

L'ANGIOGENÈSE, ÉTAPE CLÉ DE LA RÉGÉNÉRATION TISSULAIRE, EST MODULÉE PAR LES PLAQUETTES.



Sarah BERNDT PhD¹, Gilles CARPENTIER²,
Axel TOLLANCE PhD^{1,3}, Antoine TURZI¹

¹ Regen Lab SA, 1052 Le Mont-sur-Lausanne, Switzerland.

² Gly-CRRET Research Unit 4397, Université Paris-Est Créteil, Créteil, France.

³ Department of Orthopedic Surgery, Geneva University Hospitals & Faculty of Medicine, Geneva, Switzerland

Résumé

L'angiogenèse *in vivo* et *in vitro*, dans les processus physiologiques et pathologiques, est un processus multifactoriel. Elle implique une pléthore de molécules de signalisation et de voies, des cellules en dialogue dynamique et d'innombrables cytokines et facteurs de croissance pour générer un système vasculaire fonctionnel et stable. Cette vascularisation, cependant, est l'un des prérequis de la régénération tissulaire car elle assure un apport continu de nutriments et d'oxygène. Ces considérations ont trouvé leur entrée dans l'ingénierie tissulaire moderne lorsque l'importance vitale d'un réseau vasculaire a été de plus en plus étudiée.

L'avenir des approches régénératives combinera inévitablement les stratégies éprouvées sur le terrain de l'ingénierie tissulaire avec les techniques biomoléculaires modernes dans l'environnement scientifique des cellules souches et de la thérapie génique.

L'équilibre fragile entre les propriétés mécaniques, le support tissulaire et la stimulation angiogénique sera l'objet de recherches en médecine régénérative pour les années à venir.

Dans ce travail, nous avons mis l'accent sur le potentiel d'utilisation de préparations dérivées de plaquettes (plasma riche en plaquettes (PRP), PRP combiné à l'acide hyaluronique (PRP-HA) et lysats de plaquettes (PL)) pour une angiostimulation contrôlée.

Mots-clés: angiogenèse, plaquettes, régénération.

