

NICOLAS L'HEUREUX

CONSTRUCTION D'UN VAISSEAU SANGUIN HUMAIN
PAR INGÉNIERIE TISSULAIRE:
UNE NOUVELLE APPROCHE

Thèse
présentée
à la Faculté des études supérieures
de l'Université Laval
pour l'obtention
du grade Philosophiæ Doctor (Ph.D.)

Biologie Cellulaire et Moléculaire
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

DÉCEMBRE 1996



**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.

0-612-26075-5

Canada

Résumé court

Les biomatériaux synthétiques sont utilisés lors de la production d'organes par ingénierie tissulaire afin de fournir le support mécanique nécessaire pour résister aux contraintes rencontrées *in vivo*. Dans cette thèse, nous présentons une nouvelle méthode qui permet de produire un vaisseau sanguin humain en utilisant exclusivement des cellules humaines cultivées (aucun matériau exogène synthétique ou biologique). Il s'agit du premier vaisseau sanguin entièrement biologique produit par ingénierie tissulaire à présenter une pression à l'éclatement supérieure à celle de veines humaines. De plus, son endothélium a inhibé l'adhésion plaquettaire, sa média était contractile, tandis que sa maniabilité et sa suturabilité ont permis une implantation préliminaire *in vivo*. Ainsi, ce vaisseau sanguin, entièrement biologique et humain, a présenté les qualités d'une prothèse vasculaire et d'un modèle d'étude *in vitro*. Par ailleurs, cette nouvelle technologie a également été utilisée pour produire un nouvel équivalent cutané.

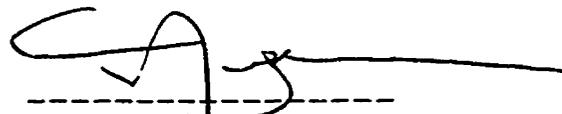
Résumé long

Depuis toujours, les biomatériaux synthétiques ont fourni le support mécanique nécessaire aux organes produits par ingénierie tissulaire qui devront affronter des contraintes physiques importantes *in vivo* comme, par exemple, dans le cas des vaisseaux sanguins. Le but de ce doctorat a été de produire un vaisseau sanguin humain entièrement biologique qui présente les caractéristiques nécessaires à son utilisation en tant que prothèse vasculaire *in vivo*. Une nouvelle méthode a été mise au point qui permet de construire un vaisseau sanguin, par ingénierie tissulaire, en utilisant exclusivement des cellules humaines cultivées. Celui-ci ne contient aucun matériau exogène, qu'il soit synthétique ou biologique. Au cours de cette approche, ce sont les cellules elles-mêmes qui synthétisent la matrice extracellulaire qui assure la structure du tissu. Ce vaisseau sanguin a présenté une pression à l'éclatement dépassant 2000 mmHg, ce qui est supérieure à celle de veines humaines. Il s'agit du premier vaisseau sanguin produit par ingénierie tissulaire à présenter une telle résistance tout en étant entièrement biologique. De plus, son endothélium a inhibé l'adhésion plaquettaire *in vitro* tandis que sa maniabilité et sa suturabilité ont permis une implantation préliminaire *in vivo*. Par ailleurs, la média du vaisseau, composée de cellules musculaires lisses, a démontré des qualités contractiles intéressantes face à plusieurs agonistes vasculaires classiques: histamine, sérotonine et bradykinine. Ce tissu contractile a été utilisé, dans les bains à organe isolé standard, comme outil de recherche dans le cadre d'une étude pharmacologique des récepteurs purinergiques P2. De plus, cette média a été utilisée comme modèle d'étude des flux calciques intracellulaires, par microfluorométrie, en réponse à l'ATP. Ainsi, ce vaisseau sanguin, entièrement biologique et humain, présente les qualités d'une prothèse vasculaire et d'un modèle d'étude *in vitro*. Enfin, cette nouvelle technologie a également mené à la production d'un nouvel équivalent cutané. Celui-ci a également été utilisé comme modèle pharmacologique *in vitro* et des expériences sont en cours afin d'évaluer son potentiel en tant que greffon cutané *in vivo*. En conclusion, cette nouvelle approche s'est révélée très polyvalente et peut être appliquée à la production de nombreux organes par ingénierie tissulaire.



Nicolas L'Heureux

(Étudiant)



François Auger

(Directeur)

Avant-propos

Je tiens à remercier mon directeur et directeur du Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale (LOEX), le Dr François Auger. Il a su créer un environnement où supports scientifique, moral et financier m'ont permis de mener à bien ce doctorat. J'espère que le produit de celui-ci sera aussi profitable pour son laboratoire qu'il le sera pour ma future carrière.

Je remercie tout autant ma co-directrice, Dr Lucie Germain pour son aide constante tout au long de ce doctorat. Son soutien fut senti et apprécié à maintes reprises. Je la remercie particulièrement pour avoir accepté de remplir la fonction exigeante de prélectrice.

Mes remerciements s'adressent également au Dr Raymond Labbé, qui a su me guider et m'informer lors de mes incursions dans le monde de la chirurgie vasculaire pratique. Son expertise et son adresse m'ont été d'une aide inestimable.

Je suis particulièrement reconnaissant aux Dr Douville et Dr Clowes qui ont bien voulu prendre le temps de lire et d'évaluer cette thèse. Leurs expertises respectives ne peuvent que donner de la valeur à ce document.

Cette thèse n'aurait pu être ce qu'elle est sans la précieuse collaboration des Dr Stoclet et Dr Andriantsitohaina du Laboratoire de Pharmacologie et de Physiopathologie Cellulaires (URA CNRS 600) de Strasbourg. J'y remercie également Anne Duchesne pour son aide précieuse. Il en va de même pour les Dr F. Marceau et Dr Petitclerc du Centre de Recherche de l'Hôtel-Dieu de Québec, et le Dr Pedro D'Orléans-Juste de la Faculté de Pharmacie de Sherbrooke.

Je veux également exprimer ma gratitude à Stéphanie Pâquet, Kathleen Baker, Louise Martin et, particulièrement, Martine Michel pour avoir été des collaboratrices exceptionnelles

De plus, je remercie le FCAR pour la bourse qu'il m'a attribuée ainsi que la Fondation des Maladies du Coeur et la Fondation de l'Hôpital du Saint-Sacrement pour leurs contributions financières à mes projets.

Enfin, je remercie tous ceux qui m'ont aidé, que ce soit par leurs conseils, par de l'aide technique ou par des encouragements, au LOEX ou à l'extérieur. Je ne vous nommerai pas tous ... de peur d'oublier quelqu'un (une).

*À ma crapule qui me tient sur mes gardes
et qui me force à vivre selon mes standards.*

À mes parents, à qui je dois plus que je ne le sais.

"L'imagination est plus importante que le savoir."

Albert Einstein

"No Matter where you go, there you are."

*from a plaque aboard the starship Excelsior
Star Trek VI: The Undiscovered Country*

Table des matières

Résumé court	II
Résumé long	III
Avant-propos	IV
Table des matières	VII
Liste des figures et tableaux	XII
Liste des abréviations	XVII
1. Introduction générale	1
1.1 Problématique et buts de la recherche	2
1.2 Développement, structure, fonctions et pathologies du vaisseau sanguin	6
1.2.1 Le développement.....	6
1.2.2 La structure.....	10
1.2.3 Les fonctions.....	12
1.2.4 Les pathologies: l'athérosclérose.....	13
1.3 Les cellules vasculaires <i>in vitro</i>	20
1.3.1 Les cellules endothéliales.....	20
1.3.1.1 Culture cellulaire.....	20
1.3.1.2 Métabolisme des cellules endothéliales.....	22
1.3.1.3 Modulation de la contraction des cellules musculaires lisses.....	23
1.3.1.4 Hémostase.....	24
1.3.1.5 Étude de l'athérosclérose.....	25
1.3.1.6 Autres rôles et utilisations de l'endothélium.....	25
1.3.2 Les cellules musculaires lisses.....	27
1.3.2.1 Culture cellulaire.....	27
1.3.2.2 Étude de l'athérosclérose.....	28
1.3.2.3 Étude de la contraction des cellules musculaires lisses.....	29
1.3.2.3.1 Mécanismes contractiles.....	29
1.3.2.3.2 Contractilité des cellules musculaires lisses <i>in vitro</i>	38
1.3.2.3.3 Récepteurs purinergiques.....	41
1.3.2.4 Autres rôles des cellules musculaires lisses.....	45
1.3.3 Les fibroblastes.....	47

1.3.3.1 Culture cellulaire et acide ascorbique	47
1.3.3.2 Fibroblastes vasculaires et anévrisme	48
1.4 La modélisation de la paroi vasculaire <i>in vitro</i>	51
1.4.1 Coculture directe	51
1.4.2 Milieux conditionnés	52
1.4.3 Cultures sur microbilles («microcarrier beads»)	53
1.4.4 Utilisation de microfiltres	53
1.4.5 Gels de collagènes	55
1.5 Les prothèses vasculaires	57
1.5.1 Prothèses synthétiques	57
1.5.2 Modifications de surface	58
1.5.3 Endothélialisation	61
1.5.4 Prothèses partiellement biologiques	65
1.5.4.1 Tissus xénogéniques et allogéniques	65
1.5.4.2 Tissus allogéniques	68
1.5.4.3 Méthode de Sparks	71
1.5.4.4 Weinberg et Bell	73
1.5.4.5 Matsuda et collaborateurs	75
1.5.5 Prothèses entièrement biologiques	78
1.5.5.1 L'Heureux et collaborateurs	78
1.5.5.2 Sous-muqueuse intestinale	82
1.6 Présentation du corps de la thèse	85
2. Article: «A Tissue Engineered Human Blood Vessel»	87
2.1 Résumé	88
2.2 Abstract	89
2.3 Introduction	90
2.4 Results	91
2.4.1 TEBV construction and organization	91
2.4.2 Mechanical strength of the TEBV	93
2.4.3 Hemocompatibility	96
2.4.4 Grafting of the TEBV	99
2.5 Discussion	101
2.6 Methods	102
2.6.1 TEBV production	102
2.6.2 Histological labeling	103

2.6.3 Mechanical strength	10
2.6.4 Zymography	10
2.6.5 Endothelial functionality	10
2.6.6 Animal studies	10
2.7 Acknowledgments	10
2.8 References	10
3. Une média vasculaire contractile produite par ingénierie tissulaire: applications pharmacologiques	110
3.1 Introduction	111
3.2 Matériel et méthodes	113
3.2.1 Production de la média vasculaire	113
3.2.2 Analyse histologique	114
3.2.3 Essais de contraction	114
3.3 Résultats	115
3.3.1 Organisation des médias vasculaires	115
3.3.2 Récepteurs purinergiques	118
3.3.2.1 Réponse contractile à l'ATP	118
3.3.2.2 Récepteurs purinergiques P ₂ X	118
3.3.2.3 Récepteurs purinergiques P ₂ Y	121
3.3.2.4 Récepteurs purinergiques P ₂ U	128
3.3.3 Canaux calciques	132
3.3.3.1 Caractère de la contraction au KCl	133
3.3.3.2 Détection des canaux calciques sensibles au potentiel	135
3.3.3.3 Rôle du Ca ⁺⁺ dans la contraction au KCl	140
3.3.4 Activité de la guanylyl cyclase et effet de l'oxyde nitrique	142
3.3.5 Réactivité aux chlorure de nickel	143
3.3.6 Rôle des macrophages dans la réponse des tissus vasculaires	146
3.4 Discussion	149
3.5 Conclusion	155
4. Influx calcique dans la média vasculaire contractile	156
4.1 Introduction	157
4.2 Matériel et méthode	158
4.2.1 Tissus utilisés	158
4.2.2 Mesure des flux calciques	158

4.2.3 Chargement au Fura-2	160
4.3 Résultats	160
4.3.1 Le calcium extracellulaire et la réponse calcique à l'ATP	160
4.3.1.1 Réponse en présence de Ca ⁺⁺ extracellulaire	160
4.3.1.2 Réponse en l'absence de Ca ⁺⁺ extracellulaire	162
4.3.1.3 «Quench» par le manganèse	163
4.3.1.4 Le cas du nickel	168
4.3.1.5 Utilisation du lanthane	168
4.3.2 Les stocks calciques intracellulaires et la réponse à l'ATP	170
4.3.2.1 Sensibilité à la caféine	170
4.3.2.2 Sensibilité à la ryanodine	174
4.3.2.3 Sensibilité à la thapsigargine	176
4.3.2.4 La réponse calcique au chlorure de potassium	177
4.3.2.5 La réponse calcique à la bradykinine	181
4.4 Discussion	184
4.4.1 Le rôle du Ca ⁺⁺ extracellulaire dans la réponse calcique à l'ATP	184
4.4.2 L'entrée du Ca ⁺⁺ extracellulaire lors de la réponse calcique à l'ATP	186
4.4.3 Les stocks de Ca ⁺⁺ intracellulaires	188
4.4.4 Les effets du chlorure de potassium	190
4.5 Conclusion	193
5. Article: «Role of the transfollicular route in percutaneous absorption of hydrocortisone: in vitro studies with a new tissue engineered skin equivalent with hair».	194
5.1 Présentation de l'article	195
5.2 Résumé	196
5.3 Abstract	197
5.4 Introduction	199
5.5 Materials and Methods	201
5.5.1 Cell culture	201
5.5.2 Skin equivalents with hair	203
5.5.2.1 Tissue engineered dermal equivalent	203
5.5.2.2 Hair insertion	203
5.5.3 Skin equivalent production	204
5.5.4 Histology	204
5.5.5 Immunohistochemistry	204

5.5.6 Transmission electron microscopy -----	205
5.5.7 Percutaneous absorption studies-----	205
5.6 Results -----	206
5.6.1 Macroscopic and microscopic evaluation -----	206
5.6.2 Phenotypic analysis by immunohistochemistry -----	206
5.6.3 Ultrastructural analysis-----	211
5.6.4 Influence of hair in percutaneous absorption -----	213
5.7 Discussion-----	213
5.8 Acknowledgments-----	218
5.9 References-----	218
6. Conclusion générale-----	224
7. Bibliographie générale-----	231
8. Annexe 1: Brevet: «Production of a Contractile Smooth Muscle» -----	291

Liste des tableaux et figures

Figure 1:	Structure générale (a) d'une veine et (b) d'une artère élastique. page 11
Figure 2:	Une vue générale des différentes étapes du développement de l'athérosclérose. page 16
Tableau I:	Étapes menant à la formation de la strie lipidique. page 17
Tableau II:	Molécules de l'endothélium favorisant le recrutement des monocytes et l'augmentation de leur synthèse par les LDL oxydées. page 19
Figure 3:	Mécanismes généraux contrôlant l'interaction actine-myosine dans les cellules musculaires lisses. page 31
Figure 4:	Structure du complexe contractile de la myosine du muscle lisse de type II. page 32
Figure 5:	Mécanismes de contrôle de la concentration Ca^{2+}_i dans la cellule musculaire lisse. page 34
Figure 6:	Résumé des mécanismes de contrôle de la contraction des cellules musculaires lisses. page 36
Figure 7:	Mécanisme de désensibilisation de la contraction de la cellule musculaire lisse. page 38
Tableau III:	Caractéristiques des sous-types de récepteur purinergique P2. page 42
Figure 8:	La structure prédite du récepteur purinergique de sous-type P _{2U} humain. page 46
Figure 9:	Méthode de production d'un équivalent vasculaire basée sur l'utilisation de gels de collagènes. page 80
Figure 10:	Représentation schématisée du premier modèle vasculaire entièrement humain produit au LAEX. page 81
Figure 11:	«Organization of the TEBV.» page 95
Figure 12:	«Mechanical strength of the TEBV.» page 97

Figure 13:	«Inhibition of platelet adhesion by the endothelium.» page 98
Figure 14:	«Graftability of the TEBV.» page 100
Figure 15:	Aspect macroscopique de la média vasculaire cultivée. page 116
Figure 16:	Caractérisation histologique et immunohistologique de la média vasculaire cultivée. page 117
Figure 17:	Réponse contractile d'une média reconstruite à l'ATP en présence de Ca ⁺⁺ extracellulaire. page 119
Figure 18:	Réponse contractile d'une média reconstruite à l'ATP en absence de Ca ⁺⁺ extracellulaire. page 119
Figure 19:	Effet de l' $\alpha\beta$ -Met ATP (10^{-3} M) sur la réponse contractile des médias reconstruites. page 120
Figure 20:	Effet du PPADS (0 ou 60 μ M) sur la réponse contractile des médias reconstruites. Courbe dose-réponse en pourcentage de la contraction initiale à l'ATP (2×10^{-3} M).....	page 122
Figure 21:	Effet du PPADS (0 ou 60 μ M) sur la réponse contractile des médias reconstruites. Courbe dose-réponse en pourcentage de la contraction initiale à l'ATP (3×10^{-3} M).....	page 123
Figure 22:	Effet du réactif «blue 2» (10^{-4} M) sur la réponse contractile des médias reconstruites (expérience 1). page 124
Figure 23:	Effet du réactif «blue 2» (10^{-4} M) sur la réponse contractile des médias reconstruites (expérience 2). page 125
Figure 24:	Effet du réactif «blue 2» sur la réponse contractile des médias reconstruites à l'ATP (tracé). page 126
Figure 25:	Témoin de l'effet du réactif «blue 2». Réponse contractile des médias reconstruites à l'ATP (tracé). page 127
Figure 26:	Effet du réactif «blue 2» (3×10^{-5} M) sur la réponse contractile des médias reconstruites (expérience 3). page 128
Figure 27:	Réponse contractile d'une média reconstruite provoquée par des doses additives d'UTP. page 130

Figure 28:	Premier essai de saturation des récepteurs purinergiques par l'UTP. page 131
Figure 29:	Deuxième essai de saturation des récepteurs purinergiques par l'UTP. page 132
Figure 30:	Réponse contractile d'une média reconstruite provoquée par le KCl. page 134
Figure 31:	Réponse contractile d'une média reconstruite provoquée par le KCl (100 mM). Effet du rinçage. page 135
Figure 32:	Effet de la Nitrendipine, ajoutée avec le KCl, sur la réponse contractile d'une média reconstruite provoquée par le KCl. page 137
Figure 33:	Effet de la Nitrendipine, ajoutée au maximum de contraction, sur la réponse contractile d'une média reconstruite provoquée par le KCl. page 138
Figure 34:	Effet de la Nitrendipine, ajoutée 30 minutes avant la contraction, sur la réponse contractile d'une média reconstruite provoquée par le KCl (100 mM) en présence de Nitrendipine. page 139
Figure 35:	Réponse contractile d'une média reconstruite provoquée par le KCl en l'absence de Ca^{++} extracellulaire. page 141
Figure 36:	Détection de la guanylyl cyclase dans les médias reconstruites. page 143
Figure 37:	Réponse contractile d'une média reconstruite provoquée par le Ni^{++} page 144
Figure 38:	Effet de la concentration de Ni^{++} sur la réponse contractile d'une média reconstruite provoquée par le Ni^{++} page 145
Figure 39:	Réponse contractile d'une média reconstruite provoquée par des doses additives de Ni^{++} page 145

- Figure 40: Contractions en réponse à des agonistes standards.
A. Artère ombilicale. B. Média cultivée. page 147
- Figure 41: Contractions en réponse à des agonistes anaphylactiques. A. Artère ombilicale. B. Média cultivée. page 148
- Figure 42: Concentration de calcium cytoplasmique en fonction du temps lors de la stimulation d'une média vasculaire par l'ATP (1mM) en présence de Ca^{++} extracellulaire. page 162
- Figure 43: Rapport 350/380nm en fonction du temps lors de la stimulation d'une média vasculaire par l'ATP (1mM) en absence de Ca^{++} extracellulaire. page 165
- Figure 44: Rapport 350/380nm en fonction du temps lors de la stimulation d'une média vasculaire par l'ATP (1mM) en absence de Ca^{++} extracellulaire. page 166
- Figure 45: Lumière émise à 510nm en fonction du temps et la longueur d'onde d'excitations lors de la stimulation d'une média reconstruite par l'ATP (1mM) en présence de Mn^{++} extracellulaire. page 167
- Figure 46: Rapport 350/380nm en fonction du temps lors de la stimulation d'une média vasculaire par l'ATP (1mM) et le Ni^{++} (1mM). page 169
- Figure 47: Rapport 350/380nm en fonction du temps lors de la stimulation d'une média vasculaire par l'ATP (1mM) et le La^{+++} (0.2mM). page 170
- Figure 48: Rapport 350/380nm en fonction du temps lors de la stimulation d'une média vasculaire par la caféines (10mM). page 172
- Figure 49: Rapport 350/380nm en fonction du temps lors de la stimulation d'une média vasculaire par la caféines (10mM) et à l'ATP (1mM). page 173

- Figure 50: Rapport 350/380nm en fonction du temps lors de la stimulation d'une média vasculaire par la ryanodine (10 μ M) et à l'ATP (1mM). page 175
- Figure 51: Rapport 350/380nm en fonction du temps lors de la stimulation d'une média vasculaire par la thapsigargine (5 μ M) et à l'ATP (1mM). page 177
- Figure 52: Rapport 350/380nm en fonction du temps lors de la stimulation d'une média vasculaire par l'ATP (1mM) après une longue perfusion sans Ca⁺⁺. page 178
- Figure 53: Concentration du calcium cytoplasmique en fonction du temps lors de la stimulation d'une média vasculaire par le KCl (100mM) et l'ATP (1 mM). page 180
- Figure 54: Concentration du calcium cytoplasmique en fonction du temps lors de la stimulation d'une média vasculaire par la bradykinine (1 μ M) et l'ATP (1 mM). page 182
- Figure 55: Concentration du calcium cytoplasmique en fonction du temps lors de la stimulation d'une média vasculaire par la bradykinine (1 μ M) avec et sans Ca⁺⁺ extracellulaire. page 183
- Figure 56: «Histology and Immunohistology of the interfollicular region of matured skin equivalent.» page 208
- Figure 57: «Histology and Immunohistology of the hair follicle within matured skin equivalent (cross section).» page 209
- Figure 58: «Ultrastructural organization of the dermal-epidermal junction.» page 212
- Figure 59: «Influence of the transfollicular pathway on hydrocortisone *in vitro* percutaneous absorption.» page 214
- Figure 60: «Production of a living tubular tissue.» page 302
- Figure 61: «Graded contractile response of tissue engineered smooth muscle to vasoactive compounds.» page 303

Liste des abréviations

- OCAL: tampon sans Ca⁺⁺ avec 0.5mM d'EGTA*
- AA: acide arachidonique*
- ab-Met ATP: ab-méthylène adénosine 5'-triphosphate*
- ac-LDL: «acetylated low density lipoprotein»*
- aFGF: «acidic fibroblast growth factor»*
- bFGF: «basic fibroblast growth factor»*
- Ap4A: diadénosine tétraphosphate*
- ATP: adénosine 5'-triphosphate*
- BK: bradykinine*
- BM: bleu de méthylène*
- BSA: «bovine serum albumin»*
- Ca⁺⁺i: ions calcium intracellulaire*
- CaM: calmoduline*
- K II: protéine kinase de type II.*
- ChR: canal calcique contrôlé par un récepteur*
- ChSR: canal calcique contrôlé par un récepteur situé sur le réticulum sarcoplasmique*
- ChV: canal calcique sensible au potentiel*
- CMFDA: «5-chloromethylfluorescein-diacetate»*
- d: diamètre*
- DG: 1,2-diacylglycérol*
- Dil: «1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine chlorate»*
- DME: «Dulbecco-Vogt modification of Eagle's medium»*
- DMSO: diméthylsulphoxide*
- EC: «endothelial cell»*
- ECGF: «endothelial cell growth factor»*
- EDTA: «Ethylenediaminetetraacetic Acid»*
- EGF: «epidermal growth factor»*
- EGTA: «Ethylene Glycol-bis(b-aminoethyl Ether)N,N,N',N'-tetraacetic Acid»*
- ePTFE: «expanded» polytétrafluoroéthylène*
- Ex: échangeur Na⁺/Ca⁺⁺*
- F: «fibroblast»*
- Fura-2, AM: acétoxyméthyle de Fura-2*
- G: protéine G*
- GMPc: guanosine 5'-monophosphate cyclique*
- GRO: une protéine connue aussi sous le nom de «growth-related cytokine/melanoma growth-stimulatory activity»*
- HAM: «Ham's F12 supplement»*
- HBGF: «heparin binding growth factor»*
- HMM: «heavy meromyosin»*
- HSV: «human saphenous veins»*
- IM: «inner membrane»*
- IP3: inositol 1,4,5-triphosphate*
- l'EDRF: «endothélium derived relaxing factor»*
- L: ligand*
- LC17: chaîne légère de la myosine de 17 kDa (essentielle)*
- LC20: chaîne légère de la myosine de 20 kDa (régulatrice)*
- LDL: «low density lipoprotein»*
- LMM: «light meromyosin»*
- M-CSF : «monocyte colony stimulating factor»*

<i>MCP-1</i> : « <i>monocyte chemotactic protein 1</i> »	<i>PtdCho</i> : <i>phosphatidylcholine</i>
<i>MLC20</i> : <i>de 20 kDa</i>	<i>R</i> : <i>récepteur</i>
<i>MLCK</i> : <i>kinase de la chaîne légère de la myosine</i>	<i>RB-2</i> : <i>Cibacron Blue 3GA, mieux connu sous le nom de réactif «blue 2»</i>
<i>MLCP</i> : <i>phosphatase de la chaîne légère de la myosine</i>	<i>RYA</i> : <i>ryanodine</i>
<i>MS</i> : « <i>mouse skin</i> »	<i>S1 et S2</i> : <i>sous-fragments 1 et 2</i>
<i>NaK</i> : <i>ATPase échangeuse de Na⁺/K⁺</i>	<i>SE</i> : « <i>skin equivalent</i> »
<i>NHS</i> : « <i>normal human skin</i> »	<i>SEH</i> : « <i>skin equivalent with hair</i> »
<i>Nit</i> : <i>nitrendipine</i>	<i>SEM</i> : « <i>scanning electron microscopy</i> »
<i>NO</i> : <i>oxyde nitrique</i>	<i>SIS</i> : « <i>small intestine submucosa</i> »
<i>P</i> : <i>site de phosphorylation.</i>	<i>SMC</i> : « <i>smooth muscle cells</i> »
<i>PD-ECGF</i> : « <i>platelet derived endothelial cell growth factor</i> »	<i>SNP</i> : <i>nitroprussiate de sodium</i>
<i>PDGF</i> : « <i>platelet derived growth factor</i> »	<i>SR</i> : <i>réticulum sarcoplasmique</i>
<i>PI</i> : <i>phosphatidylinositol</i>	<i>STD</i> : <i>tampon standard avec Ca⁺⁺</i>
<i>PIP2</i> : <i>phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>	<i>TEBV</i> : « <i>tissue engineered blood vessel</i> »
<i>PIP</i> : <i>phosphatidylinositol 4-phosphate</i>	<i>TGF-b</i> : « <i>transforming growth factor-b</i> »
<i>PLA2</i> : <i>phospholipase A2</i>	<i>Thaps</i> : <i>thapsigargine</i>
<i>PLC</i> : <i>phospholipase C spécifique des phosphates d'inositol</i>	<i>TIMP-1</i> : « <i>tissue inhibitor of metalloproteinases-1</i> »
<i>PPADS</i> :	<i>UTP</i> : <i>uridine 5'-triphosphate</i>
<i>1-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid 4-sodium</i>	<i>VEGF</i> : « <i>vascular endothelial growth factor</i> »
<i>Protéine Gi</i> : <i>caractérisée par son activité inhibitrice de l'adénylate cyclase</i>	<i>VLDL</i> : « <i>very low density lipoprotein</i> »
	<i>VM</i> : « <i>vascular media</i> »

Autorisation de co-auteur(s) pour un article inclut dans le mémoire ou la thèse

NOM DE L'ÉTUDIANT-E

Nicolas L'Heureux

NOM DU PROGRAMME

Biologie Cellulaire et Moléculaire

TITRE DU MÉMOIRE OU DE LA THÈSE

Construction d'un vaisseau sanguin humain par ingénierie tissulaire; découverte d'une nouvelle technologie

Par la présente, le(s) soussigné(e), co-auteur(s) d'un article intitulé :

faisant partie du mémoire de maîtrise ou de la thèse de doctorat présentée à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval, autorise(nt) l'insertion de l'article dans ce mémoire ou cette thèse et l'éventuel microfilmage selon les règles de la Bibliothèque nationale du Canada (Service des thèses canadiennes).

SIGNATURE

NOM EN CARACTÈRE D'IMPRIMERIE

DATE

Nicolas L'Heureux

Nicolas L'Heureux

18/2/97

F. Auger

François A. Auger

Ce formulaire doit être remis à la Faculté des études supérieures au moment du dépôt initial.

Autorisation de co-auteur(s) pour un article inclus dans le mémoire ou la thèse

**NOM DE
L'ÉTUDIANT-E**

Nicolas L'Heureux

NOM DU PROGRAMME

Biologie Cellulaire et Moléculaire

**TITRE DU MÉMOIRE
OU DE LA THÈSE**

Construction d'un vaisseau sanguin
humain par ingénierie tissulaire;
découverte d'une nouvelle technologie

Par la présente, le(s) soussigné(s), co-auteur(s) d'un article intitulé :

Production of a contractile Smooth Muscle.

faisant partie du mémoire de maîtrise ou de la thèse de doctorat présentée à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval, autorise(nt) l'inclusion de l'article dans ce mémoire ou cette thèse et l'éventuel microfilmage selon les règles de la Bibliothèque nationale du Canada (Service des thèses canadiennes).

SIGNATURE

NOM EN CARACTÈRE D'IMPRIMERIE

DATE

Nicolas L'Heureux

Nicolas L'Heureux

17/2/97

Lucie Germain

Lucie Germain

19/2/98

François A. Auger

François A. Auger

27/2/98

02/17/98 10:03

UCSD → 418 682 8000

418 682 8000

NO.198 P0

18/02 '98 10:01

418 682 8000

Lab Gde Brules

002

Autorisation de co-auteur(s) pour un article inclu dans le mémoire ou la thèse

NOM DE
L'ÉTUDIANT-E

Nicolas L'Heureux

NOM DU PROGRAMME

Biologie Cellulaire et Moléculaire

TITRE DU MÉMOIRE
OU DE LA THÈSE

Construction d'un vaisseau sanguin
humain par ingénierie tissulaire;
découverte d'une nouvelle technologie

Par la présente, le(s) soussigné(s), co-auteur(s) d'un article inclus:

*Role of the transfollicular route in percutaneous absorption
of hydrocortisone: in vitro studies with a new tissue
engineered skin equivalent with hair.*

faisant partie du mémoire de maîtrise ou de la thèse de doctorat présentée à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval, autorise(m) l'inclusion de l'article dans ce mémoire ou cette thèse et l'émission microfilmée selon les règles de la Bibliothèque nationale du Canada (Service des thèses canadiennes).

SIGNATURE

NOM EN CARACTÈRE D'IMPRIMERIE

DATE

Nicolas L'Heureux

Nicolas L'Heureux

17/2/97

Lucie Germain

Lucie Germain

19/02/98

Wen Xu

Wen Xu

26/02/98

François A. Auger

François A. Auger

27/02/98

Martine Michel

Martine Michel

26/02/98

Autorisation de co-auteur(s) pour un article inclus dans le mémoire ou la thèse

**NOM DE
L'ÉTUDIANT-E**

Nicolas L'Heureux

NOM DU PROGRAMME

Biologie Cellulaire et Moléculaire

**TITRE DU MÉMOIRE
OU DE LA THÈSE**

*Construction d'un vaisseau sanguin
humain par ingénierie tissulaire:
découverte d'une nouvelle technologie*

Par la présente, le(s) soussigné(s), co-auteur(s) d'un article intitulé :

*Role of the transfollicular route in percutaneous absorption
of hydrocortisone: in vitro studies with a new tissue
engineered skin equivalent with hair.*

faisant partie du mémoire de maîtrise ou de la thèse de doctorat présentée à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval, autorise(nt) l'inclusion de l'article dans ce mémoire ou cette thèse et l'éventuel microfilmage selon les règles de la Bibliothèque nationale du Canada (Service des thèses canadiennes).

SIGNATURE

NOM EN CARACTÈRE D'IMPRIMERIE

DATE

Nicolas L'Heureux

Nicolas L'Heureux

17/2/97

Lucie Germain

Lucie Germain

19/02/88

Wen Xu

Wen Xu

26/02/98

François A. Auger

27/02/98

Martine Michel

Ce formulaire doit être remis à la Faculté des études supérieures au moment du dépôt initial.

Autorisation de co-auteur(s) pour un article inclus dans le mémoire ou la thèse

**NOM DE
L'ÉTUDIANT-E**

Nicolas L'Heureux

NOM DU PROGRAMME

Biologie Cellulaire et Moléculaire

**TITRE DU MÉMOIRE
OU DE LA THÈSE**

Construction d'un vaisseau sanguin
humain par ingénierie tissulaire;
découverte d'une nouvelle technologie

Par la présente, le(s) soussigné(s), co-auteur(s) d'un article intitulé :

A Tissue Engineered Blood Vessel.
human

faisant partie du mémoire de maîtrise ou de la thèse de doctorat présentée à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval, autorise(nt) l'insertion de l'article dans ce mémoire ou cette thèse et l'éventuel microfilmage selon les règles de la Bibliothèque nationale du Canada (Service des thèses canadiennes).

SIGNATURE

NOM EN CARACTÈRE D'IMPRIMERIE

DATE

Nicolas L'Heureux

Nicolas L'Heureux

17/2/97

Lucie Germain

Lucie Germain

18/2/98

François A. Auger

François A. Auger

26/2/98

Raymond Labbé

27/2/98

Stéphanie Pâquet

Stéphanie Pâquet

26/2/98

Ce formulaire doit être remis à la Faculté des études supérieures au moment du dépôt initial.

Autorisation de co-auteur(s) pour un article inclus dans le mémoire ou la thèse

NOM DE
L'ÉTUDIANT-E

Nicolas L'Heureux

NOM DU PROGRAMME

Biologie Cellulaire et Moléculaire

TITRE DU MÉMOIRE
OU DE LA THÈSE

Construction d'un vaisseau sanguin
humain par ingénierie tissulaire:
découverte d'une nouvelle technologie

Par le co-auteur, les co-auteurs(s), co-auteur(s) d'un article inclus :

A Tissue Engineered Blood Vessel.
HUMAN

Inclure partie du mémoire de maîtrise ou de la thèse de doctorat présentée à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval, du professeur responsable de l'article dans ce mémoire ou en la thèse et l'éventuel microfilmage selon les règles de la Bibliothèque nationale du Canada (Service des bases et L'information).

SIGNATURE

NOM EN CARACTÈRE IMPRIMÉ

DATE

Nicolas L'Heureux

Nicolas L'Heureux

17/2/98

Lucie Germain

Lucie Germain

18/2/98

François A. Auger

26/2/98

Raymond Labbé

Raymond Labbé

27/2/98

Stéphanie Pâquet

Stéphanie Pâquet

26/2/98

Chapitre I

1. Introduction générale

1.1 Problématique et buts de la recherche

Les maladies cardiovasculaires, dont la plus importante est l'athérosclérose, sont la principale cause de mortalité et de morbidité en Amérique du Nord.¹ Il n'est donc pas surprenant de constater le nombre impressionnant de publications scientifiques dédiées à cette pathologie (au moins 2000 articles publiés en 1995 seulement). En effet, les principaux facteurs de risque, la progression et les effets dévastateurs de l'athérosclérose sont bien décrits mais les mécanismes complexes sous-jacents doivent encore être éclaircis. Afin de mieux analyser les phénomènes impliqués dans l'athérosclérogénèse, de nombreux chercheurs ont mis au point des modèles permettant l'analyse, *in vitro*, du comportement des cellules de la paroi vasculaire (cellules endothéliales et musculaires lisses) dans diverses conditions contrôlées de coculture.²⁻¹⁴ Cependant, aucun de ces modèles n'a réussi à reproduire l'ensemble des caractéristiques d'un vaisseau sanguin humain. Néanmoins, grâce aux progrès constants dans le domaine de l'ingénierie tissulaire, il est maintenant possible de créer des modèles de vaisseaux sanguins encore plus fidèles à la réalité. Il s'agit là du premier but de ce doctorat.

Au point de vue clinique, l'athérosclérose entraîne, dans les derniers stades de la maladie, l'obstruction de vaisseaux sanguins. Cet événement a des conséquences plus ou moins importantes selon le vaisseau qui est touché: un léger inconfort dans le cas de petits vaisseaux secondaires; de fortes douleurs et souvent des amputations dans le cas des vaisseaux des jambes; des paralysies plus ou moins importantes s'il s'agit de vaisseaux desservant le système nerveux central (accidents cérébraux vasculaires); et bien sûr, l'infarctus du myocarde qui, dans bien des cas, entraîne la mort. Dans plusieurs de ces cas, une greffe vasculaire permet de rétablir la circulation sanguine dans les tissus desservis par le vaisseau thrombosé. Dans le scénario idéal, une autogreffe peut être réalisée en utilisant une veine ou une artère saine qui n'est pas indispensable ailleurs chez le

patient. Malheureusement, l'athérosclérose est une maladie systémique qui affecte le réseau vasculaire à plusieurs endroits à la fois. Ainsi, les autres vaisseaux du patient, qui pourraient servir de greffons, sont souvent en très mauvais état, ou même, déjà obstrués. De plus, puisque la maladie affecte plusieurs sites à la fois, les patients doivent très souvent subir plusieurs pontages successifs ou concomitants. Au fil des années, les greffons autologues viennent à manquer et c'est alors que les prothèses synthétiques entrent en jeu. Ces tubes de biomatériaux hémocompatibles donnent de très bons résultats dans le cas de vaisseaux de grands diamètres, et sont également utiles dans le cas de diamètres moyens.^{15,16} Cependant, dans le cas de vaisseaux de faibles diamètres (cœur et jambes), les prothèses synthétiques ne donnent que de piètres résultats.¹⁷⁻¹⁹

Diverses approches ont déjà été utilisées afin d'améliorer les performances de prothèses synthétiques de faible diamètre ($d \leq 5$ mM). Outre la recherche ininterrompue de nouveaux matériaux synthétiques plus inertes, plusieurs stratégies visent à rendre les prothèses plus «biologiques». Ces efforts ont d'ailleurs donné lieu aux premiers pas de l'ingénierie tissulaire vasculaire. Au cours des dernières années, l'ingénierie tissulaire s'est considérablement développée et est maintenant reconnue comme un domaine de recherche à part entière. Elle a même été choisie par le journal *Scientific American* comme l'une des quatre disciplines médicales qui auront le plus d'impact au cours du prochain siècle.²⁰ En effet, plusieurs organes produits par ingénierie tissulaire s'approchent tellement de l'original que leur utilisation clinique chez l'homme, comme organe de remplacement, est en cours ou est sérieusement considérée. C'est dans cette optique que le second but de ce doctorat vise à produire un modèle de vaisseau sanguin humain ayant les caractéristiques nécessaires à son utilisation comme greffon vasculaire de faible diamètre chez l'humain.

Depuis 1985, le Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale (LOEX) évolue dans le domaine des modèles d'organes construits par culture cellulaire. Étudiant et produisant d'abord de la peau, le LOEX a ensuite mis sur pied le Laboratoire d'Angiogénèse Expérimentale (LAEX), en 1989, faisant ainsi son entrée dans le monde des modèles vasculaires. Plus récemment, le Laboratoire d'Orthopédogénèse Expérimentale (LOPEX) a été créé dans le but de reconstituer, *in vitro*, un ligament antérieur croisé humain. Enfin, le dernier né du LOEX, le Laboratoire d'Organogénèse Pneumologique Expérimentale (LOPNEX), a pour objectif de produire un modèle tridimensionnel de bronche humaine pour des fins de recherche dans le domaine de l'asthme. Dans tous les projets du LOEX, une attention toute particulière a été apportée à la création d'un environnement cellulaire naturel et à l'emploi de cellules humaines. Pour le LAEX, cet effort se concrétise en cinq grands principes. Premièrement, les cellules utilisées sont exclusivement d'origine humaine. Deuxièmement, la matrice extracellulaire est entièrement naturelle (non-synthétique) et d'origine humaine. Troisièmement, le modèle comprend les trois types cellulaires principaux contenus dans un vaisseau sanguin (cellules endothéliales, cellules musculaires lisses et fibroblastes). Quatrièmement, les types cellulaires sont respectivement disposés de façon à respecter la répartition des populations cellulaires telle qu'observée *in vivo*. Enfin, le modèle possède une structure tridimensionnelle imitant celle d'un vaisseau sanguin, c'est-à-dire tubulaire.

En 1993, les efforts du LAEX se sont concrétisés en une première publication qui présentait l'unique modèle de vaisseau sanguin tubulaire entièrement humain.²¹ Ce faisant, les 5 principes de bases établis plus tôt ont été respectés. Les avantages théoriques de ce type de greffon vasculaire sont nombreux. Tout d'abord, un endothélium fonctionnel procurerait une surface naturellement antithrombogénique. De plus, cet endothélium pourrait limiter les problèmes d'hyperplasie intimale qui sont la principale cause d'échec à long terme des prothèses vasculaires.²² Par ailleurs, l'absence de produit synthétique et la présence d'une matrice extracellulaire physiologique réduiraient

vraisemblablement les problèmes d'inflammation et d'infection en favorisant le comportement normal des cellules (incluant les cellules immunocompétentes).²³⁻³⁰ Finalement, le fait que le greffon soit vivant pourrait permettre à celui-ci de s'adapter à son environnement, de répondre à des stimuli physiologiques et même, de croître parallèlement à son hôte.³¹ Malheureusement, ce premier modèle ne pouvait être considéré comme une prothèse vasculaire apte à être greffée puisque celui-ci s'est avéré trop fragile.

Ce doctorat s'inscrit donc directement dans la suite de ces premiers travaux de recherche. Le défi à relever était de produire, par ingénierie tissulaire, un nouveau type de vaisseau sanguin entièrement humain mais ayant des qualités mécaniques permettant la greffe et ce, sans recourir à l'utilisation de matériaux synthétiques. D'autre part, en tant que modèle vasculaire *in vitro*, celui-ci serait supérieur aux anciens modèles car il permettrait de faire des expériences dans des conditions de substrats cellulaires, de pression et de flot beaucoup plus physiologiques.

Afin de faciliter la compréhension des documents qui formeront le corps de cette thèse, la suite de l'introduction fera un survol des différents concepts qui forment la toile de fond des recherches dont nous verrons les fruits plus loin. Tout d'abord, nous ferons une brève description du vaisseau sanguin et de sa principale pathologie: l'athérosclérose. Par la suite, partant des systèmes plus simples en allant vers les plus complexes, nous ferons la revue des connaissances dans le domaine de l'utilisation des cellules vasculaires *in vitro*, de la construction de modèles de paroi vasculaire *in vitro*, et enfin, de la production de prothèses vasculaires pour des applications *in vivo*.

1.2 Développement, structure, fonctions et pathologies du vaisseau sanguin

1.2.1 Le développement

Le système cardiovasculaire est le premier organe fonctionnel de l'embryon des vertébrés.⁶¹⁷ Ceci reflète bien l'importance de la vasculogénèse dans le développement embryonnaire. Les premières structures vasculaires observables sont les îlots sanguins («blood island») qui se forment dans le sac vitellin (1-somite).⁶¹⁸ Il s'agit d'agrégats de cellules issues du mésoderme. Ceux-ci sont constitués d'une couche périphérique de cellules appelées «angioblastes» ceinturant des cellules hématopoïétiques primitives. Les angioblastes sont définis comme étant des cellules possédant plusieurs des marqueurs des cellules endothéliales mais n'ayant pas encore formé de lumière. Les angioblastes et les cellules hématopoïétiques semblent provenir d'une même cellule mère: l'hémangioblaste.⁶¹⁹ Ceci a d'abord été suggéré par leur proximité histologique mais a également été étayé par le fait que les cellules endothéliales et les cellules hématopoïétiques partagent de nombreuses protéines membranaires (PECAM-1, CD34, QH1, MB1).⁶¹⁷ Par la suite, les îlots sanguins se fusionnent pour former des structures étirées qui présentent une lumière primitive. Cette étape est également marquée par la différenciation des cellules endothéliales qui est marquée par l'apparition d'une matrice extracellulaire vasculaire périphérique. À ce stade, les cellules endothéliales entrent dans une phase de prolifération et de migration qui permettra d'établir des connexions entre les différentes structures vasculaires naissantes afin de développer un plexus capillaire primitif.⁶¹⁷

Contrairement aux angioblastes extra-embryonnaires, dans le sac vitellin, les angioblastes intra-embryonnaires ne se différencient pas auprès des cellules hématopoïétiques.⁶²⁰ En effet, ces angioblastes migrent seul à partir du mésoderme pour former des capillaires par fusion avec d'autres angioblastes

en migration. Cette migration débute peu après l'apparition des angioblastes extra-embryonnaires au stade 1-somite. Au stade 2-somite, les deux réseaux de capillaires sont déjà reliés.

L'organisation spatiale des angioblastes est dictée par deux éléments importants: les facteurs de croissance et les molécules d'adhésion. Le facteur de croissance crucial pour la différenciation et la migration de cellules à partir du mésoderme semble être le FGF («fibroblast growth factor»).⁶²¹ Celui-ci induirait l'activation de gènes spécifiques ayant comme effet l'agrégation de cellules mésodermiques dans une zone adjacente à l'endoderme.⁶¹⁷ Par la suite, le VEGF («vascular endothelial growth factor») sécrété par les cellules endodermiques serait le facteur de croissance responsable de la différenciation des cellules mésodermiques ayant migré en angioblastes, puis en cellules endothéliales. Ce scénario est cohérent avec l'expression des récepteurs correspondants. En effet, des expériences utilisant des souris «knock-out», ou avec une mutation dominante négative, ont démontré qu'un système FGF/récepteur FGF intact est nécessaire à la différenciation du mésoderme.⁶²² Par contre, les récepteurs pour le FGF ne sont plus exprimés par les cellules endothéliales des capillaires de l'embryon.⁶²³ De plus, le récepteur pour le VEGF s'est être la molécule la plus précoce exprimée par des cellules du mésoderme qui se différencie en angioblastes.⁶¹⁷ Plus tard dans le développement, ces l'expression de ces récepteurs persistera mais sera restreint aux cellules endothéliales.⁶²⁴ Ainsi, le FGF joue un rôle important dans la différenciation mésodermique mais ne semble pas influencer directement la vasculogénèse ou l'angiogénèse. Par contre, le VEGF agit directement sur les cellules endothéliales, aussi bien au cours de la différenciation, du développement embryonnaire que de la vie adulte.⁶¹⁷

La différenciations des cellules endothéliales s'accompagne également d'une modification de la matrice extracellulaire environnante. Lors de la migration des cellules mésodermiques et l'apparition des îlots sanguins, la

matrice extracellulaire qui entoure les cellules est essentiellement composée de fibronectine. Par la suite, l'apparition de laminine est observée parallèlement à la différenciation des angioblastes en cellules endothéliales et l'apparition d'une membrane périvasculaire. Enfin, la synthèse de collagène de type IV indique un stade avancé d'organisation de la membrane basale endothéliales et la formation de capillaires.

Un aspect intéressant du développement vasculaire est l'apparition de cellules musculaires lisses.⁶²⁵ Contrairement aux cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses ne semblent pas influencer le patron de l'arbre vasculaire mais paraissent plutôt apparaître en réponse à celui-ci. En effet, plusieurs études montrent que les cellules musculaires lisse sont dérivées des cellules du mésenchyme entourant les capillaires en formation. Ces cellules sont donc recrutées sur place en fonction de l'activité vasculogénique de chaque organe primitif.⁶²⁶ Ce recrutement pourrait s'effectuer grâce aux nombreux facteurs de croissances sécrétés par les cellules endothéliales.¹²¹ Outre l'origine mésodermique des cellules musculaires lisses, peu de choses sont connues sur l'origine précise des précurseurs des cellules musculaires lisses vasculaires. Les expériences réalisées afin d'éclaircir la question ont révélé que ces cellules peuvent provenir de plusieurs tissus différents dont la crête neurale.⁶²⁵ Ceci permet de croire que des origines embryonnaires différentes pourraient donner lieu à des lignées de cellules musculaires lisses vasculaires différentes dotées de caractéristiques et de rôles propres. Cette idée est cohérente avec l'hétérogénéité observée dans la population de cellules musculaires lisses adultes.^{627, 628}

L'organisation des cellules musculaires lisses vasculaires semble, en grande partie, déjà déterminée au moment de la naissance. Par exemple, dans le cas des artères principales, le nombre de couches de cellules musculaires à la naissance est celui observé chez les vaisseaux adultes correspondants.⁶²⁹ Par la suite, l'augmentation de l'épaisseur de la paroi vasculaire est attribuable à la synthèse de matrice extracellulaire, l'augmentation

du nombre de cellules (hyperplasie) ou à l'augmentation de la masse cellulaire (hypertrophie).⁶²⁵

Un signal prédominant dans la différenciation vasculaire est donné par la stimulation mécanique des cellules vasculaires. *In vitro*, les cellules endothéliales et musculaires lisse sont sensibles aux stimulation mécaniques.⁶³⁰⁻³³ A cours du développement, les forces de cisaillements produites par le commencement de la circulation sanguine contribuent au remodelage et à l'expansion du réseaux vasculaire. Par exemple, les vaisseaux importants du sac vitellin ne se développent que lorsque le réseaux vasculaire extra-embryonnaire est relié à la circulation principale.⁶¹⁷ Par ailleurs, la différenciation des cellules musculaires lisses est le résultat d'une hypertrophie en réponse à une augmentation de la charge imposée aux cellules.⁶³⁴ Ces deux types de stimulations mécaniques seront également importantes lors de la différenciation terminale des vaisseaux sanguin au cours de la vie adulte et semblent également liées au développement de pathologies vasculaires.⁶³⁵⁻³⁹

1.2.2 La structure

Les prothèses vasculaires de faible diamètre sont implantés afin de remplacer des artères, dites musculaires, dont la structure est présentée à la figure 1. Comme tous les vaisseaux sanguins du corps humain, l'intérieur de la lumière des artères musculaires est entièrement tapissée d'une monocouche de cellules endothéliales. Celles-ci reposent sur une membrane élastique que l'on nomme la membrane, ou limitante, élastique interne. Entre la membrane élastique interne et les cellules endothéliales se trouve une très petite quantité de matrice fibreuse. Par microscopie électronique, on peut constater que les cellules endothéliales reposent en fait sur une très fine membrane basale. Cette membrane basale est composée de collagène de type IV, de laminine, de fibronectine, d'héparane sulfate, de chondroïtine sulfate, de nidogène, etc.^{27,32} La zone comprise entre la membrane élastique interne et la lumière est appelée intima. La média est constituée essentiellement de cellules musculaires lisses orientées circulairement autour de l'axe du vaisseau. Le peu d'espace visible entre les cellules est occupé par du matériel élastique et collagénique. L'adventice est la couche extérieure du vaisseau et est séparée de la média par la membrane, ou limitante, élastique externe. L'adventice est peuplée de fibroblastes (ou fibrocytes) répartis dans une matrice fibreuse, riche en collagène et en élastine, qui forme un tissu conjonctif dense. L'adventice est parcourue par de petits vaisseaux sanguin (vasa vasorum) et des terminaisons nerveuses qui alimentent la média.

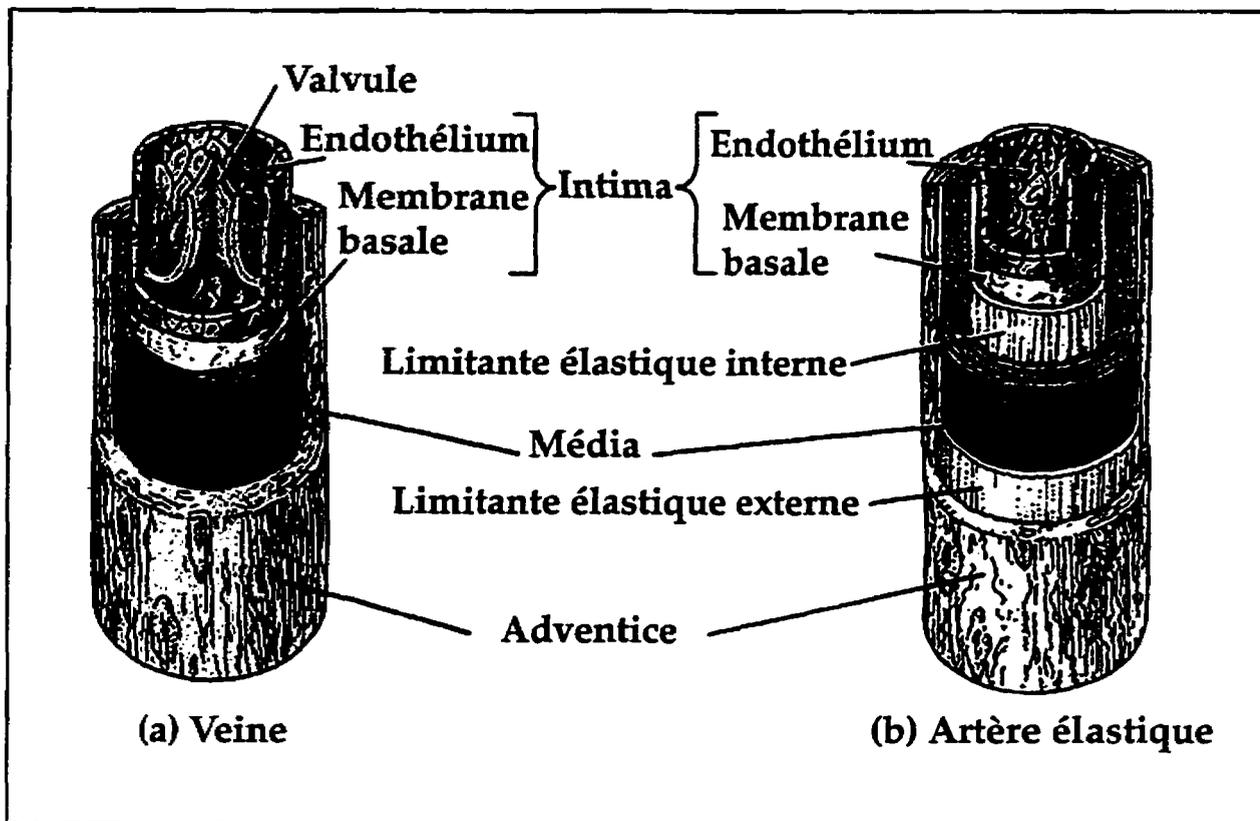


Figure 1: Structure générale (a) d'une veine et (b) d'une artère élastique (d'après Spence et Mason³³).

Les artères de plus gros diamètre possèdent essentiellement la même architecture mais leurs médias contiennent beaucoup plus de fibres élastiques d'où leur nom d'artère élastique. Les artères de plus faible diamètre contiennent de moins en moins de cellules musculaires lisses et, au niveau des artérioles ($d < 0.5 \text{ mM}$), plus vraiment d'adventice structurée. Au niveau des capillaires, seules subsistent les cellules endothéliales, leur membrane basale et quelques cellules qui tiennent à la fois du fibroblaste et de la cellule musculaire lisse: les péricytes.³⁴⁻³⁷ Les veines, au niveau des artères musculaires, ont la même architecture générale que ces dernières mais leur media est beaucoup moins épaisse alors que leur adventice l'est un peu plus. De plus, elles ne possèdent pas de limitantes élastiques.

1.2.3 Les fonctions

La fonction des vaisseaux sanguins est de transporter cellules, macromolécules, ions, liquides et gaz dans tout l'organisme. Cette fonction est la base de toutes les autres fonctions du corps humain car elle fournit l'oxygène et les nutriments nécessaires à la survie de chaque cellule tout en récupérant dioxyde de carbone et déchets variés. La circulation sanguine est également à la base des fonctions complexes de l'organisme car elle permet le transport des hormones et des cellules qui assurent la communication des divers systèmes entre eux. Ainsi, le système sanguin est vraiment à la base de la vie de l'organisme ce qui explique le symbolisme profond qu'a le sang dans la plupart des sociétés.

C'est ce sang qui coule dans nos veines et artères qui dicte la structure et les fonctions du système circulatoire comme les automobilistes d'un vaste système routier influencent son organisation. Ainsi, les vaisseaux sanguins sont, d'abord et avant tout, caractérisés par leur surface hémocompatible qui permet au sang de «rouler» sans problème pour aller à son «travail». Ainsi, ils assurent la bonne circulation des «ordures», du «courrier», de la «nourriture» et des «policiers» afin de permettre le bon fonctionnement de la «société». Mais les vaisseaux doivent aussi permettre une bonne adhérence lorsque les cellules doivent changer de direction ou s'arrêter et se «stationner» pour accomplir leur travail de coagulation, d'inspection ou de nettoyage. Cette fonction délicate est assurée par l'endothélium, le véritable guide routier qui réussit à indiquer à tout un chacun la direction à prendre. Cette fine monocouche joue donc un rôle central dans les phénomènes d'hémostase, d'immunité ou de perméabilité trans-endothéliale.

La média vasculaire est un peu le feu de circulation du système sanguin. C'est le degré de contraction de cette dernière qui détermine le flot

sanguin dans les différentes artères du corps humain. De plus, c'est également le tonus de la média, au niveau des artérioles, dites «vaisseaux de résistance», qui établit la pression artérielle systémique. Mais la cellule musculaire lisse n'est que simple exécutante d'ordres provenant de l'endothélium ou des centres nerveux de contrôle par l'entremise d'une hormone ou d'un influx nerveux sympathique ou vasomoteur. Comme c'est le cas sur les grands boulevards, souvent nommés «grandes artères», lorsque les feux de circulation se multiplient, ou sont mal réglés, la circulation est perturbée, causant des embouteillages et des accidents. Dans la circulation sanguine, c'est ce qui arrive dans les phénomènes comme l'hypertension et l'athérosclérose.

Enfin, l'adventice est la partie méconnue du vaisseau sanguin à qui la tâche ingrate de soutenir mécaniquement l'ensemble du vaisseau a été confiée. Elle est un peu comme les «piliers de béton» qui supportent un tronçon d'autoroute aérien: ils ne se font pas remarqués jusqu'au moment où ils cèdent. Heureusement, alors que les «feux de circulation» donnent beaucoup de fil à retordre au monde de la recherche médicale, nos «piliers de béton» sont beaucoup plus fiables. Néanmoins, des faiblesses sont parfois observés sous la forme d'anévrismes, dont les origines et localisations peuvent varier, mais dont la rupture a des conséquences souvent désastreuses.³⁸

1.2.4 Les pathologies: l'athérosclérose

Les pathologies du vaisseau sanguin peuvent se diviser en trois grands groupes: l'athérosclérose, l'hypertension et les problèmes d'hémostase (thrombose excessive ou insuffisante). Ces différentes pathologies sont souvent reliées et peuvent se retrouver chez un même patient. Puisque l'athérosclérose est la pathologie responsable de la plupart des greffes vasculaires, c'est la seule qui sera traitée dans cette introduction. Le but de cette section n'est certes pas de faire

une revue exhaustive de la question de l'athérosclérose; plusieurs excellentes revues récentes sont disponibles pour ce faire.³⁹⁻⁴¹ Cependant, il ne serait être question d'écrire un ouvrage traitant des prothèses vasculaires sans faire un survol de la pathologie qui justifie l'essentiel de la recherche dans ce domaine!

L'athérosclérose est une maladie considérée comme étant systémique. Pourtant, celle-ci ne crée pas de lésions au hasard de l'arbre vasculaire. En effet, il a été observé, il y a déjà plusieurs années, que les lésions athéroscléromateuses se produisent à des sites bien déterminés et pratiquement nulle part ailleurs.^{42,43} D'un point de vue histologique, les premiers signes de la maladie sont une accumulation, dans l'intima, de macrophages gorgés de lipides (cellules spumeuses ou cellules spumeuses), de quelques cellules musculaires lisses ainsi que de lymphocytes T (figure 2, étape 3).^{44,45} Cette accumulation est connue sous le nom de «fatty streak» et se retrouve déjà chez de jeunes enfants et adultes.⁴⁶⁻⁴⁸ Cette lésion se développe en une lésion intermédiaire par l'accumulation de macrophages et de cellules musculaires lisses (figure 2, étape 4); elles forment des monticules dans la lumière du vaisseau et en diminuent considérablement le diamètre, entraînant une diminution du débit sanguin et, dans certains cas, des malaises. À ce stade, il peut se former de petits caillots sanguins, insuffisants pour bloquer la circulation, mais qui provoquent la dégranulation des plaquettes sanguines. Ceci a comme conséquence le relargage de facteurs de croissance et de médiateurs de l'inflammation qui peuvent faciliter la progression de la plaque (PDGF, TGF- β , EGF, facteur plaquettaire 4, β -thromboglobuline, thromboxane A₂, etc.) en favorisant la prolifération des cellules musculaires lisses et en accentuant la réaction inflammatoire.^{49,50} Les lésions plus avancées, appelées plaque athéroscléromateuse, sont coiffées d'une couche fibreuse, d'où le terme «scléros». Elles sont essentiellement composées de collagène, et contiennent toujours des cellules musculaires lisses, des macrophages saturés de lipides et des lymphocytes T dont plusieurs sont activés (figure 2, étape 5).⁵¹ Le centre de la lésion est fait de cristaux de cholestérol, de

gouttelettes lipidiques et de débris résultant de la nécrose.⁵² Dans les derniers stades de la maladie, la plaque se calcifie par l'action d'une cellule de la paroi vasculaire, encore mal identifiée, qui exprime des gènes associés avec le développement des os.⁵³ Cette calcification modifie les caractéristiques mécaniques de la plaque et la prédispose à la rupture de celle-ci.^{54,55} Enfin, la plupart des décès lors d'un infarctus du myocarde surviennent lorsque ces plaques se détachent ou se fissurent entraînant une thrombose immédiate et fulgurante du vaisseau associé. Celle-ci est sans doute attribuable à l'exposition du facteur tissulaire («tissue factor») à la circulation sanguine.⁵⁶⁻⁵⁹

Du point de vue cellulaire, les sites susceptibles de développer des lésions sont caractérisés par une perméabilité accrue de l'endothélium à des macromolécules telles l'albumine, le fibrinogène et les lipoprotéines contenant du cholestérol (LDL = «low density lipoprotein», VLDL = «very low density lipoprotein», lipoprotéine A, etc.).⁶⁰⁻⁶⁴ Il s'agirait de la première étape menant à la formation de la strie lipidique ou «fatty streak» (tableau I). De plus, les cellules endothéliales de ces sites démontrent un indice de renouvellement («turnover») augmenté ainsi qu'un glycocalyx plus mince que les cellules à des sites non-susceptibles.^{65,66} Ces effets sur les cellules endothéliales ont été traditionnellement attribués aux particularités hémodynamiques des sites susceptibles, plus spécifiquement en termes de force de cisaillement («shear stress»).⁶⁷ Cependant, ces sites correspondent aussi bien à des conditions de faibles flots que de flots élevés.⁶⁸⁻⁷¹ Dernièrement, on a proposé l'hypothèse que les sites susceptibles seraient caractérisés par le stress induit sur la paroi vasculaire par la pression sanguine et non le flot.⁷² Cette hypothèse paraît séduisante, mais nécessite une étude plus approfondie afin d'être confirmée.

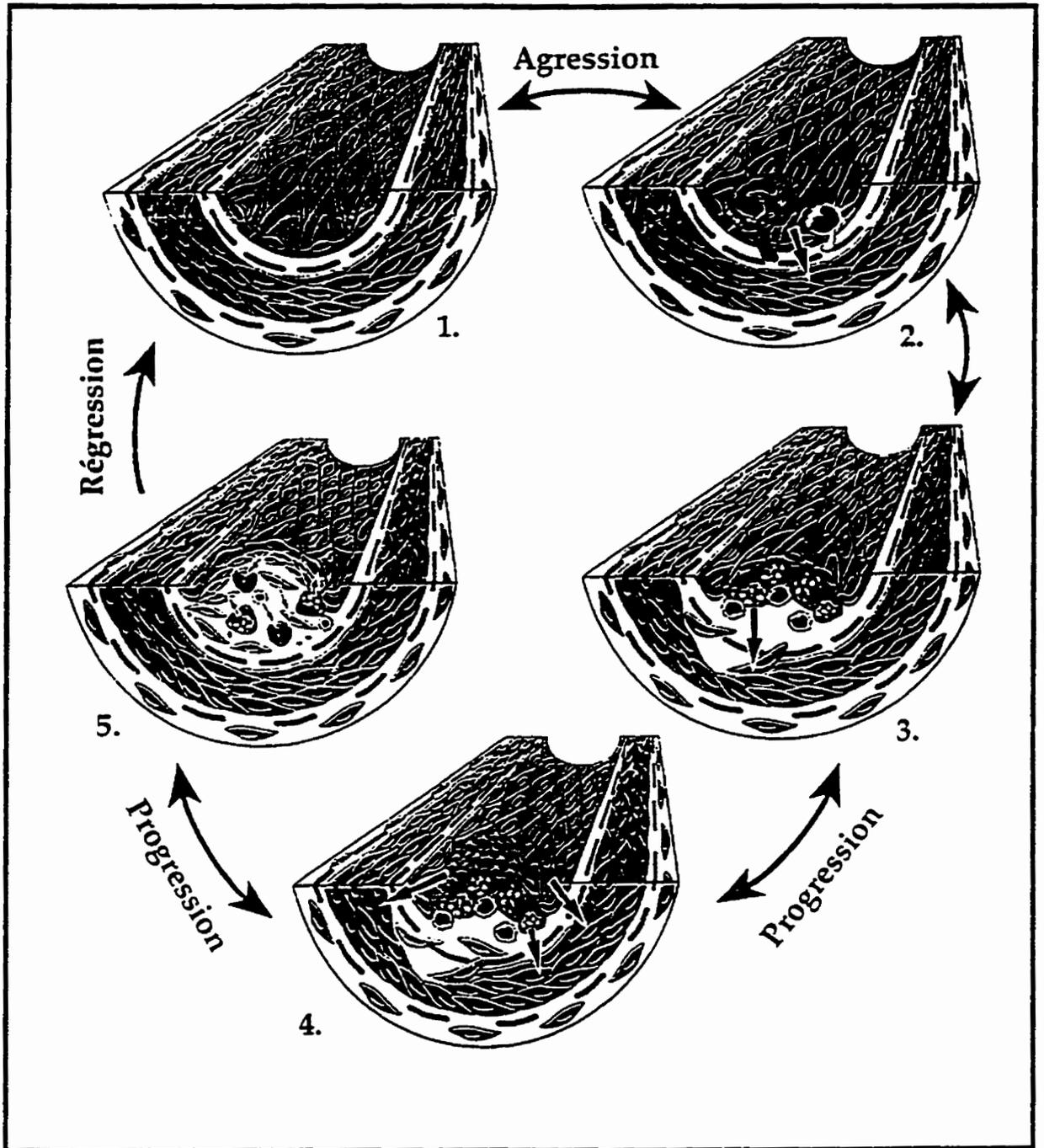


Figure 2: Une vue générale des différentes étapes du développement de l'athérosclérose (d'après Ross⁴⁰).

Tableau I: Étapes menant à la formation de la strie lipidique
(d'après Berliner et coll. ⁷³)

Étapes	
1	Transport des lipoprotéines
2	Rétention des lipoprotéines
3	Modifications des lipoprotéines
4	Adhérence des monocytes
5	Migration des monocytes (chimiotactisme)
6	Différenciation des monocytes
7	Formation des cellules spumeuses

L'hypothèse la plus acceptée pour expliquer l'athérosclérogénèse a été avancée par Russel Ross et est connue sous le nom de «response-to-injury hypothesis» (figure 2).^{40,74,75} Celle-ci suggère que l'athérosclérose est une réaction inflammatoire chronique en réponse à une agression au niveau des cellules endothéliales. Cette agression peut aller du simple stress mécanique exercé par des conditions anormales de flot sanguin à la destruction totale de la cellule endothéliale en passant par l'hypercholestérolémie, les infections virales, les composantes de la fumée de cigarette, etc.⁷⁶ En réponse à ces agressions, les cellules endothéliales expriment des cytokines et molécules d'adhésions permettant le recrutement de monocytes sanguins (figure 2, étape 2). Une fois les monocytes dans l'espace sous-endothélial, ceux-ci se différencient en macrophages, sécrétant une batterie de cytokines, d'enzymes et de radicaux oxygénés qui amplifient la réaction inflammatoire (figure 2, étape 3).^{77,78} Les cellules musculaires lisses répondent à cet environnement par une prolifération, une migration vers le lumen, une augmentation marquée de la synthèse de collagène et par la synthèse de facteurs protéiques tel le MCP-1 («monocyte

chemotactic protein 1»).^{79,80} Pour leur part, les cellules endothéliales réagissent à toutes ces molécules en conservant leur phénotype inflammatoire, perpétuant ainsi le cercle vicieux.

Plusieurs agents ont été considérés comme agresseurs potentiels de l'endothélium mais la molécule pointée du doigt par plusieurs comme étant la grande responsable est la LDL.^{73,81-83} Tel que mentionné précédemment, cette molécule est concentrée au niveau des sites susceptibles à l'athérosclérose. De plus, il a été démontré que celle-ci peut être oxydée dans l'environnement sous-endothélial.^{81,82} Or, les LDL oxydées ont une activité chimiotactique pour les macrophages et induiraient même la synthèse de MCP-1 par ces derniers.^{84,85} De plus, elles induisent la synthèse de la protéine GRO par les cellules endothéliales, une cytokine favorisant l'adhésion des monocytes à l'endothélium (tableau II).⁸⁶ Les LDL oxydées augmentent également la synthèse de MCP-1 dans les cellules endothéliales.⁸⁷ Elles pourraient ainsi entraîner une forte migration de monocytes/macrophages dans la paroi vasculaire.⁸⁸ Puisque ceux-ci possèdent un fort pouvoir oxydatif, il en résulte une oxydation accélérée des LDL et une suroxydation des LDL déjà oxydées. Ces LDL suroxydées sont reconnues par de nouveaux récepteurs, sur les macrophages, qui ne sont pas contrôlés par la concentration intracellulaire de cholestérol («scavenger receptor»).^{89,90} Ceci entraîne la surconsommation de LDL par les macrophages qui deviennent les cellules spumeuses caractéristiques des lésions de l'athérosclérose (figure 2, étapes 3, 4 et 5).⁹¹

Le combat contre l'athérosclérose passe d'abord par la surveillance des facteurs de risques contrôlables tels la consommation de cholestérol, la cigarette, l'alcool, l'obésité, l'hypertension, etc. De plus, certaines approches thérapeutiques sont à l'étude afin de pouvoir activement combattre la maladie.⁹⁵ En effet, on place beaucoup d'espoir sur les thérapies visant à diminuer l'oxydation des LDL à l'aide d'antioxydants puissants. Des études ont démontré la capacité du probucol, un puissant antioxydant, à réduire le

développement de l'athérosclérose chez le lapin et chez les primates suivant des diètes élevées en cholestérol.^{96,97} Cependant, la première étude menée chez l'humain n'a pas montré d'effet anti-athérogénique bien que le traitement ait réussi à rendre les LDL des patients plus résistants à l'oxydation.^{98,99} D'autres études sont en cours afin de comprendre ce paradoxe. Par ailleurs, il semble possible de pouvoir stabiliser, et même faire régresser, les lésions athéroscléromateuses et plusieurs avenues de recherches visent à réaliser cet exploit (les étapes potentiellement réversibles sont marquées par les flèches à doubles tête de la figure 2).^{revues: 95,100} Enfin, nos cousins français semblent avoir découvert depuis longtemps l'antidote contre l'athérosclérose. En effet, le vin rouge, même dilué 1000 fois, protège les LDL de l'oxydation catalysée par le cuivre; ceci expliquerait la faible incidence de maladies coronariennes observée en France malgré une alimentation riche en cholestérol.¹⁰¹

Tableau II: Molécules de l'endothélium favorisant le recrutement des monocytes et l'augmentation de leur synthèse par les LDL oxydées (d'après ⁷³)

Molécules	ARN messenger	Protéine
MCP-1	24 fois	20 fois
M-CSF	4 fois	10 fois
GRO	30 fois	20 fois
Sélectine-P	2 fois	2.5 fois

MCP-1 = «monocyte chemotactic protein 1»⁸⁷

M-CSF = «monocyte colony stimulating factor»⁹²

GRO = une protéine connue aussi sous le nom de «growth-related cytokine/melanoma growth-stimulatory activity»⁸⁶

Sélectine-P ^{93,94}

1.3 Les cellules vasculaires *in vitro*

1.3.1 Les cellules endothéliales

1.3.1.1 Culture cellulaire

La majorité des connaissances acquises concernant les cellules endothéliales, et ce dans presque tous les domaines d'études, ont été en très grande partie obtenue à partir d'expériences menées *in vitro*. En effet, avec l'avènement de techniques d'isolement et de culture cellulaire de plus en plus raffinées, il est devenu possible de cultiver des cellules endothéliales humaines de diverses sources et dans différentes conditions. Celles-ci peuvent être soumises à des stimuli pharmacologiques, mécaniques ou encore conservées en culture en contact avec d'autres types cellulaires.

C'est Eric A. Jaffe, en 1973, qui connaît les premiers grands succès dans le domaine de l'isolement et de la culture des cellules endothéliales.¹⁰² Sa technique d'isolement par perfusion de collagénase bactérienne est toujours utilisée et reste une des meilleures techniques disponibles.¹⁰³⁻¹⁰⁸ Au début des années 80, la découverte d'un facteur de croissance spécifique aux cellules endothéliales, qui sera nommé ECGF («endothelial cell growth factor»), ainsi que l'utilisation de fibronectine ou de gélatine pour couvrir les surfaces de culture, permettent l'obtention de grandes quantités de cellules endothéliales humaines.^{109,110} Enfin, c'est en 1983 que la découverte de l'héparine, en tant que puissant potentialisateur de l'activité de l'ECGF, porta la culture des cellules endothéliales à son niveau actuel.¹¹¹ L'effet de l'héparine est dû à sa très grande affinité pour l'ECGF et à sa capacité de protéger celui-ci de la dégradation, par des protéases présentes dans le milieu de culture.¹¹²

À la suite de nombreux efforts visant à établir une nomenclature structurée des différents facteurs de croissance, l'ECGF a été classé dans la grande classe des «heparin binding growth factor» de classe 1 (HBGF-1).¹¹³ De plus, l'ECGF présente une grande homologie de séquence avec l'«acidic fibroblast growth factor-1» (aFGF-1), qui est également de la classe des HBGF-1, et il semble que les deux noms aient souvent été utilisés sans discrimination.¹¹⁴ Des travaux suggèrent que l'ECGF et l'aFGF proviendrait d'ailleurs du même précurseur: l'ECGF- β .¹¹⁵ Néanmoins, cette nomenclature basée sur la capacité d'un facteur de croissance à se lier à l'héparine est loin de faire l'unanimité. Son utilisation reste d'ailleurs limitée et les nomenclatures triviales ont encore majoritairement cours.

Plusieurs autres facteurs ayant une activité d'ECGF ont été extraits de diverses sources dont ils portent souvent le nom: «retina-derived growth factor», «brain-derived growth factor», «astroglial growth factor», «embryonal carcinoma-derived growth factor», «platelet derived endothelial cell growth factor» (PD-ECGF), «vascular endothelial growth factor» (VEGF), et «omentum-derived growth factor».¹¹⁴ Certains sont probablement très semblables, sinon identiques, aux aFGF ou bFGF («basic fibroblast growth factor») tandis que d'autres pourraient être véritablement différents. C'est le cas du PD-ECGF et du VEGF qui ne possèdent pas d'affinité pour l'héparine.^{116,117} Le VEGF, aussi appelé vasculotropine ou «vascular permeability factor», possède une très puissante activité ECGF qui est augmentée en présence de Mg^{++} .¹¹⁸ La séquence de ce dernier est apparentée au «platelet derived growth factor» (PDGF).¹¹⁶ Néanmoins, le VEGF n'est pas utilisé de routine pour favoriser la prolifération des cellules endothéliales pour des raisons qui relèvent certainement des coûts reliés à sa production.

Au cours des dernières années, d'autres substances ont été utilisées afin de créer des conditions de culture plus favorables aux cellules endothéliales mais aucune n'a reçu un accueil unanime. Mentionnons tout de même que l'utilisation de thrombine, de sérum de veau de nouveau-né et, tout particulièrement, de nombreuses molécules de la matrice extracellulaire ont été proposées comme additifs encourageant la croissance ou la différenciation des cellules endothéliales.^{27,28,105,119-122}

1.3.1.2 Métabolisme des cellules endothéliales

Le bagage synthétique et sécrétoire des cellules endothéliales est très impressionnant et s'explique par le rôle central qu'elles jouent dans le maintien de l'équilibre de l'organisme, du système circulatoire et de la paroi vasculaire. Voici donc un bref aperçu de l'éventail des molécules produites ou modifiées par les cellules endothéliales.

La matrice extracellulaire semble être d'une grande importance en ce qui concerne le comportement des cellules endothéliales; il n'est donc pas surprenant que celles-ci produisent de nombreuses molécules retrouvées dans la matrice extracellulaire vasculaire ainsi que d'autres molécules d'adhésion.²⁷ Parmi les plus importantes, nommons les collagènes de types III, IV et V, la fibronectine, la thrombospondine, l'élastine, la laminine, les sulfates d'héparanes et autres mucopolysaccharides.¹²³⁻¹²⁷ De plus, les cellules endothéliales sont capables de sécréter des collagénases et autres enzymes pour modifier la matrice qui les entoure.^{103,128-131}

Les cellules endothéliales sont également capables de sécréter de nombreux facteurs ayant des effets variés sur divers types de cellules.^{121,132,133} Un «platelet derived growth factor-like», immunologiquement identique au PDGF des plaquettes sanguines, est un facteur de croissance particulièrement stimulant

pour les cellules musculaires lisses. Celui-ci serait d'ailleurs un des facteurs de croissance jouant un rôle critique dans l'athérosclérogénèse.¹³⁴ Ainsi, les cellules endothéliales sont potentiellement à l'origine d'un réseau complexe d'actions paracrines et endocrines, mais également autocrines.¹²¹

Enfin, les cellules endothéliales synthétisent des protéines essentielles à la thrombose, à la coagulation et à la fibrinolyse normale.^{135-138, revues: 139,140} Par ailleurs, elles incorporent et modifient les lipoprotéines: HDL, LDL acétylées et β -LDL.^{8,141} De plus, elles sécrètent des agents vasodilatateurs ainsi que vasoconstricteurs qui contrôlent le tonus des cellules musculaires.^{revues: 142-146}

1.3.1.3 Modulation de la contraction des cellules musculaires lisses

À l'aube des années 80, on ne croyait pas que les cellules endothéliales jouaient un rôle très important dans les phénomènes de contraction des cellules musculaires lisses qui, rappelons-le, contrôlent la pression artérielle. C'est à la suite de la publication des travaux de Furchgott et Zawadzki, montrant que la présence d'un endothélium fonctionnel est nécessaire à la contraction d'une artère en réponse à l'acétylcholine, que de nombreux biologistes cellulaires et physiologistes durent réviser leurs propos.¹⁴⁷ En effet, il a été découvert par la suite que les effets vasodilatateurs de nombreux produits pharmacologiques (naturels ou non) n'étaient obtenus que par l'intermédiaire de la cellule endothéliale. On lui attribua alors la sécrétion d'un facteur inhibant la contraction des cellules musculaires lisses: l'EDRF ou «endothélium derived relaxing factor». Mentionnons, entre autres, que les effets produits par les catécholamines, la vasopressine, la thrombine, la bradykinine, l'histamine, l'acide arachidonique, la sérotonine et l'ionophore A23187 s'exercent par l'intermédiaire de l'endothélium.^{revues:142-146}

La nature du fameux EDRF est maintenant connue et il s'agit du NO, ou monoxyde d'azote.¹⁴⁸ revue de la découverte: 149 De nos jours, ce composé extrêmement instable peut être dosé par le biais de ses produits de dégradation ou de son activité oxydante.¹⁵⁰⁻¹⁵² Ceci facilite les recherches impliquant le NO[•] dans certaines pathologies telles l'hypertension et le choc septique.^{153,154} Malgré tout, il y a des effets vasoactifs reliés à l'endothélium qui ne sont pas attribuables à la synthèse de NO, ainsi que d'autres agents qui exercent leur action en l'absence total d'un endothélium.^{5,155}

1.3.1.4 Hémostase

Un des rôles les plus importants de l'endothélium est le contrôle de la coagulation sanguine. En effet, outre le fait que les cellules endothéliales synthétisent des facteurs de coagulation aussi importants que le facteur V et le facteur VIII, celles-ci doivent offrir une surface antithrombogénique en temps normal mais pouvoir provoquer la coagulation lorsque les circonstances le demandent.^{135,136} Pour ce faire, les cellules endothéliales possèdent une multitude de mécanismes.^{revues: 139,140} En effet, elles ont la capacité d'activer la coagulation en fixant les facteurs Va, IXa et Xa, la thrombine, la thromboplastine et le fibrinogène. De plus, elles synthétisent des composantes de leur propre membrane basale qui, si exposées au flot sanguin, permettent l'adhésion et l'agrégation des plaquettes sanguines. Par contre, les cellules endothéliales peuvent également synthétiser de l'antithrombine III, de la thrombomoduline, de la protéine S, de l'activateur du plasminogène, des sulfates d'héparane, de la prostacycline et, comme vu précédemment, du NO. Toutes ces substances ont des activités anticoagulantes ou antiagrégantes. Ainsi, les cellules endothéliales contrôlent étroitement l'équilibre entre les mécanismes pro et antithrombotiques.

Lorsque l'équilibre est rompu, cela entraîne de graves problèmes cliniques tels l'hémophilie, la thrombose, et peut-être même l'athérosclérose.

1.3.1.5 Étude de l'athérosclérose

L'implication de l'endothélium dans la pathogénèse de l'athérosclérose est beaucoup moins apparente que celle des cellules musculaires lisses, mais elle n'en est pas moins importante ou reconnue pour autant.^{revues: 76,156} Comme nous l'avons vu à la section 1.2.3 de ce chapitre, l'élément déclencheur de l'athérosclérose serait, selon l'hypothèse de «response-to-injury», l'agression des cellules endothéliales.⁷⁵ Les stress subis par l'endothélium pourraient être de natures variées. Les cellules endothéliales en culture ont permis de mettre en évidence, entre autres causes possibles, les métabolites du cholestérol, les stress hémodynamiques, les infections virales et les composantes de la fumée de cigarette.^{8,157-164} Les mécanismes proposés par lesquels les cellules endothéliales répondraient à ces provocations sont multiples: la sécrétion de facteurs de croissance stimulant la prolifération et/ou migration des cellules musculaires lisses et macrophages, l'adoption d'un caractère pro-thrombotique ou pro-inflammatoire, la modification de son métabolisme et du transport des lipides ou encore, la diminution de production de facteurs inhibant les cellules musculaires lisses tels les molécules reliées à l'héparine. De façon passive, par simple modification de sa perméabilité, l'endothélium pourrait amener d'importantes modifications dans la composition du milieu entourant les cellules musculaires lisses, favorisant ainsi leur prolifération.^{8,49,134,165-178}

1.3.1.6 Autres rôles et utilisations de l'endothélium

L'endothélium tient également d'autres rôles importants dont le dérèglement pourrait être à la source de certaines pathologies. Par exemple, on

a découvert que les cellules endothéliales cultivées avec de fortes concentrations de glucose forment des membranes basales plus épaisses que dans des conditions de culture standard.¹⁷⁹ Cette observation rappelle les membranes basales très épaisses observées sous les cellules endothéliales dans une pathologie associée à des troubles de circulation qui entraîne ulcères et gangrène: le diabète. Voici donc un modèle d'analyse *in vitro* très intéressant et d'une grande simplicité. Par ailleurs, des études *in vitro* ont montré le rôle primordial de l'endothélium dans l'invasion des tumeurs cancéreuses.¹⁸⁰ Enfin, les cellules endothéliales entretiennent des relations avec d'autres types cellulaires dont certains peuvent surprendre tel que les kératinocytes.^{181,182}

Un aspect important des cellules endothéliales est leur implication dans les phénomènes immunologiques. En effet, par leur situation anatomique, elles jouent un rôle primordial dans la circulation des cellules immunocompétentes telles les neutrophiles, les macrophages, et les lymphocytes. Au cours des dernières années, il a été découvert que les cellules endothéliales sont capables de produire et de répondre à de nombreuses cytokines et interleukines, ainsi que d'exprimer à leur surface des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II.¹⁸³⁻¹⁹¹ Les cellules endothéliales sont donc impliquées dans des phénomènes immunologiques aussi variés que l'inflammation, le combat contre les infections et le rejet de greffe.^{revues: 192-195}

L'avenir de la recherche concernant les cellules endothéliales est vaste et prometteur. Un intérêt certain est soulevé par la possibilité de créer des modèles d'angiogénèse microscopique *in vitro* (création de capillaires) étant donné l'importance de ce phénomène *in vivo*.¹⁹⁶⁻¹⁹⁹ D'ailleurs, du point de vue de l'ingénieur tissulaire, une expertise dans la création de réseaux de capillaire est très intéressante. En effet, lors de l'implantation d'éventuels organes issus de l'ingénierie tissulaire, la question de l'apport sanguin dans cet organe sera d'autant plus critique que cet organe sera épais. Il est probable que la simple angiogénèse naturelle au site de la greffe ne suffise pas pour permettre la survie

de la plupart des cellules du tissu. Ainsi, des stratégies afin d'obtenir une capillarisation des nouveaux tissus devront être établies: soit en installant des capillaires avant la greffe; soit en accélérant la migration de ceux-ci vers le nouveau tissu à l'aide de molécules angiogéniques. Un modèle de peau humaine capillarisée *in vitro* afin d'augmenter les taux de prise lors de la greffe de ces équivalents, a d'ailleurs été développé dans notre laboratoire et un article sous le point d'être soumis.

