

GABRIELLE OUELLET

**RECONSTRUCTION D'UN ÉQUIVALENT URÉTRAL PAR
MÉTHODE D'AUTO-ASSEMBLAGE EN GÉNIE
TISSULAIRE**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en biologie cellulaire et moléculaire
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

DÉPARTEMENT DE CHIRURGIE
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2010

©Gabrielle Ouellet, 2010

Plusieurs maladies sont à l'origine de désordres urétraux. Pour traiter ces troubles, des biomatériaux acellulaires ou des tissus non-urologiques natifs sont utilisés mais mènent régulièrement à des complications post-opératoires. Dans le cadre de mon projet de maîtrise, nous avons évalué la faisabilité de produire, par la méthode d'auto-assemblage, un modèle tubulaire urétral autologue. Par la suite, nous avons regardé la possibilité d'adapter l'équivalent reconstruit au modèle animal choisi, soit le porc, puisque son système urinaire est physiologiquement similaire à celui de l'humain. Pour atteindre le premier objectif, un modèle tubulaire urétral constitué de cellules humaines fut élaboré. S'en est suivi une caractérisation pour évaluer sa fonctionnalité et sa viabilité. Ensuite, pour atteindre notre deuxième but, des tests préliminaires pour établir et déterminer les paramètres optimaux de culture furent réalisés pour produire un feuillet à partir de fibroblastes porcins. En résumé, l'équivalent urétral développé dans notre laboratoire est un modèle innovateur dans le domaine de la reconstruction urologique. La production d'un feuillet avec des fibroblastes de porc est une étape importante qui va permettre de compléter le modèle urologique autologue porcin et de passer aux tests précliniques chez le porc.

Avant-propos

Un des plaisirs de la recherche, contrairement au stéréotype du scientifique solitaire dans son laboratoire, est de rencontrer des gens qui partagent votre passion. Certains sont là pour vous conseiller et vous guider, alors que d'autres partagent votre quotidien peu importe les circonstances. Ces personnes vous aident à progresser et à apprendre, et ce, bien au-delà de votre sujet d'étude. C'est à eux que je veux rendre hommage avant tout.

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche Dr Stéphane Bolduc, qui a su me guider et me conseiller tout au long de ma maîtrise en plus de me permettre d'exploiter au maximum mon projet et de me dépasser. Merci à Martine Magnan de m'avoir enseigné les techniques de la méthode d'auto-assemblage. Merci spécialement à ma coéquipière Sara Bouhout et à Jean Dubé pour leur appui tout au long de ma maîtrise. Merci pour le temps consacré à nos discussions sur mon projet de recherche et votre aide pour la rédaction de l'article : *Production of Connective Pig Sheet by Tissue Engineering*. Sans vous deux, je n'aurais pas réussi tout ce que j'ai entrepris avec autant de succès. Également, merci à Caroline Audet pour son soutien moral et son aide lors de mes expériences.

Ensuite, je souhaite remercier ceux qui m'ont permis d'atteindre tous mes objectifs pour mon projet sur le porc, dont Anne-Marie Moisan pour son aide et ses précieux conseils lors des prélèvements à l'université. Également à Israël Martel, Amélie Lavoie et Daniel Larouche pour avoir répondu à mes mille et une questions avec la joie et la bonne humeur.

Enfin, d'un côté plus personnel, je souhaite remercier Éleine Brière qui m'a aidé à apprendre tous les codes de programmation pour me permettre de remettre mon mémoire comme il est aujourd'hui. Aussi, un merci particulier à mes parents, Claude et Claude, qui m'appuient dans chacun de mes projets, même les plus fous. Merci pour votre soutien durant toutes ces années. Merci aussi à mon frère Vincent, qui m'a aidé à chaque fois que j'ai eu besoin de lui pour mes rédactions et mes

présentations en anglais. Et finalement, un merci tout spécial à mon conjoint David, qui me soutient et m'encourage depuis les huit dernières années dans tout les projets que j'entreprends. Merci.



Table des matières

Résumé	ii
Avant-propos	iii
Liste des figures	viii
Liste des abréviations	ix
1 Introduction	1
1.1 Notions théoriques	1
1.1.1 Le système urinaire	1
1.1.2 L'urètre	1
1.1.3 Pathologies de l'urètre	5
1.2 Traitements des défauts urétraux	7
1.2.1 Tissus natifs non urologiques : le début du génie tissulaire en urologie	7
1.2.2 Matrices de tissus acellulaires	11
1.2.3 Polymères synthétiques	15
1.3 Mise en situation de la problématique	17
1.3.1 L'approche autologue : la méthode d'auto-assemblage	17
1.3.2 Objectif	18
2 Modèle tubulaire urétral	19
2.1 Introduction	19
2.2 Matériel et méthodes	20
2.2.1 Extraction cellulaire	20
2.2.2 Construction du modèle urétral	22
2.2.3 Test de résistance mécanique	23
2.2.4 Résistance aux sutures	24
2.2.5 Viabilité cellulaire	25
2.2.6 Caractérisation	26
2.2.7 Western Blot	26
2.3 Résultats	27
2.3.1 Morphologie de l'équivalent urétral	27
2.3.2 Caractérisation de l'équivalent	27
2.3.3 Viabilité cellulaire	31
2.3.4 Résistance mécanique	31

2.4	Discussion	33
2.5	Conclusion	34
3	Production of Connective Pig Sheet by Tissue Engineering	35
3.1	Résumé	35
3.2	Introduction	36
3.3	Materials and Methods	37
3.3.1	Cell extraction	37
3.3.2	Cell culture	38
3.3.3	Histological analysis	39
3.3.4	Immunofluorescence characterization	39
3.4	Results	40
3.4.1	Fibroblasts proliferation	40
3.4.2	Formation of a porcine monolayer fibroblasts sheet	41
3.4.3	Cellular contaminations	43
3.4.4	Formation of three layer fibroblasts sheets	43
3.4.5	Detection of extracellular matrix in fibroblasts sheets	44
3.5	Discussion	46
3.6	Conclusion	47
4	Discussion	48
5	Conclusion	50
	Références	50

Liste des figures

1.1	Représentation schématique du système urinaire chez la femme et l'homme	2
1.2	Représentation schématique de la structure de l'urètre	3
1.3	Représentation schématique de l'urothélium	3
1.4	Représentation schématique de l'hypospadias avant et après correction chirurgicale. . .	6
1.5	Représentation schématique des fistules génito-urinaires chez la femme	6
1.6	Représentation schématique des différentes sténoses urétrales	7
2.1	Représentation schématique de l'extraction des fibroblastes d'une biopsie cutanée . . .	21
2.2	Représentation schématique de l'extraction des cellules urothéliales d'une biopsie vésicale	22
2.3	Représentation schématique du modèle urétral par la méthode d'auto-assemblage . . .	23
2.4	Bioréacteur	24
2.5	Représentation schématique de la procédure pour évaluer la résistance mécanique de l'équivalent urétral	25
2.6	Vue macroscopique du modèle urétral après 7 semaines de culture et 1 semaine en perfusion	28
2.7	Coupe histologiques	29
2.8	Caractérisation en immunofluorescence de la matrice extracellulaire, de l'urothélium et de la lame basale	30
2.9	Confirmation par western blot de la présence de la cytokératine 8/18 dans les substituts reconstruits	30
2.10	Méthode d'extraction par explant pour évaluer la viabilité cellulaire du modèle urétral	31
2.11	Évaluation de la résistance mécanique par test d'éclatement de l'équivalent urétral à différents temps de culture	32
3.1	Schematic representation of fibroblasts extraction from each sites of biopsy	38
3.2	Fibroblasts proliferation comparing 37°C and 39°C culture temperature	41
3.3	Histological view of the monolayer fibroblasts sheets cultured at 39°C	42
3.4	Thickness measurements at 39°C of the POF and HSF fibroblasts sheets obtained at 14 and 21 days	43
3.5	Mix culture observed at 39°C	44
3.6	Histological view of the three layer fibroblasts sheets cultured at 39°C	44
3.7	Thickness measurements of the three layer fibroblasts sheets obtained at 39°C	45

3.8	ECM characterization of the three layer fibroblasts sheets obtained at 39°C by immunofluorescence with native pig oral mucosa as control	45
-----	--	----

Liste des abréviations

SNA	système nerveux autonome.....	1
SNC	système nerveux central.....	1
BAMG	bladder acellular matrix graft.....	12
SIS	small intestinal submucosa.....	14
PHB	acide polyhydroxybutyrique.....	15
PGA	acide polyglycolique.....	15
Hyaff-11	benzyle ester hyaluronane.....	16
PGA	acide polyglycolique.....	15
PLGA	acide polylactique-co-glycolique.....	16
PLLA	acide poly-L-polylactique.....	16
LOEX	Laboratoire d'organogénèse expérimentale.....	17
PBS	tampon phosphate saline.....	20
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium.....	20
SVF	sérum de veau foetal.....	20
DH	Dulbecco's Modified Eagle's Medium avec du Ham's F12.....	21
EGF	facteur de croissance épidermique.....	21
BSA	sérum-albumine bovin.....	26
ECM	extracellular matrix.....	37
FBS	Foetal Bovine Serum.....	38
HSF	human skin fibroblasts.....	38
PSF	pig skin fibroblasts.....	38
POF	pig oral fibroblasts.....	38

1.1 Notions théoriques

1.1.1 Le système urinaire

Le système urinaire joue un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie du corps humain. Il est constitué des reins, des uretères, de la vessie, et de l'urètre (Figure 1.1). Chez l'homme, on retrouve en plus la prostate. Les reins possèdent de nombreuses fonctions dont beaucoup sont liées à la filtration du sang et à l'excrétion de l'urine. Ils assurent l'équilibre et la consistance des composantes sanguines en agissant sur la tension osmotique, la balance acido-basique et hydro-électrolytique. L'urine qui est produite est composée de déchets métaboliques, azotés et exogènes, ce qui en fait un liquide biologique toxique pour les cellules et les structures protéiques. Elle est drainée par les uretères jusqu'à la vessie, un réservoir naturel de forme sphérique, où elle s'accumule. Lors de la miction, elle est évacuée hors de l'organisme par l'urètre (Bronchti 2005).

1.1.2 L'urètre

Le rôle de l'urètre est de conduire l'urine du col de la vessie jusqu'à l'extérieur de l'organisme sous le contrôle de deux sphincters, le sphincter urétral interne qui est formé de muscles lisses provenant des fibres musculaires du muscle détrusor de la vessie et qui est contrôlé par le système nerveux autonome (SNA). Suit le sphincter externe, strié du périnée, qui est constitué de muscle squelettique et est contrôlé par le système nerveux central (SNC) (Adé-Damilano 2006).

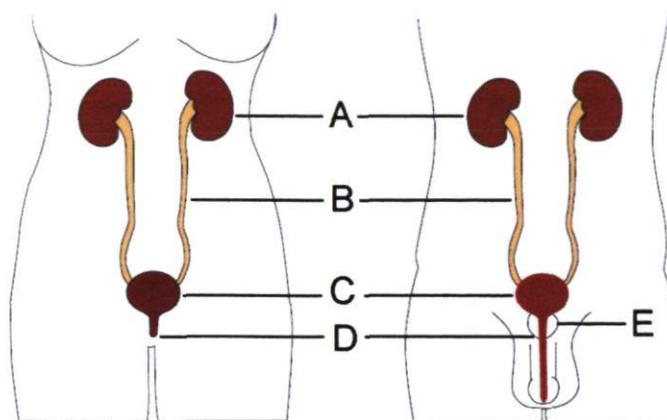


Figure 1.1 – Représentation schématique du système urinaire chez la femme et l’homme. A) Reins. B) Uretères. C) Vessie. D) Urètre. E) Prostate. (©LOEX).

Pour ce qui est de la structure de l’urètre (Figure 1.2), il est constitué d’une couche de cellules musculaires lisses entourées de tissu conjonctif intrafasciculaire. Au-dessus, se trouve la lamina propria qui renferme des fibroblastes, des microcapillaires et des fibres de collagène, principalement de type I et III. Ensuite, sur la lame basale, repose l’urothélium (McCarthy et al. 2003). Cet urothélium est un épithélium pseudostratifié transitionnel. Il crée une barrière imperméable qui a pour rôle de protéger les couches inférieures sensibles à la toxicité de l’urine. L’urothélium possède un cycle de rotation cellulaire de 200 jours et est une défense encore plus efficace que l’épiderme de la peau. Il est composée de cellules basales qui sont les précurseurs des cellules intermédiaires et des cellules superficielles surnommées les cellules parapluies à cause de leur forme comparable (Figure 1.3). Ces cellules superficielles sont caractérisées par la présence d’une membrane apicale asymétrique spécialisée, laquelle est un arrangement par interactions spécifiques de protéines d’urolakines, pour former une cloison protectrice à la surface apicale. Il est important de noter que l’organisation de l’urolakine est par conséquent le marqueur de différenciation de l’urothélium (Veranic et al. 2004; Turner et al. 2008; Wu et al. 2009).

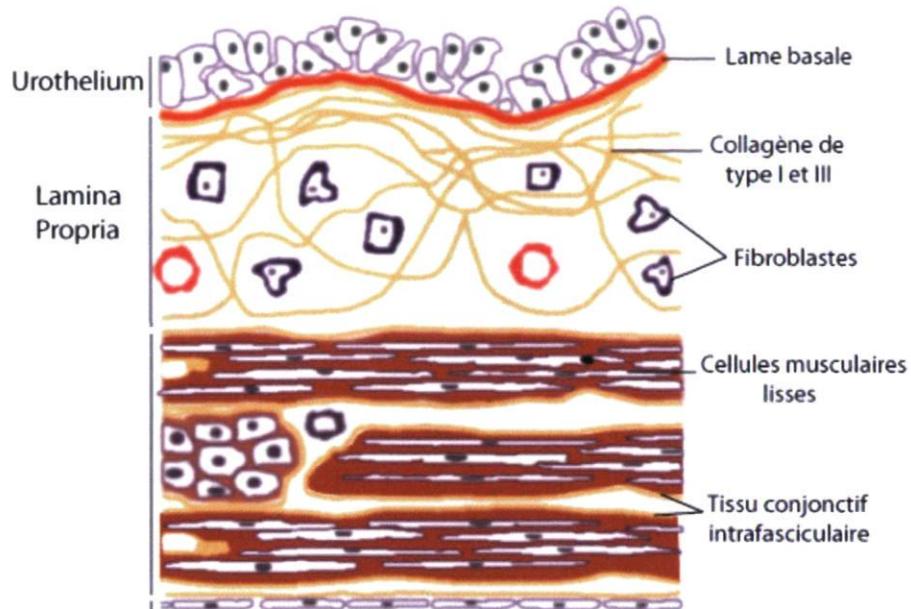


Figure 1.2 – Représentation schématique de la structure de l'urètre. (©LOEX).

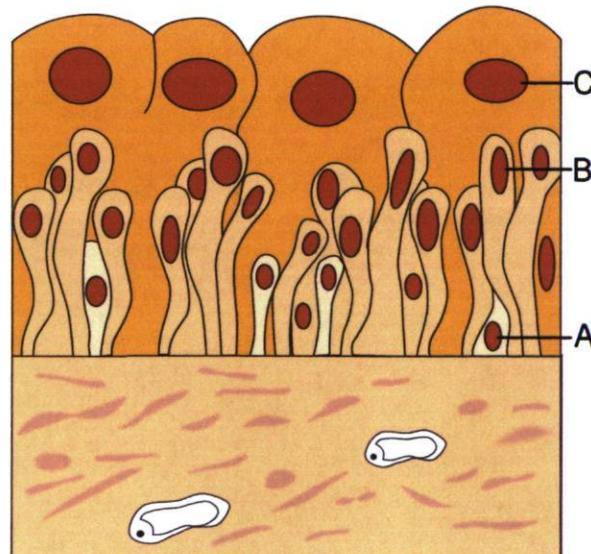


Figure 1.3 – Représentation schématique de l'urothélium. A) Les cellules basales. B) Les cellules intermédiaires. C) Les cellules superficielles aussi connues sous le nom de cellules parapluries. (©LOEX).

Par contre, il faut prendre en compte que l'urothélium retrouvé tout au long des voies urinaires diffère au niveau biochimique et de son ultra-structure selon le site anatomique, à cause des divergences intrinsèques acquises durant le développement. Donc l'urothélium est divisé en trois sections cellulaires particulières dont la première tapisse le système collecteur rénal (calices et bassinet) et l'uretère, la deuxième est la vessie et la troisième couvre le col de la vessie et l'urètre proximal. Cette adaptation cellulaire est expliquée par leur origine embryonnaire distinct. L'urothélium provenant du pelvis rénal et de l'uretère dérive du mésoderme tandis que celui de la vessie et de l'urètre proximal découle du feuillet embryonnaire interne, l'endoderme (Batourina et al. 2005; Liang et al. 2005; Viana et al. 2007; Wu et al. 2009). Cette dérivation embryonnaire explique également la transition épithéliale retrouvée histologiquement au niveau du conduit urétral aussi bien chez l'homme que chez la femme.

Histologiquement, l'urètre est composé de 3 couches : la muqueuse, la musculuse lisse et l'adventice. Comme il est possible de le voir dans la Figure 1.1, la longueur urétrale diffère chez l'homme et la femme, ce qui engendre des différences au niveau de son organisation. Chez l'homme, l'urètre fait environ 20 cm de longueur et est constitué de 3 sections. La section prostatique part de la vessie et passe dans la prostate. Elle mesure environ 4 cm et est tapissée d'un urothélium. L'urètre membraneux traverse les muscles du périnée, mesure environ 1 cm et est recouvert d'un épithélium cylindrique stratifié. Dans les deux premières sections, on retrouve une musculuse constituée d'une couche longitudinale interne épaisse et d'une couche circulaire externe plus fine. La partie spongieuse quant à elle mesure environ 15 cm et est tapissée d'un épithélium cylindrique bistratifié. Chez la femme, l'urètre mesure environ 3 cm et contrairement à l'homme est formé de 2 sections. Le premier tiers dit proximal est bordé d'un urothélium et possède une musculuse lisse composée d'une couche longitudinale interne épaisse et d'une couche circulaire externe plus fine. Le deux tiers distaux sont recouvert d'un épithélium cylindrique pluristratifié (Bronchti 2005; Adé-Damilano 2006). Également, l'urètre chez la femme est mobile et lorsque son angle de déplacement est en continuel changement, une hypermobilité est retrouvée ce qui peut causer des problèmes d'incontinence urinaire (Di Pietto et al. 2008).

1.1.3 Pathologies de l'urètre

Plusieurs pathologies peuvent causer des désordres urétraux tels le diverticule urétral congénital, l'absence congénitale du pénis, le micropénis, l'atrésie urétrale et le cancer. Mais pour aider à la compréhension, nous ne nous concentrerons que sur les malformations et maladies suivantes.

L'épispadias est une malformation congénitale de la portion distale de l'urètre dans laquelle le méat urinaire, l'orifice externe de l'urètre, s'ouvre sur la face dorsale du pénis. Sa prévalence chez le nouveau-né masculin est de 1 sur 117 000 et parmi le nouveau-né féminin elle est de 1 sur 484 000. Cette anomalie rare s'associe presque toujours à une exstrophie de la vessie qui est elle un peu plus fréquente (1 sur 35 000). Le traitement fait appel à la reconstruction en plusieurs phases de la vessie, du sphincter urétral, de l'urètre et du pénis. Des séquelles telles l'incontinence urinaire et des fonctions sexuelles perturbées sont fréquemment observées. L'hypospadias, quant à lui, est également une malformation congénitale de la portion distale de l'urètre où le méat urinaire s'ouvre cette fois sur la face ventrale du pénis. Sa prévalence chez le nouveau-né masculin est plus élevée soit de 1 sur 250 (Campbell et al. 2007). Une reconstruction en plusieurs phases est parfois nécessaire pour retrouver la pleine longueur de l'urètre lorsque le méat est proximal, comme il est représenté dans la Figure 1.4 (Larousse 2004).

La fistule est une anomalie d'origine pathologique ou congénitale caractérisée par la formation d'un canal qui communique avec une glande ou cavité naturelle et permet de déverser au-dehors leurs sécrétions ou contenu. Dans la Figure 1.5, il est possible de voir les différents types de fistules retrouvées au niveau génito-urinaire chez la femme. Pour corriger le problème, une intervention chirurgicale sera nécessaire (Larousse 2004) .

