduced diameter and smaller area compared to the control. It should be noted that the diameter of the CLS was in the range of *in vivo* values, which is between 5-10 µm (Simionescu and Simionescu, 1988). Thus, our model has proven to be efficient, both

qualitatively and quantitatively, to screen substances and to discriminate between angiogenic and angiostatic molecules.

Over the past several years, significant progresses have been made in the understanding of angiogenesis and its control. The use of numerous *in vivo* and *in vitro* systems (Cockerill *et al*, 1995 ; Ribatti and Vacca, 1999) has facilitated the assessment of angiogenesis control, in which angiogenic and angiostatic substances intervene. Identification and understanding of the molecules that regulate angiogenesis is critical because it would provide novel diagnostic and therapeutic applications to different clinical situations such as tumor angiogenesis and wound healing (Folkman and Klagsbrun, 1987; Folkman and Shing, 1992; Risau, 1995; Folkman, 1985; 1995).

Even if *in vivo* models have been useful to study many aspects of angiogenesis, they present major drawbacks such as significant cost and non-specific inflammatory response from the host. *In vitro* models have been developed to reproduce the formation of capillary-like tubules by the EC. Unfortunately, most of these models are produced with only one ECM component and with animal EC (Cockerill *et al*, 1995). Interactions with other cell types and with a complex ECM are deemed essential for angiogenesis (Madri and Williams, 1983; Klagsbrun and D'Amore, 1991; Montesano *et al*, 1993; Villaschi and Nicosia, 1994; Black *et al*, 1998). The assay used in this study allows human EC to form such interactions and thus permitted us to analyze angiogenesis in a more complex environment, which represents better the *in vivo* situation comparatively to other three-dimensional angiogenesis models.

Other angiogenic and angiostatic molecules should be tested with our angiogenesis model in order to compare their efficacy. Most angiostatic molecules inhibit the formation of neovessels

by inhibiting the proliferation and migration of EC instead of killing these cells (Folkman, 1995). To determine when and how a molecule acts during the process of angiogenesis, it should be added in the medium at different times during the production of the ERD. Furthermore, by investigating at different levels the mechanisms of action of angiogenic molecules, it could allow the development new ways to block their activities. It has been shown that the antiproliferative activity might be generated by a direct interaction between an inhibitor and an angiogenic factor: 16kDa prolactin inhibits VEGF while PF-4 blocks FGF-2 dimerization (D'Angelo *et al*, 1995). By using different combination of angiogenic and angiostatic molecules at the same time, it would also be possible to investigate their mechanism of action on the regulation of their mutual expression. It will be also interesting to determine whether combinations of different molecules have synergistic or antagonistic effects on the *in vitro* angiogenic response and to examine the relative potency of molecules when they are combined.

Heterogeneity between EC from different sources is well established (McClure, 1921 ; Majno, 1965 ; Garlanda and Dejana, 1997 ; Craig *et al*, 1998). Microvascular EC are functionally distinct from the macrovascular EC (Jackson and Nguyen, 1997 ; Mason *et al*, 1997 ; Hudlicka *et al*, 1998). Their properties can even vary within a single microvessel (Tsuboi *et al*, 1990). It also has been shown that EC from pathological states differ from normal ones (Thorin and Shreeve, 1998). EC implicated in tumoral angiogenesis, wound healing and inflammation originate mainly from microvessels. Human or animal macrovascular EC have been used for *in vitro* studies even if many pathological processes occur at microvascular level (Montesano *et al*, 1993; Villaschi and Nicosia, 1994; Cockerill *et al*, 1995; Craig *et al*, 1998). Therefore, it would be preferable to use appropriate EC and to maintain their specific properties *in vitro* to ensure that the model is as close as possible to reality. Since many techniques have been developed to isolate selectively and to culture pure population of human

dermal microvascular EC (Marks *et al*, 1985; Conradlapostolle *et al*, 1996; Gupta *et al*, 1997; Richard *et al*, 1998) or even isolate EC and their progenitors from peripheral blood (Boyer *et al*, 2000), it will be possible to improve our model by using one of these methods.

Since Folkman first postulated that angiogenesis was essential for solid tumor growth, research has focused on the role of angiogenesis in tumor progression and identifying molecules that block or disrupt the angiogenic process (Folkman *et al*, 1971 ; Folkman, 1971, 1972 and 1985). Recently, St. Croix *et al* compared the gene expression patterns of endothelium derived from normal and malignant colorectal tissues and demonstrated that these were, in general, different from one an other (St. Croix *et al*, 2000). Furthermore, it could be interesting to study tumor-induced angiogenesis by including human tumor cell lines in the model. In order to improve the model, it would be preferable to include EC or different cell types derived from various tumors.

Angiogenesis is a complex phenomenon regulated by numerous elements: expression of growth factors and their receptors (VEGFs, FGFs, angiopoietins, ephrins) (Neufeld *et al*, 1999; Gale and Yancopoulos, 1999), the dual action of proteinases and their inhibitors (MMPs vs TIMPs, PAs vs PAIs) (Mignatti *et al*, 1996; Haas and Madri, 1999), composition of the extracellular matrix (Black *et al*, 1998; Nicosia and Madri, 1987, Villaschi and Nicosia, 1994), expression of adhesion molecules (integrins, PECAM, VE-cadherin) (Brooks, 1996; Yang *et al*, 1999; Newman, 1997) and action of some cellular components (pericytes) (Diaz-Flores *et al*, 1992a; Hirschi and D'Amore, 1997). This angiogenesis model would be a useful tool to investigate the coordination and the role of these factors during capillary development. Furthermore, the skin is an organ frequently affected by inflammatory diseases and thus represented an ideal organ in which to study expression of adhesion molecules and their

relationship to inflammatory events (Black *et al*, in preparation). The ERD will also be an excellent tool in pharmacotoxicological tests and thus, could replace animal testing.

This model is very well suited to study the potential of drugs *in vitro* since it supports the formation of CLS in minimal culture conditions with human EC which have demonstrated physiological reaction to angiogenic and angiostatic molecules. In addition, our three-dimensional system is a good model to study neovascularization in different contexts and will certainly contribute to our understanding of EC physiology in an environment that approaches the *in vivo* situation. The production of endothelialized organs by tissue engineering opens tremendous new possibilities in the comprehension of angiogenesis dependent events.

CHAPITRE IV

PEAU RECONSTRUITE ENDOTHÉLIALISÉE HUMAINE GREFFÉE SUR DES SOURIS ATHYMIQUES: ANASTOMOSE DU RÉSEAU DE TUBULES ENDOTHÉLIAUX AVEC LES CAPILLAIRES DU LIT DE LA PLAIE

Chapitre IV. Peau reconstruite endothélialisée humaine greffée sur des souris athymiques: Anastomose du réseau de tubules endothéliaux avec les capillaires du lit de la plaie

Human Endothelialized Reconstructed Skin Transplanted on Nude Mice: Inosculation of Capillary-Like Structures with Wound Bed Capillaries

Valérie Hudon[1], François Berthod[1], Annie F. Black[1], Danielle Larouche[1], Lucie Germain[1], and François A. Auger[1]

[1] Laboratoire d'Organogenèse Expérimentale, Hôpital du St-Sacrement and Département de chirurgie, Faculté de médecine, Université Laval, Québec Canada

A. *Résumé*

Un des principaux obstacles aux greffes de peaux reconstruites (PR) chez les grands brûlés est l'absence de structures vasculaires dans le derme qui peut ralentir le processus de revascularisation du greffon et provoquer la nécrose de l'épiderme par manque d'apport nutritif. Nous avons mis au point une peau reconstruite endothélialisée (PRE) dans laquelle les cellules endothéliales (CE) humaines forment spontanément des tubules ressemblant à des capillaires. L'objectif de ce projet est de démontrer que la greffe d'une PRE permet d'accélérer le processus de revascularisation du greffon par connexion des capillaires présents dans le greffon avec ceux de l'hôte, accélérant ainsi le processus de revascularisation. Nous avons greffé sur des souris athymiques dans des chambres de Fusenig, des PRE composées de

kératinocytes, de fibroblastes et de CE humaines cultivées dans une éponge de collagène/ glycosaminoglycanes/ chitosane. Des biopsies ont été prélevées 2, 4 et 7 jours après la greffe afin d'analyser en histologie et en immunohistochimie l'évolution des réseaux capillaires humains et murins dans le greffon. Pour mettre en évidence une anastomose entre les capillaires humains et murins, nous avons marqué le sang murin avec un colorant. Nos résultats indiquent que la greffe d'une PRE induirait une augmentation de la vitesse de vascularisation du greffon. En effet, des vaisseaux contenant du sang sont observés à proximité de l'épiderme de la PRE 7 jours après la greffe tandis que des vaisseaux contenant du sang prennent 15 jours avant d'atteindre l'épiderme dans une PR traditionnelle. Nous avons donc mis en évidence l'établissement accéléré après greffe d'un réseau vasculaire fonctionnel dans la PRE.

B. Abstract

Wound coverage with an autologous *in vitro* reconstructed skin (RS) made of both dermis and epidermis should be the best alternative to split-thickness grafts for patients with extensive burns. Unfortunately, different obstacles have delayed the use of composite RS. One of the reasons proposed for the poor survival of RS is insufficient vascularization. Previously, we have developed an endothelialized human tissue engineered skin in which a network of capillary-like tubes has spontaneously formed. The aim of this project was to verify if the transplantation of our endothelialized reconstructed skin (ERS) could accelerate graft revascularization by inosculation of its pre-existing capillary-like network with the host's own blood vessels, as it is observed in full thickness skin autografts. This is the first attempt to demonstrate an inosculation process between wound bed capillaries and capillary-like structures generated in a tissue engineered RS. The ERS were produced by the co-culture of

three human cell types, keratinocytes, fibroblasts and umbilical vein endothelial cells, in a collagen/ glycosaminoglycans/ chitosan biopolymer. The ERS were grafted on nude mice in a Fusenig chamber. Histological and immunohistochemical analyses were performed on biopsies taken 2, 4 and 7 days after transplantation in order to observe the evolution of the capillaries in the skin graft. Immunohistochemical analysis of the ERS exhibits several characteristics associated with the microvasculature *in vivo* such as von Willebrand factor, PECAM-1 and basement membrane components. We showed that 7 days after transplantation, capillaries containing blood cells were observed under the epidermis of the ERS, while none could be detected in standard RS before 15 days. The growth of new mouse capillaries from the recipient bed into the graft was detected only in the third inferior part of the ERS at day 7. These results suggest that the initial vascularization in the ERS is the result of inosculation rather than neovascularization. The transplantation of our ERS on humans should accelerate graft vascularization by the anastamosis of the pre-existing vascular-like network of the ERS with the recipient bed's capillaries. These results open many possibilities for implantation of other tissue-engineered structures requiring vascularization.

C. Introduction

Wound coverage with an autologous *in vitro* reconstructed skin (RS) made of both dermis and epidermis should be the best alternative to split-thickness grafts for patients with full-thickness cutaneous wounds. Unfortunately, various drawbacks have delayed the clinical application of RS (Berthod and Damour, 1997). Lack of vascularization after grafting has been suggested as one of the major reason for poor graft take and survival of RS (Boyce, 1996). This lack of adequate blood supply is also an obstacle to the development of many tissue engineered organs.

Young *et al* have described the two mechanisms responsible for the phenomenon of revascularization of human full thickness skin graft on nude mice: inosculation and neovascularization (Converse and Ballantyne, 1962 ; Haller and Billingham, 1967 ; Lambert, 1971 ; Demarchez *et al*, 1987). They showed that when human skin was grafted on athymic mice, initial vascularization was limited solely to anastamosis of severed ends of human vessels in the graft to mouse vessels from the recipient's bed (Young *et al*, 1996). Neovascularization, the growth of completely new capillaries from the recipient's bed into the graft, is a later process. Since RS does not present a capillary network, it survives by diffusion of nutriment through the graft (imbibition) until neovascularization occurs.

Previously, we have developed an endothelialized reconstructed skin (ERS) in which a network of human capillary-like structures (CLS) was spontaneously formed within the dermis (Black *et al*, 1998). The ERS showed the organization of CLS into a complex network with branching morphology. Furthermore, the tubules observed in the skin model were real CLS with a well-formed lumen on the entire length of the tubules as it was observed with confocal laser scanning microscopy (Hudon *et al*, chapitre 3). Since this RS contains its own capillary-like network, it could vascularize in the same manner as full thickness human skin grafts by establishing blood flow through inosculation (Young *et al*, 1996; Black *et al*, 1998). The aims of this study were to observe the inosculation process within a tissue engineered ERS in order to determine if the transplantation of the ERS could accelerate graft revascularization.

D. Material and Methods

1. Human keratinocyte and dermal fibroblast isolation

Keratinocytes and human fibroblasts were isolated from human skin biopsies after breast reductive surgeries as previously described (Germain *et al*, 1993; Auger *et al*, 1995). Keratinocytes were grown in Dulbecco-Vogt modification of Eagle's medium (DMEM) with Ham's F12 in a ratio 3 :1 (Flow Lab., Mississauga, Canada), supplemented with 24,3 µg/ml adenine, 10 µg/ml human epidermal growth factor (Chiron Corp., Emeryville, Calif.), 5 µg/ml bovine insulin, 5 µg/ml human transferrin, $2X10^{-9}$ M 3, 3', 5', triiodo-L-thyronin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 0,4 µg/ml hydrocortisone (Calbiochem, LaJolla, Calif.), 10^{-10} M cholera toxin (Schwarz/Mann, Cleveland, Ohio), 100 U/ml penicillin and 25 µg/ml gentamicin (Schering, Pointe Claire, Canada), and 10% newborn calf serum (CS, Fetal clone II, Hyclone, Logan, Utah), and used at the second passage as previously described (Germain *et al*, 1993). Fibroblasts were grown in DMEM (Flow Lab.) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Immunocorp, Montreal, Canada), antibiotics (100 U/ml of penicillin G, and 25 µg/ml of gentamicin) in 8% CO_2 at 37°C.

2. Human umbilical vein endothelial cell isolation

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were obtained from healthy newborns by enzymatic digestion with 0.153 IU/mg collagenase H (Boehringer Mannheim, Laval, Canada), as previously described (L'Heureux *et al*, 1993; L'Heureux *et al*, 1998). Veins were canulated at both ends and washed with calcium-free HEPES solution (Flow Lab). A collagenase solution was then injected to rinse and fill the vein and the cord was placed in HEPES with 5

mM $CaCl_2$ at 37°C. After a 15 minute incubation, the veins were perfused with M199 medium (Sigma, Mississauga, Canada) containing 10% Fetal clone II (Hyclone) and antibiotics (100 U/ml of penicillin G, and 25 μg/ml of gentamicin).

Endothelial cells (EC) were centrifuged and resuspended in M199 medium supplemented with 20% NCS, 2.28 mM glutamine, 25 000 IU/ml heparin (Leo Laboratories, Pickering, Canada), 19 μg/ml endothelial cell growth supplement (Sigma) and antibiotics (100 U/ml of penicillin G, and 25 μg/ml of gentamicin) (Gordon *et al*, 1983). HUVEC were plated on gelatin-coated tissue culture flasks. EC characterization was assessed as previously described (L'Heureux *et al*, 1993).

3. Collagen/ glycosaminoglycan/ chitosan biopolymer preparation

Collagen/ glycosaminoglycan/ chitosan biopolymers were prepared as previously described (Shahabeddin *et al*, 1990 ; Saintigny *et al*, 1993 ; Berthod *et al*, 1993 ; Damour *et al*, 1994). These sponges were obtained with type I, III bovine collagen, chitosan (95% deacetylated) (Laboratoire Perouse Implant, Chaponost, France), and chondroitin 4-6 sulfates (Laboratoire Perouse Implant, Chaponost, France) then were dissolved in 0,1% acetic acid and mixed. Then, 2,5 ml/well (9 cm^2) of the final solution was poured into 6 well plates (Becton Dickinson, Toronto, Canada) and frozen overnight at –70°C. The frozen plates were then lyophilized in a Genesis 12EL vacuum lyophilizer (Virtis, Gardiner, N.Y.), submerged in 70% ethanol for 48h, rinsed and equilibrated in 7 ml of supplemented DMEM, and incubated at 37°C with 8% CO_2 for a minimum 48h

4. Reconstructed skin and endothelialized reconstructed skin preparation

Two different RD were produced: 1) The standard RD was prepared by adding a suspension of 2,1 X 10^5 fibroblasts/cm^2 on top of the biopolymer; 2) The ERD was produced by seeding a suspension 1:1 ratio of fibroblasts and of HUVEC (Black *et al*, 1998). The RD and the ERD were cultured for 10 days in a medium containing 50 µg/ml ascorbic acid (Sigma) and DMEM supplemented with 10% FCS and M199 supplemented with 20% NCS in a ratio 1:1. The medium was changed 3 times a week.

Human keratinocytes were plated on the RD and the ERD at a concentration of 2,1 X 10^5 cells/cm^2. All RS were cultured in complete medium with 10% NCS (as described above) and 50 µg/ml ascorbic acid under submerged conditions for 7 days. The RS were then elevated at the air-liquid interface for the remaining 14 days in DME-Ham's F12, supplemented with 10% NCS, 0,4 µg/ml hydrocortisone, 5 µg/ml insulin, 50 µg/ml ascorbic acid, and antibiotics.

