



**Optimisation de la production par génie tissulaire
de tissus humains reconstruits *in vitro*
pour une application clinique**

Mémoire

Catherine Villeneuve

**Maîtrise en Biologie Cellulaire et Moléculaire
Maître ès sciences (M. Sc.)**

Québec, Canada

© Catherine Villeneuve, 2013

Le génie tissulaire est une technologie prometteuse pour combler la pénurie de tissus. Cependant, la culture requise avant la greffe peut potentiellement conduire à la transmission d'agents infectieux ainsi qu'à des réactions immunitaires déclenchées par des protéines animales résiduelles. Lors de la reconstruction de tissus par auto-assemblage, l'ajout d'acide ascorbique et de sérum bovin stimule les cellules à sécréter la matrice extracellulaire pour résulter en tissu. En vue d'une utilisation clinique, des produits sans xénogène ont été testés. Le milieu défini LM enrichi de 1% de sérum humain stimule la prolifération cellulaire et ce milieu sans sérum soutient la différenciation adipogénique. Plusieurs analyses ont permis de caractériser les tissus adipeux produits: ils contiennent de petits adipocytes, sont 1,8 fois plus épais et deux fois moins contractiles que ceux produits en milieu standard. Ces résultats indiquent que des tissus conjonctifs et adipeux sécuritaires peuvent être produits pour de futures greffes.

Abstract

Tissue engineering is a promising technology to address the shortage of tissues. However, culturing cells *in vitro* prior to transplantation can potentially lead to transmission of infectious agents as well as immune responses triggered by residual animal proteins. During tissue reconstruction by the self-assembly method, ascorbic acid and bovine serum stimulate cells to secrete extracellular matrix resulting in a manipulatable tissue. For clinical purposes, xenogenic-free products were tested. The defined medium (LM) enriched with 1% human serum stimulated cell proliferation and serum-free medium supported the adipogenic differentiation. Several analyses were performed to characterize the reconstructed adipose tissues: they contain small adipocytes, are 1.8 times thicker and half as contractile as those produced in standard medium. These results indicate that improved connective and adipose tissues can be produced for future transplantation.

Remerciements

En finissant cette maîtrise, je constate que j'ai beaucoup cheminé. Je ne suis plus la même personne que celle qui est rentrée au laboratoire lors de mon stage de baccalauréat. J'ai grandi en connaissance, en aptitude, en compréhension, tant côté scientifique, que social et personnel. Je ne le cache pas, ce ne fut pas facile tous les jours, mais ce fut très enrichissant.

Je tiens à remercier ma directrice de maîtrise, le Dre Julie Fradette. J'ai toujours pu compter sur son appui et son aide quand j'en avais besoin. Un merci aussi pour la compréhension et la patience qu'elle a eu envers moi. Elle a cru en moi et j'espère aujourd'hui, en terminant ce mémoire, lui montrer qu'elle a eu raison de le faire. Merci Julie!

Un remerciement au Dr François Auger et au Dre Lucie Germain de m'avoir accueillie parmi eux au sein du Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale. Ainsi, qu'à tous ceux que j'ai côtoyés au cours de ces dernières années, professeurs, assistants de recherche, étudiants, stagiaires et employés. Chacun à sa façon a su m'apporter de bonnes choses que ce soit de l'aide, des mots d'encouragement, des rires ou de belles amitiés. Il y a eu beaucoup de bons moments qui resteront dans mon cœur.

Un remerciement tout spécial à ma famille. À mes parents, Suzanne et Émilien, à ma sœur, Camille et à mes tantes, Carole et Jacinthe, pour leur soutien toujours présent, 24h sur 24h. Ainsi qu'à ma belle-mère Christine pour son aide dans la correction de mon mémoire. À mes petits amours : Estéban, Roméo et Jolan pour leur débrouillardise, leur collaboration et leur acceptation quand je ne pouvais être présente auprès d'eux. À mon prince charmant, mon mari Yves, sans qui ce rêve n'aurait pas pu se réaliser. Il a été tout pour moi. Je ne saurais jamais assez le remercier pour sa présence à mes côtés, sa confiance inébranlable en moi, son appui dans mon projet, son aide incessante, et surtout, pour son merveilleux amour envers moi. Mille fois merci mon chéri.

*Je dédie ce mémoire à mon époux et à mes fils,
ainsi que pour toi, grand-maman*

« Il est toujours trop tôt pour abandonner »

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	v
Remerciements	vii
Table des matières	xi
Liste des abréviations	xiii
Liste des figures	xv
Liste des tableaux	xvii
Chapitre 1 Introduction	1
1.1 Les cellules souches.....	1
1.1.1 Une alternative aux cellules souches embryonnaires pour la recherche.....	4
1.1.2 Le tissu adipeux et les différentes cellules qui le composent, dont les cellules souches.....	5
1.2 Médecine régénératrice.....	8
1.2.1 La méthode d'auto-assemblage.....	9
1.2.2 Une nouvelle tendance : la recherche sans xénoène.....	11
1.3 La greffe, les réactions immunitaires de l'hôte et les maladies zoonoses.....	16
1.3.1 La greffe.....	16
1.3.2 Rejet de la greffe versus réaction d'hypersensibilité de l'hôte.....	17
1.3.3 Les maladies animales pouvant survenir suite à une greffe.....	19
1.4 Problématique et objectifs.....	20
Chapitre 2 Matériels et méthodes	23
2.1 Culture cellulaire <i>in vitro</i> en flacon.....	23
2.1.1 Extraction des cellules souches mésenchymateuses du tissu adipeux.....	23
2.1.2 Décongélation des cellules.....	24
2.1.3 Compte cellulaire.....	24
2.1.4 Observation de certaines caractéristiques cellulaires : leur morphologie et leur diamètre.....	25
2.1.5 Technique de trypsination.....	25
2.1.6 Courbe de prolifération.....	26
2.1.7 Congélation des cellules.....	27
2.2 Culture cellulaire <i>in vitro</i> en plaque de 6 puits.....	27
2.2.1 Production de tissu reconstruit.....	27
2.2.2 Condition dynamique.....	29
2.3 Les différents milieux de culture utilisés.....	30
2.3.1 Le milieu standard.....	30
2.3.2 Le milieu défini LM.....	30
2.4 Différenciation en adipocyte.....	31
2.4.1 Différenciation des cellules en adipocytes <i>in vitro</i>	31
2.4.2 Milieux d'induction.....	32
2.4.3 Milieux de contrôle.....	33

2.4.4 Milieux de culture adipogénique.....	33
2.4.5 Quantification de la différenciation adipocytaire.....	34
2.5 Produits de substitution sans protéine animale	35
2.6 Prise d'échantillons des tissus pour les analyses.....	36
2.6.1 Contraction tissulaire.....	36
2.6.2 Histologie	37
Chapitre 3 Résultats.....	39
3.1 Impact de la trypsine bactérienne <i>TrypLETM Select</i> sur la prolifération cellulaire....	39
3.2 Impact de l'utilisation de milieux définis sur la culture cellulaire	42
3.3 Impact du sérum humain sur la culture cellulaire	46
3.4 Impact sur la différenciation adipocytaire de la présence d'insuline humaine dans le milieu d'induction de la différenciation	48
3.5 La nécessité d'avoir ou non un revêtement dans les flacons.....	49
3.6 Impact du <i>CryoStorTM CS10</i> sur la cryopréservation des cellules.....	51
3.7 Production de tissus reconstruits en 3D avec le milieu LM sans sérum	53
Chapitre 4 Discussion.....	57
Impact de l'utilisation de produits sans xénogène sur la production de tissu reconstruit conjonctif ou adipeux.....	57
Chapitre 5 Conclusion	65
Bibliographie.....	66

Liste des abréviations

A-MEM	Milieu modifié <i>Eagle alpha</i> (<i>modified Eagle medium alpha</i>)
Ang-1	Angiopoïétine-1
CSM	Cellules souches mésenchymateuses (<i>MSC, Mesenchymal stem cells</i>)
CSTA	Cellules souches mésenchymateuses provenant du tissu adipeux
CSM-MO	Cellules souches mésenchymateuses provenant de la moelle osseuse
CryoStor	<i>CryoStorTMCS10</i>
DH	Milieu DMEM/HAM (<i>Dulbecco's modified Eagle Medium : Ham's F-12</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> (Facteur de croissance épidermique)
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Dosage d'immunoabsorption par enzyme liée)
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i> (Facteur de croissance des hépatocytes)
IBMX	Isobutylméthyxanthine
IgE	Immunoglobuline E
IMC	Indice de masse corporelle
KOSR	<i>KnockoutTM Serum Replacement</i>
LM	Milieu défini LM
LOEX	Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale

PAI-1	<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i> (Inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1)
PBS	Tampon saline phosphate
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i> (Facteur de croissance plaquettaire)
S	Sérum
SH	Sérum humain
StemPro	<i>StemPro[®] MSC SFM XenoFree</i>
SVF	Sérum de veau foetal
T3	Thyronine
TrypLE	<i>TrypLETM Select</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> (Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire)

Liste des figures

Figure 1.1 : Origine des différents niveaux de potentialité des cellules souches	2
Figure 1.2 : Les différentes phases de l'embryogenèse humaine observées pendant la première semaine de la conception	3
Figure 1.3 : Schéma représentant une coupe transversale de la peau	5
Figure 1.4 : Capacité de différenciation des cellules souches mésenchymateuses	6
Figure 1.5 : Les deux voies de la médecine régénératrice	8
Figure 1.6 : Représentation schématique du processus de reconstruction de tissu adipeux par la méthode d'auto-assemblage	10
Figure 1.7 : Représentation schématique du processus de réaction immunitaire de type I	18
Figure 2.1 : Représentation schématique des étapes importantes de production de tissus adipeux et de tissus conjonctifs reconstruits par la méthode d'auto-assemblage en génie tissulaire	32
Figure 2.2 : Représentation schématique de la contraction tissulaire d'un tissu reconstruit lors de sa séparation avec l'ancrage de papier	36
Figure 3.1 : Courbe de prolifération de cellules ayant été trypsinées avec différents agents de trypsination sur quelques passages	40
Figure 3.2 : Diamètre des cellules cultivées pour lesquelles la trypsination a été réalisée avec de la trypsine animale standard ou du TrypLE au cours de quatre passages	41
Figure 3.3 : Différenciation adipogénique des feuillets adipeux selon le milieu de culture utilisé après 14 jours de différenciation rehaussée par la coloration lipidique à l'huile rouge	43
Figure 3.4 : Quantification des lipides obtenus dans les feuillets adipeux reconstruits après 14 jours de différenciation en fonction du milieu de culture utilisé	44
Figure 3.5 : Courbe de prolifération de cellules en présence de différents milieux de culture sur trois passages.....	45

Figure 3.6 : Diamètre des cellules obtenues suite à la culture dans différents milieux	46
Figure 3.7 : Différenciation adipogénique des feuillets adipeux selon le milieu de culture utilisé après 14 jours de différenciation	47
Figure 3.8 : Quantification des lipides obtenus dans les feuillets adipeux reconstruits après 14 jours de différenciation en présence d'insulines animale ou humaine	48
Figure 3.9 : Pourcentage de mortalité cellulaire après l'extraction et quantité de cellules récoltées après une semaine de culture suivant l'extraction en présence ou non de revêtement dans les flacons de culture	50
Figure 3.10 : Morphologie des cellules après 7 jours de culture en présence ou non de revêtement à la polylysine (cellules au passage 0)	51
Figure 3.11 : Viabilité des cellules ayant été cryopréservées dans le milieu de conservation standard ou dans du CryoStor	52
Figure 3.12 : Aspect histologique représentatif des tissus reconstruits conjonctifs et adipeux dans différents milieux de culture	54
Figure 3.13 : Effet du milieu de culture sur l'épaisseur des tissus reconstruits	54
Figure 3.14 : Photo macroscopique de la contraction d'un tissu reconstruit avec du milieu DH 10% SVF et du milieu LM sans sérum	55
Figure 3.15 : Pourcentage de contraction tissulaire lors du retrait de l'ancrage du tissu reconstruit	56

Liste des tableaux

Tableau 1.1 : Résumé de quelques études faites sur la culture des cellules mésenchymateuses sans xénoène	14
Tableau 2.1 : Répertoire des produits avec et sans xénoène utilisés en reconstruction de tissu conjonctif et/ou adipeux	35
Tableau 3.1 : Pourcentage de mortalité des cellules lors de la trypsination avec différents agents de trypsination sur quatre passages	40

Chapitre 1

Introduction

1.1 Les cellules souches

Depuis toujours l'être humain s'intéresse à tout ce qui l'entoure, mais un sujet qui l'intrigue tout particulièrement, c'est lui-même. C'est pourquoi il existe différents champs d'étude sur l'homme, tels que la psychologie, la médecine et l'anthropologie. Par ailleurs, on trouve aussi l'embryologie. L'embryologie est une science qui étudie la formation de l'homme et ce à partir de l'ovule fertilisé jusqu'à la construction d'un humain tout entier. Cette formation est possible grâce aux premières cellules qui sont formées lors de la fertilisation de l'ovule. Ces cellules sont les cellules souches.

Les cellules souches sont des cellules indifférenciées, c'est-à-dire qu'elles n'ont pas de spécialité cellulaire. Ces cellules sont prisées en recherche pour leur potentiel de division illimité et leur possibilité de se différencier en plusieurs types cellulaires (Tondeur *et al.*, 2008). Il existe divers degrés de potentialité chez les cellules souches qui sont alors qualifiées de totipotentes, de pluripotentes, de multipotentes et d'unipotentes (Figure 1.1).

Les cellules souches totipotentes sont des cellules ayant la capacité d'acquérir toutes les spécialités cellulaires, d'où leur nom totipotente qui signifie : tout pouvoir. En effet, elles peuvent engendrer les quelques 200 types de cellules que l'on retrouve chez l'homme (Hemmat *et al.*, 2010). Elles sont prélevées sur l'ovule au quatrième jour de la fécondation, c'est-à-dire à la phase de morula (Figure 1.2). Quand les cellules sont prélevées de l'embryon à la phase du blastocyste, elles sont pluripotentes. En recherche, quand on utilise des cellules souches de provenance embryonnaire, ce sont celles-ci. La pluripotentialité de ces cellules signifie qu'elles peuvent se différencier en tous les types de cellules, mais ne

peuvent donner naissance à un être humain entier (Hatzfeld *et al.*, 2006). Les cellules souches multipotentes sont des cellules qui ne se différencient qu'en un certain type de cellule. En général, les types cellulaires sont définis selon le feuillet embryonnaire dont proviennent les cellules (De Vos *et al.*, 2009, Coulombel, 2010, Duprat *et al.*, 2010). En effet, lors de la gastrulation, c'est-à-dire au début de la troisième semaine après la conception de l'embryon, il y a formation de trois catégories de feuillets embryonnaires: le mésoderme, l'endoderme et l'ectoderme (Figure 1.1) (Hatzfeld *et al.*, 2006). Ces feuillets vont permettre la genèse de tous les tissus qui font partie de l'organisme. Finalement, on retrouve aussi des cellules souches unipotentes. Celles-ci n'ont qu'une seule spécialité cellulaire possible. Les cellules souches multipotentes et unipotentes se retrouvent chez l'homme autant à l'état embryonnaire qu'à l'état adulte.

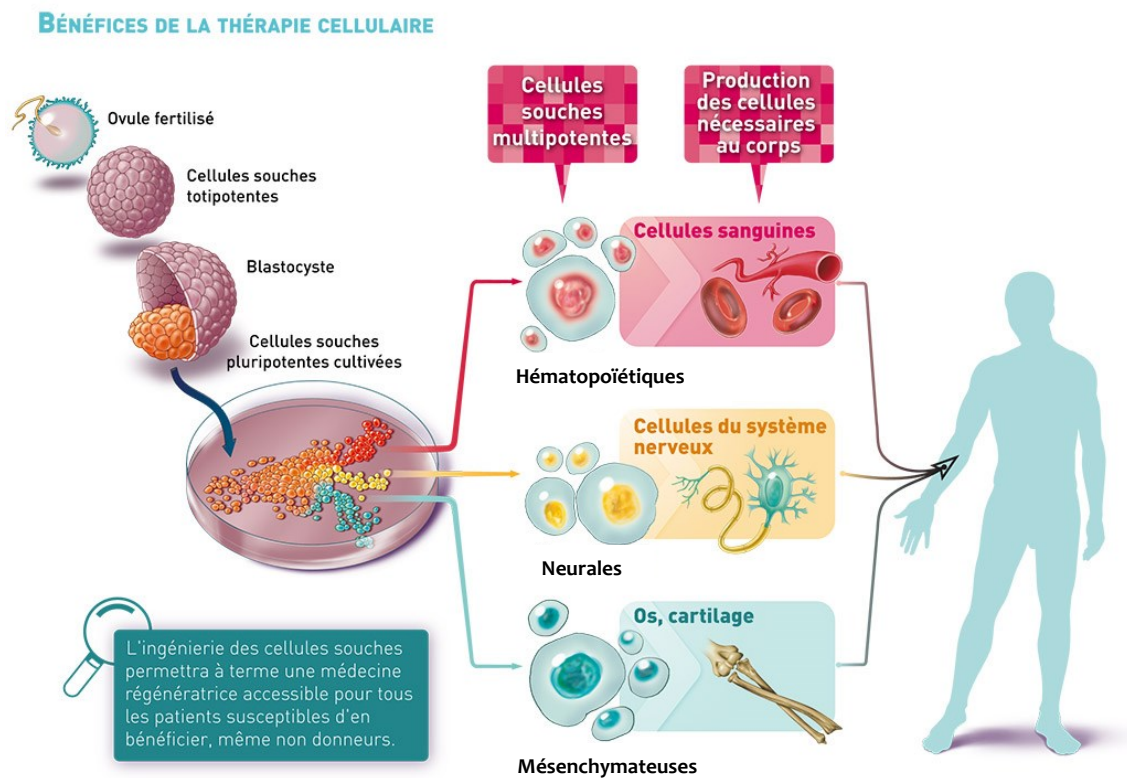


Figure 1.1. Origine des différents niveaux de potentialité des cellules souches.

[www.santedemain.org]



Figure 1.2. Les différentes phases de l’embryogenèse humaine observées pendant la première semaine de la conception.

[Image modifiée de www.virtualmedicalcentre.com]

Ainsi, les premières recherches sur les cellules souches se sont portées sur les cellules souches embryonnaires. Toutefois, obtenir de telles cellules implique la destruction d’embryons. Évidemment, cela n’est pas sans contestation éthique puisque les droits de la personne sont touchés (George & Lee, 2009). Au fil des années, on a constaté qu’il est aussi possible d’extraire des cellules souches du cordon ombilical, de la moelle osseuse et du tissu adipeux. Ces découvertes sont un grand avancement en recherche médicale puisqu’elles permettent de réduire de manière remarquable les besoins en embryons pour obtenir de telles cellules. Cependant, pour certaines recherches thérapeutiques et médicamenteuses, la recherche sur le processus embryonnaire humain, ainsi que la recherche sur certaines maladies génétiques, il est préférable d’utiliser des cellules souches embryonnaires. Pour éviter qu’il y ait des embryons uniquement conçus pour la recherche, la loi permet l’utilisation d’embryons surnuméraires ne provenant que de la procréation médicalement assistée (Hatzfeld et al., 2006, Bernard & Zucker, 2011).

1.1.1 Une alternative aux cellules souches embryonnaires pour la recherche

Dès la découverte des cellules souches humaines adultes, un engouement pour ce nouveau sujet s'est déclaré et a suscité l'intérêt de nombreux chercheurs. Ces cellules sont intéressantes en recherche car leur obtention ne soulève pas certaines questions juridiques ou éthiques puisqu'il n'y a pas de destruction d'embryon humain lors de leur extraction. Elles sont d'autant plus avantageuses qu'elles peuvent être prélevées chez des patients au stade adulte, ce qui facilite grandement leur acquisition et augmente leur diversité.

Les cellules souches adultes ayant été principalement étudiées sont celles extraites de la moelle osseuse. On y retrouve, entre autres, les cellules souches hématopoïétiques et mésenchymateuses. Ce sont des cellules multipotentes et qui ont aussi la possibilité de s'auto-renouveler (Gomillion & Burg, 2006). Cependant, pour extraire les cellules souches mésenchymateuses, une anesthésie rachidienne ou totale est souvent nécessaire. Ce sont des extractions douloureuses pour le patient. Lors d'une extraction, seulement une faible quantité de cellules souches est extraite, ce qui implique qu'il faut être judicieux dans l'utilisation qu'on en fait. Pour en avoir une quantité suffisante pour la recherche, il est nécessaire de faire une banque de cellules. D'ailleurs, il est intéressant d'avoir une banque de cellules provenant d'un même donneur car cela permet d'avoir beaucoup de cellules provenant de la même origine. En contrepartie, faire une banque de cellules peut épuiser les cellules, augmenter la possibilité de contamination et de mortalité. De plus, faire une telle extraction nécessite des frais qui sont relativement dispendieux.

Voyant cela, certains chercheurs se sont intéressés à rechercher la présence de cellules souches adultes dans d'autres tissus du corps humain. Leur recherche fut fructueuse, puisqu'ils ont été capables d'isoler, entre autres, des cellules souches mésenchymateuses à partir de différents organes, tels que le cordon ombilical et le tissu adipeux (Wagner *et al.*, 2005). Les principaux avantages des cellules souches issues du tissu adipeux sont la facilité de leur extraction, leur abondance et leur potentiel de prolifération *in vitro*. D'ailleurs, deux pourcents de ces cellules extraites du tissu adipeux

possèderaient les caractéristiques des cellules souches mésenchymateuses (Strem *et al.*, 2005), alors que dans la moelle osseuse, ce pourcentage s'élèverait seulement à 0,005%.

1.1.2 Le tissu adipeux et les différentes cellules qui le composent, dont les cellules souches

Le tissu adipeux est un tissu conjonctif qui recouvre une vaste zone de notre corps. On le retrouve sous forme de différents dépôts, ainsi que sous la peau où il constitue l'hypoderme (Figure 1.3). Ce tissu conjonctif est hautement spécialisé, il a la propriété d'entreposer l'énergie pour notre organisme et de l'isoler contre le froid par la présence de nombreux vaisseaux sanguins (Gomillion & Burg, 2006). Dans le tissu adipeux, lorsque l'on retrouve une forte quantité de mitochondries dans les adipocytes, le tissu sera brun (Casteilla & Dani, 2006, Gimble *et al.*, 2007). Dans le cas contraire, il sera blanc. À la naissance, l'humain possède davantage de tissu brun que de blanc. Progressivement, en vieillissant, le tissu blanc va se substituer au tissu brun.

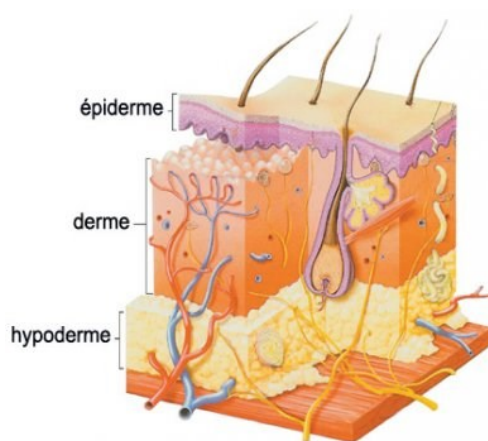


Figure 1.3. Schéma représentant une coupe transversale de la peau.