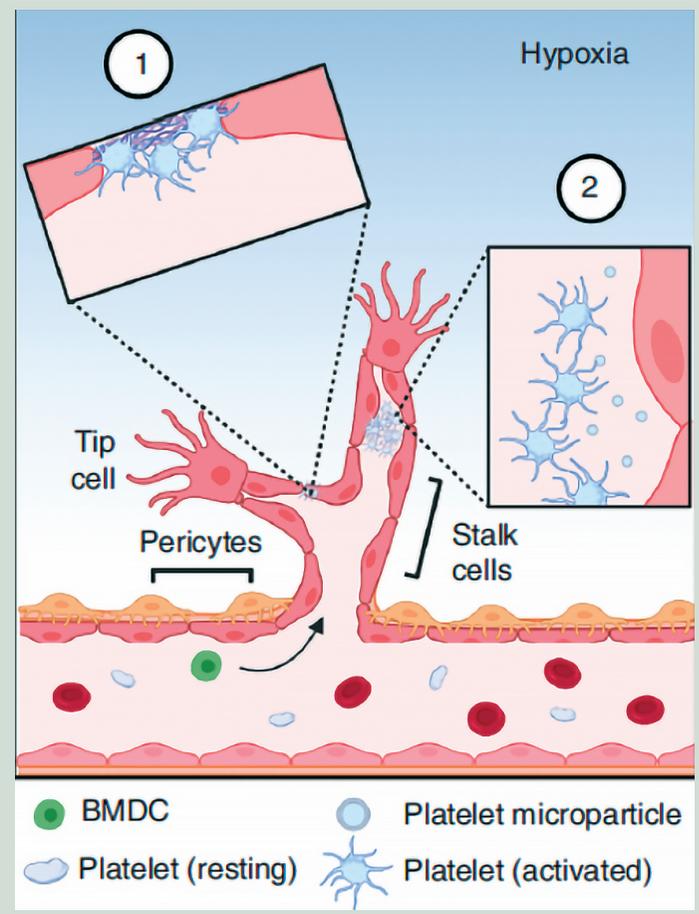
INTRODUCTION: L'ANGIOGENÈSE, ÉTAPE CLÉ DE LA RÉGÉNÉRATION TISSULAIRE

L'**angiogenèse**, processus par lequel de nouveaux vaisseaux sanguins se forment à partir des vaisseaux existants, joue un rôle crucial dans la régénération tissulaire. En effet, lorsqu'un tissu est endommagé ou lorsqu'il a besoin de croître, une vascularisation adéquate est essentielle pour fournir les nutriments, l'oxygène et les facteurs de croissance nécessaires à la réparation ou à la croissance tissulaire [1].

Dans le contexte de la régénération tissulaire, l'angiogenèse peut être stimulée de différentes manières, notamment par l'utilisation de facteurs de croissance, de thérapies cellulaires ou de matériaux biomimétiques. En favorisant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, on améliore la vascularisation du tissu endommagé, ce qui accélère le processus de guérison et favorise une régénération tissulaire plus complète [2].

Comprendre et manipuler l'angiogenèse dans le cadre de la régénération tissulaire ouvre ainsi la voie à de nombreuses applications médicales prometteuses, notamment dans le traitement des blessures

Figure 1. Mécanismes de régulation de l'angiogenèse par les plaquettes. Dans l'angiogenèse bourgeonnante (AB), la privation de nutriments, l'hypoxie et les facteurs pro angiogéniques incitent à l'activation des cellules endothéliales (EC) et à la croissance vasculaire, où les cellules de pointe guident les cellules souches hautement prolifératives. Les plaquettes circulantes peuvent contribuer à l'AB en (1) préservant l'intégrité vasculaire en se liant soit à la matrice extracellulaire (ECM) exposée, soit aux ECs. Les plaquettes activées peuvent également (2) libérer des molécules angiogéniques et des microparticules plaquettaires (PMPs) à proximité des ECs (adapté de Roweth et Battinelli, 2024 [5]).



graves, des maladies vasculaires et de la dégénérescence tissulaire [3]. En optimisant ce processus biologique complexe, nous sommes en mesure d'améliorer significativement les résultats cliniques et de promouvoir la santé et le bien-être des patients.

En ce qui concerne l'angiogenèse, les plaquettes jouent un rôle crucial en libérant divers facteurs de croissance et cytokines qui favorisent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir des vaisseaux existants.

Ces facteurs de croissance comprennent notamment le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), le facteur de croissance des fibroblastes (FGF), le facteur de croissance plaquettaire (PDGF) et d'autres molécules pro-angiogéniques [4].

Lorsqu'une lésion tissulaire se produit, les plaquettes sont activées et recrutées sur le site de la blessure. Elles libèrent alors ces facteurs de croissance, ce qui stimule la prolifération et la migration des cellules endothéliales, favorisant ainsi la formation de nouveaux vaisseaux sanguins pour assurer la réparation tissulaire et la guérison. En outre, les plaquettes peuvent interagir avec d'autres cellules impliquées dans l'angiogenèse, telles que les cellules endothéliales et les cellules immunitaires, pour réguler le processus de manière coordonnée.

Comprendre le rôle des plaquettes dans l'angiogenèse est crucial pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à moduler ce processus dans divers contextes pathologiques, tels que les maladies cardiovasculaires, le cancer et la régénération tissulaire.

Des recherches approfondies sont en cours pour élucider les mécanismes sous-jacents et exploiter le potentiel thérapeutique des produits dérivés des plaquettes dans la modulation de l'angiogenèse [5].

LES MODÈLES DE CULTURE 3D *IN VITRO* SONT DES OUTILS PRÉCIEUX POUR ÉTUDIER L'ANGIOGÈNESE, CAR ILS PERMETTENT DE RECRÉER DE MANIÈRE PLUS FIDÈLE L'ENVIRONNEMENT TRIDIMENSIONNEL TROUVÉ DANS LE CORPS HUMAIN [6]

Voici les principaux avantages de ces modèles pour l'étude de l'angiogénèse :

Représentation réaliste de l'environnement cellulaire

Les cultures 3D permettent aux cellules de se développer dans un environnement tridimensionnel plus proche de celui qu'elles rencontrent *in vivo*, du fait des différents types cellulaires en présence et de leur interaction avec la matrice environnante. Cela favorise une interaction cellule-cellule et cellule-matrice plus physiologique et une expression génique plus fidèle, ce qui peut conduire à des résultats plus pertinents.