5. Animals and surgical manipulations

Adult male athymic nu/nu mice (42 days old) (Charles River Laboratories, Lasalle, Canada) were used for these experiements (Lopez Valle *et al*, 1992; Auger *et al*, 1993; Xu *et al*, 1996; Li *et al*, 1997). The mice were injected with ceftazidime (3 mg/mouse, Glaxo, Toronto, Canada) 24 and 48 h before surgery to prevent infections. Ampicilin and gentamicine sulfate (100 U/ml and 26 mg/l respectively; Novopharm limited, Toronto, Canada) were also added to the mice's sterile drinking water. Animals were anesthetized by inhalation of Isoflurane USP (Schein Pharmaceutical, Etobicoke, Canada). A 2 cm incision was made through the dorsal skin. The loose connective tissue under the *panniculus carnosus* was excised. A silicone

Fusenig chamber (Worst *et al*, 1974) (made in our laboratory) was implanted and stitched to the mouse skin. Human skin from breast reductive surgery was used as positive control. The skin was washed in PBS supplemented with antibiotics in order to remove the remaining blood. A 9 cm^2 human skin was cut to be the same size as the RS and the ERS. All 3 different samples were deposited directly on the dorsal muscle of the mouse. A cap was used to close the chamber for the first 4 days after grafting. Mice were sacrificed at 2, 4 and 7 days postgrafting for analysis. An intracardiac injection of India ink was performed to facilate the detection of blood flow within the capillaries and/or CLS. The experiment was performed twice and gave similar results. A total of 42 mice were grafted. All manipulations of animals were done according to the rules established by the Canadian Council on Animal Care.

6. Histological analysis

Samples were fixed with Bouin's solution and embedded in paraffin. Six µm sections were cut and stained using Masson's trichrome to determine the presence of CLS with blood cells and/or with India ink in the graft.

E. Results

Grafts on nude mice were performed with 3 different types of graft: RS, ERS and human skin (figure 19). The RS were considered as negative control while human skin was used as positive control to validate our grafting method. At the time of the grafting, the 2 types of RS showed a differentiated epidermis (figure 19, A and B). CLS were found in the dermal part of the ERS (figure 19, B; arrows) while none could be observed in the traditional RS. These CLS

were found in the upper part of the RD. Note that the capillaries present in the human skin did not contain red blood cells at the moment of the graft (figure 19, C; arrows).

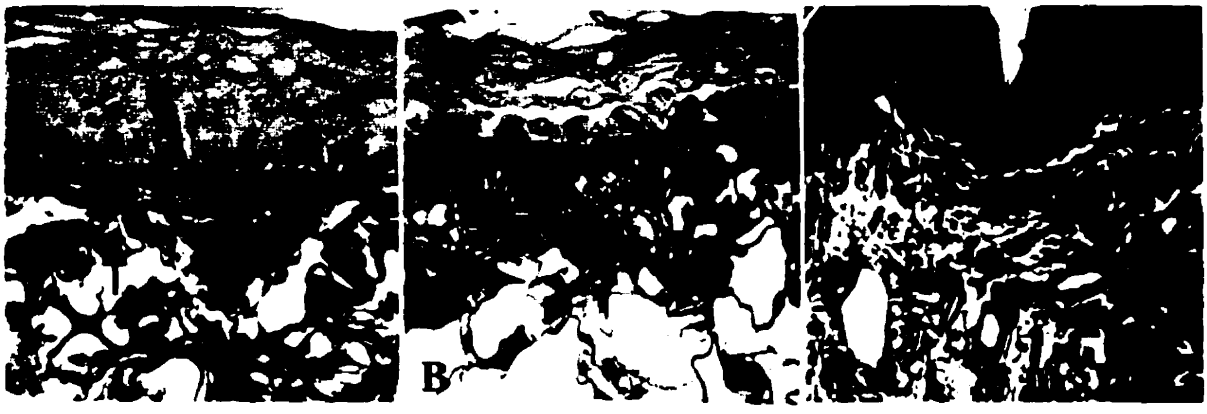

Figure 19. **RS, ERS and human skin histology before transplantation.** The sections were stained with Masson's trichrome. The RS (A) or the ERS (B) presented after 31 days of culture a well-defined epidermis. We can observe the presence of CLS in the ERS (B; arrows); these structures were absent from the RS (A). Note that the capillaries present in the human skin did not contain red blood cells at the moment of the graft (figure 18, C; arrows).

It was important to demonstrate that vascularization of the human skin that was grafted was due to an inosculation process (Young *et al*, 1996). The reestablishment of blood flow was determined with histological analysis by detecting red blood cells and/or India ink within the vessels. Two days after grafting, it was possible to detect red blood cells in two out of three human grafts (figure 20, A). All the skin samples harvested after 4 or 7 days showed vessels filled with red blood cells (figure 20, B and C). It seems likely that the initial process of vascularization was the result of anastomosis instead of neovascularization. The capillaries containing red blood cells could be observed everywhere in the graft even under the epidermis (figure 20). Therefore, our results for the split-thickness skin grafts supports those obtained by

Young *et al* confirming that inosculation occurs in human skin grafts, it is an early process and that our grafting methods were adequate.

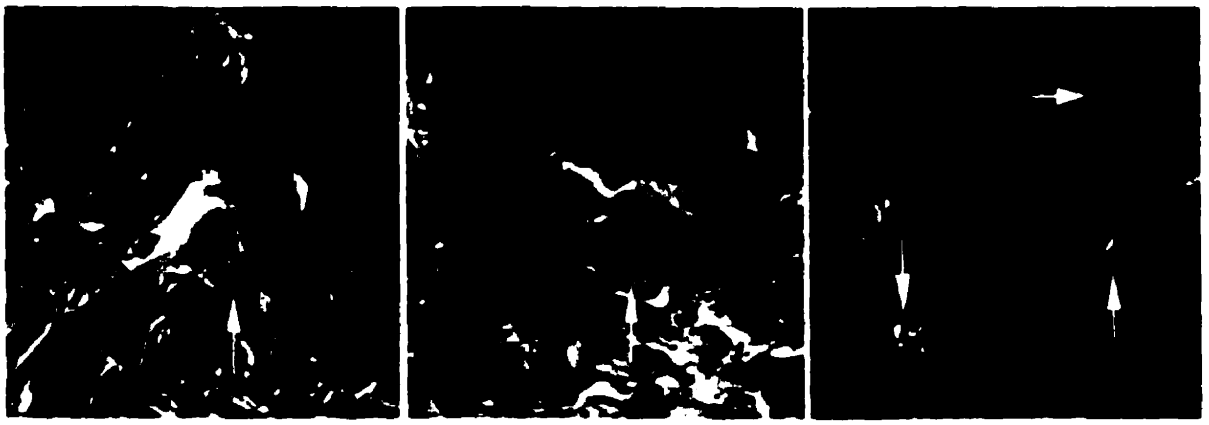

Figure 20. **Vascularization of human skin grafted on athymic mice.** The sections were stained with Masson's trichrome and observed 2 (A), 4 (B) and 7 (C) days after grafting. Red blood cells in graft capillaries were observed in two out of three grafts harvested at day 2 (A). At 4 (B) or 7 (C) days after the transplantation, all grafts contained blood. It seems likely that the initial process of vascularization was the result of inosculation instead of neovascularization.

Analysis of RS and ERS after 7 days showed CLS in the dermal part of the ERS in which the presence of red blood cells and India ink was detected (figure 21, A and B). These vessels were located immediately under the epidermis. No blood vessels could be detected in the RS under the epidermis (figure 21, C). Furthermore, we could observe the presence of vessels in the bottom third of the RS and ERS which were the result of neovascularization from the recipients wound bed since they were stained with a specific antibody for mouse EC (data not showed). No EC stained with this antibody could be detected elsewhere in the RS or ERS. The

blood vessels founded in the upper part of the grafts stained positively for EC markers but negatively for specific murin EC one.

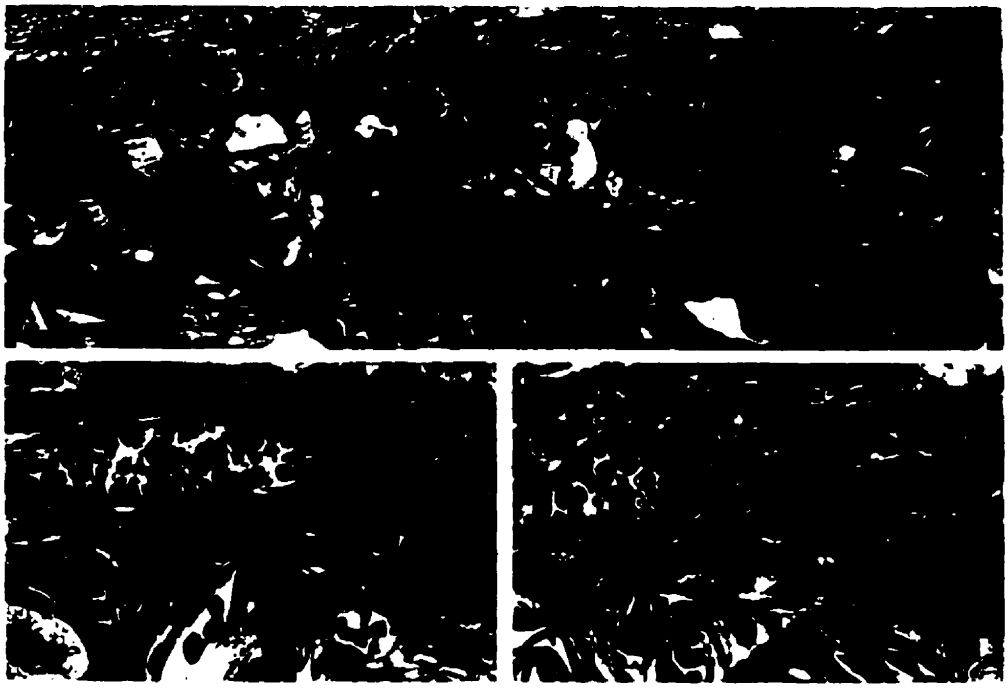

Figure 21. **Vascularization of RS and ERS 7 days after grafting.** Sections were stained with Masson's trichrome. Our results suggest that the capillary-like network improved the vascularization of the ERS. Indeed, 7 days after transplantation, CLS containing red blood cells were observed under the epidermis of the ERS (B and C), while none could be detected in RS (A).

F. Discussion

One of the principal restriction to the use of RS for wound coverage is the delay in vascularization that can diminish the graft take and provoke necrosis of the epidermis because

of the lack of nutriments (Boyce, 1996). We hypothesized that a RS containing a capillary-like network should vascularize the same manner as transplanted full thickness human skin and thus, allow a faster vascularization by inosculation between the capillaries of the graft and the wound bed (Converse *et al*, 1975; Young *et al*, 1996). Thus, it was of clinical relevance to produce a RS that contained a network of CLS to improve vascularization of the traditional RS. We had previously developed an ERS that sustained the spontaneous formation of CLS with human EC in simple culture conditions (Black *et al*, 1998 and 1999). We confirmed that the tubules observed in the ERS were true CLS with a well-formed lumen in the entire length of the tubules, with basement membrane proteins on the basal side of the EC. This CLS was organized into a complex network with branching morphology (Hudon *et al*, in preparation). The mean diameter of the CLS was in the range of *in vivo* values, between 5 to 10 μm. Furthermore, the ERS model reacted physiologically when treated with angiogenic or angiostatic molecules. In the present study, we describe that the inclusion of EC in a RS accelerates the process of vascularization compared to traditional RS. Our results suggest that the initial process of vascularization was the result of anastomosis supported by neovascularization. To our knowledge, this is the first demonstration of an inosculation process between wound bed capillaries and CLS generated in a tissue engineered RS.

The human skin grafts allowed the validation of our methods. Two days after the graft, 2 out of 3 ERS presented capillaries filled with red blood cells and/or India ink. After 4 and 7 days, we observed the presence of red blood cells within the capillaries in all the samples. The vessels in which blood circulation was observed were homogeneously distributed in the graft. Thus, we confirmed the results obtained previously by Young *et al* (Young *et al*, 1996). Furthermore, we observed that the establishment of blood circulation occurred faster within the ERS than the traditional RS. Indeed, CLS filled with red blood cells and/or India ink were

present under the epidermis of the ERS after 7 days while the RS showed vessels only in the lower third of the dermal portion. Thus, grafting of RS containing a CLS network accelerates the process of vascularization.

The difference of revascularization time obtained between the human skin and the ERS, (2 to 4 days vs. 7 days respectively) can be explained by a discrepancy in the extent of the distribution of capillaries in the human skin vs the ERS. Indeed, the vessels presented in the human skin reached the lowest part of the graft while the CLS of the ERS were confined in its upper part. Since capillaries were located at the bottom of the human skin graft, it allowed a faster anastomosis with capillaries from wound bed than in the case of the ERS. For the ERS, establishment of blood circulation occurred when the CLS and the capillaries from the wound bed grew enough to be able to connect.

We suggest that the vascularization of the ERS is the result of the growth activation of human CLS and capillaries and the anastomosis between human and mice vessels. We consider the environment of the graft particularly rich in growth factors. Indeed, in a wound environment, there is secretion of angiogenic molecules by different types of cells that become activated (Brown *et al*, 1992; Hakvoort *et al*, 2000; Trompezinski *et al*, 2000). Furthermore, keratinocytes are known to express VEGF in culture (Ballaun *et al*, 1995 ; Viac *et al*, 1997) and fibroblasts to present angiogenic properties *in vitro* (Villashi and Nicosia, 1994). Activated EC present are also able to express different angiogenic factors (Antonelli-Orlidge *et al*, 1989 ; Namiki *et al*, 1995 ; Seghezzi *et al*, 1998 ; Yamagishi *et al*, 1999). Thus, the angiogenic molecules present in the graft environment could contribute to enhance mice capillary and human CLS growth so that they can be in contact. Furthermore, the vascularization in the ERS graft could not be the result of neovascularization solely since mice EC remained in the inferior portion of the RS and ERS after 7 days. We consider that the

initial vascularization within the ERS is the result of an inosculation phenomenon rather than neovascularization. Indeed, mice capillaries could not be detected under the epidermis of SE grafted on nude mice until 15 days after the graft (Berthod *et al*, submitted for publication).

It would be possible to optimize these graft results by improving our culture conditions in order to attract the CLS toward the inferior portion of the ERS. Culture of the ERS in presence of well-known angiogenic molecules such as VEGF or bFGF, while they are at the air-liquid interface could attract the CLS deeper in the ERS. Those factors would also have beneficial effects on the production of the ECM and thus stimulate the formation of CLS. Furthermore, it would be possible to include keratinocytes or fibroblasts genetically modified to express angiogenic growth factor (Supp *et al*, 2000). Thus, we could increase the quantity of CLS present in the ERS and further reduce the time of vascularization.

It would be interesting to perform long term grafts in order to analyze the remodeling of the CLS. It would be important to use EC previously marked to simplify the detection of human EC of the ERS and the analysis. EC transformed to express GFP (Green Factor Protein) would be efficient as a long lasting method to identify EC (Dehio *et al*, 1998). It would then be possible to observe and determine the survival of human EC within the graft in long term studies. Such studies would also allow the analysis of the influence that these two phenomenons have on one another, angiogenesis and innervation. It has been demonstrated that angiogenesis precedes innervation in skin grafts and that the initial regenerative fibers appears associated with the newly formed vessels (Gu *et al*, 1995 ; Hobson *et al*, 1997 ; Kangesu *et al*, 1998). Furthermore, the presence of keratinocytes seems to influence directly the regenerative vessels and nerves (Kangesu *et al*, 1998). Thus, there is a relation between nerve regeneration and angiogenesis. By grafting the different RS for long periods, it would be

possible to study the interactions of the CLS of the ERS with the regenerative nerves fibers and to verify if the presence of the CLS favor the emergence of nerve fibers in the ERS.

Since red blood cells observation can be difficult due to the small size of the vessels and impossible in the case of immunohistochemical studies, intracardiac injection of India ink was performed to stain the blood in order to facilitate detection of blood flow within the different types of grafts. This staining was mostly effective for the wound bed-graft junction and human skin graft. The vessels observed in the RS rarely contain blood cells. Since it is impossible to observe red blood cells in frozen sections, it is preferable to stain blood with India ink to detect blood into vessels. It is important to ensure that the India ink staining is within the vessels and colocalizes with EC specific markers. The real number of vessels stained with India ink was under-estimated compared with red blood cells containing-vessels since the ink did not went into all the vessels in positive control.

To use the ERS clinically, it should be produced with 3 types of autologous cells. Different techniques have been described to isolate microvascular EC from dermis and adipose tissue (Marks *et al*, 1985; Karasek, 1989, Hewett *et al*, 1993; Conradlapostolle *et al* 1996 ; Gupta *et al*, 1997 ; Richard *et al*, 1998). Unfortunately, the quantity of EC extracted with these methods is not sufficient for ERS production. Methods that allow the isolation of EC and/or their precursors from peripheral blood and to differentiate them in culture (Ashara *et al*, 1997; Boyer *et al*, 2000) are promising alternatives. The angioblasts isolated from blood circulation can participate in different postnatal physiological and pathological neovascularization phenomenon (Asahara *et al*, 1999). These results are very interesting for the clinical application of the ERS. EC circulating progenitors could be isolated from peripheral blood and incorporated within the RS to verify if they could differentiate in EC and form CLS. We could

then avoid the problem of small amount of EC that can be isolated from skin biopsies and then allow the production of the ERS completely with autologous cells.

Even if the EC are the major constituent of the primitive vascular complex and their maturation requires interactions with other cell types mainly pericytes (Diaz-Flores *et al*, 1992; Risau and Flamme, 1995; Hirschi and D'Amore, 1997). The pericytes are associated with microvessels, surrounding EC with their processes. They represent a heterologous population of cells that originated from mesenchymal cells and present different functional roles. Pericytes can be identified with immunostaining for α-actin, desmin and vimentin (Herman and D'Amore, 1985; Fujimoto and Singer, 1987). *In vitro*, they inhibit EC proliferation and migration by cellular interactions (Antonelli-Orlidge *et al*., 1989; Sato and Rifkin, 1989). These interactions are considered to be necessary for capillary differentiation. We performed α-actin staining on graft samples after 2, 4 and 7 days post-grafting to verify if the ERS contain pericyte after grafting (data not showed). This molecule was present at the periphery of dermis microvessels in human skin graft while no positive staining was obtained in the ERS. Emergence of the pericytes could occur afterward. By determining the human and/or mice origin of the pericytes with long term grafts, it would allow to clarify the post-natal origin of the pericytes and to determine if they derive or not from the perivascular fibroblast as suggested previously (Stein *et al*, 1996).