[www.baudrin.lautre.net]

Le tissu adipeux est composé, entre autres, de cellules souches mésenchymateuses, de fibroblastes, d'adipocytes, de cellules endothéliales, de cellules musculaires lisses, de cellules sanguines, de monocytes, de macrophages et de lymphocytes (Gomillion & Burg, 2006, Cheng *et al.*, 2011). Une des particularités du tissu adipeux est la présence de lipides. Ces lipides sont contenus dans les adipocytes. En effet, à l'état mature, le cytoplasme de l'adipocyte peut contenir jusqu'à 90% de lipides (Patrick, 2004).

En laboratoire, il est possible de produire des adipocytes en induisant la différenciation des cellules souches mésenchymateuses contenues dans le tissu adipeux, en supplémentant le milieu de culture avec des hormones et des facteurs de croissance. Par ailleurs, en 2001 et 2002, les travaux du Dr. Zuk et ses collègues ont démontré la multipotentialité de ces cellules souches. En effet, elles peuvent aussi se différencier en chondrocytes, en ostéocytes, en myocytes, en cellules musculaires lisses et en cellules neuronales (Figure 1.4) (Safford *et al.*, 2002, Zuk *et al.*, 2002, Zuk *et al.*, 2001, Liu *et al.*, 2009).

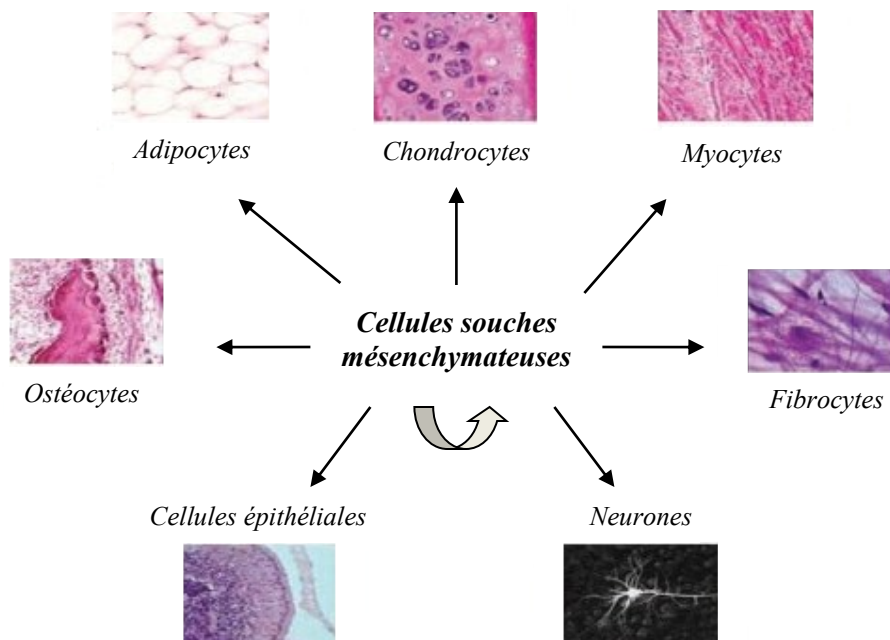


Figure 1.4 Capacité de différenciation des cellules souches mésenchymateuses.
 [Figure modifiée de (Liu *et al.*, 2009)]

Au Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale, les cellules souches mésenchymateuses utilisées pour la recherche sont prélevées du tissu adipeux sous-cutané que l'on retrouve au niveau des cuisses, des fesses et des hanches. Aucune cellule ne provient du tissu adipeux abdominal car des études antérieures ont montré que les propriétés de ces cellules adipeuses ne sont pas les mêmes. Les cellules souches mésenchymateuses se retrouvent généralement dans des endroits périvasculaires et auraient des caractéristiques des péricytes (Crisan *et al.*, 2008, Lin *et al.*, 2008). Les cellules souches mésenchymateuses sont fusiformes. Elles ont une morphologie semblable à celle des fibroblastes (Kassem *et al.*, 2004, Barry & Murphy, 2004). Par la présence, entre autres, de facteurs de croissance et de cytokines, ces cellules ont un effet paracrine (Ghannam *et al.*, 2010). Il a été remarqué que sur ces cellules souches la caractérisation des marqueurs de surface diffère d'une étude à l'autre. Ce fait s'explique parce que les phénotypes de ces cellules sont différents selon la méthode de culture utilisée et/ou selon le niveau de différenciation des cellules, d'où la discordance que ce sujet peut apporter d'un article scientifique à l'autre (Kassem *et al.*, 2004, Baer & Geiger, 2012). On ne retrouve pas de marqueurs spécifiques et uniques pour identifier les cellules souches mésenchymateuses humaines, par contre, on sait que ces cellules sont CD31-, CD45-, CD34+/- (selon l'anticorps utilisé et les conditions de culture), CD73+, CD90+ et CD105+ (Baptista *et al.*, 2009, Mitchell *et al.*, 2006). Et, évidemment, on peut se fier à leur capacité de différenciation (Baer & Geiger, 2012).

Ainsi, par les différents qualificatifs qui les caractérisent, comme leur abondance dans le tissu adipeux, leur simplicité à être extraites en grande quantité, leur possibilité de se multiplier et de se différencier *in vitro*, les cellules souches mésenchymateuses représentent un parti très intéressant pour la médecine régénératrice (Gimble *et al.*, 2007).

1.2 Médecine régénératrice

La médecine régénératrice est un complément à la médecine traditionnelle. En effet, elle possède l'originalité d'utiliser des cellules souches pour soigner les patients. Ces cellules souches proviennent soit du patient lui-même, soit d'un donneur. La médecine régénératrice comprend deux grands domaines : la thérapie cellulaire et le génie tissulaire (Figure 1.5).

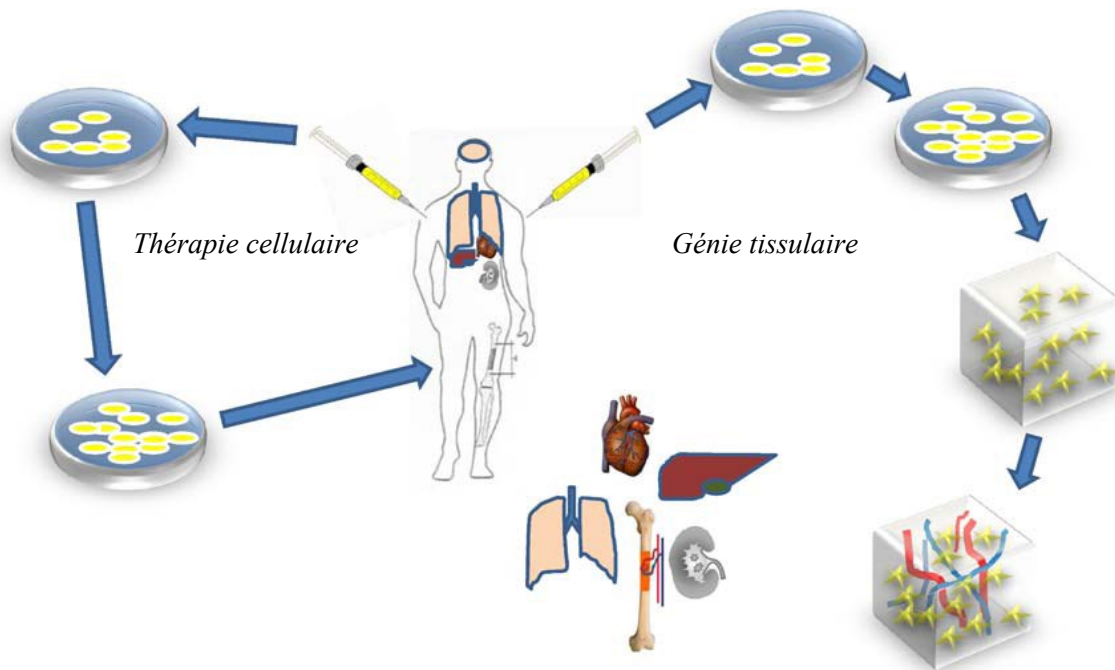


Figure 1.5. Les deux voies de la médecine régénératrice.
[(Ehnert et co., 2009)]

La thérapie cellulaire est une technique d'approche médicale qui consiste à injecter ou à appliquer chez un patient des cellules souches naturelles ou modifiées pour remplacer ou stimuler la guérison des tissus qui sont atteints et ainsi permettre la guérison de l'organisme. Habituellement, les cellules souches utilisées n'ont pas encore de spécialité, c'est-à-dire qu'elles n'ont pas été différenciées avant l'injection. Elles se différencieront ou non selon les besoins de l'organisme grâce aux molécules sécrétées par l'organisme lui-même.

Le génie tissulaire, lui, est une technique qui vise à reproduire du tissu humain en laboratoire pour des fins de transplantations, d'études sur les médicaments ou d'études sur certaines maladies. Cette technique permet de reconstruire *in vitro* un tissu ou même un organe à partir de différentes sources de cellules humaines et ce, à l'aide d'échafaudages synthétiques ou naturels. Ces tissus reconstruits peuvent servir à aider la guérison d'un tissu abîmé chez un patient, régénérer un tissu ayant perdu sa fonctionnalité ou se substituer à des tissus ou des organes endommagés. Ainsi, les cellules souches utilisées ici sont souvent différenciées avant leur implantation, en laboratoire, vers le type cellulaire souhaité (Ehnert *et al.*, 2009). Toutefois, on utilise aussi des cellules souches n'ayant pas été différenciées, comme celles qui se trouvent dans le derme ou dans le tissu conjonctif.

1.2.1 La méthode d'auto-assemblage

En génie tissulaire, pour faire de la reconstruction de tissu *in vitro*, les cellules sont principalement cultivées à l'aide d'échafaudages synthétiques ou naturels. Dans les échafaudages synthétiques, on peut compter les disques de polymères, les éponges, les mousses et les microsphères injectables (Gomillion & Burg, 2006). Ces biomatériaux sont utilisés pour faciliter la formation des tissus en trois dimensions. Ici, au centre de recherche LOEX, la technique privilégiée de reconstruction de tissus est la méthode d'auto-assemblage (Grinnell *et al.*, 1989, Hata & Senoo, 1989, Ishikawa *et al.*, 1997, L'Heureux *et al.*, 1998). Un des avantages de cette technique est qu'elle ne nécessite pas de biomatériaux. En effet, la présence de tels matériaux pourrait compliquer l'utilisation du tissu reconstruit chez le patient. D'ailleurs, plusieurs équipes de recherche se sont intéressées à la possibilité d'une réaction immunitaire provoquée par la présence de biomatériaux dans le tissu nouvellement greffé chez un patient (Tang & Eaton, 1995, Anderson *et al.*, 2008, Onuki *et al.*, 2008, Morais *et al.*, 2010).

La méthode d'auto-assemblage consiste à ajouter un supplément d'acide ascorbique au milieu de culture enrichi de sérum bovin, afin qu'ensemble ils stimulent les cellules à sécréter de la matrice extracellulaire et aident à son organisation. Ceci permet la formation

d'un feuillet cellulaire tridimensionnel manipulable. Et par l'empilement de trois feuillets cellulaires, par exemple, une cohésion peut se faire entre eux pour créer un tissu reconstruit plus épais. Les premiers tissus réalisés par la technique d'auto-assemblage étaient faits à base de fibroblastes et de cellules musculaires lisses (L'Heureux et al., 1998, Michel *et al.*, 1999). Par la suite, la Dre Fradette a adapté cette méthode pour permettre aux cellules souches mésenchymateuses, provenant du tissu adipeux, de se différencier en adipocytes tout en stimulant la production de matrice extracellulaire et ce, dans le but d'obtenir du tissu adipeux humain reconstruit (Figure 1.6) (Vermette *et al.*, 2007, Trottier *et al.*, 2008).

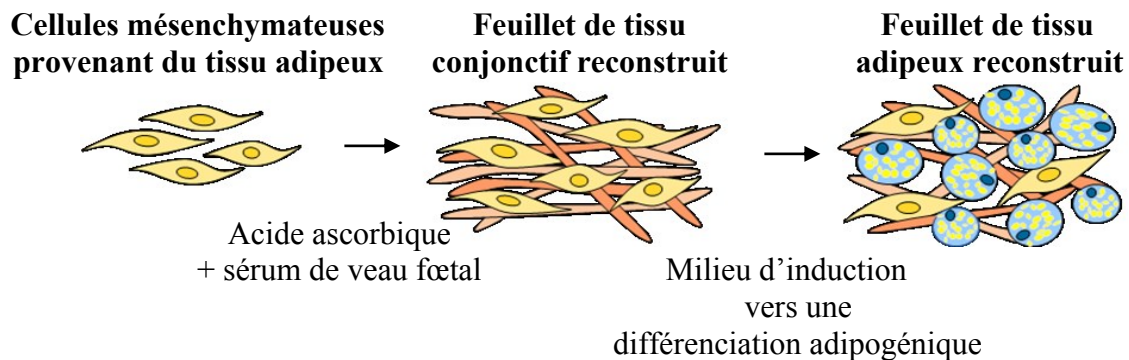


Figure 1.6. Représentation schématique du processus de reconstruction de tissu adipeux par la méthode d'auto-assemblage.

© Dre Julie Fradette

Les tissus adipeux reconstruits par la méthode d'auto-assemblage ont l'avantage de ne pas contenir de biomatériaux exogènes. Ils sont produits pour faire de la greffe de la peau contenant les trois couches : épiderme, derme et hypoderme pour permettre de combler la perte des tissus lors d'une brûlure au 3^{ème} degré, par exemple (Trottier et al., 2008). Ils peuvent aussi servir à combler des résections de tumeurs comme l'ablation d'un sein cancéreux ou corriger des problèmes au niveau du tissu adipeux, tel que la lipodystrophie. Bien sûr, ils peuvent aussi servir pour la recherche, comme outils pour tester différents produits pharmacologiques. Ils sont structurellement similaires au gras humain natif (Vallee *et al.*, 2009, Vermette et al., 2007). La matrice extracellulaire de ces tissus adipeux reconstruits contient du collagène I et IV et de la fibronectine et leurs

adipocytes sont remplis de lipides. Ils contiennent des adipocytes fonctionnels, comme le montrent la sécrétion de leptine et leur capacité à effectuer la lipolyse suite à une stimulation appropriée (Vermette et al., 2007)

1.2.2 Une nouvelle tendance : la recherche sans xénogène

Pour la réalisation de tissus reconstruits, différents produits sont utilisés pour permettre la survie des cellules, leur prolifération et leur différenciation. Cependant, plusieurs de ces produits sont d'origine animale, ce qui implique que l'on peut retrouver dans les tissus reconstruits destinés à la greffe la présence de composantes animales résiduelles. Cette présence pourrait provoquer un rejet de la greffe de la part de l'hôte. Et en effet, il a été observé que les anticorps de l'hôte réagiraient en lysant les cellules nouvellement greffées (Hatzfeld et al., 2006). Face à cet éventuel danger, plusieurs équipes de recherche se sont penchées sur la question pour contrer ce problème. Ainsi, pour éviter la présence de xénogènes (gènes provenant d'une autre espèce) l'utilisation d'alternatives aux produits de provenance animale est encouragée. Par ailleurs, la 6^{ème} recommandation du guide *Lignes directrices pour l'application en clinique des cellules souches* de l'*International Society for Stem Cell Research* (ISSCR) préconise que:

« Lorsque cela est possible, les composantes d'origine animale utilisées dans la culture ou la préservation des cellules devraient être remplacées par des composantes humaines ou des composantes chimiquement définies pour réduire les risques de transfert accidentel aux patients de matériel chimique ou biologique indésirable ou de pathogènes ((ISSCR), 2008). »¹

Cependant, la présence de protéines animales dans la culture cellulaire n'est pas une mince affaire à solutionner, puisque la majorité des additifs ou des produits sont d'origine animale, que ce soit du sérum, des hormones, des suppléments, de la trypsine ou des agents

¹ http://www.isscr.org/clinical_trans/pdfs/ISSCR_GLClinicalTrans_French_FNL.pdf

de cryopréservation. Il n'est pas possible de faire une simple substitution de ces produits sans s'attendre à ce qu'il se produise un impact sur la culture cellulaire puisqu'inévitablement, il y en aura. Pour avoir un bon produit de substitution, il est nécessaire d'en trouver un qui réponde aux besoins des cellules sans modifier leurs caractéristiques biologiques ni morphologiques, et qui puisse satisfaire aux exigences espérées, tout en minimisant les coûts que cela peut entraîner. C'est pourquoi des équipes comme celles du Dr Moustapha Kassem, du Dre Bettina Lindroos et du Dr Adam Katz travaillent dans cette voie et tentent d'améliorer la culture des cellules souches mésenchymateuses pour une utilisation clinique sans xénogène.

Un des plus grands facteurs de transmission de protéines animales que l'on retrouve généralement en culture cellulaire est le sérum de veau fœtal. C'est un supplément nutritif qui complète le milieu de culture par la présence de facteurs de croissance et d'éléments tels que l'albumine et la fibronectine qui contribuent à l'attachement des cellules au plastique. Pour réduire la présence de protéines animales dans les tissus reconstruits, il est primordial de chercher une alternative au sérum bovin. C'est pourquoi l'équipe du Dr Kassem a comparé l'effet de la substitution du sérum de veau fœtal dans le milieu de culture par du sérum humain sur ses cultures de cellules souches mésenchymateuses originaires de la moelle osseuse. Leur étude a porté, entre autres, sur la prolifération cellulaire et leur différenciation adipocytaire *in vitro*. Les résultats obtenus étaient similaires d'un sérum à l'autre (Aldahmash *et al.*, 2011). Le Dr Kassem constate que l'on retrouve une grande variabilité, hétérogénéité dans la littérature, entre les résultats obtenus d'une équipe de chercheurs à l'autre (Tableau 1.1). En effet, pour sa part, l'équipe du Dre Karen Bieback a démontré que le sérum humain nuit à la prolifération à long terme sur les cellules souches mésenchymateuses comparativement au sérum de veau fœtal et que des différences au niveau de la taille et l'adhérence des cellules sont observées (Bieback *et al.*, 2009, Bieback *et al.*, 2010). De son côté, le Dre Asli Kocaoemer et son équipe ont constaté que la capacité des cellules à proliférer était augmentée lors de six passages successifs et que leur différenciation adipocytaire se maintenait bien (Kocaoemer *et al.*, 2007). La Dre Bettina Lindroos et son équipe ont aussi utilisé le sérum humain. Ils ont comparé l'effet de milieu enrichi de 15% de sérum humain ou de 10% de sérum de veau fœtal sur la caractérisation des cellules : la prolifération, la différenciation, les marqueurs de surface et

l'expression des gènes (Lindroos *et al.*, 2010). En présence de 15% de sérum humain, il a été possible de produire une prolifération cellulaire satisfaisante ainsi qu'une adipogénèse. La cytométrie en flux a montré que les marqueurs de surface des cellules observés pour les deux conditions n'avaient aucune différence significative, mais des différences ont été remarquées au niveau de l'expression de certains gènes, comme le TGF- β qui a une expression plus élevée en présence de sérum humain.

L'équipe du Dr Adam Katz a affronté le problème autrement, en décidant de produire un milieu de culture enrichi sans xénoène spécialement conçu pour les cellules mésenchymateuses (Parker *et al.*, 2007). Et contrairement aux études du Dre Lindroos qui a augmenté la quantité de sérum utilisée dans son milieu de culture quand il était de provenance humaine, l'équipe du Dr Adam Katz a conçu un milieu défini nécessitant peu de sérum humain (0,5 à 1%) ou même pas du tout pour répondre aux besoins nutritifs des cellules. Ce milieu est une variante du milieu défini AR8 (Parker *et al.*, 2007), et se nomme : milieu LM. Cependant, ce produit n'est pas disponible sur le marché. Toutefois, une demande de brevet pour le produit a été déposée. Ce milieu en présence d'une faible quantité de sérum humain permet d'améliorer la prolifération cellulaire et une différenciation *in vitro* des cellules en adipocytes, chondrocytes ou ostéocytes a été observée qu'il y ait présence ou non de sérum. L'équipe du Dre Rajala en collaboration avec la Dre Lindroos ont aussi expérimenté un nouveau milieu défini sans xénoène: le RegES (Rajala *et al.*, 2010). Ce milieu serait capable de maintenir la prolifération des cellules souches embryonnaires humaines, des cellules souches pluripotentes induites (iPSC) et des cellules souches mésenchymateuses provenant du tissu adipeux. Et même, il augmenterait de manière significative le taux de prolifération de ces dernières, maintiendrait leur potentiel de différenciation, mais apporterait des différences au niveau de l'expression de certains marqueurs de surface, tels que CD45 et CD34. Pour sa part, l'équipe du Dr Vladimir Zachar a étudié plusieurs milieux de cultures (dont le DMEM/F12, le A-MEM et le LP02) avec différents produits de remplacement du sérum (dont le KOSR et le SR3) à des concentrations variables. La conclusion qu'ils en ont tirée est que le milieu A-MEM (*Eagle medium alpha* modifié) serait le plus approprié pour ce type de cellules. Plusieurs produits de remplacement du sérum donnent un rendement nettement inférieur à celui du sérum de veau fœtal, cependant, il a été observé qu'une concentration de 10% de

KOSR dans le milieu a su maintenir la prolifération des cellules souches mésenchymateuses du tissu adipeux au même niveau qu’avec 10% de sérum de veau foetal. Par contre, à une telle concentration, le KOSR ne permet pas aux cellules d’avoir une capacité de différenciation adipocytaire constante. Effectivement, le Dre Lund et son équipe ont remarqué une différence statistiquement significative entre les moyennes de l’intensité relative densitométrique qu’ils ont obtenues lors la différenciation de leurs cellules en utilisant cette concentration de KOSR dans leur milieu de différenciation (Lund *et al.*, 2009).