En terminant, les cellules endothéliales, par leur position stratégique, sont le véhicule parfait pour la médecine du prochain siècle: la thérapie génique. Par exemple, des projets comme l'implantation sur les parois vasculaires humaines de cellules endothéliales transfectées, contenant des gènes codant pour diverses protéines, et permettant ainsi la sécrétion continue de produits pour des fins thérapeutiques, sont déjà en cours.²⁰⁰⁻²⁰⁴, revue: 205

1.3.2 Les cellules musculaires lisses

1.3.2.1 Culture cellulaire

Les débuts de la culture des cellules musculaires lisses remontent aux années 1913-1914, avec les premières observations de cellules musculaires lisses en culture par Champy et par Laqueur.^{206,207} Une grande part de ces succès précoces est sans doute reliée aux modestes besoins de ces cellules en culture. En effet, les cellules musculaires lisses prolifèrent rapidement dans des milieux simples, comme du «Dulbecco's Modification of Eagle's Medium» supplémenté avec aussi peu que 5% de sérum de veau fœtal.²⁰⁸ De plus, leur prolifération peut être stimulée de façon importante par de nombreux facteurs de croissance tels l'EGF («epidermal growth factor»), le aFGF et le bFGF, mais surtout

par le PDGF qui semble le plus puissant et dont l'implication *in vivo* semble la plus probable et importante.^{121,209-215, revue: 113,216}

De nombreux aspects de la biologie des cellules musculaires lisses ont été étudiés *in vitro* tel que le métabolisme des lipides, la sécrétion de facteurs influençant les cellules endothéliales et les facteurs stimulant leur propre croissance.^{8,208,217-221} Mais, lorsque l'on discute des cellules musculaires lisses, un des grands sujets de recherche qui perdure depuis des années est la modulation phénotypique qui s'opère chez ces cellules.^{166,222-226, revues: 208,227,228} Brièvement, il existe deux phénotypes pour une cellule musculaire lisse; le premier est appelé «contractile» et se caractérise par une apparence étendue, un index mitotique bas (raison pour laquelle on réfère parfois à ce phénotype comme un état «d'arrêt de croissance»), une certaine capacité de contraction et un cytoplasme riche en myofilaments; le second se nomme «synthétique» et présente des cellules fusiformes se divisant à un rythme élevé, possédant peu de filaments contractiles mais des organelles synthétiques très développées.^{revues: 166,227,229-231}

1.3.2.2 Étude de l'athérosclérose

Selon l'hypothèse de Ross, discutée plus tôt à la section 1.2.3, la cause de la formation de plaques athéroscléromateuses serait l'agression de l'endothélium.⁷⁵ Par la suite, un ou plusieurs des mécanismes mentionnés plus tôt (métabolites du cholestérol, stress hémodynamiques, infections virales, composantes de la fumée de cigarette, etc.) entraîneraient la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses, amenant l'apparition d'une masse fibreuse synthétisée par ces cellules. Pour apporter des solutions à ce problème, qui reste la première cause de mortalité et de morbidité dans les pays industrialisés, deux grandes avenues de recherche sont explorées: les facteurs contrôlant la prolifération des cellules musculaires lisses et les facteurs

influençant le métabolisme des lipides. Dans le premier cas, le PDGF reste le principal facteur stimulant à l'étude, tandis que l'héparine est le produit inhibiteur sur lequel plusieurs chercheurs se penchent. De plus, une grande variété d'autres stratégies inhibitrices soient également en développement.^{121,165,169,210,212,232-246} Dans le second cas, l'hypercholestérolémie ainsi que l'influence des cellules endothéliales et d'autres cellules sur le transport, la modification et le métabolisme des lipides chez les cellules musculaires lisses sont des sujets d'actualité.²⁴⁷⁻²⁵⁴

1.3.2.3 Étude de la contraction des cellules musculaires lisses

Le tonus des cellules musculaires lisses vasculaires influence directement la pression artérielle. Cette dernière joue un rôle prépondérant dans certaines pathologies telles l'hypertension et le choc septique.^{revues: 154,255-257} Il n'est donc pas surprenant de constater que la contraction de cellules musculaires lisses est abondamment étudiée *in vivo* et également *in vitro*.

1.3.2.3.1 Mécanismes contractiles

Les études ayant mené à la découverte des mécanismes de contraction des cellules musculaires lisses ont d'abord été, réalisées *ex vivo* en utilisant des muscles lisses animaux isolés. De nos jours, une grande partie de la recherche sur les mécanismes fins de la contraction se fait en utilisant des cellules musculaires lisses en culture, en grande majorité d'origine animale. Il n'est pas dans notre intention de faire une revue complète des divers mécanismes impliqués dans la contraction des cellules musculaires lisses car de très bonnes revues concernant chacun des aspects de ce phénomène sont disponibles.²⁵⁸⁻²⁶⁸ Le but de cette section est plutôt de définir sommairement les différents éléments

qui interviennent lors de la contraction des cellules musculaires lisses et d'en décrire les mécanismes de base.

L'organisation de l'appareil contractile de la cellule musculaire lisse diffère énormément de celle de la cellule musculaire striée. En effet, il n'y a pas de bandes-Z caractéristiques qui permettent l'identification nette de sarcomères: l'unité contractile du muscle strié.²⁵⁹ Cependant, les deux cellules musculaires utilisent le même principe de base pour générer la force musculaire: l'interaction des filaments d'actine et de myosine. Bien que ces molécules soient différentes selon qu'elles proviennent d'une cellule musculaire lisse ou striée, dans les deux cas, les filaments d'actine et de myosine glissent les uns sur les autres grâce au cycle de l'activité ATPase du complexe actine/myosine.^{revues: 269,270} De plus, c'est également dans les deux cas que le facteur déterminant pour la contraction s'avère être la concentration de calcium cytoplasmique (Ca^{2+}_i). Mais c'est ici que s'arrête la ressemblance entre les deux systèmes. En effet, alors que l'augmentation de Ca^{2+}_i permet la création du complexe Ca^{2+} /troponine sur les filaments d'actine dans les cellules musculaires striées, celle-ci entraîne la formation du complexe Ca^{2+} /calmoduline dans les cellules musculaires lisses (figure 3). Par cette addition de Ca^{2+} , la calmoduline (CaM) change de conformation et se fixe à la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCK) et active cette dernière. Le complexe Ca^{2+} /CaM/MLCK peut maintenant aller phosphoryler la sérine en position 19 de la chaîne légère de la myosine de 20 kDa (MLC_{20}). La myosine est un hexamère formé de deux chaînes lourdes de 200 kDa chacune et de quatre chaînes légères: une paire de chaînes légères de 17 kDa chacune, dites essentielles, et une paire de 20 kDa chacune, dites régulatrices (figure 4). Ce sont ces dernières qui possèdent, comme leur nom l'indique, un fort pouvoir régulateur sur l'activité ATPase de la myosine qui, celui-ci, dépend de leur phosphorylation par le complexe Ca^{2+} /CaM/MLCK. Ainsi, la phosphorylation de la MLC_{20} permet l'hydrolyse efficace de l'ATP et la contraction du muscle.^{revues: 259,260,266-268} Lorsque le niveau de Ca^{2+} revient au

niveau basal, le complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{MLCK}$ se dissocie et la MLC_{20} est déphosphorylée par une phosphatase (MLCP), stoppant l'activité ATPase du complexe actine/myosine et entraînant la relaxation du muscle (figure 3).²⁷¹⁻²⁷⁴

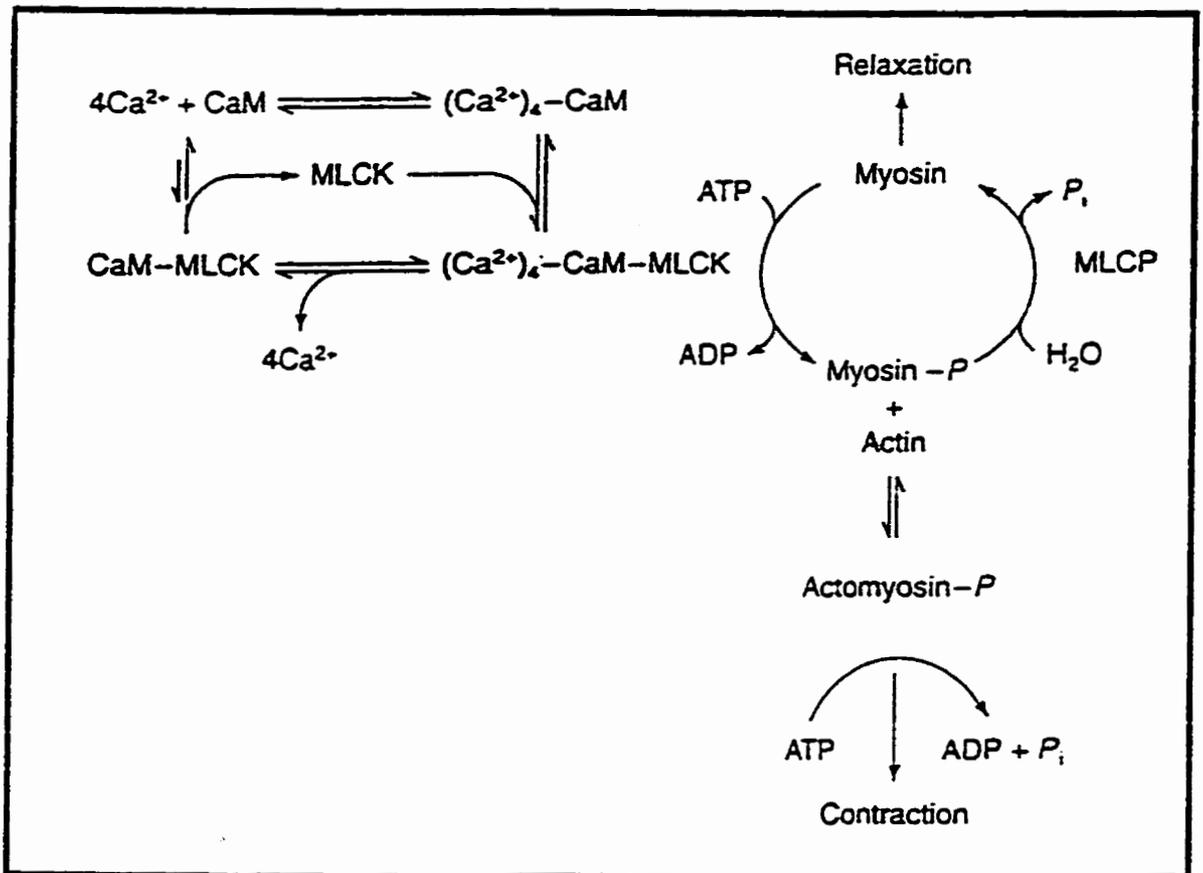


Figure 3: Mécanismes généraux contrôlant l'interaction actine-myosine dans les cellules musculaires lisses (tiré de Allen et Walsh²⁶⁷).

Le Ca^{2+} nécessaire pour faire passer sa concentration dans le sarcoplasme cellulaire de son niveau de base ($\approx 140 \text{ nM}$) à un niveau provoquant la contraction ($500\text{-}700 \text{ nM}$) peut provenir de deux réservoirs.^{275, 276} Le premier

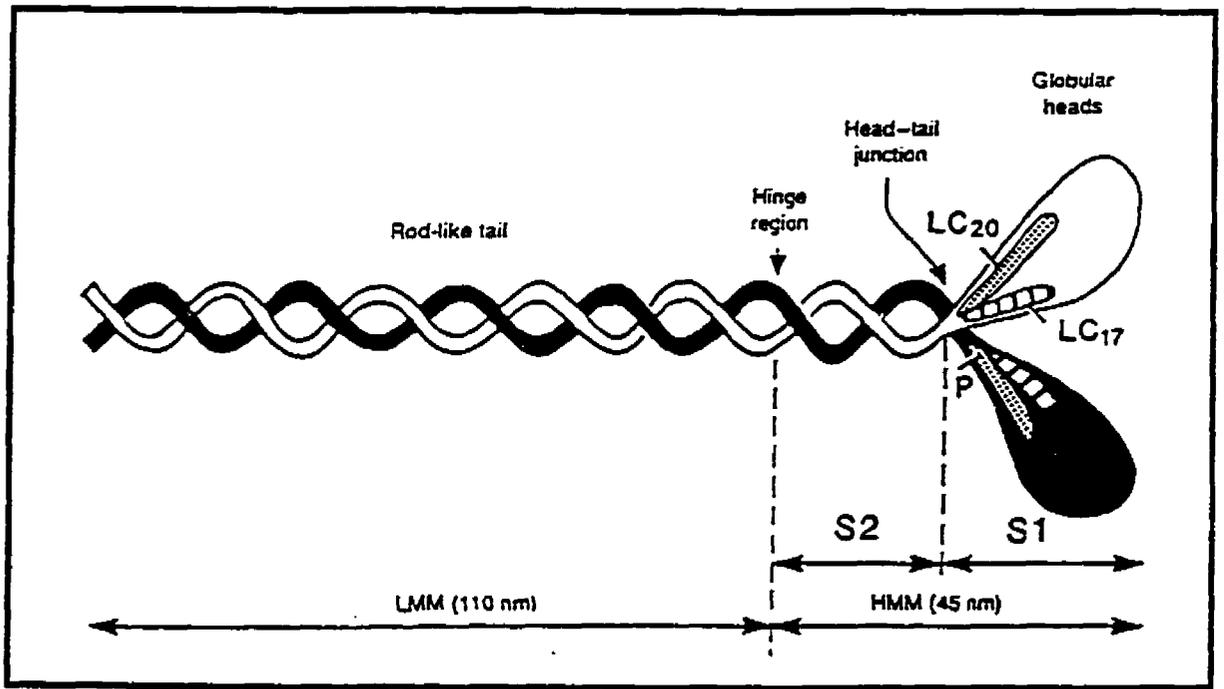


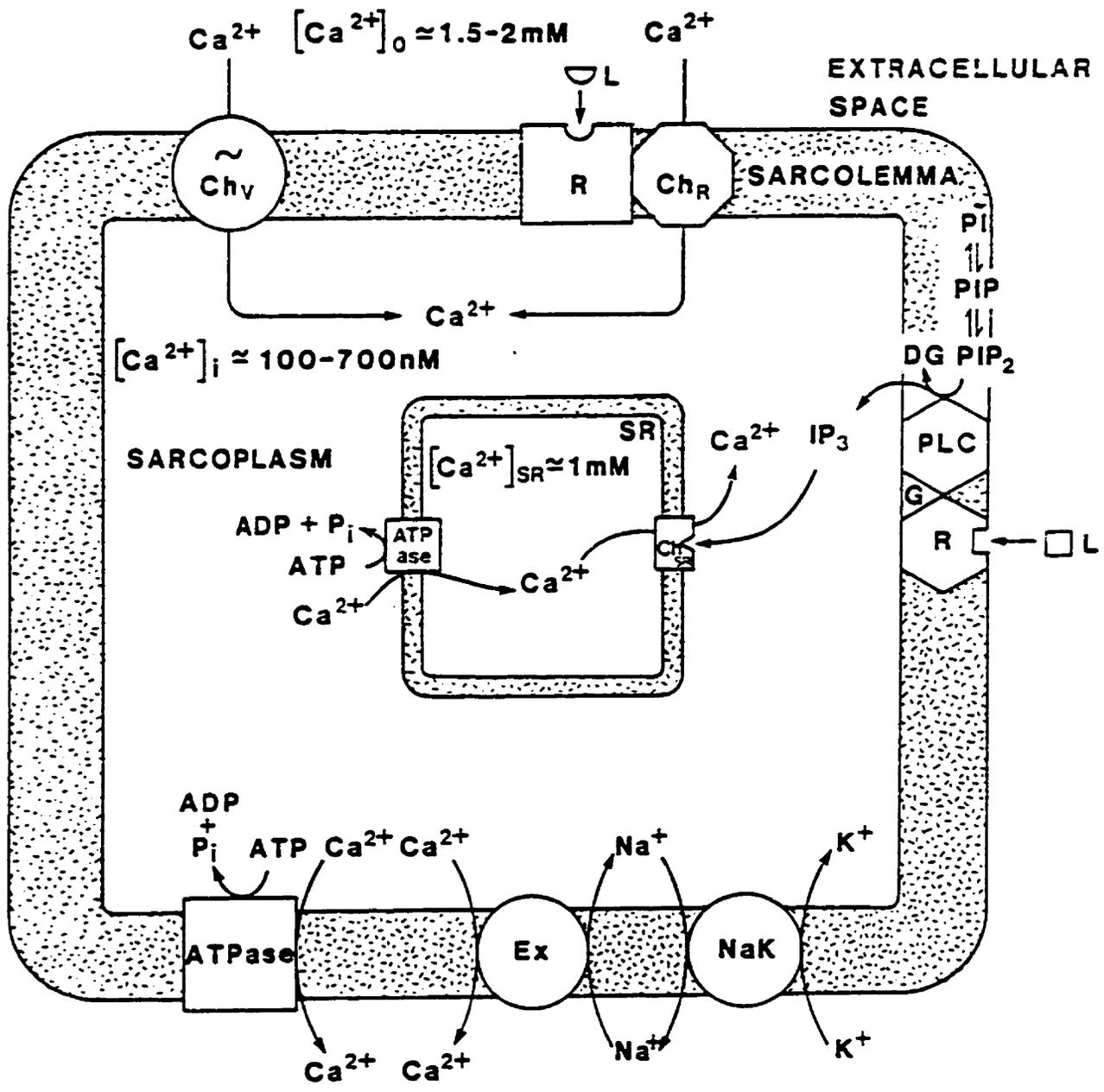
Figure 4: Structure du complexe contractile de la myosine du muscle lisse de type II (tiré de Allen et Walsh²⁶⁷). LMM= «light meromyosin», HMM= «heavy meromyosin», LC₂₀= chaîne légère de la myosine de 20 kDa (régulatrice), LC₁₇= chaîne légère de la myosine de 17 kDa (essentielle), S₁ et S₂= sous-fragments 1 et 2, P= site de phosphorylation.

est l'environnement extracellulaire et le second est le lumen du réticulum sarcoplasmique.²⁷⁷ Dans les deux cas, la concentration de Ca²⁺ y est de l'ordre de quelques millimolaires. L'entrée de Ca²⁺ dans la cellule se fait par l'intermédiaire de canaux calciques qui sont situés au niveau de la membrane sarcoplasmique (figure 5). Ceux-ci sont contrôlés soit par le potentiel (types L : «long acting» ou T : «transient»), soit par un récepteur.²⁷⁸⁻²⁸³ Du côté du réticulum sarcoplasmique, la libération du Ca²⁺ dans le sarcoplasme survient suite à la stimulation du récepteur à l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) ou à la suite d'une élévation du Ca²⁺_i.^{261, 284, 285} Les récepteurs calciques impliqués dans ce dernier phénomène, la libération de

Ca²⁺ induite par le Ca²⁺_i, peuvent être sollicités pharmacologiquement par la ryanodine ou la caféine.²⁸⁵ On y réfère d'ailleurs comme étant le «récepteur à la ryanodine». De plus, il existe deux stocks calciques dans le réticulum sarcoplasmique: un est sensible à la caféine et l'IP₃, tandis que l'autre n'est sensible qu'à l'IP₃.²⁸⁶⁻²⁸⁸ Afin d'assurer le retour de la concentration de Ca²⁺_i à la normale, l'extrusion du Ca²⁺_i s'effectue, au niveau de la membrane sarcoplasmique, grâce à une pompe calcique ATPase et, de façon moins importante, par un échangeur d'ions Na⁺/Ca²⁺ associé à une ATPase échangeuse d'ions Na⁺/K⁺.^{262,289-292} De plus, pour contribuer à l'extrusion du Ca²⁺_i et pour assurer son remplissage, le réticulum sarcoplasmique possède également, dans sa membrane, une pompe calcique ATPase mais différente de celle de la membrane cytoplasmique.²⁹⁰⁻²⁹²



Figure 5 (page suivante): Mécanismes de contrôle de la concentration Ca²⁺_i dans la cellule musculaire lisse (tiré de Walsh²⁵⁹). SR: réticulum sarcoplasmique, Ch_R: canal calcique contrôlé par un récepteur, Ch_{SR}: canal calcique contrôlé par un récepteur situé sur le réticulum sarcoplasmique, Ch_V: canal calcique sensible au potentiel, DG: 1,2-diacylglycérol, Ex: échangeur Na⁺/Ca²⁺, G: protéine G, IP₃: inositol 1,4,5-triphosphate, L: ligand, NaK: ATPase échangeuse de Na⁺/K⁺, PI: phosphatidylinositol, PIP: phosphatidylinositol 4-phosphate, PIP₂: phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PLC: phospholipase C spécifique des phosphates d'inositol, R: récepteur.



Deux mécanismes d'action différents entraînent une augmentation du Ca^{2+}_i : i) une modification du potentiel de la membrane sarcoplasmique ou ii) l'activité pharmacologique d'une substance lorsqu'elle se lie à son récepteur (figure 6). Dans le premier cas, une dépolarisation de la membrane de la cellule musculaire lisse, habituellement obtenue *in vitro* par l'ajout de 100 mM de KCl au milieu extracellulaire, entraîne l'ouverture des canaux calciques dépendants du potentiel et donc, une importante entrée de Ca^{2+} dans la cellule. Dans le second cas, un ligand peut se lier soit à un récepteur qui contrôle l'ouverture d'un canal calcique, soit à un récepteur lié à une protéine G.^{266,293} Dans le cas d'un récepteur qui contrôle un canal calcique, la liaison du ligand provoque non seulement une entrée de Ca^{2+} , mais aussi d'autres cations, car ces canaux ne sont pas spécifiques au Ca^{2+} .^{294,295} L'entrée de cations par ces canaux entraînerait une dépolarisation de la membrane et l'ouverture des canaux calciques dépendants du potentiel. C'est ce mécanisme qui serait responsable de l'élévation massive du Ca^{2+}_i observée par la suite, et non la quantité de Ca^{2+} entrant à proprement dit par ces canaux.²⁶⁶ Lorsque le ligand se fixe à un récepteur lié à une protéine G, il entraîne l'activation de cette dernière qui peut avoir de nombreux effets selon le type de protéine G impliqué. Dans plusieurs cas, l'activation de la protéine G mène à l'activation de la phospholipase C membranaire qui hydrolyse le phospho-inositol 4,5-diphosphate en inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3) et en diacylglycérol. L' IP_3 ainsi produit diffuse dans le cytoplasme et se lie à son récepteur sur la membrane du réticulum sarcoplasmique pour provoquer la libération de stocks calciques (figure 5).²⁶⁶ Pour sa part, le diacylglycérol active une protéine kinase C qui peut phosphoryler plusieurs autres protéines. Dans d'autres cas, la protéine G activée produit d'autres seconds messagers ayant des effets multiples sur plusieurs éléments impliqués dans la contraction des cellules musculaires lisses en agissant, entre autre, sur la concentration des nucléotides cycliques.^{263,268} De plus, la liaison d'un ligand à un récepteur de type tyrosine kinase peut également entraîner la formation d' IP_3 en activant une phospholipase $C\gamma$.^{296,297} Enfin, dans tous les

mécanismes envisagés, l'augmentation du Ca^{2+}_i peut entraîner un relargage de Ca^{2+} des stocks du réticulum sarcoplasmique par le phénomène de libération de Ca^{2+} induite par le Ca^{2+} .²⁸⁵

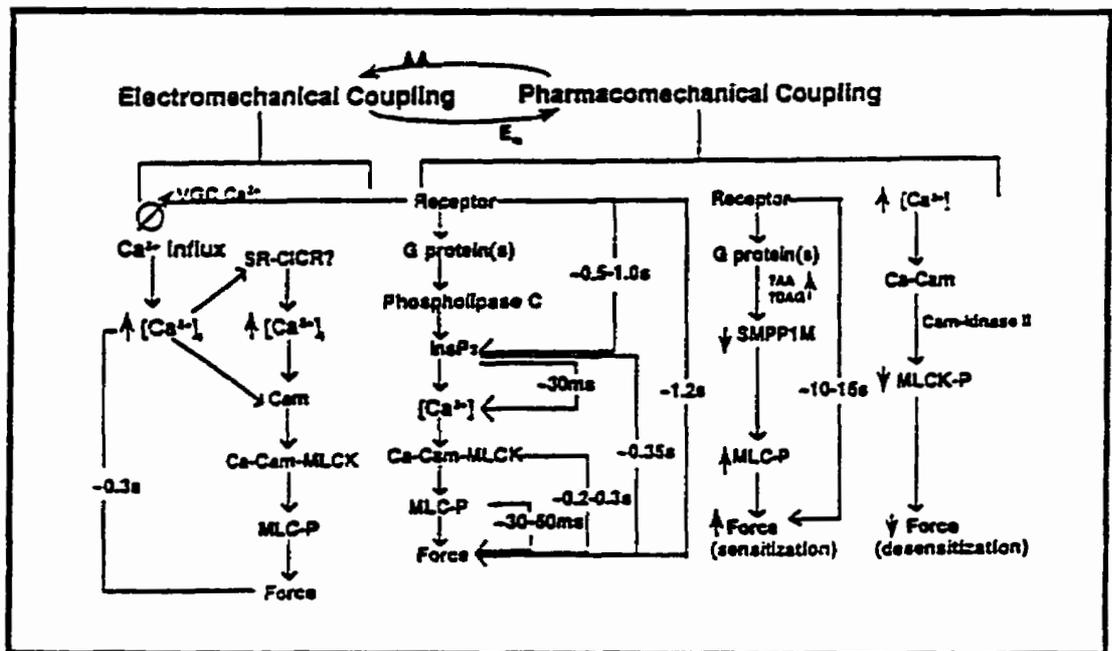


Figure 6: Résumé des mécanismes de contrôle de la contraction des cellules musculaires lisses (tiré de Somlyo et Somlyo²⁶⁶).

Outre la variation de la concentration de Ca^{2+}_i , il existe d'autres mécanismes de contrôle de la contraction de la cellule musculaire lisse. On appelle ces mécanismes de contrôle indépendants de la concentration de Ca^{2+}_i des mécanismes de sensibilisation au Ca^{2+} (ou de désensibilisation). Dans la cascade d'événement décrits plus haut, on constate immédiatement les possibilités de régulation que présente la MLCP (figure 3). En effet, le tonus musculaire de base est la résultante, à un niveau de Ca^{2+}_i donné, de l'équilibre entre l'activation continue de la MLC_{20} par le complexe $Ca^{2+}/CaM/MLCK$ et de sa constante désactivation par la MLCP. Ainsi, toute activité inhibant la MLCP augmente le

tonus musculaire pour une même concentration de Ca^{2+}_i .²⁷² Ce phénomène a été démontré lors de la stimulation de récepteurs associés à des protéines G (α -adrénergiques, muscariniques, etc.).²⁹⁸⁻³⁰⁰ En effet, lors de la fixation du ligand le récepteur active la phospholipase A_2 , par le biais de la protéine G associée, et celle-ci hydrolyse les phospholipides membranaires pour produire de l'acide arachidonique (figure 7). Cette dernière inhibe la MLCP en dissociant sa sous-unité catalytique (37 kDa) des deux autres sous-unités qui sont responsables de l'attachement à la myosine (130 et 20 kDa).²⁷² Il en résulte donc une augmentation de la quantité de MLC_{20} phosphorylées et une augmentation de la tension développée pour une même concentration de Ca^{2+}_i . Bien que deux phosphatases animales aient déjà été identifiées, la nature et les mécanismes de contrôle des phosphatases du muscle lisse sont des questions qui animent plusieurs groupes de recherche.³⁰¹⁻³⁰⁶

Selon le même raisonnement, tout ce qui inhibe l'activité de la MLCK entraîne une désensibilisation des cellules musculaires lisses au Ca^{2+}_i . C'est ce qui est observé lors de la montée du Ca^{2+}_i à des niveaux de $\approx 1 \mu M$ (figure 7). Ceci entraîne l'activation d'une protéine kinase sensible au complexe Ca^{2+}/CaM . Celle-ci phosphoryle la MLCK, diminuant l'affinité de cette dernière pour le complexe Ca^{2+}/CaM .^{264,307,308} Ainsi, il en résulte une concentration plus faible de complexe $Ca^{2+}/CaM/MLCK$ ce qui, en retour, diminue la quantité de MLC_{20} phosphorylée. Enfin, la caldesmone et la calponine, deux protéines retrouvées en association avec les filaments d'actine dans les cellules musculaires lisses pourraient également servir d'éléments régulateurs de la contraction. En effet, dans les deux cas, ces protéines sont capables d'inhiber l'activité actomyosine et leurs activités pourraient être modulables par leur phosphorylation.²⁶⁷

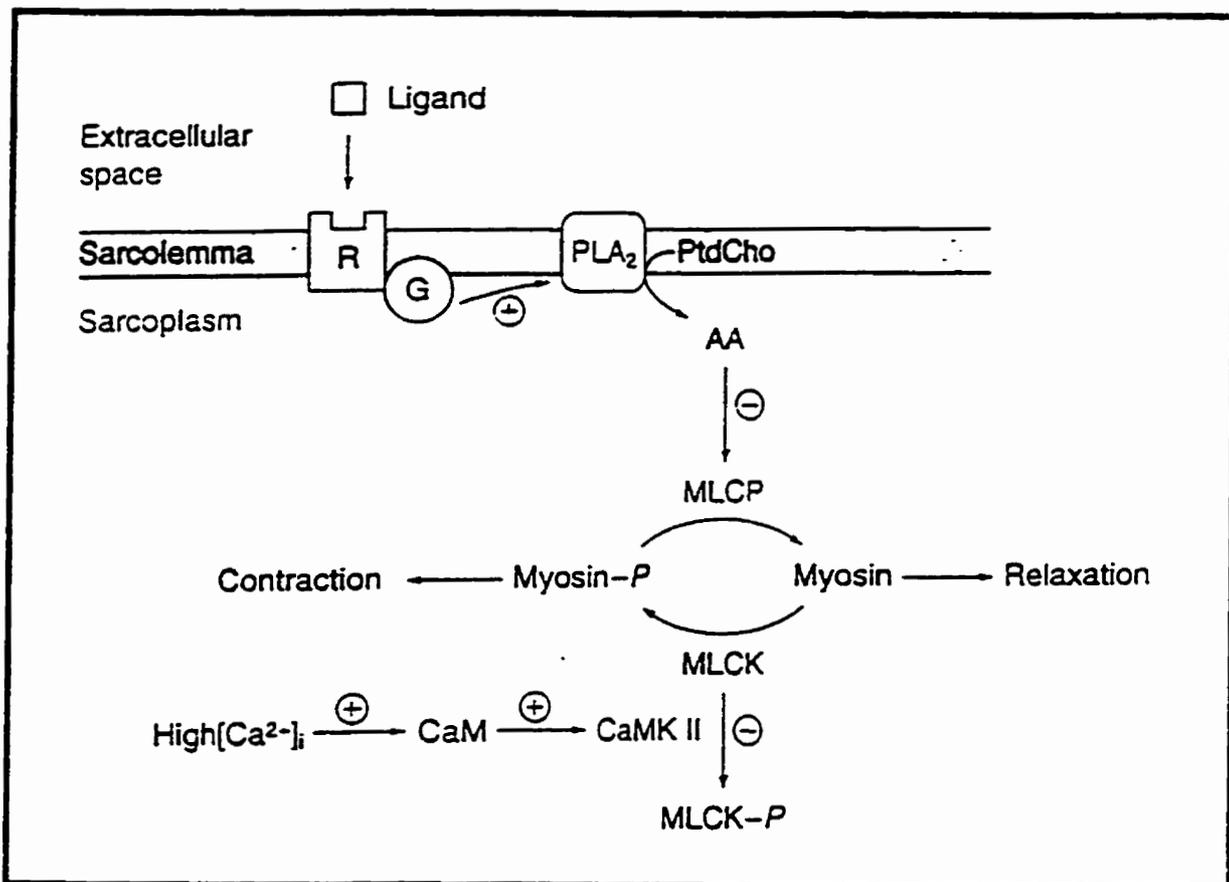


Figure 7: Mécanisme de désensibilisation de la contraction de la cellule musculaire lisse (tiré de Allen et Walsh²⁶⁷). PtdCho: phosphatidylcholine, R: récepteur, G: protéine G, PLA₂: phospholipase A₂, AA: acide arachidonique, CaMK II: protéine kinase de type II.

1.3.2.3.2 Contractilité des cellules musculaires lisses *in vitro*

Jusqu'à récemment, les cellules musculaires lisses en culture ne pouvaient être étudiées pour leur pouvoir contractile car celles-ci perdent très rapidement cette propriété *in vitro* (après un seul passage).²⁰⁸ En effet, bien qu'il soit possible de déduire l'effet contractile d'une substance sur la contraction des cellules musculaires lisses en observant l'activation de cascades enzymatiques ou la variation de seconds messagers intracellulaires, tel que décrit à la section

précédante, cette approche reste indirecte et nécessite un appareillage coûteux et complexe.^{2,5,155,309,310} Par contre, l'étude de la contraction de vaisseaux animaux *ex vivo*, dans des bains d'organe isolé, est attrayante puisqu'elle permet la mesure directe des forces générées par le muscle lisse fraîchement extrait de son environnement naturel. De plus, l'équipement nécessaire pour effectuer ces expériences est relativement peu coûteux, facile d'utilisation ainsi que d'entretien et est déjà en place dans la majorité des laboratoires de pharmacologie vasculaire. Ainsi, les tests de nouveaux produits pharmacologiques ayant potentiellement des effets vasoactifs sont toujours effectués sur des sections d'artères isolées d'animaux comme le lapin ou le rat.¹⁵⁵

Au cours des années 80, les électrophysiologistes travaillent déjà sur des cellules musculaires lisses fraîchement isolées. Équipés de micromanipulateurs et de systèmes d'acquisition et d'analyse d'image, ils leur est possible d'observer la rétraction des cellules musculaires lisses en réponse à des agonistes vasoactifs. Certains développeront même des méthodes de mesures quantitatives de la contraction basées soit sur les variations de surface ou de longueur des cellules, soit sur le nombre de cellules qui contractent.³¹¹⁻³¹⁵ Comme la force générée par les cellules musculaires lisses isolées et non-adhérentes n'est pas nécessairement directement proportionnelle à leur rétrécissement ou au nombre de cellules qui contractent, ces méthodes d'évaluation ne permettent pas la mesure de la force générée par la contraction des cellules. De plus, ces méthodes demandent l'examen de nombreuses cellules et, rappelons-le, nécessitent l'utilisation d'un appareillage sophistiqué.

En 1980, Harris et collaborateurs proposent l'utilisation de silicone solidifié comme un nouvel outil pour l'étude de la locomotion cellulaire.³¹⁶ Cette technique consiste à enduire une surface de culture avec un fin film de silicone que l'on prend soin de faire polymériser, de couvrir de protéines et d'y ensemercer des cellules. Les cellules y adhèrent et, lorsque celles-ci développent une force de traction pour se déplacer, elles déforment le

souple film de silicone. Ceci se traduit par de petites vaguelettes visibles, à l'aide d'un simple microscope, autour des cellules qui tentent de se déplacer. À l'aide de cette technique, des équipes ont étudié la contraction des cellules musculaires lisses vasculaires en réponse à des agonistes vasoactifs.³¹⁷⁻³²⁰ Puisque le nombre de vaguelette n'est pas directement proportionnel à la force générée par les cellules en contraction, la mesure quantitative de cette dernière ne peut être obtenue par cette méthode. Elle présente donc les mêmes désavantages que les méthodes décrites ci-dessus, ayant néanmoins le mérite d'être plus simple, et de mesurer l'activité d'une cellule adhérente à un substrat, bien qu'il partiellement soit synthétique.

Mais quelque soit la méthode utilisée, l'intérêt principal de mesurer la contraction de cellules musculaires lisses isolées *in vitro* est de pouvoir les cultiver avant de les utiliser. En effet, la culture cellulaire présente l'avantage de produire un grand nombre de cellules à partir de peu de matériel de départ. Elle dégage des limites et inconvénients liés au prélèvement de tissus chez l'être vivant (disponibilité, coût, sacrifice, quantité, protocole d'isolation, questions éthiques), diminue certains facteurs de variabilité (individu, source, isolement) et, de plus, permet des conditions expérimentales impossibles *in vivo*. Il a été démontré que des cellules musculaires lisses vasculaires animales (bovin et rat) pouvaient conserver leur phénotype contractile, même lorsque cultivées pendant plusieurs passages, suffisamment pour permettre la mesure de leur contraction par la méthode du silicone ou de celle basée sur l'analyse d'image.^{317,321-324} Ceci est également le cas des cellules musculaires lisses animales cultivées des voies respiratoires et urinaires.^{325,326}

Mais qu'en est-il des cellules musculaires lisses humaines? Malheureusement, les cellules humaines perdent totalement leur capacité de contraction lorsqu'elles sont cultivées ne serait-ce qu'un seul passage. Malgré l'utilisation de techniques très sensibles permettant la détection de la contraction des cellules, il n'est fait état d'aucun cas dans la littérature de cellules musculaires

lisses humaines cultivées ayant contracté, soient-elles vasculaires ou autres. Si les cellules musculaires lisses humaines pouvaient rester contractiles en culture, leur utilisation serait d'un grand intérêt. En effet, malgré les faiblesses inhérentes aux méthodes d'analyse des cellules cultivées, la nature humaine des cellules peut être un facteur important et même primordial dans certains cas. Ainsi, ne serait-il pas judicieux de tester des médicaments vasoactifs sur des cellules humaines en complément ou à la place de tissus animaux?

1.3.2.3.3 Récepteurs purinergiques

Les récepteurs purinergiques se divisent en deux grandes familles: ceux qui reconnaissent l'adénosine, dits P_1 , et ceux qui reconnaissent les purines phosphatées, dits P_2 . C'est la famille des récepteurs P_2 qui retiendra particulièrement notre attention dans cette section car il en sera question dans les articles présentés aux chapitres 3 et 4. Il existe cinq sous-types bien définis de récepteurs P_2 qui se nomment P_{2X} , P_{2Y} , P_{2T} , P_{2Z} et P_{2U} .^{revues: 327-329} À chacun de ces sous-types correspond un ou des agonistes naturels: P_{2X} et P_{2Y} = ATP et ADP, P_{2T} = ADP, P_{2Z} = ATP^{4-} , P_{2U} = ATP et UTP. De plus, il existe trois autres sous-types potentiels de récepteurs P_2 : un récepteur des nucléotides de l'uridine qui reconnaîtrait l'UDP et l'UTP, un récepteur P_{2D} liant le Ap_4A (diadénosine tétraphosphate) et un récepteur $P_{2(PC12)}$ sensible à l'ATP.³³⁰⁻³³² Puisque seuls les récepteurs P_{2X} , P_{2Y} et P_{2U} sont susceptibles d'être exprimés par les cellules de la paroi vasculaire, nous nous limiterons à ces trois sous-types. Les différents sous-types de récepteurs ont été définis grâce à leur sensibilité relative à différents agonistes synthétiques et naturels. Le tableau III présente un résumé des caractéristiques de chaque sous-type de récepteur P_2 .

Tableau III: Caractéristiques des sous-types de récepteur purinergique P₂ (d'après Harden et coll.³²⁹)

Sous-Types	Sélectivité pharmacologique	Effecteurs primaires (secondaires)
P _{2X}	$\alpha, \beta\text{-metATP} = \beta, \gamma\text{-metATP} > \text{ATP} \gg$ ADP β S = 2-MeSATP	Canal cationique
P _{2Y}	2-metSATP > ADP β S > ATP >> $\alpha, \beta\text{-metATP} = \beta, \gamma\text{-metATP}$	Protéines Gq et Gi (\neq PLC, \downarrow ADC, CI)
P _{2U}	ATP = UTP > ATP γ S >> ADP inactifs = 2-MeSATP; ADP β S; $\beta, \gamma\text{-metATP}$	Protéines Gq et Gi (\neq PLC)
P _{2T}	2-MeSATP > ADP antagonistes = ATP, AMP	Protéines Gi (\neq PLC, \downarrow ADC, \neq Ca ⁺⁺ ?)
P _{2Z}	ATP ₄ = BzATP >> ATP	Pore membranaire

Abréviations: met= méthyl, S= thio, Bz= 3'-O-(4-benzoyl)benzoyl-ATP,

PLC= phospholipase C, ADC= adénylate cyclase, CI= Canal ionique.

Les récepteurs P_{2Y} et P_{2U} sont, tous deux, des récepteurs couplés à une protéine G. Dans les deux cas, celle-ci active une phospholipase qui hydrolyse les phospholipides de la membrane produisant de l'IP₃. Ce dernier se

fixe à son récepteur au niveau du réticulum sarcoplasmique, entraînant le relargage massif de Ca^{2+} . C'est d'ailleurs à la similitude de leur mécanisme d'action (une élévation de la concentration d' IP_3) que l'on doit certaines conclusions erronées. En effet, à la fin des années 80, toute élévation de la concentration d' IP_3 en réponse à une stimulation par l'ATP ou l'ADP était associée au récepteur P_{2U} car la présence du récepteur P_{2U} était largement sous-estimée.³²⁹ Le récepteur P_{2Y} diffère pourtant du P_{2U} par sa capacité à inhiber l'adénylate cyclase. Dans le système des cellules de rat C6, utilisant 11 agonistes spécifiques, il a été démontré que l'inhibition de l'adénylate cyclase présentait une sélectivité pharmacologique qui correspondait à celle d'un récepteur P_{2Y} .^{333,334} Conséquemment, il a été montré que cette activité dépendait de l'activation d'une protéine G_i (caractérisée par son activité inhibitrice de l'adénylate cyclase).³³⁵ Par ailleurs, dans le système de l'érythrocyte de dinde, un récepteur ayant les caractéristiques pharmacologiques du sous-type P_{2Y} produit une augmentation de la concentration d' IP_3 et, subséquemment de Ca^{2+}_i , sans inhiber l'adénylate cyclase.³³⁶ Cette action est dépendante d'une protéine G_{11} , de la famille des protéines G_q , et de l'activation par celle-ci d'une phospholipase C_β .^{337,338} Étant donné la grande fidélité avec laquelle les récepteurs se lient avec un sous-type de protéine G, il est probable qu'il existe deux sous-types de récepteurs P_{2Y} . D'ailleurs, dans les myocytes de souris, où l'ATP et l'ADP induisent une augmentation de la concentration d' IP_3 et une inhibition de l'adénylate cyclase, l'inhibition de l'adénylate cyclase est sensible à la toxine de pertussis (inhibiteur des protéines G_i), alors que l'augmentation d' IP_3 ne l'est pas.³³⁹

Les récepteurs de sous-types P_{2U} sont encore pharmacologiquement mal décrits en partie à cause de l'absence d'analogues de l'UTP. Par contre, ces récepteurs sont exprimés dans de très nombreux tissus.³²⁹ Lorsqu'ils sont sollicités, ils entraînent l'activation d'une phospholipase C et une élévation de la concentration d' IP_3 comme c'est le cas pour les récepteurs P_{2Y} . Par contre aucun lien n'a été établi, jusqu'à maintenant, entre l'activation des

récepteurs P_{2U} et une modification de la concentration de l'AMPc bien que cela ne soit pas une caractéristique obligatoire des récepteurs P_{2Y} . Ce qui différencie le mieux les récepteurs P_{2U} des P_{2Y} est leur sensibilité à l'UTP (d'où le «U») et leur insensibilité au 2-metSATP (tableau III).

L'ADN complémentaire des récepteurs P_{2U} et P_{2Y} a été récemment cloné.³⁴⁰ Leur séquence d'acides aminés prédites correspond bien avec les fonctions biochimiques qui leur avaient été attribuées et les place dans la superfamille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à une protéine G (figure 8). Les récepteurs clonés de P_{2Y} de poulet et de dinde ont environ 30% d'homologie de séquence avec les récepteurs P_{2U} humains et de souris.³⁴¹⁻³⁴⁴ Ceux-ci ont très peu d'homologie avec la famille P_1 des récepteurs purinergiques. L'ADN complémentaire des récepteurs P_{2Y} et P_{2U} a aussi été réexprimé dans des cellules de mammifères, leur conférant ainsi la capacité de répondre aux analogues de l'ATP avec la spécificité correspondante à chacun des sous-types de récepteurs.^{342,345} Enfin, une analyse par transfert Northern réalisée avec l'ARN messager correspondant confirme l'expression de ces deux sous-types de récepteurs dans de nombreux organes.^{342,343,346}

Les récepteurs purinergiques du sous-type P_{2X} sont des canaux ioniques qui s'ouvrent au contact de leurs ligands («ligand-gated» ou «receptor operated »).³⁴⁷ Ces canaux sont spécifiques aux cations mais non au Ca^{++} . Ils ont été découverts par des études d'électrophysiologie qui ont révélé, en réponse à l'ATP, des courants dépolarisants qui survenaient très rapidement, qui étaient rapidement inactivés, qui étaient indépendants du potentiel de la membrane et dont l'activation ne semblait pas associée à la génération de seconds messagers classiques (Ca^{++} , AMPc, protéine G).³²⁸ Ces caractéristiques ressemblent à celles des canaux ioniques activés par des récepteurs lors des influx nerveux (récepteurs à la nicotine, GABA, acétylcholine, sérotonine, glutamate et glycine). D'ailleurs, il est maintenant établi que l'ATP est un co-neurotransmetteur au niveau de diverses

synapses neurone-neurone et neurone-muscle.³⁴⁸ Outre la sensibilité aux analogues de l'ATP, le sous-type P_{2X} peut être différencié du sous-type P_{2Y} à l'aide de la suramine qui inhibe la réponse associée à la stimulation des P_{2X}. Cependant, la classification des récepteurs P_{2X} n'est pas si simple! L'existence de sous-types de récepteurs P_{2X} a d'ailleurs été avancée afin d'expliquer certaines incohérences dans la classification pharmacologique des récepteurs P_{2X}. Celle-ci reste une source de controverses.³⁴⁹

Le récepteur P_{2X} a été cloné et sa structure s'avère très différente des récepteurs neuronaux cités plus haut.^{344,350} Sa structure prédite est plus près de celle d'un canal sodique épithélial et d'un mécanorécepteur bactérien.²⁹⁵ Des études ont également révélé une expression très répandue de son ARNm ce qui confirme son rôle dans divers tissus.³⁴⁴ On a également remarqué une expression très forte de ce dernier dans les thymocytes en apoptose et dans la glande pituitaire ce qui suggère des fonctions importantes et insoupçonnées de ce récepteur dans des phénomènes immunitaires et endocrines.²⁹⁵ De plus, le récepteur cloné a été exprimé dans des cellules de mammifères et présente une sensibilité aux analogues de l'ATP qui correspond à celle du récepteur P_{2X} d'artère d'oreille de lapin et de queue de rat.³⁴⁹

1.3.2.4 Autres rôles des cellules musculaires lisses

Pratiquement toute la recherche concernant les cellules musculaires lisses vasculaires se rapporte, d'une façon ou d'une autre, à l'athérosclérose ou au contrôle de la pression sanguine à cause de l'importance de ces pathologies. Cependant, d'autres projets de recherche s'intéressent à des pathologies concernant les cellules musculaires lisses viscérales, par exemple, dans les cas de fibroses lors d'inflammations chroniques de l'intestin.¹⁶⁷ Par ailleurs, les cellules musculaires lisses du système reproducteur féminin font

ailleurs, les cellules musculaires lisses du système reproducteur féminin font également l'objet d'études *in vitro*.³⁵¹ Enfin, les voies respiratoires contiennent également des cellules musculaires lisses. Leur tonus contrôle l'ouverture des voies respiratoires et son dérèglement est à la base des problèmes reliés à l'asthme. Des cultures de cellules musculaires lisses des voies respiratoires sont également utilisés pour la recherche dans ce domaine.^{352, 353}

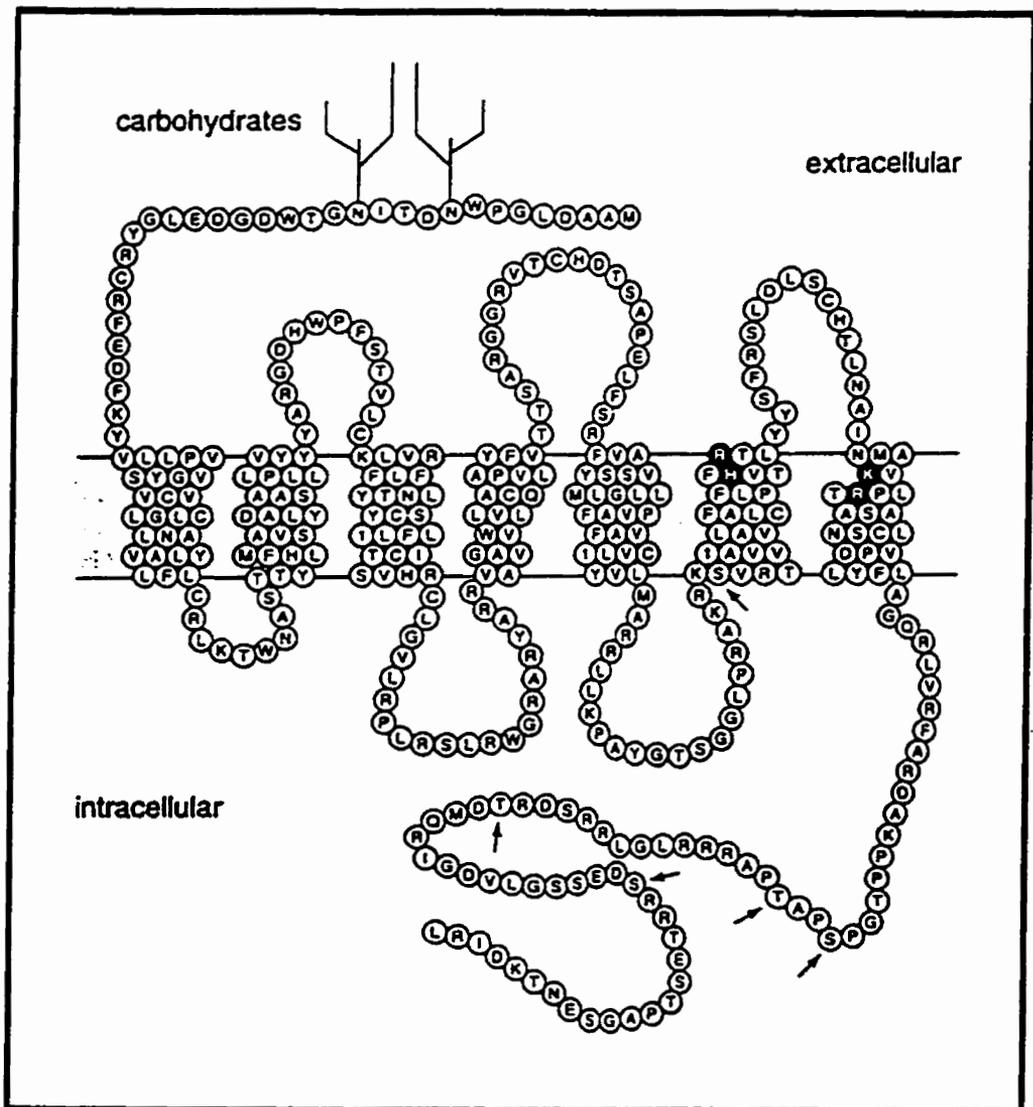


Figure 8: La structure prédite du récepteur purinergique de sous-type P2U humain (tiré de Parr et coll.³⁴³).

1.3.3 Les fibroblastes

1.3.3.1 Culture cellulaire et acide ascorbique

Le fibroblaste est sans aucun doute la cellule adhérente qui a été la plus étudiée, et donc, la cellule qui est la mieux connue. En effet, les fibroblastes sont cultivés *in vitro* depuis les débuts de la culture cellulaire et ceci est sans doute attribuable à leurs exigences nutritives très limitées. En effet, tout milieu de culture classique, additionné de 5% à 10% de sérum animal, permet des conditions de cultures quasi optimales pour ce type cellulaire. Ces cellules plutôt «rustiques» peuvent même être cultivées dans des milieux définis sans sérum. Ainsi, les fibroblastes se sont avérés les candidats idéaux pour toutes sortes d'expériences à caractère fondamental qui s'intéressent au fonctionnement de la cellule de mammifère: prolifération, adhésion, locomotion, migration, métabolisme, toxicité, cytosquelette, etc.^{157,316,354-358}

De façon plus spécifique, le rôle des fibroblastes a été établi comme étant celui de fabriquer les protéines fibreuses qui constituent l'essentiel des tissus conjonctifs. Ainsi, plusieurs groupes de recherche se sont attardés à déterminer la nature de la matrice extracellulaire produite par les fibroblastes ainsi que les facteurs influençant la synthèse de cette dernière.³⁵⁹ À ce point de vue, l'acide ascorbique (vitamine C) a été identifié comme étant un facteur très important dans la synthèse de collagène fibrillaire (type I et III), la principale protéine de la matrice extracellulaire produite par les fibroblastes.^{360,361} L'acide ascorbique joue un rôle de cofacteur de la prolyl-hydroxylase lors de l'hydroxylation de la proline en hydroxyproline.^{362,363} Cet acide aminé modifié est très abondant dans le collagène et est essentiel à sa conformation en triple hélice. Une carence alimentaire en vitamine C produit la fameuse maladie qui a marqué le voyage des premiers explorateurs en Amérique: le scorbut. Celle-ci se caractérise, entre autre, par la perte des dents qui résulte de la fragilisation extrême

du ligament dentaire. Ce phénomène est attribuable à une très faible synthèse de collagène par les fibroblastes ligamentaires qui sont incapables d'assurer le renouvellement du collagène en absence d'acide ascorbique.³⁶⁴

In vitro, l'acide ascorbique augmente de façon remarquable la synthèse de collagène par les fibroblastes.³⁶⁵ Cependant, ce phénomène semble être indépendant de son rôle de cofacteur de l'hydroxylation de la proline.^{360,366} En effet, la majeure partie de l'effet de l'acide ascorbique est observée à des concentrations largement supérieures à celle nécessaire à la pleine hydroxylation de la proline. De plus, l'effet de l'acide ascorbique semble lié au degré de peroxydation des lipides cellulaires.^{367,368} D'ailleurs, l'effet de l'acide ascorbique est significativement inhibé par des produits antioxydants liposolubles mais non hydrosolubles.³⁶⁹ Tout ceci peut paraître surprenant puisque l'on pense généralement à l'acide ascorbique en tant qu'antioxydant. Cependant, en présence d'une large quantité d'ions Fe^{2+} , l'acide ascorbique génère une activité oxydatrice importante qui pourrait expliquer la peroxydation des lipides ainsi que sa toxicité à de fortes concentrations.³⁷⁰⁻³⁷² Par ailleurs, l'acide ascorbique exerce son effet sur la synthèse de collagènes de types I et III, en partie en augmentant la concentration d'ARN messager codant pour ces protéines.^{373,374}

1.3.3.2 Fibroblastes vasculaires et anévrisme

Suite aux progrès de la culture cellulaire, des fibroblastes ont été isolés à partir de tissus d'origines de plus en plus variées: peau saine, cicatrices, ligaments, muqueuse orale, vaisseaux sanguins, etc. Il est rapidement devenu évident que, contrairement à la perception générale, tous les fibroblastes ne se comportent pas de la même façon. Ainsi, l'idée que les fibroblastes aient des rôles importants autres que la synthèse et le maintien de la matrice extracellulaire commence à faire surface. En effet, pendant longtemps, les fibroblastes ont été cantonnés dans un rôle à caractère structural, ils ont été très peu considérés comme ayant des fonctions physiologiques autres, bien qu'étant abondamment

utilisés comme outil de recherche. Ceci est particulièrement vrai dans le domaine vasculaire où les cellules endothéliales et musculaires lisses ont profité de pratiquement toute l'attention des équipes de recherche.

Pourtant, il semble bien qu'il y ait des communications possibles entre les fibroblastes et les autres cellules vasculaires. Par exemple, les fibroblastes favorisent l'organisation des cellules endothéliales en capillaire *in vitro*.^{375,376} De plus, les fibroblastes sécrètent un facteur qui augmente la synthèse de prostacycline par les cellules endothéliales.^{377,378} En retour, les cellules endothéliales influencent le phénotype des fibroblastes et modulent la façon dont ces derniers modifient et synthétisent la matrice extracellulaire *in vitro*.^{375,379,380} *In vivo*, l'influence de facteurs humoraux synthétisés par les cellules vasculaires est beaucoup moins facile à mettre en évidence. Ceci dit, dans le domaine des greffes vasculaires, deux équipes ont mis en évidence, dans le sérum de patients présentant une incapacité à incorporer une prothèse vasculaire synthétique, un facteur qui inhibe la prolifération des fibroblastes.^{381,382} L'origine et la nature exacte de ce facteur est encore inconnue. Puisque l'incorporation dans les tissus environnants est un facteur critique pour le bon fonctionnement d'une prothèse vasculaire, il s'agit d'un cas où l'importance des fibroblastes, et des facteurs humoraux qui les affectent, est clairement mise en évidence. Par ailleurs, l'adventice vasculaire semble jouer un rôle dans le métabolisme de substances physiologiques aussi importantes que l'oxyde nitrique ou l'angiotensine.^{383,384} L'adventice pourrait même influencer le développement de l'hyperplasie intimale.^{385,386} Dans ce cas, l'effet ne serait peut-être pas attribuable aux fibroblastes eux-mêmes mais aux vasa vasorum de l'adventice qui éviteraient l'hypoxie des cellules musculaires lisses de la média.

Les nouvelles fonctions physiologiques encore insoupçonnées de l'adventice ne changent pas le fait que son rôle principal reste d'assurer la résistance mécanique du vaisseau sanguin. À ce chapitre, les connaissances ont beaucoup évolué et il apparaît maintenant clairement que la stabilité mécanique

de l'adventice dépend d'un délicat équilibre entre la dégradation et la synthèse des protéines structurales (collagène et élastine).³⁸⁷ Lorsqu'il y a déséquilibre, on observe l'apparition d'une dilatation de la paroi vasculaire: un anévrisme. Histologiquement, ce phénomène est caractérisé par la dégradation massive du réseau des fibres élastiques de la média.³⁸⁷ Cependant, le fait que l'adventice seule puisse maintenir l'intégrité mécanique du vaisseau, et que ce tissu soit principalement constitué de collagène, suggère que le métabolisme de ce dernier est important dans l'étiologie de la maladie.³⁸⁷ En effet, la présence de métalloprotéinases/collagénases dans les lésions anévrismales a été établie.^{388,389} Ces protéases pourraient être sécrétées par les cellules inflammatoires observées aux sites des lésions anévrismales, ou par les cellules vasculaires, ou par les deux.³⁸⁸ La densité de cellules inflammatoires dans l'adventice dilatée a été quantifiée et semble proportionnelle à la taille de l'anévrisme.³⁸⁸ Or, les cellules inflammatoires peuvent également synthétiser des élastases, ce qui suggère que la dégradation du réseau de fibres élastiques serait une des premières étapes de la formation de l'anévrisme.^{390,391} Récemment, un modèle animal de dilatation artérielle dans un contexte de rejet de greffe xenogénique a été mis au point.³⁹² Dans ce système, l'ensemencement du greffon vasculaire avec des cellules musculaires lisses transfectées surexprimant le TIMP-1 («tissue inhibitor of metalloproteinases-1»), un puissant inhibiteur des collagénases, réduit la formation d'anévrismes.³⁹³ Comme prévu, cette surexpression de TIMP-1 diminue considérablement l'activité de la métalloprotéinase-9 (collagénase de 92 KDa ou gélatinase B) dans les tissus du greffon. Ceci suggère que les composantes collagéniques jouent un rôle crucial dans le maintien de la résistance mécanique du greffon. Ceci dit, ce traitement réduit également la dégradation du réseau élastique du greffon. Cette dégradation, et son inhibition, peuvent s'expliquer par l'activité élastase qu'exercent plusieurs métalloprotéinases, malgré leurs noms de collagénase ou gélatinase.³⁹⁴ C'est d'ailleurs le cas pour la métalloprotéinase-9.³⁹⁵ Ainsi, en supposant que ce modèle reflète en partie le développement des anévrismes chez l'humain, les

deux réseaux protéiques structuraux, collagénique et élastique, pourraient être importants pour assurer la stabilité mécanique du vaisseau sanguin.

1.4 La modélisation de la paroi vasculaire *in vitro*

1.4.1 Coculture directe

La coculture directe consiste simplement à ensemercer des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses dans un flacon de culture. Les cellules partagent alors le même milieu de culture, le même substrat et se font compétition pour la surface disponible.^{5,8,396} Les deux types de cellules peuvent être ensemençés simultanément ou un type de cellules peut profiter d'une période d'attachement et d'adaptation avant l'ensemencement du second type.^{2-4,11} Les cellules sont donc en contact direct.

De nombreuses recherches ont été menées à l'aide de ces cocultures afin de déterminer les effets de la présence d'un type cellulaire sur l'autre et vice-versa. Ce modèle est essentiellement utilisé pour détecter les effets de facteurs solubles sécrétés par les cellules, surtout ceux qui ont une très courte durée de vie. De par le contact direct des cellules, ce modèle permet également d'étudier les mécanismes de communications intercellulaires qui sont dépendants des contacts cellule-cellule.⁵

Ce modèle comporte de nombreux désavantages. D'une part, dans l'étude des cellules vasculaires de vaisseaux de grand et moyen diamètre, la pertinence de permettre un contact intercellulaire n'est pas évidente puisque cela ne représente pas la situation *in vivo*. D'autre part, les cellules musculaires lisses étant beaucoup moins difficiles à cultiver que les cellules endothéliales, elles prennent rapidement le dessus sur ces dernières. Ceci confère une grande

instabilité au modèle qui n'est utilisé que pour des expériences de courte durée (<48 h). Par ailleurs, il est possible de déterminer la prolifération d'une population donnée, en inhibant la division cellulaire de l'autre population. Pour ce faire, la mitomycine a été utilisée, mais son emploi pourrait influencer les résultats obtenus. De plus, un compte cellulaire nécessite une évaluation différentielle alors que la récupération d'une population donnée est complexe et implique, par exemple, des étapes de séparation telles un immunomarquage suivi d'un passage au fluorocytomètre en flux.^{3,11}

Parmi les autres problèmes que comporte ce modèle, mentionnons aussi le non-respect de la répartition physique et des proportions des types cellulaires ainsi que l'absence de matrice extracellulaire adéquate dont l'importance pour les cellules endothéliales a été abordée plus tôt.

1.4.2 Milieux conditionnés

Ceux-ci ne constituent pas vraiment un modèle de coculture mais soulèvent le problème de la séparation physique des types cellulaires. Un milieu conditionné est un milieu ayant baigné un type cellulaire donné pendant une période de temps donnée. Celui-ci contient donc les facteurs solubles produits et relargués par le type cellulaire choisi. Ce milieu est ensuite utilisé pour cultiver un second type cellulaire et il est ainsi possible d'observer les influences d'un type cellulaire sur un autre en ce qui à trait aux facteurs solubles.^{3,8,397}

Le principal problème que pose ce genre de modèle, outre la possibilité d'un facteur à demi vie très courte, est que la population de cellules conditionnant le milieu ne subit pas l'influence du second type cellulaire. Ainsi, il a été démontré que certains facteurs sont sécrétés sous forme inactive et sont

activées présence du second type cellulaire.³ Dans le cas où ce produit activé aurait un effet rétroactif sur la première population, cet effet n'est jamais observable. Ce problème est résolu en cultivant des cellules côte à côte, dans un milieu commun, mais sans permettre de contact cellulaire. Évidemment, de nombreux désavantages persistent dont le non-respect de la répartition physique et des proportions des types cellulaires ainsi que l'absence de matrice extracellulaire adéquate.³⁹⁷

1.4.3 Cultures sur microbilles («microcarrier beads»)

La culture sur ces petites billes de substrats, analogues à ceux des flacons de culture, vise également à permettre la séparation des populations et à minimiser les contacts intercellulaires. Le modèle utilisé consiste à cultiver des cellules endothéliales sur des microbilles que l'on dépose dans des puits contenant des cultures de cellules musculaires lisses.^{6,155} Malheureusement, ce modèle n'élimine pas les possibilités de contact entre les espèces, bien qu'il les réduise. Il est néanmoins envisageable que des cellules endothéliales puissent se décrocher des billes et se retrouver parmi les cellules musculaires lisses, ou que des cellules musculaires lisses migrent sur une bille déposée sur le fond du puits. De plus, tous les problèmes mentionnés dans le paragraphe précédant persistent.

1.4.4 Utilisation de microfiltres

La compagnie Millipore Corp. (Bedford, MA) produit une chambre de culture appelée Millicell. Il s'agit d'un puits de plastique dont le fond est constitué d'un microfiltre de cellulose dont les pores sont de 0.45 μm . La Millicell s'insère avec précision dans un puits plus grand de façon à ce que son fond soit à environ 2 mM de celui du puits. Dans le modèle vasculaire, des

cellules endothéliales sont ensemencées dans la Millicell et des cellules musculaires lisses sont cultivées dans le fond du puits de la plaque.^{3,11} Les deux milieux ne sont en contact que par les pores de 0.45 μm situés sous les cellules endothéliales. Ainsi, les milieux baignant les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses peuvent être prélevés et analysés séparément, et des expériences de transport d'un milieu à l'autre peuvent être effectuées (perméabilité de l'endothélium). Il existe d'autres types de chambres qui fonctionnent selon le même principe.^{5,165}

Ce modèle possède donc de nombreux avantages: séparation et récupération facilitées des cellules et des milieux de culture, possibilité d'études de facteurs solubles, mais surtout, bonne répartition physique des cellules. Celle-ci permet d'évaluer les proportions cellulaires et les fonctions de transport de l'endothélium. Par contre, la question de la matrice extracellulaire, qui peut influencer les phénotypes cellulaires, n'est pas résolue, bien que certaines équipes recouvrent leurs filtres de collagène et autres molécules d'adhésion.^{5,165} De plus, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses sont relativement éloignées les unes des autres par rapport à la situation retrouvée *in vivo*. Cela pourrait avoir une certaine importance dans l'évaluation de la production de facteurs solubles efficaces à très courtes distances (ayant une demie vie très courte ou nécessitant un gradient de concentration élevé).

C'est ce problème qu'ont résolu Weber et son équipe, en 1986, en cultivant des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses sur les côtés opposés d'un microfiltre de polycarbonate d'une épaisseur d'à peine 10 μm .¹³ Tout en conservant les cellules séparées, ce modèle leur offre une très grande proximité. Reste, bien sûr, le problème de la matrice extracellulaire et de l'impossibilité de permettre la migration des cellules musculaires lisses à travers les cellules endothéliales pour étudier des phénomènes tels l'athérosclérogénèse.

1.4.5 Gels de collagènes

La différence entre une culture *in vitro* et un tissu *in vivo* se situe principalement au niveau de la matrice extracellulaire. En effet, *in vivo*, les cellules sont en contact avec une matrice extracellulaire complexe de par sa nature et son organisation. *In vitro*, les cellules sont déposées directement sur du plastique ou sur des protéines adsorbées sur celui-ci. De plus, Les cellules du mésenchyme *in vivo* sont complètement enveloppées par la matrice extracellulaire alors qu'*in vitro*, elles se retrouvent sur la matrice. La technologie des gels de collagènes permet d'apporter une solution partielle à ces problèmes. Ces gels sont produits par la neutralisation d'une solution de collagène fibrillaire (types I, II ou III) solubilisé dans l'acide dilué. Il s'ensuit la précipitation du collagène, sa polymérisation en fibres et la formation d'une matrice peu dense de collagène hydraté. Au cours de la manipulation, des cellules peuvent être ajoutées dans le collagène neutralisé, avant la polymérisation du collagène, pour produire des équivalents tissulaires.^{398,399}

En 1986, van Buul-Wortelboer et son équipe mettent au point un modèle de parois vasculaires utilisant des cellules humaines et du collagène de type III de peau de veau utilisé comme matrice extracellulaire.¹² Dans ce modèle, des cellules musculaires lisses sont ensemencées et cultivées sur un gel de collagène puis recouvertes d'un second gel de collagène sur lequel seront ensemencées des cellules endothéliales. Ce modèle constitue une bonne imitation de la situation *in vivo* car il fournit une matrice extracellulaire naturelle et respecte la distribution tridimensionnelle des types cellulaires. De plus, il permet la récupération sélective des cellules par digestions des enzymatiques appropriées.

Certains problèmes persistent toujours. En effet, les milieux extracellulaires apical et basal ne peuvent pas être récupérés séparément. Ceci sera

résolu par le modèle de Navab et ses collaborateurs en 1988.¹⁰ En effet, ce modèle est comparable à celui décrit plus haut mais il est construit sur un microfiltre de polycarbonate et inséré dans un support permettant de séparer les milieux supérieurs et inférieurs.

Le groupe de van Buul-Wortelboer précise que son modèle n'est stable que 10 jours tandis que Navab, dont les expériences sont de courte durée, ne le précise pas. Le problème d'instabilité provient du fait que les cellules musculaires lisses semblent détruire la matrice de collagène, probablement en sécrétant des collagénases lors de la culture *in vitro*.⁴⁰⁰ Ces deux modèles restent, malgré tout, très complets et s'approchent de la situation retrouvée *in vivo*. Néanmoins, certaines améliorations peuvent encore être apportées. Notons, entre autres, que la matrice extracellulaire fournie par le gel de collagène n'est pas aussi complexe que celle observée *in vivo*. En effet, celle-ci ne contient pas de collagènes non-fibrillaires, surtout de type IV, ni d'élastine, de protéoglycans, de laminine, etc.^{28,401,402}

Avec l'avènement des modèles tridimensionnels, grâce principalement à la technique des gels de collagènes, la modélisation de la paroi vasculaire est devenue presque complète. Cependant, une dernière caractéristique manque encore à ces modèles: la forme tubulaire. À première vue, cette caractéristique peut paraître superflue pour un modèle vasculaire *in vitro*. Néanmoins, la forme tubulaire est préférable pour des expériences qui concernent l'hémodynamique. Ceci dit, des modèles tridimensionnels plan ont déjà été utilisés pour des études hémodynamiques.⁴⁰³ Alors, les difficultés associées à la production *in vitro* d'un équivalent vasculaire tubulaire valent-elles les avantages que peuvent offrir un tel modèle? Peut-être que non. Par contre, du point de vue de l'ingénierie tissulaire vasculaire, visant une application clinique, l'obtention d'un équivalent tubulaire est essentiel pour la production d'une prothèse vasculaire. Au cours du prochain chapitre, nous verrons comment certaines équipes ont répondu à cette question.

1.5 Les prothèses vasculaires

1.5.1 Prothèses synthétiques

Depuis l'utilisation des premières prothèses artérielles artificielles chez l'humain par Blakemore et Voorhees, en 1954, les matériaux synthétiques se sont rapidement succédés.⁴⁰⁴ Avec l'avènement du Dacron[®], du Téflon[®] et finalement, en 1974, du ePTFE («expanded» polytétrafluoroéthylène) il est devenu évident que les prothèses synthétiques ne donnent de bons résultats que lors du remplacement de vaisseaux de diamètres importants et, jusqu'à un certain point, pour celui des vaisseaux de diamètres moyens.^{17-19,405} Ainsi, malgré plus de 30 ans d'excellente recherche dans le domaine des biomatériaux, il n'existe toujours pas de matériel complètement hémocompatible qui permettrait de produire des prothèses vasculaires pour le remplacement de vaisseaux de faibles diamètres (diamètre inférieur à 5 mM).

En effet, aucun biomatériau n'est capable d'inhiber complètement l'adsorption des protéines plasmatiques, notamment du fibrinogène, qui entraînent les interactions avec les plaquettes sanguines.⁵⁰ Il en résulte une activation plaquettaire chronique qui entraîne la déposition progressive de fibrine sur la paroi de la prothèse.⁴⁰⁶ Cela engendre un rétrécissement de la lumière du vaisseau, d'autant plus important que le diamètre de la prothèse est faible. Si ce rétrécissement est significatif, il obstrue le flot sanguin, favorisant d'autant plus l'activation plaquettaire. C'est pourquoi les vaisseaux de faibles diamètres présentent une faible perméabilité au cours des 30 premiers jours post-implantation, alors que ce n'est pas le cas avec les prothèses de plus gros diamètres. De plus, les prothèses de faibles diamètres sont exposées à des flots plutôt faibles, ce qui favorise également l'activation plaquettaire.

À plus long terme, les prothèses de faibles diamètres, tout comme celles de plus gros diamètres, peuvent développer une hyperplasie intimale.⁴⁰⁷ Cette prolifération excessive des cellules musculaires lisses produit une protubérance dans la lumière artérielle, au niveau de l'anastomose. En interférant avec le flot sanguin, l'hyperplasie intimale stimule l'activation plaquettaire qui, elle même, favorise la progression de la lésion en fournissant des facteurs de croissance aux cellules musculaires lisses. Le rétrécissement de la lumière finit par causer une thrombose qui peut entraîner l'obstruction de la prothèse. Encore une fois, ce phénomène est d'évolution plus rapide dans les prothèses de faibles diamètres puisque la marge de manoeuvre y est moins grande que dans les prothèses de plus gros diamètres. Les causes de l'hyperplasie intimale sont multiples.⁴⁰⁷⁻⁴⁰⁹ Néanmoins, la dégranulation des plaquettes au contact du biomatériau constitue certainement une source importante de facteurs de croissance pour les cellules musculaires lisses (PDGF, TGF- β , EGF, etc.).^{50,213} De plus, la réaction inflammatoire produite par le biomatériau attire les neutrophiles et les macrophages, qui eux-mêmes sécrètent de nombreux facteurs mitogéniques pour les cellules musculaires lisses.³⁰ Enfin, les propriétés mécaniques différentes du biomatériau et de l'artère humaine produisent une zone de perturbations biomécaniques au site de l'anastomose.⁴¹⁰⁻⁴¹² Or, la stimulation mécanique des cellules musculaires lisses peut également provoquer leur prolifération.^{226,413} Ainsi, tant et aussi longtemps que les biomatériaux ne seront pas complètement inertes, il est peu probable qu'ils puissent constituer des prothèses de faibles diamètres présentant des taux de perméabilité satisfaisants.

1.5.2 Modifications de surface

En réponse à la réactivité persistante des biomatériaux, plusieurs équipes ont changé leur fusil d'épaule et ont développé des approches visant à rendre les prothèses synthétiques plus «biologiques». Cette stratégie vise

à camoufler le biomatériau derrière un masque biologique dans le but de tromper l'organisme et d'éviter les réactions plaquettaires et inflammatoires. Dans un premier temps, des prothèses de faibles diamètres ont été recouvertes de protéines pacificatrices comme l'albumine, la gélatine ou le collagène. Scientifiquement, s'agit de saturer la prothèse avec des protéines dépourvues de séquence RGD afin de limiter l'adsorption du fibrinogène, riche en séquence RGD. En effet, c'est à la séquence RGD que se lie le récepteur plaquettaire GP IIb/IIIa. De plus, la densité de fibrinogène adsorbé sur une surface a été démontrée comme étant proportionnelle à l'adhésion plaquettaire sur cette dernière.⁴¹⁴ Mais en réalité, le principal objectif de l'ajout d'une couche protéique est de limiter la porosité des prothèses vasculaires. En effet, une prothèse non poreuse a l'avantage de ne pas nécessiter une étape de pré-coagulation, de diminuer le temps opératoire et de limiter les pertes sanguines; trois caractéristiques importantes pour les chirurgiens vasculaires.

Afin d'immobiliser ces diverses protéines, plusieurs méthodes ont été développées. Une méthode classique utilise le pouvoir polymérisant des aldéhydes (glutaraldéhyde ou formaldéhyde) afin de fixer les protéines.⁴¹⁵⁻⁴²⁰ Cette méthode très utilisée est très efficace mais peut induire une certaine toxicité cellulaire.⁴²¹⁻⁴²⁴ De nombreuses autres méthodes chimiques d'immobilisation ont également été mises au point telles que la polymérisation à l'aide de carbodiimide ou d'isocyanate, l'alkylation avec des résidus C₁₈, la photo-activation, la décharge de plasma, l'application d'une fine couche polymère ayant une forte affinité pour la protéine à immobiliser, ou simplement une imprégnation en milieu aqueux suivie d'une dénaturation à l'autoclave.^{417,425-432} Dans presque tous les cas, la porosité des prothèses au moment de l'implantation a été nulle, répondant bien aux besoins pratiques du chirurgien. Du point de vue de l'adhésion plaquettaire, quelques études menées *in vitro* ont démontré une diminution de la thrombogénicité suite à l'ajout de protéines pacificatrices.^{430,433,434} Cependant, ces résultats obtenus après de courtes périodes d'exposition *in vitro* ne sont pas nécessairement représentatifs des résultats qui

seront observés *in vivo*. En fait, la plupart des études animales à plus ou moins long terme n'ont pas démontré d'effets positifs du recouvrement protéique sur la thrombogénicité des prothèses.^{429,433,435,436} Notons ici que la grande variabilité dans la méthode et la nature du recouvrement protéique rend une comparaison entre les différentes études difficile, pour ne pas dire hasardeuse. Il est néanmoins possible de conclure que le recouvrement protéique ne nuit pas aux performances des prothèses vasculaires. C'est d'ailleurs ce type de conclusions que présentent la majorité des études menées chez l'humain.^{437,438}

Toutefois, la polymérisation excessive des protéines immobilisées peut entraîner des effets négatifs. En effet, le recouvrement protéique est biodégradé *in vivo* au cours d'une période allant de 2 semaines à plus de 6 mois, en fonction du degré de polymérisation.^{429,436,439,440} Dans le cas d'une polymérisation très forte, la résorption retardée de la couche protéique retarde l'incorporation de la prothèse dans les tissus environnants, ce qui peut sérieusement mettre en péril la survie du greffon.^{418,419,439,441} Par contre, une forte polymérisation semble conférer une certaine antithrombogénicité à la prothèse.⁴³⁹ Ainsi, il semble qu'un équilibre soit nécessaire, entre une polymérisation forte conférant un avantage antithrombogénique initial, d'une part, et une polymérisation faible favorisant les processus de «guérison» et d'incorporation du greffon, d'autre part.

Dotées de toutes ces nouvelles techniques d'immobilisation protéique, certaines équipes ont vu là une occasion de donner un rôle non plus passif, mais actif, aux protéines fixées. Dans toutes les approches qui seront mentionnées ici, la difficulté est de réussir à fixer la molécule d'intérêt suffisamment solidement pour qu'elle ne soit pas solubilisée en quelques heures, mais ce, sans que celle-ci ne perde son activité biologique ou ne devienne inaccessible aux cellules visées. Par exemple, afin de combattre les infections des prothèses synthétiques, un événement assez rare mais aux conséquences désastreuses, des chercheurs ont fixé, avec succès, différents antibiotiques aux

biomatériaux synthétiques.⁴⁴²⁻⁴⁴⁶ Il est à noter que même les protéines pacificatrices seules confèrent aux matériaux synthétiques une certaine résistance à l'infection bactérienne.⁴⁴⁷ Certaines équipes ont également cherché à donner une activité anticoagulante aux prothèses synthétiques de faibles diamètres en y greffant des protéines ayant une activité biologique appropriée.^{448,449} Ainsi, l'héparine, pour ses propriétés anticoagulantes, et l'urokinase, pour ses propriétés fibrinolytiques, ont été liées à des prothèses vasculaires synthétiques.⁴⁵⁰⁻⁴⁵³ Enfin, des facteurs de croissance ont été fixés sur des biomatériaux dans l'espoir de favoriser l'adhésion, la migration ou la croissance de cellules endothéliales sur les parois des prothèses synthétiques.⁴⁵⁴⁻⁴⁵⁷ Notons que, pour l'instant, toutes ces approches restent encore purement expérimentales.

1.5.3 Endothélialisation

Dans la dernière section, nous avons vu comment la recherche dans le domaine des prothèses vasculaires est passée d'une approche visant à produire des biomatériaux synthétiques complètement inertes à une approche qui tente de composer avec les inévitables réactions biologiques face aux biomatériaux. Il en ressort que le problème fondamental des prothèses synthétiques de faibles diamètre est la thrombose. Or, la surface hémocompatible par excellence reste une monocouche de cellules endothéliales qui possèdent une batterie de systèmes coordonnés visant à contrôler l'adhésion et l'activation plaquettaire.¹⁴⁰ Avec l'avènement de la culture des cellules endothéliales humaines, au début des années 70, l'idée d'ensemencer un endothélium sur la surface interne d'une prothèse synthétique n'a pas tardé à faire surface.⁴⁵⁸ Vers la fin de cette décennie, les premières expériences animales d'endothélialisation de prothèses synthétiques donnaient déjà des résultats encourageants.⁴⁵⁹ Stimulées par ces résultats prometteurs, d'autres études animales sont venues confirmer les bienfaits de l'endothélialisation.⁴⁶⁰⁻⁴⁶³

En 1984, les premières prothèses synthétiques endothélialisées avec des cellules autologues ont été implantées chez l'humain. Malgré les résultats positifs obtenus chez l'animal, l'endothélialisation chez l'humain donna des résultats plutôt décevants.⁴⁶⁴ Depuis, d'autres études cliniques ont été menées et certains résultats obtenus semblent encourageants.⁴⁶⁵⁻⁴⁶⁷ Cependant, ces résultats sont souvent à peine significatifs et ne semblent pas reproductibles.^{468,469} Il faut noter ici que ces études menées chez l'humain sont ardues étant donné le faible nombre de patients traités et l'impossibilité d'observer le développement de l'endothélium. Des méthodes indirectes ont donc été utilisées tel que l'évaluation d'indices de thrombogénicité et de déposition plaquettaire.

Mais comment expliquer cette différence entre les expériences animales et humaines? Probablement par la différence fondamentale entre le mode de guérison des prothèses synthétiques chez l'humain et chez les autres espèces.^{470,471} En effet, chez l'humain, il se forme une pseudo-intima composée principalement d'une couche dense de fibrine, tandis que chez l'animal, il se forme une néo-intima contenant des cellules musculaires lisses. Chez l'humain, les cellules endothéliales ne migrent pas à plus de quelques millimètres du site de l'anastomose alors que, chez l'animal, les cellules endothéliales recouvrent entièrement l'intérieur des prothèses synthétiques, plus ou moins rapidement selon les espèces.^{471,472} Ainsi, la tendance à l'endothélialisation spontanée observée chez l'animal peut expliquer, en partie, les différences observées. Bien sûr, la situation n'est pas aussi simple car, non seulement les capacités d'endothélialisation spontanée varient significativement entre les espèces animales, mais il a été démontré que l'endothélialisation spontanée chez l'humain est possible dans certains cas.⁴⁷³ Dans ce cas, il s'agirait probablement d'une endothélialisation par des cellules provenant de la circulation sanguine tel que démontré chez le chien.⁴⁷⁴ Il semble clairement, néanmoins, que ce ne soit pas la règle générale. Enfin, les différences observées entre humain et animal peuvent également provenir de la différence qui existe entre les cellules endothéliales elles-mêmes, tel que cela est observé *in vitro*. En effet, les cellules

endothéliales humaines en culture sont beaucoup plus sensibles que les cellules de la plupart des autres espèces animales, tant pour leurs exigences en facteur de croissance que pour leurs substrats de culture ou leurs densité cellulaire à l'ensemencement. Ainsi, cette sensibilité pourrait également se refléter *in vivo*.

Après 15 ans de recherche dans le domaine de l'endothélialisation des prothèses vasculaires synthétiques, l'utilisation clinique de cette technique ne paraissait donc pas fournir les avantages escomptés.¹⁰⁴ Il faut dire que, du point de vue du biologiste cellulaire, les méthodes d'ensemencement utilisées jusque là ne donnaient pas beaucoup de chances aux cellules endothéliales. En effet, les premières expériences ont été menées en une seule étape, c'est-à-dire que les cellules endothéliales ont été prélevées de la veine donneuse et ensemencées dans la prothèse au cours de la même intervention chirurgicale. Ceci implique deux choses. Premièrement, les cellules ensemencées n'ont pas été cultivées *in vitro*, donc elles ne sont pas en nombre suffisant pour assurer un endothélium confluent au moment de l'ensemencement puisque: i) le vaisseau donneur est plus court que la prothèse et ii) l'extraction cellulaire est incomplète et entraîne une mortalité importante même en utilisant une méthode enzymatique (plus douce que les méthodes mécaniques).¹⁰⁶ Deuxièmement, les cellules ensemencées n'ont qu'au plus 90 minutes pour adhérer à leur substrat. Ainsi, lorsque le flot sanguin est rétabli, les cellules endothéliales ne sont pas confluentes et n'ont pas eu le temps d'établir des liens bien organisés avec la prothèse.⁴⁷⁵

Au début des années 90, les chercheurs dans le domaine des prothèses vasculaires sont devenus beaucoup plus sensibles aux besoins des cellules vasculaires, et surtout, endothéliales. L'équipe de Zilla utilise une technique qui fournit aux cellules endothéliales plusieurs des conditions favorables à l'établissement d'un endothélium vasculaire organisé.⁴⁷⁶ En effet, les cellules endothéliales sont cultivées *in vitro* afin d'en obtenir un nombre suffisant pour ensemenecer la prothèse synthétique à une forte densité cellulaire.

De plus, la prothèse utilisée est traitée avec une colle biologique qui fournit un substrat naturel aux cellules endothéliales. Enfin, les cellules sont cultivées dans la prothèse pendant environ 10 jours afin de permettre la confluence, une adhésion complète et l'organisation du cytosquelette cellulaire.¹⁰⁸ Cette méthodologie a produit de très bons résultats lors des essais cliniques avec des taux de perméabilité à 3 ans en position femoropoplitée de 85%, dans le cas de prothèses ensemencées de 6 mM, versus 55% dans le cas de prothèses non traitées.⁴⁷⁷ De plus cette technique a permis d'établir un endothélium confluent *in vivo* dans le cas d'un greffon synthétique mesosystémique en «H».⁴⁷⁸ Un autre groupe, utilisant une technique semblable, a également obtenu des résultats positifs chez l'humain, au niveau de la jambe.⁴⁷⁹ Ainsi, il semble que l'endothélialisation des prothèses synthétiques soit sur la bonne voie.

En terminant cette section, mentionnons que certains aspects de l'endothélialisation peuvent être optimisés afin d'augmenter les performances de cette technique. Par exemple, il semblerait logique, qu'au cours de la période de culture, un pré-conditionnement des cellules endothéliales, à l'aide de forces de cisaillement («shear stress»), puisse augmenter leur résistance au flot lors du rétablissement de la circulation sanguine. En effet, cette approche semble donner de bons résultats *in vitro*.⁴⁸⁰ Par ailleurs, il semble évident que la réaction inflammatoire qu'entraînent les biomatériaux et le traumatisme de la greffe nuit à la persistance des cellules endothéliales *in vivo*.⁴⁸¹ Ainsi, il serait peut-être intéressant d'utiliser une forme d'immunosuppression transitoire afin de favoriser la survie de l'endothélium.

1.5.4 Prothèses partiellement biologiques

1.5.4.1 Tissus xénogéniques et allogéniques

Lors de l'obstruction d'une artère de faible diamètre, le chirurgien greffe préférentiellement une veine ou une artère autologue, surtout si le pontage se situe en dessous du genou.⁴⁸²⁻⁴⁸⁴ En absence de vaisseaux autologues greffables, l'implantation d'une prothèse synthétique est obligatoire, même si sa perméabilité est faible dans des situations de flot réduit et de pression élevée.¹⁷⁻¹⁹ Afin d'offrir une alternative à l'implantation d'une prothèse synthétique de faible diamètre, plusieurs équipes se sont tournées vers l'utilisation possible de vaisseaux humains allogéniques ainsi que de vaisseaux animaux (xénogéniques).

