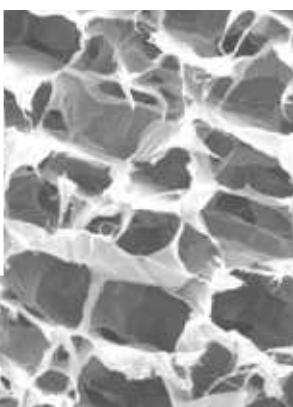


La conception du support

Support en alginate



Structure en éponge



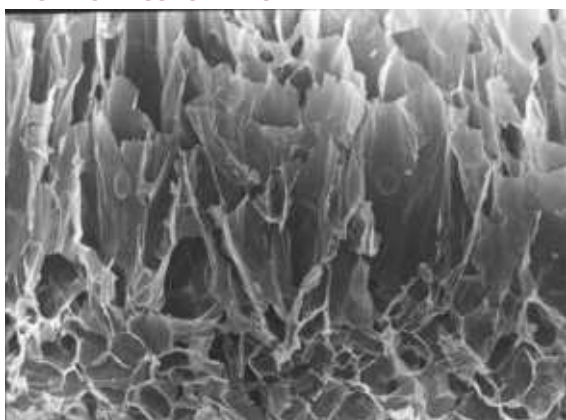
R. Bashir et S. Cohen; Ben-Gurion Univ.

Les cellules ont besoin d'un support qui les guide pour s'organiser en 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.

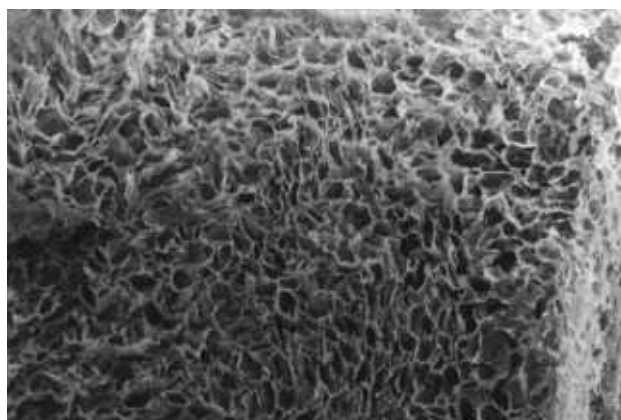
La congélation de l'hydrogel a permis d'obtenir une architecture en éponge, les cristaux de glace étant séparés par de minces parois solides d'alginate. La sublimation des cristaux libère des pores de formes, de taille et d'orientation variées reflétant la vitesse et la direction de la croissance des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

RÉGIMES DE CONGÉLATION



Elsavir 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.

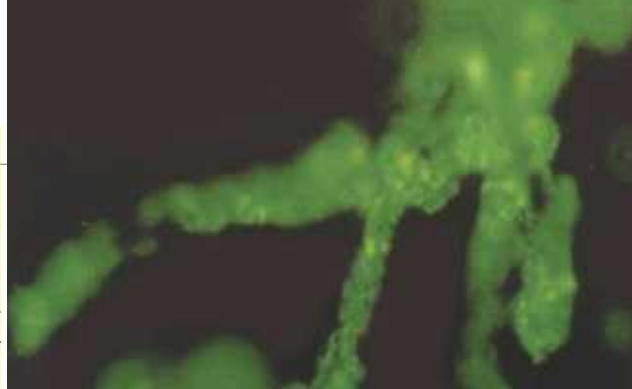
Ainsi, nous avons prévenu toute nouvelle détérioration pouvant aboutir à une insuffisance cardiaque. Pour autant, on ignore encore le mécanisme grâce auquel ce traitement a protégé le muscle cardiaque, car le tissu greffé ne contribuait pas encore aux contractions du cœur. Il semble qu'en empêchant la 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.

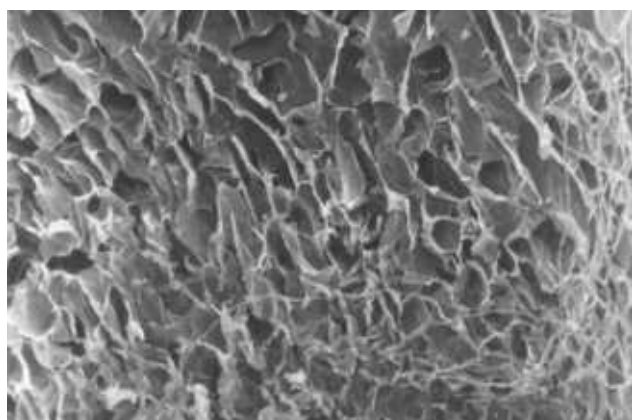
L'armature d'alginate stimule peut-être la croissance des vaisseaux sanguins simplement parce qu'elle leur fournit un support lorsqu'ils pénètrent dans la zone endommagée. Le matériau lui-même doit attirer des cellules souches qui stimulent la régénération, car la structure moléculaire de l'alginate 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



ARCHITECTURE DES PORES

Notre aptitude à contrôler l'architecture des supports avec les techniques de congélation est précieuse parce que la structure des pores a une influence notable sur la fonction du tissu en formation. Des pores allongés, par exemple, favorisent la formation de vaisseaux sanguins. Nous avons utilisé de l'azote liquide pour créer des supports contenant de longs canaux, puis nous les avons ensemencés avec des cellules endothéliales marquées par une substance fluorescente : nous avons constaté que les cellules se sont arrangées en structures qui ressemblaient à des capillaires.



