



Évaluation de l'impact de pansements biologiques humains produits par génie tissulaire sur la guérison de plaies cutanées murines

Mémoire

Pascal Morissette Martin

Maitrise en biologie cellulaire et moléculaire

Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

© Pascal Morissette Martin, 2015

Résumé

L'étude de la guérison des plaies à l'aide de substituts produits par génie tissulaire est un domaine en plein essor. Dans ces travaux, les effets de pansements biologiques produits en laboratoire à partir de cellules souches/stromales du tissu adipeux (CSTA) différenciées ou non en adipocytes ont été évalués sur des plaies cutanées in vivo. Un modèle de souris possédant un épiderme fluorescent a permis de démontrer que les plaies traitées avec les pansements biologiques guérissent plus rapidement que les plaies non traitées, et ce, de manière indépendante de la réépithélialisation. Une augmentation de la formation du tissu de granulation et une angiogenèse accrue ont également été observées dans les groupes traités. Ces résultats établissent que les substituts contenant des CSTA ou des adipocytes fonctionnels favorisent la réparation tissulaire. À terme, ces travaux pourraient mener au développement de nouvelles indications cliniques pour le traitement des ulcères cutanés.

Abstract

Promotion of skin repair for acute or chronic wounds through the use of tissue-engineered products is an active field of research. This study evaluates the effects mediated by two types of tissue-engineered biological dressings containing human in vitro-differentiated adipocytes or adipose-derived stromal cells (ASCs). Re-epithelialization, granulation tissue formation and neovascularization of full-thickness cutaneous wounds were specifically assessed using a murine model featuring a fluorescent epidermis. In comparison to wounds that did not receive either type of biological dressings, treated wounds displayed significantly faster wound closure rates. Non-invasive imaging of GFP-expressing keratinocytes determined that wound closure was independent from re-epithelialization mechanisms, while histological assessments of the scar tissues showed thicker granulation tissues enriched in collagens and increased angiogenesis. Taken together, these results establish that engineered substitutes featuring adipocytes or ASCs can promote cutaneous healing when applied as temporary dressings, suggesting their relevance for chronic wound management studies.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières	vii
Liste des figures	xi
Liste des tableaux.....	xiii
Liste des abréviations	xv
Remerciements.....	xix

Chapitre 1 : Introduction générale	1
1.1 La peau humaine.....	1
1.1.1 Physiologie de la peau humaine.....	1
1.1.2 L'épiderme.....	2
1.1.3 La jonction dermo-épidermique.....	5
1.1.4 Le derme	6
1.1.5 L'hypoderme.....	8
1.1.6 Les annexes cutanées	14
1.1.7 Différences notables entre la peau humaine et la peau murine	14
1.2 Les plaies cutanées.....	15
1.2.1 Les processus de réparation tissulaire cutanée	17
1.2.2 Les plaies chroniques et le cas particulier des plaies diabétiques	26
1.2.3 Traitement des plaies chroniques.....	28
1.3 Les pansements biologiques, le potentiel des CSTA et l'approche par auto-assemblage.....	29
1.3.1 Les pansements biologiques.....	29
1.3.2 Le potentiel régénérateur des cellules souches mésenchymateuses et des CSTA	31
1.3.3 Le potentiel régénérateur des adipocytes	32
1.3.4 Les pansements biologiques enrichis en CSTA.....	32
1.3.5 Les pansements biologiques produits à l'aide de la méthode d'auto-assemblage.....	33
1.4 Modèles d'étude des plaies	34
1.4.1 Les modèles <i>in vitro</i>	34
1.4.2 Les modèles animaux	36
1.5 Problématiques et objectifs spécifiques.....	40

Chapitre 2 : Matériel et méthodes	43
2.1 Production de pansements biologiques humains	43
2.2 Chirurgies et expériences animales.....	45
2.3 Cinétiques de guérison et de réépithélialisation	48
2.4 Analyses histologiques – colorations et immunomarquages	49
2.5 Quantifications des marquages effectués sur les coupes transversales	51
2.6 Tests de résistance mécanique	51
2.7 Essais <i>in vitro</i> préliminaires aux expériences <i>in vivo</i>	52
2.8 Essais immuno-enzymatiques de type ELISA	54
2.9 Analyses statistiques	54

Chapitre 3 : Résultats	55
3.1 Production des pansements par génie tissulaire et détermination de la fréquence optimale de changement des pansements <i>in vitro</i>	55
3.2 Évaluation de l'impact de pansements adipeux et conjonctifs sur la guérison de plaies cutanées murines	57
3.2.1 Les pansements ne favorisent pas la réépithélialisation des plaies	58
3.2.2 Les pansements influencent la formation du tissu de granulation	60
3.2.3 Les pansements influencent la néovascularisation	65
3.2.4 Les pansements biologiques ne semblent pas affecter les propriétés mécaniques des tissus ..	67
3.2.5 Les pansements conservent la capacité de produire des molécules bioactives suite à leur utilisation sur la souris	68
Chapitre 4 : Discussion	69
4.1 Détermination de la fréquence des changements de pansements	69
4.2 Avantages de l'usage des animaux à épiderme fluorescent	70
4.3 Effets des pansements conjonctifs et adipeux sur la guérison des plaies	70
4.4 Stratégies d'utilisation des pansements biologiques	75
Conclusion	77
Bibliographie	79
Annexe	93
Avant-propos	93
Enhancing repair of full-thickness excisional wounds: impact of tissue-engineered biological dressings featuring human differentiated adipocytes	94
Abstract	95
1. Introduction	96
2. Material and methods	97
2.1 Production of human tissue engineered dressings	97
2.2 Quantification of secreted molecules	98
2.3 Animal experiments	98
2.4 Macroscopic and fluorescent imaging of the wounds	99
2.5 Histological analysis of paraffin embedded tissues	100
2.6 Immunolabelings and analyses on tissue cryosections	100
2.7 Evaluation of wounds mechanical properties	101
2.8 Statistical analyses	102
3. Results	102
3.1 Tissue-engineered dressings secrete growth factors and pro-angiogenic molecules <i>in vitro</i>	102
3.2 Global wound closure is enhanced by the adipose dressings without impacting on the reepithelization rate	103
3.3 Granulation tissue formation is impacted by the biological dressings	103
3.4 Neovascularization is promoted by the biological dressings	104
3.5 Mechanical properties of the healed wounds	104
4. Discussion	105
5. Conclusion	107

Disclosures.....	107
Acknowledgements	108
Tables.....	109
Figure captions.....	110
Figures	112
References	119

Liste des figures

Figure 1.1	La structure de la peau normale humaine	2
Figure 1.2	La structure de l'épiderme humain.....	3
Figure 1.3	La structure du derme humain.....	6
Figure 1.4	Les deux catégories de plaies cutanées.....	16
Figure 1.5	La guérison des plaies.....	17
Figure 1.6	Les cellules activées dans les processus de réparation tissulaire cutanée.....	19
Figure 1.7	La réépithélialisation (aspect histologique).....	20
Figure 1.8	Schématisation des étapes importantes de l'angiogenèse.....	25
Figure 1.9	Exemple d'ulcère de pied diabétique.....	27
Figure 1.10	Excisions cutanées dorsales avec extenseurs en silicone (externes).....	39
Figure 2.1	Étapes de production des pansements biologiques.....	43
Figure 2.2	Dépôts des pansements biologiques sur les plaies.....	46
Figure 2.3	Ligne du temps des expériences animales.....	48
Figure 2.4	Test de traction uniaxiale.....	52
Figure 2.5	Schéma du montage <i>in vitro</i> afin de déterminer la fréquence de changement des pansements biologiques.....	53
Figure 3.1	Apparence macroscopique et microscopique des pansements biologiques.....	55
Figure 3.2	Détermination de la fréquence optimale de changement des pansements.....	57
Figure 3.3	Cinétique de guérison des plaies.....	59
Figure 3.4	Cinétique de réépithélialisation des plaies.....	60
Figure 3.5	Les pansements adipeux stimulent la formation du tissu de granulation.....	61
Figure 3.6	Épaisseur des compartiments dermiques.....	62
Figure 3.7	Organisation du collagène au sein des tissus de granulation visualisée au rouge picrosirius.....	63
Figure 3.8	Évaluation semi-quantitative de la surface du tissu de granulation recouvert par les fibres de collagènes.....	65
Figure 3.9	Organisation du tissu de granulation.....	65
Figure 3.10	Nombre de cellules exprimant le marqueur de leucocytes CD45 se situant dans les tissus de granulation.....	63
Figure 3.11	Les pansements biologiques favorisent l'angiogenèse.....	64
Figure 3.12	Les pansements biologiques ne semblent pas avoir d'impact sur les propriétés mécaniques de la peau cicatricielle.....	67
Figure 3.13	Fonctionnalité des pansements suite au passage de trois jours sur les plaies <i>in vivo</i>	68

Liste des tableaux

Tableau 1.1	Facteurs bioactifs sécrétés par les adipocytes humains	9
Tableau 1.2	Molécules signalétiques bioactives importantes sécrétées par les CSTA humaines..	12
Tableau 1.3	Différences notables entre la peau humaine et murine	15
Tableau 1.4	Exemples de modèles d'étude des plaies chez les rongeurs <i>in vivo</i>	38
Tableau 2.1	Immunomarquages effectués sur les coupes transversales de plaies congelées	50

Liste des abréviations

<u>sigle</u>	<u>nom français</u>	<u>nom anglais</u>
α -sma	α actine du muscle lisse	α smooth muscle actin
AGE	Produits avancés de glycation	Advanced glycation end products
Ang-1	Angiopoïétine-1	Angiopoietin-1
bFGF	Facteur de croissance basique des fibroblastes	Basic fibroblast growth factor
CSF-1	Facteur de stimulation de colonie-1	Colony stimulating factor-1
CSF-2	Facteur de stimulation de colonie-2	Colony stimulating factor-2
CSTA	Cellules souches du tissu adipeux	Adipose-derived stem cells
EGF	Facteur de croissance épidermique	Epidermal growth factor
GFP	Protéine fluorescente verte	Green fluorescent protein
H2B	Histone 2B	Histone 2B
HGF	Facteur de croissance des hépatocytes	Hepatocyte growth factor
HB-EGF	Facteur de croissance épidermique liant l'héparine	Heparin-binding EGF-like growth factor
IGF-1	Facteur de croissance analogue à l'insuline 1	Insulin like growth factor-1
IL-1	Interleukine 1	Interleukin 1
IL-6	Interleukine 6	Interleukin 6
IL-8	Interleukine 8	Interleukin 8
K14	Kératine 14	Keratin 14
KGF-1	Facteur de croissance des kératinocytes-1	Keratinocyte growth factor-1
KGF-2	Facteur de croissance des kératinocytes-2	Keratinocyte growth factor-2
MCP-1	Protéine chimio attractante de monocytes-1	Monocyte chemotactic protein 1
MMP	Métalloprotéinases	Metalloproteinases
NO	Oxyde nitrique	Nitric oxide
PAI-1	Inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type1	Plasminogen activator inhibitor-1
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes	Platelet-derived growth factor
TGF- α	Facteur de croissance de transformation α	Transforming growth factor α
TGF- β	Facteur de croissance de transformation β	Transforming growth factor β
TIMP	Inhibiteur des métalloprotéinases	Tissue inhibitor of metalloproteinases
TAR	Tissu adipeux reconstruit	Reconstructed adipose tissue
TCR	Tissu conjonctif reconstruit	Reconstructed connective tissue
t-test	Test T de Student	Student T-test
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale α	tumor necrosis factor α
UV	Ultraviolet	Ultraviolet
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire	Vascular endothelial growth factor

À ma famille et à mes proches

«Tout ce que nous avons à décider,
c'est ce que nous devons faire du temps qui nous est imparti.»
- J.R.R Tolkien

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier ma directrice de recherche Julie Fradette. Merci pour ton support, ta patience, ton énorme disponibilité, ta rigueur, et surtout, pour la confiance que tu m'as accordée. Ta passion pour la recherche, malgré ses hauts et ses bas, est contagieuse! Ces années d'apprentissage passées au labo seront une ressource inestimable d'outils pour le futur.

Un merci immense et sincère aux filles de l'équipe! Vos encouragements, votre énergie et votre sagesse m'ont sauvé la peau du cou un nombre incalculable de fois. Dominique, un gros merci pour ton temps, pour les nombreuses discussions, pour les innombrables explications, pour avoir ouvert mes œillères quand j'étais un peu trop borné et pour tous ces fous rires! Tu as été un véritable pilier. Valérie, j'ai adoré travailler en ta compagnie, ton calme et ta résilience ont toujours su me faire progresser. Amandine, je ne peux te remercier assez pour toutes ces fois où nous avons fait des « tours de l'horloge ». Les heures de labeur passées à travailler sous la hotte ou à l'animalerie avec toi m'ont semblé être des secondes. Maryse, merci pour ton optimisme, ta présence et ta patience à mon égard toutes les fois où je t'ai dérangée pour te poser des questions ou pour dire des niaiseries. Je n'aurai pas pu faire autant de soirées dans le bureau si tu n'avais pas été là ! Kim, merci d'avoir été ma complice durant ces trois années. Les mots me manquent pour te dire à quel point ton écoute, ton sens de l'humour et ta bonne humeur ont été importants pour moi. Merci d'avoir su endurer mes folies. Nos «tites-soupes» et nos «ti-cafés» ont égayé mes journées. Marie-Ève, tu as toujours su me challenger et me faire découvrir d'autres façons de voir les choses. Je tâcherai de ne pas oublier tous les outils que tu m'as transmis! Meryem, ton énergie débordante, ton authenticité, ton goût de la science et ta curiosité auront été un véritable vent de fraîcheur. Marc et Valérie L.G., merci pour vos «petites mains» et pour toute l'aide que vous m'avez apportée durant vos stages. Merci les filles (et Marc), j'ai su m'épanouir scientifiquement, mais également personnellement à vos côtés !

Un immense merci à ma co-directrice, Véronique Moulin. Votre aide ponctuelle a été essentielle à la réalisation de ces travaux ! Merci pour votre temps et votre bonne humeur ! Merci également à Véronique Laterreur pour l'aide apportée à tous les niveaux pour les tests mécaniques.

J'aimerais également remercier chaleureusement toute la grande famille du LOEX. Les bons moments que nous avons passés ensemble vont toujours me rester. Audrey et Lorène, merci d'avoir été présentes durant les hauts et les bas de cette grande aventure ! Le LOEX aurait manqué de saveur sans vous. Merci également à Amé Mo, Isa «Ginette» Gendreau, Petit Pouliô (Clau), Seb, Catherine, Akram, Amélie Langlois, Laetitia, Lydia, Sab, Alex et à tous les autres pour les conversations enrichissantes, pour toutes ces Souches et tous ces bons moments inoubliables!

Je voudrais également remercier mes parents et ma famille. Merci à vous pour votre aide, votre support inconditionnel et votre compréhension. Merci également pour votre indulgence lors des moments où j'ai été moins présent. Merci à mes parents, et tout particulièrement à ma petite maman, pour votre amour et les sacrifices que vous avez effectués pour moi, je ne vous remercierai jamais assez.

Chapitre 1 : Introduction générale

1.1 La peau humaine

1.1.1 *Physiologie de la peau humaine*

La peau est l'organe le plus important de l'organisme en termes de superficie et de volume. Chez un adulte moyen, son poids représente environ 15% de l'ensemble de la masse d'un individu (Kanitakis 2002). En plus de créer une barrière physique contre les agressions de l'environnement, la peau, également appelée tégument, occupe de nombreuses fonctions. La sécrétion de molécules bioactives, la perception sensorielle et la thermorégulation sont tous d'importants rôles joués par la peau afin d'assurer l'homéostasie de l'organisme (Kanitakis 2002).

L'architecture de cet organe peut être divisée en trois grandes couches ou compartiments distincts: l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Figure 1.1). L'épiderme, la couche la plus superficielle, est d'origine ectodermique, tandis que les couches médiane et profonde, respectivement le derme et l'hypoderme, proviennent du mésoderme (Widelitz, Jiang et al. 1997).

La peau contient également des annexes cutanées qui comprennent les glandes sébacées, les glandes sudoripares, les ongles et les follicules pileux chez l'homme. Ces annexes sont ancrées dans le derme et traversent verticalement le derme et l'épiderme sur toute leur épaisseur. Certaines structures, telles que les poils, se retrouvent en contact avec l'hypoderme à certains niveaux ou le traversent même partiellement.

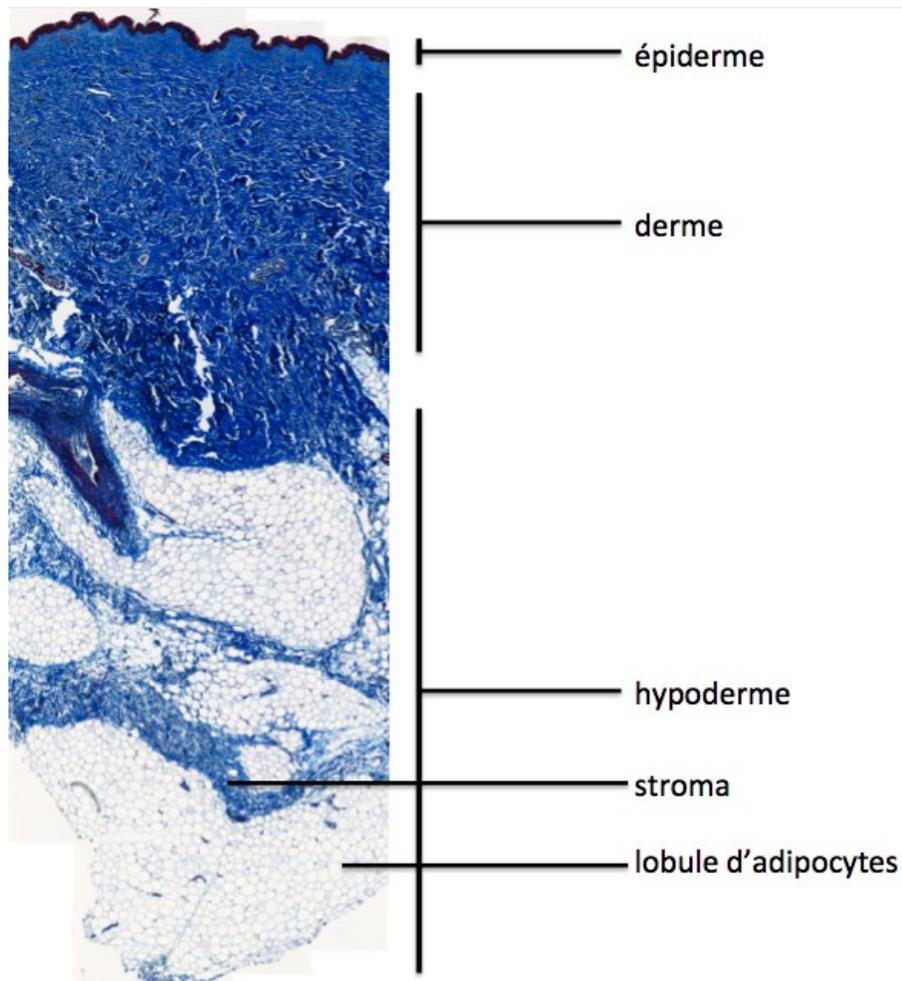


Figure 1.1 La structure de la peau normale humaine. Coupe transversale de peau colorée au trichrome de Masson. Grossissement de 100 fois (objectif de 10X). ©Julie Fradette

1.1.2 L'épiderme

L'épiderme est un épithélium pavimenteux, stratifié et cornéifié. Cet épithélium se renouvelle continuellement sur une période d'environ un mois grâce à la prolifération et à la différenciation des kératinocytes qui en sont le type cellulaire principal. Selon les régions du corps qu'il recouvre, l'épaisseur de l'épiderme est variable : pouvant aller de 50 μm au niveau des paupières à 1 mm au niveau des paumes, la moyenne se situant à environ 100 μm (Kanitakis 2002).

En regardant une coupe histologique d'un épiderme, on remarque que son arrangement varie progressivement du bas vers le haut (Figure 1.2). Cette différence est principalement due à la différenciation verticale des kératinocytes dont la morphologie change en migrant vers la surface de l'épiderme. Ainsi, quatre couches épidermiques distinctes peuvent être observées de bas en haut : soit la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée (Kanitakis 2002).

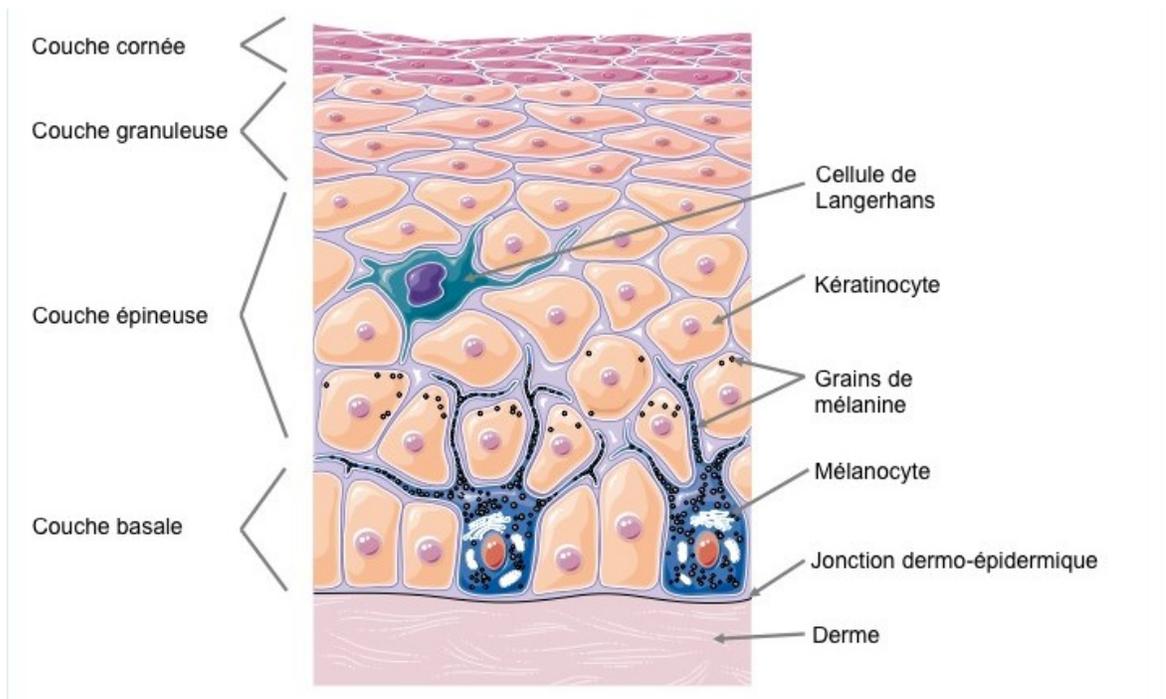


Figure 1.2 La structure de l'épiderme humain. Adapté de (<http://smart.servier.fr/servier-medical-art> 2014).

La couche basale

Morphologiquement, les kératinocytes de la couche basale ont une apparence cuboïde. Leur cytosquelette est caractérisé par la présence des kératines 5 et 14 (Nelson and Sun 1983). Les kératines font partie d'une grande famille de protéines qui compose les filaments intermédiaires présents dans les kératinocytes. Ces câbles intracellulaires sont donc responsables de la robustesse de l'épiderme et sont exprimés de manière transitoire durant le processus de différenciation des kératinocytes. Tout comme les kératinocytes des couches supérieures, ceux de la couche basale sont reliés entre eux par des desmosomes.

Bien que l'épiderme contienne environ 80% de kératinocytes, d'autres types cellulaires y sont présents, et ce, majoritairement au niveau de la couche basale. Parmi ceux-ci, on retrouve les cellules de Merkel qui sont des cellules mécano-réceptrices; les cellules de Langerhans qui représentent des cellules du système immunitaire inné; et les mélanocytes qui sont associés à la pigmentation de la peau et de ses phanères (les poils et ongles chez l'humain) (Kanitakis 2002, Prost-Squarcioni 2006). Les mélanocytes sont des cellules spécialisées dans la production de la mélanine, un pigment coloré qui protège l'ADN des cellules de l'épiderme contre les rayons ultraviolets (UV) du soleil. La mélanine est incorporée dans les kératinocytes et il

est possible de compter en moyenne 1 mélanocyte pour 10 kératinocytes basaux et pour 36 kératinocytes suprabasaux (Prost-Squarcioni 2006, Singh, Kurfurst et al. 2010).

En plus des nombreux kératinocytes et des types cellulaires moins abondants mentionnés ci-haut, la couche basale de l'épiderme contient des cellules souches épithéliales. Ces cellules permettent le renouvellement continu des kératinocytes. Elles se retrouvent dans le renflement des follicules pileux et dans les crêtes épidermiques profondes de la peau, et ce, en faible nombre. Un de leurs marqueurs est la kératine 19 (Michel, Torok et al. 1996, Larouche, Lavoie et al. 2010). Ces cellules souches épithéliales ont la particularité de se diviser asymétriquement : cela permet la conservation d'une population de cellules souches épithéliales tout en permettant la production de cellules amplificatrices transitoires. Ces cellules amplificatrices transitoires sont des cellules unipotentes qui ont un potentiel prolifératif élevé. Les kératinocytes basaux nouvellement formés peuvent par la suite se différencier de la couche profonde vers la couche superficielle de l'épiderme (Michel, Torok et al. 1996).

Les couches suprabasales (épineuse et granuleuse)

Les couches suprabasales de l'épiderme (couche épineuse et granuleuse) sont des zones transitoires qui sont caractérisées par la transformation graduelle des kératinocytes de la couche basale en cornéocytes (Kanitakis 2002).

Les kératinocytes des couches épineuses sont caractérisés par la présence marquée de desmosomes. Le duo de kératines 1 et 10 commence à être traduit et produit à partir de cette couche et en sont des marqueurs spécifiques. L'arrangement des kératines et des desmosomes crée un réseau intercellulaire qui donne la résistance mécanique de l'épiderme (Fuchs and Green 1980).

Dans la couche granuleuse, les kératinocytes ont une morphologie aplatie et possèdent toujours leurs organelles. L'apparition de granules et de corps lamellaires intracellulaires y est dénotée. Les granules renferment les précurseurs de la filaggrine et de la loricine. Ces protéines seront nécessaires à la cornéification de l'épiderme, discutée dans la section suivante. Pour leur part, les corps lamellaires contiennent des composants qui seront excrétés dans l'espace extracellulaire. On y dénote des constituants lipidiques tels que des céramides, des triglycérides et des acides gras libres, ainsi que des éléments protéiques comme l'involucrine et la transglutaminase (Banks-Schlegel and Green 1981, Mehrel, Hohl et al. 1990, Menon and Ghadially 1997).

La couche cornée

Une fois qu'ils ont atteint leur état de différenciation terminale, les kératinocytes deviennent des cornéocytes, des cellules mortes, aplaties et vidées de leurs noyaux (Proksch, Brandner et al. 2008). Le processus de cornification est caractérisé par la destruction des organelles, l'évidement du cytoplasme et l'agrégation des kératines intracellulaires sous l'action de la filaggrine. Des protéines se retrouvant dans l'espace extracellulaire interstitiel, soit l'involucrine et la loricine (protéines structurales de l'enveloppe cornée (Banks-Schlegel and Green 1981, Mehrel, Hohl et al. 1990)), sont pontées par l'activité de la transglutaminase (Harrison, Layton et al. 2007). Les composants des corps lamellaires (céramides, triglycérides et acides gras libres) sont excrétés dans l'espace extracellulaire. Tous contribuent de manière importante à l'étanchéité de la couche cornée (Menon and Ghadially 1997).

Le contact avec l'environnement, sous forme de friction et de forces de cisaillement, entraîne la desquamation de la couche cornée. On assiste alors au détachement de petites strates de peau dévitalisée constituée de cornéocytes joints les uns aux autres. Le cycle de renouvellement de ces cornéocytes, remplacés par la prolifération et la différenciation des kératinocytes sous-jacents, est d'une durée d'environ un mois (Proksch, Brandner et al. 2008).

1.1.3 La jonction dermo-épidermique

L'épiderme et le derme sous-jacent sont joints par une membrane basilaire nommée jonction dermo-épidermique. La jonction entre le derme et l'épiderme n'est toutefois pas lisse : elle est caractérisée par de multiples «vallons» et «crêtes». On désigne cette succession de hauts et de bas sous le nom de papilles dermiques. Cette architecture comporte deux avantages considérables : elle permet d'augmenter la souplesse et la résistance de la peau d'une part, et accentue la surface de contact entre le derme et l'épiderme multipliant ainsi les échanges de nutriments et de chaleur (Schittny and Yurchenco 1989, Ventre, Mollica et al. 2009).

La composition de la jonction dermo-épidermique est typique de la plupart des membranes basales : présence de laminines (principalement de laminine $\alpha3\beta3\gamma2$, abrégée en laminine 332 ou 3A32 et anciennement appelée laminine 5), de collagènes (principalement de collagène de type IV), de protéoglycans et de nidogène (Schittny and Yurchenco 1989). Cette jonction est également composée d'éléments spécifiques qui sont importants pour l'ancrage des kératinocytes : les hémidesmosomes. Ces complexes membranaires de protéines confèrent une résistance mécanique supplémentaire à la jonction dermo-épidermique. En effet, ils agissent en tant qu'ancrages du réseau formé par les kératines intracellulaires (5 et

14 principalement) tout en étant liés aux intégrines spécialisées dans la liaison de la matrice extracellulaire (préférentiellement les intégrines $\alpha6\beta4$ et $\alpha3\beta1$) (Schittny and Yurchenco 1989, Borradori and Sonnenberg 1999).

1.1.4 Le derme

Le derme est le tissu conjonctif sous-jacent à l'épiderme (Figure 1.1). Comme la majorité des tissus conjonctifs de l'organisme, celui-ci est impliqué dans les fonctions de soutien, de nutrition, de résistances mécaniques et de souplesse. Il renferme une matrice extracellulaire importante dont les composants majoritaires sont des fibres de collagènes, des fibres élastiques, de la fibronectine et des protéoglycans (Ventre, Mollica et al. 2009). La figure 1.3 illustre les principaux éléments présents dans le derme qui seront décrits de manière plus approfondie.

