

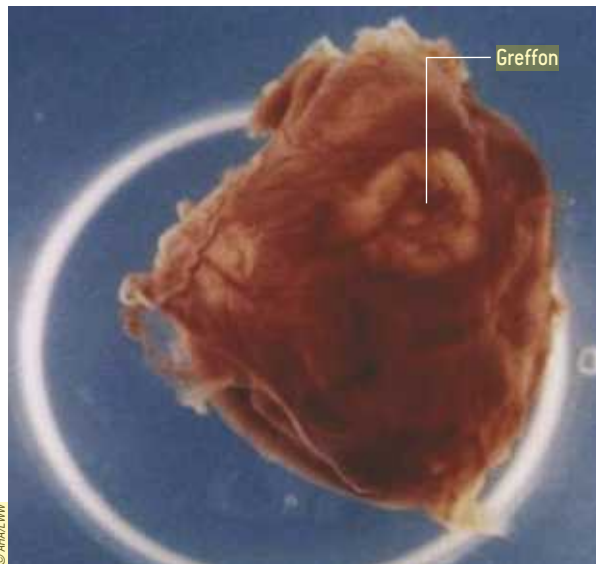
Le collagène lui-même, ainsi que d'autres protéines de la matrice extracellulaire, telle la fibronectine, ont également été testés en tant que support. Bien que ces protéines contiennent des acides aminés auxquels des cellules vivantes adhèrent, elles n'ont pas une résistance mécanique suffisante pour supporter un grand nombre de cellules, et, qui plus est, le collagène est rapidement consommé par les enzymes de l'organisme. En outre, certaines protéines peuvent être rejetées par le système immunitaire, ce qui ne ferait qu'accroître les risques encourus par le patient.

Nous avons donc décidé de fabriquer une armature faite avec un alginat, un polysaccharide dérivé d'algues. Il est biocompatible, c'est-à-dire qu'il n'est pas rejeté par le système immunitaire. Et, quand certains alginates sont dissous dans l'eau, puis exposés à des ions calcium chargés positivement, ils se comportent comme un hydrogel contenant 98 pour cent d'eau : leur consistance est gélatineuse et ils ont des propriétés élastiques semblables à celles d'une matrice extracellulaire naturelle.

Cependant, pour utiliser cet hydrogel d'alginat comme support, il nous fallait lui donner une forme et une structure interne, tout en renforçant sa résistance mécanique pour qu'il puisse conserver sa forme malgré le poids des cellules qui le coloniseraient. Pour ce faire, nous avons versé la solution d'alginat dans une série de moules, puis nous les avons refroidis selon trois méthodes produisant des gradients de température distincts durant la congélation. Des cristaux de glace séparés par de minces parois d'alginat se sont formés dans tous les échantillons. Après avoir éliminé ces cristaux par sublimation, il nous restait une armature ressemblant à une éponge dont les minuscules pores reflétaient la forme des cristaux. En agissant sur les paramètres de la congélation, nous changions la densité des pores, leur taille et leur direction, ainsi que la densité des connexions (voir l'encadré pages 80 et 81).

Les pores doivent être interconnectés, car cela permet aux cellulesensemencées de pénétrer dans l'armature. Il faut aussi que les nutriments puissent atteindre les cellules et que leurs déchets soient éliminés. Le degré d'interconnexion des pores influe aussi sur la revascularisation du tissu transplanté. Enfin, l'architecture d'une telle armature, qui ressemble à une mousse ou à une ruche, contribue à sa résistance mécanique. Bien qu'elles soient surtout constituées de vide (elles contiennent 95 pour cent de pores), ces structures sont très résistantes. Ainsi, nous disposons d'une armature ayant la structure souhaitée, n'activant pas le système immunitaire, non toxique, ayant une bonne stabilité mécanique à long terme, et se désagrégeant dans l'organisme en un temps raisonnable. Encore fallait-il vérifier que des cellules vivantes colonisaient ce support.