Contrôle précis des conditions expérimentales

Les modèles 3D offrent la possibilité de contrôler plus précisément les conditions expérimentales, telles que la composition du milieu de culture, la concentration en facteurs de croissance et la rigidité du substrat. Cela permet aux chercheurs de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de l'angiogénèse et d'identifier les facteurs qui la régulent.

	Culture cellulaire 2D	Culture Cellulaire 3D
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> Facilité de manipulation et d'imagerie. Coût souvent moins élevé. Plus grande disponibilité de lignées cellulaires. Plus adapté à certains types d'analyses cellulaires, comme la prolifération cellulaire ou les essais de cytotoxicité. 	<ul style="list-style-type: none"> Reproduction plus fidèle de l'architecture tissulaire <i>in vivo</i>. Meilleure représentation des interactions cellulaires et de la morphologie cellulaire. Permet d'étudier des phénomènes biologiques complexes, tels que l'angiogénèse ou la métastase. Peut fournir des résultats plus prédictifs pour l'évaluation de médicaments ou de thérapies.
Désavantages	<ul style="list-style-type: none"> Incapacité à reproduire fidèlement l'environnement tridimensionnel du tissu <i>in vivo</i>. Limitations dans la représentation de l'interaction cellulaire et de la morphologie cellulaire réelle. Moins représentatif des phénomènes physiologiques <i>in vivo</i>. Peut conduire à des résultats moins prédictifs pour l'efficacité des médicaments ou des thérapies. 	<ul style="list-style-type: none"> Complexité accrue dans la manipulation et l'imagerie. Coût potentiellement plus élevé. Moins de disponibilité de lignées cellulaires adaptées aux modèles en trois dimensions. Risque accru de non-standardisation et de reproductibilité des résultats. Chronophage

Figure 2. Avantages et Inconvénients des modèles cellulaires en 2D par rapport aux modèles en 3D.

Étude de la dynamique temporelle

Les modèles 3D permettent de suivre l'évolution de l'angiogenèse au fil du temps, ce qui est crucial pour comprendre les différentes étapes du processus, telles que la formation des vaisseaux sanguins, leur maturation et leur remodelage. Cela permet également d'étudier comment les différents types de cellules interagissent et coordonnent leurs activités au cours de l'angiogenèse.

Test de médicaments et de thérapies

Les cultures 3D *in vitro* peuvent être utilisées pour évaluer l'efficacité de médicaments et de thérapies ciblant l'angiogenèse, comme les inhibiteurs de l'angiogenèse utilisés dans le traitement du cancer ou les agents pro-angiogéniques utilisés pour favoriser la régénération tissulaire. Ces modèles permettent de réaliser des tests précliniques plus rapides et plus économiques tout en réduisant le recours à des modèles animaux.

En résumé, les modèles de culture 3D *in vitro* offrent un moyen puissant et flexible d'étudier l'angiogenèse dans un contexte physiologiquement pertinent, ce qui peut contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes biologiques sous-jacents et à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour traiter un large éventail de maladies et de troubles.

LE MODÈLE DES BILLES D'ANGIOGENÈSE EN FIBRINE (FBA) EST UNE TECHNIQUE D'ANGIOGENÈSE 3D *IN VITRO*

(Figure 3) [7]

Dans ce modèle, des billes ou des microsphères en polymère sont revêtues de cellules endothéliales, qui sont les cellules qui tapissent les vaisseaux sanguins.