La sténose urétrale est le rétrécissement pathologique de la portion proximale ou distale de l'urètre qui peut être d'origine congénitale, inflammatoire ou traumatique (Figure 1.6). Cette maladie peut être retrouvée à tout âge et survient le plus souvent de l'urètre bulbaire (Figure 1.6, numéro 3). Plusieurs traitements peuvent être employés pour corriger la sténose comme la dilatation urétrale simple à l'aide de sondes calibrées, l'urétrotomie interne endoscopique, l'urétroplastie ou la mise en place par voie endoscopique d'une prothèse temporaire ou permanente. Si la sténose récidive,

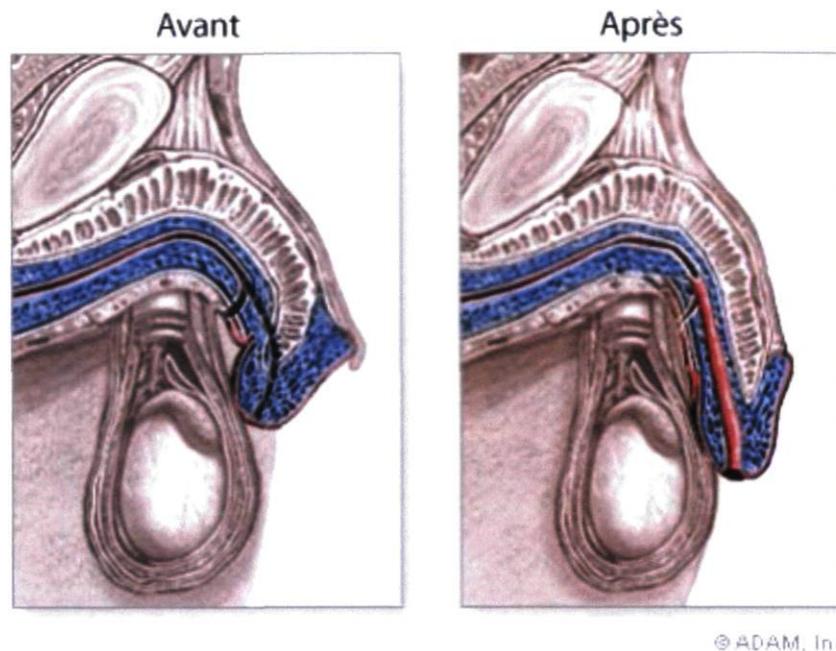


Figure 1.4 – Représentation schématique de l'hypospadias avant et après correction chirurgicale. *Figure adaptée de www.adams.com.*

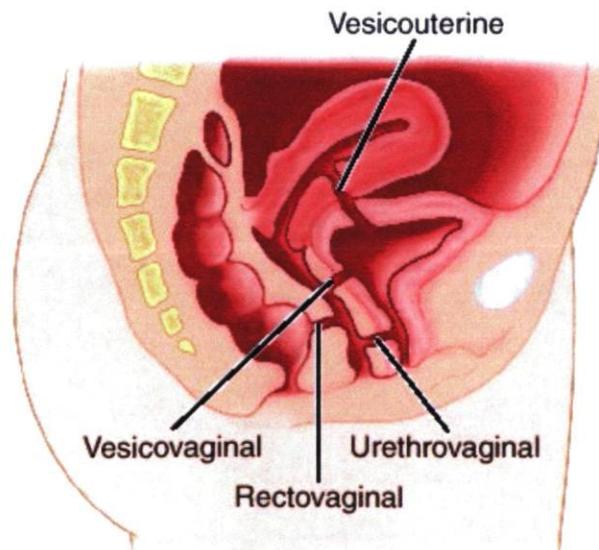


Figure 1.5 – Représentation schématique des fistules génito-urinaires chez la femme. *Figure adaptée de www.medical-dictionary.thefreedictionary.com/fistula.*

le traitement doit être répété et si elle s'aggrave une rectification chirurgicale doit être effectuée (Larousse 2004) .

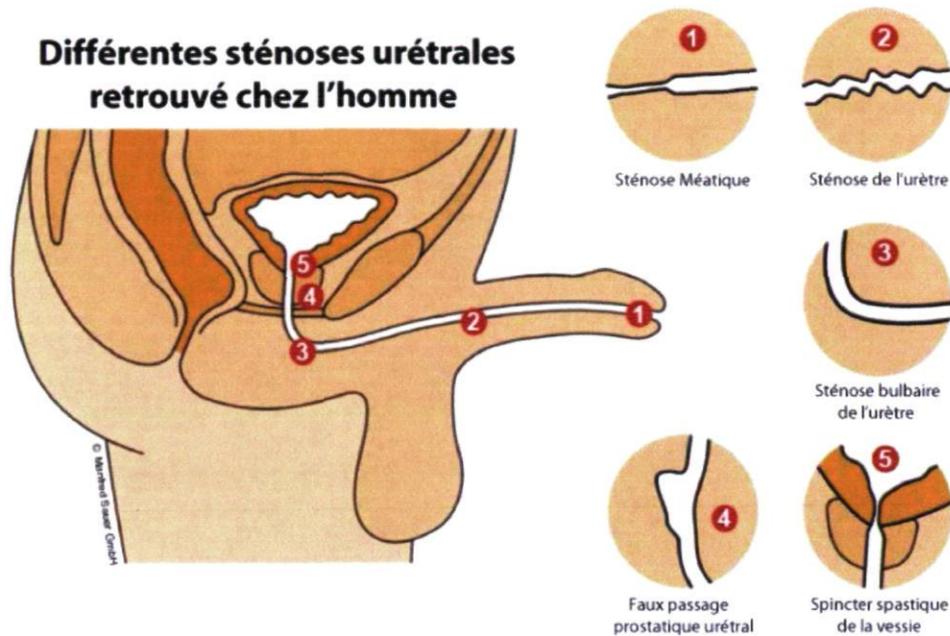


Figure 1.6 – Représentation schématique des différentes sténoses urétrales. Figure adapté de www.manfred-sauer.co.uk/iq cath.as.

1.2 Traitements des défauts urétraux

Pour traiter ces désordres urétraux, la reconstruction chirurgicale est nécessaire. Pour l'instant, les urologues ont recours aux tissus non urologiques, mais d'autres matériaux tels les matrices de tissus acellulaires et les polymères synthétiques sont étudiés comme solutions de remplacement.

1.2.1 Tissus natifs non urologiques : le début du génie tissulaire en urologie

Plusieurs tissus non urologiques furent utilisés pour la reconstruction urétrale dont l'uretère en 1909 (Schmieden 1909), la veine saphène en 1910 (Tuffier 1910) et l'appendice en 1911 (Lexner 1911).

La peau fut employée pour la première fois en 1914 (Nové-Josserand 1914) sous forme d'épaisseur partielle et roulée en forme de tube. Par contre, les résultats obtenus n'étant pas ceux attendus, attribuables à la contraction du greffon, ce type de tissu fut abandonné jusqu'en 1941 (Humby 1941) alors que fut rapportée l'utilisation de la peau pleine épaisseur provenant de la région génitale. Par la suite, en 1948 (Mc Indoe 1948), une greffe de peau d'épaisseur partielle fut utilisée. Cette fois-ci pour obtenir le greffon, le patient dut porter un dilatateur sous la peau pendant 6 mois pour bien séparer la peau avant le prélèvement. La même année, une reconstruction urétrale avec de la peau pleine épaisseur a également été employée (Young et Benjamin 1948; Vyas et al. 1987).

Deux types d'épaisseurs sont utilisés lors du prélèvement de la peau à des fins d'urétroplastie, soit pleine ou partielle. Pour ce qui est de l'utilisation de la peau pleine épaisseur, plusieurs sites donateurs furent étudiés pour leurs différentes caractéristiques comme la peau du prépuce, de la région supraclaviculaire, de l'intérieur de l'avant-bras, de la fesse ou de la cuisse (Devine et Horton 1977; Hanna 1983; Hendren et Crooks 1980; Shapiro 1984). Pour l'instant, la peau du pénis et du prépuce reste le type de peau le plus utilisé par les chirurgiens, puisqu'elle est plus souple, moins épaisse que les autres sites donateurs (Vyas et al. 1987) et l'absence de poils de ces deux sites diminue la probabilité de complications après la reconstruction de l'urètre. En général, de bons résultats en urétroplastie furent obtenus lors de son emploi, par contre des complications postchirurgicales sont tout de même retrouvées. Le prélèvement de la peau peut laisser des plaies non esthétiques aussi bien au site de prélèvement qu'au site de l'urétroplastie. Tandis qu'au site de reconstruction, des complications comme des fistules ou des sténoses récurrentes en plus d'une maladie inflammatoire de la peau dans la région génitale, Balanitis Xerotica Obliterans, peuvent apparaître. De plus, la croissance des poils dans la lumière de l'urètre reconstruit, provenant de la peau prélevée, avec ou sans concrétion et la contraction du greffon furent observés. Pour ce qui est de l'utilisation de peau d'épaisseur partielle, une diminution de la tendance à se contracter fut montrée, mais survient tout de même un manque adéquat de la résilience et de la force du tissu (Markiewicz et al. 2007). Actuellement, la peau du prépuce est considérée comme l'étalon or pour l'urétroplastie, mais quand ce type de peau n'est pas disponible à la suite d'une intervention antérieure, une circoncision, la présence de cicatrice ou bien pour un défaut urétral plus long, d'autres types de tissus vont être nécessaires pour la reconstruction urétrale (Theodorescu et al. 1998).

Le premier article suggérant l'utilisation de la muqueuse orale pour l'urétroplastie est paru en 1941 (Humby 1941). Par contre, dû à de mauvais résultats, ce type de tissu ne fut réutilisé qu'en 1992 (Burger et al. 1992) alors qu'il fut réintroduit comme étant un type de tissu supplémentaire disponible pour la reconstruction urétrale. Dans la littérature, les deux sites les plus utilisés pour le prélèvement de la muqueuse orale sont la muqueuse buccale et la muqueuse labiale de la lèvre inférieure. Ainsi, quand la peau de la région génitale n'est pas disponible, la muqueuse orale est une bonne alternative, car elle est facilement accessible, exempte de poil et elle est présente en abondance même chez l'adulte. En plus, elle possède des propriétés qui sont intéressantes telle l'élasticité, une sous-muqueuse très vascularisée, une couche muqueuse épaisse, mais parfois trop épaisse, et une tolérance à une exposition aussi bien à l'air qu'aux liquides (Caldamone et al. 1998). Également, l'utilisation de la muqueuse orale évite les désavantages esthétiques en plus des conséquences retrouvées lors du prélèvement de la peau pénienne (Barbagli et Lazzeri 2006). La morbidité associée à ce type de tissu est la douleur, l'inconfort, l'ouverture limitée de la bouche, un défaut neurosensif et une modification du débit salivaire si les canaux excréteurs sont touchés par la dissection. Ces complications sont temporaires, allant d'un à plusieurs mois, dépendant d'où la muqueuse orale fut prélevée. Les complications postopératoires liées à la reconstruction urétrale sont encore la formation de fistules et de sténoses de l'urètre ou du méat (Barbagli et Lazzeri 2006; Markiewicz et al. 2007, 2008). Une étude a comparé l'utilisation de la muqueuse orale à la peau pénienne et dans l'ensemble un taux de réussite similaire fut obtenu sans différence significative. En conclusion, les deux types de tissus furent déclarés d'excellents matériaux (Alsikafi NF 2005) et sont considérés les étalons or pour la reconstruction urétrale.

L'utilisation de la muqueuse vésicale quant à elle fut introduite pour l'urétroplastie en 1947, mais un taux élevé de complications a retardé son usage clinique jusqu'en 1981 (Coleman et al. 1981) où elle fut associée à de bons résultats quand la peau pénienne n'était pas disponible. Les cliniciens l'ont immédiatement adoptée à cause de sa structure similaire à celle de l'urètre. Par contre, les désavantages de l'utilisation de ce type de tissu proviennent de la procédure de prélèvement qui est techniquement complexe puisqu'une incision abdominale est requise en plus d'entraîner une cicatrice et de la douleur. Les principales complications suivant la reconstruction urétrale sont un prolapsus muqueux et la sténose du méat (Vyas et al. 1987; Markiewicz et al. 2007). Pour surmonter ces complications, une combinaison de l'utilisation de la peau du prépuce ou du pénis avec la muqueuse vésicale fut étudiée (Duffy et al. 1988). Une diminution des sténoses du méat fut observée, mais aucune étude de suivi sur cette combinaison ne fut retrouvée dans la littérature par la suite.

Chez la femme, la sténose urétrale ou la fistule sont peu fréquentes et elles sont liées à des problèmes d'incontinence (McKinney 1979). Lorsqu'une reconstruction urétrale est nécessaire la muqueuse vaginale fut utilisée (Brannan 1951). Les principaux avantages de l'utilisation de ce tissu sont similaires à la muqueuse orale puisqu'il est facilement prélevé, exempt de poil, élastique, naturellement humide et il y a absence de plaie non esthétique. En général, de bons résultats furent obtenus et les complications postopératoires rapportées sont limitées (Tsivian et Sidi 2006).

D'autres tissus non urologiques pour l'urétroplastie ont également été étudiés lors de situations spécifiques ou quand les étalons or ne sont pas disponibles. En 1967, la tunica vaginalis qui entoure les testicules fut rapportée pour la première fois dans une étude expérimentale (Ariyoshi 1967). Ce tissu fut préconisé, car il est facilement disponible en plus d'être simple à prélever et à utiliser. D'autres avantages, telle une absence de poil, une très bonne vascularisation du tissu en plus d'une tension satisfaisante ainsi que de bonnes propriétés physiques qui résultent en une meilleure rétention des sutures furent rapportés. Au fil des années, la tunica vaginalis fut utilisée dans des études expérimentales pour des techniques opératoires d'urétroplastie (Talja et al. 1987; Khoury et al. 1989; Calado et al. 2005) et en général de bons résultats furent observés. En 1998, une équipe de recherche a étudié la forme optimale pour l'utilisation de lambeau de tunica vaginalis en comparant la forme de greffe par apposition à la forme tubulaire sur un modèle de lapin New Zealand avec un groupe contrôle. Dans la littérature, le lapin New Zealand est le modèle d'étude animale standard utilisé pour la reconstruction urétrale. À la suite de cette étude, les auteurs ont conclu que la forme de greffe par apposition de lambeau était plus adéquate que la forme en tube pour la reconstruction à long terme parce qu'elle est mieux vascularisée car moins de complications furent observées, mais sans plus de conclusion convaincante (Theodorescu et al. 1998). En 2009, une autre étude a combiné l'utilisation de la tunica vaginalis avec un lambeau d'ilots de prépuce, pour une période de 12 semaines sur un modèle de lapin, pour surmonter les complications retrouvées avec l'utilisation de la tunica vaginalis seule (Leslie et al. 2009). Même combiné avec la peau de prépuce, des complications au site de reconstruction tels la fistule et le diverticule urétral sont survenus. Cliniquement, l'usage de la tunica vaginalis fut évalué dans deux études possédant des conclusions différentes. La première équipe a trouvé que ce tissu est utile surtout lors de cas de reconstruction difficile pourvu qu'il ne soit pas exposé à l'air (Snow et Cartwright 1992) et la deuxième équipe n'a trouvé aucun avantage à son utilisation, sous forme de greffe en apposition, pour la réparation de la section proximale de l'urètre dû à un taux élevé de sténose (Joseph et Perez 1999). Aujourd'hui, la tunica vaginalis est

utilisée pour recouvrir la section urétrale reconstruite dans le but de la protéger. Un autre type de tissu, la veine autologue, a également été utilisé lors d'une étude expérimentale sur un modèle de lapin cependant aucun résultat concluant n'en est ressorti (Kahveci et al. 1995). Plus récemment, la muqueuse du colon fut suggérée lors de remplacement urétral dans le cas de sténose urétrale longue et complexe. Le tissu fut étudié sur un modèle canin et utilisé chez l'homme avec relativement de bons résultats. Les principales complications retrouvées au site de prélèvement n'ont pas été décrites, mais au site de reconstruction, la sténose du méat, la sténose de la section bulbaire ou bulbomembraneuse de l'urètre au site anastomotique fut observée avec un faible taux de complication (Xu et al. 2003, 2004, 2009).

1.2.2 Matrices de tissus acellulaires

Les matrices de tissus acellulaires sont obtenues de tissus natifs décellularisés et stérilisés. Par conséquent, elles sont naturellement biocompatibles et biodégradables ce qui représente un atout important comme support de substitution. Plusieurs méthodes sont utilisées pour effectuer leur préparation (Rosario et al. 2008), mais en général les grandes lignes consistent en un délaminage mécanique du tissu suivi par un traitement enzymatique consistant en une solution hypotonique pour détruire les résidus cellulaires et finalement en une stérilisation avec l'oxyde d'éthylène ou l'acide péracétique. Ce type de substitut a l'avantage de posséder des propriétés mécaniques et biochimiques comparables au tissu natif qui doit être remplacé. Effectivement, la procédure de traitement permet de préserver l'environnement tridimensionnel favorable à l'infiltration, la migration et la prolifération cellulaire à l'intérieur de celui-ci (Sutherland et al. 1996; Farhat et al. 2008). Un coup les cellules infiltrées, elles peuvent avoir une organisation et une différenciation adéquate pour produire leur propre matrice extracellulaire durant la résorption du substitut. Par contre cet environnement n'est pas en conformité avec l'architecture physiologique. En fait, ces modèles acellulaires ne peuvent pas être identiques puisque le traitement mécanique et chimique pour l'acellularisation du tissu détériore inévitablement la composition et l'organisation des protéines de la matrice (Brown et al. 2002). Par contre, il ne faut pas oublier que les protéines sont sujettes à se déplier ce qui peut être causé par une augmentation de la température, un contact avec d'autres éléments biophysique dénaturants, comme le pH, ou des agents biochimiques, comme l'urée. Par conséquent, une diminution de l'élasticité et de

la résistance mécanique pourrait ne pas permettre la pleine expansion qui est retrouvée avec le tissu natif. Toutefois, les aptitudes pour supporter la néovascularisation sont préservées (Lantz et al. 1993; Kajbafzadeh et al. 2007), du moins la présence de cellules endothéliales précurseurs fut observée après la greffe.

Dans la littérature, plusieurs matrices de tissu acellulaire sont appelées matrice de collagène. Par exemple la matrice de vessie acellulaire aussi appelée bladder acellular matrix graft (BAMG). Le principal avantage de se servir du BAMG pour la reconstruction urétrale, comme d'autres types de tissus acellulaires, est qu'il s'agit d'un matériel déjà disponible sur le marché prêt à l'avance pour utilisation, ce qui évite toute chirurgie supplémentaire comme retrouvée pour le prélèvement des tissus non urologiques. Ainsi, il y a diminution du temps opératoire, puisque le tissu peut être préparé en grande quantité en laboratoire et peut être entreposé jusqu'à son utilisation (Chen et al. 1999; De Filippo et al. 2002). Plusieurs études furent effectuées sur l'utilisation de ce type de matériel avec ou sans la présence de cellules. Une première étude fut effectuée avec du BAMG xénogénique de source porcine sur un modèle de lapin sous forme de greffe par apposition pour une période de 6 mois. Le but des auteurs était d'évaluer si l'utilisation de BAMG était appropriée pour la reconstruction urétrale sur un modèle animal (Chen et al. 1999). Les résultats ont démontré que son utilisation était convenable puisqu'il n'y a pas eu d'évidence d'infection, de rejet du greffon, de fistule ou de formation de lithiase (calcification, pierre). En 2003, une étude fut effectuée sur 28 patients adultes avec du BAMG allogénique provenant de tissu vésical prélevé sur des cadavres humains (El-Kassaby et al. 2003). Ces patients furent suivis sur une période de 36 à 48 mois après l'opération et de bons résultats furent observés puisque seulement 4 fistules sont survenues. Finalement, une autre étude fut effectuée avec du BAMG xénogénique de source porcine sous forme de tube utilisé sur un modèle de lapin durant 1 mois et des résultats opposés furent rapportés (Dorin et al. 2008). Le but de cette étude était de déterminer s'il y avait une limite de longueur maximale pour le défaut urétral dans lequel l'utilisation de matrice acellulaire peut être suffisante pour le remplacement. Leurs résultats ont montré que l'utilisation de BAMG sans cellule sous forme tubulaire peut être utilisée avec succès lors de la réparation d'un court défaut urétral de moins de 0,5 cm. Également, il a bien été documenté que la ré-anastomose primaire, sans greffe interposée, à cette longueur est très efficace. Alors il semblerait que cette information limite la valeur potentielle de l'utilisation du greffon de matrice acellulaire sous forme tubulaire. Cette étude suggère que les défauts urétraux de plus de 1 cm nécessitent l'ajout de cellules dans la matrice acellulaire pour permettre une croissance saine

du tissu urétral en plus d'éviter la formation de fistule et d'autres complications. Également, cette étude met l'accent sur la divergence observée au cours de la dernière décennie dans la littérature à l'égard du succès de l'utilisation de matrices acellulaires sur de petits animaux pour la reconstruction urétrale et de l'échec de ceux-ci sur de plus gros animaux et chez l'humain (Dorin et al. 2008).