Les premières tentatives d'utilisation, chez l'animal, de vaisseaux humains non traités (xénogreffes), tel que la veine ombilicale, se sont soldées par un échec attribuable à un rejet qui entraîne la thrombose ou la formation d'anévrismes.⁴⁸⁵ Aussi, diverses méthodes de fixation ont été développées afin de réduire l'immunogénicité des xénogreffes vasculaires. La plupart d'entre elles visent à détruire les protéines membranaires cellulaires, responsables du rejet, par le biais d'un agent polymérisateur puissant tel que les aldéhydes ou les époxy.⁴⁸⁶ Cependant, la matrice extracellulaire semble également contenir un fort pouvoir immunogène puisqu'un traitement avec un détergent puissant, qui dissout toutes les structures cellulaires, ne réussit pas à empêcher le rejet de vaisseaux xénogéniques.³⁹²

L'animal est une source accessible et peu coûteuse de tissus de toutes natures. Dans le domaine vasculaire, ce sont les artères d'origine bovine qui ont été abondamment utilisées comme matériel de base pour produire des greffons vasculaires xénogéniques modifiés par polymérisation. Les premiers

essais faits avec ce type de greffe ont révélé une forte tendance au développement d'anévrismes après 2 ans d'implantation.^{487,488} Dans le but de résoudre ce problème, l'artère a été polymérisée à l'aide d'un agent plus puissant: le glutaraldéhyde plutôt que le dialdéhyde.⁴⁸⁹ Cette nouvelle fixation semble avoir donné de bons résultats car elle a diminué la susceptibilité de la prothèse à se biodégrader tout en diminuant sa thrombogénicité. Cette dernière propriété lui est probablement conférée par la charge négative que lui transmet la méthode de fixation. Cette charge correspond à celle de la paroi vasculaire normale et a déjà été identifiée comme étant un facteur important dans les phénomènes de coagulation.⁴⁹⁰

Au cours des dernières années plusieurs prothèses produites à partir de vaisseaux bovins ont été développées par diverses compagnies privées. Voici un aperçu de quelques unes de ces prothèses et des résultats préliminaires qui les caractérisent. La prothèse Bioflow, produite par Bio-Vascular Inc., est une artère thoracique interne, d'origine bovine, fixée à la dialdéhyde. Cette prothèse a présenté une forte tendance à la thrombose précoce au cours des essais *in vivo*, chez le chien, ainsi que lors des essais cliniques, en position coronarienne.⁴⁹¹⁻⁴⁹⁴ De plus, celle-ci semble rapidement montrer des signes de dilatation anévrismale, tel qu'observé dans les années 70 pour des prothèses fixées à l'aide de dialdéhyde.^{487,488,492} Ainsi, l'utilisation de cette prothèse a été conseillée dans des cas de pontages coronariens d'urgence seulement, lorsqu'aucun vaisseau autologue n'est disponible.⁴⁹⁵ Cependant, d'autres prothèses bioartificielles présentent de meilleures performances.⁴⁹²

La prothèse vasculaire Biopolymeric, produite par St.-Jude Medical Inc., est une artère carotide bovine fixée à la glutaraldéhyde et renforcée par un treillis de Dacron®. Les premiers essais cliniques chez l'humain montrent des taux de perméabilité satisfaisants, au niveau des jambes, car supérieurs à ceux obtenus avec des prothèses entièrement synthétiques.^{496,497} De plus, aucun signe de développement d'anévrisme n'a été identifié après 2 ans, chez l'humain, et

6 mois, chez le chien.^{496,498} Par contre, cette prothèse a présenté un taux d'infection relativement élevé dans un contexte clinique (6%).⁴⁹⁶ Des résultats à plus long terme, chez l'humain, sont nécessaires avant de pouvoir juger du réel potentiel de cette prothèse vasculaire de faible diamètre.

Enfin, la prothèse Denaflex, produite par Baxter Healthcare Co., est une artère bovine fixée avec des polyépoxy et à laquelle de l'héparine a été liée ioniquement à la surface luminale. L'addition d'héparine à la prothèse a diminué les dépôts de fibrinogène à sa surface tel que déterminé dans un système de circulation extracorporelle chez le chien.⁴⁹⁹ Cependant, cette diminution ne s'est pas reflétée dans l'adhésion plaquettaire. De plus, ce traitement n'a pas rendu cette prothèse moins thrombogénique que la prothèse Bioflow. Par ailleurs, une étude *in vitro* a démontré que cette prothèse active moins les éléments du complément qu'une prothèse contenant un biomatériau comme la prothèse BioPolymeric.⁴⁸⁶ Lors d'essais *in vivo*, en position coronarienne chez le chien, cette prothèse a présenté un taux de perméabilité supérieur à 6 mois, mais non significativement, à celui de la prothèse Bioflow: $44\pm 13\%$ et $12\pm 11\%$ respectivement ($P=0.56$). Parmi les greffons explantés à 6 mois ou à 1 an, les prothèses Denaflex ont présenté des signes de dégénération mineure et une surface luminale lisse, alors que la seule prothèse Bioflow perméable à 6 mois ou plus était couverte de thrombi et présentait des signes de dégradation plus avancés, ainsi que de dilatation. Ces résultats semblent très prometteurs mais il faudra attendre une étude plus vaste afin de confirmer la supériorité de cette greffe et le bien-fondé de procéder à des essais chez l'humain. De plus, des résultats positifs obtenus *in vivo* par une équipe indépendante de Baxter Healthcare Co. seraient également souhaitables.

1.5.4.2 Tissus allogéniques

Outres les tissus animaux fixés, les tissus allogéniques humains ont également stimulé la recherche dans le domaine des prothèses vasculaires. En effet, nous savons que les meilleurs taux de perméabilité de pontages fémoropoplités sont obtenus avec des autogreffes de veines saphènes.¹⁸ Mais qu'en est-il des allogreffes de veines saphènes? Les premiers essais dans le domaine ont rapidement démontré que les allogreffes artérielles, fraîches, congelées, ou lyophilisées, avaient une forte propension à l'anévrisme, tandis que les allogreffes veineuses présentaient plutôt des tendances à la thrombose.⁵⁰⁰⁻⁵⁰³ De plus, il est devenu assez évident que la compatibilité entre le donneur et le receveur est un paramètre crucial pour la réussite de greffes veineuses.^{504,505} De nos jours, nous savons que les cellules endothéliales jouent un rôle très important dans le rejet de greffe et que, même en utilisant des traitements immunosuppresseurs agressifs, les greffes vasculaires allogéniques entre individus incompatibles sont vouées à l'échec.⁵⁰⁶⁻⁵⁰⁸

L'utilisation de méthodes de conservation cryogéniques de vaisseaux allogéniques a suscité beaucoup d'espoir car elle a semblé pouvoir diminuer considérablement les réactions de rejet associées à ce type de greffon.^{509,510} Le mécanisme de ce phénomène semble reposer sur la destruction totale ou partielle des cellules endothéliales du greffon, ce qui en diminue l'antigénicité.⁵¹¹ Cependant, ceci se produit évidemment au détriment du caractère antithrombogénique du vaisseau.⁵¹² Avec les nouvelles techniques de congélation cellulaire, une certaine intégrité des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses peut être observée après décongélation.⁵¹³⁻⁵¹⁵ Par contre, il n'est pas évident que la survie cellulaire dans les greffons allogéniques soit un avantage en ce qui concerne la durabilité de ces greffons *in vivo*.⁵¹⁶ Les premiers essais cliniques chez l'humain ont donné des résultats plutôt décevants avec des taux de perméabilité de 33% à 20 mois et de moins de 50% à 10 mois.^{517,518} En 1992, De Leersnijder et collaborateurs ont présenté des résultats

cliniques à long terme de 100 greffes vasculaires en position fémorale distale.⁵¹⁹ Cette étude a démontré un excellent taux de perméabilité (42% à 7 ans) en utilisant des veines saphènes allogéniques, enlevées pour des problèmes de varices, et conservées à 4°C. Ces très bons résultats sont malheureusement associés à un taux d'anévrisme inacceptable de 12%. Par ailleurs, van Reedt Dortland et collaborateurs ont également publié les résultats à long terme de l'implantation de greffes veineuses allogéniques chez l'humain.⁵²⁰ Un très bon taux de perméabilité cumulatif de 53%, après 5 ans, a été observé pour des greffons en position fémoropoplitée et infrapoplitée. Cependant, cette bonne perméabilité s'est également vue associée à un taux d'anévrisme extrêmement élevé de 18% à 3 ans et de 58% à 5 ans. Récemment, une étude clinique limitée, et à court terme, a confirmé que les allogreffes vasculaires humaines, dans ce cas des artères congelées, présentent une forte propension à la thrombose précoce en plus d'être susceptibles aux dilatations anévrismales.⁵²¹ Pour l'instant, il semble que l'utilisation des greffons vasculaires allogéniques soient plus pertinente dans le cas de reconstructions urgentes ou temporaires plutôt que dans le cas de greffes vasculaires à long terme.^{522,523} Enfin, les performances de ces greffons allogéniques, non traités chimiquement, sont nettement améliorées par l'utilisation d'immunosuppresseurs.^{505,524,525} Ceci indique bien qu'il s'agit véritablement d'une transplantation avec toutes les considérations immunologiques et les dangers de transmission virale que cela implique.

Le cordon ombilical est certainement la source la plus importante de vaisseaux sanguins humains. Il n'est donc pas surprenant d'apprendre que la veine du cordon ombilical a été utilisée pour produire des prothèses vasculaires de faibles diamètres. Puisqu'il s'agit d'une allogreffe, l'implantation de celle-ci, sans traitements chimiques préalables, conduit à des taux d'anévrisme élevés ainsi qu'à d'autres complications.⁴⁸⁵ Largement inspiré des travaux traitant de la fixation des vaisseaux bovins, Dardik et collaborateurs ont produit une prothèse vasculaire en polymérisant la veine ombilicale avec du glutaraldéhyde.⁵²⁶ Cette prothèse a également été renforcée d'un treillis extérieur

de polyester. Diverses études ont confirmé que cette bioprothèse était mécaniquement résistante et stable, *in vitro*, tout en étant immunologiquement peu réactive.⁵²⁷ Vers la fin des années 80, Dardik et collaborateurs publient de très bons résultats cliniques à long terme de reconstructions vasculaires distales dans les extrémités inférieures.^{527,528} Par exemple, les auteurs ont observé des taux de perméabilité de 50% à 6 ans pour des greffes poplitées sous le genou; des résultats tout à fait comparables à ceux obtenus avec des veines saphènes autologues.⁵²⁷ Toutefois, l'enthousiasme soulevé par ces résultats a été pondéré par des taux de dilatations et d'anévrismes très élevés, dépassants 20%, surtout après la cinquième année d'implantation.^{528,529} Par ailleurs, Guidouin et collaborateurs ont mené une étude histopathologique post-implantation attentive de ce type de greffon et ont observé des signes de dégradation, une grande fragilité et une propension à la colonisation bactérienne lors d'infections.⁵³⁰

De nos jours, la production des prothèses de veine de cordon ombilical n'est plus faite à la main. Celles-ci sont le résultat d'un protocole de préparation et de fixation très rigoureux, contrôlé par ordinateur.⁴⁸⁵ Le produit final est donc de meilleure qualité et d'une grande reproductibilité au point de vue de son épaisseur et de l'uniformité de sa surface luminale; deux caractéristiques critiquées des prothèses ombilicales antérieures.⁵³⁰ Ce sont des résultats cliniques obtenus, en partie, avec cette prothèse améliorée que Dardik et son équipe ont publiés récemment.⁵³¹ Cette étude présente un très bon taux de perméabilité de 65% à 5 ans pour des greffes poplitées, marquant ainsi une légère amélioration par rapport aux résultats publiés 10 ans plus tôt. Cette amélioration peut être le reflet des nouvelles caractéristiques de la prothèse tout autant que celui des changements survenus dans le domaine des techniques chirurgicales, du suivi des patients et des indications menant à la greffe vasculaire. Par ailleurs, les auteurs rapportent un taux d'anévrismes véritables de moins de 1% à 5 ans et insistent sur le fait que ces problèmes ont été largement exagérés dans la littérature. Ceci dit, rappelons que cette prothèse avait montré une tendance à la dilatation surtout après 5 ans.⁵²⁹ Notons également que même l'équipe de Dardik

a délaissé la prothèse ombilicale au profit de la veine saphène autologue au cours des dernières années.⁵³¹ Ainsi, malgré d'excellents résultats lors de reconstructions vasculaires distales, la prothèse ombilicale n'est plus que très peu utilisée de nos jours. En effet, les résultats à long terme nécessaires à la validation de cette prothèse, qui devraient provenir de plusieurs centres indépendants, ne seront peut-être jamais disponibles.

En conclusion, les différentes prothèses élaborées à partir de tissu naturels xéno et allogéniques souffrent, tout comme les prothèses synthétiques, d'une forte tendance à la thrombose précoce. De plus, leur nature biologique les rendent susceptibles à la biodégradation et au développement d'anévrismes; un défaut que ne présentent pas les greffons synthétiques. Cette faiblesse mécanique a été fatale à l'utilisation des prothèses bioartificielles, car cette caractéristique est très importante pour le chirurgien vasculaire. Néanmoins, ces prothèses pourraient éventuellement être utilisées sélectivement dans des cas où la durée de vie anticipée de l'implantation est courte.

1.5.4.3 Méthode de Sparks

Vers la fin des années 60, Charles Sparks présente les résultats d'une nouvelle technique particulièrement ingénieuse visant à produire une prothèse vasculaire autologue.⁵³² Cette méthode confie au plus sophistiqué des bioréacteurs le soin de produire la prothèse: le corps humain. Pour ce faire, un support tubulaire de silicone, entouré d'un treillis de Dacron®, est implanté sous la peau du patient dans le but de former un tissu collagénique vivant, intimement imbriqué dans la structure du treillis de polyester. Après une période de maturation sous-cutanée d'environ 2 mois, l'implant est explanté et le treillis de Dacron® est retiré de sur son support de silicone. Le produit final est alors taillé à ses extrémités et directement greffé. Cette prothèse est connue sous le nom de «Sparks-Mandrill». Cette approche fort astucieuse produit donc une prothèse

synthétique recouverte de tissu humain, autologue, naturel et vivant. En théorie, cette méthode peut produire un nombre illimité de vaisseaux autologues dans les cas où les veines ou artères autologues ne sont pas disponibles.

Malheureusement, les premiers résultats cliniques ont été très décevants.⁵³³ En effet, cette prothèse a montré un très fort caractère thrombogénique ce qui n'est pas surprenant si l'on considère que le collagène est un puissant agent agrégeant pour les plaquettes.⁵³⁴ De plus, ces tissus se sont également révélés sensibles à la formation d'anévrisme dès la première année d'implantation.⁵³³ Des études cliniques de plus grande ampleur et à plus long terme sont venues confirmer la tendance de cette prothèse à la thrombose précoce et à la dilatation.⁵³⁵⁻⁵³⁸ De plus, les taux de perméabilité observés se sont révélés nettement inférieurs à ceux obtenus avec des veines saphènes autologues. Ainsi, l'opinion du monde médical a été unanime et a recommandé de limiter l'utilisation de ce greffon à la greffe vasculaire d'accès pour l'hémodialyse dans des cas particuliers.⁵³⁹⁻⁵⁴¹ Ce greffon, qui était produit commercialement par Edwards Laboratories, a été retiré du marché à la fin de l'année 1976.

En 1980, l'idée de Sparks a été reprise par Ketharanathan et collaborateurs mais dans un contexte xénogénique.⁵⁴² Cette nouvelle prothèse est produite essentiellement selon le protocole de Sparks mais chez le mouton. De plus, elle est polymérisée au glutaraldéhyde pour en diminuer l'antigénicité, en augmenter sa résistance mécanique et la rendre moins thrombogénique.⁵⁴³ Cette prothèse est commercialisée sous le nom d'Omniflow. Les études menées chez l'animal montrent de bons résultats, surtout lorsque la prothèse est utilisée comme greffon veineux.^{544,545} Cependant, cette prothèse présente des signes de biodégradation limitée, après 6 mois d'implantation.⁵⁴⁴ Par contre, aucun signe d'anévrisme n'a été observé bien que cela ne soit pas révélateur puisque ces études ont été de courtes durées (3 à 6 mois). Une récente étude clinique chez l'homme rapporte un taux de perméabilité de 84% à 3 ans des reconstructions vasculaires fémoropoplitées au-dessus du genou.⁵⁴⁶ Cette étude est limitée (29

patients) et d'autres données obtenues chez l'humain seront nécessaires afin de juger de l'intérêt de cette prothèse.

Le principe avancé par Sparks était ingénieux et démontrait, particulièrement pour l'époque, un profond souci de produire une prothèse aux caractéristiques biologiques et immunologiques permettant une véritable intégration de la prothèse dans les tissus du receveur. Cependant, le caractère extrêmement thrombogénique du collagène natif a été sous-estimé et semble être trop prononcé pour permettre son utilisation en contact direct avec le sang. Si Sparks avait développé son modèle de nos jours, il aurait peut-être profité des techniques d'ensemencement de cellules endothéliales pour réduire ce problème. En ce qui concerne les problèmes d'anévrismes, l'utilisation des treillis de polyester produits actuellement aurait peut-être éliminé cette faiblesse. Dans sa forme actuelle (Omniflow), le concept de Sparks perd beaucoup de son intérêt. En effet, les avantages de cette prothèse ovine, fixée au glutaraldéhyde, par rapport à ceux des prothèses vasculaires dérivées de vaisseaux sanguins stabilisés, animaux ou humains, sont loin d'être évidents.

1.5.4.4 Weinberg et Bell

À la fin des années 70, Eugene Bell popularise la technique de production d'équivalents tissulaires à l'aide de gel de collagène (voir section 1.4.5.). Il utilise d'abord cette technique pour produire des équivalents cutanés dermo-épidermiques où des kératinocytes reposent sur un gel de collagène contenant des fibroblastes.^{398,547,548} Puis, en 1986, Weinberg et Bell présentent le premier modèle de vaisseau sanguin de forme tubulaire entièrement biologique.¹⁴ L'ingénierie tissulaire vasculaire est née! Ce vaisseau est constitué de collagène (de peau de porc ou de tendon de queue de rat), de cellules endothéliales, de cellules musculaires lisses, et de fibroblastes vasculaires bovins. Dans ce modèle, les cellules sont incluses dans des gels de collagène en cylindres

concentriques formant, de l'extérieur vers l'intérieur, des équivalents d'adventice (fibroblastes+collagène), de média (cellules musculaires lisses+collagène), et d'endothélium (cellules endothéliales).

Dans l'article où ce modèle est présenté, les auteurs démontrent avec élégance que celui-ci comporte un endothélium fonctionnel tant sur le plan sécrétoire qu'au niveau de son rôle de barrière pour les macromolécules. De plus, leur modèle ressemble à une artère de mammifère par son histologie et sa forme tridimensionnelle. Ce projet est présenté, d'abord et avant tout, comme un modèle *in vitro* de vaisseau sanguin afin de permettre diverses études en laboratoire. De ce point de vue, ce modèle constitue une imitation très poussée d'un vaisseau sanguin, ce qu'on pourrait appeler de l'angiogénèse macroscopique. Il semble également démontrer une bonne stabilité *in vitro* (aisément 36 jours en culture sur un support, mais sans endothélium), présentant l'avantage d'envisager toutes sortes d'expériences à long terme.

La résistance mécanique de ce modèle s'est avérée très faible. Néanmoins, suite à l'optimisation de la concentration de collagène, du temps de maturation et, surtout, à l'ajout de deux matrices de Dacron[®] incorporées entre la média et l'adventice ainsi qu'à l'intérieur de l'adventice, le modèle présente une pression à l'éclatement de 323 ± 31 mmHg. Cette résistance respectable n'est cependant pas suffisante pour permettre d'envisager l'implantation de ce modèle comme greffon vasculaire. La faiblesse mécanique de ce type de prothèse est certainement liée à l'organisation, ou plutôt au manque de cette dernière, de la matrice extracellulaire. En effet, il faut garder en tête que, bien que la formation d'un gel de collagène soit le résultat de l'assemblage de fibres de collagène, celles-ci sont peu nombreuses et distantes les unes des autres. De plus, elles ne sont pas assemblées en faisceaux parallèles comme c'est le cas *in vivo*. Enfin, il ne faut pas oublier que la matrice extracellulaire naturelle du vaisseau sanguin est de plus

nature complexe et qu'elle ne contient pas que du collagène mais aussi plusieurs autres molécules dont l'élastine qui y joue un rôle mécanique important.

1.5.4.5 Matsuda et collaborateurs

Depuis la fin des années 80, Takehisa Matsuda et son équipe se sont intéressés à la production d'équivalents vasculaires par ingénierie tissulaire. La technologie centrale de leurs nombreux modèles est encore celle des gels de collagène, essentiellement telle que décrite par Weinberg et Bell.^{14,549,550} Cette équipe s'est longuement penchée sur des questions concernant les techniques de production des tissus bi- et tridimensionnels *in vitro*, incluant la production de modèles d'équivalent dermo-épidermiques comme Bell l'avait fait auparavant.^{551-557,558}

Par rapport au modèle de Weinberg et Bell, Matsuda innove en s'intéressant à la composition de la matrice extracellulaire et à son influence sur l'adhésion plaquettaire et la prolifération des cellules endothéliales. En effet, il inclut une variété de glycoaminoglycane dans ces gels de collagène tel que le sulfate de dermatan, l'acide hyaluronique, le sulfate d'héparane et le sulfate de chondroïtine C.⁵⁴⁹ Cette étude montre que le sulfate de dermatane et l'acide hyaluronique augmentent la prolifération des cellules endothéliales, et diminuent l'adhésion plaquettaire, lorsqu'ils sont inclus dans les gels de collagène. Par la suite, tous les modèles produits par cette équipe seront constitués de collagène de type I et de sulfate de dermatane car ce dernier augmente également l'adhésion des cellules endothéliales lors de leur ensemencement.

Dans son approche conceptuelle, Matsuda inclut toujours une prothèse vasculaire synthétique à ses modèles afin de fournir la résistance mécanique nécessaire à l'implantation *in vivo*. La plupart de ces modèles sont constitués d'un gel tubulaire de collagène/sulfate de dermatan contenant ou non

des cellules musculaires lisses, dont la lumière est tapissée de cellules endothéliales, et qui est entouré d'une prothèse vasculaire.^{556,557,559-562} Ce modèle, lorsque soumis à des pressions pulsatiles et à des forces de cisaillement *in vitro*, présente une organisation cellulaire intéressante: les cellules endothéliales s'orientent dans le sens du flot tandis que les cellules musculaires lisses s'orientent de façon circulaire comme c'est le cas *in vivo*.⁵⁶⁰ De plus, probablement grâce à la matrice extracellulaire qui leur est fournie, les cellules endothéliales résistent aux forces de cisaillements auxquelles elles sont soumises.

Une des particularité de la recherche de l'équipe de Matsuda est qu'elle s'intéresse de façon plus spécifique au comportement des gels de collagène *in vivo*. En effet, travaillant dans un système autologue chez le chien, cette équipe a montré à maintes reprises que les cellules implantées dans des gels de collagènes, soutenus par des prothèses synthétiques, survivent très bien *in vivo*.^{224,559,563,564} Suite à l'implantation, les cellules musculaires lisses se sont orientées circulairement et se sont différenciées tandis que les cellules endothéliales se sont orientées dans le sens du flot sanguin et forment un endothélium confluent 2 semaines après l'implantation. De plus, ces modèles présentent de très bons taux de perméabilité (75% et 100%) pour des prothèses artérielles de faible diamètre (3 mM et 4 mM) bien que les temps d'implantations soient courts (26 et 12 semaines).^{556,558} Fait intéressant, ces résultats ont été obtenus sans l'aide de drogues antiplaquettaires ou anticoagulantes. Ceci suggère soit la présence d'un endothélium confluent et fonctionnel, soit l'efficacité du mélange collagène/sulfate de dermatane comme inhibiteur de l'adhésion plaquettaire.

Utilisant d'abord des modèles simplifiés contenant des cellules endothéliales avec ou sans cellules musculaires lisses, l'équipe de Matsuda produit finalement un modèle qui inclut aussi des fibroblastes.⁵⁶⁵ Dans ce modèle, les fibroblastes sont soit mélangés avec les cellules musculaires lisses dans le même gel de collagène, soit incorporés dans un gel qui entoure celui

contenant les cellules musculaires lisses. Dans les deux cas, une prothèse de Dacron® périphérique fournit la résistance mécanique (diamètre interne 4 mM). Douze semaines après implantation, seulement 64% des greffons sont encore perméables mais les échecs observés seraient imputables à des problèmes techniques. Néanmoins, cette étude montre des résultats très intéressants: dans le modèle où les cellules musculaires lisses et les fibroblastes sont mélangés, les cellules musculaires ont migré vers la lumière du vaisseau tandis que les fibroblastes sont retrouvés à la périphérie de celui-ci. Ceci suggère fortement qu'il existe des signaux capables de guider le remodelage *in vivo* lorsqu'un produit de l'ingénierie tissulaire est implanté. Par ailleurs, Matsuda et son équipe ont également montré dans cet article que la matrice extracellulaire implantée est complètement remodelée par l'organisme afin d'augmenter sa densité au niveau de celle observée dans les vaisseaux sanguins normaux.

Dans une étude *in vitro*, l'équipe de Matsuda a tenté de produire un modèle entièrement biologique capable de résister à des pressions physiologiques sans l'aide d'une prothèse synthétique.⁵⁶¹ En utilisant une solution de collagène presque deux fois plus concentrée, et dix fois plus de cellules musculaires lisses que Weinberg et Bell, un vaisseau a été produit dont la pression à l'éclatement atteint 110 mmHg. Malgré ce très bon résultat, ce type de résistance ne permet pas une implantation au niveau artériel mais, tout au plus, permet d'espérer une implantation veineuse comme le propose les auteurs. Récemment, un modèle composé de cellules musculaires lisses et de cellules endothéliales a été implanté au niveau de la veine cave du chien.⁵⁶⁶ Malheureusement, lorsque celui-ci n'est pas soutenu par une matrice de Dacron®, il ne résiste à la pression que quelques jours. Par contre, en présence de Dacron®, cette prothèse veineuse de 7 mM de diamètre interne présente un taux de perméabilité de 64% après 24 semaines d'implantation. La cause de l'échec des greffons n'est pas précisée mais la thrombose en est probablement l'élément responsable, étant donné le faible flot sanguin au niveau veineux. Dans cette étude, le remodelage à long terme (24 semaines) du tissu implanté a été analysé en

détail confirmant les observations rapportées dans d'autres publications de cette équipe.^{558,563,565}

En conclusion, ces études montrent, encore une fois, que l'utilisation des gels de collagènes pour la production de vaisseaux sanguins par ingénierie tissulaire nécessite le soutien mécanique d'une prothèse synthétique. Dans ces conditions, il est possible de greffer ces prothèses biosynthétiques lors de pontages artériels ou veineux. Il est encore trop tôt pour savoir si ce type de construction fournira des avantages suffisamment importants, par rapport aux greffons purement synthétiques, pour justifier le temps et l'argent associés à ce type de greffons autologues.

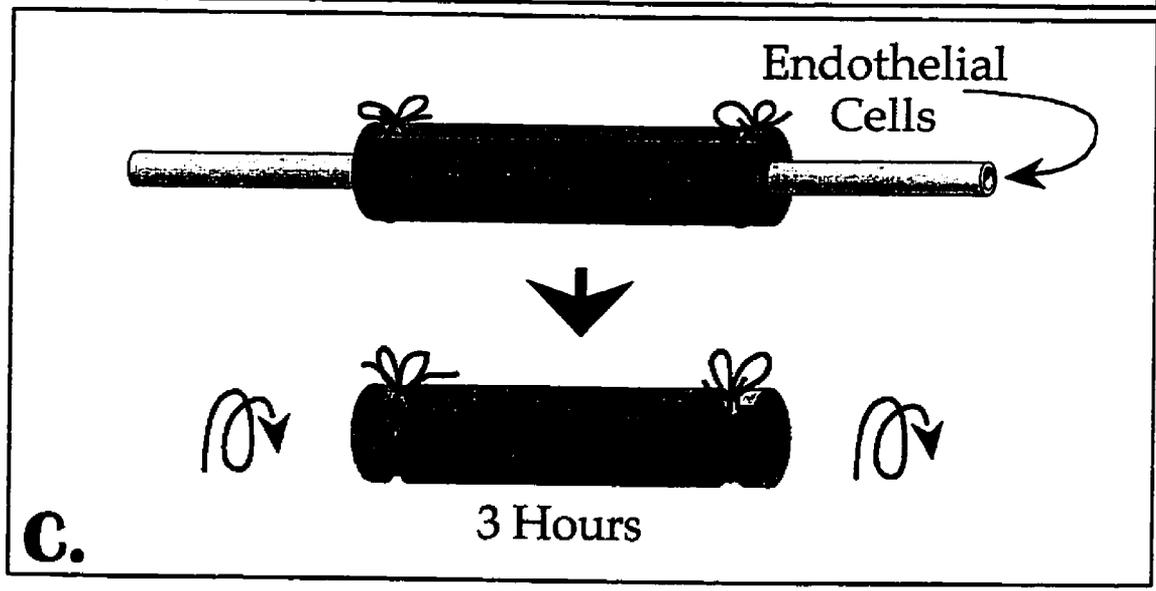
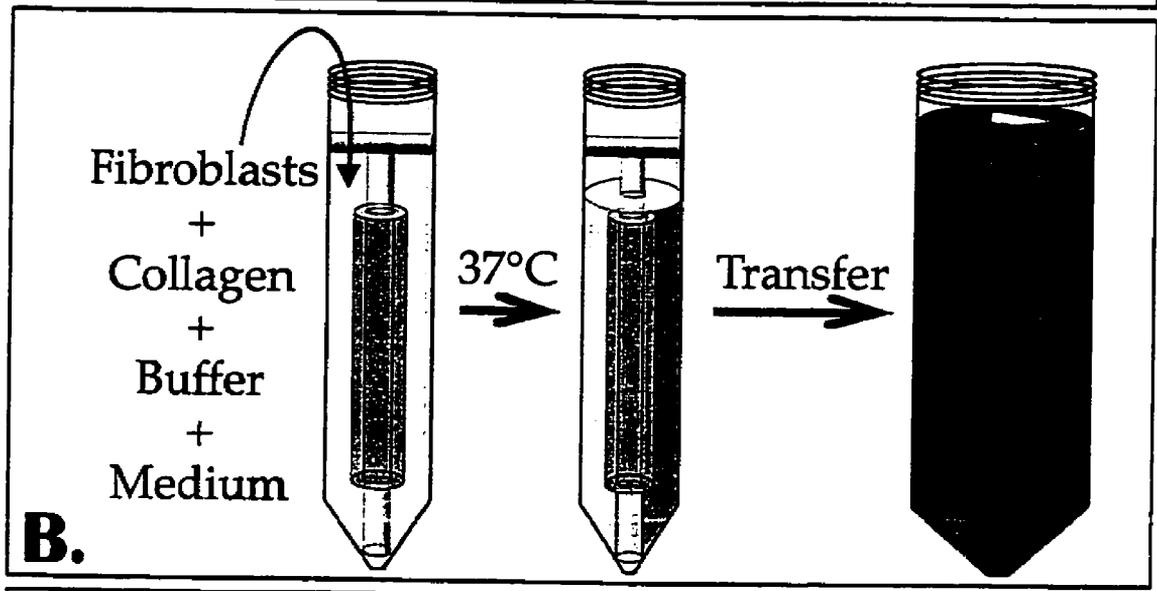
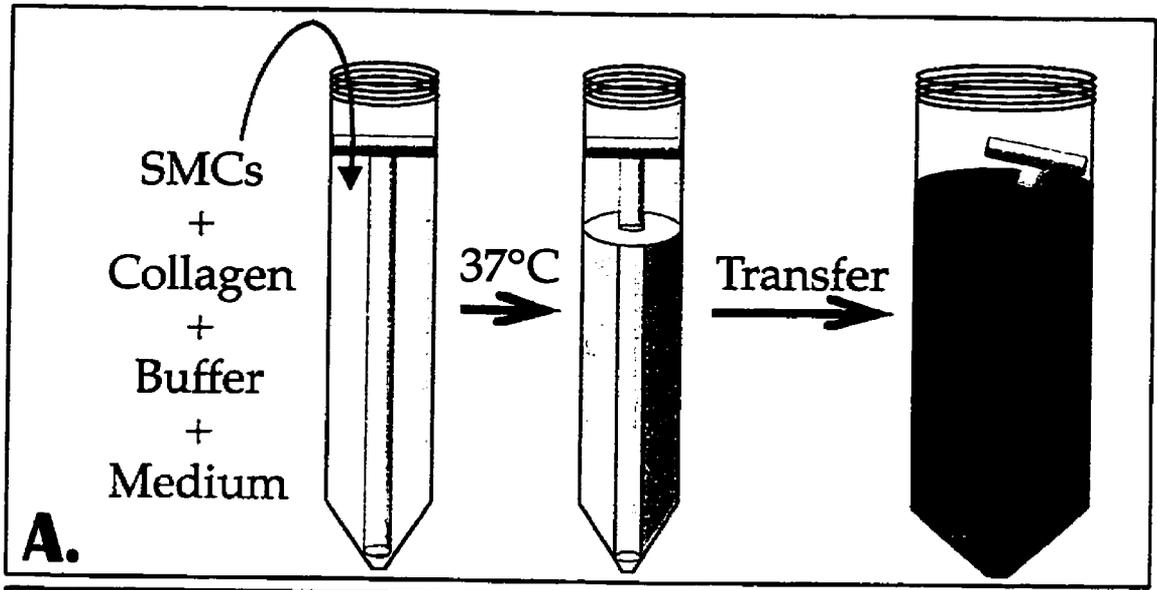
1.5.5 Prothèses entièrement biologiques

1.5.5.1 L'Heureux et collaborateurs

En 1993, notre laboratoire a publié un article présentant un équivalent vasculaire tridimensionnel entièrement humain (cellules et collagène).²¹ Inspiré du modèle de Weinberg et Bell, il a été produit grâce à la technique des gels de collagène, mais cette fois, avec du collagène placentaire humain de types I et III, normalement retrouvés dans les vaisseaux sanguins humains (figure 9).^{14,567} Le modèle contient des cellules endothéliales, musculaires lisses et des fibroblastes humains dans une organisation semblable à celle d'un vaisseau sanguin humain (figure 10). D'un point de vue histologique, ce modèle présente plusieurs caractéristiques des tissus vasculaires dont un endothélium fonctionnel et des cellules musculaires lisses orientées de façon circulaire par rapport à l'axe du vaisseau. Il s'agit là, de l'avis même de Weinberg et Bell, d'une caractéristique importante qui est absente de leur modèle.¹⁴

Du point de vue mécanique, ce modèle n'a pas montré plus de résistance que celui de Weinberg et Bell et un des buts de ce doctorat était donc d'améliorer celle-ci. L'approche utilisée a été d'inclure une matrice de collagène humain oxydé de type IV dont les propriétés de résistance mécanique sont très impressionnantes (> 500 mmHg). Ainsi, ce modèle resterait entièrement humain et exclurait tout produit synthétique contrairement à ceux de Weinberg et de Matsuda. Néanmoins, des recherches plus approfondies dans cette voie n'ont pas été nécessaires puisqu'une autre solution s'est offerte à nous et celle-ci vous sera présentée en détails au chapitre II.

Figure 9 (page suivante): Méthode de production d'un équivalent vasculaire basée sur l'utilisation de gels de collagènes. (A) La média est produite en mélangeant des cellules musculaires lisses, du collagène solubilisé dans de l'acide dilué, un tampon concentré et du milieu de culture. Cette solution est coulée dans un moule cylindrique contenant un support tubulaire en son centre. La polymérisation du mélange se produit rapidement à 37°C et le gel qui en résulte est transféré dans un récipient plus grand. Du milieu de culture est ajouté à la média nouvellement formée et celle-ci est conservée en culture pendant une semaine. (B) La média ayant contracté, il est possible de mouler un second gel de collagène autour de celle-ci en la transférant dans son moule original. L'adventice est produite de la même façon que la média mais en substituant des fibroblastes aux cellules musculaires lisses. (C) Après maturation de l'adventice, le tissu tubulaire est retiré de son support et les deux extrémités sont canulées. Des cellules endothéliales en suspension sont injectées dans la lumière du vaisseau et celui-ci est maintenu en rotation lente pendant 3 heures afin de permettre aux cellules d'adhérer au collagène.



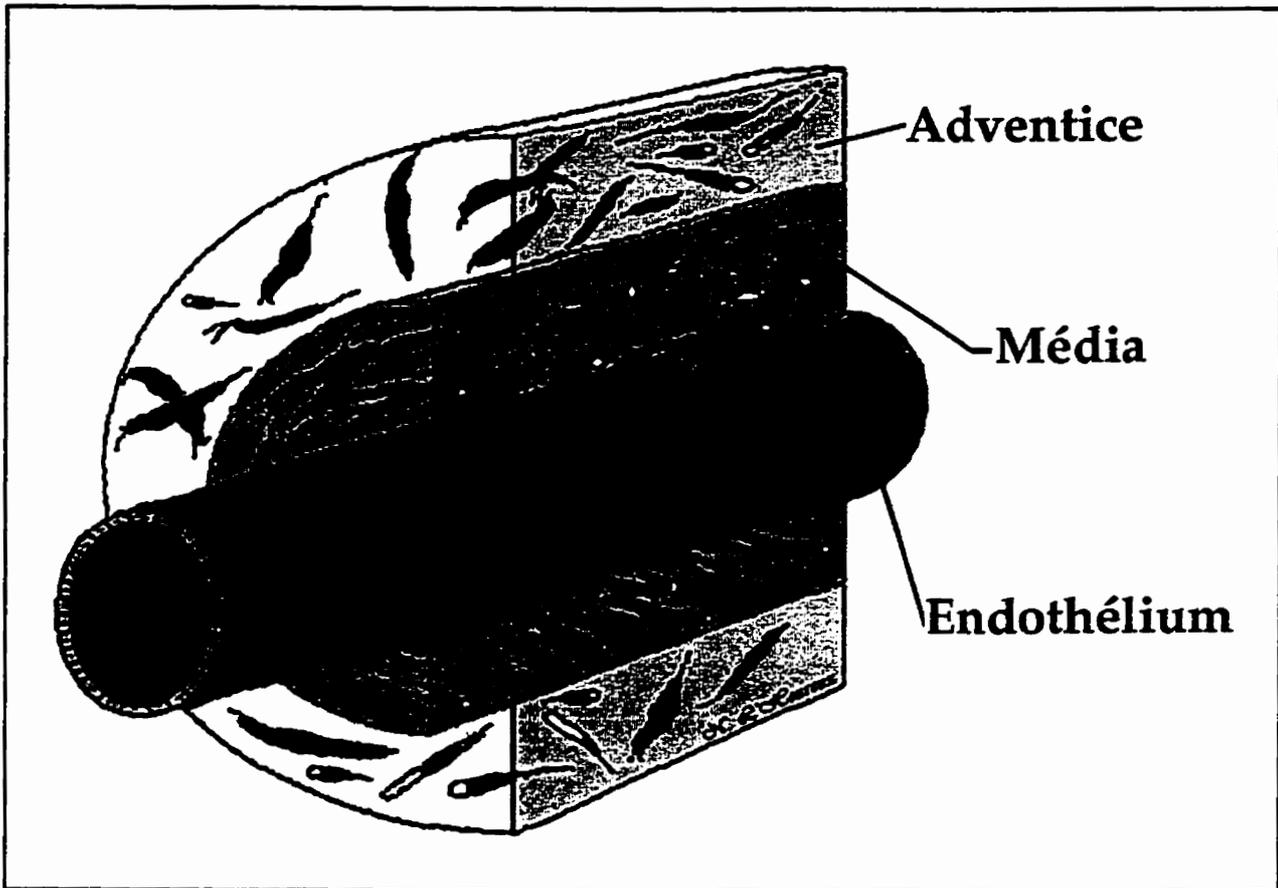


Figure 10: Représentation schématisée du premier modèle vasculaire entièrement humain produit au LAEX.

Du point de vue mécanique, ce modèle n'a pas montré plus de résistance que celui de Weinberg et Bell et un des buts de ce doctorat était donc d'améliorer celle-ci. L'approche utilisée a été d'inclure une matrice de collagène humain oxydé de type IV dont les propriétés de résistance mécanique sont très impressionnantes (> 500 mMHg). Ainsi, ce modèle resterait entièrement humain et exclurait tout produit synthétique contrairement à ceux de Weinberg et de Matsuda. Néanmoins, des recherches plus approfondies dans cette voie n'ont pas été nécessaires puisqu'une autre solution s'est offerte à nous et celle-ci vous sera présentée en détail au chapitre II.

1.5.5.2 Sous-muqueuse intestinale

En 1990, G. C. Lantz et collaborateurs publient la première d'une série d'études qui présentent les succès d'une approche originale au problème de greffons vasculaires de faible diamètre.⁵⁶⁸ Cette méthode, déjà proposée dans les années 60, relève beaucoup plus de la chirurgie que de l'ingénierie tissulaire.^{569,570} Cependant, son approche «entièrement biologique» la rend particulièrement pertinente dans le cadre de ce travail. La stratégie utilisée est la suivante: 1) une section proximale du jéjunum est prélevée, 2) différentes couches de tissu externes et internes sont enlevées par abrasion pour ne laisser que la tunique sous-muqueuse ainsi que la muqueuse musculaire et le chorion, 3) le tissu tubulaire qui en résulte est désinfecté dans de la néomycine à 10% pendant 15 minutes, 4) enfin, le diamètre du tube est ajusté en enfilant celui-ci sur une tige du diamètre désiré et en suturant longitudinalement le tissu à l'aide de fils chirurgicaux de polypropylène 6-0. Le tube ainsi produit peut être greffé comme prothèse vasculaire au cours de la même opération chirurgicale. Ce greffon est connu dans la littérature sous le nom de «small intestine submucosa» (SIS).

Cette méthode produit donc un greffon autologue vivant et qui contient deux des trois types cellulaires retrouvés dans un vaisseau sanguin (fibroblastes et cellules musculaires lisses). Elle entraîne l'utilisation d'une grande quantité de fil de suture par rapport à une autogreffe normale mais il s'agit tout de même d'une faible quantité de matériel synthétique par rapport à une prothèse artificielle. De toute façon, l'implantation de tous les greffons vasculaires implique l'utilisation de sutures artificielles non-résorbables jusqu'à ce que de nouvelles techniques permettent de s'en dispenser.⁵⁷¹⁻⁵⁷³ L'endothélialisation du greffon est observée en 4 semaines, avec l'apparition d'une néointima contenant de nombreuses cellules musculaires lisses.⁵⁷⁴ Le greffon se caractérise également par une très bonne intégration dans les tissus environnants, si bien qu'il devient impossible de le distinguer du tissu conjonctif après 8 semaines.⁵⁶⁸

Au cours d'une première évaluation faite chez le chien, ce type de greffon a donné de très bons résultats avec un taux de perméabilité de 75% après environ 1.5 années (diamètre interne de 4.3 mM) dans des positions artérielles.⁵⁶⁸ Ce résultat a été obtenu à l'aide d'un traitement anticoagulant soutenu au cours des 8 premières semaines. Des dilatations anévrismales ont été observées dans 11% des cas tandis que 5.5% des greffons ont éclaté. Comme nous l'avons vu plus tôt, ceci reflète bien le type de complication rencontré lors de l'utilisation des greffons biologiques. Cependant, une étude subséquente, chez le chien toujours, montre que ces greffons présentent un taux de perméabilité de 89%, dans une position veineuse, sans signes apparents d'anévrismes.⁵⁷⁵ Ce meilleur comportement a été attribué à la faible pression sanguine veineuse et à l'absence de pulsation.

Dans une autre étude, la même technique a été utilisée mais avec la muqueuse intestinale de porc au lieu de celle de chien. Cette fois, il s'agit donc de greffons xenogéniques dont les cellules sont probablement mortes puisque les «vaisseaux» ont été conservés dans de la néomycine 10% à 4°C jusqu'à 5 jours. Ceci dit, ces SIS porcins montrent un taux de perméabilité de 83% après 180 jours, en position artérielle, se comparant donc avec le taux de 87.5% obtenu avec des veines saphènes comme contrôle.⁵⁷⁶ De plus, les SIS ont semblé guérir de façon comparable aux veines saphènes. Dans une étude récente, ces SIS ont présenté un taux de perméabilité de 87% après 180 jours, en position artérielle, par rapport à un taux de 25 % pour des greffons de ePTFE servant de contrôles.⁵⁷⁴ Contrairement aux SIS canins, aucune rupture ou signes d'anévrismes n'ont été mentionnés dans ces deux études utilisant les SIS porcins. De plus, selon les auteurs, les SIS xenogéniques n'ont jamais créé de réactions immunes menant à un rejet. Cependant, aucune étude n'a spécifiquement analysé cet aspect de la question.

Une inquiétude vient immédiatement à l'esprit lorsque l'utilisation d'un greffon intestinal en position vasculaire est envisagée: le danger

d'infection. Il est surprenant de constater, qu'au contraire, les SIS sont plus résistantes à l'infection que les prothèses de ePTFE lorsque mises au défi par l'application de *Staphylococcus aureus* autour du greffon.^{577,578} Ceci correspond bien avec les études qui montrent que les vaisseaux naturels, ou même les prothèses synthétiques endothélialisées, sont moins susceptibles aux infections bactériennes que les prothèses synthétiques seules.^{23,24,579}

Ainsi, le SIS semble être une prothèse vasculaire très intéressante pour ses qualités de guérison, de résistance à l'infection, d'intégration aux tissus environnants et de comportement mécanique. Toutes ces qualités sont liées à sa nature entièrement biologique, en particulier la dernière. En effet, la matrice extracellulaire présente des qualités élastiques et est facilement remodelée par l'organisme.^{580,581} Néanmoins, il n'est pas possible de produire des SIS ayant de bonnes qualités mécaniques à partir de tissus ovins, équins, caprins, bovins ou, malheureusement, humains.⁵⁷⁷ Ainsi, d'éventuels SIS pour une utilisation clinique chez l'humain devraient consister en des xénogreffes animales. Ceci soulève certaines inquiétudes en ce qui concerne les possibilités de transmission d'infections virales et les potentielles réactions immunes, surtout lors d'une seconde greffe. Afin de mettre fin à ces craintes, des méthodes de stérilisation variées peuvent être envisagées mais les traitements drastiques qu'elles entraînent nuiraient probablement beaucoup aux performances des SIS comme prothèses vasculaires de faibles diamètres.

Des résultats à long terme chez l'animal (3 à 5 ans) sont nécessaires afin de prouver que ce greffon ne présente pas de prédispositions à l'anévrisme comme c'est le cas pour les autres prothèses à caractère biologique. Ensuite, des études cliniques devront démontrer que ces greffons xénogéniques porcins, non endothélialisés et non stabilisés chimiquement, guérissent aussi bien chez l'humain que chez le chien.

1.6 Présentation du corps de la thèse

Le chapitre II présente l'article principal de la thèse. Il décrit une nouvelle technique d'ingénierie tissulaire qui, bien que relativement simple, permet la production de tissus ayant une résistance mécanique comparable à celle des tissus *in vivo*. Dans ce chapitre, cette méthode est appliquée à la production d'un vaisseau sanguin. Le modèle ainsi produit présente une organisation cellulaire et tissulaire remarquablement similaire à celles d'une artère humaine. De plus, cette artère néo-synthétisée ne contient que des cellules humaines (endothéliales, musculaires lisses et fibroblastes) qui ont elles-mêmes synthétisé la matrice extracellulaire qui les entoure. Ainsi, aucun matériau exogène, biologique ou synthétique, n'est incorporé dans ce vaisseau. Malgré cela, celui-ci résiste à des pressions hydrauliques qui dépassent même celles auxquelles une veine saphène humaine peut résister. Enfin, ce vaisseau présente d'autres caractéristiques qui ont permis d'utiliser celui-ci comme greffon vasculaire chez le chien.

Dans les chapitres III et IV, la partie centrale du modèle vasculaire, la média, est utilisée comme modèle pharmacologique *in vitro*. En effet, cette nouvelle technique d'ingénierie tissulaire permet de produire un tissu cylindrique contenant des cellules musculaires lisses humaines cultivées qui contractent en réponse à des agonistes vasoactifs. Cette média reconstruite contractile est le seul modèle connu qui permet d'observer des cellules musculaires lisses humaines cultivées contractiles. Dans le chapitre III, celle-ci est utilisée, comme le serait un vaisseau animal ou humain, dans des études de contraction en bains d'organe isolé. Afin de démontrer que ce nouveau modèle peut être utilisé comme outil pharmacologique dans divers domaines, plusieurs aspects de la question ont été abordés. Cependant une analyse plus détaillée des récepteurs purinergiques a été réalisée. Au chapitre IV, une étude des flux calciques en réponse à diverses stimulations est présentée. Celle-ci démontre que

les médias reconstruites peuvent également être utilisées pour mener des études sur les aspects plus fondamentaux de la contraction des cellules musculaires lisses.

Le chapitre V montre comment cette nouvelle technique d'ingénierie tissulaire peut également être appliquée à la construction d'un autre organe. En effet, la technique ayant servi à la production de l'adventice vasculaire sera mise à profit pour produire le derme d'un équivalent cutané. Celui-ci présente une organisation histologique et une résistance mécanique qui en font un très bon modèle pour étudier la perméabilité trans-cutanée *in vitro*.

Ainsi, la nouvelle technique présentée dans cette thèse a été découverte au cours de recherches dans le domaine des prothèses vasculaires mais aura aussi donné naissance à un nouveau modèle pharmacologique vasculaire et cutané. Les mérites et faiblesses de ces modèles seront discutés au chapitre VI.

Enfin, l'annexe 1 présente le brevet américain protégeant le modèle pharmacologique utilisé aux chapitres III et IV. Dans un monde où la recherche doit se fier davantage à l'entreprenaria pour assurer son support financier, la production d'un brevet revêt une grande importance. Ce chapitre permet de voir comment une découverte de nature biotechnologique peut être protégée au point de vue légal. Ce type d'expertise devient de plus en plus utile pour les étudiants, en tant que futurs professionnels de la recherche, ainsi que pour les chercheurs en tant que futures entrepreneurs.

Chapitre II

2. Article: «A Tissue Engineered Human Blood Vessel»

2.1 Résumé

Depuis toujours, les biomatériaux synthétiques ont fourni le support mécanique nécessaire aux organes produits par ingénierie tissulaire qui devront affronter des contraintes physiques importantes *in vivo* comme, par exemple, dans le cas des vaisseaux sanguins. Dans cette thèse, nous présentons une nouvelle méthode qui permet de produire un vaisseau sanguin humain en utilisant exclusivement des cellules humaines cultivées (aucun matériau exogènes synthétiques ou biologiques). Il s'agit du premier vaisseau sanguin entièrement biologique produit par ingénierie tissulaire qui possède une pression à l'éclatement supérieure à celle de veines humaines. De plus, son endothélium a inhibé l'adhésion plaquettaire, sa média était contractile, tandis que sa maniabilité et sa suturabilité ont permis une implantation préliminaire *in vivo*. Ainsi, ce vaisseau sanguin, entièrement biologique et humain, a présenté les qualités d'une prothèse vasculaire et d'un modèle d'étude *in vitro*. Par ailleurs, cette nouvelle technologie a également été utilisée pour produire un nouvel équivalent cutané.

2.2 Abstract

Until now, mechanically challenged tissue engineered organs, such as blood vessels, always had to rely on synthetic materials for structural support. In this report, we present a new approach which allowed the production of a tissue engineered blood vessel (TEBV) exclusively from human cells without any synthetic or exogenous biomaterials. This is the first biological TEBV to display a burst strength comparable to that of human veins. Furthermore, its endothelium strongly inhibited platelet adhesion, and short-term animal studies revealed good handling and suturability characteristics. Thus, this completely biological and human TEBV displayed the fundamental qualities of a vascular graft.

AUTHORS: Nicolas L'Heureux, Stéphanie Pâquet, Raymond Labbé, Lucie Germain and François A. Auger.

AFFILIATION: Laboratoire d'Angiogenèse Expérimentale/LOEX, Hôpital du Saint-Sacrement and Department of Surgery, Faculty of Medicine, Laval University

2.3 Introduction

Synthetic small diameter vascular grafts (inside diameter ≤ 5 mM) have shown disappointing patency rates particularly in locations like the lower leg where low blood flow and high resistance increase platelet/biomaterial interaction time resulting in higher risks of thrombus formation.¹⁻³ In order to enhance patency, many groups have developed approaches to "cellularize" synthetic vascular grafts by seeding them with cells of various origins, mostly endothelial, in hopes of rapid endothelialisation of the lumen and decreased blood/biomaterial interactions.⁴⁻⁷ Our group has taken this approach one step further by developing a novel tissue engineering technique which eliminates completely the need for synthetic biomaterial in a new kind of TEBV.

A decade ago, Weinberg and Bell broke new grounds when they produced the first completely biological TEBV, using animal collagen gels and bovine cultured vascular cells.⁸ Unfortunately, this model failed to display significant mechanical strength and ultimately had to be reinforced with Dacron® meshes. Recently, using similar techniques, our group and others have respectively developed human and canine completely biological TEBV but have encountered the same mechanical limitations.^{9, 10} These projects paved the way to the idea of using such constructs as small diameter vascular grafts. Indeed, a completely biological TEBV should have numerous theoretical advantages. First, a living graft means a responsive and self-renewing tissue with an inherent healing potential. Second, its biological matrix can be remodeled by the body according to the needs of the environment. And third, the absence of synthetic material will avoid foreign body reaction, allow complete graft integration, limit graft infection and may result in increased overall patency rates.¹¹⁻¹³

In this report, we present a new type of TEBV produced exclusively from human cells, without synthetic or exogenous biological material, and, for the first time, featuring remarkable mechanical strength. Our method takes advantage of the abundant synthesis of extracellular matrix by smooth muscle cells (SMC) and fibroblasts when cultured *in vitro* in the presence of ascorbic acid. On a microscale, these cells recreate a physiological environment by secreting and organizing an extracellular matrix with characteristics similar to that observed *in vivo*.^{14, 15} We assembled these microstructures into macrostructures *in vitro* to produce engineered tissues featuring important mechanical strength and complex histological organization. Although proteins from naturally occurring extracellular matrix have been isolated and characterized, these can not be re-assembled *in vitro* as an extracellular matrix featuring physiological density and organization. This explains the inability of previously designed completely biological TEBV to display physiological strength.⁸⁻¹⁰

2.4 Results

2.4.1 TEBV construction and organization

After a month of culture with ascorbic acid, cells (SMC or fibroblasts) and their newly synthesized extracellular matrix, can be detached from the culture dish as a single living sheet of tissue. These sheets can be wrapped around an inert tubular support to produce a cylinder composed of concentric sheet layers. After a maturation period, the layers firmly adhered to one another forming a cohesive tubular tissue. From this simple technique, we developed a sequential approach to TEBV construction starting with an inner membrane (IM) which was a dehydrated tubular tissue made by fibroblasts. This acellular matrix was added to provide both an even surface for endothelial cell (EC) seeding and an effective barrier against SMC migration into the lumen of the vessel. The IM was

slipped around a tubular mandrel and a sheet of SMC was rolled around it to produce a vascular media. After a week of maturation in a bioreactor designed to provide simultaneously mechanical support and luminal flow of culture medium, a sheet of fibroblasts was rolled around the vascular media. After a maturation period of at least 8 weeks, the inner tubular mandrel was removed and the TEBV was either tested for mechanical strength or cannulated at both ends for luminal endothelial cell seeding.⁹

Macroscopically, the TEBV appeared as a homogeneous tubular tissue strikingly resembling a human artery (Figure 11a). Histological analysis revealed well defined tissues: intima, media and adventitia (Figure 11b). The adventitia exhibited very dense collagenous layers as well as abundant fibroblasts. In the media, SMC appeared as elongated cells with circumferential or longitudinal orientations. SMC density, although very high for an *in vitro* model, was still lower than in a normal vascular media. Interestingly, SMC did not to penetrate the dense IM although they were in contact with it for more than 8 weeks and exposed to a gradient of nutrients leading to the lumen. Metabolic labeling and immunostaining of the endothelium revealed confluent and active ECs as demonstrated by von Willebrand factor expression and acetylated low density lipoprotein (ac-LDL) uptake, two specific EC functions (Figure 11c).¹⁶⁻¹⁹ SMC stained positively for muscular markers α -smooth muscle actin (not shown) and desmin (Figure 11d).^{20, 21} Adventitial cells were negative for desmin or α -smooth muscle actin but fibroblasts expressed vimentin and synthesized high amounts of elastin assembled in small fibers which were organized in large circular arrays (Figure 11e). Immunostaining also indicated that the extracellular matrix contained type I, III and IV collagens as well as laminin, fibronectin and chondroitin sulfates (not shown).

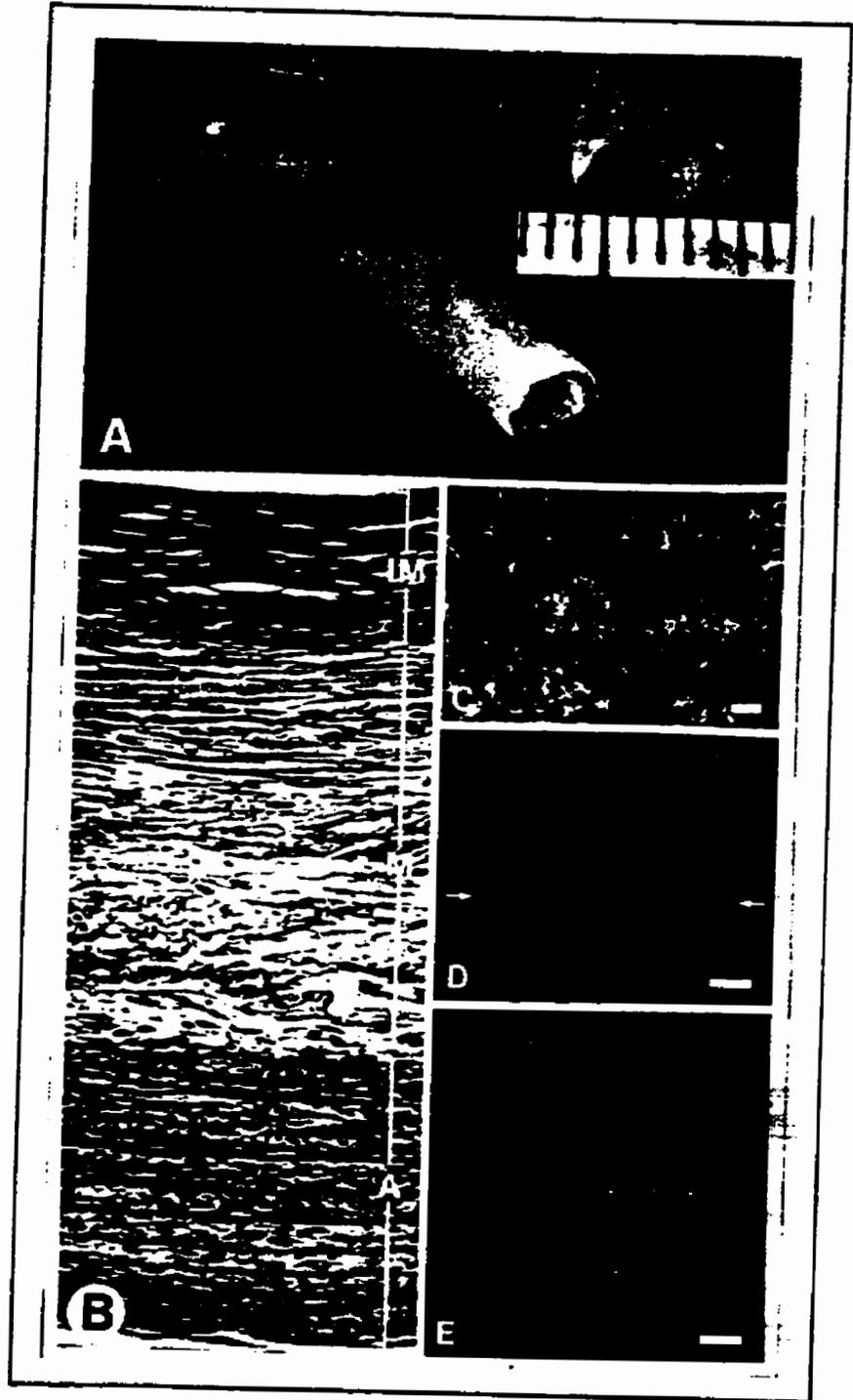
2.4.2 Mechanical strength of the TEBV

Since mechanical strength had been the weak point of previous completely biological TEBV, we first evaluated this aspect of our vessel. To maximize its burst strength, we decided to optimize the maturation time of the engineered adventitia since it was clearly stronger than the media. The burst strength of the adventitia steadily increased from the first to the 7th week of maturation, where it reached a plateau at 2232 ± 251 mmHg (Figure 12a). This plateau was maintained until at least the 12th week and some adventitia were matured for 24 weeks without significant change in strength (2382 ± 249 mmHg, $n = 5$). Consequently, TEBV were kept in culture for at least 8 weeks after the addition of the adventitia. The burst strength of the complete TEBV (2594 ± 501 mmHg) was comparable to the adventitia alone although the IM itself had a burst strength of over 1000 mmHg (Figure 12b). Most importantly, TEBV burst strength was significantly higher than that of human saphenous veins (1680 ± 307 mmHg) which are currently considered as the optimal grafts for lower limb vascular reconstruction.³

We attribute the mechanical strength of this model to the particularly well organized collagenous matrix of the adventitia (Figure 12 c). Ultrastructural analysis revealed long collagen fibrils, featuring characteristic 67 nm cross-striation periodicity, organized in closely packed bundles of parallel fibrils as it is the case *in vivo*. Fibril bundles were in proximity to parallel 10-12 nm elastin-associated microfibers and oriented in various directions which is characteristic of a mature collagen scaffold.^{22, 23} Since increased metalloproteinase synthesis by SMC or fibroblasts has been suggested to play a role in long-term stability of engineered organs *in vitro*⁸, we followed collagenase synthesis during our vessel production and maturation (Figure 12d). When cell sheets were rolled, a rapid and marked overall decrease in collagenase production was observed for both SMC (lane 1 vs 3) and fibroblasts (not shown). However, a

gelatinolytic doublet of about 50 kDa was specifically induced when fibroblasts were rolled either alone (not shown) or over SMC (lanes 2, 3, and 4). This induction subsided within 2 weeks. Long-term studies revealed stable low-level gelatinase secretion (lane 6).

Figure 11 (next page): Organization of the TEBV. (a) Macroscopic view of a mature TEBV (9 weeks of adventitial maturation). The vessel demonstrates a self-supporting aspect when taken out of culture medium (open lumen = 3 mm). Note that the various layers now form a continuous vascular wall (inset, graduation = 1 mm). (b) Paraffin cross section of the vascular wall stained with Masson's trichrome shows collagen in blue-green and cells in dark purple. Aside from an over sized internal elastic lamina (IM = 125 μ m), the histology is similar to that of a muscular artery with a large media (M = 320 μ m) and a surrounding adventitia (A = 235 μ m). (c) *En face* view of the endothelium seeded on the IM. Cytoplasmic green fluorescence reveals cell viability, metabolic activity and confluence. Red fluorescence (DiI-ac-LDL uptake) confirms cell viability and the endothelial nature of the cells. Blue fluorescence shows the characteristic von Willebrand factor expression in ECs (orange = red + green; pink = red + green + blue). Scale bar = 25 μ m. (d) Frozen cross section of the media-adventitia junction (arrows) stained for desmin (nuclei are stained blue). Scale bar = 50 μ m. (e) Frozen cross section of the adventitia double stained for elastin (green) and vimentin (red). Scale bar = 50 μ m.



2.4.3 *Hemocompatibility*

The ECs seeded on the IM covered 99.2 ± 0.7 % (n=6) of the luminal surface at a cell density of $5.4 \pm 1.1 \times 10^4$ cells/cm² (n=5) as measured by morphometric analysis. These ECs released prostacyclin, a potent inhibitor of platelet aggregation, at a basal rate of 8.6 ± 1.8 pg/10⁵ cells per 12 h (n=5), and responded to thrombin stimulation by an 2.9 ± 0.7 fold increase in synthesis as observed by others.²⁴ Heparinized human whole blood was used in a functional assay to further evaluate the blood compatibility of this endothelium. When ECs were absent, platelets adhered to the IM in small clusters whereas confluent ECs inhibited platelet adhesion by 93.2 ± 3.6 % and limited the phenomenon to single platelet adhesion in inter-cellular gaps (Figure 13).

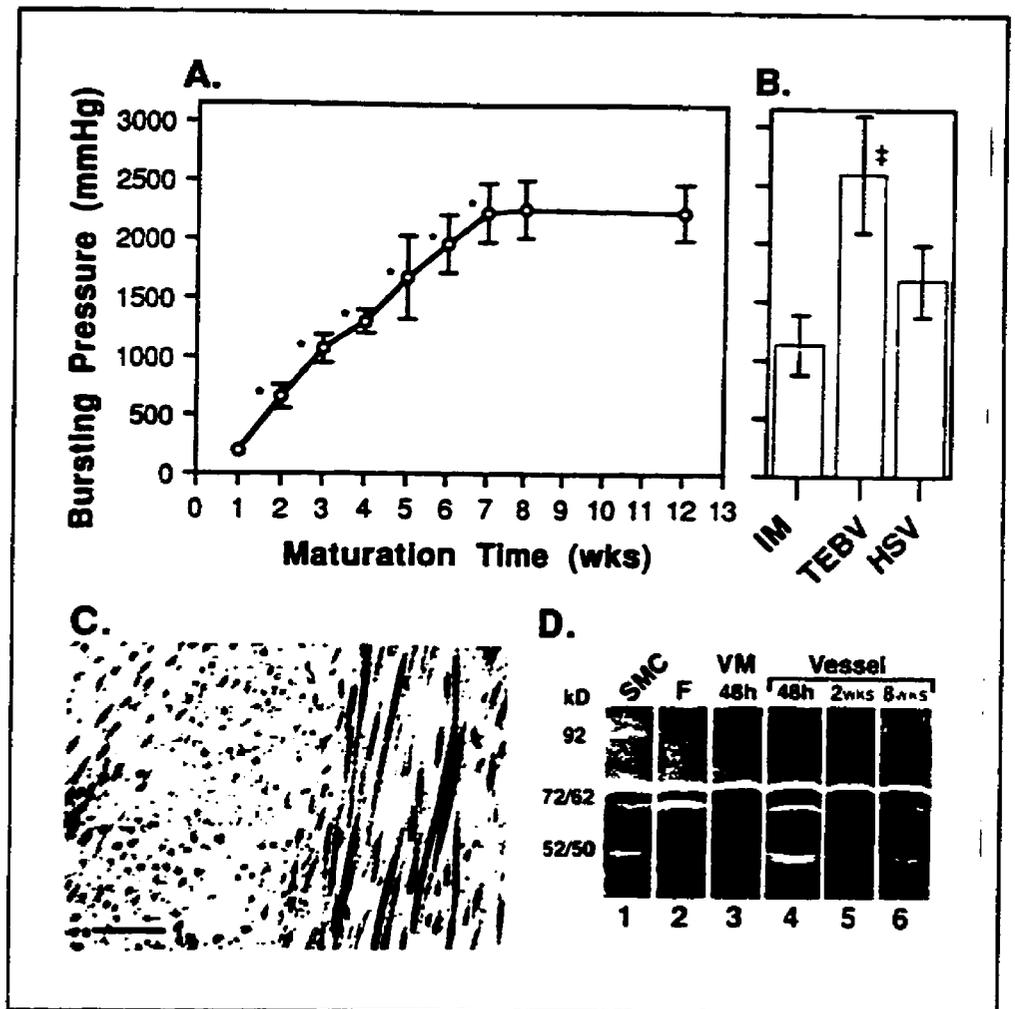


Figure 12: Mechanical strength of the TEBV. (a) Burst strength of tissue engineered adventitia as a function of maturation time. * Significantly different than preceding point ($p < 0.05$, Student t-test, $n = 8$ to 13). (b) Burst strength of rehydrated IM alone ($n = 6$), matured TEBV (9 weeks of adventitial maturation, $n = 5$) and human saphenous veins (HSV, $n = 2$). † Significantly different from HSV ($p < 0.05$ ANOVA). (c) Transmission electron micrograph of the adventitial matrix. Uranyl acetate and lead citrate stain. Scale bar = 500 nm. (d) Gelatin zymogram showing gelatinase activity in conditioned culture medium. Lanes 1 and 2: SMC and fibroblast (F) sheets prior to rolling. Lane 3: 2 days old vascular media (VM) i.e. SMC sheet rolled on a IM. Lanes 4, 5 and 6: addition of the adventitia.

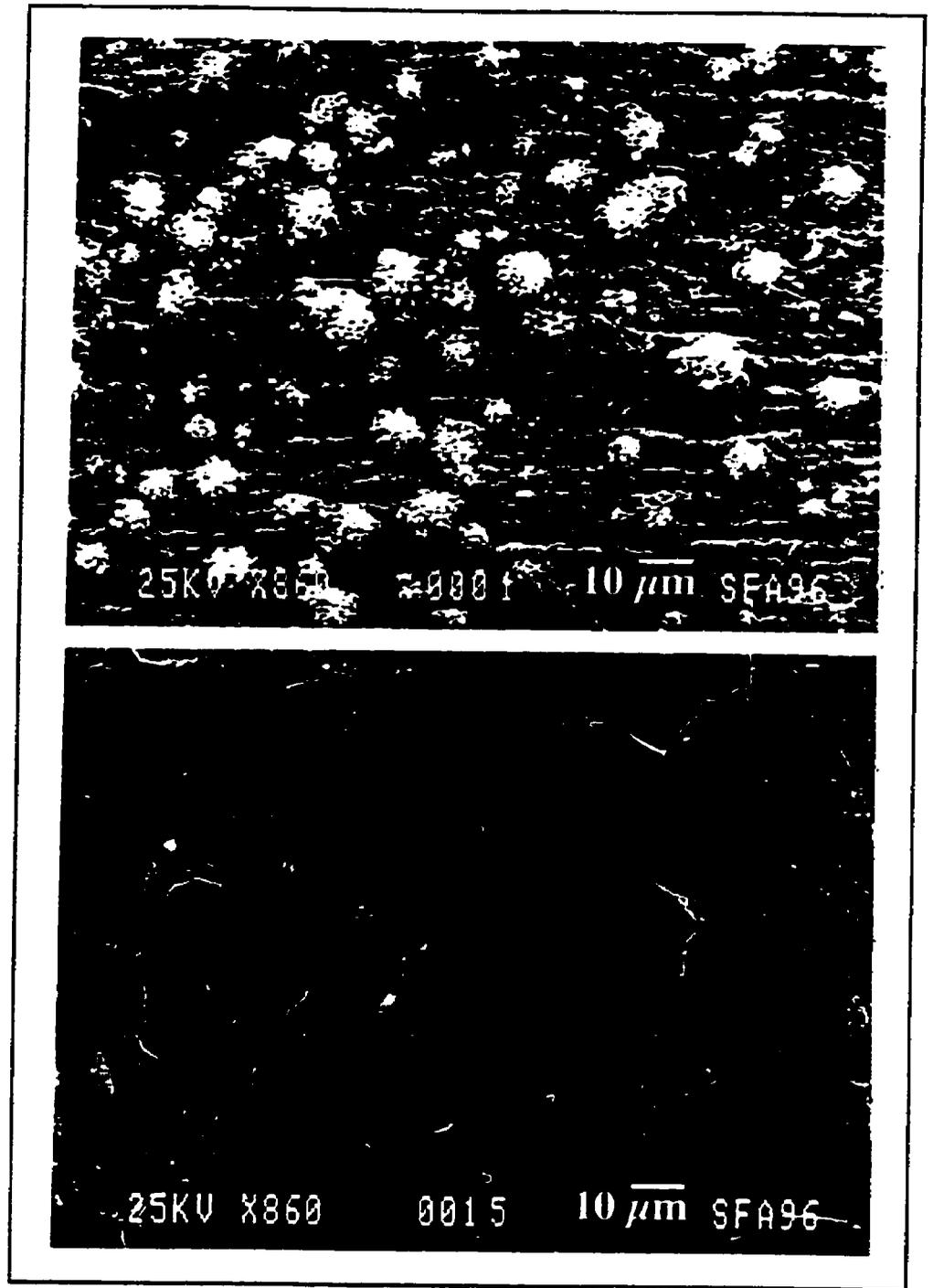


Figure 13: Inhibition of platelet adhesion by the endothelium. Scanning electron micrographs of unendothelialized IM (top) promoted platelet adhesion and activation whereas endothelialized IM (bottom) almost completely inhibited the process.

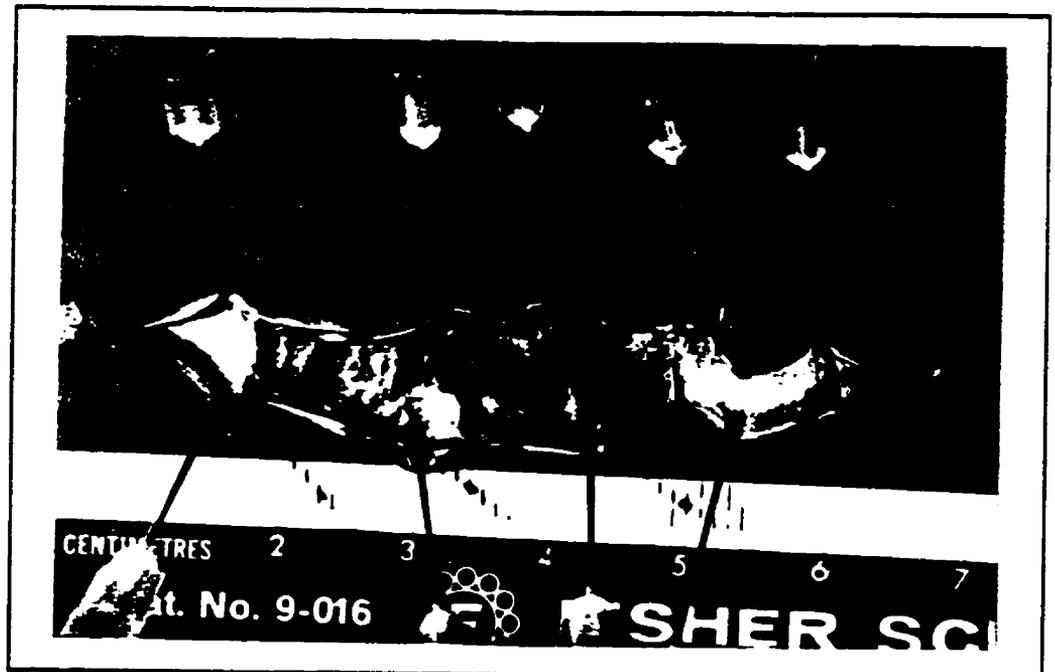
2.4.4 Grafting of the TEBV

In order to assess the *in vivo* graftability, 5 cm long unendothelialized human TEBV (inner diameter = 3 mM) were implanted, as interposition femoral grafts, in mongrel dogs. Only a short-term study was deemed feasible in a vascular xenograft setting. Suturability and handling characteristics of the graft were evaluated as "tissue-like" by an experienced vascular surgeon. When blood flow was re-established, no transmural blood loss was observed and immediate patency was confirmed by a palpable pulse and visual downstream pulsatile flow. After 7 days, graft patency was assessed by angiography and explantation (Figure 14). A patency rate of 50% (3 out of 6 grafts) was observed. Patent grafts showed a smooth thrombus-free luminal surface and did not show signs of degradation, tearing or dilatation. In all grafts, intramural blood infiltrations were observed between tissue layers but these did not correlate with decreased patency. Aside from blood infiltration, histological analysis revealed that graft architecture was retained. Graft failures occurred during the first days and were the result of occlusive thrombus formation. This problem was attributed to the surgical procedure resulting in some minor graft tissue damage at the anastomosis site.

Figure 14 (next page): Graftability of the TEBV. (a) Angiogram of the lower limbs 7 days after implantation. Two patent TEBV are visible (arrows) providing normal blood flow in both legs. (b) After angiographic examination, the TEBV was explanted along with adjacent segments of the femoral artery, gently flushed with saline, fixed in formaldehyde, longitudinally slit open and pinned down to expose the luminal surface. Limited blood infiltrations are seen inside the vessel wall. The luminal surface is free of thrombus. Anastomosis showed no signs of deterioration. Graduation = 1 mM.



(a)



(b)

2.5 Discussion

In this report, we have established the feasibility of producing a completely biological TEBV, exclusively from human cells, that met the 3 fundamental qualities expected of a vascular graft: mechanical strength, blood compatibility and suturability. Furthermore, our model closely mimics a human blood vessel from a morphological and histological point of view. A very important feature of this vessel is its complex and naturally organized extracellular matrix. This matrix may provide appropriate signals to the vascular cells, through stimulation of integrin receptors, thus directing them toward a normal physiological phenotype.^{25, 26} This may explain the expression of desmin in this model, a marker for highly differentiated SMC considered to be irreversibly lost in cultured human SMC.²⁷ Proper expression of proteolytic enzymes has also been considered an indication of cell phenotype and shown to be influenced by extracellular matrix signaling.^{28, 29} We have observed the transient induction of specific gelatinases suggesting some extracellular remodeling. However, the general long-term down regulation of gelatinase activity from SMC and fibroblasts may also be the result of the very physiological environment provided by this model. Weinberg and Bell observed that their collagen gel based model experienced an abrupt loss of strength ($\approx 50\%$) between 30 and 80 days of maturation and attributed it to an increased collagenase synthesis by SMC or fibroblasts.⁸ The long-term mechanical stability of our model is in accord with the sustained low level of collagenase activity observed. This also suggests that a cell synthesized matrix induces less collagenase expression, or is more resistant to protease activity, than biochemically extracted and reassembled matrix.

The non-synthetic nature of this vascular graft warrants hope of increased long-term patency rates for lower limb vascular reconstructions. However, animal TEBV will have to be designed in order to assess, in an autologous setting, the long-term value of this vascular graft. Indeed, the

presence of an endothelium, additional surgical experience and some design modifications will likely improve the graft patency rate. Furthermore, as it is produced from sub-cultured cells, this model may be an appealing tool for gene therapy since these cells would be in close proximity to blood and because human EC, SMC and fibroblasts can be safely transfected *in vitro* without using viruses which induce an immunogenic response.³⁰⁻³²

In conclusion, we assembled completely biological human conjunctive and muscular tubular tissues in order to construct a blood vessel. However, the shape and cell content of these tissues can be modified to create, with the same basic technique, numerous other completely biological tissue engineered organs. Not only does this new approach provide an alternative to the use of synthetic materials in tissue engineering, but it may also lead to the production of a wide range of completely biological grafts to meet the growing need for human replacement organs.

2.6 Methods

2.6.1 *TEBV production*

To produce sheets, cells were cultured in standard culture medium supplemented with 50 µg/ml of ascorbic acid in standard 75 cm² culture flasks as described in reference 9. Fibroblast sheets had to be mechanically peeled off whereas SMC sheets spontaneously detached from the dish. Five weeks of culture were found to produce fibroblast sheets with an optimal strength to culture time ratio for a given maturation period. Consequently, all adventitias or IM were produced from 35 days old sheets. Sheets were rolled on styrene or polytetrafluoroethylene cylinders and attached with surgical thread for 2 days after which time the thread was removed. IM were produced in advance from

dehydrated adventitias, stored at -20°C, and rehydrated before use. During maturation, tissues were cultured in standard medium with 50 µg/ml of ascorbic acid except for ECs which were grown a medium containing EC growth factor and heparin as described in reference 9.

2.6.2 *Histological labeling*

For EC staining, living tissues were labeled with CMFDA (5-chloromethylfluorescein-diacetate; Molecular Probes, Eugene, OR) for 2 h (10µM) and with DiI-ac-LDL (DiI = 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine chlorate; BTI, Stoughton, MA) for 3 h (7.5µg/ml) in standard culture conditions. Cells were then fixed in 4% formaldehyde, rinsed in phosphate-buffered saline, permeabilized with 0.1% saponin and stained with a mouse anti-human von Willebrand factor monoclonal antibody (Chemicon, El Segundo, CA) and a Cascade blue conjugated goat anti-mouse antibody (Molecular Probes, Eugene, OR). Green, red and blue stains were taken as separate color micrographs using appropriate filters on a Nikon epifluoroscopic microscope and digital images were overlaid as true optical colors. For medial staining, frozen cross sections were fixed in acetone, incubated with mouse anti-desmin monoclonal antibody (Sigma, St. Louis, MO) and Texas Red conjugated goat anti-mouse antibody (Molecular Probes, Eugene, OR). Nuclei were stained blue with Hoechst 33258. For adventitial staining, frozen cross sections were fixed in acetone and double stained with rabbit anti-human elastin antibody (A. Grimaud, Institut Pasteur, Lyon, France), mouse anti-vimentin monoclonal antibody (N. Marceau, Hôtel-Dieu, Québec, Canada), FITC conjugated goat anti-rabbit (Cederlane, Hornby, Canada) and Texas Red conjugated goat anti-mouse antibody.

2.6.3 *Mechanical strength*

Adventitias (inside diameter 4.5 mM) were cannulated on a specially designed system and pressurized with physiological buffer. Hydrostatic pressure was increased by 5 mmHg steps until vessel failure. Fresh HSV were diameter matched with TEBV (inside diameter 3 mM) and free of collaterals. HSV were unused segments of carefully dissected autografts from patients undergoing distal vascular reconstruction.

2.6.4 *Zymography*

Gelatinase activity was determined on 10% SDS-polyacrilamide gels copolymerized with 3.5% gelatin.³³ All mediums were conditioned for 48h and sample volumes were adjusted for total culture medium volumes.

2.6.5 *Endothelial functionality*

Prostacyclin synthesis was measured by detection of its stable degradation product 6-keto-prostaglandin F_{1α} with a radioimmunoassay kit (Amersham, UK) in culture medium conditioned by confluent ECs seeded on the IM. EC medium was perfused at a rate of 2.6 ml/h for 12 hours with or without thrombin (2 U/ml). For platelet adhesion studies, fresh heparinized human blood (14 U/ml) was slowly perfused (0.2 ml/min.) in the lumen of an IM or an endothelialized IM with an 8-roller peristaltic pump, at 37°C for 30 minutes. Lumens were gently flushed with culture medium to remove unattached platelets, fixed in 2% glutaraldehyde and processed for scanning electron microscopy (SEM). Three vessels were used in each condition. Each vessel was cut in 5 specimens. Platelets were counted in 3 random fields from each specimen.

2.6.6 *Animal studies*

ECs were omitted to avoid acute rejection. Consequently, dogs were anticoagulated with warfarin (days -1 to 7) to raise prothrombin time to 2 times the normal value. Dogs also received acetylsalicylic acid (325 mg/day on days -2 to 7) and heparin (100 U/kg on days 0 and 1). Immunosuppression was obtained with cyclosporin-A and given to maintain a blood concentration of 500 ng/ml (days -2 to 7). Anastomosis were performed using a continuous running suture of 6-0 polypropylene. Graft patency was monitored daily by Doppler signaling techniques. Animal experiments were approved by the Ethics Committee of Laval University in accordance with the guide lines of the Canadian Council on Animal Care.

2.7 Acknowledgments

We gratefully thank the Fondation des Maladies du Coeur and the Fondation de l'Hôpital du Saint-Sacrement for financial support; N. Marceau and A. Grimaud for generously providing antibodies for vimentin and elastin; R. Guidouin and S. Bourassa from the Institut des Biomatériaux de Québec for SEM; K. Baker, L. Martin, A. Pusterla and L. Vue for technical assistance; C. Marin for photographic assistance and M. Michel and F. Berthod for careful review of the manuscript.

2.8 References

1. Yeager, R.A. *et al.* Differential patency and limb salvage for polytetrafluoroethylene and autogenous saphenous vein in severe lower extremity ischaemia. *Surgery* 91, 99-103 (1982).
2. Charlesworth, P.M., Brewster, D.C., Darling, R.C., Robinson, J.G. & Hallet, J.W. The fate of polytetrafluoroethylene grafts in lower limb bypass surgery: A six year follow-up. *Br. J. Surg.* 72, 896-899 (1985).
3. Veith, F.J. *et al.* Six year prospective multicenter randomized comparison of autologous saphenous vein and expanded polytetrafluoroethylene grafts in infrainguinal arterial reconstructions. *J. Vasc. Surg.* 3, 104-114 (1986).
4. Williams, S.K., Rose, D.G. & Jarrell, B.E. Microvascular endothelial cell seeding of ePTFE vascular grafts: improved patency and stability of the cellular lining. *J. Biomed. Mat. Res.* 28, 203-212 (1994).
5. Zilla, P. *et al.* Clinical *in vitro* endothelialization of femoropopliteal bypass grafts: an actuarial follow-up over three years. *J. Vasc. Surg.* 19, 540-548 (1994).
6. Pasic, M. *et al.* Seeding with omental cells prevents late neointimal hyperplasia in small-diameter dacron grafts. *Circulation* 92, 2605-2616 (1995).
7. Noishiki, Y., Tomizawa, Y., Yamane, Y. & Matsumoto, A. Autocrine angiogenic vascular prosthesis with bone marrow transplantation. *Nature Med.* 2, 90-93 (1996).
8. Weinberg, C.B. & Bell, E. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science* 231, 397-400 (1986).
9. L'Heureux, N., Germain, L., Labbe, R. & Auger, F.A. *In vitro* construction of a human blood vessel from cultured vascular cells: a morphologic study. *J. Vasc. Surg.* 17, 499-509 (1993).
10. Hirai, J. & Matsuda, T. Venous reconstruction using hybrid vascular tissue composed of vascular cells and collagen - tissue regeneration process. *Cell Transplant.* 5, 93-105 (1996).