The results obtained in this study show that the ERS possesses excellent perspectives in their clinical applications for wound treatment. The presence of a CLS network in a RS prior to the graft increases the speed of vascularization. Thus, by including a network of CLS, we eliminate the lack of blood supply, which is an obstacle to the development for most tissue engineered organs.

CHAPITRE V

DISCUSSION GÉNÉRALE

Chapitre V. Discussion générale

Depuis que Folkman a établi un lien entre la croissance tumorale et l'angiogenèse, l'intérêt pour ce phénomène a connu un essor considérable (Folkman *et al*, 1971 ; Folkman, 1971, 1972 et 1985). De nombreux efforts ont été concentrés pour développer des modèles *in vivo* et *in vitro* fiables afin d'étudier l'angiogenèse (Cockerill *et al*, 1995 ; Ribatti et Vacca, 1999). Bien que les modèles *in vivo* aient permis d'accroître considérablement nos connaissances sur l'angiogenèse, l'utilisation de ces derniers comporte d'importantes limitations : manipulations difficiles sur les animaux, variabilité, coût élevé et réponse non-spécifique de l'hôte entraînant l'apparition de faux positifs.

Les modèles d'angiogenèse *in vitro* les plus répandus sont le modèle de l'aorte, la membrane amniotique humaine, l'angiogenèse spontanée *in vitro*, le modèle *in vitro* en trois dimension et le modèle en coculture (Cockerill *et al*, 1995). Ces derniers permettent d'étudier le phénomène d'angiogenèse dans un environnement plus contrôlé que dans le cas des modèles *in vivo* et leur utilisation est toujours très répandue pour l'étude de l'angiogenèse. Le modèle de PRE développé dans notre laboratoire (Black *et al*, 1998) et utilisé lors de ce projet, comporte de nombreux avantages par rapport aux différents modèles d'angiogenèse développés jusqu'à ce jour. Comparativement à la majorité de ces derniers, il est produit complètement à partir de cellules humaines et permet le développement de structures tubulaires sans ajout de facteurs de croissance ou de promoteurs tumoraux. La formation spontanée de structures ressemblant aux capillaires est associée en partie à la présence de MEC mature et de facteurs de croissance néosynthétisés dans l'environnement dans lequel les cellules évoluent (Berthod *et al*, 1993 ; 1996). Par ailleurs, il permet d'étudier les interactions qu'effectuent les CE avec d'autres types

cellulaires et avec les protéines de la MEC. Ces interactions sont reconnues comme étant essentielles lors de la formation des vaisseaux *in vivo* et *in vitro* (Madri et Pratt, 1986 ; Ingber et Folkman, 1989 ; Ingber *et al*, 1990 ; Lattera *et al*, 1990 ; Fournier et Doillon, 1992 ; Montesano *et al*, 1993 ; Villashi et Nicosia, 1994 ; Madri, 1997 ; Black *et al*, 1998 ; Vernon et Sage, 1995 et 1999). Le but des recherches présentées dans ce mémoire était de démontrer la fonctionnalité du modèle de PRE à des fins clinique et expérimentales comme modèle *in vitro*.

Nous avons poursuivi la caractérisation des structures observées dans le modèle par un double marquage en immunofluorescence. Ces structures étaient composées de CE et secrétaient des protéines associées à la membrane basale *in vivo*. Ensuite, nous avons étudié ces structures en microscopie confocale. Nous avons été en mesure de déterminer que les structures endothéliales formaient un réseau qui s'étendait vers la portion inférieure du DR et qu'elles formaient de multiples connections entre-elles. De plus, par reconstruction en trois dimensions, nous avons observé que ces structures possédaient un lumen bien formé. Le lumen s'étendait sur toute la longueur des tubules comparativement aux structures que l'on retrouve dans bien des modèles d'angiogenèse (Nicosia et Ottinetti, 1990b ; Bikflavi *et al*, 1991 ; Sage et Vernon, 1994). Puisque le modèle possédait des structures tubulaires comparables à celles des capillaires, nous avons vérifié s'il pouvait être utilisé pour évaluer les effets de molécules angiogéniques et angiostatiques. Le DRE présentait significativement davantage de structures tubulaires lorsque stimulé par des molécules angiogéniques (46 à 70 % plus de structures que le témoin). De plus, ces structures possédaient une surface et un diamètre plus importants que celles du témoin dans lequel aucune molécule n'était ajoutée. Des résultats contraires ont été obtenus lorsque le DRE était mis en présence d'une molécule angiostatique (59 % moins de structures que le témoin). Donc, le DRE pourrait être utilisé

comme modèle *in vitro* pour évaluer l'efficacité de modulateurs de l'angiogenèse comme méthode alternative à l'expérimentation animale.

L'hétérogénéité entre les CE provenant de différentes sources est largement documentée (McClure, 1921 ; Majno, 1965 ; Garlanda et Dejana, 1997 ; Thorin et Shreeve, 1998 ; Craig *et al*, 1998). Les CE impliquées dans l'angiogenèse tumorale, la guérison de plaies et l'inflammation proviennent principalement des microvaisseaux. Les CE dérivant des microvaisseaux sont reconnues comme étant distinctes des macrovasculaires (Jackson et Nguyen, 1997 ; Mason *et al*, 1997 ; Hudlicka *et al*, 1998). Bien que l'hétérogénéité des CE soit bien connue, les modèles *in vitro* utilisés pour l'étude des CE dans certaines pathologies sont produits à l'aide de CE provenant de macrovaisseaux ou de différents animaux (Montesano *et al*, 1993 ; Villaschi et Nicosia, 1994 ; Cockerill *et al*, 1995 ; Hoying *et al*, 1996 ; Craig *et al*, 1998). La source de CE utilisée lors des études *in vitro* est primordiale puisque les CE sont différentes les unes par rapport aux autres et peuvent répondre différemment à certains facteurs. Il serait donc préférable d'utiliser des CE d'origine humaine et provenant de l'organe et du vaisseau de taille correspondante afin de s'assurer que le modèle représente le plus possible la réalité. Quelques techniques ont été développées pour isoler sélectivement et cultiver des CE microvasculaires dermiques humaines (Marks *et al*, 1985 ;Conradlapostolle *et al*, 1996 ; Gupta *et al*, 1997 ; Richard *et al*, 1998). Il serait donc possible d'améliorer notre modèle en remplaçant l'utilisation des HUVEC par l'emploi de CE microvasculaires.

St. Croix *et al* ont récemment comparé les profils d'expression de gènes pour différents endothéliums dérivants de tissus normaux et tumoraux (2000). Ils ont démontré que ces profils d'expression variaient et qu'en général, les endothéliums étaient différents les uns des autres. Il a été proposé d'étudier l'angiogenèse induite par différentes lignées de cellules tumorales.

Ceci pourrait être facilement réalisé dans le cas de notre modèle et ce, par contact direct ou non avec les cellules tumorales. Ainsi, l'efficacité de notre modèle serait grandement améliorée pour le tri ou le développement de molécules angiostatiques dans le but de traiter les tumeurs. Il est aussi possible d'isoler différents endothéliums provenant de pathologies humaines comme l'arthrite rhumatoïde (Abbot *et al*, 1992) et la sclérose systémique (Kraling *et al*, 1994). Afin d'être en mesure d'utiliser notre modèle dans l'étude de pathologies dans lesquelles le système vasculaire est primordial et pour le développement de traitements, il faudrait produire une PRE avec des CE et/ou d'autres lignées cellulaires pathologiques ou tumorales.

L'angiogenèse est un phénomène complexe contrôlé par plusieurs éléments : facteurs de croissance et leurs récepteurs (VEGFs, FGFs, angiopoïétines, éphrines) (Neufeld *et al*, 1999 ; Gale et Yancopoulos, 1999), activité de protéinases et de leurs inhibiteurs (MMPs vs TIMPs, PAs vs PAIs) (Mignatti *et al*, 1996 ; Haas et Madri, 1999), changements de la composition de la MEC (Black *et al*, 1998 ; Nicosia et Madri, 1987, Villaschi et Nicosia, 1994), expression de diverses molécules d'adhésion (intégrines, PECAM, VE-cadhérine) (Brooks, 1996 ; Yang *et al*, 1999; Newman, 1997) et interactions avec différents types cellulaires (péricytes) (Diaz-Flores *et al*, 1992 ; Hirschi et D'Amore, 1997). Le modèle de PRE serait un outil de choix pour étudier ces divers éléments et leurs rôles dans la formation de capillaires. Puisque la peau est un organe fréquemment affecté par des maladies inflammatoires, la PRE représente un outil intéressant pour étudier l'expression de molécules d'adhésion sur les CE et leurs relations avec les événements inflammatoires (Black *et al*, en préparation).

Bien que la greffe de PR soit jusqu'à présent la meilleure alternative pour le recouvrement des plaies profondes, elle comporte certains inconvénients (Berthod et Damour, 1997). Un des

principaux obstacles à l'utilisation des PR chez les grands brûlés est l'absence de composantes vasculaires qui retarde le processus de vascularisation dans les greffons. Ce retard de vascularisation peut provoquer la nécrose de l'épiderme par manque d'apport nutritif (Boyce *et al*, 1995). Il a été démontré que la peau pleine épaisseur greffée sur des souris athymiques ou des rats se revascularisait par inosculation i.e. anastomose entre les capillaires des greffons et ceux du lit de la greffe (Converse *et al*, 1975 ; Young *et al*, 1996). Théoriquement, une PR contenant préalablement un réseau de capillaires devrait se vasculariser de la même façon que la peau humaine. Donc, une telle PRE serait vascularisée plus rapidement qu'une PR traditionnelle grâce à son réseau de tubules vasculaires et ainsi améliorerait la qualité du greffon. Puisque nous avons établi que le modèle de PRE possède de vraies structures capillaires dans sa portion dermique, nous avons voulu vérifier dans la deuxième partie de ce mémoire si les PRE greffées sur des souris athymiques seraient vascularisées de la même manière que les peaux humaines. Par ailleurs, nous avons voulu déterminer si la greffe des PRE permettrait d'accélérer le processus de vascularisation du greffon. Un marquage intracardiaque du sang à l'encre de Chine a été effectué afin de simplifier la détection de sang à l'intérieur des vaisseaux.

Les greffes de peaux humaines effectuées ont permis de valider notre méthode de travail. Deux jours après la greffe, 2 greffons sur 3 présentaient des capillaires remplis de globules rouges et/ou de sang marqué à l'encre de Chine. Après 4 et 7 jours, on pouvait observer la présence de circulation sanguine dans tous les greffons. Les vaisseaux sanguins contenant des globules rouges étaient répartis uniformément dans le greffon et non pas uniquement à la jonction greffon-lit. Ainsi, nous avons été en mesure de recréer les mêmes résultats obtenus précédemment par l'équipe de Young (Young *et al*, 1996). Par ailleurs, nous avons observé que l'établissement de la circulation sanguine s'effectuait plus rapidement à l'intérieur des PRE que dans le cas des PR traditionnelles. En effet, des vaisseaux remplis de globules rouges

et/ou d'encre de Chine étaient présents sous l'épiderme des PRE après 7 jours tandis que les PR présentaient uniquement des vaisseaux dans le tiers inférieur du derme. Ainsi, la greffe de PR contenant un réseau de capillaires permet d'accélérer le processus de vascularisation.

La différence de temps de revascularisation que l'on a obtenue entre la peau humaine et la PRE (2 à 3 jours versus 7 jours) est facilement explicable. On voit bien par marquage en immunofluorescence que les vaisseaux présents dans la peau humaine sont répartis de façon homogène jusqu'au bas du greffon tandis que les structures tubulaires de la PRE sont confinées à la portion supérieure de cette dernière. Ainsi, la présence de capillaires dans le bas du greffon de peau humaine permet d'effectuer une anastomose plus rapidement avec les capillaires du lit de la greffe que dans le cas de la PRE. Chez les PRE, l'établissement de la circulation sanguine aura lieu lorsque les structures tubulaires de la PRE et que les capillaires de la souris auront progressé suffisamment pour être en mesure de se connecter (figure 22).

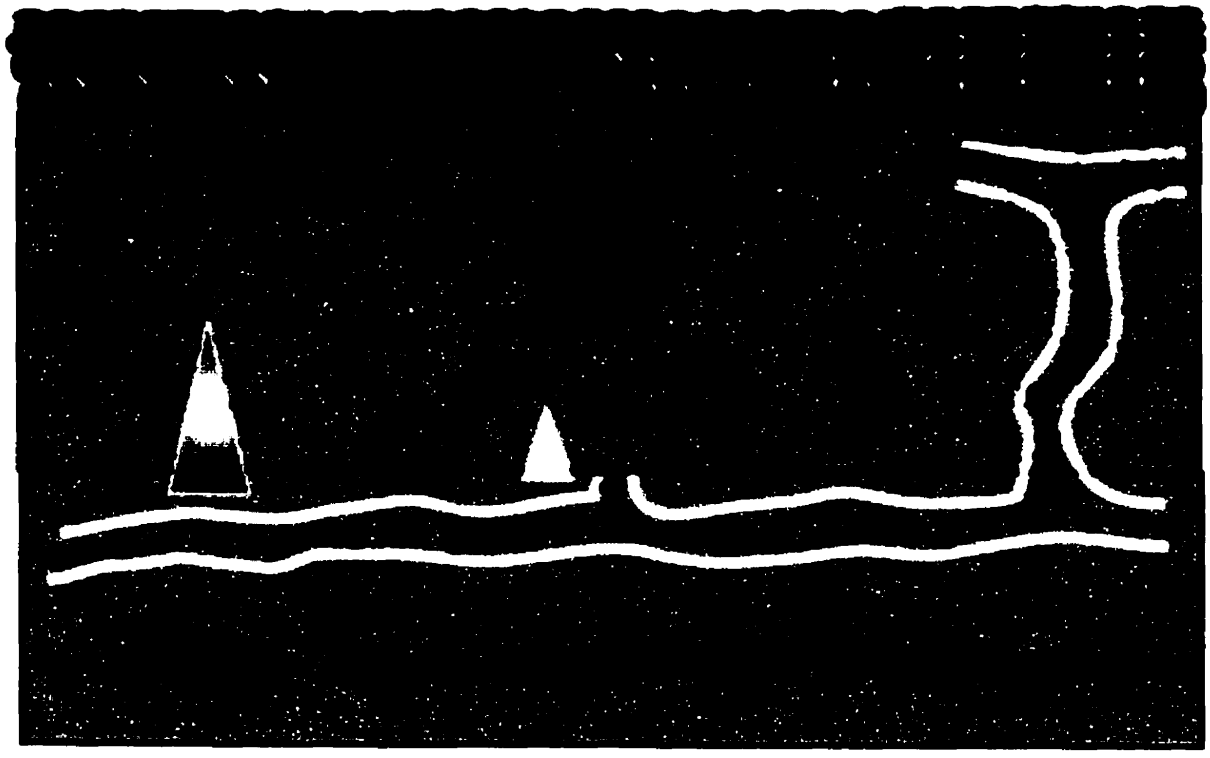

Figure 22. **Processus probable de vascularisation d'une PRE.**

Nous pensons que la vascularisation des PRE résulte d'une activation de la croissance des capillaires et d'une anastomose entre les vaisseaux murins et humains. Nous considérons l'environnement de la greffe comme étant particulièrement riche en facteurs de croissance. En effet, lors de la formation d'une plaie, il y a sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance par différents types cellulaires. Par exemple, le VEGF peut être exprimé par les fibroblastes (Trompezinski *et al*, 2000) et les kératinocytes (Brown *et al*, 1992). De plus, lors de la formation de plaies, les kératinocytes peuvent exprimer aussi du TGF-β1, - β2, - β3 et du bFGF (Hakvoort *et al*, 2000). *In vitro*, les kératinocytes expriment aussi du VEGF (Ballaun *et al*, 1995 ; Viac *et al*, 1997) et les fibroblastes présentent des propriétés angiogéniques (Villashi

et Nicosia, 1994). Les CE activées sont aussi en mesure d'exprimer différents facteurs angiogéniques (Antonelli-Orlidge *et al*, 1989 ; Namiki *et al*, 1995 ; Seghezzi *et al*, 1998 : Yamagishi *et al*, 1999). Ainsi, les molécules angiogéniques présentes dans l'environnement du greffon doivent contribuer à augmenter la croissance des capillaires murins et des structures tubulaires humaines afin qu'ils puissent se rejoindre. Par ailleurs, la vascularisation des greffons de PRE ne pourrait être le résultat d'une néovascularisation seule puisque les CE murines demeuraient dans la portion inférieure des PR et PRE après 7 jours. Nous pensons donc que la vascularisation initiale à l'intérieur des PRE doit être le résultat d'un phénomène d'inosculation plutôt que de néovascularisation proprement dite. En effet, les capillaires murins ne peuvent être détectés sous l'épiderme de PR greffés sur des souris athymiques avant 15 jours (Berthod *et al*, soumis pour publication).

Il serait possible d'améliorer les résultats obtenus lors des greffes en améliorant les conditions de culture des PRE afin que les structures tubulaires soient distribuées jusque dans la portion inférieure de l'éponge. Cultiver les PRE en présence de molécules angiogéniques connues (VEGF ou bFGF par exemple) permettrait d'attirer les structures plus profondément dans le DRE. Par ailleurs, il serait possible d'inclure des kératinocytes ou fibroblastes modifiés génétiquement et exprimant des facteurs de croissance angiogéniques. Ainsi, tel que publié récemment par Boyce *et al*, nous pourrions augmenter la quantité de capillaires présents et peut-être même diminuer davantage le temps de vascularisation (Boyce *et al*, 2000).