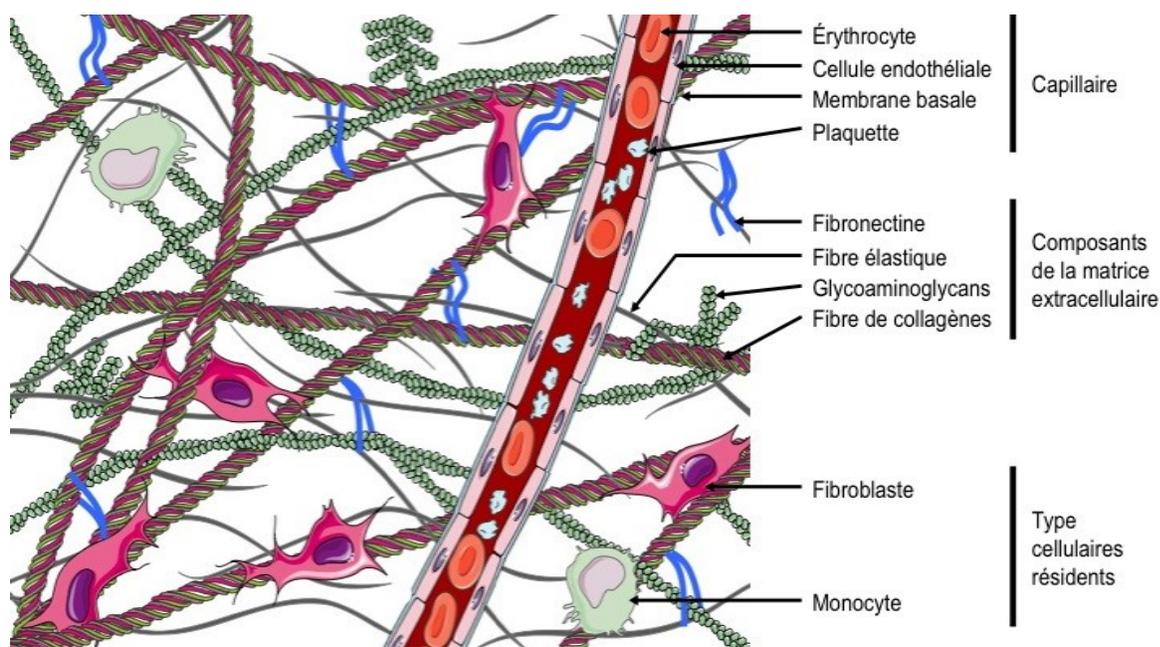


Figure 1.3 La structure du derme humain. Montage créé à partir d'images libres d'accès provenant de (<http://smart.servier.fr/servier-medical-art> 2014). ©Pascal Morissette Martin

Histologiquement, le derme peut être subdivisé en deux compartiments distincts. Le premier, le derme papillaire, se situe au niveau des papilles dermiques et est constitué majoritairement de fibres de collagènes de petits calibres qui sont orientées perpendiculairement par rapport à l'épiderme. Le second, le derme réticulaire, se situe plus en profondeur et est élaboré de manière plus dense. La taille et le nombre des fibres de collagènes y sont plus importants (Prost-Squarcioni 2006).

Les cellules du derme

Les fibroblastes dermiques représentent le type cellulaire résident majoritaire du derme. Si l'on compare avec la structure de l'épiderme, les fibroblastes ne sont pas joints physiquement les uns aux autres contrairement aux kératinocytes. Ils se retrouvent donc de manière plus ou moins isolée dans un environnement riche en matrice extracellulaire.

Les fibroblastes sont responsables de l'entretien de l'architecture de cette matrice extracellulaire : ils synthétisent la majorité des protéines la composant, de même que les protéases requises pour la dégrader et la remodeler. Ayant également un rôle paracrine, ces cellules ont la capacité de sécréter des cytokines impliquées dans le maintien et dans la réparation tissulaire suite à une blessure, ainsi que dans la communication entre le derme et les kératinocytes (Goulet, Poitras et al. 1996, Kim, Park et al. 2007).

Le derme est un tissu hautement vascularisé qui contient un nombre important de cellules endothéliales résidentes (Kanitakis 2002). Les cellules endothéliales sont les cellules formant les capillaires et recouvrant la surface interne (monocouche) des vaisseaux sanguins et des vaisseaux lymphatiques. Elles s'enchâssent les unes aux autres et sont jointes par des jonctions adhérentes et des jonctions serrées. Leur arrangement forme des tubules vides en leur centre qui laisse passer le flux sanguin. Ces cellules sécrètent également une membrane basale sur la face externe des tubules. Cette membrane est constituée en partie de fibres de collagène de type IV et de laminine 332. La membrane basale augmente la résistance mécanique des tubules (Wallez and Huber 2008). Le système vasculaire du derme contient également des péricytes, un type cellulaire spécialisé dans la stabilisation des capillaires de petits calibres.

Des cellules résidentes du système nerveux périphérique (prolongements axonaux, cellules de Schwann composant la gaine de myéline, etc.) et des cellules migratoires du système immunitaire (mastocytes, macrophages, lymphocytes, etc.) se retrouvent aussi dans le derme (Kanitakis 2002, Prost-Squarcioni 2006).

La matrice extracellulaire dermique

La matrice extracellulaire dermique confère à la peau des propriétés mécaniques qui lui permettent de résister à la plupart des stress mécaniques qu'elle subit. Cette matrice est très riche en collagènes.

Les collagènes correspondent à une grande famille de protéines structurales. Ce sont ces protéines, agencées sous forme de fibrilles et de fibres, qui donnent le caractère robuste et solide de la matrice extracellulaire. Les fibres de collagènes se déclinent en divers types qui diffèrent en fonction de l'organe dans lequel elles se retrouvent (van der Rest and Garrone 1991). Dans la matrice dermique, les collagènes majoritaires sont ceux de type I (60 à 80%), III (15 à 25%) et V (2 à 5%) (Prost-Squarcioni 2006).

En plus du collagène, la matrice extracellulaire dermique possède un important réseau de fibres élastiques. Leur rôle est, comme leur nom le laisse sous-entendre, de conférer à la peau ses propriétés élastiques. Elles sont composées majoritairement d'élastine et de fibrilline-1. Ces fibres tendent à se dégrader avec le temps : cette dégradation est caractéristique de la perte des propriétés élastiques de la peau en fonction de l'âge des individus (Seite, Zucchi et al. 2006).

Une autre protéine importante, la fibronectine, joue des rôles importants dans la liaison à la matrice extracellulaire. Elle agit surtout en tant que «pont moléculaire» aidant à la réticulation de la matrice extracellulaire. En effet, cette protéine s'associe aux intégrines de la cellule d'une part et aux autres constituants de la matrice d'autre part (Midwood and Schwarzbauer 2002). Elle possède de nombreux ligands dont la plupart des autres éléments de la matrice extracellulaire (Norton and Hynes 1987).

Puis, enchevêtrées au travers des divers types de fibres protéiques structurales du derme, plusieurs glycoprotéines sont retrouvées. Lorsque ces protéines sont liées à des arrangements de sucres de très haut poids moléculaire tels que des glycosaminoglycans, elles prennent le nom plus spécifique de protéoglycans. Les protéoglycans jouent un rôle important de rétention d'eau pour le derme. Cette fonction de «réservoir» est possible grâce à la forte affinité qu'ont les glycoaminoglycans pour l'eau. Certains protéoglycans ont également des rôles signalétiques : ils ont la capacité de séquestrer des facteurs de croissance sous formes inactives (ou de ligands solubles de ces facteurs). Ils peuvent donc agir en tant que médiateur de la réparation tissulaire en réponse à un bris d'intégrité qui libérerait les facteurs de croissance latents (Engel and Chiquet 2011).

Tous les éléments de la matrice s'entrecroisent et participent, à leur façon, aux diverses propriétés mécaniques de la peau. Par exemple, les fibres de collagène contribuent à la robustesse et à la force du tissu, tandis que les fibres élastiques participent grandement à l'élasticité et la compliance de la peau (White, Brody et al. 1971, Munoz, Bea et al. 2008). Par ses propriétés mécaniques distinctes, la matrice protège donc les cellules résidentes, les vaisseaux sanguins, les nerfs et les glandes que l'on retrouve dans le derme.

1.1.5 L'hypoderme

L'hypoderme, également appelé tissu adipeux sous-cutané, se retrouve en dessous du derme. À la différence de l'épiderme et du derme qui sont joints de manière franche par la jonction dermo-épidermique, le derme et l'hypoderme n'ont pas de délimitation définie (Figure 1.1). De manière courante, on attribue au tissu adipeux des rôles de soutien (soutien de la peau aux tissus sous-jacents, amortissement des chocs), de thermorégulation et de réserve énergétique.

Toutefois, le tissu adipeux est également un organe endocrinien dans son ensemble. En effet, les cellules en son sein ont la capacité de sécréter diverses cytokines, reconnues plus spécifiquement sous le nom d'«adipokines», qui peuvent agir de manière locale (par voie autocrine ou paracrine) ou systémique (par voie endocrine) sur l'organisme (Sader, Nian et al. 2003, Hauner 2004, Fu and Li 2009). Le sécrétome du tissu adipeux sera discuté davantage dans les sections dédiées aux différents types cellulaires associés au tissu adipeux.

Les adipocytes

Les adipocytes blancs sont les cellules principales du gras sous-cutané. Ces cellules sont spécialisées dans l'accumulation et l'utilisation de lipides. Ces lipides sont emmagasinés sous forme de triglycérides à l'intérieur de gouttelettes uniloculaires. L'espace intracellulaire des adipocytes est majoritairement occupé par la gouttelette de triglycérides, tandis que l'espace restreint subsistant est occupé par le noyau, les organelles et une mince couche de cytoplasme. L'adipocyte moyen mesure de 70 à 120 µm de diamètre. Au niveau tissulaire, les adipocytes sont arrangés par lobules. L'espace interstitiel entre les différents lobules est occupé par des vaisseaux sanguins, des nerfs et du stroma (Hauner 2004).

Plusieurs molécules bioactives sont sécrétées par les adipocytes. Ces molécules, regroupées par ordre alphabétique dans le tableau 1.1, ont des effets bioactifs au niveau endocrinien (métabolisme des lipides/lipoprotéines, tonus vasculaire, réponse inflammatoire, homéostasie sanguine) et paracrines (réponse inflammatoire, homéostasie locale, promotion de l'angiogenèse et de la prolifération cellulaire dans un contexte de plaies cutanées).

Tableau 1.1 Facteurs bioactifs sécrétés par les adipocytes humains

Molécules	Fonctions principales (chez l'adulte)	Effets	Source
Adiponectine	Impliquée dans l'anabolisme des glucides et des lipides. Hormone insulino-sensible.	Systémiques	(Maeda, Okubo et al. 1996) et (Ailhaud 2006)
Angiopoïétine-1 (Ang-1)	Participe à la stabilité des jonctions intercellulaires des cellules endothéliales.	Locaux	(Dallabrida, Zurakowski et al. 2003)
Angiotensine II	Rôles majeurs : vasoconstricteur (élévation de la pression artérielle). Rôles mineurs : médiateur inducteur de la production de PAI-1 et d'interleukines au niveau du tissu adipeux.	Systémiques et locaux	(Skurk, Lee et al. 2001) et (Skurk, van Harmelen et al. 2004)
Apeline	Hormone endocrinienne jouant des rôles au niveau vasculaire, cardiaque, cérébral, digestif et osseux.	Systémiques et locaux	(Hung, Hsieh et al. 2011)

Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF)	Chimioattracteur puissant des cellules endothéliales. Participe également à la perméabilité des vaisseaux sanguins pour permettre la prolifération/migration des cellules endothéliales.	Locaux	(Zhang, Magovern et al. 1997) et (Rega, Kaun et al. 2007)
Facteur de croissance des hépatocytes (HGF)	Agent mitogène commun à plusieurs types cellulaires, qu'ils soient épithéliaux, endothéliaux ou mésenchymateux.	Locaux	(Nakamura and Mizuno 2010) et (Saiki, Watanabe et al. 2006)
Facteur de croissance du tissu nerveux (NGF)	Agent mitogène important pour la croissance, le maintien et la survie de certaines cellules nerveuses.	Locaux	(Fain 2006)
Facteur de stimulation de colonie (CSF-1)	Impliqué dans l'hypertrophie des adipocytes et dans le recrutement de monocytes. Sécrété de manière plus importante dans un contexte d'obésité.	Locaux	(Levine, Jensen et al. 1998)
Hormones stéroïdiennes	Les adipocytes ne sécrètent pas d'hormones stéroïdiennes <i>per se</i> . Toutefois, les aromatasés qu'ils contiennent contribuent à la transformation des diverses formes de stéroïdes présents dans le sang.	Systémiques et locaux	(Nelson and Bulun 2001) et (Hauner 2004)
Inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type1 (PAI-1)	Joue un rôle dans l'inhibition de la fibrinolyse et dans l'adipogenèse (détachement des préadipocytes de la matrice extracellulaire).	Locaux	(Bastelica, Morange et al. 2002) et (Stefansson and Lawrence 1996)
Interleukines 6 et 8 (IL-6 et IL-8)	Médiateurs et messagers de l'inflammation. Chimioattracteurs de certaines cellules du système immunitaire tels que les neutrophiles et les monocytes.	Locaux	(Skurk, van Harmelen et al. 2004) et (Hauner 2004)
Leptine	Rôles majeurs : régulation de l'appétit et la prise de poids en agissant sur l'hypothalamus. Rôles mineurs : migration des kératinocytes et des cellules endothéliales.	Systémiques et locaux	(Stallmeyer, Kampfer et al. 2001) et (Sierra-Honigmann, Nath et al. 1998)
Lipoprotéine lipase	Hydrolyse des lipoprotéines permettant aux adipocytes de capter les acides gras. (Sécrétées par les adipocytes, les LPL vont se lier sur la membrane des cellules endothéliales).	Locaux	(Cook, Groves et al. 1985)
Monobutyryne	Stimule la migration des cellules endothéliales (mais non pas leur prolifération). Sécrétée principalement lors de la différenciation adipocytaire.	Locaux	(Dobson, Kambe et al. 1990)
Prostaglandine E2	Agent médiateur de l'inflammation.	Locaux	(Fain, Madan et al. 2004)
Protéine chimio attractante de monocytes-1 (MCP-1)	Impliquée dans le recrutement de monocytes. (sécrétée de manière plus importante dans un contexte d'obésité).	Locaux	(Takahashi, Mizuarai et al. 2003)
Pentraxine 3	Joue un rôle dans l'homéostasie du tissu adipeux.	Locaux	(Abderrahim-Ferkoune, Bezy et al. 2003)

Autres molécules	Ayant des rôles dans le métabolisme des lipides/lipoprotéines, dans le tonus vasculaire, la réponse inflammatoire, l'homéostasie locale et sanguine, ainsi que la matrice extracellulaire.	Systémiques et locaux	(Chen, Cushman et al. 2005), (Ailhaud 2006) et (Fain, Madan et al. 2004)
------------------	--	-----------------------	--

NOTE : Il est connu que toutes ces molécules sont produites par le tissu adipeux humain. Toutefois, la confirmation que ce sont bien les adipocytes qui sécrètent ces molécules a parfois été obtenue à l'aide de modèles d'adipocytes murins. De plus, les molécules y sont classées par ordre alphabétique.

Les cellules mésenchymateuses du tissu adipeux

La fraction stromale du tissu adipeux est une niche riche en cellules mésenchymateuses tels que des fibroblastes, des péricytes, des progéniteurs hématopoïétiques, des préadipocytes (cellules stromales engagées au début de la voie de différenciation adipocytaire ne contenant pas de lipides) et des cellules souches du tissu adipeux. Comme tout tissu conjonctif, le tissu adipeux contient également plusieurs types cellulaires non résidents dans sa fraction stromale, tels que des leucocytes et des érythrocytes (Zuk, Zhu et al. 2001, Safford, Hicok et al. 2002, Zuk, Zhu et al. 2002). Près de 2% des cellules stromales résidentes sont considérées comme des cellules souches mésenchymateuses multipotentes (Strem and Hedrick 2005). La multipotence des cellules souches du tissu adipeux a été démontrée par leur capacité à se différencier en chondrocytes, en ostéoblastes, en cellules à caractères neuronaux, en cellules musculaires lisses, en cardiomyocytes et, bien entendu, en adipocytes (Zuk, Zhu et al. 2001, Safford, Hicok et al. 2002, Zuk, Zhu et al. 2002, Planat-Benard, Menard et al. 2004).

Les cellules souches mésenchymateuses du tissu adipeux

Les «cellules stromales/souches du tissu adipeux» (CSTA ou ASC pour *Adipose-derived Stromal/Stem Cells*) sont les cellules mésenchymateuses résidentes du tissu adipeux (fibroblastes, péricytes, préadipocytes et cellules souches multipotentes). Dans un contexte de culture cellulaire en laboratoire, trois lignes directrices ont été données par la communauté scientifique afin de pouvoir désigner les CSTA comme telles. Dans un premier temps, les CSTA fraîchement extraites du tissu doivent être adhérentes aux surfaces traitées pour la culture (avec une viabilité cellulaire d'au moins 90%). Elles doivent présenter un immunophénotype caractéristique : elles sont habituellement positives aux marqueurs de surfaces CD90, CD73, CD105, CD44, CD36, et négatives aux marqueurs de leucocytes CD45 et CD106, ainsi qu'au marqueur de cellules endothéliales CD31. En dernier lieu, il est conseillé d'effectuer des essais *in vitro* démontrant la capacité que ces cellules ont à se différencier. Ainsi, à partir d'une même population cellulaire de CSTA, il devrait être possible d'induire leur différenciation en chondrocytes, en ostéoblastes et en adipocytes. La caractérisation de la différenciation doit se faire au niveau tissulaire et moléculaire où une série de biomarqueurs, tels que

des combinaisons spécifiques de facteurs de transcription nucléaires, doivent être mises en évidence (Bourin, Bunnell et al. 2013).

Plusieurs molécules bioactives sont sécrétées par les CSTA. Ces molécules, classées par ordre alphabétique dans le tableau 1.2, ont des effets nombreux : antioxydants, pro-prolifératifs, pro-angiogéniques et anti-apoptotiques (Rehman, Traktuev et al. 2004, Kim, Park et al. 2009).

Tableau 1.2 Molécules signalétiques bioactives importantes sécrétées par les CSTA humaines

Molécules	Fonctions principales (chez l'adulte)	Actions	Source
Angiopoïétine-1 (Ang-1)	Participe à la stabilité des jonctions intercellulaires des cellules endothéliales des capillaires.	Locales	(Dallabrida, Zurakowski et al. 2003)
Facteur de croissance analogue à l'insuline 1 (IGF-1)	Agent mitogène commun à plusieurs types cellulaires, qu'ils soient épithéliaux, endothéliaux ou mésenchymateux.	Locales	(Le Roith 1997) et (Kim, Park et al. 2007)
Facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF)	Agent mitogène spécifique aux cellules mésenchymateuses.	Locales	(Heldin 1992) et (Kim, Park et al. 2007)
Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF)	Agent mitogène et chimioattracteur puissant des cellules endothéliales. Affecte la perméabilité des vaisseaux sanguins pour permettre la prolifération/migration des cellules endothéliales.	Locales	(Zhang, Magovern et al. 1997) et (Rehman, Traktuev et al. 2004)
Facteur basique de croissance des fibroblastes (bFGF)	Agent mitogène commun. Il a des effets sur les cellules mésenchymateuses et les cellules endothéliales.	Locales	(Ornitz and Itoh 2001) et (Rehman, Traktuev et al. 2004)
Facteur de croissance des hépatocytes (HGF)	Agent mitogène commun à plusieurs types cellulaires, qu'ils soient épithéliaux, endothéliaux ou mésenchymateux.	Locales	(Nakamura and Mizuno 2010) et (Rehman, Traktuev et al. 2004)
Facteur de croissance des kératinocytes (KGF)	Agent mitogène spécifique aux kératinocytes. Importants lors de la réépithélialisation dans un contexte de plaies cutanées.	Locales	(Ebrahimian, Pouzoulet et al. 2009) et (Kim, Park et al. 2007)
Facteur de croissance du tissu nerveux (NGF)	Agent mitogène important pour la croissance, le maintien et la survie de certaines cellules nerveuses.	Locales	(Fain 2006)

Facteur de croissance de transformation β (TGF- β)	Possibilité d'agir sur plusieurs voies signalétiques selon le contexte (agent mitogène, inducteur de différenciation cellulaire ou d'apoptose).	Locales	(Massague 2012) et (Rehman, Traktuev et al. 2004)
Facteurs de stimulation de colonie 1 et 2 (CSF-1 et 2)	Impliqués dans l'hypertrophie des adipocytes et dans le recrutement de monocytes. Sécrités de manière plus importante dans un contexte d'obésité.	Locales	(Levine, Jensen et al. 1998) et (Rehman, Traktuev et al. 2004)
Inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1 (PAI-1)	Joue un rôle dans l'inhibition de la fibrinolyse et dans l'adipogénèse (détachement des préadipocytes de la matrice extracellulaire).	Locales	(Bastelica, Morange et al. 2002) et (Stefansson and Lawrence 1996)
Interleukines 6 et 8 (IL-6 et IL-8)	Médiateurs et messagers de l'inflammation. Chimioattractants de certains leucocytes tels que les neutrophiles et les monocytes.	Locales	(Skurk, van Harmelen et al. 2004) et (Hauner 2004)
Protéine chimio attractante de monocytes-1 (MCP-1)	Impliquée dans le recrutement de monocytes. Sécritée de manière plus importante dans un contexte d'obésité.	Locales	(Takahashi, Mizuarai et al. 2003)

NOTE : La sécrétion des molécules a été démontrée à l'aide de CSTA humaines. De plus, celle-ci sont classées par ordre alphabétique dans le tableau.

Autres types cellulaires du tissu adipeux

Comme la plupart des tissus conjonctifs vascularisés, l'hypoderme est riche en leucocytes circulatoires non résidents (macrophages, granulocytes, lymphocytes et autres), en cellules vasculaires (cellules endothéliales, cellules musculaires lisses, et autres) et en cellules du système nerveux périphérique (prolongements axonaux, cellules de Schwann composant la gaine de myéline, et autres) (Kanitakis 2002, Hauner 2004).

La matrice extracellulaire du tissu adipeux

L'absence d'une délimitation franche entre le derme et l'hypoderme fait en sorte que la matrice extracellulaire du tissu adipeux possède plusieurs similitudes avec la matrice dermique. Ces deux tissus conjonctifs sont toutefois différents sur un point important : la présence des adipocytes et leur arrangement stérique. Afin d'augmenter leur résistance mécanique, les adipocytes ont la particularité de s'entourer d'une membrane basale individuelle riche en collagène de type IV et en laminine (Kubo, Kaidzu et al. 2000). Le collagène de type VI est également un élément important entourant les adipocytes (Khan, Muise et al. 2009).

1.1.6 Les annexes cutanées

Les phanères sont les annexes cutanées kératinisées, soient les poils (poils, cheveux, duvet, etc.) et les ongles chez l'homme (Kanitakis 2002). Leurs fonctions sont d'abord et avant tout des fonctions de protection : les poils corporels protègent du froid, les cheveux protègent du soleil, les cils protègent les yeux des petits débris, les ongles protègent les dernières phalanges des doigts et des orteils, etc. (Kanitakis 2002). Dans la peau, les poils sont produits et contenus dans des gaines appelées follicules pileux. Cette gaine est composée d'une invagination de l'épiderme dans le derme, allant même jusque dans l'hypoderme dans certains cas. Un muscle dit érecteur du poil est également attaché à la gaine et permet le redressement du poil (Prost-Squarcioni 2006). Les glandes sébacées font partie de la macrostructure du follicule pileux, puisqu'elles sécrètent une huile appelée sébum dans le canal formant la gaine des poils. Le sébum lubrifie les follicules pileux et aide à l'hydratation adéquate de la couche cornée. Il a également été démontré que le sébum possédait des propriétés antiseptiques. Chaque follicule pileux possède une ou plusieurs glandes sébacées annexées à celui-ci (Kanitakis 2002).

Les glandes sudoripares sont responsables de la production de la sueur. Elles se retrouvent ancrées profondément dans la peau, souvent même au niveau de l'hypoderme. La sueur est acheminée par un canal qui traverse la peau jusqu'à l'épiderme. La production de la sueur est essentielle à l'organisme qui se sert de la transpiration comme principal moyen de diminuer sa température (Kanitakis 2002).

1.1.7 Différences notables entre la peau humaine et la peau murine

La peau murine partage de nombreuses similitudes avec la peau humaine décrite dans les sections précédentes. Malgré ces ressemblances morphologiques, anatomiques et physiologiques quelques différences notables existent entre les organes cutanés des deux espèces.

La première différence anatomique en importance est la présence d'une couche supplémentaire extensive se retrouvant sous l'hypoderme murin, le *panniculus carnosus*. Cette structure rend la peau murine non adhérente aux muscles sous-jacents, alors que la peau humaine, qui est dépourvue de cette structure, est liée plus solidement aux muscles sur lesquels elle repose (Wong, Sorkin et al. 2011, Davidson, Yu et al. 2013). La seconde différence architecturale entre la peau des deux espèces est la pilosité. En effet, la densité des follicules pileux qui compose le pelage des souris est supérieure à la densité des follicules pileux corporels humains. De plus, une classe de longs poils spécialisés dans la perception sensorielle, les vibrisses, est présente sur le museau des souris et est absente chez l'humain. Le tableau 1.3 souligne les différences les plus notables entre la peau humaine et murine.

Tableau 1.3 Différences notables entre la peau humaine et murine

Différences	Chez la souris	Chez l'humain
Poils	Densité corporelle beaucoup plus élevée, présence de vibrisses au niveau du museau et cycles de renouvellement d'environ 3 semaines.	Densité corporelle plus faible, présence de poils spécialisés (cheveux, sourcils, etc.) et cycles de renouvellement très variables.
Architecture épithéliale	Absence de crêtes épidermiques.	Présence de crêtes épidermiques.
Glandes sudoripares apocrines	Présentes seulement autour des glandes mammaires.	Présentes aux aisselles, aux niveaux inguinaux et périanaux.
Propriétés biomécaniques	Épiderme, derme et hypoderme mince. Peau plus souple et moins résistante.	Épiderme, derme et hypoderme épais. Peau plus rigide et plus résistante.
Structure sous-cutanée	Présence d'un <i>panniculus carnosus</i> extensif. Peau non adhérente sur la majeure partie du corps.	L'équivalent d'un <i>panniculus carnosus</i> existe au niveau du cou où il prend le nom de <i>platysma</i> ou de muscle peaucier du cou.
Réparation tissulaire suite à un bris	Guérison majoritairement due à la contraction des plaies. Cette contraction à grande échelle est possible puisque la peau n'est pas adhérente aux muscles sous-jacents.	Guérison majoritairement due à la migration cellulaire. Cette migration comprend la réépithélialisation, la formation d'un tissu de granulation et la néovascularisation du tissu de granulation.
Épaisseur de l'hypoderme	Varie en fonction du cycle des poils.	Varie d'une région anatomique à l'autre, mais varie peu au sein d'une même région.
Sécrétome du tissu adipeux	Sécrétion de cytokines ressemblant davantage aux cytokines produites par les macrophages. Sécrétion de résistine par les adipocytes. Corrélation entre les niveaux sanguins de résistine et le diabète.	Sécrétion de cytokines plus distincte de celles produites par les macrophages. Sécrétion de résistine par les macrophages. Aucune corrélation entre les niveaux sanguins de résistine et le diabète.
Vascularisation et matrice extracellulaire du tissu adipeux	Moins vascularisé et réseau de matrice extracellulaire moins présent.	Plus vascularisé et réseau de matrice extracellulaire plus présent.

Modifié et adapté de (Wong, Sorkin et al. 2011) avec ajouts tirés de (Fain 2006).

La différence de structure entre les mammifères à peau adhérente (tel que l'être humain) et ceux à peau non adhérente (tel que la souris) fait en sorte qu'il est parfois difficile de transférer les connaissances d'une espèce à l'autre *de facto*. Toutefois, il existe des modèles d'études cutanées adaptés permettant de faire cette translation de la souris à l'homme (section 1.4.2).

1.2 Les plaies cutanées

En tant qu'organe barrière entre l'organisme et l'environnement, la peau est soumise à de multiples stress qui peuvent venir altérer son intégrité. La vitesse et la qualité de la guérison peuvent être très variables chez l'humain. L'ampleur de la plaie initiale (surface et profondeur), l'état du lit de la plaie, la présence d'ischémie,

d'infection, d'inflammation ou de nécrose, de même que la localisation anatomique, la qualité des soins prodigués, ainsi que de l'état de santé globale de l'individu souffrant d'une plaie cutanée sont tous des facteurs affectant la guérison (Moffatt and Vowden 2008).

De manière globale, les plaies peuvent être séparées en deux grandes catégories (Figure 1.4). Dans la première, on retrouve les plaies superficielles qui sont caractérisées par un bris au niveau de l'épiderme. Le derme reste intact et l'épiderme se régénère par réépithélialisation. La seconde catégorie, celle des plaies profondes, regroupe divers types de plaies de plus grande envergure où plusieurs couches de la peau (épiderme, derme et parfois même hypoderme et tissus sous-jacents) sont altérées. Le derme étant touché, les plaies de ce type saignent et des séries de migrations cellulaires doivent se produire afin de remplir l'espace laissé vacant (Moffatt and Vowden 2008, Gottrup, Apelqvist et al. 2013).

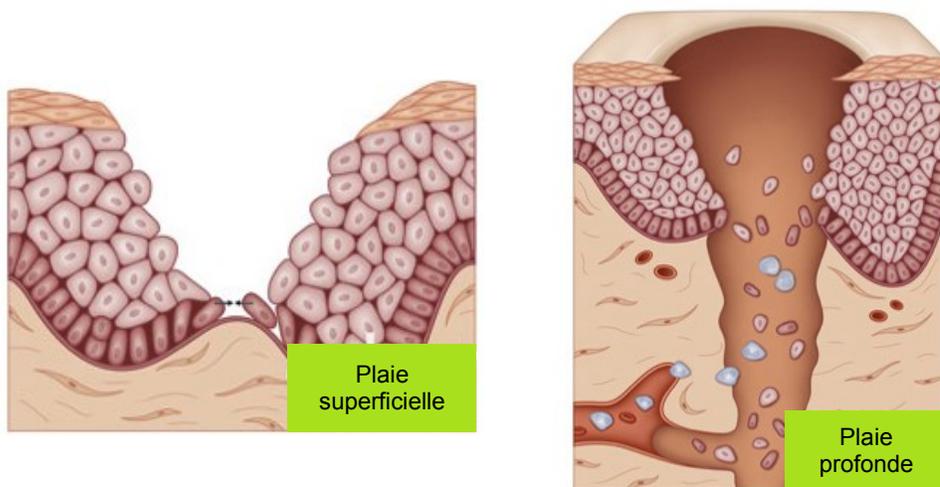


Figure 1.4 Les deux catégories de plaies cutanées. Les plaies superficielles sont caractérisées par un bris d'intégrité au niveau de l'épiderme, tandis que plusieurs couches de la peau sont altérées dans le cas des plaies profondes. Modifié de (LE Neures 2009).

Les plaies profondes peuvent également être subdivisées en diverses catégories. Le système de classement le plus utilisé met en opposition des plaies dites aiguës et des plaies dites chroniques. Les lésions traumatiques telles que les brûlures, les engelures, les coupures, les déchirures, les abrasions font normalement partie de la catégorie dite aiguë. Il en va de même pour les incisions et les excisions chirurgicales. Pour leur part, les plaies chroniques sont caractérisées par des lésions pour lesquelles la régénération tissulaire est altérée. Leur guérison est anormalement longue, voire même nulle: une grande proportion de ces plaies démontre une détérioration dans le temps. Très souvent, elles sous-tendent des problèmes de santé importants tels qu'un diabète mal contrôlé, un cancer (effets directs du cancer ou effets secondaires des traitements) ou bien des problèmes d'origines vasculaires (Mustoe 2004). Les risques

d'infections des plaies chroniques sont très élevés et leur guérison constitue un enjeu important en milieux hospitaliers.