11. Birinyi, K.L., Douville, C., Lewis, S.A., Bjornson, H.S. & Kempczinski, R.F. Increased resistance to bacteremic graft infection after endothelial cell seeding. *Surgery* 5, 193-197 (1987).
12. Craig, W.S., Cheng, S., Mullen, D.G., Blevitt, J. & Pierschbacher, M.D. Concept and progress in the development of RGD-containing peptide pharmaceuticals. *Biopolymers* 37, 157-175 (1995).
13. Margiotta, M.S., Benton, L. & Greco, R.S. Endothelial cells adherent to expanded polytetrafluoroethylene express the intercellular adhesion molecule-1. *J. Am. Coll. Surg.* 181, 215-219 (1995).
14. Hata, R.I. *et al.* Regulation of collagen metabolism and cell growth by epidermal growth factor and ascorbate in cultured human skin fibroblasts. *Eur. J. Biochem.* 173, 261-267 (1988).
15. Grinnell, F., Fukamizu, H., Pawelek, P. & Nakagawa, S. Collagen processing, crosslinking, and fibril bundle assembly in matrix produced by fibroblasts in long-term cultures supplemented with ascorbic acid. *Exp. Cell Res.* 181, 483-491 (1989).
16. Wagner, D.D., Olmsted, J.B. & Marder, V.J. Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *J. Cell Biol.* 95, 355-360 (1982).
17. Voyta, J.C., Via, D.P., Butterfield, C.E. & Zetter, B.R. Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. *J. Cell Biol.* 99, 2034-2040 (1984).
18. Coates, A. & Tripp, E. Comparison of two fluorochromes for flow cytometric assay of cellular glutathione content in human malignant melanoma. *Melanoma Res.* 5, 107-111 (1995).
19. Poot, M., Kavanagh, T.J., Kang, H.C., Haugland, R.P. & Rabinovitch, P.S. Flow cytometric analysis of cell cycle-dependent changes in cell thiol level by combining a new laser dye with Hoechst 33342. *Cytometry* 12, 184-187 (1991).
20. Absher, M. *et al.* Characterization of vascular smooth muscle cell phenotype in long-term culture. *In vitro Cell. Dev. Biol. -Animal* 25, 183-192 (1989).

21. Skalli, O. *et al.* A monoclonal antibody against α -smooth muscle actin. a new probe for smooth muscle differentiation. *J. Cell Biol.* **103**, 2787-2796 (1986).
22. Fleischmajer, R. *et al.* Elastin-associated microfibrils (10 nm) in a three-dimensional fibroblast culture. *J. Invest. Dermatol.* **97**, 638-643 (1991).
23. Birk, D.E. & Linsenmayer, T.F. Collagen Fibril Assembly, Deposition, and Organisation into Tissue-Specific Matrices. in *Extracellular Matrix Assembly and Structure* (eds Yurchenco, P.D., Birk, D.E. & Mecham, P.R.) 91-128 (Academic Press, San Diego, 1994).
24. Haegerstrand, A., Gillis, C. & Bengtsson, L. Serial cultivation of adult human endothelium from the great saphenous vein. *J. Vasc. Surg.* **16**, 280-285 (1992).
25. Gamble, J.R. *et al.* Regulation of *in vitro* capillary tube formation by anti-integrin antibodies. *J. Cell Biol.* **121**, 931-943 (1993).
26. Yamamoto, M., Yamamoto, K. & Noumura, T. Type I collagen promotes modulation of cultured rabbit arterial smooth muscle cells from a contractile to a synthetic phenotype. *Exp. Cell Res.* **204**, 121-129 (1993).
27. Thyberg, J., Hedin, U., Sjolund, M., Palmberg, L. & Bottger, B.A. Regulation of differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells. *Arteriosclerosis* **10**, 966-990 (1990).
28. Tremble, P.M., Lane, T.F., Sage, E.H. & Werb, Z. SPARC, a secreted protein associated with morphogenesis and tissue remodeling, induces expression of metalloproteinases in fibroblasts through a novel extracellular matrix-dependent pathway. *J. Cell Biol.* **121**, 1433-1444 (1993).
29. Seltzer, J.L. *et al.* Activation of 72-kDa type IV collagenase/gelatinase by normal fibroblasts in collagen lattices is mediated by integrin receptors but is not related to lattice contraction. *Exp. Cell Res.* **213**, 365-374 (1994).
30. Xu, X.M. *et al.* Enhanced prostacyclin synthesis in endothelial cells by retrovirus-mediated transfer of prostaglandin H synthase cDNA. *J. Clin. Invest.* **91**, 1843-1849 (1993).
31. Pickering, J.G. *et al.* Liposome-mediated gene transfer into human vascular smooth muscle cells. *Circulation* **89**, 13-21 (1994).

32. Veelken, H. *et al.* Primary fibroblasts from human adults as target cells for ex vivo transfection and gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 5, 1203-1210 (1994).
33. Auger, F.A. *et al.* Skin equivalent produced with human collagen. *In vitro Cell. Dev. Biol. -Animal* 31, 432-439 (1995).

Chapitre III

3. Une média vasculaire contractile produite par ingénierie tissulaire: applications pharmacologiques

3.1 Introduction

Dans ce chapitre, nous verrons que la média vasculaire, produite selon la technique décrite au chapitre précédent, possède des capacités contractiles et peut donc être utilisée comme outil de recherche pharmacologique. Les résultats présentés dans ce chapitre, et dans le chapitre qui suit, sont le fruit d'un stage de recherche effectué au Laboratoire de Pharmacologie et de Physiopathologie Cellulaires (URA CNRS 600) de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg, sous la supervision des docteurs R. Andriantsitohaina et J.-C. Stoclet (directeur). Des résultats complémentaires ont été obtenus depuis la fin de ce stage mais, pour des raisons conjoncturelles, ceux-ci n'étaient pas disponibles au moment de la rédaction de cette thèse. Lorsque tous les résultats seront rassemblés, les deux prochains chapitres donneront lieu à deux articles.

Grâce au développement de la culture cellulaire, plusieurs études sont maintenant effectuées sur des cellules maintenues en culture plutôt que sur des organismes vivants entiers ou des organes prélevés chez ceux-ci. En effet, la culture cellulaire permet de réduire significativement le coût et la variabilité des expériences. Elle autorise également la réalisation de nouveaux types d'expériences. Cependant, les cellules en culture ont tendance à perdre certaines de leurs caractéristiques. Ce phénomène, dit de dédifférenciation, entraîne, chez les cellules musculaires lisses, la perte de leur principale fonction: le pouvoir contractile.^{208,228} Ceci est particulièrement vrai pour les cellules d'origine humaine. Ainsi, aucune condition permettant la contraction de cellules musculaires lisses humaines cultivées n'a été décrite jusqu'à ce jour. Les études de contraction *in vitro* sont donc effectuées sur des cellules d'origine animales puis leurs résultats sont extrapolés à l'humain.

Nous avons vu, à la section 1.3.2.3.2 de l'introduction générale, que plusieurs méthodes ont été utilisées afin d'évaluer la contraction des cellules

musculaires lisses cultivées *in vitro*. Nous présentons ici une média vasculaire humaine, produite par ingénierie tissulaire, qui possèdent trois avantages importants par rapport aux modèles de contraction de cellules musculaires lisses cultivées décrits jusqu'à maintenant. Premièrement, par rapport à des cellules animales, la nature humaine des cellules diminue les risques que les résultats obtenus ne puissent pas être extrapolés à l'humain. Deuxièmement, la média vasculaire peut être étudiée à l'aide d'appareils de mesure simples qui sont déjà présents dans les laboratoires de pharmacologie vasculaire classique. Troisièmement, cette méthode permet d'évaluer directement et quantitativement la contraction des cellules musculaires lisses.

Dans ce chapitre, nous verrons comment cette média vasculaire peut-être utilisée comme outil pharmacologique. Comme exemple, nous procéderons à la caractérisation classique des récepteurs à l'adénosine 5'-triphosphate (ATP) présents sur les cellules musculaires lisses. Dans le contexte vasculaire, l'ATP est un agoniste contractile physiologique des cellules musculaires lisses. Il participe au maintien du tonus musculaire de la paroi vasculaire en tant que cotransmetteur, avec la noradrénaline, lors de la stimulation nerveuse sympathique.^{582,583} De plus, l'ATP est relargué par les cellules endothéliales et musculaires lisses elles-mêmes suite à diverses stimulations et ce phénomène pourrait jouer un rôle important dans certaines pathologies (vasospasme).^{328,584} La section 1.3.2.3.3 de l'introduction générale fait la revue des concepts touchants les récepteurs purinergiques P₂ (sensibles à l'ATP). Sur les cellules musculaires lisses, deux sous types de récepteurs purinergiques P₂ ont été bien décrits: les P_{2X} et P_{2Y}.⁵⁸⁵ De plus, un troisième type de récepteur à plus récemment été découvert sur ces mêmes cellules: le P_{2U}.³²⁸ Ainsi, 3 des 5 sous-types de récepteurs purinergiques P₂ peuvent potentiellement être retrouvés sur les cellules musculaires lisses.

Outre l'étude des récepteurs purinergiques, ce chapitre présente également des résultats complémentaires sur d'autres aspects de la contractilité des médias vasculaires reconstruites. En effet, au cours des diverses expériences centrées sur la réponse à l'ATP, plusieurs autres substances ont été utilisées. Certaines ont produit des réponses normales tandis que d'autres ont donné des résultats surprenants que nous avons tenté de mieux comprendre. Enfin, ce chapitre présente également des travaux réalisés en collaboration avec le Dr F. Marceau, au Centre de Recherche de l'Hôtel-Dieu de Québec, avec l'aide précieuse d'Éric Petitclerc. Ces derniers présentent un exemple d'utilisation de ce modèle comme un outil pharmacologique dans un contexte de recherche.

3.2 Matériel et méthodes

3.2.1 *Production de la média vasculaire*

Les cellules musculaires lisses humaines ont été isolées à partir d'explants de la veine ombilicale selon la méthode de Ross.⁵⁸⁶ Elles ont été sous-cultivées dans du DME:HAM-F12 (3:1) additionné de 10% de sérum de veau foetal décomplémenté.²¹ Les cellules ont été utilisées aux cinquième ou sixième passages.

Afin de produire un feuillet de cellules musculaires lisses, les cellules ont été cultivées dans un milieu additionné de 50µg/ml d'acide ascorbique. Après une période de culture de deux à trois semaines, le feuillet cellulaire commence à se détacher spontanément de fond du flacon de culture. À ce moment, le feuillet est complètement détaché de la surface de culture, roulé autour d'un support de styrène de 4.5 mM de diamètre externe et maintenu en culture. Après une semaine de maturation, le feuillet roulé forme un tissu cylindrique assez cohérent pour permettre de découper ce cylindre en anneaux

d'approximativement 5 à 8 mM de longueur. Ces anneaux de média vasculaire sont maintenus en culture sur le support pour une période de maturation qui peut durer de 3 à 10 semaines.

3.2.2 *Analyse histologique*

L'immunofluorescence indirecte a été réalisée sur des coupes en congélation (fixation à l'acétone -20°C, 10 minutes) avec les anticorps suivants: anti- α -actine (monoclonal de souris; Sigma, St-Louis, MI), anti-collagène de type IV humain (polyclonal de lapin; Chemicon, Temecula, CA), anti-myosine spécifique des cellules musculaires lisses (monoclonal de souris; Chemicon, Temecula, CA), anti-myosine non-musculaire (polyclonal de lapin; Biomedical Technologies, Stoughton, MA), anti-desmine (monoclonal de souris; Sigma, St-Louis, MI), anti-vimentine (monoclonal de souris; N. Marceau, Centre de recherche de l'Hôtel-Dieu de Québec), anti-collagène de type I (polyclonal de lapin; Chemicon, Temecula, CA), anti-élastine (polyclonal de lapin; J.-F. Grimaud, Institut Pasteur, Lyon, France).

3.2.3 *Essais de contraction*

Les études de contraction ont été réalisées dans des bains à organe isolé standards. Les tissus ont été baignés dans du tampon de Krebs (NaCl 119 mM, KH_2PO_4 0.4 mM, NaHCO_3 14.9 mM, MgSO_4 1.17 mM, glucose 5.5 mM et CaCl_2 2.5mM) gazés par un mélange 95% O_2 : 5% CO_2 et maintenus à 37°C. Les médias cultivées ont été soumises à une tension de base de 500 à 800 mg jusqu'à ce que la tension se stabilise (\approx 1 h). Par la suite, ces médias reconstruites ont été exposées à 10^{-3} M d'ATP afin de vérifier leur capacité contractile, puis ont été abondamment rincées et, au moins une 1h30 plus tard, restimulées avec diverses

substances. Pour plus de clarté, le protocole d'utilisation des divers agonistes et antagonistes est détaillé lors de la description des résultats correspondants. À moins de précisions contraires, tous les réactifs ont été obtenus chez Sigma.

3.3 Résultats

3.3.1 Organisation des médias vasculaires

Les médias cultivées sont constituées de cellules musculaires lisses humaines incluses dans une matrice extracellulaire qui a été synthétisée par ces dernières. Les médias, dans leur état final, ne contiennent aucune matrice synthétique. Ces médias cultivées peuvent être produites en grandes quantités et maintenues sur un support tubulaire rigide jusqu'au moment de l'expérience (figure 15A). Elles sont alors retirées du support et contractent spontanément (figure 15B et C). Elles ont une apparence tissulaire et peuvent donc être manipulées comme des tissus prélevés chez l'animal ou l'humain. Elles se prêtent aussi parfaitement au montage dans les baignoires à organe isolé (figure 15D).

Du point de vue histologique, les médias présentent des couches de collagène entourant des cellules musculaires lisses très allongées et partiellement orientées circulairement autour de l'axe du support (figure 16A). Les cellules expriment, à différentes intensités, des marqueurs de différenciation spécifiques aux cellules musculaires lisses tels que les isotypes de l' α -actine et de la myosine spécifiques aux cellules musculaires lisses (figure 16B et C). De plus, les cellules musculaires lisses expriment un filament intermédiaire caractéristique de la lignée musculaire: la desmine (figure 16D). Par ailleurs, la matrice extracellulaire néo-synthétisée contient des protéines structurales retrouvées dans la média vasculaire *in vivo* tel que le collagène de type I, une composante structurale importante de la matrice extracellulaire, le collagène de type IV, un

constituant de la membrane basale des cellules musculaires lisses, et l'élastine (figure 16D, E et F).

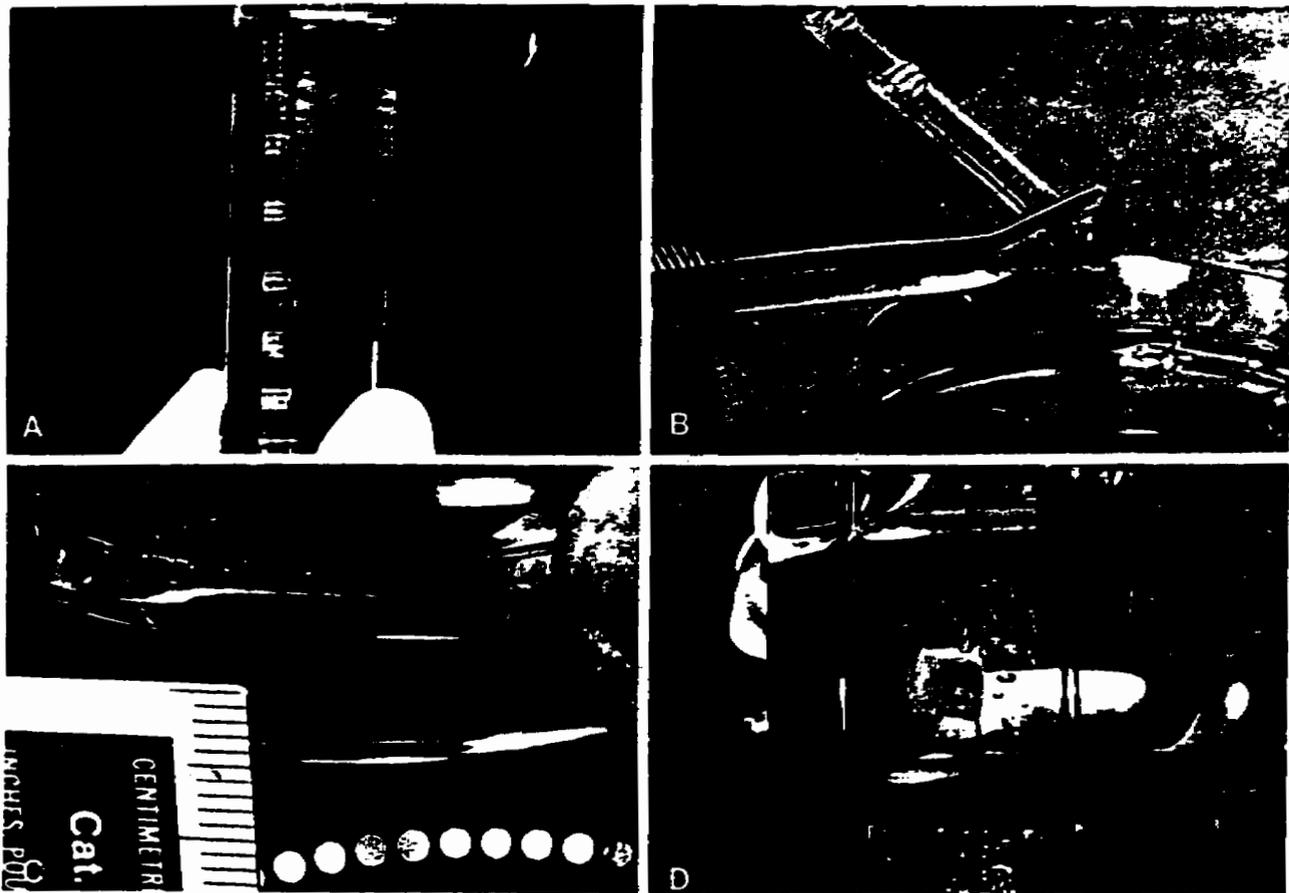


Figure 15: Aspect macroscopique de la média vasculaire cultivée. A. Culture sur support par groupes de 12 rondelles. B. Retrait facile d'une rondelle de son support. C. Contraction spontanée de la rondelle (diamètre du support 4.5 mM). D. Média cultivée dans un bain à organe isolé.

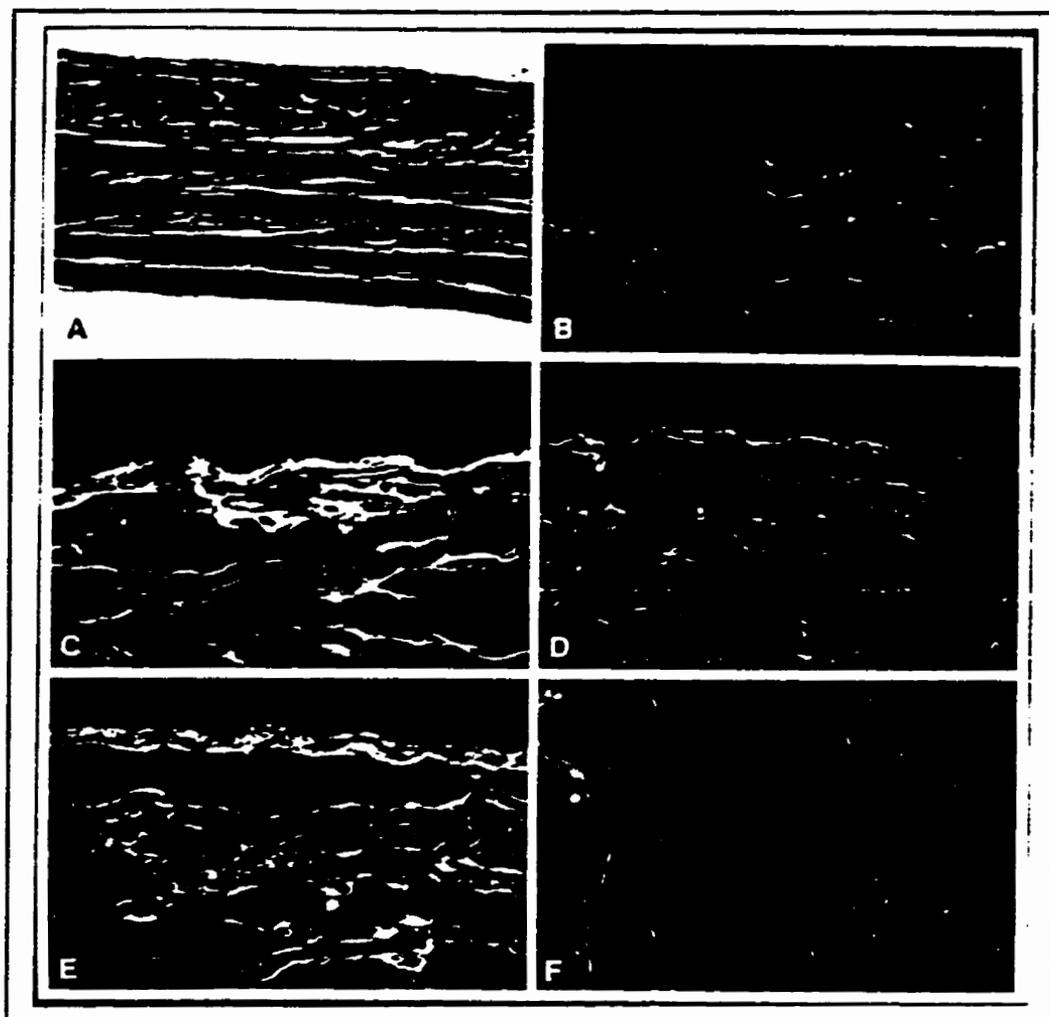


Figure 16: Caractérisation histologique et immunohistologique de la média vasculaire cultivée (5 semaines de maturation; coupes transversales).

A. Les cellules musculaires lisses (mauve) sont très allongées et intimement enchevêtrées dans une matrice collagénique (bleu) néo-synthétisée (trichrome de Masson), x225. B. Immunodétection de l'isotype de l' α -actine spécifique des cellules musculaires lisses, x115. C. Immunodétection de l'isotype de la myosine spécifique aux cellules musculaires lisses, x115. D. Immunodétection de la desmine (rouge), du collagène de type I (vert) et coloration nucléaire de Hoechst (bleu), x115. E. Immunodétection du collagène de type IV (vert) et coloration nucléaire de Hoechst (bleu), x225. F. Immunodétection de l'élastine, x225. Remarquez l'arrangement fibrillaire.

3.3.2 Récepteurs purinergiques

3.3.2.1 Réponse contractile à l'ATP

Les médias vasculaires reconstruites ont répondu à une stimulation par l'ATP par une contraction relativement rapide et très soutenue. La figure 17 présente la contraction observée lors d'une stimulation par doses successives d'ATP. Remarquez comme la contraction est maintenue à son maximum pendant plus de 15 minutes sans ajout supplémentaire d'ATP.

En absence de Ca^{2+} extracellulaire, obtenue par 3 rinçages avec un tampon de Krebs sans Ca^{2+} et contenant 0.5mM d'EGTA, la média cultivée s'est relâchée pour atteindre un plateau de tension inférieur (figure 18). Dans ces conditions, la média n'a répondu que très faiblement à une stimulation à l'ATP et la contraction produite a été transitoire. De plus, une stimulation additionnelle n'a pas permis d'augmenter, ou même de maintenir, le niveau de contraction. Enfin, la tension post-stimulation est tombé rapidement sous le niveau de base.

3.3.2.2 Récepteurs purinergiques P_{2X}

L' $\alpha\beta$ -méthylène adénosine 5'-triphosphate ($\alpha\beta$ -Met ATP) est un agoniste spécifique des récepteurs purinergiques de type P_{2X} .⁵⁸⁵ En plus de stimuler fortement ce type de récepteur, il a aussi comme effet de désensibiliser le tissu à une seconde stimulation via les récepteurs P_{2X} . Cette action est également spécifique au type P_{2X} . Certaines des médias reconstruites ont été stimulées avec 10^{-3} M d' $\alpha\beta$ -Met ATP pendant 15 à 20 minutes. Les tissus, avec ou sans $\alpha\beta$ -Met ATP, ont reçu ensuite des doses croissantes et additives d'ATP. Les résultats sont

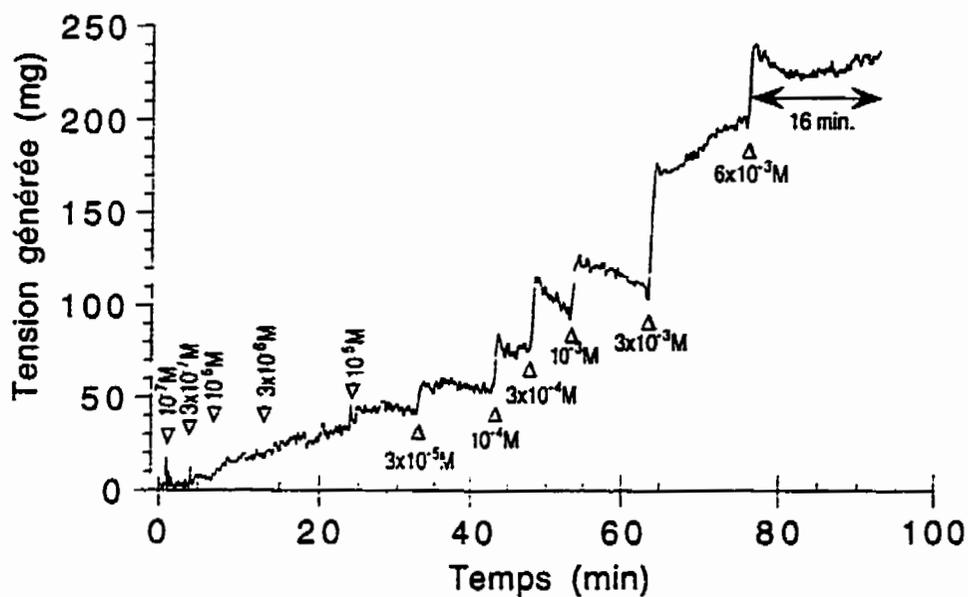


Figure 17: Réponse contractile d'une média reconstruite à l'ATP en présence de Ca^{++} extracellulaire. Un tracé de contraction représentatif de huit.

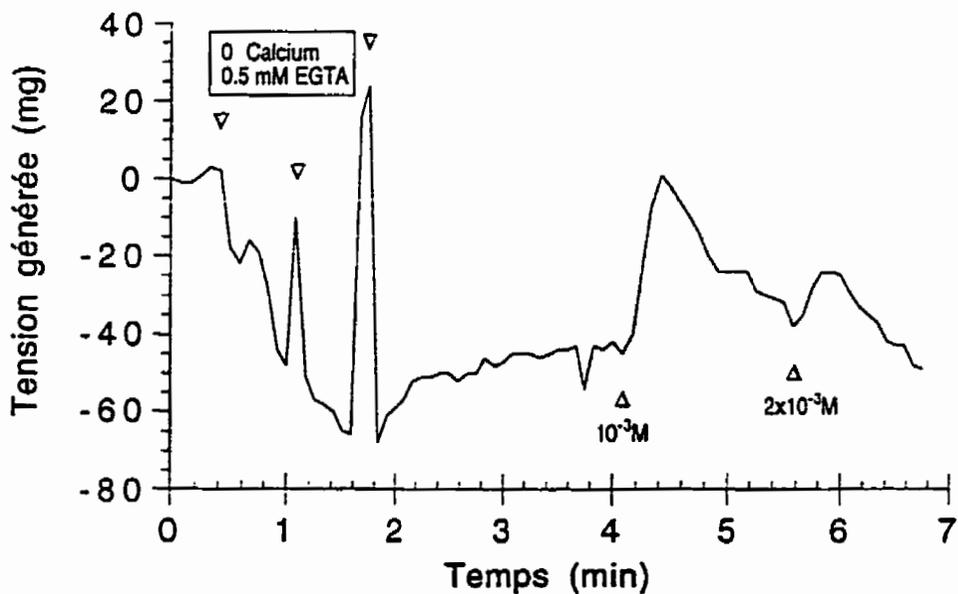


Figure 18: Réponse contractile d'une média reconstruite à l'ATP en absence de Ca^{++} extracellulaire. Un tracé de contraction représentatif de trois.

présentés sous forme de pourcentage de contraction par rapport à la contraction produite, pour chaque tissu, par 10^{-3} M d'ATP en début d'expérience. Cette façon de procéder a été choisie car elle permet de comparer les différents tissus entre eux malgré des capacités contractiles absolues qui diffèrent.

Une stimulation à l' $\alpha\beta$ -Met ATP à 10^{-3} M, une forte dose, ne cause aucune contraction des médias reconstruites ($n=10$, résultat non présenté). Par la suite, une stimulation par des doses croissantes d'ATP a produit une courbe dose-réponse qui n'a pas varié en fonction de la présence d' $\alpha\beta$ -Met ATP (figure 19). Ceci permet de conclure que la réponse contractile obtenue suite à une stimulation à l'ATP n'est pas attribuable à l'action de récepteurs purinergiques de P_{2X} .

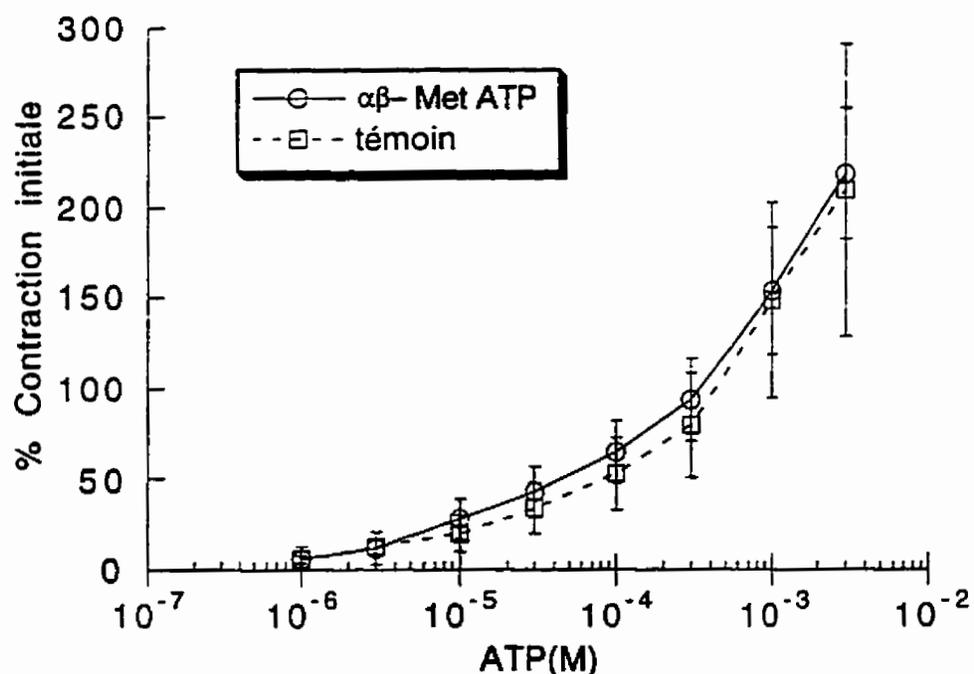


Figure 19: Effet de l' $\alpha\beta$ -Met ATP (10^{-3} M) sur la réponse contractile des médias reconstruites (moyenne de 4 expériences \pm écart-type). Courbe dose-réponse en pourcentage de la contraction initiale à l'ATP (10^{-3} M).

Le PPADS (1-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulphonic acid 4-sodium) est un inhibiteur compétitif puissant et spécifique des récepteurs purinergiques de type P_{2X} .⁵⁸⁷ Afin de confirmer les résultats obtenus avec l' $\alpha\beta$ -Met ATP, la capacité du PPADS d'inhiber la réponse contractile des médias à l'ATP a été évaluée.

Les résultats de deux expériences sont présentés aux figures 20 et 21. Dans chacun des cas, 6 tissus ont été exposés à une dose initiale d'ATP afin de vérifier leurs capacité de réponse. Ces médias reconstruites ont été abondamment rincées et, au moins 1h30 plus tard, 3 des tissus ont été mis en contact avec $60 \mu\text{M}$ de PPADS pendant 30 minutes. Ensuite, les médias, avec ou sans PPADS, ont été stimulées par des doses croissantes d'ATP. Les résultats de ces expériences sont présentés séparément car les doses initiale d'ATP n'étaient pas tout à fait identiques (2×10^{-3} et 3×10^{-3}). Ces expériences ne montrent pas d'effet inhibiteur du PPADS et même, à deux reprises, certains points témoins ont été légèrement plus bas en présence de PPADS. Ainsi, ces résultats confirment ceux obtenus avec l' $\alpha\beta$ -Met ATP, c'est-à-dire que la contraction des médias reconstruites, lorsqu'elles sont stimulées par l'ATP, n'est pas attribuable à l'action de récepteurs purinergiques de type P_{2X} .

3.3.2.3 Récepteurs purinergiques P_{2Y}

Le Cibacron Blue 3GA, mieux connu sous le nom de réactif «blue 2» (RB-2), a été utilisé comme un inhibiteur spécifique des récepteurs purinergiques de type P_{2Y} .⁵⁸⁸ Bien que ces récepteurs ne soient pas considérés comme prépondérants dans la réponse contractile des vaisseaux sanguins lors de la stimulation à l'ATP, les conditions de culture particulières auxquelles les médias reconstruites ont été soumises auraient peut-être pu accentuer l'expression de ces récepteurs.^{328,588}

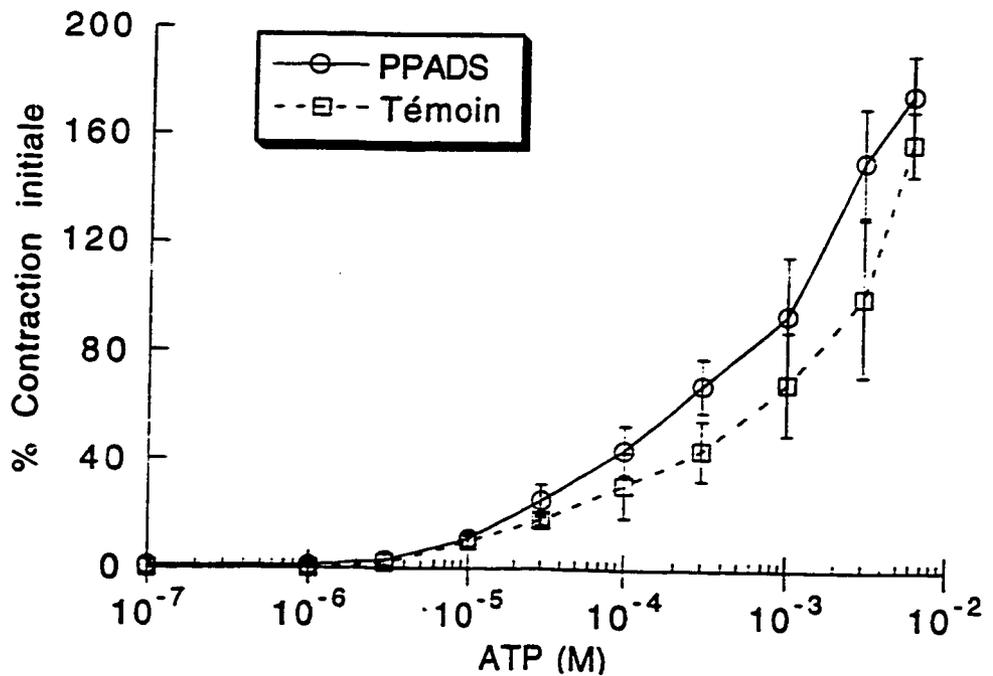


Figure 20: Effet du PPADS (0 ou 60 μ M) sur la réponse contractile des médias reconstruites . Courbe dose-réponse en pourcentage de la contraction initiale à l'ATP (2×10^{-3} M). (n=3, moyenne \pm écart-type)

Après une dose initiale de 10^{-3} M d'ATP afin de vérifier leur capacité de réponse, les médias reconstruites ont été abondamment rincées et, au moins une 1h30 plus tard, mises en contact avec le RB-2 pendant 30 minutes. Les médias, avec ou sans RB-2, reçurent ensuite des doses croissantes et additives d'ATP. Les résultats présentés ici sont le fruit de trois expériences distinctes (trois médias reconstruites différentes) totalisant 5 tissus traités au RB-2 (deux tissus ont été éliminés pour cause de réponse trop faible) et 7 tissus témoins. Ces résultats sont présentés sous forme de pourcentage de contraction par rapport à la contraction produite, pour chaque tissu, par 10^{-3} M d'ATP en début d'expérience.

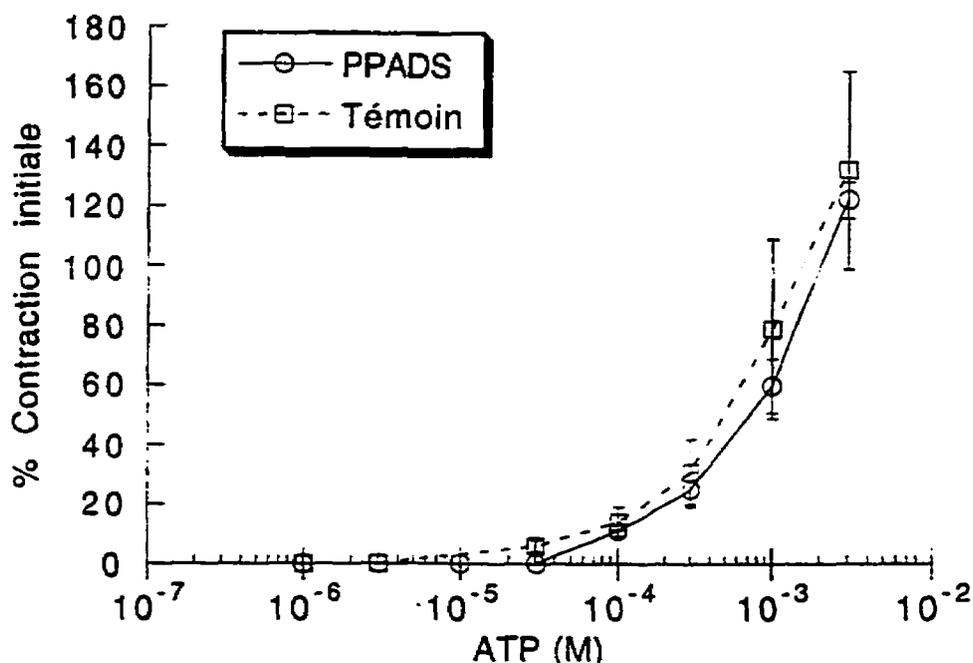


Figure 21: Effet du PPADS (0 ou 60 μM) sur la réponse contractile des médias reconstruits. Courbe dose-réponse en pourcentage de la contraction initiale à l'ATP (3×10^{-3} M). (n=3, moyenne \pm écart-type)

La figure 22 présente les résultats de la première expérience et montre que le RB-2 n'inhibe pas la contraction des médias reconstruits en réponse à l'ATP. La figure 23 présente les résultats d'une seconde expérience. Dans ce cas, on constate un effet inhibiteur du RB-2 à de faibles concentrations d'ATP. Ces résultats s'expliquent fort bien lorsque l'on regarde les tracés de contraction originaux présentés en figure 24 (avec le RB-2) et en figure 25 (témoin). Il devient évident que le RB-2 produit, à lui seul, un effet relaxant qui semble masquer la réactivité des médias à faibles concentrations d'ATP. Cet effet relaxant serait à de fortes concentrations d'ATP. Il est possible que cet effet soit attribuable à une trop forte concentration de RB-2. En conséquence, une troisième expérience a été menée en utilisant le RB-2 à 3×10^{-5} M. Ces résultats sont présentés à la figure 26 et l'on peut y voir les mêmes résultats que ceux obtenus lors de la

seconde expérience. Les tracés de contraction avaient également le même profil que ceux de la seconde expérience.

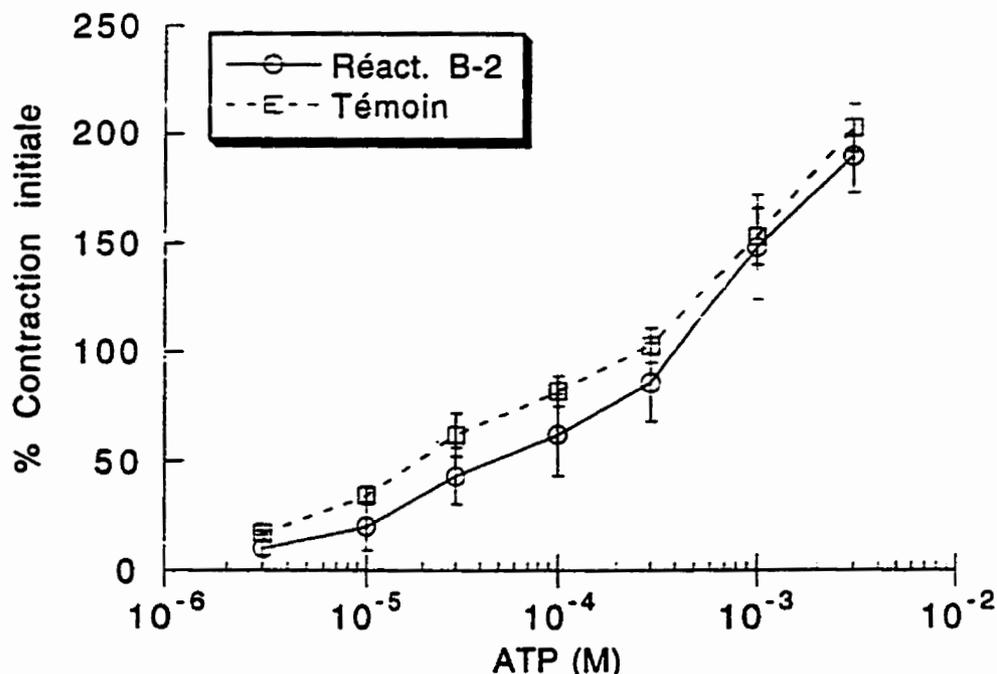


Figure 22: Effet du réactif «blue 2» (10^{-4} M) sur la réponse contractile des médias reconstruits (expérience 1). Courbe dose-réponse en pourcentage de la contraction initiale à l'ATP (10^{-3} M). ($n=3$, moyenne \pm écart-type)

Le fait que de fortes concentrations d'ATP abolissent l'effet du RB-2 laisse croire que ce dernier n'a eu qu'un effet relaxant non-spécifique et que, une fois cet effet annulé, les tissus ont répondu à des concentrations d'ATP par des contractions de même ampleur avec ou sans RB-2. En conclusion, tel que montré par la première expérience, le RB-2 ne semble pas avoir d'effet inhibiteur sur la réponse à l'ATP des médias reconstruits. Ceci tend à démontrer que la réponse contractile obtenue suite à une stimulation à l'ATP n'est pas attribuable à l'action de récepteurs purinergiques de type $P_{2\gamma}$. Des expériences complémentaires

seront réalisées afin de pouvoir affirmer avec certitude qu'il n'y a pas de récepteurs $P_{2\gamma}$.

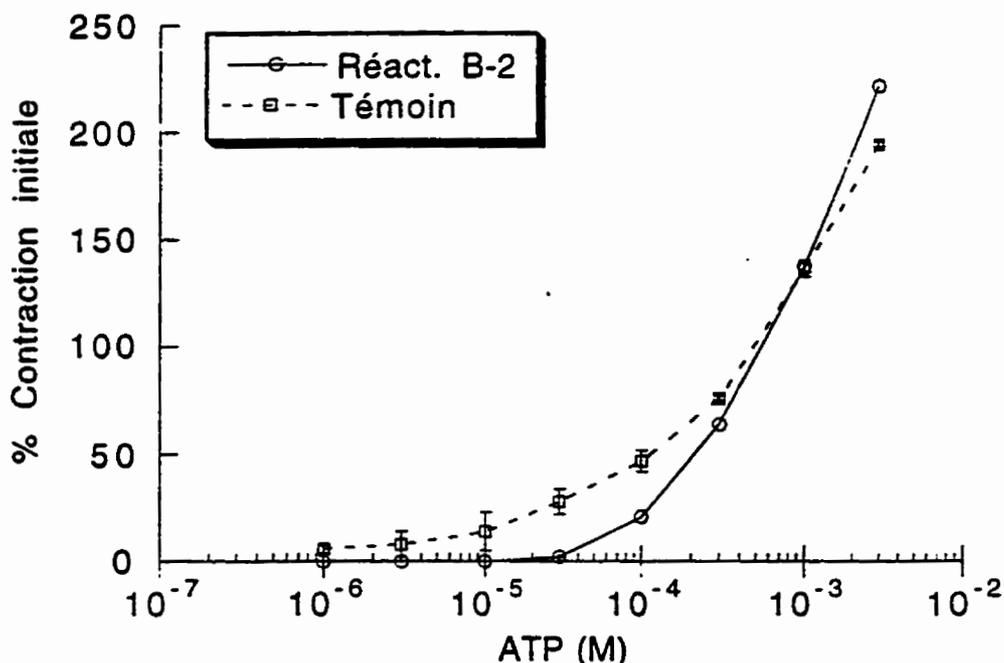


Figure 23 : Effet du réactif «blue 2» (10^{-4} M) sur la réponse contractile des médias reconstruites (expérience 2). Courbe dose-réponse en pourcentage de la contraction initiale à l'ATP (10^{-3} M). (Traités $n=1$; Témoin $n=2$; moyenne \pm écart-type).

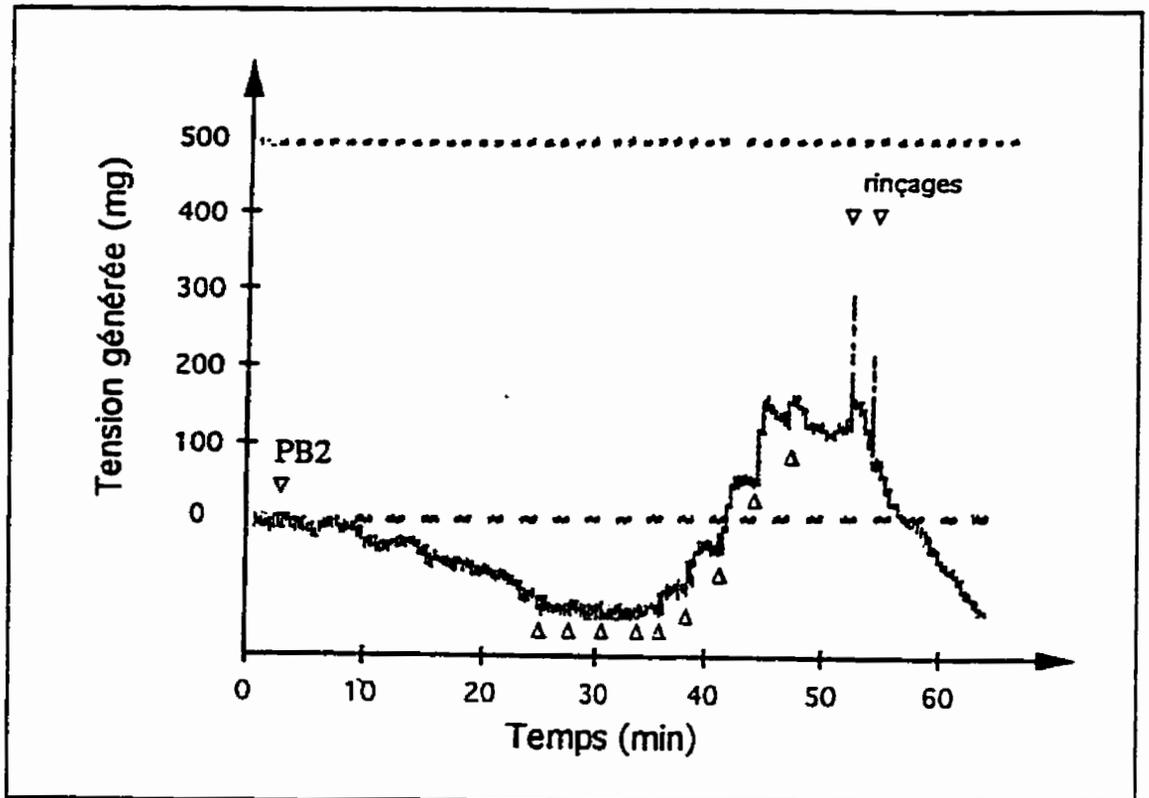


Figure 24: Effet du réactif «blue 2» sur la réponse contractile des médias reconstruites à l'ATP (10^{-6} M, 3×10^{-6} M, 10^{-5} M, 3×10^{-5} M, 10^{-4} M, 3×10^{-4} M, 10^{-3} M, 3×10^{-3} M et 6×10^{-3} M) Un tracé de contraction représentatif de quatre.

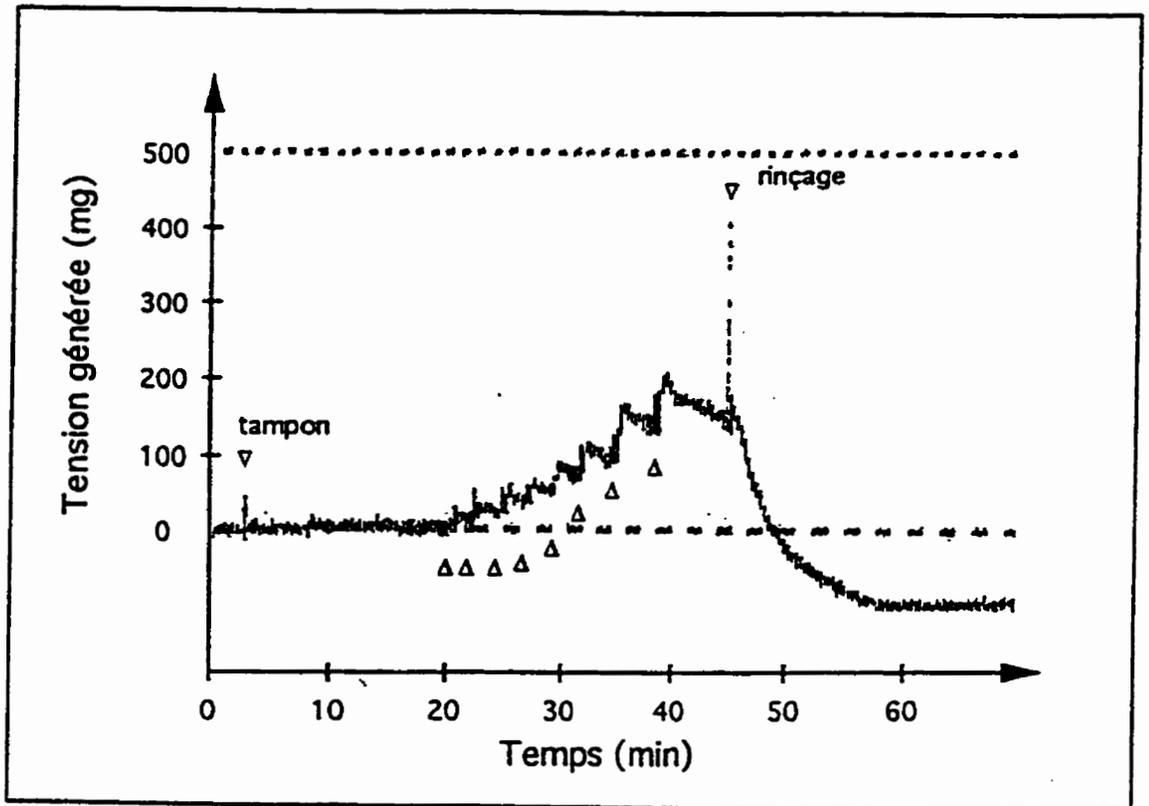


Figure 25: Témoin de l'effet du réactif «blue 2». Réponse contractile des médias reconstruites à l'ATP (10^{-6} M, 3×10^{-6} M, 10^{-5} M, 3×10^{-5} M, 10^{-4} M, 3×10^{-4} M, 10^{-3} M, 3×10^{-3} M et 6×10^{-3} M). Un tracé de contraction représentatif de quatre.

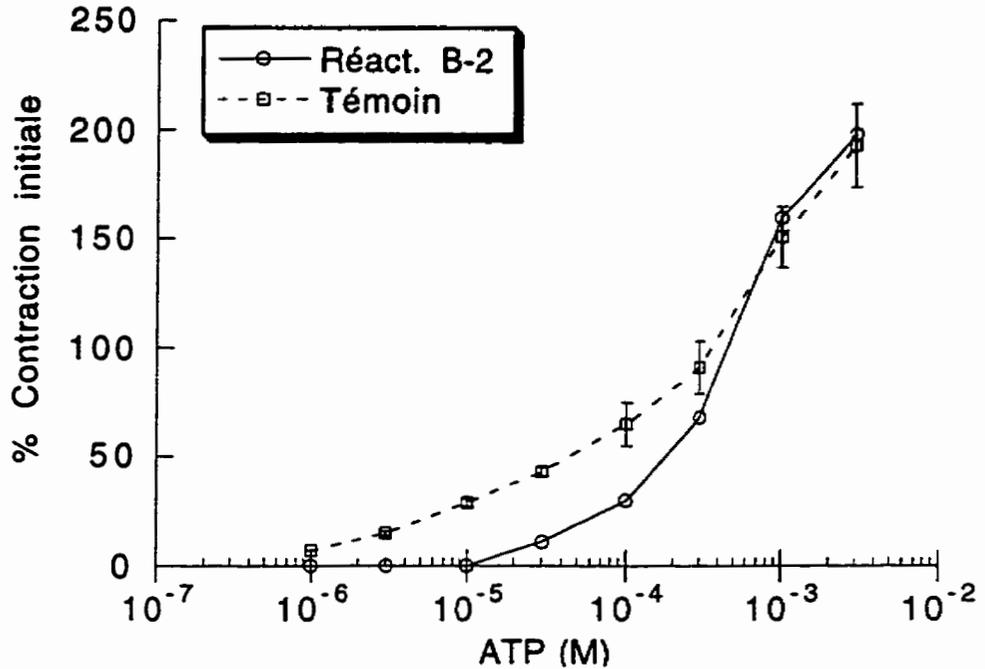


Figure 26: Effet du réactif «blue 2» (3×10^{-5} M) sur la réponse contractile des médias reconstruites (expérience 3). Courbe dose-réponse en pourcentage de la contraction initiale à l'ATP (10^{-3} M). (Traités $n=1$; Témoin $n=2$; moyenne \pm écart-type).

3.3.2.4 Récepteurs purinergiques P_{2U}

Les récepteurs purinergiques de type P_{2U} sont caractérisés, outre leur sensibilité à l'ATP, par leur réponse spécifique à l'uridine 5'-triphosphate (UTP).³²⁸ Toutes les médias reconstruites testées (quatre médias reconstruites distinctes, lors de quatre expériences distinctes, totalisant 15 échantillons) ont toujours montré une réponse contractile à l'UTP. Les médias reconstruites, lorsqu'elles sont confrontées à des concentrations croissantes d'UTP, contractent de façon graduelle et soutenue (figure 27). Les médias reconstruites paraissent un

peu moins sensibles à l'UTP (sensibilité $\approx 10^{-4}$ M) qu'à l'ATP (sensibilité $\approx 10^{-6}$ M à 10^{-5} M). Ainsi, nous pouvons conclure à la présence de récepteurs purinergiques de type P_{2U} à la surface des cellules musculaires lisses des médias reconstruites.

Afin de déterminer si les récepteurs de type P_{2U} sont les seuls responsables de la réponse contractile des médias reconstruites face à l'ATP, nous avons tenté de saturer les récepteurs purinergiques avec de l'UTP. Cette expérience est présentée à la figure 28 qui nous montre que, malgré une pré-contraction avec 3×10^{-3} M d'UTP, une très forte dose, une média reconstruite répond encore à une stimulation par 10^{-3} M d'ATP. Une saturation des récepteurs a été tentée à nouveau avec des doses additives d'UTP allant jusqu'à 6×10^{-3} M mais une dose de 10^{-3} M d'ATP réussit malgré tout à produire une contraction additionnelle (figure 29). La figure 29 démontre que les récepteurs à l'UTP n'étaient pas saturés lors de l'expérience précédente (même avec à 3×10^{-3} M d'UTP). En conclusion, bien que ces expériences de saturation ne représentent qu'un nombre limité d'échantillon, il semble que les récepteurs purinergiques de type P_{2U} ne soient pas les seuls récepteurs purinergiques présents.

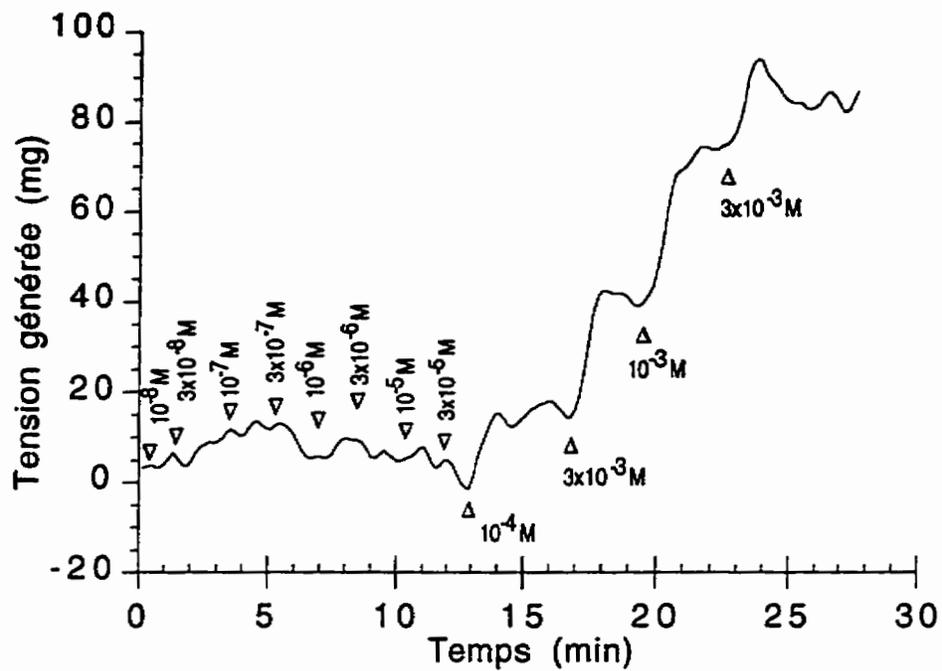


Figure 27: Réponse contractile d'une média reconstruite provoquée par des doses additives d'UTP. Un tracé représentatif de trois.

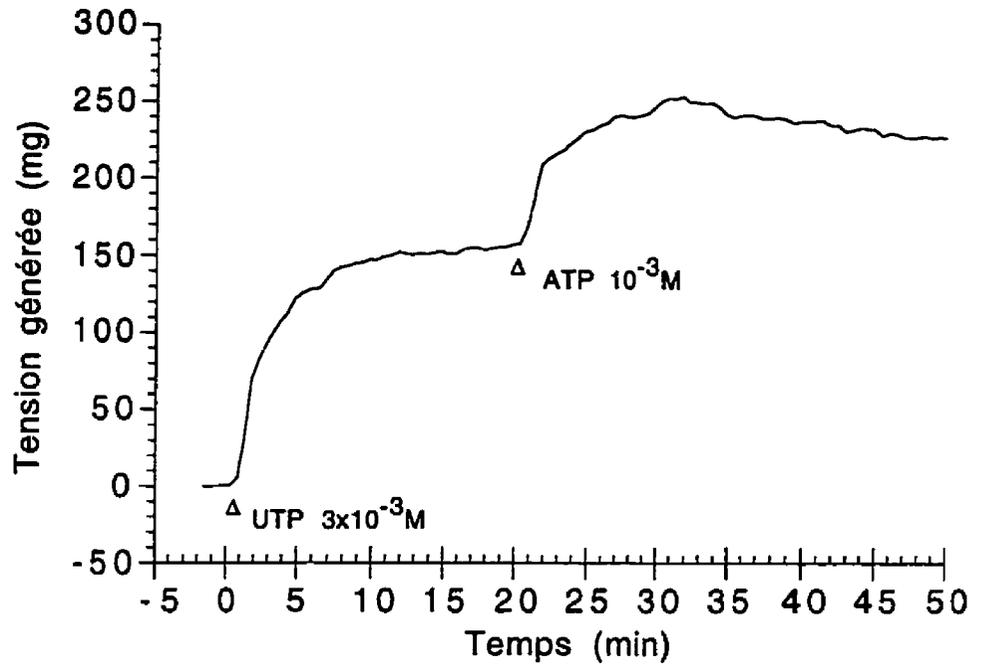


Figure 28: Premier essai de saturation des récepteurs purinergiques par l'UTP. Un tracé représentatif de deux.

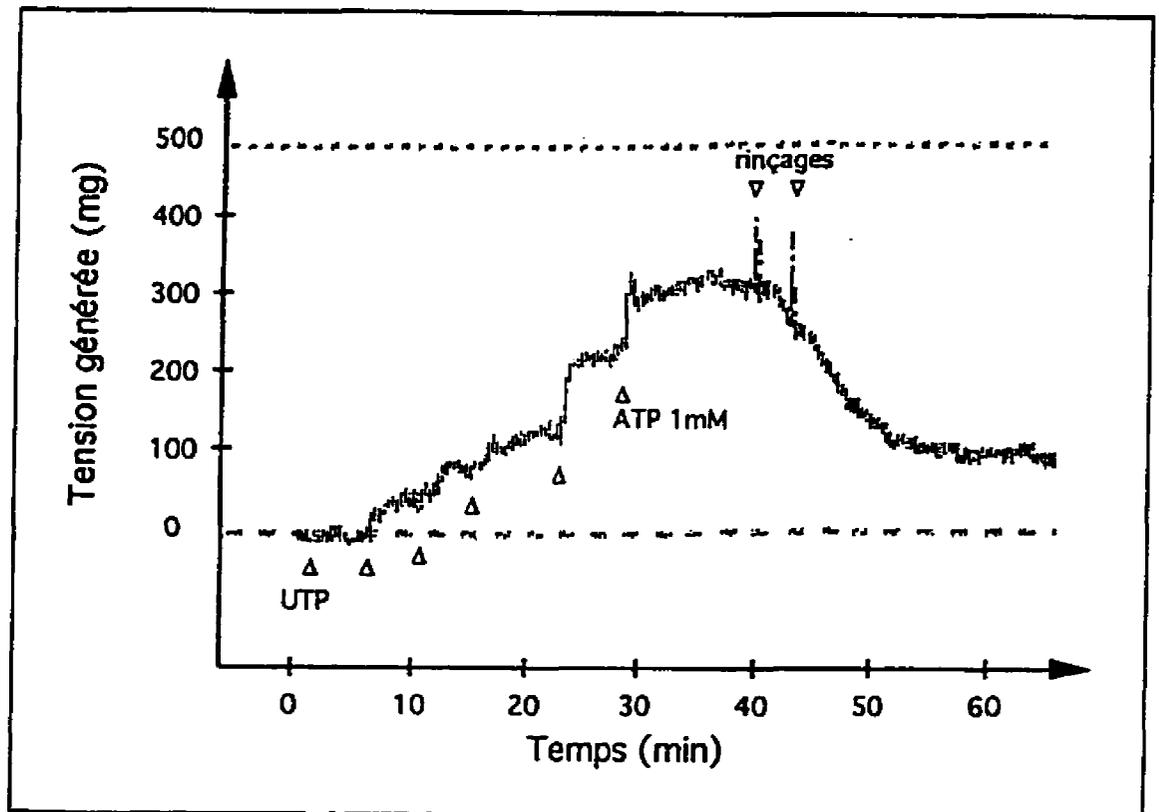


Figure 29: Deuxième essai de saturation des récepteurs purinergiques par l'UTP (10^{-4} M, 3×10^{-4} M, 10^{-3} M, 3×10^{-3} M, 6×10^{-3} M). ATP 3×10^{-3} M. Un tracé représentatif de trois.

3.3.3 Canaux calciques

Nous avons déjà vu, à la section 1.3.2.3.1 de l'introduction générale, que l'entrée de Ca^{++} dans le cytoplasme de la cellule musculaire lisse induit la contraction cellulaire. Nous avons également vu que cette entrée pouvait s'effectuer, ou être amplifiée, par des canaux calciques sensibles au potentiel. Le chlorure de potassium (KCl) est couramment utilisé afin de dépolariser les membranes de cellules musculaires lisses. En effet, le potentiel de la membrane dépend des gradients ioniques de K^+ , Na^+ et de Cl^- . Ainsi, les canaux calciques sensibles au potentiel s'ouvriront lors de cette dépolarisation et

laisseront entrer le Ca^{++} extérieur, entraînant une augmentation de Ca^{++} intracellulaire et la contraction cellulaire. Ce phénomène est extrêmement rapide et est considéré comme ayant une grande importance physiologique pour le maintien du tonus musculaire vasculaire.²⁶³ Ainsi avons-nous voulu savoir comment les médias vasculaires reconstruites répondraient à une telle dépolarisation.

3.3.3.1 Caractère de la contraction au KCl

La réactivité au KCl a été obtenue en changeant le tampon de Krebs standard des bains à organe pour une solution modifiée où du KCl (100 mM final) a été substitué à une partie du NaCl tout en conservant l'osmolarité constante. Ce changement de tampon entraîne la contraction de la médie reconstruite. La figure 30 présente une telle contraction qui s'avère extrêmement lente, au lieu de la réponse immédiate attendue, mais d'une ampleur jamais observée auparavant que ce soit avec de fortes doses d'ATP, d'UTP, de bradykinine ou d'histamine. La contraction atteint un maximum en 50 minutes et diminue très lentement (contraction encore présente à 70% du maximum après 110 minutes). La figure 31 montre une autre contraction au KCl où l'on peut constater que le rinçage du KCl entraîne un retour très rapide vers la tension de base. Ceci montre bien que l'effet observé n'est pas attribuable aux rinçages nécessaires lors du changement de tampon, bien qu'ils produisent des perturbations importantes, mais bien au KCl lui-même.

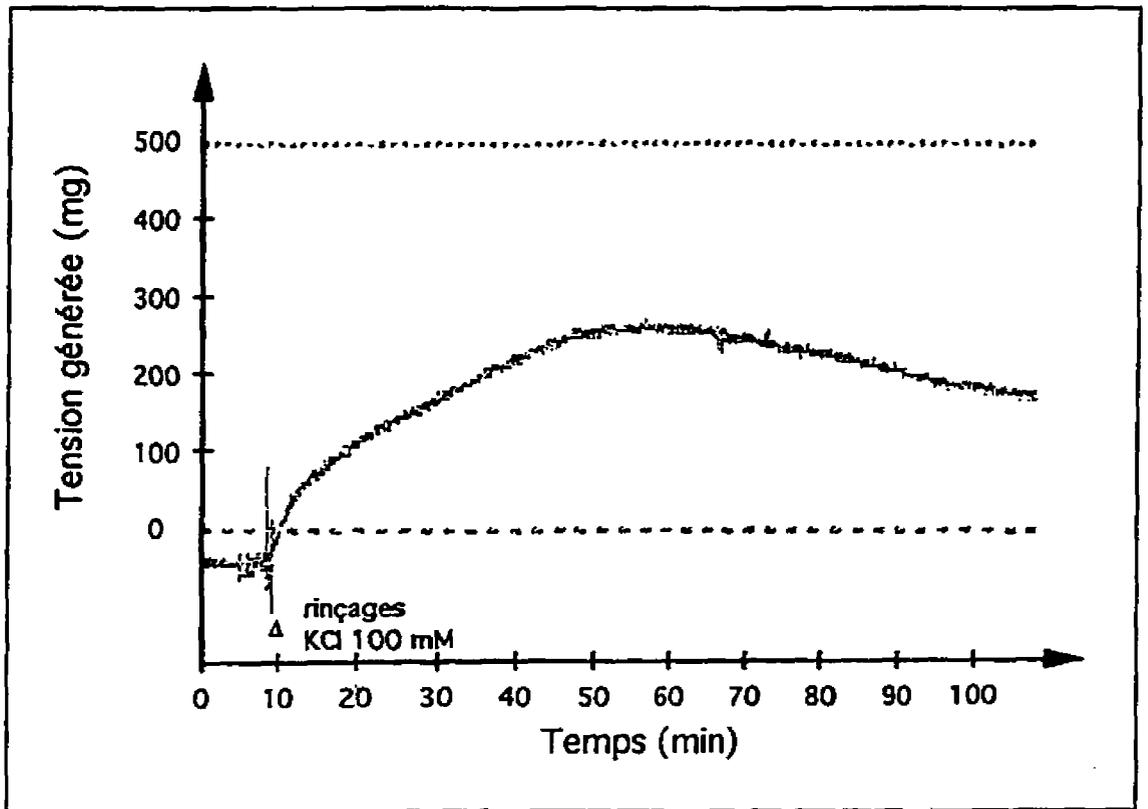


Figure 30: Réponse contractile d'une média reconstruite provoquée par le KCl (100 mM). Un tracé représentatif de 15.

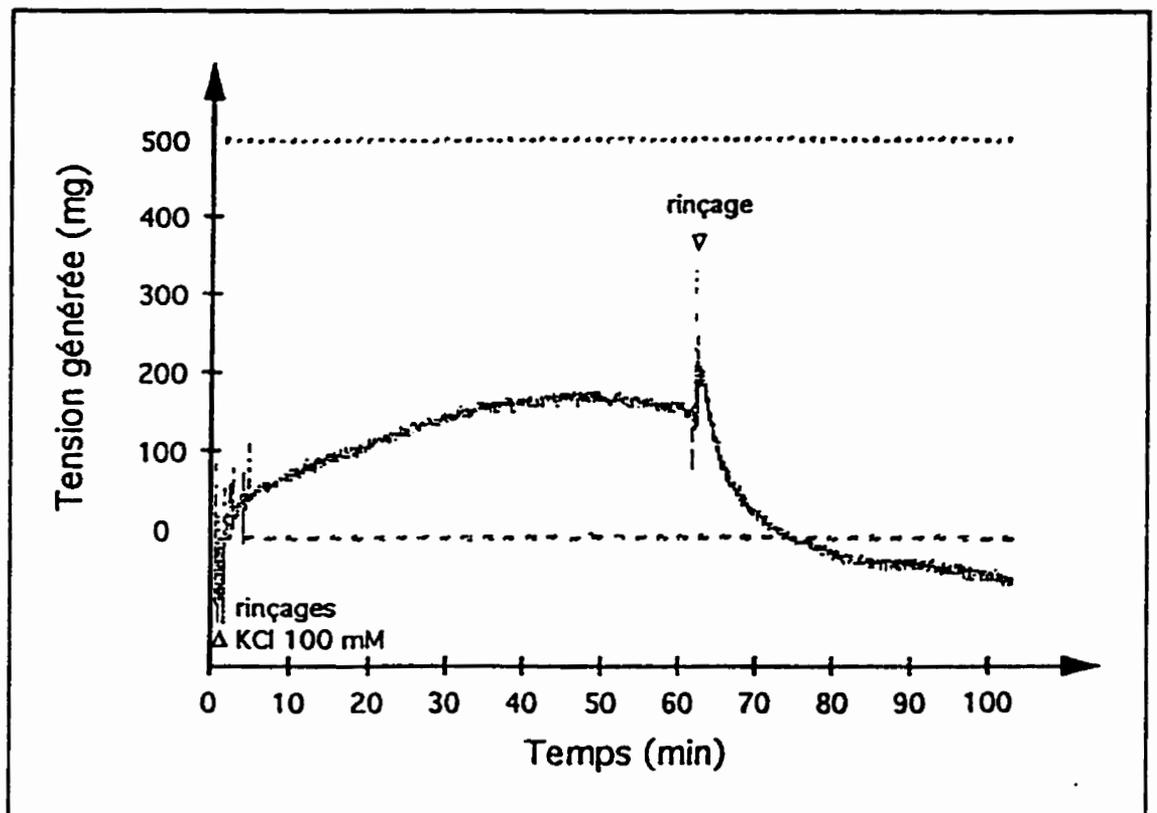


Figure 31: Réponse contractile d'une média reconstruite provoquée par le KCl (100 mM). Effet du rinçage. Un tracé représentatif de six.

3.3.3.2 Détection des canaux calciques sensibles au potentiel

Comme nous l'avons vu, les canaux calciques sensibles au potentiel sont tenus, de façon générale, comme responsables de l'effet du KCl sur les cellules musculaires lisses. Néanmoins, le caractère lent des contractions observées chez les médias reconstruites ne correspond pas bien au mécanisme connu du fonctionnement des canaux calciques sensibles au potentiel.

Afin de vérifier la présence de canaux calciques sensibles au potentiel, un inhibiteur de ces canaux a été utilisé: la nitrendipine (Nit).⁵⁸⁹ Pour ce faire, la Nit (1 μ M) a été ajoutée avec le KCl (n=3), au pic de contraction (n=3),

ou 30 minutes avant le changement de tampon et pendant la contraction (n=2). La figure 32 présente la contraction obtenue par l'effet simultané du KCl et de la Nit. La contraction est lente, forte et soutenue. La figure 33 montre que l'addition de la Nit au maximum de contraction n'a pas d'effet sur la contraction produite par le KCl. La figure 34 présente la contraction obtenue lors d'une incubation de 30 minutes avec la Nit avec la stimulation au KCl (en présence de Nit). La contraction est particulièrement bien soutenue, bien qu'elle ne paraisse pas aussi forte que les autres. Néanmoins, l'ampleur de la contraction ne peut être précisément évaluée étant donné les effets perturbateurs importants que peuvent avoir les rinçages au KCl.

Le réactif «Bay K» est un agoniste spécifique des canaux calciques sensibles au potentiel. Il a été utilisé (1 μ M) suite à une pré-dépolarisation légère avec 25 mM de KCl pendant 15 minutes (n=2). La dépolarisation partielle n'a pas eu d'effet sur le tonus des médias reconstruites, pas plus que le «Bay K» d'ailleurs (résultats non présentés).

En conclusion, aucune expérience ne laisse croire à la présence de canaux calciques sensibles au potentiel fonctionnels. Ces canaux ne sont donc probablement pas responsables, de façon significative, de la contraction observée en présence de 100 mM de KCl.

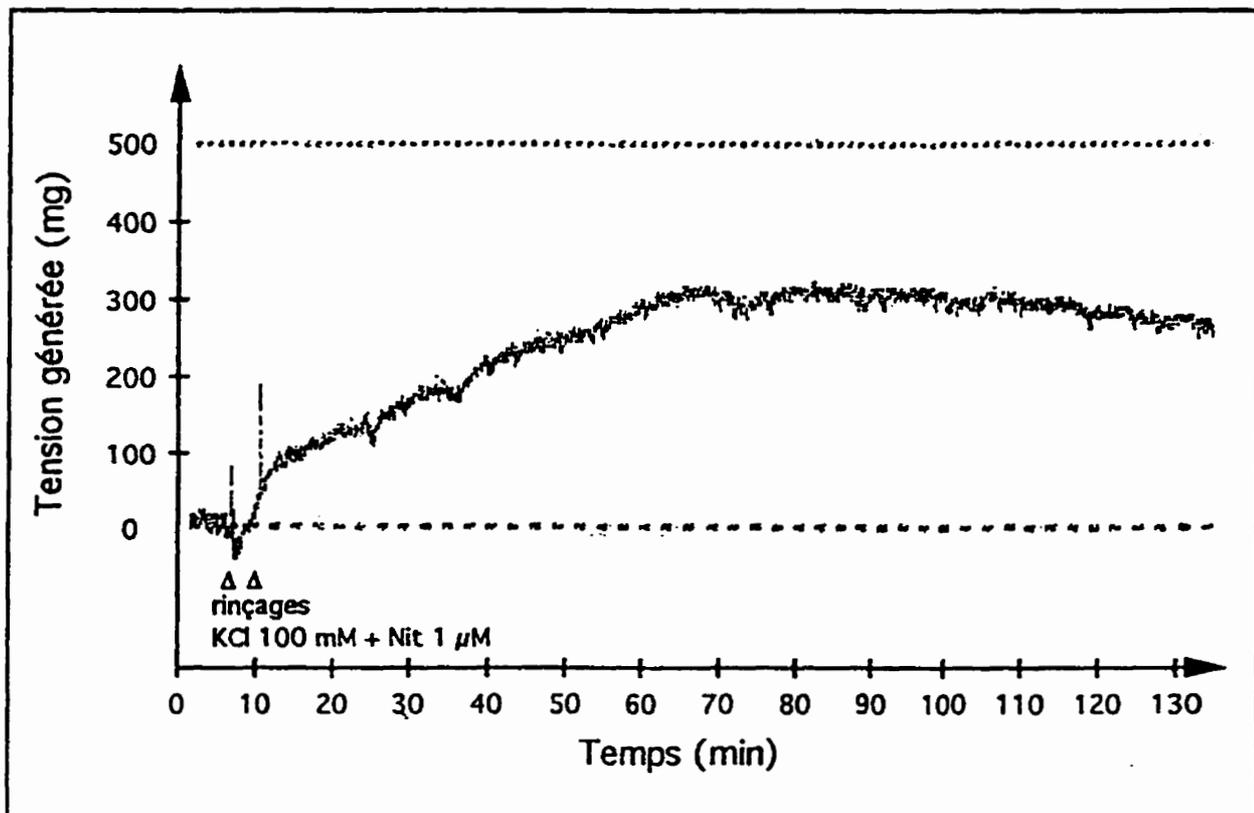


Figure 32: Effet de la Nitrendipine, ajoutée avec le KCl, sur la réponse contractile d'une média reconstruite provoquée par le KCl (100 mM). Un tracé représentatif de trois.

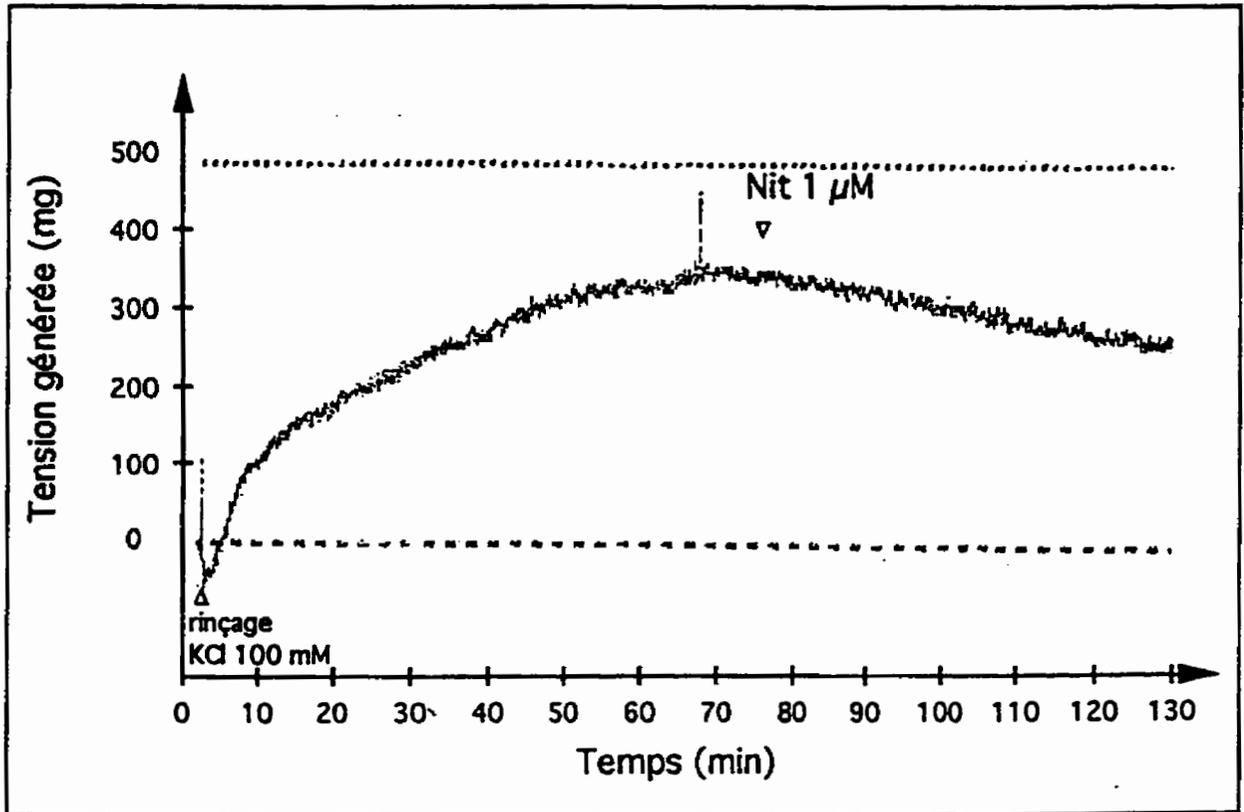
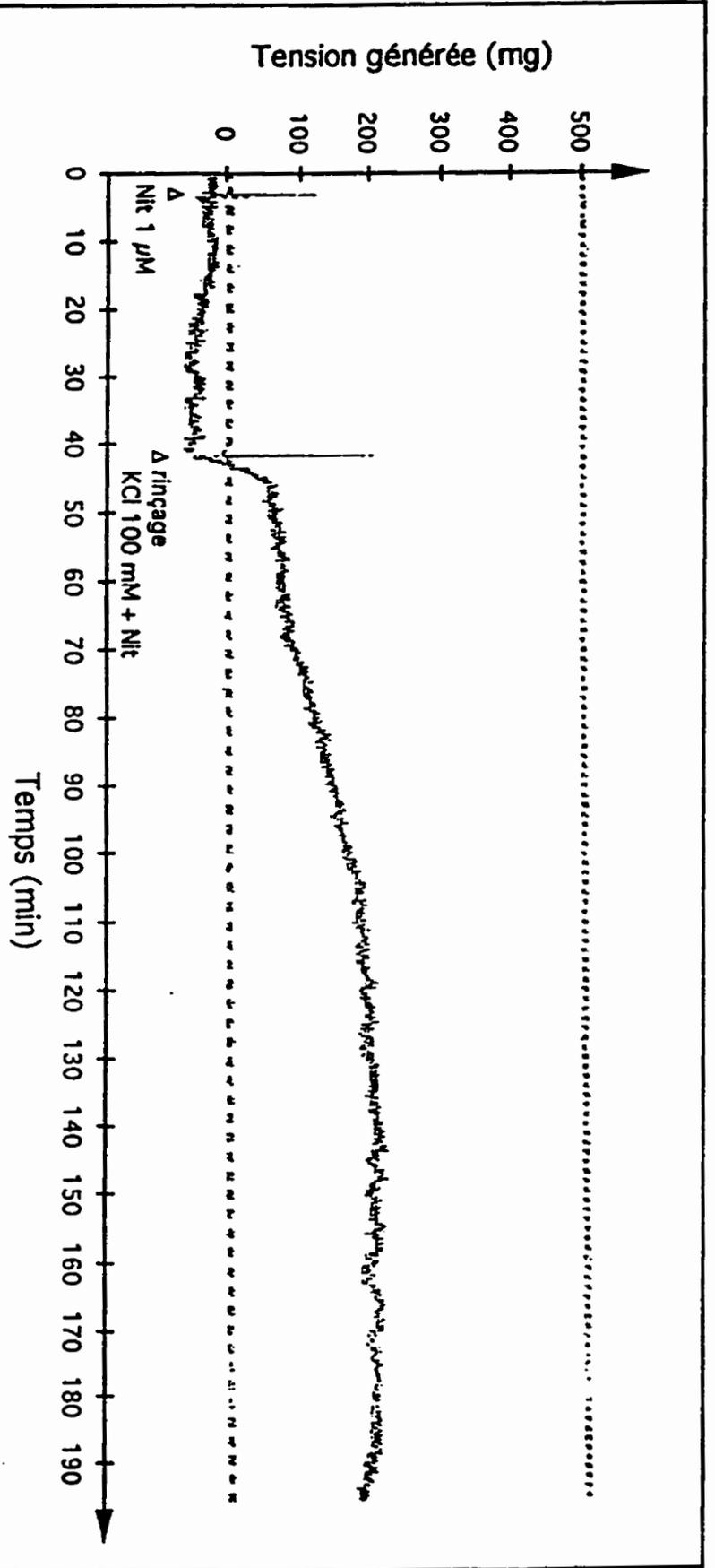


Figure 33: Effet de la Nitrendipine, ajoutée au maximum de contraction, sur la réponse contractile d'une média reconstruite provoquée par le KCl (100 mM). Un tracé représentatif de trois.

Figure 34: Effet de la Nitrendipine, ajoutée 30 minutes avant la contraction, sur la réponse contractile d'une média reconstruite provoquée par le KCl (100 mM) en présence de Nitrendipine. Un tracé représentatif de deux.

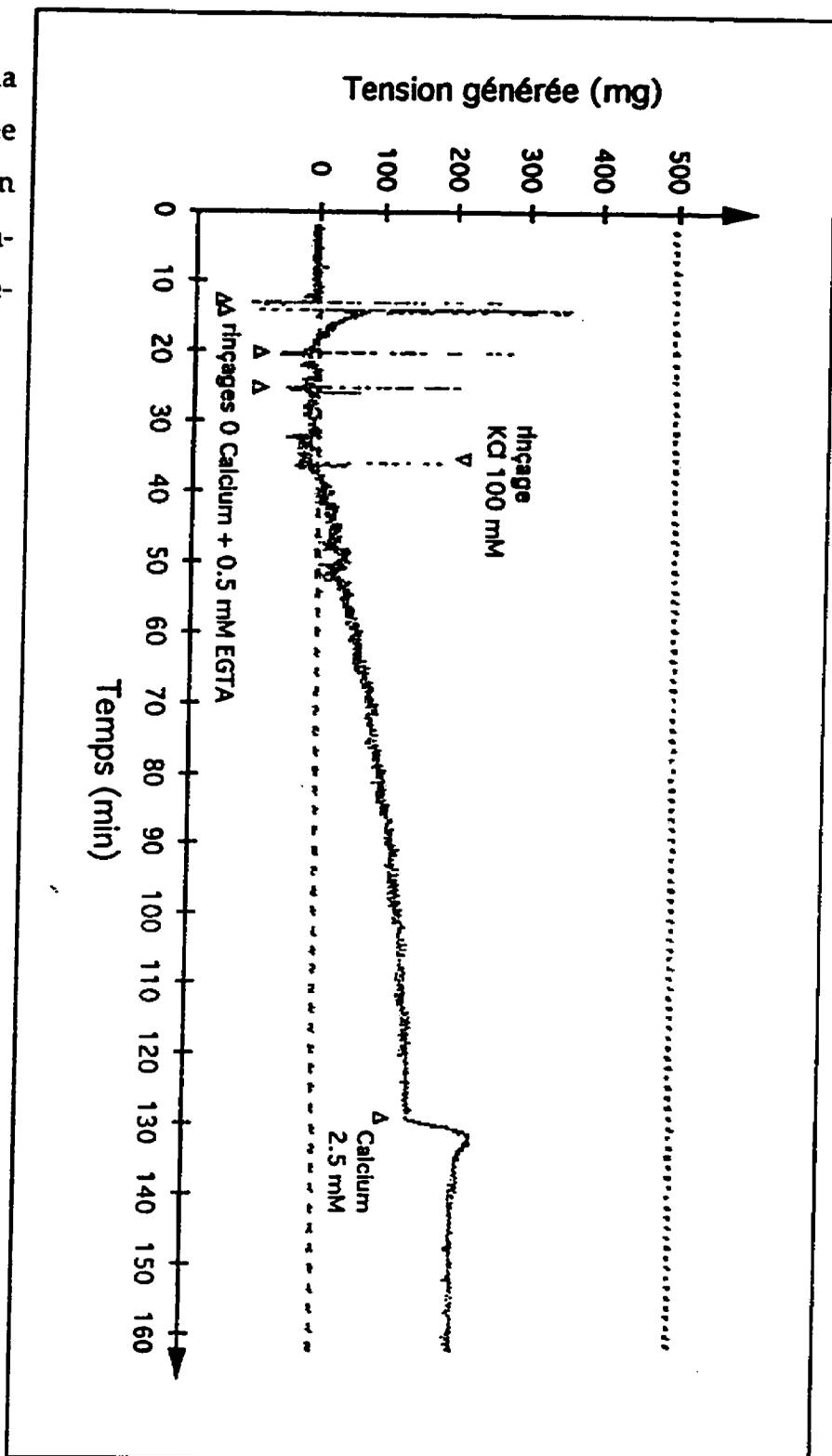


3.3.3.3 Rôle du Ca^{2+} dans la contraction au KCl

Puisque la contraction en réponse au KCl n'est pas liée à la présence de canaux calciques sensibles au potentiel fonctionnels, nous avons voulu vérifier si cette contraction était, tout au moins, reliée à une entrée de Ca^{2+} extracellulaire.