Afin d'analyser le remodelage des structures tubulaires, il serait intéressant d'effectuer des expériences de greffe à plus long terme. Il serait important toutefois d'utiliser des CE préalablement marquées afin de faciliter la reconnaissance des CE humaines du greffon et les analyses. Des CE transformées à l'aide d'un vecteur contenant la protéine GFP (Green Factor Protein) serait un outil à considérer (Dehio *et al*, 1998). Des études à long terme permettraient

par le fait même d'analyser l'influence que deux phénomènes ont l'un envers l'autre, l'angiogenèse et l'innervation. En effet, il a été démontré que l'angiogenèse précède l'innervation lors de greffes et que les fibres initiales de régénération apparaissent en association avec les vaisseaux nouvellement formés (Gu *et al*, 1995 ; Hobson *et al*, 1997 ; Kangesu *et al*, 1998). De plus, la présence de kératinocytes semblerait exercer une influence directe sur les vaisseaux et les nerfs en régénération (Kangesu *et al*, 1998). Il existerait donc une étroite relation entre les fibres nerveuses et les vaisseaux sanguins. Cette relation serait favorisée par les facteurs de croissance présents dans l'environnement et par d'autres composants tissulaires. La greffe à long terme des différents EC permettrait d'étudier les interactions entre les structures tubulaires de la PRE et les nerfs en croissance et de vérifier si la présence de ces structures favorise l'apparition de fibres nerveuses dans la PRE.

Le marquage du sang à l'encre de Chine a été effectué afin d'être en mesure de déterminer s'il y avait établissement ou non de circulation sanguine à l'intérieur de vaisseaux. Ce marquage s'est révélé être efficace principalement pour le lit musculaire de la greffe et pour les greffons de peau humaine. Les vaisseaux observés dans les PR contenaient rarement de l'encre de Chine. Il était plus facile d'observer en histologie la présence de globules rouges à l'intérieur des vaisseaux sanguins. Cependant, il est impossible d'observer des cellules sanguines en immunohistochimie : il est donc préférable de marquer le sang à l'encre de Chine pour l'observation de coupes congelées car c'est une méthode simple pour détecter le sang. Il faut faire attention cependant à ce que le marquage à l'encre de Chine soit situé à l'intérieur de vaisseaux et ce, par colocalisation avec des marqueurs spécifiques des CE. Bien entendu, les vaisseaux marqués sont une sous-estimation du nombre réel de vaisseaux dans lesquels la circulation a été établie. En effet, l'encre de Chine ne marque pas la totalité des vaisseaux dans des contrôles positifs.

Afin que ce modèle puisse être utilisé cliniquement, il serait important de produire les PRE avec 3 types de cellules autologues. Quelques techniques sont maintenant connues pour l'isolement de CE microvasculaires à partir de derme ou de tissu adipeux (Karasek, 1989 ; Hewett *et al*, 1993 ; Conradlapostolle *et al*, 1996 ; Gupta *et al*, 1997 ; Richard *et al*, 1998). Cependant, la quantité de CE extraites par ces méthodes peut être insuffisante pour la production des PRE. Il serait intéressant d'utiliser des méthodes alternatives qui permettent d'isoler les précurseurs des CE et de les différencier en culture. En effet, on sait maintenant que le phénomène de vasculogenèse n'est plus réservé exclusivement à l'embryon puisque des angioblastes humains et murins ont été isolés de la circulation sanguine chez des sujets adultes (Asahara *et al*, 1997). Ces cellules sont en mesure de prendre part à différents phénomènes de néovascularisation postnatal physiologique ou pathologique (Asahara *et al*, 1999). Ces résultats sont très intéressants pour l'application clinique du modèle. En effet, il serait intéressant d'inclure les précurseurs de CE au modèle afin de vérifier s'ils sont en mesure de se différencier en CE et de former des structures tubulaires. Ainsi, on pourrait contourner le problème de faibles quantités de CE isolées à partir de biopsies de peau et produire des PRE à partir de cellules autologues. Cependant, il faudrait évaluer la faisabilité de tels prélèvements sur ces patients qui sont déjà très affaiblis par leur condition. De plus, en produisant les PRE de cette façon, elles pourraient être considérées davantage comme un modèle de vasculogenèse.

Bien que les CE soient les principaux constituants du complexe vasculaire primitif, la différenciation de vaisseaux primitifs en vaisseaux matures requière des interactions avec d'autres types cellulaires, principalement les péricytes (Diaz-Flores *et al*, 1992 ; Risau et Flamme, 1995 ; Hirschi et D'Amore, 1997). Les péricytes, présents particulièrement chez les microvaisseaux, entourent les CE à l'aide de prolongements. Ils représentent une population hétérogène de cellules d'origine mésenchymateuse et possèdent de multiples rôles

fonctionnels. Ils peuvent êtres identifiés par marquages immunohistochimiques contre l'α-actine, la desmine ou la vimentine (Fujimoto et Singer, 1987). Les péricytes inhiberaient *in vitro* la prolifération et la migration des CE par contact cellulaire (Antonelli-Orlidge *et al.*, 1989 ; Sato et Rifkin, 1989). Ces interactions seraient nécessaires pour la différentiation des capillaires. Il serait possible de vérifier, à l'aide de marquages spécifiques, si le modèle de PRE présente, après greffe, des péricytes. Des marquages d'α-actine ont été effectués sur les greffons après 2,4 et 7 jours (résultats non présentés). L'α-actine a été détectée en périphérie des microvaisseaux dermiques dans les greffons de peaux humaines, mais aucun marquage positifs n'a été obtenus dans le cas des PRE. L'apparition de péricytes semble donc être plus tardive. Il serait intéressant d'effectuer des greffes à plus long terme et de vérifier l'origine humaine et/ou murine des péricytes. Ainsi, il serait possible d'éclairer davantage l'origine post-natale des péricytes et de déterminer s'ils dérivent ou non des fibroblastes périvasculaires tel que suggéré précédemment (Stein *et al*, 1996).

Les résultats obtenus dans cette étude prouvent que le modèle de PRE présente des perspectives intéressantes, tant au niveau clinique qu'en tant que modèle d'angiogenèse *in vitro*. Notre modèle pourrait être un outil de choix pour l'industrie pharmaceutique afin d'étudier le potentiel de molécules *in vitro* comme méthode alternative à l'expérimentation animale Premièrement, en supportant la formation de structures tubulaires par des CE humaines sans ajout de facteurs de croissance, il y a peu de risques d'interférences avec les molécules étudiées. Deuxièmement, il est en mesure de réagir correctement aux molécules angiogéniques et angiostatiques. Par ailleurs, la PRE est un excellent modèle pour étudier l'angiogenèse dans différents contextes et va certainement contribuer à améliorer la compréhension de la physiologie des CE dans un environnement se rapprochant de la situation *in vivo*. D'autre part, il devrait avoir un impact considérable dans le traitement des brûlés. La

présence de structures capillaires dans la PRE préalablement à une greffe a permis une augmentation de la vitesse de vascularisation. Ainsi, en appliquant ce principe d'inclure préalablement un réseau de structures tubulaires, on règle le problème des tissus ou organes produits grâce au génie tissulaire, qui ne peuvent survivre par imbibition et qui seront vascularisés plus rapidement par inosculation, quelle que soit leur épaisseur.

CHAPITRE VI

RÉFÉRENCES

Chapitre VI. Références

A

Abbot SE, Kaul A, Stevens CR, Blake DR. (1992) Isolation and culture of synovial microvascular endothelial cells. Characterization and assessment of adhesion molecule expression. Arthritis Rheum. 35 : 401-406.

Albelda AM, Buck CA. (1990) Integrins and other cell adhesion molecules. FASEB J. 4 : 2868-2880.

Albelda SM, Oliver PD, Romer LH, Buck CA. (1990) EndoCAM: a novel endothelial cell-cell adhesion molecule. J. Cell Biol. 110 : 1227-1237.

Allwood JS. (1995) The primary care management of burns. Nurse Pract. 20 (8) : 74, 77-79.

Angiolillo AL, Kanegane H, Sgadari C, Reaman GH, Tosato G. (1997) Interleukin-15 promotes angiogenesis in vivo. Biochem. Biophys. Res. Commun. 233:231-237.

Antonelli-Orlidge A, Saunders KB, Smith SR, D'Amore PA. (1989) An activated form of transforming growth factor beta is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86 : 4544-4548.

Arthur WT, Vernon RB, Sage EH, Reed MJ. (1998) Growth factors reverse the impaired sprouting of microvessels from aged mice. Microvasc. Res. 55:260-270.

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells of angiogenesis. Science. 275 : 964-967.

Asahara Y, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. (1999a) Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. Circ. Res. 85 : 221-228.

Asmussen PD. (1986) The skin. Einfürung und Grundlangen: Rohstoffe, die Haut, Klebetechnologie. Compendium medical Hamburg A.G. Biersdorf 1 :6.

Auerbach R, Auerbach W, Polakowski I. (1991) Assays for angiogenesis: A review. Pharmacol. Ther. 51 : 1-11.

Auerbach R, Kubai L, Sidky Y. (1976) Angiogenesis induction by tumors, embryonic tissues, and lymphocytes. Cancer Res. 36 : 3435-3440.

Auerbach R, Kubal L, Knighton D, Folkman J. (1974) A simple procedure for long-term cultivation of chicken embryos. Dev. Biol. 41 : 391-394.

Auger FA, Guignard R, Lopez Valle CA, Germain L. (1993) Role and innocuity of Tissel, a tissue glue, in the grafting process and in vivo evolution of huamn cultured epidermis. Brit. J. Plast. Surg. 46 : 136-.

Auger FA, Lopez-Valle CA, Guignard R, Tremblay N, Noel B, Goulet F and Germain L. (1995) Skin equivalents produced by tissue-engineering using human collagens. In vitro Cell. Dev. Biol. 31: 432-439.

Auger FA, Rouabhia M, Goulet F, Berthod F, Moulin V, Germain L. (1998) Tissue-engineered human skin substitutes developed from collagen-populated hydrated gels: clinical and fundamental applications. Med. Biol. Eng. Comput. 36(6) : 801-812.

Auger FA. (1988) The role of cultured autologous human epithelium in large burn wound trestment. Transplantation/ Implantation Today 5 :21-24.

Augustin HG, Kozian DH, Johnson RC. (1994) Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. Bioessays. 16(12):901-6.

Ausprunk DH, Folkman J. (1977) Migration and proliferation of endothelial cells performed and newly formed blood vessels during tumour angiogenesis. Microvasc. Res. 14 : 53-65.

B

Ballaun C, Weninger W, Uthman A, Weich H, Tschachler E. (1995) Human keratinocytes express the three major splice forms of vascular endothelial growth factor. J. Invest. Dermatol. 104(1) : 7-10.

Barillari G, Albonici L, Franzese O, Modesti A, Liberati F, Barillari P, Ensoli B, Manzari V, Santeusanio G. (1998) The basic residues of placenta growth factor type 2 retrieve sequestered angiogenic factors into a soluble form: implications for tumor angiogenesis. Am J Pathol 152:1161-1166.

Basson CT, Knowles WJ, Abelda S, Bell L, Castronovo V, Liotta LA, Madri JA. (1990) Spatiotemporal segregation of endothelial cell integrin and non-integrin extracellular matrix binding proteins during adhesion events. J. Cell Biol. 110 : 789-802.

Bauer J. et al (1992) In vitro model of angiogenesis using a human endothelial derived permanent cell line: Contribution of induced gene expression, G proteins and integrins. J. Cell. Physiol. 153 : 437-449.

Bell E, Ehrlich HP, Sher S, Merril C, Sarber R, Hull B, Nakatsuji T, Church D and Buttle DJ. (1981) Development and use of a living skin equivalent. Plast. Reconstr. Surg. 67: 386-392.

Bell E, Ivarsson B, Merril C. (1979) Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 1274-1278.

Benathan M, Labidi-Ubaldi F. (1998) Substituts épidermiques et dermo-épidermiques vivants pour le traitement des grands brûlés. Revue médicale de la Suisse Romande 118 : 149-153.

Benazra D. (1978) Neovasculogenetic ability of prostaglandin growth factors and synthetic chemoattractants. Am. J. Ophtalmol. 86 : 455-461.

Benelli U, Bocci G, Danesi R, Lepri A, Bernardini N, Bianchi F, Lupetti M, Dolfi A, Campagni A, Agen C, Nardi M, Del Tacca M. (1998) The heparane sulfate suleparoide inhibits rat corneal angiogenesis and in vitro neovascularization. Exp. Eye Res. 67:133-142.

Berbari P, Thibodeau A, Germain L, Saint-Cyr M, Gaudreau P, El-Khouri S, Dupont E, Garrel DR. (1999) Antioangiogenic effects of the oral administration of liquid cartilage extracts in humans. Journal of Surgical Research 87(1) : 108-113.

Berthod F, Damour O. (1997) In vitro reconstructed skin models for wound coverage in deep burns. British Journal of Dermatology 136 : 809-816.

Berthod F, Hayek D, Damour O, Collombel C. (1993) Collagen synthesis by fibroblasts-cultured within a collagen sponge. Biomaterials 14 : 749-754.

Berthod F, Rouabhia M. (1997) Exhaustive review of clinical alternatives for damaged skin replacement. Mahmoud Rouabhia. Skin substitute production by tissue engineering: clinical and fundamental applications. Austin, TX R.G. Landes Company :23-45.

Berthod F, Sahuc F, Hayek D, Damour O, Collombel C. (1996) Deposition of collagen fibril bundles by long-term culture of fibroblasts in a collagen sponge. Journal of biomedical materials research 32 : 87-94.

Bikfalvi A. (1999) Le rôle du facteur de croissance des fibroblastes-2 dans l'angiogénèse tumorale. Pathol. Biol. 47(4) : 364-367.

Bikflavi A, Cramer EM, Tenza D, Tobelem G. (1991) Phenotypic modulations of human umbilical vein endothelial cells and human dermal fibroblasts using two angiogenic assays. Biol. Cell 72 : 275-278.

Birk DE, Fitch JM, Barbiarz JP and Lisenmayer TF. (1988) Collagen type I and V are present in the same fibril in the avian corneal stroma. J. Cell Biol. 106: 999-1008.

Black AF, Berthod F, L'Heureux N, Germain L and Auger FA. (1998) In vitro reconstruction of a human capillary-like network in a tissue-engineered skin equivalent. FASEB J. 12:1331-1340.

Black AF, Hudon V, Damour O, Germain L and Auger FA. (1999) A Novel approach for studying angiogenesis : a human skin equivalent with a capillary-like network. Cell Biol. Tox. 15: 81-90.

Bornstein P, O'Rouke K, Wikstrom K, Wolf FW, Katz R, Li P, Dixit VM. (1991) A second expressed thrombospondin gene (Thbs2) exists in the mouse genome. J. Biol. Chem. 266(20) : 12821-12824.

Bowden PE, Stark HJ, Breitkreutz D, Bowden PE, Stark HJ, Breitkreutz D, Fusenig NE. (1987) Expression and modification of keratins during terminal differentiation of mammalian epidermis. Curr. Top. Dev. Biol. 22: 35-68.

Boyce ST, Christianson DJ, Hansborough JF. (1988) Structure of a collagen-GAG dermal skin substitute optimized for cultured human epidermal keratinocytes. J. Biomed. Mater. Res. 22 : 939-957.

Boyce ST, Greenhalgh DG, Kagan RJ, Housinger T, Sorell JM, Childress CP et al. (1993b) Skin anatomy and antigen expression after burn wound closure with composite grafts of cultured skin cells and biopolymers. Plast. Reconstr. Surg. 91 : 632-641.

Boyce ST, Medrano EE, Abdel-Malek Z, Supp AP, Dodick JM, Nordlund JJ et al. (1993a) Pigmentation and inhibition of wound contraction by cultured skin substitues with adult melanocytes after transplantation to athymic mice. J. Invest. Dermatol. 100 : 360-365.

Boyce ST, Supp AP, Harriger MD, Greehalgh DG, Warden GD. (1995) Topical nutriments promote engrafment and inhibit wound contraction of cultured skin substitutes in athymic mice. J. Invest. Dermatol. 104 : 345-349.

Boyce ST, Michael S, Reichert U, Shroot B and Schmidt R. (1990) Reconstructed skin from cultured human keratinocytes and fibroblasts on a collagen-glycosaminoglycan biopolymer. Skin Pharmacol. 3:136-143.

Boyce ST, Michael S, Reichert U, Shroot B, Schmidt R. (1990) Reconstructed skin from cultured human keratinocytes and fibroblasts on a collagen-glycosaminoglycan biopolymer. Skin Pharmacol. 3:136-143.

Boyce ST. (1996) Cultured skin substitutes: a review. Tissue Eng. 2 : 255-266.

Boyer M, Townsend LE, Vogel LM, Falk J, Reitz-Vick D, Trevor KT, Villalba M, Bendick PJ, Glover JL. (2000) Isolation of endothelial cells and their progenitor cells from human peripheral blood. J Vasc Surg. 31(1 Pt 1):181-9.

Braverman IM. (1997) The cutaneous microcirculation: ultrastructure and microanatomical organization. Microcirculation 4(30 : 329-340.

Brooks PC, Clark RAF, Cheresh DA. (1994b) Requirement of vascular integrin αvβ3 for angiogenesis. Science 264:569-571.

Brooks PC, Montgomery AMP, Rosenfeld M et al. (1994a) Integrin avb3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. Cell 79 : 1157-1164.

Brooks PC, Strömblad S, Klemke R, Visscher D, Sarkar FH, Cheresh DA. (1995) Anti-integrin avb3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. J. Clin. Invest. 96 : 1815-1822.