La prévalence des plaies chroniques est élevée dans la population. Par exemple, près du quart des patients diabétiques développeront au moins un ulcère des membres inférieurs au cours de leur vie (Fonder, Lazarus et al. 2008). Suite à des complications, ces plaies peuvent mener à des amputations jusque dans les régions saines afin d'arrêter la nécrose progressive des tissus. Les patients diabétiques sont 20 fois plus à risque d'être amputés d'un membre inférieur (orteils, pied, etc.) que les patients non diabétiques (<http://www.phac-aspc.gc.ca/cd-mc/publications/diabetes-diabete/facts-figures-faits-chiffres-2011/index-fra.php> 2011).

1.2.1 Les processus de réparation tissulaire cutanée

La guérison des plaies superficielles est régulée par un processus régénératif : la réépithélialisation. Dans le cas des plaies profondes, la participation de nombreux processus cicatriciels est requise. Cette large gamme de processus peut être circonscrite en quatre phases distinctes qui s'entrecroisent dans le temps : l'hémostase, la phase inflammatoire, la phase proliférative et la phase de remodelage (Figure 1.5) (Guo and Dipietro 2010, Cherubino, Rubin et al. 2011). Ces phases seront décrites dans les sections suivantes. Une attention particulière sera toutefois donnée à la phase proliférative.

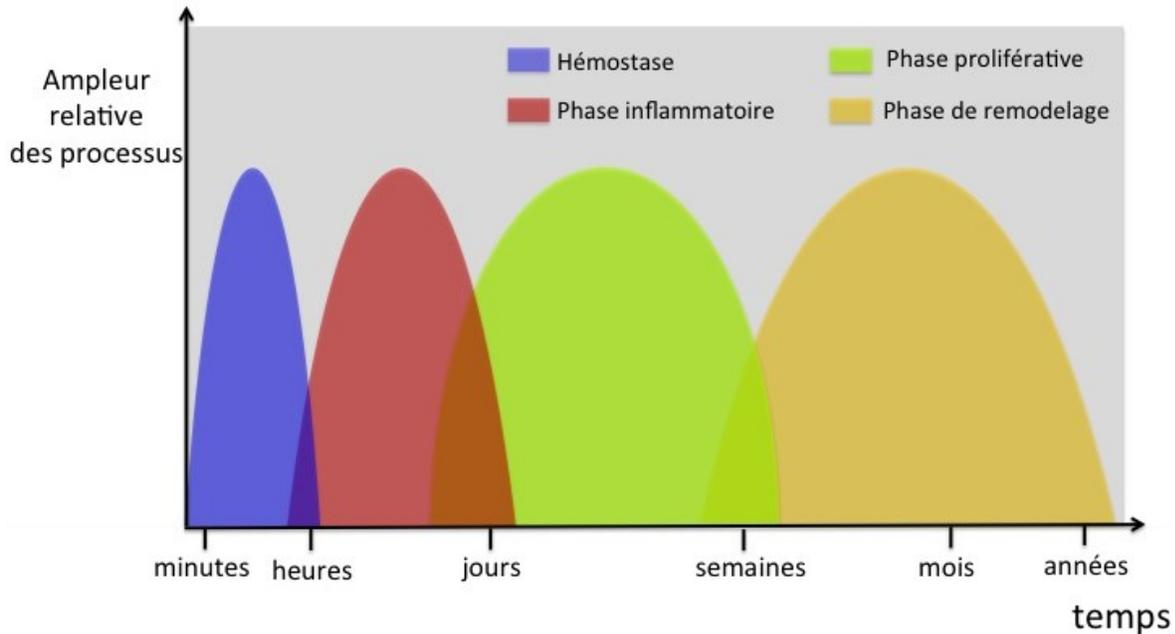


Figure 1.5 La guérison des plaies. La guérison des plaies peut être subdivisée en 4 phases qui s'entrecroisent dans le temps : l'hémostase, la phase inflammatoire, la phase proliférative et la phase de remodelage. La durée des processus dépend largement de la taille et du type de plaie. ©Pascal Morissette Martin

L'hémostase

L'hémostase comprend un ensemble de processus cellulaires et moléculaires permettant l'arrêt des saignements dans les minutes qui suivent la lésion. Afin de limiter la perte sanguine, les plaquettes s'agglomèrent au site de la lésion en formant le clou plaquettaire : la première barrière colmatant la fuite sanguine. En parallèle, une cascade enzymatique entraîne la polymérisation de fibrine autour du clou plaquettaire qui complètera le bouchon hémostatique. Ces processus se déroulent de manière rapides et limitées afin de freiner la perte sanguine au maximum tout en empêchant l'obstruction des vaisseaux sanguins (Singer and Clark 1999, Guo and Di Pietro 2010).

La phase inflammatoire

Le début de la phase inflammatoire est caractérisé par le relargage de molécules pro-inflammatoires par les cellules du tissu lésé localisées en périphérie de la plaie, et par les cellules du bouchon hémostatique. Parmi ces médiateurs précoces de l'inflammation, on retrouve le facteur de croissance épidermique (EGF), les TGF- β , les interleukines 1, 6 et 8 (IL-1, IL-6 et IL-8), les PDGF et le bFGF (Guo and Di Pietro 2010). Ces facteurs de croissance jouent également plusieurs autres rôles dans l'activation cellulaire de la phase proliférative (traités dans la section suivante).

Les premières cellules de l'immunité à être recrutées au site de la plaie sont les neutrophiles. Ces leucocytes débutent le nettoyage de la plaie en phagocytant les particules et les bactéries qui s'y retrouvent. Ils y seront pour une durée de 24 à 48 heures. Leur action très agressive produit des protéases et des espèces réactives d'oxygène. Celles-ci réduiront la matrice extracellulaire, déjà brisée, en fragments de plus petites tailles. Ces petits fragments de matrice et les cytokines sécrétées par les neutrophiles, dont le MCP-1, le facteur de nécrose tumorale (tumor necrosis factor- α , TNF- α) et l'IL-1, stimulent l'infiltration de monocytes circulants au site de la plaie (Singer and Clark 1999).

Ces monocytes, une fois activés, deviennent des macrophages qui prennent le relais des neutrophiles dans leur travail de nettoyage. En plus de la phagocytose, leur présence sera essentielle à la régénération tissulaire, que ce soit pour leur rôle de chimioattracteur lymphocytaire ou d'initiateur de la phase proliférative. Ces rôles sont médiés par la sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance tels que le TNF- α , le PDGF, les TGF- β et α , l'IL-1 et l'IGF-1. Les macrophages sont également impliqués dans l'immunité à médiation humorale en présentant des antigènes aux lymphocytes lorsque ceux-ci sont présents au site de la plaie (Singer and Clark 1999).

La phase proliférative

La phase proliférative comprend la migration et la prolifération de divers types cellulaires présents à la marge de la plaie afin de former un tissu cicatriciel. En fonction du compartiment anatomique et des types cellulaires impliqués, trois processus principaux peuvent être définis : la réépithélialisation (migration des kératinocytes vers le centre de la plaie), la formation du tissu de granulation (migration des fibroblastes et des cellules immunitaires dans le lit de la plaie) et l'angiogenèse (migration des cellules endothéliales afin de revasculariser le tissu de granulation).

Une communication entre les macrophages, les neutrophiles, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les kératinocytes est primordiale afin d'assurer la réalisation appropriée de tous les processus impliqués dans la guérison cutanée. Ces cellules, ainsi que les diverses cytokines et facteurs de croissance responsables de leur activation, sont illustrés à la figure 1.6. Ces mitogènes peuvent enclencher la migration, la prolifération ou bien la différenciation des types cellulaires sur lesquels elles agissent. Les fonctions biologiques de ces molécules seront décrites dans les sections suivantes.

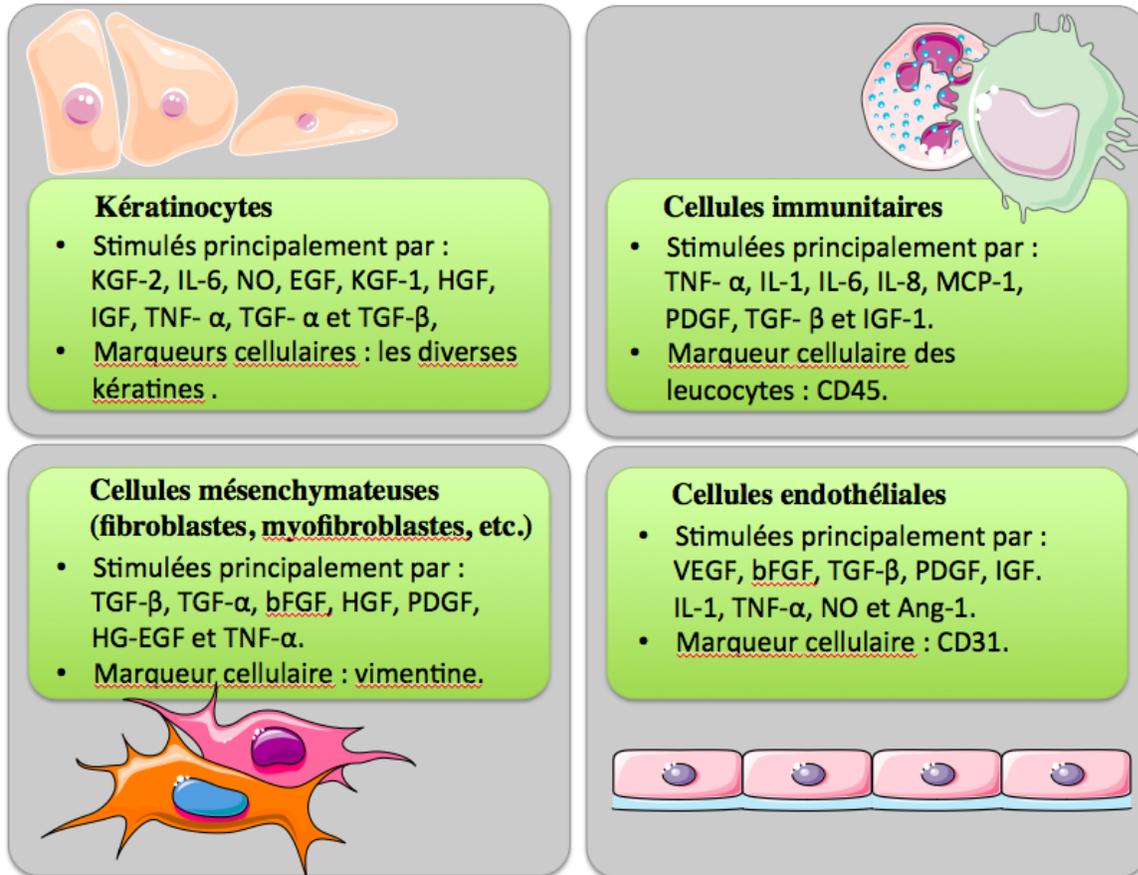


Figure 1.6 Les cellules activées dans les processus de réparation tissulaire cutanée. Montage créé à partir d'images en libre accès provenant de (<http://smart.servier.fr/servier-medical-art> 2014). ©Pascal Morissette Martin

La réépithélialisation

Suite à un bris d'intégrité de la peau en condition de plaies aiguës, l'épiderme tend à se régénérer de manière très efficace. Les cellules responsables de ce processus sont les kératinocytes qui prolifèrent et migrent afin de remplir l'espace sans épiderme (Figure 1.7).

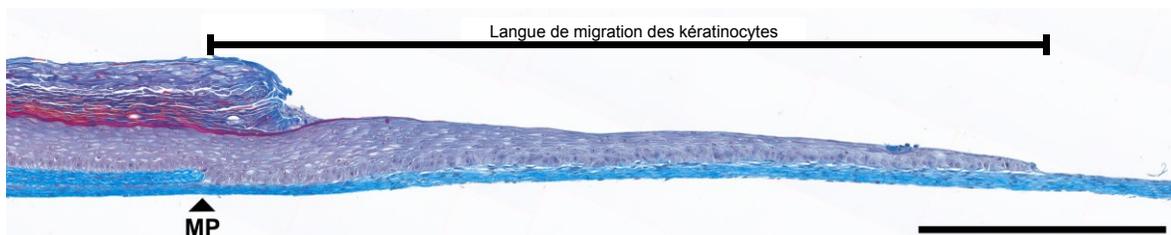


Figure 1.7 La réépithélialisation (aspect histologique). Coloration au trichrome de Masson d'une coupe transversale d'un modèle de plaies *in vitro* démontrant bien la prolifération et la migration des kératinocytes. Les kératinocytes sont colorés en mauves (diverses teintes) et la matrice extracellulaire contenant les fibroblastes dermiques en bleu. Barre de mesure = 500 μm . Abréviation : MP, Marge de la plaie. Tiré de (Labbé 2013).

Plusieurs molécules ont des effets importants sur la prolifération et la migration des kératinocytes. Parmi celles-ci, trois d'entre elles ont été démontrées comme ayant de très forts impacts sur l'activation de la migration et la prolifération des kératinocytes, soit le KGF-2, l'IL-6 et l'oxyde nitrique (NO) (Stallmeyer, Kampfer et al. 1999, Goldman 2004). Il a été proposé que ce serait la sécrétion d'IL-1 et de TNF- α par les macrophages arrivés au site de la plaie qui induirait la production d'IL-6 et de KGF-2 par les fibroblastes dermiques. Une fois activés par ces molécules, les kératinocytes s'impliqueraient eux-mêmes dans une voie de rétroaction positive afin de perpétuer le processus en sécrétant l'IL-6 et le NO (Goldman 2004). D'autres facteurs de croissance produits au site de la lésion permettent également de stimuler les kératinocytes. C'est le cas du EGF, du KGF-1, du HGF, de l'IGF, du TNF- α , du TGF- α , des TGF- β et du facteur de croissance épidermique liant l'héparine (HB-EGF) (Singer and Clark 1999, Goldman 2004, Guo and Dipietro 2010, Nakamura and Mizuno 2010). Il a également été démontré que des molécules, ne possédant classiquement pas de rôle dans les processus de réépithélialisation, pouvaient agir directement sur les kératinocytes. C'est le cas notamment de la leptine (Ring, Scully et al. 2000). En effet, cette hormone sécrétée par les adipocytes matures est reconnue pour avoir des impacts importants au niveau de la prise de nourriture. Son récepteur (ObR) est d'ailleurs exprimé de manière très importante par les cellules de l'hypothalamus, responsable de la satiété. La perte de fonction du récepteur chez des souris transgéniques a permis de découvrir ses nombreux rôles sur le métabolisme de l'organisme. Ces souris diabétiques, communément appelées souris *db/db*, ont d'ailleurs un phénotype de guérison altéré des plaies. L'administration systémique et locale de leptine exogène chez ces animaux rétablit le phénotype de guérison des plaies des animaux non diabétiques (Ring, Scully et al. 2000).

Durant la réépithélialisation, l'expression génique des kératinocytes au pourtour de la plaie est modulée dans le temps. Ces variations d'expression, nécessaires à la régénération et à l'activation des kératinocytes, peuvent être observées dans une zone concentrique de 60 à 80 kératinocytes de distance autour de la plaie. De 8 à 24 heures suivant la lésion, les kératinocytes inter-folliculaires commencent à exprimer les kératines 6 et 16 qui sont absentes des kératinocytes inter-folliculaires dans une peau non lésée. L'expression des kératines 1, 10 et 2 de ces kératinocytes «activés» sera diminuée 48 heures après la lésion (Fuchs and Weber 1994, Usui, Mansbridge et al. 2008). La migration des kératinocytes basaux débute habituellement entre 6 et 24h suivant la lésion. À ce moment, les kératinocytes adjacents aux marges de la plaie perdent leur apparence cuboïde, s'aplatissent et débutent la sécrétion de laminine 332. L'avancée des kératinocytes dans le lit de la plaie forme alors une «langue de migration». Afin de se mouvoir, les kératinocytes de la langue de migration expriment les intégrines $\alpha 3 \beta 1$. Ces intégrines, qui possèdent la capacité de se lier aux

précurseurs de la forme totalement mature de la laminine 332, permettent la migration des kératinocytes vers le centre de la plaie (Laplante, Germain et al. 2001, Usui, Mansbridge et al. 2008).

En plus de cette migration concentrique des kératinocytes basaux, un phénomène de «saute-mouton» (appelé *leap-frog* en anglais) participe à la régénération de l'épiderme. Tout comme les kératinocytes basaux, les kératinocytes suprabasaux s'aplatissent davantage et commencent à proliférer et à migrer. Leur migration s'effectue sur les kératinocytes sous-jacents jusqu'au point où certains d'entre eux «tombent» et se positionnent au-devant des kératinocytes basaux. Ces «nouveaux kératinocytes basaux» se retrouvent donc limitrophes à la marge de la plaie et sécrètent à leur tour de la laminine 332. Ce phénomène de saute-mouton participe donc activement à l'épaississement et à l'élongation de la langue de migration (Laplante, Germain et al. 2001).

La prolifération et la migration des kératinocytes sont également caractérisées par plusieurs phénomènes intracellulaires, tels que l'arrêt de la différenciation verticale des kératinocytes, ainsi que le désassemblage des desmosomes et des hémidesmosomes. Les voies de signalisation, permettant le ré-assemblage de ces structures et permettant de nouveau la différenciation verticale des cellules, seront activées lorsque les kératinocytes s'ancreront de manière permanente à la nouvelle membrane basale formée de laminine 332 et de collagène de type IV (Laplante, Germain et al. 2001).

La formation du tissu de granulation

Le tissu de granulation est le nom donné au tissu conjonctif se formant dans le lit d'une plaie. Dans les cas non pathologiques, les fibroblastes dermiques prolifèrent, migrent et sécrètent une matrice extracellulaire cicatricielle afin de remplir l'espace laissé vacant par la blessure. La réparation du compartiment dermique de la peau fournit également le support adéquat permettant aux kératinocytes de migrer (Singer and Clark 1999). D'autres cellules dermiques résidentes telles que les cellules endothéliales migrent à l'intérieur du tissu de granulation et reforment les capillaires sanguins. Ce processus de néovascularisation, nommé angiogenèse, sera décrit à la section suivante. Les cytokines et les facteurs de croissances libérés au site de la plaie régulent, orchestrent et activent la formation du tissu de granulation.

L'activation des fibroblastes aux marges des plaies est médiée par le PDGF, le TGF- β et le bFGF libérés lors de la dégranulation plaquettaire. Cette libération rapide d'une forte concentration de facteurs de croissance n'est toutefois pas durable dans le temps. C'est donc l'arrivée des macrophages dans la plaie qui va permettre de soutenir de manière plus importante l'activation des fibroblastes grâce à la production continue de TGF- β , de TGF- α , de bFGF, de PDGF, de HB-EGF et de TNF- α . Grâce à tous ces facteurs de croissance,

les fibroblastes se retrouvent sous une forme «activée» où ils se mettent à proliférer, exprimer les intégrines nécessaires à leur déplacement et migrer vers le centre de la plaie (Singer and Clark 1999, Goldman 2004).

Durant les stades précoces de la guérison, les fibroblastes migrent dans la fibrine produite lors de l'hémostase. Afin de pouvoir synthétiser une nouvelle matrice permanente, les fibroblastes doivent dégrader cette matrice temporaire de fibrine qui leur aura permis de se déplacer dans le lit de la plaie. Pour ce faire, les cellules sécrètent la plasmine ainsi que plusieurs métalloprotéinases (MMP), dont les MMP 1, 2, 3 et 13 (respectivement collagénase 1, gélatinase A, stromélysine 1, and collagénase 3) (Singer and Clark 1999). La plasmine et les MMP dégradent en partie la fibrine, le bouchon hémostatique ainsi qu'une partie de matrice extracellulaire saine. La dégradation de glycoaminoglycans contenus dans la matrice libère des facteurs de croissance qui étaient séquestrés par ceux-ci (bFGF, TGF- β et VEGF). Ces facteurs participent au maintien de l'activation des fibroblastes (Volk, Iqbal et al. 2013).

Durant la formation du nouveau stroma, certains fibroblastes se différencient en cellules plus spécialisées pour la guérison tissulaire du compartiment mésenchymateux : les myofibroblastes. La différenciation des fibroblastes en myofibroblastes durant la phase proliférative de la guérison des plaies est régulée d'abord par la présence de tension mécanique au sein de la plaie, puis par la présence conjointe de TGF- β et de fibronectine cellulaire (Desmouliere, Chaponnier et al. 2005, Volk, Iqbal et al. 2013).

Alors que les fibroblastes ont comme objectifs primaires de coloniser la matrice de fibrine et d'y synthétiser quelques composants leur permettant de se mouvoir plus aisément (sécrétion de fibronectine et de vitronectine), les myofibroblastes sont les orchestrateurs principaux du remodelage matriciel (section suivante). Les myofibroblastes, très importants durant la phase proliférative, sont en fait des fibroblastes différenciés qui sont spécialisés dans l'élaboration de la matrice et synthétisent ses principaux composants précoces dont les collagènes de type I et III, la fibronectine et l'acide hyaluronique (Desmouliere, Chaponnier et al. 2005). Leurs effets pro-angiogéniques sur les cellules endothéliales ont également été démontrés (Moulin, Mayrand et al. 2010, Mayrand, Laforce-Lavoie et al. 2012). Ils sont caractérisés par la présence de fibres de stress constituées principalement d' α -actine du muscle lisse (α -sma, pour α -smooth muscle actin). Ces fibres font en sorte que ces cellules sont très contractiles, ce qui permet la légère contraction des plaies observées lors de la phase proliférative de la guérison cutanée humaine (Volk, Iqbal et al. 2013). Malgré leur caractère contractile, les myofibroblastes sont toujours considérés comme des cellules stromales, au même titre que les fibroblastes desquels ils sont différenciés. Ces deux types cellulaires expriment d'ailleurs tous deux la vimentine, un filament intermédiaire exprimé, entre autres, dans les cellules d'origine mésenchymateuse (Touhami, Di Pasquale et al. 2005).

L'angiogenèse

Aussi reconnue sous les noms de néovascularisation ou de revascularisation, l'angiogenèse est l'ensemble des étapes nécessaires à la construction d'un nouveau réseau vasculaire de capillaires dans les tissus lésés afin de promouvoir leur survie. Physiologiquement, elle est indissociable de la formation du tissu de granulation (Singer and Clark 1999).

À la suite d'une lésion, les cellules endothéliales commencent à bourgeonner à partir de capillaires existants non lésés au pourtour de la plaie. La stimulation initiale des cellules endothéliales serait due à l'environnement hypoxique périphérique de la plaie, ainsi qu'à la dégranulation plaquettaire libérant le VEGF, le bFGF et le TGF- β . Un gradient de facteurs de croissance s'établit par la suite par l'entremise de la sécrétion des macrophages et des kératinocytes. Une fois les cellules endothéliales activées (Figure 1.8), celles-ci commencent à dégrader la membrane basale entourant les capillaires afin de permettre leur prolifération et leur migration vers le centre de la plaie. Contrairement aux fibroblastes, cette migration se fait de manière séquentielle : les cellules s'alignent une derrière l'autre afin de former des proto-capillaires. Les cellules endothéliales synthétisent ensuite une membrane basale les entourant et forment des vésicules en leur centre. Ces proto-capillaires peuvent être appelés capillaires lorsqu'ils seront aptes à transporter le sang suite à la formation d'un lumen (Adams and Alitalo 2007).

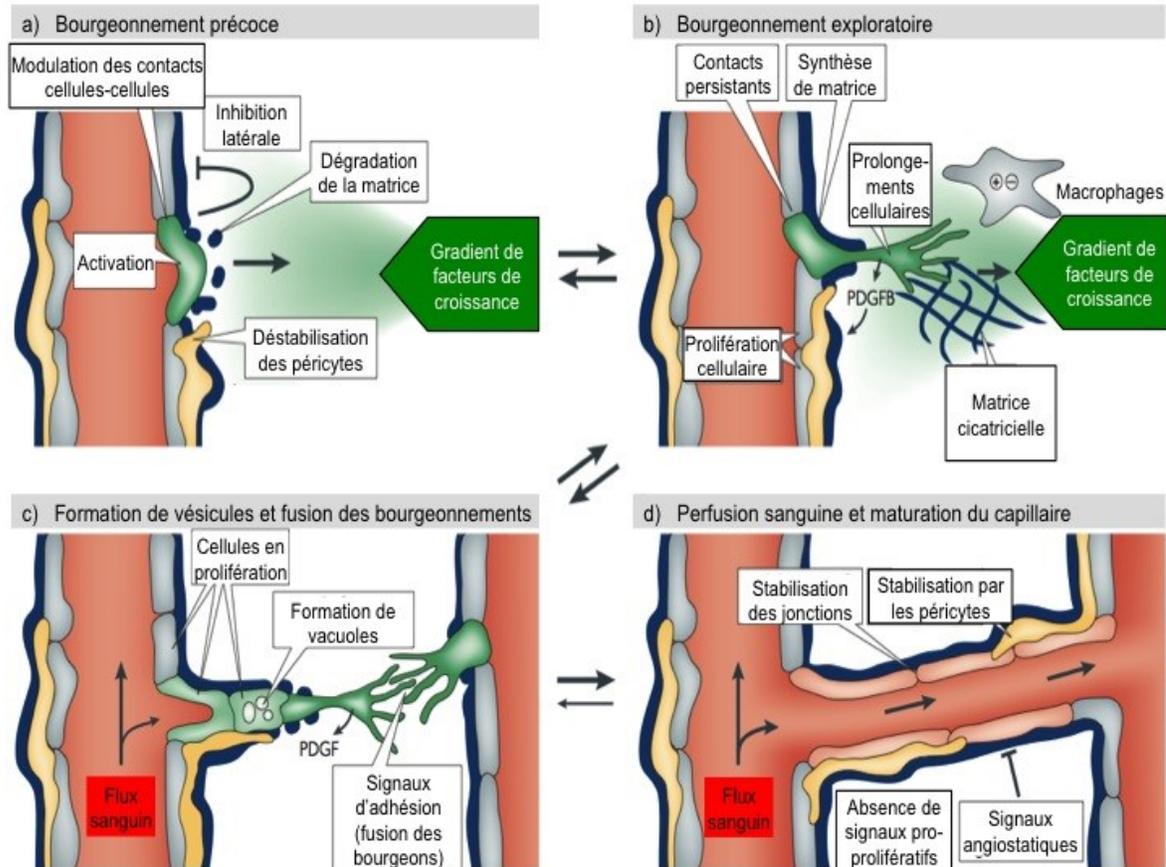


Figure 1.8 Schématisation des étapes importantes de l'angiogenèse. a) Bourgeoisement précoce, b) bourgeoisement exploratoire, c) formation de vésicules et fusion des bourgeoisements et d) perfusion sanguine et maturation du capillaire. En gris, les cellules endothéliales; en jaune, les péricytes; en bleu, la membrane basale; et en vert, les cellules endothéliales participant activement à l'angiogenèse. Modifié et traduit de (Adams and Alitalo 2007).

Bien qu'il soit connu que le VEGF, le bFGF et le TGF- β aient des effets puissants sur les cellules endothéliales, ces facteurs de croissance ne sont pas les seules molécules à propriétés pro-angiogéniques ou angiostatiques (maintien du réseau existant empêchant sa dégradation) au cours de la guérison. Ensemble, les kératinocytes, les macrophages, les fibroblastes et les myofibroblastes sécrètent également un ensemble de facteurs pro-angiogéniques dont le PDGF, l'IGF, l'IL-1, le TNF- α et le NO (Singer and Clark 1999, Goldman 2004). De plus, il a été démontré que les cellules endothéliales possèdent le récepteur de la leptine (ObR) sur leur membrane cytoplasmique, et que la présence de cette molécule pourrait stimuler l'angiogenèse dans certains contextes (Sierra-Honigmann, Nath et al. 1998). En effet, ces conclusions ont pu être tirées d'expériences *in vivo* effectuées chez des rats invalidés ou non pour le récepteur ObR. Il a été démontré qu'une présence accrue de leptine pouvait induire une néovascularisation dans les cornées de rats normaux, alors qu'aucune augmentation de la vascularisation des tissus n'était visible chez des rats

transgéniques invalidés pour ObR. Ces données suggèrent donc que la leptine peut agir de manière directe sur les cellules endothéliales afin de stimuler leur migration, leur prolifération et leur arrangement en capillaires.

La phase de remodelage matriciel

Les myofibroblastes, responsables de la sécrétion de la matrice extracellulaire lors de la phase proliférative, sont également impliquées dans la dégradation des composants matriciels temporaires du tissu de granulation. Les protéines responsables de la dégradation se divisent en deux classes, les protéases (divers types de MMP) et leurs inhibiteurs spécifiques les TIMP (tiré de l'anglais *Tissue Inhibitors of MetalloProteinases*). Ensemble, les MMP et les TIMP forment un système de dégradation efficace s'autorégulant. Vers la fin des processus cicatriciels, les myofibroblastes entrent en apoptose et les processus de guérison se terminent (Desmouliere, Chaponnier et al. 2005).

La phase de remodelage est également caractérisée par une étape «d'élagage» des capillaires. Lors de l'angiogenèse, un nombre très important de capillaires se forme. Ceux-ci ne sont pas tous nécessaires au maintien de l'homéostasie des structures cutanées. La sélection des capillaires à être élagués sera régulée par de nombreux facteurs. D'un côté, le réseau est soutenu par des éléments angiostatiques. L'interrelation entre les ratios angiopoïétine-1/angiopoïétine-2/VEGF et la présence d'une matrice extracellulaire adéquate au support des cellules endothéliales sont des facteurs importants pour le maintien du réseau. La présence de péricytes qui entourent les capillaires de manière discontinue va également participer à la stabilisation vasculaire. Le passage du flux sanguin dans les capillaires est un autre facteur d'importance dans la sélection des structures vasculaires à conserver ou élaguer. Ce dernier crée des forces de cisaillements mécaniques sur les parois internes des cellules endothéliales. Une présence de capillaires superflus dans un réseau entraîne une diminution des forces de friction assez importante. Les cellules endothéliales des capillaires recevant le moins de sang vont alors entrer en apoptose. Un nombre adéquat de capillaires peut ainsi être maintenu en fonction d'un débit sanguin considéré minimal (Adams and Alitalo 2007).

1.2.2 Les plaies chroniques et le cas particulier des plaies diabétiques

Les plaies chroniques sont caractérisées par des processus de régénération tissulaire altérés. Leur étiologie peut être variée : diabète mal contrôlé, cancers (effets directs de la maladie ou effets secondaires des traitements), problèmes d'origines vasculaires, présence d'infections et âge des individus (Mustoe 2004, Fonder, Lazarus et al. 2008). Les ulcères diabétiques, les plaies de pression, les ulcères veineux et les ulcères ischémiques sont les plaies chroniques les plus souvent rencontrées en clinique (Jeffcoate and Harding 2003, Mustoe 2004).