Pour ce faire, des médias reconstruites ont été stimulées avec un tampon 100 mM KCl sans Ca^{2+} suivi de plusieurs rinçages ($n=3$). Ce traitement n'a pas interféré avec la contraction (résultats non présentés). Par la suite, des médias reconstruites ont été préalablement rincées à trois reprises avec du tampon Krebs sans Ca^{2+} contenant 0.5 mM EGTA (20 minutes) afin d'éliminer toute trace de Ca^{2+} avant la stimulation un tampon 100 mM KCl sans Ca^{2+} et avec 0.5 mM d'EGTA ($n=6$). Ce traitement diminue l'intensité des contractions mais ces dernières demeurent et restent très soutenues. La baisse de réactivité pourrait être imputable à la déplétion des stocks de Ca^{2+} intracellulaires suite au longs rinçages sans Ca^{2+} et avec EGTA. Une seconde expérience a été réalisée mais cette fois la concentration en EGTA a été portée à 2 mM ($n=6$). La figure 35 montre que, bien que l'intensité de la contraction ait diminué par rapport à la stimulation avec Ca^{2+} , la contraction persiste et l'augmentation de la concentration d'EGTA n'accroît pas cette baisse. La phase initiale de la contraction est beaucoup moins rapide en l'absence de Ca^{2+} mais ceci pourrait être attribuable à l'effet perturbateur des nombreux rinçages associé à la faible intensité de la contraction. La figure 35 nous montre également que l'ajout soudain de 2.5 mM de Ca^{2+} provoque une contraction limitée de la média reconstruite suivie par un plateau augmenté ($n=2$). Ainsi, le Ca^{2+} extracellulaire n'est pas nécessaire à la contraction au KCl mais celui-ci facilite cette dernière.

Figure 35: Réponse contractile d'une média reconstruite provoquée par le KCl (100 mM) en l'absence de Ca^{++} extracellulaire. Un tracé représentatif de six.



3.3.4 *Activité de la guanylyl cyclase et effet de l'oxyde nitrique*

L'oxyde nitrique (NO) est l'un des plus puissants vasodilatateurs. Par son effet relaxant directe sur les cellules musculaires lisses.^{146,590} L'effet relaxant du NO est la conséquence de son effet stimulant sur la guanylyl cyclase, l'enzyme produisant le guanosine 5'-monophosphate cyclique (GMPc).¹⁴⁴ Ainsi, l'étude des effets du NO est une avenue de recherche très importante dans le domaine vasculaire. Il nous a donc paru important de voir si les médias vasculaires reconstruites pouvaient répondre au NO, c'est-à-dire, si elles avaient une guanylyl cyclase fonctionnelle.

La figure 36 présente l'effet du nitroprussiate de sodium (SNP) sur la contraction d'une média reconstruite induite par une dose de bradykinine (10^{-6} M). Le SNP est une molécule instable qui se dégrade, en solution aqueuse, en produisant du NO.⁵⁹¹ Une dose de 10^{-5} M de SNP produit une relaxation nette et marquée de la média reconstruite. Une seconde dose, de 10^{-4} M de SNP, accentue cette relaxation. Le bleu de méthylène (BM) est un inhibiteur de la guanylyl cyclase et, ainsi, bloque l'effet activateur du NO sur la guanylyl cyclase.⁵⁹² La figure 36 montre l'effet du BM qui annule complètement l'effet relaxant du SNP. Il est à remarquer que cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois ($n=3$). Par contre, l'effet du SNP a également été vérifié dans d'autres contextes expérimentaux ($n=2$). En conclusion, les cellules musculaires lisses des médias reconstruites possèdent une guanylyl cyclase car elles sont susceptibles au NO.

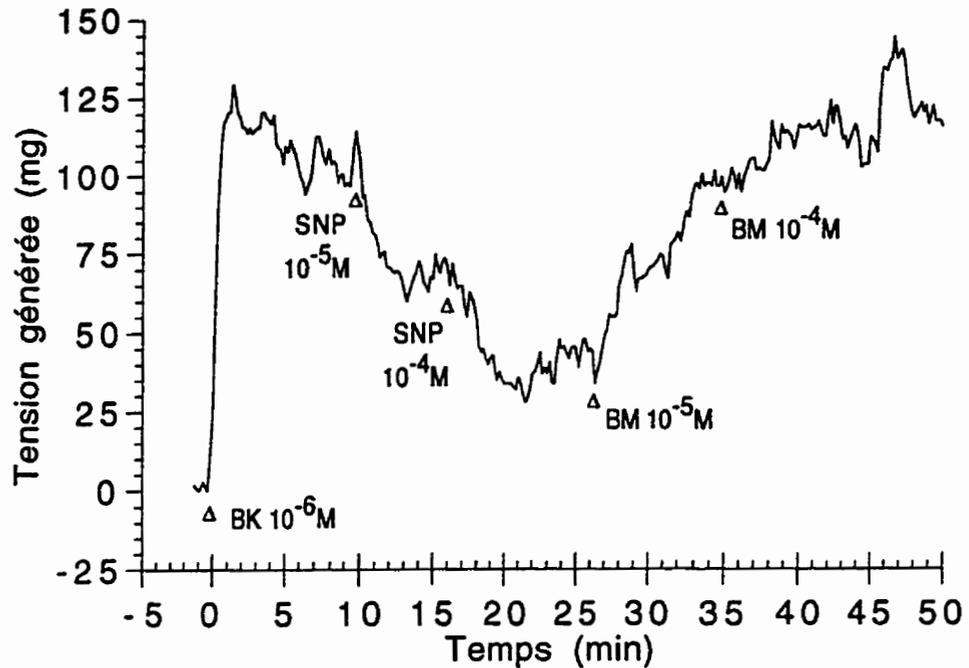


Figure 36: Détection de la guanylyl cyclase dans les médias reconstruites. Relaxation induite par le nitroprussiate de sodium et réversibilité de l'effet par le bleu de méthylène (n=1).

3.3.5 Réactivité aux chlorure de nickel

Dans ce type d'expérience, le chlorure de nickel est utilisé comme donneur d'ions Ni^{++} . Ces ions divalents sont utilisés de concert avec le Ca^{++} extracellulaire afin de démontrer la dépendance d'un phénomène face à l'influx de Ca^{++} extracellulaire. En effet, le Ni^{++} a la propriété de prendre la place du Ca^{++} dans les canaux calciques et de bloquer ces derniers. Ainsi, le Ni^{++} bloque l'entrée de Ca^{++} dans le cytoplasme de la cellule en présence de Ca^{++} extracellulaire.

Lorsqu'une média reconstruite est mise en présence de Ni^{++} , avec Ca^{++} extracellulaire mais en l'absence de tout autre stimulus, cette dernière contracte rapidement et très intensément (n=6). Cette réaction n'est pas observée

avec des tissus vasculaires *ex vivo*. La figure 37 présente la contraction observée suite à l'ajout de 0.1 mM ou 1 mM de Ni²⁺. Les résultats sont présentés en pourcentage d'une contraction témoin de 10⁻³ M d'ATP. La contraction provoquée par le Ni²⁺ apparaît donc beaucoup plus intense que celles obtenues avec de l'ATP (≈300%). L'amplitude de la contraction ne semble toutefois pas directement reliée à la concentration de Ni²⁺ utilisée. Par contre, la vitesse de contraction, elle, semble être proportionnelle à la concentration de Ni²⁺. La figure 38 montre clairement la relation de proportionnalité entre la concentration d'une dose initiale de Ni²⁺ et la vitesse de la réponse contractile d'une média reconstruite. Enfin, la figure 39 démontre que, suite au déclenchement de la contraction par une très faible dose de Ni²⁺, des doses subséquentes répétées même 10 fois plus fortes que la dose initiale, n'entraînent pas une contraction plus importante.

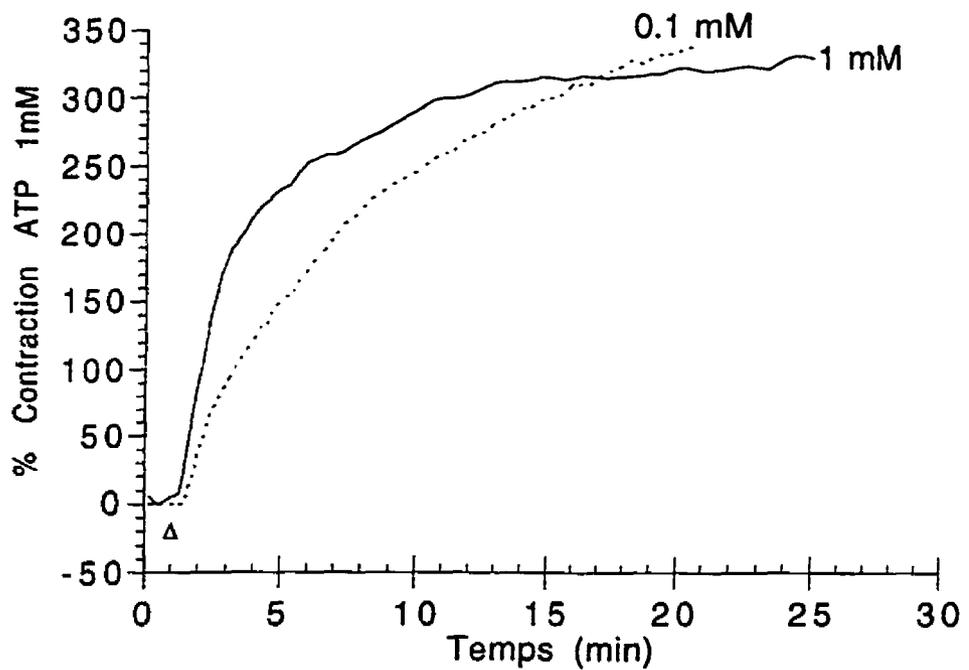


Figure 37: Réponse contractile d'une média reconstruite provoquée par le Ni²⁺. Tracé de contraction exprimé en pourcentage d'une contraction témoin à l'ATP (10⁻³ M). (n=1)

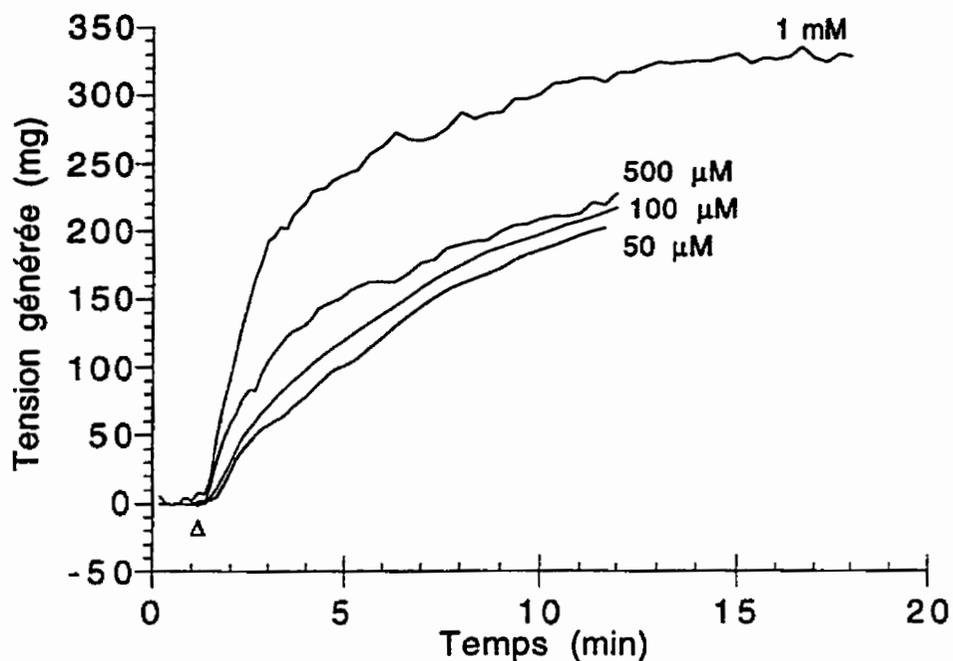


Figure 38: Effet de la concentration de Ni^{2+} sur la réponse contractile d'une média reconstruite provoquée par le Ni^{2+} . Tracés de contraction (n=1).

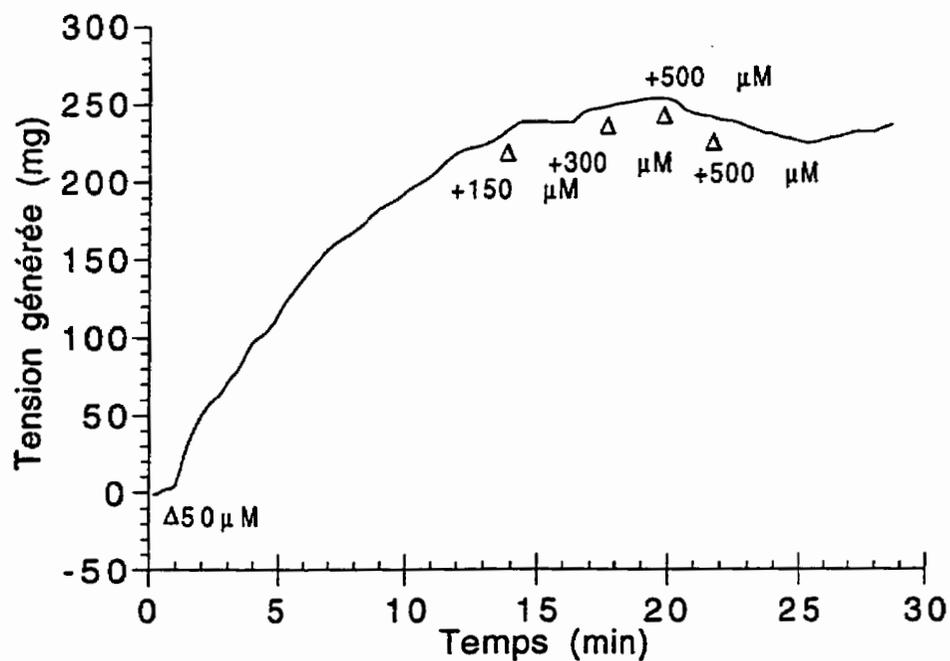


Figure 39: Réponse contractile d'une média reconstruite provoquée par des doses additives de Ni^{2+} . Tracés de contraction (n=1).

3.3.6 *Rôle des macrophages dans la réponse des tissus vasculaires*

Un autre exemple de l'utilité d'un tel modèle en recherche vasculaire est présenté dans cette section. Dans ce cas, les médias cultivées ont été utilisées pour étayer l'hypothèse voulant que la réponse contractile des tissus vasculaires humains aux agents anaphylactiques soit produite par l'intermédiaire des macrophages résidents.⁵⁹³ En effet, l'équipe du Dr F. Marceau s'intéresse depuis plusieurs années à cette question. Puisque la présence de quelques macrophages dans la paroi vasculaire suffirait à déclencher une contraction, la réponse à cette question est difficile à obtenir à partir d'expériences utilisant des tissu *ex vivo*. Cependant, les médias vasculaires reconstruites, de par leur nature cellulaire pure, sont à même de fournir des éléments de réponse à cette question. En effet, le fait que la média cultivée soit obtenue d'une culture pure de cellules musculaires lisses en passage écarte la possibilité de cellules contaminantes.

Les médias vasculaires reconstruites et l'artère du cordon ombilical humain ont répondu à des agonistes vasculaires normaux comme l'histamine, la bradykinine et le U-46619, un analogue de la thromboxane A (figure 40). Par rapport à l'artère ombilicale, les médias reconstruites ont réagi par des contractions beaucoup plus faible (de 3.6 à 20 fois). Néanmoins, bien que quantitativement beaucoup plus faibles, les contractions obtenues avec notre modèle sont facilement interprétables d'un point de vue qualitatif. La figure 41 nous présente les résultats obtenus avec des agonistes anaphylactiques. Nous pouvons constater que, contrairement à l'artère ombilicale, les médias reconstruites ne répondent pas du tout aux agonistes anaphylactiques. Ces résultats appuient l'idée que les cellules musculaires lisses ne possèdent pas les récepteurs correspondants. Ceci vient appuyer la théorie selon laquelle la réponse à ce type d'agoniste n'est pas directement attribuable aux cellules musculaires lisses dans les tissus vasculaires.

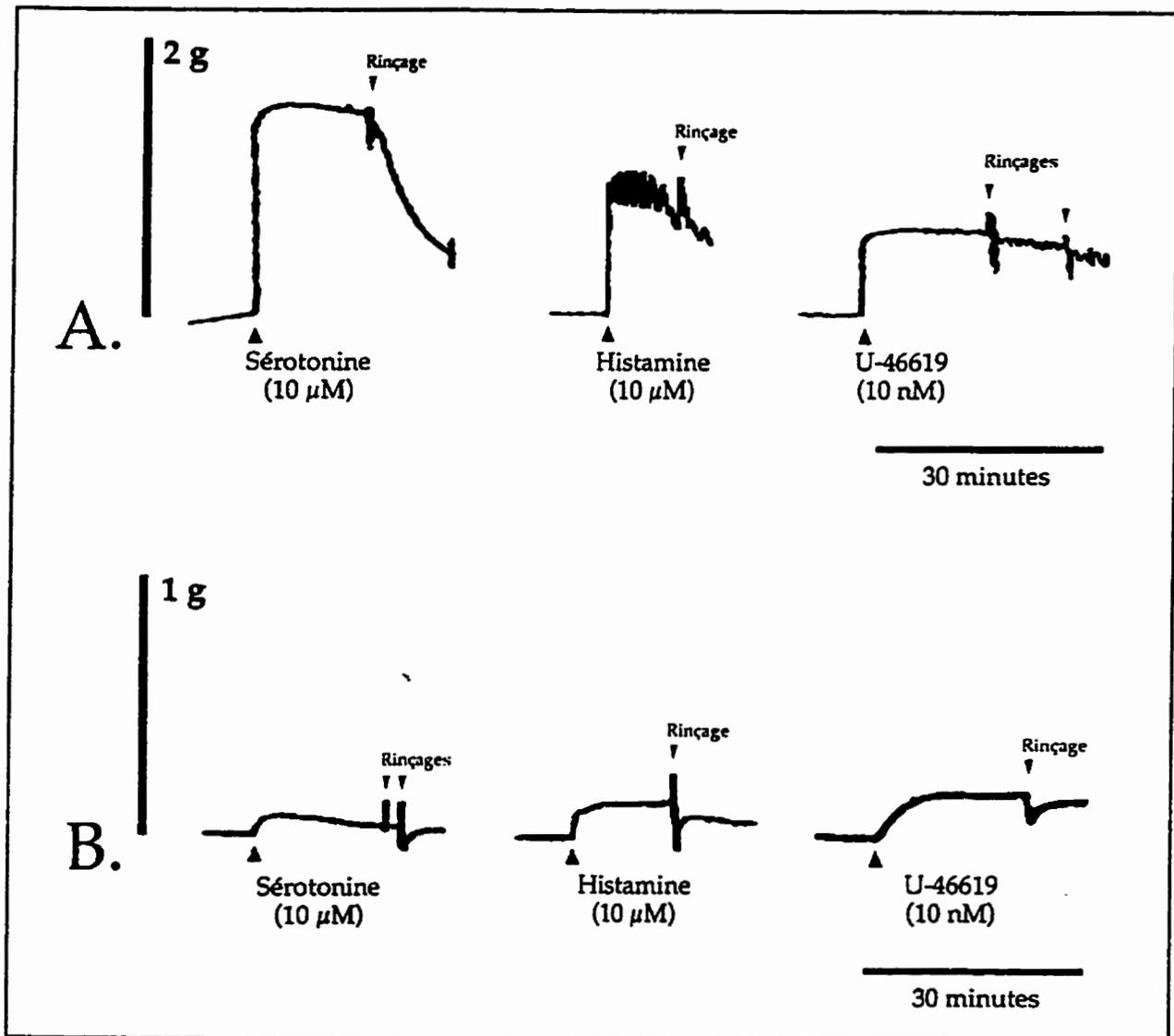


Figure 40: Contractions en réponse à des agonistes standards. A. Artère ombilicale. B. Média cultivée.

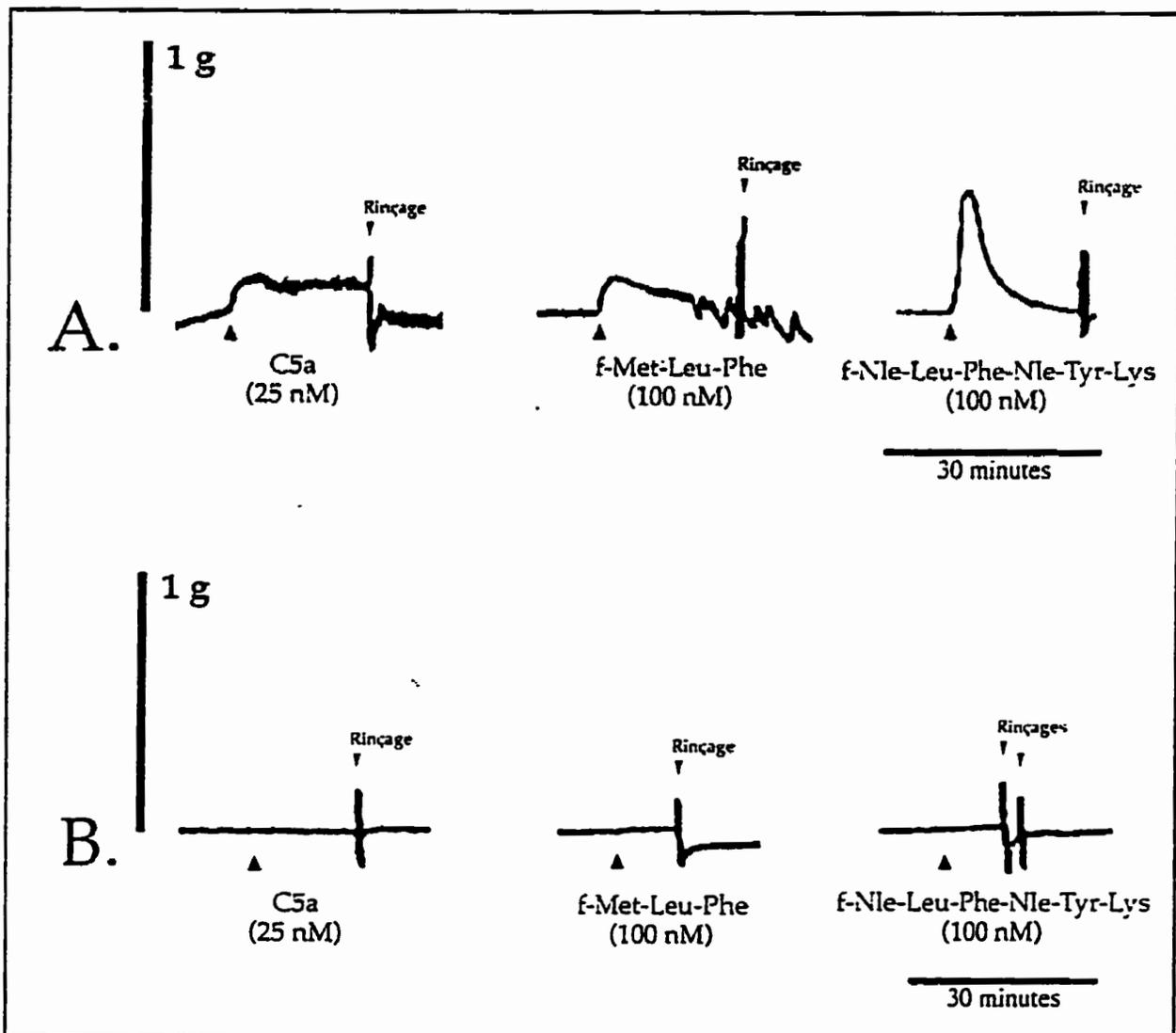


Figure 41: Contractions en réponse à des agonistes anaphylactiques. A. Artère ombilicale. B. Média cultivée.

3.4 Discussion

À l'aide d'une nouvelle technique d'ingénierie tissulaire, nous avons produit un tissu tubulaire contenant des cellules musculaires lisses humaines contractiles. Cette média vasculaire reconstituée présente des caractéristiques macroscopiques, histologiques et contractiles qui reflètent plusieurs de celles observées chez la média vasculaire humaine. Les résultats présentés ici démontrent que ce modèle peut-être utilisé pour faire des études pharmacologiques de contractions en utilisant le même matériel et les mêmes réactifs que ceux couramment utilisés avec des tissus animaux ou humains.

La plupart des études de contractions vasculaires se sont effectuées, et s'effectuent toujours, avec des vaisseaux sanguins animaux. Cependant, les différences inter-espèces étant de mieux en mieux établies, et les mouvements de protection des animaux étant de plus en plus forts, les chercheurs se tournent vers l'utilisation de vaisseaux humains ou vers des méthodes utilisant des cellules en cultures. Malheureusement, les tissus humains sont souvent difficilement disponibles et d'une qualité très variable. Pour ce qui est de modèles de culture cellulaire, bien que certains permettent d'observer la contraction de cellules musculaires lisses en culture, aucun d'entre eux ne permet de mesurer de façon quantitative la force générée par les cellules.^{317,323-326} De plus, des cellules musculaires lisses contractiles humaines n'ont jamais été observées en culture. Ainsi, les médias vasculaires produites par ingénierie tissulaire présentent un modèle unique qui permet de mesurer les contractions de cellules musculaires lisses en culture d'origine humaine.

Pour faire de ce modèle un outil pharmacologique utile, il est nécessaire de bien caractériser ce dernier. En effet, il serait illusoire et prétentieux de croire que ce modèle reproduit toutes les qualités d'un vaisseau sanguin humain. Il est donc important d'établir dans quels domaines de la recherche

vasculaire ce modèle pourra servir. C'est dans cet esprit qu'une étude pharmacologique des récepteurs purinergiques P_2 a été réalisée. Celle-ci a démontré que les médias reconstruites ne répondaient pas à une forte dose d' $\alpha\beta$ -méthylène-ATP, le plus puissant agoniste des récepteurs purinergiques de sous-type P_{2X} .⁵⁸⁵ De plus, cet agoniste n'a pas produit d'effet désensibilisant sur la réponse des médias à l'ATP.⁵⁸⁸ Par ailleurs, la réponse des médias à l'ATP n'a pas été inhibée par le PPADS, un inhibiteur compétitif, puissant et spécifique des récepteurs purinergiques de sous-type P_{2X} .^{587,588} Ces résultats montrent clairement que les cellules musculaires lisses des médias reconstruites ne possèdent pas de récepteurs purinergiques P_{2X} . D'autre part, l'utilisation du réactif «blue 2», un inhibiteur spécifique des récepteurs purinergiques de sous-type P_{2Y} , n'a pas mené à l'inhibition nette de la réponse des médias à l'ATP.⁵⁸⁸ Cependant, ce résultat reste incertain et nécessitera confirmation avec des doses plus faibles de l'inhibiteur. Enfin, l'UTP produit une forte contraction des médias reconstruites ce qui établit, hors de tout doute, la présence de récepteurs P_{2U} puisqu'il s'agit du seul sous-type de récepteurs purinergique qui est sensible à l'UTP.³²⁹ Des essais de saturation des récepteurs P_{2U} par de fortes doses d'UTP n'ont pas inhibé la réponse à l'ATP. Ceci laisse croire à la présence d'autres sous-types de récepteurs purinergiques P_2 que le sous-type U. Ceci dit, la figure 29 ne montre pas rigoureusement la saturation des récepteurs à l'UTP après une dose de 6×10^{-3} M d'UTP. Cependant, il est difficile d'ajouter des doses supérieures pour des raisons de solubilité et parce qu'elles pourraient causer des artefacts.

Ainsi, la présence de récepteurs de sous-types autres que P_{2U} n'a pu être écartée. De plus, l'absence de récepteurs de sous-types P_{2Y} n'a pu être catégoriquement confirmée. Pour répondre définitivement à cette question, il faudrait utiliser le 2-méthylthio-ATP qui est l'agoniste le plus puissant des récepteurs de sous-types P_{2Y} et qui n'a pas d'effet sur le sous-type P_{2U} .³²⁹ En absence de réaction, il faudrait établir l'absence de sous-types de récepteurs jamais observés chez les cellules musculaires lisses tel que les sous-types P_{2Z} ou $P_{2(PC12)}$,

ce dernier étant encore mal défini.^{329,331} En effet, il n'existe pas d'inhibiteur spécifique connu des récepteurs de sous-types P_{2U}.

La présence de récepteurs de sous-types P_{2U} n'est pas surprenante puisque ceux-ci ont été observés sur les cellules musculaires lisses vasculaires *in vivo* et en culture.^{309,588,594-596} Par contre, l'absence de récepteurs de sous-types P_{2X} est plutôt surprenante car ces récepteurs sont largement distribués sur les cellules musculaires lisses vasculaires et viscérales.^{349,588,597-600} Ceci dit, son absence a été notée sur des cellules musculaires lisses porcines en culture.³⁰⁹ Par ailleurs, la présence de récepteurs de sous-type P_{2Y} serait surprenante puisque celui-ci est principalement retrouvé au niveau de l'endothélium dans les vaisseaux sanguins.^{582,598} Cependant, des contractions associées à des récepteurs de sous-type P_{2Y} ont déjà été observées avec des artères mésentériques de rat à de fortes dose d'ATP.⁵⁸⁸ Pacaud et collaborateurs ont observé le changement d'expression des récepteurs purinergiques P₂ lors de la mise en culture de cellules musculaires lisses d'aorte de rat.⁶⁰¹ Ils ont observé une perte d'expression de récepteurs de sous-type P_{2X}, une induction de l'expression des sous-type P_{2Y}, et une expression maintenue des récepteurs de sous-type P_{2U}. Ces résultats correspondent bien aux nôtres bien que l'expression des sous-type P_{2Y} n'ait pas été clairement démontrée dans notre modèle.

Le profil de contraction des médias reconstruites en réponse à l'ATP n'est pas observé normalement avec des vaisseaux *ex vivo*.^{582,588,598} En effet, cette réponse est habituellement rapide et transitoire alors que nous observons une réponse soutenue. Cette réponse transitoire est attribuée, *in vivo*, aux récepteurs de sous-type P_{2X} qui contrôlent des canaux ioniques principalement perméables aux ions Ca²⁺ et Na⁺.^{328,602} Ces récepteurs sont rapidement inactivés mais l'entrée directe de Ca²⁺ peut suffire à entraîner la contraction. De plus, l'entrée de Na⁺, et de Ca²⁺, provoque la dépolarisation de la membrane cytoplasmique et une entrée massive de Ca²⁺ par les canaux calciques

sensibles au potentiel ou sensibles au Ca^{2+} .²⁶³ Dans les médias reconstruites, ces récepteurs sont absents tandis que les récepteurs de sous-type $\text{P}_{2\text{U}}$ sont prépondérants. Or, ces récepteurs sont liés à une protéine G qui active le métabolisme des phosphates d'inositol et l' IP_3 ainsi produit cause la libération de stocks calciques du réticulum sarcoplasmique. Ainsi, ces récepteurs produisent une contraction moins rapide que ceux de sous-type $\text{P}_{2\text{X}}$ mais celle-ci est soutenue comme celle observée avec les médias cultivées. Le profil général de contraction des médias reconstruites en réponse à l'ATP est donc cohérent avec les sous-types de récepteurs purinergiques identifiés par cette étude.

Le type de contraction observé suite à une dépolarisation par 100 mM de KCl est très étrange. La lenteur de celle-ci ne laisse pas croire à l'implication des canaux calciques sensibles au potentiel dans cette réponse. De plus, l'inactivité de la nitrendipine, un inhibiteur canaux calciques sensibles au potentiel, ainsi que du réactif BAY K 8644, un agoniste partiel des canaux calciques sensibles au potentiel, laisse croire à l'absence de ces canaux dans ce modèle.^{589,603,604} Cette absence est surprenante puisque ces canaux sont très importants dans la réponse contractile des cellules musculaires lisses *in vivo*.⁶⁰⁵ Ainsi, ce modèle ne reproduit pas la situation observée *in vivo* en ce qui concerne les canaux calciques sensibles au potentiel. Cependant, la forte mais lente contraction observée en présence de 100 mM de KCl reste sans explication. Celle-ci reflète peut-être un mécanisme de contraction encore inconnu puisque caché par la réponse habituellement observée avec des tissus *ex vivo*? En effet, ce type de modèle, bien que ne représentant pas parfaitement certains aspects de la situation observée *in vivo*, pourrait peut-être permettre de découpler certains phénomènes de la réponse cellulaire habituelle.

La réaction des médias cultivées au Ni^{2+} présente également une réponse surprenante. En effet, le Ni^{2+} s'est avéré l'agoniste contractile le plus puissant jamais utilisé sur des médias reconstruites alors que celui-ci n'a jamais

été décrit comme un agent contractile chez des tissus vasculaires prélevés *in vivo*. Sur les médias reconstruites, le Ni^{2+} semble déclencher une réaction contractile dont la rapidité est dépendante de la concentration mais dont l'intensité semble indépendante de la concentration de Ni^{2+} utilisée. Cet effet du Ni^{2+} a été découvert en fin de stage, donc, peu de travaux ont pu être réalisés afin de percer le mystère entourant son mécanisme d'action. Néanmoins, des éléments d'information supplémentaires seront apportés par l'étude des influx calciques en réponse au Ni^{2+} (voir le prochain chapitre).

L'étude des agents vasodilatateurs est une sphère de recherche importante dans le domaine, entre autre, de l'hypertension. Les médias vasculaires reconstruites pourront être un outil utile dans ce domaine puisqu'elle sont sensible à l'effet du NO, le plus important des vasodilatateurs.^{146,590} Cette sensibilité révèle la présence d'une guanylyl cyclase fonctionnelle, qui est activée par le NO, et qui peut être inhibée par le bleu de méthylène.⁵⁹² Ainsi, la contraction de la média cultivée est sensible à la concentration de guanosine 5'-monophosphate cyclique intracellulaire tel que c'est le cas *in vivo*.¹⁴⁴

Les travaux effectués chez le Dr Marceau ont montré que les médias vasculaires reconstruites répondent à des agonistes vasculaires variés. De plus, ces travaux montrent bien comment ce type de modèle peut servir à apporter des éléments de réponse lorsque les conditions expérimentales *in vivo* sont difficilement contrôlables. Dans ce cas, nous avons montré que les tissus produits *in vitro*, à partir d'une culture pure de cellules musculaires lisses humaines en passage, ne réagissaient pas à des agonistes anaphylactiques qui produisent la contraction des vaisseaux *ex vivo*. Ceci vient appuyer l'hypothèse selon laquelle la réponse à ce type d'agoniste n'est pas directement attribuable aux cellules musculaires lisses mais bien aux macrophages résidents des tissus vasculaires.⁵⁹³ Bien entendu, les conditions de culture peuvent grandement influencer le phénotype cellulaire, et il est possible que l'absence de réponse soit

attribuable à une modification des cellules musculaires lisses dans ce modèle. Une expérience intéressante serait d'ajouter des macrophages humains à la média contractile afin de voir si ceux-ci seraient capables d'induire la contraction des cellules musculaires lisses en réponse aux agents anaphylactiques.

La principale faiblesse de ce modèle, en tant qu'outil de recherche pharmacologique, est la variation de la réponse contractile d'un échantillon en fonction du nombre de stimulations appliquées. En effet, des expériences préliminaires ont montré que les médias reconstruites répondent avec moins d'intensité, lors d'une seconde ou d'une troisième stimulation, par rapport à la première. Ainsi, ce modèle ne permet pas de comparer des contractions successives faites sur un même échantillon, en présence ou absence d'un inhibiteur. Dans l'étude des récepteurs purinergiques, des contractions faites sur différents tissus ont été comparées. C'est pourquoi la contraction observée est exprimée en pourcentage d'une contraction témoin préalable. Ainsi, la contraction est relativisée en fonction du potentiel contractile du tissu testé. Cette méthode est couramment utilisée en pharmacologie. Cependant, le fait de ne pouvoir se servir d'un tissu comme témoin interne augmente les causes de variations. Pour cette raison, ce modèle semble plus approprié pour des protocoles basés sur des variations importantes, par exemple, l'utilisation d'un agoniste spécifique plutôt qu'un inhibiteur partiel.

Un modèle produit à partir de cellules en culture présente plusieurs avantages: grande disponibilité, reproductibilité, utilisation possible de cellules humaines, élimination de questions d'éthique, conditions de culture variables, composition cellulaire contrôlée, élimination de facteurs indissociables *in vivo*, etc. Cependant, tout modèle possède des limites. Il est donc primordial d'établir les domaines de recherche où il est pertinent d'utiliser un certain modèle. Dans notre cas, une caractérisation pharmacologique partielle a été établie et démontre que les médias vasculaires sont aptes à être utilisées pour

l'étude de nombreuses molécules vasoactives. Par contre, elles présentent aussi certains comportements qui ne reflètent pas la situation *in vivo*. Ceci pourrait être attribuable aux conditions de culture ou à la durée prolongée de la culture. Ceci dit, cette culture prolongée peut être mise à profit pour soumettre les cellules musculaires lisses à des conditions qu'il serait impossible d'établir *in vivo*.

3.5 Conclusion

En conclusion, nous avons produit un modèle de média vasculaire contractile humaine à partir de sous-cultures pures de cellules musculaires lisses de la veine ombilicale. Ce modèle est facile d'utilisation et permet de mener plusieurs types d'expérience de contraction en utilisant du matériel et des réactifs classiques en pharmacologie vasculaire. D'autres études sont nécessaires afin d'élargir son champ d'utilisation, néanmoins, ce modèle paraît déjà voué à un avenir prometteur.

Chapitre IV

4. Influx calcique dans la média vasculaire contractile

4.1 Introduction

Notre média vasculaire humaine, produite par ingénierie tissulaire, constitue le premier modèle cellulaire contractile composé de cellules musculaires lisses humaines cultivées (en passage). Il est d'ailleurs le seul modèle de culture cellulaire à permettre une mesure quantitative des forces contractiles générées par des cellules musculaires lisses en réponse à des agonistes contractiles physiologiques. Ces mesures peuvent être obtenues grâce à un appareillage classique de mesure de contraction isométrique couramment utilisé dans les laboratoires de pharmacologie classique. Cette dernière qualité fait de ce modèle un outil particulièrement intéressant pour la recherche pharmacologique appliquée.

Dans le chapitre précédent, afin d'évaluer la pertinence et la polyvalence de ce modèle en tant qu'outil de recherche, nous avons entrepris l'étude des divers aspects de la réponse contractile de la média reconstruite suite à la stimulation par l'adénosine 5'-triphosphate (ATP). Dans ce chapitre, nous évaluerons les flux calciques intracellulaires se produisant dans les cellules musculaires lisses lors de cette réponse. En effet, pour plusieurs types cellulaires, des rôles fondamentaux sont attribués aux variations de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire cytoplasmique (Ca^{2+}_i) que ce soit dans les domaines de l'excitabilité ou de la contractilité cellulaire.⁶⁰⁶ Dans le cas des cellules musculaires lisses, il est établi qu'une augmentation de la concentration du Ca^{2+}_i entraîne la contraction cellulaire. Cet influx, indépendamment de son origine, mène à la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine musculaire.²⁶⁶ Ceci permet l'interaction myosine-actine et la génération de forces contractiles à partir de liens phosphore de haute énergie. L'étude des flux calciques lors de la contraction des cellules musculaires lisses a d'ailleurs mis à jour des modulations complexes de ces derniers dont l'amplitude, le taux de variation, la persistance et les sources

intracellulaires sont autant de paramètres qui permettent un contrôle précis de la réponse cellulaire (voir section 1.3.2.3.1 de l'introduction générale).

Dans ce chapitre, nous utiliserons une méthode basée sur la mesure quantitative de l'épifluorescence des cellules musculaires lisses chargées d'un fluorochrome sensible à la concentration d'ions calcium.⁶⁰⁷ Les médias reconstruites se sont avérées un très bon matériel pour l'étude des variations de la concentration du Ca^{2+}_i par cette technique. Parmi les 24 expériences réalisées, seulement trois se sont avérées non concluantes. Les médias cultivées produisent de très beaux tracés de fortes intensités, stables et dont les variations en réponse à des agonistes sont importantes et très nettes.

4.2 Matériel et méthode

4.2.1 *Tissus utilisés*

Les médias reconstruites utilisées pour cette étude étaient identiques à celles utilisées au cours des expériences de contraction présentées au chapitre précédent. Ainsi, veuillez vous référer à la section 3.2.1 pour plus de détails.

4.2.2 *Mesure des flux calciques*

La méthode de mesure assistée par ordinateur se fait grâce à un microfluoromètre (Fluorolog II, SPEX, Edison, NJ, USA) associé à un bain d'organe isolé horizontal à perfusion.⁶⁰⁷ Celle-ci est basée sur la propriété d'un fluorochrome, le Fura-2, d'absorber la lumière de 340nm lorsqu'il est lié aux ions Ca^{2+} , alors qu'il absorbe préférentiellement la lumière de 380nm en absence de

Ca^{2+} . Dans les deux cas, le Fura-2 émet de la lumière à 510nm. Ainsi, un fluoromètre envoie, par l'intermédiaire d'un microscope à épifluorescence, un rayon à 350nm sur les cellules chargées de Fura-2 et celui-ci enregistre la lumière émise, à 510nm, par le Fura-2 excité. Ensuite, le fluoromètre émet à 380nm et enregistre à 510nm toujours. Ces deux opérations sont effectuées plusieurs fois par seconde. Ainsi, des tracés de l'intensité lumineuse (à 510nm) en fonction du temps sont obtenus pour une excitation à 350nm et à 380nm pratiquement simultanément. La concentration de Ca^{2+}_i étant proportionnelle au rapport de l'intensité lumineuse émise lors de l'excitation à 350nm sur celle émise lors de l'excitation à 380nm (rapport 350/380), un graphique de ce rapport en fonction du temps présente les variations de concentration de Ca^{2+} dans le cytoplasme cellulaire.

De plus, il est possible de déterminer la concentration calcique réelle à laquelle est exposé le Fura-2 qui se trouve dans le cytoplasme des cellules chargées. Afin de calculer cette concentration de Ca^{2+} , il est nécessaire de procéder à une étape de calibration. Pour ce faire, les cellules sont, simultanément, perméabilisées partiellement par l'ionomycine ($20\mu\text{M}$), dépolarisées par 100mM de KCl, et stimulées par une dose massive de bradykinine ($10\mu\text{M}$) dans un tampon contenant 5mM de Ca^{2+} . Le but de cette étape est de saturer le fluorochrome intracellulaire de Ca^{2+} et de mesurer son rapport 350/380 que l'on nomme R_{max} . Par la suite, les cellules sont perfusées avec du tampon sans Ca^{2+} , contenant 20mM d'EGTA, jusqu'à ce que le rapport 350/380 soit stable: c'est le R_{min} . Enfin, en utilisant le R_{min} , le R_{max} , et en soustrayant le bruit de fond initial, il est possible d'obtenir un graphique de la concentration de Ca^{2+} cytoplasmique en fonction du temps.

4.2.3 *Chargement au Fura-2*

Avant le chargement, les tissus ont été équilibrés à une tension de 500mg à 800mg et rincés à plusieurs reprises par le tampon de Krebs (NaCl 119mM, KH_2PO_4 0.4mM, NaHCO_3 14.9mM, MgSO_4 1.17mM, glucose 5.5mM et CaCl_2 2.5mM), gazé avec un mélange 95% O_2 : 5% CO_2 , et maintenu à 37°C. Au moment du chargement, le tampon a été enlevé et le tissu a été rincé une fois par une solution composée de: 50 μg d'acétoxyméthyle de Fura-2 (Fura-2, AM; Molecular Probe, Eugene, OR, USA) repris dans 15 μl de DMSO, 15 μl d'acide pluronique (20% final) et 7.5 ml de tampon de Krebs. La média a été ensuite incubée 2h dans cette solution à 21°C dans l'obscurité. Au cours de cette incubation, le Fura-2, AM pénètre dans les cellules et, suite à une action enzymatique, est accumulé sous forme de Fura-2, molécule à laquelle la membrane cellulaire est relativement imperméable. La solution de chargement a été ensuite retirée et le tissu perfusé par le tampon de Krebs à 37°C pour éliminer le Fura-2, AM extracellulaire. Le chargement a été confirmé en comparant le spectre d'absorption (de 300nm à 400nm) avant et après chargement: l'apparition d'un pic d'absorption à 350nm indique la présence de Fura-2 lié au Ca^{2+} cytoplasmique. À moins de précisions contraires, tous les réactifs ont été obtenus de chez Sigma.

4.3 Résultats

4.3.1 *Le calcium extracellulaire et la réponse calcique à l'ATP*

4.3.1.1 Réponse en présence de Ca^{2+} extracellulaire

Une stimulation à l'ATP, en présence de Ca^{2+} extracellulaire, a été réalisée à 22 reprises, dans diverses conditions expérimentales, au cours de

11 expériences distinctes. Dans tous les cas, une augmentation rapide, intense et transitoire de la concentration de Ca^{2+}_i a été observée (figure 42). Pour huit de ces expériences, la calibration a été réalisée. Au cours de ces huit expériences, 10 stimulations ont été enregistrées pour une augmentation moyenne de Ca^{2+}_i de 993 ± 601 nm (min./max.: 380 nm à 2200 nm). Ces stimulations ont été toutes réalisées dans des conditions semblables mais non identiques. Ces résultats ont été obtenus avec des tissus âgés de 54 ± 17 jours (min./max.: 29-76). La réponse calcique n'a pas été influencée par l'âge des tissus. Ainsi, il apparaît clairement que les médias cultivées répondent à une stimulation à l'ATP par une augmentation du Ca^{2+}_i en présence de Ca^{2+} extracellulaire. Ceci correspond bien aux observations de contractilité présentées au chapitre précédent.

Bien que la présence d'une réponse calcique ait été très constante, le profil de variation du Ca^{2+}_i observé en réponse à l'ATP a été assez variable. En effet, 16 stimulations réalisés dans des conditions idéales ont produit un profil pouvant être classé dans une de ces trois catégories: le pic initial du Ca^{2+}_i , intense et transitoire, est suivi par un retour approximativement au niveau de base (n=5), par un plateau légèrement au-dessus du niveau de base (n=6), par une baisse sous le niveau de base puis un retour approximativement au niveau de base (n=5). Donc, les médias cultivées répondent toujours à une stimulation à l'ATP par une augmentation intense, rapide, et transitoire du Ca^{2+}_i . Cependant, le niveau du Ca^{2+}_i post-stimulation n'a pu être précisément établi. Néanmoins, il est clair que celui-ci est voisin du niveau de base.

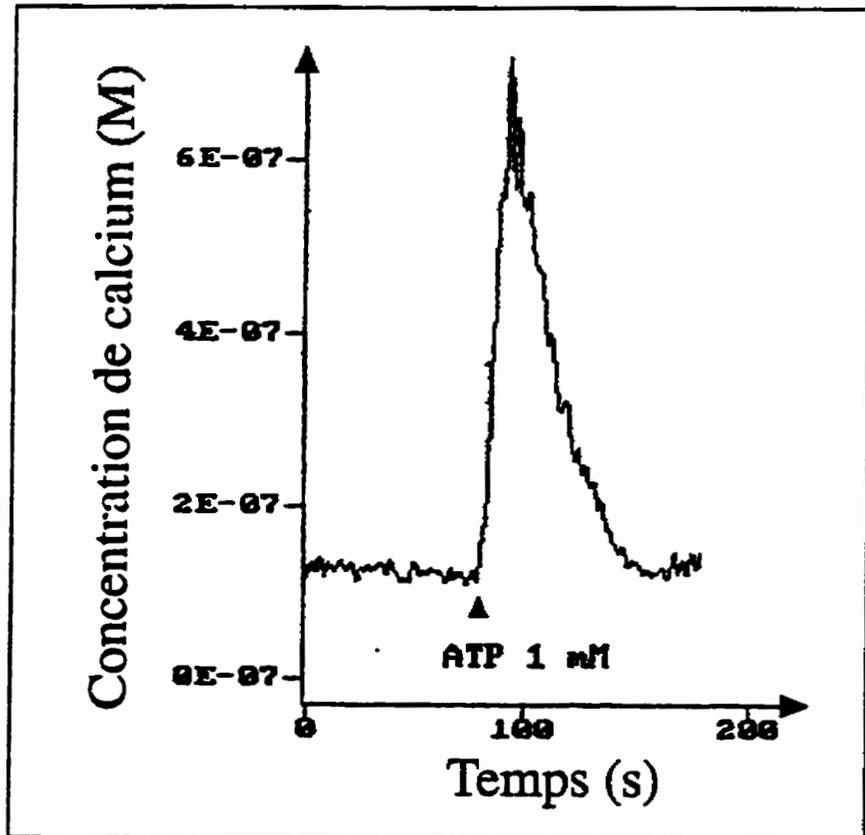


Figure 42: Concentration de calcium cytoplasmique en fonction du temps lors de la stimulation d'une média vasculaire par l'ATP (1mM) en présence de Ca^{2+} extracellulaire. STD: tampon standard avec Ca^{2+} . Un tracé représentatif de 10.

4.3.1.2 Réponse en l'absence de Ca^{2+} extracellulaire

L'augmentation du niveau de Ca^{2+}_i implique l'apport de Ca^{2+} dans le cytoplasme de la cellule. Ce Ca^{2+} peut provenir de deux sources: du milieu extracellulaire ou d'organelles de stockage de Ca^{2+} inaccessibles au Fura-2 (principalement le réticulum sarcoplasmique). Afin de déterminer la dépendance de l'augmentation du niveau de Ca^{2+}_i vis-à-vis du Ca^{2+} extracellulaire, des stimulations à l'ATP ont été réalisées en l'absence de Ca^{2+} extracellulaire.

Lors de telles expériences, les médias sont perfusés pendant 5 minutes avec un tampon de Krebs sans Ca^{2+} et en présence de 0.5mM d'EGTA. Ce traitement enlève toutes traces de Ca^{2+} extracellulaire et abaisse visiblement le niveau de Ca^{2+}_i (figure 43). Une stimulation à l'ATP, en absence de Ca^{2+} extracellulaire, a été réalisée à 14 reprises, dans diverses conditions expérimentales, au cours de 10 expériences distinctes. Dans tous les cas, une augmentation nette et transitoire du Ca^{2+}_i a été observée. De plus, cet influx calcique a été toujours suivi par une baisse, plus ou moins intense, du niveau de Ca^{2+}_i sous le niveau de base pré-stimulation, et par l'établissement, lors d'enregistrement suffisamment longs, d'un plateau à ce niveau (figure 44). Pour 5 des stimulations réalisées dans des conditions idéales, la calibration (une étape nécessaire à l'évaluation de la concentration réelle de Ca^{2+}_i) a été obtenue. Une augmentation moyenne de Ca^{2+}_i de 585 ± 523 nm (min./max.: 200 nm à 1500 nm) a été observée. Ainsi, il apparaît clairement que la réponse calcique des médias cultivées, suite à la stimulation par l'ATP, ne dépend pas entièrement de la présence de Ca^{2+} extracellulaire.

4.3.1.3 «Quench» par le manganèse

Afin de mettre en évidence l'entrée du Ca^{2+} extracellulaire lors de la stimulation à l'ATP, la technique dite du «manganese quench» a été utilisée. Celle-ci est basée sur les propriétés du Mn^{2+} de pouvoir pénétrer dans la cellule par les canaux calciques et de produire l'extinction, «quench», du Fura-2. Ainsi, lorsque le Ca^{2+} extracellulaire est remplacé par du Mn^{2+} (2.5mM), celui-ci pénètre lentement, mais à un rythme constant, dans la cellule et entre en compétition avec le Ca^{2+} pour le Fura-2. Ceci entraîne l'extinction de ce dernier, ce qui se traduit par une baisse linéaire de l'intensité de la lumière émise («quench»).

Cette entrée du Mn^{2+} ne s'opère pas par les canaux calciques, qui sont fermés, mais par perméabilité non spécifique à travers la membrane cellulaire. Au moment de la stimulation par l'ATP, s'il y a ouverture de canaux calciques pour permettre l'entrée de Ca^{2+} extracellulaire, l'entrée de Mn^{2+} extracellulaire sera accélérée et l'extinction du Fura-2 progressera plus rapidement.

La figure 45 présente un bel exemple de l'extinction produite par le Mn^{2+} . À 600s, la média est en absence de Ca^{2+} extracellulaire depuis 5 minutes et le niveau de Ca^{2+}_i est stable. Le Mn^{2+} est ajouté à 660s produisant une baisse linéaire de l'intensité de la lumière émise aussi bien par l'excitation à 350nm (tracé du haut) que celle à 380nm (tracé du bas). À 800s, l'ATP est ajoutée et produit une élévation transitoire du Ca^{2+}_i après quoi l'intensité de la lumière émise reprend sa descente linéaire. Cette dernière diminution linéaire se fait: 1) dans le prolongement et 2) parallèlement à la baisse observée avant la stimulation. Ceci démontre respectivement que: 1) le taux d'entrée de Mn^{2+} n'a pas varié au cours de la stimulation par l'ATP et que 2) le taux d'entrée de Mn^{2+} reste le même après stimulation par l'ATP (très légère diminution). En conclusion, la technique du «manganese quench» n'a pas permis de mettre en évidence l'entrée de Ca^{2+} extracellulaire lors de la stimulation par l'ATP.

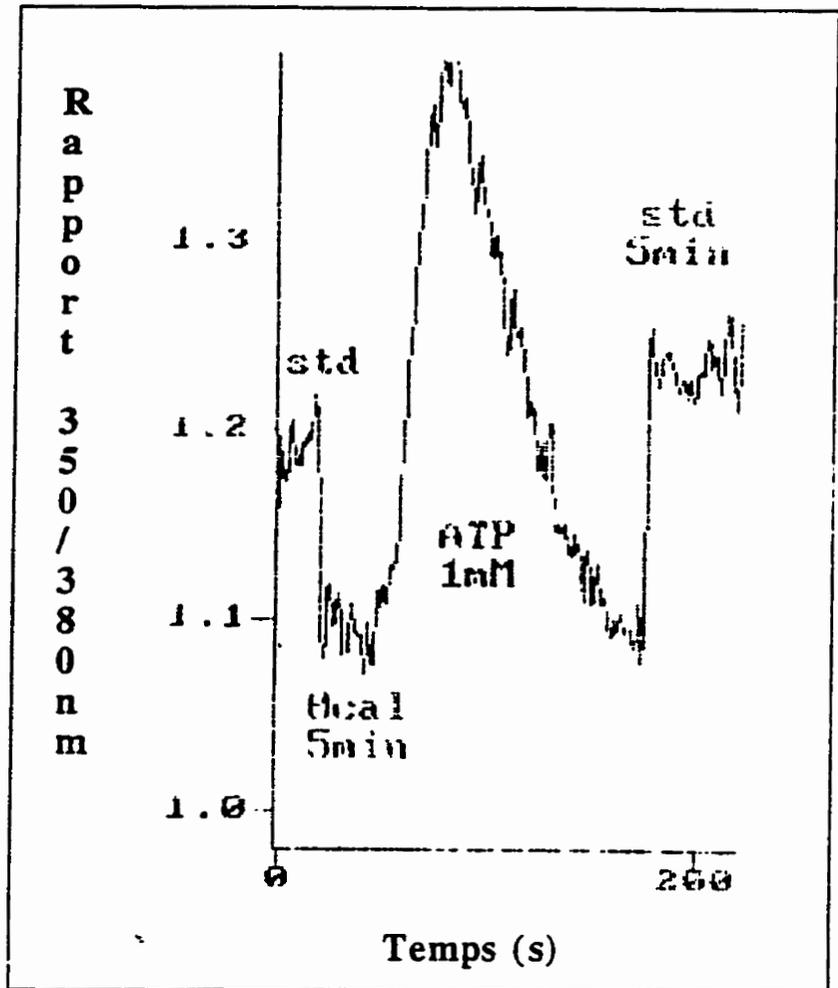


Figure 43: Rapport 350/380nm en fonction du temps lors de la stimulation d'une média vasculaire par l'ATP (1mM) en absence de Ca^{2+} extracellulaire. STD: tampon standard avec Ca^{2+} . 0CAL: tampon sans Ca^{2+} avec 0.5mM d'EGTA. Un tracé représentatif de 10.

Remarques générales: 1) La concentration de Ca^{2+}_i est proportionnelle au rapport de l'intensité lumineuse émise lors de l'excitation à 350nm sur celle émise lors de l'excitation à 380nm. 2) Dans ce type d'enregistrement, celui-ci est interrompue lors des rinçages dont les durées sont indiquées. Le niveau observé est celui à la fin de la période de rinçage. L'échelle du temps n'est donc pas continue.

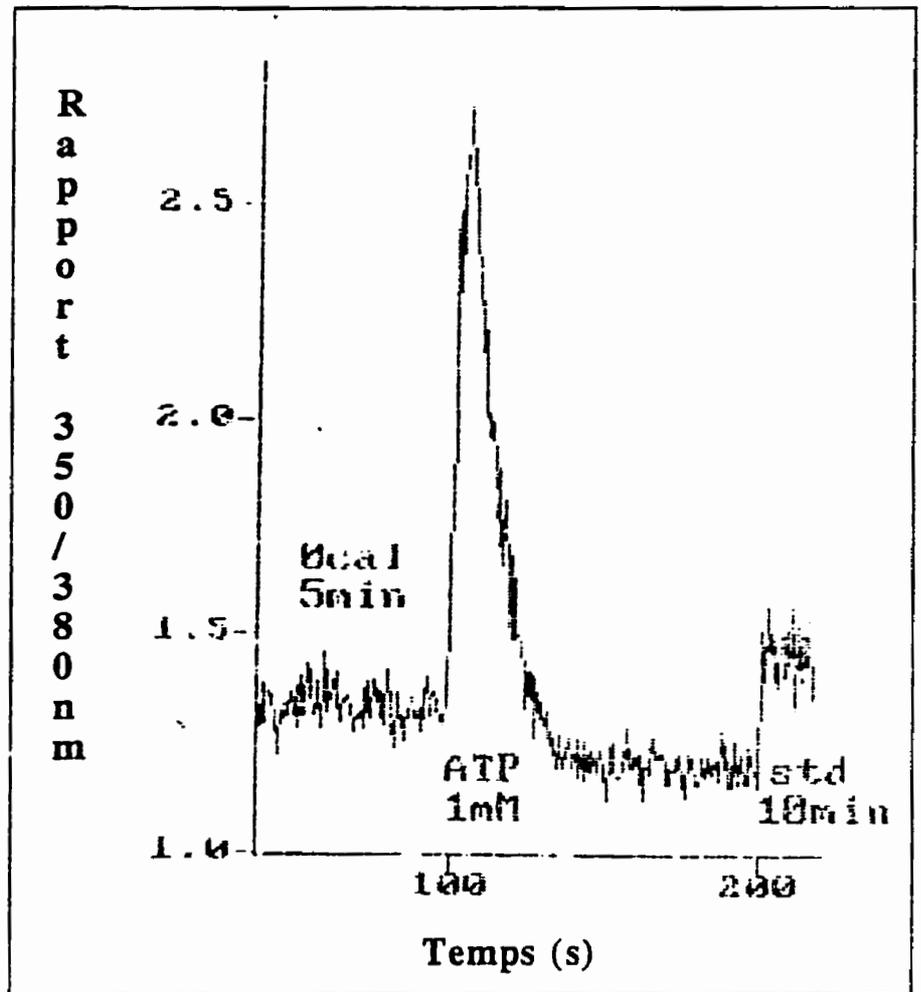


Figure 44: Rapport 350/380nm en fonction du temps lors de la stimulation d'une média vasculaire par l'ATP (1mM) en absence de Ca^{2+} extracellulaire. STD: tampon standard avec Ca^{2+} . 0CAL: tampon sans Ca^{2+} avec 0.5mM d'EGTA. Un tracé représentatif de 4.

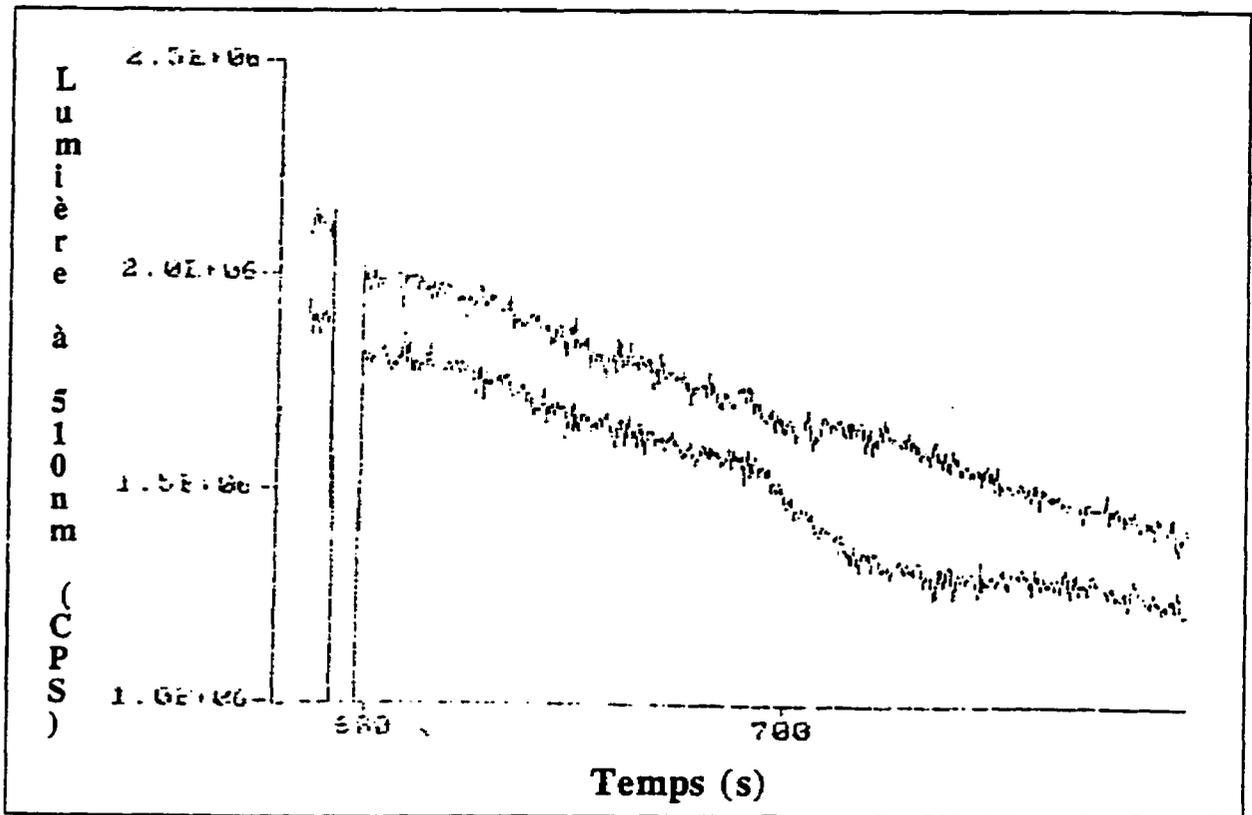


Figure 45: Lumière émise à 510nm en fonction du temps et la longueur d'onde d'excitations (350nm = tracé du haut, 380nm = tracé du bas) lors de la stimulation d'une média reconstruite par l'ATP (1mM) en présence de Mn^{++} extracellulaire. Un tracé représentatif de 2. (Voir le texte pour une description détaillée).

4.3.1.4 Le cas du nickel

Le Ni^{2+} est couramment utilisé lors d'expériences sur les flux calciques comme bloqueur non spécifique des canaux calciques. Il a été utilisé afin de déterminer si le léger plateau du Ca^{2+}_i , parfois observé après la réponse calcique à l'ATP, était le résultat d'une entrée de Ca^{2+} extracellulaire.

Lors de 3 expériences distinctes, 5 perfusions au Ni^{2+} (1 ou 0.1mM) ont été réalisées immédiatement après une stimulation à l'ATP. À notre grand étonnement, lors de toutes les stimulations, le Ni^{2+} a produit une forte élévation transitoire du Ca^{2+}_i (figure 46). Ce pic calcique est généralement suivi d'une baisse du niveau du Ca^{2+}_i sous le niveau de base et d'une remontée de celui-ci vers le niveau de base. Ainsi, le traitement au Ni^{2+} produit une élévation intense et transitoire du Ca^{2+}_i semblable à celle observée lors d'une stimulation à l'ATP. Le Ni^{2+} se comporte donc, avec les médias cultivées, comme un agoniste calcique plutôt qu'un bloqueur non spécifique des canaux calciques.

4.3.1.5 Utilisation du lanthane

Le La^{3+} possède également la propriété de bloquer les canaux qui permettent l'entrée du Ca^{2+} extracellulaire dans la cellule. Il a été utilisé une seule fois pour déterminer si le niveau de Ca^{2+}_i post-stimulation à l'ATP était dépendant d'une entrée continue de Ca^{2+} extracellulaire. La figure 47 présente cette expérience. Suite à la stimulation à l'ATP, un faible plateau du niveau de Ca^{2+}_i post-stimulation est présent. Le La^{3+} (0.2mM) est alors ajouté, en présence de Ca^{2+} extracellulaire, et une baisse du Ca^{2+}_i semble survenir. Malheureusement, malgré une forte fluorescence, le niveau de base de Ca^{2+}_i n'est pas stable et les résultats obtenus ne sont pas nets. En conclusion, cette expérience unique suggère

que le faible plateau du niveau de Ca^{2+}_i observé suite à la stimulation à l'ATP pourrait être dû à une entrée de Ca^{2+} extracellulaire.

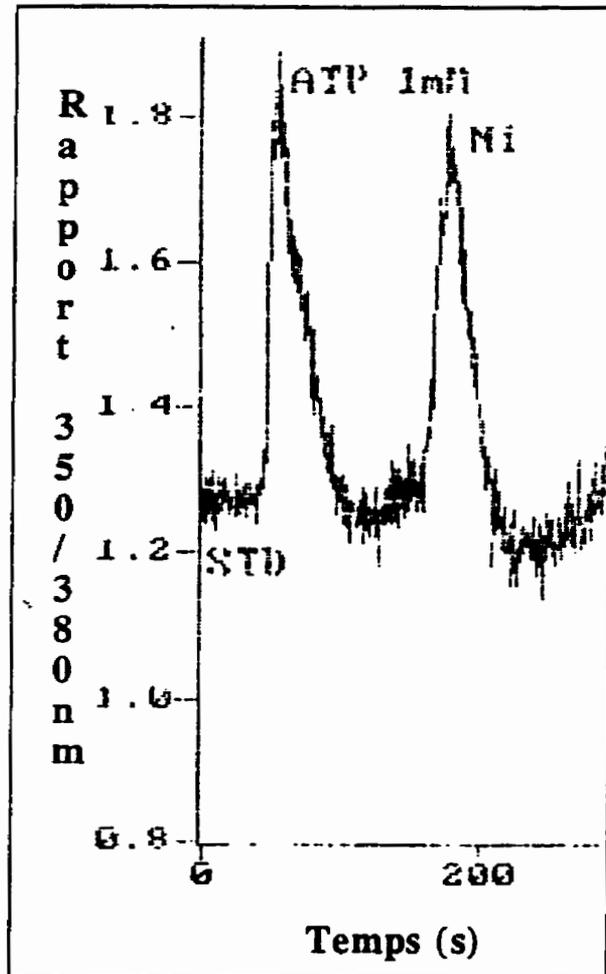


Figure 46: Rapport 350/380nm en fonction du temps lors de la stimulation d'une média vasculaire par l'ATP (1mM) et le Ni^{2+} (1mM). STD: tampon standard avec Ca^{2+} . Un tracé représentatif de 3.

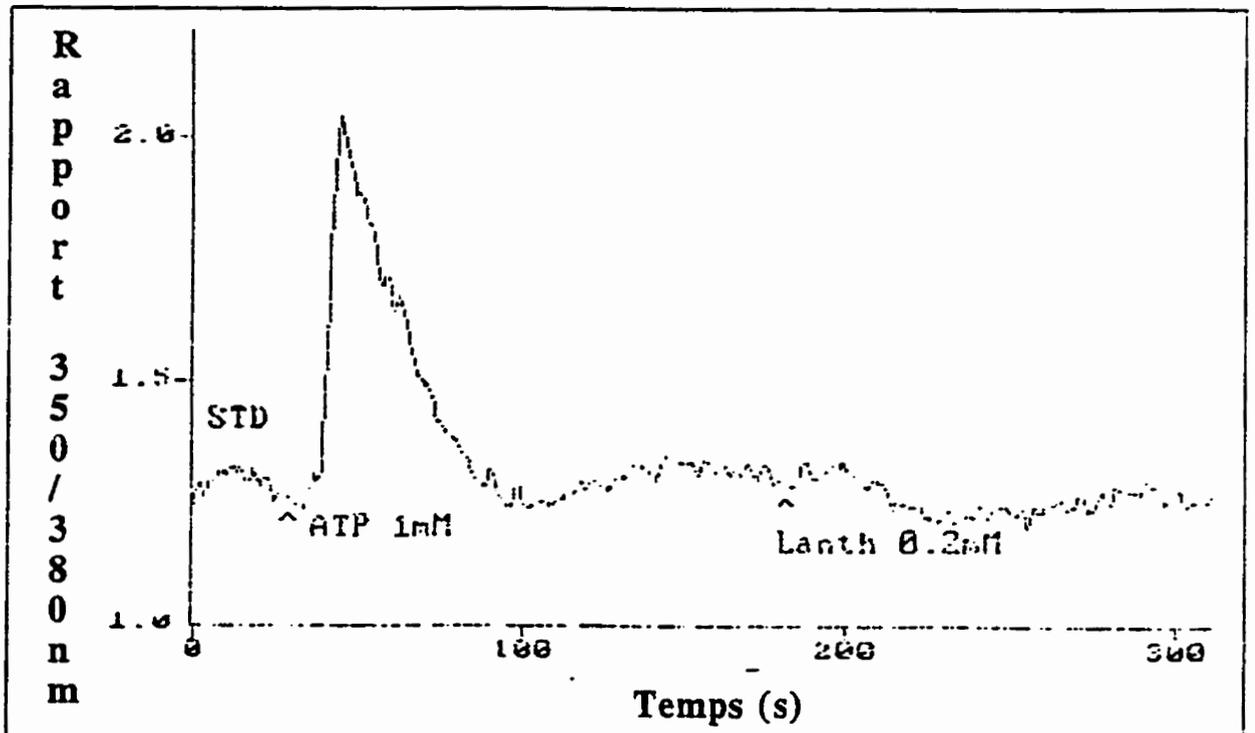


Figure 47: Rapport 350/380nm en fonction du temps lors de la stimulation d'une média vasculaire par l'ATP (1mM) et le La^{3+} (0.2mM). STD: tampon standard avec Ca^{2+} . Un tracé unique.

4.3.2 Les stocks calciques intracellulaires et la réponse à l'ATP

4.3.2.1 Sensibilité à la caféine

Puisque le rôle du Ca^{2+} extracellulaire semble être secondaire lors de la réponse calcique suite à la stimulation à l'ATP (voir section 4.3.1.2), la source principale de Ca^{2+} devrait être les stocks calciques retenus dans le réticulum sarcoplasmique. Ces stocks sont définis par leur sensibilité à certaines drogues. La caféine est un agoniste des canaux calciques du réticulum sarcoplasmique et permet donc de vider les stocks calciques sensibles à la caféine.^{285, 608}

Afin de déterminer l'existence de stocks calciques sensibles à la caféine, cette dernière a été utilisée à une concentration de 10mM, dans un tampon sans Ca^{2+} et avec EGTA. Aucun effet n'a été observé au cours des 50s de perfusion avec la drogue. Une seconde expérience a été effectuée, à 25°C au lieu de 37°C, car la caféine aurait un effet plus marqué à cette température. De plus, le temps d'enregistrement a été allongé à 100s post-stimulation. Cette expérience donna les mêmes résultats que la précédente. Lors d'une troisième expérience, la perfusion de la caféine, 10mM à $\approx 25^\circ\text{C}$, a été précédée par une perfusion avec un tampon sans Ca^{2+} , pendant 5 minutes, afin de mettre en relief le Ca^{2+} libéré par la caféine. Cependant, lors de la perfusion à la caféine, seule une baisse du Ca^{2+}_i a été observée. Cette expérience a été répétée mais, cette fois, l'enregistrement post-stimulation a été allongé à 230s consécutives et des lectures après 5, 10 et 13 minutes ont été effectuées (figure 48). Cette expérience confirme toutes celles réalisées jusque là et montre que l'absence de réponse n'est pas imputable à des limites d'enregistrement.

En présence de Ca^{2+} extracellulaire, une perfusion à la caféine (10mM, 37°C) ne modifie pas l'intensité de la réponse calciques suite à une stimulation à l'ATP (figure 49). De plus, cette expérience révèle que la perfusion à la caféine cause une baisse du Ca^{2+}_i lors de la présence de Ca^{2+} extracellulaire. Toutefois, certains événements inexplicables au début de cette expérience laissent flotter un doute quant à la qualité de cette observation. La perfusion à la caféine en présence de Ca^{2+} extracellulaire a donc été répétée en fin d'expérience (figure 49). Celle-ci confirme la baisse de Ca^{2+}_i lors de la perfusion en présence de Ca^{2+} extracellulaire. En conclusion, aucun stocks sensibles à la caféine n'ont pu être mis en évidence lors des 5 expériences réalisées à cette fin.

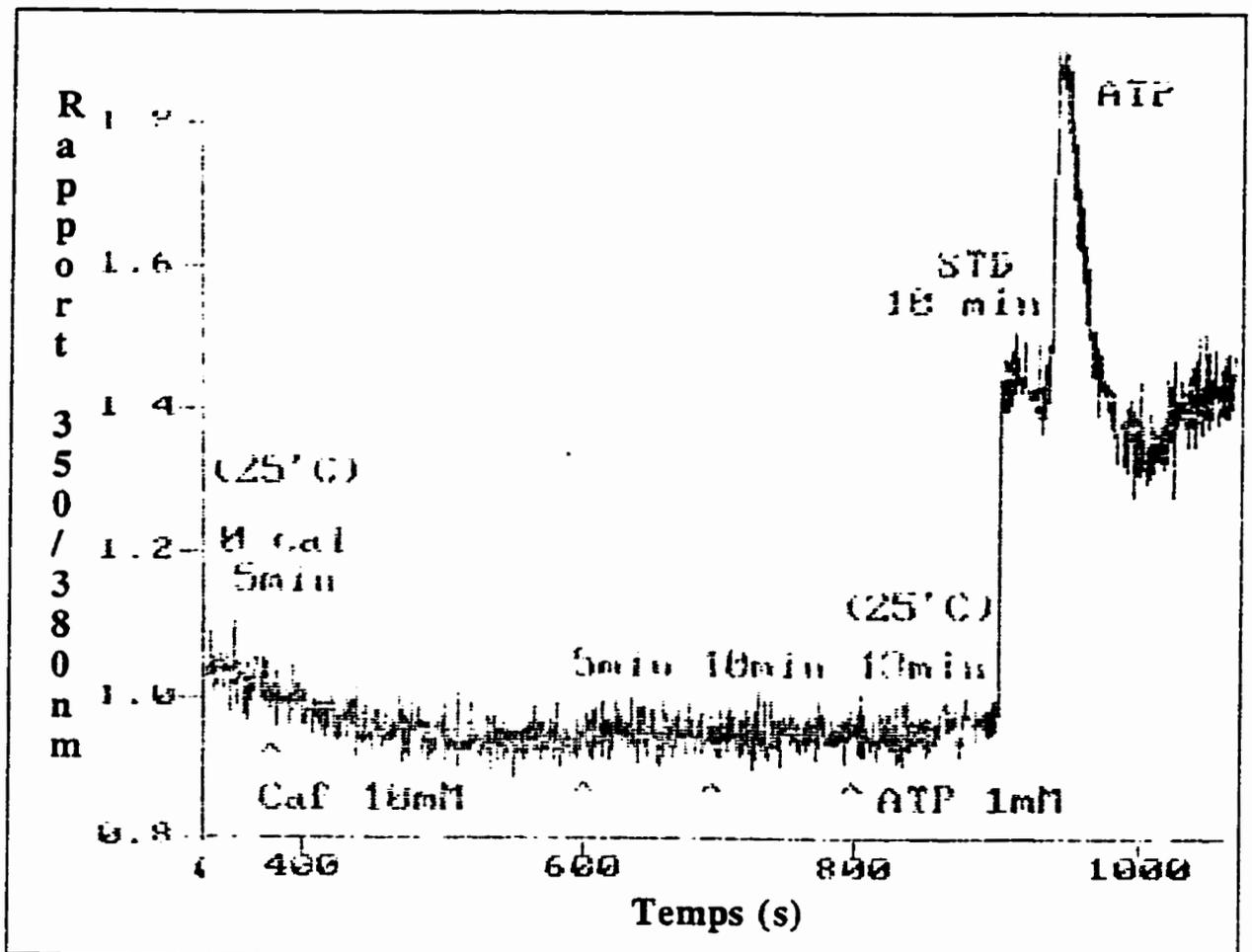


Figure 48: Rapport 350/380nm en fonction du temps lors de la stimulation d'une média vasculaire par la caféines (10mM). STD: tampon standard avec Ca^{2+} . 0CAL: tampon sans Ca^{2+} avec 0.5mM d'EGTA. Un tracé représentatif de 3.

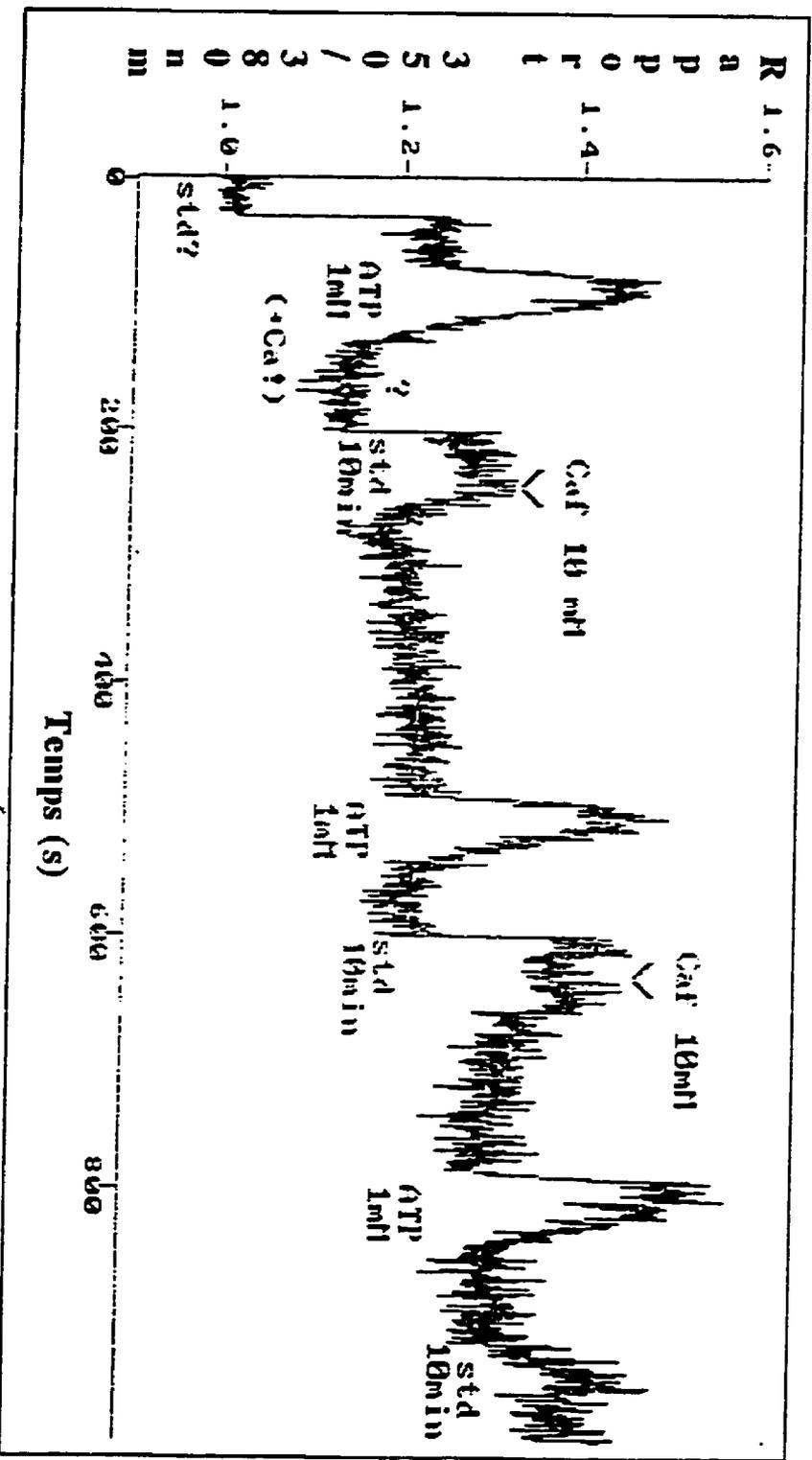


Figure 49: Rapport 350/380nm en fonction du temps lors de la stimulation d'une média vasculaire par la caféines (10mM) et à l'ATP (1mM). STD: tampon standard avec Ca⁺⁺. 0CAL: tampon sans Ca⁺⁺ avec 0.5mM d'EGTA. (?): comportement inexplicable. Un tracé représentatif de 2.

4.3.2.2 Sensibilité à la ryanodine

La ryanodine est une drogue qui ouvre les mêmes canaux calciques du réticulum sarcoplasmique que la caféine. Le stock calcique sollicité lors de ces stimulations est d'ailleurs connu sous le nom de «stock sensible à la ryanodine» («ryanodine sensitive»).⁶³⁶ Dans le but de confirmer les résultats obtenus avec la caféine, quelques expériences ont été réalisées avec la ryanodine.

Une perfusion de 3 minutes avec 10 μM de ryanodine, en l'absence de Ca^{2+} extracellulaire, ne modifie pas significativement la réponse calcique à l'ATP. Une légère baisse du niveau Ca^{2+}_i a été observée et pourrait simplement être attribuable à l'absence de Ca^{2+} extracellulaire. Par contre, lors d'une autre expérience, la perfusion à la ryanodine, en présence de Ca^{2+} extracellulaire, fit augmenter significativement le niveau de Ca^{2+}_i et sembla inhiber sérieusement l'augmentation du niveau de Ca^{2+}_i en réponse à l'ATP. Cependant, ce tissu avait subi plusieurs stimulations auparavant et ces observations devaient être confirmées. La figure 50 montre qu'une perfusion à la ryanodine provoque une augmentation nette du Ca^{2+}_i en présence de Ca^{2+} extracellulaire. Ceci confirme les résultats précédents et laisse croire à la présence de stocks sensibles à la ryanodine. Cette augmentation du Ca^{2+}_i disparaît après 10 minutes de perfusion ce qui est cohérent avec l'épuisement des stocks sensibles à la ryanodine. La média a été alors débarrassée du Ca^{2+} extracellulaire (pour éviter que les stocks se rechargent) et stimulée à l'ATP (figure 50). La réponse calcique produite est nettement moins intense que celle obtenue avant perfusion à la ryanodine. De plus, 15 minutes de rinçage avec Ca^{2+} extracellulaire, afin de recharger les stocks, suivies de 5 minutes de rinçage sans Ca^{2+} extracellulaire, permettent à la média de répondre à l'ATP avec une intensité comparable à celle observée avant le traitement à la ryanodine (figure 50). La réponse à la bradykinine semble également être sensible à la ryanodine. En conclusion des stocks sensibles à la ryanodine semblent bien sollicités lors de la stimulation à l'ATP.