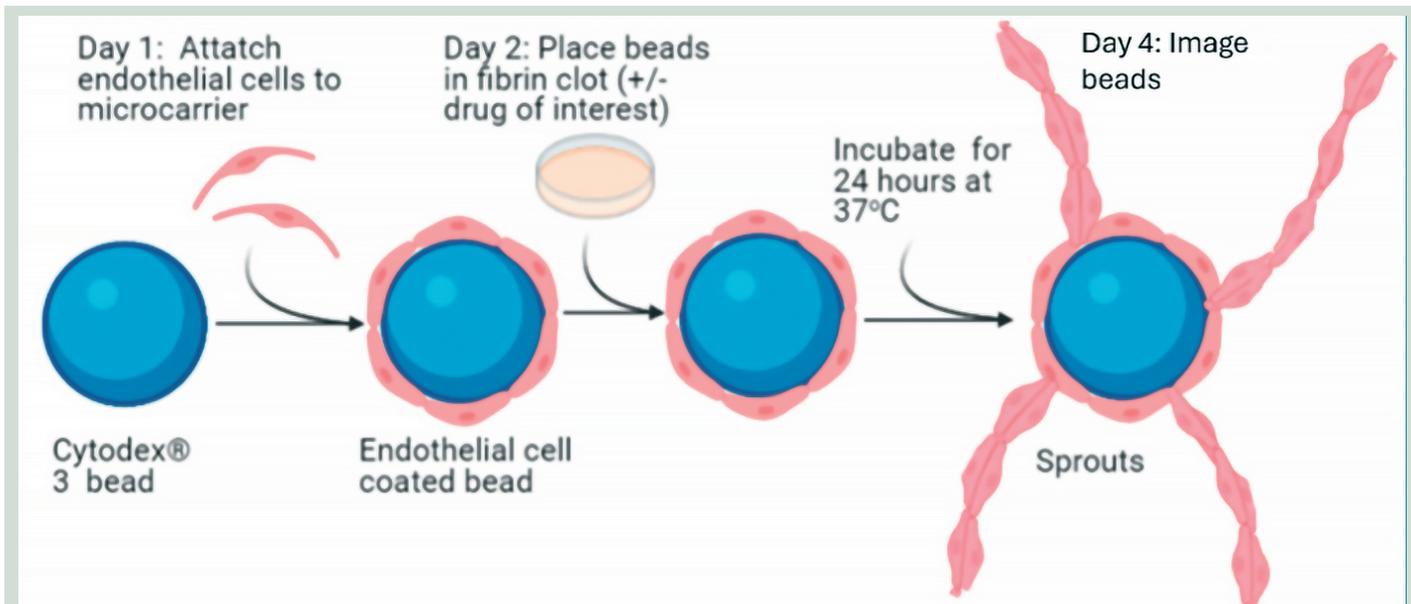


Figure 3. Les étapes de l'analyse de l'angiogenèse avec des billes de gel de fibrine.

- Le premier jour consiste à attacher les cellules endothéliales à un microporteur (bille).
- Le deuxième jour implique l'incorporation des billes enrobées dans un caillot de fibrine composé de facteurs de croissance et du composé d'intérêt ainsi que de l'ensemencement d'une couche de fibroblastes à la surface du gel.
- Enfin, après une incubation de 48 heures à 37 °C, les billes sont imagées le quatrième jour (adapté de Clavane et al. 2022) par un microscope automatique à haut débit.

Ces billes sont ensuite incorporées dans un gel de fibrine, une protéine présente dans le sang qui forme un caillot lorsqu'elle est activée. Une fois les billes incorporées dans le gel de fibrine, une couche de fibroblastes est déposée au-dessus des gels de fibrine afin de sécréter les facteurs de croissance requis à une angiogenèse spontanée.

Un milieu de culture est ajouté dans lequel sera dilué les composés d'intérêt à tester : dans notre cas, les préparations à base de plaquettes : le PRP (RegenPRP), le PRP-HA (Cellular Matrix) et les lysats plaquettaires (Platelet Max).

Au fil du temps, les cellules endothéliales, vont proliférer sous l'influence des différents stimuli apportés par les fibroblastes ainsi que les facteurs de croissance provenant des préparations à base de plaquettes.

Elles vont ensuite migrer hors des billes pour former de véritables tubes capillaires qui contiennent des lumières, répliquant, étape par étape, le processus d'angiogenèse observé *in vivo*.