Les plaies chroniques sont l'une des nombreuses complications du diabète. Au cours de leur vie, 15% à 25% des patients diabétiques développeront au moins un ulcère sur un membre inférieur (jambe, pied, etc.) (Figure 1.9) (Fonder, Lazarus et al. 2008). Lorsque l'on rapporte ces chiffres sur l'ensemble de la population, une à deux personnes sur cent développera des ulcères diabétiques ou veineux sur les membres inférieurs de leur corps à un moment de leur vie. Une amputation des membres atteints est même nécessaire dans 15 à 27% des cas. Dans les cas les plus légers, ces amputations se limitent aux orteils, mais elles sont également effectuées au niveau des pieds et des genoux dans les cas plus sévères. Près de la moitié des patients ayant subi une amputation décèdent dans les 3 premières années à la suite de l'intervention chirurgicale (Jeffcoate and Harding 2003).



Figure 1.9 Exemple d'ulcère de pied diabétique. Image tirée de (Jeffcoate and Harding 2003).

Il est bien connu qu'un diabète non traité ou mal contrôlé entraîne une hyperglycémie. Cette hyperglycémie entraîne la réaction de Maillard, nommée également glycation, suspectée comme étant la cause des complications majeures associées au diabète (White, Brody et al. 1971, Hunt, Dean et al. 1988). La glycation est une réaction biochimique non enzymatique en deux étapes. Elle débute par l'ajout spontané de sucres sur des groupes amines libres d'une protéine, soit les groupes amines N-terminaux ou des résidus lysines, sur lesquels s'additionnent d'autres sucres. À la suite de réactions successives spontanées au sein des chaînes glycosylées (déshydratations, condensations, hydrolyses et oxydations), des produits avancés de glycation sont formés (AGE, *Advanced Glycation Endproducts*) (Hunt, Dean et al. 1988). À terme, il a été démontré que les AGE altèrent l'activité biologique des protéines et la présence de ces composés serait la cause des

problèmes vasculaires, néphrologiques et neuropathiques rencontrés chez les gens souffrant de diabète mal contrôlé (Nishino, Horii et al. 1995).

1.2.3 Traitement des plaies chroniques

Plusieurs traitements existent afin de soigner les plaies chroniques. Ceux-ci doivent être adaptés à chaque type de plaie et être modulables en fonction de son évolution dans le temps. Quatre principes généraux régissent le traitement des lésions cutanées. D'abord, l'éradication des infections, par voie locale ou systémique, constitue une étape critique afin de permettre une réparation tissulaire adéquate. Puis, il est important d'élaborer des mécanismes qui permettraient de décharger la zone ulcérée et son pourtour. Par exemple, une lésion plantaire guérira plus facilement si l'on évite d'y mettre du poids. Enfin, les soins directs, tels que la préparation du lit de la plaie ou le choix des pansements qui serviront à le recouvrir, sont des éléments importants afin de favoriser les processus cicatriciels. Finalement, le traitement des problèmes vasculaires, s'il existe, est une des avenues importantes à considérer (Fonder, Lazarus et al. 2008). Le présent ouvrage ne se veut pas un descriptif exhaustif des méthodes de soins des plaies. Néanmoins, une brève description des principaux soins directs aux plaies sera abordée ci-dessous.

La préparation du lit de la plaie est une étape critique à la guérison. L'objectif principal est d'enlever tous les composants pouvant retarder ou empêcher les processus de régénération, tels que les tissus nécrotiques, l'exsudat, les microorganismes et la présence de cellules anormales (Fonder, Lazarus et al. 2008). Pour ce faire, un débridement physique ou chimique de ces composants doit parfois être effectué. Ensuite, l'arsenal de soins cliniques peut compter sur une vaste gamme de pansements traditionnels afin de traiter les divers cas pouvant être rencontrés. Parmi ceux-ci, des gazes imprégnées, des pansements plastifiés semi-occlusifs, des hydrogels, des hydrocolloïdes, des pansements d'alginates et des mousses absorbantes sont tous des éléments utilisés de manières fréquentes (Cherubino, Rubin et al. 2011). À ces soins de première ligne, s'ajoute parfois également l'utilisation de chambre à pression négative. Ces appareils, lorsque disponibles, sont connus pour avoir des effets positifs sur la guérison cutanée (Argenta and Morykwas 1997). Les mécanismes d'action exacts de cette technique sont peu connus, mais les pistes de réponses suggèrent qu'une pression négative pourrait augmenter le flux sanguin, diminuer la colonisation bactérienne, diminuer l'œdème tissulaire et drainer l'excès d'exsudats.

Ces traitements traditionnels n'offrent malheureusement pas le rendement désiré pour le traitement des plaies chroniques. Les processus de réparation tissulaire de ces plaies sont intrinsèquement affectés et ne sont plus en mesure de permettre une fermeture des lésions cutanées, même avec les traitements énumérés ci-dessus. En effet, certains ulcères peuvent subsister durant plusieurs mois, voire des années, malgré une prise en charge clinique (Gottrup, Apelqvist et al. 2013). D'autres avenues issues des biotechnologies, telles

que celles utilisant des pansements biologiques, ont été investiguées afin d'induire la guérison de ces types de plaies.

1.3 Les pansements biologiques, le potentiel des CSTA et l'approche par auto-assemblage

Lorsque les options de traitements plus traditionnelles s'épuisent, des alternatives issues de la biotechnologie (biochimie, biologie moléculaire, cellulaire et tissulaire) peuvent être envisagées. Parmi les méthodes mises au point pour favoriser la cicatrisation cutanée, des pansements biologiques produits en laboratoire à l'aide de techniques de génie tissulaire ont démontré leur efficacité (Shevchenko, James et al. 2010).

1.3.1 Les pansements biologiques

Un pansement biologique est un produit fabriqué à l'aide de techniques d'ingénierie tissulaire, dont le but est d'améliorer les processus cicatriciels de l'hôte. Le domaine des pansements biologiques est en pleine expansion : plusieurs produits issus de ces technologies sont actuellement sur le marché et de nombreuses équipes de recherche s'intéressent à leur développement et leur amélioration.

Ces pansements sont tous constitués d'un échafaudage tridimensionnel dans lequel des cellules peuvent être ensemencées ou non. Diverses stratégies existent afin de produire ces échafaudages et d'y inclure des cellules. Ces matrices peuvent avoir plusieurs origines et être composées de divers biomatériaux. Parmi ceux-ci, il est possible de dénoter des dermes humains ou porcins décellularisés, des gels de protéines matricielles, des polymères issus de procédés chimiques, etc. Malgré le nombre important de méthodes de production, les pansements en développement ou présentement sur le marché peuvent être regroupés en deux grandes catégories en fonction de leur mode d'utilisation. D'abord, il y a ceux décrits comme permanents. Ils sont installés une seule fois dans le lit des plaies et s'intègrent à la peau du patient avec tous leurs composants. Ensuite, il y a ceux qui sont définis comme «temporaires». Contrairement à ce que leur appellation pourrait laisser présager, les pansements biologiques de cette catégorie ne sont pas retirés après leur dépôt dans le lit des plaies. L'appellation « temporaire » s'explique plutôt par le fait que les composants matriciels de ces pansements ont tendance à se dégrader ou à s'incorporer rapidement aux lits des plaies. Le praticien peut alors être amené à appliquer plusieurs pansements de façon consécutive jusqu'à la fermeture complète de la plaie (Shevchenko, James et al. 2010).

Globalement, les modes d'action des pansements biologiques sont peu connus et peuvent varier en fonction du type, de l'architecture et de la méthode d'utilisation des pansements. Toutefois, il est reconnu dans la littérature que le sécrétome des cellules peuplant les divers types de pansements cellularisés serait un des facteurs responsables de leur effet bénéfique. Un rôle est également accordé à la présence d'une matrice extracellulaire où les composants matriciels auraient la particularité de créer des niches propices à l'établissement des cellules de l'hôte (Langer and Rogowski 2009, Shevchenko, James et al. 2010).

Les coûts associés aux développements des technologies, aux essais cliniques requis avant leur commercialisation et à leur méthode de production, font en sorte que les pansements biologiques sont très coûteux. Des études économiques et épidémiologiques ont toutefois démontré que leur utilisation peut être tout de même rentable pour les systèmes de santé (Langer and Rogowski 2009). En effet, lorsqu'ils sont employés afin de stimuler la guérison d'ulcères qui ne répondent pas bien aux traitements conventionnels, les coûts engendrés par l'achat des pansements biologiques sont compensés par plusieurs facteurs. En outre, leur usage est corrélé avec une augmentation des taux de guérison des plaies récalcitrantes, un raccourcissement des temps de traitements et une diminution du nombre de complications (infections, amputations, etc.). Ainsi, des sommes associées aux effectifs humains, aux épisodes d'hospitalisation plus courts (et moins nombreux) sont ainsi épargnées (Langer and Rogowski 2009).

À l'heure actuelle, deux pansements biologiques commercialisés et disponibles sur le marché connaissent un fort succès : les recouvrements biologiques Apligraf® (Falanga and Sabolinski 1999) et Dermagraft® (Marston, Hanft et al. 2003). Apligraf® est présentement le pansement le plus employé en clinique. Il est constitué d'un compartiment dermique (matrice de collagène bovin de type Iensemencé de fibroblastes allogéniques néo-nataux) et d'un compartiment épidermique (kératinocytes néo-nataux ensemencés sur le compartiment dermique). Ce pansement contient donc des composants xénogéniques et des cellules vivantes allogéniques. Des études cliniques ont démontré son efficacité pour le traitement d'ulcères chroniques diabétiques. Étant un des premiers recouvrements biologiques à avoir été mis sur le marché et ayant prouvé son efficacité, il est présentement considéré en tant que standard dans le domaine des pansements permanents. Pour sa part, Dermagraft® est le second recouvrement le plus utilisé. Contrairement à Apligraf®, celui-ci est constitué d'un unique compartiment dermique. Ce compartiment est fait d'une matrice extracellulaire de polyglactine absorbable dans laquelle ont été ensemencés des fibroblastes néo-nataux. Cette matrice, biodégradable, fait de ce substitut un pansement de type «temporaire». Il doit donc être appliqué de manière répétée dans le lit des plaies afin d'en stimuler la guérison. Dermagraft® contient donc des éléments synthétiques et des cellules vivantes allogéniques. Ce substitut s'est également montré efficace dans les soins des ulcères diabétiques.

1.3.2 Le potentiel régénérateur des cellules souches mésenchymateuses et des CSTA

Depuis quelques années, le potentiel de régénération tissulaire des cellules souches mésenchymateuses a été largement rapporté dans la littérature (Teng, Huang et al. 2014). Diverses études ont d'ailleurs démontré que les cellules souches/stromales provenant de la moelle osseuse (Fathke, Wilson et al. 2004, Wu, Chen et al. 2007, Stoff, Rivera et al. 2009), des cordons ombilicaux (Zhang, Hao et al. 2012, Park, Moon et al. 2013), du fluide amniotique (Kim, Zhang et al. 2012, Skardal, Mack et al. 2012) et du tissu adipeux (CSTA) (Kim, Park et al. 2007, Lim and Yoo 2010, Nauta, Seidel et al. 2013) avaient un potentiel probant afin de stimuler les processus de cicatrisation cutanée.

L'intérêt porté aux CSTA provient principalement de leurs effets biologiques bénéfiques sur la guérison cutanée, mais également des avantages pratiques de travailler avec ces cellules (Gimble, Katz et al. 2007). En effet, leur mode de prélèvement, leur grande accessibilité et la possibilité de les extraire du tissu adipeux en grand nombre à partir d'une seule intervention, font en sorte que ces cellules sont prisées dans les études précliniques. Bien que les autres cellules mésenchymateuses citées plus haut possèdent également des propriétés bénéfiques au niveau de la réparation de lésions cutanées, celles-ci ne possèdent pas les trois avantages «pratiques» des CSTA (Gimble, Katz et al. 2007). Par exemple, les cellules souches de la moelle osseuse sont accessibles à partir d'une chirurgie invasive et douloureuse. Les cellules du sang de cordon ou de sa matrice, de même que les cellules souches amniotiques, sont toutes facilement accessibles avec des techniques peu invasives, mais puisque ces tissus sont de petites tailles, le nombre de cellules obtenu pour un seul échantillon est globalement plus faible.

Plusieurs auteurs ont émis les hypothèses que ce serait le sécrétome des CSTA (voir tableau 1.2, section 1.1.5) qui serait responsable des effets bénéfiques observés (Salgado, Reis et al. 2010, Murphy, Moncivais et al. 2013). De nombreuses expérimentations publiées ont confirmé cette hypothèse, et ce, peu importe la manière dont les CSTA ont été employées. Des applications topiques de milieux conditionnés par les CSTA (Chen, Tredget et al. 2008), le dépôt de suspensions cellulaires ou de sphéroïdes dans les plaies (Amos, Kapur et al. 2010), l'injection intradermique de CSTA dans les marges des plaies (Stoff, Rivera et al. 2009, Kim, Zhang et al. 2012) et le dépôt d'un mélange de fibrine et de CSTA frais dans les plaies (Steinberg, Hong et al. 2012) sont toutes des approches qui ont été testées. Il est intéressant de noter que ces approches se sont avérées probantes sur divers aspects de la guérison dans les modèles de plaies qui ont été investigués : plaies incisionnelles (Stoff, Rivera et al. 2009), plaies excisionnelles pleines épaisseurs (Amos, Kapur et al. 2010, Kim, Zhang et al. 2012), des plaies ischémiques (Steinberg, Hong et al. 2012) et des plaies diabétiques

(Amos, Kapur et al. 2010, Kim, Zhang et al. 2012). Ces divers modèles de plaies seront abordés dans la section 1.4.2 et décrits dans le tableau 1.4.

1.3.3 Le potentiel régénérateur des adipocytes

Récemment, un intérêt face aux rôles des adipocytes dans la cicatrisation apparaît dans la littérature. En effet, la découverte des effets bénéfiques potentiels des adipocytes sur les plaies est relativement récente. Bien que peu nombreux, les articles qui s'intéressent à ce sujet proviennent de divers milieux scientifiques. Par exemple, des cliniciens ont dénoté l'amélioration de l'apparence des cicatrices hypertrophiques suite à l'injection sous-cutanée de gras autologue au niveau de la plaie (Klinger, Marazzi et al. 2008). Ces mêmes auteurs ont tenté d'injecter du lipoaspirat autologue sous des ulcères chroniques récalcitrants à la guérison et ont observé la fermeture de toutes les plaies traitées (Klinger, Caviggioli et al. 2010). Par la suite, d'autres études ont confirmé la présence des effets bénéfiques du tissu adipeux sur la réparation tissulaire et ont investigué les processus cicatriciels favorisés par la présence de ces cellules (Sultan, Barr et al. 2012, Loder, Peterson et al. 2014), soit la néo-vascularisation et la formation du tissu de granulation. Ces évidences cliniques ont su démontrer que le tissu adipeux possède un fort potentiel régénérateur. Le tableau 1.1 souligne d'ailleurs de manière détaillée un grand nombre de molécules sécrétées par les adipocytes. Parmi celles-ci, il est possible de remarquer la présence de plusieurs molécules favorisant divers aspects de la phase proliférative de la guérison cutanée.

1.3.4 Les pansements biologiques enrichis en CSTA

Tel que discuté dans la section 1.3.1, les pansements biologiques cellularisés actuellement disponibles en clinique sont enrichis de fibroblastes avec ou sans kératinocytes. À ce jour, aucun pansement commercial ne contient de CSTA. De part leur fort potentiel régénérateur et leurs avantages pratiques importants, plusieurs équipes s'intéressent à la production de substituts biologiques enrichis avec ces cellules.

Ainsi, plusieurs échafaudages produits par génie tissulaire ont été explorés afin de pouvoir administrer les CSTA au site de plaie. Parmi ceux-ci on retrouve, des matrices de collagènes digérées partiellement (Nambu, Ishihara et al. 2007, Nambu, Kishimoto et al. 2009, Nambu, Ishihara et al. 2011), des matrices de fibroïne et de chitosan (Altman, Yan et al. 2009, Altman, Abdul Khalek et al. 2010), des dermes décellularisés (Huang, Hsu et al. 2012), des pansements biologiques décellularisés commerciaux enrichis en CSTA (Meruane, Rojas et al. 2012), des substituts cutanés (Collawn, Banerjee et al. 2012), des microbilles de silicones enrobées d'acide acrylique (Jiang, Qi et al. 2013), des feuillets cellulaires (Lin, Grahovac et al. 2013, Sasagawa, Shimizu et al. 2014, Yu, Tu et al. 2014), des hydrogels mixtes d'acide hyaluronique et de gomme de gellane

(Cerqueira, da Silva et al. 2014), de la tropoélastine électrofilée (Machula, Ensley et al. 2014) et des copolymères de polyhydroxybutyrate et d'hydroxyvalérate (Zonari, Martins et al. 2015).

Étant donné la grande diversité des biomatériaux et des modèles animaux utilisés pour les études de guérisons cutanées, il est difficile de tirer des conclusions générales pouvant s'appliquées à tous les cas répertoriés. Cependant, tous ces substituts ont montré qu'ils pouvaient affecter positivement un ou plusieurs aspects de la guérison dans les modèles d'études *in vivo* sélectionnés. Il est également intéressant de noter que ces échafaudages enrichis de CSTA ont toujours été utilisés de manière permanente dans les études citées : leurs composants xénogéniques s'intègrent donc aux tissus de l'hôte durant la réparation tissulaire.

1.3.5 Les pansements biologiques produits à l'aide de la méthode d'auto-assemblage

Une étude récente effectuée sur une petite cohorte de patients a démontré qu'une méthode de reconstruction tissulaire, dite méthode d'auto-assemblage, pouvait être utilisée afin de fabriquer des substituts cutanés autologues employables en tant que pansements biologiques, et ce, à partir de fibroblastes dermiques (Boa, Cloutier et al. 2013). Cette étude prospective a investigué la guérison de 14 ulcères chroniques de membres inférieurs de cinq patients qui ne répondaient pas à des traitements conventionnels depuis plus de 6 mois. Une série de traitements de 6 à 7 cycles de dépôt de pansements biologiques a contribué à la réparation totale et sans complications de 10 ulcères sur les 14. La réparation complète de deux ulcères supplémentaires fut possible à l'aide de soins traditionnels prodigués à la suite du premier cycle de traitement dans un premier cas, puis à l'aide d'un deuxième cycle d'application des pansements biologiques dans le deuxième cas. Avec un taux de succès de 12 sur 14, et ce, dans des situations de plaies chroniques humaines rencontrées en clinique, la technique d'auto-assemblage semble donc très prometteuse pour le soin des plaies chroniques.

Cette méthode est particulièrement adaptée à la reconstruction de substituts cutanés. Elle permet notamment la production de peaux reconstruites hautement similaires à la peau normale humaine contenant un compartiment dermique et un compartiment épidermique. Leur épiderme pluristratifié exprime l'ensemble des marqueurs de différenciation épidermique et l'on observe la présence de cellules souches épithéliales au niveau de la membrane basale telle qu'observée dans la peau humaine. On observe également la présence d'hémidesmosomes entre le derme et l'épiderme, soit au niveau de la jonction dermo-épidermique. Finalement, des tests ont démontré que la peau reconstruite par auto-assemblage présente les propriétés mécaniques appropriées. Il est donc possible de produire une peau recréant efficacement la fonction de barrière par la présence de son épiderme, offrant une résistance et une élasticité adéquate par la présence de son derme et qui est compatible avec l'ajout d'un hypoderme reconstruit, toujours à partir de la méthode

par auto-assemblage (Michel, L'Heureux et al. 1999, Pouliot, Larouche et al. 2002, Trottier, Marceau-Fortier et al. 2008).

Cette technique d'ingénierie tissulaire permet également la reconstruction d'autres tissus «humains», tels que des vaisseaux sanguins (L'Heureux, Paquet et al. 1998), des cornées (Germain, Auger et al. 1999), du tissu vésical (Magnan, Berthod et al. 2006) et du tissu adipeux (Vermette, Trottier et al. 2007). Pour ce faire, la méthode d'auto-assemblage repose sur la stimulation des cellules humaines extraites et cultivées *in vitro* à produire leur propre matrice extracellulaire à l'aide d'acide ascorbique et de sérum. De cette manière, les cellules mésenchymateuses produisent un environnement tridimensionnel sans avoir recours aux biomatériaux synthétiques ou exogènes. Toutefois, la méthode d'auto-assemblage ne permet pas seulement la reconstruction de pansements biologiques contenant des CSTA, mais elle permet également la reconstruction de tissu adipeux à partir de ces mêmes CSTA. Ces résultats ont été présentés dans des travaux antérieurs de l'équipe de recherche (Vermette, Trottier et al. 2007). Deux types de tissus *in vitro* peuvent donc être produits à partir des CSTA : des tissus contenant des CSTA et d'autres contenant des adipocytes. L'approche par auto-assemblage fut donc sélectionnée afin de produire les pansements biologiques employés au cours des études présentées dans cet ouvrage.

1.4 Modèles d'étude des plaies

Les modèles expérimentaux permettant d'étudier la cicatrisation sont abondants. Ceux-ci ne sont pas tous égaux et ne permettent pas de mettre en lumière et de décortiquer les mêmes phases de la réparation cutanée (l'hémostase, l'inflammation, la prolifération et le remodelage). La pertinence de leur utilisation dépend donc grandement du but et des objectifs visés par les auteurs. Les modèles les plus utilisés peuvent se regrouper en deux groupes, soient les tests *in vitro* ou les tests *in vivo*. Les tests *in vitro*, tel que le «scratch assay», les tests de co-cultures et les cultures organotypiques, permettent habituellement de simplifier, de normaliser et de contrôler plus étroitement les paramètres expérimentaux que les tests *in vivo*. Les seconds, qui comprennent l'utilisation de modèles animaux, permettent généralement d'avoir une meilleure vue d'ensemble des processus, d'étudier les impacts de traitements éventuels sur toutes les phases de la guérison cutanée (en fonction des moments de prélèvements des tissus pour analyses) et de mimer des cas de guérison spécifiques observés chez l'homme.

1.4.1 Les modèles *in vitro*

La stratégie principale derrière la vaste majorité des études *in vitro* est de tirer profit de la capacité des cellules humaines, ou animales, à réagir à divers stimuli dans un contexte *ex vivo*. Elles possèdent comme caractéristiques importantes de simplifier les systèmes d'étude ce qui permet de décortiquer les fondements

biologiques de mécanismes tels que la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire, ainsi que l'activation de voies signalétiques et la communication cellules-cellules. L'usage de cellules ou de tissus d'origine humaine est possible dans le cas des tests *in vitro*, alors que les tests précliniques *in vivo* sont habituellement effectués sur des animaux.

En condition *in vitro*, la culture cellulaire occupe une place prédominante : la culture en monocouche simple ou en co-culture ainsi que la culture d'explants étant largement employées. L'usage des techniques issues de la culture cellulaire et de l'ingénierie tissulaire font en sorte que les études *in vitro* sont moins onéreuses et sont possibles à plus large échelle que les études *in vivo*.

Le «scratch assay»

Les tests de migration cellulaire, dits *scratch assay* en anglais, sont très utilisés lors d'études de biologie cellulaire et moléculaire. Ils sont rapides, relativement peu coûteux et reproductibles s'ils sont effectués correctement. Les étapes de base consistent à faire une "rayure" dans une monocouche de cellules, puis à prendre des photos à intervalles réguliers des cellules qui migrent pour remplir la zone dénudée (Liang, Park et al. 2007). Ce test s'applique seulement aux cellules adhérentes, dont plusieurs cellules de l'épiderme et du derme font parties : fibroblastes dermiques, cellules endothéliales microvasculaires, kératinocytes, myofibroblastes, cellules avec des caractéristiques pathologiques ou non, etc. Ce type de test permet surtout de comprendre les mécanismes cellulaires à l'origine de la migration et de la prolifération cellulaire. Ils constituent l'une des étapes préliminaire permettant d'étudier la phase proliférative de la guérison des plaies en vue d'études plus poussées.

Les tests en co-culture

Des tests de co-culture sans contact permettant d'étudier les influences paracrines (les différents types cellulaires sont séparés à l'aide d'inserts dans des plaques de culture par exemple) ou avec contacts permettant d'étudier les influences juxtacrines (dans le cas où les différents types cellulaires sont ensemencés ensemble dans le même compartiment) peuvent être effectués (Miki, Ono et al. 2012). Les possibilités de devis expérimentaux sont abondantes. Les conditions expérimentales, les types cellulaires utilisés et les analyses effectuées à la suite de ce type d'expérience permettent de mettre en évidence des caractéristiques se produisant durant la phase inflammatoire ou la phase proliférative de la réparation tissulaire. Par exemple, des études en co-culture ont permis de mettre en évidence l'importance de l'état d'hydratation de l'épiderme (mouillé ou sec) sur la sécrétion du collagène par les fibroblastes sous-jacents (Tandara and Mustoe 2011). Cela fut possible à l'aide de la production d'épidermes (issus d'une culture en monocouche de kératinocytes différenciés *in vitro*) à l'intérieur d'insert, puis en mettant les inserts contenant

les épidermes différenciés mouillés (submergés par du milieu de culture) ou secs (non submergés) dans des puits contenant des monocouches de fibroblastes dermiques.

Les techniques organotypiques

À l'opposé des techniques précédentes pour lesquelles les buts recherchés étaient de simplifier les modèles, les techniques organotypiques tentent d'imiter le plus fidèlement possible la complexité des processus en jeu lors de la guérison des plaies *in vivo*. Pour ce faire, des plaies sont effectuées sur deux types de tissus : des tissus natifs excisés et maintenus en culture (Greenwald, Gottlieb et al. 1992) ou des substituts cutanés reconstruits (Maas-Szabowski, Stark et al. 2000, Laplante, Germain et al. 2001, Peramo, Marcelo et al. 2009, Blais, Levesque et al. 2013).

Un inconvénient important de la première stratégie est l'accès à un nombre limité de tissu humain en général. Le faible nombre de réplicats accessible provenant d'un même individu est également problématique : les variabilités interindividuelles diminuent grandement la reproductibilité de ces résultats. De plus, des tissus natifs de grandes tailles sont difficiles à obtenir, ce qui empêche d'obtenir un échantillonnage important. Dans ces circonstances, l'utilisation de substituts cutanés reconstruits en laboratoire devient donc intéressant, puisque leur production en grand nombre est possible. Les techniques d'ingénierie tissulaire ont donc l'avantage d'être statistiquement valides et de permettre l'élaboration de contrôles expérimentaux appropriés.

Même si elles s'en rapprochent, les techniques organotypiques *in vitro* ne reproduisent pas à la perfection les plaies *in vivo*. La composante immunitaire y fait souvent défaut. Il est également légitime de penser que l'expansion cellulaire *in vitro*, le nombre de passages des cellules, la congélation des cellules et le type de matrice extracellulaire utilisés pourraient avoir un impact sur les modèles d'études *in vitro*, et que cela pourrait affecter la capacité des tissus à imiter la cicatrisation *in vivo*. En dépit de ces inconvénients, les avantages découlant de leur utilisation en font des techniques intéressantes qui permettent de vérifier l'impact de divers produits sur la guérison cutanée, et ce, surtout au niveau de la réépithélialisation. Ces tests permettent à la fois de décortiquer les processus moléculaires et cellulaires en jeu lors de la guérison et de justifier la réalisation d'études animales plus élaborées et beaucoup plus coûteuses.

1.4.2 Les modèles animaux

À l'image des techniques *in vitro* organotypiques, la majorité des modèles animaux ont comme objectif d'imiter les processus cicatriciels des plaies humaines avec le plus de fidélité possible. Pour ce faire, divers types de lésions cutanées peuvent être reproduites sur des animaux. C'est le cas de certaines interventions chirurgicales (incisions ou excisions de la peau), de certains traumatismes, de blessures thermiques (brûlures ou

engelures à divers degrés), de brûlures chimiques ou bien de blessures induites suite à une irradiation de la peau (Davidson 1998).

Plusieurs de ces lésions sont effectuées dans des modèles qui tentent de simuler des situations cliniques observées pour lesquelles les plaies sont sujettes à des complications: présence d'infections, d'ulcérations et d'ischémie. En effet, l'inoculation de pathogènes connus au sein de plaies, l'utilisation d'animaux diabétiques, ou ayant subi des traitements de chimiothérapie, d'irradiations et l'obstruction de vaisseaux sanguins irriguants un site anatomique précis sont tous des exemples de méthodes permettant d'étudier la cicatrisation dans les contextes de plaies chroniques (Davidson 1998).

Les animaux utilisés

Tel qu'abordé à la section 1.1.7, certains mammifères tels que les rongeurs ont une peau non adhérente, tandis que d'autres espèces comme les humains ont une peau bien adhérente au fascia et aux tissus sous-jacents. Ce paramètre est particulièrement important lors de la sélection d'un modèle animal (Davidson, Yu et al. 2013).

Les lésions cutanées des mammifères à peaux adhérentes tendent à guérir majoritairement à l'aide de mécanismes au cours desquels la migration cellulaire est nécessaire. Cela n'est pas le cas chez les mammifères à peaux non adhérentes où la grande majorité de la fermeture des plaies est due à une forte contraction de la peau. Cette contraction de la peau est observable macroscopiquement par le rapprochement des marges de la plaie. Afin de se retrouver dans une situation où une translation des résultats expérimentaux vers la clinique humaine est possible, la contraction des plaies doit être bloquée ou du moins limitée (Davidson, Yu et al. 2013).

Les animaux les plus utilisés dans les études animales sont les porcs, les lagomorphes (lapins et lièvres) et les rongeurs (rats et souris). De par sa peau adhérente structurellement très similaire à la peau humaine, le porc est l'animal chez lequel les plaies sont les plus semblables à celles observées chez l'être humain. Cependant, peu d'études animales ont recours à ces animaux, et ce, pour des raisons d'ordre pratique. En effet, les coûts d'achat, la difficulté d'approvisionnement, les coûts d'hébergement, les effectifs humains requis pour leur élevage et la présence d'installations adaptées aux grands animaux sont des éléments limitant leur usage (Davidson 1998). Ensuite, les modèles de plaies de lapin sont souvent utilisées dans le domaine. Bien que le corps des lagomorphes soit recouvert de peau non adhérente, leurs oreilles sont dépourvues de *panculus carnosus* et les plaies qui y sont effectuées ne guérissent pas par contraction (Ahn and Mustoe 1990). Leurs oreilles étant d'une bonne superficie, il est possible d'y faire plusieurs plaies. Des

études avec de nombreux réplicats par groupes expérimentaux sont donc possibles à l'aide de ces animaux (Ahn and Mustoe 1990, Davidson, Yu et al. 2013).