À cause de ces problèmes, des études ont commencé à rapporter l'importance d'ensemencer des cellules sur le BAMG pour la reconstruction urétrale. Ces études furent effectuées avec du BAMG, xénogénique ou allogénique, ensemencé de cellules et furent comparés au contrôle de BAMG sans cellule. Une première étude a utilisé du BAMG xénogénique de source porcine sous forme tubulaire ensemencée avec des cellules urothéliales et musculaires lisses extraites de vessies de lapins New Zealand et implantée dans un modèle de lapin pendant 6 mois. Les résultats ont montré que l'usage de BAMG ensemencé de cellules provenant d'un tissu vésical peut être utilisé pour un remplacement tubulaire tandis que le BAMG seul mène à une pauvre formation de tissu et à l'apparition de sténose (De Filippo et al. 2002). Une autre étude avec un modèle allogénique consistant à l'utilisation de BAMG ensemencé de cellules épithéliales extraites de lapin New Zealand fut effectuée avec le même modèle animal pendant 6 mois. Les résultats obtenus sont similaires à l'étude précédente, soit que l'utilisation de BAMG avec ajout de cellules épithéliales donne de meilleurs résultats que le BAMG sans cellule. Également, l'équipe de recherche affirme que l'utilisation des cellules épithéliales semble adéquate pour remplacer les cellules urothéliales (Fu et al. 2007). Par contre, le problème est que 6 mois après la reconstruction, les cellules épithéliales ont gardé leurs formes structurales au lieu d'acquiescer la structure transitionnelle caractéristique aux cellules urothéliales. Une autre étude fut effectuée avec du BAMG allogénique sur un modèle de lapin durant 6 mois, mais cette fois-ci l'équipe de recherche a ensemencé des kératinocytes extraits de la muqueuse orale. Leurs résultats montrent que les kératinocytes oraux ont une bonne biocompatibilité avec le BAMG et confirment les résultats des études précédentes soit que l'utilisation de BAMG avec cellules est supérieure au BAMG sans cellule (Li et al. 2008a,b). Néanmoins, comme dans l'étude avec les cellules épithéliales, les kératinocytes oraux ont conservé leur structure d'épithélium squameux stratifié au lieu d'acquiescer la forme transitionnelle des cellules urothéliales, même 6 mois après l'intervention. En conclusion, le BAMG ensemencé de cellules semble permettre la régénération du tissu à travers le défaut urétral et elle maintient l'écoulement de l'urine sans obstruer la lumière de l'urètre. Par contre, le choix du

type cellulaire est primordial pour retrouver une structure épithéliale similaire à ce qui est observé dans l'urètre natif et non un autre type d'épithélium.

Pour la reconstruction urétrale, d'autres tissus furent étudiés comme greffon de matrice acellulaire. La sous-muqueuse du petit intestin connu commercialement sous le nom de small intestinal submucosa (SIS) (SIS ©, Cook biotech, West Lafayette, IN, É-U) a premièrement été suggérée puisqu'elle a été montré dans une variété d'organes qu'elle peut promouvoir la régénération spécifique du tissu. Le SIS est composé de mailles de collagène avec différents facteurs de croissance intrinsèques, tels les cytokines, les protéines structurales, les glycoprotéines et les protéoglycans, qui vont pouvoir assister la migration aussi bien que la prolifération et la différenciation cellulaire durant le processus de régénération (Voytik-Harbin et al. 1997; Colvert et al. 2002). Les avantages d'utiliser ce type de tissu sont similaires à la matrice BAMG. Une étude pilote fut effectuée avec du SIS xénogénique de source porcine sur un modèle de lapin pendant une période de 3 mois. Le but était d'évaluer la pertinence d'utiliser des pièces de SIS en greffe apposée en urétroplastie et sa faisabilité (Kropp et al. 1998), par contre l'étude fut effectuée sur un court terme et aucun suivi ne fut fait par la suite. Également, l'utilisation d'urètre acellulaire homologue fut suggérée pour la reconstruction urétrale. L'avantage de prendre l'urètre acellularisé vient du fait que la matrice est identique à celle de l'urètre puisqu'elle provient du même tissu. Alors, les différents facteurs de croissance intrinsèques (les cytokines, les protéines structurales, les glycoprotéines et les protéoglycans) sont identiques. Aussi, ce tissu permet une intervention en une seule phase puisqu'il est de même forme et dimension que l'urètre qui doit être remplacé. Une équipe de recherche s'est intéressée à l'utilisation de ce tissu homologue acellulaire à des fins d'urétroplastie sur un modèle de lapin sur une période de 8 mois (Sievert et al. 2000). Ils ont fait une étude complète des différents paramètres concernant la prise du greffon, la revascularisation, les changements observés lors de la régénération et l'amélioration fonctionnelle du greffon dans le temps. Leurs résultats ont démontré une régénération aussi bien fonctionnelle qu'histologique de la matrice d'urètre homologue acellulaire. Une autre équipe a fait une étude similaire. Leur but était le même, mais sur une période de 6 mois au lieu de 8 (Hu et al. 2008). Par contre, les résultats de cette étude ne sont pas aussi convaincants que l'étude précédente, mais sont tout de même similaires. Par la suite, la matrice d'aorte acellularisée fut étudiée. L'objectif de cette équipe de recherche était de créer un modèle expérimental de défaut urétral et de le réparer en utilisant comme substitut un greffon de matrice aortique acellulaire allogénique (Parnigotto et al. 2000). Les avantages d'utiliser ce type de tissu acellulaire proviennent de sa structure initiale qui est déjà de forme tubulaire et possède

les dimensions appropriées pour permettre son application directe. Le chirurgien peut donc décider de la longueur du défaut en plus de la taille de l'urètre à reconstruire. En général, ils ont obtenu de bons résultats après 12 mois, mais aucun suivi n'est retrouvé par la suite dans la littérature.

Par contre, même si ce type de substitut est une approche intéressante, des réactions immunitaires suite à leurs implantations sont retrouvées dues aux protéines cytoplasmiques et aux membranes cellulaires toujours présentes dans les matrices acellulaires, même après les différents traitements pour décellulariser le tissu. De plus, la réaction du système immunitaire face à la dégradation et la présence au long terme de ces tissus sont très mal connues et des études seront nécessaires pour améliorer les connaissances sur ces sujets très importants (Badylak et Gilbert 2008).

1.2.3 Polymères synthétiques

Plusieurs polymères synthétiques furent étudiés au cours des années, seuls ou avec ajout de cellules, pour renforcer le support du matériel. Les principaux avantages d'utiliser des polymères synthétiques sont, qu'ils diminuent les réactions inflammatoires et autres effets secondaires, qu'ils soient biodégradables et qu'ils éliminent le risque de croissance de poil ou sa formation dans la lumière de l'urètre, retrouvé avec les greffes de peaux avec poils. Également, puisque c'est un matériel dit artificiel, cela élimine les complications au site de prélèvement. De plus, il est possible de jouer sur les différentes propriétés du polymère comme sa porosité, sa longueur et son diamètre nécessaire pour l'urétroplastie (Olsen et al. 1992). À la fin des années 1970, certains alloplastiques furent étudiés pour la reconstruction urétrale tels le Silicone, le Dacron, le Gore-Tex et le Teflon sans grand succès sur le chien et l'humain (Gilbaugh et al. 1969; Court et al. 1971, 1973; Hakky 1977). Les résultats obtenus n'ont pas été fructueux et ces matériaux ont mené à des complications postopératoires comme des fistules et des hématomes périurétraux (Dreikorn et al. 1979). Avec l'évolution de la technologie, de nouveaux polymères sont apparus et furent étudiés pour l'urétroplastie. En 1992, un tube formé d'acide polyhydroxybutyrique (PHB) revêtu à l'intérieur d'acide polyglycolique (PGA), fut testé sur un modèle de chien durant 12 mois. Après 8 mois, le polymère avait complètement disparu et la lumière de l'urètre était plus grande que la normale, mais aucune complication ne fut rapportée (Olsen et al. 1992). Les résultats obtenus sont intéressants, mais seulement basés sur des observations

macroscopiques et histologiques. De plus, aucun suivi ne fut fait par la suite. En 1997, une équipe de recherche a suggéré l'utilisation de guide à implant pour corriger les courts défauts urétraux. Ils ont fait une étude pilote sur un nouveau polymère biodégradable et hautement biocompatible, le benzyle ester hyaluronane (Hyaff-11) sur un modèle de lapin pendant 1 mois. Le guide à implant fut comparé à deux groupes contrôles, soit un groupe utilisant un guide de silicone et un contrôle négatif. Les principaux avantages de Hyaff-11, résident dans son inertie, sa possibilité de produire un dispositif avec un taux variable de biodégradation, son profil favorable de toxicité et de biocompatibilité, ses propriétés de protéger les tissus délicats et son potentiel de guérison de plaie. Dans cette étude pilote, aucune complication ne fut observée à l'exception du site de suture où une microfistule est apparue. En histologie, l'utilisation d'Hyaff-11 semble promouvoir la prolifération des cellules urothéliales en forme cuboïdal en opposition à ce qui fut retrouvé avec le guide de silicone, où il y a eu régression de ces cellules en épithélium squameux (Italiano et al. 1997). Aucun suivi ne fut effectué par la suite avec ce type de matériel pour l'urétroplastie.

Plus récemment, une équipe de recherche a étudié l'utilisation d'une prothèse composée d'acide polyglycolique (PGA) revêtue avec une solution d'acide polylactique-co-glycolique (PLGA) etensemencé avec des chondrocytes d'origine bovine (Amiel et al. 2001). Les auteurs ont comparé le modèle en condition statique *in vitro*, dans un bioréacteur et *in vivo*. Le modèle fut implanté sous-cutanéés dans des souris athymiques, pendant 4 et 10 semaines. La capacité d'implanter des chondrocytes dans le tractus génito-urinaire fut démontrée dans la littérature pour le traitement du reflux vésico-urétéral (Atala et al. 1993, 1994; Diamond et Caldamone 1999), de l'incontinence urinaire (Atala et al. 1994) et l'installation de prothèse pénienne (Yoo et al. 1998, 1999). L'objectif de cette étude était d'utiliser des chondrocytes autologues pour obtenir un modèle biocompatible. En général, de bons résultats furent obtenus, mais des études sur le long terme doivent être faites sur des modèles animaux. Également, les effets toxiques provenant de l'urine sur le modèle n'ont pas été regardés. Une autre équipe de recherche a étudié l'usage de polymères synthétiques avec cellules sur un modèle de lapin durant 24 semaines (Fu et al. 2009). Les auteurs ont utilisé une prothèse composée d'acide poly-L-polylactique (PLLA)ensemencée de cellules urothéliales autologues provenant de l'urètre. Ils ont utilisé le PLLA car il possède une force mécanique en section transversale satisfaisante et une flexibilité longitudinale modérée, ce qui rend plus facile l'adaptation de l'expansion du polymère, ce qui permet d'assurer le support pour l'urètre et empêcher son effondrement. La structure du polymère fournit aussi un bon environnement pour l'adhésion cellulaire. Après 12 semaines, le polymère était

dégradé et après 24 semaines, les cellules s'étaient implantées avec succès puisqu'elles ont survécu et se sont bien régénérées. Cependant, cette étude reste tout de même sur un court terme. Comme pour les autres matrices de tissus acellulaires, l'utilisation de cellules dans les nouveaux polymères synthétiques aide à prévenir les complications et une meilleure réparation est observée après l'urétroplastie. Même avec ces résultats, d'autres matériaux sont choisis en premier et comme il est possible de le constater, peu d'études furent effectuées pour supporter leur utilisation après 12 mois pour la reconstruction urétrale.

1.3 Mise en situation de la problématique

1.3.1 L'approche autologue : la méthode d'auto-assemblage

Jusqu'à ce jour, l'intégration des substituts décrits précédemment a causé des complications après la reconstruction urétrale. Ceci est expliqué par la dégradation de matériaux biosynthétiques ou xénogéniques, qui libèreraient des substances non identifiées. Ces dernières années, le domaine de la reconstruction d'organes a connu l'émergence de la méthode d'auto-assemblage (Auger et al. 2002) qui se base sur la capacité des cellules à produire leur propre support matriciel. Cette approche consiste en la culture cellulaire dans des conditions bien définies en plus de la construction d'un échafaudage autologue exempt de biomatériaux exogènes. Au Laboratoire d'organogénèse expérimentale (LOEX), la méthode d'auto-assemblage a prouvé ses aptitudes dans la régénération de la peau, de vaisseaux sanguins et de la cornée (Germain et al. 1993; Auger et al. 1995; Germain et al. 1999; Pouliot et al. 2002; Tremblay et al. 2005), pour la greffe ou l'étude pharmacologique. Les fibroblastes dermiques sont intéressants puisqu'en présence d'acide ascorbique (Davidson et al. 1997; Chepda et al. 2001), ils ont la capacité de synthétiser de la matrice extracellulaire de façon accrue pour ainsi former un feuillet de collagène. Le feuillet autologue peut ainsi être superposé ou enroulé pour créer un environnement tridimensionnel pour la réorganisation de cellules supplémentaires spécifiques de l'organe reconstruit. C'est pourquoi notre équipe de recherche travaille à élaborer des tissus urologiques autologues en étudiant la faisabilité de reproduire la structure physiologique de la muqueuse vésicale et du tube génito-urinaire.

1.3.2 Objectif

Au cours du projet de maîtrise, une évaluation de la faisabilité de produire un modèle urétral autologue et viable avec des cellules humaines fut effectuée grâce à la méthode d'auto-assemblage. Par la suite, pour réaliser les tests précliniques chez l'animal, le porc fut choisi étant donné que son système urinaire est similaire à celui de l'humain. Il s'agit également de l'animal de choix pour le modèle de tissu vésical sur lequel notre équipe de recherche travaille en parallèle. Le plus grand défi est donc d'obtenir un feuillet avec des fibroblastes de porc puisque, dans la littérature, aucune équipe de recherche n'y est parvenue.

2.1 Introduction

Il fut discuté dans le chapitre 1 que plusieurs pathologies peuvent causer des désordres urétraux et que les chirurgiens ont recours à la peau du prépuce, du pénis ou à la muqueuse orale pour corriger ou reconstruire ces défauts. Également, des études sont menées pour trouver des alternatives, comme les matrices acellulaires ou les polymères synthétiques avec ou sans l'ajout de cellules. Par contre, ces options mènent encore à des complications postopératoires, par exemple la fistule, la sténose ou la contraction du greffon, en plus de ne pas donner les résultats attendus.

Ainsi, la nécessité de développer d'autres alternatives de traitement et une connaissance plus approfondie de la biologie cellulaire ont menées vers le génie tissulaire afin de concevoir une solution thérapeutique. Le besoin clinique de trouver une méthode adéquate et fiable pour le remplacement du tissu urétral est essentiel. Pour cette raison, la faisabilité de construire un modèle tubulaire urétral composé entièrement de cellules autologues et de leur propre matrice extracellulaire fut évaluée. Il fut décidé de débiter avec les cellules humaines parce que leurs conditions de culture les plus optimales sont déjà connues contrairement aux cellules animales qui posent problème lors de la culture cellulaire. La construction de l'équivalent fut inspirée de la méthode d'auto-assemblage et du modèle de l'équipe vasculaire (L'Heureux et al. 1993; Auger et al. 2002; Tremblay et al. 2005) élaboré au LOEX et qui consiste à prendre un feuillet de fibroblastes et à en faire un tube. Dans ce chapitre, une caractérisation et une évaluation des propriétés mécaniques de la construction vont permettre d'évaluer la capacité de la méthode à produire un greffon structurellement adéquat et possédant des propriétés mécaniques acceptables. En urologie, cette technique est une nouvelle approche qui peut éventuellement entraîner des changements importants au niveau de la reconstruction urétrale.

2.2 Matériel et méthodes

2.2.1 Extraction cellulaire

Pour cette étude, l'utilisation des fibroblastes provenant d'une biopsie de peau au lieu d'une biopsie vésicale fut choisie. Il n'est pas possible lors de l'extraction cellulaire de séparer les fibroblastes des cellules musculaires lisses et il n'y a pas de marqueur cellulaire adéquat pour indiquer les cellules musculaires lisses. Un site d'extraction plus simple et plus accessible fut donc utilisé. Ainsi, les fibroblastes furent extraits (Figure 2.1) d'un prélèvement cutané humain de 4 cm par 4 cm. La biopsie fut rincée 10 fois dans une solution tampon phosphate saline (PBS) contenant 100 U/ml de pénicilline (Sigma, Oakville, ON, Canada), 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de gentamicine (Schering, Pointe-Claire, QC, Canada) et 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de fungizone (Squibb, Montréal, QC, Canada). Ensuite, la biopsie fut coupée en petits morceaux qui furent placés pour une incubation à 4°C pour 16 heures dans une solution de 500 mg/ml de thermolysine (Sigma) et tampon 1X d'Hépès (MP Biomedicals, Montréal, QC, Canada) contenant 1 mM de calcium chlorure dihydrate à pH 7.4 (CaCl_2 , Sigma). Après l'incubation, la couche épithéliale fut enlevée de la couche dermique par séparation mécanique. La section dermique fut transférée dans une unité de trypsination contenant une solution de collagénase H à 0,125 U/ml (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) pendant 3 heures à 37°C avec agitation. Ensuite, le surnageant fut récupéré et centrifugé 10 minutes à la température de la pièce et les fibroblastes recueillis furent ensemencés dans des flacons 75 cm² de culture cellulaire (Falcon ; Becton-Dickinson, Lincoln Park, NJ, É-U) avec du Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) contenant 10% de sérum de veau foetal (SVF) (Invitrogen), 100 U/ml de pénicilline (Sigma) et 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de gentamicine (Schering). Par la suite, les fibroblastes furent cultivés à 37°C et 8% de CO₂ et le milieu de culture fut changé trois fois par semaine.