Tableau 1.1. Résumé de quelques études faites sur la culture des cellules mésenchymateuses humaines sans xénogène

<i>Milieus de culture sans xénogène</i>	<i>Types de cellules</i>	<i>Résultats obtenus en comparaison à ceux obtenus avec 10% de sérum de veau foetal</i>	<i>Références</i>
α-MEM + 5% de sérum humain	CSM humaines	Prolifération cellulaire comparable	(Aldahmash <i>et al.</i> , 2011)
α-MEM + 10% KOSR	CSTA humaines	Prolifération cellulaire comparable, mais pas de différenciation en adipocytes	(Lund <i>et al.</i> , 2009)
DMEM + 1, 3 ou 10% de sérum humain	CSM-MO humaines	Taux de prolifération cellulaire augmenté et différenciation adipocytaire maintenus pour la culture avec 10% de sérum humain, avec 1 et 3% de sérum les résultats sont inférieurs	(Stute <i>et al.</i> , 2004)
DMEM + 10% de sérum humain	CSTA humaines	Diminution du taux de prolifération cellulaire, morphologie cellulaire légèrement modifiée et variations obtenues au niveau de certains gènes	(Bieback <i>et al.</i> , 2009)
DMEM + 10% de lysat plaquettaire humain	CSTA humaines	Diminution du taux de prolifération cellulaire, conservation de la capacité de différenciation, aucune différence immunophénotypique observée	(Blande <i>et al.</i> , 2009)
DMEM + 2,5% de lysat plaquettaire humain	CSTA humaines	Taux de prolifération satisfaisant	(Blande <i>et al.</i> , 2009)

Milieux de culture et sérums sans xénogène	Types de cellules	Résultats obtenus en comparaison à ceux obtenus avec 10% de sérum de veau foetal	Références
DMEM/F-12 (1:1) + 15% de sérum humain	CSTA humaines	Taux de prolifération cellulaire et différenciation adipocytaire comparables	(Lindroos et al., 2010)
Mesencult-XF	CSM humaines	Prolifération cellulaire possible sans sérum humain	(Hartmann et al., 2010)
Milieu AR8 + 0,5 à 1% de sérum humain	CSTA humaines	Augmentation du taux de prolifération et différenciation adipocytaire maintenue	(Parker et al., 2007)
Milieu RegES (Ko-DMEM) + 10% sérum humain	CSTA humaines	Taux de prolifération cellulaire augmenté, différenciation soutenue et maintien de la multipotentialité des CSTA.	(Rajala et al., 2010)
StemPro® MSC SFM XenoFree + 10% de sérum humain	CSTA humaines	Taux de prolifération cellulaire augmentée	(Lindroos et al., 2009)
StemPro® MSC SFM XenoFree	CSM humaines	Prolifération cellulaire impossible sans sérum humain	(Hartmann et al., 2010, Miwa et al., 2012)

CSM : cellules souches mésenchymateuses

CSTA : cellules souches mésenchymateuses provenant du tissu adipeux

CSM-MO : cellules souches mésenchymateuses provenant de la moelle osseuse

KOSR : *KnockoutTM Serum Replacement*

La trypsination, en génie tissulaire, est une technique importante intervenant durant la prolifération et avant la production de tissus reconstruits. Habituellement, la trypsine utilisée est animale. C'est pourquoi, l'équipe du Dr Carvalho a comparé la trypsine porcine avec le *TrypLETM Express* et le *TrypZean[®]* (Carvalho et al., 2011). Le *TrypLETM Express* est produit par des bactéries, alors que le *TrypZean[®]* provient du maïs. Leur étude s'est basée sur le rendement, la viabilité et l'immunophénotype des cellules souches mésenchymateuses en fonction de la trypsine utilisée. Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différences significatives qu'on prenne une ou l'autre des trypsines.

Lors de la création de banques cellulaires, par exemple, il est bon de pouvoir préserver les cellules à long terme. Pour ce faire, les cellules sont congelées dans un produit de cryopréservation et ultérieurement, elles pourront être décongelées pour être utilisées. Le produit de cryopréservation couramment utilisé est une solution de DMSO/sérum de veau

foetal. Par souci d'éviter les xénogènes, certaines équipes ont étudié des agents de cryopréservation sans protéine animale (Kim *et al.*, 2007, Zeisberger *et al.*, 2011, Thirumala *et al.*, 2010, Lee *et al.*, 2010). Ce n'est pas évident, puisqu'il faut un produit de remplacement qui maintienne l'intégrité des cellules et qui permette une bonne survie de celles-ci après la décongélation. Il existe, entre autres, le *KryoLife™ Xeno-Free* pour les mélanocytes, le *STEM-CELLBANKER®* et le *CELLOTION®* pour les cellules souches embryonnaires ou pour les cellules souches pluripotentes induites et le *CryoStor™CS10* qui semble être plus polyvalent et conviendrait à plusieurs types de cellules dont les cellules souches mésenchymateuses.

1.3 La greffe, les réactions immunitaires de l'hôte et les maladies zoonoses

1.3.1 La greffe

Chez les grands brûlés, dans le but d'aider à la guérison des plaies, on utilise parfois des substituts dermiques pour recouvrir les brûlures. Il en existe sous divers formats, par exemple sous forme de matrice synthétique dermique recouverte de fibroblastes humains allogéniques (*Transcyte®*, *Dermagraft®*) ou recouverte de polypeptides de porc (*Biobrane®*) ou sous forme de peau cadavérique de provenance humaine (*Alloderm®*) (Duprat *et al.*, 2010, Braye *et al.*, 2005). Cependant, outre l'approvisionnement difficile en certaines de ces peaux, une telle greffe peut aussi entraîner un risque de transmission de maladies et parfois provoquer une grave réaction immunitaire chez le patient. Avec les nouvelles avancées en médecine régénératrice, les tissus reconstruits par génie tissulaire sont maintenant utilisés chez les grands brûlés et sont une belle réussite. Ces tissus sont pour la plupart entièrement humains. Cependant, actuellement, plusieurs produits et additifs utilisés lors de la production de tissus reconstruits sont d'origine animale. Bien que ces produits ne se retrouvent que sous forme de traces dans les tissus, il y a un risque de contamination

d'agents infectieux animaux qui pourrait aussi provoquer une réaction immunitaire de la part du patient nouvellement greffé. Cela pourrait entraîner un rejet de greffe ou une maladie post-greffe (Mackensen *et al.*, 2000, Spees *et al.*, 2004).

1.3.2 Rejet de la greffe versus réaction d'hypersensibilité de l'hôte

Lors d'une transplantation de tissu ou d'organe, il y a un risque de rejet de la greffe et/ou d'une réaction d'hypersensibilité de la part de l'hôte. Il est important de discerner la différence entre ces deux réponses. Le rejet de la greffe est dû à une réponse du système immunitaire de l'hôte vis-à-vis du greffon. Ce dernier étant perçu comme un corps étranger, l'organisme de l'hôte se protège à l'aide d'anticorps qui vont « attaquer » le tissu greffé et le détruire. La réaction d'hypersensibilité est aussi une réponse du système immunitaire faisant intervenir des anticorps, mais cette réaction immunitaire peut s'étendre à l'organisme hôte tout entier. Parfois, cette réponse peut être extrême et donc dangereuse pour le patient.

On retrouve trois catégories de rejets de greffe : le rejet hyper aigu, le rejet aigu et le rejet chronique. Le rejet hyper aigu est un rejet qui se fait dans les premières heures suivant la transplantation de la greffe. On observe alors une thrombose des vaisseaux sanguins qui irriguent le greffon. Le rejet aigu est un rejet cellulaire qui intervient dans les trois premiers mois suivant la transplantation du greffon. C'est une réaction des lymphocytes T qui envahissent le greffon et le détruisent. Le rejet chronique s'installe avec le temps, au site du greffon il se crée une inflammation persistante. Cette inflammation entraîne une fibrose des vaisseaux sanguins du tissu greffé ce qui peut réduire considérablement l'irrigation du greffon. Ce dernier mal irrigué finit par se détériorer (Keller & Burlingham, 2011, Kolopp-Sarda *et al.*, 2008).

Il existe des réactions immunitaires où la réponse face au xénogène est excessive, ce sont des réactions d'hypersensibilité. Il y a une quarantaine d'années, les immunologistes anglais Gell et Coombs ont classé ces réactions immunitaires par type de un à quatre (Descotes & Choquet-Kastylevsky, 2001). Cette classification est basée selon le temps de

la réponse et la façon dont l'organisme réagit. Le type I représente une réaction immédiate où des anticorps IgE sont produits en grande quantité. Les IgE relarguent beaucoup d'histamines ou de kininogènes ce qui provoque une vasodilatation, des spasmes dans les muscles lisses, une production de mucus, un œdème et un érythème cutané (Burgmester & Pezzutto, 2005) (Figure 1.7). Le tout peut provoquer un choc anaphylactique qui peut être mortel. En effet, la présence de xénogènes dans les greffons de tissus reconstruits pourrait provoquer ce type de réaction immunitaire (Parker et al., 2007, Lindroos et al., 2010).

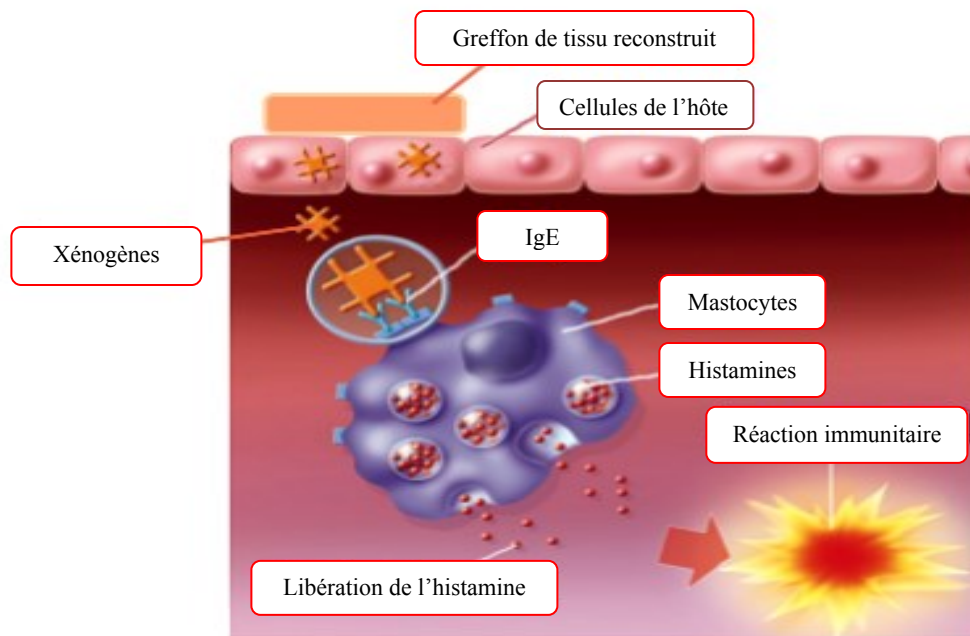


Figure 1.7. Représentation schématique du processus de réaction immunitaire de type I.

[Figure modifiée tirée de www.parisdietetique.fr]

Le type II représente une réaction d'anticorps cytotoxiques qui se produit, par exemple, pendant la grossesse. En effet, cela peut avoir lieu quand la mère a un rhésus négatif et son fœtus un rhésus positif. Après le premier accouchement, elle va créer des anticorps contre le rhésus positif de l'enfant. Cependant, lors de sa deuxième grossesse, si

ce fœtus a aussi un rhésus positif, les anticorps de la mère passeront au travers du placenta et engendreront une hémolyse des érythrocytes fœtaux (Burgmester & Pezzutto, 2005). Sans l'aide de la médecine, cette mère ne pourra plus avoir d'enfant ayant un rhésus positif. Le type III représente une réaction où des complexes immuns sont formés, puis déposés sur les parois des vaisseaux, les poumons, les reins ou les articulations ce qui amène une réaction d'inflammation à ces endroits (Burgmester & Pezzutto, 2005). Le type IV représente une réaction d'hypersensibilité retardée. Pour que cette réaction ait lieu, il faut que les cellules soient en contact à, au minimum, deux reprises avec l'antigène. Lors du premier contact, c'est la phase de sensibilisation, qui dure de 10 à 14 jours. À cette étape, des anticorps spécifiques seront formés. Lors du second contact, ces anticorps se multiplient et s'accumulent, provoquant des oedèmes au niveau de la peau. Une inflammation locale est alors induite par les cytokines relarguées par les anticorps (Burgmester & Pezzutto, 2005).

1.3.3 Les maladies animales pouvant survenir suite à une greffe

Les zoonoses sont des maladies animales transmissibles à l'homme. Elles sont causées par des virus, des bactéries, des prions ou des parasites. Elles peuvent être très dangereuses pour l'homme, au point d'en être mortelles. Il existe plusieurs modes de transmission de ces maladies infectieuses, par un contact avec l'animal, par les manipulations en abattoirs, par l'alimentation ou par xénogreffe.

En génie tissulaire, le risque de contamination avec des protéines animales, sur les cultures cellulaires humaines *in vitro*, est créé par l'utilisation de produits ayant une provenance animale. En effet, lors de ces cultures, des produits tels que les additifs ou la trypsine, par exemple, sont d'origine animale. Ces produits sont nécessaires pour permettre de préserver la viabilité des cellules, leur prolifération et leur différenciation. Bien qu'introduits par petites quantités, leur utilisation est étendue sur plusieurs semaines et cela peut laisser des traces de protéines animales sur les cellules, ce qui « contamine » les futurs feuillets de tissus reconstruits. En soi, dans le domaine de la recherche cela n'affecte en rien

la qualité des tissus produits, mais au niveau clinique, si on vise une utilisation sur un patient, il est préférable de trouver une alternative sans protéines animales.

Les maladies qui pourraient être transmises sont les maladies à prion. Ce sont des maladies où l'agent pathogène possède une grande résistance de survie. La plus connue des maladies à prions transmissible à l'homme est l'encéphalopathie spongiforme, qui s'appelle dans ce cas la maladie de Creutzfeldt-Jakob. C'est une maladie essentiellement bovine, cependant elle a été aussi découverte à de rares occasions chez d'autres animaux, tel que le chat ou la chèvre (Dormont, 1997, Williams & Miller, 2003). Comme un des principaux suppléments ajoutés au milieu de culture est le sérum de veau fœtal, on se méfie. Surtout que les tissus reconstruits sont destinés à être utilisés sur un tissu blessé, déjà affaibli au niveau de sa défense immunitaire. Les symptômes de la maladie sont suffisamment sévères pour qu'il soit important d'en tenir compte. Chez l'homme, les symptômes apparaissent après plusieurs années. Ils débutent par des signes psychiatriques, ensuite nerveux jusqu'à la paralysie pour terminer par la mort du patient. Malheureusement, aucun traitement ne semble pouvoir soigner cette maladie. Même s'il est peu probable que ce type de maladie soit transmissible dans nos cultures, il est bon d'en tenir compte.

1.4 Problématique et objectifs

En médecine régénératrice, il est parfois nécessaire de faire la greffe de tissu adipeux, notamment dans le but de remplacer un manque en tissu mou causé par une maladie congénitale ou acquise, ou par l'ablation d'une tumeur ou par une brûlure profonde. L'objectif global de ce projet consiste à produire des tissus reconstruits conjonctifs et adipeux pour une utilisation clinique. Il s'agirait d'une greffe autologue car le tissu serait reconstruit à partir de cellules prélevées par lipoaspiration chez le patient lui-même. L'avantage d'être autologue est qu'il y a très peu de risque de rejet après la greffe et cela évite la transmission d'éventuelles maladies. Cependant, de par la présence des protéines animales résiduelles provenant, en grande partie, du milieu de culture dans lequel

les tissus sont reconstruits, il y aurait un risque potentiel de transmission d'agents infectieux et de graves réactions immunitaires de la part du patient nouvellement greffé (Rajala et al., 2010, Lindroos et al., 2009, Parker et al., 2007, Aldahmash et al., 2011). Or la méthode actuelle de production de tissus inclut l'utilisation de sérum de veau fœtal et d'autres produits d'origine animale. Ce projet de recherche se veut de suivre la 6^{ème} recommandation du guide *Lignes directrices pour l'application en clinique des cellules souches* de l'*International Society for Stem Cell Research* (ISSCR) qui a été définie à la section 1.2.2.

Commercialement, on peut retrouver des milieux de culture pour les cellules mésenchymateuses ne contenant pas de sérum animal, ni de protéine animale (Baer *et al.*, 2010, Hattori *et al.*, 2008, Lindroos et al., 2009, Lund et al., 2009, Parker et al., 2007). Le milieu sans xénoène qui a été choisi pour ce projet d'étude est un milieu qui semble prometteur : le milieu défini LM. Il constituerait une alternative intéressante répondant aux critères cliniques souhaités. Ce milieu est une variante du milieu AR8 élaboré par le Dr Katz de l'Université de Virginie aux États-Unis (Parker et al., 2007). Il a été conçu pour les cellules mésenchymateuses. Présentement, il est en instance de brevet, il n'est pas encore en vente libre, mais grâce à une collaboration, ce milieu a été utilisé pour les expériences présentées dans ce mémoire.

Ainsi, dans la vision d'une future application clinique, ce projet de maîtrise vise à reconstruire du tissu conjonctif et adipeux humain par auto-assemblage en absence de protéines animales pour répondre au critère sans xénoène.

L'hypothèse de recherche est que le remplacement des produits utilisés contenant des protéines animales par des produits sans xénoène permettra la production de tissu humain autant conjonctif qu'adipeux par la méthode d'auto-assemblage en génie tissulaire. Cependant, pour réaliser l'auto-assemblage à partir des cellules, il est habituellement nécessaire d'ajouter du sérum de veau fœtal et de l'acide ascorbique car cela incite les cellules à sécréter de la matrice et à s'organiser en feuillets cellulaires. Donc, la substitution du sérum d'origine bovine est particulièrement importante.

Les différents objectifs du projet sont d'étudier l'impact des produits sans xénoène lors de la production de tissu humain : conjonctif et adipeux. Premièrement, l'impact d'une trypsine d'origine bactérienne sur les cellules en prolifération a été analysé. Deuxièmement, l'effet de différents milieux de culture en présence ou non de sérum humain autant sur la prolifération cellulaire que sur la reconstruction de tissus a été déterminé. Troisièmement, l'impact de différents substituants utilisés pour éviter que les cellules aient un contact avec des protéines animales, tels que l'agent de cryopréservation sur la conservation des cellules et l'insuline humaine sur la différenciation des cellules en adipocytes a été étudié.

Chapitre 2

Matériels et méthodes

2.1 Culture cellulaire *in vitro* en flacon

2.1.1 Extraction des cellules souches mésenchymateuses du tissu adipeux

Lors de la lipoaspiration, il n'y a pas que des cellules adipeuses qui sont retirées au patient. L'extrait de gras retiré contient aussi des cellules souches, des cellules sanguines circulantes, des fibroblastes et des péricytes. En signant un consentement éthique, le patient autorise que son prélèvement de gras soit utilisé pour la recherche. À sa réception, on procède au nettoyage du gras reçu. Le nettoyage se fait avec du PBS de culture 1X supplémenté d'antibiotiques et de fongicide gentamicine, pénicilline et fungizone. Pour ce faire, on procède comme suit : on rince abondamment le gras avec le PBS, puis on aspire le surplus de liquide, et l'opération est répétée jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de trace de sang dans le liquide. Ensuite, pendant 30 minutes d'agitation, à 37°C, le gras rincé est traité par de la collagénase stérile dans des unités de trypsination. La collagénase (Sigma-Aldrich, St-Louis, États-Unis) utilisée est diluée à 0,075% dans un tampon Krebs-Ringer Buffer à pH 7.4. Avant d'être utilisée, cette solution est stérilisée par un filtre 0,22 µm. Ensuite, l'incubation est poursuivie par 10 minutes de trypsination. La trypsination est arrêtée par du milieu de culture, ce qui, par le fait même, dilue le produit de l'extraction. Le produit est alors centrifugé à 1180 rpm pendant 20 minutes. Le surnageant est aspiré et le culot est préservé. Celui-ci contient, entre autres, les cellules souches mésenchymateuses. Un compte cellulaire est fait à l'hémacymètre. Une prise d'échantillon du culot est faite pour réaliser un contrôle de qualité par cytométrie en flux. Les cellules sont prêtes à être ensemencées dans des flacons avec du milieu de culture à une densité de 66 000 cellules/cm². Le lendemain, un changement de milieu est fait pour chaque flacon afin d'enlever les débris et les cellules non-adhérées, telles que les macrophages, les

érythrocytes et les cellules mortes. Ces cellules en passage 0 sont trypsinées avant la confluence et congelées pour de futures expériences.

2.1.2 Décongélation des cellules

Habituellement, c'est par la décongélation de populations cellulaires que débutent les expérimentations. Il y aura une exception où l'expérience débute avec des cellules qui ont été fraîchement extraites entièrement sans la présence de protéines animales (tel qu'il a été expliqué à la section 2.1.1). Les cellules congelées qui sont utilisées étaient préservées dans de l'azote liquide. Ensuite, une centrifugation de cette suspension a été faite pour obtenir un culot de cellules. Ce culot fut resuspendu avec du milieu chaud, soit milieu DH vierge ou soit milieu LM dépendamment de la condition de culture cellulaire voulue. Un décompte cellulaire a été fait à l'hémacymètre (Bright Line). Cela permet de connaître aussi la mortalité des cellules survenue lors de leur décongélation. Par la suite, les cellules ont étéensemencées à $6,6 \times 10^3$ cellules/cm² dans des flacons Nunc (VWR international, Mississauga, Ontario, Canada) de 25 cm² ou de 75 cm² pour une amplification cellulaire.

2.1.3 Compte cellulaire

Après une décongélation cellulaire ou une trypsination (section 2.1.5), un compte au bleu de trypan à l'hémacymètre est réalisé. Ce produit permet de voir les cellules viables : petites et rondes, alors que les cellules mortes sont un peu plus grosses et teintées en bleu foncé. Le pourcentage de mortalité cellulaire est calculé par le nombre de cellules mortes divisé par le nombre total de cellules comptées multiplié par cent. Un autre compte est aussi fait au Coulter (*Coulter Counter*, Beckman Coulter, Floride, États-Unis). Avec le Coulter, il est aussi possible de connaître la grosseur moyenne des cellules. Ces comptes sont faits pour quantifier les cellules présentes. C'est grâce à ces données qu'il est possible

de connaître la mortalité cellulaire, la grosseur des cellules et de tracer des courbes de prolifération.

2.1.4 Observation de certaines caractéristiques cellulaires : leur morphologie et leur diamètre

Chaque type cellulaire est unique, les cellules ont des caractéristiques qui leur sont propres. Il en existe plusieurs, on compte entre autres leurs marqueurs de surface, leur morphologie, leur diamètre, leur fonction (section 2.4.5) et leur capacité de prolifération (section 2.3.1).

La morphologie des cellules est importante car si celle-ci change, cela veut dire que les cellules sont affectées, c'est-à-dire qu'elles se différencient ou qu'elles sont en apoptose (Wlodkowic *et al.*, 2012). Les observations morphologiques des cellules se font au microscope Olympus CKX41 (Olympus, Tokyo, Japon). Elles permettent de qualifier les cellules : leur forme, leur aspect et leur taille. Ces observations sont faites avant chaque changement de milieu. Ce qui représente une observation tous les 2 jours en moyenne. Ainsi, s'il y a une modification au niveau de la morphologie des cellules, elle pourra être rapidement perçue.

Comme il a été mentionné dans la section précédente, le diamètre des cellules est déterminé pendant un compte cellulaire au Coulter. L'appareil permet de savoir le diamètre médian et la moyenne des diamètres des cellules qui sont passées dans le compteur.