Les rongeurs

Les rongeurs tels que les rats et les souris sont parmi les animaux les plus utilisés en laboratoire dans le domaine de la guérison cutanée. Plusieurs stratégies existent afin de limiter ou d'éviter totalement la contraction de leur peau. Ne pouvant se contracter, les plaies tendent à guérir par prolifération et migration cellulaire, ce qui les rapproche énormément de la guérison des plaies observée chez l'humain. Le tableau 1.4 regroupe les modèles les plus utilisés permettant d'atteindre ce but.

Tableau 1.4 Exemples de modèles d'étude des plaies chez les rongeurs *in vivo*

Type de plaies	Description	Avantages	Inconvénients	Source
Excisions cutanées crâniennes	Une plaie pleine épaisseur (se rendant jusqu'au périoste crânien) est effectuée sur le dessus de la tête de la souris ou du rat.	Effectuées de cette manière, les plaies ne sont pas contractiles.	Migration des cellules sur un substrat rigide. Superficie limitée.	(Kim, Mogford et al. 2001)
Excisions cutanées caudales	Une plaie sur la face dorsale de la queue des rats/souris où l'épiderme et le derme sont enlevés sur une longueur de 2 à 3 centimètres.	La peau recouvrant la queue des rongeurs est adhérente et ne guérit pas par contraction.	Migration des cellules sur un substrat rigide. Superficie limitée.	(Falanga, Schroyer et al. 2004)
Excisions cutanées dorsales avec extenseurs en silicone (externes)	Deux à quatre plaies pleines épaisseurs (se rendant jusqu'au muscle sous-jacent) sont effectuées sur le dos de rat ou de souris. Ensuite, des extenseurs de silicones sont collés et suturés sur le pourtour des plaies. (Voir Figure 1.10)	La présence des extenseurs de silicone empêche la contraction des plaies. Celles-ci guérissent ainsi par migration cellulaire.	Afin d'éviter le décollement des extenseurs à long terme, des réajustements en cours d'expérience (nouvelles sutures) sont souvent nécessaires.	(Galiano, Michaels et al. 2004)
Excisions cutanées dorsales avec extenseurs en silicones (internes)	Des extenseurs de silicones sont insérés sous la peau par une incision faite sur le dos des rongeurs. Une fois les extenseurs sous-cutanés suturés, deux plaies pleines épaisseurs (se rendant jusqu'au muscle sous-jacent) sont effectuées en leur centre.	La présence des extenseurs de silicone empêche la contraction des plaies. Les extenseurs internes sont plus durables dans le temps que les extenseurs externes.	Procédure plus complexe et plus invasive pour les animaux. Effets sous-cutanés des extenseurs non connus sur la cicatrisation.	(Ren, Zhou et al. 2012)
Excisions cutanées dorsales avec extenseurs métalliques	Une plaie pleine épaisseur est effectuée sur le dessus de la tête de la souris ou du rat.	Effectuées de cette manière, les plaies ne sont pas contractiles.	Migration des cellules sur un substrat rigide. Superficie limitée.	(Kim, Mogford et al. 2001)

Ischémie dorsale	Une plaie où l'épiderme et/ou le derme sont enlevés sur une longueur de 2 à 3 centimètres (sur la face dorsale de la queue).	La peau recouvrant la queue des souris et des rats est adhérente et ne guérit pas par contraction.	Migration des cellules sur un substrat rigide. Superficie limitée.	(Falanga, Schrayner et al. 2004)
------------------	--	--	--	----------------------------------

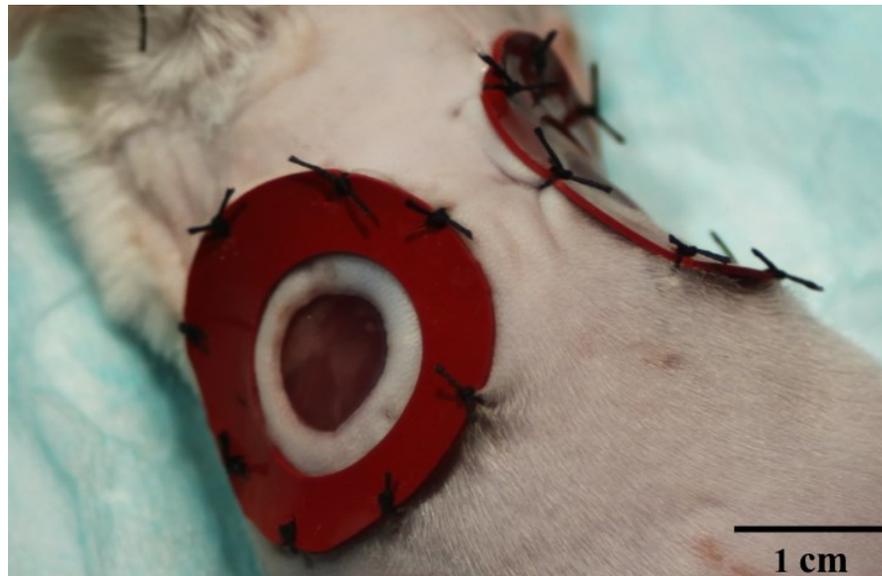


Figure 1.10 Excisions cutanées dorsales avec extenseurs en silicone (externes). En orange, il est possible de voir les deux extenseurs de silicone. Ceux-ci sont collés et suturés sur la peau de la souris. Ce modèle fut retenu pour effectuer les études de guérison cutanée du présent ouvrage. ©Pascal Morissette Martin

Les rongeurs, et plus précisément les souris, offrent de nombreux avantages pour les études de la cicatrisation des plaies. L'accessibilité à une vaste gamme de souris transgéniques est un des avantages principaux de travailler avec ces animaux. Ces modèles de souris transgéniques ont joué un rôle crucial dans la découverte ou la confirmation *in vivo* des effets de plusieurs agents mitogènes sur la guérison des plaies. Ce fut le cas pour le KGF en utilisant des souris invalidées pour ce facteur de croissance (Guo, Degenstein et al. 1996). D'autres facteurs tels que le coût relativement bas de ces expériences et la possibilité d'effectuer des expériences statistiquement valides grâce à un nombre élevé de plaies, encouragent l'usage des modèles d'étude murins.

Bref, les modèles animaux sont des outils inestimables afin de comprendre la biologie moléculaire, cellulaire et tissulaire de la cicatrisation. Malgré le nombre élevé de similitudes entre les plaies observées chez l'animal et celles observées chez l'homme, des différences sont tout de même dénotées au niveau de l'architecture, de la fonction du système immunitaire, de la physiologie, et des mécanismes assurant la guérison cutanée.

Ces modèles, incontournables lors de la réalisation d'études précliniques, ne peuvent remplacer la réalisation d'études cliniques extensives effectuées chez l'homme (Davidson 1998).

1.5 Problématiques et objectifs spécifiques

Dans un contexte de population vieillissante où la prévalence du diabète et de ses complications ne cessent d'augmenter, les plaies chroniques récalcitrantes aux traitements traditionnels sont un enjeu majeur pour le système de santé. Les pansements biologiques disponibles commercialement, bien que fonctionnels, ne sont pas optimaux dans leur état actuel. En effet, ceux-ci sont souvent construits avec des biomatériaux exogènes non humains et sont intégrés dans les tissus des patients.

La méthode de production que nous proposons, c'est-à-dire une production de pansements biologiques avec la méthode d'auto-assemblage et à partir de CSTA, nous semble très prometteuse. Elle permet la production de tissu reconstruit exempt de biomatériaux exogènes, tout en substituant les fibroblastes dermiques par les CSTA. Cette substitution donne l'avantage d'utiliser un type cellulaire possédant des caractéristiques intéressantes en médecine régénératrice, que ce soit au niveau de leur capacité à stimuler les mécanismes prolifératifs de la guérison des plaies, qu'au niveau de leur accessibilité et de leur grande biodisponibilité (voir section 1.3.2). De plus, l'utilisation des CSTA possède également un avantage supplémentaire : elle permet la différenciation des CSTA en adipocytes au sein des pansements biologiques. Deux types de tissus peuvent ainsi être reconstruits. D'une part, des tissus de type conjonctif (contenant des cellules souches, des cellules stromales et une matrice extracellulaire tridimensionnelle humaine) et des tissus de type adipeux (contenant des adipocytes matures, des cellules stromales et une matrice extracellulaire tridimensionnelle humaine). La différenciation des CSTA en adipocytes s'avère très intéressante étant donné que leurs effets sur la guérison des plaies sont très peu étudiés dans la littérature scientifique actuelle. De plus, aucune étude se penchant sur les capacités régénératrices de pansements biologiques contenant des adipocytes n'a été effectuée à ce jour.

Ces deux types de tissus, soit ceux de type conjonctif (contenant des CSTA non-différenciées et une matrice extracellulaire riche en collagènes) ou ceux de type adipeux (contenant des adipocytes, des CSTA non différenciées et une matrice extracellulaire riche en collagènes), ont été employés en tant que pansements biologiques. À la lumière du sécrétome de ces deux types cellulaires (tableaux 1.2 et 1.3), de la littérature actuelle sur les CSTA et du succès des pansements produits par la méthode d'auto-assemblage, notre hypothèse est que les deux types de pansements biologiques que nous avons produits auront des effets

bénéfiques sur les processus cicatriciels.

Le modèle d'étude de plaies sélectionné afin de vérifier les impacts des pansements conjonctifs et adipeux a été le modèle de plaies pleines épaisseurs avec extenseurs externes en silicone sur des souris. Ce modèle a été choisi puisqu'il limite grandement la contraction de la peau murine, qu'il est reproductible et que la réalisation des chirurgies nécessaires à l'installation des extenseurs de silicone est facile. Des modifications au modèle original furent toutefois nécessaires, afin de le rendre compatible avec notre devis expérimental. En effet, les pansements conjonctifs et adipeux ont été utilisés de manière temporaire et sans qu'ils ne soient incorporés dans les tissus de l'hôte lors de la guérison *in vivo*. Pour y parvenir, ces derniers ont été changés à intervalles réguliers durant les expériences animales. Les pansements usagés étaient retirés du lit des plaies tous les trois jours, puis des pansements y étaient installés de nouveau.

Le **premier objectif** poursuivi a été de déterminer la fréquence optimale de changements de pansements dans le modèle. Pour ce faire, un environnement *in vitro* mimant le contact avec l'air auquel les pansements sont confrontés une fois sur les souris a été mis en place.

Le **second objectif** a été de vérifier le potentiel de régénération des deux types de pansements sur tous les mécanismes de la phase proliférative de la réparation tissulaire (réépithélialisation, formation du tissu de granulation et angiogenèse). Le suivi de la réépithélialisation des plaies dans le temps a été possible grâce à l'utilisation d'une souris transgénique possédant un épiderme fluorescent. Cette méthode d'analyse est une première dans la littérature actuelle. Elle répond même à un problème actuel dans le suivi des plaies, puisqu'il y est très difficile d'imager spécifiquement la réépithélialisation en évitant de sacrifier des animaux. Grâce à un appareil d'imagerie macroscopique de la fluorescence, le suivi des langues de migration des kératinocytes est possible, et ce, sans avoir recouru aux sacrifices d'animaux. Pour leur part, la formation du tissu de granulation et l'angiogenèse ont pu être évaluées à la fin de la guérison, au moment où les plaies ont été prélevées pour réaliser les analyses histologiques.

Les impacts potentiels de tels pansements biologiques ouvrent la voie à une nouvelle avenue permettant de stimuler la guérison endogène des plaies. Dans une optique thérapeutique à moyen terme, ils représentent donc un espoir de développement d'outil supplémentaire adapté et efficace pour le traitement de plaies récalcitrantes à la guérison.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

2.1 Production de pansements biologiques humains

Dans cette étude, des tissus adipeux reconstruits (TAR) et des tissus conjonctifs reconstruits (TCR) ont été produits par la méthode d'auto-assemblage (publiée dans Vermette et al. 2007 et détaillée dans Labbé et al. 2011). Cette méthode, optimisée pour la production de tissus de 9,6 cm² (l'intérieur d'un puits d'une plaque de culture de 6 puits), a dû être légèrement adaptée afin de produire des tissus de 3,8 cm² (l'intérieur d'un puits d'une plaque de culture de 12 puits) qui étaient nécessaires pour une utilisation *in vivo*. La figure 2.1 représente schématiquement toutes les étapes nécessaires à leur production.

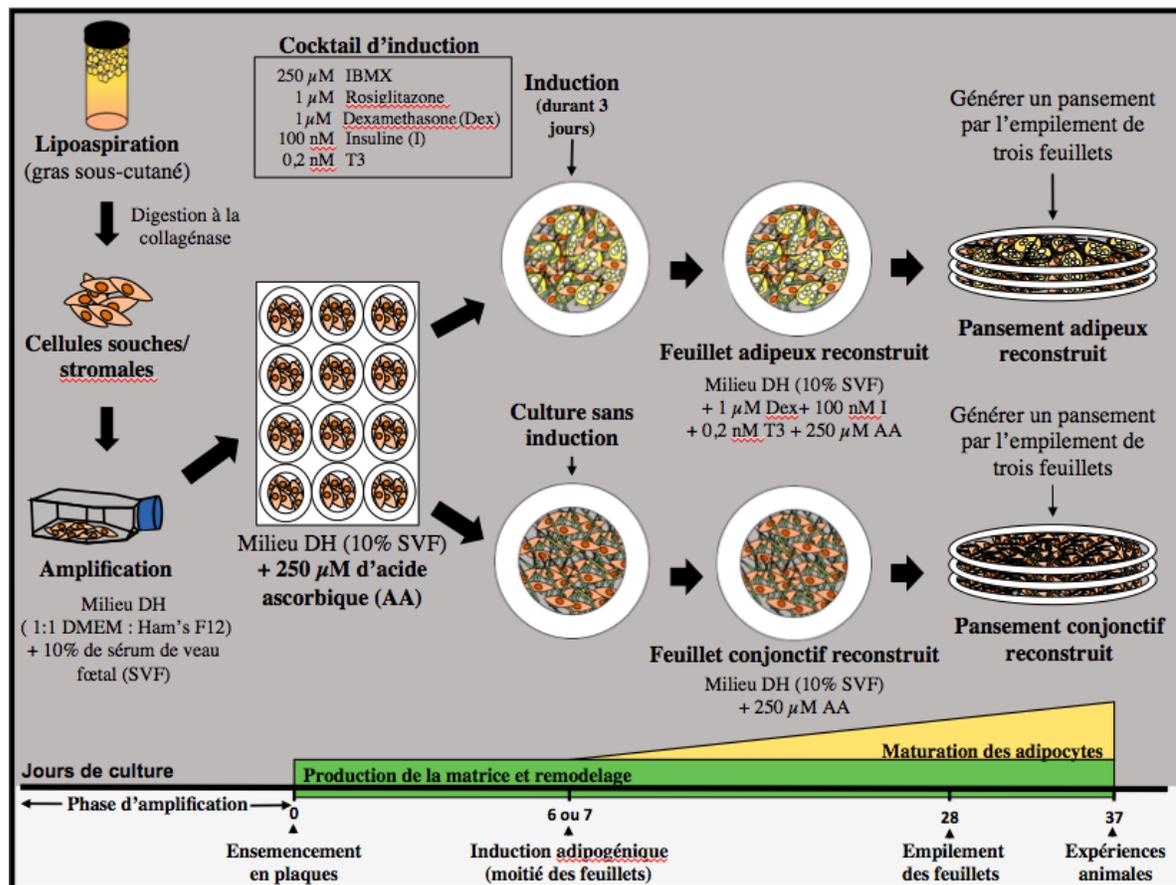


Figure 2.1 Étapes de production des pansements biologiques. Modifié et adapté de (Aubin, Vincent et al. 2014).

Les populations cellulaires utilisées pour la production des tissus proviennent de la banque de cellules humaines congelées de l'équipe de Dre Fradette. Cette banque de cellules a été créée avec le consentement des donateurs et avec l'approbation du comité d'éthique humaine du centre de recherche du CHU de Québec. Les deux populations cellulaires utilisées ont été extraites de tissus adipeux sous-cutanés de femmes âgées de 35 et de 38 ans. Ces deux patientes avaient un indice de masse corporelle de 21 kg/cm² et de 29,5 kg/cm² respectivement. Afin d'extraire les CSTA de lipoaspirations, celles-ci ont été soumises à des digestions enzymatiques (collagénase et trypsine), ainsi qu'à des étapes de filtrations et de centrifugations. Une fois les cellules obtenues, elles ont étéensemencées à une densité de 6,7 à 8x10⁴ cellules par cm² dans des flacons de type Nunc (Thermo scientific, Ottawa, ON, Canada). Après 7 jours de culture, les CSTA ont été dissociées des flacons, congelées à passage (P) 0 et conservées dans l'azote liquide jusqu'à leur utilisation.

Puisque les cellules utilisées proviennent d'une banque cellulaire préétablie, la production des TAR et des TCR débute donc par la décongélation des CSTA, suivie de leur ensemencement dans des flacons de 25 ou 75 cm² de type Nunc. À ce moment, les cellules sont cultivées dans un milieu d'expansion constitué de milieu DH (*Dulbecco's modified Eagle's medium* et *Ham's F12 medium* dans des proportions 1 : 1, Invitrogen, Burlington, ON, Canada) qui est complété avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF; HyClone Laboratories, Logan, UT, USA), 100 UI/mL de pénicilline G (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) et 25 µg/mL de gentamicine (Sigma-Aldrich). Lorsqu'un nombre adéquat de cellules était obtenu, celles-ci étaientensemencées à une densité de 2,34 -3,15 x 10⁴ cellules/cm² dans des plaques 12 puits (Becton Dickinson Labware, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) dans lesquels des ancrages en papier (papier-filtre Whatman®, GE Healthcare, Ottawa, ON, Canada) y avaient été préalablement déposés.

Les puits dédiés à la production de TCR ont reçu du milieu DH complet supplémenté avec une solution d'acide ascorbique fraîchement préparée (Sigma-Aldrich) à une concentration de 50 µg/mL, et ce, à partir de la date de l'ensemencement jusqu'à leur utilisation *in vivo*. Afin d'induire la différenciation des CSTA en adipocytes et de produire des TAR, les autres puits ont reçu du milieu d'induction 6 jours après l'ensemencement des cellules en plaque. Trois jours plus tard, ce milieu a été enlevé et remplacé par un milieu de maintien adipogénique. Ces deux milieux ont été décrits précédemment dans (Labbe, Marceau-Fortier et al. 2011). Vingt-quatre jours après l'ensemencement des cellules et 18 jours après l'induction de la différenciation des cellules en adipocytes, les feuillets cellulaires produits ont été levés et empilés par paquet de trois afin de produire des TCR et des TAR respectivement. Ces tissus reconstruits ont par la suite été maintenus en culture dans leurs milieux respectifs. Les TCR et les TAR ont été utilisés respectivement en tant que pansements conjonctifs et pansements adipeux dans les expériences *in vivo*.

2.2 Chirurgies et expériences animales

Les souris utilisées pour les expériences animales ont été des souris transgéniques K14-H2B-GFP. Celle-ci ont la particularité de posséder un épiderme fluorescent (Rendl, Polak et al. 2008), puisqu'elles expriment la protéine fluorescente verte (GFP pour *Green Fluorescent Protein*) conjuguée à l'histone 2B (H2B) sous le contrôle du promoteur de la kératine 14 (K14). Ainsi, toutes les cellules de leur organisme exprimant la K14, comme les kératinocytes, émettent une fluorescence verte lorsqu'éclairées par une lumière UV. Une colonie de ces souris transgéniques a été établie à l'animalerie du centre d'organogenèse expérimentale de l'Université Laval / LOEX. Les souris fondatrices de cette colonie ont été gracieusement données par le laboratoire de la Dre Elaine Fuchs (Rockefeller University, New York City, NY, USA). Toutes les procédures impliquant la création de la colonie, ainsi que les expérimentations animales subséquentes, ont été approuvées par les comités d'éthique animale du CHU de Québec et de l'Université Laval.

Afin de vérifier les impacts des deux types de pansements biologiques sur des plaies cutanées murines, trois groupes expérimentaux ont été étudiés. Le premier groupe, servant de contrôle négatif, ne reçut aucun pansement. Les deuxième et troisième groupes ont reçu respectivement des pansements adipeux et des pansements conjonctifs. Le modèle choisi afin d'effectuer les expériences de guérison cutanée a été le modèle publié par le Dr Galiano en 2004 (Galiano, Michaels et al. 2004). Des modifications importantes ont cependant été apportées à ce modèle afin de le rendre compatible avec un retrait fréquent des pansements. Les étapes nécessaires pour obtenir le modèle de plaies pleines épaisseurs avec extenseurs en silicone sont représentées à la figure 2.2 A, tandis que les modifications apportées à ce modèle sont représentées en B et en D.

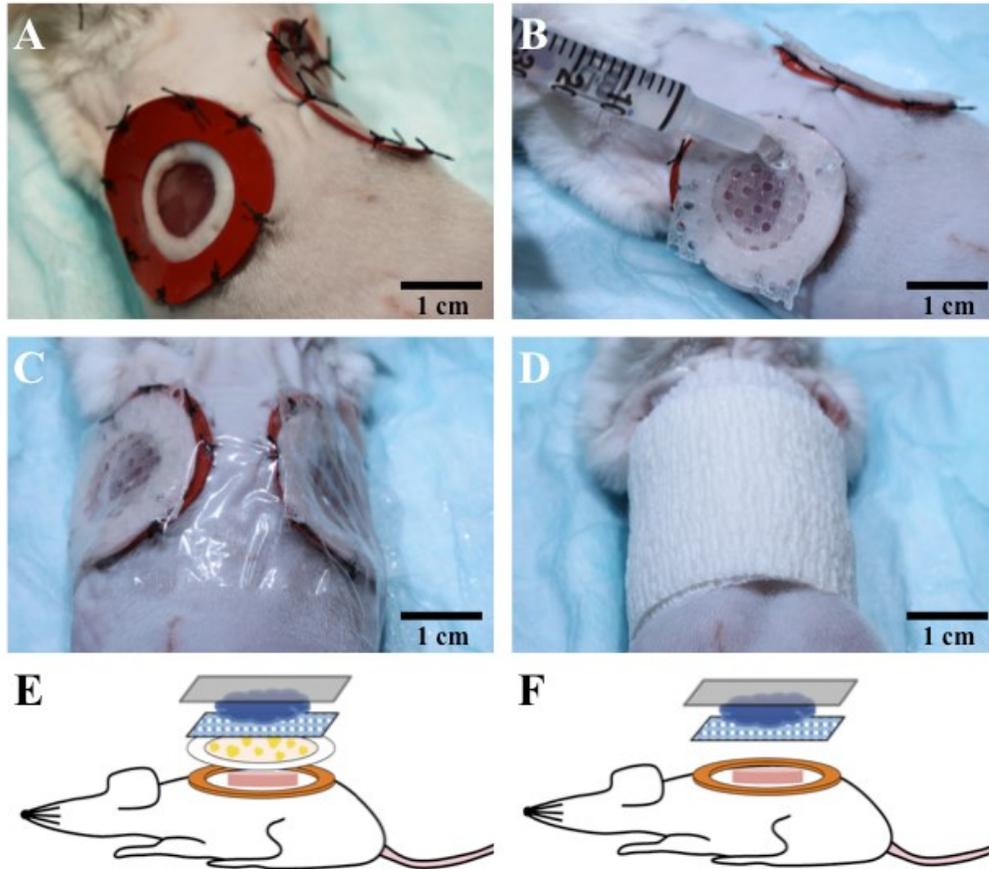


Figure 2.2 Dépôts des pansements biologiques sur les plaies. A) Plaies dénudées avec extenseurs en silicone; B) Dépôt du pansement biologique dans le lit de la plaie, puis ajout du treillis siliconé atraumatique et de l'hydrogel salin isotonique; C) Ajout d'une pellicule transparente semi-occlusive; D) Ajout d'un bandage cohésif enrobant le montage sous-jacent afin de le sécuriser; E) représentation schématique pour les groupes ayant reçu des pansements; F) représentation schématique pour le groupe contrôle sans pansement biologique. Note : Afin d'augmenter la clarté des schémas, le bandage cohésif a été omis en E) et en F).
©Pascal Morissette Martin

Les animaux ont été anesthésiés, rasés et dépilés un à deux jours avant la journée des chirurgies. À ce moment, deux plaies ont été réalisées de part et d'autre de la colonne vertébrale des souris. Ces plaies pleines épaisseurs se rendaient jusqu'au muscle et ont été effectuées à l'aide d'un échantillonneur cutané de 8 mm de diamètre. Le *panculus carnosus* a également été retiré. Par la suite, des extenseurs en silicone ont été sécurisés sur le pourtour des plaies, et ce, à l'aide de colle chirurgicale (Dermabond advanced™, Ethicon, Johnson & Johnson Medical, Markham, ON, Canada) et de huit points de suture (fils de soie 6-0, Ethicon, Johnson & Johnson Medical). Ces extenseurs, d'un diamètre interne de 13 mm, avaient préalablement été découpés à partir de feuilles de silicone de grade médical d'une épaisseur de 0,5 mm (Grace Bio-Labs, Bend, OR, USA), puis avaient été stérilisés à l'autoclave.

À la figure 2.2 B à F, il est possible de voir les diverses étapes du montage qui permet de rendre le modèle compatible avec des changements fréquents des pansements. Pour ce faire, des éléments ont dû être ajoutés sur le dessus des pansements biologiques. Ceux-ci étaient eux-mêmes déposés dans le lit des plaies (Figure 2.2 E). Dans le groupe sans pansement, les éléments étaient ajoutés directement dans le lit des plaies (Figure 2.2 F). La première composante est un carré de 1 cm² d'un treillis siliconé atraumatique pour les plaies (Mepitel®, Mölnlycke Health Care, Oakville, ON, Canada) qui est ajouté sur le dessus des pansements biologiques. Ce treillis a la particularité de ne pas adhérer aux surfaces avec lesquelles il est en contact lorsque celles-ci sont humides. Ainsi, c'est ce treillis qui permet d'enlever les couches subjacentes sans arracher les pansements biologiques (qui doivent par la suite être enlevés très délicatement) et donc sans endommager les langues de migration lors du retrait de ces pansements. La seconde modification apportée au modèle présenté dans la littérature est l'ajout d'environ 0,1 mL d'un hydrogel salin isotonique sans composés actifs (Normlge®l®, Mölnlycke Health Care). Celui-ci permet de conserver une certaine humidité au niveau des pansements et des plaies. Ensuite, un film transparent semi-occlusif (Tegaderm™ transparent film, 3M, London, ON, Canada), qui participe également à conserver le montage humide, est taillé et déposé sur le dessus de l'hydrogel. Pour éviter que les souris n'endommagent les films transparents semi-occlusifs et les montages sous-jacents lorsqu'elles sont retournées dans leur cage, une mince couche de bandage cohésif (AMD Ritmed, Lachine, QC, Canada) est enroulée autour de leur corps (Figure 2.2 D). Ces bandages cohésifs sont installés de façon à ce que les animaux puissent se mouvoir avec facilité dans leur cage.

Lors des expériences animales, les 21 souris utilisées K14-H2B-GFP étaient âgées de 18 semaines et elles ont été divisées en deux cohortes (11 souris femelles et 10 souris mâles). La figure 2.3 représente une ligne du temps des deux expériences animales réalisées.

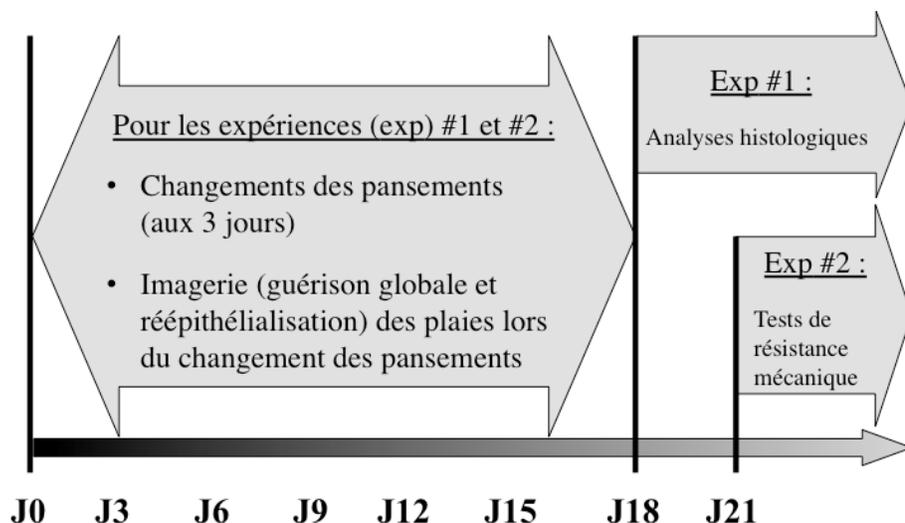


Figure 2.3 Ligne du temps des expériences animales. Le jour 0 représente le jour de la chirurgie et le premier jour où les plaies ont reçu des pansements. Exp #1 : n = 6 (pansements adipeux), n = 2 à 6 en fonction des jours d'analyses (pansements conjonctifs), n = 8 (plaies sans pansements). Exp #2 : n = 6 (pansements adipeux), n = 6 (pansements conjonctifs), n = 8 ou 10 en fonction des jours d'analyses (plaies sans pansements). ©Pascal Morissette Martin

Dans les deux cohortes, et donc pour les 42 plaies, les cinétiques de guérison ont été étudiées jusqu'au jour du sacrifice des souris. Les méthodes utilisées pour ce suivi sont décrites dans la section 2.3. Vers la fin de la guérison (fermeture des plaies macroscopiques près de 90-95%), les tissus cicatriciels ont été prélevés et analysés. Dans la première expérience, soit celle comprenant les 10 souris mâles, les tissus cicatriciels ont été prélevés au 18^{ème} jour et ont été analysés à l'aide de diverses méthodes histologiques, décrites dans la section 2.4. Pour la seconde cohorte, soit celle utilisant les 11 souris femelles, les tissus ont été prélevés au 21^{ème} jour. Ceux-ci ont été utilisés afin de réaliser des tests de résistance mécanique. Ces tests seront détaillés dans la section 2.6. Pour les deux cohortes, le dernier jour où les plaies ont reçu un nouveau pansement a été le 15^{ème} jour. Toutes les plaies des groupes traités ont donc reçu des pansements pour une durée totale de 18 jours.

2.3 Cinétiques de guérison et de réépithélialisation

Tel qu'illustré à la figure 2.2, les pansements biologiques étaient changés tous les trois jours pendant une période totale de 18 jours. À ces moments, les pansements étaient retirés avec précaution et chacune des couches des montages était enlevée avec précaution. Pendant que les souris étaient anesthésiées à l'isoflurane et que leurs plaies étaient exposées à l'air libre, deux types d'imageries ont été effectués. Une fois

les plaies imagées, de nouveaux pansements étaient déposés dans le lit des plaies, puis les montages protégeant les pansements étaient refaits.