Avant d'implanter ces armatures dans des animaux de laboratoire, nous avons observé le comportement des cellules cardiaques sur de l'alginat *in vitro*. Nous avons prélevé des cellules de cœurs d'embryons de rats – qui, contrairement à des cardiomyocytes matures, se divisent – et nous les avons mises en suspension dans un milieu liquide contenant des nutriments. Nous avons ensuite placé dans ce milieu de culture des armatures rondes de six millimètres de diamètre et de un millimètre d'épaisseur. L'ensemble a été soumis à une force centrifuge modérée ; nous avons



Deux mois après son implantation sur un cœur de rat, un supportensemencé avec des cellules s'est intégré dans une zone d'infarctus. Des vaisseaux sanguins locaux ont pénétré dans le greffon, alimentant les cellules cardiaques matures à l'intérieur de l'implant et empêchant ainsi l'extension de l'infarctus.

constaté que les cellules se répartissent dans les pores des armatures en moins de 30 minutes. La rapidité est un avantage précieux pour préserver la viabilité de ces cellules sensibles au manque d'oxygène. Par conséquent, nous avons pu placer une densité élevée de cellules sur nos supports (10^8 cellules par centimètre cube, densité comparable à celle du muscle cardiaque mature).

Reconstruire un fragment de cœur

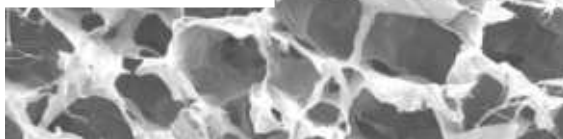
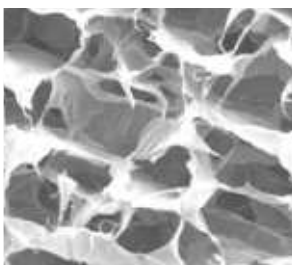
Nous avons transféré nos supportsensemencés dans un bioréacteur, qui maintient des conditions de culture idéales tout en assurant une circulation continue du milieu contenant les nutriments. Au bout de 24 heures, nous avons détecté des myocytes en train de battre. Au bout de sept jours, nous avons transplanté ces édifices dans des cœurs vivants. Nous avons anesthésié des rats adultes qui avaient eu un infarctus du myocarde sept jours auparavant. La cicatrice était bien visible, et nous avons placé les supportsensemencés sur l'infarctus, refermé l'incision, et attendu. Deux mois plus tard, nous avons ouvert pour observer le cœur, et nous avons constaté que de nombreux vaisseaux sanguins issus du tissu cardiaque sain irriguaient le greffon (voir la figure ci-dessus). Les implants s'étaient bien intégrés à la cicatrice, et les supports d'alginat avaient commencé à se dissoudre, une matrice extracellulaire naturelle prenant leur place. Les cellules cardiaques embryonnaires s'étaient développées en fibres musculaires matures, et quelques-unes étaient même organisées en structures parallèles comme dans un tissu cardiaque en développement. Les connexions mécaniques et les synapses électriques indispensables pour que les cellules cardiaques se contractent et conduisent les signaux nerveux étaient également présentes entre les fibres.

La conception du support

Support en alginate



Structure en éponge



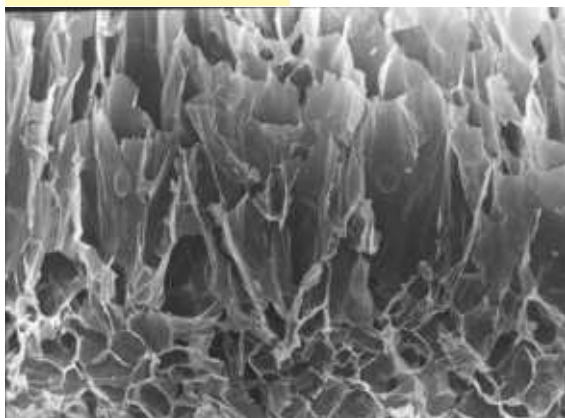
R. Bashir et S. Cohen; Ben-Gurion Univ.

Les cellules ont besoin d'un support qui les guide pour s'organiser en un tissu. La structure idéale contient des pores interconnectés, dont le diamètre est supérieur à 200 micromètres (la taille moyenne d'un capillaire), ce qui permet à des vaisseaux sanguins de s'infiltrer.

Nous avons choisi l'alginate, un dérivé d'algues, en raison de sa ressemblance avec la matrice extracellulaire naturelle. Il nous fallait cependant trouver un moyen de transformer une solution visqueuse d'alginate et d'eau en une armature solide dont la forme (*ci-contre à gauche*) et l'architecture interne (*ci-contre à droite*) seraient contrôlables avec précision.