2.1.5 Technique de trypsination

La trypsination consiste à dissocier les liens entre les cellules et la surface du flacon afin de séparer les cellules entre elles. Pour la trypsination de ces expériences, deux types de trypsines ont été utilisés : la trypsine animale (*Trypsine 1-500*, Intergen, Toronto,

Ontario, Canada) habituellement utilisée au laboratoire, ainsi, que le *TrypLE™ Select* (GIBCO™, Invitrogen Corporation, Burlington, Ontario, Canada). Cette dernière est une trypsine composée d'enzymes recombinants provenant d'une fermentation microbienne. Elle a pour avantage de ne pas contenir de xénoène animal. Le produit s'utilise comme suit : après avoir enlevé le milieu du flacon, les cellules sont nettoyées par une solution tampon de phosphate salin (PBS), puis trypsinées au TrypLE pendant une incubation de 3 min. à 37°C. Ensuite, pour permettre de diluer le TrypLE et ainsi interrompre son effet, deux fois plus de milieu de culture qu'habituellement est ajouté dans le tube. La suite de la procédure pour trypsiner avec le TrypLE est identique à celle utilisée par la trypsine habituelle, c'est-à-dire qu'après avoir prélevé la suspension cellulaire et l'avoir mise dans un tube stérile, un rinçage du flacon avec 2 ou 4 ml de milieu est fait. Ce rinçage est aussi préservé dans le tube stérile. Une centrifugation de ce tube est faite à 1180 tours par minutes pendant 10 minutes (Labbe *et al.*, 2011). Par la suite, le surnageant est aspiré tout en conservant le culot cellulaire. Ce culot est resuspendu dans du milieu pour avoir la concentration désirée. Les cellules sont maintenant prêtes à êtreensemencées.

2.1.6 Courbe de prolifération

Pour étudier l'effet des milieux de culture sur la prolifération cellulaire, une courbe de prolifération a été réalisée. Elle permet de voir au cours des passages comment se comportent les cellules dans leur milieu respectif. Pour ce faire, au moins 3 flacons de 25 cm² ou de 75 cm² ont étéensemencés pour chacune des conditions (n = 3). Un changement de milieu de culture total a été fait tous les 2-3 jours de culture pour tous les flacons. Au 7^{ème} jour de culture, des photos macroscopiques d'un flacon de chaque condition de culture ont été prises au grossissement 4X, 10X et 20X pour permettre de visualiser la confluence des cellules et leur morphologie. Grâce à une trypsination des cellules dans les flacons, un compte cellulaire à l'hémacymètre et au Coulter a été fait pour quantifier la prolifération et la mortalité des cellules en fonction de leur milieu respectif et pour connaître le diamètre des cellules. Pour permettre de tracer une courbe de prolifération, les cellules de chaque flacon sont comptées individuellement, mais avant

l'ensemencement, les cellules de tous les flacons de la même condition sont regroupées dans un seul tube pour homogénéiser la population cellulaire. Le restant des cellules a été ensemencé à nouveau dans au moins 3 autres flacons de 25 cm² ou 75 cm² par condition pour un nouveau passage (P). À chaque trypsination, un passage est compté. Les résultats obtenus sont portés sur un graphique. Les données sont présentées en ratio de cellules récoltées sur cellules ensemencées par cm² par jour. Ces données sont des moyennes de celles obtenues avec des écart-types SD.

2.1.7 Congélation des cellules

Pour conserver les cellules, il est préférable que celles-ci soient au stade de prolifération lors de la congélation. À ce stade, les cellules sont trypsinées et comptées à l'hémacymètre avec du bleu de Trypan. Elles sont ensuite centrifugées. Puis, elles sont suspendues à nouveau avec 1 ml de milieu de congélation froid à une concentration entre 1x10⁶ et 3x10⁶ de cellules par vial. Les cellules sont congelées dans l'azote liquide. Les deux milieux de cryopréservation utilisés sont soit le milieu standard composé de 10% de DMSO (Sigma- Aldrich, St-Louis, États-Unis) et de 90% de sérum de veau fœtal (Hyclone, Logan, UT, USA) ou soit le *CryoStorTMC510* (StemCell Technologies Inc, Vancouver, Canada). Ce dernier a la particularité d'être un agent de cryopréservation sans protéine animale et sans sérum. Il ne nécessite aucune dilution, il est prêt à être utilisé.

2.2 Culture cellulaire *in vitro* en plaque de 6 puits

2.2.1 Production de tissu reconstruit

Toutes les cultures cellulaires des expériences présentées dans ce mémoire ont été produites dans un incubateur (*SANYO CO₂ incubator*, SANYO Electric Co. Ltd.) à 37 °C et à 8% de CO₂ pour simuler un environnement *in vivo*, tel qu'il est habituellement utilisé pour nos travaux qui incluent parfois la culture de kératinocytes humains (Germain &

Auger, 1995). Les manipulations des cellules ont été réalisées sous une hotte à flux laminaire stérile à la température de la pièce. Les milieux utilisés étaient toujours préchauffés à 37 °C pour éviter un traumatisme aux cellules.

La prolifération cellulaire s'est faite sur une semaine ou deux, selon le besoin en quantité de cellules. Cependant à chaque semaine, quand les cellules amplifiées atteignaient environ 90% de confluence, elles étaient trypsinées. Ensuite, les cellules étaient soit réensemencées dans des flacons pour poursuivre l'amplification cellulaire, soit mises dans des plaques Nunc pour produire des feuillets cellulaires. Ainsi, lors de la production de tissu, les cellules étaient ensemencées dans des plaques Nunc de 6 puits dont chaque puits de 9,6 cm² contenait un ancrage de papier filtre (Whatman[®], Fisher Scientific, Ottawa, Canada). L'ancrage est un anneau de 3,4 cm de diamètre d'une épaisseur de 0,5 cm. Il sert de support aux cellules pour faciliter la manipulation des feuillets reconstruits et pour éviter une contraction du feuillet. Préalablement, les puits avec leur ancrage respectif ont été rincés avec une solution tampon de phosphate salin pour enlever le restant de charpie du papier filtre. Sur les ancrages, après l'ensemencement des cellules dans les puits, des minis lingots d'acier inoxydable ont été déposés pour maintenir le papier au fond de la plaque et lui conférer une forme plane. L'ancrage et les lingots ont été maintenus dans le puits tout le long de chaque expérience (Labbe et al., 2011).

Lors de la production des feuillets en plaque, un supplément d'acide ascorbique (Sigma-Aldrich, St-Louis, États-Unis) d'une concentration de 50 µg/ml est ajouté au milieu de culture à chaque changement de milieu. Ce supplément stimule les cellules à produire et à organiser la matrice extracellulaire. Cependant, il est important de préparer le supplément le jour même de son utilisation car cet acide ascorbique (ascorbate de sodium) dissout se dégrade rapidement en présence de l'oxygène et d'un pH basique. Les changements de milieux contenus dans les puits sont réalisés à une fréquence de 2 ou 3 jours. Pour éviter que les cellules aient un contact avec l'air, seulement la moitié du milieu par puits est changée, c'est-à-dire 3 ml sur 6 ml.

Grâce à des études antérieures, on est certain qu'après 4 semaines de culture, les feuillets reconstruits sont manipulables. Par conséquent, au jour 28 de culture, ils sont levés et empilés (Labbe et al., 2011). Pour ce faire, trois feuillets cellulaires traités dans les mêmes conditions ont été soulevés de la plaque et les ancrages de chacun ont été agrafés ensemble pour construire un tissu tridimensionnel conjonctif ou adipeux selon le cas (section 2.2.1) et les déposer dans un pétri contenant leur milieu respectif. Pour avoir une bonne cohésion entre les feuillets, deux petits cercles de Mérocel (lingette chirurgicale, Medtronic OphtaLMics, Jacksonville, Floride, États-Unis), un anneau et des poids supplémentaires ont été déposés sur l'empilement. Après 24h, les cercles de Mérocel et l'anneau ont été enlevés. Au jour 35 de culture, les tissus tridimensionnels étaient prêts à être analysés. Des échantillons de tissus ont été prélevés : un tiers de ceux-ci est utilisé pour faire des colorations histologiques (section 2.5.2), un autre tiers est congelé dans un milieu d'enrobage OCT pour des analyses ultérieures (section 2.5.3) et le dernier tiers préservé pour de futures analyses protéiques.

2.2.2 Condition dynamique

Habituellement les cultures se font en condition statique et restent tout le long de l'expérience sur le plateau de l'incubateur. Cependant, il a été démontré que les cultures cellulaires en condition dynamique, c'est-à-dire des cultures subissant un mouvement de vague continu, donnent un tissu conjonctif plus épais (Fortier *et al.*, 2013). Dans le but d'optimiser les conditions de culture, les expériences ont été faites en condition dynamique. À la différence de la culture en condition statique, les cultures en condition dynamique étaient placées, 24 heures après l'ensemencement, sur une plate-forme agitatrice tridimensionnelle (*Ocelot Rotator*, Fisher Scientific) à 35 tours par minute. Ce délai permettait aux cellules de se fixer au fond de la plaque. Lors de l'empilement aussi, il y a un délai de 24 heures avant la remise des pétris sur la plate-forme agitatrice. Cependant, il est bon de préciser que lors de la prolifération cellulaire en flacon, les cultures sont en condition statique et ce n'est que lors de la production de tissus que les cultures en plaque ou en pétri sont en condition dynamique.

2.3 Les différents milieux de culture utilisés

2.3.1 Le milieu standard

Pour préserver les cellules en culture *in vitro*, elles sont cultivées dans un milieu de culture qui va leur apporter des nutriments. Le milieu de base utilisé est composé du milieu DMEM-HAM (DH) 1:1 (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada), c'est-à-dire du *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) et du *Ham's F12* (HAM) contenant une solution tampon de 15 mM d'*HEPES* et de 1,2 g/L de NaHCO₃. Pour éviter d'éventuelles contaminations, 100 UI/ml de pénicilline combinée avec 25 µg/ml de gentamicine sont ajoutées au milieu. Ce milieu est supplémenté de sérum de veau fœtal (SVF) (Hyclone, Logan, Utah, États-Unis) concentré à 10%. Ce milieu constitue le milieu de référence habituellement utilisé (Vermette et al., 2007). Lors de certaines expériences, le sérum utilisé sera du sérum humain (SH) à différentes concentrations de 1% ou de 10% pour obtenir le milieu DH 1% de sérum humain ou celui à 10% de sérum humain. Le sérum humain (Lonza, Walkersville, États-Unis) vient de donneurs humains ayant été testés négatifs pour l'hépatite B et C, ainsi que pour le VIH-I et VIH-II.

2.3.2 Le milieu défini LM

Le milieu défini LM est un milieu de culture sans sérum et sans xénoène développé par l'équipe du Dr. Katz (Parker et al., 2007). C'est un milieu qui est enrichi de plusieurs additifs pour compenser le manque de sérum. On y retrouve entre autres de l'insuline humaine. Ce milieu est fait à une concentration de 10X et préservé congelé à -20°C. Pour les expériences réalisées dans ce mémoire, il a été décongelé et dilué à 1x dans du milieu DH vierge. L'antibiotique composé de 100 UI/ml de pénicilline combinée avec 25 µg/ml de gentamicine lui a été ajouté pour donner du milieu LM 1X sans sérum. Pour réaliser un milieu LM 1% de sérum humain, il a suffi d'ajouter 1% de sérum humain à du milieu LM sans sérum.

Lors de la préparation du milieu de culture dans un contenant de verre, le sérum est toujours mis en premier, suivi par l'insuline car en présence du verre, l'insuline se colle aux parois. Le sérum contient de l'albumine qui enrobe le verre, ce qui empêche l'insuline de s'y coller. Pour le bon fonctionnement de l'expérience, il faut évidemment que l'insuline reste dans le milieu de culture. Comme les milieux définis contiennent peu ou pas de sérum, le milieu LM a été maintenu dans des bouteilles en polyéthylène téréphthalate copolyester stériles (NALGENE Labware, VWR international, Mississauga, Ontario, Canada) afin de préserver l'insuline dans le milieu de culture.

2.4 Différenciation en adipocyte

2.4.1 Différenciation des cellules en adipocytes *in vitro*

La différenciation cellulaire est l'étape de spécialisation où la cellule développe ses caractères biochimiques, physiologiques et morphologiques qui vont lui conférer une spécialité : hépatocyte, lymphocyte ou adipocyte. *In vitro*, pour produire des tissus ayant une spécialité particulière, on stimule les cellules en utilisant un milieu de culture contenant un cocktail spécifique de suppléments. Ainsi, pour que les cellules stromales mésenchymateuses se différencient en adipocytes, il faut induire leur différenciation. Pour cela, on utilise à tour de rôle un milieu d'induction (section 2.4.2) et un milieu pour adipocytes (section 2.4.4) (Labbe et al., 2011). Le milieu d'induction est celui qui incite les cellules à se différencier en adipocytes. Il a été utilisé sur les cellules le septième jour de leur culture en plaque (Figure 2.1). Puis, le troisième jour suivant l'induction, le deuxième milieu a été utilisé et ce, jusqu'à la fin de l'expérience, c'est un milieu adipogénique (Figure 2.1). Celui-ci a une composition nécessaire pour entretenir les adipocytes. Pour chaque plaque de 6 puits, trois puits possédaient des cellules induites qui se sont différenciées en partie en adipocytes, et les trois autres puits possédaient des cellules non-induites, c'est-à-dire seulement du tissu conjonctif. Ces dernières sont les contrôles des cellules induites. Elles ont été cultivées dans le même milieu tout au long de l'expérience, excepté le jour 7 de culture, où un milieu de contrôle a été utilisé (section 2.4.3).

Ainsi pour induire les cellules, les puits sont entièrement vidés de leur milieu qui est remplacé par du milieu d'induction ou du milieu de contrôle, selon la condition. Trois millilitres de milieu par puits seront introduits. Après les 3 jours suivant le jour de l'induction, les puits sont complétés par 3 ml du milieu adipogénique pour les puits induits; pour les puits non-induits du milieu de base typique à chacune des conditions étudiées a été utilisé. Pour chacun des puits, le traitement a été identique pour ne pas biaiser les résultats.

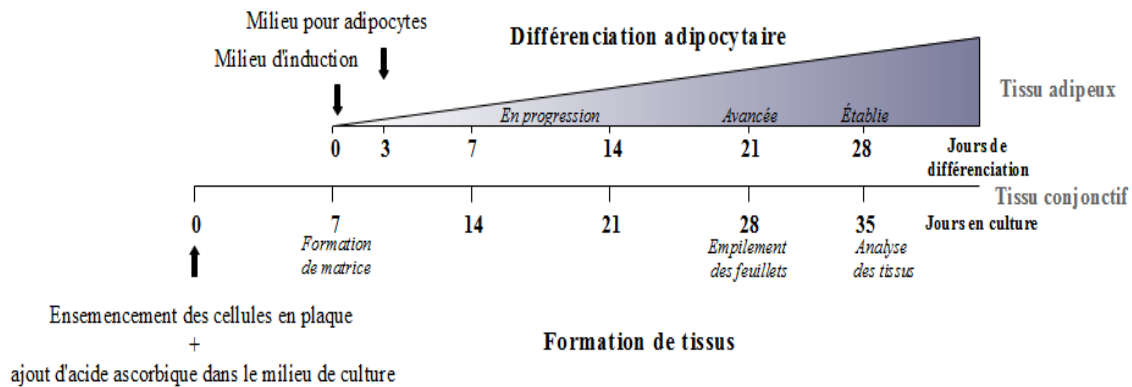


Figure 2.1. Représentation schématique des étapes importantes de production de tissus adipeux et de tissus conjonctifs reconstruits par la méthode d'auto-assemblage en génie tissulaire. (Figure modifiée de (Vermette et al., 2007)).

2.4.2 Milieux d'induction

Pour que les cellules stromales mésenchymateuses se différencient en adipocytes, il faut un milieu d'induction. Ce milieu est utilisé, une seule fois, après 7 jours de culture, c'est-à-dire environ 3 à 5 jours après la confluence des cellules. Comme chaque condition a son propre milieu, un milieu d'induction a été fait pour chacune d'elle. Le milieu d'induction est composé à partir du milieu de base avec seulement 3% de sérum auquel 100 nM d'insuline (Sigma), 0,2 nM de thyronine (T3) (Sigma), 1 μ M de dexaméthasone

(Sigma), 0,25 mM d'isobutylméthylxanthine (IBMX) (Sigma) et 1 μ M de rosiglitazone (Cayman Chemical, Cedarlane Laboratories Ltd.) sont ajoutés. Ces deux derniers additifs sont des puissants inducteurs pour les cellules (Rosen & Spiegelman, 2000, Albrektsen *et al.*, 2002). Ainsi pour le milieu DH 10 % SVF ou 10% SH, c'est leur sérum respectif qui fut utilisé à 3% seulement. Pour le milieu LM sans sérum, aucun sérum n'a été utilisé dans la préparation du milieu d'induction. Et pour le milieu LM 1% SH, c'est 1% de sérum humain qui a été mis et non 3%.

2.4.3 Milieux de contrôle

Pendant les trois jours de l'induction uniquement, un milieu de contrôle a été fait pour les puits qui ont servi de contrôle lors de la différenciation adipocytaire, c'est-à-dire les puits où sont produits les tissus conjonctifs. Ce milieu de culture est composé de milieu DH où seulement 3% de sérum humain ou bovin ont été utilisés au lieu de 10% de sérum. Cependant, aucun sérum n'a été mis dans le milieu LM sans sérum et uniquement 1% de sérum humain dans celui à 1% de sérum humain. À ces milieux, 38 μ l de diméthylsulfoxyde (DMSO) ont été ajoutés pour 100 ml de milieu. Le DMSO est le produit utilisé pour diluer les additifs utilisés dans le milieu d'induction. Il est à noter que ce produit peut être toxique pour les cellules, mais à une concentration plus élevée que celle utilisée (Rowley & Anderson, 1993). Toutefois, pour permettre à toutes les cellules de recevoir un traitement équivalent, il a été introduit dans la préparation du milieu de contrôle.

2.4.4 Milieux de culture adipogénique

Après les trois premiers jours d'induction, l'expérience se poursuit avec un milieu adipogénique pour les cellules en différenciation seulement. Ce milieu comprend 100 nM

d'insuline, 0,2 nM de thyronine et 1 μ M de dexaméthasone qui sont ajoutés aux milieux de base DH contenant 10% de sérum humain ou de veau foetal, à celui LM contenant 1% de sérum humain ou sans sérum (Vermette et al., 2007, Labbe et al., 2011).

2.4.5 Quantification de la différenciation adipocytaire

Lors d'observation au microscope d'un feuillet de tissu adipeux en formation, la présence de petites gouttelettes de lipides dans le feuillet permet de visualiser la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes. Ceci la démontre qualitativement. Cependant, il est possible de quantifier cette différenciation adipocytaire et ce, grâce à une coloration à l'huile rouge. En effet, cette huile colore les lipides neutres contenus dans les cellules et tout principalement ceux retrouvés dans les adipocytes. Cela leur donne une teinte rougeâtre, contrairement aux autres organites qui sont dans les tons de gris. La coloration à l'huile rouge des feuillets reconstruits dans des plaques de 6 puits est pratiquée le 21^{ème} jour de culture des feuillets, soit 14 jours après l'induction ou non de la différenciation adipocytaire. Le protocole utilisé est une modification du protocole réalisé par l'équipe de Kuri-Harcuch (Kuri-Harcuch & Green, 1978, Ramirez-Zacarias *et al.*, 1992). Les feuillets reconstruits sont rincés à l'aide de PBS pour être ensuite fixés dans du formol 3,7%. Après une incubation de 30 minutes à la température de la pièce, les feuillets sont colorés avec une solution contenant de l'huile rouge. Cette solution est composée de 0,3% d'huile rouge en poudre (Sigma) et de 3 portions d'isopropanol (Fisher Scientific) pour 2 portions d'eau distillée stérile. Les feuillets restent dans la solution de coloration pendant 15 minutes. La coloration est arrêtée par de l'éthanol 70% et les feuillets sont à nouveau rincés avec de l'eau distillée stérile. Puis, des photos des feuillets sont prises à différents grossissements, tels que 4X, 10X et 20X. L'extraction lipidique des cellules se fait à l'aide d'une solution de 4% *Nonidet*TM (Sigma) dans de l'isopropanol. C'est dans ce produit que doivent incuber les feuillets reconstruits pendant 10 à 15 minutes. Ensuite, le produit contenu dans chacun des puits où se trouve un feuillet reconstruit est récolté individuellement (n = 3) et lu au spectrophotomètre *SpectraMax*[®] *Plus* (Molecular Devices) à une longueur d'onde de 520 nm. Le logiciel *SoftMax*[®] *Pro* version 4.7.1. permet de

connaître la quantité de lipides contenus dans chaque puits, donc d'évaluer la différenciation en adipocytes de chaque feuillet de tissu adipeux reconstruit. Les analyses de données sont faites avec le logiciel *Prism* (GraphPad Software Inc., La Jolla, Californie, États-Unis) et c'est le Test de Student T, non pairé qui a été utilisé pour les analyses statistiques. Les résultats finaux sont une soustraction des valeurs obtenues pour les feuillets de tissu adipeux (feuillets induits) par celle obtenues pour les feuillets de tissus conjonctifs (feuillets non-induits).

2.5 Produits de substitution sans protéine animale

Tableau 2.1. Répertoire des produits avec et sans xénoène utilisés en reconstruction de tissu conjonctif et/ou adipeux

<i>Produits habituellement utilisés</i>	<i>Produits de substitution sans xénoène</i>	<i>Étape de la reconstruction tissulaire où il intervient</i>
Milieu de culture de base (DH) <i>Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada</i>	Milieu défini LM <i>Virginie, USA</i> Milieu StemPRO® MSC SFM Xeno free <i>GIBCO™, Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada</i>	Tout au long de la reconstruction
Sérum de veau fœtal <i>Hyclone, Logan, Utah, USA</i>	Sérum humain <i>LONZA, Walkesville, USA</i>	Prolifération
Insuline animale (pancréas bovin) <i>SIGMA-ALDRICH, St-Louis, USA</i>	Solution d'insuline humaine (recombinante de levures) <i>SIGMA-ALDRICH, St-Louis, USA</i>	Différenciation
Trypsine 1-500 (origine porcine) <i>Intergen, Toronto, Ontario, Canada</i>	TrypLE™ Sélect (origine bactérienne) <i>GIBCO™, Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada</i>	Extraction cellulaire, trypsination durant la prolifération et avant la congélation

<i>Produits habituellement utilisés</i>	<i>Produits de substitution sans xénoène</i>	<i>Étape de la reconstruction tissulaire où il intervient</i>
Milieu de cryopréservation standard (10% DMSO et 90% SVF)	CryoStor™ CS10 STEMCELL TECHNOLOGIES INC, Vancouver, Canada	Congélation
Aucun revêtement	Poly-L-Lysine 0,01% solution SIGMA-ALDRICH, St-Louis, USA	Extraction (passage 0)

2.6 Prise d'échantillons des tissus pour les analyses

2.6.1 Contraction tissulaire

Lors de la fin d'une expérience, les tissus sont séparés de leur ancrage de papier à l'aide d'un scalpel (Figure 2.2). Le tissu est coupé le long de l'ancrage. Aussitôt, il se contracte. Pour pouvoir faire une analyse de cette contraction de tissu et permettre de mesurer celle-ci, une photographie macroscopique du tissu au côté d'une règle millimétrique est prise.