En premier lieu, des photographies macroscopiques à haute résolution ont été prises avec une caméra de type EOS Rebel XSi (Canon Canada Inc., Mississauga, ON, Canada). À l'aide du logiciel ImageJ (NIH, <http://imagej.nih.gov/>) et de ces photographies, il a été possible de mesurer la surface encore non refermée de chacune des plaies pour chaque temps d'analyse. Des pourcentages de guérison étaient par la suite calculés en rapportant l'aire de la zone non guérie à un jour donné sur l'aire de la plaie initiale. Ces photographies macroscopiques renseignent sur la guérison «globale», puisque tous les paramètres de la guérison participent à la fermeture des plaies lorsqu'elles sont observées à l'œil nu (réépithélialisation, formation du tissu de granulation, angiogenèse et inflammation). Sur ces photographies, il est d'ailleurs très ardu de suivre la réépithélialisation des plaies. Cette problématique a pu être résolue suite à l'usage de la seconde méthode d'imagerie qui a mis à profit l'utilisation de souris transgéniques exprimant la GFP dans leur épiderme. Un appareil IVIS® (Lumina II In Vivo Imaging System, Caliper Life Sciences (a PerkinElmer Company), Hopkinton, MA, USA) a permis d'obtenir des clichés de la fluorescence émise par l'épiderme à chacun des temps analysés. Ces images ont par la suite été utilisées afin de tracer les zones non recouvertes par les kératinocytes. Les cinétiques de réépithélialisation ont été calculées en rapportant l'aire des zones non réépithélialisées à un jour donné sur l'aire des plaies initiales, puis en les exprimant en tant que pourcentages de fermeture.

2.4 Analyses histologiques – colorations et immunomarquages

Lors de la première expérience, les tissus cicatriciels ont été prélevés au 18^{ème} jour suivant la création de la lésion. Ceux-ci ont été prélevés en incluant des marges de peau saine d'environ 2 à 5 mm, puis chaque prélèvement a été sectionné afin de permettre diverses analyses.

Suivant leur découpe, les tissus destinés aux analyses histologiques ont été fixés dans une solution de formaldéhyde 3,7% durant 24 heures. Ces tissus ont ensuite été enrobés dans de la paraffine et coupés en fines sections transversales de 5 µm à l'aide d'un microtome (RM2245, Leica, Concord, ON, Canada). Les sections de tissu obtenues ont ensuite été colorées au trichrome de Masson ou au rouge picrosirius. Le trichrome de Masson donne de l'information sur la structure du tissu en colorant la matrice extracellulaire en bleu et les cellules en rose, tandis que le rouge de picrosirius permet de visualiser les fibres de collagènes à l'aide d'une lumière polarisée (Rich and Whittaker 2005). Les lames colorées par les deux méthodes ont par la suite été photographiées à l'aide d'une caméra AxioCam ICc1 montée sur un microscope M2 (Zeiss Canada, Toronto, ON, Canada). Afin de visualiser la surface totale des coupes à partir d'acquisitions partielles de la surface, des juxtapositions de photos provenant d'une même coupe ont été réalisées à l'aide de Photoshop

CS4. L'épaisseur moyenne des tissus de granulation et des dermes intacts adjacents a été mesurée sur les mosaïques issues des colorations au trichrome de Masson sur lesquelles l'épaisseur des compartiments dermiques a été tracée à l'aide du logiciel ImageJ. Dans tous les cas, les compartiments épidermiques étaient exclus des mesures.

Les échantillons de tissus destinés aux immunofluorescences a été enrobée dans de l'OCT (Tissue-Tek OCT, Sakura Finetek, Torrance, CA, USA), congelés de manière rapide dans de l'azote liquide et conservés à -80°C. Les blocs d'OCT contenant les tissus ont été coupés en fines sections de 10 µm d'épaisseur avec un cryostat (JUNG RM2035, Leica, Concord, ON, Canada) afin d'obtenir des coupes transversales des plaies, puis ces coupes ont été conservées à -20°C jusqu'à leur utilisation. À la suite d'une fixation à l'acétone, des immunofluorescences indirectes dirigées contre diverses molécules d'intérêt ont été effectuées. Ces traitements permettaient de visualiser la présence de la GFP sur les lames. Le tableau 2.1 regroupe les informations sur les anticorps primaires utilisés.

Tableau 2.1 Immunomarquages effectués sur les coupes transversales de plaies congelées

Anticorps primaire (dirigé contre)	Marqueur tissulaire	Numéro de catalogue	Compagnie
α-sma	Péricytes, cellules musculaires lisses, myofibroblastes	Ab5694	Abcam, Toronto, ON, Canada
CD31	Cellules endothéliales (et certaines cellules du système immunitaire)	553370	BD Pharmingen, Mississauga, ON, Canada
CD45	Leucocytes	Ab10558	Abcam
Collagène de type III (col III)	Collagène sécrété de manière importante lors de la cicatrisation	Ne s'applique pas	Don de l'Institut Pasteur, France
Collagène de type IV (col IV)	Membrane basale	Ab6586	Abcam
Kératine 14	Kératinocytes basaux	PRB-155P	Covance Inc, Montréal, Canada
Vimentine	Cellules d'origine mésenchymateuse	NB300-223	Novus Biological, Oakville, ON, Canada

Note : Molécules classées par ordre alphabétique.

Afin de valider les méthodes par immunofluorescence, des contrôles négatifs avec des anticorps isotypiques correspondants (IgG de lapin, Ab-105-c, R&D systems; IgG de rat, EMD Millipore, CBL605, Billerica, MA, USA) et des contrôles d'omission des anticorps primaires ont été effectués. Les anticorps secondaires suivants ont également été utilisés : anti-IgG de lapin produit chez le poulet et conjugué au colorant Alexa 594 (A-21442, Molecular Probes, Eugene, OR, USA), anti-IgG de rat produit chez la chèvre conjugué au colorant Alexa 594 (A-11007) ou anti-IgY de poulet produit chez la chèvre et conjugué au colorant rhodamine (AP406-KC, EMD Millipore). Un marquage des noyaux avec un agent intercalant de l'ADN (Hoechst, Sigma-Aldrich) a

été effectué durant les immunofluorescences. Celles-ci ont été imagées à l'aide de caméras AxioCam HRm montées sur des microscopes M2 (Zeiss Canada). Les immunomarquages dirigés contre le CD31, le collagène de type III et la vimentine ont été imagés en utilisant un module ApoTome (Zeiss Canada) monté sur un microscope M2. Afin de reproduire des mosaïques de coupes transversales complètes, des juxtapositions de photos provenant d'une même coupe ont été réalisées à l'aide de Photoshop CS4.

2.5 Quantifications des marquages effectués sur les coupes transversales

Les mosaïques issues des coupes colorées au rouge picosirius ont été utilisées afin d'évaluer de manière semi-quantitative le pourcentage de l'aire du tissu de granulation recouvert par des fibres de collagène. Pour ce faire, le logiciel ImageJ a été utilisé pour délimiter les tissus de granulation sur les coupes (en excluant les compartiments épidermiques et les dermes natifs) et pour quantifier, en pourcentage, la surface des tissus de granulation recouverte par les fibres de collagènes.

Une fois les immunofluorescences contre CD31 et CD45 effectuées, les signaux positifs sur les images obtenues ont été quantifiés. Dans les deux cas, le derme non lésé et l'épiderme étaient exclus des surfaces analysées. Les structures positives au CD31 dans le tissu de granulation ont été calculées à l'aide d'ImageJ et rapportées en pourcentage d'aire recouverte. Ce pourcentage est donc défini comme l'aire du tissu recouvert d'un signal positif sur l'aire totale du tissu de granulation. Les immunomarquages de six plaies ayant reçu des pansements adipeux, deux plaies ayant reçu des pansements conjonctifs et huit plaies contrôle sans pansements ont été quantifiées en utilisant trois coupes transversales par échantillons. Contrairement aux immunofluorescences dirigées contre CD31 où des structures complexes telles que des capillaires étaient marquées, les structures révélées par les immunofluorescences dirigées contre CD45 étaient des cellules distinctes. Celles-ci ont donc pu être comptées grâce au *Automatic Nuclei Counter plug-in* (<http://www.bioimage.ucsb.edu/>) d'ImageJ. Pour ce marquage, six plaies ayant reçu des pansements adipeux, deux plaies ayant reçu des pansements conjonctifs et huit plaies contrôle sans pansements ont été quantifiées en utilisant deux coupes transversales pour chacun des échantillons.

2.6 Tests de résistance mécanique

L'évaluation de la résistance mécanique des tissus cicatriciels a été possible grâce à la réalisation de tests de traction uniaxiale (White, Brody et al. 1971, Munoz, Bea et al. 2008). Ces tests ont été effectués sur les tissus prélevés de la cohorte de souris femelles, pour un total de 5 plaies ayant reçu des pansements adipeux, 6

plaies ayant reçu des pansements conjonctifs et 8 plaies n'ayant pas reçu de pansement. Tous ces tissus ont été prélevés sans le muscle sous-jacent 21 jours après la journée de chirurgie, puis ont été découpés à l'aide d'un poinçon en forme de sablier en prenant soin de centrer les tissus cicatriciels dans la partie la plus mince et la plus fragile de la forme (Figure 2.4 A). Pour effectuer les tests, les échantillons étaient installés dans un appareil d'essai électrodynamique (Instron E1000, Instron Corp, Norwood, MA). Une fois les échantillons installés dans les pinces de cette machine, celle-ci appliquait une tension de 0,2 mm/s afin de les étirer de manière unidirectionnelle (Figure 2.4 B). Le test s'arrêtait lorsque les échantillons cédaient dans la région centrale plus mince. Durant les tests, la longueur de l'échantillon ainsi que la charge appliquée pour induire la déformation ont été mesurées avec une cellule de chargement (Instron 2530-437). Le tout a été enregistré dans le système. Trois types de propriétés mécaniques ont pu être déterminées à l'aide des données recueillies, dont la force de tension au point de rupture (UTS pour *Ultimate Tensile Strength*), le pourcentage de déformation et le module d'élasticité. L'UTS, exprimé en MPa, a été évalué en divisant la force enregistrée au moment de la rupture de l'échantillon par l'épaisseur de l'échantillon dans sa section centrale. Ces épaisseurs ont pu être mesurées grâce à des analyses histologiques (trichrome de Masson) réalisées sur les «retailles» de tissus adjacents à la zone centrale effectuée avec le poinçon. Le pourcentage de déformation a été mesuré en normalisant la longueur de l'échantillon à son point de rupture avec sa longueur initiale. Le module d'élasticité, également en MPa, a été calculé en tant que la zone linéaire de la pente de la courbe de contrainte en fonction de la déformation.

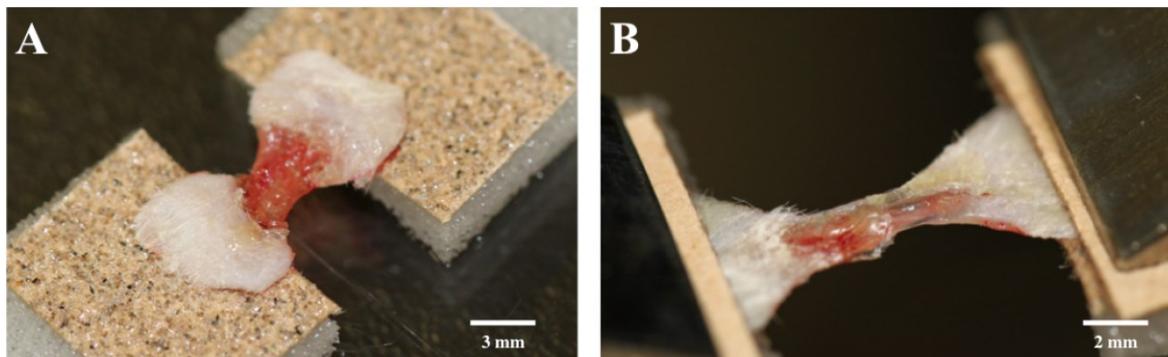


Figure 2.4 Test de traction uniaxiale. A) Tissu cicatriciel avant l'installation entre les pinces; B) Tissu en train de subir la tension appliquée par l'appareil. ©Pascal Morissette Martin

2.7 Essais *in vitro* préliminaires aux expériences *in vivo*

Afin de déterminer les intervalles de temps optimaux entre les changements de pansements biologiques, des analyses *in vitro* ont été réalisées. Notre objectif était de mimer de manière la plus fidèle possible les

conditions des pansements lors de leur dépôt sur les souris. Un côté du pansement biologique a donc été déposé dans le milieu de culture alors que l'autre côté était gardé en contact avec l'air grâce à l'utilisation de petits promontoires permettant de créer cet interface. Ceux-ci sont communément appelés «tables air-liquide». Les mêmes éléments utilisés au-dessus des pansements chez la souris ont ensuite été ajoutés.

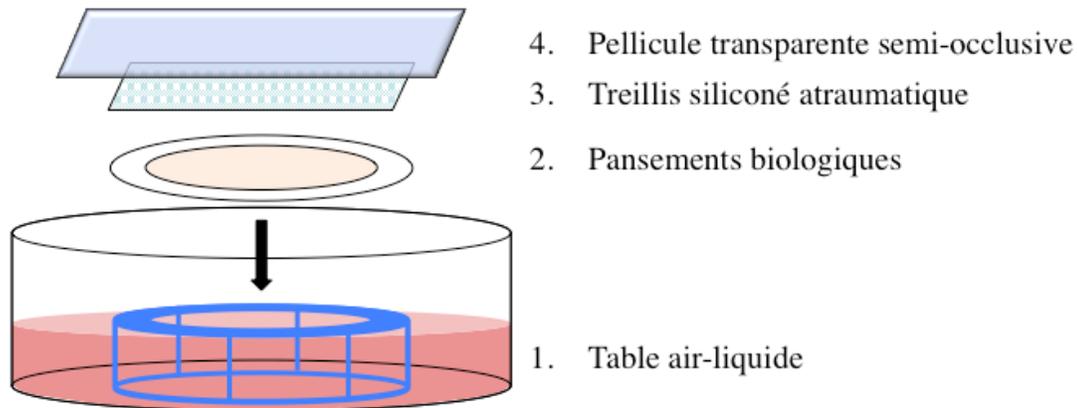


Figure 2.5 Schéma du montage *in vitro* afin de déterminer la fréquence de changement des pansements biologiques. ©Pascal Morissette Martin

Les milieux utilisés pour ces tests ont été très similaires aux deux milieux utilisés pour la maturation des pansements (Figure 2.1), la seule différence entre les premiers et les seconds étant leurs concentrations en SVF de 1%. Ces tests ont été réalisés en utilisant des plaques 6 puits contenant 4,5 mL de milieu dans lesquelles une table permettant d'établir un interface air-liquide ont été déposée dans chaque puits (Jean, Bernard et al. 2011). Tel qu'illustré à la figure 2.1, les pansement biologiques (cultivés pendant 30 jours et soumis au cocktail de différenciation adipogénique durant 26 jours dans le cas des pansements adipeux) et des carrés d'environ 1 cm² de Mepitel® recouvert d'une pellicule transparente de type Tegaderm™ ont été déposés séquentiellement sur chaque table air-liquide. Une fois les montages effectués, les pansements ont été laissés en contact indirect avec l'air durant 48, 72 et 96 heures. À chaque intervalle de 24 heures, la fonctionnalité et la mortalité des cellules dans les tissus ont été quantifiées à l'aide de dosages immuno-enzymatiques (ELISA, de l'anglais *enzyme-linked immunosorbent assay*, voir section 2.8). Des contrôles de tissus maintenus en condition immergée ont également été effectués afin de permettre une évaluation de la fonctionnalité et de la mortalité des pansements en culture.

Après des périodes de 48, 72 et 96 heures, les montages étaient retirés et les tissus étaient incubés dans une solution de 2 µM d'homodimère-1 d'éthidium (EthD-1, Invitrogen, Burlington, ON, Canada) pendant une heure, puis fixés durant toute une nuit dans une solution de 3,7% de formaldéhyde. L'EthD-1 a la particularité de

marquer les noyaux des cellules mortes en rouge. Suite à la fixation au formaldéhyde, un contre marquage au Hoechst (Sigma-Aldrich) a été utilisé afin de marquer les noyaux de toutes les cellules en bleu. L'imagerie des tissus a été réalisée grâce à un microscope confocal LSM700 (Zeiss). À partir de ces images, la quantification des noyaux des cellules mortes et des cellules totales a été réalisée à l'aide du logiciel IMARIS 7.0.0 (Bitplane Inc, South Windsor, CT, USA).

2.8 Essais immuno-enzymatiques de type ELISA

Dans le cas des tissus utilisés pour les expériences animales, cinq molécules d'intérêt, soient HGF, VEGF, Ang-1, PAI-1 et la leptine, ont été quantifiées dans les surnageants de culture à l'aide de dosage de type ELISA (DuoSets®, R&D systems, Minneapolis, MN, USA) après 36 jours de culture, soit le premier jour d'utilisation des pansements chez les souris. Pour ce faire, les milieux ont été conditionnés par les pansements durant une période de 24 heures préalablement aux prélèvements de milieux conditionnés.

La sécrétion des tissus utilisés dans le cadre des essais *in vitro* a également été quantifiée. Les milieux conditionnés par les pansements mis à l'interface air-liquide ou les pansements contrôles immergés ont été utilisés afin de déterminer la fonctionnalité des tissus via leur potentiel de sécrétion des molécules d'intérêt (HGF, VEGF, Ang-1 et leptine). À la suite de ces prélèvements faits à tous les 24 heures, le milieu restant dans les puits était remplacé par 4,5 mL de milieu frais.

Les données issues des dosage de type ELISA sont présentées en tant que la soustraction des valeurs brutes par les valeurs des contrôles négatifs (milieu ayant passé 24h dans l'incubateur sans pansements).

2.9 Analyses statistiques

À moins de précisions contraires, les analyses statistiques sont représentées en tant que moyenne \pm écart-type. Les tests T de Student (t-test) et les analyses de la variance (ANOVA, de l'anglais *analysis of variance*) ont tous été effectués à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Les intervalles de confiance de tous les tests étaient placés au seuil de 95% ($p < 0,05$). Les détails relatifs à chacun de ces tests se retrouvent dans les légendes des figures lorsque cela est approprié.

Chapitre 3 : Résultats

3.1 Production des pansements par génie tissulaire et détermination de la fréquence optimale de changement des pansements *in vitro*

À la fin de la culture cellulaire, les pansements conjonctifs obtenus étaient composés de CSTA et de matrice extracellulaire, tandis que les pansements adipeux générés étaient composés d'adipocytes, de matrice extracellulaire et également de CSTA non-différenciées (Figure 3.1).

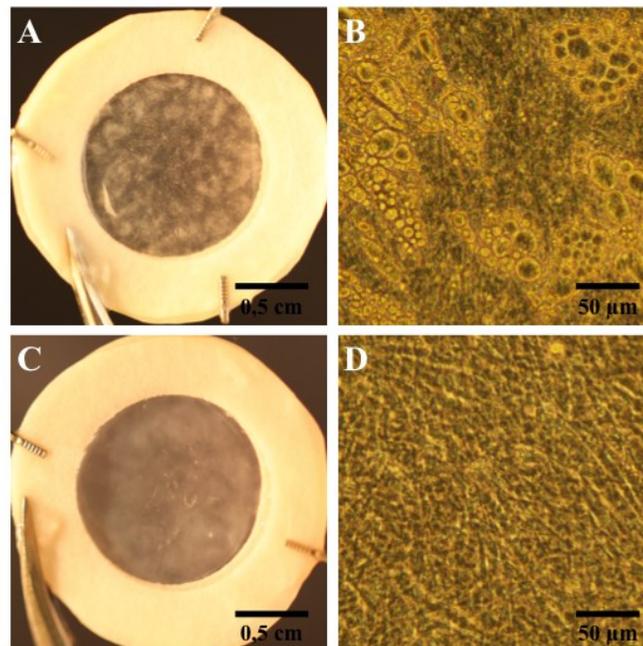


Figure 3.1 Apparence macroscopique et microscopique des pansements biologiques. A) et B) pansement adipeux; C) et D) pansement conjonctif. A) et C) apparence macroscopique (pansements cultivés pendant 47 jours et pansements adipeux soumis aux cocktails adipogéniques pendant 41 jours); B) et D) apparence microscopique (pansements cultivés pendant 24 jours et pansements adipeux soumis aux cocktails adipogéniques pendant 18 jours).

Le choix d'opter pour des changements de pansements durant l'expérimentation animale s'est basé sur les résultats préliminaires issus d'un modèle de guérison des plaies organotypiques *in vitro* (Laplante, Germain et al. 2001). Dans ce modèle, des changements de pansements aux deux jours s'étaient montrés bénéfiques lorsque ce groupe était comparé à celui où les pansements n'étaient pas changés (Labbé 2013). En conséquence, le premier objectif des travaux du présent mémoire a été de déterminer la fréquence optimale des changements de pansements. Afin de mimer le contact des pansements avec l'air auquel les pansements

seront exposés lors des expériences animales, les tissus ont été mis à l'interface air-liquide (Figure 2.5). Ces tests *in vitro* avaient comme avantage de permettre une étude de la mortalité et de la fonctionnalité des cellules contenues dans les tissus. La fonctionnalité des cellules a été évaluée via leur capacité de sécrétion de différentes cytokines dans le milieu de culture sur une période de 24 heures après 48, 72 et 96 heures passées en culture. En effet, il était impossible d'effectuer ce genre d'essais sur les souris, puisqu'il est impossible de quantifier la présence des molécules bioactives pendant que les pansements sont sur les souris.

Les résultats du test de mortalité (Figure 3.1 A et B) indiquent que la mortalité des cellules, contenues dans les pansements, augmente entre le deuxième et le quatrième jour en fonction du temps de contact avec l'interface air-liquide. Les taux de mort cellulaire atteints n'excèdent jamais 12,5% et sont plus élevés pour les pansements conjonctifs que pour les pansements adipeux dans tous les cas ($p < 0,05$), à l'exception du contact à l'air-liquide pendant 48 heures. Entre le troisième et le quatrième jour, une forte augmentation plus importante qu'aux autres jours est observée pour le groupe des pansements conjonctifs.

La fonctionnalité des tissus conjonctifs et adipeux a pu être évaluée à l'aide de la quantification de quatre molécules. Ces molécules, soient la leptine, le VEGF, l'Ang-1 et le HGF, ont été sélectionnées afin d'agir en tant que rapporteurs du sécrétome des cellules. Les patrons de molécules bioactives sécrétées sont très similaires entre les deux types de pansements, à l'exception de la leptine dont la présence est plus marquée dans les milieux conditionnés par les pansements adipeux (Figure 3.2 C). Tout au long du contact avec l'air, les niveaux de leptine et de VEGF diminuent avec le temps, tandis que les niveaux d'Ang-1 et de HGF restent globalement inchangés. La disparition de VEGF au troisième jour (pansement adipeux) et au quatrième jour (pansements conjonctifs) semble indiquer une diminution de la fonctionnalité des tissus.

La diminution de la sécrétion de leptine tout au long du contact à l'air, l'absence de détection de VEGF au troisième et quatrième jour et l'augmentation importante de la mortalité des cellules des pansements conjonctifs entre le troisième et le quatrième jour ont été considérés comme des facteurs limitants. Ces facteurs ont donc conduit à la prise de décision des changements de pansements au trois jours pour les expériences animales.

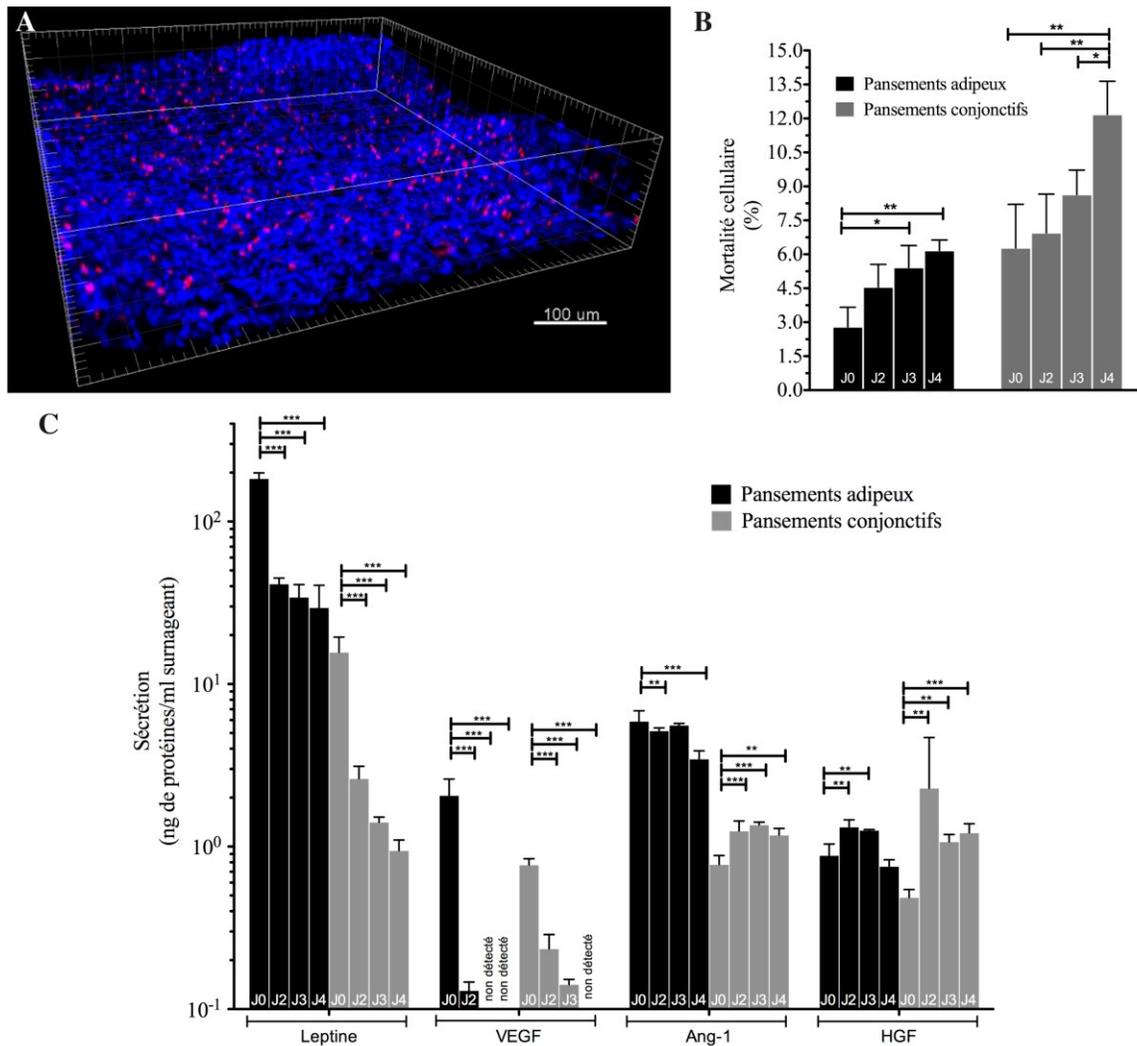


Figure 3.2 Détermination de la fréquence optimale de changement des pansements. A) Exemple d'imagerie confocale permettant de visualiser les cellules mortes en rouge (marquage à l'EthD-1) et les cellules totales en bleu (marquage au Hoechst). B) Quantification de la mortalité des cellules issues des marquages présentés en A). C) Estimation de la fonctionnalité des tissus par quantification de quatre molécules sécrétées. J0 = contrôles immergés pendant 4 jours, J2-J3-J4 = pansements ayant passé 48-72-96 heures à l'interface air-liquide. Statistiques : données exprimées en tant que moyenne \pm écart-type. ANOVA, N = 1 donneur, n = 3 ou 4 par conditions, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

3.2 Évaluation de l'impact de pansements adipeux et conjonctifs sur la guérison de plaies cutanées murines

Le second objectif poursuivi par ces travaux était d'évaluer l'impact des pansements produits à partir de cellules humaines sur la guérison de plaies cutanées murines. Pour ce faire, un modèle de plaies pleines épaisseurs avec extenseurs en silicone a été utilisé de concert avec des souris transgéniques K14-H2B-GFP possédant un épiderme fluorescent (Figure 2.2).

Le devis expérimental a permis de suivre spécifiquement la contribution de la réépithélialisation, de la formation du tissu de granulation et de l'angiogenèse à la réparation tissulaire. Pour ce faire, deux stratégies majeures ont été mises en œuvre. La première consistait à suivre l'évolution de la guérison globale des plaies et de la réépithélialisation à l'aide de photographies macroscopiques et d'imagerie spécifique lors des changements de pansements. Ceci a permis de suivre l'évolution de la guérison globale et de la réépithélialisation dans le temps. La seconde série d'analyses s'est basée sur les tissus cicatriciels, soit vers la fin des processus prolifératifs de la guérison. L'ensemble des tissus de la première expérience, soient ceux issus de la cohorte de souris mâles, a été utilisé pour effectuer les analyses histologiques au 18^{ème} jour. Les tissus de la seconde expérience, soient ceux issus de la cohorte de souris femelles, ont été employés lors des tests de résistance mécanique au 21^{ème} jour. Ce choix a été effectué afin de limiter la contribution possible des dimorphismes sexuels aux données recueillies.

De plus, quatre des six réplicats biologiques du groupe des plaies ayant reçu des pansements conjonctifs ont été perdus dans la cohorte des souris mâles. À cause du faible nombre de réplicats biologiques restants (deux) pour ce groupe expérimental, il a été impossible d'effectuer des analyses statistiques lors des quantifications issues des analyses histologiques des plaies pour ce groupe. Cette problématique est absente dans la cohorte des tissus femelles, et par conséquent, pour les tests de résistance mécanique.

3.2.1 Les pansements ne favorisent pas la réépithélialisation des plaies

Le suivi de l'apparence globale des plaies a été possible à l'aide de photographies macroscopiques à haute résolution des plaies lors des changements de pansements (Figure 3.3 A). À chacun des jours d'analyses, les aires de guérison résiduelles étaient mesurées et les pourcentages de fermeture des plaies étaient calculés à partir de l'aire des plaies au jour 0, le tout, afin de produire les cinétiques globales de guérison (Figure 3.3 B). Les deux types de plaies ayant reçu des pansements ont démontré une guérison accélérée de trois jours par rapport aux plaies non traitées. Cette avancée est observable de manière constante jusqu'au 15^{ème} jour (Figure 3.3 B). Lorsque comparés ensemble, aucune différence significative n'est dénotée pour les deux groupes traités (Figure 3.3 B).

Le suivi spécifique de la réépithélialisation a été effectué aux trois jours à l'aide d'imagerie de la fluorescence et grâce à l'épiderme fluorescent des souris K14-H2B-GFP (Figure 3.4 A et C). À chaque changement de pansements, les plaies ont été imagées (Figure 3.4 A) et des pourcentages de réépithélialisation relatifs au jour zéro ont été calculés (Figure 3.4 B). Sur les images de la figure 3.4 A, les signaux forts sont représentés avec des tons d'orangé et de jaune, les signaux faibles sont indiqués par des tons de rouge et de bourgogne, tandis qu'une absence de fluorescence est visible par la superposition des photographies sous-jacentes en

noir et blanc. Malgré les faibles différences significatives observables au troisième et 18^{ème} jours (Figure 3.4 B), les trois cinétiques de réépithélialisation se confondent et aucune différence n'est notable entre les trois groupes expérimentaux.