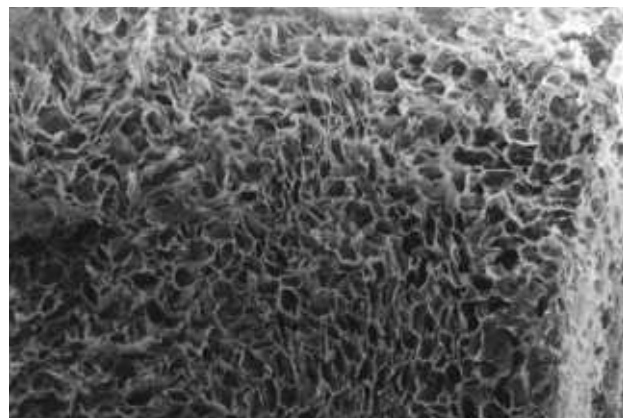
La congélation de l'hydrogel a permis d'obtenir une architecture en éponge, les cristaux de glace étant séparés par de minces parois solides d'alginate. La sublimation des cristaux libère des pores de formes, de taille et d'orientation variées reflétant la vitesse et la direction de la croissance des cristaux lors du refroidissement.

RÉGIMES DE CONGÉLATION



Elsavler et S. Zmora et S. Cohen; Ben-Gurion Univ.

Dans un bain d'huile à -35°C , de la glace s'est formée très rapidement, produisant de minuscules pores interconnectés et denses sur le fond. Des pores allongés et plus grands, au-dessus, suivent la direction du front de refroidissement.



Dans de l'azote liquide à -196°C , un gradient similaire apparaît. La forme complexe des pores dans la partie supérieure de l'échantillon résulterait de la grande volatilité de l'azote, qui produit des fronts de refroidissement pluridirectionnels là où le gaz rencontre la solution d'alginate.

Avant d'effectuer les transplantations, nous avons mesuré par échographie la fonction cardiaque des rats, en faisant de même pour un groupe de rats de contrôle ayant eu un infarctus, et ayant subi une ouverture du thorax, mais pas de transplantation. Deux mois plus tard, nous avons à nouveau examiné tous les rats par échographie cardiaque. Dans le groupe contrôle, nous avons observé le scénario habituel de dégradation du cœur: dilatation du ventricule gauche et diminution notable de la fonction cardiaque. Au contraire, chez les rats transplantés, la taille du ventricule gauche, l'épaisseur de sa paroi et la fonction cardiaque étaient stables.

Ainsi, nous avons prévenu toute nouvelle détérioration pouvant aboutir à une insuffisance cardiaque. Pour autant, on ignore encore le mécanisme grâce auquel ce traitement a protégé le muscle cardiaque, car le tissu greffé ne contribuait pas encore aux contractions du cœur. Il semble qu'en empêchant la croissance de l'infarctus et en épaississant artificiellement la paroi du cœur dans la zone de l'infarctus, le greffon ait évité le remodelage habituel du ventricule.

Nous pensons que la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins dans la zone de l'infarctus a également contri-

bué à ralentir la détérioration du tissu. Le nombre et la taille des nouveaux vaisseaux sanguins ont augmenté quand nous avons implanté des supports peuplés de cellules, mais nous avons constaté que même des supports dépourvus de cellules stimulent la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins dans un infarctus.

L'armature d'alginate stimule peut-être la croissance des vaisseaux sanguins simplement parce qu'elle leur fournit un support lorsqu'ils pénètrent dans la zone endommagée. Le matériau lui-même doit attirer des cellules souches qui stimulent la régénération, car la structure moléculaire de l'alginate ressemble à celle d'un des principaux polysaccharides de la matrice extracellulaire naturelle. Pour tester cette hypothèse, nous avons récemment injecté un hydrogel d'alginate directement dans des infarctus de rats. Même sous cette forme, l'alginate a préservé la structure et la fonction du ventricule, en agissant, semble-t-il, comme un substitut de la matrice extracellulaire et en stimulant l'angiogenèse.

Nous nous efforçons d'identifier les sources potentielles de cellules cardiaques qui seraient utilisables dans des transplantations humaines. Les cellules cardiaques matures d'un