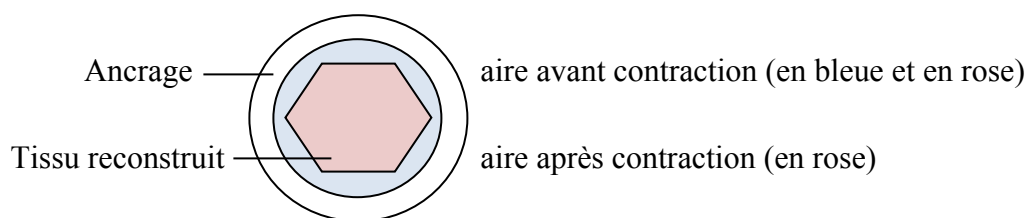


Figure 2.2. Représentation schématique de la contraction tissulaire d'un tissu reconstruit lors de sa séparation avec l'ancrage de papier.

Le logiciel Image J permet de mesurer la contraction tissulaire. L'échelle des mesures que le logiciel utilise est ajustée à une distance connue de la règle photographiée avec le tissu. Le logiciel, calibré par cette mesure, est utilisé pour connaître l'aire avant contraction, puis l'aire après contraction observée sur la photographie. Les données sont compilées pour évaluer le pourcentage de contraction tissulaire, c'est-à-dire soustraire la mesure de l'aire après la contraction à celle de l'aire avant la contraction, le tout divisé par la mesure de l'aire avant contraction.

2.6.2 Histologie

Il est fort intéressant de pouvoir observer l'aspect histologique des tissus reconstruits afin de visualiser leur structure. Pour ce faire, lors de la fin d'une expérience, quatre échantillons de chaque tissu sont prélevés sur une lamelle et fixés dans du formol tamponné à 10%. Les échantillons sont ensuite enrobés de paraffine, puis, coupés transversalement de 5 µm. Par échantillon, il y a deux coupes qui sont répétées trois fois ($n = 3$). Les coupes des échantillons sont déposées sur des lames, puis colorées au trichrome de Masson. Cette coloration permet de bien distinguer certaines composantes contenues dans le tissu : le collagène en bleu, le cytoplasme des cellules en rose et leur noyau en violet. Pour les tissus adipeux reconstruits, les adipocytes sont reconnaissables par la présence de trou blanc dans le tissu coloré. Ainsi, grâce à ces coupes colorées il est possible d'observer un côté qualitatif du tissu reconstruit, c'est-à-dire son côté histologique, mais il est aussi possible d'avoir un côté quantitatif, c'est-à-dire la mesure de son épaisseur. Pour ce faire, chaque coupe a été photographiée deux fois à deux endroits différents et trois mesures de l'épaisseur du tissu par photo ont été effectuées avec le logiciel Image J (*NIH*, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Ces photographies ont été réalisées à partir d'un appareil photo Nikon Coolpix 4500 (Nikon, Montréal, Québec, Canada) fixé sur un microscope Nikon Eclipse Ts100.

2.6.3 Prise de surnageants

Avant de faire la coloration à l'huile rouge, des échantillons de surnageant ont été prélevés pour de futures analyses ELISA, afin de connaître certaines molécules que les adipocytes des tissus reconstruits sécrètent. Lors du dernier changement de milieu, avant le jour prévu pour la fin de l'expérience, une plaque contrôle a été faite. Celle-ci devait contenir chacun des milieux utilisés lors de l'expérience. Cette plaque ne doit posséder aucune cellule dans ses puits. Par puits, on doit retrouver un échantillon de 4 ml d'un des milieux utilisés. Puis, la plaque est incubée dans les mêmes conditions que les plaques contenant des cellules. Ainsi, le jour de la fin de l'expérience, on a des échantillons de surnageant des cultures et leurs contrôles. Trois millilitres de chacune des conditions ont été prélevés et répartis dans trois microtubes stériles distincts (1 ml par microtube). Ces échantillons sont congelés et préservés à -80°C jusqu'au jour de leur utilisation.

3.1 Impact de la trypsine bactérienne *TrypLETM Select* sur la prolifération cellulaire

L'objectif de ce projet est de reproduire du tissu humain conjonctif ou adipeux sans xénogène. Pour ce faire, il est nécessaire de substituer les produits d'origine animale utilisés habituellement lors de cette production par des produits ne contenant aucune protéine animale. Donc, étape par étape, les produits ont été substitués.

La trypsination est une technique qui consiste à dissocier les liens entre les cellules et la surface du flacon et les cellules entre elles et ce, grâce à un produit de trypsination. La trypsine est une endoprotéase qui hydrolyse les liens peptidiques des acides aminés, lysine et arginine, au niveau du carbone terminal (<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes/trypsin.html>). Cette technique est couramment utilisée en culture cellulaire lors de l'amplification des cellules. Actuellement, au Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale, la trypsine utilisée est animale. Elle est d'origine porcine. Pour éviter qu'il y ait des traces de protéine animale dans la culture des cellules, un substitut de trypsine a été utilisé : le *TrypLETM Select*. Celui-ci est d'origine bactérienne. Afin de déterminer si le TrypLE pourrait affecter la prolifération des cellules souches mésenchymateuses extraites du tissu adipeux, deux cultures cellulaires en parallèle ont été réalisées sur plusieurs passages dans le milieu DH 10% SVF. Une où les cellules ont été trypsinées avec la trypsine animale et l'autre avec le TrypLE. Les résultats montrent que lors des premiers passages le TrypLE ne semble pas affecter la prolifération des cellules, alors que pour des passages plus élevés, tel que le passage 6, il semblerait qu'il l'affecte légèrement (Figure 3.1).

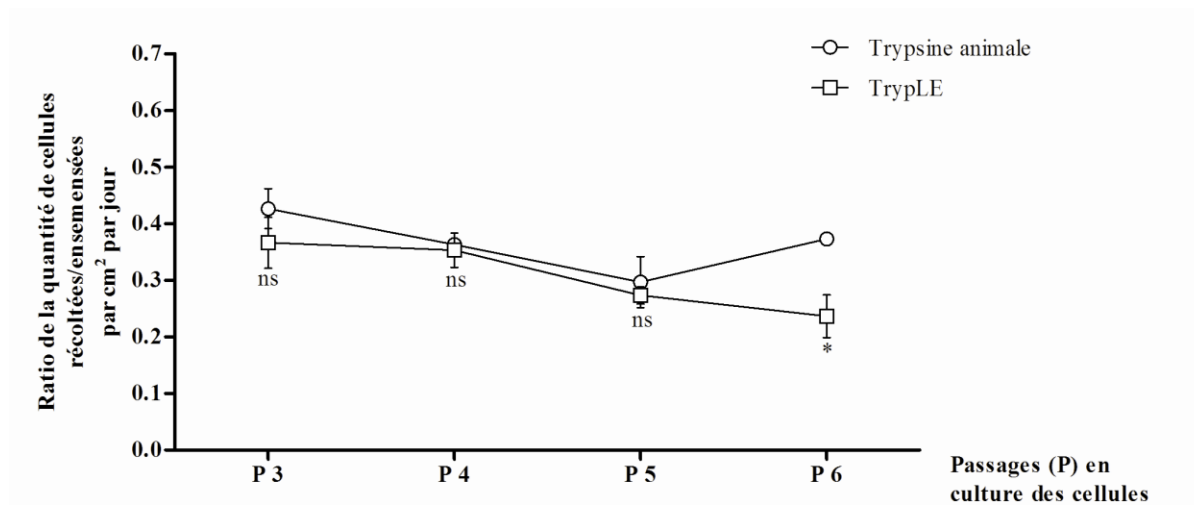


Figure 3.1. Courbe de prolifération de cellules ayant été trypsinées avec différents agents de trypsination sur quelques passages. (n = 3) Cellules cultivées dans du milieu DH 10% sérum de veau fœtal. Test de Student T, non pairé, P = 0,61.

Une détermination de la mortalité des cellules a été réalisée pour déterminer l'effet du TrypLE sur la survie des cellules (Tableau 3.1). Cette observation s'est étendue sur 4 passages, du passage 3 au passage 6. Ce qui a été constaté est que le TrypLE ne semble statistiquement pas être plus nocif pour les cellules que la trypsine standard. D'ailleurs, les taux de mortalité entre les deux conditions sont similaires. Lors des trypsinations, la présence de mortalité cellulaire est chose courante (http://tools.invitrogen.com/content/sfs/brochures/GIBCO_CC19_v3.pdf), mais toujours à une petite échelle et c'est exactement ce que l'on retrouve ici : une mortalité entre 0,7 % et 2,8 %.

Tableau 3.1. Pourcentage de mortalité des cellules lors de la trypsination avec différents agents de trypsination sur quatre passages

<i>Passage</i>	<i>DH 10% SVF (trypsine animale)</i> (%)	<i>DH 10% SVF (TrypLE)</i> (%)
P3	2,62 ± 0,94	2,11 ± 1,88
P4	1,88 ± 0,29	2,21 ± 0,51
P5	2,79 ± 1,55	0,86 ± 0,75
P6	0,95 ± 1,03	0,66 ± 0,57

Un des critères morphologiques qui a été analysé est le diamètre des cellules (Figure 3.2). On a opté pour celui-ci car c'est un bon indice de l'impact que pourrait avoir un produit sur la cellule (Sethe *et al.*, 2006). Le diamètre des cellules souches mésenchymateuses provenant du tissu adipeux *in vitro* est autour de 20 μm . On remarque qu'au fil des passages, le diamètre des cellules reste quasi-similaire entre les différentes cellules autant pour les cellules trypsinées à la trypsine animale qu'au TrypLE. Ceci se produit même au passage 5, où les cellules pour les deux conditions ont un diamètre un peu plus grand que ceux obtenus aux autres passages. Cependant, aucune différence significative n'a été notée entre les valeurs obtenues pour chacun des passages.

Ainsi pour les critères généraux observés, tels que la prolifération cellulaire, la mortalité cellulaire et le diamètre des cellules, le TrypLE peut être considéré comme un bon substitut à la trypsine animale habituellement utilisée. Ceci concorde avec les objectifs de cet ouvrage et permet son utilisation dans les expériences menées ici.

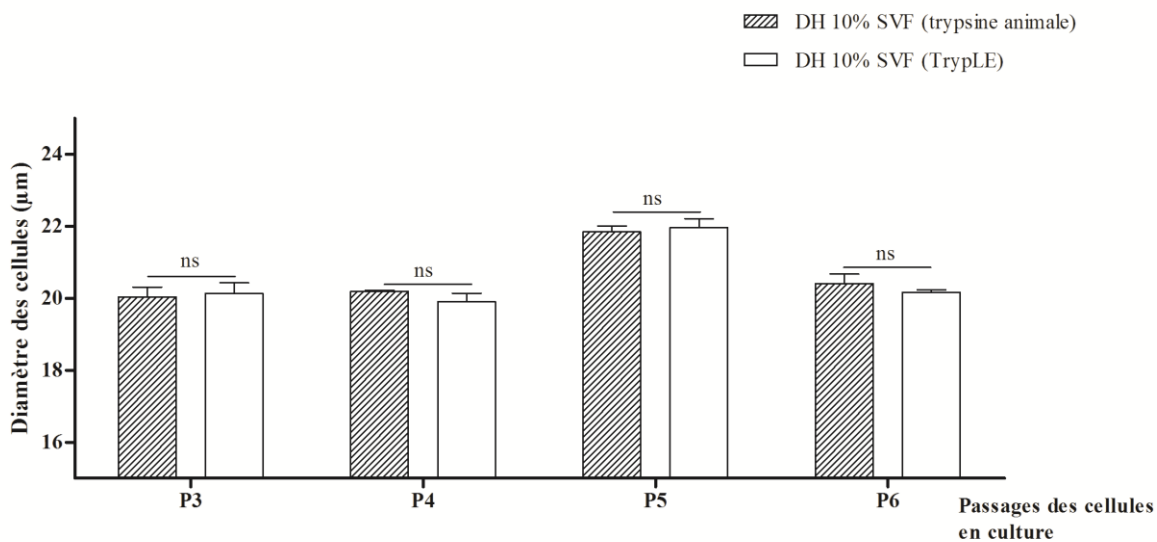


Figure 3.2. Diamètre des cellules cultivées pour lesquelles la trypsination a été réalisée avec de la trypsine animale standard ou du TrypLE au cours de quatre passages. DH 10% SVF (trypsine): P3, n = 2; P4 et P6, n = 4; P5, n = 3. DH 10% SVF (TrypLE) : n = 3; sauf pour P6, n = 4. Test de Student T, non païré. SVF : sérum de veau foetal.

3.2 Impact de l'utilisation de milieux définis sur la culture cellulaire

Dans l'intention de reconstruire des tissus conjonctifs et adipeux dans des conditions dépourvues de xénogènes, il était primordial de changer de milieu de culture, puisque c'est de celui-ci que provient la majorité des protéines animales retrouvées dans les tissus. En effet, le milieu de culture DH habituellement utilisé est toujours supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal. Donc, pour enlever cette source de protéines animales dans le milieu, un substitut au sérum bovin a été utilisé: du sérum humain. Ainsi, deux cultures cellulaires ont été réalisées en parallèle avec du milieu DH, dont une, supplémentée avec 10% de sérum de veau fœtal, l'autre, supplémentée avec 10% de sérum humain. Les résultats obtenus pour la culture faite à base de milieu contenant 10% de sérum humain ne furent pas très encourageants. Effectivement, dès le premier passage, une diminution du taux de prolifération d'environ 49% a été constatée pour la culture ayant été cultivée dans du milieu contenant du sérum humain et ce taux fut maintenu au fil des passages. Pour les cultures en milieu contenant du sérum animal le taux de prolifération d'un passage à l'autre est statistiquement similaire. Puisque le milieu DH enrichi de 10% sérum humain ne convient pas à la prolifération des cellules utilisées, nous nous sommes tournés vers un autre milieu de culture plus approprié.

Sur le marché, il existe quelques milieux définis convenant à une culture pour les cellules mésenchymateuses correspondant aux critères privilégiés pour une utilisation clinique, c'est-à-dire sans xénogène, par exemple le StemPro® MSC SFM XenoFree, le MSC NutriStem® XF Medium et le Mesencult™. Un des milieux défini qui semble répondre aux critères souhaités pour notre type de culture particulière est le milieu défini *StemPro® MSC SFM XenoFree* de la compagnie GIBCO. Par souci de vouloir comparer ses performances avec un autre produit relativement semblable, un autre milieu de culture a été recherché. Celui qui a attiré l'attention est un nouveau milieu défini : le milieu LM. Ce milieu de culture n'est pas encore commercialisé car il est en instance de brevet. Il a été conçu par l'équipe du Dr. Katz de l'Université de Virginie. Ainsi, lors de ce travail, deux milieux définis de culture ont été étudiés soit les milieux StemPro et LM. Pour ces études,

les milieux définis sont aussi comparés au milieu standard utilisé habituellement en laboratoire pour réaliser ce type de culture, c'est-à-dire au milieu DH supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal. Ce dernier a servi de milieu de référence.

Cependant, les cultures faites avec le milieu *StemPro*[®] *MSC SFM XenoFree* n'ont pas donné les résultats escomptés au niveau de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en adipocytes. Notamment, après 14 jours de différenciation, il y avait très peu d'adipocytes dans les feuillets reconstruits. Habituellement, après 2 semaines de différenciation, on observe une quantité intéressante d'adipocytes. Pour confirmer l'observation au microscope, une coloration à l'huile rouge a permis de mettre en évidence tous les adipocytes contenus dans les feuillets. Et effectivement, on ne pouvait observer que quelques petits adipocytes contrairement à ce qui a été observé dans les cultures ayant eu du milieu standard, ainsi que celles cultivées dans le milieu LM sans sérum, où de nombreux adipocytes étaient visibles (Figure 3.3).

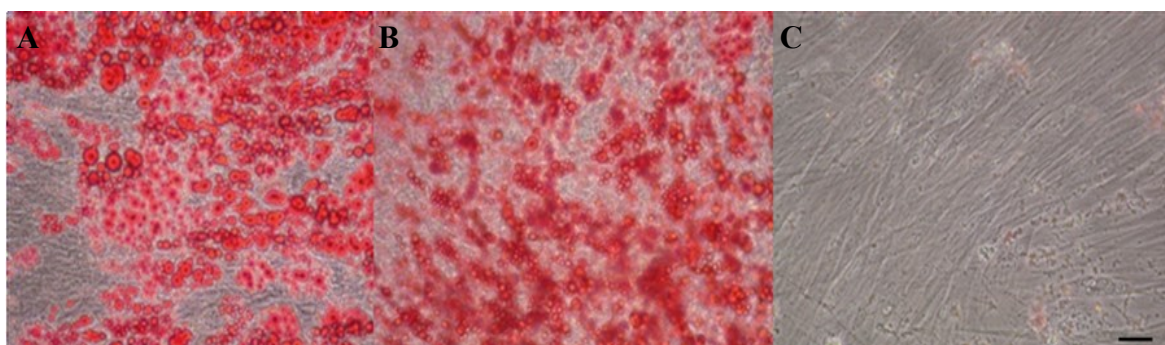


Figure 3.3. Différenciation adipogénique des feuillets adipeux selon le milieu de culture utilisé après 14 jours de différenciation rehaussée par la coloration lipidique à l'huile rouge. Feuilletts obtenus avec A) milieu DH 10% SVF, B) le milieu LM sans sérum et C) le milieu StemPro. Barre = 50 μ m.

Par souci de donner une valeur quantitative à l'observation faite à la Figure 3.3., une quantification des lipides contenus dans les feuillets reconstruits a été réalisée à l'aide du spectrophotomètre. Et effectivement, les résultats obtenus ont confirmé cet état de fait : pour le milieu StemPro, on a obtenu 0,006 d'accumulation lipidique à une densité optique

de 520 nm, alors que pour le milieu standard c'était 0,867 (Figure 3.4). Cela équivaut à un rapport de 1 à 145.

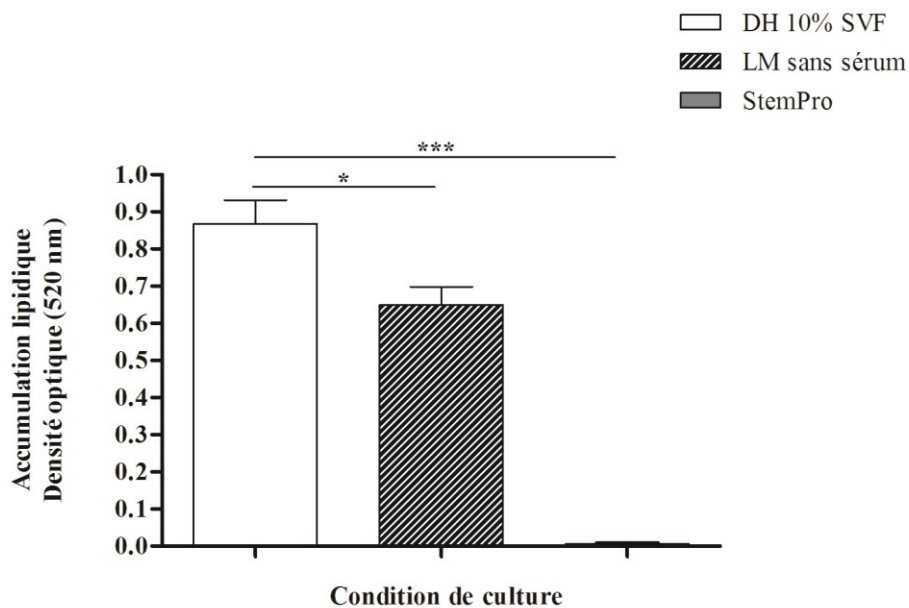


Figure 3.4. Quantification des lipides obtenus dans les feuillets adipeux reconstruits après 14 jours de différenciation en fonction du milieu de culture utilisé. Moyenne \pm SEM, n = 3, ANOVA test, P = 0,0001. SVF : sérum de veau fœtal.

Ne répondant pas aux besoins requis, le milieu défini StemPro n'a pas été davantage étudié. Les efforts se sont donc tournés vers les études sur le milieu LM qui, d'ailleurs, ont donné des résultats plus prometteurs. De fait, les résultats préliminaires obtenus avec le milieu défini LM montrent que ce milieu semble être adéquat pour une culture *in vitro* des cellules souches mésenchymateuses provenant du tissu adipeux humain. L'équipe du Dr. Katz a remarqué qu'en ajoutant de 0,5% à 1% de sérum humain à son milieu AR8 (une variante du milieu LM) la prolifération cellulaire était grandement améliorée (Parker et al., 2007). Donc, en suivant les recommandations de l'équipe du Dr. Katz, nous avons choisi d'utiliser le milieu LM avec un supplément de 1% de sérum humain.

Ces expériences ont été répétées trois fois. Les trois conditions de culture cellulaire ont été réalisées simultanément à chaque fois. Et puisque les résultats obtenus lors de

l'étude de la comparaison des trypsines étaient concluants, la trypsine utilisée lors de la trypsination des cellules fut dès lors seulement le TrypLE. Pour observer la prolifération cellulaire, la culture a été réalisée sur trois passages. Les données obtenues ont permis de tracer une courbe de prolifération pour chacune des conditions. Les résultats ont été compilés et la figure 3.5 présente leur moyenne et leur SD (n = 6). On remarque que le supplément de 1% de sérum humain dans le milieu défini LM augmente significativement la prolifération cellulaire de pratiquement trois fois par rapport à celle obtenue avec le milieu DH avec sérum de veau foetal. Ce qui n'est pas le cas avec le milieu LM sans sérum où la prolifération cellulaire semble être affectée par le manque de sérum. En effet, on obtient de moins en moins de cellules par rapport à la quantité de cellules récoltées versus cellesensemencées par cm^2 par jour.