Dans un congélateur à -20°C , la solution d'alginate est d'abord refroidie jusqu'à -10°C , réchauffée jusqu'à -2°C , et refroidie lentement jusqu'à -20°C . L'eau cristallise au même moment dans tout l'échantillon, de sorte que les pores sont répartis uniformément et interconnectés.

patient ne se répliquent pas, et ne peuvent servir pour la réparation des infarctus. Les cellules de donneurs éventuels qui pourraient devenir des cardiomyocytes comprennent les cellules souches embryonnaires et les cellules souches adultes issues de la moelle osseuse ou du sang du cordon ombilical. Toutes ces cellules de donneur seraient reconnues comme étrangères par le système immunitaire du patient, ce qui nécessiterait l'utilisation de médicaments immunosuppresseurs. Des cellules autologues – provenant du patient lui-même – seraient préférables pour éviter cette difficulté. Ce pourrait être des cellules souches et des cellules précurseurs dérivées de la moelle osseuse, des muscles ou de la graisse, ou bien des cellules souches embryonnaires produites à partir des cellules du patient par clonage thérapeutique. Ou encore des cellules souches cardiaques, mais on ne les a pas encore identifiées.

Nos résultats suggèrent plusieurs approches possibles pour l'application des supports d'alginate à la protection et à la régénération de cœurs humains endommagés par un infarctus du myocarde. Nous sommes persuadés, par exemple, que d'ici trois ans nous serons prêts à tester des

supports d'alginate non ensemencés chez des patients ayant eu un infarctus du myocarde. Nos récentes expériences sur des porcs ont confirmé ce que nous avons observé chez des rats : même sans cellules, un support d'alginate semble prévenir l'expansion d'un infarctus et empêcher le remodelage de la paroi du ventricule.

Cette aptitude de l'alginate à favoriser l'angiogenèse suggère que nous pourrions améliorer la survie de cellules transplantées en implantant d'abord une armature, en attendant la vascularisation, puis en ensemencant l'armature avec des cellules. Nous avons testé la méthode chez des rats, avec des résultats prometteurs. La vascularisation s'est également trouvée notablement renforcée lorsque nous avons incorporé dans l'armature des microsphères qui libéraient des facteurs de croissance de façon contrôlée. Malheureusement, la prévascularisation de l'armature réduit l'espace disponible pour les cellules transplantées, et nous cherchons comment ajuster l'angiogenèse en utilisant différents types de facteurs de croissance.

Aujourd'hui, on sait contrôler *in vitro* la forme, la composition et la fonction du tissu cardiaque. Pour les patients qui ont eu un infarctus du myocarde, il faudrait remplacer un morceau du cœur, et l'implantation d'un support poreux vide ne suffirait pas. Nous sommes par conséquent confrontés au problème de maintenir vivant un tissu transplanté jusqu'à ce que la vascularisation locale soit restaurée. Nous cherchons aujourd'hui à fabriquer un greffon prévascularisé.

Nous avons créé un lit capillaire *in vitro* en ensemencant un support en alginate avec des cellules endothéliales, qui tapissent normalement les parois des vaisseaux sanguins, puis nous avons mis cette structure en culture dans un bioréacteur. Dans l'étape suivante, nous cultiverons ensemble, sur une armature, des cellules endothéliales et des cardiomyocytes, pour essayer de faire pousser des capillaires à l'intérieur même d'un fragment de myocarde. Même si nous réussissons, nous devons vérifier que ce lit capillaire devient fonctionnel après transplantation et à quel rythme. Si les connexions avec les vaisseaux locaux s'établissent rapidement, alors les chances de survie du tissu transplanté seraient excellentes.

De nombreux chercheurs tentent de créer un tissu prévascularisé en utilisant des stratégies variées. La mise en commun des résultats obtenus fera forcément progresser ce domaine en pleine effervescence qu'est l'ingénierie du tissu cardiaque. Cela prendra une décennie, voire deux, mais la fabrication d'un morceau de cœur humain vivant n'est plus aujourd'hui une utopie.

Smadar COHEN est professeur de biotechnologie à l'Université Ben-Gurion de Beer-Sheva, en Israël. **Jonathan LEOR** dirige l'Institut Neufeld de recherches cardiaques de l'Université de Tel-Aviv.

E. LAVIK et R. LANGER, *Tissue Engineering: Current State and Perspectives*, in *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 65, n° 1, pp. 1-9, juillet 2004.

J. LEOR et S. COHEN, *Myocardial Tissue Engineering: Creating a Muscle Patch for a Wounded Heart*, in *Annals of New York Academy of Sciences*, vol. 1015, pp. 312-319, mai 2004.

Le cœur, Dossier Pour la Science, n° 40, juillet/septembre 2003.