Dans une publication du groupe Nature© (Carpentier et al, Scientific Report 2020) [8], nous avons développé une méthode originale d'analyse morphométrique semi-automatique à haut débit afin d'augmenter la puissance statistique des quantifications réalisées (**Figure 4**).

Ce modèle couplé à cette nouvelle quantification offre un moyen pratique et reproductible d'étudier les mécanismes sous-jacents de l'angiogenèse et d'évaluer l'efficacité de différents agents thérapeutiques, tels que les médicaments anti-angiogéniques ou les agents pro-angiogéniques.

De plus, il permet de visualiser facilement les changements morphologiques et fonctionnels des vaisseaux sanguins formés, en réponse aux facteurs de croissance relargués par les plaquettes.

Il s'agit d'un outil précieux pour la recherche en biologie vasculaire et pour le développement de nouvelles thérapies en médecine régénérative et en physiopathologie vasculaire [9].

DANS NOTRE ÉTUDE *IN VITRO*, NOUS AVONS ÉVALUÉ ET COMPARÉ LA CAPACITÉ DE TROIS PRÉPARATIONS DÉRIVÉES DES PLAQUETTES

- Le plasma riche en plaquettes (PRP),
- Le PRP à l'acide hyaluronique (PRP-HA)
- Les lysats de plaquettes (PL) à différentes concentrations (5-40 %)

Pour leurs effets biologiques sur les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC) au niveau de :

- Leur métabolisme,
- Leur viabilité,
- Leur sénescence,
- La sécrétion de facteurs angiogéniques,
- et les capacités angiogéniques en 2D (test de formation de tubes endothéliaux ou EFTA),
- et en 3D (test en billes de fibrine ou FBA) [10] (**Figure 5**).

Le PRP, le PRP-HA et le PL induisent des réponses angiogéniques différentes.

Nous avons démontré que même si les trois préparations sont dérivées des plaquettes, elles contiennent des mélanges divers de facteurs de croissance qui déclenchent différemment les étapes du processus angiogénique spatialement et temporellement.

Les PL sont des stimulateurs puissants de la prolifération endothéliale mais de manière non orchestrée, ce qui entrave la formation adéquate des tubes endothéliaux.