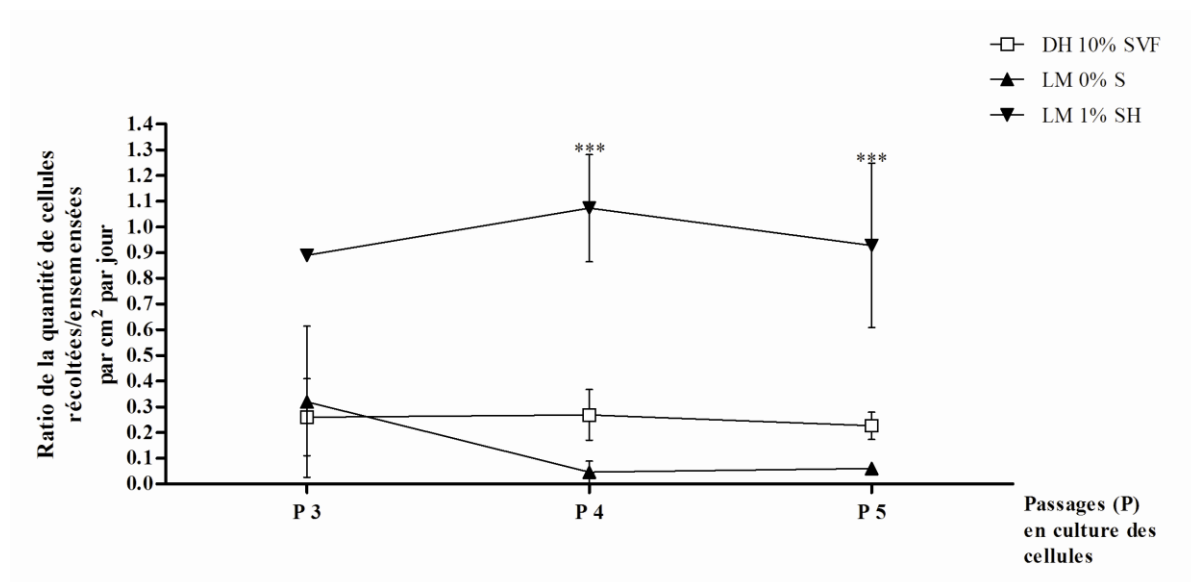


Figure 3.5. Courbe de prolifération de cellules en présence de différents milieux de culture sur trois passages. N = 3, n = 6, sauf pour les données obtenues avec le milieu LM 0% sérum où P4 : n = 5, P5 : n = 1 et pour le milieu LM 1% sérum où P3 : n = 1 et P5 : n = 5. Test T de Student, non pairé comparé au milieu standard où *** : P = 0,0005. SVF : sérum de veau foetal, S : sérum et SH : sérum humain.

3.3 Impact du sérum humain sur la culture cellulaire

Dans une optique d'utilisation sécuritaire de tissus destinés à la greffe, le sérum humain est une alternative intéressante au sérum de veau fœtal, puisque celui-ci, avant d'être utilisé, a subi un contrôle anti-pathogène. De plus, pour diminuer davantage le risque de rejet, il y a aussi la possibilité d'avoir du sérum autologue. Ces avantages rendent ce sérum plus fiable et mieux contrôlé que le sérum bovin habituellement utilisé. D'autant plus que les résultats des expériences précédentes ont démontré que le milieu LM supplémenté de 1% de sérum humain améliore nettement le rendement prolifératif des cellules. Du point de vue clinique ce fait est très intéressant, car cela veut dire qu'il nécessiterait de prélever chez le patient moins de cellules à l'origine pour obtenir la quantité suffisante de cellules permettant de produire du tissu reconstruit.

Pour étudier l'impact du milieu LM supplémenté de sérum humain, le diamètre des cellules en expansion a été analysé. On remarque que ce milieu enrichi de sérum humain produit des cellules un peu plus petites que celles obtenues avec le milieu standard (Figure 3.6). Cependant, ce diamètre est relativement bien maintenu au cours des passages.

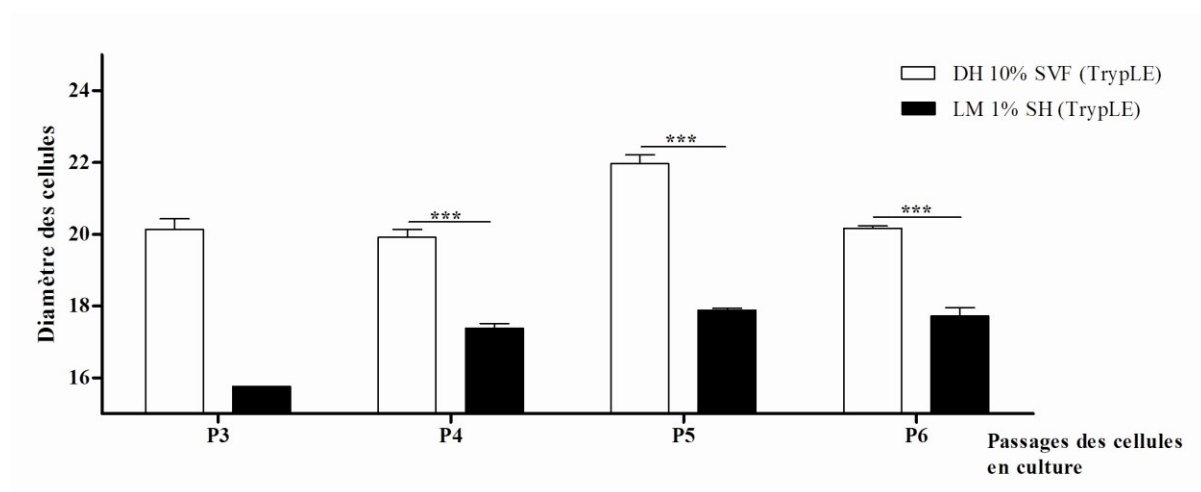


Figure 3.6. Diamètre des cellules obtenues suite à la culture dans différents milieux. Test T de Student, non pairé, $P < 0,0001$. SVF : sérum de veau fœtal et SH : sérum humain.

Motivées par ces résultats positifs, des études ont été poursuivies pour observer les performances du milieu LM sur la différenciation cellulaire en adipocytes et sur la production de tissus tridimensionnels autant conjonctifs qu'adipeux. Habituellement, au jour de la différenciation cellulaire, la quantité de sérum animal dans le milieu est réduite à 3%. En effet, lors d'études ultérieures, il a été constaté que la présence de trop de sérum nuit à la différenciation des cellules et que celui-ci favoriserait plutôt la prolifération, d'où le fait que sa concentration dans le milieu de différenciation soit diminuée. C'est le niveau de 3% de sérum dans le milieu qui a été retenu car il permettait d'obtenir un bon rendement de différenciation adipocytaire pour la culture *in vitro*.

Étonnamment, les expériences faites avec le milieu LM 1% de sérum humain démontrent que le minime 1% de sérum humain dans le milieu de différenciation inhibe quasiment complètement la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en adipocytes (voir Figure 3.7 C). En parallèle à celles-ci, d'autres expériences ont été réalisées. Ces expériences consistaient à faire une différenciation cellulaire avec du milieu LM ne contenant pas de sérum. Les résultats obtenus ont donné des résultats prometteurs. En effet, on a remarqué la présence d'adipocytes (gouttelettes plus ou moins blanchâtres) dans les tissus adipeux ce qui permet de confirmer que la différenciation adipogénique a bel et bien eu lieu (Figure 3.7 B). Dans, cette condition, les adipocytes obtenus dans le tissu reconstruit sont en moyenne un peu plus petits et répandus plus uniformément dans le tissu (Figure 3.7. B), contrairement aux adipocytes que l'on retrouve dans le tissu reconstruit avec le milieu standard au sérum de veau (Figure 3.7. A).

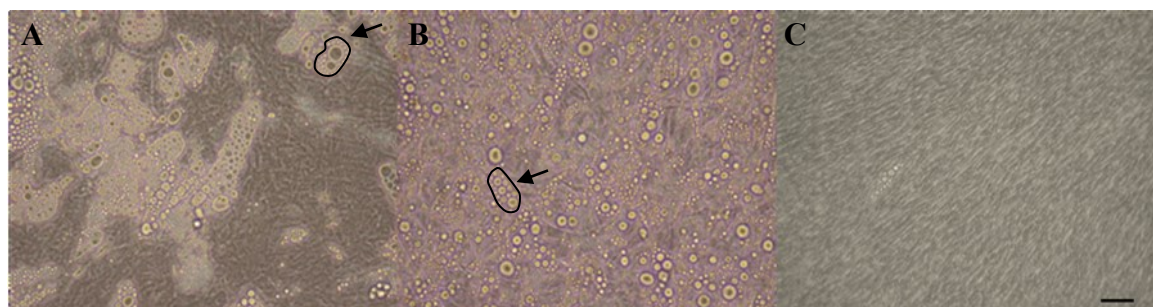


Figure 3.7. Différenciation adipogénique des feuillets adipeux selon le milieu de culture utilisé après 14 jours de différenciation.

Feuillets obtenus avec A) le milieu DH 10% SVF, B) le milieu LM sans sérum et C) le milieu LM 1% sérum humain. Les flèches représentent un adipocyte. Barre = 50 μ m.

3.4 Impact sur la différenciation adipocytaire de la présence d'insuline humaine dans le milieu d'induction de la différenciation

Lors de l'induction de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en adipocytes, le milieu de culture est supplémenté de dexaméthasone, de rosiglitazone, d'IBMX, de transferrine et d'insuline. L'insuline habituellement ajoutée à cette étape provient de pancréas bovin, et donc, pour maintenir un milieu sans xénogène, celle-ci a été remplacée par de l'insuline humaine. Puisque c'était la première fois que cet échange était réalisé, il a été de mise d'observer l'impact que pourrait avoir l'insuline humaine sur la différenciation adipocytaire. Pour ce faire, les cellules ont été réparties et cultivées dans du milieu DH 10% SVF, et induites soit en présence d'insuline bovine ou humaine. Pour chacune des conditions, la moitié des feuillets obtenus a été mise dans des conditions permettant la différenciation des cellules. Après 14 jours de différenciation, une coloration à l'huile rouge a été réalisée pour pouvoir évaluer la quantité de lipide accumulée dans les adipocytes nouvellement formés (Figure 3.8). Lorsque l'on regarde ces résultats préliminaires, on remarque que la condition contenant de l'insuline animale a une accumulation lipidique qui n'est pas significativement différente de celle obtenue avec le milieu supplémenté avec l'insuline humaine. La présence de l'insuline humaine dans le milieu d'induction de la différenciation ne semble pas nuire à la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en adipocytes.

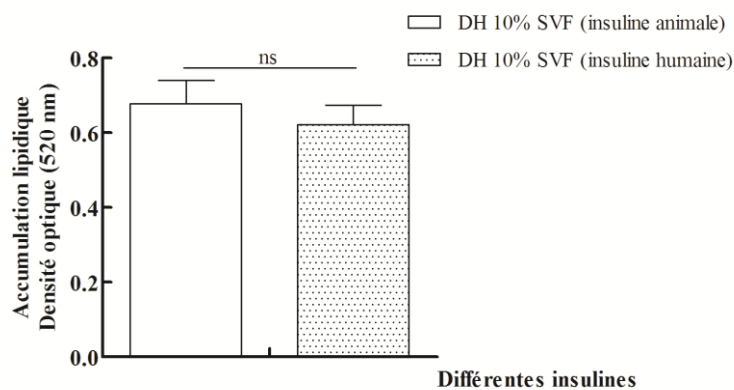


Figure 3.8. Quantification des lipides obtenus dans les feuillets adipeux reconstruits après 14 jours de différenciation en présence d'insulines animale ou humaine. Moyenne \pm SD, n = 3, Test T de Student, non païré, P = 0,0514. SVF : sérum de veau foetal.

3.5 La nécessité d'avoir ou non un revêtement dans les flacons

Pour toutes les expériences effectuées et présentées dans ce mémoire, les cellules souches mésenchymateuses utilisées, permettant de produire du tissu reconstruit humain, proviennent de lipoaspirats de tissu adipeux qui sont prélevés chez des donneurs consentants. En se fiant à leur indice de masse corporelle (IMC), ces derniers étaient toujours des patients qui pouvaient être considérés en bonne santé puisque leur indice représentait un poids normal. Un tel poids est souvent indicateur d'une bonne santé physique. D'après Santé Canada, l'indice de masse corporelle d'une personne ayant un poids normal est situé entre 18,5 et 24,9. Pour des personnes entre 18 et 65 ans, cet indice est calculé à partir du poids du patient en kilogramme et de sa taille en mètre : poids/taille².

Lors de l'extraction des cellules mésenchymateuses de manière classique, on utilise un milieu de culture supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal pour préserver la viabilité des cellules aspirées. Cependant, pour pouvoir produire des tissus reconstruits sans aucune protéine animale, l'extraction des cellules de la prochaine expérience qui sera décrite a été réalisée avec le milieu défini LM ne contenant que 1% de sérum humain et ce, dès les premières étapes de l'extraction. Or, la présence d'albumine trouvée dans le sérum permet aux cellules d'adhérer aux flacons de culture. Puisque dans ce cas-ci, il n'y a que 1% de sérum dans le milieu de culture, on trouve donc très peu d'albumine dans ce dernier. Pour aider les cellules à adhérer pendant leur culture, la culture a été effectuée en présence de revêtement dans les flacons. Le revêtement choisi est un composé de polylysine : c'est un polymère de lysine, ne contenant aucune protéine animale. Il est connu pour son potentiel d'adhésion cellulaire (Lu *et al.*, 2009). En parallèle, une culture cellulaire a été réalisée sans revêtement pour permettre d'étudier la nécessité ou non d'avoir un revêtement de polylysine dans les flacons. Les résultats obtenus pour la mortalité cellulaire après une semaine de culture montrent que la présence de la polylysine permet d'obtenir des résultats semblables ($5,6 \pm 1,2$ %) à ceux habituellement obtenus par la méthode standard (5,6 %), cependant, ce n'est pas nettement meilleur que la culture sans revêtement ($4,4 \pm 1,3$ %) (Figure 3.9 A). Il en est de même pour la quantité de cellules ayant proliféré dans les flacons au cours d'une semaine, on ne remarque pas de différence significative entre les

différentes conditions. Chacune semble être aussi bonne que l'autre. Bien que graphiquement, avec le milieu LM 1% sérum humain, on pourrait percevoir une moins bonne performance proliférative quand il n'y a pas de revêtement dans les flacons, statistiquement, les résultats sont considérés comparables (Figure 3.9 B). Toutefois, ce ne sont que des résultats préliminaires.

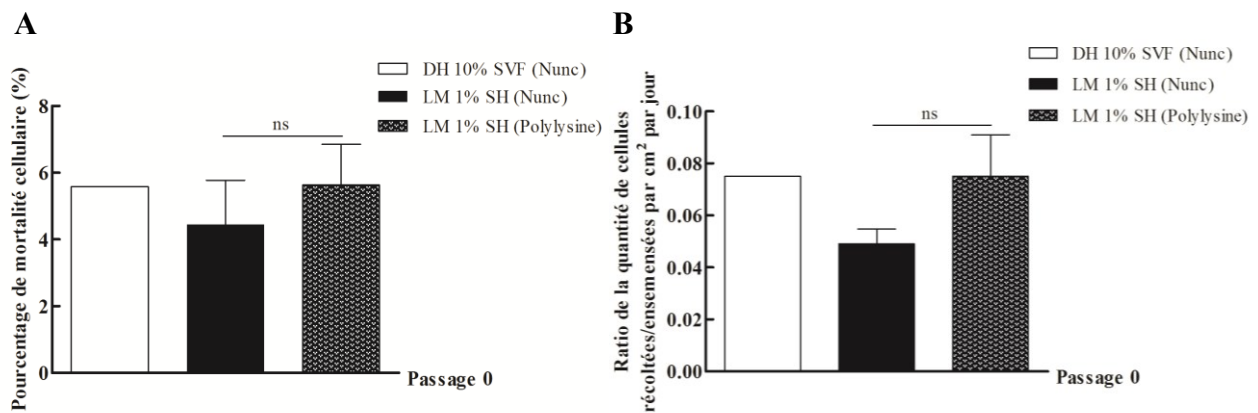


Figure 3.9. Pourcentage de mortalité cellulaire après l'extraction (A) et quantité de cellules récoltées après une semaine de culture suivant l'extraction (B) en présence ou non de revêtement dans les flacons de culture. La trypsination de ces cellules a été réalisée avec le TrypLE au passage 0 (n = 3, sauf pour les cellules dans le milieu DH 10% SVF). Test de Student T non païré, P < 0,69. SVF : sérum veau fœtal et SH : sérum humain.

Il est intéressant d'observer, du point de vue de la morphologie cellulaire, si la présence du revêtement dans les flacons a un impact sur la conformation et l'arrangement des cellules. Après une semaine de culture, lors de la trypsination, un compte cellulaire a été fait. Le Coulter a mesuré le diamètre des cellules. Pour les deux conditions, on retrouve des cellules ayant une moyenne de 18,9 μm de diamètre. Une observation au microscope a permis de constater que la morphologie des cellules ne semble pas, elle non plus, être affectée par la polylysine (Figure 3.10). Cependant, dans le feuillet sans revêtement, on remarque quelques trous acellularisés (voir les flèches à la Figure 3.10 A). Cette observation est importante car cela pourrait nuire à la qualité et la maniabilité du tissu

reconstruit. Tandis que la présence du revêtement de polylysine semble éviter cela (Figure 3.10 B).

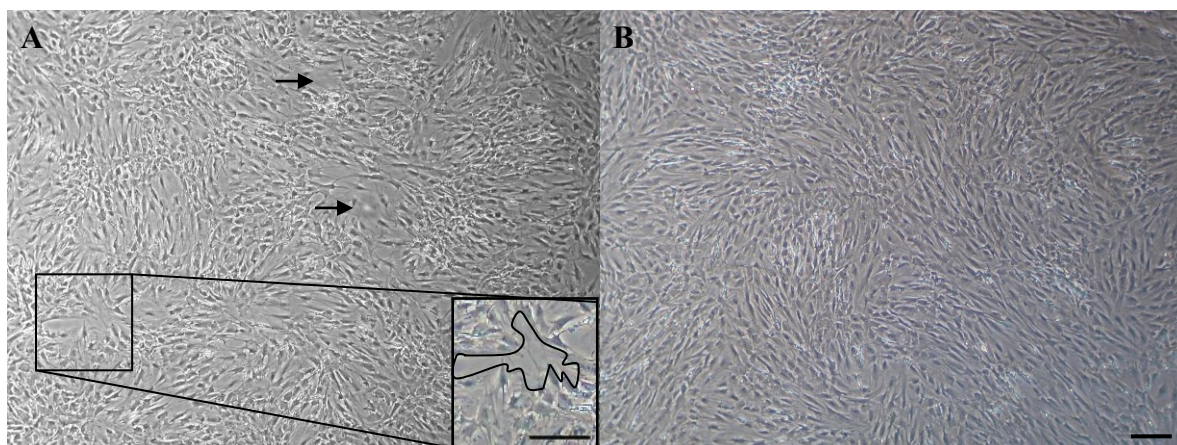


Figure 3.10. Morphologie des cellules après 7 jours de culture en présence ou non de revêtement de polylysine (cellules au passage 0). A) sans revêtement et B) avec revêtement de polylysine. Les flèches et le grossissement représentent quelques-uns des trous acellularisés retrouvés dans la culture. Barre = 50 μ m.

3.6 Impact du *CryoStorTMCS10* sur la cryopréservation des cellules

Après avoir extrait, fait proliférer, et différencié des cellules souches mésenchymateuses dans des conditions entièrement sans protéine animale, il était nécessaire d'étudier aussi la conservation de ces cellules dans des conditions sans xénogène. Habituellement, le milieu de cryopréservation qui est utilisé au sein de l'équipe est un milieu composé de 90% sérum de veau fœtal et de 10% de DMSO. Donc, dans un souci de préserver les cellules dans des conditions sans protéine animale, les cellules ont été congelées dans un milieu de cryopréservation, le *CryoStorTMCS10* de la compagnie *STEMCELL Technologies*. C'est un milieu défini qui ne contient pas de sérum, ni de protéines animales.

Comme c'était un nouvel agent de préservation, une comparaison avec le milieu standard a été réalisée, certaines cellules ont été congelées avec ce nouveau milieu et d'autres avec le milieu standard. Après 30 jours de congélation à -80°C , les cellules ont été décongelées. À l'aide de l'hémacymètre, on a pu connaître la viabilité des cellules dans les deux conditions. Les résultats obtenus montrent que le milieu de cryopréservation *CryoStorTMCSI0* est aussi efficace que le milieu standard contenant des protéines animales, en effet les deux pourcentages de viabilité des cellules ayant été congelées sont relativement équivalents (Figure 3.11).

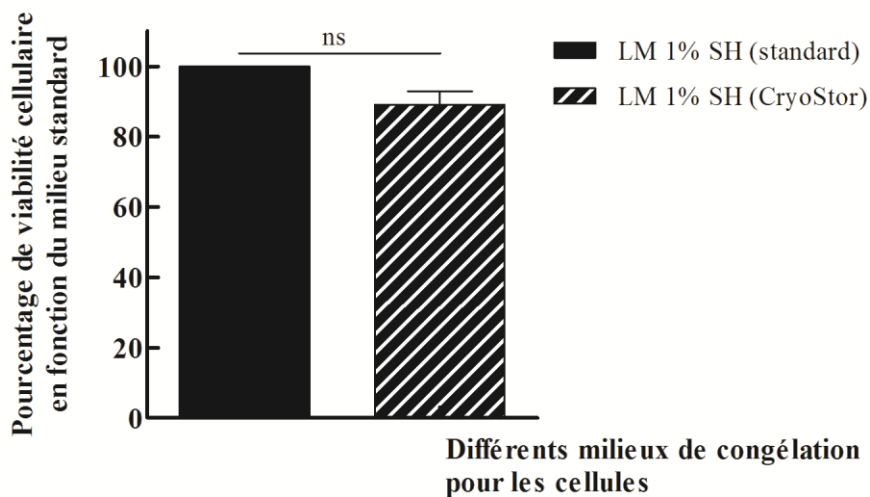


Figure 3.11. Viabilité des cellules ayant été cryopréservées dans du milieu de conservation standard ou dans le CryoStor. (N = 2, n = 2) Test de Student T, non pairé, P = 0,05.

3.7 Production de tissus reconstruits en 3D avec le milieu LM sans sérum

Pour permettre d'étudier l'effet que pourrait avoir le milieu LM sans sérum sur la production de tissus reconstruits humains, une comparaison a été réalisée entre des feuillets produits en présence de ce milieu et d'autres produits avec le milieu standard. L'impact du milieu de culture LM a été observé autant sur du tissu conjonctif qu'adipeux. La production par auto-assemblage de tissus en 3D s'est faite sur 35 jours de culture. La différenciation pour les futurs tissus adipeux a été amorcée au 7^{ème} jour de culture et l'empilement pour tous les feuillets au 28^{ème} jour. Les tissus sont composés d'un empilement de trois feuillets cellulaires manipulables ayant tous les trois la même condition, c'est-à-dire soit tissu conjonctif, soit tissu adipeux. Au 35^{ème} jour de culture, une biopsie des tissus est réalisée pour permettre leur analyse. L'analyse de l'aspect histologique des tissus a été facilitée grâce à une coloration au trichrome de Masson des tissus (Figure 3.12). En effet, on peut distinguer les cellules, en rose, des fibres de collagène de la matrice, en bleue. Aussi à l'aide du logiciel Image J, on a pu obtenir la mesure de l'épaisseur des tissus reconstruits (Figure 3.13).

L'analyse des tissus obtenus dans les deux conditions a permis de découvrir que la présence du milieu LM sans sérum semble contribuer à augmenter l'épaisseur de la matrice extracellulaire dans les tissus adipeux reconstruits comparativement à ceux obtenus avec le milieu standard. D'ailleurs, pour des tissus adipeux composés de trois feuillets cellulaires, on note un rapport d'épaisseur d'environ 1 à 2 entre les deux conditions (Figures 3.12 et 3.13). Pour les tissus conjonctifs, on remarque aussi une très légère augmentation, mais statistiquement celle-ci est non-significative.