Pour ce qui est des cellules urothéliales (Figure 2.2), une biopsie vésicale de 1 cm par 3 cm fut prélevée d'une vessie complète et lavée 10 fois dans une solution PBS contenant les mêmes concentrations de pénicilline, de gentamicine et de fungizone que précédemment décrites. Par la suite, la section supérieure comprenant l'urothélium fut séparée de la couche musculaire à l'aide d'un scalpel et fut coupée en plus petits morceaux qui furent mis dans une solution thermolysine de 500 mg/ml et

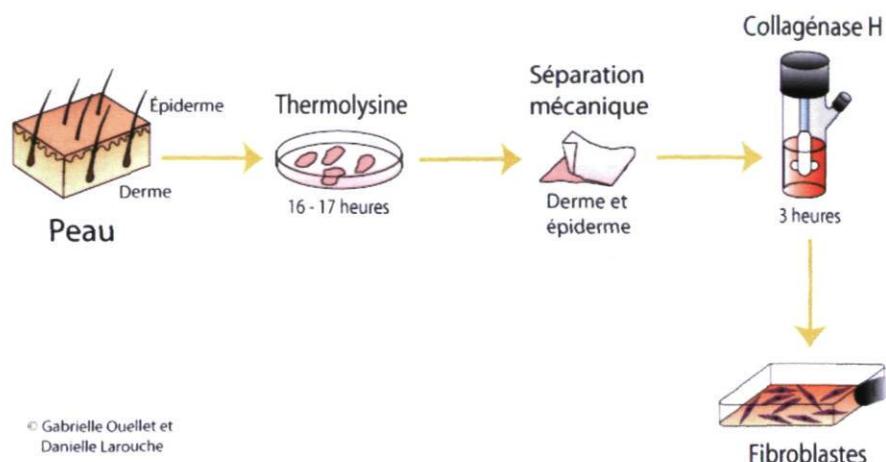


Figure 2.1 – Représentation schématique de l'extraction des fibroblastes d'une biopsie cutanée. (©LOEX).

dans les mêmes conditions d'incubation que les fibroblastes. Ensuite, les cellules urothéliales furent séparées par frottement mécanique du tissu et transférées dans une unité de trypsination contenant de la trypsine-EDTA (Intergen, Toronto, ON, Canada), pour bien dissocier les cellules, et incubées à 37°C avec agitation pendant 30 minutes. Comme pour les fibroblastes, le surnageant fut récupéré et centrifugé 10 minutes à la température de la pièce. Les cellules urothéliales recueillies furent ensemencées dans des flacons 75 cm² de culture cellulaire (Falcon; BD) avec du milieu de culture Dulbecco's Modified Eagle's Medium avec du Ham's F12 (DH) (Invitrogen) contenant 10% de SVF, 5 µg/ml d'insuline (Sigma), 0,4 µg/ml d'hydrocortisone (Calbiochem, Gibbstown, NJ, É-U), 10⁻¹⁰ M de toxine du choléra (Sigma), 10 µg/ml de facteur de croissance épidermique (EGF) (Austral Biologicals, San Ramon, CA, É-U), 100 U/ml de pénicilline (Sigma) et 25 µg/ml de gentamicine (Schering). Également, pour fournir une couche nourricière aux cellules urothéliales, des cellules S3T3 (fibroblastes murins irradiés) furent ensemencées dans les flacons de cultures à une concentration cellulaire de 2×10⁴ cellules/cm². Après l'extraction, les cellules furent cultivées à 37°C et 8% de CO₂ et le milieu de culture fut changé trois fois par semaine.

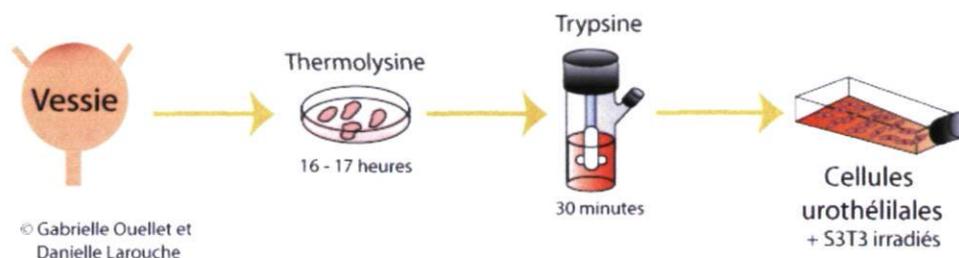


Figure 2.2 – Représentation schématique de l'extraction des cellules urothéliales d'une biopsie vésicale. (©LOEX).

2.2.2 Construction du modèle urétral

Pour réaliser le modèle (Figure 2.3), les fibroblastes furent ensemencés dans des plaques gélatinées de culture de 500 cm² (Corning Incorporated, Corning, NY, É-U) à une concentration de 1×10⁴ cellules/cm². Les fibroblastes furent cultivés 27 jours dans des conditions identiques et dans le même milieu de culture que décrit plus haut, mais en ajoutant 50 µg/ml d'acide ascorbique (Sigma). L'acide ascorbique est un cofacteur qui promeut l'hydroxylation de la proline en hydroxyproline, ce qui stabilise les monomères de collagène présent à l'intérieur de la matrice extracellulaire et permet l'obtention d'un feuillet manipulable. Au 28^e jour, le feuillet de fibroblastes formé fut roulé autour d'un mandrin de 6,5 mm de diamètre pour constituer un tube, puis mis à maturation pendant 21 jours pour favoriser l'adhésion entre les couches matricielles. Cette fois-ci, le milieu de culture DH 10% SVF (Invitrogen) avec 100 U/ml de pénicilline (Sigma), 25 µg/ml de gentamicine (Schering) et 50 µg/ml d'acide ascorbique (Sigma) fut utilisé. Après un total de 49 jours, le mandrin fut enlevé et une canule fut installée à chacune des extrémités du tube de fibroblastes pour permettre de garder la lumière ouverte (Figure 2.6 A). Par la suite, des cellules urothéliales furent décollées du flacon 75 cm² de culture à l'aide de trypsine (Invitrogen), centrifugées 10 minutes à 1180 rpm à la température de la pièce et 3 ml de suspension cellulaire à une concentration de 1 million/ml fut ensemencée à l'intérieur du tube de fibroblastes. Les contrôles ne furent pas ensemencés de cellules urothéliales. Pour permettre une meilleure adhésion des cellules aux parois du tube, le substitut fut placé dans une chambre (Figure 2.4 A) qui à son tour fut placée sur une machine rotative à approximativement 1 tour/minute pendant deux heures suivies de deux temps de repos de 30 minutes de chaque côté des chambres. Par la suite, les équivalents avec ou sans cellules urothéliales furent placés en perfusion

dans un bioréacteur conçu au LOEX (Figure 2.4 B) pour permettre de contrôler le débit et faire passer du milieu de culture des cellules urothéliales décrites plus haut grâce à une pompe (Ismatek™, Cole-Palmer Canada inc., Montréal, QC, Canada). Le bioréacteur fut placé dans un incubateur à 37°C avec 8% de CO₂. Dans le but de stimuler la prolifération et la maturation cellulaires, la perfusion fut maintenue pendant une semaine et les milieux de culture furent changés après 4 jours (Magnan et al. 2009).

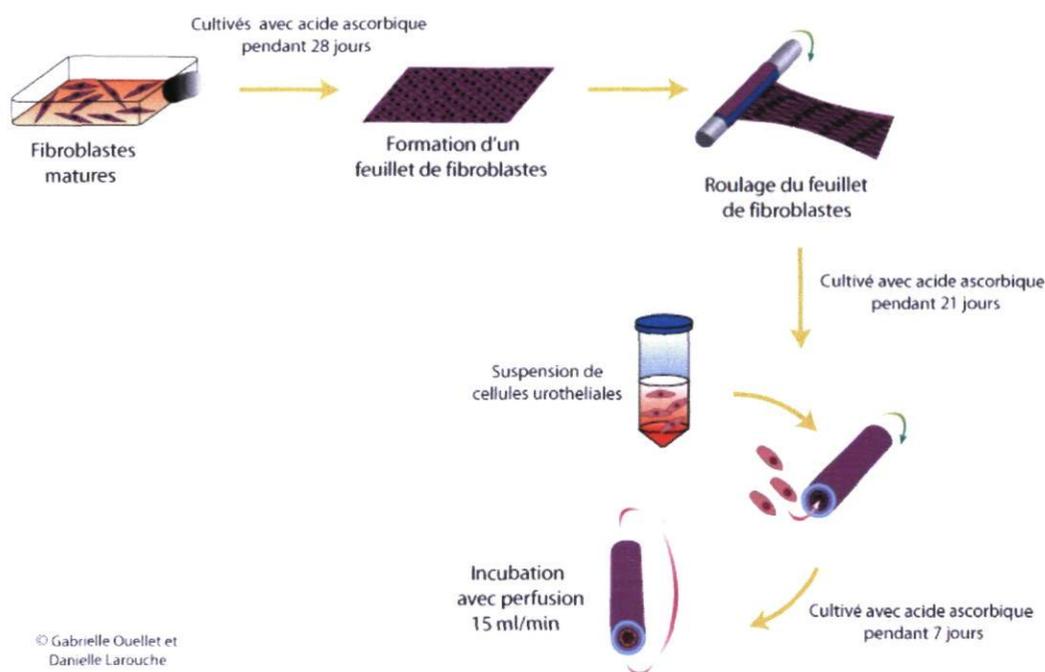


Figure 2.3 – Représentation schématique du modèle urétral par la méthode d'auto-assemblage. (©LOEX).

2.2.3 Test de résistance mécanique

La résistance mécanique de l'équivalent urétral fut évaluée après 14, 21 et 28 jours de culture. Le 28 jours inclut 21 jours de maturation sur mandrin et 7 jours avec ou sans perfusion dans le bioréacteur. Ils furent montés dans un appareil qui les a soumis à un chargement hydrostatique utilisant du PBS tout en surveillant la pression interne. À travers un programme d'automatisation conçu par ordinateur utilisant LabView™ (National Instruments, Austin, TX, É-U), un moteur à pas (Excitron Corp., Boulder, CO, É-U) fut contrôlé pour comprimer une seringue insérée entre

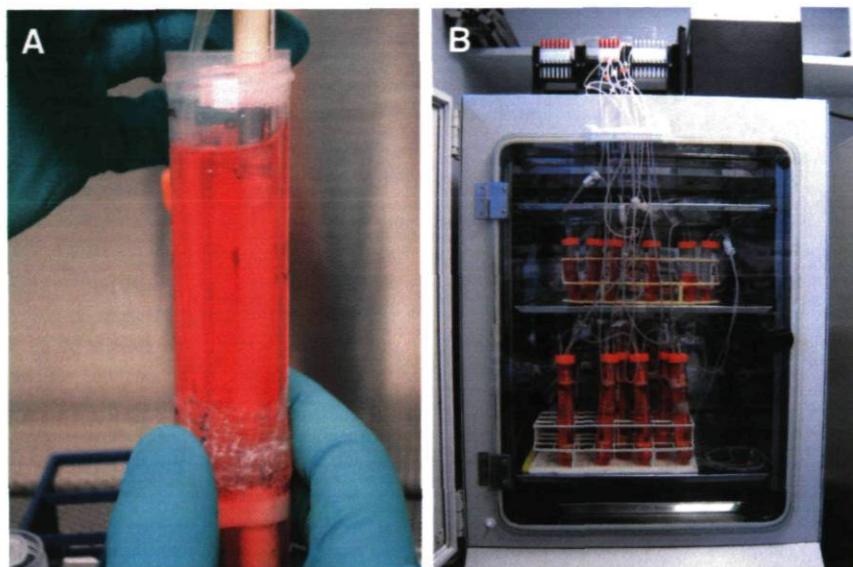


Figure 2.4 – Bioréacteur. A) Montage de l'équivalent urétral dans la chambre. B) Assemblage complet du bioréacteur avec les chambres à l'intérieur d'un incubateur à 37°C et la pompe pulsatile à l'extérieur.

deux plaques d'un étau. Le débit fut gardé à 8 ml/min jusqu'à l'éclatement du substitut. Pour éliminer la compliance du système, des tubes rigides (Cole-Palmer Canada inc.) furent utilisés pour joindre le montage à un capteur de pression (Cole-Palmer Canada inc.). Le capteur de pression fut employé pour surveiller les variations de pression à l'intérieur de l'équivalent urétral à l'aide d'une carte d'acquisition des données (National Instruments). La pression de rupture fut considérée comme étant la poussée maximale atteinte avant la défaillance du tube cellulaire. L'inspection visuelle du diagramme des courbes de pression a permis une lecture rapide du point de rupture, de l'analyse du comportement du modèle et l'estimation des conditions les plus appropriées. Également, des urètres de porc natif furent utilisés pour déterminer le point de rupture contrôle pour l'équivalent urétral (Magnan et al. 2009).

2.2.4 Résistance aux sutures

À la fin de la culture cellulaire des tubes de fibroblastes, soit 21 jours de maturation sur le mandrin et 7 jours de perfusion dans le bioréacteur, des tests de suture furent effectués avec des sections de

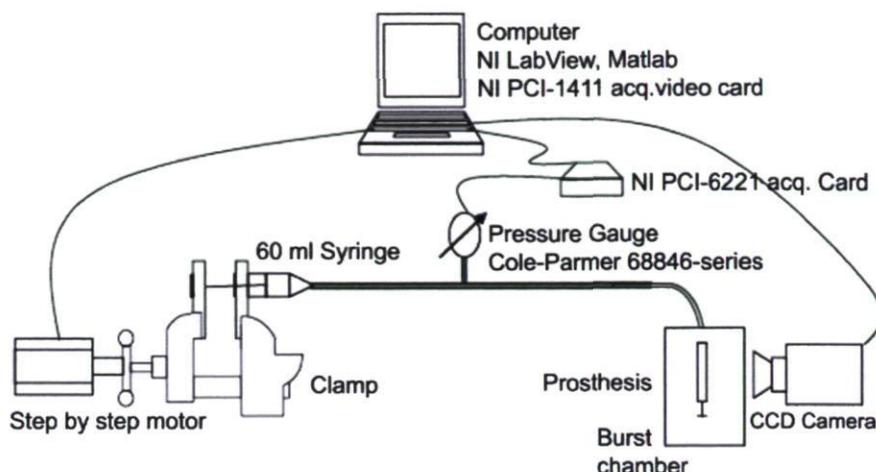


Figure 2.5 – Représentation schématique de la procédure pour évaluer la résistance mécanique de l'équivalent urétral. (©R. Gawin/LOEX).

tubes et du fils de suture absorbable synthétique 6-0 (Syneture, Norwalk, CT, É-U) (Magnan et al. 2009).

2.2.5 Viabilité cellulaire

Deux méthodes différentes furent exécutées pour évaluer la viabilité et la migration des cellules après 7 semaines de cultures et 1 semaine de perfusion. Premièrement, les cellules furent extraites de nouveau à partir d'un équivalent urétral utilisant la même procédure d'extraction décrite précédemment. Deuxièmement, la méthode à l'aide d'explant sur les tubes constitués de fibroblastes fut utilisée pour évaluer leur potentiel de migration. Cette méthode consiste à couper le substitut en petits morceaux et de les placer avec du milieu de culture dans un pétri de culture. L'observation de la migration à partir de l'explant (Figure 2.10) et la multiplication des cellules furent effectuées à différents temps. Pour les deux méthodes, les cellules furent placées à 37°C dans un incubateur humidifié avec 8 % de CO₂ et le milieu de culture fut changé trois fois semaine jusqu'à l'obtention de la confluence (Magnan et al. 2009).

2.2.6 Caractérisation

Des sections de tubes constitués de fibroblastes avec ou sans cellules urothéliales furent fixées dans le fixateur de tissu Histochoice (Armesco, Solon, OH, É-U) et enrobées dans de la paraffine. Des sections histologiques de 5 μm furent colorées au trichrome de Masson. Le diamètre interne des constructions fut mesuré au même moment que la résistance mécanique. Pour ce qui est du marquage à l'immunofluorescence, des sections de 20 μm furent fixées dans l'acétone à 100%, bloquées dans du PBS contenant 1% (poids/volume) de sérum-albumine bovin (BSA) (Sigma) et incubées 1 heure avec l'anticorps primaire. Les anticorps primaires qui furent utilisés sont : un IgG de lapin anti-collagène de type I (dilution 1 :100) (Cedarlane Laboratories Ltd, Burlington, ON, Canada) pour marquer le collagène de type I présent dans la matrice extracellulaire sécrétée par les fibroblastes, un IgM de souris anti-fibronectine cellulaire (dilution 1 :400) (Sigma) pour voir la connexion des cellules fibroblastiques à la matrice extracellulaire, un IgG de lapin anti-cytokératine 8/18 (dilution 1 :1000) (ARP, Belmont, MA, É-U) pour voir l'épithélium transitionnel créé par les cellules urothéliales et un anticorps de lapin anti-laminine (dilution 1 :400) (Sigma) pour détecter la lamina propria sous les cellules urothéliales. Les anticorps secondaires utilisés furent couplés à un fluorochrome rhodamine (rouge) ou Alexa 488 (vert). Les noyaux furent marqués avec un colorant nucléaire, le Hoesch. Les résultats furent observés avec un microscope Nikon Eclipse E800 intégré à un système confocal Nikon C1 (Nikon, Tokyo, Japan) et les images furent traitées avec le logiciel Adobe Photoshop 9.0 (Adobe Systems, San Jose, CA, É-U).

2.2.7 Western Blot

Pour effectuer le western blot, des sections de tubes de fibroblastes avec ou sans cellules urothéliales furent broyées manuellement dans de l'azote liquide, mis dans un tampon de lyse et le dosage des protéines fut analysé par spectrophotométrie. Ensuite, les échantillons furent bouillis 10 minutes à 100°C et centrifugés 10 minutes à 10 000 G. Lors de l'électrophorèse, 20 μl furent ajoutées par puits au gel SDS-polyacrylamide et migrées dans un tampon d'électrode pendant 1 heure et 45 minutes à 120 volts. Par la suite, le transfert des bandes fut effectué sur une membrane PVDF (Millipore, Tokyo, Japon) activée au méthanol à 4°C pendant 1 heure à 100 volts. Pour ce qui est

de l'immunodétection, la membrane de PVDF fut bloquée avec du TBS-Tween 0,05% et lait 5% pendant 30 minutes avec agitation. Ensuite, une incubation avec l'anticorps primaire, soit le même anti-cytokératine 8/18 utilisé pour l'immunofluorescence, fut employé à une dilution de 1 :3000 dans une solution de TBS-Tween 0,05% et lait 5% durant 1 heure avec agitation. S'en est suivie 3 rinçages de 5 minutes dans du TBS-Tween 0,05% avec agitation et une incubation avec l'anticorps secondaire, un anti-IgG-IgM de souris peroxydase diluée à 1 :2000, pendant 30 minutes avec agitation. Pour permettre la détection des bandes de protéines, la membrane fut incubée 2 minutes dans une solution ECL (GE Healthcare, Baie-d'Urfé, QC, Canada) et exposée à un film anti-rayon X (Kodak Carestream Health, Inc., Rochester, NY, É-U) dans une chambre noire. Pour confirmer le marquage des protéines sur la membrane, l' α -tubuline fut utilisée comme contrôle.

2.3 Résultats

2.3.1 Morphologie de l'équivalent urétral

Du point de vue macroscopique, l'équivalent urétral reconstruit (Figure 2.6) fut uniforme, malléable et résistant aux manipulations. Également, il supporta sans problème la pression de perfusion à l'intérieur du bioréacteur. Le diamètre interne des constructions cylindriques était de 6 mm avant l'ensemencement des cellules urothéliales et d'environ 8 mm après une semaine dans le bioréacteur. Aussi la résistance du tissu aux sutures fut évaluée et deux tubes ont permis l'obtention d'un peu plus de 14 cm de longueur (Figure 2.6 D et E).

2.3.2 Caractérisation de l'équivalent

Au niveau histologique (Figure 2.7), après une coloration au trichome de Masson du tissu reconstruit, une épaisse couche de matrices extracellulaire en bleu fut observée en plus d'une belle cohésion entre les différentes couches matricielles comme chez l'urètre de porc natif (Figure 2.7 A). En plus, en rose, fut observée une prolifération des cellules urothéliales, de 4 à 6 couches, formant un urothélium

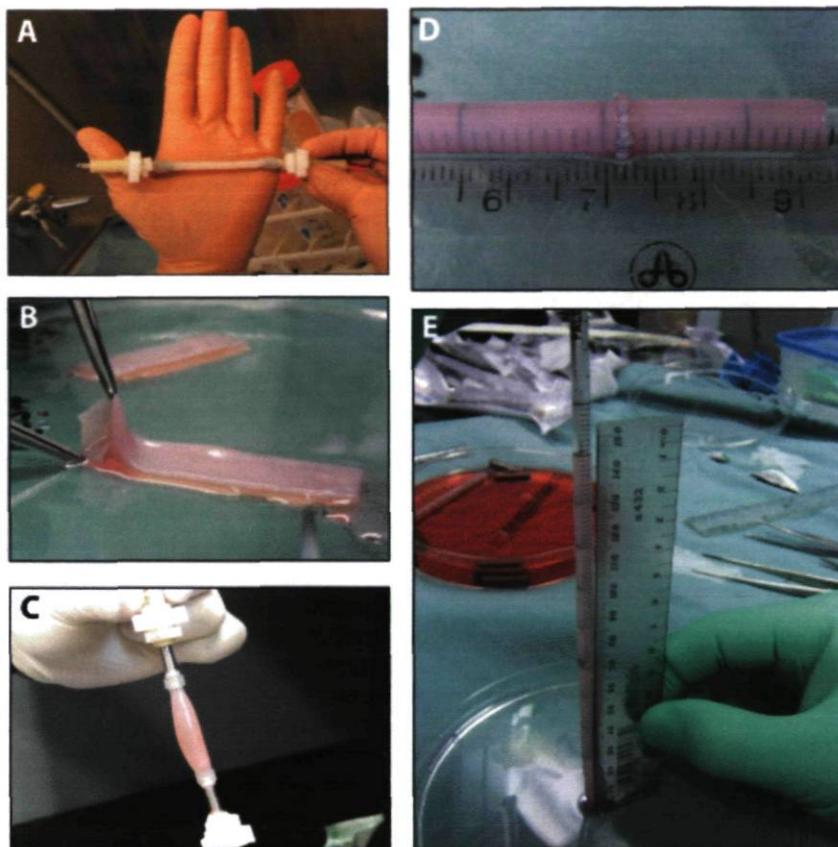


Figure 2.6 – Vue macroscopique du modèle urétral après 7 semaines de culture et 1 semaine en perfusion. A) Montage du substitut avant de le mettre dans le bioréacteur. L'équivalent qui fut obtenu est B) uniforme, résistant aux manipulations, C) robuste à la pression du milieu de culture et D) facilement suturable puisque E) 2 tubes furent suturés ensemble et ont donné un peu plus de 14 cm.

pluristratifié, lequel est retrouvé tout au long de la lumière de l'équivalent. Également, la surface apicale des cellules urothéliales suggère une morphologie qui s'approche des cellules parapluies qui sont retrouvées dans un urothélium différencié. En résumé, une similarité est constatée avec le modèle urétral reconstruit par la méthode d'auto-assemblage et l'urètre de porc natif.