Brooks PC. (1996) Role of integrins in angiogenesis. European Journal of Cancer 2423-2429.

Brown LF, Yeo KT, Berse B, Yeo TK, Senger DR, Dvorak HF, van de Water L. (1992) Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. J. Exp. Med. 176(5) : 1375-1379.

Burgeson RE, Lunstrum GP, Rokosova B, Rimberg CS, Rosenbaum LM and Keene DR. (1990) The structure and function of type VII collagen. Ann. NY Acad. Sci. 580: 32-43.

Burgeson RE. (1993) Type VII collagen, anchoring fibrils and epidermolysis bullosa. J. Invest. Dermatol. 101: 252-255.

Burke JF, Yannas IV, Quinby WC et al. (1981) Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. Ann. Surg. 194 : 413-428.

Burri PH, Tarek MR. (1990) A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation. Anat. Rec. 228 : 35-45.

C

Cao Y, O'Reilly MS, Marshall B, Flynn E, Ji RW, Folkman J. (1998) Expression of angiostatin cDNA in a murine fibrosarcoma suppresses primary tumor growth and produces long-term dormancy of metastase. J. Clin. Invest. 101:1055-1063.

Caprioli A, Jaffredo T, Gautier R, Dubourg C, Dieterlen-Lièvre F. (1998) Blood-borne seeding by hematopoietic and endothelial precursors from the allantois. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95 : 1641-1646.

Carmeliet P, Mackman N, Moons L, Luther T, Gressens P, Van Vlaenderen I, Demunck H, Kasper M, Breier G, Evrard P, Muller M, Risau W, Edgington T, Collen D. (1996) Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. Nature. 383(6595):73-5.

Chen CS, Toda KI, Maruguchi Y, Matsuyoshi N, Horiguchi Y, Imamura S. (1997) Establishment and characterization of a novel in vitro angiogenesis model using a microvascular endothelial cell line, F-2C, cultured in chemically defined medium. In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. 33 (10) : 796-802.

Ching LM, Browne WL, Tchernegovski R, Gregory T, Baguley BC, Palmer BD. (1998) Interaction of thalidomide, phthalimide analogues of thalidomide and pentoxifylline with the anti-tumor agent 5,6-dimethylxanthenone-4acetic acid: concomitant reduction of serum tumor necrosis factor-alpha and enhancement of anti-tumor activity. Br. J. Cancer 78:336-343.

Choudhuri R, Zhang HT, Donnini S, Ziche M, Bicknell R. (1997) An angiogenic role for the neurokines midkine and pleiotrophin in tumorigenesis. Cancer Res. 57:1814-1819.

Cid M, Grant DS, Hoffman GS, Auerbach R, Fauci AS, Kleinman HK. (1993) Identification of haptoglobin as an angiogenic factor in sera from patients with systemic vasculitis. J. Clin. Invest. 91 : 977-985.

Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM. (1998) Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. Blood. 91(10):3527-61.

Clapp C, Martial JA, Guzman RC, Rentier-Delure F, Weiner RI. (1993) The 16-kilodalton N-Terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. Endocrinology 133:1292-1299.

Clark RAF, Tonnesen MG, Gailit J, Cheresh DA. (1996) Transient functionnal expression of avb3 on vascular cells during wound repair. Am. J. Pathol. 148 : 1407-1421.

Claudy A. (1987) La microcirculation cutanée. 4e cours de biologie de la peau. 161 : 125-132.

Claudy A. (1997) Les cellules endotheliales cutanées. D. Schmitt. Biologie de la peau humaine 217-223.

Cockerill GW, Gamble JR, Vadas MA (1995) Angiogenesis: models and modulators. International. Review of Cytology. 159 : 113-160.

Conrad TJ, Chandler DB, Corless JM, Klintworth GK. (1994) In vivo measurement of corneal angiogenesis with video data acquisition and computerized image analysis. Lab. Invest. 70 : 426-434.

Conradlapostolle V, Bordenavel L, Baquey C. (1996) Optimization of use of UEA-1 magnetic beads for endothelial cell isolation. Cell Biol. Toxicol. 12 : 189-197.

Converse JM, Ballantyne D. (1962) Distribution of diphosphopyridine nucleotide diaphrose in rat skin autografts and homografts. Plast. Recons. Surg. 30 : 415-.

Converse JM, Smahel J, Ballantyne DL Jr, Harper AD. (1975) Inosculation of vessels of skin graft and host bed: a fortuitous encounter. Br. J. Plast. Surg. 28(4) : 274-282.

Cooper ML, Hansbrough JF. (1991) Use of a composite skin graft composed of cultured human keratinocytes and fibroblasts and a collagen-GAG matrix to cover full-thickness wounds on athymic mice. Surgery 109 : 198-207.

Cornelius LA, Nehring LC, Roby JD, Parks WC, Welgus HG. (1995) Human dermal microvascular endothelial cells produce matrix metalloproteinases in response to angiogenic factors and migration. J. Invest. Dermatol. 105 : 170-176.

Coughlin CM, Salhany KE, Wysocka M, Aruga E, Kurzawa H, Chang AE, Hunter CA, Fox, JC, Trinchieri G, Lee WMF. (1998) Interleukin-12 and interleukin-18 synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis. J. Clin. Invest. 101:1441-1452.

Craig LE, Spelman JP, Strandberg JD, Zink MC. (1998) Endothelial cells from diverse tissues exhibit differences in growth and morphology. Microvascular Research 55 : 65-76.

D

D'Amato RJ, Lin CM, Flynn E et al. (1994) 2-methoxyestradiol, an endogenous mammalian metabolite, inhibits tubulin polymerization by interacting at the colchicine site. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91 : 3964-3968.

Damour O, Augustin C, Black AF. (1998) Applications of reconstructed skin models in pharmaco-toxicological trials. Med. Biol. Eng. Comput. 36(6) : 825-832.

Damour O, Gueugniaud PY, Berthin M et al. (1994) A dermal substrate made of collagen-GAG-chitosan for deep burn coverage: first clinical uses. Clin. Mater. 15 : 273-276.

D'Angelo G, Struman I, Martial J, Weiner RI. (1995) Activation of mitogen-activated protein kinases by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in capillary endothelial cells is inhibited by the antiangiogenic factor 16-kDa N-terminal fragment of prolactin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92 : 6374-6378.

Davis GE, Camarillo CW. (1995) Regulation of endothelial cell morphogenesis by integrins, mechanical forces, and matrix guidance pathways. Exp Cell Res. 216(1):113-23.

Davis GE, Camarillo CW. (1996) An alpha 2 beta 1 integrin-dependent pinocytic mechanism involving intracellular vacuole formation and coalescence regulates capillary lumen and tube formation in three-dimensional collagen matrix. Exp Cell Res. 224(1):39-51.

Deed R, Rooney P, Kumar P, Norton JD, Smith J, Freemont AJ, Kumar S. (1997) Early-response gene signaling is induced by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan in endothelial cells. Inhibition by non-angiogenic, high molecular weight hyaluronan. Int. J. Cancer. 10:251-256.

Dehio M, Knorre A, Lanz C, Dehio C. (1998) Construction of versatile high-level expression vectors for Bartonella henselae and the use of green fluorescent protein as a new expression marker. Gene 215(2) : 223-229.

Dejana E, Bazzoni G, Lampugnani MG. (1999) Vascular endothelial (VE)-cadherin: only an intercellular glue? Exp. Cell Res. 252(1) : 13-19.

Dejana E, Corada M, Lampugnani MG. (1995) Endothelial cell-to-cell junctions. FASEB J. 9(10):910-8.

Demarchez M, Hartmann DJ, Prunieras M. (1987) An immunohistological study of the revascularization process in human skin transplanted onto the nude mouse. Transplantation. 43 (6) : 896-903.

Detmar M, Yeo K-T, Nagy JA, Van De Water L, Brown LF, Berse B, Elicker BM, Ledbetter S, Dvorak HF. (1995) Keratinocyte-derived vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) is a potent mitogen for dermal microvascular endothelial cells. J. Invest. Dermatol. 105 : 44-50.

Devries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. (1992) The fms-like tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial growth factor. Science 255 : 989-991.

Diaz-Flores L, Gutierrez R, Varela H. (1992) Behavior of postcapillary pericytes during postnatal angiogenesis. J. Morphol. 213 : 33-45.

Diaz-Flores L, Gutiérrez R, Varela H. (1994) Angiogenesis: an update. Histology and histopathology 9 : 807-843.

Dinney CP, Bielenbreg DR, Perrotte P, Reich R, Eve BY, Bucana CD, Fidler IJ. (1998) Inhibition of basic fibroblast growth factor expression, angiogenesis, and growth of human bladder carcinoma in mice by systemic interferon-alpha administration. Cancer Res. 58:808-814.

Dobryszycka W. (1997) Biological functions of haptoglobin-new pieces to an old puzzle. Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 35:647-654.

Doherty MJ, Canfield AE. (1999) Gene expression during vascular pericyte differentiation. Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression 9(1) : 1-17.

Drake CJ, Cheresh DA, Little CD. (1995) An antagonist of integrin avb3 prevents maturation of blood vessels during embryonic neovascularization. J. Cell. Sci. 108 : 2655-2661.

E

Eckes B, Mauch C, Hüppe G and Krieg T. (1993) Down-regulation of collagen synthesis in fibroblasts within three-dimensional collagen lattices involves transcriptional and posttranscriptional mechanisms. FEBS Lett. 318: 129-133.

Elenius K, Vainio S, Laato Met al. (1991) Induced expression of syndecan in healing wounds. J. Cell Biol. 114 : 585-595.

Emonard H. et al. (1987) Interactions between fibroblasts and a reconstitutes membrane matrix. Invest. Dermatol. 89 : 156-163.

Enerback L, Norrby K. (1989) The mast cell. Curr. Top. Pathol. 79 : 169-204.

Engelmann GL, Dionne CA, Jaye MC. (1992) Acidic fibroblast growth factor and heart development Circulation Research 72 : 7.

F

Fajardo LF, Kowalski J, Kwan HH, Prionas SD, Allison AC. (1988) The disc angiogenesis system. Lab. Invest. 58 : 718-724.

Fajardo LF. (1989) The complexity of endothelial cells. A review. Am J Clin Pathol. 92(2):241-50.

Ferrara N, Henzel WJ. (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 161 : 851-858.

Ferrara N, Henzel WJ. (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 161 : 851-858.

Fett JW, Strydom DL, Lobb RR, Alderman EM, Bethume JL, Riordan JF, Vallee BL. (1985) Isolation and characterization of angiogenin, and angiogenic protein from human carcinoma cells. Biochemistry 24 : 5480-5486.

Fine JD, Jonhson LB, Cronce D et al. (1993) Intracytoplasmic retention of type VII collagen and dominant dystrophic epidermolysis bullosa: reversal of defect following cessation of or marked improvement in disease activity. J. Invest. Dermatol. 101 : 232-236.

Fitzpatrick LR et al (1992) Acidic fibroblast growth factor accelerates the healing of the acetic-acid-induced gastric ulcers in rats. Digestion 53 : 17-27.

Flamme I, Frölich T, Risau W. (1997) Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. J. Cell. Physiol. 173 : 206-210.

Flamme I, Risau W. (1992) Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. Development 116 : 435-439.

Folkman J, D'Amore P. (1996) Blood vessel formation: what is its molecular basis? Cell 87 : 1153-1155.

Folkman J, Haudenschild BC, Zetter BR. (1979) Long-term culture of capillary endothelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76 : 5217-5221.

Folkman J, Ingber DE. (1987) Angiostatic steroids. Method of discovery and mechanisms of action. Ann. Surg. 206 : 374-383.

Folkman J, Klagsbrun M, Sasse J, Wadzinski M, Ingber D, Vlodavsky I. (1988) A heparin-binding angiogenic factor -basic fibroblast growth factor- is stored within basement membrane. Am. J. Pathol. 130 : 393-400.

Folkman J, Klagsburn M. (1987) Angiogenic factor. Science 235 : 442-447.

Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. (1971) Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. J. Exp. Med 133 (2) : 275-288.

Folkman J, Shing Y. (1992) Control of angiogenesis by heparin and olther sulfated polysaccharides. Adv. Exp. Med. Biol. 313 : 355-364.

Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. (1989b) Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. Nature 339:58-62.

Folkman J, Weisz PB, Joullie MM, Li WW, Ewing WR. (1989a) Control of angiogenesis with synthetic heparin substitutes. Science 243:1490-1493.

Folkman J. (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N. Engl. J. Med. 285 (21) : 1182-1186.

Folkman J. (1972) Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. Ann. Surg. 175 (3) : 409-416.

Folkman J. (1982) Angiogenesis: initiation and control. Ann N.Y. Acad. Sci. 401 : 212-227.

Folkman J. (1985) Tumor angiogenesis. Adv. Cancer Res. 43 : 175-203.

Folkman J. (1995) Clinical applications of research on angiogenesis. N. Engl. J. Med. 333 (26) : 1757-1763.

Foster CA and Holbrook KA. (1989) Ontogeny of Langerhans cells in human embryonic and fetal skin: cell densities and phenotypic expression relative to epidermal growth. Am J Anat. 184(2):157-64.

Fournier N, Doillon CJ. (1992) In vitro angiogenesis in fibrin matrices containing fibronectin and hyaluronic acid. Cell. Biol. Int. Rep. 26 : 1251-1263.

Frater-Schroder M, Muller G, Birchmeier M, Bohlen P. (1986) Transforming growth factor-beta inhibits endothelial cell proliferation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 137 : 295-302.

Freedlander E. (1998) New forms of skin grafting: from the laboratory to the clinic. Hospital Medecine 59(6) : 484-487.

Freedlander E. (1998) New forms of skin grafting: from the laboratory to the clinic. Hosp Med. 59(6):484-7.

Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varner JA, Cheresh DA. (1995) Definition of two angiogenic pathways by distinct av integrins. Science 270 : 1500-1502.

Fuchs E and Green H. (1980) Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. Cell 19: 1033-1042.

Fuchs E. (1995) Keratins and the skin. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 11: 123-153.

Fujimoto T, Singer SJ. (1987) Immunocytochemical studies of desmin and vimentin in pericapillary cells of chicken. J. Histochem. Cytochem. 35 : 1105-1115.

Fukushi J, Morisaki T, Shono T, Nishie A, Torisu H, Ono M, Kuwano M. (1998) Novel biological functions of interleukine-4: formation of tube-like structures by vascular endothelial cells in vitro and angiogenesis in vivo. Biochem. Biophys. Res. Commun. 250:444-448.

Furchgott RF, Zawadski JV. (1980) The obligatory role of endothelial cell in regulation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature 288 : 373-376.

G

Gale NW, Yancopoulos GD. (1999) Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. Genes & Development 13 : 1055-1066.

Gallico GG 3d, O'Connor NE, Compton CC, Kehinde O, Green H. (1984) Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. N. Engl. J. Med. 311(7) : 448-451.

Garlanda C, Dejana E. (1997) Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 17(7):1193-202.

Germain L, Guignard R, Rouabhia M, Auger FA. (1995) Early basement membrane formation following the grafting of cultured epidermal sheets detached with thermolysin or Dispase. Burns. 21(3):175-80.

Germain L, Michel M, Fradette J, Xu W, Godbout MJ, Li H. (1997) Skin stem cell identification and culture: a potential tool for rapid epidermal sheet production and grafting. In skin substitute production by tissue engineering: clinical and fundamental applications. Editor M Rouabhia. Landes. 177-210.

Germain L, Rouabhia M, Guignard R, Carrier L, Bouvard V, Auger FA. (1993) Improvement of human keratinocyte isolation and culture using thermolysin. Burns 19(2) : 99-104.

Gimbrone MA Jr, Nagel T, Topper JN. (1997) Biomechanical activation: en emerging paradigm in endothelial adhesion biology. J. Clin. Invest. 100 (11) : S61-S65.

Gimbrone MA Jr. (1995) Vascular endothelium in health and disease. E. Harber Molecular cardiovascular medecine New-York Scientific american medecine : 49-61.

Gingras D, Béliveau R. (1997) L'angiogénèse tumorale: une nouvelle cible thérapeutique anticancéreuse. Médecine/ Sciences 13 : 1428-1435.

Goldberg GI, Marmer BL, Gant GA, Eisen AZ. (1989) Human 72kD type IV gelatinase forms a complex with a tissue inhibitor of metalloproteinase designated TIMP-2. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86 : 8207-8211.

Gonzalez Crussi F. (1971) Vasculogenesis in the chick embryo. An ultrastructural study. Am. J. Anat. 130 : 441-460.

Good DJ, Polverini PJ, Rastinejad F, Le Beau MM, Lemons RS, Frazier WA and Bouck NP. (1990) A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6624-6628.

Gordon PB, Sussman II, Hatcher VB. (1983) Long-term culture of human endothelial cells. In Vitro Cell. Dev. Biol. 9 : 661-671.

Gospodarowicz D, Abraham JA, Schilling J. (1989) Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 86 : 7311-7315.

Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigerer L, Neufeld G. (1987) Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. Endocr. Rev. 8 : 95-114.

Grant DS. et al. (1989) Two different laminin domains mediate the differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures in vitro. Cell (Cambridge. Mass.) 58 : 933-943.

Green H, Kehinde O.Thomas J. (1979) Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 5665-5668.

Greve JM, Davis G, Meyer AM et al. (1989) The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. Cell 56 : 839

Gu XH, Terenghi G, Kangesu T, Navsaria HA, Springall DR, Leigh IM, Green CJ, Polak JM. (1995) Regeneration pattern of blood vessels and nerves in cultured keratinocyte grafts assessed by confocal laser scanning microscopy. Br. J. Dermatol. 132(3) : 376-383.

Gupta K, Ramakrishnan S, Browne PV, Solvey A, Hebel RP. (1997) A novel technique for culture of human dermal microvascular endothelial cells under either serum-free or serum-supplemented with vascular endothelial growth-factor. Exp. Cell. Res. 230 : 244-251.