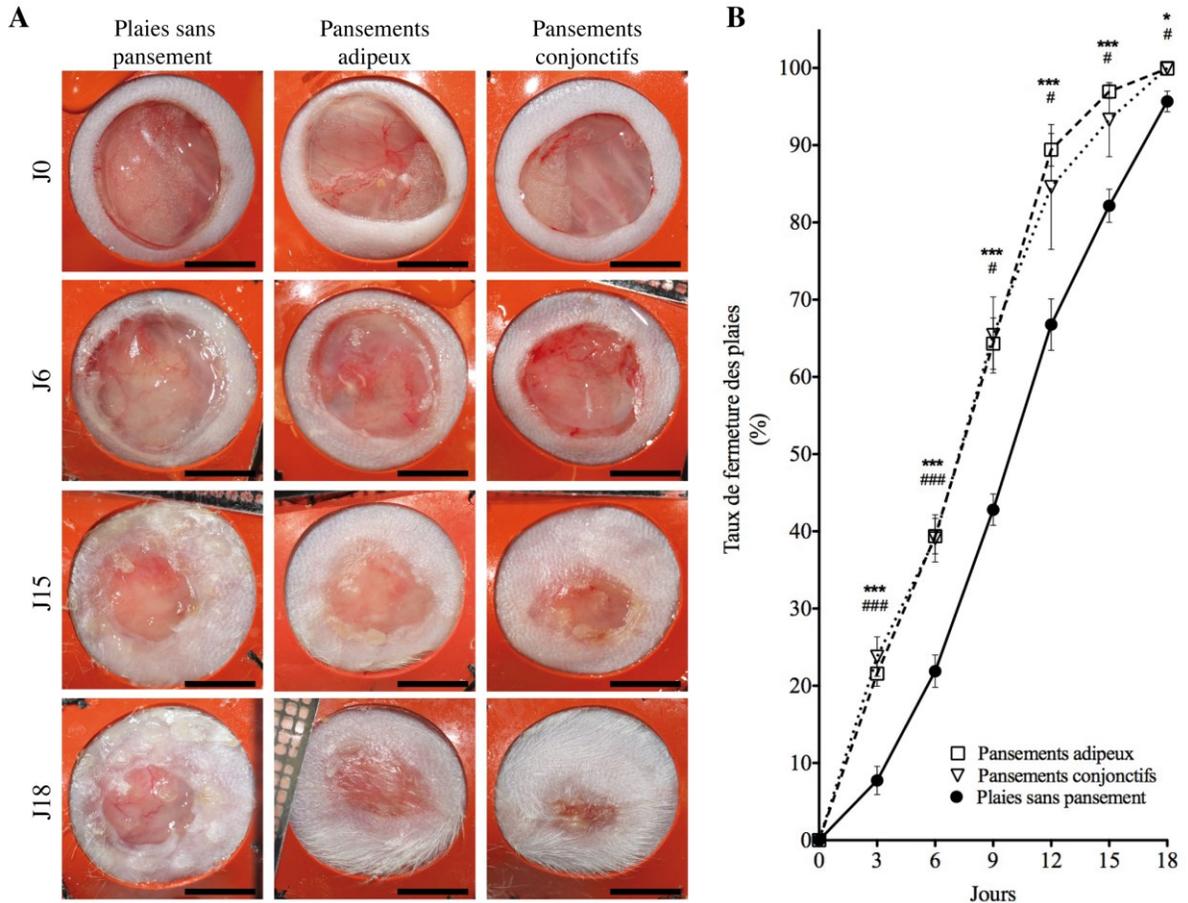


Figure 3.3 Cinétique de guérison des plaies. A) Photographies macroscopiques représentatives montrant la guérison sur une période de 18 jours pour tous les groupes expérimentaux. B) Les cinétiques de guérison calculées pour chacun des groupes. Statistiques : données exprimées en tant que moyenne \pm variance. ANOVA, N = 2, n = entre 8 et 18 par conditions. Les astérisques (*) représentent les statistiques entre le groupe de pansements adipeux et le groupe de plaies sans pansement, tandis que les dièses (#) représentent les statistiques entre le groupe des pansements conjonctifs et le groupe de plaies sans pansements. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$. Barres : 5 mm.

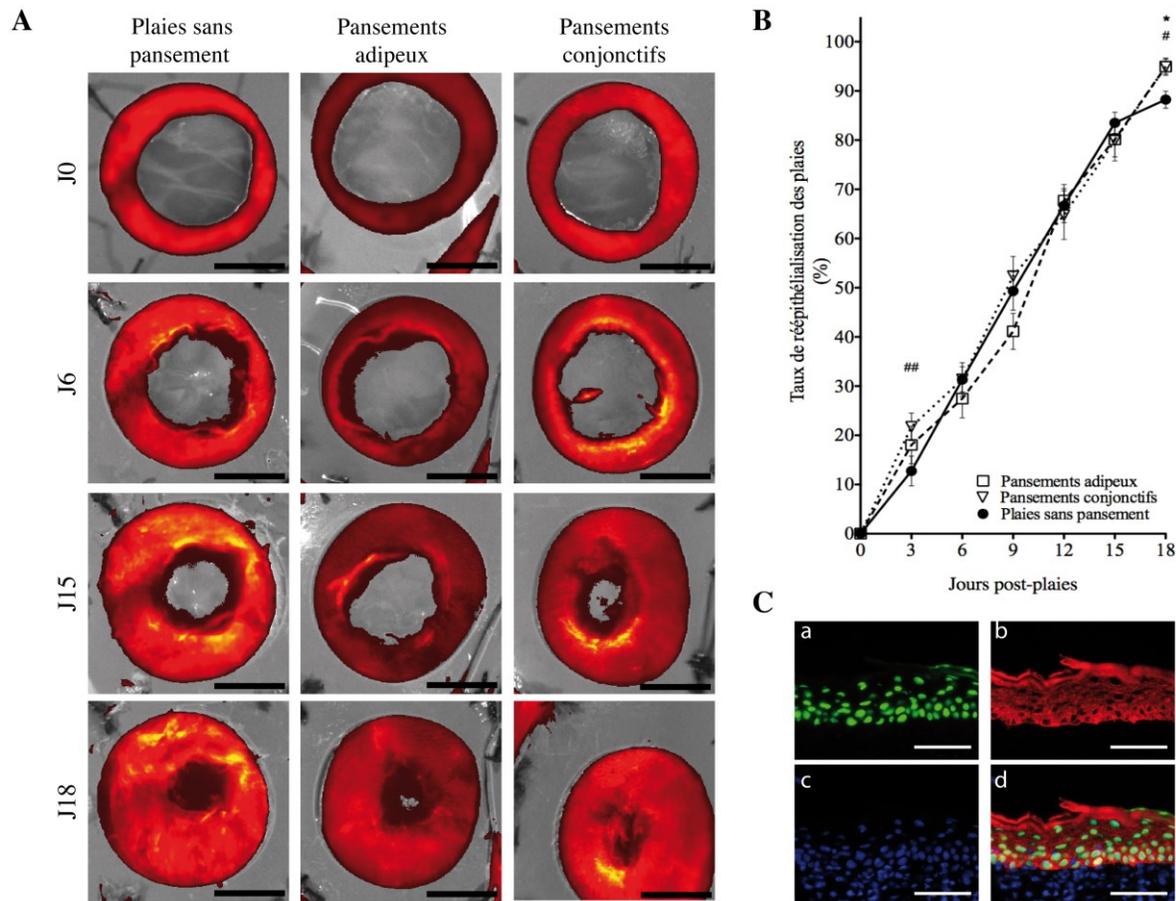


Figure 3.4 Cinétique de réépithélialisation des plaies. A) Photographies issues de l'imagerie macroscopique de la fluorescence sur une période de 18 jours pour tous les groupes expérimentaux. B) Cinétiques de réépithélialisation calculées pour chacun des groupes. C) Coupe transversale d'une plaie de souris dans une partie d'épiderme régénéré, où a) fluorescence de la GFP présente dans les noyaux des kératinocytes visible en vert, b) immunofluorescence dirigée contre la K14 en rouge, c) marquage de tous les noyaux en bleu au Hoechst, d) superposition représentant la co-localisation tissulaire de la K14 et de la H2B-GFP sous le promoteur de la K14. Statistiques: données exprimées en tant que moyenne \pm variance. ANOVA, N = 2, n = entre 8 et 18 par conditions. Les astérisques (*) représentent les statistiques entre le groupe de pansements adipeux et le groupe de plaies sans pansement, tandis que les dièses (#) représentent les statistiques entre le groupe des pansements conjonctifs et le groupe de plaies sans pansements. ** p<0,01, * p<0,05. Barres : en A) 5 mm et en C) 100 μ m.

3.2.2 Les pansements influencent la formation du tissu de granulation

Au 18^{ème} jour de la première expérience (cohorte de souris mâles), les plaies ont été prélevées afin d'effectuer diverses analyses quantitatives et qualitatives. Tel qu'illustré sur la figure 3.5, des colorations au trichrome de Masson ont été effectuées sur des coupes transversales pleines longueurs des plaies. En marquant la matrice extracellulaire en bleu et les cellules en rose, cette coloration donne de l'information sur l'architecture du tissu de granulation et sur l'épiderme régénéré. Des différences dans la structure des tissus de granulation

des groupes traités ont été observées lorsque ceux-ci ont été comparés avec le groupe non traité. D'abord, la présence de tissu de granulation avec une forte densité matricielle était moins abondante pour les groupes non traités (Figure 3.5 E et F vs A et B). Les tissus provenant des plaies traitées étaient plus homogènes que ceux du groupe non traité. Les épaisseurs mesurées sur les coupes transversales colorées au trichrome de Masson ont montré la présence d'un tissu de granulation du groupe non traité qui était 1,7 fois plus mince par rapport à celui de plaies traitées ou bien au derme de la peau intacte présente aux bords de la plaie (Figure 3.6). Il est important de noter que le groupe traité avec des pansements conjonctifs n'est pas représenté dans la figure 3.5. Toutefois, les tendances tissulaires observées sur les colorations au trichrome de Masson de ce groupe semblaient aller dans le même sens que celles du groupe des pansements adipeux.

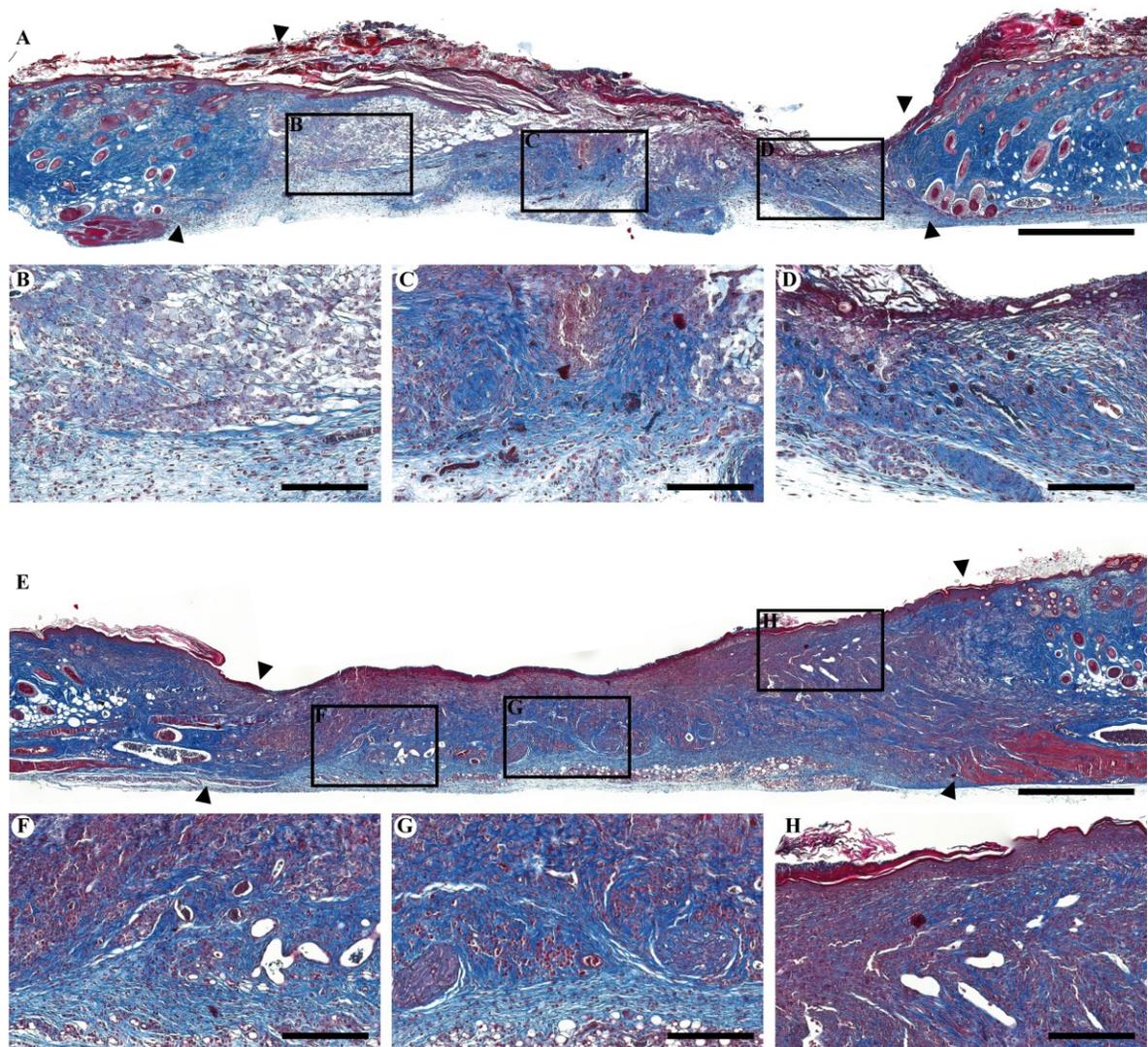


Figure 3.5 Les pansements adipeux stimulent la formation du tissu de granulation. A) et E) Exemples représentatifs de coupes transversales pleines longueurs des groupes de plaies n'ayant pas reçu de pansement et du groupe ayant reçu des pansements adipeux respectivement; B), C) et D), puis F), G) et H)

sont des agrandissements provenant de A) et E) respectivement. Les flèches noires indiquent les marges des plaies. Barres : (A et E) 1 mm, (B à D et F à H) 250 μm .

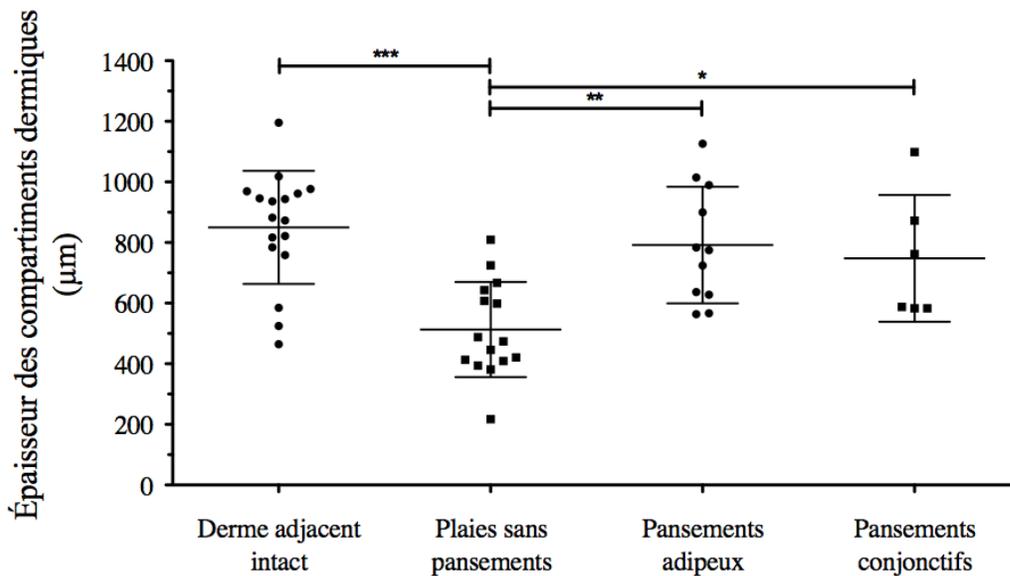


Figure 3.6 Épaisseur des compartiments dermiques. Statistiques : données exprimées en tant que moyenne \pm écart-type, ANOVA, N =1, n = 11 à 17 par conditions, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

La coloration au rouge picosirius a permis d'apporter des précisions supplémentaires sur l'architecture de la matrice extracellulaire en révélant les fibres de collagènes au sein du tissu de granulation en rouge (Figure 3.7). L'évaluation semi-quantitative des fibres de collagènes sur les colorations au rouge picosirius a montré que les tissus de granulation provenant de plaies traitées avec les pansements adipeux étaient recouverts de 1.3 fois plus de fibres de collagènes que ceux du groupe non traité (Figure 3.8). La quantification des leucocytes au sein des tissus de granulation, qui sont marqués à l'aide d'une immunofluorescence dirigée contre le CD45, ne révèle aucune différence significative entre les groupes expérimentaux (Figure 3.9 C, F et I, puis Figure 3.10). Ensuite, des immunofluorescences ont confirmé que les types cellulaires majoritaires dans les plaies étaient d'origine mésenchymateuse (Figure 3.9 B, E et H). La forte présence de collagène de type III, typique des tissus en réparation, a également été confirmée dans tous les groupes expérimentaux à l'aide d'immunofluorescence (Figure 3.9 A, D et G). Au final, aucune conclusion ne peut être tirée avec le groupe de plaies ayant reçu des pansements conjonctifs étant donné le nombre insuffisant d'échantillons dans ce groupe.

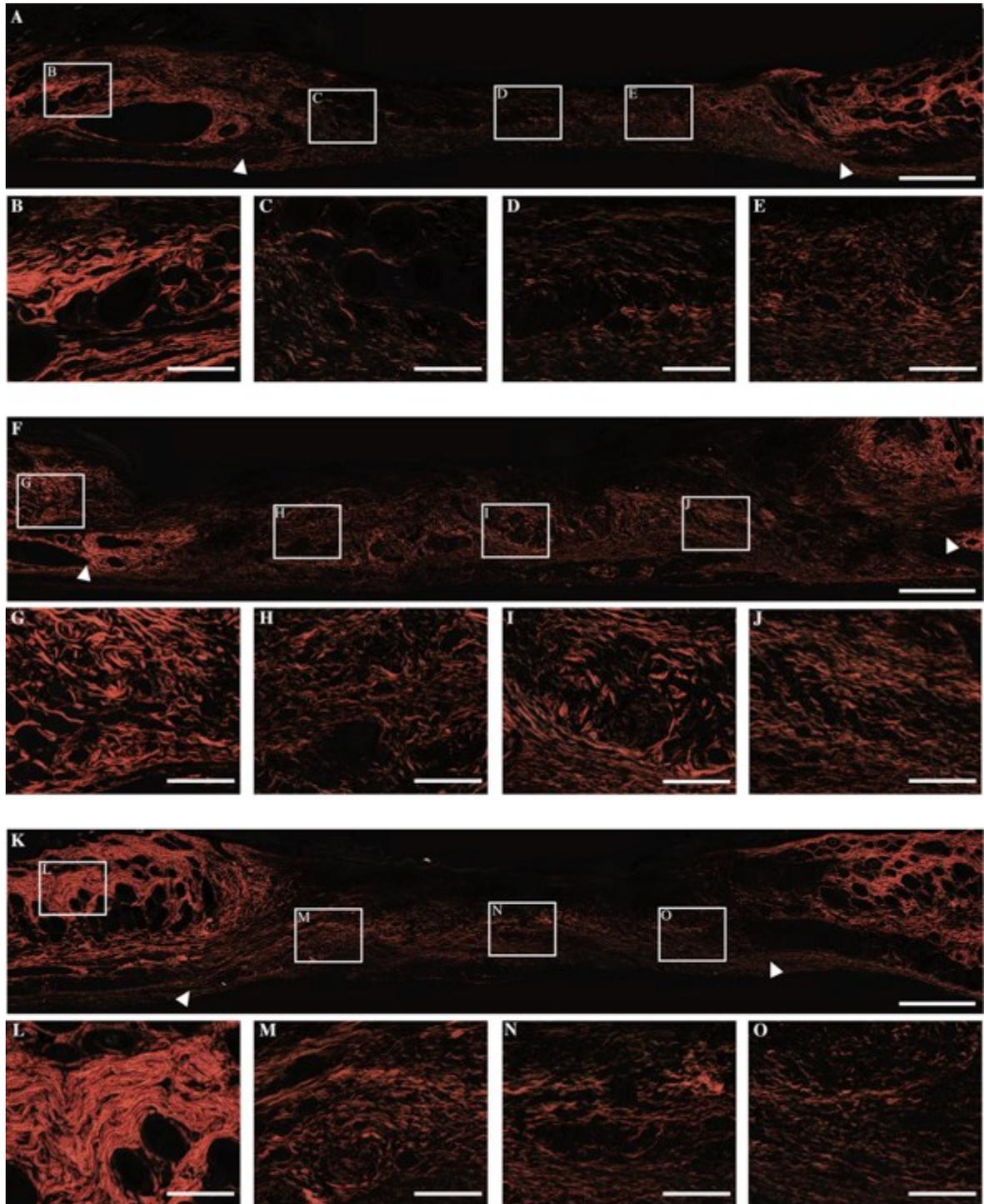


Figure 3.7 Organisation du collagène au sein des tissus de granulation visualisée au rouge picrosirius. A), F) et K) sont des exemples représentatifs de coupes transversales pleines longueurs des groupes sans traitement, adipeux et conjonctifs respectivement. B) à E), ainsi que G) à J), puis L) à O) sont des agrandissements provenant de A), F) et K) respectivement. Les flèches blanches indiquent les marges des plaies. Barres : (A, F et K) 1 mm, (B à E, G à J et L à O) 250 μ m.

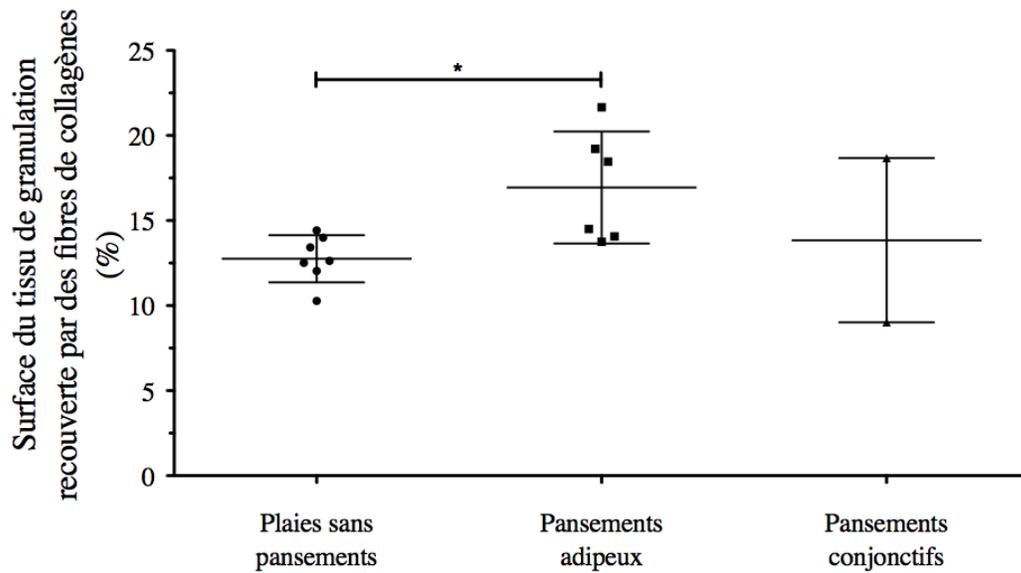


Figure 3.8 Évaluation semi-quantitative de la surface du tissu de granulation recouverte par les fibres de collagènes. Statistiques : données exprimées en tant que moyenne \pm écart-type, t-test, N = 1, n = 6 à 8, * p<0,05.

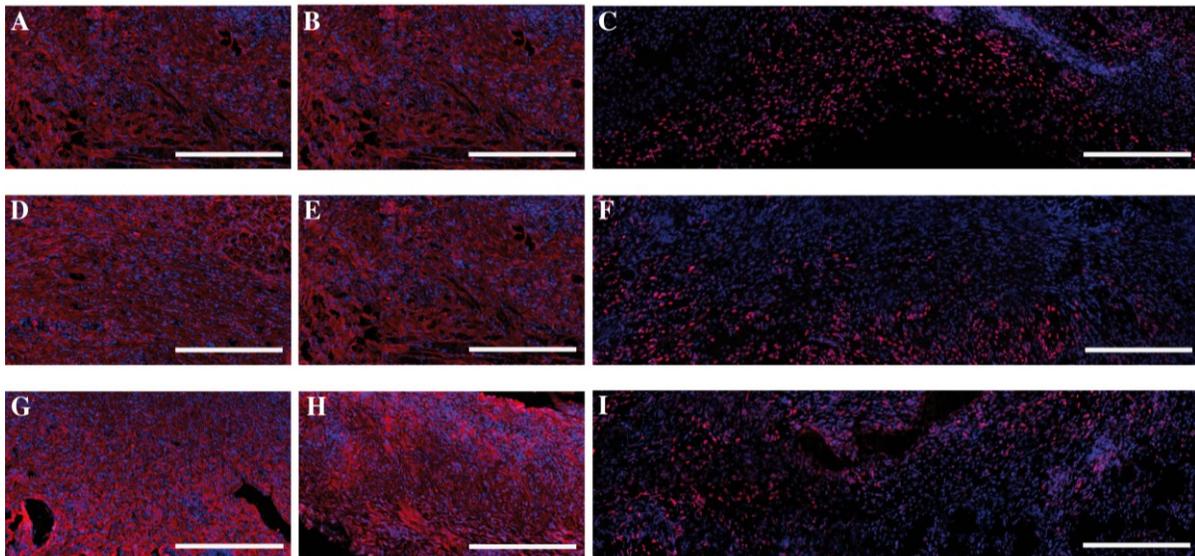


Figure 3.9 Organisation du tissu de granulation. A), D) et G) sont des immunofluorescences de marquage contre le collagène de type III; B), E) et H) sont des marquages dirigés contre la vimentine; C), F) et I) sont dirigés contre le CD45; A) à C), ainsi que D) à F), puis G) à I) représentent les groupes des pansements sans traitement, adipeux et conjonctifs respectivement. En rouge, les marquages des trois molécules, en bleu contre marquage au Hoechst. Barres : 200 μ m.

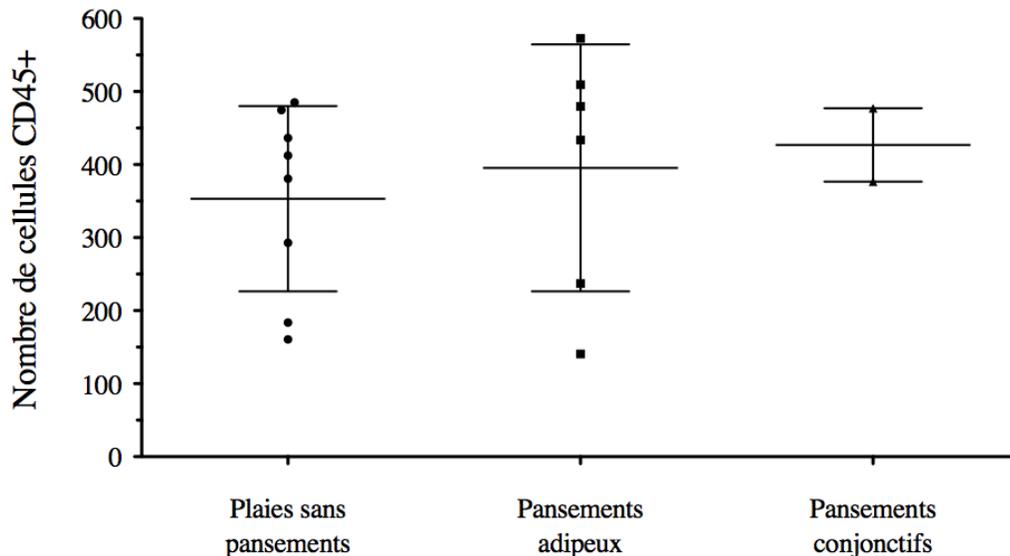
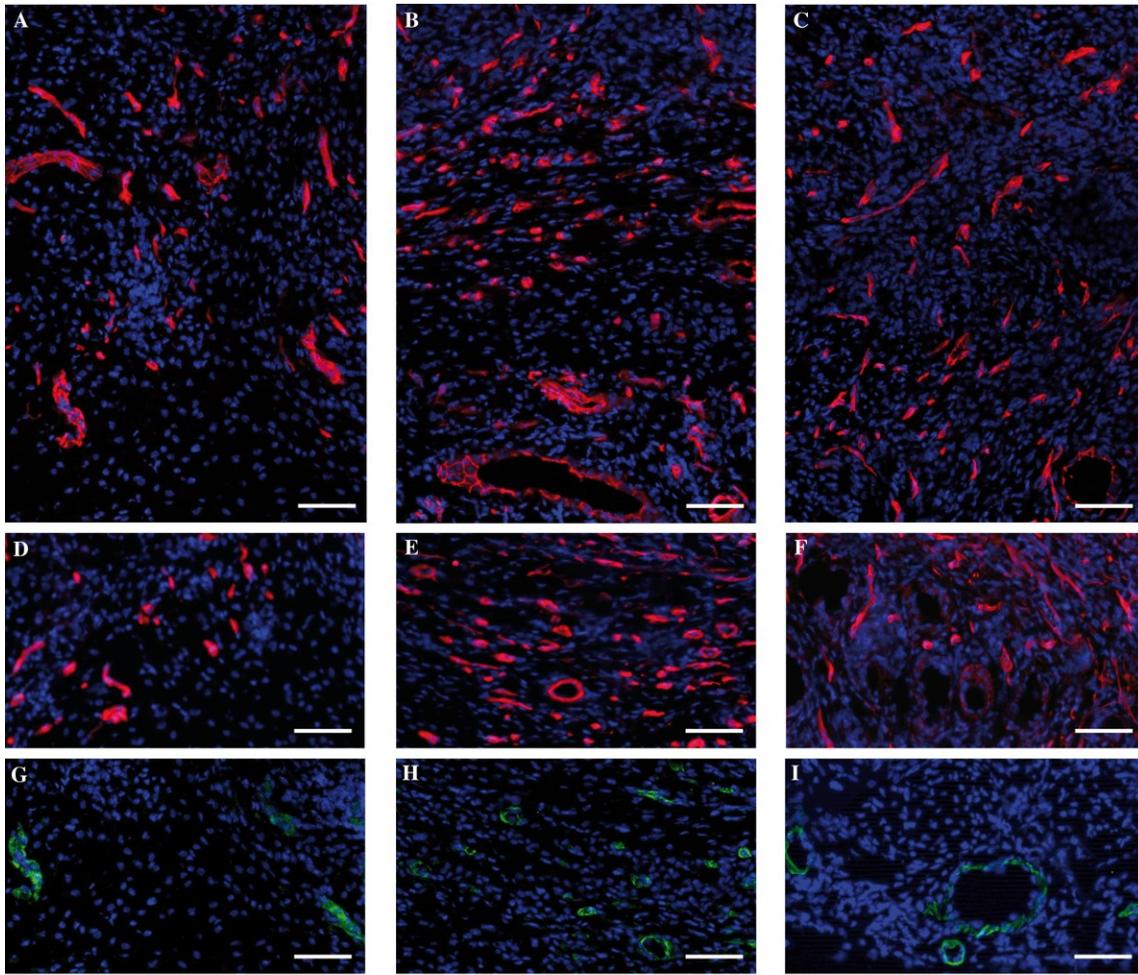


Figure 3.10 Nombre de cellules exprimant le marqueur de leucocytes CD45 se situant dans les tissus de granulation. Statistiques : données exprimées en tant que moyenne \pm écart-type, t-test, N = 1, n = 6 à 8 (aucune différence statistique notée entre le groupe sans plaie et le groupe de pansements adipeux).