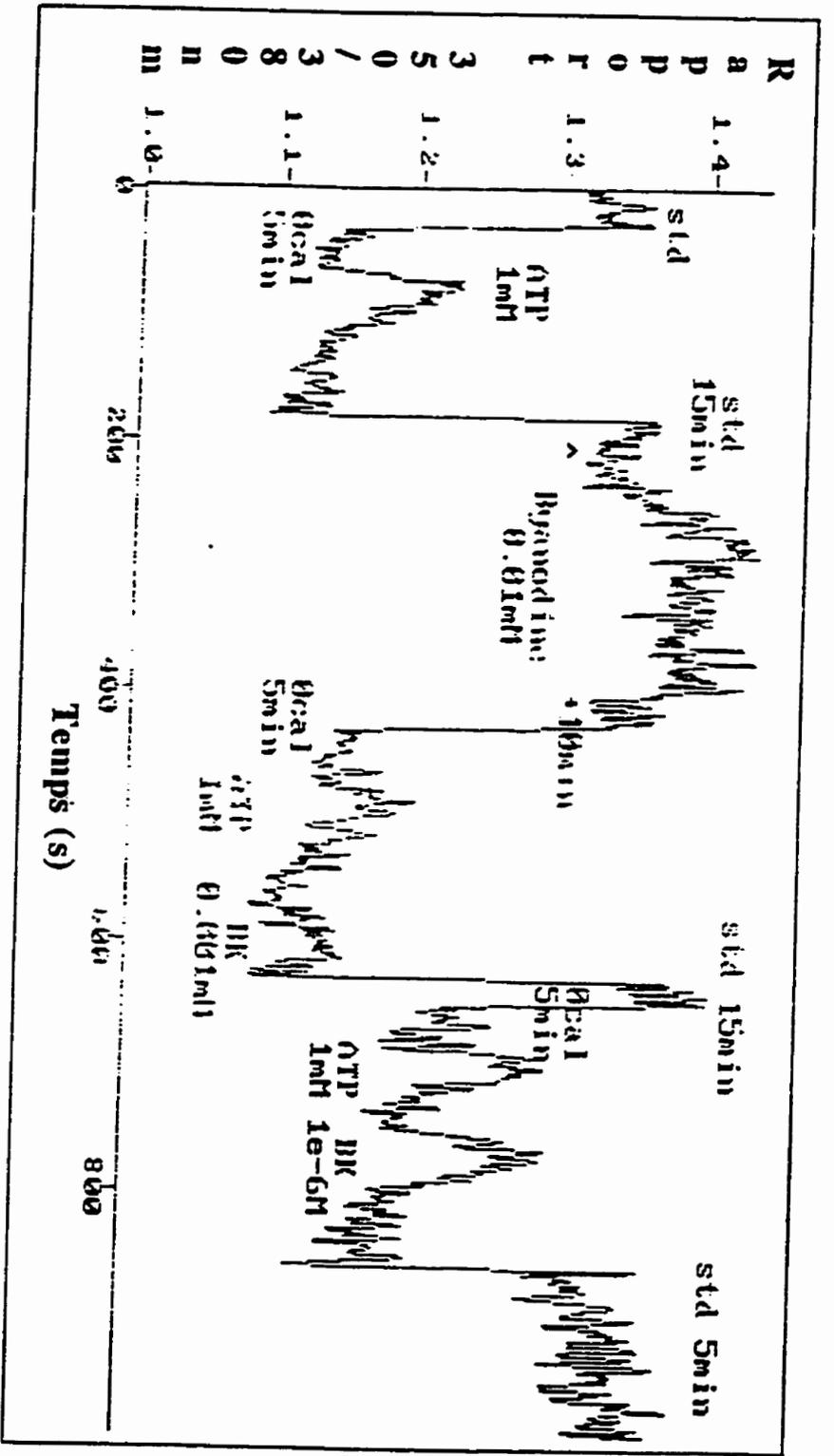


Figure 50: Rapport 350/380nm en fonction du temps lors de la stimulation d'une média vasculaire par la ryanodine (10µM) et à l'ATP (1mM). STD: tampon standard avec Ca⁺⁺. 0CAL: tampon sans Ca⁺⁺ avec 0.5mM d'EGTA. BK: bradykinine. Un tracé représentatif de 2.

4.3.2.3 Sensibilité à la thapsigargine

La thapsigargine est un inhibiteur irréversible de la pompe calcique du réticulum sarcoplasmique.⁶⁰⁶ La sensibilité à cette drogue définit les «stocks sensibles à la thapsigargine». La thapsigargine est utilisée en suivant la même stratégie que celle utilisée pour la caféine ou la ryanodine.

Trois expériences ont montré que la thapsigargine (5 μ M), en l'absence de Ca²⁺ extracellulaire, ne produit aucun effet immédiat (~150s à 200s) sur le niveau de Ca²⁺_i (figure 51). De plus, deux expériences ont indiqué que, malgré le traitement à la thapsigargine, même prolongé, les cellules sont en mesure de refaire rapidement, et au moins partiellement, leurs stocks calciques en présence de Ca²⁺ extracellulaire. Afin de mettre en évidence l'effet de la thapsigargine, la figure 51 présente également les résultats obtenus lors d'une perfusion prolongée à la thapsigargine (15 minutes), en l'absence de Ca²⁺ extracellulaire. Ainsi, cette perfusion, précédée par un rinçage de 5 minutes sans Ca²⁺ extracellulaire, abolit presque complètement la réponse calcique à l'ATP. Cependant, l'expérience témoin démontre que l'inhibition de la réponse observée peut s'expliquer par la simple privation de Ca²⁺ extracellulaire pendant 20 minutes (figure 52). L'expérience suivante tenta de contourner le problème en procédant à une perfusion prolongée à la thapsigargine (15 minutes), en présence de Ca²⁺ extracellulaire, et suivie immédiatement par une perfusion à la thapsigargine de 5 minutes, sans Ca²⁺ extracellulaire, et enfin, par une stimulation à l'ATP. Ce traitement n'a produit aucune inhibition de la réponse calcique à l'ATP. Rappelons toutefois que cette expérience a été réalisée avec un tissu très peu réactif. En conclusion, les stocks calciques sensibles à la thapsigargine n'ont pu être mis en évidence par les expériences réalisées.

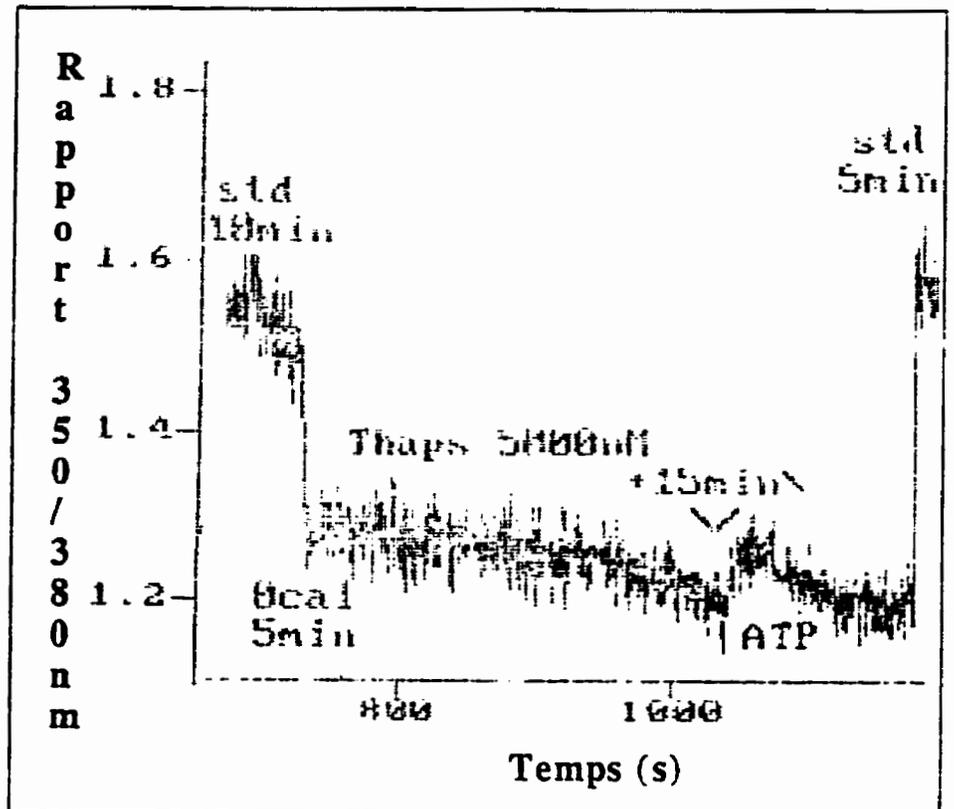


Figure 51: Rapport 350/380nm en fonction du temps lors de la stimulation d'une média vasculaire par la thapsigargine ($5\mu\text{M}$) et à l'ATP (1mM). STD: tampon standard avec Ca^{2+} . 0CAL: tampon sans Ca^{2+} avec 0.5mM d'EGTA.

4.3.2.4 La réponse calcique au chlorure de potassium

Le KCl (100mM) est régulièrement utilisé lors de l'étude des influx calciques dans les cellules musculaires lisses car, en dépolarisant la membrane cellulaire, il provoque l'ouverture de canaux calciques dépendants du potentiel («voltage operated channels»), ce qui entraîne une entrée massive du Ca^{2+} extracellulaire dans le cytoplasme cellulaire. Ce traitement est utilisé pour provoquer une contraction rapide et maximale des cellules et favorise le

remplissage des stocks intracellulaires en fournissant une forte concentration de Ca^{2+} cytoplasmique.

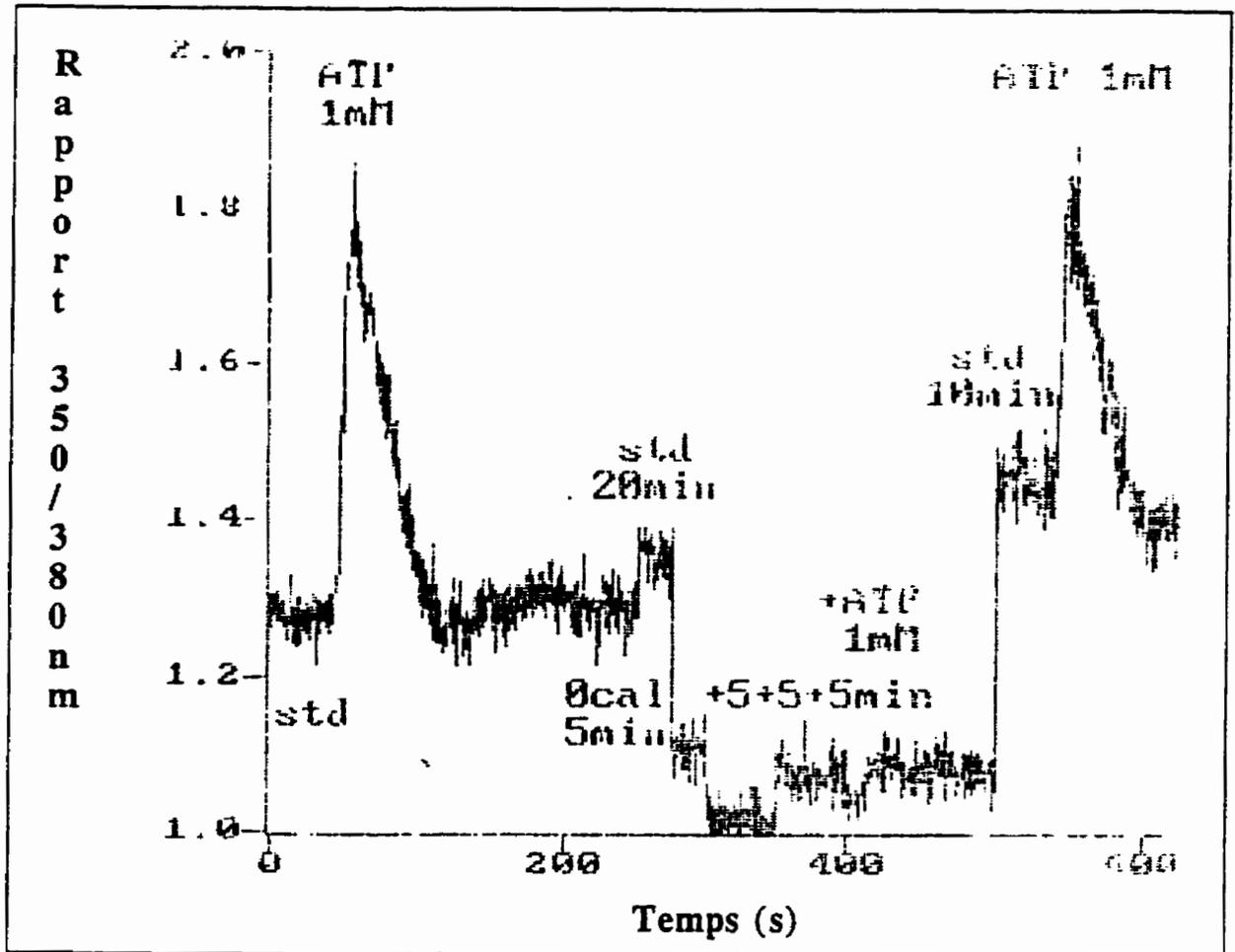


Figure 52: Rapport 350/380nm en fonction du temps lors de la stimulation d'une média vasculaire par l'ATP (1mM) après une longue perfusion sans Ca^{2+} . STD: tampon standard avec Ca^{2+} . 0CAL: tampon sans Ca^{2+} avec 0.5mM d'EGTA.

Au cours des nombreuses expériences réalisées, un rinçage de 5 minutes au KCl 100mM a été utilisé à plusieurs reprises dans le but de recharger les stocks calciques intracellulaires et, ainsi, de permettre des réponses calciques

lors d'une deuxième ou troisième stimulation. Il est rapidement devenu évident que les médias cultivées ne répondaient pas de façon classique à ce traitement. En effet, le KCl n'a entraîné ni une montée fulgurante du Ca^{2+}_i , ni une contraction rapide de la média cultivée. En effet, tel que présenté dans le chapitre précédent, le KCl provoque une contraction très importante, et soutenue, des médias cultivées mais celle-ci ne se développe qu'en plusieurs minutes. Afin de mieux comprendre ce phénomène, les effets du KCl sur le niveau de Ca^{2+}_i des médias cultivées ont été analysés.

Lors de 8 expériences distinctes, 11 stimulations au KCl firent l'objet d'un enregistrement permettant d'observer une faible augmentation du niveau de Ca^{2+}_i . La figure 53 présente les effets du KCl dans des conditions optimales (niveau de base stable et enregistrement prolongé). Une faible augmentation de Ca^{2+}_i a pu être observée suite à la stimulation au KCl. Celle-ci établit un plateau de l'ordre de 50nM, pendant environ 100s, qui s'estompe progressivement, et qui a disparu après 12 minutes. Cette expérience montre aussi qu'en présence continue de KCl le niveau de Ca^{2+}_i reste au niveau de base pendant 60 minutes, et que la cellule reste en mesure de répondre normalement à une stimulation par 1mM d'ATP. Une seconde expérience a confirmé ces résultats: plateau d'environ 50nM, retour au niveau de base en moins de 5 minutes, stabilité du niveau de base jusqu'à 60 minutes et persistance de la réponse calcique suite à une stimulation après 60 minutes. Deux expériences additionnelles ont situé la durée de cette réponse calcique entre 3 et 5 minutes et confirment son ordre de grandeur. Par ailleurs, la nitrendipine (1 μ M), qui est un bloqueur des canaux calciques dépendants du potentiel, n'a pas influencé pas la réponse au KCl lorsqu'elle est ajoutée après la disparition du plateau initial. En conclusion, le traitement au KCl 100mM provoque une légère augmentation du niveau de Ca^{2+}_i qui retourne au niveau de base en 3 à 5 minutes.

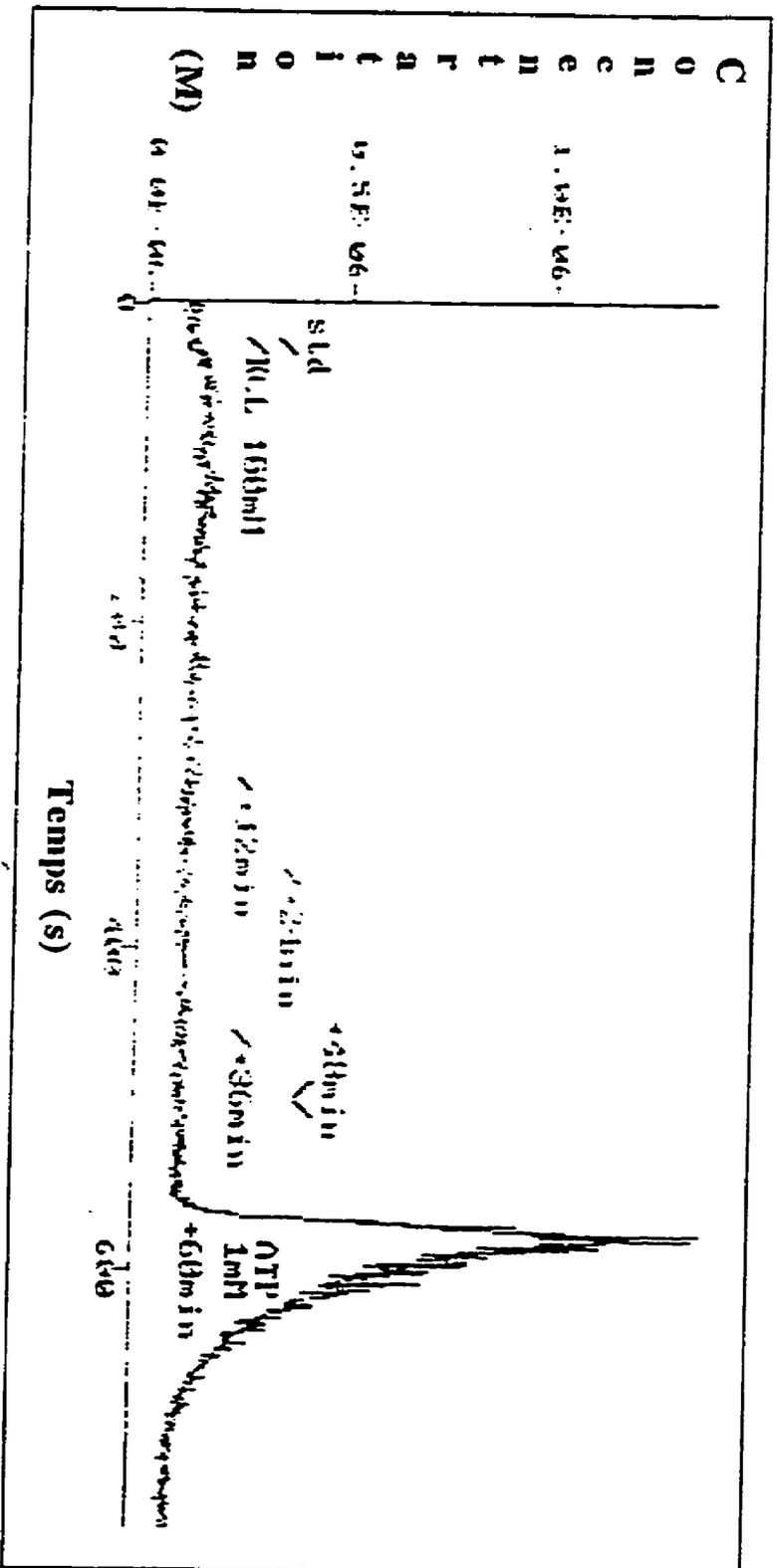


Figure 53: Concentration du calcium cytoplasmique en fonction du temps lors de la stimulation d'une média vasculaire par le KCl (100mM) et l'ATP (1 mM). STD: tampon standard avec Ca⁺⁺. "/" indique le temps de stimulation par le KCl. L'échelle du temps n'est donc pas continue. Un tracé représentatif de 4.

4.3.2.5 La réponse calcique à la bradykinine

La bradykinine (BK) a été utilisée à 7 reprises (10 μ M), au cours de 5 expériences distinctes, et s'est avérée être un agoniste extrêmement puissant (figure 54). Celle-ci semble d'ailleurs être plus puissante que l'ATP à 1mM. Après le pic initial de Ca²⁺_i, en présence de Ca²⁺ extracellulaire, le niveau de Ca²⁺_i établit un plateau au dessus du niveau de base (figure 55, première stimulation). Par ailleurs, le Ca²⁺ extracellulaire semble jouer un rôle mineur dans la réponse calcique à la BK; il serait responsable de 20% à 25% de la contraction (figure 55, seconde stimulation). En l'absence de Ca²⁺ extracellulaire, le niveau de Ca²⁺_i post-stimulation chute sous le niveau de base initial comme cela a été le cas avec l'ATP (n=2). En conclusion, la BK est un agoniste très puissant et semble avoir la même dépendance face au Ca²⁺ extracellulaire que la réponse calcique générée par l'ATP.

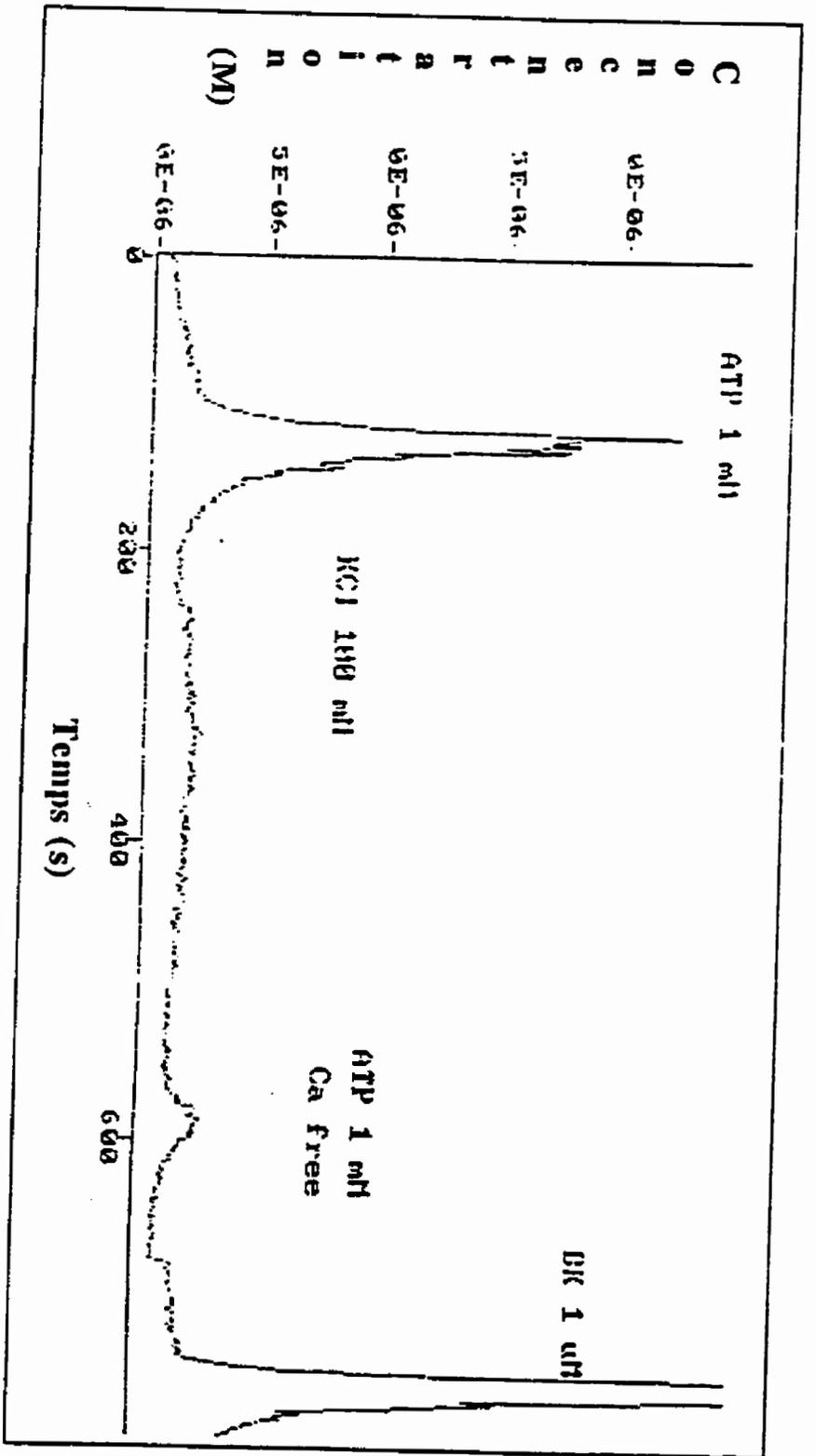


Figure 54: Concentration du calcium cytoplasmique en fonction du temps lors de la stimulation d'une média vasculaire par la bradykinine (1 μM) et l'ATP (1 mM). STD: tampon standard avec Ca⁺⁺.

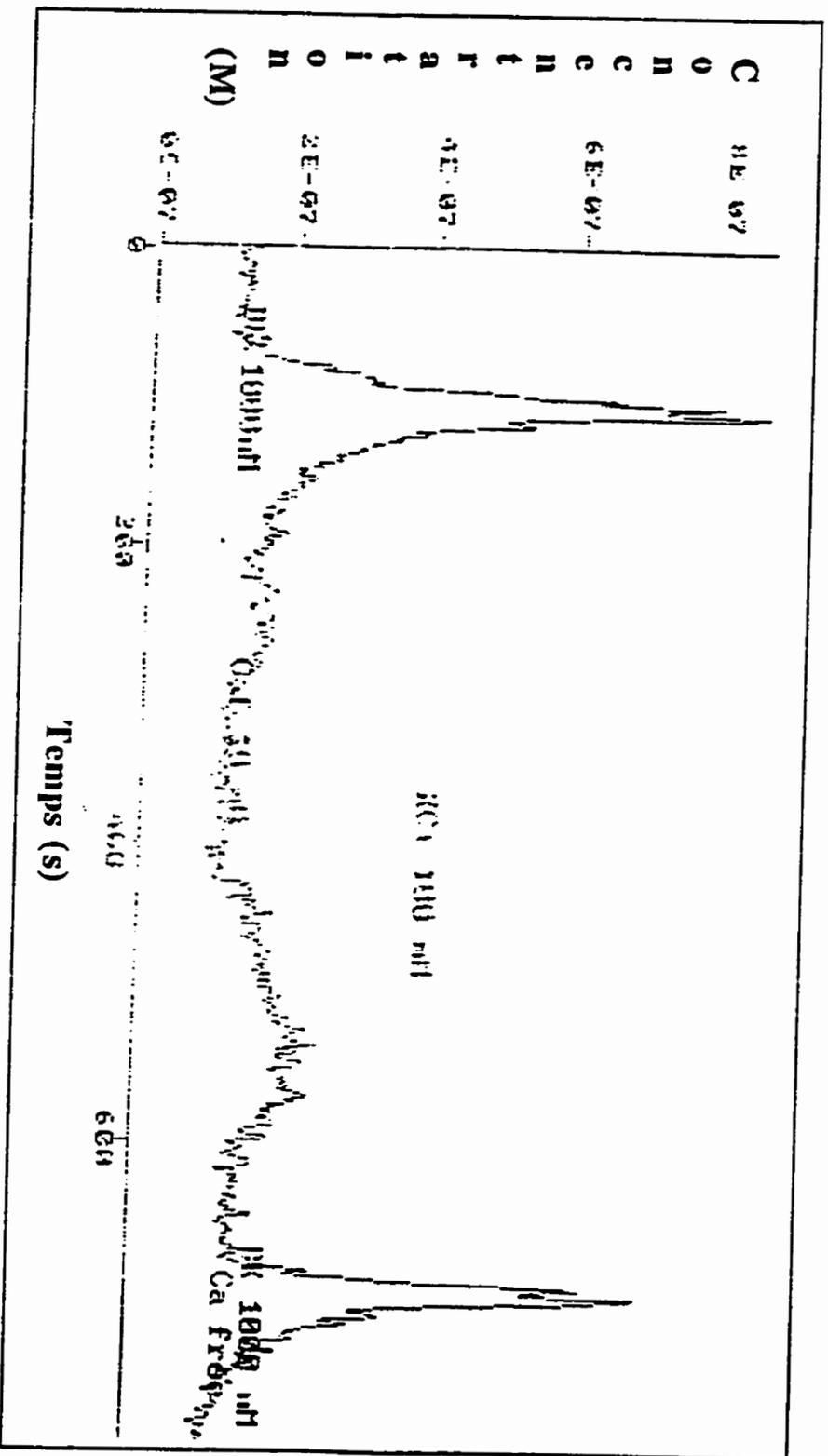


Figure 55: Concentration du calcium cytoplasmique en fonction du temps lors de la stimulation d'une média vasculaire par la bradykinine (1 μ M) avec et sans Ca⁺⁺ extracellulaire.

4.4 Discussion

4.4.1 *Le rôle du Ca^{2+} extracellulaire dans la réponse calcique à l'ATP*

Les médias cultivées ont toujours répondu à une stimulation à l'ATP par une augmentation intense, rapide et transitoire du Ca^{2+}_i et ce, en présence ou en absence de Ca^{2+} extracellulaire. Cependant, au cours des multiples expériences réalisées en présence de Ca^{2+} extracellulaire, le niveau du Ca^{2+}_i post-stimulation n'a pu être établi de façon précise. En effet, compte tenu de l'échelle des graphiques, il est parfois malaisé de déterminer si le niveau de Ca^{2+}_i post-stimulation est légèrement inférieur, légèrement supérieur ou égal au niveau de base pré-stimulation. Par exemple, la stimulation de la figure 54, qui a été la plus forte enregistrée (pic $\approx 2200nM Ca^{2+}_i$), semble donner lieu à un plateau équivalent au niveau de base (niveau de base est à 44s) mais cela reste difficile à déterminer à la simple observation de ce graphique. Par contre, lors de réponses moins fortes, les faibles différences de niveau peuvent être plus facilement établies. Ceci dit, il n'est pas certain que de si faibles différences de Ca^{2+}_i soient significatives car il est clair que le niveau du Ca^{2+}_i post-stimulation reste voisin du niveau de base. Lors de futures expériences, il serait intéressant de procéder à plusieurs stimulations à l'ATP sur une même média afin d'évaluer si leur comportement varie en fonction du nombre de stimulation subit comme c'est le cas au point de vue contractile. De plus, des enregistrements post-stimulation plus longs devraient être réalisés afin d'établir clairement le comportement du niveau de Ca^{2+}_i post-stimulation. Ceci dit, bien qu'il ait été démontré que l'ATP, en présence de Ca^{2+} extracellulaire, produit une contraction soutenue des médias cultivées (voir chapitre III), cette contraction ne peut s'expliquer par un plateau significatif du Ca^{2+}_i post-stimulation. Ceci laisse croire à l'existence de mécanismes contractiles extrêmement sensibles au Ca^{2+} ou à une persistance de

l'effet du pic initial du Ca^{2+}_i attribuable, par exemple, à l'absence de mécanismes de rétroaction négative.

Lors d'une stimulation à l'ATP en absence de Ca^{2+} extracellulaire, les médias cultivées répondent également par une augmentation intense, rapide et transitoire du Ca^{2+}_i . Par contre, le niveau de Ca^{2+}_i post-stimulation ne revient pas à des valeurs voisines du niveau de base mais s'établit invariablement sous celui-ci. De plus, une comparaison des augmentations moyennes de Ca^{2+}_i (pic initial) en présence et en absence de Ca^{2+} extracellulaire suggère une baisse de l'intensité de la réponse de l'ordre de 40% (993 ± 601 nm vs 585 ± 523 nm). Cependant, cette évaluation quantitative n'est pas significative ($p=0.2$ au T-Test de Student). Ainsi, malgré cette variabilité, il est possible d'affirmer que la présence de Ca^{2+} extracellulaire n'est pas essentielle à la réponse calcique mais que celui-ci semble l'améliorer.

Ces résultats correspondent bien aux résultats obtenus sur la contractilité des médias en l'absence de Ca^{2+} extracellulaire (voir chapitre III). En effet, dans ces conditions, la contraction des médias cultivées est affaiblie et très peu soutenue. L'absence de contraction soutenue s'explique bien par une diminution significative du niveau de Ca^{2+}_i post-stimulation. Cependant, une contraction significativement plus faible s'explique mal par une diminution, généralement peu importante, du pic calcique initial. Néanmoins, étant donné le décalage important entre le pic de Ca^{2+}_i ($\approx 30s$ après addition de l'ATP) et la contraction maximale des médias cultivées ($\approx 300s$ à $600s$ après addition de l'ATP), il est probable que la chute du Ca^{2+}_i post-stimulation sous le niveau de base inhibe le développement de la contraction qui aurait eu lieu avec un niveau de Ca^{2+}_i normal. En ce qui concerne les récepteurs purinergiques, l'effet marginal de l'absence de Ca^{2+} extracellulaire est cohérent avec la présence majoritaire de récepteurs de sous-type P_{2U} puisque ceux-ci sollicitent les stocks intracellulaires de Ca^{2+} .⁶⁰⁹

4.4.2 L'entrée du Ca^{2+} extracellulaire lors de la réponse calcique à l'ATP

Afin de démontrer l'entrée de Ca^{2+} extracellulaire lors de la stimulation à l'ATP, trois ions ont été utilisés: le Mn^{2+} , le Ni^{2+} et le La^{3+} .^{314,610} Tous trois ont la propriété de bloquer non-spécifiquement les canaux calciques permettant l'entrée du Ca^{2+} extracellulaire dans le cytoplasme cellulaire. La méthode du «manganese quench» a été utilisée avec succès pour démontrer qu'il n'y a pas d'entrée du Ca^{2+} extracellulaire par des canaux calciques au cours de, ou après, la stimulation par l'ATP.⁶¹⁰ De plus, le fait que l'augmentation transitoire du niveau de Ca^{2+}_i en réponse à l'ATP soit, malgré la présence du Mn^{2+} , observable par l'intermédiaire du Fura-2 confirme que les stocks calciques cellulaires sont responsables d'une bonne partie de la réponse à l'ATP. Par ailleurs, afin d'expliquer la différence entre les niveaux du Ca^{2+}_i post-stimulation en présence et en absence de Ca^{2+} extracellulaire, la possibilité d'une faible entrée de Ca^{2+} extracellulaire post-stimulation a été étudiée. La méthode du «manganese quench» est efficace pour mettre en évidence les influx calciques relativement importants, cependant, elle n'est pas assez sensible pour détecter de faibles entrées calciques. Par contre, l'ajout d'un bloqueur des canaux calciques après le pic de Ca^{2+}_i initial, en présence de Ca^{2+} extracellulaire, permet de mettre en évidence ces faibles entrées calciques. Ce type d'expérience a été réalisé avec du Ni^{2+} et du La^{3+} .

Dans le cas du Ni^{2+} , de fortes augmentations du Ca^{2+}_i ont été enregistrées lors de l'ajout de celui-ci. Ce phénomène, très surprenant, ne peut s'expliquer par un effet du Ni^{2+} sur le Fura-2 car cette hypothèse a déjà été écartée par des expériences contrôles. Ainsi, le Ni^{2+} produit donc réellement une augmentation du Ca^{2+}_i . En effet, les médias cultivées répondent par de très fortes contractions, relativement rapides et bien soutenues, à des doses équivalentes, et plus faibles, de Ni^{2+} (voir chapitre III). Il serait intéressant de réaliser des stimulations au Ni^{2+} en l'absence de Ca^{2+} extracellulaire afin de déterminer si l'augmentation de Ca^{2+}_i observée provient d'une entrée de Ca^{2+} extracellulaire ou

d'une stimulation des stocks intracellulaires. De plus, il serait important de déterminer si le Ni^{2+} produit son effet en pénétrant dans la cellule ou par une action sur des éléments membranaires. En effet, il a été récemment démontré que le Mn^{2+} pouvait avoir un effet contractile sur des cellules musculaires lisses à des concentrations millimolaires.⁶¹¹ Dans ce cas, le Mn^{2+} pénètre dans la cellule et active directement avec les protéines contractiles de la cellule. Étant donné les ressemblances structurales et fonctionnelles qui existent entre ces deux cations, le Ni^{2+} pourrait agir par le même mécanisme en plus de causer une élévation du Ca^{2+}_i .

Dans le cas du La^{3+} , la seule expérience réalisée suggère l'existence d'un faible influx calcique post-stimulation et laisse donc croire à un rôle possible du Ca^{2+} extracellulaire dans le maintien du niveau de Ca^{2+}_i post-stimulation. Pour s'en assurer, il serait impératif de répéter cette expérience. Cette conclusion serait cohérente avec les très faibles contractions obtenues en absence de Ca^{2+} extracellulaire (chapitre III).

L'entrée de Ca^{2+} extracellulaire lors de la stimulation par l'ATP a été décrite pour des cellules musculaires lisses vasculaires en culture.⁶¹² Dans ce cas, l'entrée de Ca^{2+} post-stimulation a été observée en présence continue d'ATP mais n'était pas attribuable à l'ouverture de canaux calciques sensibles au potentiel. Cette entrée continue de Ca^{2+} produit des oscillations calciques, faibles mais stables (>30 min) , qui disparaissent en absence de Ca^{2+} extracellulaire. Ce phénomène explique peut-être la persistance des contractions à des niveaux globaux de Ca^{2+}_i bas. En effet, la mesure du Ca^{2+}_i obtenue avec la méthode que nous avons utilisée donne une moyenne du Ca^{2+}_i de plusieurs cellules à la fois. Or, les oscillations calciques ne sont visibles que lors de l'observation individuelle d'une cellule.⁶¹³ Par ailleurs, les influx calciques en réponse à la stimulation des récepteurs purinergiques ont été décrits pour cellules musculaires lisses vasculaires porcines en culture.³⁰⁹ L'influx calcique de ces cellules, qui étaient

également très sensibles à l'UTP, ont montré une faible dépendance face au Ca^{2+} extracellulaire. Par contre, une privation prolongée en Ca^{2+} extracellulaire, ou un blocage des canaux calciques, ont mené à l'épuisement des stocks calciques cellulaires et ont inhibé la réponse calcique. Fait intéressant, le Ni^{2+} a été utilisé pour bloquer l'entrée de Ca^{2+} extracellulaire lors de cette étude. De plus, un inhibiteur des canaux calciques sensibles au potentiel n'a pas inhibé l'entrée de Ca^{2+} extracellulaire vers les stocks cellulaires.

Pris dans leur ensemble, tous ces résultats montrent que le Ca^{2+} extracellulaire ne joue pas un rôle essentiel dans l'augmentation du niveau de Ca^{2+}_i en réponse à l'ATP. Par contre, celui-ci est essentiel pour le maintien du niveau de Ca^{2+}_i post-stimulation qui chute brutalement en l'absence de Ca^{2+} extracellulaire. Le mécanisme de cette dépendance pourrait être mis en évidence par des expériences additionnelles utilisant le La^{3+} ou le Co^{2+} (un autre bloqueur de canaux calciques).³⁰⁹ Ainsi, l'influx calcique observé lors de la stimulation par l'ATP provient essentiellement des stocks intracellulaires de Ca^{2+} . Ceux-ci peuvent être progressivement vider en absence de Ca^{2+} extracellulaire ce qui s'accompagne d'une diminution de la réponse calcique. Pour expliquer la dépendance du Ca^{2+}_i post-stimulation face au Ca^{2+} extracellulaire, nous avançons l'hypothèse que le Ca^{2+} extracellulaire pénètre dans la cellule par un canal calcique qui n'est pas sensible au potentiel et qu'il transite par les réservoirs calciques cellulaires.

4.4.3 *Les stocks de Ca^{2+} intracellulaires*

Puisqu'il est clair que les stocks calciques intracellulaires sont les sources principales de Ca^{2+} lors de la réponse à l'ATP, leur caractérisation revêt une importance toute particulière. Des stocks sensibles à la caféine n'ont pu être mis en évidence malgré les différents protocoles utilisés, avec et sans Ca^{2+}

extracellulaire. Par ailleurs, une perfusion à la caféine semble entraîner une baisse du Ca^{2+}_i même en présence de Ca^{2+} extracellulaire. D'autres expériences seraient nécessaires afin de donner un sens à cette observation.

Afin de confirmer les résultats obtenus avec la caféine, des expériences ont été réalisées avec la ryanodine. En présence de Ca^{2+} extracellulaire, les expériences effectuées présentent des montées nettes du niveau de Ca^{2+}_i en réponse à la ryanodine. De plus, l'influence de la ryanodine sur le niveau de Ca^{2+}_i semble disparaître après 10 minutes ce qui correspondrait bien à un épuisement des stocks calciques. Ainsi, la ryanodine et la caféine n'auraient pas la même activité sur les stocks calciques des médias cultivées. Ceci est surprenant puisque ces deux agonistes activent les mêmes canaux calciques du réticulum sarcoplasmique.^{285,288} Ce phénomène pourrait peut-être s'expliquer par des modes d'actions différents.

Par ailleurs, la sensibilité des stocks calciques à la thapsigargine a également été évaluée. Cette drogue est un inhibiteur spécifique irréversible de la pompe calcique du réticulum sarcoplasmique.⁶⁰⁶ Celle-ci assure le chargement continu de stocks calciques intracellulaires et participe à l'extrusion du Ca^{2+}_i du cytoplasme suite à des élévations du niveau de ce dernier.⁶¹⁴ Au cours des expériences utilisant la thapsigargine, aucun effet immédiat de celle-ci n'a pu être mis en évidence. De plus, malgré l'utilisation de plusieurs protocoles différents, aucune inhibition de la réponse à l'ATP n'a été observée suite à un traitement à la thapsigargine.

En conclusion, des stocks calciques intracellulaires sensibles à la ryanodine ont été impliqués dans la réponse calcique des médias cultivées à l'ATP. Néanmoins, seulement deux expériences ont été réalisées et des expériences complémentaires devront être réalisées afin de confirmer ces résultats.

4.4.4 *Les effets du chlorure de potassium*

Les nombreuses expériences réalisées avec le KCl ont démontré que celui-ci entraîne une faible montée du Ca^{2+}_i ($\approx 50nM$) qui persiste 2 à 3 minutes avant de disparaître complètement en moins de 5 minutes. L'effet du KCl se fait théoriquement sur les canaux calciques dépendants du potentiel par dépolarisation de la membrane cellulaire. Dans cette optique, les résultats obtenus portent à croire qu'il n'y aurait qu'une très faible quantité de canaux calciques dépendants du potentiel fonctionnel. De plus, ceux-ci seraient inactivés rapidement puisque l'augmentation du Ca^{2+}_i s'estompe en quelques minutes. Ce type de désensibilisation a d'ailleurs été décrit pour des cellules musculaires lisses vasculaires de rat en primoculture.⁶¹⁵ Des études électrophysiologiques ont confirmé qu'il s'agissait bien de canaux calciques dépendants du potentiel de type L. D'ailleurs, l'absence d'effet de la nitrendipine, lorsqu'ajoutée après la disparition de la faible montée du Ca^{2+}_i , suggère l'inactivation de ces canaux. Il serait intéressant d'ajouter la nitrendipine 30 minutes avant la perfusion au KCl pour vérifier que l'augmentation du Ca^{2+}_i est bien attribuable à l'activation de canaux calciques dépendants du potentiel.

Au point de vue contractile, le KCl produit une contraction très forte mais qui ne se développe qu'en plusieurs minutes (maximum atteint en 30-50 minutes). De plus, cette contraction est très soutenue. Ceci ne correspond donc pas avec les niveaux de Ca^{2+}_i observés lors d'une perfusion au KCl. Pour ce qui est de l'effet de la nitrendipine, lorsque celle-ci est ajoutée au plateau de contraction, elle ne produit aucun effet. De plus, la nitrendipine ajoutée 30 minutes avant le KCl n'empêche pas la contraction des médias cultivées. Enfin, un agoniste des canaux calciques dépendants du potentiel ne produit pas de contraction des médias cultivées (voir chapitre III). Ainsi, les études de contractilité et de variation du Ca^{2+}_i suggèrent que les canaux calciques dépendants du potentiel ne sont pas impliqués dans la réponse contractile et probablement

pas, ou très peu, dans la réponse calcique. D'ailleurs, la disparition des canaux calciques dépendants du potentiel au cours de la culture des cellules musculaires lisses a déjà été décrite.⁶¹⁵ Ainsi, en absence de canaux calciques dépendants du potentiel, deux questions se posent. Quel est le mécanisme responsable de l'augmentation initiale du Ca^{2+}_i ? Et, comment les médias cultivées peuvent-elles contracter tout en restant à des niveaux de Ca^{2+}_i voisins du niveau de base?

En ce qui concerne la première question, il serait possible que, pour des raisons propres aux médias cultivées, la nitrendipine ne puisse inhiber correctement les canaux calciques dépendants du potentiel. Des expériences de blocages avec d'autres agonistes pourraient confirmer cette hypothèse. De plus, il serait intéressant de tenter d'inhiber la réponse avec des bloqueurs non-spécifiques des canaux calciques (Mn^{2+} , La^{3+} ou Co^{2+}) afin de déterminer si l'augmentation du Ca^{2+}_i est bien le résultat d'une entrée de Ca^{2+} extracellulaire par des canaux calciques, et non d'un phénomène de déstabilisation de la membrane. Enfin, une perfusion au KCl en l'absence de Ca^{2+} extracellulaire permettrait de s'assurer que la hausse du Ca^{2+}_i est bien causée par une entrée de Ca^{2+} extracellulaire. Il pourrait en être autrement car des expériences de contraction ont montré que les médias cultivées contractent, en réponse au KCl, même en l'absence de Ca^{2+} extracellulaire.

Pour répondre à la seconde question, le KCl pourrait également inhiber la déphosphorylation de la chaîne légère de la myosine (inhibition d'une phosphatase). Ainsi, à un niveau faible et constant de Ca^{2+}_i , il y aurait accumulation de la forme activée (phosphorylée) de la chaîne légère de la myosine. Ceci produirait une contraction lente et progressive jusqu'au maximum de la contraction cellulaire. Par ailleurs, une augmentation du Ca^{2+}_i pourrait également être le résultat d'un blocage des systèmes d'extrusion du Ca^{2+}_i . En effet, il y a une entrée continue du Ca^{2+} extracellulaire dans le cytoplasme cellulaire qui est constamment compensée par des pompes qui expulsent le Ca^{2+}_i

vers l'extérieur de la cellule ou stockent celui-ci dans les organelles cellulaires. Une inhibition de ces systèmes produirait une augmentation progressive du Ca^{2+}_i . Cependant, il faudrait que ce blocage soit temporaire pour expliquer le retour du Ca^{2+}_i au niveau de base. À vrai dire, toutes les hypothèses impliquant une inhibition des mécanismes de rétroactivité négative de la contraction seraient compatibles avec la contraction progressive observée en l'absence d'un niveau élevé de Ca^{2+}_i .

Quoi qu'il en soit, ces hypothèses en soulèvent une autre: la très faible élévation du Ca^{2+}_i initiale est-elle l'élément déclencheur de la contraction cellulaire ou s'agit-il de deux phénomènes indépendants? Les expériences menées en l'absence de Ca^{2+} extracellulaire, tel que suggéré plus haut, répondront partiellement à cette question.

Par ailleurs, un traitement au KCl 100mM vise la dépolarisation de la membrane cellulaire mais cette dépolarisation est-elle effective dans le modèle de médias cultivées? Il est concevable que les cellules musculaires lisses, cultivées *in vitro* pendant de longues périodes, possèdent des membranes hyperpolarisées et que le traitement au KCl ne parvienne pas à les dépolariser suffisamment. Des études électrophysiologiques pourraient déterminer la véracité de cette hypothèse.

Enfin, le contact prolongé des médias avec le KCl (60 minutes) ne nuit pas à la réponse calcique survenant à la suite d'une stimulation à la BK ou à l'ATP. Ceci laisse croire que la contraction soutenue produite par le KCl ne porte pas préjudice aux stocks calciques intracellulaires ou, du moins, pas à ceux stimulés par l'ATP ou la BK. Ceci est cohérent avec les diverses hypothèses proposées. Des expériences de contractilité n'ont pas établi si une média contractée au maximum par le KCl est sensible, au point de vue contractile, à une stimulation supplémentaire par l'ATP ou la BK. De telles expériences

indiqueraient si la contraction cellulaire a atteint son maximum au plateau produit par le KCl ou si une augmentation du Ca^{2+}_i peut encore augmenter le niveau de contraction.

4.5 Conclusion

Notre modèle s'est révélé un outil intéressant pour l'étude des influx calciques dans les cellules musculaires lisses. De plus, la mesure quantitative de l'épifluorescence des cellules musculaires lisses chargées au Fura-2 s'est avérée une très bonne méthode pour la mesure des variations de la concentration du Ca^{2+}_i dans notre modèle. En effet, les médias cultivées ont produit de très beaux tracés de fortes intensités, stables et dont les variations en réponse à des agonistes sont importantes et très nettes. La qualité des réponses calciques observées dépassait même celle observée avec des tissus vasculaires fraîchement prélevés. La grande qualité des tracés obtenus s'explique peut-être par la simplicité de la structure du tissu, ce qui diminue les interférences lumineuses, De plus, la densité moindre des tissus pourrait se traduire par une plus grande accessibilité du Fura-2 aux cellules musculaires lisses lors du chargement.

Ainsi, non seulement les médias cultivées peuvent être utilisées pour des études de contraction, réalisables grâce à un appareillage classique, mais elle peuvent aussi être utilisées pour analyser des phénomènes plus fins de la réponse cellulaire, en utilisant des appareils à la fine point de la technologie. Cette qualité fait de ce modèle un outil particulièrement intéressant pour la recherche pharmacologique appliquée. Pour cette raison, son procédé de fabrication a fait l'objet du brevet américain # 08/368,205 qui vous est présenté en annexe.

Chapitre V

5. Article: «Role of the transfollicular route in percutaneous absorption of hydrocortisone: *in vitro* studies with a new tissue engineered skin equivalent with hair».

5.1 Présentation de l'article

À première vue, le sujet de ce chapitre peut paraître inopportun dans le cadre d'une thèse centrée sur le domaine vasculaire. Il n'en n'est rien. En effet, cette thèse est belle et bien axée principalement sur des questions relatives à la biologie vasculaire, cependant, il s'agit avant tout d'une thèse d'ingénierie tissulaire. En effet, ce domaine de recherche s'est affirmé, au cours des 10 dernières années, comme étant une science à part entière et dont le potentiel est de plus en plus reconnu. À ce titre, ce travail de recherche visait autant, sinon d'avantage, à développer de nouvelles approches et de nouveaux outils pour la construction d'organes *in vitro*, qu'à la production d'un vaisseau sanguin en tant que tel.

L'ingénierie tissulaire étant un nouveau domaine de recherche biomédicale, il est encore possible d'y faire des découvertes qui traversent les frontières entre des sujets de recherche apparemment incompatibles. C'est le cas de notre «nouvelle approche». Celle-ci n'est pas qu'une nouvelle approche pour la construction de vaisseaux sanguins mais bien une nouvelle approche pour la construction d'organes *in vitro*. Dans ce chapitre, cette approche fournit la composante dermique pour un modèle de peau reconstruite mais il ne s'agit là que d'une application parmi de nombreuses autres possibilités. En effet, la production de feuillets tissulaires, et leur assemblage en de tissus vivants homogènes par à une maturation contrôlée, pourrait être réalisée avec une variété de types cellulaires. Ainsi, ce nouvel outil apparaît comme étant très polyvalent et ne devrait pas être limité au monde du vasculaire.

5.2 Résumé

Les appendices de la peau sont considérés comme étant un canal permettant de contourner la barrière créée par le stratum corneum et, ainsi, de faciliter l'absorption transcutanée de substances en applications. Cependant, en l'absence d'un modèle d'étude satisfaisant, il est difficile d'évaluer l'apport respectif de la voie transfolliculaire et transépidermique. Nous avons produit, par ingénierie tissulaire, un nouvel équivalent cutané et y avons inclus des unités pilosébacées complètes. Celui-ci ne contient que des fibroblastes et des kératinocytes d'origine humaine (aucun matériel exogène biologique ou synthétique). Les fibroblastes ont été cultivés en présence d'acide ascorbique afin de former un feuillet fait de cellules et de matrice extracellulaire néo-synthétisée. Plusieurs feuillets ont été utilisés afin de produire un tissu conjonctif dont l'ultrastructure est bien organisée. Les caractéristiques mécaniques de ce tissu ont permis d'y inclure des unités pilosébacées. Quatre semaines après l'ensemencement de kératinocytes, une membrane basale continue a été observée par immunohistochimie et par analyse ultrastructurale. La différenciation des kératinocytes a été établie par l'expression de marqueurs caractéristiques (kératine 10, filagrine and transglutaminase). Une étude de perméabilité transcutanée a été réalisée à l'aide de ce modèle afin d'évaluer l'importance de la voie de pénétration transfolliculaire. Aucune période de latence n'a été observée lors de la diffusion de l'hydrocortisone et le taux de pénétration a été significativement augmenté par la présence de poils. Ainsi, l'importance de la voie de pénétration transfolliculaire a été établie à l'aide de ce nouvel équivalent cutané entièrement humain et biologique.

5.3 Abstract

Skin appendages are often considered as channels that bypass the stratum corneum barrier and are generally thought to facilitate the dermal absorption of topical agents. However, the lack of a satisfactory model constitutes a major limitation to assess the distinct contributions of the transepidermal and transfollicular routes. We have designed a new tissue engineered skin equivalent in which complete pilosebaceous units were integrated. This new model was produced exclusively from human fibroblasts and keratinocytes without any exogenous material, nor biological or synthetic. Fibroblasts were culture for 35 days with ascorbic acid and form a sheet in the bottom on the culture dish. The dermal equivalent, made of 4 layers of these fibroblast sheets, exhibited a well organized collagenous connective tissue, as shown by electron microscopy. After 4 weeks of keratinocytes seeding, the basement membrane was continuous and ultrastructurally organized; collagen IV and VII, component of the dermo-epidermal junction, were also expressed. Keratinocytes formed a stratified and cornified epidermis on the top of this extracellular matrix, and exhibited typical marker of differentiation (keratins 10, filaggrin and transglutaminase). We used this new model to assess the role of the transfollicular route in percutaneous absorption studies *in vitro*. No lag-time was observed in the diffusion of hydrocortisone through hairy skin equivalent, and the rate of penetration was higher, compared to the control. Therefore, we demonstrated the importance of hair follicle in hydrocortisone percutaneous absorption *in vitro*, with a complete human model where the only variable was the presence of the pilosebaceous unit.

AUTHORS: Martine Michel *[†], Nicolas L'Heureux * , Wen Xu *, Francois A. Auger *, and Lucie Germain *

REMARQUE: L'auteur de la thèse a partagé la conception, la production et l'analyse de ce modèle avec M. Michel (50:50). Il a également réalisé l'étude ultrastructurale. Enfin, il a participé à l'écriture de cet article (15%).

AFFILIATION: * Laboratoire de Recherche des Grands Brûlés/LOEX, Hôpital du Saint-Sacrement, Québec, Qc, Canada and Département de chirurgie, Université Laval, Sainte-Foy, Québec, Qc, Canada

† Martine Michel's present address is: Department of Oral Biology, University of Washington, Box 357132, Seattle WA, 98195-7132, USA

5.4 Introduction

The most important role of the skin is to act as a barrier, thus protecting the whole body from the entrance and loss of various substances. Nonetheless, percutaneous drug delivery is more and more considered as the most useful system for long-term systemic pharmacological therapy. Aside from practical issues, percutaneous absorption allows control of drug concentrations in plasma and inhibits drug metabolism due to initial bypass of the liver.¹

The process of drug migration through the skin has been described as a passive diffusion process with two distinct routes: the transepidermal route across the stratum corneum (by an inter or transcellular pathway), and the transappendageal route through the hair follicles and their associated sebaceous glands.² The potential role of skin appendages has been debated in the literature for many years.^{for review, see 3} In early studies, the ability of the appendages to act as a conduit for drug transport were never really considered to be important because of the trivially small fraction of total body surface area that they occupy (0.1%). Since then, however, their importance as rapid-transit "shunt" pathways through the stratum corneum has been assessed by several authors.^{4,5,for review see 3} A study by Scheuplein suggested that transient diffusion occurred primarily via hair follicles and sweat glands; and steady-state diffusion primarily through the stratum corneum.⁶ In the case of polar steroids, which have a low diffusion constant, shunt diffusion could become predominant, and control percutaneous absorption not only in the transient period but also during the steady state.⁷ Different models have been designed to evaluate the importance of skin appendages. Mouse strains with different hair densities have been used to compare the rate of penetration of benzo[a]pyrene and testosterone.⁴ Hairless rats with full-thickness burns were used to compare the rate of penetration of steroids through the scar tissue, in which follicles and sebaceous glands disappeared during healing, and normal skin.^{5,8} Human studies have compared either

anatomic sites with different hair follicle density (forehead, forearm, and palm)⁹ or scar tissue (lacking skin appendages) and normal adjacent skin.¹⁰ In all these *in vitro* and *in vivo* studies, the rate of penetration of the drug through an appendage-free skin was similar or lower compared to the normal skin. However, hairless animals are not reliable models because they still have hair follicles. Furthermore, scar skin lacks some histological and mechanical properties of normal skin. As for hairless body sites such as palm and soles, they have a much thicker stratum corneum than other anatomical sites. Therefore, the lack of a satisfactory model constitutes a major limitation to assess the distinct contributions of the transepidermal and transfollicular routes.

Recent progress in cell culture allowed the production of skin equivalents by seeding cultured keratinocytes upon various substrates such as: artificial membranes¹¹, de-epidermized dermis¹², collagen gels, chitosan-glycosaminoglycan sponges or nylon meshes populated by fibroblasts.^{13-16,for review see 17} Keratinocyte seeding and proliferation on these various dermal equivalents lead to the formation of an epidermal layer, which becomes stratified and cornified when skin equivalents are raised at the air-liquid interface.¹⁸⁻²¹ We have performed percutaneous absorption studies with such skin equivalent and have observed functional properties qualitatively similar but quantitatively more permeable than normal mouse and human skin.²¹ However, all these skin equivalent models only partially reproduce human skin since they lack hair follicles, nerves, sebaceous glands, sweat glands and blood vessels.

Hair follicles have been previously cultured *in vitro*, in an organ culture system or on a sponge-supported histoculture.^{22,23} Their rate of growth and hair fiber production were evaluated near to the physiological values, and their use for hair drug targeting or gene therapy have been reported.²⁴⁻²⁸ Hair follicles have also been used as a source of keratinocytes in a skin equivalent

model.^{29,30} However, none of these models were used to study the role of hair follicles in percutaneous absorption.

In this paper, we present a new tissue engineered skin equivalent in which complete pilosebaceous units were integrated. This new model was produced exclusively from human fibroblasts and keratinocytes without any exogenous material, nor biological or synthetic. The dermal equivalent exhibited a well organized collagenous connective tissue. After 4 weeks of keratinocyte seeding, the basement membrane was ultrastructurally organized and continuous. Epidermis on the top of the extracellular matrix was stratified and expressed typical marker of differentiation. With this skin equivalent, we demonstrated the importance of hair follicles in hydrocortisone percutaneous absorption *in vitro*, with a model where the only variable was the presence of the pilosebaceous unit.

5.5 Materials and Methods

5.5.1 Cell culture

Keratinocytes were grown as previously described.^{31, 32} in complete DME-HAM: a combination of Dulbecco-Vogt modification of Eagle's medium (DME) with Ham's F12 in a 3:1 proportion (Flow Laboratories, Mississauga, Ontario, Canada), supplemented with 24.3 µg/ml adenine (Sigma Chemicals, St-Louis, MO), 5 µg/ml insulin (Sigma), 2×10^{-9} M 3,3',5'triiodo-L-thyronine (Sigma), 5 µg/ml human transferrin (Sigma), 0.4 µg/ml hydrocortisone (Calbiochem, La Jolla, CA), 10^{-10} M cholera toxin (Schwartz/Mann, Cleveland, OH), 10% fetal calf serum (Flow Laboratories), 10 ng/ml human

epidermal growth factor (EGF) (Chiron Corp., Emeryville, CA), 100 UI/ml penicillin G (Sigma) and 25 µg/ml gentamicin sulfate (Scheering Inc, Pointe-Claire, Canada). Fibroblasts were cultured in DME, supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics.

Human keratinocytes and dermal fibroblasts were obtained from normal adult skin specimens removed during reductive breast surgery. Keratinocytes were isolated and cultured as previously described.¹⁷ Briefly, for cell isolation, skin fragments were digested with 500 µg/ml thermolysin (Sigma) for 2 h at 37°C.³² Then, the dermis was mechanically separated from the epidermis with forceps. Keratinocytes were dissociated from the epidermis with a trypsin solution (0.05% trypsin 1-300 (ICN Biochemical, Montreal, Canada)) containing 0.01% EDTA (Becker Chemical Co., Philisburg, NJ). Cells were seeded at 1×10^6 keratinocytes/cm² on a lethally irradiated 3T3 fibroblasts feeder layer in the complete medium and cultured as previously described.^{33,32} Keratinocytes were used at their 3rd passage.

Human fibroblasts were obtained from dermal skin biopsies and cultured as previously described.¹⁷ Cells were used between their 4th and 8th passage.

All cultures were incubated at 37°C in a 8% CO₂ air atmosphere and culture media were changed 3 times a week.

5.5.2 *Skin equivalents with hair*

5.5.2.1 Tissue engineered dermal equivalent

Fibroblasts were allowed to grow for 35 d in medium previously described containing 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of ascorbate (Sigma). The sheet of fibroblasts obtained in the bottom of the dish was peeled off; four layers were superposed on one other and the surface area was maintained by an anchoring ring for an other week of culture.

5.5.2.2 Hair insertion

Human vellus hair follicles were obtained from normal adult skin specimens removed during reductive breast surgery. Small skin fragments with hair follicles were digested with 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ thermolysin at 4°C overnight. Then, the epidermis with the hair follicles was mechanically separated from the dermis with forceps. Hair follicles in anagen phase were selected, inserted in the dermal equivalent in which small holes were previously made. A small surface of epidermis around the hair follicle was kept on the surface of the dermal equivalent. An additional fibroblast sheet was added on the bottom of the dish, leading the hair follicle to be surrounded by the extracellular matrix. Control samples were obtained by laying down an epidermis explant without hair follicle on the top of the holed dermal equivalent. Maturation of the dermal equivalents was obtained after a week.

5.5.3 Skin equivalent production

After a week of dermal equivalent maturation, human keratinocytes were seeded at a density of 2×10^5 cells/cm² in keratinocyte complete medium. They reached confluence after 8 days of submerged culture and were then raised at the air-liquid interface. Complete DME-HAM with 5% serum, 50 µg/ml ascorbate, and without EGF was changed three days a week. Samples were used after 21 d of air-liquid culture for further analysis.

5.5.4 Histology

For histological analysis, skin equivalents were fixed with Bouin's solution and paraffin embedded. Six mM thick sections were stained with hematoxylin, phloxine and saffron.

5.5.5 Immunohistochemistry

Samples were embedded in frozen tissue embedding medium (OCT compound, Miles Inc., Elkhart, IN), frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C until use. Indirect immunofluorescence assay was performed on acetone-fixed (10 min at -20°C) cryosections (4 mM thick) as previously reported.^{34,32} Sections were incubated with mouse monoclonals anti-human transglutaminase, anti-human filaggrin (BTI, Stoughton, MA), anti-human K10 (clone k8.60, Sigma) for 45 min, and then with rhodamine-conjugated goat anti-mouse IgG-IgM (Chemicon, Temecula, CA) for 30 min. They were then examined under a Nikon Optiphot microscope, equipped with epifluorescence, and photographed with a Kodak Tmax 400 ASA film.

5.5.6 Transmission electron microscopy

Samples were fixed in 4% glutaraldehyde, postfixed in osmium tetroxide, and dehydrated through graded ethanol. They were then embedded in Epon 812. Ultra-thin sections were counterstained with uranyl acetate lead citrate.

5.5.7 Percutaneous absorption studies

Percutaneous absorption was measured using standard Franz diffusion cell technique as previously described.^{21,35,36} Briefly, samples were clamped tightly between the two glass chambers of the diffusion cell (FDC-100 Standard, 0.63 cm² surface area, "O"-ring (Crown Glass, Somerville, NJ)), and 100 μ l of ³H-hydrocortisone (54.5 Ci/mmol; NEN Dupont, Mississauga, Ontario, Canada) was deposited in the upper chamber. The lower chamber was filled with saline: BSA (1% bovine serum albumin in 0.15 M NaCl). At selected intervals (1h, 2h, 4h, 6h, 8h and 24h), the dermal bathing solution was completely removed and replaced by fresh saline:BSA. The lower chamber was maintained at 37°C with a water jacket. Scintillation fluid (Scintisafe™ 30% Fischer Scientific) was added to a fraction of the eluate, and radioactivity determined with a scintillation counter (Beckman LS 6000 SC, Beckmann Inc, Fullerton CA).

5.6 Results

5.6.1 Macroscopic and microscopic evaluation

The dermal component of the equivalent displayed a remarkably "tissue-like" appearance and texture. Once seeded with keratinocytes and raised at the air-liquid interface, the epidermal coverage rapidly became visible to the eye as a dry, smooth and shiny surface. This step is made easy by the "skin-like" firmness of the complete equivalent. Histological analysis revealed that differentiation and stratification had taken place at the air-liquid interface as the characteristically cuboidal keratinocytes of the basal layer became flat, with elongated nuclei, oriented in the long axis of the cells, in the suprabasal layers (Figure 58A). In the uppermost layers, cells reached terminal differentiation, as shown by the formation of a thick stratum corneum composed of numerous enucleated cell layers.

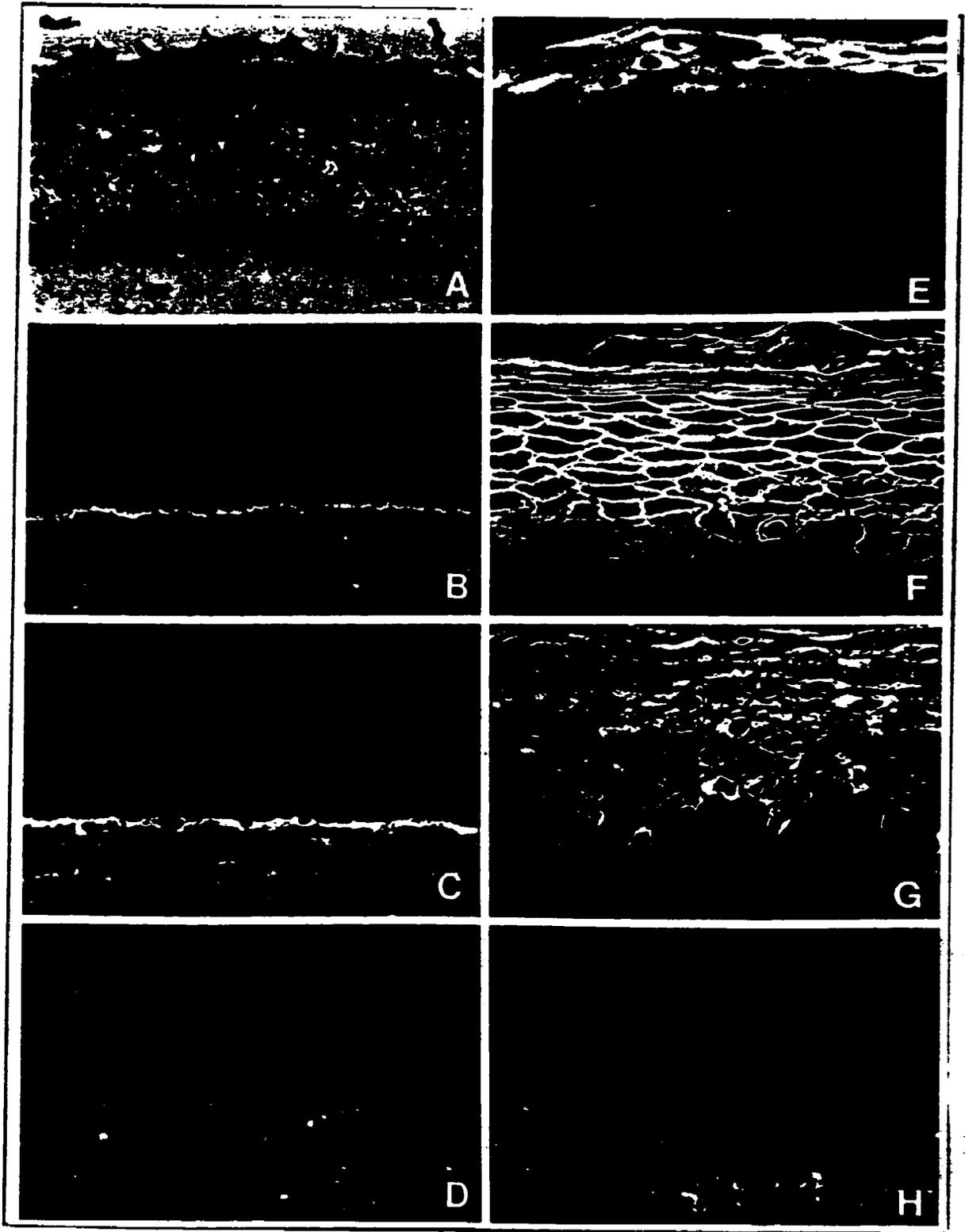
5.6.2 Phenotypic analysis by immunohistochemistry

In order to evaluate the quality of the epidermal differentiation in our skin equivalent, interfollicular skin equivalent frozen sections were stained with antibodies against constituents of the basement membrane as well as differentiation markers (Figure 58B-C). Laminin, type collagen IV were strongly stained at the dermal-epidermal junction whereas type VII collagen, an anchoring fiber protein, showed a continuous but speckled staining. Uninterrupted expression along the basement membrane corresponds to normal human skin organization.

Filaggrin is a histidine-rich protein, which aggregates intermediate filaments to produce the matrix between the keratin filaments in the

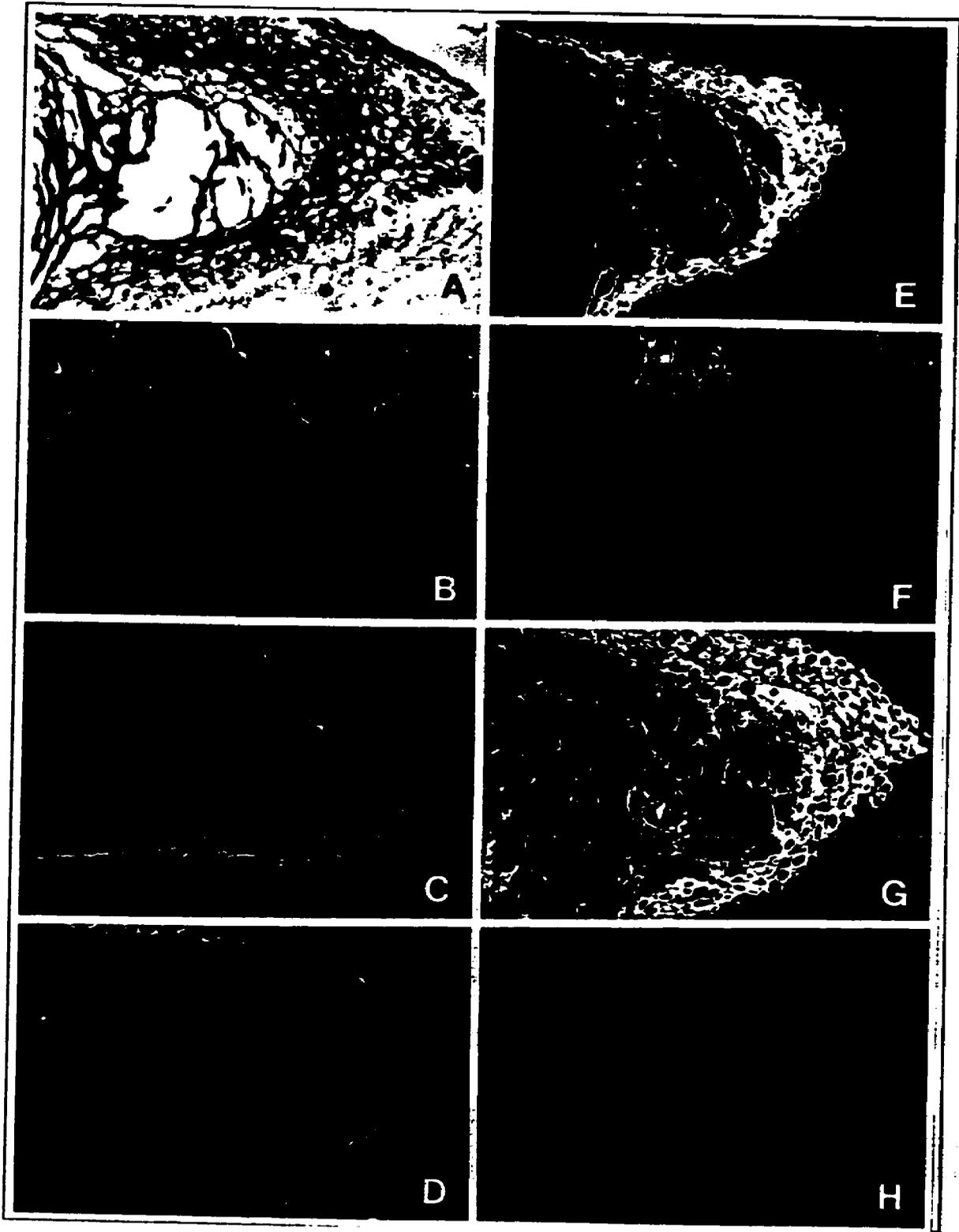
cornified cells.^{for review see 37} Its expression in the skin equivalents was strong in the stratum corneum, and a granular pattern was observed in the upper part of the stratum granulosum (Figure 58E). Transglutaminase is an enzyme activated at the transitional zone between the granular and horny layers. Its expression was strong in the upper layers whereas the first suprabasal layers were not stained. As would be expected, transglutaminase was never expressed in the basal layer of skin equivalents (Figure 58F). Keratin 10, a marker for epidermal differentiation¹⁹ was expressed in all suprabasal layers of the epidermis (Figure 58G).

Figure 56 (next page): Histology and Immunohistology of the interfollicular region of matured skin equivalent at 21 days (x270) . Hematoxylin & Eosin stain of a frozen section (A). Part of the stratum corneum was lost during processing. Immunostaining for basement membrane components: Note the expression of laminin (B), type IV collagen (C), and type VII collagen (D) expressed all along the dermal-epidermal junction. Immunostaining of markers for keratinocyte differentiation: filaggrin (E) is restricted to the granular and cornified layers whereas transglutaminase (F) and keratin 10 (G) are expressed in all suprabasal epidermal cell layers. Control stains (conjugate only) showed spotted background in the dermal area (H).



Immunostaining of the hair follicle shows a continuous expression of basement membrane proteins at the follicular-dermal junction (Figure B-C). It demonstrates the adaptation of the follicular keratinocytes which have completely filled the insertion space and have established a new basement membrane at the periphery of the follicle. This also suggests a strong attachment of the appendage to its new environment as observed on Figure 59A. Immunostaining of the differentiation markers also indicated good keratinocyte adaptation as filaggrin (Figure 59E) expression was highly restricted to the granular and cornified layer whereas transglutaminase (Figure 59F) and keratin 10 (Figure 59G) are still expressed in all suprabasal epidermal cell layers. These stains confirm conserved keratinocyte polarity in the cultured hair follicle even after X days in culture.

Figure 57 (next page): Histology and Immunohistology of the hair follicle within matured skin equivalent at 21 days (cross sections; x135). Hematoxylin & Eosin stain of a frozen section (A). Immunostaining for basement membrane components: Note the continuous expression of laminin (B), type IV collagen (C), and type VII collagen (D) along the follicle-dermis junction. Immunostaining of markers for keratinocyte differentiation: strong filaggrin (E) expression is restricted to the granular and cornified layers whereas transglutaminase (F) and keratin 10 (G) are expressed in all suprabasal epidermal cell layers. Control stains (conjugate only) showed weak background in the dermal area (H).



5.6.3 Ultrastructural analysis

Electron microscopic analysis of interfollicular biopsies from skin equivalents after 3 weeks at the air-liquid interface revealed a well differentiated epidermis and a dense underlying dermal equivalent. Basal keratinocytes were cuboidal with a well developed intermediate filament network around the nucleus (data not shown). After 2 weeks at the air-liquid interface, hemidesmosomes were already present along the cytoplasmic membrane of the basal cells and the basement membrane was discontinuously organized (data not shown). At 3 weeks, the epidermal-dermal junction was remarkably well organized and continuous (Figure 60A,B). Keratin intermediate filaments were found attached to the hemidesmosomes (Figure 60B) which were frequently observed along the basement membrane (Figure 60A). Lamina lucida and lamina densa were clearly distinct at the junctional zone (Figure 60A,B). Anchoring filaments extend from the hemidesmosomes to the lamina densa, running across the lamina lucida (Figure 60A,B). Anchoring fibrils looped down from the lamina densa, and some of these terminated in anchoring plaques (Figure 60B). The dermal equivalent underneath the epidermis was a well organized collagenous connective tissue (Figure 60C). Collagen fiber bundles were dense and composed of fibers featuring a characteristic 67 nm periodicity. Bundles were oriented perpendicular one to each other, but parallel to the epidermal surface, exhibiting a typical pattern of the dermis *in vivo*.³⁸ They were surrounded by a vast network of parallel 10-12 nm elastin-associated microfibrils (Figure 60C).³⁹

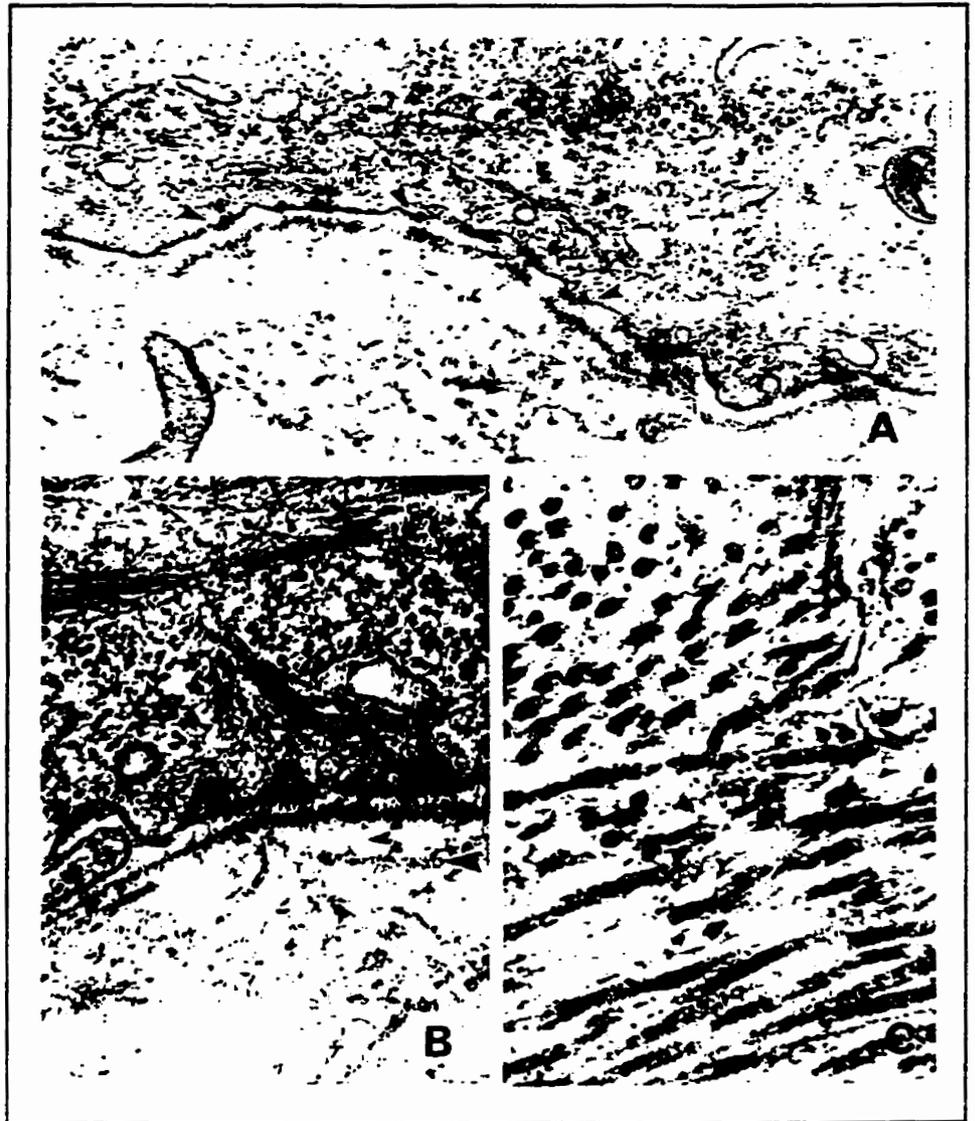


Figure 58: Ultrastructural organization of the dermal-epidermal junction.

Numerous hemidesmosomes (arrow heads) are present along the continuous basement membrane (A; x38400); keratin intermediate filaments are attached to the dense plaque of the hemidesmosomes at the periphery of the basal keratinocytes (B; x48000). Note the presence of anchoring filaments coursing from the hemidesmosomes through the lamina lucida to the lamina densa. Anchoring fibrils (arrow heads) are clearly seen extending into the dermis. Some of these terminate in an anchoring plaque (large arrow heads). Bundles of parallel collagen fibers (C; x81500) are oriented in various directions and associated with a parallel microfibril network.

5.6.4 Influence of hair in percutaneous absorption

The rate of penetration of hydrocortisone through skin equivalents with or without hair was evaluated by *in vitro* percutaneous absorption using Franz diffusion cells, as previously described.^{21,36} As shown in Figure 61, the skin equivalents with hair were more permeable to hydrocortisone compared to the one without hair. No lag-time was observed with hairy skin equivalent and 70% of the hydrocortisone had diffused through the samples after 8 h. As expected, a lag-time was observed in the diffusion of the hydrocortisone through the skin equivalent without hair and only 20% of the drug was found in the receiver compartment after 8 h. In all cases, the rate of penetration of hairless mouse and normal human skin were found similar to our previous results.²¹

5.7 Discussion

Recent reports have suggested that, in addition to the transepidermal route, hair follicles and sebaceous glands can contribute significantly to transepidermal delivery.^{4-6,for review see 3} However, follicular delivery studies were limited by the absence of a model well suited for permeability experiments. Our study describes a complete human skin equivalent model produced exclusively from cutaneous cells without any exogenous material, nor biological or synthetic. It exhibited histological, immunohistological, and ultrastructural properties similar to normal human skin. Furthermore, it permitted the insertion of hair follicles (or pilosebaceous unit), and gave a model where the only variable was the presence of the appendage. Therefore, such an *in vitro* model allowed us to clearly demonstrate the direct importance of hair follicle in *in vitro* percutaneous absorption of hydrocortisone.

Chapitre VI

6. Conclusion générale

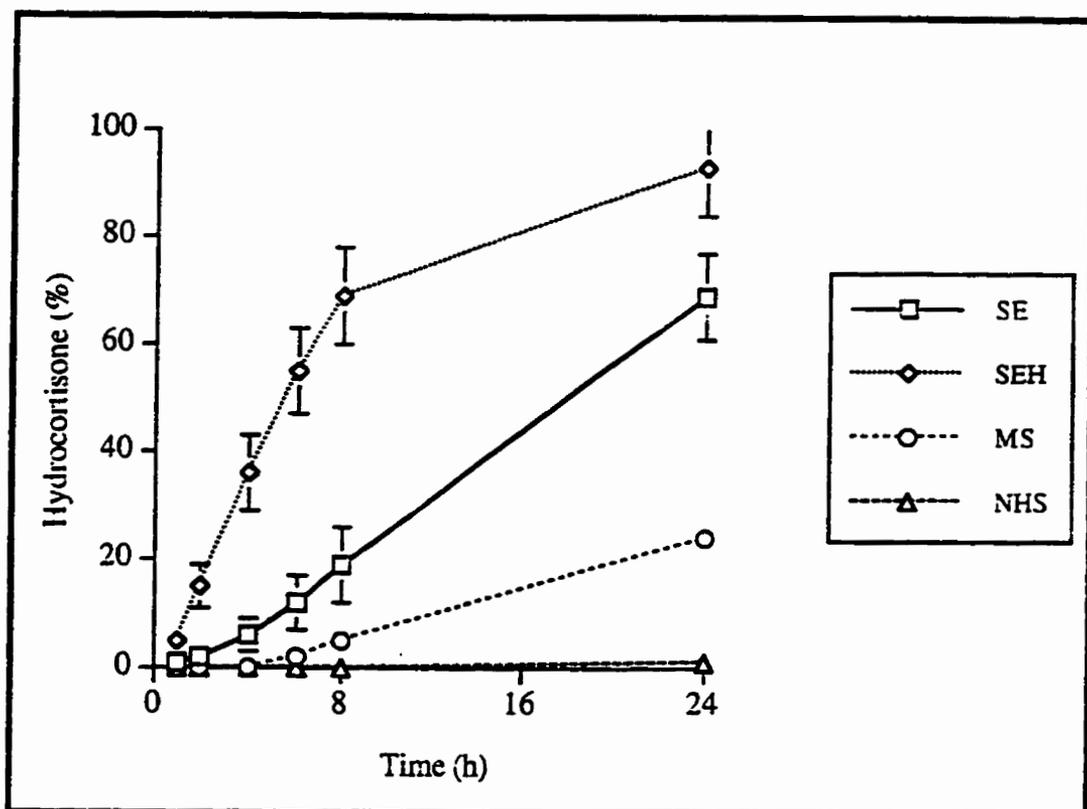


Figure 59: Influence of the transfollicular pathway on hydrocortisone *in vitro* percutaneous absorption. One representative experiment of three. Values are means of skin equivalent without hair (SE, n=4), skin equivalent with hair (SEH, n=7), mouse skin (MS, n=2), normal human skin (NHS, n=2) \pm SD.

In our new model, human adult dermal fibroblasts were cultured in monolayer with ascorbic acid. As previously described, ascorbic acid increases procollagen mRNA synthesis in human and mouse fibroblasts.^{40,41} It allows the post-translational hydroxylation of lysine and proline, leading to the efficient collagen helix formation and secretion of collagen from the cell.^{42,43} This property was already used by Naughton *et al.*⁴⁴ in a three-dimensional culture of fibroblasts using a nylon mesh. Our model does not have any synthetic material. After 35 to 42 days of fibroblast monolayer culture, the sheet formed at the bottom

of the dish can be easily peeled off, and 2 to 4 layers can be superposed, insuring a thick dermal equivalent for keratinocytes and hair follicles. This demonstrates that the fibroblasts do not need a three-dimensional culture system to form a complex extracellular matrix. The various extracellular matrix components (type I, II and IV collagens, elastin, laminin, etc.) originated only from the endogenous secretion and accumulation by human fibroblasts. Therefore, this matrix is entirely composed of human proteins assembled according to the cell's need. It exhibits some properties close to the human dermis. Indeed, laminin, collagen IV and collagen VII were strongly expressed at the dermo-epidermal junction. As revealed by ultrastructural morphology, the abundant collagen fibers exhibited typical periodicity and were organized in bundles, as observed in human dermis.³⁸ Moreover, a large number of microfibrils seen as single units or in bundles intermingled with collagen fibrils in a parallel fashion. As demonstrated by L'Heureux *et al* (submitted), this *in vitro* extracellular matrix also contains elastin, a significant component of the dermis usually absent from the collagen gels and other dermal equivalent. This endows elastic properties to the dermal equivalent, one of the most important mechanical properties of the dermis.

One of the most interesting aspect of this new model is the development of a continuous basal lamina and numerous anchoring zone observed at the dermo-epidermal junction. A complete lamina densa was observed after 4 weeks of co-culture, one week earlier than previously reported by Contard *et al*.¹⁵ The basal lamina was separated from the basal keratinocytes by a clear and distinct lamina lucida. Hemidesmosomes were present all along the basal surface of the keratinocytes and were connected with keratin intermediate filaments. Anchoring filaments extend from the hemidesmosomes to the lamina densa, running across the lamina lucida. Also anchoring fibrils have been observed, looping down from the lamina densa, and terminating in anchoring plaques.

When keratinocytes were seeded on this lattice, they proliferated, differentiated at the air-liquid interface, and gave rise to a stratified and cornified epidermis. Keratin 10, transglutaminase, as well as filaggrin were expressed in the suprabasal layers. Therefore, matured skin equivalents featured a well stratified epidermis and expressed phenotypic differentiation markers observed in normal human skin.