H

Haas TL, Madri JA. (1999) Extracellular-driven matrix metalloproteinase production in endothelial cells: implications for angiogenesis. Trends Cardiovasc. Med. 9 : 70-77.

Hadley MA, Weeks BS, Kleinman HK. (1990) Laminin promotes formation of cord-like structures by Sertoli cells in vitro. Dev. Biol. 140 : 318-327.

Hakvoort T, Altun V, van Zuijlen PP, de Boer WI, van Schadewij WA, van der Kwast TH (2000) Transforming growth factor-beta (1), -beta (2), -beta (3), basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor expression in keratinocytes of burn scars. Eur. Cytokine Netw. 11(2) : 233-239.

Haller JA, Billingham RE. (1967) Studies of the origin of the vasculature in free skin grafts. Ann. Surg. 166 : 896- .

Hanahan D. (1997) Signaling vascular morphogenesis and maintenance. Science 277 : 48-50.

Handin RI, Wagner DD. (1989) Molecular and cellular biology of von Willebrand factor. Prog Hemost Thromb. 9:233-59.

Hansbrough JF, Boyce ST, Cooper ML, Foreman TJ. (1989) Burn wound closure with cultured autologous keratinocytes and fibroblasts attached to a collagen-glycosaminoglycan substrate. JAMA 262 : 2125-2130.

Hansbrough JF, Dore C, Hansbrough WB. (1992) Clinical trials of a living dermal tissue replacement placed beneath meshed split-thickness skin grafts on excised burn wounds. J. Burn Care Rehabil. 13 : 519-529.

Hansbrough JF, Morgan JL, Greenleaf G et al. (1994) Evaluation of Graftskin composite grafts on full-thickness wounds on athymic mice. J. Burn Care Rehabil. 15 : 346-353.

Hansbrough JF, Morgan JL, Greenleaf GE, Bartel R. (1993) Composite grafts of human keratinocytes grown on a polyglactin mesh-cultured fibroblast dermal substitute function as a bilayer skin replacement in full thickness wounds on athymic mice. J. Burn Care Rehabil. 14 : 485-494.

Hansen-Smith FM, Hudlicka O, Egginton S. (1996) In vivo angiogenesis in adult rat skeletal muscle: Early changes in capillary network architecture and ultrastructure. Cell Tissue Res. 286 : 123-136.

Harriger MD, Warden GD, Greenhalgh DG, Kagan RJ, Boyce ST. (1995) Pigmentation et microanatomy of skin regenerated from composite grafts of cultured cells to full-thickness burn wounds. Transplantation 59 : 702-707.

Hata R-I, Senoo H. (1989) L-ascorbic acid 2-phosphate stimulates collagen accumulation, cell proliferation, and formation of a three-dimensionnal tissue-like substance by skin fibroblasts. J. Cell Physiol. 138 : 8-16.

Hayes AJ, Huang WQ, Mallah J, Yang DJ, Lippman ME, Li LY. (1999) Angiopoietin-1 and its receptor Tie-2 participate in the regulation of capillary-like tubule formation and survival of endothelial cells. Microvascular Research 58(3) : 224-227.

Heeb MJ, Espana F, Geiger M, Collen D, Stump DC, Griffin JH. (1987) Immunological identity of heparin-dependent plasma and urinary protein C inhibitor and plasminogen activator inhibitor-3. J. Biol. Chem. 262 : 15813-15816.

Heimbach D, Luterman A, Burke J, Cram A, Herndon D. (1988) Artificial dermis for major burns, a multi-center randomized clinical trial. Ann. Surg. 208 : 313-320.

Heinmark RL, Twardzik DR, Schwartz ST. (1986) Inhibition of endothelial regeneration by type-beta like transforming growth factor from platelets. Science 233 : 1078-1080.

Hellstrom M, Kaln M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C. (1999) Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recrutement of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. Development 126(14) : 3047-3055.

Henkel W and Glanville RW. (1982) Covalent cross-linking between molecules of type I and type III collagen. Eur. J. Biochem. 122: 205-213.

Herbert JM, Cottineau M, Driot F, Pereillo JM, Maffrand JP. (1988) Activity of pentosan polysulfate and derived compounds on vascular endothelial cell proliferation and migration induced by acidic and basic FGF in vitro. Biochem. Pharmacol. 37:4281-4288.

Herman IM, D'Amore PA. (1985) Microvascular pericytes contain muscle and nonmuscle actins. J. Cell Biol. 101 : 43-52.

Hewett PW, Murray JC, Price EA, Watts ME, Woodcock M. (1993) Isolation and characterization of microvessel endothelial cells from human mammary adipose tissue. In Vitro Cell. Dev. Biol. 29A : 523-331.

Higounec I, Demarchez M, Régnier M, et al. (1994) Improvement of epidermal differentiation and barrier function in reconstructed human skin after grafting onto athymic nude mice. Arch. Dermatol. Res. 286 : 107-131.

Hirakow R, Hiruma T. (1981) Scanning electron microscopic study on the development of primitive blood vessels in chick embryos at the early somite-stage. Anat. Embryol. 163 : 299-306.

Hirschi KK, D'Amore PA. (1996) Pericytes in the microvasculature. Cardiovascular Research 32 : 687.

Hirschi KK, D'Amore PA. (1997) Control of angiogenesis by the pericyte: molecular mechanisms and significance. EXS 79 : 419-428.

His, W. (1900) Lecithoblast und angioblast der wirbeltiere. Abhandl. Math-Phys. Ges. Wiss. 26 : 171-328.

Hobson MI, Brown R, Green CJ, Terenghi G. (1997) Inter-relationships between angiogenesis and nerve regeneration: a histochemical study. Brit. J. Plastic Surg. 50 : 125-131.

Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. (1999) New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. Oncogene 38(18) : 5356-5362.

Holbrook KA. (1989) Biological structure and function: perspectives on morphologic approches to the study of the granular layer keratinocyte. J. Invest. Dermatol. 92: 84s-104s.

Holbrook KA. (1994) Ultrastructure of the epidermis. In: The keratinocyte handbook. Editors: IM Leigh, EB Lane and FM Watt. Cambridge University Press. 3-39.

Hood JD, Meininger CJ, Ziche M, Granger HJ. (1998) VEGF upregulates ecNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. American Journal of Physiology 274 : H1054-H1058.

Hoying JB and Williams S K. (1996) Effects of basic fibroblast growth factor on human microvessel endothelial cell migration on collagen I correlates inversely with adhesion and is cell density dependent. J. Cell. Physiol. 168 : 294-304.

Hu GF. (1998) Neomycin inhibits angiogenin-induced angiogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:9791-9795.

Hudlicka O, Brown MD, Egginton S. (1998) Angiogenesis: basic concepts and methodology. Halliday, A., Hunt, B.J., Poston, L., Schachter, M., eds An introduction to vascular biology. Cambridge University Press : 3-20.

Hughes S, Hall P. (1993) Overview of the fibroblast growth factor and receptor families: complexity functional diversity, and implications for future cardiovascular research. Cardiovasc. Res. 27 : 1199-1203.

I

Ingber D, Folkman J. (1988) Inhibition of angiogenesis through modulation of collagen metabolism. Lab. Invest. 59 : 44-51.

Ingber D, Fujita T, Kishimoto S, Sudo K, Kanamaru T, Brem H, Folkman J. (1990) Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumor growth. Nature 348:555-557.

Ingber DE, Folkman J. (1989) How does extracellular matrix control capillary morphogenesis? Cell (Cambridge, Mass.) 58 : 803-805.

Ito K, Abe T, Tomita M, Morimoto A, Khono K, Mori T, Ono M, Sugenoya A, Nishihira T, Kuwano M. (1993) Anti-angiogenic activity of arachidonic acid metabolism inhibitors in angiogenesis model systems involving human microvascular endothelial cells and neovascularization in mice. Int. J. Cancer 55:660-666.

Iwasaki S, Tsuruoka N, Hattori A, Sato M, Tsujimoto M, Kohno M. (1995) Distribution and characterization of specific cellular binding proteins for bone morphogenetic protein-2. J. Biol. Chem. 270 : 5476.

J

Jackson CJ, Jenkins KL. (1991) Type I collagen fibrils promote rapid vascular tube formation upon contact with the apical side of cultured endothelium. Exp. Cell Res. 192 : 319-323.

Jackson CJ, Nguyen M. (1997) Human microvascular endothelial cells differ from macrovascular endothelial cells in their expression of matrix metalloproteinases. Int. J. Biochem. Cell Biol. 29(10) : 1167-1177.

Jackson JR, Bolognese B, Hillegass L, Kassis S, Adams J, Griswold DE, Winkler JD. (1998) Pharmacological effects of SB220025, a selective inhibitor of P38 mitogen-activated protein kinase, in angiogenesis and chronic inflammatory disease models. J. Pharmacol. Exp. Ther. 284:687-692.

Jacobsson A, Norrby K. (1991) Kinetics of a mammalian angiogenic response. Cell Proliferation 24 : 59.

Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. (1973) Culture of endothelial cells derived from mbilical veins: Identification by morphologic criteria. J. Clin. Invest. 52 : 2745.

Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. (1973) Culture of endothelial cells derived from mbilical veins: Identification by morphologic criteria. J. Clin. Invest. 52 : 2745.

Jaffe EA. (1987) Cell biology of endothelial cells. Hum. Pathol. 18 : 234-239.

Jaggers DC, Collins WP, Milligan SR. (1996) Potent inhibitory effects of steroids in an in vitro model of angiogenesis. Journal of Endocrinology 150 : 457-464.

Jaggers DC, Collins WP, Milligan SR. (1996) Potent inhibitory effects of steroids in an in vitro model of angiogenesis. Journal of endocrinology 150 : 457-464.

Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A et al. (1996) A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2 receptor tyrosine kinase). EMBO J. 15 : 290-298.

Jussilia L, Valtola R, Partanen TA, Salven P, Heikkilae P, Matikainen MT, Renkonen R, Kaipainen A, Detmar M, Tschaler E, Alitalo K. (1998) Lymphatic endothelium and Kaposi's sarcoma spindle cells detected by antibodies against the vascular endothelial growth factor receptor-3. Cancer Res. 58 : 1599-1604.

K

Kallard T (1986) Effect of immunomodulators LS-2616 on growth and metastasis of the murine B16-F10 melanoma. Cancer Res. 46 : 3018-3022.

Kangesu T, Manek S, Terenghi G, Gu XH, Navsaria HA, Polak JM, Green CJ, Leigh IM. (1998) Nerve and blood vessel growth in response to grafted dermis and cultured keratinocytes. Plast. Recons. Surg. 101(4) : 1029-1038.

Karasek MA, Charlton ME. (1971) Growth of post-embryonic skin epithelial cells on collagen gels. J. Invest. Dermatol. 56: 205-210.

Karasek MA. (1989) Microvascular endothelial cell culture. J. Invest. Dermatol. 93 : 33S-38S.

Kessel J, Fabian B. (1985) Graded morphogenetic patterns during the development of the extraembryonic blood system and coelom of the chick blastoderm: A scanning electron microscope and light microscope study. Am. J. Anat. 173 : 99-112.

Khan JK et al. (2000) Gene expression profiling in an in vitro model of angiogenesis. Am. J. Pathol. 156 : 1887-1900.

Kieny HK, Mauger A. (1984) Immunofluorescence localisation of extracellular matrix components during muscle morphogenesis. J. Exp. Zool. 232 : 327-341.

Kieser A, Welch HA, Brandner G, Marme D, Kolch W. (1994) Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. Oncogene 9 : 963-969.

Kirsner RS. (1998) The use of Apligraft in acute wounds. J. Dermatol. 25 (12) : 805-811.

Klagsbrun M, D'Amore PA. (1991) Regulators of angiogenesis. Annu Rev Physiol. 53:217-39.

Klagsburn M, D'Amore PA. (1991) Regulators of angiogenesis. Annu. Rev. Physiol. 53 : 217-239.

Kleinman HK. et al (1982) Isolation and characterisation of type IV procollagen, laminin, and heparin sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. Biochemistry 21 : 6188-6193.

Kohn EC, Alessandro R, Spoonster J, Wersto RP, Liotta LA. (1995) Angiogenesis: role of calcium-mediated signal transduction. Proc Natl Acad Sci U S A 92(5):1307-1311.

Koivunen E, Arap W, Valtanen H et al (1999) Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor. Nature Biotechnology 17 : 768-774.

Kon K, Fujiwara T. (1994) Transformation of fibroblasts into endothelial cells during angiogenesis. Cell Tissue Research 278 : 625-628.

Kraling BM, Jimenez SA, Sorger T, Maul GG. (1994) Isolation and characterization of microvascular endothelial cells from human dermis and from skin biopsies of patients with systemic sclerosis. Laboratory Investigation 71 : 745-754.

Kruse FE, Joussen AM, Rohrschneider K, Becker MD, Volker HE. (1998) Thalidomide inhibits corneal angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor. Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 235:461-466.

Kubota Y, Kleinman HK, Martin GR, Lawley TJ. (1988) Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells in capillary-like structure. J.Cell. Biol. 107 : 1589-1598.

Kumar R, Yoneda J, Bucana CD, Fidler IJ. (1998) Regulation of distinct steps of angiogenesis by different angiogenic molecules. Int. J. Oncol. 12(4) : 749-757.

Kusaka M, Sudo K, Matsutani E, Kozai Y, Fijita T, Ingber D, Folkman J. (1994) Cytostatic inhibition of endothelial cell growth by the angiogenesis inhibitor TNP-470 (AGM-1470). Br. J. Cancer 69 : 212-216.

L

Laherty CD, O'Rouke K, Wolf FW, Katz R, Seldin MF, Dixit VM. (1992) Characterization of mouse thrombospondin 2 sequence and expression during cell growth and development. J. Biol. Chem. 267(5) : 3274-3281.

Lambert PB. (1971) Vascularization of skin grafts. Nature. 232 : 279- .

Lansman JB. (1988) Endothelial mecanosensors. Going with the flow. Nature 331 : 481-482.

Lattera J, Guérin C, Goldstein GW. (1990) Astrocytes induce neural microvascular endothelial cells to form capillary-like structure in vitro. J. Cell. Physiol. 144 : 204-215.

Leavesley DI, Schwartz MA, Rosenfeld M, Cheresh DA. (1993) Integrin beta 1- and beta 3-mediated endothelial cell migration is triggered through distinct signaling mechanisms. J Cell Biol. 121(1):163-70.

Leco KJ, Khokha R, Pavloff N, Hawkes SP, Edwards DR. (1994) TIMP-3 is an extracellular matrix-associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse cells and tissues. J. Biol. Chem. 269 : 9352-9360.

Leung DW, Cachianes G, Kuang W-J, Goeddel DV, Ferrara N. (1989) Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. Science 246 : 1306-1309.

Levy AP, Levy NS, Wegner S, Goldberg MA. (1995) Transcriptionnal regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. J. Biol. Chem. 270 : 13333-13340.

Lewis LJ, Hoak JC, Maca RD, Fry GL. (1973) Replication of human endothelial cells in culture. Science 181 : 453.

L'Heureux N, Germain L, Labbe R, Auger FA. (1993) In vitro construction of a human blood vessel from cultured vascular cells: a morphologic study. J Vasc Surg. 17(3):499-509.

L'Heureux N, Paquet S, Labbe R, Germain L, Auger FA. (1998) A completely biological tissue-engineered human blood vessel. FASEB J. 12(1):47-56.

Li H, Berthod F, Xu W, Damour O, Germain L, Auger FA. (1997) Use of *in vitro* reconstructed skin to cover skin flap donor site. Journal of Surgical Research 73 : 143-148.

Libby P, Birinyi L K. (1986) The dynamic nature of vascular endothelial functions. Zilla, Fasol, Deutsch Endothelialization of vascular grafts. 1st Eur. workshop advanced technologies in vascular surgery. Vienna : 80-99.

Loppez Valle CA, Glaude P, Auger FA. (1992) Surgical model for in vivo evaluation of cultured epidermal sheets in mice. Plast. Reconstr. Surg. 89 : 139- ?.

M

Maciag T, Kadish J, Wilkins L, Stemerman MB, Weinstein R. (1982) Organizational behaviour of human vein endothelial cells. J. Cell Biol. 94 : 511-520.

MacMillan BG. (1984) Present status of bioadherent materials, barrier dressings, and biosynthetics as skin substitues. Wise, D.L. Burn wound coverings. Boca Raton, CRC Press. 1 : 115-136.

Madri JA, Bell L, Merwin JR. (1992a) Modulation of vascular cell behavior by transforming growth factor beta. Mol. Reprod. Dev. 32 : 121-126.

Madri JA, Pratt BM, Yannariello-Brown J. (1988) Matrix driven cell size changes modulate aortic endothelial cell proliferation and sheet migration. Am. J. Pathol. 132 : 18-27.

Madri JA, Pratt BM. (1986) Endothelial cell-matrix interactions: In vitro models of angiogenesis. J. Histochem. Cytochem. 34 : 85-91.

Madri JA, Pratt BM. (1988) Angiogenesis. R.F. Clark and P. Henson eds. The molecular and cellular biology of wound healing. New York Plenum Press : 337-358.

Madri JA, Williams SK. (1983) Capillary endothelial cell cultures: phenotypic modulation by matrix components. J Cell Biol. 97(1):153-65.

Madri JA. (1997) Extracellular matrix modulation of vascular cell behaviour. Transpl. Immunol. 5(3) : 179-183.

Majano G. (1965) Ultrastructure of the vascular membrane. Hamilton, W.F. and Dow, P. Handbook of physiology. Baltimore Williams and Wilkins 2 : 2293-2375.

Majewski S, Skopinska M, Marczak M, Szmurlo A, Bollag W, Jablonska S. (1996) Vitamin D3 is a potent inhibitor of tumor cell-induced angiogenesis. J. Invest. Dermatol. Symp. Proc. 1:97-101.