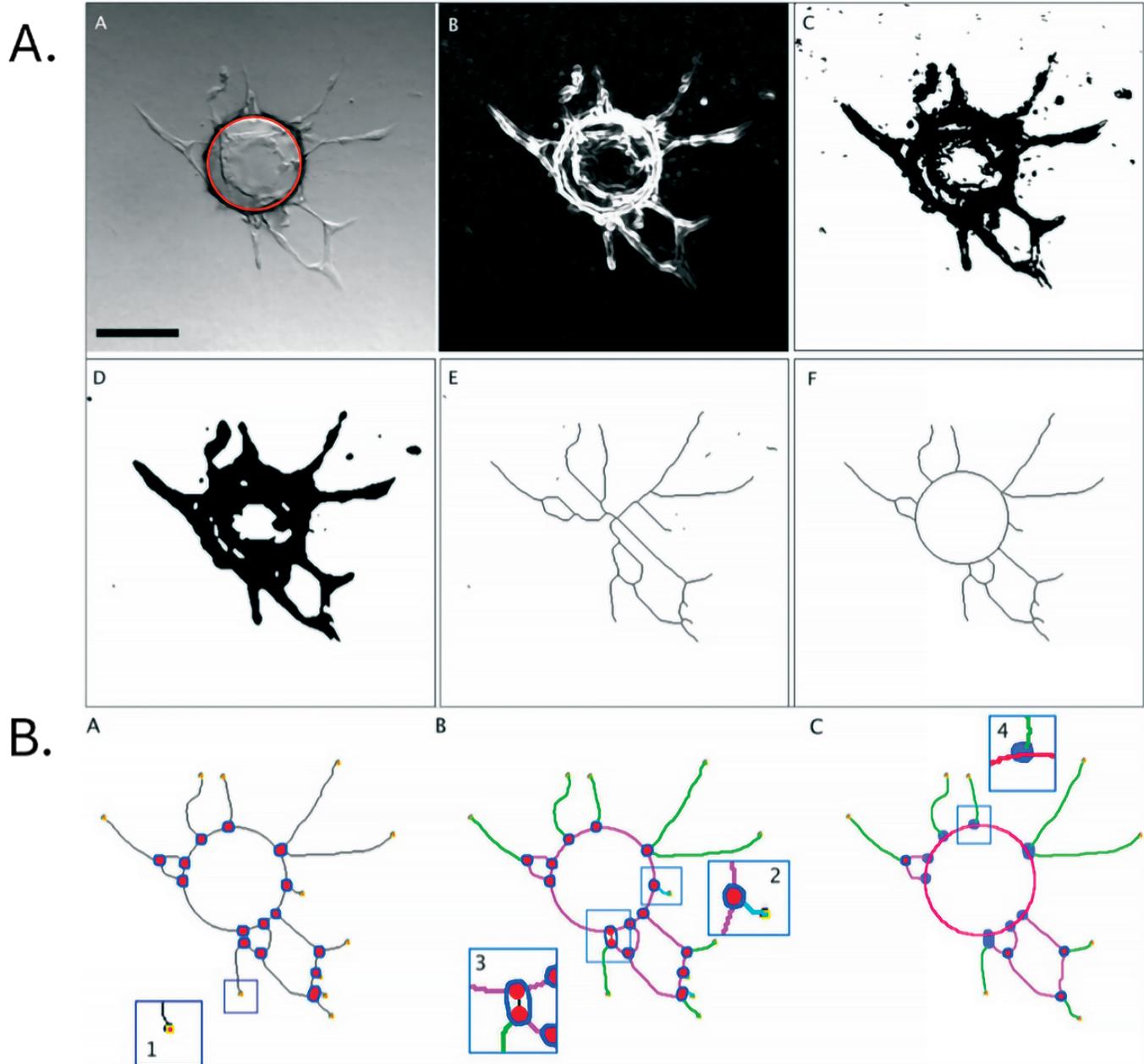


Figure 4. Développement d'une nouvelle méthode d'analyse morphométrique de l'angiogenèse dans le modèle des billes de fibrine basée sur la détection « d'arbres vasculaires ». Tiré de [8].

A **A.** Image de l'échantillon initial montrant la sphère détectée. **B.** Amélioration des forts gradients et suppression de l'arrière-plan. **C.** Seuil « Moyen ». **D.** Segmentation binaire finale. **E.** Squelette de la segmentation binaire. **F.** Squelette final après nettoyage de l'intérieur de la sphère. Barre d'échelle : 200 μm .

B **Détection d'objets vectoriels dans les arbres squelettisés.** **A.** Extrémités qui sont des points rouges entourés de jaune (encart 1). **B.** Détection des Branches (vertes) et des Segments (magenta).

L'encart 2 montre une branche artificielle (cyan) (car trop petite) qui sera supprimée par le programme.

L'encart 3 montre une fusion entre deux jonctions proches en une seule (bord bleu).

C. Représentation de l'analyse finale, comprenant les jonctions d'ancrage (violet, encart 4), qui intersectent la limite de la sphère (rouge).