Par la suite, une caractérisation à l'immunofluorescence fut effectuée afin de confirmer les résultats observés en histologie. Pour détecter la matrice extracellulaire, des marquages du collagène de type I, le type de collagène le plus retrouvé dans la matrice extracellulaire, et de la fibronectine, qui a un rôle majeur dans la migration cellulaire, fut effectué. Dans les deux cas, le marquage fut constaté à la pleine hauteur du substitut (Figure 2.8 A et B). Par la suite, pour détecter les cellules urothéliales

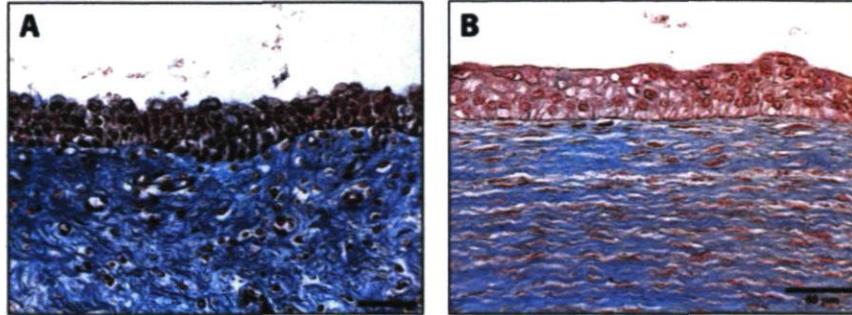


Figure 2.7 – Coupe histologiques. A) *Urètre de porc natif.* B) *Équivalent urétral reconstruit par la méthode d'auto-assemblage.* (Barre de mesure : 50 μm)

et évaluer si la lame basale était présente sous l'urothélium, un marquage à la cytokératine 8/18 (Romih et al. 2002), un marqueur de l'épithélium transitionnel, et à la laminine furent effectués sur les tissus reconstruits perfusés dans le bioréacteur. Les résultats ont montré la présence d'une belle prolifération des cellules urothéliales en plus d'appuyer la morphologie de forme parapluie des cellules apicales observées en histologie (Figure 2.8 C). En plus, la présence de la lame basale uniforme sous les cellules urothéliales fut observée (Figure 2.8 D). Pour confirmer la présence de la cytokératine 8/18 à l'intérieur de l'équivalent urétral et la spécificité du marqueur en immunofluorescence, un western blot fut effectué (Figure 2.9). L'équivalent urétral, avec perfusion (*puits 3, 4, 5*) ou sans perfusion (*puits 6, 7*), fut comparé à la vessie de porc (*puits 1*) et au tube constitué de fibroblastes seuls avec (*puits 8*) ou sans perfusion (*puits 2*). Les résultats semi-quantitatifs ont montré la présence de la cytokératine 8 chez le tissu natif et le substitut avec ou sans perfusion. Par contre, pour la cytokératine 18 fut seulement détectée que chez le contrôle et l'équivalent avec perfusion. Ces résultats suggèrent que la perfusion est importante pour la prolifération et la différenciation plus complète de l'urothélium. Donc en combinant les résultats obtenus, le modèle urétral reconstruit avec perfusion montre des caractéristiques retrouvées chez le tissu natif tel un urothélium pluristratifié qui repose sur une lame basale en plus de la présence d'une épaisse couche de matrice extracellulaire.

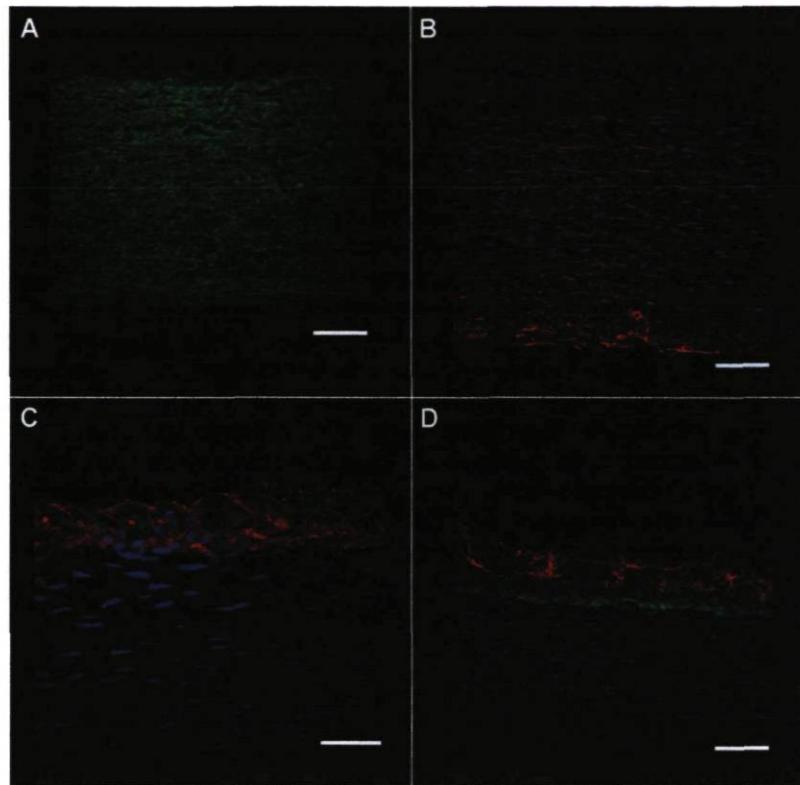


Figure 2.8 – Caractérisation en immunofluorescence de la matrice extracellulaire (A et B), de l'urothélium (C) et de la lame basale (D). A) Collagène de type I. B) Fibronectine. C) Cytokératine 8/18. D) Double marquage à la cytokératine 8/18 en rouge et la laminine en vert. (Barre de mesure : 50 μm)

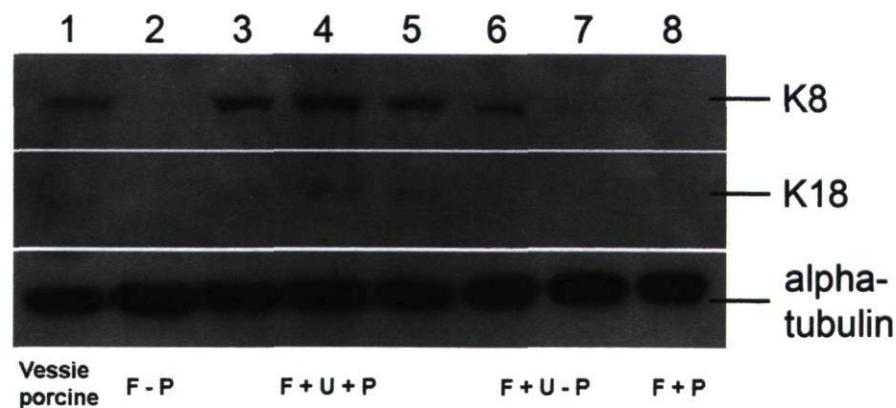


Figure 2.9 – Confirmation par western blot de la présence de la cytokératine 8/18 dans les substituts reconstruits. Puit 1 : tissu natif. Puits 2 et 8 : contrôle sans cellules urothéliales. Puits 3, 4 et 5 : équivalent avec perfusion. Puits 6 et 7 : équivalent sans perfusion. (F : fibroblastes, U : cellules urothéliales et P : perfusion)

2.3.3 Viabilité cellulaire

Pour déterminer la viabilité cellulaire du modèle urétral après 7 semaines de culture et une semaine en perfusion, une deuxième extraction des deux types cellulaire fut effectuée et un taux de mortalité inférieur à 2 % fut obtenu, ce qui correspond à la valeur standard pour une culture cellulaire. Pour la méthode d'extraction par explant, en moins de 24 heures les fibroblastes ont commencé à migrer et à coloniser le pétri de culture (Magnan et al. 2009).

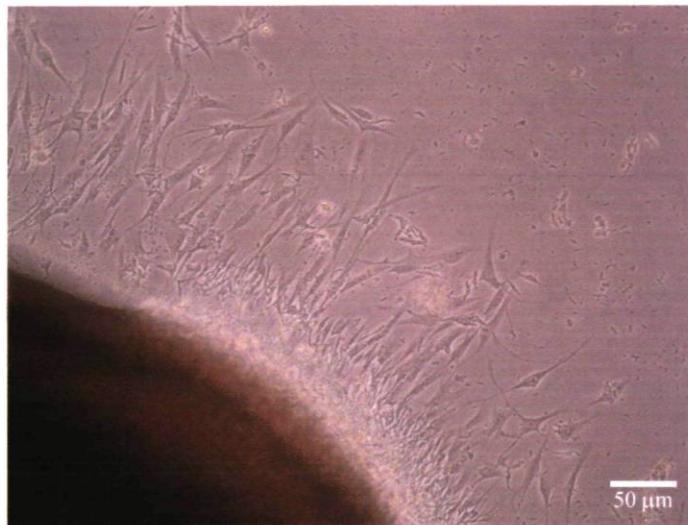


Figure 2.10 – Méthode d'extraction par explant pour évaluer la viabilité cellulaire du modèle urétral. *Migration des cellules vers l'extérieur du substitut. (Barre de mesure : 50 µm)*

2.3.4 Résistance mécanique

L'appareil développé au laboratoire a permis l'évaluation avec précision du point de rupture des équivalents urétraux construits à l'aide de la méthode d'auto-assemblage (Figure 2.11). Des urètres porcins furent testés à titre comparatif. Après 14 jours de maturation des tubes de fibroblastes sur mandrin, il fut possible d'évaluer leur solidité et une pression de rupture moyenne de 803 ± 22 mmHg (millimètre de mercure) ($n=6$) fut obtenu. Après 21 jours de maturation, les tubes de fibroblastes ont gagné en résistance en endurant une pression moyenne de 1133 ± 76 mmHg ($n=5$), ce qui représente une augmentation moyenne de 41,1 %. Après l'ajout d'une semaine avec perfusion dans le bioréacteur,

les équivalents avec cellules urothéliales ont obtenu une pression moyenne de rupture de 1703 ± 103 mmHg ($n=5$), tandis que les substituts sans cellules urothéliales ont obtenu une pression moyenne de 1761 ± 248 mmHg ($n=3$). Après 4 semaines de maturation sans bioréacteur, une pression moyenne de rupture de 1801 ± 158 mmHg ($n=6$) fut observé. L'urètre de porc a obtenu pour sa part une pression de rupture maximale de 583 mmHg et une pression moyenne de 418 ± 66 mmHg ($n=4$), ce qui est inférieur à la pression qui fut retrouvée chez tout les équivalent à chacun des temps de maturation. Pour toutes les périodes de maturation, les couches des tubes de fibroblastes sont restées fusionnées les unes aux autres formant un tissu tubulaire uniforme. En plus, après une semaine dans le bioréacteur, la résistance mécanique de l'équivalent et son intégrité histologique furent maintenus. Il est très intéressant de confirmer que le substitut reconstruit peut conserver ces propriétés pendant au moins une semaine dans des conditions pulsatiles. En plus, ces résultats démontrent que la présence de cellules urothéliales n'influence pas à la hausse ou à la baisse la résistance mécanique du modèle urétral reconstruit (Magnan et al. 2009).

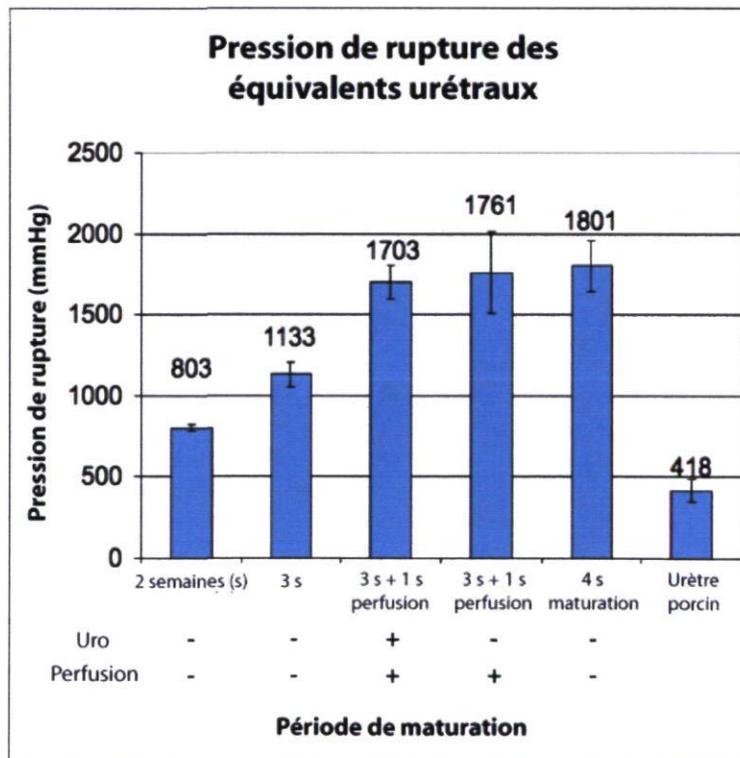


Figure 2.11 – Évaluation de la résistance mécanique par test d'éclatement de l'équivalent urétral à différents temps de culture. (Uro : cellules urothéliales)

2.4 Discussion

Comme il en fut question dans le chapitre 1, la quantité limitée de tissus urologiques autologues disponibles pour la reconstruction urétrale et les complications multiples associées à ces tissus ou à l'utilisation de matériaux d'origine non urologique (les matrices acellulaires et les polymères synthétiques) ont apporté un intérêt croissant pour développer un substitut urologique mieux adapté physiologiquement avec le moins de complication possible. Dans ce chapitre, il fut démontré qu'il est maintenant possible de recréer un équivalent urétral tubulaire en utilisant la méthode d'auto-assemblage, et ce, sans utilisation de matrice exogène.

Pour des motifs éthiques, il n'est pas possible de prélever des échantillons urologiques sains chez l'humain, mais le prélèvement chez des donneurs cadavériques nous sera possible si les familles consentent au don d'organes pour des fins de recherche. Pour cette raison, des tissus porcins natifs, tels l'urètre et la vessie, furent utilisés pour comparer le modèle aussi bien au niveau de la caractérisation que de la résistance mécanique puisque son système urinaire est physiologiquement et proportionnellement similaire à celui de l'humain.

Chaque construction tubulaire inclut dans ce chapitre a montré une force mécanique supérieure au contrôle, l'urètre de porc natif, ce qui démontre notre capacité de produire un tissu *in vitro* adéquat pour la greffe. L'ajout de cellules urothéliales aux tubes constitués de fibroblastes n'a en rien diminué leur résistance mécanique. De plus, les résultats ont montré que les équivalents peuvent soutenir une stimulation pulsatile pendant une semaine complète sans perdre leur intégrité mécanique et histologique en plus de bonifier la prolifération et la différenciation des cellules urothéliales. Également, les cellules à l'intérieur du substitut sont toujours viables après 8 semaines en culture cellulaire, ce qui démontre que les cellules sont dans des conditions de culture favorables. Il fut aussi montré qu'il est possible de faire un tube d'un peu plus de 14 cm de longueur, après suture de deux équivalents urétraux, ce qui est intéressant pour la correction chez l'homme d'un plus long défaut urétral. Par conséquent, le développement de cette technique mène à une méthode alternative pour la reconstruction urétrale dans lequel une large variété de pathologies congénitales ou acquises nécessite une reconstruction. L'équivalent urétral élaboré grâce au génie tissulaire et à la méthode d'auto-assemblage ne contient aucun autre matériel que les cellules et leur matrice extracellulaire.

Ainsi, les cellules utilisées seront prélevées sur le patient nécessitant la greffe ce qui va permettre la production d'un substitut complètement autologue en plus d'éviter le besoin d'une croissance cellulaire après l'implantation du greffon puisqu'il est déjà complètement viable.

En perspectives, l'ajout de cellules endothéliales au modèle urétral devrait diminuer le temps pour la revascularisation du greffon en postopératoire. Ce projet s'appuie sur une étude menée au laboratoire et qui a montré que l'ajout de cellules endothéliales dans un modèle de peau a permis l'inosculation du greffon 4 jours après la greffe au lieu de 14 jours sans cellule endothéliale (Tremblay et al. 2005). Également, le prochain objectif est de faire une étude chez un modèle animal afin d'effectuer des tests pré-cliniques et de comprendre les impacts et les interactions physiologiques *in vivo* du modèle. À plus long terme, avec l'ajout des cellules musculaires lisses, puisque l'équivalent est tubulaire, il sera possible de transformer et d'adapter le modèle pour la réparation d'uretère.

2.5 Conclusion

L'équivalent urétral autologue est un modèle innovateur qui offre une alternative prometteuse sans matrice exogène pour le remplacement ou la reconstruction urétrale. Comme pour les tissus alternatifs, l'extraction cellulaire va nécessiter un ensemencement à partir d'une biopsie de peau, mais de plus petite superficie. Pour obtenir les cellules urothéliales, un lavage vésical peut être pratiqué chez le patient ce qui rend la méthode encore moins invasive. Ainsi, le plus grand avantage du modèle urétral reste qu'il sera constitué des cellules de l'éventuel patient, ce qui représente une alternative prometteuse pour diminuer les réactions inflammatoires, et ainsi permettre une greffe exempte de rejet.

Production of Connective Pig Sheet by Tissue Engineering

3.1 Résumé

Plusieurs pathologies sont à l'origine de désordres urétraux. Pour traiter ces troubles, des biomatériaux acellulaires ou des tissus non-urologiques autologues, lambeaux ou greffes, sont utilisés et mènent trop souvent à des complications post-opératoires. L'alternative proposée est de reconstruire, selon la méthode d'auto-assemblage, un modèle urétral autologue. Pour effectuer les tests précliniques chez l'animal, le porc fut choisi pour sa similarité avec l'humain. Afin de produire un feuillet avec les fibroblastes de porc, une étude de prolifération ainsi que des tests d'optimisation au niveau du site d'extraction et de la culture cellulaire furent effectués pour permettre la production d'un feuillet dans les conditions les plus optimales. Lors de l'obtention d'un feuillet, des empilements en tricouche furent exécutés. Par la suite, une caractérisation de la matrice extracellulaire sur coupe histologique et par immunofluorescence fut réalisée. Suite aux tests d'optimisation, la muqueuse orale et la température à 39°C furent les deux points primordiaux qui ont permis la formation d'un feuillet avec les fibroblastes de porc. Le feuillet obtenu est macroscopiquement uniforme et résistant aux manipulations ce qui a rendu possible l'empilement en tricouche. Finalement, le collagène de type I et la fibronectine furent montrés par immunofluorescence, confirmant la présence de matrice extracellulaire. L'équivalent urétral développé dans notre laboratoire est un modèle innovateur dans le domaine de la reconstruction urologique. La production d'un feuillet avec les fibroblastes de porc est une étape importante qui va permettre de compléter le modèle autologue porcin et de passer aux tests précliniques chez le porc.