Malhotra R, Stenn KS, Fernandez LA, Braveman IM. (1989) Angiogenic properties of normal and psoriatic skin associate with epidermis, not dermis. Lab. Invest. 61 : 162-165.

Malinda KM, Sidhu GS, Banaudha KK, Gaddipati JP, Maheshwari RK, Goldstein AL and Kleinman HK. Thymosin alpha 1 stimulates endothelial cell migration, angiogenesis, and wound healing. J. Immunol. 1998;160:1001-1006.

Manetti F, Capello V, Botta M, Corelli F, Mongelli N, biasili G Borgia AL, Ciomei M. (1998) Synthesis and binding mode of heterocyclic analogues of suramin inhibiting the human basic fibroblast growth factor. Bioorg. Med. Chem. 6:947-958.

Marks RM, Czerniecki M, Penny R. (1985) Human microvascular endothelial cells: an improved method for tissue culture and a description of some singular properties in culture. In Vitro Cellular & Developmental Biology 21(11) : 627-635.

Marx M, Perimutter RA, Madri JA. (1994) Modulation of platelet-derived growth factor receptor expression in microvascular endothelial cells during in vitro angiogenesis. J. Clin. Invest. 93 : 131-139.

Mason JC, Yarwood H, Sugars K, Haskard DO. (1997) Human umbilical vein and dermal microvascular endothelial cells show heterogeneity in response to PKC activation. Am. J. Physiol. 273 : C1233-1240.

Matsumura T, Wolff K, Petzelbauer P. (1997) Endothelial cell tube formation depends on cadherin 5 and CD31 interactions with filamentous actin. The Journal of Immunology 158 : 3408-3416.

Matsuzaki K et al (1989) Monoclonal antibodies against heparin-binding growth factor II/ basic fibroblast growth factor that blocks its biological activity: invalidity of the antibodies for tumour angiogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86 : 9911-9915.

McClure C. (1921) The endothelial problem. Anat. Rec. 22 : 229-235.

Mendler M, Eich-Bender SG, Vaughan L, Winterhalter KH and Brukner P. (1989) Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX and XI. J. Cell Biol. 108: 191-197.

Ment LR, Stewart WB, Ardito TA, Huang E, Madri JA. (1992) Indomethacin promotes germinal matrix microvasculature maturation in the newborn pup. Stroke 23 : 1132-1137.

Meredith JE, Fazeli B, Schwartz MA. (1993) The extracellular matrix as a cell survival factor. Mol. Cell Biol. 4 : 953-961.

Meyer GT, Matthias LJ, Noack L, Vadas MA, Gamble JR. (1997) Lumen formation during angiogenesis in vitro involves phagocytic activity, formation and secretion of vacuoles, cell death, and capillary tube remodelling by different populations of endothelial cells. Anat Rec. 249(3):327-40.

Michel M, Auger FA, Germain L. (1993) Anchored skin equivalent cultured in vitro: a new tool for percutaneous absorption studies. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 29A(11):834-7.

Michel M, L'Heureux N, Pouliot R, Xu W, Auger FA, Germain L. (1999) Characterization of a new-engineered human skin equivalent with hair. In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. 35(6) : 318-326.

Mignatti P, Morimoto T, Rifkin DB. (1992) Basic fibroblast growth factor released by single isolated cells stimulates their migration in an autocrine manner. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88 : 11007-11011.

Mignatti P, Rifkin DB, Welgus HG, Parks WC. (1996) Proteinases and tissue remodeling. Richard A. F. Clark The molecular and cellular biology of wound repair. New York Plenum Press : 427-474.

Miyake A, Konishi M, Martin F, Hernday N, Ozaki K, Yamamoto S, Mikami T, Itoh N. (1998) Structure and expression of a novel member, FGF-16, on the fibroblast growth factor family. Biochem. Biophys. Res. Commun. 243(1) : 148-152.

Miyamoto S, Teramoto H, Coso OA, Gutkind JS, Burbelo PD, Akiyama SK, Yamada KM. (1995) Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. Cell Biol. 131(3):791-805.

Moghaddam A, Zhang HT, Fan TP, Hu DE, Lees VC, Turley et al. (1995) Thymidine phosphorylase is angiogenic and promotes tumor growth. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:998-1002.

Mohammadi M, Froum S, Hamby JM, Schroeder MC, Panek RL, Lu GH, Eliseenkova AV, Green D, Schlessinger J, Hubbard SR. (1998) Crystal structure of an angiogenesis inhibitor bound to the FGF receptor tyrosine kinase domain. EMBO J. 17:5896-5904.

Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B and Krepler R. (1982) The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. Cell 31: 11-24.

Moncada S, Gryglewski R, Bunting S et al. (1976) An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. Nature 263 : 663-665.

Montesano R and Orci L. (1985) Tumor-promoting phorbol ester induce angiogenesis in vitro. Cell (Cambridge, Mass.) 42 : 469-477.

Montesano R, Kumar S, Orci L, Pepper MS. (1996) Synergistic affect of hyaluronan oligosaccharides and vascular endothelial growth factor on angiogenesis in vitro. Lab. Invest. 75:249-262.

Montesano R, Orci L. (1987) Phorbol ester induces angiogenesis in vitro from large vessel endothelial cell. J. Cell Physiol. 139 : 284-291.

Montesano R, Pepper MS, Orci L. (1993) Paracrine induction of angiogenesis in vitro by Swiss 3T3 fibroblasts. J. Cell Sci. 105 : 1013-1024.

Montesano R, Pepper MS, Orci L. (1993) Paracrine induction of angiogenesis in vitro by Swiss 3T3 fibroblasts. J Cell Sci. 105 (Pt 4):1013-24.

Montesano R, Pepper MS, Vassalli JD, Orci L. (1987) Phorbol ester induces cultured endothelial cells to invade a fibrin matrix in the presence of fibrinolytic inhibitors. J Cell Physiol. 132(3):509-16.

Montesano R, Vasalli JD, Baird A, Guilleman R, Orci L. (1986) Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83 : 7297-7301.

Montesano R. (1992) Regulation of angiogenesis *in vitro*. European Journal of Clinical Investigation 22 : 504-515.

Moreau P, Tea B-S, Dam T-V, Hamet P. (1997) Altered balance between cell replication and apoptosis in hearts and kidneys of newborn SHR. Hypertension 30 (part 2) : 720-724.

Moresi JM, Horn TD. (1997) Distribution of Langerhans cells in human hair follicle. J Cutan Pathol. 24(10):636-40.

Moses MA, Sudhalter J, Langer R. (1990) Identification of an inhibitor of neovascularisation from cartilage. Science 248 : 1408-1410.

Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. (1993) PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. J. Exp. Med. 178 : 449-460.

Murohara T, Witzenbichler B, Spyridopoulos I, Asahara T, Ding B, Sullivan A, Losordo DW, Isner JM. (1999) Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 19(5):1156-61.

N

Nakazawa K, Kalassy M, Sahuc F, Collombel C, Damour O. (1998) Pigmented human skin equivalent as a model of the mecanisms of control of cell-cell and cell-matrix interactions. Med. Biol. Eng. Comput. 36 (6) : 813-820.

Namiki A, Brogi E, Kearney M, Kim EA, Wu T, Couffinhal T, Varticovski L, Isner JM. (1995) Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. J. Biol. Chem. 270(52) : 31189-31195.

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. FASEB Journal 13 : 9-22.

Newman PJ, Berndt MC, Gorski J, White II GC, Lyman S, Paddock C, Muller WA. (1990) PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. Science 247 : 1219-1222.

Newman PJ. (1997) The biology of PECAM-1. J. Clin. Invest. 99(1) : 3-8.

Nicosia RF and Ottinetti A. (1990a) Growth of microessels in serum-free matrix culture of rat aorta. Lab. Invest. 63 : 115-122.

Nicosia RF, Lin YJ, Hazelton D, Qian X. (1997) Endogenous regulation of angiogenesis in the rat aorta model. Role of vascular endothelial growth factor. Am. J. Pathol. 151:1379-1386.

Nicosia RF, Madri JA. (1987) The microvascular extracellular matrix. Developmental changes during angiogenesis in the aortic ring-plasma clot model. Am. J. Pathol. 128 : 78-90.

Nicosia RF, Ottinetti A. (1990b) Modulation of microvascular growth and morphogenesis by reconstitued basement membrane gel in three-dimensional cultures of rat aorta: a comparative study of angiogenesis in matrigel, collagen, fibrin, and plasma clot. In Vitro Cell. Dev. Biol. 26 : 119-218.

Nicosia RF, Villaschi S. (1995) Rat aortic smooth muscle cells become pericytes during angiogenesis in vitro. Lab. Invest. 73(5) : 658-666.

Nör JE, Christensen J, Mooney DJ, Polverini PJ. (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. Am. J. Pathol. 154 : 375-384.

Norrby K, Jakobsson A, Sörbo, J. (1986) Mast-cell-mediated angiogenesis: A novel experimental model using the rat mesentery. Virchows Arch. (Cell Pathol.) 52 : 195-206.

Norrby K. (1997) Angiogenesis: new aspects relating to its initiation and control. A.P.M.I.S. 105 : 417-437.

O

O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai, N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR and Folkman J. (1997) Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. Cell 88:277-285.

Okada N, Fushimi M, Nagata Y, Fukunaga T, Tsutsumi Y, Nakagawa S, Mayumi T. (1996) Evaluation of angiogenic inhibitors with an in vivo quantitative angiogenesis method using agarose microencapsulation and mouse hemoglobin enzyme-linked immunosorbent assay. Jpn J Cancer Res 87:952-957.

Okamura K. et al (1992) A model system for tumour angiogenesis: Involvement of transforming growth factor-a in tube formation of human microvascular endothelial cells induced by oesophageal cancer cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 186 : 1471-1479.

Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A et al. (1996) Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93 : 2576-2581.

Ono M, Kawahara N, Goto D, Wakabayashi Y, Ushiro S, Yoshida S, Izumi H, Kuwano M, Sato Y. (1996) Inhibition of tumor growth and neovascularization by an anti gastric ulcer agent. Cancer Res. 56:1512-.

O'Reilly MS, Holmgren L, Chen C, Folkman J. (1996) Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. Nat.Med. 2 : 689-692.

Osborn L, Hessian C, Tizard R et al. (1989) Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. Cell 59 : 1203

O'Shea KS, Dixit V. (1988) Unique distribution of extracellular matrix component thrombospondin in the developing mouse embryo. J. Cell Biol. 107 : 2737-2748.

Overall CM, Wrana JL, Sodek J. (1991) Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor-beta 1 in human fibroblasts. J. Biol. Chem. 266 : 14064-14071.

P

Partanen J, Vainikka S, Korhonen J, Armstrong E, Alitalo K. (1992) Diverse receptors for fibroblast growth factor. Prog. Growth Factor Research 4 : 69.

Pearson JD. (1991) Endothelial cell biology. Radiology 179 : 9-14.

Pepper MS, Belin D, Montesano R, Orci L, Vassalli JD. (1990) Transforming growth factor-beta 1 modulates basic fibroblast growth factor-induced proteolytic and angiogenic properties of endothelial cells in vitro. J Cell Biol. 111(2):743-55.

Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. (1991) Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 181(2):902-6.

Pepper MS, Montesano R. (1990) Proteolytic balance and capillary morphogenesis. Cell Differ. Dev. 32 : 319-328.

Peters KG, Werner S, Chen G, Williams LT. (1992) Two FGF receptor genes are differentially expressed in epithelial and mesenchymal tissues during limb formation and organogenesis in the mouse. Development 114 : 233-243.

Pierce GF. (1990) Macrophages: important physiologic and pathologic sources of polypeptide growth factors. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 2 : 233-234.

Plouet J, Moro F, Bertagnolli S, Coldeboeuf N, Mazarguil H, Clamens S, Bayard F. (1997) Extracellular cleavage of the vascular endothelial growth factor 189 amino acid form by urokinase is required for its mitogenic effect. J. Biol. Chem. 272 : 13390-13396.

Polverini PJ. (1995) The pathophysiology of angiogenesis. Crit. Rev. Oral. Biol. Med. 6 : 230-247.

Polverini PJ. (1996) Cellular adhesion molecules: newly identified mediators of angiogenesis. Am. J. Pathol. 148 : 1023-1029.

Pomahac B, Svensjo T, Yao F, Brown H, Eriksson E. (1998) Tissue engineering of skin. Crit. Rev. Oral Biol. Med. 9 (3) : 333-344.

Potts RO, Francour ML. (1991) The influence of stratum corneum morphology on water permeability. J. Invest. Dermatol. 96: 495-499.

Pruniéras M, Régnier M, Woodley D. (1983) Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. J. Invest. Dermatol. 81 : 28-33S.

R

Redlitz A, Daum G, Sage EH. (1999) Angiostatin diminishes activation of the mitogen-activated protein kinases ERK-1 and ERK-2 in human dermal microvascular endothelial cells. J. Vasc. Res. 36(1) : 28-34.

Régnier M, Schweizer J, Michel S et al. (1986) Expression of high molecular weight (167 kDs) keratin in human keratinocutes cultured on dead de-epidermized dermis. Exp. Cell Res. 165 : 63-72.

Resnick N, Gimbrone MA Jr. (1995) Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression. FASEB Journal 9 :874-882.

Rheinwald JG and Green H. (1975) Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. Cell. 6 : 331-343.

Rheinwald JG, Green H. (1975) Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. C ell 6 : 331-343.

Rheinwald JG, Green H. (1977) Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. Nature 265(5593) : 421-424.

Rheinwald JG, Green H. (1977) Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. Nature. 265(5593):421-4.

Ribatti D, Vacca A, Roncali L, Dammacco F. (1991) Angiogenesis under normal and pathological conditions. Haematologica 76 : 311-320.

Ribbati D, Vacca A. (1999) Models for studying angiogenesis in vivo. The International Journal of Biological Markers. 14 (4) ; 207-213.

Richard L, Velasco P, Detmar M. (1998) A simple immunomagnetic protocol for the selective isolation and long-term culture of human dermal microvascular endothelial cells. Exp. Cell Res. 240(1) : 1-6.

Risau W, Flamme I. (1995) Vasculogenesis. Ann. Rev. Cell Dev. Biol. 11 : 73-91.

Risau W. (1995) Differentiation of endothelium. FASEB Journal 9 : 926-933.

Risau W. (1997) Mechanisms of angiogenesis. Nature : 386 : 671-674.

Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NJ, Wakefield LM, Heine UI, Liotta IA, Falanga V, Kehrl JH, Fauci AS. (1986) Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4167-4171.

Rodgers GM, Greenberg CS, Schuman MA. (1983) Characterisation of the effects of cultured vascular cells on the activation of blood coagulation. Blood 61 : 1155-1162.

Rogelj S, Weinberg RA, Fanning P, Klagsbrun M. (1988) Basic fibroblast growth factor fused to a signal peptide transforms cells. Nature 331 : 173-175.

Rousselle P, Lunstrum GP, Keene DR and Burgeson RE. (1991) Kalinin: An epithelium-specific basement membrane adhesion molecule that is a component of anchoring filaments. J. Cell Biol. 114: 567-576.

Ruegg C, Yilmaz A, Bieler G, Bamat J, Chaubert P and Lejeune FJ. (1998) Evidence for the involvement of endothelial cell integrin $\alpha v\beta 3$ in the disruption of the tumor vasculature induced by TNF and INFγ. Nature Med. 4:408-414.

Ruggeri ZM, Ware J. (1993) von Willebrand factor. FASEB Journal 7 : 308-316.

S

Sabin FR. (1920a) Preliminary note on the differentiation of angioblasts and the method by which they produce blood-vessels, blood plasma and red blood-cells as seen in the living chick. Anat. Rec. 13 : 199-204.

Sabin FR. (1920b) Studies on the origin of blood vessels and of red corpuscules as seen in living blastoderm of the chick during the second day of incubation. Carnegie Contrib. Embryol. 9 : 213-259.

Sage H, Decker J, Funk S, Cow M. (1989) SPARC: a Ca2+-binding extracellular protein associated with endothelial cell injury and proliferation. J. Mol. Cell Cardiol. 21(Suppl 1) : 13-22.

Sage H, Vernon RB. (1994) Regulation of angiogenesis by extracellular matrix: the growth and the glue. J. Hypertension 12 (Suppl 10) : S145-S152.

Sahuc F, Nakazawa K, Berthod F et al. (1996) Mesenchymal-epithelial interactions regulate gene expression of type VII collagen and kalinin in keratinocytes and dermal-epidermal junction formation in a skin equivalent model. Wound Rep. Reg. 4 : 93-102.

Saintigny G, Bonnard M, Damour O and Collombel C. (1993) Reconstruction of epidermis on a chitosan cross-linked collagen-GAG lattice: effects of fibroblasts. Acta Derm. Venereol. 73: 175-180.

Sakamoto N, Iwahana M, Tanaka NG, Osada Y. (1991) Inhibition of angiogenesis and tunour growth by a synthetic laminin peptide CDPGYIGSR-NH2. Cancer Res. 51 : 903-906.

Sakamoto T, Ishibashi T, Kimura H, Yoshikawa H, Spee C, Harris MS, Hinton DR, Ryan SJ. (1995) Effect of telogalan sodium on angiogenesis in vitro by choroidal endothelial cells. Invest. Ophtalmol. 36:1076-1083.

Sakkoula E, Pipili-Synetos E, Maragoudakis ME. (1997) Involvement of nitric oxide in the inhibition of angiogenesis by interleukine-2. Br. J. Pharmacol. 122:793-795.

Sandison JC. (1928) The transparent chamber of the rabbit's ear giving complete description of improved technic of construction and introduction and general accounts of growth and behaviour of lining cells and tissues as seen with the microscope. Am. J. Anat. 41 : 447-473.