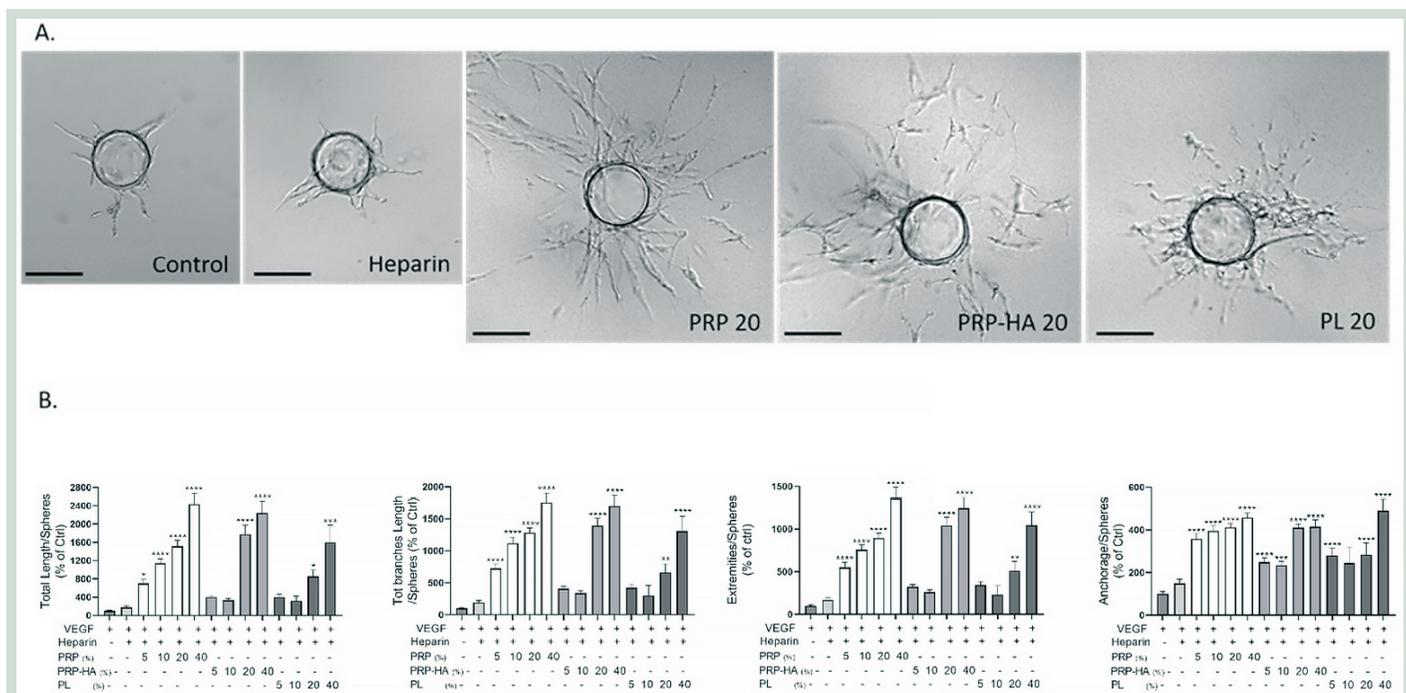


Figure 5. Les produits dérivés des plaquettes modulent différemment l'angiogenèse dans le test des billes de fibrine en 3D.

A. Les cultures 3D d'EC humaines (HUVEC) ont été traitées avec des produits dérivés des plaquettes (PRP, PRP-HA et PL) à des concentrations différentes (5-40 %) pendant 4 jours. Images représentatives d'une augmentation massive de l'angiogenèse (PRP 20, PRP-HA 20) ou d'une légère prolifération endothéliale à partir des billes enrobées d'EC (PL20) par rapport aux conditions témoins (témoin et héparine) au jour 4. Barre d'échelle : 150 μ m.

B. La quantification des paramètres morphométriques du réseau capillaire a été réalisée par une méthode informatisée sur des images prises le jour 4. Les paramètres représentatifs mesurés étaient la longueur totale, la longueur totale des branches, le nombre d'extrémités et le nombre de jonctions d'ancrage par sphère. Les graphiques sont représentatifs de trois expériences indépendantes. Cent sphères ont été quantifiées pour chaque condition expérimentale. Données de Berndt et al. *Biomedicine*. 2021 [10].

Le PRP et le PRP-HA contenant des plaquettes vivantes induisent la meilleure réponse angiogénique dans le modèle 3D complexe FBA qui récapitule l'ensemble du processus angiogénique.

Le PRP et le PRP-HA peuvent également présenter des propriétés anti-vieillessement sur les HUVEC, car la sénescence endothéliale est diminuée [10].

L'acide hyaluronique, en tant qu'hydrogel biodégradable naturel, favorise une libération contrôlée des facteurs de croissance du PRP.

Le profilage du sécrétome explique les activités biologiques par une sécrétion différentielle de facteurs angiogéniques puissants lorsque les plaquettes sont cultivées seules ou en présence de HUVEC.