3.2 Introduction

In clinical urology, several conditions like hypospadias and strictures cause urethral disorders that will require surgical correction to replace the injured segment (Campbell et al. 2007). To rectify those problems, partial or total reconstruction is required. The actual gold standard used by surgeon is the penile foreskin (Vyas et al. 1987; Theodorescu et al. 1998) and when it is not available, oral mucosa is the alternative (Caldamone et al. 1998; Barbagli et Lazzeri 2006; Markiewicz et al. 2007, 2008). Those non-urological tissues are mainly used because they are easily harvested and hairless. The hair growth in the reconstructed urethra will prevent the possible formation of lithiasis post-surgically. Also, many studies have been made with other biomaterials, like xenogenic acellular tissues matrices (Kropp et al. 1998; Chen et al. 1999) and synthetic polymers (Olsen et al. 1992; Italiano et al. 1997; Parnigotto et al. 2000), to replace the non-urological tissues when they are no more available. Initially, they were mainly used alone, but as studies evolved, cells were added to increase the viability of the models, aiming at decreasing the complications like stenosis and graft rejection (Sievert et al. 2000; Amiel et al. 2001; De Filippo et al. 2002; Dorin et al. 2008; Fu et al. 2009). The animal model used for those studies was usually the New Zealand rabbit because it is a standard animal model used for urethral reconstruction (Vyas et al. 1987; Parnigotto et al. 2000; Amiel et al. 2001; Fu et al. 2009). Two studies have been made on a dog model (Olsen et al. 1992; Xu et al. 2003) and only two studies on human cadaveric tissues (El-Kassaby et al. 2003; Xu et al. 2009). Overall, there is a lack of studies made with larger animal model. Because the alternative solutions available still lead to major complications and graft rejection; there is still a need for autologous tissues with properties similar to the urethra.

For the past few years, the organ reconstruction field witnessed the emergence of the self-assembly method (Auger et al. 2002), based on the cells capacity to produce their own matrix support. This approach consists of a cell culture in well-defined conditions that will construct an autologous scaffold free of exogenous biomaterials. In previous studies, the self-assembly method proved its capacities in blood vessels (L'Heureux et al. 1998), cornea (Germain et al. 1999), and skin (Germain et al. 1993; Auger et al. 1995; Pouliot et al. 2002) regeneration, specifically for grafting in the treatment of burned patients or pharmacological studies. In urological reconstruction, we have been able to successfully reconstruct *in vitro* an autologous, watertight and resistant vesical equivalent (Bouhout

et al. 2010) and urethral substitute (Magnan et al. 2009) with human cells. Human dermal fibroblasts are interesting cells since, in presence of ascorbic acid (Davidson et al. 1997; Chepda et al. 2001), they have the ability to synthesize extracellular matrix (ECM) in an increased way to form a collagen-layer. The autologous sheets can then be superimposed or rolled to create a three-dimensional environment for the reorganization of additional cells specific to the reconstructed organ. However, the production of sheets with fibroblasts extracted from pig skin, using the same parameters as described above, is more complicated because these cells are not able to synthesize enough ECM under standard conditions.

To overcome urethral replacement tissue limitations, we elected to work with a pig model for his structural and dynamic similarities with the human urinary system. In order to make possible *in vivo* long-term studies, we investigated the feasibility to produce a porcine fibroblasts sheet to obtain an autologous urological graft. This study presents the characterization and step of development of our reconstructed tissue.

3.3 Materials and Methods

3.3.1 Cell extraction

Human and porcine skin fibroblasts cells were extracted from a small skin biopsy (Figure 3.1). The biopsies were cut 4 by 4 centimeters (16 cm^2) and washed in phosphate-buffered saline (PBS) solution containing 100 U/ml penicillin (Sigma, Oakville, ON, Canada), 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamicin (Schering, Pointe-Claire, QC, Canada) and 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fungizone (Squibb, Montreal, QC, Canada). Then, the skin was cut into small pieces and put in a solution of 500 mg/ml thermolysin (Sigma) and Hepes 1X buffer (MP Biomedicals, Montreal, QC, Canada) with 1 mM calcium chloride dihydrate (CaCl_2 , Sigma) (pH 7.4) for an overnight incubation at 4°C . To obtain pig oral fibroblasts (Figure 3.1), cells were extracted from an oral biopsy of 6 mm in diameter. The biopsies were also washed in a PBS solution containing penicillin, gentamicin and fungizone at the same concentrations. Then the oral mucosa biopsy was cut into small pieces and put overnight at 4°C in a solution of 2,5 mg/ml Dispase

II (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) and Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Invitrogen, Burlington, ON, Canada). After the incubation, the epithelial layers were mechanically removed from the connective tissue section containing fibroblasts. The last sections were transferred in a trypsination unit containing a collagenase H solution (0,125 U/ml, Roche Diagnostics) and put at 37°C for an overnight incubation. After a ten minutes centrifugation at 1180 rpm at room temperature, the cells were seeded in 75 cm² tissue-culture flasks (Falcon; Becton-Dickinson, Lincoln Park, NJ, USA) with DMEM supplemented with 10% Foetal Bovine Serum (FBS)(Invitrogen), 100 U/ml penicillin (Sigma) and 25 µg/ml gentamicin (Schering). The human and porcine fibroblasts were cultured with 8% of CO₂ at 37°C and 39°C, and the culture medium was changed three times a week. Cells were used at passage 6 for human skin fibroblasts (HSF) and pig skin fibroblasts (PSF), and pig oral fibroblasts (POF) at passage 4.

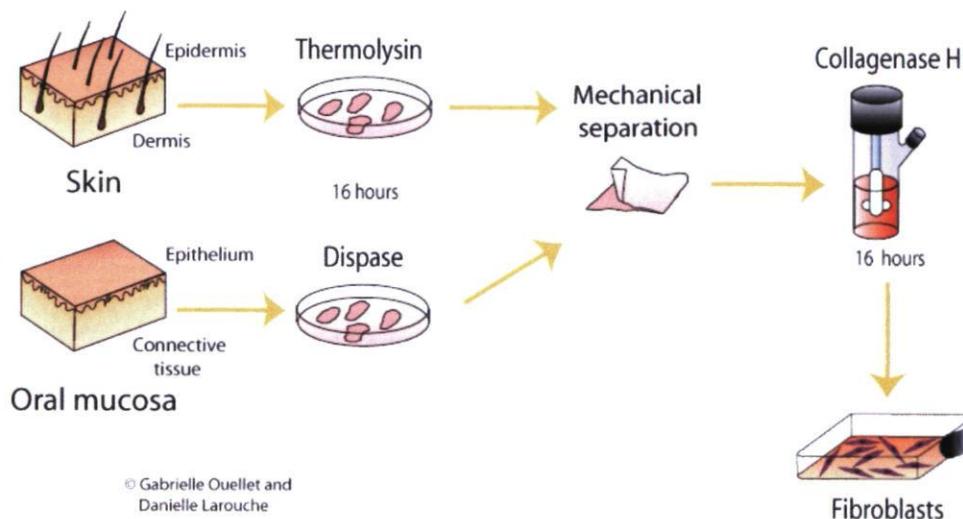


Figure 3.1 – Schematic representation of fibroblasts extraction from each sites of biopsy. (©LOEX).

3.3.2 Cell culture

To study the fibroblasts proliferation, cells were seeded at $8,3 \times 10^3$ cells/cm² in 6-wells culture plate (Falcon; BD) and cultured with DMEM supplemented with 10% FBS with penicillin and

gentamicin as described in cell extraction section. At day 1, 3, 5 and 7, three wells were trypsinated and three cell counts for each well were taken with a coulter (Beckman Coulter, Mississauga, ON, Canada).

To obtain a fibroblasts sheet, cells were seeded at $8,3 \times 10^3$ cells/cm² in 6-wells culture plate or at 8×10^3 cells/cm² in 25 cm² tissue-culture flasks (Falcon; BD) with the same culture medium supplemented with 50 µg/ml of ascorbic acid (Sigma) and 235,2 µg/ml of glutamine (Karna et al. 2001)(Invitrogen) to stimulate the production of ECM. The cells were cultured in the same culture conditions under 8% of CO₂ at 37°C and 39°C and the culture medium was changed three times a week. In the 6-wells plate, biopsy was made at day 7, 14 and 21 to see if there was formation of a fibroblasts sheet. For the 25 cm² tissue-culture flasks, when a fibroblasts sheet was formed at day 20, three layers were superimposed one over another and maintained in culture under the same culture conditions and a biopsy was performed 3 days later.

3.3.3 Histological analysis

Fibroblasts sheets were fixed with Histochoice tissue fixative (Armesco, Solon, OH, USA) for 24 hours and embedded in paraffin. Five micrometers sections were cut and stained with a Masson's trichrome coloration to determine the presence of ECM in the fibroblasts sheets equivalents. A Nikon Eclipse E600 microscope (Nikon, Quebec, QC, Canada) equipped with a Coolsnap digital camera for color pictures was used. Images were processed with Adobe Photoshop 9.0 software (Adobe Systems, San Jose, CA, USA).

3.3.4 Immunofluorescence characterization

For indirect immunofluorescence staining, fibroblasts in proliferation or frozen sections of 20 µm were fixed in 100% acetone, blocked in PBS containing 1% (w/v) bovine serum albumin (BSA, Sigma) and then incubated with monoclonal antibodies. The primary antibodies utilized were : a mouse IgG1 anti-keratin 10 (dilution 1 :100) (Cedarlane Laboratories Ltd., Burlington, ON, Canada)

to mark keratin present in keratinocytes found with fibroblasts, a rabbit IgG anti-collagen type I (dilution 1 :100) (Cedarlane Laboratories Ltd., Burlington, ON, Canada) to stain the collagen type I produced by the fibroblasts and a mouse IgM anti-cellular fibronectin (dilution 1 :400) (Sigma) to visualize the connection of fibroblasts cells to ECM. The secondary antibodies used were : a mouse IgG Alexa 488 (green fluorochrome) (dilution 1 :400) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) and a goat IgG-IgM Rhodamine (red fluorochrome) (dilution 1 :200) (Chemicon, Temecula, CA, USA). For controls, the primary antibody was omitted. Nuclei were stained with Hoechst nuclear dye. The final results were viewed with Nikon C1 confocal system fitted to a Nikon Eclipse E800 microscope (Nikon, Tokyo, Japan) and images were also processed with Adobe Photoshop 9.0 (Adobe Systems).

3.4 Results

For all our experiments, human skin fibroblasts were used as control. We already know their behavior in 37°C culture conditions (Auger et al. 1995; Germain et al. 1999; Pouliot et al. 2002). For porcine fibroblasts we used two types coming from different sites of extraction : skin and oral mucosa, one contained hair and the other being hairless.

3.4.1 Fibroblasts proliferation

HSF are currently cultured at 37°C, the internal temperature of the human body, whereas the pig's internal temperature is 39°C (Koo et al. 2000). The influence of temperature on fibroblasts proliferation was studied at both 37°C and 39°C (Figure 3.2). Observations of fibroblasts compiliation were made at day 5, because the confluence was reached at day 7. At 39°C, no significant change was observed in cell number for HSF (3.3%) compared to cells cultured at 37°C (Figure 3.2 A). However, increasing the temperature displayed a significant difference for pig fibroblasts (Figure 3.2 B-D). Similar augmentations were observed for POF 1(12.1%) (Figure 3.2 C) and POF 2 (15.4%) (Figure 3.2 D). The most significant difference was obtained for PSF with an increase of 102.6%

(Figure 3.2 B). These results showed that increasing temperature from 37°C to 39°C had a positive influence on the proliferation of both oral and skin porcine fibroblasts.

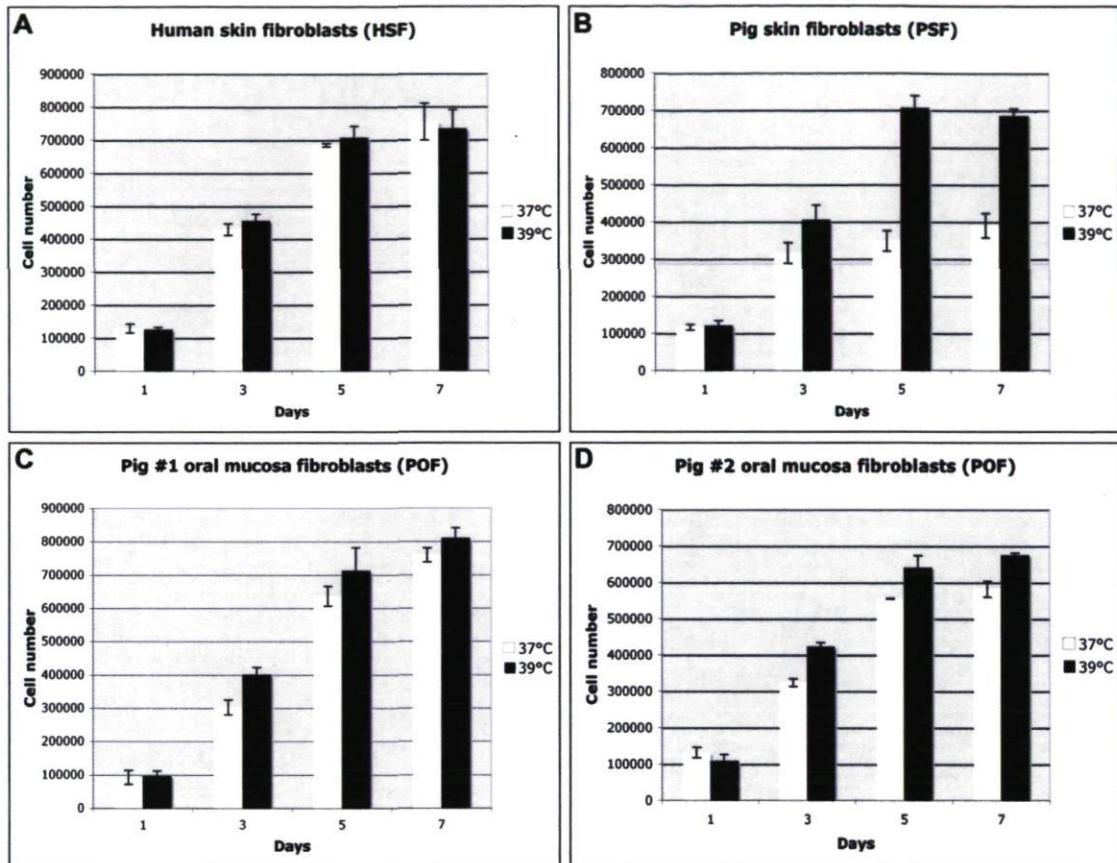


Figure 3.2 – Fibroblasts proliferation comparing 37°C and 39°C culture temperature. A) Human skin fibroblasts (HSF). B) Pig skin fibroblasts (PSF). C) Pig oral fibroblasts 1 (POF 1). D) Pig oral fibroblasts 2 (POF 2).

3.4.2 Formation of a porcine monolayer fibroblasts sheet

The effect of temperature on cells capacity to produce sheets was then studied. Therefore we cultured the same three types of fibroblasts (HSF, PSF and POF) again at both temperatures to see if a matrix sheet would be produced by fibroblasts after 7, 14 and 21 days of culture (Figure 3.3). At day 7, no fibroblasts sheet was observed at both temperatures and not enough ECM was formed.

At day 14, HSF sheets were present at both temperatures. No results were observed at 37°C for PSF but at 39°C the sheets obtained were extremely thin and difficult to handle (Figure 3.3). For POF, thin sheets were obtained at 37°C, but at 39°C POF presented thicker sheets, uniform and easy to handle (Figure 3.3).

After 21 days, at 37°C POF presented thin and not uniform fibroblasts sheets and HSF provided uniform and thicker sheets. At 39°C, we obtained thin fibroblasts sheets with PSF and there was not enough ECM produced to have a usable fibroblasts sheet (Figure 3.3). At this same temperature, for HSF and POF, the fibroblasts sheets were uniform and easy to handle (Figure 3.3). When we measured and histologically compared the thickness of the matrix produced by fibroblasts between day 14 and 21, we observed a sheet 21% thicker for HSF and 52% thicker for POF (Figure 3.4).

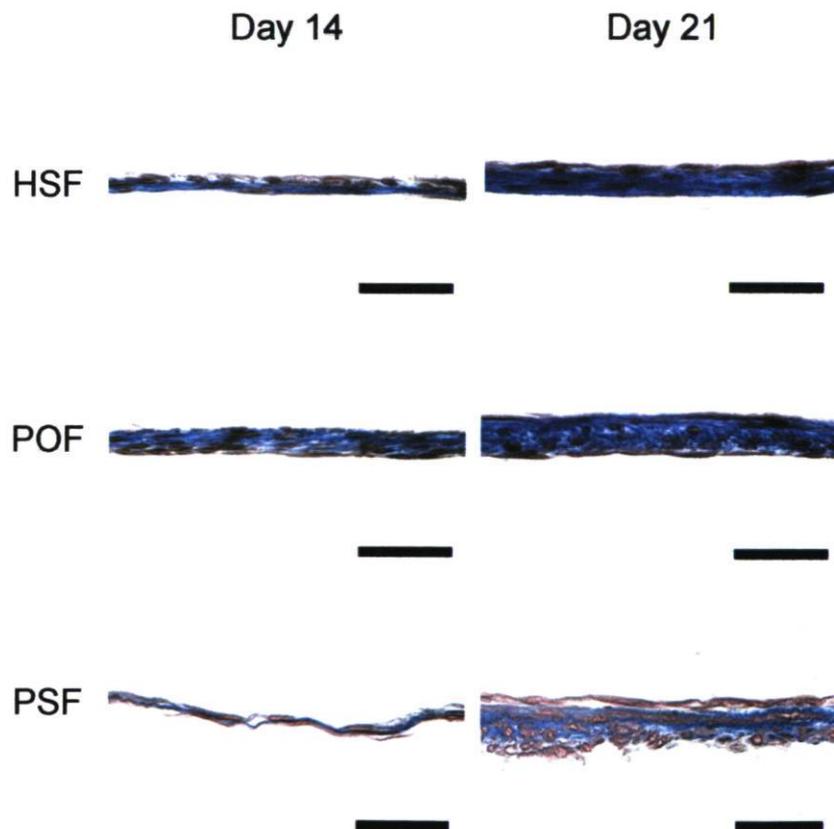


Figure 3.3 – Histological view of the monolayer fibroblasts sheets cultured at 39°C. In blue the extracellular matrix and in pink the cells. (Scale bar : 50 μm)

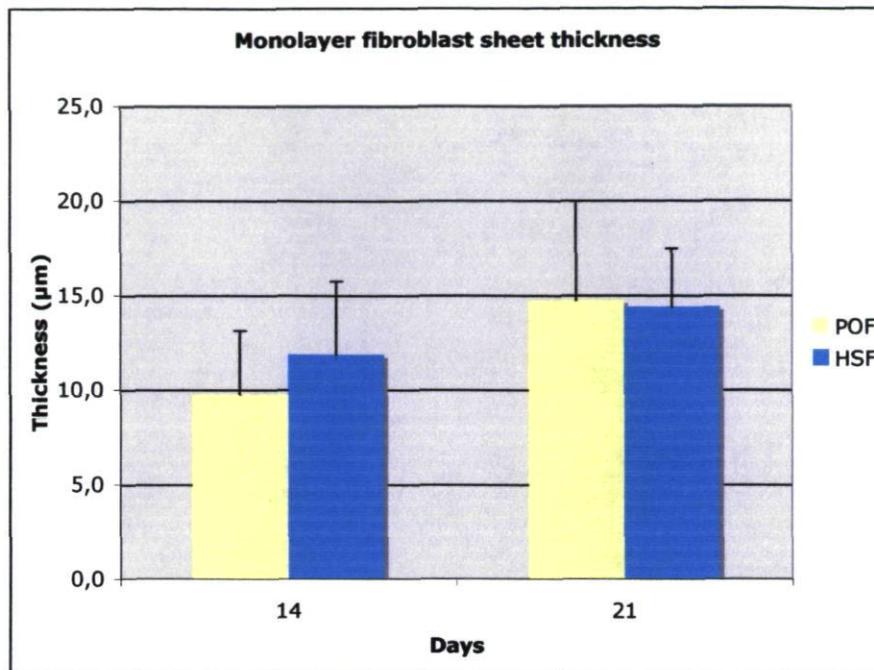


Figure 3.4 – Thickness measurements at 39°C of the POF and HSF fibroblasts sheets obtained at 14 and 21 days.