Sasisekharan R, Moses MA, Nugent MA, Cooney CL, Langer R. (1994) Heparinase inhibits neovascularization. Proc Natl Acad Sci U S A 9:1524-1528.

Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, Gridley T, Wolburg H, Risau W, Qin Y. (1995) Distinct roles of the receptor tyrosine kinase Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. Nature 376 : 70-74.

Sato Y, Rifkin DB. (1989) Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a later transforming growth factor-beta-like molecule by plasmin during co-culture. J. Cell Biol. 109 : 309-315.

Schimmenti Y, Yan H-C, Madri JA, Albelda S. (1992) Cell adhesion molecule PECAM-1 modulates cell migration. J. Cell Physiol. 153 : 417-428.

Schimmenti Y, Yan H-C, Madri JA, Albelda S. (1992) Cell adhesion molecule PECAM-1 modulates cell migration. J. Cell Physiol. 153 : 417-428.

Schlotterer M. (1997) Intérêt des allogreffes cutanées dans le traitement des grands brûlés. Chirurgie 122 : 6-9.

Schreiber AB, Winkler ME, Derynck R. (1986) Transforming growth factor alpha: a more potent angiogenic factor than epidermal growth factor. Science 232 : 1250-1253.

Schwartz MA, Owaribe K, Kartenbeck J, Franke WW. (1990) Desmosomes and hemidesmosomes: constitutive molecular components. Ann. Rev. Cell Biol. 6: 461-491.

Schweigerer L. et al. (1992) Indentification in human urine of a natural growth inhibitor of cells derived from solid paediatric tumors. Eur. J. Clin. Invest. 22 : 260-264.

Seeley KA, Aggeler J. (1991) Modification of milk protein synthesis through alteration of the cytoskeleton in mouse mammary epithelial cells cultured on a reconstituted basement membrane. J. Cell. Physiol. 146 : 117-130.

Seghezzi G, Patel S, Ren CJ, Gualandris A, Pintucci G, Robbins ES, Shapiro RL, Galloway AC, Rifkin DB, Mignatti P. (1998) Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. J. Cell Biol. 141:1659-1673.

Selye H. (1953) On the mecanism through which hydrocortisone effects the resistence of tissue to injury. JAMA 152 : 1207-1213.

Shahabeddin L, Berthod F, Damour O, Collombel C. (1990) Characterization of skin reconstructed on a chitosan-cross linked collagen matrix. Skin Pharmacol. 3 : 107-114.

Shahabeddin L, Damour O, Berthod F, Rousselle P, Saintiguy G et Collombel C. (1991) Reconstructed skin from cocultured human keratinocytes and fibroblasts on a chitosan cross-linked collagen-GAG matrix. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 2, 222-226.

Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsentein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. (1995) Failure of blood formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. Nature (London) 376 : 62-66.

Sheridan RL, Tompkins RG. (1999) Skin substitutes in burns. Burns 25 : 97-103.

Shimo T, Nakanishi T, Nishida T et al. (1999) Connective tissue growth factor induces the proliferation, migration, and tube formation of vascular endothelial cells in vitro, and angiogenesis in vivo. J. Biochem. 126(1) : 137-145.

Shing Y, Folkman J, Sullivan R, Butterfield C, Murray J, Klagsburn M. (1984) Heparin affinity:purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. Science 223 : 1296-1299.

Sholley MM, Ferguson GP, Seibel HR, Montour JL, Wilson JD. (1984) Mechanisms of neovascularization: vascular sprouting can occur without proliferation of endothelial cells. Lab. Invest. 51 : 624-632.

Simionescu N, Simionescu M. (1988) The cardiovascular system. Leon Weiss. Cell and tissue biology : A textbook of histology Munich Urban & Schwarzenberg Inc.-Baltimore-Munich 355-400.

Simmons D, Makgoba MW, Seed B. (1989) ICAM, an adhesion ligand for LFA-1, is homologous to the neural cell adhesion molecule NCAM. Nature 331 : 624

Sims DE. (1986) The pericyte: a review. Tissue Cell 18 : 153-174.

Sin N, Meng L, Wang, MQW, Wen J.J, Bornmann WG, Crews CM. (1997) The anti-angiogenic agent fumagillin covalently binds and inhibits the methionine aminopeptidase, MetAP-2. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94 : 6099-6103.

Smith LT, Holbrook KA, Byers PH. (1982) Structure of the dermal matrix during development and in the adult. J Invest Dermatol.79 (Suppl 1):93s-104s.

Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klasgsbrun M. (1998) Neutrophilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform specific receptor for vascular endothelial growth factor. Cell 92 : 735-745.

Sondell M, Lundborg G, Kanje M. (1999) Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. Journal of Neuroscience 19(14) : 5731-5740.

Sporn MG, Roberts AB. (1988) Peptide growth factors are multifunctional. Nature 332 : 217-219.

St Croix B, Rago C, Velculescu V, Traverso G, Romans KE, Montgomery E, Lal A, Riggins GJ, Lengauer C, Vogelstein B, Kinzler KW. (2000) Genes expressed in human tumor endothelium. Science. 289(5482):1197-202.

Staunton DE, Dustin ML, Springer TA. (1989) Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. Nature 339 : 61

Stein J, Drenckhahn D, Nehls V. (1996) Development of pericyte-like cells during angiogenesis in quail chick chimeras as detected by combined Feulgen reaction and immunohistochemistry. Anatomisches Institut 178(2) : 153-158.

Streit M, Riccardi L, Velasco P, Brown LF, Hawighorst T, Bornstein P, Detmar M. (1999) Thrombospondin-2: a potent endogenous inhibitor of tumor growth and angiogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96(26) : 14888-14893.

Stromblad S, Becker JC, Yebra M, Brooks PC, Cheresh DA. (1996) Suppression of p53 activity and p21WAF1/CIP1 expression by vascular cell integrin alphaVbeta3 during angiogenesis. Clin Invest. 98(2):426-33.

Strydom DJ. (1998) The angiogenins. Cell Mol. Life Sci. 54:811-824.

Suganumu M, Fujiki H, Surguri H, Yoshizawa S, Hirota M, Makayasu M, Ojika M, Wakamatsu K, Yamada K, Sugimura T. (1988) Okadaic acid: An additionnal non-phorbol-12-tetradecanoate-13-acetate-type tumor promoter. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85 : 1768-1771.

Sunderkotter C, Goebeler M, Schulze-Osthoff K, Bhardwaj R, Sorg C. (1991) Macrophage-derived angiogenesis factors. Pharmacol Ther. 51:195-216.

Supp DM, Supp AP, Bell SM, Boyce ST. (2000) Enhanced vascularization of cultured skin substitutes genetically modified to overexpress vascular endothelial growth factor. J. Invest. Dermatol. 114 : 5-13.

Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. (1996) Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. Cell 87 : 1171-1180.

Suri C, McClain J, Thurston G, McDonald DM, Zhou H, Oldmixon EH, Sato TN, Yancopoulos GD. (1998) Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. Science 282 : 468-471.

T

Tachibana T. (1995) The Merkel cell: recent findings and unresolved problems. Arch. Histol. Cytol. 58 (4) : 379-396.

Tanaka T, Yoshinobu M, Wen P, Kufe DW, Fine HA. (1997) Viral vector-mediated transduction of a modified platelet factor 4 cDNA inhibits angiogenesis and tumor growth. Nature Med. 3:437-442.

Taub M, Wang Y, Szensny MT, Kleinman HK. (1990) Epidermal growth factor or transforming growth factor alpha is required for kidney tubulogenesis in matrigel cultured in serum free medium. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87 : 4002-4006.

Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Bohlen P. (1992) Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial growth factor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 187 : 1579-1586.

Thorin E, Shreeve SM. (1998) Heterogeneity of vascular endothelial cells in normal and disease states. Pharmacol Ther. 78(3):155-66.

Timpl R, Brown JC. (1994) The laminins. Matrix Biol. 14: 275-281.

Tortora GJ, Reynolds Grabowski S, Parent J-C. (1994) Le système tégumentaire. A & P Textbooks, Inc., and Sandra Reynolds Grabowski. Principes d'anatomie et de physiologie. Anjou, Canada Centre Éducatif et Culturel inc. 132-152.

Trent JF, Kirsner RS. (1998) Tissue engineered skin: Apligraft, a bi-layered living skin equivalent. Int. J. Clin. Pract. 52 (6) : 408-413.

Trompezinski S, Pernet I, Mayoux C, Schmitt D, Viac J. (2000) Transforming growth factor-beta1 and ultraviolet A1 radiation increase production of VEGF but not endothelin-1 in human dermal fibroblasts. Br. J. Dermatol. 143(3) : 539-545.

Tsarfaty I, Resau JH, Rulong, S, Keydar I, Faletto DL, VandeWoude GF. (1992) The net proto-oncogene receptor and lumen formation. Science 257 : 1258-1261.

Tsuboi R, Sato Y, Rifkin DB. (1990) Correlation of cell migration, cell invasion, receptor number, proteinase production, and basic fibroblast growth factor levels in endothelial cells. J. Cell Biol. 110 : 511-517.

Tufro A, Norwood VF, Carey RM, Gomez RA. (1999) Vascular endothelial growth factor induces nephrogenesis and vasculogenesis. Journal of the American Society of Nephrology 10(10) : 2125-2134.

Turner RR, Beckstead JH, Warnke RA et al. (1987) Endothelial cell phenotypic diversity. Am. J. Clin. Pathol. 87 : 569-575.

U

Uitto J, Mauviel A and McGrath J. (1996) The dermal-epidermal basement membrane zone in cutaneous wound healing. In: The molecular and cellular biology of wound repair. Second edition, editor RAF Clark, Plenum Press, New York 513-560.

Unger E et al (1994) Basic fibroblast growth factor enhances myocardial collaterals flow in a canine model. Am. J. Physiol. 266 : 1588-1595.

V

Van Belle E, Witzenbichler B, Chen D, Silver M, Chang L, Schwall R, Isner JM. (1998) Potential angiogenic effect of scatter factor/hepatocyte growth factor: the case for paracrine amplification of angiogenesis. Circulation 97:381-390.

Van Hinsbergh VWM. (1988) Regulation of the synthesis and secretion of plasminogen activators by endothelial cells. Haemostasis 18 : 307-327.

Varner JA, Brooks PC, Cheresh DA. (1995) The integrin avb3: Angiogenesis and aptoptosis. Cell Adhes. Commun. 3 : 367-374.

Vernon RB, Sage EH. (1995) Between molecules and morphology. Extracellular matrix and creation of vascular form. Am. J. Pathol. 147 : 873-883.

Vernon RB, Sage EH. (1999) A novel, quantitative model for study of endothelial cell migration and sprout formation within three-dimensional collagen matrices. Microvascular Research. 57 : 118-133.

Viac J, Palacio S, Scmitt D, Claudy A. (1997) Expression of vascular endothelial growth factor in normal epidermis, epithelial tumors and cultured keratinocytes. Arch. Dermatol. Res. 289(3) : 158-163.

Villaschi S, Nicosia RF. (1994) Paracrine interactions between fibroblasts and endothelial cells in a serum-free coculture model: Modulation of angiogenesis and collagen gel contraction. Lab. Invest. 71 : 291-299.

Vittet D, Buchou T, Schweitzer A, Dejana E, Huber P. (1997) Targeted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94 : 6273-6278.

Voest EE, Kenyon BM, O'Reilly MS, Truitt G, D'Amato RJ, Folkman J. (1995) Inhibition of angiogenesis in vivo by interleukin-12. J. Natl. Cancer Inst. 87:581-586.

Volpert OV, Ward WF, Lingen MW, Chesler L, Solt DB, Johnson MD, Molteni A, Polverini PJ, Bouck NP. (1996) Captopril inhibits angiogenesis and slows the growth of experimental tumors in rats. J. Clin. Invest. 98:671-679.

W

Wagner DD, Marder VJ. (1984) Biosynthesis of von Willebrand protein by human endothelial cells: processing steps and their intracellular localization. J. Cell Biol. 99 : 2123-2130.

Wagner DD, Olmsted JB, Marder VJ. (1982) Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. J. Cell Biol. 95 : 355-360.

Wainwright DJ. (1995) Use of acellular allograft dermal matrix (AlloDerm) in the management of full-thickness burns. Burns 21 : 24 ? ?

Walder CE, Errett CJ, Bunting, S, Lindquist P, Ogez JR, Heinsohn HG, Ferrara N, Thomas GR. (1996) Vascular endothelial growth factor augments muscle blood flow and function in a rabbit model of chronic hindlimb ischemia. J. Cardiovasc. Pharmacol. 27 : 91-98.

Wamil BD, Thurman GB, Sundell HW, DeVore RF, Wakefield G, Johnson DH, Wang YF, Hellerqvist CG. (1997) Soluble E-selectin in cancer patients as a marker of the therapeutic efficacy of CM101, a tumor-inhibiting anti-neovascularization agent, evaluated in phase I clinical trial. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 123:173-179.

Wang N, Butler JP, Ingber DE. (1993) Mechanotransduction across the cell surface and through the cytosqueleton. Science 260 : 1124-1127.

Weidner N, Carrol PR, Flax J, Blumefield W, Folkman J. (1993) Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. Am. J. Pathol. 143 : 401-409.

Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. (1991) Tumor angiogenesis and metastasis: Correlation in invasive breast carcinoma. N. Engl. J. Med. 324 : 1-8.

Weiss JB, McLaughlin B. (1998) Endothelial cell stimulating angiogenesis factor. Int. J. Biochem. Cell. Biol. 30:423-427.

Wetzels RHW, Robben HCM, Leigh IM, Shaafsma HE, Vooijs GP and Ramaekers FCS. (1991) Distribution patterns of type VII collagen in normal and malignant human tissues. Am. J. Pathol. 139: 451-459.

Whalen E, Donnely TA, Naughton G, Rheins LA. (1994) The development of three-dimensional in vitro human tissue models. Hum. Exp. Toxicol. 13 : 853-859.

Wight TN, Raugi GJ, Mumby SM, Bornstein P. (1985) Light microscopy immunolocation of thrombospondin in human tissues. J. Histochem. Cytochem. 33 : 295-302.

Wilting J, Christ B. (1992) A morphological study of the rabbit corneal assay. Anat. Ann. 174 : 549-556.

Wilting J, Christ B. (1996) Embryonic angiogenesis: a review. Naturwissenschaften 83 : 153-164.

Wojta J, Kaun C, Breuss JM, Koshelnick Y, Beckmann R, Hattey E, Mildner M, Weninger W, Nakamura T, Tschachler E, Binder BR. (1999) Hepatocyte growth factor increases expression of vascular endothelial growth factor receptor flk-1 in human endothelial cells. Lab. Invest. 79(4) : 427-438.

Wojtowicz-Praga SM, Dickson RB, Hawkins MJ. (1997) Matrix metalloproteinase inhibitors. Invest. New Drugs 15:61-75.

Woltering EA, Watson JC, Alperin-Lea RC, Sharma C, Keenan E, Kurozawa D, Barrie R. (1997) Somatostatin analogs: angiogenesis inhibitors with novel mechanisms of action. Invest New Drugs 15(1):77-86.

Worst PK, Valentine EA, Fusenig NE. (1974) Formation of epidermis after reimplantation of pure primary epidermal cell cultures from perinatal mouse skin. J. Natl. Cancer Inst. 53 : 1061-.

X

Xu W, Germain L, Goulet F, Auger FA. (1996) Permanent grafting of living skin substitutes: Surgical parameters to control for successful results. J. Burn Care Rehabil. 17 : 7-.

Y

Yamada Y, Nezu J, Shimane M, Hirata Y. (1997) Molecular cloning of a novel vascular endothelial growth factor, VEGF-D. Genomics 42(3) : 483-488.

Yamagishi S, Kawakami T, Fujimori H, Yonekura H, Tanaka N, Yamamoto Y, Urayama H, Watanabe Y, Yamamoto H. (1999) Insulin stimulates the growth and tube formation of human microvascular endothelial cells through autocrine vascular endothelial growth factor. Microvascular research 57(3) : 329-339.

Yamaguchi TP, Harpal K, Henkemeyer M et al (1994) FGFR-1 is required for embryonic growth and mesodermal patterning during mouse gastrulation. Genes Dev. 8 : 3032-3044.

Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S et al. (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature 332 : 411-415.

Yang S, Graham J, Kahn JW, Schwartz EA, Gerritsen ME. (1999) Functionnal roles for PECAM-1 (CD31) and VE-cadherin (CD144) in tube assembly and lumen formation in three-dimensional collagen gels. American Journal of Pathology 155(3) : 887-895.

Yoshida S, Ono M, Shono T, Izumi H, Ishibashi T, Suzuki H, Kuwano M. (1997) Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. Mol. Cell. Biol. 17:4015-4023.

Young DM, Greulich KM and Weier HG (1996) Species-specific in situ hybridation with fluorochrome-labeled DNA probes to study vascularization of human skin grafts on athymic mice. J. Burn Care Rehabil. 17: 305-310.

Young DM, Mathes SJ. (1993) Thermolysin de-epithelialized dermis supports the growth of cultured epidermis and vascularizes: a potential skin replacement. Plastic Surgery Research Council National Meeting. Houston, Texas. 189-193.

Z

Zabrenetzky V, Harris CC, Steeg PS, Roberts DD. (1994) Expression of the extracellular matrix molecule thrombospondin inversely correlates with malignant progression in melanoma, lung and breast carcinoma cell lines. Int. J. Cancer 59 : 191-195.

Zhai Y, Ni J, Jiang G-W et al (1999) VEGI, a novel cytokine of the tumor necrosis factor family, is an angiogenesis inhibitor that suppresses the growth of colon carcinomas in vivo. FASEB Journal 13 : 181-189.

Zimmerman GA, Whatley RE, Benson DE, MaIntyre TM, Prescott SM. (1990) Endothelial cells for studies of platelet-activating factor and arachinodate metabolites. Methods Enzymol. 187 : 520.