EN CONCLUSION

Le PRP seul ou combiné à l'acide hyaluronique est un réservoir de facteurs de croissance qui favorise l'angiogenèse pour les applications de génie tissulaire cellulaire *in vitro*.

De plus, les résultats sont d'un grand intérêt pour les applications cliniques où les préparations dérivées des plaquettes sont utilisées pour une thérapie angio-régénérative *in situ* afin d'accélérer la cicatrisation des plaies et la réparation tissulaire.

RÉFÉRENCES

1. Carmeliet P., Jain R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407 : 249.
2. Mastrullo V., Cathery W., Velliou E., Madeddu P., Campagnolo P. Angiogenesis in Tissue Engineering: As Nature Intended? *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 2020; 8 : 188.
3. Azari Z., Nazarnezhad S., Webster T.J., Hoseini S.J., Brouki Milan P., Baino F., Kargozar S. Stem cell-mediated angiogenesis in skin tissue engineering and wound healing. *Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 2022; 30 : 421.
4. Peterson J.E., Zurakowski D., Italiano J.E., Jr., Michel L.V., Fox L., Klement G.L., Folkman J. Normal ranges of angiogenesis regulatory proteins in human platelets. *American journal of hematology* 2010; 85 : 487.
5. Roweth H.G., Battinelli E.M. Platelets and (Lymph)angiogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2023; 13.
6. Nowak-Sliwinska P., Alitalo K., Allen E., Anisimov A., Aplin A.C., Auerbach R., Augustin H.G., Bates D.O., van Beijnum J.R., Bender R.H.F., Bergers G., Bikfalvi A., Bischoff J., Bock B.C., Brooks P.C., Bussolino F., Cakir B., Carmeliet P., Castranova D., Cimpean A.M., Cleaver O., Coukos G., Davis G.E., De Palma M., Dimberg A., Dings R.P.M., Djonov V., Dudley A.C., Duffon N.P., Fendt S.M., Ferrara N., Fruttiger M., Fukumura D., Ghesquiere B., Gong Y., Griffin R.J., Harris A.L., Hughes C.C.W., Hultgren N.W., Iruela-Arispe M.L., Irving M., Jain R.K., Kalluri R., Kalucka J., Kerbel R.S., Kitajewski J., Klaassen I., Kleinmann H.K., Koolwijk P., Kuczynski E., Kwak B.R., Marien K., Melero-Martin J.M., Munn L.L., Nicosia R.F., Noel A., Nurro J., Olsson A.K., Petrova T.V., Pietras K., Pili R., Pollard J.W., Post M.J., Quax P.H.A., Rabinovich G.A., Raica M., Randi A.M., Ribatti D., Ruegg C., Schlingemann R.O., Schulte-Merker S., Smith L.E.H., Song J.W., Stacker S.A., Stalin J., Stratman A.N., Van de Velde M., van Hinsbergh V.W.M., Vermeulen P.B., Waltenberger J., Weinstein B.M., Xin H., Yetkin-Arik B., Yla-Herttuala S., Yoder M.C., Griffioen A.W. Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays. *Angiogenesis* 2018; 21 : 425.
7. Berndt S., Issa M.E., Carpentier G., Cuendet M. A Bivalent Role of Genistein in Sprouting Angiogenesis. *Planta medica* 2018; 84 : 653.
8. Carpentier G., Berndt S., Ferratge S., Rasband W., Cuendet M., Uzan G., Albanese P. Angiogenesis Analyzer for ImageJ - A comparative morphometric analysis of «Endothelial Tube Formation Assay» and «Fibrin Bead Assay». *Scientific reports* 2020; 10 : 11568.
9. Clavane E.M., Taylor H.A., Cubbon R.M., Meakin P.J. Endothelial Cell Fibrin Gel Angiogenesis Bead Assay. *Methods Mol Biol* 2022; 2441 : 321.
10. Berndt S., Carpentier G., Turzi A., Borlat F., Cuendet M., Modarressi A. Angiogenesis Is Differentially Modulated by Platelet-Derived Products. *Biomedicines* 2021; 9.