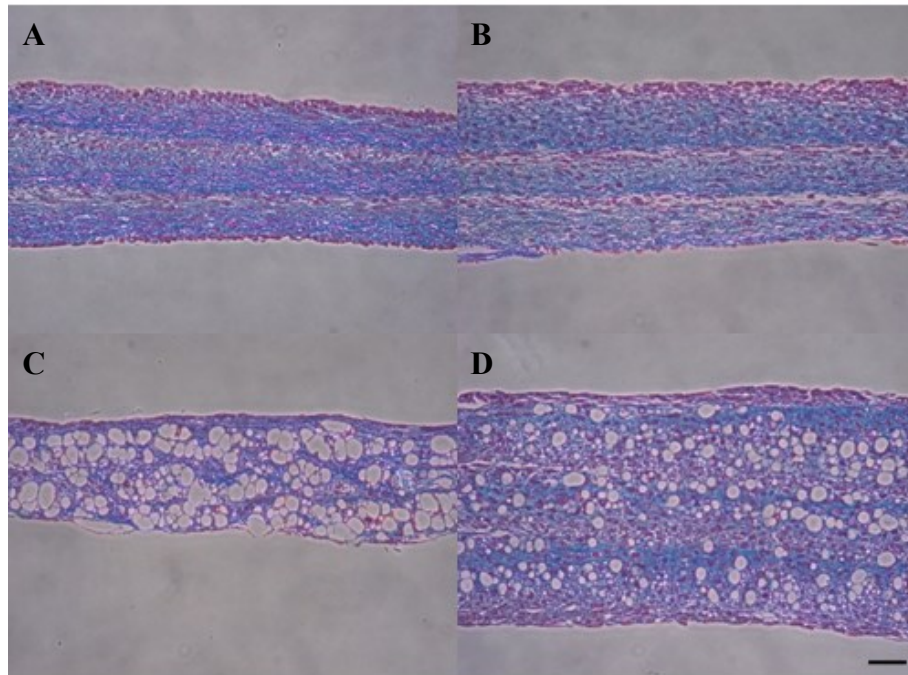


Figure 3.12. Aspect histologique représentatif des tissus reconstruits conjonctifs (A-B) et adipeux (C-D) dans différents milieux de culture. Coupes histologiques colorées au trichrome de Masson de tissus cultivés avec du milieu DH 10% SVF (A-C) et du milieu LM sans sérum (B-D). Barre = 50 μ m.

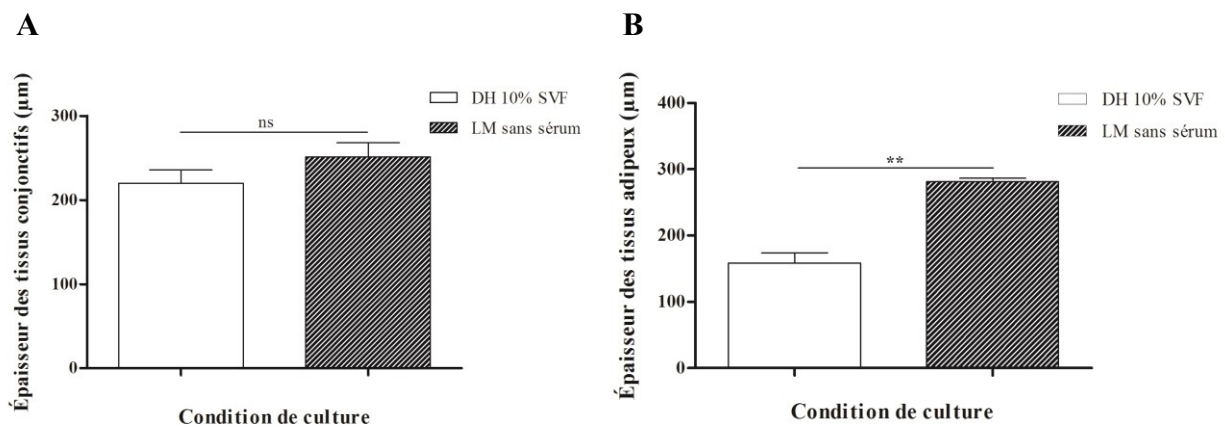


Figure 3.13. Effet du milieu de culture sur l'épaisseur des tissus reconstruits. Moyenne \pm SEM, Test T de Student, non pairé, $P = 0,0028$. SVF : sérum de veau fœtal.

Afin de comparer quelques caractéristiques entre les tissus adipeux reconstruits à partir du milieu LM à ceux reconstruits avec le milieu standard, une analyse par le logiciel *Simple PCI* a été réalisée. Celui-ci a calculé la quantité d'adipocytes retrouvés par $100 \mu\text{m}^3$ de tissu et la surface moyenne de ces adipocytes. Bien que visuellement on observe moins d'adipocytes dans le tissu adipeux produit avec du milieu LM (Figure 3.12 C et D), le logiciel *Simple PCI* révèle que les deux conditions de culture respectent la même proportion d'adipocytes par surface de tissu. De fait, pour les cultures produites avec le milieu DH 10% SVF, on obtient une moyenne de $15,26 \pm 0,76 \mu\text{m}$ d'adipocytes par $100 \mu\text{m}^3$ de tissu, alors que pour les cultures produites avec le milieu LM sans sérum, on obtient une moyenne de $14,77 \pm 3,95 \mu\text{m}$. Toutefois, les adipocytes retrouvés dans le milieu LM sans sérum sont environ 2,05 fois plus petits que ceux obtenus avec le milieu standard, puisque la surface moyenne par adipocyte est de $186,39 \pm 12,03 \mu\text{m}^2$ pour ceux obtenus avec le milieu DH 10% SVF et de $92,47 \pm 2,76 \mu\text{m}^2$ pour ceux obtenus avec le milieu LM sans sérum.

La contraction tissulaire des tissus reconstruits a aussi été considérée lors de l'analyse des tissus obtenus. En effet, il est possible de l'observer et de la mesurer lorsque l'on sépare le tissu reconstruit de l'ancrage de papier avec un bistouri. Il a été remarqué que les tissus produits avec le milieu LM sans sérum contractent moins que les tissus produits en milieu standard (Figures 3.14 et 3.15). La diminution de contraction observée pour le tissu conjonctif est d'environ 2,9 fois et pour le tissu adipeux 2,2 fois.

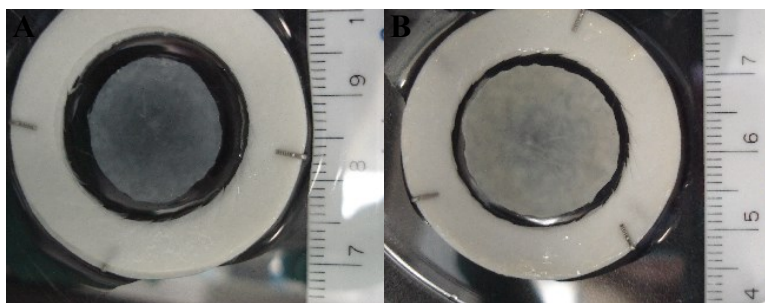


Figure 3.14. Photo macroscopique de la contraction d'un tissu reconstruit avec du milieu DH 10% SVF (A) et du milieu LM sans sérum (B).

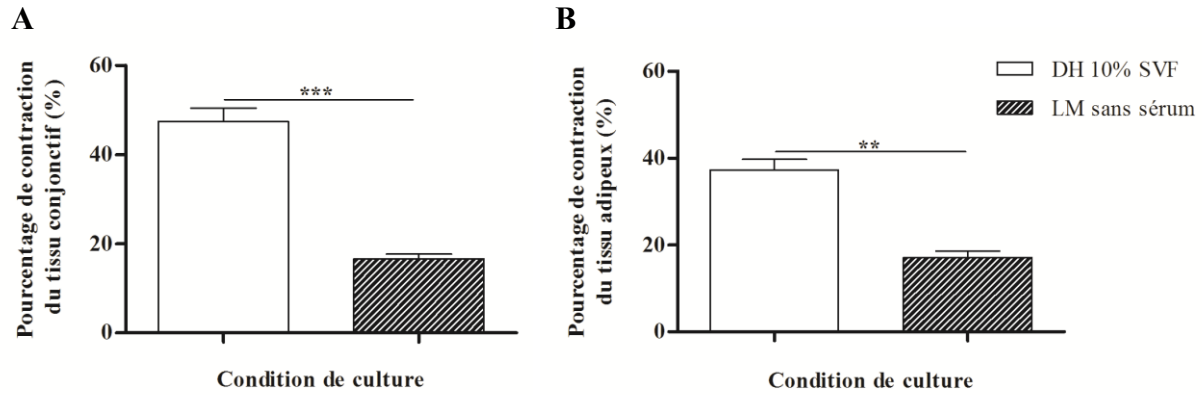


Figure 3.15. Pourcentage de contraction tissulaire lors du retrait de l'ancrage du tissu reconstruit. Tissus reconstruits conjonctifs (A) et adipeux (B). Test de Student T, non pairé, *** : $P = 0,0006$, ** : $P = 0,0043$. SVF : sérum de veau fœtal.

Chapitre 4

Discussion

Impact de l'utilisation de produits sans xénoène sur la production de tissu reconstruit conjonctif ou adipeux.

Dans un souci de produire *in vitro* des tissus reconstruits humains, conjonctifs ou adipeux, sans xénoène pour permettre une utilisation clinique plus sécuritaire, tous les produits de provenance animale qui sont habituellement utilisés lors de la production de tissus reconstruits ont été remplacés par un produit similaire sans trace animale.

Ainsi, les travaux présentés dans ce mémoire démontrent qu'il est possible de reproduire du tissu conjonctif et adipeux sans protéine animale par la méthode d'auto-assemblage en génie tissulaire.

Pour pouvoir produire des tissus reconstruits par cette méthode, il est habituellement nécessaire d'ajouter au milieu de culture du sérum bovin et de l'acide ascorbique. Ces derniers permettent aux cellules de sécréter et d'organiser davantage de matrice extracellulaire, ce qui rend les feuillets cellulaires plus résistants et donc manipulables. Or il a été conseillé par l'équipe du Dr Katz de ne pas utiliser plus de 2% de sérum humain (Parker et al., 2007). Ce qui représente un défi puisque le fait d'utiliser si peu de sérum pourrait nuire à la production de matrice extracellulaire et à la manipulabilité des tissus reconstruits, les rendant ainsi plus fragiles. Aussi, bien que les substituts des produits aient été choisis avec soin pour qu'ils soient quasi similaires à ceux habituellement utilisés, ils n'étaient pas identiques. Il a été remarqué en laboratoire que le simple fait de changer de lot de sérum bovin avait un impact sur la production de tissu reconstruit, on peut donc facilement imaginer que la substitution d'un nouveau produit sur le tissu reconstruit peut avoir de grandes répercussions. C'est pourquoi les travaux présentés dans ce mémoire ont d'abord étudié séparément les différents substituts de ces produits. Il était ainsi plus facile

de détecter lequel des substituts convenait ou ne convenait pas à la production de tissu par la méthode d'auto-assemblage.

Premièrement, pour être dans une optique de tissus reconstruits sans protéines animales, il était important d'avoir une alternative au produit de trypsination car celui habituellement utilisé est d'origine porcine. La trypsination est une technique importante puisqu'elle intervient à plusieurs reprises durant la prolifération et avant la production des tissus reconstruits, d'où l'intérêt d'étudier sa substitution en premier. Pour notre étude, le substituant utilisé fut le *TrypLETM Select* de la compagnie *GIBCOTM*. Il est de la même famille que le *TrypLETM Express*. D'après la littérature, ce produit étant d'origine bactérienne semblait bien correspondre à l'utilisation que nous comptons en faire. Et effectivement, pour les cellules au cours des premiers passages, ce produit de trypsination a donné des résultats statistiquement similaires à ceux obtenus avec la trypsine animale, autant au niveau de la prolifération des cellules que pour leur pourcentage de mortalité lors de la trypsination. En observant le diamètre et la morphologie des cellules, on remarque que ceux-ci ne semblent pas non plus être affectés par le changement d'agent de trypsination. Nos résultats concordent avec ceux obtenus par les quelques équipes qui ont travaillé sur ce sujet (Carvalho et al., 2011). Donc, comme ces résultats étaient satisfaisants, toutes les cellules utilisées dans ce mémoire ont été, par la suite, trypsinées via le *TrypLETM Select*.

Dans une autre étude, bien que ce ne soient que des résultats préliminaires, il a été observé que l'insuline humaine pouvait être aussi efficace que l'insuline bovine lors de la différenciation des cellules en adipocytes. Elle ne semble pas nuire à la différenciation, même la quantité de lipides retrouvée dans les cellules adipeuses différenciées en sa présence est quasi similaire à celle retrouvée avec l'insuline animale. Donc, il semblerait qu'elle puisse constituer une bonne alternative à l'insuline bovine.

Puisque la majorité des protéines animales retrouvées dans les tissus reconstruits proviennent du milieu de culture, il fut primordial de penser à modifier celui-ci. Le sérum contenu dans le milieu de culture était bovin, c'est pourquoi on lui a substitué du sérum

humain. Cette substitution apporte d'ailleurs plusieurs avantages puisque la composition du sérum de veau fœtal est mal définie, elle est variable d'un lot à l'autre et il n'y a pas de contrôle sur la présence ou non de vecteurs de maladies dans le sérum. Pour ce dernier point, il existe des firmes privées qui peuvent réaliser un tel contrôle sur le sérum bovin, mais les coûts que cela implique sont élevés, alors que pour le sérum humain, certains fournisseurs font cette analyse systématiquement. Le sérum humain présente aussi l'avantage qu'il pourrait être autologue. Donc, une expérience a été réalisée pour voir s'il était possible de simplement remplacer le sérum animal par du sérum humain. Cependant, la présence de 10% de sérum humain dans le milieu DH habituel n'a pas donné le résultat escompté, au contraire, la présence de ce sérum nuisait à la prolifération cellulaire. En effet, on retrouvait de grands trous acellularisés dans les cultures et lors du décompte des cellules, après une semaine de culture, on avait moins de cellules que la quantité qui avait étéensemencée. Ce fait est sans doute dû au manque de contact entre les cellules, cela les a probablement incitées à l'apoptose (Park *et al.*, 1999). Ce qui pourrait expliquer pourquoi une diminution du nombre de cellules a été observée après une semaine de culture. Le sérum humain retrouvé sur le marché n'était pas un sérum fœtal contrairement à celui du sérum de veau, ce qui fait que l'on retrouve beaucoup moins de facteurs de croissance dans le sérum humain (Honn *et al.*, 1975, Bieback *et al.*, 2010). On sait que ces facteurs sont importants lors de la prolifération cellulaire, mais ne connaissant pas leur quantité exacte dans le sérum de veau fœtal, nous espérions que le sérum humain en possédait suffisamment, mais cela ne semble pas être le cas. Le Dr Kassem a aussi obtenu ce résultat. Il émet comme nous l'hypothèse que l'inhibition observée pourrait être causée par un faible taux de facteurs de croissance retrouvés dans le sérum humain adulte, mais suggère aussi la présence de substances inhibitrices de prolifération (Aldahmash *et al.*, 2011).

Étant donné que le milieu DH supplémenté de 10% de sérum humain ne s'avère pas être un bon substitut, on a opté pour remplacer le milieu de culture au complet par un milieu défini. Les milieux définis sont souvent riches en suppléments ce qui pourrait bien correspondre aux besoins des cellules utilisées pour ce mémoire. À titre de comparaison, l'impact du milieu défini *StemPro® MSC SFM* de *GIBCO™* et, grâce à une collaboration, du milieu défini LM de l'équipe du Dr. Katz ont été étudiés.

À la suite de nos expériences, nous avons pu observer que le milieu défini *StemPro*[®] *MSC SFM* n'est pas un milieu approprié pour la différenciation des cellules souches provenant du tissu adipeux que nous utilisons. Cependant, le milieu défini LM a mieux répondu à nos attentes. En nous fiant à l'expertise de l'équipe de Katz travaillant dans notre domaine avec le milieu LM (Parker et al., 2007), nous avons opté pour l'utilisation du milieu de culture supplémenté avec seulement 1% de sérum humain lors de la prolifération cellulaire. De plus, cela a l'avantage que si on utilise moins de sérum pour les cultures en laboratoire, il sera nécessaire d'en prélever moins chez le patient lorsqu'on produira du tissu entièrement autologue, ce qui pourra être bénéfique lors de l'application clinique. Nos résultats ont montré que le milieu de culture LM supplémenté de 1% de sérum humain contribue grandement à améliorer les performances des cellules du point de vue prolifératif. Néanmoins, au moment de la différenciation, la présence de ce sérum inhibe pratiquement complètement la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en adipocytes.

Donc, l'hypothèse du Dr Kassem qui suggère qu'il y aurait des substances inhibitrices de prolifération dans le sérum humain pourrait porter à la discussion (Aldahmash et al., 2011). En effet, lorsque le milieu DH était supplémenté de 10% de sérum humain, cette constatation effectivement a été observée. Cependant, les expériences de ce mémoire qui utilisent le sérum humain avec le milieu défini LM ne démontrent pas la présence de substances inhibitrices de prolifération, au contraire, il semblerait que le 1% de sérum humain en présence du milieu LM aurait un effet bénéfique sur la prolifération des cellules. Peut-être que l'effet inhibiteur n'a pas été observé à cause du faible taux de sérum humain dans le milieu LM. En cherchant dans la littérature, on apprend que les équipes de recherche ont divers résultats à ce sujet, puisqu'il y a tellement de paramètres dont il faut tenir compte : l'origine des cellules mésenchymateuses, leur protocole d'extraction, leur protocole de culture, la quantité de sérum utilisé, les additifs utilisés dans le milieu de différenciation. Il est donc difficile pour l'heure de pouvoir établir des comparaisons de résultats valables entre les équipes dans de telles conditions.

Des expériences ont aussi été faites avec le milieu LM sans sérum, celles-ci ont montré que l'absence de sérum nuit à la prolifération cellulaire et d'ailleurs, ce résultat a été confirmé par l'équipe du Dr Katz (Parker et al., 2007). En effet, il a été constaté que la quantité de cellulesensemencées par cm^2 (densité d'ensemencement) avec le milieu AR8 sans sérum avait un impact sur la prolifération des cellules. S'il y avait trop peu de cellulesensemencées, c'est-à-dire moins que 15 000 cellules/ cm^2 leur milieu défini AR8 ne soutenait pas la prolifération. Bien que le milieu LM soit une variante de ce milieu, il est possible que ce phénomène se retrouve aussi dans nos résultats observés vu que l'ensemencement de nos cellules dans la condition LM est d'environ de 9 000 cellules/ cm^2 . De plus, il est probable que la prolifération des cellules soit affectée par le manque de nutriments et de facteurs de croissance retrouvés généralement dans le sérum. Cependant, le milieu LM sans sérum permet une différenciation des cellules en adipocytes. Cette constatation a permis d'améliorer et d'établir un nouveau protocole pour la réalisation de tissus humains reconstruits à l'aide du milieu défini LM. En effet, lors de la prolifération cellulaire, les cellules seront cultivées avec du milieu LM supplémenté de 1% de sérum humain et ce, jusqu'au moment de la production de tissus. Dès lors, le milieu LM utilisé sera sans supplément de sérum et si nécessaire, la différenciation cellulaire pourra alors être initiée pour la production de tissus adipeux. Toutefois, une autre alternative au sérum de veau fœtal pourrait être de le remplacer par des lysats plaquettaires, apparemment 5% serait suffisant pour remplacer 10% de sérum animal (Rauch *et al.*, 2011). Le plasma humain serait aussi un produit de remplacement intéressant (Kocaoemer et al., 2007, Felka *et al.*, 2010). Tout comme le sérum, le plasma sanguin est la partie liquide du sang, mais ce dernier comprend le sérum et les facteurs de coagulation. Le plasma humain a justement été expérimenté avec des cellules souches mésenchymateuses par le Dr Felka. Les conclusions qui peuvent être tirées de ces expériences sont que ce produit pourrait être une bonne alternative au sérum de veau fœtal pour la prolifération cellulaire (Felka et al., 2010). D'ailleurs, pour améliorer la prolifération cellulaire des cellules souches de provenance adipeuse, on suggère de supplémenter le plasma humain avec des facteurs de croissance, tels que PDGF, EGF, VEGF. Le PDGF est reconnu pour être un stimulateur important dans la prolifération cellulaire, mais aussi pour être un inhibiteur de différenciation (Koellensperger *et al.*, 2006).

Les cultures avec le milieu défini LM ont permis de constater plusieurs avantages à utiliser ce milieu pour la reconstruction de tissu. Pendant la prolifération cellulaire, les mesures prises au Coulter ont montré que les cellules ayant été cultivées dans le milieu LM sont légèrement plus petites que celles obtenues en milieu standard, mais il est important de noter que la taille de leur diamètre est maintenue au fil des passages ce qui démontre une certaine stabilité de l'effet du milieu et surtout, que les cellules ont bien su s'adapter à ce nouveau milieu.

Le milieu LM permet en effet d'obtenir des tissus adipeux reconstruits 1,8 x plus épais que ceux produits dans le milieu standard et ce, tout en respectant la même proportion d'adipocytes par surface de tissu. Il a été constaté également que les tissus produits avec le milieu LM sans sérum contractent moins que ceux produits avec le milieu standard. Pour les tissus conjonctifs, cette réduction est approximativement de 2,9 fois et pour les tissus adipeux de 2,2 fois. Ce fait est très intéressant pour d'éventuelles greffes, car la réduction de taille des tissus humains reconstruits est un aspect important observé en conditions de culture standard [Figure 3.15 et (Gauvin *et al.*, 2012)]. En effet, lors de la greffe de ces tissus, on doit produire une plus grande quantité de tissus pour prévoir la perte encourue par cette réduction. Or grâce au milieu LM, on pourra davantage se fier à la taille réelle du tissu produit en laboratoire et reproduire une quantité plus précise de ce que l'on aura besoin. Ces résultats vont permettre une économie de temps, de travail et réduire les coûts. Ainsi, lorsqu'un patient aura besoin de tissus, il sera possible de réduire la quantité de tissus reconstruits à produire pour couvrir sa plaie ou son déficit tissulaire. Bien entendu, avant d'arriver à ce stade, il faudrait faire des greffes sur des animaux pour vérifier la survie des tissus adipeux et la rétention réelle de leur volume *in vivo*.

Lors d'une étude en parallèle par notre équipe, il semblerait que les tissus adipeux reconstruits en présence du milieu LM sans sérum sécrèteraient d'avantage d'Ang-1 et d'HGF par rapport aux quantités obtenues avec le milieu standard. Ces molécules ont des caractéristiques pro-angiogéniques, ce qui pourrait faciliter la formation de vaisseaux sanguins dans les greffons, améliorer leur survie et leur implantation chez l'hôte. De plus, pour poursuivre les recherches, il sera essentiel d'étudier plus en profondeur la

fonctionnalité des adipocytes produits avec du milieu LM par ELISA, en étudiant le sécrétome des cellules pendant la culture, et en faisant un essai métabolique de stimulation de la lipolyse, par exemple.