Although tissue engineering and cell culture have given rise to various skin equivalent models, none of these contains hair follicles. Hair follicles have been used as a new source of epidermal keratinocytes avoiding skin biopsies.⁴⁵ Indeed, cells from the outer root sheath are known for their extensive proliferation potential and a subpopulation located in the bulge area are found with stem cell properties.⁴⁶⁻⁵⁰ In organotypic cocultures with human dermal fibroblasts, these cells develop a stratified epithelium reminiscent of regenerating appendage-free epidermis.^{29,51} In other respects, hair follicle have been cultured *in vitro*, in dishes or in an histoculture system, to evaluate the influence of different growth factors and cytokines on their growth rate.^{22,26,30} These models were optimized for hair follicle studies but did not include the sebaceous gland attached to the outer root sheet. In our study, we isolated the complete pilosebaceous unit and inserted it in our new skin equivalent. To the best of our knowledge, this is the first report of a skin equivalent with hair follicles. Our model allows the clean insertion of the pilosebaceous unit between two sheets of fibroblasts, hence surrounding it with natural extracellular matrix, as in human dermis. The shape of the hair follicle remained stable for at least 5 weeks in culture, and did not degenerate.

This skin equivalent with hair follicles allowed us to address the question of the role of skin appendages in percutaneous absorption. For drugs with a low diffusion constant, shunt diffusion (through the skin appendages) can be predominant, and control percutaneous absorption not only in the transient period but during the steady state as well.⁷ Indeed, the rate of penetration through

our skin equivalents with hair follicles was higher compared to the control with only interfollicular epidermis. Interestingly, no lag-time was observed when hair follicles were inserted in the skin equivalents, confirming the mathematical analysis of Scheuplein.⁷ Previous *in vitro* or *in vivo* studies with human or animal skin lead to the same conclusion, implicating the hair follicles as important enhancer of the rate of penetration of large molecules. However, the comparison was always made between two types of skins in which the presence of hair follicles was not the only variable, i.e. scar and normal skin, hairless mouse strains with different hair density, or palm and abdominal skin. Our direct comparison between skin equivalents with or without hair follicles clearly indicates the importance of this appendage in the percutaneous absorption of hydrocortisone. Therefore, this *in vitro* model ascertain the significance of follicular delivery. It could be very useful in the understanding of the control mechanisms which govern the transfollicular pathway, and accelerate the design of hair follicle-specific drug delivery system, specifically for several dermatological abnormalities.

5.8 Acknowledgments

We are grateful to the plastic surgeons from the Saint-Sacrement hospital (Québec, Canada) who provided us with skin specimens. We also thank Rina Guignard, Julie Bergeron and Nathalie Tremblay for technical help and Claude Marin for photographic assistance. This study was supported by the Medical Research Council of Canada, the "Réseau des Grands Brûlés du Fonds de la Recherche en Santé du Québec", the "Fondation des Pompiers du Québec pour les Grands Brûlés" and the "Fondation de l'Hôpital du Saint-Sacrement". L. Germain and F. A. Auger were recipients of Scholarships from the "Fonds de la Recherche en Santé du Québec". M. Michel and N. L'Heureux were recipient of Studentships from the "Fonds de la Recherche en Santé du Québec" and "Fonds FCAR du Québec", respectively.

5.9 References

1. Shaw, J.E., Prevo, M., Gale, R. & Yum, S.I. Percutaneous absorption. in *Physiology, biochemistry, and molecular biology of the skin, 2nd edition*. Vol. II (eds Goldsmith, L.A.) 1447-1479 (1991).
2. Scheuplein, R.J. Mechanism of percutaneous absorption. I. routes of penetration and the influence of solubility. *J Invest Dermatol* 45, 334-346 (1965).
3. Lauer, A.C., Lieb, L.M., Ramachandran, C., Flynn, G.L. & Weiner, N.D. Transfollicular drug delivery. *Pharm Res* 12, 179-186 (1995).
4. Kao, J., Hall, J. & Helman, G. *In vitro* percutaneous absorption in mouse skin: influence of skin appendages. *Tox Appl Pharmacol* 94, 93-103 (1988).
5. Illel, B., Schaefer, H., Wepierre, J. & Doucet, O. Follicles play an important role in percutaneous absorption. *J Pharm Sci* 80, 424-427 (1991).

6. Scheuplein, R.J., Blank, I.H., Brauner, G.J. & MacFarlane, D.J. Percutaneous absorption of steroids. *J Invest Dermatol* 52(1), 63-70 (1969).
7. Scheuplein, R.J. Mechanism of percutaneous absorption II. Transient diffusion and the relative importance of various routes of skin penetration. *J Invest Dermatol* 48(1), 79-88 (1967).
8. Hueber, F., Wépierre, J. & Schaefer, H. Role of transepidermal and transfollicular routes in percutaneous absorption of hydrocortisone and testosterone: *in vivo* study in the hairless rat. *Skin pharmacol* 5, 99-107 (1992).
9. Tur, E., Maibach, H.I. & Guy, R.H. Percutaneous penetration of methyl nicotinate at three anatomic sites: evidence for an appendageal contribution to transport? *Skin pharmacol* 4, 230-234 (1991).
10. Hueber, F., Schaefer, H. & Wépierre, J. Role of transepidermal and transfollicular routes in percutaneous absorption of steroids: *in vitro* studies on human skin. *Skin Pharmacol* 7, 237-244 (1994).
11. Mak, V.H.W. *et al.* Barrier function of human keratinocyte cultures grown at the air-liquid interface. *J Invest Dermatol* 96, 323-327 (1991).
12. Régnier, M., Pruniéras, M. & Woodley, D.M. Growth and differentiation of adult human epidermal cells on dermal substrates. *Front Matrix Biol* 9, 4-35 (1981).
13. Bell, E., Ivarsson, B. & Merrill, C. 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(3), 1274-1278 (1979).
14. Berthod, F., Hayek, D., Damour, O. & Collombel, C. Collagen synthesis by fibroblasts cultured within a collagen sponge. *Biomaterials* 14, 749-754 (1993).
15. Contard, P. *et al.* Culturing keratinocytes and fibroblasts in a three-dimensional mesh results in epidermal differentiation and formation of a basal lamina-anchoring zone. *J Invest Dermatol* 100, 35-39 (1993).
16. Slivka, S.R., Landeen, L.K., Zeigler, F., Zimber, M.P. & Bartel, R.L. Characterization, barrier function, and drug metabolism of an *in vitro* skin model. *J Invest Dermatol* 100, 40-46 (1993).

17. Germain, L. & Auger, F.A. Tissue engineered biomaterials: biological and mechanical characteristics. In *Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering*, Wise, D L, Trantolo, D J, Altobelli, D A, Yaszemski, M J, Gresser, J D, Schwartz, E R eds, Marcel Dekker, NY 1, 699-734 (1995).
18. Pruniéras, M., Régnier, M. & Woodley, D. Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. *J Invest Dermatol* 81(1), 23s-33s (1983).
19. Asselineau, D., Bernard, B.A., Bailly, C. & Darmon, M. Epidermal morphogenesis and induction of the 67K keratin polypeptide by culture of human keratinocytes at the liquid-air interface. *Exp Cell Res* 159, 536-539 (1985).
20. Asselineau, D., Bernard, B.A., Bailly, C., Darmon, M. & Pruniéras, M. Human epidermis reconstituted by culture: Is it "normal"? *J Invest Dermatol* 86, 181-186 (1986).
21. Michel, M., Germain, L., Bélanger, P.M. & Auger, F.A. Functional evaluation of anchored skin equivalent cultured *in vitro*: percutaneous absorption studies and lipid analysis. *Pharm Res* 12, 455-458 (1995).
22. Philpott, M.P., Green, M.R. & Kealey, T. Human hair growth *in vitro*. *J Cell Sci* 97, 463-471 (1990).
23. Li, L., Margolis, L.B., Paus, R. & Hoffman, R.M. Hair shaft elongation, follicle growth, and spontaneous regression in long-term, gelatin sponge-supported histoculture of human scalp skin. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 8764-8768 (1992).
24. Rolland, A., Wagner, N., Chatelus, A., Shroot, B. & Schaefer, H. Site-specific drug delivery to pilosebaceous structures using polymeric microspheres. *Pharm Res* 12(10), 1738-1744 (1993).
25. Li, L., Lishko, V. & Hoffman, R.M. A model for gene therapy of the hair growth processes. *In Vitro Cell Dev Biol* 29a, 258-260 (1993).
26. Li, L. & Hoffman, R.F. Histoculture radioametric *in vitro* hair growth assay. *In Vitro Cell Dev Biol* 29a, 449-450 (1993).

27. Li, L., Hoffman, R.M. & Lishko, V. High efficiency liposome-mediated transfection of the tyrosinase gene to cultured cells: a model for the gene therapy of hair color restoration. *In Vitro Cell Dev Biol* 30a, 135-138 (1994).
28. Li, L. & Hoffman, R.M. The feasibility of targeted selective gene therapy of the hair follicle. *Nature Med* 1(7), 705-706 (1995).
29. Lenoir, M.C., Bernard, B.A., Pautrat, G., Darmon, M. & Shroot, B. Outer root sheath cells of human hair follicle are able to regenerate a fully differentiated epidermis *in vitro*. *Develop Biol* 130, 610-620 (1988).
30. Lenoir-Viale, M.C., Galup, C., Darmon, M. & Bernard, B.A. Epidermis reconstructed from the outer root sheath of human hair follicle. Effect of retinoic acid. *Arch Dermatol Res* 285, 197-204 (1993).
31. Green, H., Kehinde, O. & Thomas, J. Growth of cultured human epidermal cells into a multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Natl Acad Sci USA* 76(11), 5665-5668 (1979).
32. Germain, L. *et al.* Improvement of human keratinocyte isolation and culture using thermolysin. *Burns* 2, 99-104 (1993).
33. Rheinwald, J.G. & Green, H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6, 331-343 (1975).
34. Bouvard, V., Germain, L., Rompr, P., Roy, B. & Auger, F.A. Influence of dermal equivalent maturation on the development of a cultured skin equivalent. *Biochem Cell Biol* 70, 34-42 (1992).
35. Franz, T.J. Percutaneous absorption. On the relevance of *in vitro* data. *J Invest Dermatol* 64(3), 190-195 (1975).
36. Michel, M., Auger, F.A. & Germain, L. Anchored skin equivalent cultured *in vitro*: a new tool for percutaneous absorption studies. *In Vitro Cell Dev Biol* 29a, 834-837 (1993).
37. Dale, B.A., Resing, K.A. & Presland, R.B. Keratohyalin granule proteins. in *The keratinocyte handbook* (eds Leigh, I., Lane, B. & Watt, F.) 323-350 (Cambridge University Press, Cambridge, 1994).

38. Birk, D.E. & Linsenmayer, T.F. Collagen Fibril Assembly, Deposition, and Organisation into Tissue-Specific Matrices. in *Extracellular Matrix Assembly and Structure* (eds Yurchenco, P.D., Birk, D.E. & Mecham, P.R.) 91-128 (Academic Press, San Diego, 1994).
39. Fleischmajer, R. *et al.* Elastin-associated microfibrils (10 nm) in a three-dimensional fibroblast culture. *Journal of Investigative Dermatology* 97, 638-643 (1991).
40. Geesin, J.C., Darr, D., Kaufman, R., Murad, S. & Pinnell, S.R. Ascorbic acid specifically increases type I and type III procollagen messenger RNA levels in human skin fibroblasts. *J Invest Dermatol* 90, 420-424 (1988).
41. Lamand, S.R. & Bateman, J.F. A mouse 3T6 fibroblast cell culture model for the study of normal and protein-engineered collagen synthesis and deposition into the extracellular matrix. *Matrix* 13, 323-330 (1993).
42. Murad, S., Tajima, S., Johnson, G.R., Sivarajah, A. & Pinell, S.R. Collagen synthesis in cultured human skin fibroblasts: effect of ascorbic acid and its analogs. *J Invest Dermatol* 81(2), 158-162 (1983).
43. Chan, D., Lamande, S.R., Cole, W.G. & Bateman, J.F. Regulation of procollagen synthesis and processing during ascorbate-induced extracellular matrix accumulation *in vitro*. *Biochem J* 269, 175-181 (1990).
44. Naughton, G.K., Jacob, L. & Naughton, B.A. A physiological skin model for *in vitro* toxicity studies. *Alternative Methods in toxicology* 7, 183-189 (1989).
45. Limat, A. & Noser, F.K. Serial cultivation of single keratinocytes from the outer root sheath of human scalp hair follicles. *J Invest Dermatol* 87, 485-488 (1986).
46. Cotsarelis, G., Sun, T.T. & Lavker, R.M. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* 61, 1329-1337 (1990).
47. Yang, J.S., Lavker, R.M. & Sun, T.T. Upper human hair follicle contains a subpopulation of keratinocytes with superior *in vitro* proliferative potential. *J Invest Dermatol* 101, 652-659 (1993).

48. Rochat, A., Kobayashi, K. & Barrandon, Y. Location of stem cells of human hair follicles by clonal analysis. *Cell* 76, 1063-1073 (1994).
49. Moll, I. Proliferative potential of different keratinocytes of plucked human hair follicles. *J Invest Dermatol* 105, 14-21 (1995).
50. Michel, M. *et al.* Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells *in vivo* and *in vitro*: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage. *J Cell Sci* 109, 1017-1028 (1996).
51. Limat, A. *et al.* Restoration of the epidermal phenotype by follicular outer root sheath cells in recombinant culture with dermal fibroblasts. *Exp Cell Res* 194, 218-227 (1991).

Chapitre VI

6. Conclusion générale

Conclusion générale

Dans le chapitre II, nous avons vu que notre modèle de vaisseau sanguin humain, produit par ingénierie tissulaire, possède toutes les caractéristiques fondamentales d'un greffon vasculaire: résistance mécanique, suturabilité et antithrombogénicité. La prochaine étape de validation de ce greffon est son utilisation chez l'animal ce qui permettra de travailler dans un contexte autologue. Pour ce faire, des cultures de cellules endothéliales, de cellules musculaires lisses et de fibroblastes devront être établies à partir de tissus obtenus d'un même individu. En effet, puisqu'il n'existe pas de lignés syngéniques de gros animaux de laboratoire (chien ou cochon), ces expériences devront être réalisées sur une base individuelle. Ceci complexifie significativement le protocole expérimental mais cela s'avérera une très bonne, et nécessaire, évaluation de l'éventuelle faisabilité clinique de la méthode.

Dans un contexte autologue, un endothélium pourra être établi à la surface interne du vaisseau ce qui devrait diminuer les problèmes de thrombose précoce rencontrés lors de notre premier essai *in vivo*. Cependant, l'antithrombogénicité du greffon endothélialisé dépendra de la persistance des cellules endothéliales après la greffe. Dans le cas des prothèses synthétiques endothérialisées, nous avons vu que la perte de cellules endothéliales après la greffe a été un problème important qui a vraisemblablement été la raison pour laquelle cette technique n'a pas montré les avantages escomptés lors des essais cliniques. L'équipe de Zilla a établi que l'utilisation d'une matrice biologique tapissant l'intérieur de la prothèse synthétique, associée à une période de culture *in vitro* prolongée, permet à l'endothélium de s'organiser afin de résister aux forces de cisaillement rencontrées *in vivo*.^{108,476} Cette équipe a d'ailleurs présenté des résultats cliniques confirmant l'efficacité de cette approche.^{5,477} Dans notre cas, les cellules endothéliales reposent sur une matrice biologique qui contient du collagène IV, une composante naturelle de leur membrane basale.^{32,revue:126} De

plus, notre modèle se prête parfaitement à la culture prolongée des cellules avant l'implantation *in vivo*. Ainsi, d'après les résultats de Zilla et collaborateurs, il est probable que les cellules endothéliales de notre modèle résistent bien au flot sanguin. Enfin, l'application graduelle de forces de cisaillement *in vitro*, dans le but de conditionner les cellules endothéliales, peut aussi être envisagée afin d'augmenter leur persistance après la greffe.⁴⁸⁰

Outre la thrombose précoce, la dilatation anévrismale est l'autre problème auquel semblent confrontées les prothèses à caractère biologique.^{485,487,488,492,519,521,528,529,535-538} À ce point de vue, deux caractéristiques de notre modèle sont importantes: la viabilité cellulaire et le caractère naturel de la matrice biologique. En effet, la présence de cellules vivantes permet d'espérer que celles-ci pourront, grâce à leurs capacités synthétiques, maintenir l'intégrité de la matrice biologique (collagène et élastine) au cours du remodelage du greffon dans les mois suivant son implantation. Pour sa part, l'absence de matrice synthétique, ou biologique modifiée chimiquement, pourrait éviter la persistance d'une réaction inflammatoire. Puisque la présence de cellules inflammatoires implique la sécrétion de métalloprotéinases matricielles, celles-ci pourraient être la cause de la formation d'anévrismes.^{388,389} De plus, la présence de matrices synthétiques, qui sont généralement peu élastiques, causent des zones de stress mécaniques importants à l'interface biomatériau/tissu qui pourraient être à l'origine de l'hyperplasie intinale, une cause tardive de sténose.⁴¹⁰ Ainsi, notre modèle possède certains avantages, par rapport aux autres prothèses vasculaires à caractère biologique, qui permettent d'espérer que celui-ci sera plus résistant à la dilatation.

L'originalité de notre modèle rend sa comparaison avec d'autres prothèses difficile. Cependant, sa nature autologue, biologique et vivante font penser au modèle de Sparks.⁵³² Or, celui-ci a présenté de sérieux problèmes de dilatation anévrismales.^{533,535-538} Une différence entre notre modèle et celui de Sparks est l'absence d'élastine dans ce dernier.⁵³³ Notre modèle serait donc

peut-être plus apte à résister aux contraintes mécaniques à long terme. De plus puisque notre modèle est endothélialisé et qu'il ne contient pas de matrice synthétique, il produira probablement une réaction inflammatoire moins importante. Enfin, le modèle de Sparks est en fait une cicatrice de forme tubulaire. Or, le tissu cicatriciel présente une structure peu organisée qui persiste pendant plusieurs mois. Notre modèle étant produit par une méthode complètement différente, il est possible que sa composition ainsi que son organisation soit significativement différentes et que cela se reflète sur son comportement *in vivo*.

Par ailleurs, le modèle de Lantz et collaborateurs, produit à partir de sous-muqueuse intestinale, partage son caractère entièrement biologique avec notre modèle.^{568,574-578} Ici encore, la structure des tissus est très différente. Néanmoins, les bons résultats obtenus avec cette prothèse laissent croire que l'implantation d'un tissu entièrement biologique autologue, non modifié, peut conduire à l'intégration totale de la greffe et à sa stabilité à long terme. En effet, les problèmes de thrombose précoce de ce greffon non endothélialisé ont pu être contrôlés à l'aide d'une thérapie anticoagulante, tandis que les problèmes d'anévrismes ont pu être éliminés par l'utilisation d'une méthode de production plus rigoureuse. Cependant, le modèle de Lantz semble se diriger vers une utilisation dans un contexte xénogénique étant donné la variabilité inter-espèces qui rend impossible la production de ce greffon à partir de sous-muqueuse intestinale de nombreuses espèces, dont l'homme.⁵⁷⁷ Dans un contexte xénogénique, il n'est pas certain que ce modèle présente d'aussi bons résultats étant donné l'absence de cellules vivantes et les problèmes d'anévrismes rencontrés lors de l'implantation de tissus vasculaires xénogéniques (même acellulaires).³⁹² Pour l'instant, des résultats à long terme ne sont pas disponibles pour les modèles xénogéniques.

Un autre aspect important à considérer lorsque l'on anticipe le comportement d'un greffon après sa greffe est la survie cellulaire. Dans le cas d'un greffon artériel, un apport de nutriments et d'oxygène sera assuré par la proximité de la circulation et par la pression artérielle. Cependant, les couches internes du vaisseau ne recevront probablement pas suffisamment de nutriments et d'oxygène à partir du lumen ou de la circulation périphérique. Ainsi, l'apparition d'un *vasa vasorum* permettrait une meilleure survie des cellules de l'adventice. Étant donné la grande facilité avec laquelle les matrices biologiques sont envahies par des capillaires lors de leur implantation *in vivo*, il est probable qu'un *néo-vasa vasorum* puisse être observé peu de temps après l'implantation.⁶¹⁶

Dans le cas de succès de la greffe vasculaire et de survie cellulaire satisfaisante, ce modèle pourrait être utilisé comme véhicule de cellules autologues transfectées exprimants une protéine d'intérêt thérapeutique. En effet, la thérapie génique à l'aide de cette technique, et utilisant des cellules autologues, permettrait une application thérapeutique à long terme. De plus, cette approche assure une grande accessibilité à la circulation sanguine et implique une transfection *in vitro* permettant ainsi un meilleur contrôle de qualité et d'éviter les risques associés à l'injection de vecteurs de transfections.

Dans les chapitres III et IV, la média vasculaire, produite par la nouvelle technique d'ingénierie tissulaire présentée au chapitre I, a été utilisée comme modèle pharmacologique pour l'étude du comportement contractile des cellules musculaires lisses. Ce nouveau modèle est unique car il est le premier modèle produit à partir de cellules musculaires lisses cultivées qui permet: 1) son utilisation à la place de vaisseaux animaux ou humains dans des bains d'organes isolés classiques pour des études de contraction, 2) d'observer la contraction de cellules musculaires lisses cultivées d'origine humaine. Ce modèle de contraction a été utilisé dans une étude pharmacologique des récepteurs purinergiques. De

plus, celui-ci s'est également révélé être un bon outil de recherche dans le domaine des influx calciques dans les cellules musculaires lisses en réponse à des agonistes vasoactifs. Les résultats présentés dans cette thèse montrent que la média cultivée nécessitera une caractérisation plus poussée afin de déterminer quels aspects de la réponse contractile et calcique sont adéquatement représentés dans ce modèle. Cependant, les comportements surprenants observés au cours des diverses études utilisant ce modèle ne devraient pas être écartée comme étant sans intérêt. Au contraire, un modèle *in vitro* peut parfois permettre de découvrir des phénomènes qui sont masqués *in vivo*. Ainsi, tels que de nombreuses lignées de cellules immortalisées, un modèle *in vitro* offre la possibilité d'étudier certains phénomènes dans des conditions contrôlées, bien que pas nécessairement physiologiques.^{331,333, 335}

De nos jours, le coût de production est un facteur important qui déterminera l'utilisation d'un greffon vasculaire ou d'un modèle *in vitro*. Ainsi, il est important de préciser que les protocoles utilisés n'ont pas été optimisés dans le but de raccourcir les temps de culture au minimum ou de réduire la consommation de sérum animale lors de la culture. Ces considérations devront néanmoins être attentivement analysées afin de valoriser ces découvertes. C'est dans cet optique qu'un brevet a été déposé pour protéger cette nouvelle technologie. Certains facteurs pourront également influencer la «valeur» de ces nouveaux modèles. Par exemple, le niveau futur des restrictions concernant l'utilisation des animaux de laboratoire, imposées par les gouvernements et l'opinion publique, sera un facteur important pour l'utilisation de modèle *in vitro*. Par ailleurs, les craintes soulevées par les dangers d'infection virale lors de greffes de tissus allogéniques ou xénogéniques favorisent une approche autologue, même coûteuse, aux problèmes associés au remplacement d'organe. Enfin, les réactions de l'organisme aux biomatériaux synthétiques sont devenus une préoccupation plus importante depuis les récents événements liés aux implants mammaires.

La production d'un équivalent cutané, à partir de la technique de base mise au point pour la production d'un vaisseau sanguin, montre bien à quelle point cette nouvelle méthode est polyvalente. Elle permet de produire des tissus ayant une structure tissulaire dont les propriétés physiologiques ont permises dépasser les limites actuelles de l'ingénierie tissulaire: la construction d'un vaisseau sanguin entièrement biologique doté d'une résistance mécanique supra-physiologique, la production d'une média vasculaire permettant à des cellules musculaires lisses humaines cultivées d'exprimer un phénotype réellement contractile et l'élaboration d'un équivalent dermo-épidermique entièrement biologique dont les qualités ultrastructurales sont insurpassées *in vitro*. En conclusion, les applications en ingénierie tissulaire de cette nouvelle technologie semblent innombrables et d'autres modèles organes pourront bientôt profiter de cette approche simple mais innovatrice.

Chapitre VII

7. Bibliographie générale

Bibliographie Générale

1. Arteriosclerosis: Report of the working group on arteriosclerosis of the National Heart, Lung, and Blood Institute, Vol. 2. *US Department of Health and Human Services, Government Printing Office, Washington, DC* (1981).
2. Crossman, C., Dashwood, M.R., Brain, S.D., McEwan, J. & Pearson, J.D. Action of calcitonin gene-related peptide upon bovine vascular endothelial and smooth muscle cells grown in isolation and coculture. *Br J Pharmacol* **99**, 71-76 (1990).
3. Antonelli-Orlidge, A., Saunders, K.B., Smith, S.R. & D'Amore, P.A. An activated form of transforming growth factor β is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 4544-4548 (1989).
4. de Bono, D.P., Pittilo, M., Pringle, S. & Green, C. Endothelial-smooth muscle interactions *in vitro*: effects of high pH, flowing medium and extracellular matrix. *Br J Exp Path* **69**, 209-220 (1988).
5. Goligorsky, M.S. Role of endothelium in endotoxin blockade of voltage-sensitive Ca^{2+} channels in smooth muscle cells. *Am J Physiol* **257**, 875-881 (1989).
6. Ganz, P., Davies, P.F., Leopold, J.A., Gimbrone, M.A. & Alexander, R.W. Short-and long-term interactions of endothelium and vascular smooth muscle in coculture: effects on cyclic GMP production. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 3552-3556 (1986).
7. Grinnel, F. & R., L.C. Reorganization of hydrated collagen lattices by human skin fibroblasts. *J Cell Sci* **66**, 51-63 (1964).
8. Hajjar, D.P., Marcus, A.J. & Hajjar, K.A. Interactions of arterial cells. Studies on the mechanisms of endothelial cell modulation of cholesterol metabolism in co-cultured smooth muscle cells. *J Biol Chem* **262**, 6976-6981 (1987).
9. Jones, P.A. Construction of an artificial blood vessel wall from cultured endothelial and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 1882-1886 (1979).

10. Navab, M. *et al.* Monocyte migration into the subendothelial space of a coculture of adult human aortic endothelial and smooth muscle cells. *J Clin Invest* 82, 1853-1863 (1988).
11. Orledge, A. & D'Amore, P.A. Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells. *J Cell Biol* 105, 1455-1462 (1987).
12. Van Buul-Wortelboer, M.F. *et al.* Reconstitution of the vascular wall *in vitro*. A novel model to study interactions between endothelial and smooth muscle cells. *Exp Cell Res* 162, 151-158 (1986).
13. Weber, E., Hammerle, H., Vatti, R., Berti, G. & Betz, E. Co-cultivation of endothelial and smooth muscle cells on opposite sides of a porous membrane. *Vessels Appl Pathol* 4, 246-252 (1986).
14. Weinberg, C.B. & Bell, E. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science* 231, 397-400 (1986).
15. Lind, R.E. *et al.* Aortofemoral bypass grafting. *Microvel Am Surg* 48, 89-92 (1982).
16. Moore, W.S., Cafferata, H.T., Hall, A.D. & Blaisdell, F.W. In defense of grafts across the inguinal ligament: An evaluation of early and late results of aorto-femoral bypass grafts. *Ann Surg* 168, 207-214 (1968).
17. Charlesworth, P.M., Brewster, D.C., Darling, R.C., Robinson, J.G. & Hallett, J.W. The fate of polytetrafluoroethylene grafts in lower limb bypass surgery: A six year follow-up. *Br J Surg* 72, 896-899 (1985).
18. Veith, F.J. *et al.* Six year prospective multicenter randomized comparison of autologous saphenous vein and expanded polytetrafluoroethylene grafts in infrainguinal arterial reconstructions. *J Vasc Surg* 3, 104-114 (1986).
19. Yeager, R.A. *et al.* Differential patency and limb salvage for polytetrafluoroethylene and autogenous saphenous vein in severe lower extremity ischaemia. *Surgery* 91, 99-103 (1982).
20. Langer, R. & Vacanti, J.P. Artificial organs. in *Scientific American* Vol. September 130-133, 1995).

21. L'Heureux, N., Germain, L., Labbe, R. & Auger, F.A. *In vitro* construction of a human blood vessel from cultured vascular cells: a morphologic study. *J Vasc Surg* 17, 499-509 (1993).
22. Pasic, M. *et al.* Seeding with omental cells prevents late neointimal hyperplasia in small-diameter Dacron grafts. *Circulation* 92, 2605-2616 (1995).
23. Birinyi, K.L., Douville, C., Lewis, S.A., Bjornson, H.S. & Kempczinski, R.F. Increased resistance to bacteremic graft infection after endothelial cell seeding. *Surgery* 5, 193-197 (1987).
24. Rosenman, J.E. *et al.* Bacterial adherence to endothelial-seeded polytetrafluoroethylene grafts. *Surgery* 98, 816-823 (1985).
25. Margiotta, M.S., Benton, L. & Greco, R.S. Endothelial cells adherent to expanded polytetrafluoroethylene express the intercellular adhesion molecule-1. *J Am Coll Surg* 181, 215-219 (1995).
26. Craig, W.S., Cheng, S., Mullen, D.G., Blevitt, J. & Pierschbacher, M.D. Concept and progress in the development of RGD-containing peptide pharmaceuticals. *Biopolymers* 37, 157-175 (1995).
27. Herman, I. Extracellular matrix-cytoskeletal interactions in vascular cells. *Tissue & Cell* 19, 1-19 (1987).
28. Gospodarowicz, D., Vlodavsky, I. & Savion, N. The extracellular matrix and the control of proliferation of vascular endothelial and vascular smooth muscle cells. *J Supra Struc* 13, 339-372 (1980).
29. Davis, G.E. & Camarillo, C.W. Regulation of endothelial cell morphogenesis by integrins, mechanical forces, and matrix guidance pathways. *Exp Cell Res* 216, 113-123 (1995).
30. Parsson, H., Jundzill, W., Jonung, T., Thorne, J. & Norgren, L. The adhesion of labelled neutrophils on synthetic vascular grafts. An experimental porcine study. *Eur J Vasc Surg* 7, 257-262 (1993).
31. Noishiki, Y., Yamane, Y. & Miyata, T. Long-term evaluation of a growable graft. *ASAIO Trans* 35, 267-270 (1989).

32. Timpl, R. & Dziadek, M. Structure, development, and molecular pathology of basement membranes. *Int Rev Exp Pathol* **29**, 1-112 (1986).
33. Spence, A.S. & Mason, E.M. *Anatomie et physiologie, une approche intégrée*, 855 (Éditions du nouveau pédagogique inc., Montréal, 1983).
34. Nicosia, R.F. & Villaschi, S. Rat aortic smooth muscle cells become pericytes during angiogenesis *in vitro*. *Lab Invest* **73**, 658-666 (1995).
35. Kelley, C., D'Amore, P., Hechtman, H.B. & Shepro, D. Microvascular pericyte contractility *in vitro*: comparison with other cells of the vascular wall. *J Cell Biol* **104**, 483-490 (1987).
36. Tilton, R.G. Capillary pericytes: perspectives and future trends. *J Electron Microsc Tech* **19**, 327-344 (1991).
37. Sims, D.E. Recent advances in pericyte biology- Implications for health and disease. *Can J Cardiol* **7**, 431-443 (1991).
38. Johansen, K. *et al.* Ruptured abdominal aortic aneurysm: the Harborview experience. *J Vasc Surg* **13**, 240-245; discussion 245-247 (1991).
39. Schwartz, C.J., Valente, A.J. & Sprague, E.A. A modern view of atherogenesis. *Am J Cardiol* **71**, 9b-14b (1993).
40. Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **362**, 801-809 (1993).
41. Ross, R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol* **57**, 791-804 (1995).
42. DeBakey, M.E., Lawrie, G.M. & Glaeser, D.H. Patterns of atherosclerosis and their surgical significance. *Ann Surg* **201**, 115-131 (1985).
43. Cornhill, J.F., Herderick, E.E. & Sary, H.C. Topography of human aortic sudanophilic lesions. in *Blood flow in large arteries: applications to atherogenesis and clinical medicine* Vol. 15 (ed. Liepsch, D.W.) 13-19 (Karger, Basel, 1990).
44. Geer, J.C., McGill, J.C. & Strong, J.P. The fine structure of human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* **Xxxviii**, 263-275 (1961).
45. Sary, H.C. Composition and classification of human atherosclerotic lesions. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* **421**, 277-290 (1992).

46. Stary, H.C. Evolution of atherosclerotic plaques in the coronary arteries of young adults. *Atherosclerosis* 3, 471a (1983).
47. McGill, H.C.J. Persistent problems in the pathogenesis of atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 4, 443-451 (1984).
48. Pathobiological-Determinants-of-Atherosclerosis-in-Youth-(PDAY)-Research-Group. Natural history of aortic and coronary atherosclerotic lesions in youth. Findings from the PDAY Study. *Arterioscler Thromb* 13, 1291-1298 (1993).
49. Davies, P. Vascular cell interactions with special reference to the pathogenesis of atherosclerosis. *Lab Invest* 55, 5-24 (1986).
50. Greisler, H.P. Vascular graft healing- interfacial phenomena. in *New biologic and synthetic vascular prostheses* 1-19 (R.G. Landers Company, Austin, 1991).
51. Stemme, S., Holm, J. & Hansson, G.K. T lymphocytes in human atherosclerotic plaques are memory cells expressing CD45RO and the integrin VLA-1. *Arterioscler Thromb* 12, 206-211 (1992).
52. Ross, R., Wight, T.N., Strandness, E. & Thiele, B. Human atherosclerosis. I. Cell constitution and characteristics of advanced lesions of the superficial femoral artery. *American Journal of Pathology* 114, 79-93 (1984).
53. Bostrom, K. *et al.* Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 91, 1800-1809 (1993).
54. Watson, K.E. *et al.* TGF-beta 1 and 25-hydroxycholesterol stimulate osteoblast-like vascular cells to calcify. *J Clin Invest* 93, 2106-2113 (1994).
55. Demer, L.L. Effect of calcification on *in vivo* mechanical response of rabbit arteries to balloon dilation. *Circulation* 83, 2083-2093 (1991).
56. Davies, M.J. & Thomas, A.N. Thrombosis and acute coronary-artery lesions in sudden cardiac ischemic death. *N Eng J Med* 310, 1137-1140 (1984).
57. Drake, T.A., Hannani, K., Fei, H.H., Lavi, S. & Berliner, J.A. Minimally oxidized low-density lipoprotein induces tissue factor expression in cultured human endothelial cells. *Am J Pathol* 138, 601-607 (1991).

58. Lassila, R. Inflammation in atheroma: implications for plaque rupture and platelet-collagen interaction. *Eur Heart J* **14**, 94-97 (1993).
59. Brand, K. *et al.* Oxidized LDL enhances lipopolysaccharide-induced tissue factor expression in human adherent monocytes. *Arterioscler Thromb* **14**, 790-797 (1994).
60. Hoff, H.F., Gerrity, R.G., Naito, H.K. & Dusek, D.M. Quantification of Apo B in aortas of hypercholesterolemic swine. *Lab Invest* **48**, 492-504 (1983).
61. Packham, M.A., Rowsell, H.C., Jorgensen, L. & Mustard, J.F. Localized protein accumulation in the wall of the aorta. *Exp mol pathol* **7**, 214-232 (1967).
62. Bell, F.P., Adamson, I. & Schwartz, C.J. Aortic endothelial permeability to albumin: focal and regional patterns of uptake and transmural distribution of ¹³¹I-albumin in the young pig. *Exp mol pathol* **20**, 57-68 (1974).
63. Bell, F.P., Gallus, A.S. & Schwartz, C.J. Focal and regional patterns of uptake and transmural distribution of ¹³¹I-fibrinogen in the pig aorta *in vivo*. *Exp mol pathol* **20**, 281-292 (1974).
64. Feldman, D.L., Hoff, H.F. & Gerrity, R.G. Immunohistochemical localization of Apo B in aorta from hyperlipidemic swine. Preferential accumulation in lesion-prone areas. *Arch Pathol Lab Med* **108**, 817-822 (1984).
65. Caplan, B.A. & Schwartz, C.J. Increased endothelial cell turnover in areas of *in vivo* Evans Blue uptake in the pig aorta. *Atherosclerosis* **17**, 401-417 (1973).
66. Gerrity, R.G., Richardson, M., Somer, J.B., Bell, F.B. & Schwartz, C.J. Endothelial cell morphology in areas of *in vivo* Evans Blue uptake in the young pig aorta II. Ultrastructure of the intima in areas of differing permeability to proteins. *American Journal of Pathology* **89**, 313-335 (1977).
67. Assakura, T. & Karino, T. Flow patterns and spacial distribution of atherosclerotic lesions in human coronary arteries. *Circ Res* **66**, 1045-1066 (1990).
68. Ku, K.N., Giddens, D.P., Zarins, C.K. & Glagov, S. Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation. *Arteriosclerosis* **5**, 293-302 (1985).

69. Fry, D.L. Acute vascular endothelial changes associated with increased blood velocity gradients. *Circ Res* **22**, 165 (1968).
70. Caro, C.G., Fitz-Gerald, J.M. & Schroter, J.M. Arterial distribution of early atheroma in man. *Nature* **223**(1969).
71. LoGerfo, F.G., Nowak, M.D., Quist, W.C., Crawshaw, H.M. & Bharadvaj, B.K. Flow studies in a model carotid bifurcation. *Arteriosclerosis* **1**, 235-241 (1981).
72. Thubrikar, M.J. & Robicsek, F. Pressure-induced arterial wall stress and atherosclerosis. *Ann Thorac Surg* **59**, 1594-1603 (1995).
73. Berliner, J.A. *et al.* Atherosclerosis: Basic mechanisms: Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* **91**, 2488-2496 (1995).
74. Ross, R. & Glomset, J.A. The pathogenesis of atherosclerosis. *N Eng J Med* **295**, 369-377 (1976).
75. Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis- an update. *N Eng J Med* **Feb 20**, 488-300 (1986).
76. Gotlieb, A.I. & Koo, E.W.Y. Endothelial injury. *Can Med Assoc J* **142**, 349 (1990).
77. Schwartz, C.J. *et al.* Atherosclerosis as an inflammatory process: the role of the monocyte-macrophage. *Ann N Y Acad Sci* **454**, 115-120 (1985).
78. Schwartz, C.J. *et al.* Monocyte-macrophage participation in atherogenesis: inflammatory components of pathogenesis. *Seminars Thromb Hemost* **12**, 79-86 (1986).
79. Valente, A.J., Graves, D.T., Vialle-Valenti, C.E., Delgado, R. & Swchartz, C.J. Purification of a monocyte chemotactic factor (SMC-CF) secreted by non-human primate vascular smooth muscle cells in culture. *Biochem* **27**, 4162-4168 (1988).
80. Yoshimura, T., Robinson, E.A., Tanaka, S., Appella, E. & Leonard, E.J. Purification and aminoacid analysis of two human monocyte chemoattractants produced by phytohemagglutinin-stimulaed human peripheral blood mononuclear leukocytes. *J Immunol* **142**, 1956-1962 (1989).

81. Witztum, J.L. & Steinberg, D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* **88**, 1785-1792 (1991).
82. Witztum, J.L. The oxidation hypothesis of atherosclerosis [see comments]. *Lancet* **344**, 793-795 (1994).
83. Laurman, W. Modified low density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. *Int J Occup Med Environ Health* **7**, 65-76 (1994).
84. Navab, M. *et al.* Monocyte migration into the subendothelial space of a coculture of adult human aortic endothelial and smooth muscle cells. *J Clin Invest* **82**, 1853-1863 (1988).
85. Cushing, S.D. & Fogelman, A.M. Monocytes may amplify their recruitment into inflammatory lesions by inducing monocyte chemotactic protein. *Arterioscler Thromb* **12**, 78-82 (1992).
86. Schwartz, D. *et al.* Role of the GRO family of chemokines in monocyte adhesion to mM-LDL-stimulated endothelium. *J Clin Invest* **94**, 1968-1973 (1994).
87. Cushing, S.D. *et al.* Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *PNAS* **87**, 5134-5138 (1990).
88. Yla Herttuala, S. *et al.* Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 5252-5256 (1991).
89. Brown, M.S. & Goldstein, J.L. Scavenging for receptors. *Nature* **343**, 508-509 (1990).
90. Sparrow, C.P., Parthasarathy, S. & Steinberg, D.A. A macrophagereceptor that recognizes oxidized low density lipoprotein but not acetylated low density lipoprotein. *J Biol Chem* **264**, 2499-2604 (1989).
91. Rosenfeld, M.E. *et al.* Macrophage-derived foam cells freshly isolated from rabbit atherosclerotic lesions degrade modified lipoproteins, promote oxidation of low-density lipoproteins, and contain oxidation-specific lipid-protein adducts. *J Clin Invest* **87**, 90-99 (1991).

92. Rajavashisth, T.B. *et al.* Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low density lipoproteins. *Nature* **344**, 254-257 (1990).
93. Lehr, H.A. *et al.* P-selectin mediates the interaction of circulating leukocytes with platelets and microvascular endothelium in response to oxidized lipoprotein *in vivo*. *Lab Invest* **71**, 380-386 (1994).
94. Gebuhrer, V., Murphy, J.F., Bordet, J.C., Reck, M.P. & McGregor, J.L. Oxidized low-density lipoprotein induces the expression of P-selectin (GMP140/PADGEM/CD62) on human endothelial cells. *Biochem J* **306**, 293-298 (1995).
95. Naito, M., Hayashi, T. & Iguchi, A. New approaches to the prevention of atherosclerosis. *Drugs* **50**, 440-453 (1995).
96. Mao, S.J., Yates, M.T., Parker, R.A., Chi, E.M. & Jackson, R.L. Attenuation of atherosclerosis in a modified strain of hypercholesterolemic Watanabe rabbits with use of a probucol analogue (MDL 29,311) that does not lower serum cholesterol. *Arterioscler Thromb* **11**, 1266-1275 (1991).
97. Sasahara, M. *et al.* Inhibition of hypercholesterolemia-induced atherosclerosis in the nonhuman primate by probucol. I. Is the extent of atherosclerosis related to resistance of LDL to oxidation? *J Clin Invest* **94**, 155-164 (1994).
98. Elinder, L.S. & Walldius, G. Antioxidants and atherosclerosis progression: unresolved questions. *Curr Opin Lipidol* **5**, 265-268 (1994).
99. Johansson, J. *et al.* Lowering of HDL2b by probucol partly explains the failure of the drug to affect femoral atherosclerosis in subjects with hypercholesterolemia. A Probucol Quantitative Regression Swedish Trial (PQRST) Report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**, 1049-1056 (1995).
100. Schwartz, C.J. *et al.* Atherosclerosis. Potential targets for stabilization and regression. *Circulation* **86**, 117-123 (1992).
101. Frankel, E.N., Kanner, J., German, J.B., Parks, E. & Kinsella, J.E. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* **341**, 454-457 (1993).

102. Jaffe, E.A., Machman, R.L., Bekcer, C.G. & Minick, C.R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52, 2745-2758 (1973).
103. Jaffe, E.A. Culture of human endothelial cells. *Transplant Proc* Xii, 49-53 (1980).
104. Mosquera, D.A. & Goldman, M. Endothelial cell seeding. *Br J Surg* 78, 656-660 (1991).
105. Seeger, J.M. & Klingman, N. Improved *in vivo* endothelialization of prosthetic grafts by surface modification with fibronectin. *J Vasc Surg* 8, 476-482 (1988).
106. Sharefkin, J., Van, W.H., Cruess, D., Albus, R. & Levine, E. Adult human endothelial cell enzymatic harvesting. *J Vasc Surg* 4, 567-577 (1986).
107. Sharpe, R.J., Arndt, K.A., Bauer, S.I. & Maione, T.E. Cyclosporine inhibits basic fibroblast growth factor-driven proliferation of human endothelial cells and keratinocytes. *Arch Dermatol* 125, 1359-1362 (1989).
108. Zilla, P. *et al.* *In vitro*-lined endothelium: initial integrity and ultrastructural events. *Surgery* 116, 524-534 (1994).
109. Maciag, T., Cerundolo, J., Ilsley, S., Kelley, P.R. & Forand, R. An endothelial cell growth factor from bovine hypothalamus: identification and partial characterization. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 5674-5678 (1979).
110. Maciag, T., Hoover, G., Stemerman, M. & Weinstein, R. Serial propagation of human endothelial cells *in vitro*. *J Cell Biol* 91, 420-426 (1981).
111. Thornton, S.C., Mueller, S.N. & Levine, E.M. Human endothelial cells: use of heparin in cloning and long-term serial cultivation. *Science* 222, 623-625 (1983).
112. Mueller, S.N., Thomas, K.A., Di, S.J. & Levine, E.M. Stabilization by heparin of acidic fibroblast growth factor mitogenicity for human endothelial cells *in vitro*. *J Cell Physiol* 140, 439-448 (1989).
113. Burgess, W. & Maciag, T. The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem* 58, 575-606 (1989).

114. Pimentel, E. *Handbook of growth factors, Volume II: peptide growth factors*, 362 (CRC Press, Boca Raton, 1994).
115. Burgess, W.H., Mehlman, T., Marshak, D.R., Frader, B.A. & Maciag, T. Structural evidence that endothelial cell growth factor β is the precursor of both endothelial growth factor α and acid fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 7216 (1986).
116. Conn, G. *et al.* Amino acid and cDNA sequences of a vascular endothelial cell mitogen that is homologous to platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 2628 (1990).
117. Ishikawa, F. *et al.* Identification of angiogenic activity and cloning and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor. *Nature* **338**, 557 (1989).
118. Ferrara, N., Houck, K., Jakeman, L. & Leung, D.W. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev* **13**, 18-32 (1992).
119. Gordon, P.B., Sussman, I.I. & Hatcher, V.B. Long-term culture of human endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol -Anim* **19**, 661-671 (1983).
120. Gospodarowicz, D., Brown, K.D., Bridwell, C.R. & Zetter, B.R. Control of proliferation of human vascular endothelial cells. Characterization of response of human umbilical vein endothelial cells to fibroblast growth factor, epidermal growth factor, and thrombin. *J Cell Biol* **77**, 774-788 (1978).
121. Hoshi, H., Kan, M., Chen, J.K. & McKeehan, W.L. Comparative endocrinology -paracrinology -autocrinology of human adult large vessel endothelial and smooth muscle cells. *In vitro Cell Dev Biol -Anim* **24**, 309-320 (1988).
122. Young, W.C. & Herman, I.M. Extracellular matrix modulation of endothelial cell shape and motility following injury *in vitro*. *J Cell Sci* **73**, 19-32 (1985).
123. Jaffe, E.A. & Mosher, D.F. Synthesis of fibronectin by cultured human endothelial cells. *J Exp Med* , 1779-1791 (1978).

124. Mosher, D.F., Doyle, M.J. & Jaffe, E.A. Synthesis and secretion of thrombospondin by cultured human endothelial cells. *J Cell Biol* 93, 343-348 (1982).
125. Lawalczyk, A.P., Tulloh, R.H. & Mckeown-longo, P.J. Polarized fibronectin secretion and localized matrix assembly sites correlate with subendothelial matrix formation. *Blood* 75, 2335-2342 (1990).
126. Kramer, R.H., Fuh, G.M. & Karasek, M.A. Type IV collagen synthesis by cultured human microvascular endothelial cells and its deposition into the subendothelial basement membrane. *Biochem* 24, 7423-7430 (1985).
127. Kinsella, M.G. & Wight, T.N. Isolation and characterization of dermatan sulfate proteoglycans synthesized by cultured bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 263, 19222-19231 (1988).
128. Sasaguri, Y. *et al.* Effect of linoleic acid hydroperoxide on production of matrix metalloproteinases by human aortic endothelial and smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 100, 189-196 (1993).
129. Unemori, E.N., Ferrara, N., Bauer, E.A. & Amento, E.P. Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J Cell Physiol* 153, 557-562 (1992).
130. Tyagi, S.C., Kumar, S. & Glover, G. Induction of tissue inhibitor and matrix metalloproteinase by serum in human heart-derived fibroblast and endomyocardial endothelial cells. *J Cell Biochem* 58, 360-371 (1995).
131. Sato, Y. *et al.* Indispensable role of tissue-type plasminogen activator in growth factor-dependent tube formation of human microvascular endothelial cells *in vitro*. *Exp Cell Res* 204, 223-229 (1993).
132. DiCorleto, P.E. Cultured endothelial cells produce multiple growth factors for connective tissue cells. *Exp Cell Res* 153, 167-172 (1984).
133. Vlodavsky, I. *et al.* Endothelial cell-derived basic fibroblast growth factor: synthesis and deposition into subendothelial extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 2292-2296 (1987).

134. Munro, J.M. & Cotran, R.S. The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation. *Lab Invest* **58**, 249-261 (1988).
135. Cervený, T.J., Fass, D.N. & G., M.K. Synthesis of coagulation factor V by cultured aortic endothelium. *Blood* **63**, 1467-1474 (1984).
136. Jaffe, E.A., Hoyer, L.E. & Nachman, R.L. Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **71**, 1906-1909 (1974).
137. McIntyre, D.E., Pearson, J.D. & Gordon, J.L. Localisation and stimulation of prostacyclin production in vascular cells. *Nature London* **271**, 549-551 (1978).
138. Bunting, S., Gryglewsky, R., Moncada, S. & Vane, J.R. Arterial wall generates from prostaglandin endoperoxidase a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation. *Prostaglandins* **12**, 897-913 (1976).
139. Pearson, J.D. Endothelium as a haemocompatible surface. in *Endothelialization of vascular grafts* (ed. Zilla, P.P.F., R. D.; Deutsch, M.) 71-79 (Karger, N.Y., 1987).
140. Wu, K.K. Endothelial cells in hemostasis, thrombosis, and inflammation. *Hosp Pract* , 145-166 (1992).
141. Voyta, J.C., Via, D.P., Butterfield, C.E. & Zetter, B.R. Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. *J Cell Biol* **99**, 2034-2040 (1984).
142. Gryglewsky, R., Bunting, S. & Vane, J.R. Mediators produced by the endothelial cell. *Hypertension* **12**, 530-548 (1988).
143. Vanhoutte, P.M. Endothelium and control of Vascular function. State of the art lecture. *Hypertension* **13**, 658-667 (1989).
144. Stoclet, J.C. The L-arginine-NO pathway and cyclic GMP in the vessel wall. *Z Kardiol* **80**, 87-90 (1991).
145. Mombouli, J.V. & Vanhoutte, P.M. Kinins and endothelial control of vascular smooth muscle. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* **35**, 679-705 (1995).
146. Moncada, S. Nitric oxide. *Journal of Hypertension Dec* **12**, S35-s39 (1994).

147. Furchgott, R.F. & Zawadzki, J.K. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by the endothelium. *Nature* **288**, 373-376 (1980).
148. Palmer, R.M.J., Ferrigo, A.G. & Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524-525 (1987).
149. Stoclet, J.C. & Julou-Schaeffer, G. De l'EDRF au monoxyde d'azote: la découverte d'un messager majeur en physiologie vasculaire. *Réalités Cardiologiques* **1**, 15-18 (1990).
150. Schinikerth, V.B., Fisslthaler, B. & Busse, R. CGRP enhances induction of NO synthase in vascular smooth muscle cells via a cAMP-dependent mechanism. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* **Dec 36**, H2483-h2490 (1994).
151. Finder, J. *et al.* TGF-beta regulates production of NO in pulmonary artery smooth muscle cells by inhibiting expression of NOS. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology* **12**, L862-1867 (1995).
152. Murphy, M.E. & Noack, E. Nitric oxide assay using hemoglobin method. *Methods Enzymol* **233**, 240-250 (1994).
153. Star, R.A. Nitric oxide. *Am J Med Sci* **306**, 348-358 (1993).
154. Wolfe, T.A. & Dasta, J.F. Use of nitric oxide synthase inhibitors as a novel treatment for septic shock. *Ann Pharmacother* **29**, 36-46 (1995).
155. Johns, R.A. Desmopressin is a potent vasorelaxant of aorta and pulmonary artery isolated from rabbit and rat. *Anesthesiology* **72**, 858-864 (1990).
156. DiCorleto, P.E. & Chisolm, G.M. III: Participation of the endothelium in the development of the atherosclerotic plaque. *ProgLipid Res* **25**, 365-374 (1986).
157. Chisolm, G.M. *et al.* 7 beta-Hydroperoxycholest-5-en-3 beta-ol, a component of human atherosclerotic lesions, is the primary cytotoxin of oxidized human low density lipoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 11452-11456 (1994).

158. Haller, H. *et al.* Low-density lipoprotein induces vascular adhesion molecule expression on human endothelial cells. *Hypertension* **25**, 511-516 (1995).
159. Sampath, R., Kukiela, G.L., Smith, C.W., Eskin, S.G. & McIntire, L.V. Shear stress-mediated changes in the expression of leukocyte adhesion receptors on human umbilical vein endothelial cells *in vitro*. *Ann Biomed Eng* **23**, 247-256 (1995).
160. Morigi, M. *et al.* Fluid shear stress modulates surface expression of adhesion molecules by endothelial cells. *Blood* **85**, 1696-1703 (1995).
161. Jacob, H.S. Vascular shear forces and atherogenesis: Roles of shear-provoked endothelial viral infection and heme iron accumulation. *Perspectives in Biology and Medicine* **FAL 38**, 114-124 (1994).
162. Lemstrom, K.B., Aho, P.T., Bruggeman, C.A. & Hayry, P.J. Cytomegalovirus infection enhances mRNA expression of platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor-beta(1) in rat aortic allografts - Possible mechanism for cytomegalovirus-enhanced graft arteriosclerosis. *Arterioscler Thromb* **14**, 2043-2052 (1994).
163. Waldman, W.J., Knight, D.A., Adams, P.W., Orosz, C.G. & Sedmak, D.D. *In vitro* induction of endothelial adhesion molecule and MHC antigen expression by cytomegalovirus-activated CD4(+) T cells. *Transplantation Proceedings* **27**, 1269-1271 (1995).
164. Vischer, U.M., Jornot, L., Wollheim, C.B. & Theler, J.M. Reactive oxygen intermediates induce regulated secretion of von Willebrand factor from cultured human vascular endothelial cells. *Blood* **85**, 3164-3172 (1995).
165. Stoll, L.L. & Spector, A.A. Interaction of platelet-activating factor with endothelial and vascular smooth muscle cells in coculture. *J Cell Physiol* **139**, 253-261 (1989).
166. Chamley-Campbell, J. & Campbell, G. What controls smooth muscle phenotype? *Atherosclerosis* **40**, 347-357 (1981).

167. Graham, M.F., Drucker, D.E.M., Perr, H.A., Diegelmann, R.F. & Ehrlich, H.P. Heparin modulates human intestinal smooth muscle cell proliferation, protein synthesis, and lattice contraction. *Gastroenterology* **93**, 801-809 (1987).
168. Castellot, J., Wright, T. & Karnovsky, M. Regulation of vascular smooth muscle cell growth by heparin and haparan sulfates. *Seminars Thromb Hemost* **13**, 489-503 (1987).
169. Clowes, A.W. Regulation of smooth muscle cell function by heparin. *J Vasc Surg* **15**, 911-913 (1992).
170. Castellot, J.J., Addonizio, M.L., Rosenberg, R. & Karnovsky, M.J. Cultured endothelial cells produce a heparinlike inhibitor of smooth muscle cell growth. *J Cell Biol* **90**, 372-379 (1981).
171. Vlodavsky, I. *et al.* Endothelial cell-derived basic fibroblast growth factor: synthesis and deposition into subendothelial extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 2292-2296 (1987).
172. Schneeberger, P.M., Vanlangevelde, P., Vankessel, K.P.M., Vandenbroucke-grauls, C.M.J.E. & Verhoef, J. Lipopolysaccharide induces hyperadhesion of endothelial cells for neutrophils leading to damage. *Shock* **2**, 296-300 (1994).
173. Lindner, V., Lappi, D.A., Baird, A., Majack, R.A. & Reidy, M.A. Role of basic fibroblast growth factor in vascular lesion formation. *Circ Res* **68**, 106-113 (1991).
174. Pesonen, E. Infection and intimal thickening: evidence from coronary arteries in children. *Eur Heart J* **15**, 57-61 (1994).
175. Alexander, J.J., Miguel, R. & Piotrowski, J.J. Calcium regulation of endothelial permeability to low-density lipoprotein. *J Surg Res* **59**, 371-377 (1995).
176. Williams, B., Baker, A.Q., Gallacher, B. & Lodwick, D. Angiotensin II increases vascular permeability factor gene expression by human vascular smooth muscle cells. *Hypertension* **25**, 913-917 (1995).
177. Friedman, M.H. & Fry, D.L. Arterial permeability dynamics and vascular disease. *Atherosclerosis* **104**, 189-194 (1993).

178. Guretzki, H.J., Gerbitz, K.D., Olgemoller, B. & Schleicher, E. Atherogenic levels of low density lipoprotein alter the permeability and composition of the endothelial barrier. *Atherosclerosis* 107, 15-24 (1994).
179. Cagliero, E., Majello, M., Boeri, D., Roy, S. & Lorenzi, M. Increased expression of basement membrane components in human endothelial cells cultured in high glucose. *J Clin Invest* 82, 735-738 (1988).
180. Tsuboi, R., Sato, Y. & Rifkin, D.B. 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 (1990).
181. Sharpe, R.J., Arndt, K.A., Bauer, S.I. & Maione, T.E. Cyclosporine inhibits basic fibroblast growth factor-driven proliferation of human endothelial cells and keratinocytes. *Arch Dermatol* 125, 1359-1362 (1989).
182. Ono, M. *et al.* Induction of human microvascular endothelial tubular morphogenesis by human keratinocytes: involvement of transforming growth factor- α . *Biochem Biophys Res Commun* 189, 601-609 (1992).
183. Lapierre, L.A., Fiers, W. & Pober, J.S. Three distinct classes of regulatory cytokines control endothelial cell MHC antigen expression: Interactions with immune γ interferon differentiate the effects of tumor necrosis factor and lymphotoxin from those of leucocyte α and fibroblast β interferon. *J Exp Med* 167, 794-804 (1988).
184. Martin-Mondiere, C.F., Caprani, A., Desgranges, P.C., Loisanche, D.Y. & Charron, D.J. Shear stress affects expression of major histocompatibility complex antigens on human endothelial cells. *Trans AM Soc Artif Intern Organs* Xxxv, 288-290 (1989).
185. Iademarco, M.F., Barks, J.L. & Dean, D.C. Regulation of vascular cell adhesion molecule-1 expression by IL-4 and TNF- α in cultured endothelial cells. *J Clin Invest* 95, 264-271 (1995).
186. Klein, C.L. *et al.* Comparative studies on vascular endothelium *in vitro* .1. Cytokine effects on the expression of adhesion molecules by human umbilical

- vein, saphenous vein and femoral artery endothelial cells. *Pathobiology* **62**, 199-208 (1994).
187. Taipale, J., Lohi, J., Saarinen, J., Kovanen, P.T. & Keskkioja, J. Human mast cell chymase and leukocyte elastase release latent transforming growth factor-B1 from the extracellular matrix of cultured human epithelial and endothelial cells. *J Biol Chem* **270**, 4689-4696 (1995).
188. Yao, J.L., Bone, R.C. & Sawhney, R.S. Differential effects of tumor necrosis factor-alpha on the expression of fibronectin and collagen genes in cultured bovine endothelial cells. *Cellular & Molecular Biology Research* **41**, 17-28 (1995).
189. Tsuboi, H., Ando, J., Korenaga, R., Takada, Y. & Kamiya, A. Flow stimulates ICAM-1 expression time and shear stress dependently in cultured human endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications Jan* **26** **206**, 988-996 (1995).
190. Norton, J., Sloane, J.P., Delia, D. & Greaves, M.F. Reciprocal expression of CD34 and cell adhesion molecule ELAM-1 on vascular endothelium in acute cutaneous graft-versus-host disease. *J Pathol* **168**, 96a (1992).
191. Strieter, R.M. *et al.* Endothelial cell gene expression of a neutrophil chemotactic factor by TNF-a, LPS, and IL-1B. *Science* **243**, 1467-1469 (1989).
192. Beilke, M.A. Vascular endothelium in immunology and infectious disease. *Rev Infec Dis* **Ii**, 273-283 (1989).
193. Robson, S.C. *et al.* Role of endothelial cells in transplantation. *International Archives of Allergy and Immunology Apr* **106**, 305-322 (1995).
194. Shimizu, Y., Newman, W., Tanaka, Y. & Shaw, S. Lymphocyte interactions with endothelial cells. *Immunology Today* **13**, 106-112 (1992).
195. Zimmerman, G.A., Prescott, S.M. & McIntyre, T.M. Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. *Immunology Today* **13**, 93-99 (1992).
196. Folkman, J. & Haudenschild, C. Angiogenesis *in vitro*. *Nature London* , 551-556 (1980).

197. Merwin, J.R., Anderson, J.M., Kocher, O., Van Italie, C.M. & Madri, J.A. Transforming growth factor beta₁ modulates extracellular matrix organization and cell-cell junctional complex formation during *in vitro* angiogenesis. *J Cell Physiol* **142**, 117-128 (1990).
198. Abe, T. *et al.* Induction of vascular endothelial tubular morphogenesis by human glioma cells. A model system for tumor angiogenesis. *J Clin Invest* **92**, 54-61 (1993).
199. Phillips, P.G., Birnby, L.M. & Narendran, A. Hypoxia induces capillary network formation in cultured bovine pulmonary microvessel endothelial cells. *Am J Physiol* **268**, L789-800 (1995).
200. Nabel, E.G., Plautz, G., Boyce, F.M., Stanley, J.C. & Nabel, G.J. Recombinant gene expression *in vivo* within endothelial cells of the arterial wall. *Science* **244**, 1342-1346 (1989).
201. Sackman, J.E. *et al.* Synthetic vascular grafts seeded with genetically modified endothelium in the dog: evaluation of the effect of seeding technique and retroviral vector on cell persistence *in vivo*. *Cell Transplant* **4**, 219-235 (1995).
202. Wilson, J.M. *et al.* Implantation of vascular grafts lined with genetically modified endothelial cells. *Science* **244**, 1344-1346 (1989).
203. Stanley, J.C. Genetic manipulation of seeded endothelial cells in vascular prostheses. *J Vasc Surg* **13**, 736-738 (1991).
204. Dunn, P.F. *et al.* Seeding of vascular grafts with genetically-modified endothelial cells - secretion of recombinant tpa results in decreased seeded cell retention *in-vitro* and *in-vivo*. *Circulation* **93**, 1439-1446 (1996).
205. Nabel, E.G. Gene therapy for cardiovascular disease. *Circulation* **91**, 541-548 (1995).
206. Champy, C. Quelques résultats de la méthode de culture de tissus. I. Généralités. II. Le muscle lisse (note préliminaire). *Arch Zool Exp Gen* **53**, 42-51 (1913/1914).
207. Laqueur, E. Zur Überlebensdauer von Säugertier Organen mit Automatie. *ZentralblPhysiol* **28**, 728 (1914).

208. Chamley-Campbell, J., Campbell, G.R. & Ross, R. The smooth muscle cell in culture. *Phys Review* 59, 1-61 (1979).
209. Rifkin, D.B. & Moscatelli, D. Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor. *J Cell Biol* 109, 1-6 (1989).
210. Fager, G., Hansson, G.K., Ottosson, P., Dahllof, B. & Bondjers, G. Human arterial smooth muscle cells in culture: Effects of platelet-derived growth factor and heparin on growth *in vitro*. *Exp Cell Res* 176, 319-335 (1988).
211. Winkles, J.A. *et al.* Human vascular smooth muscle cells both express and respond to heparin-binding growth factor I (endothelial cell growth factor). *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 7124-7128 (1987).
212. Inui, H., Kitami, Y., Tani, M., Kondo, T. & Inagami, T. Differences in signal transduction between platelet-derived growth factor (PDGF) alpha and beta receptors in vascular smooth muscle cells - PDGF-BB is a potent mitogen, but PDGF-AA promotes only protein synthesis without activation of DNA synthesis. *J Biol Chem* 269, 30546-30552 (1994).
213. Jawien, A., Bowen Pope, D.F., Lindner, V., Schwartz, S.M. & Clowes, A.W. Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle migration and intimal thickening in a rat model of balloon angioplasty. *J Clin Invest* 89, 507-511 (1992).
214. Golden, M.A. *et al.* Platelet-derived growth factor activity and mRNA expression in healing vascular grafts in baboons. Association *in vivo* of platelet-derived growth factor mRNA and protein with cellular proliferation. *J Clin Invest* 87, 406-414 (1991).
215. Negoro, N. *et al.* Blood pressure regulates platelet-derived growth factor A-chain gene expression in vascular smooth muscle cells *in vivo* - An autocrine mechanism promoting hypertensive vascular hypertrophy. *Journal of Clinical Investigation* 95, 1140-1150 (1995).
216. Meyeringold, W. & Eichner, W. Platelet-derived growth factor. *Cell Biology International* 19, 389-398 (1995).

217. Kuzuya, M. *et al.* Induction of angiogenesis by smooth muscle cell-derived factor: possible role in neovascularization in atherosclerotic plaque. *J Cell Physiol* **164**, 658-667 (1995).
218. Fukuo, K. *et al.* Nitric oxide mediates cytotoxicity and basic fibroblast growth factor release in cultured vascular smooth muscle cells - A possible mechanism of neovascularization in atherosclerotic plaques. *Journal of Clinical Investigation* **95**, 669-676 (1995).
219. Ikeda, U. *et al.* Involvement of LDL receptor in the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* **110**, 87-94 (1994).
220. Jimi, S., Saku, K., Uesugi, N., Sakata, N. & Takebayashi, S. Oxidized low density lipoprotein stimulates collagen production in cultured arterial smooth muscle cells. *Atherosclerosis* **116**, 15-26 (1995).
221. Li, H.M., Freeman, M.W. & Libby, P. Regulation of smooth muscle cell scavenger receptor expression *in vivo* by atherogenic diets and *in vitro* by cytokines. *Journal of Clinical Investigation* **95**, 122-133 (1995).
222. Absher, M. *et al.* Characterization of vascular smooth muscle cell phenotype in long-term culture. *In vitro Cell Dev Biol -Anim* **25**, 183-192 (1989).
223. Glukhova, M.A. *et al.* Modulation of human aorta smooth muscle cell phenotype: A study of muscle-specific variants of vinculin, caldesmon, and actin expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 9542-9546 (1988).
224. Kanda, K., Miwa, H. & Matsuda, T. Phenotypic reversion of smooth-muscle cells in hybrid vascular prostheses. *Cell Transplant* **4**, 587-595 (1995).
225. Cook, C.L., Weiser, M.C., Schwartz, P.E., Jones, C.L. & Majack, R.A. Developmentally timed expression of an embryonic growth phenotype in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* **74**, 189-196 (1994).
226. Birukov, K.G. *et al.* Stretch affects phenotype and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Mol Cell Biochem* **144**, 131-139 (1995).
227. Dilley, R.J., McGeachie, J.K. & Prendergast, F.J. A review of the proliferative behaviour, morphology and phenotypes of vascular smooth muscle. *Atherosclerosis* **63**, 99-107 (1987).

228. Thyberg, J., Hedin, U., Sjolund, M., Palmberg, L. & Bottger, B.A. Regulation of differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells. *Arteriosclerosis* 10, 966-990 (1990).
229. Campbell, G.R., Campbell, J.H., Manderson, J.A., Horrigan, S. & Rennick, R.E. Arterial smooth muscle: a multifunctional mesenchymal cell. *Arch Pathol Lab Med* 112, 977-986 (1988).
230. Owens, G.K. Control of hypertrophic versus hyperplastic growth of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 257, 1755-1765 (1989).
231. Owens, G.K. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev* 75, 487-517 (1995).
232. Fager, G. et al. Human arterial smooth muscle cells in culture: inverse relationship between proliferation and expression of contractile proteins. *In vitro Cell Dev Biol -Anim* 25, 511-520 (1989).
233. Majack, R., Majesky, M. & Goodman, L. Role of PDGF-A expression in the control of vascular smooth muscle cell growth by transforming growth factor-B. *J Cell Biol* 111, 239-247 (1990).
234. Koyama, N., Kinsella, M.G., Wight, T.N. & Clowes, A.W. Heparan-sulfate proteoglycans are induced by pdgf and play an important role in the regulation of smooth-muscle cell-migration. *Molecular biology of the cell* 6, 287-287 (1995).
235. Hwang, D.L., Latus, L.J. & Lev-Ran, A. Effects of platelet-contained growth factors (PDGF, EGF, IGF-1, and TGF-B) on DNA synthesis in porcine aortic smooth muscle cells in culture. *Exp Cell Res* 200, 358-360 (1992).
236. Au, Y.P., Kenagy, R.D. & Clowes, A.W. Heparin selectively inhibits the transcription of tissue-type plasminogen activator in primate arterial smooth muscle cells during mitogenesis. *J Biol Chem* 267, 3438-3444 (1992).
237. Au, Y.P., Kenagy, R.D., Clowes, M.M. & Clowes, A.W. Mechanisms of inhibition by heparin of vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Haemostasis* 1, 177-182 (1993).

238. Caplice, N.M., West, M.J., Campbell, G.R. & Campbell, J. Inhibition of human vascular smooth muscle cell growth by heparin. *Lancet* 344, 97-98 (1994).
239. Rapraeger, A.C., Guimond, S., Krufka, A. & Olwin, B.B. Regulation by heparan sulfate in fibroblast growth factor signaling. *Methods Enzymol* 245, 219-240 (1994).
240. Reantragoon, S., Arrigo, L.M., Seoud, M.M.A., Dweck, H.S. & Rosenfeld, L. Specific heparin fractions suppress endothelin-1 production in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Arch Biochem Biophys* 314, 315-322 (1994).
241. Ohno, T. *et al.* Gene therapy for vascular smooth muscle cell proliferation after arterial injury [see comments]. *Science* 265, 781-784 (1994).
242. Geary, R.L., Koyama, N., Wang, T.W., Vergel, S. & Clowes, A.W. Failure of heparin to inhibit intimal hyperplasia in injured baboon arteries. The role of heparin-sensitive and -insensitive pathways in the stimulation of smooth muscle cell migration and proliferation. *Circulation* 91, 2972-2981 (1995).
243. Koyama, N., Kinsella, M.G., Wight, T.N. & Clowes, A.W. Heparan-sulfate proteoglycans are induced by pdgf and play an important role in the regulation of smooth-muscle cell-migration. *Molecular biology of the cell* 6, 287-287 (1995).
244. Nabel, E.G. Gene-therapy for vascular diseases. *Atherosclerosis* 118, S 51-S 56 (1995).
245. Kenagy, R.D. & Clowes, A.W. Inhibition of smooth-muscle cell (smc) migration and proliferation is associated with stimulation of matrix metalloproteinase (mmp)-9 production by interleukin-1-beta (il-1-beta) and tumor-necrosis- factor-alpha (tnf-alpha) in baboon aortic explants. *FASEB J* 9, A 412-A 412 (1995).
246. Au, Y.P., Dobrowolska, G., Morris, D.R. & Clowes, A.W. Heparin decreases activator protein-1 binding to DNA in part by posttranslational modification of Jun B. *Circ Res* 75, 15-22 (1994).

247. Stoll, L.L. & Spector, A.A. Lipid transfer between endothelial and smooth muscle cells in coculture. *JCell Physiol* 133, 103-110 (1987).
248. Sasaguri, Y. *et al.* Effect of linoleic acid hydroperoxide on production of matrix metalloproteinases by human aortic endothelial and smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 100, 189-196 (1993).
249. Chisolm, G.M. *et al.* 7 beta-Hydroperoxycholest-5-en-3 beta-ol, a component of human atherosclerotic lesions, is the primary cytotoxin of oxidized human low density lipoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 11452-11456 (1994).
250. Daugherty, A. & Roselaar, S.E. Lipoprotein oxidation as a mediator of atherogenesis: Insights from pharmacological studies. *Cardiovascular Research* 29, 297-311 (1995).
251. Ikeda, U. *et al.* Involvement of LDL receptor in the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 110, 87-94 (1994).
252. Jimi, S., Saku, K., Uesugi, N., Sakata, N. & Takebayashi, S. Oxidized low density lipoprotein stimulates collagen production in cultured arterial smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 116, 15-26 (1995).
253. Li, H.M., Freeman, M.W. & Libby, P. Regulation of smooth muscle cell scavenger receptor expression *in vivo* by atherogenic diets and *in vitro* by cytokines. *Journal of Clinical Investigation* 95, 122-133 (1995).
254. Wang, Y.F., Lindstedt, K.A. & Kovanen, P.T. Mast cell granule remnants carry LDL into smooth muscle cells of the synthetic phenotype and induce their conversion into foam cells. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 15, 801-810 (1995).
255. Bohr, D.F., Dominiczak, A.F. & Webb, R.C. Pathophysiology of the vasculature in hypertension. *Hypertension* 18, 69-75 (1991).
256. Touyz, R.M. & Schiffrin, E.L. Signal transduction in hypertension: Part I. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2, 5-16 (1993).

257. Natanson, C., Hoffman, W.D., Suffredini, A.F., Eichacker, P.Q. & Danner, R.L. Selected treatment strategies for septic shock based on proposed mechanisms of pathogenesis. *Ann Intern Med* 120, 771-783 (1994).
258. Itoh, T. Pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle cells--an overview. *Jpn J Pharmacol* 55, 1-9 (1991).
259. Walsh, M.P. The Ayerst Award Lecture 1990. Calcium-dependent mechanisms of regulation of smooth muscle contraction. *Biochem Cell Biol* 69, 771-800 (1991).
260. Stull, J.T., Gallagher, P.J., Herring, B.P. & Kamm, K.E. Vascular smooth muscle contractile elements. Cellular regulation. *Hypertension* 17, 723-732 (1991).
261. Marks, A.R. Calcium channels expressed in vascular smooth muscle. *Circulation* 86, Iii61-67 (1992).
262. Blaustein, M.P. *et al.* Regulation of vascular smooth muscle contractility: roles of the sarcoplasmic reticulum (SR) and the sodium/calcium exchanger. *Jpn J Pharmacol* 58, 107p-114p (1992).
263. Missiaen, L., De Smedt, H., Droogmans, G., Himpens, B. & Casteels, R. Calcium ion homeostasis in smooth muscle. *Pharmacol Ther* 56, 191-231 (1992).
264. Stull, J.T., Tansey, M.G., Tang, D.C., Word, R.A. & Kamm, K.E. Phosphorylation of myosin light chain kinase: a cellular mechanism for Ca²⁺ desensitization. *Mol Cell Biochem* 128, 229-237 (1993).
265. Chacko, S. & Longhurst, P.A. Regulation of actomyosin and contraction in smooth muscle. *World J Urol* 12, 292-297 (1994).
266. Somlyo, A.P. & Somlyo, A.V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 372, 231-236 (1994).
267. Allen, B.G. & Walsh, M.P. The biochemical basis of the regulation of smooth-muscle contraction. *Trends Biochem Sci* 19, 362-368 (1994).

268. Walsh, M.P., Kargacin, G.J., Kendrick Jones, J. & Lincoln, T.M. Intracellular mechanisms involved in the regulation of vascular smooth muscle tone. *Can J Physiol Pharmacol* 73, 565-573 (1995).
269. Cook, R. The mechanism of muscle contraction. *CRC Crit Rev Biochem* 21, 53-118 (1986).
270. Huxley, H.E. Sliding filaments and molecular motile systems. *J Biol Chem* 265, 8347-8350 (1990).
271. Itoh, H. *et al.* Inhibition of myosin light chain phosphatase during Ca(2+)-independent vasocontraction. *Am J Physiol* 265, C1319-1324 (1993).
272. Gong, M.C. *et al.* Myosin light chain phosphatase activities and the effects of phosphatase inhibitors in tonic and phasic smooth muscle. *J Biol Chem* 267, 14662-14668 (1992).
273. Mitsui, T., Inagaki, M. & Ikebe, M. Purification and characterization of smooth muscle myosin-associated phosphatase from chicken gizzards. *J Biol Chem* 267, 16727-16735 (1992).
274. Chen, Y.H. *et al.* Molecular cloning of cDNA encoding the 110 kDa and 21 kDa regulatory subunits of smooth muscle protein phosphatase 1M. *FEBS Lett* 356, 51-55 (1994).
275. Williams, D.A. & Fay, F.S. Calcium transients and resting levels in isolated smooth muscle cells as monitored with quin-2. *Am J Physiol* 250, C779-C791 (1986).
276. Williams, D.A., Becker, P.L. & Fay, F.S. Regional changes in calcium underlying contraction of single smooth muscle cells. *Science* 235, 1644-1648 (1987).
277. Somlyo, A.P. & Himpens, B. Cell calcium and its regulation in smooth muscle. *FASEB J* 3, 2266-2276 (1989).
278. Yu, J. & Bose, R. Calcium channels in smooth muscle. *Gastroenterology* 100, 1448-1460 (1991).
279. Inoue, R. & Chen, S. Physiology of muscarinic receptor-operated nonselective cation channels in guinea-pig ileal smooth muscle. *Exs* 66, 261-268 (1993).

280. Tsunoda, Y. Receptor-operated Ca^{2+} signaling and crosstalk in stimulus secretion coupling. *Biochim Biophys Acta* 1154, 105-156 (1993).
281. McDonald, T.F., Pelzer, S., Trautwein, W. & Pelzer, D.J. Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells. *Physiol Rev* 74, 365-507 (1994).
282. Xiong, Z. & Sperelakis, N. Regulation of L-type calcium channels of vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 27, 75-91 (1995).
283. Hughes, A.D. Calcium channels in vascular smooth muscle cells. *J Vasc Res* 32, 353-370 (1995).
284. Ferris, C.D. & Snyder, S.H. Inositol 1,4,5-trisphosphate-activated calcium channels. *Annu Rev Physiol* 54, 469-488 (1992).
285. Herrmann-Frank, A., Darling, E. & Meissner, G. Functional characterization of the Ca^{2+} -gated Ca^{2+} release channel of vascular smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Pflugers Arch* 418, 353-359 (1991).
286. Wong, A.Y. & Klassen, G.A. A model of calcium regulation in smooth muscle cell. *Cell Calcium* 14, 227-243 (1993).
287. Yamazawa, T., Iino, M. & Endo, M. Compartments of the Ca store in single smooth muscle cells and agonist-induced Ca release. *Jpn J Pharmacol* 58(1992).
288. Yamazawa, T., Iino, M. & Endo, M. Presence of functionally different compartments of the Ca^{2+} store in single intestinal smooth muscle cells. *FEBS Lett* 301, 181-184 (1992).
289. Juhaszova, M., Ambesi, A., Lindenmayer, G.E., Bloch, R.J. & Blaustein, M.P. Na^{+} - Ca^{2+} exchanger in arteries: identification by immunoblotting and immunofluorescence microscopy. *Am J Physiol* 266, C234-242 (1994).
290. Strehler, E.E., Heim, R. & Carafoli, E. Molecular characterization of plasma membrane calcium pump isoforms. *Adv Exp Med Biol* 307, 251-261 (1991).
291. Carafoli, E. The Ca^{2+} pump of the plasma membrane. *J Biol Chem* 267, 2115-2118 (1992).
292. Raeymaekers, L. & Wuytack, F. Ca^{2+} pumps in smooth muscle cells. *J Muscle Res Cell Motil* 14, 141-157 (1993).

293. Dubyak, G.R. & el Moatassim, C. Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol* 265, C577-606 (1993).
294. Amédée, T., Large, W.A. & Wang, Q. Characteristics of chloride currents activated by noradrenaline in rabbit ear artery cells. *Am J Physiol* 428, 501-516 (1990).
295. Surprenant, A., Buell, G. & North, R.A. P2X receptors bring new structure to ligand-gated ion channels. *Trends Neurosci* 18, 224-229 (1995).
296. Zhou, C.J., Akhtar, R.A. & Abdel Latif, A.A. Purification and characterization of phosphoinositide-specific phospholipase C from bovine iris sphincter smooth muscle. *Biochem J* 289, 401-409 (1993).
297. Lefkowitz, R.J. G protein-coupled receptor kinases. *Cell* 74, 409-412 (1993).
298. Gong, M.C. *et al.* Arachidonic acid inhibits myosin light chain phosphatase and sensitizes smooth muscle to calcium. *J Biol Chem* 267, 21492-21498 (1992).
299. Gong, M.C., Kinter, M.T., Somlyo, A.V. & Somlyo, A.P. Arachidonic acid and diacylglycerol release associated with inhibition of myosin light chain dephosphorylation in rabbit smooth muscle. *J Physiol Lond* 486, 113-122 (1995).
300. Kitazawa, T., Masuo, M. & Somlyo, A.P. G protein-activation inhibits smooth muscle MLC phosphatase to increase the contractile sensitivity to Ca²⁺. *Jpn J Pharmacol* 58(1992).
301. Chen, Y.H. *et al.* Molecular cloning of cDNA encoding the 110 kDa and 21 kDa regulatory subunits of smooth muscle protein phosphatase 1M. *FEBS Lett* 356, 51-55 (1994).
302. Haystead, C.M., Gailly, P., Somlyo, A.P., Somlyo, A.V. & Haystead, T.A. Molecular cloning and functional expression of a recombinant 72.5 kDa fragment of the 110 kDa regulatory subunit of smooth muscle protein phosphatase 1M. *FEBS Lett* 377, 123-127 (1995).
303. Itoh, H. *et al.* Inhibition of myosin light chain phosphatase during Ca(2+)-independent vasocontraction. *Am J Physiol* 265, C1319-1324 (1993).

304. Shimizu, H. *et al.* Characterization of the myosin-binding subunit of smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem* 269, 30407-30411 (1994).
305. Pato, M.D. & Kerc, E. Regulation of smooth muscle phosphatase-II by divalent cations. *Mol Cell Biochem* 101, 31-41 (1991).
306. Pato, M.D., Sutherland, C., Winder, S.J. & Walsh, M.P. Smooth-muscle caldesmon phosphatase is SMP-I, a type 2A protein phosphatase. *Biochem J* 293, 35-41 (1993).
307. Tansey, M.G. *et al.* Phosphorylation of myosin light chain kinase by the multifunctional calmodulin-dependent protein kinase II in smooth muscle cells. *J Biol Chem* 267, 12511-12516 (1992).
308. Tansey, M.G., Luby Phelps, K., Kamm, K.E. & Stull, J.T. Ca(2+)-dependent phosphorylation of myosin light chain kinase decreases the Ca²⁺ sensitivity of light chain phosphorylation within smooth muscle cells. *J Biol Chem* 269, 9912-9920 (1994).
309. Kalthof, B., Bechem, M., Flocke, K., Pott, L. & Schramm, M. Kinetics of ATP-induced Ca²⁺ transients in cultured pig aortic smooth muscle cells depend on ATP concentration and stored Ca²⁺. *J Physiol Lond* 466, 245-262 (1993).
310. Wier, W.G. & Blatter, L.A. Ca(2+)-oscillations and Ca(2+)-waves in mammalian cardiac and vascular smooth muscle cells. *Cell Calcium* 12, 241-254 (1991).
311. Briner, V.A., Tsai, P., Wang, X. & Schrier, R.W. Divergent effects of acute and chronic ethanol exposure on contraction and Ca²⁺ mobilization in cultured vascular smooth muscle cells. *Am J Hypertens* 6, 268-275 (1993).
312. Briner, V.A., Tsai, P., Choong, H.L. & Schrier, R.W. Comparative effects of arginine vasopressin and oxytocin in cell culture systems. *Am J Physiol* 263, F222-227 (1992).
313. Wang, X., Briner, V.A. & Schrier, R.W. Parathyroid hormone inhibition of vasopressin-induced vascular smooth muscle contraction. *Am J Physiol* 264, F453-457 (1993).

314. Kahn, A.M., Lichtenberg, R.A., Allen, J.C., Seidel, C.L. & Song, T. Insulin-stimulated glucose transport inhibits Ca²⁺ influx and contraction in vascular smooth muscle. *Circulation* **92**, 1597-1603 (1995).
315. Kahn, A.M. *et al.* Insulin reduces contraction and intracellular calcium concentration in vascular smooth muscle. *Hypertension* **22**, 735-742 (1993).
316. Harris, A.K., Wild, P. & Stopak, D. Silicone rubber substrate : a new wrinkle in the study of cell locomotion. *Science* **208**, 177-179 (1980).
317. Murray, T.R., Marshall, B.E. & Macarak, E.J. Contraction of vascular smooth muscle in cell culture. *J Cell Physiol* **143**, 26-38 (1990).
318. Shirinsky, V.P. *et al.* Contractile rabbit aortic smooth muscle cells in culture. Preparation and characterization. *Am J Hypertens* **5**, 124s-130s (1992).
319. Birukov, K.G. *et al.* Synthesis and expression of smooth muscle phenotype markers in primary culture of rabbit aortic smooth muscle cells: influence of seeding density and media and relation to cell contractility. *Exp Cell Res* **204**, 46-53 (1993).
320. Shirinsky, V.P. *et al.* Density-related expression of caldesmon and vinculin in cultured rabbit aortic smooth muscle cells. *Exp Cell Res* **194**, 186-189 (1991).
321. Dubey, R.K. Vasodilator-derived nitric oxide inhibits fetal calf serum- and angiotensin-II-induced growth of renal arteriolar smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther* **269**, 402-408 (1994).
322. Dubey, R.K. & Overbeck, H.W. Culture of rat mesenteric arteriolar smooth muscle cells: effects of platelet-derived growth factor, angiotensin, and nitric oxide on growth. *Cell Tissue Res* **275**, 133-141 (1994).
323. Dubey, R.K., Roy, A. & Overbeck, H.W. Culture of renal arteriolar smooth muscle cells. Mitogenic responses to angiotensin II. *Circ Res* **71**, 1143-1152 (1992).
324. Sasaki, Y., Uchida, T. & Sasaki, Y. A variant derived from rabbit aortic smooth muscle: phenotype modulation and restoration of smooth muscle characteristics in cells in culture. *J Biochem* **106**, 1009-1018 (1989).