3.4.3 Cellular contaminations

When we cultured PSF at 39°C, mix cultures were observed (Figure 3.5 A). The cell morphology was similar to keratinocytes (Figure 3.5 B). To confirm this observation, we performed an immunofluorescence study using keratin 10 on PSF in proliferation (Figure 3.5 C). Due to the poor results obtained with PSF in the previous section and the presence of mix cultures; we only kept POF and HSF for the rest of our experiments.

3.4.4 Formation of three layer fibroblasts sheets

To see if POF sheets produced were resistant to manipulations like HSF, we superimposed three fibroblasts sheets cultured for 20 days (HSF and POF). Histological observations showed a good cohesion between the three layers in both species (Figure 3.6) even if it was only 3 days after

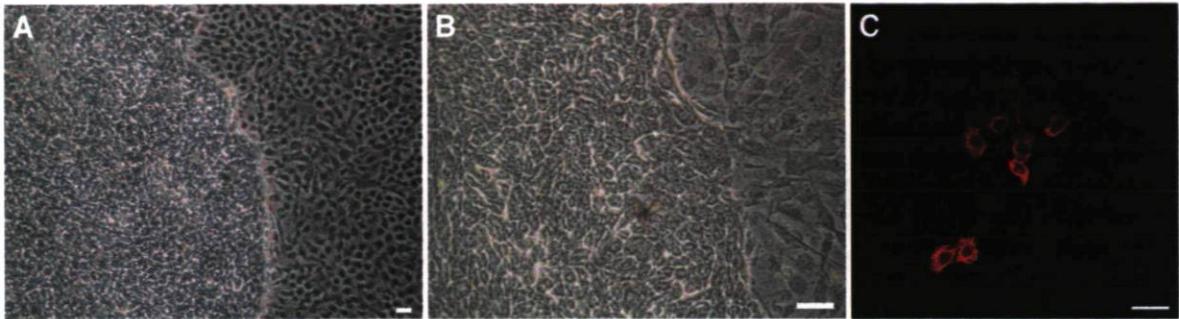


Figure 3.5 – Mix culture observed at 39°C. A) *Mix cultures observed with PSF.* B) *Cells morphology similar to keratinocytes.* (Scale bar : 100 μm) C) *Immunofluorescence study using keratin 10 staining on PSF in proliferation.* (Scale bar : 50 μm)

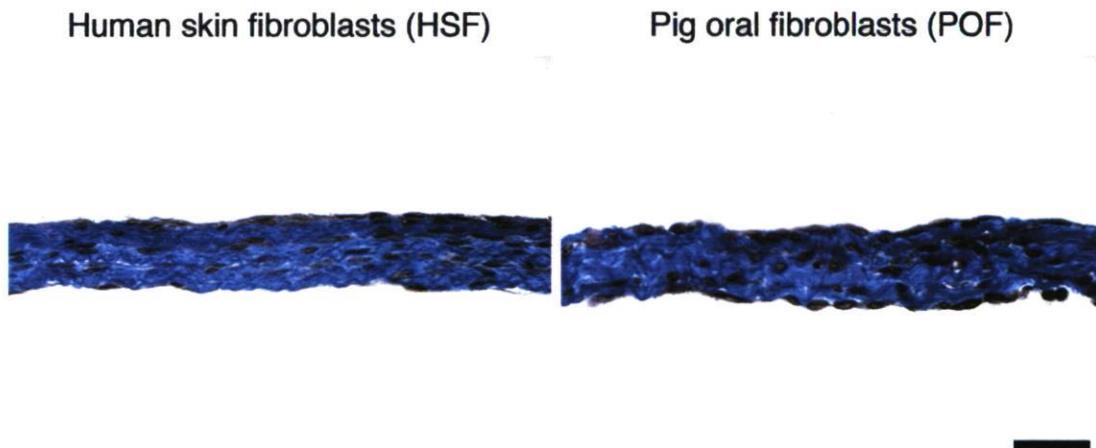


Figure 3.6 – Histological view of the three layer fibroblasts sheets cultured at 39°C. (Scale bar : 50 μm).

assembly. This result was similar in both conditions. The thickness was also measured and there was no significant difference between HSF and POF fibroblasts sheets (Figure 3.7).

3.4.5 Detection of extracellular matrix in fibroblasts sheets

Histological observations, for one or three layer fibroblasts sheets, showed the presence of ECM and cells (Figure 3.3 and 3.6). We confirmed that 39°C was the optimal temperature to obtain POF

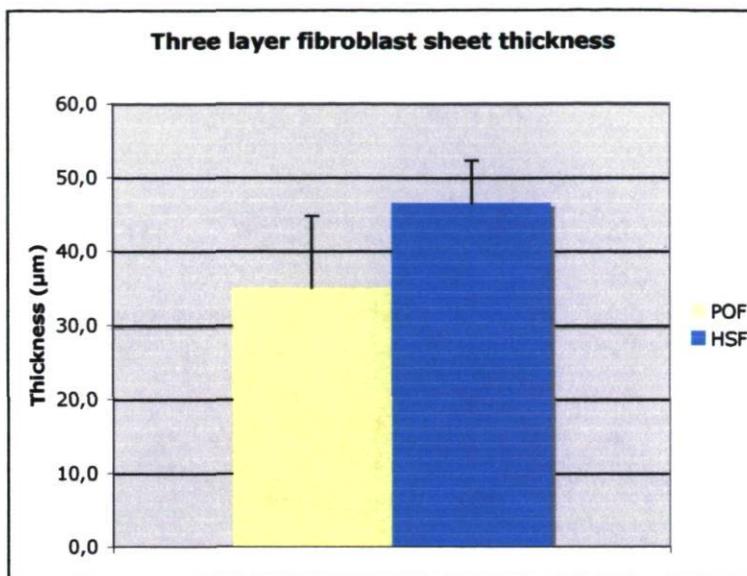


Figure 3.7 – Thickness measurements of the three layer fibroblasts sheets obtained at 39°C.

ECM production compared to HSF matrix formation. It was confirmed by immunofluorescence with collagen type I and fibronectin staining (Figure 3.8), two main constituents of native ECM.

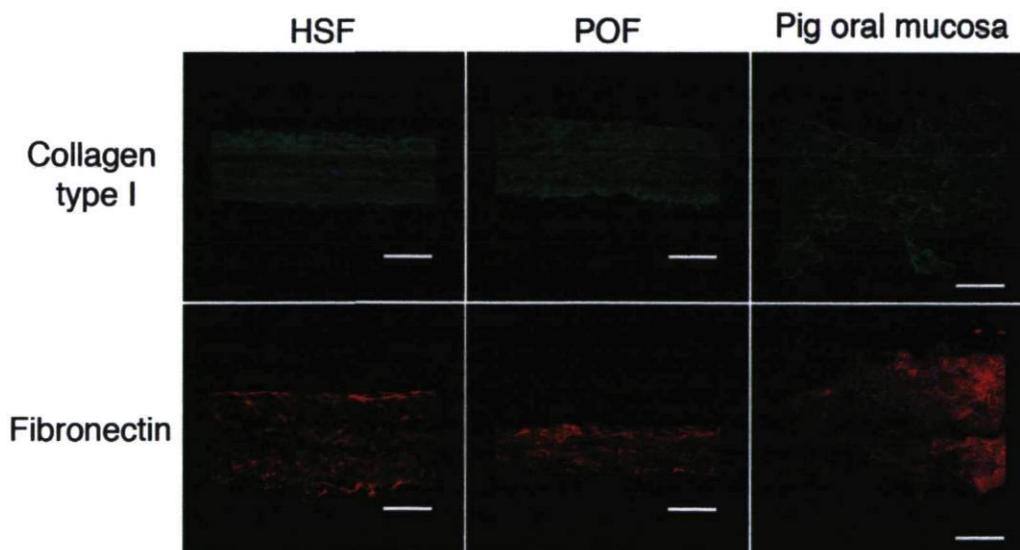


Figure 3.8 – ECM characterization of the three layer fibroblasts sheets obtained at 39°C by immunofluorescence with native pig oral mucosa as control. (Scale bar : 50 µm).

3.5 Discussion

The objective of this study was to establish and determine the optimal parameters to obtain the formation of a pig fibroblasts sheet. The first parameter considered was to improve cellular proliferation and the second, the production of ECM. After initial optimization, richer culture medium than the HSF regular media were evaluated but results remained sub-optimal (data not shown). Therefore, we increased the culture temperature to 39°C to match the physiological internal temperature of the pig (Koo et al. 2000). But it was observed that keratinocytes proliferation was promoted even if different porcine skin extraction sites were studied. A mix culture occurred, detrimental to the formation of a fibroblasts sheet. It was initially found, when the fibroblasts cells were extracted from the dermal layer of the pig skin, that it was not possible to eliminate all keratinocytes coming from the epidermal layer and hair follicles because the hair density on pig skin is higher than on human. The hypothesis was that less hair from the initial biopsy would bring less epithelial stem cells coming from the hair bulge in the dermal layer of the skin (Alonso et Fuchs 2003; Blanpain et Fuchs 2006; Larouche et al. 2008). Therefore, a new extraction site was searched on the pig, exempt of hair, to minimize the presence of keratinocytes in the culture and we decided to use oral mucosa. This extraction site is already used for corneal reconstruction (Tsai et al. 1997; Ueda et al. 1998; Imaizumi et al. 2004; Murakami et al. 2006; Shortt et al. 2007), but only keratinocytes from the epithelial layer are selected. Their method of cellular extraction was adapted to develop a new fibroblasts extraction protocol. The pig oral fibroblasts (POF) were cultured and superior results were obtained compared to pig skin fibroblasts (PSF). To confirm our initial observations, a comparison on cell proliferation and ECM production between human and pig skin fibroblasts was made. In this study, it was found that using a culture temperature of 39°C, instead of the 37°C normally used with human fibroblasts, increased the proliferation on all types of pig fibroblasts. Subsequently, we evaluated if the same temperature helped to the production of ECM. For pig fibroblasts, at 37°C, a weak synthesis of ECM was obtained but at 39°C a more uniform and easy to handle fibroblasts sheet was formed. With human fibroblasts as control, uniform and easy to handle sheets were obtained at both temperatures. From these results, it was determined that increasing the culture temperature from 37°C to 39°C had a definite positive effect on pig fibroblasts proliferation. The physiological temperature of the species could be an important parameter to consider, even *in vitro*, explaining the effect of temperature on proliferation and ECM production.

Furthermore, these results showed that the impact on the production of ECM was only found with POF, because even if PSF were cultured at 39°C, no uniform fibroblasts sheet was formed. Consequently, it became more easy to use pig fibroblasts coming from an oral mucosa biopsy than a skin biopsy to obtain a uniform and easy to handle fibroblasts sheet. Moreover, the fibroblasts sheets produced with POF were thick and similar to the HSF sheets obtained after 21 days of culture. Therefore, it was possible to successfully superimpose three layers of POF fibroblasts sheets after 20 days in culture because they were resistant enough for manipulations as observed with HSF fibroblasts sheets. A good cohesion between the sheets was observed and no significant observable difference was discerned between both species. This confirmed the similarity of POF with HSF. Characterization of the ECM produced by the fibroblasts showed the same markers at same intensity, in both POF and HSF equivalents, even if the fibroblasts were not from the same extraction site and species source.

3.6 Conclusion

In this study, we demonstrated that it is possible to produce a tissue from porcine fibroblasts. The two major points that were determined are the use of pig fibroblasts coming from oral mucosa and a culture temperature of 39°C. It enabled us to produce a uniform and easy to handle fibroblasts sheet similar to what was obtained with human fibroblasts. Overall, the porcine fibroblasts sheet we have been able to produce offers a great avenue in tissue engineering to build an autologous porcine model and perform tests on a larger animal model.

Chapitre 4

Discussion

Présentement en urologie, les chirurgiens ont régulièrement recours aux tissus non-urologiques pour le remplacement ou la reconstruction urétrale. Ces interventions nécessitent plusieurs chirurgies complexes, en plus des complications postopératoires communément retrouvées. Les alternatives proposées en recherche sont les matrices de tissus acellulaires ou les polymères synthétiques ensemencés de cellules de types urologiques ou non. L'inconvénient de ces substituts découle de leur caractère exogène ainsi que de leur produit de dégradation après implantation dans l'organisme, puisque leur impact demeure inconnu à plus long terme. Pour toutes ces raisons, notre équipe de recherche propose d'utiliser directement les cellules du patient pour créer un modèle tubulaire urétral par auto-assemblage, ne nécessitant qu'une seule intervention lors de la greffe, en raison de sa taille comparativement à l'urètre natif. Également, le modèle étant autologue, une diminution des réactions inflammatoires est attendue, ce qui devrait minimiser les risques de rejets post-chirurgicaux.

Le premier objectif a permis d'évaluer la faisabilité d'un modèle tubulaire urétral. Dans le chapitre 2, il fut démontré qu'il est maintenant possible de recréer un équivalent autologue exempt de matrice exogène, en utilisant la méthode d'auto-assemblage. Chaque construction tubulaire autologue a démontré une force mécanique supérieure à l'urètre de porc natif en contrôle, ce qui témoigne de la capacité à reconstruire un tissu *in vitro* adapté pour la greffe. L'ajout de cellules urothéliales aux tubes constitués de fibroblastes n'a en rien diminué leur résistance mécanique. De plus, les résultats ont montré que les équivalents peuvent soutenir une stimulation pulsatile pendant une semaine complète, sans perdre leur intégrité structurale et mécanique. Les résultats ont aussi montrés que ce type de culture dynamique a favorisé la prolifération des cellules urothéliales et leur viabilité, même si le tissu a nécessité une construction *in vitro* de 2 mois.

La possibilité d'adapter le modèle urétral pour effectuer des tests précliniques chez l'animal fut décrit dans le chapitre 3. Le modèle porcin fut choisi pour la grande similitude physiologique de son système urinaire avec celui de l'humain. Pour assurer le caractère autologue de l'équivalent urétral, la production d'un feuillet de fibroblastes était nécessaire puisque cela s'est préliminairement avéré impossible avec les fibroblastes porcins de type urologique. Tout d'abord, des tests non concluants furent menés en comparant le site de prélèvements chez le porc et en utilisant différents milieux de culture. Comme il fut décrit, l'utilisation d'un site de prélèvement exempt de poil, comme la muqueuse orale, ainsi qu'une température de culture physiologique au porc, soit 39°C, furent deux paramètres importants à l'élaboration d'un feuillet matriciel produit par les fibroblastes porcins. Il fut possible d'obtenir un feuillet uniforme, malléable et assez résistant aux manipulations pour pouvoir être empilé en tricouche avec succès.

L'étape suivante sera de compléter le modèle autologue porcin aussi bien pour l'équivalent vésical abordé dans le mémoire de ma coéquipière Sara (Bouhout 2010), que le substitut tubulaire urétral. Les résultats obtenus jusqu'à présent étant très encourageant, tant au niveau des propriétés biologiques que mécaniques. Des tests précliniques sont envisagés chez le porc afin d'évaluer le comportement des substituts *in vivo* après implantation. Afin de maximiser la réussite d'une greffe à long terme, l'inclusion d'un réseau microvasculaire au sein des modèles reconstruits *in vitro* est en cours, dans le but d'assurer une inosculature rapide et par conséquent l'apport en nutriments et en oxygène. Enfin, dans une perspective plus éloignée; puisque l'uretère est un tube musculaire qui évacue l'urine par mouvements péristaltiques depuis le bassinet rénal jusqu'à la vessie, l'ajout de cellules musculaires lisses au modèle tubulaire permettrait sa transformation et son adaptation pour la réparation de dommages urétéraux.

Chapitre 5

Conclusion

Le génie tissulaire a connu des succès et des échecs qui ont contribué à faire progresser les connaissances en médecine régénérative. Les matériaux de dérivation naturelle et les matrices acellulaires ont l'avantage de la reconnaissance biologique. D'autre part, les polymères synthétiques peuvent être produits en grande quantité, de manière reproductible et contrôlée. Toutefois, l'élaboration d'un substitut urologique regroupant à la fois biocompatibilité et fonctionnalité demeure encore inachevée. Les résultats présentés à travers les différentes études ont attiré notre attention sur la nécessité d'une étanchéité par rapport à la toxicité causée par les composés chimiques de l'urine, ainsi que d'une vascularisation rapide du modèle post-greffe, dans le but de préserver le développement cellulaire, en plus de prévenir sa contraction à long terme. La méthode d'auto-assemblage semble être une approche prometteuse pour reconstruire un équivalent disposant de ces propriétés. Finalement, le caractère autologue du modèle devrait favoriser la migration des cellules environnantes après greffe, pour donner lieu à un remodelage progressif dans les conditions physiologiques.

Dans un futur proche, toutes les disciplines du génie tissulaire vont être mises à contribution pour explorer de nouvelles techniques allant de la culture cellulaire dynamique jusqu'aux nanobio-technologies, et ainsi obtenir la structure unique du tissu urologique à remplacer. Cependant, le défi majeur sera de considérer la différence entre le modèle animale sain couramment utilisé en recherche et l'implantation de substitut chez un patient humain avec une pathologie urologique active.

Références

- Adé-Damilano, M. (2006). *Les voies excrétrices de l'urine*. Université de Fribourg.
- Alonso, L. et Fuchs, E. (2003). Stem cells of the skin epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 Suppl 1 :11830–5.
- Alsikafi NF, Eisenberg M, M. J. (2005). Long-term outcomes of penile skin graft versus buccal mucosal graft for substitution urethroplasty of the anterior urethra. *J. Urol.*, 173(Suppl 4) :87.
- Amiel, G. E., Yoo, J. J., Kim, B. S., et Atala, A. (2001). Tissue engineered stents created from chondrocytes. *J Urol*, 165(6 Pt 1) :2091–5.
- Ariyoshi, A. (1967). Experimental studies of urethral reconstruction using tunica vaginalis graft. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi*, 58(4) :417–32.
- Atala, A., Cima, L. G., Kim, W., Paige, K. T., Vacanti, J. P., Retik, A. B., et Vacanti, C. A. (1993). Injectable alginate seeded with chondrocytes as a potential treatment for vesicoureteral reflux. *J Urol*, 150(2 Pt 2) :745–7.
- Atala, A., Kim, W., Paige, K. T., Vacanti, C. A., et Retik, A. B. (1994). Endoscopic treatment of vesicoureteral reflux with a chondrocyte-alginate suspension. *J Urol*, 152(2 Pt 2) :641–3 ; discussion 644.
- Auger, F. A., Lopez Valle, C. A., Guignard, R., Tremblay, N., Noel, B., Goulet, F., et Germain, L. (1995). Skin equivalent produced with human collagen. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 31(6) :432–9.
- Auger, F. A., Remy-Zolghadri, M., Grenier, G., et Germain, L. (2002). A truly new approach for tissue engineering : the loex self-assembly technique. *Ernst Schering Res Found Workshop*, (35) :73–88.
- Badylak, S. F. et Gilbert, T. W. (2008). Immune response to biologic scaffold materials. *Semin Immunol*, 20(2) :109–16.
- Barbagli, G. et Lazzeri, M. (2006). Urethral reconstruction. *Curr Opin Urol*, 16(6) :391–5.