Les manipulations précédentes ont été faites avec du milieu défini sans xénoène avec des cellules qui étaient préservées dans une banque de cellules. Toutefois, ces cellules avaient été extraites et cultivées durant les quelques jours au passage 0 en présence de milieu contenant du sérum bovin. Nous voulions donc faire la preuve qu'il était possible de procéder à l'extraction et l'amplification des cellules souches mésenchymateuses dans le milieu défini LM également. Lors de l'extraction de cellules provenant du tissu adipeux, une grande quantité de cellules sont prélevées. La présence de l'albumine du sérum bovin contenue dans le milieu de culture contribue à l'adhésion de ces cellules dans le flacon. En faisant une extraction de cellules sans sérum bovin, nous avons utilisé le milieu LM ne contenant que 1% de sérum humain. Dans le but d'aider les cellules à adhérer aux flacons, une étude a été effectuée pour tester la nécessité ou non d'utiliser un revêtement de poly-L-lysine dans les flacons lors de la suite en culture des cellules fraîchement extraites. Le rendement en présence du revêtement dans le milieu défini LM donnent des résultats similaires à ceux produits par la méthode classique en présence de 10% de sérum bovin sans revêtement. Le même constat a été établi dans les recherches du Dr Katz sur les revêtements avec le milieu AR8 (Parker et al., 2007). Pour leur part, ils avaient expérimenté des revêtements de collagène de type I et de type IV, de fibronectine, de laminine et de poly-D-lysine. Ce qui permet de croire que la quantité de supplément d'albumine humaine présente dans le milieu LM est suffisante à elle seule pour permettre une adhésion des cellules. L'étude réalisée dans ce mémoire a toutefois permis de confirmer que la présence de revêtement à la poly-L-lysine dans les flacons ne semble pas nuire à la survie des cellules, ni à leur morphologie. Ce revêtement permet aussi une belle répartition des cellules dans le flacon où la présence de trous acellulaires n'a pas été observée. Cette capacité aurait aussi des répercussions sur la production de tissus car elle pourrait éventuellement permettre d'améliorer la qualité et la manipulabilité des feuillets cultivés en milieu LM.

Un dernier élément de substitution qui a été étudié est le milieu de congélation des cellules. Pour permettre de conserver les cellules à long terme, il est important d'avoir un produit qui préserve la qualité et la viabilité des cellules lorsque mises en banque dans l'azote liquide. Le produit qui a été expérimenté est le *CryoStorTMCS10*. C'est un milieu défini de cryopréservation sans protéine animale. Les résultats préliminaires semblent montrer que les cellules ayant été congelées dans le CryoStor sont bien maintenues en vie. La viabilité des cellules souches mésenchymateuses après décongélation est statistiquement similaire à celle retrouvée pour les cellules congelées dans du milieu composé de DMSO et de sérum de veau fœtal. Lors d'études non présentées dans ce mémoire, on a pu constater que le CryoStor ne semblait pas avoir affecté les cellules. En effet, la prolifération cellulaire était équivalente à celle obtenue pour les cellules ayant été préservées dans du milieu standard. Ces résultats font du milieu de congélation *CryoStorTMCS10* un produit de substitution sans protéine animale intéressant pour les cellules souches mésenchymateuses prélevées du tissu adipeux.

Chapitre 5

Conclusion

Le projet de ce mémoire consistait à optimiser la production de tissus conjonctifs et adipeux par génie tissulaire dans un contexte sans protéine animale pour une éventuelle application clinique. En remplaçant les différents produits contenant des xénogènes, il a été possible de produire de tels tissus par la méthode d'auto-assemblage.

Pour reconstruire des tissus conjonctifs et adipeux sans xénogène et permettre aux cellules souches mésenchymateuses de se différencier en adipocytes, il a fallu apporter une modification au protocole préexistant. Ainsi, il a été établi que pour l'étape de prolifération cellulaire, le milieu défini LM serait supplémenté avec 1% de sérum humain, alors que pour l'étape de production de tissus et de différenciation, le milieu défini LM serait sans sérum.

Les substitutions réalisées par *TrypLETM Select*, l'insuline humaine et le *CryoStorTM CS10* semblent maintenir les performances de prolifération et de différenciation cellulaire, ainsi que certaines caractéristiques des cellules, au même titre que les produits de provenance animale déjà utilisés. La présence de 1% de sérum humain dans le milieu défini LM améliore grandement la prolifération cellulaire. La substitution du milieu DH 10% de sérum de veau fœtal au milieu défini LM sans sérum semble apporter aussi certains avantages au tissu reconstruit. Il permet d'avoir des tissus adipeux 1,8 fois plus épais tout en étant 2 fois moins contractiles et contenant de petits adipocytes. Ceci représente des caractéristiques tissulaires intéressantes pour de futures greffes.

Finalement, l'emploi de ces produits alternatifs sans xénogène pour la reconstruction de tissus conjonctifs ou adipeux paraît être prometteur pour une utilisation sécuritaire en clinique.

Bibliographie

- (ISSCR), I. S. S. C. R. 2008. Lignes directrices pour l'application en clinique des cellules souches. *In: souches*, R. d. c. [Ed.]. Ottawa (Ontario).
- Albrektsen, T., Frederiksen, K. S., Holmes, W. E., Boel, E., Taylor, K. & Fleckner, J. 2002. Novel genes regulated by the insulin sensitizer rosiglitazone during adipocyte differentiation. *Diabetes* **51**:1042-51.
- Aldahmash, A., Haack-Sorensen, M., Al-Nbaheen, M., Harkness, L., Abdallah, B. M. & Kassem, M. 2011. Human serum is as efficient as fetal bovine serum in supporting proliferation and differentiation of human multipotent stromal (mesenchymal) stem cells in vitro and in vivo. *Stem Cell Rev* **7**:860-8.
- Anderson, J. M., Rodriguez, A. & Chang, D. T. 2008. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol* **20**:86-100.
- Baer, P. C. & Geiger, H. 2012. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells Int* **2012**:812693.
- Baer, P. C., Griesche, N., Luttmann, W., Schubert, R., Luttmann, A. & Geiger, H. 2010. Human adipose-derived mesenchymal stem cells in vitro: evaluation of an optimal expansion medium preserving stemness. *Cytotherapy* **12**:96-106.
- Baptista, L. S., do Amaral, R. J., Carias, R. B., Aniceto, M., Claudio-da-Silva, C. & Borojevic, R. 2009. An alternative method for the isolation of mesenchymal stromal cells derived from lipoaspirate samples. *Cytotherapy* **11**:706-15.
- Barry, F. P. & Murphy, J. M. 2004. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* **36**:568-84.
- Bernard, J.-L. & Zucker, J.-M. 2011. Éthique, législation et cellules souches. *Archives de Pédiatrie* **18**:11-12.
- Bieback, K., Ha, V. A., Hecker, A., Grassl, M., Kinzebach, S., Solz, H., Sticht, C., Kluter, H. & Bugert, P. 2010. Altered Gene Expression in Human Adipose Stem Cells Cultured with Fetal Bovine Serum Compared to Human Supplements. *Tissue Eng Part A*.
- Bieback, K., Hecker, A., Kocaomer, A., Lannert, H., Schallmoser, K., Strunk, D. & Kluter, H. 2009. Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells* **27**:2331-41.

- Blande, I. S., Bassaneze, V., Lavini-Ramos, C., Fae, K. C., Kalil, J., Miyakawa, A. A., Schettert, I. T. & Krieger, J. E. 2009. Adipose tissue mesenchymal stem cell expansion in animal serum-free medium supplemented with autologous human platelet lysate. *Transfusion* **49**:2680-5.
- Braye, F., Hautier, A., Bouez, C. & Damour, O. 2005. [Skin substitutes reconstructed in the laboratory: application in burn treatment]. *Pathol Biol (Paris)* **53**:613-7.
- Burgmester, G.-R. & Pezzutto, A. 2005. Atlas de poche d'immunologie. Flammarion Médecine-Sciences ed., Paris, pp. 321.
- Carvalho, P. P., Wu, X., Yu, G., Dietrich, M., Dias, I. R., Gomes, M. E., Reis, R. L. & Gimble, J. M. 2011. Use of animal protein-free products for passaging adherent human adipose-derived stromal/stem cells. *Cytotherapy* **13**:594-7.
- Casteilla, L. & Dani, C. 2006. Adipose tissue-derived cells: from physiology to regenerative medicine. *Diabetes Metab* **32**:393-401.
- Cheng, K.-H., Kuo, T.-L., Kuo, K.-K. & Hsiao, C.-C. 2011. Human adipose-derived stem cells: Isolation, characterization and current application in regeneration medicine. *Genomic medicine, Biomarkers, and Health Sciences* **3**:53-62.
- Coulombel, L. 2010. Cellules souches: un seul nom pour de multiples entités. *Revue Francophone des Laboratoires* **427**:29-39.
- Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C. W., Corselli, M., Park, T. S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., Norotte, C., Teng, P. N., Traas, J., Schugar, R., Deasy, B. M., Badyrak, S., Buhring, H. J., Jacobino, J. P., Lazzari, L., Huard, J. & Peault, B. 2008. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* **3**:301-13.
- De Vos, J., Assou, S., Tondeur, S., Dijon, M. & Hamamah, S. 2009. Les cellules souches embryonnaires humaines: de la transgression de l'embryon humain à la médecine régénératrice de demain. *Gynécologie Obstétrique et Fertilité* **37**:620-26.
- Descotes, J. & Choquet-Kastylevsky, G. 2001. Gell and Coombs's classification: is it still valid? *Toxicology* **158**:43-9.
- Dormont, D. 1997. [Unconventional transmissible agents or prions]. *Presse Med* **26**:425-30.
- Duprat, S., Lemaître, G. & Onteniente, B. 2010. Cellules souches embryonnaires et applications thérapeutiques. *Revue Francophone des Laboratoires* **427**:41-46.
- Ehnert, S., Glanemann, M., Schmitt, A., Vogt, S., Shanny, N., Nussler, N. C., Stockle, U. & Nussler, A. 2009. The possible use of stem cells in regenerative medicine: dream or reality? *Langenbecks Arch Surg* **394**:985-97.

- Felka, T., Schafer, R., De Zwart, P. & Aicher, W. K. 2010. Animal serum-free expansion and differentiation of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* **12**:143-53.
- Fortier, G. M., Gauvin, R., Proulx, M., Vallee, M. & Fradette, J. 2013. Dynamic culture induces a cell type-dependent response impacting on the thickness of engineered connective tissues. *J Tissue Eng Regen Med* **7**:292-301.
- Gauvin, R., Larouche, D., Marcoux, H., Guignard, R., Auger, F. A. & Germain, L. 2012. Minimal contraction for tissue-engineered skin substitutes when matured at the air-liquid interface. *J Tissue Eng Regen Med*, doi: 10.1002/term.543.
- George, R. P. & Lee, P. 2009. Embryonic human persons. Talking Point on morality and human embryo research. *EMBO Rep* **10**:301-6.
- Germain, L. & Auger, F. A. 1995. Tissue Engineered Biomaterials: Biological and Mechanical Characteristics. *Handbook of Biomaterials* **25**:699-734.
- Ghannam, S., Bouffi, C., Djouad, F., Jorgensen, C. & Noel, D. 2010. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Res Ther* **1**:2.
- Gimble, J. M., Katz, A. J. & Bunnell, B. A. 2007. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* **100**:1249-60.
- Gomillion, C. T. & Burg, K. J. 2006. Stem cells and adipose tissue engineering. *Biomaterials* **27**:6052-63.
- Grinnell, F., Fukamizu, H., Pawelek, P. & Nakagawa, S. 1989. Collagen processing, crosslinking, and fibril bundle assembly in matrix produced by fibroblasts in long-term cultures supplemented with ascorbic acid. *Exp Cell Res* **181**:483-91.
- Hartmann, I., Hollweck, T., Haffner, S., Krebs, M., Meiser, B., Reichart, B. & Eissner, G. 2010. Umbilical cord tissue-derived mesenchymal stem cells grow best under GMP-compliant culture conditions and maintain their phenotypic and functional properties. *J Immunol Methods* **363**:80-9.
- Hata, R. & Senoo, H. 1989. L-ascorbic acid 2-phosphate stimulates collagen accumulation, cell proliferation, and formation of a three-dimensional tissuelike substance by skin fibroblasts. *J Cell Physiol* **138**:8-16.
- Hattori, H., Nogami, Y., Tanaka, T., Amano, Y., Fukuda, K., Kishimoto, S., Kanatani, Y., Nakamura, S., Takase, B. & Ishihara, M. 2008. Expansion and characterization of adipose tissue-derived stromal cells cultured with low serum medium. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **87**:229-36.
- Hatzfeld, A., Peiffer, I. & Hatzfeld, J. 2006. Les cellules souches embryonnaires humaines: problèmes pratiques et potentialités scientifiques. *Pathologie Biologie* **54**:94-99.

- Hemmat, S., Lieberman, D. M. & Most, S. P. 2010. An introduction to stem cell biology. *Facial Plast Surg* **26**:343-9.
- Honn, K. V., Singley, J. A. & Chavin, W. 1975. Fetal bovine serum: a multivariate standard. *Proc Soc Exp Biol Med* **149**:344-7.
- Ishikawa, O., Kondo, A., Okada, K., Miyachi, Y. & Furumura, M. 1997. Morphological and biochemical analyses on fibroblasts and self-produced collagens in a novel three-dimensional culture. *Br J Dermatol* **136**:6-11.
- Kassem, M., Kristiansen, M. & Abdallah, B. M. 2004. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **95**:209-14.
- Keller, M. R. & Burlingham, W. J. 2011. Loss of tolerance to self after transplant. *Semin Immunopathol* **33**:105-10.
- Kim, M. H., Kim, I., Kim, S. H., Jung, M. K., Han, S., Lee, J. E., Nam, J. S., Lee, S. K. & Bang, S. I. 2007. Cryopreserved human adipogenic-differentiated pre-adipocytes: a potential new source for adipose tissue regeneration. *Cytotherapy* **9**:468-76.
- Kocaoemer, A., Kern, S., Kluter, H. & Bieback, K. 2007. Human AB serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Stem Cells* **25**:1270-8.
- Koellensperger, E., von Heimburg, D., Markowicz, M. & Pallua, N. 2006. Human serum from platelet-poor plasma for the culture of primary human preadipocytes. *Stem Cells* **24**:1218-25.
- Kolopp-Sarda, M. N., Malcus, C. & Kohler, C. 2008. Immunologie de la transplantation: rejets et infections en transplantation d'organes solides. *Revue Francophone des Laboratoires* **403**:23-30.
- Kuri-Harcuch, W. & Green, H. 1978. Adipose conversion of 3T3 cells depends on a serum factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**:6107-9.
- L'Heureux, N., Paquet, S., Labbe, R., Germain, L. & Auger, F. A. 1998. A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J* **12**:47-56.
- Labbe, B., Marceau-Fortier, G. & Fradette, J. 2011. Cell sheet technology for tissue engineering: the self-assembly approach using adipose-derived stromal cells. *Methods Mol Biol* **702**:429-41.
- Lee, J. E., Kim, I. & Kim, M. 2010. Adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived stem cells obtained from cryopreserved adipose aspirates. *Dermatol Surg* **36**:1078-83.
- Lin, G., Garcia, M., Ning, H., Banie, L., Guo, Y. L., Lue, T. F. & Lin, C. S. 2008. Defining stem and progenitor cells within adipose tissue. *Stem Cells Dev* **17**:1053-63.

- Lindroos, B., Aho, K. L., Kuokkanen, H., Raty, S., Huhtala, H., Lemponen, R., Yli-Harja, O., Suuronen, R. & Miettinen, S. 2010. Differential gene expression in adipose stem cells cultured in allogeneic human serum versus fetal bovine serum. *Tissue Eng Part A* **16**:2281-94.
- Lindroos, B., Boucher, S., Chase, L., Kuokkanen, H., Huhtala, H., Haataja, R., Vemuri, M., Suuronen, R. & Miettinen, S. 2009. Serum-free, xeno-free culture media maintain the proliferation rate and multipotentiality of adipose stem cells in vitro. *Cytotherapy* **11**:958-72.
- Liu, Z. J., Zhuge, Y. & Velazquez, O. C. 2009. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* **106**:984-91.
- Lu, H., Guo, L., Kawazoe, N., Tateishi, T. & Chen, G. 2009. Effects of poly(L-lysine), poly(acrylic acid) and poly(ethylene glycol) on the adhesion, proliferation and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Biomater Sci Polym Ed* **20**:577-89.
- Lund, P., Pilgaard, L., Duroux, M., Fink, T. & Zachar, V. 2009. Effect of growth media and serum replacements on the proliferation and differentiation of adipose-derived stem cells. *Cytotherapy* **11**:189-97.
- Mackensen, A., Drager, R., Schlesier, M., Mertelsmann, R. & Lindemann, A. 2000. Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother* **49**:152-6.
- Michel, M., L'Heureux, N., Pouliot, R., Xu, W., Auger, F. A. & Germain, L. 1999. Characterization of a new tissue-engineered human skin equivalent with hair. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **35**:318-26.
- Mitchell, J. B., McIntosh, K., Zvonic, S., Garrett, S., Floyd, Z. E., Kloster, A., Di Halvorsen, Y., Storms, R. W., Goh, B., Kilroy, G., Wu, X. & Gimble, J. M. 2006. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* **24**:376-85.
- Miwa, H., Hashimoto, Y., Tensho, K., Wakitani, S. & Takagi, M. 2012. Xeno-free proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cytotechnology* **64**:301-8.
- Morais, J. M., Papadimitrakopoulos, F. & Burgess, D. J. 2010. Biomaterials/tissue interactions: possible solutions to overcome foreign body response. *AAPS J* **12**:188-96.
- Onuki, Y., Bhardwaj, U., Papadimitrakopoulos, F. & Burgess, D. J. 2008. A review of the biocompatibility of implantable devices: current challenges to overcome foreign body response. *J Diabetes Sci Technol* **2**:1003-15.

- Park, M. Y., Lee, R. H., Lee, S. H. & Jung, J. S. 1999. Apoptosis induced by inhibition of contact with extracellular matrix in mouse collecting duct cells. *Nephron* **83**:341-51.
- Parker, A. M., Shang, H., Khurgel, M. & Katz, A. J. 2007. Low serum and serum-free culture of multipotential human adipose stem cells. *Cytotherapy* **9**:637-46.
- Patrick, C. W. 2004. Breast tissue engineering. *Annu Rev Biomed Eng* **6**:109-30.
- Rajala, K., Lindroos, B., Hussein, S. M., Lappalainen, R. S., Pekkanen-Mattila, M., Inzunza, J., Rozell, B., Miettinen, S., Narkilahti, S., Kerkela, E., Aalto-Setälä, K., Otonkoski, T., Suuronen, R., Hovatta, O. & Skottman, H. 2010. A defined and xeno-free culture method enabling the establishment of clinical-grade human embryonic, induced pluripotent and adipose stem cells. *PLoS One* **5**:e10246.
- Ramirez-Zacarias, J. L., Castro-Munozledo, F. & Kuri-Harcuch, W. 1992. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochemistry* **97**:493-7.
- Rauch, C., Feifel, E., Amann, E. M., Spötl, H. P., Schennach, H., Pfaller, W. & Gstraunthaler, G. 2011. Alternatives to the Use of Fetal Bovine Serum: Human Platelet Lysates as a Serum Substitute in Cell Culture Media. *Altex-Altern Anim Ex* **28**:305-16.
- Rosen, E. D. & Spiegelman, B. M. 2000. Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**:145-71.
- Rowley, S. D. & Anderson, G. L. 1993. Effect of DMSO exposure without cryopreservation on hematopoietic progenitor cells. *Bone Marrow Transplant* **11**:389-93.
- Safford, K. M., Hicok, K. C., Safford, S. D., Halvorsen, Y. D., Wilkison, W. O., Gimble, J. M. & Rice, H. E. 2002. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* **294**:371-9.
- Sæthe, S., Scutt, A. & Stolzing, A. 2006. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev* **5**:91-116.
- Spees, J. L., Gregory, C. A., Singh, H., Tucker, H. A., Peister, A., Lynch, P. J., Hsu, S. C., Smith, J. & Prockop, D. J. 2004. Internalized antigens must be removed to prepare hypoimmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. *Mol Ther* **9**:747-56.
- Strem, B. M., Hicok, K. C., Zhu, M., Wulur, I., Alfonso, Z., Schreiber, R. E., Fraser, J. K. & Hedrick, M. H. 2005. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* **54**:132-41.

- Stute, N., Holtz, K., Bubenheim, M., Lange, C., Blake, F. & Zander, A. R. 2004. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Exp Hematol* **32**:1212-25.
- Tang, L. & Eaton, J. W. 1995. Inflammatory responses to biomaterials. *Am J Clin Pathol* **103**:466-71.
- Thirumala, S., Gimble, J. M. & Devireddy, R. V. 2010. Cryopreservation of stromal vascular fraction of adipose tissue in a serum-free freezing medium. *J Tissue Eng Regen Med* **4**:224-32.
- Tondeur, S., Assou, S., Nadal, L., Hamamah, S. & De Vos, J. 2008. [Biology and potential of human embryonic stem cells]. *Ann Biol Clin (Paris)* **66**:241-7.
- Trottier, V., Marceau-Fortier, G., Germain, L., Vincent, C. & Fradette, J. 2008. IFATS collection: Using human adipose-derived stem/stromal cells for the production of new skin substitutes. *Stem Cells* **26**:2713-23.
- Vallee, M., Cote, J. F. & Fradette, J. 2009. Adipose-tissue engineering: taking advantage of the properties of human adipose-derived stem/stromal cells. *Pathol Biol (Paris)* **57**:309-17.
- Vermette, M., Trottier, V., Menard, V., Saint-Pierre, L., Roy, A. & Fradette, J. 2007. Production of a new tissue-engineered adipose substitute from human adipose-derived stromal cells. *Biomaterials* **28**:2850-60.
- Wagner, W., Wein, F., Seckinger, A., Frankhauser, M., Wirkner, U., Krause, U., Blake, J., Schwager, C., Eckstein, V., Ansorge, W. & Ho, A. D. 2005. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* **33**:1402-16.
- Williams, E. S. & Miller, M. W. 2003. Transmissible spongiform encephalopathies in non-domestic animals: origin, transmission and risk factors. *Rev Sci Tech* **22**:145-56.
- Wlodkowic, D., Skommer, J. & Darzynkiewicz, Z. 2012. Cytometry of apoptosis. Historical perspective and new advances. *Exp Oncol* **34**:255-62.
- Zeisberger, S. M., Schulz, J. C., Mairhofer, M., Ponsaerts, P., Wouters, G., Doerr, D., Katsen-Globa, A., Ehrbar, M., Hescheler, J., Hoerstrup, S. P., Zisch, A. H., Kolbus, A. & Zimmermann, H. 2011. Biological and physicochemical characterization of a serum- and xeno-free chemically defined cryopreservation procedure for adult human progenitor cells. *Cell Transplant* **20**:1241-57.
- Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Alfonso, Z. C., Fraser, J. K., Benhaim, P. & Hedrick, M. H. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* **13**:4279-95.

Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim, P., Lorenz, H. P. & Hedrick, M. H. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7:211-28.