325. Devore-Carter, D., Morway, P.F. & Weiss, E.B. Isolation and characterization of guinea-pig tracheal smooth muscle cells that retain differentiated function in long-term subculture. *Cell Tissue Res* 251, 325-331 (1988).
326. Takeda, K., Meyer-Lehnert, H., Kim, J.K. & Schier, R.W. AVP-induced Ca fluxes and contraction of rat glomerular mesangial cells. *Am J Physiol* 255, F142-150 (1988).
327. Ralevic, V. & Burnstock, G. Roles of P2-purinoceptors in the cardiovascular system. *Circulation* 84, 1-14 (1991).
328. Dubyak, G.R. & el Moatassim, C. Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol* 265, C577-606 (1993).
329. Harden, T.K., Boyer, J.L. & Nicholas, R.A. P2-purinergic receptors: subtype-associated signaling responses and structure. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 35, 541-579 (1995).
330. Pintor, J., Diaz Rey, M.A. & Miras Portugal, M.T. Ap4A and ADP-beta-S binding to P2 purinoceptors present on rat brain synaptic terminals. *Br J Pharmacol* 108, 1094-1099 (1993).
331. Kim, W.K. & Rabin, R.A. Characterization of the purinergic P2 receptors in PC12 cells. Evidence for a novel subtype. *J Biol Chem* 269, 6471-6477 (1994).
332. Lazarowski, E.R. & Harden, T.K. Identification of a uridine nucleotide-selective G-protein-linked receptor that activates phospholipase C. *J Biol Chem* 269, 11830-11836 (1994).
333. Pianet, I., Merle, M. & Labouesse, J. ADP and, indirectly, ATP are potent inhibitors of cAMP production in intact isoproterenol-stimulated C6 glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 163, 1150-1157 (1989).
334. Boyer, J.L., Lazarowski, E.R., Chen, X.H. & Harden, T.K. Identification of a P2Y-purinergic receptor that inhibits adenylyl cyclase. *J Pharmacol Exp Ther* 267, 1140-1146 (1993).

335. Lin, W.W. & Chuang, D.M. Endothelin- and ATP-induced inhibition of adenylyl cyclase activity in C6 glioma cells: role of Gi and calcium. *Mol Pharmacol* **44**, 158-165 (1993).
336. Berrie, C.P., Hawkins, P.T., Stephens, L.R., Harden, T.K. & Dowes, C.P. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in turkey erythrocytes is regulated by p2y-purinoreceptors. *Molecular Pharmacology* **35**, 526-532 (1989).
337. Maurice, D.H., Waldo, G.L., Morris, A.J., Nicholas, R.A. & Harden, T.K. Identification of G alpha 11 as the phospholipase C-activating G-protein of turkey erythrocytes. *Biochem J* **290**, 765-770 (1993).
338. Waldo, G.L., Morris, A.J., Klapper, D.G. & Harden, T.K. Receptor- and G-protein-regulated 150-kDa avian phospholipase C: inhibition of enzyme activity by isoenzyme-specific antisera and nonidentity with mammalian phospholipase C isoenzymes established by immunoreactivity and peptide sequence. *Mol Pharmacol* **40**, 480-489 (1991).
339. Yamada, M., Hamamori, Y., Akita, H. & Yokoyama, M. P2-purinoreceptor activation stimulates phosphoinositide hydrolysis and inhibits accumulation of cAMP in cultured ventricular myocytes. *Circ Res* **70**, 477-485 (1992).
340. Boarder, M.R., Weisman, G.A., Turner, J.T. & Wilkinson, G.F. G protein-coupled P-2 purinoreceptors: From molecular biology to functional responses. *Trends in Pharmacological Sciences* **16**, 133-139 (1995).
341. Filtz, T.M., Li, Q., Boyer, J.L., Nicholas, R.A. & Harden, T.K. Expression of a cloned P2Y purinergic receptor that couples to phospholipase C. *Mol Pharmacol* **46**, 8-14 (1994).
342. Lustig, K.D., Shiau, A.K., Brake, A.J. & Julius, D. Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 5113-5117 (1993).
343. Parr, C.E. *et al.* Cloning and expression of a human P2U nucleotide receptor, a target for cystic fibrosis pharmacotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 13067 (1994).

344. Valera, S. *et al.* A new class of ligand-gated ion channel defined by P2 receptor for extracellular ATP [see comments]. *Nature* **371**, 516-519 (1994).
345. Erb, L., Lustig, K.D., Sullivan, D.M., Turner, J.T. & Weisman, G.A. Functional expression and photoaffinity labeling of a cloned P2U purinergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10449-10453 (1993).
346. Webb, T.E. *et al.* Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS Lett* **324**, 219-225 (1993).
347. Bean, B.P. Pharmacology and electrophysiology of ATP-activated ion channels. *Trends Pharmacol Sci* **13**, 87-90 (1992).
348. Zimmermann, H. Signalling via ATP in the nervous system. *Trends Neurosci* **17**, 420-426 (1994).
349. Kennedy, C. & Leff, P. How should P-2X purinoceptors be classified pharmacologically? *Trends in Pharmacological Sciences* **16**, 168-174 (1995).
350. Brake, A.J., Wagenbach, M.J. & Julius, D. New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* **371**, 519-523 (1994).
351. Jeffrey, J.J., Ehlich, L.S. & Roswit, W.T. Serotonin: an inducer of collagenase in myometrial smooth muscle cells. *J Cell Physiol* **146**, 399-406 (1991).
352. Hall, I.P. & Kotlikoff, M. Use of cultured airway myocytes for study of airway smooth muscle - Invited Review. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology* **12**, L1-111 (1995).
353. Stewart, A.G., Tomlinson, P.R., Fernandes, D.J., Wilson, J.W. & Harris, T. Tumor necrosis factor alpha modulates mitogenic responses of human cultured airway smooth muscle. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **12**, 110-119 (1995).
354. Allen, T.D. & Schor, S.L. The contraction of collagen matrices by dermal fibroblasts. *J Ultra Res* **83**, 205-219 (1983).
355. Barocas, V.H., Moon, A.G. & Tranquillo, R.T. The fibroblast-populated collagen microsphere assay of cell traction force .2. Measurement of the cell

- traction parameter. *Journal of Biomechanical Engineering Transactions of the ASME* **117**, 161-170 (1995).
356. Carver, W., Molano, I., Reaves, T.A., Borg, T.K. & Terracio, L. Role of the alpha 1 beta 1 integrin complex in collagen gel contraction *in vitro* by fibroblasts. *J Cell Physiol* **165**, 425-437 (1995).
357. Delvoye, P., Wiliquet, P., Leveque, J.L., Nusgens, B.V. & Lapière, C.M. Measurement of mechanical forces generated by skin fibroblasts embedded in a three-dimensional collagen gel. *J Invest Dermatol* **97**, 898-902 (1991).
358. Desmouliere, A. & Gabbiani, G. Modulation of fibroblastic cytoskeletal features during pathological situations: The role of extracellular matrix and cytokines. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **29**, 195-203 (1994).
359. Agelli, A. & Wahl, S.M. Collagen production by fibroblasts. *Methods in Enzymology, Di Sabato Ed* **163**, 642-656 (1988).
360. Kao, W.W.-Y., Berg, R.A. & Prockop, D.J. Ascorbate increases the synthesis of procollagen hydroxyproline by cultured fibroblasts from chick embryo tendons without activation of prolyl hydroxylase. *Biochim Biophys Acta* **411**, 202-215 (1975).
361. Hata, R.I. *et al.* Regulation of collagen metabolism and cell growth by epidermal growth factor and ascorbate in cultured human skin fibroblasts. *Eur J Biochem* **173**, 261-267 (1988).
362. Peterkofsky, B. The effect of ascorbic acid on collagen polypeptide synthesis and proline hydroxylation during the growth of cultured fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* **152**, 318-328 (1972).
363. Bergethon, P.R., Mogayzel, P.J. & Franzblau, C. Effect of the reducing environment on the accumulation of elastin and collagen in cultured smooth-muscle cells. *Biochem J* **258**, 279-284 (1989).
364. Ten, C.A.R. & Deporter, D.A. The role of the fibroblast in collagen turnover in the functioning periodontal ligament of the mouse. *Archs Oral Biol* **19**, 339-340 (1974).

365. Chan, D., Lamande, S.R., Cole, W.G. & Bateman, J.F. Regulation of procollagen synthesis and processing during ascorbate-induced extracellular matrix accumulation *in vitro*. *Biochem J* **269**, 175-181 (1990).
366. Houglum, K.P., Brenner, D.A. & Chojkier, M. Ascorbic acid stimulation of collagen biosynthesis independent of hydroxylation. *Am J Clin Nutr* **54**, 1141s-1143s (1991).
367. Chandrakasan, G. & Bhatnagar, R.S. Stimulation of collagen synthesis in fibroblast cultures by superoxide. *Cell Mol Biol* **37**, 751-755 (1991).
368. Geesin, J.C., Hendricks, L.J., Falkenstein, P.A., Gordon, J.S. & Berg, R.A. Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid: characterisation of the role of ascorbate-stimulated lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* **290**, 127-132 (1991).
369. Geesin, J.C., Hendricks, L.J., Gordon, J.S. & Berg, R.A. Regulation of collagen synthesis in human dermal fibroblasts in contracted collagen gels by ascorbic acid, growth factors, and inhibitors of lipid peroxidation. *J Invest Dermatol* **96**, 607 (1991).
370. Peterkofsky, B. & Prather, W. Cytotoxicity of ascorbate and other reducing agents towards cultured fibroblasts as a result of hydrogen peroxide formation. *J cell Physiol* **90**, 61-70 (1976).
371. Buettner, G.R. In the absence of catalytic metals ascorbate does not autoxidize at pH 7: ascorbate as a test for catalytic metals. *J Biochem Biophys Methods* **16**, 27-40 (1988).
372. Schmidt, R.J., Chung, L.Y., Andrews, A.M. & Turner, T.D. Toxicity of L-ascorbic acid to L929 fibroblast cultures: relevance to biocompatibility testing of materials for use in wound management. *J Biomed Mater Res* **27**, 521-530 (1993).
373. Phillips, C., Tajima, S. & Pinnell, S. Ascorbic acid and transforming growth factor-B1 increase collagen biosynthesis via different mechanisms: coordinate regulation of pro α 1(I) and pro α 1(III) collagens. *Arch Biochem Biophys* **295**, 397-403 (1992).

374. Geesin, J.C., Darr, D., Kaufman, R., Murad, S. & Pinnell, S.R. Ascorbic acid specifically increases type I and type III procollagen messenger RNA levels in human skin fibroblasts. *J Invest Dermatol* 90, 420-424 (1988).
375. Villaschi, S. & Nicosia, R.F. 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 (1994).
376. Kuzuya, M. & Kinsella, J.L. Induction of endothelial cell differentiation *in vitro* by fibroblast-derived soluble factors. *Exp Cell Res* 215, 310-318 (1994).
377. Masakado, M. *et al.* Human fibroblast cells produce a factor that stimulates prostacyclin synthesis by vascular endothelial cells. *Thromb Res* 76, 513-524 (1994).
378. Yamauchi, T., Umeda, F., Masakado, M., Ono, Y. & Nawata, H. Serum-free conditioned medium of human diploid fibroblast cells contains an activity that stimulates prostacyclin production by cultured bovine aortic endothelial cells. *Biochem Mol Biol Int* 31, 65-71 (1993).
379. Chen, J.K., Green, G. & Weinberg, C.B. Cultured vascular endothelial cells secrete a protein factor(s) that promotes the contraction of collagen lattices made with fibroblasts. *Exp Cell Res* 193, 297-302 (1991).
380. Guarda, E., Myers, P.R., Brilla, C.G., Tyagi, S.C. & Weber, K.T. Endothelial cell induced modulation of cardiac fibroblast collagen metabolism. *Cardiovasc Res* 27, 1004-1008 (1993).
381. Ahn, S.S., Williams, D.E., Thye, D.A., Cheng, K.Q. & Lee, D.A. The isolation of a fibroblast growth inhibitor associated with perigraft seroma. *J Vasc Surg* 20, 202-208 (1994).
382. Schneiderman, J., Knoller, S., Adar, R. & Savion, N. Biochemical analysis of a human humoral fibroblast inhibitory factor associated with impaired vascular prosthetic graft incorporation. *J Vasc Surg* 14, 103-110 (1991).
383. Steinhorn, R.H., Morin, F.C. & Russell, J.A. The adventitia may be a barrier specific to nitric oxide in rabbit pulmonary artery. *J Clin Invest* 94, 1883-1888 (1994).

384. Weber, K.T., Sun, Y., Katwa, L.C. & Cleutjens, J.P.M. Connective tissue: A metabolic entity? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 27, 107-120 (1995).
385. Barker, S.G. *et al.* The adventitia and atherogenesis: removal initiates intimal proliferation in the rabbit which regresses on generation of a 'neoadventitia'. *Atherosclerosis* 105, 131-144 (1994).
386. Barker, S.G., Beesley, J.E., Baskerville, P.A. & Martin, J.F. The influence of the adventitia on the presence of smooth muscle cells and macrophages in the arterial intima. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 9, 222-227 (1995).
387. Halloran, B.G. & Baxter, B.T. Pathogenesis of aneurysms. *Semin Vasc Surg* 8, 85-92 (1995).
388. Freestone, T. *et al.* Inflammation and matrix metalloproteinases in the enlarging abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15, 1145-1151 (1995).
389. Irizarry, E. *et al.* Demonstration of interstitial collagenase in abdominal aortic aneurysm disease. *J Surg Res* 54, 571-574 (1993).
390. White, J.V., Haas, K., Phillips, S. & Comerota, A.J. Adventitial elastolysis is a primary event in aneurysm formation. *J Vasc Surg* 17, 371-380; discussion 380-371 (1993).
391. Brophy, C.M., Reilly, J.M., Smith, G.J. & Tilson, M.D. The role of inflammation in nonspecific abdominal aortic aneurysm disease. *Ann Vasc Surg* 5, 229-233 (1991).
392. Allaire, E., Guettier, C., Bruneval, P., Plissonnier, D. & Michel, J.B. Cell-free arterial grafts: morphologic characteristics of aortic isografts, allografts, and xenografts in rats. *J Vasc Surg* 19, 446-456 (1994).
393. Allaire, E., Forough, R., Wang, T., Clowes, M.M. & Clowes, A.W. Local overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) prevents arterial dilatation and rupture. *J Vasc Res* 33, 3 (1996).
394. Birkedal-Hansen, H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 7, 728-735 (1995).

395. Katsuda, S., Okada, Y., Okada, Y., Imai, K. & Nakanishi, I. Matrix metalloproteinase-9 (92-kd gelatinase type IV collagenase equals gelatinase B) can degrade arterial elastin. *American Journal of Pathology* 145, 1208-1218 (1994).
396. Ganz, P., Davies, P.F., Leopold, J.A., Gimbrone, M.A. & Alexander, R.W. Short-and long-term interactions of endothelium and vascular smooth muscle in coculture: effects on cyclic GMP production. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 3552-3556 (1986).
397. Staiano-Coico, L., Hajjar, D.P., Hefton, J.M., Hajjar, K.A. & Kimme, I.M. Interactions of arterial cells: III. Stathmokinetic analyses of smooth muscle cells cocultured with endothelial cells. *J Cell Physiol* 134, 485-490 (1988).
398. Bell, E., Merrill, C. & Solomon, D. Characteristics of a tissue equivalent formed by fibroblasts cast in a collagen gel. *J Cell Biol* 83, 398a (1979).
399. Beil, E., Ivarsson, B. & Merrill, C. 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(3), 1274-1278 (1979).
400. Kenagy, R.D., Nikkari, S.T., Welgus, H.G. & Clowes, A.W. Heparin inhibits the induction of three matrix metalloproteinases (stromelysin, 92-kD gelatinase, and collagenase) in primate arterial smooth muscle cells. *J Clin Invest* 93, 1987-1993 (1994).
401. Heickendorff, L. The basement membrane of arterial smooth muscle cells. *APMIS* 9, 1-32 (1989).
402. Wewer, U.M. & Engvall, E. Laminins. *Methods Enzymol* 245, 85-104 (1994).
403. Ziegler, T., Alexander, R.W. & Nerem, R.M. An endothelial cell-smooth muscle cell co-culture model for use in the investigation of flow effects on vascular biology. *Ann Biomed Eng* 23, 216-225 (1995).
404. Blakemore, A. & Voorhees, A.B.J. The use of tubes constructed of vinyon-N cloth in bridging arterial defects: experimental and clinical. *Ann Surg* 140, 324-334 (1954).

405. Herring, M.B. The germination of endothelial cell seeding. in *Endothelialization of vascular grafts* (eds Zilla, P.P., Fasol, R.D. & Deutsch, M.) 1-9 (Karger, N.Y., 1987).
406. Ozaki, C.K. *et al.* Platelet activation by healing ePTFE grafts. *Journal of Biomedical Materials Research* 29, 647-653 (1995).
407. Davies, M.G. & Hagen, P.O. Pathobiology of intimal hyperplasia. *Br J Surg* 81, 1254-1269 (1994).
408. Davies, M.G. & Hagen, P.O. Pathophysiology of vein graft failure: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 9, 7-18 (1995).
409. Clowes, A.W. & Reidy, M.A. Prevention of stenosis after vascular reconstruction: pharmacologic control of intimal hyperplasia—a review. *J Vasc Surg* 13, 885-891 (1991).
410. Weston, M.W., Rhee, K. & Tarbell, J.M. Compliance and diameter mismatch affect the wall shear rate distribution near an end-to-end anastomosis. *J Biomechanics* 29, 187-198 (1996).
411. Dobrin, P.B. Mechanical factors associated with the development of intimal and medial thickening in vein grafts subjected to arterial pressure: A model of arteries exposed to hypertension. *Hypertension* 26, 38-43 (1995).
412. Fung, Y. Mechanical properties and active remodeling of blood vessels. in *Biomechanics: Mechanical properties of living tissues* 321-391 (Springler Verlag, New York, 1993).
413. Wilson, E., mai, Q., Sudhir, K., Wiess, R. & Ives, H. Mechanical strain induces growth of vascular smooth muscle cells via autocrine action of PDGF. *J Cell Biol* 123, 741-747 (1993).
414. Roohk, H.V., Pick, J., Hill, R., Hung, E. & Bartlett, R.H. Kinetics of fibrinogen and platelet adherence to biomaterials. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 22, 1-7 (1976).
415. Cheung, D., Tong, D., Perelman, N., Ertl, D. & Nimni, M. Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde IV: *in vitro* and *in vivo* stability of a crosslinked collagen matrix. *Connect Tissue Res* 25, 27-34 (1990).

416. Guidoin, R. *et al.* Albumin coated and critical point dried polyester prostheses as substitutes in the thoracic aorta of dogs. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 29, 290-295 (1983).
417. Bordenave, L. *et al.* Experimental evaluation of a gelatin-coated polyester graft used as an arterial substitute. *Biomat* 10, 235-242 (1989).
418. Jonas, R., Schoen, F., Levy, R. & Castaneda, A. Biological sealants and knitted Dacron: porosity and histological comparisons of vascular material with and without collagen and fibrin glue pretreatments. *Ann Thorac Surg* 41, 657-663 (1986).
419. Jonas, R., Schoen, F., Britton, L., Ziemer, G. & Castaneda, A. Biological sealants and knitted Dacron: porosity and histological comparisons of collagen and fibrin glue pretreatments in circulatory models. *Ann Thorac Surg* 44, 283-290 (1987).
420. Quiñones-Baldrich, W., Moore, W., Zimet, S. & Chvapil, M. Development of a "leak-proof" knitted Dacron vascular prosthesis. *J Vasc Surg* 3, 895-903 (1986).
421. Middelkoop, E. *et al.* Adherence, proliferation and collagen turnover by human fibroblasts seeded into different types of collagen sponges. *Cell Tissue Res* 280, 447-453 (1995).
422. Hey, K.B., Lachs, C.M., Raxworthy, M.J. & Wood, E.J. Crosslinked fibrous collagen for use as a dermal implant: control of the cytotoxic effects of glutaraldehyde and dimethylsuberimidate. *Biotech Appl Biochem* 12, 85-93 (1990).
423. Eybl, E. *et al.* Endothelial cell lining of bioprosthetic heart valve materials. *J Thorac Cardiovasc Surg* 104, 763-769 (1992).
424. Grimm, M. *et al.* Improved biocompatibility of bioprosthetic heart valves by L-glutamic acid treatment. *J Card Surg* 7, 58-64 (1992).
425. Kito, H. & Matsuda, T. Biocompatible coatings for luminal and outer surfaces of small-caliber artificial grafts. *J Biomed Mat Res* 30, 321-330 (1996).

426. Marois, Y. *et al.* Carbodiimide cross-linked gelatin - new coating for porous polyester arterial prostheses. *Biomat* 16, 1131-1139 (1995).
427. Nakayama, Y., Matsuda, T. & Irie, M. A novel surface photo-graft polymerization method for fabricated devices. *ASAIO J* 39, M542-544 (1993).
428. Ukpabi, P. *et al.* The gelweave polyester arterial prosthesis. *Canadian journal of surgery* 38, 322-331 (1995).
429. Rumisek, J.D. *et al.* Heat-denatured albumin-coated Dacron vascular grafts: Physical characteristics and *in vivo* performance. *J Vasc Surg* 4, 136-143 (1986).
430. Eberhart, R.C. *et al.* Albumin adsorption and retention on C₁₈-alkyl-derivatized polyurethane vascular grafts. *Artif Organs* 11, 375-382 (1987).
431. Ishikawa, T., Sasakawa, S., Takase, M. & Osada, Y. Effect of albumin immobilization by plasma polymerization on platelet reactivity. *Thrombos Res* 35, 193-202 (1984).
432. Tsai, C., Huo, H., Kuikarni, P. & Eberhart, R. Biocompatible coatings with high albumin affinity. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 36, M307-M310 (1990).
433. Drury, J.K., Ashton, T.R., Cunningham, J.D., Maini, R. & Pollock, J.G. Experimental and clinical experience with a gelatin impregnated Dacron prosthesis. *Ann Vasc Surg* 1, 542-547 (1987).
434. Kottke-Marchant, K., Anderson, J., Umemura, Y. & Marchant, R. Effect of albumin coating on *in vitro* blood compatibility of Dacron arterial prosthesis. *Biomat* 10, 147-155 (1989).
435. McGee, G., Shuman, T., Atkinson, J., Weaver, F. & Edwards, W. Experimental evaluation of a new albumin-impregnated knitted Dacron prosthesis. *American Surgeon* 53, 695-701 (1987).
436. Cziperle, D.J. *et al.* Albumin impregnated vascular grafts: albumin resorption and tissue reactions. *J Cardiovasc Surg Torino* 33, 407-414 (1992).
437. Freischlag, J. & Moore, W. Clinical experience with a collagen-impregnated knitted Dacron vascular graft. *Ann Vasc Surg* 3, 895-903 (1990).

438. Alkhaffaf, H. & Charlesworth, D. Albumin-coated vascular prostheses - a 5-year follow-up. *J Vasc Surg* 23, 686-690 (1996).
439. Guidoin, R. *et al.* Collagen coatings as biological sealant for textile arterial prostheses. *Biomat* 10, 156-165 (1989).
440. Ben Slimane, S. *et al.* *In vivo* evaluation of polyester arterial grafts coated with albumin: The role and importance of crosslinking agents. *European Surgical Research* 20, 66-74 (1988).
441. Jonas, R., Ziemer, G., Schoen, F., Britton, L. & Castaneda, A. A new sealant for knitted Dacron prostheses: Minimally crosslinked galatin. *J Vasc Surg* 7, 414-419 (1989).
442. Goeaubrissonniere, O. Infection of arterial prostheses. *Presse Medicale* 24, 454-458 (1995).
443. Kimmel, R.M., Murphy, R.X., Jr. & Chowdary, R.P. Optimal management of inguinal vascular graft infections. *Ann Plast Surg* 32, 623-629 (1994).
444. Okahara, K. *et al.* An infection-resistant ptfе vascular graft - spiral coiling of the graft with ofloxacin-bonded ptfе thread. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 9, 408-414 (1995).
445. Muhl, E., Gatermann, S., Iven, H., Dendorfer, A. & Bruch, H.P. Local application of vancomycin for prophylaxis of graft infection - release of vancomycin from antibiotic-bonded dacron grafts, toxicity in endothelial-cell culture, and efficacy against graft infection in an animal-model. *Ann Vasc Surg* 10, 244-253 (1996).
446. Gahtan, V. *et al.* Antistaphylococcal activity of rifampin-bonded gelatin-impregnated dacron grafts. *J Surg Res* 58, 105-110 (1995).
447. Zdanowski, Z., Ribbe, E. & Schalen, C. Bacterial adherence to synthetic vascular prostheses and influence of human plasma. An *in vitro* study. *Eur J Vasc Surg* 7, 277-282 (1993).
448. van der Lei, B., Bartels, H.L., Robinson, P.H. & Bakker, W.W. Reduced thrombogenicity of vascular prostheses by coating with ADP-ase. *Int Angiol* 11, 268-271 (1992).

449. Dekker, A. *et al.* Improved adhesion and proliferation of human endothelial cells on polyethylene precoated with monoclonal antibodies directed against cell membrane antigens and extracellular matrix proteins. *Thromb Haemost* 66, 715-724 (1991).
450. Chang, J.C. *et al.* Experimental evaluation of a new type of heparin-bonded polyurethane. *ASAIO Trans* 37, M201-202 (1991).
451. Kim, W.G., Park, K.D., Mohammad, S.F. & Kim, S.W. SPUU-PEO-heparin graft copolymer surfaces. Patency and platelet deposition in canine small diameter arterial grafts. *ASAIO Trans* 37, M148-149 (1991).
452. Park, K.D., Kim, W.G., Jacobs, H., Okano, T. & Kim, S.W. Blood compatibility of SPUU-PEO-heparin graft copolymers. *J Biomed Mater Res* 26, 739-756 (1992).
453. Forster, R. & Bernath, F. Analysis of urokinase immobilization on the polytetrafluoroethylene vascular prosthesis. *Am J Surg* 156, 130-132 (1988).
454. Gray, J.L. *et al.* FGF-1 affixation stimulates ePTFE endothelialization without intimal hyperplasia. *J Surg Res* 57, 596-612 (1994).
455. Gosselin, C. *et al.* ePTFE coating with fibrin glue, FGF-1, and heparin: effect on retention of seeded endothelial cells. *J Surg Res* 60, 327-332 (1996).
456. Greisler, H.P. *et al.* Enhanced endothelialization of expanded polytetrafluoroethylene grafts by fibroblast growth factor type 1 pretreatment. *Surgery* 112, 244-254 (1992).
457. Hubbell, J.A., Massia, S.P. & Drumheller, P.D. Surface-grafted cell-binding peptides in tissue engineering of the vascular graft. *Ann N Y Acad Sci* 665, 253-258 (1992).
458. Mansfield, P., Wechezak, A. & Sauvage, L. Preventing thrombus on artificial vascular surfaces. True endothelial cell lining. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 21, 264-272 (1975).
459. Herring, M., Gardner, A. & Glover, J. A single-staged technique for seeding vascular grafts with autogenous endothelium. *Surgery* 84(4), 498-504 (1978).

460. Graham, L. *et al.* Endothelial cell seeding of prosthetic vascular graft. Early experimental studies with cultured autologous canine endothelium. *Arch Surg* 115, 1289-1294 (1980).
461. Stanley, J. *et al.* Enhanced patency of small-diameter externally supported Dacron iliofemoral grafts seeded with endothelial cells. *Surgery* 92, 994-1005 (1982).
462. Sharefkin, J. *et al.* Early normalization of platelet survival by endothelial seeding of Dacron arterial prosthesis in dogs. *Surgery* 92, 385-393 (1982).
463. Allen, B. *et al.* Influence of endothelial cell seeding on platelet deposition and patency in small-diameter Dacron arterial grafts. *J Vasc Surg* 1, 224-233 (1984).
464. Herring, M.B., Gardner, A.L. & Glover, J.L. Seeding of human arterial prostheses with mechanically derived endothelium. The detrimental effect of smoking. *J Vasc Surg* 1, 279-289 (1984).
465. Herring, M.B., Baughman, S. & Glover, J.L. Endothelium develops on seeded human arterial prosthesis: a brief clinical note. *J Vasc Surg* 2, 727-730 (1985).
466. Walker, M.G., Thomson, G.J.L., Vorha, R. & Shaw, J.W. Endothelial cell seeding of ePTFE vascular grafts - a clinical trial. *Br J Surg* 75, 390 (1988).
467. Ortenwall, P., Wadenvik, H., Kutti, J. & Risberg, B. Reduction in deposition of indium 111-labeled platelets after autologous endothelial cell seeding of Dacron aortic bifurcation grafts in humans: a preliminary report. *J Vasc Surg* 6, 17-25 (1987).
468. Herring, M.B., Compton, R.S., Gardner, A.L. & LeGrand, D.R. Clinical experiences with endothelial seeding in Indianapolis. in *Endothelialization of vascular grafts* (eds Zilla, P.P., Fasol, R.D. & Deutsch, M.) 218-227, N.Y., 1987).
469. Zilla, P.P., Fasol, R.D. Deutsch, M. *et al.* Endothelial cell seeding of polytetrafluoroethylene vascular grafts in humans: a preliminary report. *J Vasc Surg* 6, 535-541 (1987).
470. Berger, K., Sauvage, L., Rao, A. & Wood, S. Healing of arterial prostheses in man: its incompleteness. *Ann Surg* 175, 118-127 (1972).

471. Sauvage, L. *et al.* Interspecies healing of porous arterial prostheses. *Ann Surg* 109, 698-705 (1974).
472. Ortenwall, P., Bylock, A., Kjellstrom, T. & Risberg, B. Seeding of ePTFE carotid interposition grafts in sheep and dogs: species dependent results. *Surgery* 103, 199-205 (1988).
473. Wu, M.H. *et al.* Definitive proof of endothelialization of a Dacron arterial prosthesis in a human being. *J Vasc Surg* 21, 862-867 (1995).
474. Shi, Q. *et al.* Proof of fallout endothelialization of impervious Dacron grafts in the aorta and inferior vena cava of the dog. *J Vasc Surg* 20, 546-556; discussion 556-547 (1994).
475. Rosenman, J.E., Kenpczinski, R.F., Pearce, W.H. & Silberstein, E.B. Kinetics of endothelial cell seeding. *J Vasc Surg* 2, 778-784 (1985).
476. Zilla, P. *et al.* Use of fibrin glue as a substrate for *in vitro* endothelialization of PTFE vascular grafts. *Surg* 105, 515-522 (1989).
477. Zilla, P. *et al.* Clinical *in vitro* endothelialization of femoropopliteal bypass grafts: an actuarial follow-up over three years. *J Vasc Surg* 19, 540-548 (1994).
478. Fischlein, T. *et al.* *In vitro* endothelialization of a mesosystemic shunt: a clinical case report. *J Vasc Surg* 19, 549-554 (1994).
479. Magometschnigg, H. *et al.* Prospective clinical study with *in vitro* endothelial cell lining of expanded polytetrafluoroethylene grafts in crural repeat reconstruction. *J Vasc Surg* 15, 527-535 (1992).
480. Ott, M.J. & Ballermann, B.J. Shear stress-conditioned, endothelial cell-seeded vascular grafts: improved cell adherence in response to *in vitro* shear stress. *Surgery* 117, 334-339 (1995).
481. Emerick, S. *et al.* Leukocyte depletion enhances cultured endothelial retention on vascular prostheses. *J Vasc Surg* 5, 342-347 (1987).
482. Holzenbein, T.J. *et al.* Results of a policy with arm veins used as the first alternative to an unavailable ipsilateral greater saphenous-vein for infrainguinal bypass. *J Vasc Surg* 23, 130-140 (1996).

483. Vandermeer, J. *et al.* A comparison of internal mammary artery and saphenous vein grafts after coronary artery bypass surgery - No difference in 1-year occlusion rates and clinical outcome. *Circulation* 90, 2367-2374 (1994).
484. Whittemore, A.D. Autogenous saphenous vein versus PTFE bypass for above-knee femoropopliteal reconstruction. *J Vasc Surg* 15, 895-897 (1992).
485. Dardik, H. Modified human umbilical vein allograft. in *Vascular Surgery* (ed. Brutherford, R.) 474-480 (W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1989).
486. Wang, E.Y., Giclas, P.C., Tu, R.H., Hata, C. & Quijano, R.C. A comparative study of complement activation by Denaflex, Bioflow, and BioPolyMeric vascular grafts. *ASAIO J* 39, M691-694 (1993).
487. Dale, W. & Lewis, M. Further experiences with bovine arterial grafts. *Surgery* 80, 711-721 (1976).
488. Rosenberg, N., Thompson, J., Keshishian, J. & Vander Werf, B. The modified bovine arterial graft. *Arch Surg* 111, 222-226 (1976).
489. Sawyer, P., O'Shaughnessy, A. & Sophie, Z. Patency of small-diameter negatively charged glutaraldehyde-tanned (St. Jude Medical Biopolymeric) Graft. in *Modern vascular grafts* (ed. Sawyer, P.) 163-189 (McGraw-Hill Book Company, New York, 1987).
490. Ramasamy, N. Physicla chemistry of the blood-vascular interface. in *Modern vascular grafts* (ed. Sawyer, P.) 27-74 (McGraw-Hill Book Company, New York, 1987).
491. Suma, H., Wanibuchi, Y. & Takeuchi, A. Bovine internal thoracic artery graft for myocardial revascularization: late results. *Ann Thorac Surg* 57, 704-707 (1994).
492. Tomizawa, Y. *et al.* Coronary bypass grafting with biological grafts in a canine model. *Circulation* 90, 160-166 (1994).
493. Esposito, F. *et al.* Short-term results of bovine internal mammary artery use in cardiovascular surgery. *Tex Heart Inst J* 21, 193-197 (1994).

494. Craig, S.R. & Walker, W.S. The use of bovine internal mammary artery (Bioflow) grafts in coronary artery surgery. *Eur J Cardiothorac Surg* 8, 43-45 (1994).
495. Suma, H. *et al.* Bovine internal thoracic artery graft. Successful use at urgent coronary bypass surgery. *J Cardiovasc Surg Torino* 32, 268-270 (1991).
496. Wagner, W.H. *et al.* Early results of infrainguinal arterial reconstruction with a modified biological conduit. *Ann Vasc Surg* 6, 325-333 (1992).
497. Lotina, S., Davidovic, L. & Cinara, I. [The St. Jude biopolymeric graft in reconstruction of peripheral arteries]. *Acta Chir Jugosl* 37, 269-278 (1990).
498. Marois, Y. *et al.* *In vivo* evaluation of four chemically processed biological grafts implanted as infrarenal arterial substitutes in dogs. *Biomat* 10, 369-379 (1989).
499. Boerboom, L.E. *et al.* Heparinization of biological vascular graft reduces fibrin deposition. *Int J Artif Organs* 16, 263-267 (1993).
500. Humphries, A., Hawk, W., DeWolf, V. & LeFevre, F. Clinicopathologic observations of the fate of arterial freeze-dried homografts. *Surgery* 45, 59-70 (1959).
501. Maede, J., Linton, R., Darting, R. & Menendez, C. Arterial homografts: Along term clinical follow-up. *Arch Surg* 93, 392-399 (1966).
502. Szilagyi, D., Rodriguez, F., Smith, R. & Elliott, J. Late fate of arterial allografts. *Arch Surg* 101, 721-733 (1970).
503. Tice, D. & Zerbino, V. Clinical experience with preserved human allografts for vascular reconstruction. *Surgery* 72, 260-267 (1972).
504. Ochsner, J., DeCamo, P. & Leonard, G. Experience with fresh venous allografts as an arterial substitutes. *Ann Surg* 173, 933-939 (1971).
505. Vermassen, F. *et al.* The use of homologous veins in arterial reconstructions. An experimental study. *Acta Chir Belg* 94, 277-283 (1994).
506. Robson, S.C. *et al.* Role of endothelial cells in transplantation. *International Archives of Allergy and Immunology* 106, 305-322 (1995).

507. Wagner, E., Roy, R., Marois, Y., Douville, Y. & Guidoin, R. Posttransplant antibodies and fresh venous allograft failure in dogs. *Transplantation* 58, 537-542 (1994).
508. Wagner, E., Roy, R., Marois, Y., Douville, Y. & Guidoin, R. Fresh venous allografts in peripheral arterial reconstruction in dogs. Effects of histocompatibility and of short-term immunosuppression with cyclosporine A and mycophenolate mofetil. *J Thorac Cardiovasc Surg* 110, 1732-1744 (1995).
509. Boren, C., AJ, R. & Moore, W. Maintenance of viable arterial allografts by cryopreservation. *Surgery* , 382-391 (1978).
510. Axthelm, S., Porter, J., S, S. & Baur, G. Antigenicity of vein grafts. *Ann Surg* 189, 290-293 (1979).
511. Ochner, J. Allogenic vein. in *Graft materials* (ed. Dardik, H.) 243-247 (Symoposia specialists, Inc., Miami, 1978).
512. Street, D., Russ, G. & Ricotta, J. Platelet avidity of cryopreserved veins. *J Surg Res* 45, 363-369 (1988).
513. Showalter, D. *et al.* Cryopreserved venous conduits in canine carotide arteries. *Surgery* 106, 652-659 (1989).
514. Brockbank, K. *et al.* Functional analysis of cryopreserved veins. Preliminary Report. *J Vasc Surg* 11, 94-102 (1990).
515. Pompilio, G. *et al.* Retention of endothelium-dependent properties in human mammary arteries after cryopreservation. *Ann Thorac Surg* 61, 667-673 (1996).
516. Salomon, R.N., Friedman, G.B., Callow, A.D., Payne, D.D. & Libby, P. Cryopreserved aortic homografts contain viable smooth muscle cells capable of expressing transplantation antigens. *J Thorac Cardiovasc Surg* 106, 1173-1180 (1993).
517. Sellke, F., Meng, R. & Rossi, N. Cryopreserved, saphenous vein homografts for femoral-distal vascular reconstruction. *Journal of Cardiovascular Surgery* 30, 836-842 (1989).
518. Edwards, W. Alternate sources of autogenous or homologous venous tissue. *Surgical Rounds* , 41-54 (1989).

519. De Leersnijder, D., Willocx, P., Van Marck, E. & Vanmaele, R. Venous homografts in infra-inguinal procedures: an eight years experience. *J Cardiovasc Surg Torino* 33, 633-640 (1992).
520. van Reedt Dortland, R.W., van Leeuwen, M.S., Steijling, J.J., Theodorides, T. & van Vroonhoven, T.J. Long-term results with vein homograft in femoro-distal arterial reconstructions. *Eur J Vasc Surg* 5, 557-564 (1991).
521. Gournier, J.P., Favre, J.P., Gay, J.L. & Barral, X. Cryopreserved arterial allografts for limb salvage in the absence of suitable saphenous vein: two-year results in 20 cases. *Ann Vasc Surg* 9, S7-14 (1995).
522. Vogt, P.R. *et al.* Eradication of aortic infections with the use of cryopreserved arterial homografts. *Ann Thorac Surg* 62, 640-645 (1996).
523. Fujitani, R.M., Bassiouny, H.S., Gewertz, B.L., Glagov, S. & Zarins, C.K. Cryopreserved saphenous vein allogenic homografts: an alternative conduit in lower extremity arterial reconstruction in infected fields. *J Vasc Surg* 15, 519-526 (1992).
524. Posner, M.P. *et al.* Early results of infrageniculate arterial reconstruction using cryopreserved homograft saphenous conduit (CADVEIN) and combination low-dose systemic immunosuppression. *J Am Coll Surg* 183, 208-216 (1996).
525. Kitamura, M. *et al.* An internal thoracic artery homograft as a new small caliber vascular substitute. *ASAIO J* 40, M830-833 (1994).
526. Dardik, H., Ibrahim, I. & Dardik, I. Modified and unmodified umbilical vein allografts and xenografts employed as arterial substitutes: A morphologic assessment. *Surg Forum* 26, 286-287 (1975).
527. Dardik, H. Long-term experience with the glutaraldehyde-stabilized human umbilical cord vein graft in lower extremity revascularization. in *Modern vascular grafts* (ed. Sawyer, P.) 153-162 (McGraw-Hill Book Company, New York, 1987).
528. Dardik, H. *et al.* A decade of experience with the glutaraldehyde-tanned human umbilical cord vein graft for revascularization of the lower limb. *J Vasc Surg* 7, 336-346 (1988).

529. Dardik, H. *et al.* Biodegradation and aneurysm formation in umbilical vein grafts: Observations and a realistic strategy. *Ann Surg* 199, 61-68 (1984).
530. Guidouin, R. *et al.* Pathologic features of surgically excised human umbilical vein grafts. *J Vasc Surg* 3, 146-154 (1986).
531. Dardik, H. The second decade of experience with the umbilical vein graft for lower-limb revascularization. *Cardiovasc Surg* 3, 265-269 (1995).
532. Sparks, C. Autogenous graft made to order. *Ann Thorac Surg* 8, 104-113 (1969).
533. Guidoin, R. *et al.* Another look at the Sparks-Mandril arterial graft precursor for vascular repair. - Pathology by scanning electron microscopy. *Biomater Med Devices Artif Organs* 8, 145-167 (1980).
534. Kehrel, B. Platelet receptors for collagens. *Platelets* 6, 11-16 (1995).
535. Hallin, R.W. Complications with the mandril-grown (Sparks) dacron arterial graft. *Am Surg* 41, 550-554 (1975).
536. Hallin, R.W. & Sweetman, W.R. The Sparks' mandril graft. A seven year follow-up of mandril grafts placed by Charles H. Sparks and his associates. *Am J Surg* 132, 221-223 (1976).
537. Roberts, P.N. & Hopkinson, B.R. The Sparks mandril in femoropopliteal bypass. *Br Med J* 2, 1190-1191 (1977).
538. McLean, N.R. Gore-tex replacement of a Sparks mandril false aneurysm. *Br J Clin Pract* 36, 326 (1982).
539. Morgan, A. & Lazarus, M. Vascular access for dialysis. Technics and results with newer methods. *Am J Surg* 129, 432-439 (1975).
540. Hamilton, D.N., Briggs, J.D., Macpherson, S.G. & Wilson, A.J. The Sparks Mandril for vessel access in haemodialysis. *Proc Eur Dial Transplant Assoc* 12, 551-554 (1976).
541. Greca, G.L. *et al.* Experience with a new vascular prosthetic device (Sparks mandril) for periodic haemodialysis. *Proc Eur Dial Transplant Assoc* 12, 546-550 (1976).
542. Ketharanathan, V. & Christie, B. Glutaraldehyde-tanned ovine collagen conduits as vascular xenografts in dogs. *Arch Surg* 115, 967-969 (1980).

543. Werkmeister, J.A., White, J.F. & Ramshaw, J.A. Evaluation of the Omniflow collagen-polymer vascular prosthesis. *Med Prog Technol* 20, 231-242 (1994).
544. Marois, Y. *et al.* *In vivo* evaluation of four chemically processed biological grafts implanted as infrarenal arterial substitutes in dogs. *Biomat* 10, 369-379 (1989).
545. Ratto, G.B. *et al.* An experimental study to examine the patency and tissue response of two types of biosynthetic graft used as a replacement for porcine inferior vena cava. *J Cardiovasc Surg Torino* 33, 700-704 (1992).
546. Yoshida, H. *et al.* Early results of a reinforced biosynthetic ovine collagen vascular prosthesis for small arterial reconstruction. *Surgery Today* 26, 262-266 (1996).
547. Bell, E., Ehrlich, P.H., Buttle, D.J. & Nakatsuji, T. Living tissue formed *in vitro* and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science* 211, 1042-1054 (1981).
548. Bell, E., Sher, S. & Hull, B. The living skin-equivalent as a structural and immunological model in skin grafting. *Scanning electron microscopy Iv*, 1957-1962 (1984).
549. Matsuda, T., Kitamura, T., Iwata, H., Takano, H. & Akutsu, T. A hybrid artificial vascular graft based upon an organ reconstruction model. *Trans Am Soc Artif Intern Organs Xxxiv*, 640-643 (1988).
550. Matsuda, T., Akutsu, T., Kira, K. & Matsumoto, H. Development of hybrid compliant graft: rapid preparative method for reconstruction of a bascular wall. *Trans Am Soc Artif Intern Organs Xxxv*, 553-555 (1989).
551. Suzuki, S., Matsuda, K., Isshiki, N., Tamada, Y. & Ikada, Y. Experimental study of a newly developed bilayer artificial skin. *Biomat* 11, 356-360 (1990).
552. Niu, S., Matsuda, T. & Oka, T. Control of cellular orientation in two-dimensional tissue formation. Surface topologic effect of collagen fibers on endothelialization. *ASAIO Trans* 37, M441-442 (1991).

553. Moghaddam, M.J. & Matsuda, T. Development of a 3-D artificial extracellular matrix. Design concept and artificial vascular media. *ASAIO Trans* 37, M437-438 (1991).
554. Matsuda, K. *et al.* Evaluation of a bilayer artificial skin capable of sustained release of an antibiotic. *Biomater* 13(2), 119-122 (1992).
555. Kanda, K., Matsuda, T. & Oka, T. Two-dimensional orientational response of smooth muscle cells to cyclic stretching. *ASAIO J* 38, M382-385 (1992).
556. Miwa, H., Matsuda, T. & Iida, F. Development of a hierarchically structured hybrid vascular graft biomimicking natural arteries. *ASAIO J* 39, M273-277 (1993).
557. Kanda, K., Matsuda, T., Miwa, H. & Oka, T. Phenotypic modulation of smooth muscle cells in intima-media incorporated hybrid vascular prostheses. *ASAIO J* 39, M278-282 (1993).
558. Miwa, H. & Matsuda, T. An integrated approach to the design and engineering of hybrid arterial prostheses. *J Vasc Surg* 19, 658-667 (1994).
559. Miwa, H. & Matsuda, T. An integrated approach to the design and engineering of hybrid arterial prostheses. *J Vasc Surg* 19, 658-667 (1994).
560. Kanda, K., Matsuda, T. & Oka, T. *In vitro* reconstruction of hybrid vascular tissue. Hierarchic and oriented cell layers. *ASAIO J* 39, M561-565 (1993).
561. Hirai, J., Kanda, K., Oka, T. & Matsuda, T. Highly oriented, tubular hybrid vascular tissue for a low pressure circulatory system. *ASAIO J* 40, M383-388 (1994).
562. Kanda, K. & Matsuda, T. *In vitro* reconstruction of hybrid arterial media with molecular and cellular orientations. *Cell Transplant* 3, 537-545 (1994).
563. Miwa, H., Matsuda, T. & Iida, F. Development of a hierarchically structured hybrid vascular graft biomimicking natural arteries. *ASAIO J* 39, M273-277 (1993).
564. Kanda, K., Matsuda, T., Miwa, H. & Oka, T. Phenotypic modulation of smooth muscle cells in intima-media incorporated hybrid vascular prostheses. *ASAIO J* 39, M278-282 (1993).

565. Ishibashi, K. & Matsuda, T. Reconstruction of a hybrid vascular graft hierarchically layered with three cell types. *ASAIO J* 40, M284-290 (1994).
566. Hirai, J. & Matsuda, T. Venous reconstruction using hybrid vascular tissue composed of vascular cells and collagen - tissue regeneration process. *Cell Transplant* 5, 93-105 (1996).
567. Ramshaw, J.A., Peters, D.E., Werkmeister, J.A. & Ketharanathan, V. Collagen organization in mandrel-grown vascular grafts. *J Biomed Mater Res* 23, 649-660 (1989).
568. Lantz, G.C., Badylak, S.F., Coffey, A.C., Geddes, L.A. & Blevins, W.E. Small intestinal submucosa as a small-diameter arterial graft in the dog. *J Invest Surg* 3, 217-227 (1990).
569. Matsumoto, T., Holmes, R. & Burdick, C. The fate of inverted segment of small bowel used for the replacement of major veins. *Surgery* 60, 739-743 (1966).
570. Ferris, P. & Magassy, C. Replacement of infected arterial prosthesis with inverted jejunal autografts. *American Surgeon* 35, 681-687 (1969).
571. Ninomiya, J., Tanaka, S., Shoji, T. & Noihiki, Y. Late results of clinical experience with small caliber biological grafts. *Artif Organs* 19, 46-50 (1995).
572. Tabbara, M. *et al.* Laser-fused biologic vascular graft anastomoses. *J Invest Surg* 6, 289-295 (1993).
573. Burger, R.A., Gerharz, C.D., Draws, J., Engelmann, U.H. & Hohenfellner, R. Sutureless laser-welded anastomosis of the femoral artery and vein in rats using CO₂ and Nd:YAG lasers. *J Reconstr Microsurg* 9, 213-218 (1993).
574. Sandusky, G.E., Lantz, G.C. & Badylak, S.F. Healing comparison of small intestine submucosa and ePTFE grafts in the canine carotid artery. *J Surg Res* 58, 415-420 (1995).
575. Lantz, G.C., Badylak, S.F., Coffey, A.C., Geddes, L.A. & Sandusky, G.E. Small intestinal submucosa as a superior vena cava graft in the dog. *J Surg Res* 53, 175-181 (1992).

576. Sandusky, G.E., Jr., Badylak, S.F., Morff, R.J., Johnson, W.D. & Lantz, G. Histologic findings after *in vivo* placement of small intestine submucosal vascular grafts and saphenous vein grafts in the carotid artery in dogs. *Am J Pathol* 140, 317-324 (1992).
577. Lantz, G.C. *et al.* Small intestinal submucosa as a vascular graft: a review. *J Invest Surg* 6, 297-310 (1993).
578. Badylak, S.F., Coffey, A.C., Lantz, G.C., Tacker, W.A. & Geddes, L.A. Comparison of the resistance to infection of intestinal submucosa arterial autografts versus polytetrafluoroethylene arterial prostheses in a dog model. *J Vasc Surg* 19, 465-472 (1994).
579. Bricker, D., Beall, A. & DeBakey, M. The differential response to infection of autogenous vein versus Dacron arterial prosthesis. *Chest* 58, 566-570 (1970).
580. Herbert, S.T. *et al.* Elastic modulus of prepared canine jejunum, a new vascular graft material. *Ann Biomed Eng* 21, 727-733 (1993).
581. Hiles, M.C. *et al.* Mechanical properties of xenogeneic small-intestinal submucosa when used as an aortic graft in the dog. *J Biomed Mater Res* 29, 883-891 (1995).
582. Ralevic, V. & Burnstock, G. Roles of P₂-purinoceptors in the cardiovascular system. *Circulation* 84, 1-14 (1991).
583. Hoyle, C. & Burnstock, G. ATP receptors and their physiological roles. in *Adenosine in the nervous system* (ed. Stone, T.) 43-76 (Academic Press, London, 1991).
584. Katsuragi, T. *et al.* Existence of ATP-evoked ATP release system in smooth muscles. *J Pharmacol Exp Ther* 259, 513-518 (1991).
585. Burnstock, G. & Kennedy, C. Is there a basis for distinguishing two types of P₂-purinoceptor? *General Pharmacology* 16, 433-440 (1985).
586. Ross, R. The smooth muscle cell. II. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. *J Cell Biol* 50, 172-186 (1971).
587. Ziganshin, A. *et al.* Selective antagonism by PPADS in rabbit isolated blood vessel. *Br J Pharmacol* 111, 923-929 (1994).

588. Lagaud, G., Stoclet, J. & Andriantsitohaina, R. Calcium handling and purinoceptor subtypes involved in ATP-induced contraction in rat small mesenteric arteries. *Journal of Physiology* 493, 689-703 (1996).
589. Schaeffer, P., Lugnier, C. & Stoclet, J.C. Interactions of calmodulin antagonists with calcium antagonists binding sites. *Eur J Pharmacol* 206, 325-332 (1991).
590. Umans, J.G. & Levi, R. Nitric oxide in the regulation of blood flow and arterial pressure. *Annu Rev Physiol* 57, 771-790 (1995).
591. Mooradian, D.L., Hutsell, T.C. & Keefer, L.K. Nitric oxide (NO) donor molecules: Effect of NO release rate on vascular smooth muscle cell proliferation *in vitro*. *J Cardiovasc Pharmacol* 25, 674-678 (1995).
592. Bucher, B., Ouedraogo, S., Tschopl, M., Paya, D. & Stoclet, J.C. Role of the L-arginine-NO pathway and of cyclic GMP in electrical field-induced noradrenaline release and vasoconstriction in the rat tail artery. *Br J Pharmacol* 107, 976-982 (1992).
593. Marceau, F. *et al.* Contractile effect of the chemotactic factors F-Met-Leu-Phe C5A on the human isolated umbilical artery. *Circ Res* 67, 1059-1070 (1990).
594. Tawada, Y., Furukawa, K. & Shigekawa, M. ATP-induced calcium transient in cultured rat aortic smooth muscle cells. *J Biochem* 102, 1499-1509 (1987).
595. Phaneuf, S., Berta, P., Casanova, J. & Cavadore, J. ATP stimulates inositol phosphates accumulation and calcium mobilization in a primary culture of rat aortic myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 143, 454-460 (1987).
596. Erlinge, D., You, J., Wahlestedt, C. & Edvinsson, L. Characterisation of an ATP receptor mediating mitogenesis in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 289, 135-149 (1995).
597. Boland, B., Himpens, B., Vincent, M.F., Gillis, J.M. & Casteels, R. ATP activates P2x-contracting and P2y-relaxing purinoceptors in the smooth muscle of mouse vas deferens. *Br J Pharmacol* 107, 1152-1158 (1992).
598. Saiag, B. *et al.* Newly evidenced pyrimidinoceptors and the P2x purinoceptors are present on the vascular smooth muscle and respectively mediate the

- UTP- and ATP-induced contractions of the dog maxillary internal vein. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 76, 89-94 (1992).
599. Bolego, C., Pinna, C., Abbracchio, M.P., Cattabeni, F. & Puglisi, L. The biphasic response of rat vesical smooth muscle to ATP. *Br J Pharmacol* 114, 1557-1562 (1995).
600. Benham, C.D., Bouvier, M.M. & Evans, M.L. Changes in cytoplasmic calcium induced by purinergic P₂x receptor activation in vascular smooth muscle cells and sensory neurons. *Adv Exp Med Biol* 304, 229-239 (1991).
601. Pacaud, P., Malam Souley, R., Loirand, G. & Desgranges, C. ATP raises [Ca²⁺]_i via different P₂-receptor subtypes in freshly isolated and cultured aortic myocytes. *Am J Physiol* 269, H30-36 (1995).
602. Benham, C.D. ATP-gated cation channels in vascular smooth muscle cells. *Jpn J Pharmacol* 58, 179p-184p (1992).
603. Rampe, D. & Kane, J.M. Activators of voltage-dependent L-type calcium channels. *Drug Development Research* 33, 344-363 (1994).
604. Tomasic, M., Boyle, J.P., Worley, J.F.d. & Kotlikoff, M.I. Contractile agonists activate voltage-dependent calcium channels in airway smooth muscle cells. *Am J Physiol* 263, C106-113 (1992).
605. Yuan, X.J. Voltage-gated K⁺ currents regulate resting membrane potential and [Ca²⁺]_i in pulmonary arterial myocytes. *Circ Res* 77, 370-378 (1995).
606. Clapham, D. Calcium signaling. *Cell* 80, 259-268 (1995).
607. Bukoski, R., Bergmann, C., Gairard, A. & Stoclet, J. Intracellular Ca²⁺ and force determined simultaneously in isolated resistance arteries. *Am J Physiol* 257, H1728-1735 (1989).
608. Janssen, L.J. & Sims, S.M. Acetylcholine activates non-selective cation and chloride conductances in canine and guinea-pig tracheal myocytes. *J Physiol Lond* 453, 197-218 (1992).
609. Munshi, R., DeBernardi, M.A. & Brooker, G. P₂U-purinergic receptors on C6-2B rat glioma cells: modulation of cytosolic Ca²⁺ and cAMP levels by protein kinase C. *Mol Pharmacol* 44, 1185-1191 (1993).

610. Lynch, J.W., Lemos, V.S., Bucher, B., Stoclet, J.C. & Takeda, K. A pertussis toxin-insensitive calcium influx mediated by neuropeptide Y2 receptors in a human neuroblastoma cell line. *J Biol Chem* **269**, 8226-8233 (1994).
611. Nasu, T. Actions of manganese ions in contraction of smooth muscle. *General Pharmacology* **26**, 945-953 (1995).
612. Mahoney, M.G., Randall, C.J., Linderman, J.J., Gross, D.J. & Slakey, L.L. Independent pathways regulate the cytosolic [Ca²⁺] initial transient and subsequent oscillations in individual cultured arterial smooth muscle cells responding to extracellular ATP. *Mol Biol Cell* **3**, 493-505 (1992).
613. Mahoney, M.G., Slakey, L.L., Hepler, P.K. & Gross, D.J. Independent modes of propagation of calcium waves in smooth muscle cells. *J Cell Sci* **104**, 1101-1107 (1993).
614. Andriantsitohaina, R., Lagaud, G.J., Andre, A., Muller, B. & Stoclet, J.C. Effects of cGMP on calcium handling in ATP-stimulated rat resistance arteries. *Am J Physiol* **268**, H1223-1231 (1995).
615. Bodin, P. *et al.* Responses of subcultured rat aortic smooth muscle myocytes to vasoactive agents and KCl-induced depolarization. *Am J Physiol* **260**, C151-158 (1991).
616. Menger, M.D., Hammersen, F. & Messmer, K. *In vivo* assessment of neovascularization and incorporation of prosthetic vascular biografts. *Thorac Cardiovasc Surg* **40**, 19-25 (1992).
617. Risau, W., Flamme, I. Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **11**, 73-91 (1995).
618. Gonzalez-Crussi, F. Vasculogenesis in the chick embryo. An ultrastructural study. *Am. J. Anat.* **130**, 441-460 (1971).
619. His, W. Lecithoblast und angioblast der Wirbeltiere. *Abhandl. Math-Phys. Ges. Wiss.* **26**, 171-328 (1900).
620. Olah, I., Medgyes, J., Glick, B. Origin of aortic cell clusters in the chicken embryo. *Anat. Rec.* **222**, 60-68 (1988).

621. Cornell, R.A., Kimelman, D. Activin-mediated mesoderm induction requires FGF. *Development* 120, 453-462 (1994).
622. Amya, E., Musci, T.J., Kirschner, M.W. Expression of a dominant negative mutant of the FGF-receptor disrupts mesoderm formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 66, 257-70 (1991).
623. Peters, K.G., Werner, S., Chen, G., Williams, L.T. Two FGF-receptor genes are differentially expressed in epithelial and mesenchymal tissues during limb formation and organogenesis in the mouse. *Development* 114, 233-243 (1992).
624. Flamme, I., Breiner, G., Risau W. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-2 (flk-1) are expressed during vasculogenesis and vascular differentiation in the quail embryo. *Dev. Biol.* 168, In press.
625. Katoh, Y., Periasamy, M., Growth and differentiation of smooth muscle cells during vascular development. *Trends Cardiovasc. Med.* 6, 100-106 (1996).
626. Manasek, F.J. The ultrastructure of embryonic myocardial blood vessels. *Dev. Biol.* 26, 42-54 (1971).
627. Fang, Y.I., Komatsu, Y. & Momose, K. Heterogeneous contractile responses of single smooth muscle cells from guinea pig ileum. *J. Smooth Muscle Res.* 29, 9-17 (1993).
628. Larson, D.M., Fujiwara, K., Alexander, R.W. & Ginbrone, M.A. Heterogeneity of myosin antigenic expression in vascular smooth muscle *in vivo*. *Lab. Invest.* 59, 401-407 (1984).
629. Wolinsky, H., Glagov, S. A lamellar unit structure of aortic medial structure and function in mammals. *Circ. Res.* 20, 99-111 (1967).
630. Frangos, J.A., McIntire, L.V., Eskin, S.G. & Ives, C.L. Flow effects on prostacyclin production by cultured human endothelial cells. *Science* 227, 1477-1479 (1985).
631. Sumpio, B.E., Banes, A.J., Link, G.W. & Iba, T. Modulation of endothelial cell phenotype by cyclic stretch: inhibition of collagen production. *J Surg Res* 48, 415-420 (1990).

632. Sumpio, B.E., Banes, A.J., Link, W.G. & Johnson, G. Enhanced collagen production by smooth muscle cells during repetitive mechanical stretching. *Arch Surg* 123, 1233-1236 (1988).
633. Sumpio, B. & Banes, A. Response of porcine aortic smooth muscle cells to cyclic tensional deformation in culture. *J Surg Res* 44, 696-701 (1988).
634. Seidel, C.L. & Schildmeyer, L.A. Vascular smooth muscle adaptation to increased load. *Annu. Rev. Physiol.* 49, 489-499 (1987).
635. Fung, Y. Mechanical properties and active remodeling of blood vessels. in *Biomechanics: Mechanical properties of living tissues* . 321-391 (Springler Verlag, New York, 1993).
636. Jacob, H.S. Vascular shear forces and atherogenesis: Roles of shear-provoked endothelial viral infection and heme iron accumulation. *Perspectives in Biology and Medicine* 38, 114-124 (1994).
637. Kraiss, L.W., Kirkman, T.R., Kohler, T.R., Zierler, B. & Clowes, A.W. Shear stress regulates smooth muscle proliferation and neointimal thickening in porous polytetrafluoroethylene grafts. *Arterioscler Thromb* 11, 1844-1852 (1991).
638. Dobrin, P.B. Mechanical factors associated with the development of intimal and medial thickening in vein grafts subjected to arterial pressure: A model of arteries exposed to hypertension. *Hypertension* 26, 38-43 (1995).
639. Thubrikar, M.J. & Robicsek, F. Pressure-induced arterial wall stress and atherosclerosis. *Ann Thorac Surg* 59, 1594-1603 (1995).

Annexe 1

8. Brevet: «Production of a Contractile Smooth Muscle»

Résumé

Une structure de cellules musculaires lisses contractiles et sa méthode de production est décrite. La structure de cellules musculaires lisses comprend (i) des cellules musculaires lisses cultivées *in vitro* dans des conditions permettant la formation d'un feuillet de cellules musculaires lisses et (ii) une matrice fibreuse endogène formée par les cellules musculaires lisses, où la structure de cellules musculaires lisses conserve la capacité de contracter en réponse à des agonistes vasoactifs. La structure de cellules musculaires lisses peut être produite sous forme tubulaire et peut être utilisée afin d'évaluer les réponses contractiles des cellules musculaires lisses à l'aide d'appareils classiques de pharmacologie vasculaire.

Abstract

A contractile smooth muscle cell construct and a method for preparing the smooth muscle cell construct are described. The smooth muscle cell construct is comprised of (i) smooth muscle cells that have been cultured *in vitro* under conditions to allow the formation of a sheet of smooth muscle cells and (ii) an endogenous fibrous matrix formed by the smooth muscle cells, wherein the smooth muscle cell construct retains the ability to contract in response to vasoactive agonists. The smooth muscle cell construct may be prepared in planar or tubular form and can be used to study or evaluate the contractile responses of smooth muscle cells.

INVENTORS: Nicolas L'Heureux, Lucie Germain and François A. Auger.

AFFILIATION: Laboratoire d'Angiogenèse Expérimentale/LOEX, Hôpital du Saint-Sacrement and Department of Surgery, Faculty of Medicine, Laval University

APPLICANT: Université Laval

Field of the invention

This invention is in the field of tissue engineering. In particular the invention relates to the production, *in vitro*, of a three-dimensional preparation of a smooth muscle cell construct which contracts as a whole tissue in response to physiological stimuli. This smooth muscle construct has numerous applications including pharmacological testing, organ modelling for research purposes and vascular prosthesis development.

Background of the invention

When vascular smooth muscle cells are cultured, *in vitro*, they lose their contractile response to vasocontractile substances. This phenotypic modulation greatly limits vascular medical research to animal and animal organ experimentation, especially in such fields as hypertension. While some indirect information can be obtained from non-contracting smooth muscle cell cultures, results of such experiments must be carefully interpreted. Furthermore, even though it is possible to obtain contractile smooth muscle cells *in vitro*, if they are freshly isolated (primoculture), this technique is limited by the number of cells obtainable and clinically available human tissue.

The various methods described, up until now, to evaluate contractile responses of smooth muscle cell cultures have three common and serious weaknesses, 1) the cells are on non-physiological substrata, 2) quantitative evaluation of contraction forces are not possible, and 3) quantitative assessment of contraction is made on a "single-cell-basis" (although numerous cells can be studied concurrently) and therefore, does not necessarily provide information on a "tissue basis" response. Recently, some two-dimensional sub-cultures of non-vascular animal smooth muscle cells have shown limited contractile

responses to appropriate stimulants. Nevertheless, human sub-cultured smooth muscle cell contraction in particular cells of vascular origin, has yet to be demonstrated.

Consequently there is a need to develop a smooth muscle cell construct that can be useful as an *in vitro* replica of smooth muscle responses *in vivo*.

Summary of the invention

The present invention provides a contractile smooth muscle cell construct comprised of (i) smooth muscle cells that have been cultured *in vitro* under conditions to allow the formation of a sheet of smooth muscle cells and (ii) an endogenous fibrous matrix formed by the smooth muscle cells, wherein the smooth muscle cell construct retains the ability to contract in response to vasoactive agonists. In one embodiment the smooth muscle cell construct may be prepared in tubular form. This smooth muscle cell construct is representative of the basic structure of a vascular media, the contractile element of a blood vessel, and shows contractile responses to normal vasocontractile agonists. Thus, this invention allows the quantitative investigation of isometric contractile forces generated by pure populations of cultured, or sub-cultured, human vascular smooth muscle cells, in a physiological environment and on a "tissue basis". This tissue equivalent, contracting as a whole, is an actively vasoresponsive structure similar to its physiological counterpart, the media.

The present invention also provides a method of producing a contractile smooth muscle cell construct said method comprising,

(a) culturing the smooth muscle cells in a culture vessel with a culture medium that enhances the synthesis of a fibrous matrix by the cells;

- b) maintaining the cells in culture until the cells adhere to the culture vessel, become confluent and form a cell sheet, and
- c) allowing the cell sheet to spontaneously detach or detaching the cell sheet from a culture vessel. The cell sheet can be detached using various means such as enzymatic or mechanical detachment.

The method can also include an additional step (d) wherein said cell sheet is rolled around a tubular support to produce a tubular cell construct.

Brief description of the drawings

Figure 60 A-E is a schematic diagram showing the preparation of a tubular living tissue construct according to the method of the present invention.

Figure 61 A is a dose-response curve showing the contraction of a living tissue construct in response to varying concentrations of serotonin.

Figure 61 B is a dose-response curve showing the contraction of a living tissue construct in response to varying concentrations of histamine.

Detailed description of the invention

It has been determined that cells of mesenchymal origin (such as smooth muscle cells and fibroblasts) will grow as a multilayer of cells intertwined in an extracellular matrix (e.g. collagen) synthesized by the cells themselves. When these cells are cultured in the presence of ascorbic acid, they

reach confluence faster and the proportion of the collagenous component of the above-mentioned cultures increases drastically. If these cells are maintained in culture several days past confluence, cells and matrix will detach as a whole from the cultures substratum, thus creating a sheet of living cells in a collagenous matrix of endogenous origin.

The spontaneous detachment of such living sheet is achieved by enhancing collagen (or other matrix protein) synthesis or assembly in the cell culture. Detachment may also be included by lowering the strength of the cell to substratum junction, for example by lowering substratum adhesiveness, by using proteolytic enzymes or by using mechanical force.

Once a sheet of living tissue is obtained, it can be rolled on the outer surface of a tubular support of varying diameter to give it a tubular form. If the sheet is held in place while rolled up for a few hours in suitable cell culture conditions, it will adhere to itself relatively firmly and will stay in its tubular form, around its support. The tubular tissue hence created may be kept in culture conditions for extended periods of time and submitted to various culture conditions to influence its ongoing development (ascorbic acid, serum, mitogens, etc.)

At the end of its maturation period, the tubular tissue can be slid off its tubular support to provide the basic scaffold for the construction of a more complex tissue culture system. For example, endothelial cells can be seeded on the inner surface of a tubular tissue made of smooth muscle cells, hence producing a basic blood vessel construct or prosthesis. Such a tubular tissue prosthesis can be useful in tissue transplantation as it can be made from the cells of the graft recipient, thus circumventing immunological rejection of the prosthesis. Furthermore, the tubular tissue can be rolled up in a similarly produced sheet to obtain a two layer tubular lining tissue construct. Cells which form the second layer can be of identical nature to the cells of the first layer to

obtain a thicker tissue, or of different origin (such as fibroblasts) to create a two cell type living organ equivalent in order, for example, to study cell-cell interactions.

To study smooth muscle cell contraction, the tubular tissue, made of smooth muscle cells, is slid off its tubular support and cut in annular sections of desired width. Alternatively, the annular sections may be cut before the tubular tissue is slid off the support. Such an annular section can be mounted on an isometric force transducer, whilst in an organ culture bath, and submitted to a basal tension. Stimulations can be carried on by injecting vasoactive substances in the bath and recording the contractile response through the transducer output. This technique is well established and this invention can be a substitute for animal blood vessels which are normally used as contractile tissue.

Example 1: Preparation of Contractile Smooth Muscle Cell Sheet

The following example describes one method for preparing a contractile tubular tissue made of smooth muscle cells according to the present invention. It is not intended to limit the scope of this invention to one particular shape, cell origin or age, time frame, component concentration or culture condition. One skilled in the art can readily appreciate that various modifications can be made to the method without departing from the scope and spirit of the invention.

Typically, 750,000 viable sub-cultured human smooth muscle cells (passages 3-7) are seeded in a standard 75 cm² culture dish for a final seeding density of 10⁴ cells/cm². Cells are fed with 20ml of culture medium (3:1 mixture of Dulbecco's Modification of Eagle's Medium and Ham's F12 Modified Medium, 10% Fetal Clone II from Hyclone, 100 U/ml of penicillin G and 25µg/ml of gentamicin). The culture medium is changed every day. A freshly prepared

solution of ascorbic acid is added every day to the culture medium at a final concentration of 100ug/ml. Cells are kept in a humidified atmosphere (92% air and 8% CO₂).

Under the above-mentioned culture conditions, the cells will adhere to the culture surface and proliferate until the entire culture surface is covered with cells (confluence). If culture conditions are maintained, the cells will grow as a multilayer of cells and endogenous fibrous material. If culture is prolonged for several additional days, this fibrous tissue will show signs of detachment from the culture substratum and will spontaneously completely detach itself, as a whole, from the substratum. Omitting the ascorbic acid may lead to a longer culture period before detachment and will not produce a cohesive single sheet but rather numerous irregular masses of agglomerated cells. The complete process of spontaneous tissue detachment is a swift and sudden process and can undergo completion in as little as 15 minutes. The resulting free-floating sheet of living tissue must be kept unfolded until the following stage of fabrication since it will readily and irreversibly agglutinate. It is also possible to induce the detachment of the forming sheet, for example in order to control the time of detachment. One possibility is to use a rubber policeman to detach the sheet from the culture surface when signs of detachment are apparent. However, this method must be very carefully performed as it can cause holes in the sheet.

Although this sheet can be used for numerous applications in its planar form, a tubular form will facilitate some other applications. In particular, the tubular form is valuable for experiments relating to vascular physiology and pharmacology. In order to give a cylindrical form to the sheet of tissue the inventors have designed a tubular support as shown schematically in figure 60. Referring to figure 60, Step 1, the tubular support (2) is equipped with a thread (4) which can be set longitudinally to the external surface of the tubular support. To ensure that the thread is closely laid to the surface of the tubular support, tension is provided by two elastic rings (3) positioned outside at both

ends of the tubular support. Typically, a polypropylene thread is secured under a silicone elastomer ring, by means of a stop notch (5), while the other end of the thread is slid under the silicone ring (3) at the other end of the tube.

To roll the living sheet, one edge of the sheet (1) is placed between the tubular support and the thread. The thread (4) is then pulled along the arrow (6) in order to squeeze (7) one edge of the sheet between the thread and the external surface of the tubular support as shown in figure 60, Step 1. A minimal amount of the sheet should cross over the thread although it is important that all the edges be secured as shown in figure 60, Step 2. While rolling the living sheet, limited force can be applied to the farther edge of the sheet in order to stretch it to various degrees as shown in figure 60, Step 3. If the sheet has been mechanically detached, it is useful to leave one of its extremities attached to the culture surface in order to provide such a stretching force upon the rolling of the living sheet. When the sheet is completely rolled up, the thread is slid off by pulling in the direction of the arrow as shown in figure 60, Step 4. The sheet is then secured with the thread to prevent unrolling of the sheet as shown in figure 60, Step 5. Thereafter, the tubular living tissue can be cultured for several weeks, with ascorbic acid, to allow further maturation of the tissue. The thread may be removed 1-2 days later.

The tubular support can be made of various materials. It is usually made of inert matter, such as styrene, to facilitate the removal of the tissue at the end of the maturation period. However, it can also be made of stainless steel, collagen, polytetrafluoroethylene or bioactive or biodegradable materials. It is preferable to use a tube made of a material which can be readily cleaned and sterilized. The outer diameter of the tube will establish the final diameter of the lumen of the tubular living tissue produced (2-8mm). The thread can be easily replaced following each use. Plastic type thread can also be used if it is cleaned after each use.

After 3 to 4 weeks in the above-mentioned culture conditions the tubular tissue, which is the equivalent of a vascular media, can be slid off its tubular support and cut into annular sections of 2 to 5 mM. these annular sections can be used to test the contraction of smooth muscles *in vitro*. The annular sections prepared according to the present invention have been tested with two physiological vasoactive substances, namely serotonin and histamine. Figure 61 A and 61 B show the contraction response of annular sections when stimulated with varying concentrations of serotonin (figure 61 A) and histamine (figure 61 B). In figure 61 A, the points (1), (2), (3), and (4) represent stimulation with 30 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml and 1000 ng/ml serotonin, respectively. In figure 61 B, the points (1), (2), and (3) represent stimulation with 10^{-5} M, 3×10^{-5} and 10^{-4} M histamine, respectively. These results are comparable to those obtained using human or animal blood vessel thus demonstrating that the tissue equivalents prepared according to the present invention are useful models of living tissues.

Those knowledgeable in the field of tissue and cell culture will be able to construct equivalent structures, with only the available material in a cell culture laboratory, which can be used for specific applications by simply replacing a particular component or technique by a similar component or technique which will produce the same general effect. Such equivalents are intended to be included in the scope of this invention.

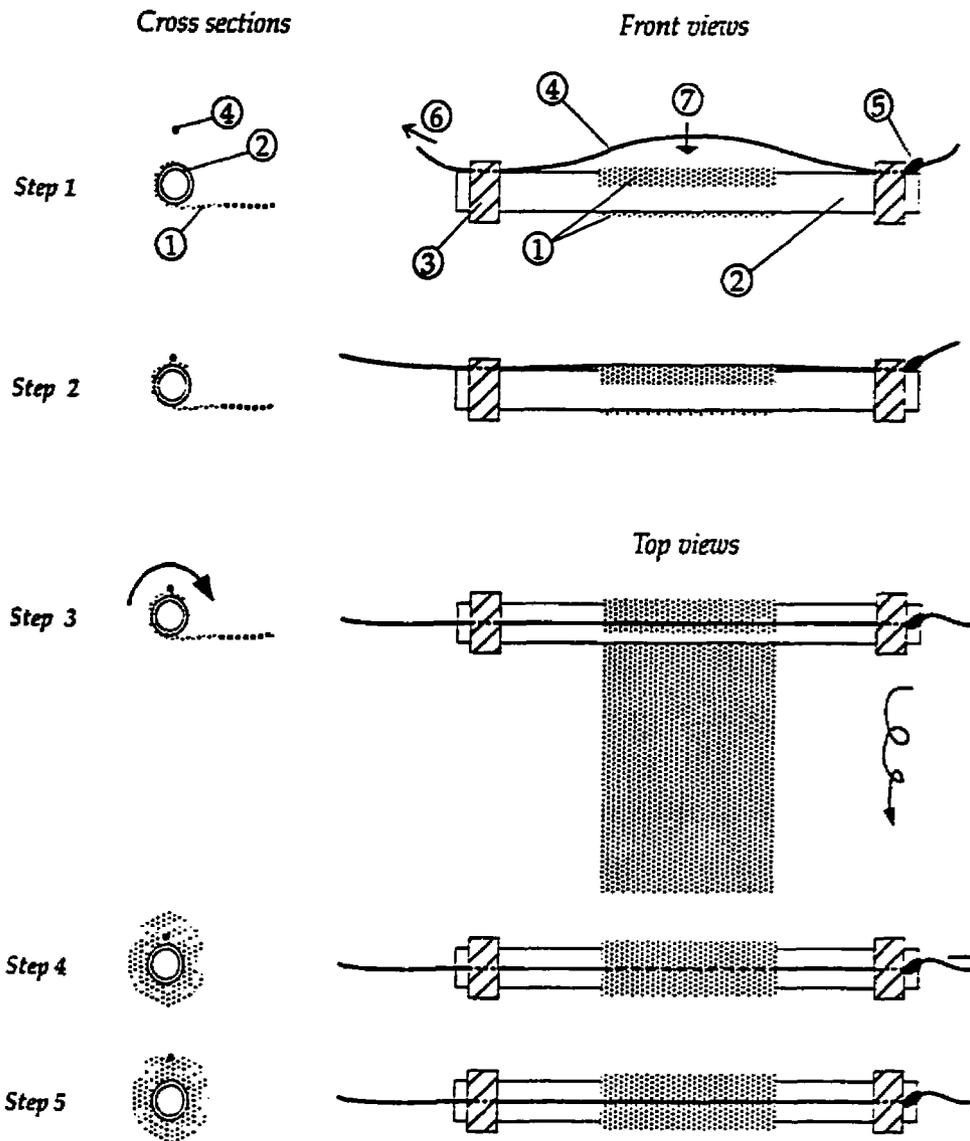


Figure 60: Production of a living tubular tissue. A living sheet is squeezed against the mandrel (7) by pulling on the thread (6) and completely rolled (step 1-3). The thread is used to keep the rolled sheet in place for the first days of maturation (step 4-5). 1= Living sheet, 2= inert tubular mandrel, 3= silicone rings, 4= surgical thread with 5= knot.

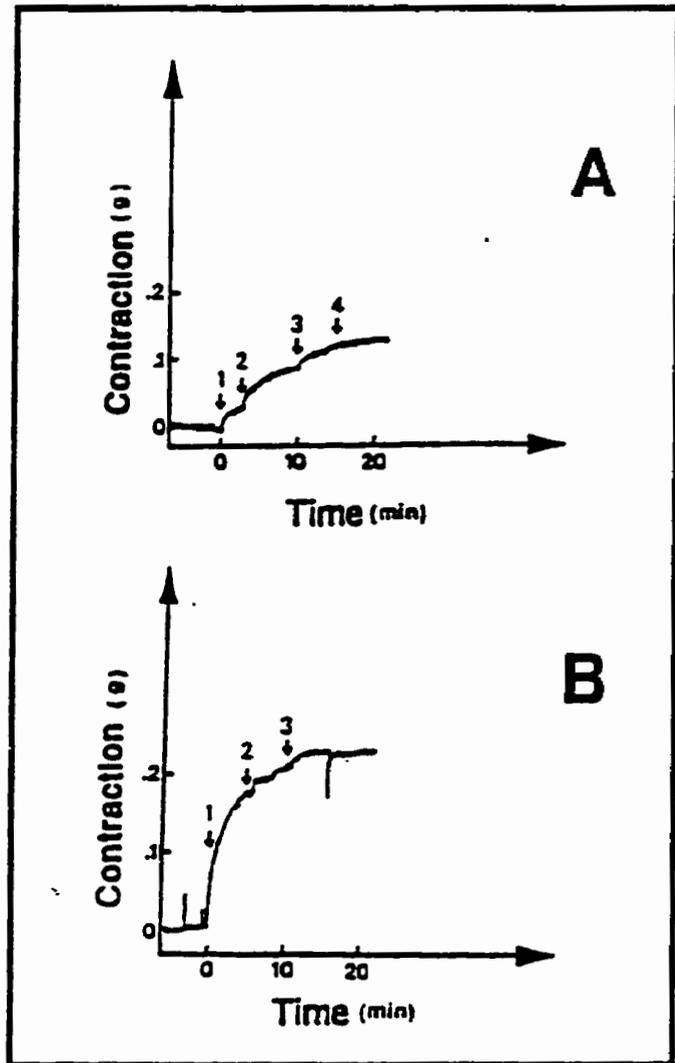


Figure 61: Graded contractile response of tissue engineered smooth muscle to vasoactive compounds. (A) Contractile response to increasing concentrations of serotonin: 1) 3×10^{-8} M, 2) 1×10^{-7} M, 3) 3×10^{-7} M and 4) 1×10^{-6} M. (B) Contractile response to increasing concentrations of histamine: 1) 10^{-5} M, 2) 3×10^{-5} M and 4) 10^{-4} M.

Claims

What we claim as our invention is:

1. A contractile smooth muscle cell construct comprising:

(i) sub-cultured human smooth muscle cells that have been cultured *in vitro* under conditions to allow the formation of a sheet of smooth muscle cells; and

(ii) an endogenous fibrous matrix formed by the smooth muscle cells; wherein the smooth muscle cell construct retains the ability to contract in response to vasoactive agonists.

2. A contractile smooth muscle cell sheet according to claim 1 wherein said smooth muscle cell construct is in tubular form.

3. A method of producing a contractile smooth muscle cell construct of claim 1 which comprises:

(a) culturing sub-cultured smooth muscle cells in a culture vessel with a culture medium that enhance the synthesis of a fibrous matrix by the cells;

(b) maintaining the cells in culture until the cells adhere to the culture vessel, become confluent and the cell and the matrix form a sheet; and

(c) allowing the cell sheet to spontaneously detach or detaching the cell sheet from the culture vessel.

4. The method according to claim 3 further comprising rolling said cell sheet around a tubular support to produce a tubular living tissue construct.

5. The method according to claim 3, wherein said culture medium includes ascorbic acid.

6. The method according to claim 4, further comprising, removing the tubular living tissue construct from the support and maintaining said tubular living tissue construct in culture.

7. A method of producing a multilayered tubular living tissue construct said method comprising;

- a) creating a tubular living tissue construct according to claim 4,
- b) rolling a second cell sheet around said tubular living tissue construct.

8. The method according to claim 7 wherein said second sheet comprises fibroblasts.

9. The method according to claim 4 further comprising seeding endothelial cells on the inner surface of said tubular living tissue construct.

10. A contractile smooth muscle cell construct prepared according to the method of claim 3.

11. The smooth muscle cell construct according to claim 10 wherein said smooth muscle cell construct contracts in response to a vasoactive substance.

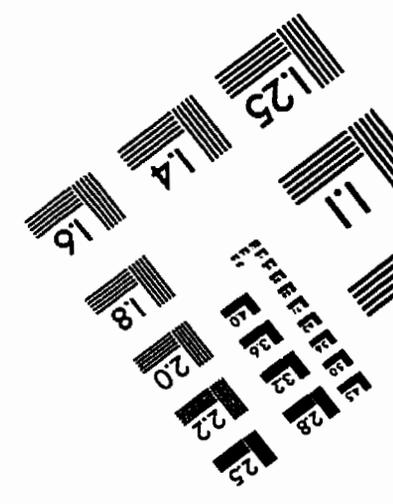
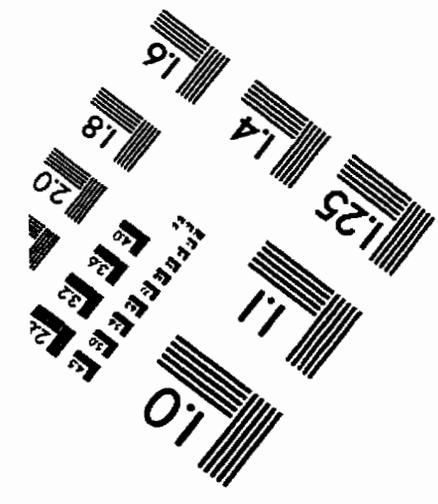
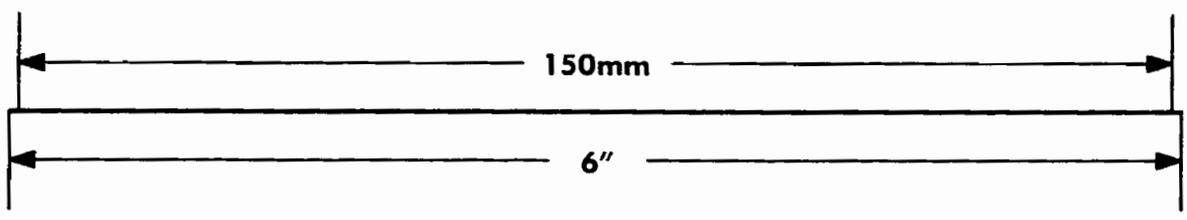
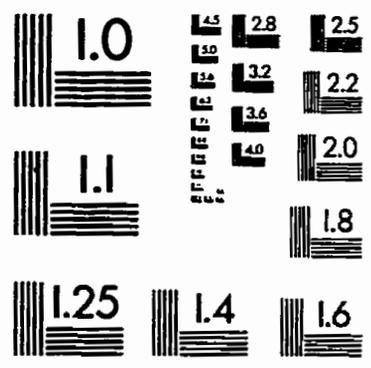
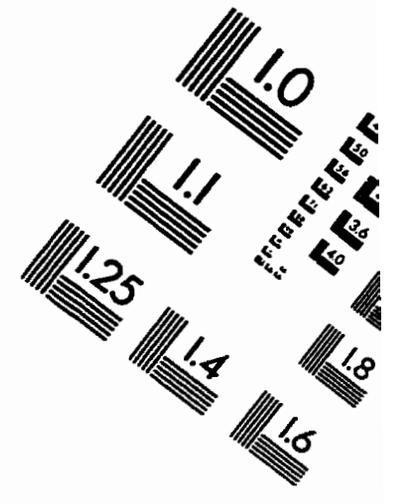
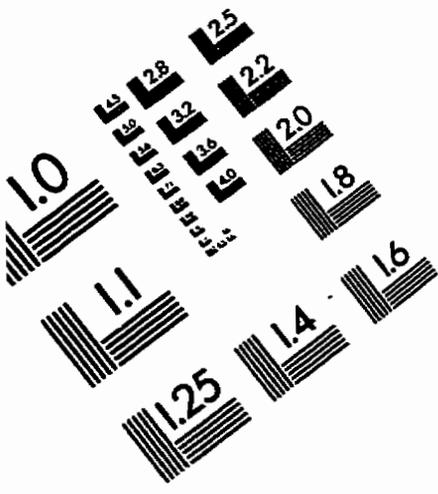
12. The smooth muscle cell construct according to claim 11 wherein said vasoactive substance is serotonin or histamine.

13. A tubular living tissue construct prepared according to the method of claim 4.

14. The tubular living tissue construct according to claim 13 wherein said construction contracts in response to a vasoactive substance.

15. The tubular living tissue construct according to claim 14 wherein the vasoactive substance is serotonin or histamine.

IMAGE EVALUATION TEST TARGET (QA-3)



APPLIED IMAGE, Inc
 1653 East Main Street
 Rochester, NY 14609 USA
 Phone: 716/482-0300
 Fax: 716/288-5989

© 1993, Applied Image, Inc., All Rights Reserved