- Batourina, E., Tsai, S., Lambert, S., Sprengle, P., Viana, R., Dutta, S., Hensle, T., Wang, F., Niederreither, K., McMahon, A. P., Carroll, T. J., et Mendelsohn, C. L. (2005). Apoptosis induced by vitamin a signaling is crucial for connecting the ureters to the bladder. *Nat Genet*, 37(10) :1082–9.
- Blanpain, C. et Fuchs, E. (2006). Epidermal stem cells of the skin. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22 :339–73.
- Bouhout, S. (2010). *Élaboration et caractérisation d'un équivalent vésical dans le contexte de la bioingénierie*. Université Laval.
- Bouhout, S., Perron, E., Gauvin, R., Bernard, G., Ouellet, G., Cattan, V., et Bolduc, S. (2010). In vitro reconstruction of an autologous, watertight, and resistant vesical equivalent. *Tissue Eng Part A*, 16(5) :1539–1548.
- Brannan, D. (1951). Stricture of the female urethra. *J Urol*, 66(2) :242–53.
- Bronchti, G. (2005). *Histologie : Morphologie des systèmes*. Université du Québec à Trois-Rivières.
- Brown, A. L., Farhat, W., Merguerian, P. A., Wilson, G. J., Khoury, A. E., et Woodhouse, K. A. (2002). 22 week assessment of bladder acellular matrix as a bladder augmentation material in a porcine model. *Biomaterials*, 23(10) :2179–90.
- Burger, R. A., Muller, S. C., el Damanhoury, H., Tschakaloff, A., Riedmiller, H., et Hohenfellner, R. (1992). The buccal mucosal graft for urethral reconstruction : a preliminary report. *J Urol*, 147(3) :662–4.
- Calado, A. A., Macedo, A., J., Delcelo, R., de Figueiredo, L. F., Ortiz, V., et Srougi, M. (2005). The tunica vaginalis dorsal graft urethroplasty : experimental study in rabbits. *J Urol*, 174(2) :765–70.
- Caldamone, A. A., Edstrom, L. E., Koyle, M. A., Rabinowitz, R., et Hulbert, W. C. (1998). Buccal mucosal grafts for urethral reconstruction. *Urology*, 51(5A Suppl) :15–9.
- Campbell, Meredith, F., Walsh, P. C., et Wein, A. J. (2007). *Campbell-Walsh Urology*, volume 4. Saunders, Elsevier.
- Chen, F., Yoo, J. J., et Atala, A. (1999). Acellular collagen matrix as a possible "off the shelf" biomaterial for urethral repair. *Urology*, 54(3) :407–10.

- Chepda, T., Cadau, M., Girin, P., Frey, J., et Chamson, A. (2001). Monitoring of ascorbate at a constant rate in cell culture : effect on cell growth. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 37(1) :26–30.
- Coleman, J. W., McGovern, J. H., et Marshall, V. F. (1981). The bladder mucosal graft technique for hypospadias repair. *Urol Clin North Am*, 8(3) :457–62.
- Colvert, J. R., r., Kropp, B. P., Cheng, E. Y., Pope, J. C. t., Brock, J. W., r., Adams, M. C., Austin, P., Furness, P. D., r., et Koyle, M. A. (2002). The use of small intestinal submucosa as an off-the-shelf urethral sling material for pediatric urinary incontinence. *J Urol*, 168(4 Pt 2) :1872–5; discussion 1875–6.
- Court, B., Auvert, J., Sausse, A., et Diep, R. (1971). Replacement of a urethral segment with a silicone elastomer tube in the male dog (preliminary note). *J Urol Nephrol (Paris)*, 77 :Suppl :562–4.
- Court, B., Xerri, A., et Auvert, J. (1973). Replacement of the urethra in man using a silicone elastomer prosthesis. 3 cases. preliminary results. *J Urol Nephrol (Paris)*, 79(12 Pt 2) :643–7.
- Davidson, J. M., LuValle, P. A., Zoia, O., Quaglino, D., J., et Giro, M. (1997). Ascorbate differentially regulates elastin and collagen biosynthesis in vascular smooth muscle cells and skin fibroblasts by pretranslational mechanisms. *J Biol Chem*, 272(1) :345–52.
- De Filippo, R. E., Yoo, J. J., et Atala, A. (2002). Urethral replacement using cell seeded tubularized collagen matrices. *J Urol*, 168(4 Pt 2) :1789–92; discussion 1792–3.
- Devine, C. J., J. et Horton, C. E. (1977). Hypospadias repair. *J Urol*, 118(1 Pt 2) :188–93.
- Di Pietto, L., Scaffa, C., Torella, M., Lambiase, A., Cobellis, L., et Colacurci, N. (2008). Perineal ultrasound in the study of urethral mobility : proposal of a normal physiological range. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*, 19(10) :1405–1409.
- Diamond, D. A. et Caldamone, A. A. (1999). Endoscopic correction of vesicoureteral reflux in children using autologous chondrocytes : preliminary results. *J Urol*, 162(3 Pt 2) :1185–8.
- Dorin, R. P., Pohl, H. G., De Filippo, R. E., Yoo, J. J., et Atala, A. (2008). Tubularized urethral replacement with unseeded matrices : what is the maximum distance for normal tissue regeneration ? *World J Urol*, 26(4) :323–6.

- Dreikorn, K., Lobelenz, J., Horsch, R., et Rohl, L. (1979). Alloplastic replacement of the partially resected canine urethra by expanded polytetrafluoroethylene grafts. preliminary results. *Urol Res*, 7(1) :19–21.
- Duffy, P. G., Ransley, P. G., Malone, P. S., et Van Oyen, P. (1988). Combined free autologous bladder mucosa/skin tube for urethral reconstruction : an update. *Br J Urol*, 61(6) :505–6.
- El-Kassaby, A. W., Retik, A. B., Yoo, J. J., et Atala, A. (2003). Urethral stricture repair with an off-the-shelf collagen matrix. *J Urol*, 169(1) :170–3; discussion 173.
- Farhat, W. A., Chen, J., Haig, J., Antoon, R., Litman, J., Sherman, C., Derwin, K., et Yeger, H. (2008). Porcine bladder acellular matrix (acm) : protein expression, mechanical properties. *Biomed Mater*, 3(2) :25015.
- Fu, Q., Deng, C. L., Liu, W., et Cao, Y. L. (2007). Urethral replacement using epidermal cell-seeded tubular acellular bladder collagen matrix. *BJU Int*, 99(5) :1162–5.
- Fu, W. J., Zhang, X., Zhang, B. H., Zhang, P., Hong, B. F., Gao, J. P., Meng, B., Kun, H., et Cui, F. Z. (2009). Biodegradable urethral stents seeded with autologous urethral epithelial cells in the treatment of post-traumatic urethral stricture : a feasibility study in a rabbit model. *BJU Int*, 104(2) :263–268.
- Germain, L., Auger, F. A., Grandbois, E., Guignard, R., Giasson, M., Boisjoly, H., et Guerin, S. L. (1999). Reconstructed human cornea produced in vitro by tissue engineering. *Pathobiology*, 67(3) :140–7.
- Germain, L., Rouabhia, M., Guignard, R., Carrier, L., Bouvard, V., et Auger, F. A. (1993). Improvement of human keratinocyte isolation and culture using thermolysin. *Burns*, 19(2) :99–104.
- Gilbaugh, J. H., J., Utz, D. C., et Wakim, K. G. (1969). Partial replacement of the canine urethra with a silicone prosthesis. *Invest Urol*, 7(1) :41–51.
- Hakky, S. I. (1977). The use of fine double siliconised dacron in urethral replacement. *Br J Urol*, 49(2) :167–71.
- Hanna, M. K. (1983). Single-stage hypospadias repair : techniques and results. *Urology*, 21(1) :30–5.

- Hendren, W. H. et Crooks, K. K. (1980). Tubed free skin graft for construction of male urethra. *J Urol*, 123(6) :858–61.
- Hu, Y. F., Yang, S. X., Wang, L. L., et Jin, H. M. (2008). Curative effect and histocompatibility evaluation of reconstruction of traumatic defect of rabbit urethra using extracellular matrix. *Chin J Traumatol*, 11(5) :274–8.
- Humby, G. (1941). A one-stage operation for hypospadias. *Brit. J. Surg.*, 29 :84–92.
- Imaizumi, F., Asahina, I., Moriyama, T., Ishii, M., et Omura, K. (2004). Cultured mucosal cell sheet with a double layer of keratinocytes and fibroblasts on a collagen membrane. *Tissue Eng*, 10(5-6) :657–64.
- Italiano, G., Abatangelo, G., J., Calabro, A., Abatangelo, G., S., Zanoni, R., O'Regan, M., et Passerini Glazel, G. (1997). Reconstructive surgery of the urethra : a pilot study in the rabbit on the use of hyaluronan benzyl ester (hyaff-11) biodegradable grafts. *Urol Res*, 25(2) :137–42.
- Joseph, D. B. et Perez, L. M. (1999). Tunica vaginalis onlay urethroplasty as a salvage repair. *J Urol*, 162(3 Pt 2) :1146–7.
- Kahveci, R., Kahveci, Z., Sirmali, S., et Ozcan, M. (1995). Urethral reconstruction with autologous vein graft : an experimental study. *Br J Plast Surg*, 48(7) :500–3.
- Kajbafzadeh, A. M., Payabvash, S., Salmasi, A. H., Sadeghi, Z., Elmi, A., Vejdani, K., Tavangar, S. M., Tajik, P., et Mahjoub, F. (2007). Time-dependent neovasculogenesis and regeneration of different bladder wall components in the bladder acellular matrix graft in rats. *J Surg Res*, 139(2) :189–202.
- Karna, E., Miltyk, W., Wołczyński, S., et Pałka, J. A. (2001). The potential mechanism for glutamine-induced collagen biosynthesis in cultured human skin fibroblasts. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 130(1) :23–32.
- Khoury, A. E., Olson, M. E., McLorie, G. A., et Churchill, B. M. (1989). Urethral replacement with tunica vaginalis : a pilot study. *J Urol*, 142(2 Pt 2) :628–30 ; discussion 631.
- Koo, D. B., Kang, Y. K., Choi, Y. H., Park, J. S., Han, S. K., Park, I. Y., Kim, S. U., Lee, K. K., Son, D. S., Chang, W. K., et Han, Y. M. (2000). In vitro development of reconstructed porcine oocytes after somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod*, 63(4) :986–92.

- Kropp, B. P., Ludlow, J. K., Spicer, D., Rippy, M. K., Badylak, S. F., Adams, M. C., Keating, M. A., Rink, R. C., Bihle, R., et Thor, K. B. (1998). Rabbit urethral regeneration using small intestinal submucosa onlay grafts. *Urology*, 52(1) :138–42.
- Lantz, G. C., Badylak, S. F., Hiles, M. C., Coffey, A. C., Geddes, L. A., Kokini, K., Sandusky, G. E., et Morff, R. J. (1993). Small intestinal submucosa as a vascular graft : a review. *J Invest Surg*, 6(3) :297–310.
- Larouche, D., Tong, X., Fradette, J., Coulombe, P. A., et Germain, L. (2008). Vibrissa hair bulge houses two populations of skin epithelial stem cells distinct by their keratin profile. *FASEB J*, 22(5) :1404–1415.
- Larousse (2004). *Larousse médicale*.
- Leslie, B., Barboza, L. L., Souza, P. O., Silva, P. S., Delcelo, R., Ortiz, V., et Macedo, A., J. (2009). Dorsal tunica vaginalis graft plus onlay preputial island flap urethroplasty : experimental study in rabbits. *J Pediatr Urol*, 5(2) :93–9.
- Lexer, E. (1911). On free transplantations. *Verh. Deutsch. Ges. Chir.*, 40 :386.
- L'Heureux, N., Germain, L., Labbe, R., et Auger, F. A. (1993). In vitro construction of a human blood vessel from cultured vascular cells : a morphologic study. *J Vasc Surg*, 17(3) :499–509.
- L'Heureux, N., Paquet, S., Labbé, R., Germain, L., et Auger, F. A. (1998). A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J*, 12(1) :47–56.
- Li, C., Xu, Y., Song, L., Fu, Q., Cui, L., et Yin, S. (2008a). Preliminary experimental study of tissue-engineered urethral reconstruction using oral keratinocytes seeded on bamg. *Urol Int*, 81(3) :290–5.
- Li, C., Xu, Y. M., Song, L. J., Fu, Q., Cui, L., et Yin, S. (2008b). Urethral reconstruction using oral keratinocyte seeded bladder acellular matrix grafts. *J Urol*, 180(4) :1538–42.
- Liang, F. X., Bosland, M. C., Huang, H., Romih, R., Baptiste, S., Deng, F. M., Wu, X. R., Shapiro, E., et Sun, T. T. (2005). Cellular basis of urothelial squamous metaplasia : roles of lineage heterogeneity and cell replacement. *J Cell Biol*, 171(5) :835–44.

- Magnan, M., Levesque, P., Gauvin, R., Dube, J., Barrieras, D., El-Hakim, A., et Bolduc, S. (2009). Tissue engineering of a genitourinary tubular tissue graft resistant to suturing and high internal pressures. *Tissue Eng Part A*, 15(1) :197–202.
- Markiewicz, M. R., DeSantis, J. L., Margarone, J. E., r., Pogrel, M. A., et Chuang, S. K. (2008). Morbidity associated with oral mucosa harvest for urological reconstruction : an overview. *J Oral Maxillofac Surg*, 66(4) :739–44.
- Markiewicz, M. R., Lukose, M. A., Margarone, J. E., r., Barbagli, G., Miller, K. S., et Chuang, S. K. (2007). The oral mucosa graft : a systematic review. *J Urol*, 178(2) :387–94.
- Mc Indoe, A. (1948). Deformities of the male urethra. *Br J Plast Surg*, 1(1) :29–47.
- McCarthy, L. S., Smeulders, N., et Wilcox, D. T. (2003). Cell biology of bladder development and the role of the extracellular matrix. *Nephron Exp Nephrol*, 95(4) :e129–33.
- McKinney, D. E. (1979). Use of full thickness patch graft in urethrovaginal fistula. *J Urol*, 122(3) :416.
- Murakami, D., Yamato, M., Nishida, K., Ohki, T., Takagi, R., Yang, J., Namiki, H., et Okano, T. (2006). Fabrication of transplantable human oral mucosal epithelial cell sheets using temperature-responsive culture inserts without feeder layer cells. *J Artif Organs*, 9(3) :185–91.
- Nové-Josserand, G. (1914). Late results of urethroplasty by tunnelization and dermoepidermal graft in severe forms of hypospadias and epispadias. *J. Urol.*, 5 :393.
- Olsen, L., Bowald, S., Busch, C., Carlsten, J., et Eriksson, I. (1992). Urethral reconstruction with a new synthetic absorbable device. an experimental study. *Scand J Urol Nephrol*, 26(4) :323–6.
- Parnigotto, P. P., Gamba, P. G., Conconi, M. T., et Midrio, P. (2000). Experimental defect in rabbit urethra repaired with acellular aortic matrix. *Urol Res*, 28(1) :46–51.
- Pouliot, R., Larouche, D., Auger, F. A., Juhasz, J., Xu, W., Li, H., et Germain, L. (2002). Reconstructed human skin produced in vitro and grafted on athymic mice. *Transplantation*, 73(11) :1751–7.
- Romih, R., Veranic, P., et Jezernik, K. (2002). Appraisal of differentiation markers in urothelial cells. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 10(4) :339–43.

- Rosario, D. J., Reilly, G. C., Ali Salah, E., Glover, M., Bullock, A. J., et Macneil, S. (2008). Decellularization and sterilization of porcine urinary bladder matrix for tissue engineering in the lower urinary tract. *Regen Med*, 3(2) :145–56.
- Schmieden, V. (1909). New method of operation for male hypospadias : free transplant of ureter to form urethra. *Arch. Klin. Chir.*, 90 :748.
- Shapiro, S. R. (1984). Complications of hypospadias repair. *J Urol*, 131(3) :518–22.
- Shortt, A. J., Secker, G. A., Notara, M. D., Limb, G. A., Khaw, P. T., Tuft, S. J., et Daniels, J. T. (2007). Transplantation of ex vivo cultured limbal epithelial stem cells : a review of techniques and clinical results. *Surv Ophthalmol*, 52(5) :483–502.
- Sievert, K. D., Bakircioglu, M. E., Nunes, L., Tu, R., Dahiya, R., et Tanagho, E. A. (2000). Homologous acellular matrix graft for urethral reconstruction in the rabbit : histological and functional evaluation. *J Urol*, 163(6) :1958–65.
- Snow, B. W. et Cartwright, P. C. (1992). Tunica vaginalis urethroplasty. *Urology*, 40(5) :442–5.
- Sutherland, R. S., Baskin, L. S., Hayward, S. W., et Cunha, G. R. (1996). Regeneration of bladder urothelium, smooth muscle, blood vessels and nerves into an acellular tissue matrix. *J Urol*, 156(2 Pt 2) :571–7.
- Talja, M., Kivisaari, L., Makinen, J., et Lehtonen, T. (1987). Free tunica vaginalis patch in urethroplasty. an experimental study. *Eur Urol*, 13(4) :259–63.
- Theodorescu, D., Balcom, A., Smith, C. R., McLorie, G. A., Churchill, B. M., et Khoury, A. E. (1998). Urethral replacement with vascularized tunica vaginalis : defining the optimal form of use. *J Urol*, 159(5) :1708–11.
- Tremblay, P. L., Hudon, V., Berthod, F., Germain, L., et Auger, F. A. (2005). Inosculation of tissue-engineered capillaries with the host's vasculature in a reconstructed skin transplanted on mice. *Am J Transplant*, 5(5) :1002–10.
- Tsai, C. Y., Ueda, M., Hata, K., Horie, K., Hibino, Y., Sugimura, Y., Toriyama, K., et Torii, S. (1997). Clinical results of cultured epithelial cell grafting in the oral and maxillofacial region. *J Craniomaxillofac Surg*, 25(1) :4–8.

- Tsivian, A. et Sidi, A. A. (2006). Dorsal graft urethroplasty for female urethral stricture. *J Urol*, 176(2) :611–3; discussion 613.
- Tuffier, T. (1910). À propos de greffes veineuses urétroplastiques. *Bull. et Mem. Soc. de Chir. de Paris*, 36 :589.
- Turner, A. M., Subramaniam, R., Thomas, D. F., et Southgate, J. (2008). Generation of a functional, differentiated porcine urothelial tissue in vitro. *Eur Urol*, 54(6) :1423–1432.
- Ueda, M., Hata, K. I., Sumi, Y., Mizuno, H., et Niimi, A. (1998). Peri-implant soft tissue management through use of cultured mucosal epithelium. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 86(4) :393–400.
- Veranic, P., Romih, R., et Jezernik, K. (2004). What determines differentiation of urothelial umbrella cells? *Eur J Cell Biol*, 83(1) :27–34.
- Viana, R., Batourina, E., Huang, H., Dressler, G. R., Kobayashi, A., Behringer, R. R., Shapiro, E., Hensle, T., Lambert, S., et Mendelsohn, C. (2007). The development of the bladder trigone, the center of the anti-reflux mechanism. *Development*, 134(20) :3763–9.
- Voytik-Harbin, S. L., Brightman, A. O., Kraine, M. R., Waisner, B., et Badylak, S. F. (1997). Identification of extractable growth factors from small intestinal submucosa. *J Cell Biochem*, 67(4) :478–91.
- Vyas, P. R., Roth, D. R., et Perlmutter, A. D. (1987). Experience with free grafts in urethral reconstruction. *J Urol*, 137(3) :471–4.
- Wu, X. R., Kong, X. P., Pellicer, A., Kreibich, G., et Sun, T. T. (2009). Uroplakins in urothelial biology, function, and disease. *Kidney Int*, 75(11) :1153–65.
- Xu, Y. M., Qiao, Y., Sa, Y. L., Wu, D. L., Zhang, J., Zhang, X. R., Chen, R., et Si, J. M. (2004). 1-stage urethral reconstruction using colonic mucosa graft for the treatment of a long complex urethral stricture. *J Urol*, 171(1) :220–3; discussion 223.
- Xu, Y. M., Qiao, Y., Sa, Y. L., Zhang, J., Fu, Q., et Song, L. J. (2009). Urethral reconstruction using colonic mucosa graft for complex strictures. *J Urol*, 182(3) :1040–10–43.

- Xu, Y. M., Qiao, Y., Sa, Y. L., Zhang, J., Zhang, H. Z., Zhang, X. R., Wu, D. L., et Chen, R. (2003). One-stage urethral reconstruction using colonic mucosa graft : an experimental and clinical study. *World J Gastroenterol*, 9(2) :381-4.
- Yoo, J. J., Lee, I., et Atala, A. (1998). Cartilage rods as a potential material for penile reconstruction. *J Urol*, 160(3 Pt 2) :1164-8; discussion 1178.
- Yoo, J. J., Park, H. J., Lee, I., et Atala, A. (1999). Autologous engineered cartilage rods for penile reconstruction. *J Urol*, 162(3 Pt 2) :1119-21.
- Young, F. et Benjamin, J. A. (1948). Repair of hypospadias with free inlay skin graft. *Surg Gynecol Obstet*, 86(4) :439-51.