3.2.3 Les pansements influencent la néovascularisation

Au jour de prélèvement des plaies, soit au 18^{ème} jour, de nombreux vaisseaux sanguins peuvent être visualisés dans les tissus de granulation de coupes transversales de plaies. Ces structures, marquées pour le CD31, ont été utilisées afin de déterminer le pourcentage d'aire recouverte par un réseau vasculaire dans les tissus de granulation (Figure 3.11 A, B, C et J). Les données issues de cette quantification ont souligné que le réseau vasculaire présent dans le tissu de granulation des plaies traitées avec les pansements adipeux couvrait 2.2 fois plus de surface que celui présent dans le tissu de granulation des plaies non traitées. Pour sa part, la présence de collagène de type IV, arrangé sous forme de tubule, souligne la présence de membranes basales formées par les capillaires (Figure 3.11 D, E et F). Finalement, le marquage dirigé contre l' α -sma suggère la présence de cellules musculaires lisses ou de péricytes autour des vaisseaux sanguins, tout en soulignant l'absence de cellules positives isolées au sein du tissu de granulation, tels que des myofibroblastes (Figure 3.11 G, H et I).



J

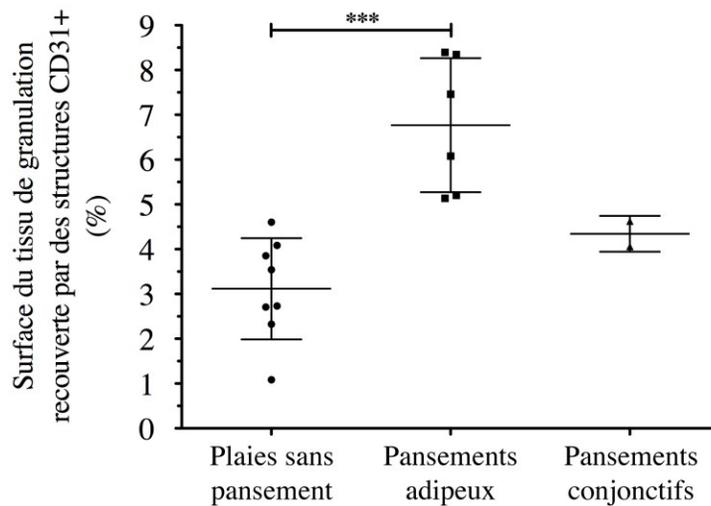


Figure 3.11 Les pansements biologiques favorisent l'angiogenèse. A), B) et C) Immunofluorescences dirigées contre le CD31 en rouge. D), E) et F) Immunofluorescences dirigées contre le collagène de type IV en rouge. G), H) et I), Immunofluorescences dirigées contre l' α -sma en vert. Noyaux marqués au Hoechst (bleu). La colonne de gauche représente le groupe de plaies vides, celle du centre le

groupe de pansements adipeux et à droite le groupe de pansements conjonctifs. J) Graphique représentant la surface du tissu de granulation recouverte par des structures positives au CD31. Statistiques : moyenne \pm écart-type. N = 1, t-test effectué entre le groupe des plaies sans pansement et du groupe des pansements adipeux, *** $p < 0,0002$. Barres : 200 μ m.

3.2.4 Les pansements biologiques ne semblent pas affecter les propriétés mécaniques des tissus

Des tests de traction uniaxiale ont permis d'obtenir des données préliminaires sur les propriétés mécaniques des tissus cicatriciels (Figure 3.12). Dans l'ensemble, ces données préliminaires suggèrent que la résistance et la rigidité de la peau sont similaires dans les trois groupes expérimentaux. En effet, le module d'élasticité qui constitue une indication de la rigidité des tissus était semblable dans les trois groupes (Figure 3.12 A). Ensuite, la force maximale de rupture, qui représente la contrainte maximale que peut supporter un spécimen avant de rompre et donc sa résistance, n'était pas différente entre les trois groupes expérimentaux (Figure 3.12 B). Puis, le pourcentage de déformation des spécimens n'est pas statistiquement différent lorsque les groupes traités sont comparés au groupe non traité (Figure 3.12 C).

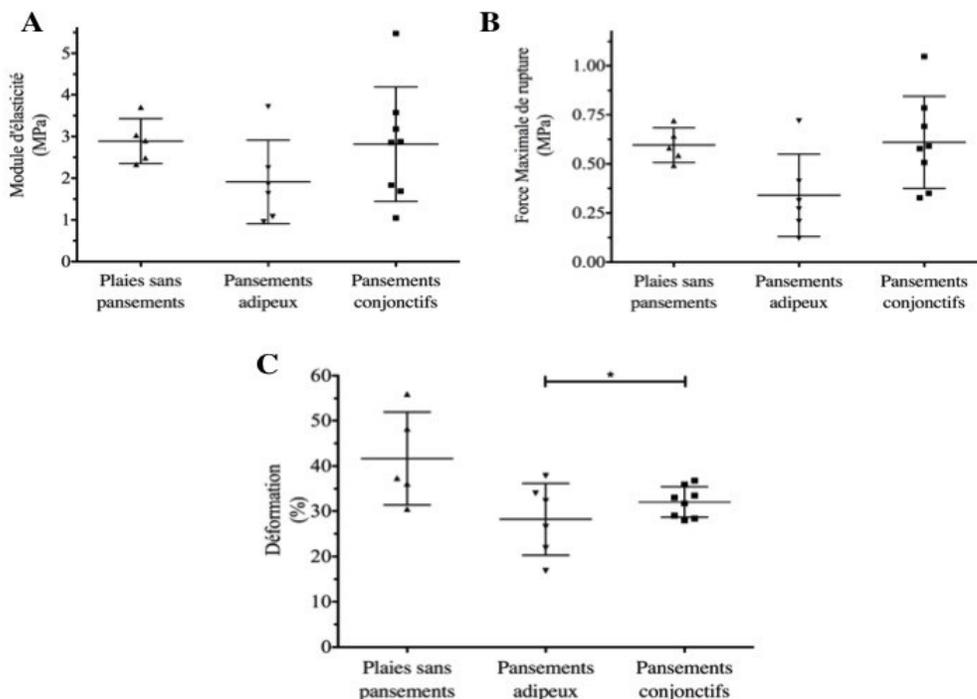


Figure 3.12 Les pansements biologiques ne semblent pas avoir d'impact sur les propriétés mécaniques de la peau cicatricielle. A) Module d'élasticité de la peau. B) Force maximale de rupture de la peau. C) Pourcentage de déformation de la peau.

3.2.5 Les pansements conservent la capacité de produire des molécules bioactives suite à leur utilisation sur la souris

Puisqu'il était impossible de quantifier la présence des molécules bioactives lorsque ceux-ci étaient positionnés sur la souris, cette quantification a été réalisée dans les milieux conditionnés par des pansements ayant été remis en culture suite à leur séjour de 72 heures sur le dos des souris (Figure 3.13). Aux mêmes jours, des milieux conditionnés par des pansements avant que ceux-ci ne soient positionnés sur les plaies ont été prélevés. Dans tous les cas où les pansements post-plaies ont été remis en culture, il est possible de dénoter la sécrétion des cinq molécules dosées. Cela indique que les pansements conservent la capacité de produire des molécules importantes pour la formation du tissu de granulation et pour l'angiogenèse suite à leur passage sur les souris. Bien que les niveaux de leptine, de PAI-1 et d'Ang-1 sécrétés diminuent suite à ce passage chez la souris (diminution respective de 8,8 fois, 2,2 fois et 1,3 fois dans le groupe des pansements conjonctifs; puis de 4,5 fois, 2,0 fois et de 2,7 fois (la diminution d'Ang-1 est non significative pour ce groupe toutefois) dans le groupe des pansements adipeux), il est intéressant de souligner l'augmentation de VEGF et de HGF dans les deux types de pansements (augmentation respective de 2,6 fois et de 2,9 fois pour les pansement adipeux; puis de 1,9 et 3,7 fois pour les pansements conjonctifs).

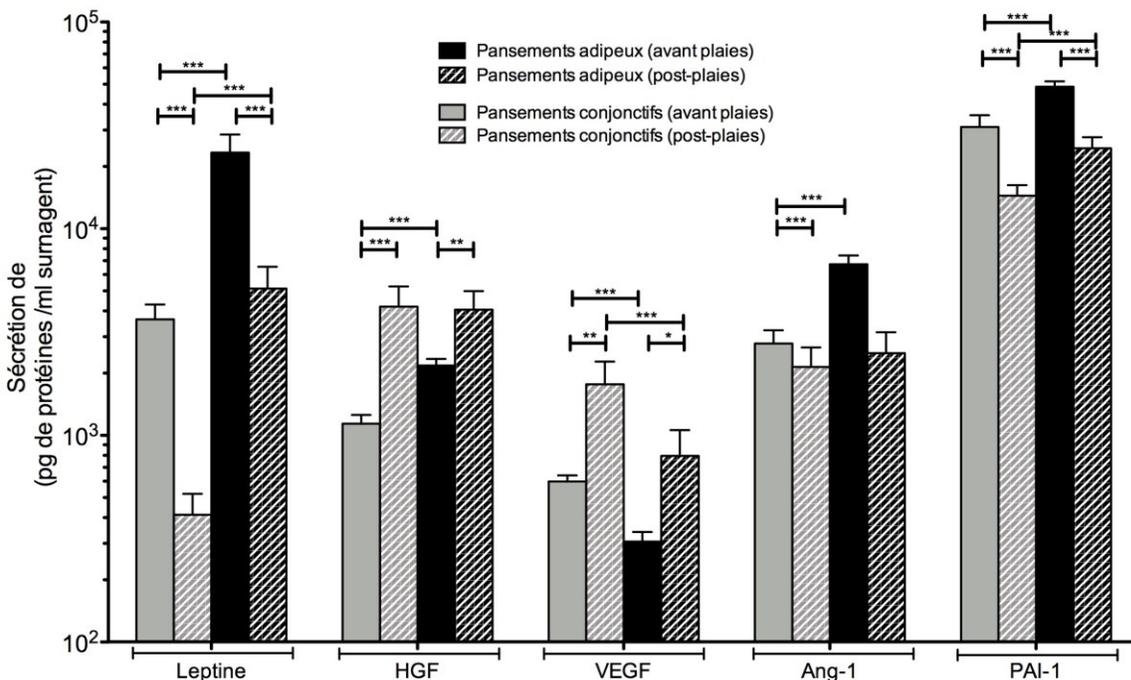


Figure 3.13 Fonctionnalité des pansements suite au passage de trois jours sur les plaies *in vivo*. Statistiques : données exprimées en tant que moyenne \pm écart-type. ANOVA, N = 1, n = 4 par conditions avant plaies et n = 11 pour pansements post-plaies. *** p<0,001, ** p<0,01, * p<0,05.

Chapitre 4 : Discussion

4.1 Détermination de la fréquence des changements de pansements

Afin de déterminer la fréquence optimale des changements de pansements, la mortalité cellulaire au sein des pansements et la fonctionnalité de ceux-ci ont été quantifiées à l'aide d'essais *in vitro* effectués à l'interface air-liquide. De manière générale, les résultats ont montré que les pansements biologiques semblaient toujours fonctionnels, du moins en partie, après que leurs côtés externes aient été exposés 96 heures à l'air. En effet, les dosages de molécules bioactives ont souligné la présence d'Ang-1 et de HGF à des niveaux similaires à ceux obtenus pour les contrôles submergés. Cependant, la forte diminution de la sécrétion de leptine tout au long du contact à l'air, l'absence de VEGF au troisième jour pour les pansements adipeux et au quatrième jour pour les pansements conjonctifs, de même que l'augmentation importante de la mortalité des cellules pour les pansements conjonctifs entre le troisième et le quatrième jour ont toutes été considérées comme des facteurs «limitants». La décision d'effectuer des changements de pansements aux trois jours a été prise. Bien qu'ils soient moins importants au troisième jour de contact avec l'air, les niveaux de sécrétion des pansements démontrent toujours un potentiel bioactif sur les tissus lésés à la suite d'un passage de trois jours à l'interface air-liquide.

Dans l'optique de caractériser les impacts du contact de l'air sur les cellules à l'intérieur des tissus produits, la répétition des expériences *in vitro* serait à envisager. D'une part, cela permettrait d'augmenter la validité statistique des essais effectués ($N = 1$, $n = 3$ ou 4). D'autre part, il serait intéressant d'observer le comportement des pansements en contact avec l'air sur une durée plus importante que quatre jours. En effet, les forts niveaux d'Ang-1 et de HGF présents indiquent que le tissu conserve une certaine fonctionnalité au delà du quatrième jour. Des périodes allant jusqu'à 7 ou 14 jours pourraient être considérées afin d'avoir un portrait complet des effets de l'air sur les pansements. Les pansements biologiques actuellement utilisés en clinique sont habituellement réappliqués à tous les 7 jours. Le dosage de plusieurs autres molécules intéressantes pourrait avantageusement parachever le profil de sécrétion des pansements. Des molécules telles que IL-6, IL-8, MCP-1, CSF-1 et 2, IGF, TGF- β , bFGF pourraient toutes être d'excellentes candidates afin de mieux connaître l'étendue des effets médiés par les pansements *in vivo*. La possibilité de pouvoir changer les pansements moins souvent serait intéressante du côté clinique et économique, puisqu'une fréquence de changement de pansements plus espacée réduirait le nombre de pansements utilisés permettrait au personnel soignant de minimiser les temps de traitements.

4.2 Avantages de l'usage des animaux à épiderme fluorescent

L'originalité de notre devis expérimental repose en partie sur l'usage de souris K14-H2B-GFP (Rendl, Polak et al. 2008). Tel qu'expliqué précédemment, ces souris transgéniques expriment la GFP conjuguée à l'histone 2B sous le promoteur de la K14. Ainsi, tous les noyaux des cellules exprimant la K14, tels que les kératinocytes de l'épiderme, émettent une fluorescence verte sous une lumière UV. L'utilisation de ces souris offre un avantage considérable puisqu'elles permettent l'étude spécifique de la réépithélialisation. Il est donc possible d'observer l'avancée des kératinocytes sans sacrifier les animaux, avec l'aide d'un appareil d'imagerie macroscopique non invasif de la fluorescence. À l'heure actuelle, aucune équipe s'intéressant à la réépithélialisation des plaies ne possède les outils afin de suivre de manière spécifique et exacte l'avancée des kératinocytes. Ces équipes s'appuient plutôt sur des études histologiques afin de discuter de la réépithélialisation des plaies. Ce type d'analyse, bien qu'informatif, est cependant moins précis et moins exact pour calculer des cinétiques relatives à l'avancée de la langue de migration de l'épiderme.

4.3 Effets des pansements conjonctifs et adipeux sur la guérison des plaies

L'hypothèse de recherche se base sur des éléments dans la littérature scientifique des dernières années qui soulignent fortement les impacts positifs des CSTA en médecine régénératrice (section 1.3.2). Toutefois, une série d'articles publiés récemment suggère que les adipocytes, un type cellulaire n'étant traditionnellement pas considéré comme un joueur dans les processus cicatriciels, pourraient également avoir des effets bénéfiques sur la guérison des plaies. Ces articles, bien que peu nombreux, proviennent de divers horizons : des histoires de cas cliniques, ainsi que des recherches fondamentales en biologie cellulaire et moléculaire. Une équipe de médecins américains a notamment publié deux histoires de cas cliniques s'intéressant aux propriétés régénératrices du tissu adipeux. Dans la première (Klinger, Marazzi et al. 2008), les cliniciens ont dénoté l'amélioration de l'apparence de cicatrices hypertrophiques résultantes de brûlures sévères au visage suite à l'injection sous-cutanée de gras autologue. Dans la seconde (Klinger, Caviggioli et al. 2010), les injections sous-cutanées de tissu adipeux ont stimulé la fermeture des plaies dans des contextes d'ulcères chroniques des membres inférieurs récalcitrants à la guérison. Même si ces auteurs ne se sont pas intéressés aux mécanismes cellulaires ou tissulaires pouvant expliquer ce phénomène, ils ont mis en évidence l'importance du tissu adipeux sur la qualité de la peau régénérée. Par la suite, d'autres études ont confirmé la présence des effets bénéfiques du tissu adipeux sur la réparation tissulaire. Ces études se sont également intéressées aux processus cicatriciels favorisés par la présence de ces cellules (Sultan, Barr et al. 2012, Loder, Peterson et al. 2014). Elles ont montrés que les effets régénérateurs de la présence des adipocytes sont attribuables à

leur capacité à stimuler la néo-vascularisation et la formation du tissu de granulation aux seins de cicatrices hypertrophiques. Grâce à des analyses histologiques, les auteurs ont su démontrer les effets du tissu adipeux au niveau du tissu de granulation et de la vascularisation de cicatrices créées à la suite de choc thermique.

Les effets stimulants des pansements sur les phases de la guérison ont été mis en valeur au cours de la cinétique de guérison globale des plaies. En effet, il a été observé que les deux groupes ayant reçu des pansements ont accéléré les cinétiques de fermeture des plaies comparativement au groupe non traité. Bien qu'aucune différence significative n'ait été dénotée entre les cinétiques des deux types de traitements, l'accélération de la fermeture des plaies de ces deux groupes a même atteint une amplitude de trois jours d'avance sur les plaies sans pansement. Toutefois, les images macroscopiques ne permettaient pas de distinguer quels processus, parmi l'inflammation, la réépithélialisation, la formation du tissu de granulation et la néovascularisation, contribuaient à l'accélération de la fermeture des plaies observée. Grâce à un appareil d'imagerie de la fluorescence permettant la visualisation de la présence de cellules exprimant la GFP, l'examen de l'avancée des langues de migration des kératinocytes a révélé une absence de différences entre les groupes expérimentaux. Cette absence de différence pourrait s'expliquer par le fait que le modèle de plaies sélectionné, qui est favorable à la migration des kératinocytes, aurait atteint un plateau relativement à la vitesse de migration. En effet, la prolifération et la migration cellulaire s'effectuent d'une part dans un environnement humide (Gottrup, Apelqvist et al. 2013), ainsi que dans un modèle de plaies non chroniques. Les conditions optimales sont donc réunies pour une réépithélialisation déjà très efficace. Ainsi, il serait raisonnable d'anticiper que ces résultats puissent être différents dans un modèle de plaies chroniques, voire diabétiques, qui sont reconnues pour leur guérison ralentie et altérée. Nous ne pouvons exclure que le retrait des pansements puisse être une source potentielle de stress ayant affecté la migration des cellules de l'épiderme. Toutefois, l'avancée des kératinocytes observée en fluorescence au cours des 18 jours de guérison suggère que les impacts du changement des pansements seraient négligeables.

De leur côté, les pansements adipeux ont montré qu'ils semblent influencer deux mécanismes importants au niveau de la phase proliférative de la guérison des plaies : la formation du tissu de granulation et la néo-vascularisation. En effet, l'apparence histologique des trois groupes expérimentaux a révélé une homogénéité accrue dans les tissus de granulation qui ont été traités avec les pansements adipeux durant 18 jours. Les tissus de granulation des groupes traités étaient également plus épais que ceux du groupe non traité. Le nombre similaire de leucocytes dans les plaies, identifiés par le marquage du récepteur de surface CD45, confirme que les différences d'épaisseur observées ne sont pas dues à des différences entre les infiltrations cellulaires des deux conditions, mais à une sécrétion de la matrice par les cellules mésenchymateuses. Les colorations au rouge picrosirius soulignent une présence plus marquée des fibres de collagènes dans les tissus de granulation des plaies traitées avec les pansements adipeux. Ces résultats histologiques démontrent

bien les effets des cellules contenues dans les pansements adipeux sur les cellules dermiques. Ces données vont dans le même sens que la littérature, où l'intercommunication des adipocytes avec les cellules dermiques a été démontrée dans un contexte de lésions cutanées (Schmidt and Horsley 2013). Enfin, le marquage des structures positives au CD31 indique que le groupe de plaies traitées à l'aide des pansements adipeux a favorisé l'angiogenèse lors de la cicatrisation. Les quelques articles de la littérature scientifique s'intéressant aux rôles joués par le tissu adipeux dans des contextes de réparations tissulaires cutanées mentionnés ci-haut confirment les résultats obtenus (Sultan, Barr et al. 2012, Loder, Peterson et al. 2014). En effet, les effets régénérateurs de la présence des adipocytes ont été attribués à leur capacité à stimuler la néo-vascularisation et la formation du tissu de granulation dans ces études.

La faible puissance statistique du groupe des pansements conjonctifs n'a pas permis l'obtention de résultats aussi probants que ceux du groupe des pansements adipeux. Tel qu'expliqué précédemment, cela est dû au faible nombre de réplicats biologiques (quatre des six réplicats biologiques n'étant pas disponibles) lors des analyses histologiques des plaies qui ont reçu des pansements conjonctifs. À la lumière des tendances observées dans les données préliminaires issues de ce groupe, il serait plausible de penser que ces derniers agiraient de manière similaire aux pansements adipeux. À l'heure actuelle, il reste tout de même impossible de dire avec certitude que la formation du tissu de granulation et la néovascularisation des plaies seraient affectées de la même façon et dans le même ordre de grandeur que dans le cas de l'usage des pansements adipeux. Des études supplémentaires seraient nécessaires afin de confirmer les tendances observées. De plus, il est important de mentionner que la perte des tissus étant seulement subvenue dans une des deux expériences animales (cohorte de souris mâles ayant été utilisée pour les analyses histologiques), un nombre statistiquement valable d'échantillons a toutefois permis d'effectuer les analyses statistiques des cinétiques de fermeture des plaies (guérison globale et réépithélialisation). Les résultats issus des cinétiques, indiquant que les pansements conjonctifs ont des effets comparables aux pansements adipeux et qu'ils améliorent les vitesses globales de guérison indépendamment de la réépithélialisation, sont donc valides.

Un autre point appuyant l'hypothèse des modes d'action similaires entre les deux types de pansements est la présence des CSTA au sein des deux types de pansements. Malgré un nombre important d'adipocytes, les pansements adipeux comprennent toujours une proportion importante de cellules stromales non différenciées en adipocytes. Les effets des CSTA pourraient donc être perceptibles dans les deux groupes expérimentaux. Plusieurs études ont également démontré que les CSTA, employées avec différentes stratégies telles que des techniques de thérapie cellulaire ou bien d'ingénierie tissulaire, favorisent la réparation du compartiment dermique en stimulant la formation du tissu de granulation par les fibroblastes et en stimulant les cellules endothéliales responsables de l'angiogenèse. Ces résultats ont d'ailleurs été confirmés dans les divers contextes de lésions cutanées explorés : tests de migration *in vitro*, tests de co-culture, plaies excisionnelles

murines sans extenseurs, plaies excisionnelles pleines épaisseurs avec extenseurs en silicone effectuées chez la souris, plaies excisionnelles pleines épaisseurs sans extenseurs en silicone effectuées chez le rat et plaies pleines épaisseurs chez le porc (Kim, Park et al. 2007, Altman, Yan et al. 2009, Kim, Zhang et al. 2012, Meruane, Rojas et al. 2012, Yun, Jeon et al. 2012). Les impacts de l'utilisation de pansements produits à l'aide de la méthode d'auto-assemblage et contenant des CSTA vont donc dans le même sens que d'autres méthodes qui utilisent ces cellules et qui sont présentées dans la littérature. Les présents travaux sont donc en quelque sorte validés par les travaux d'autres équipes de recherche, mais se distinguent par l'originalité des techniques d'analyse, le choix du modèle animal et l'usage temporaire des pansements. Finalement, les pansements adipeux et conjonctifs ne semblent pas avoir eu d'impact sur les propriétés mécaniques des tissus cicatriciels dans le contexte des études encourues. Cette absence de différence est peut-être due à la fenêtre de temps durant laquelle les propriétés ont été vérifiées. L'évaluation de ces propriétés pourrait être faite lors de la période de remodelage, afin de vérifier si les pansements n'ont pas un effet au cours de cette phase de la guérison.

Les données provenant des cinétiques de guérison globale, des cinétiques de réépithélialisation et des épaisseurs des compartiments dermiques 18 jours après la création des plaies laissent entrevoir que les deux types de pansements biologiques testés seraient égaux dans leur capacité à augmenter les processus cicatriciels. Ainsi, il semblerait que les effets synergiques des diverses molécules bioactives sécrétées par les pansements conjonctifs et adipeux soient équivalents. De manière intéressante, les effets similaires des pansements sur la guérison concordent avec les résultats du dosage de ces cinq molécules, soit la leptine, VEGF, HGF, Ang-1 et PAI-1. En effet, bien que les patrons de sécrétion des deux pansements soient différents, les effets synergiques de ces molécules ne sont pas prédictibles : certaines molécules sont produites de manière plus élevée par les pansements conjonctifs, d'autres par les pansements adipeux. De plus, il est important de ne pas perdre de vue que ces cinq molécules, importantes pour la formation du tissu de granulation et pour l'angiogenèse qui ont été utilisées comme des «rapporteurs», ne représentent qu'un petit échantillon de toutes les molécules sécrétées par les CSTA et les adipocytes qui peuvent avoir des effets sur la réparation tissulaire. Des études plus poussées du sécrétome seraient donc nécessaires afin d'avoir un portrait plus complet de la situation.

Une des rares études de biologie moléculaire, s'étant intéressée à la communication entre les adipocytes et les autres cellules impliquées dans la guérison cutanée, aborde dans le même sens que les données acquises avec les pansements adipeux (Schmidt and Horsley 2013). En outre, les auteurs ont tenté d'évaluer l'importance de la présence des cellules adipeuses sur les fibroblastes et les kératinocytes dans un modèle de plaies murines chroniques, le tout, à l'aide d'animaux dépourvus d'adipocytes de manière génétique et pharmacologique. En l'absence d'adipocytes dans les modèles génétiques et pharmacologiques, la présence

de fibroblastes et le dépôt de la matrice extracellulaire ont été altérés, ce qui menait à une réparation cutanée anormale. Les résultats ont également dénoté que la présence ou l'absence des kératinocytes ne modifiaient pas le comportement migratoire et prolifératif de ces cellules. Ces résultats suggèrent donc que la communication directe entre les adipocytes et les fibroblastes est un facteur important afin d'induire des mécanismes de prolifération, de migration et de sécrétion de composants de la matrice extracellulaire par les fibroblastes. Il est donc plausible de considérer que l'application d'un pansement contenant des adipocytes et des CSTA puisse contribuer de manière similaire à stimuler les fibroblastes résidents au pourtour des plaies. Une autre étude a permis de démontrer les effets sur la phase proliférative de la réparation tissulaire suite à une injection unique de tissu adipeux (Sultan, Barr et al. 2012). Dans leur modèle de cicatrices issues de brûlures thermiques chez la souris, les auteurs ont su mettre en évidence l'augmentation de l'angiogenèse et la diminution de la fibrose responsable de l'augmentation de rigidité au site des cicatrices.

Dans le contexte actuel, les tissus reconstruits par la méthode d'auto-assemblage démontrent un potentiel clinique appréciable. Afin de confirmer celui-ci, il serait important de reconduire une série d'expériences dans le modèle d'étude employé. D'abord, celles-ci auraient le grand avantage d'augmenter la puissance statistique de l'étude. Ceci est non négligeable, surtout si l'on prend en considération que la perte d'échantillons de groupe des pansements conjonctifs a empêché de tirer des conclusions quant à leur mode d'action. Un incontournable pour la suite du projet reste la réalisation d'expériences dans un contexte de plaies chroniques. Ce type d'expériences permettrait de se rapprocher davantage des cas observés en clinique: la cible d'action thérapeutique de ces pansements étant les plaies humaines récalcitrantes à la guérison. La réalisation d'un modèle d'étude des plaies chroniques est relativement aisée. Tel que démontré par des expériences préliminaires non présentées dans le cadre de cet ouvrage, le modèle d'anneau de silicone est applicable à de nombreuses espèces de souris, dont des souris transgéniques diabétiques telles que les souris *db/db* et les souris NONcNZO/LtJ (Fang, Kryger et al. 2010). Tous comme les humains, les souris diabétiques ont également un phénotype de plaies récalcitrantes à la guérison (Michaels, Churgin et al. 2007). Ces souris ont un diabète de type II, caractéristique des gens développant des ulcères cutanés. L'utilisation de ces souris comporte cependant un désavantage de taille : la perte de la possibilité d'effectuer un suivi spécifique des kératinocytes grâce à l'imagerie macroscopique de la fluorescence. Pour contrer ce problème, il serait possible d'induire un diabète chez les souris K14-H2B-GFP. Plusieurs substances, dont la streptozotocine, permettent d'induire un diabète de type I chez les animaux traités (Graham, Janecek et al. 2011).

4.4 Stratégies d'utilisation des pansements biologiques

Afin de permettre l'étude de l'impact des pansements conjonctifs et adipeux sur la guérison cutanée, quelques modifications ont été apportées au modèle de plaies murines pleines épaisseurs avec extenseurs cutanés en silicone sélectionné (modèle de Galiano et al. 2004). Pour ce faire, un treillis siliconé atraumatique et de l'hydrogel isotonique ont été employés sous la membrane semi-occlusive. L'usage du treillis, fréquent en clinique, a permis de réduire au maximum les impacts du retrait des couches supérieures du bandage sur la langue de migration des plaies lors des changements de pansements. L'ajout de cet élément s'est avéré très important, puisque des essais ayant été effectués sans ce treillis (résultats non présentés) avaient mis en évidence l'altération des langues de migration lors du retrait des membranes semi-occlusives. Pour sa part, l'hydrogel isotonique, utilisé conjointement avec la pellicule semi-occlusive, permet de conserver la plaie et les pansements biologiques dans un milieu humide. Ce milieu humide est important afin de réduire la mortalité cellulaire au sein des pansements d'une part, mais également puisqu'un milieu humide est habituellement conseillé pour la guérison de plaies complexes (Gottrup, Apelqvist et al. 2013).

Afin de ne pas être confrontés à la problématique des changements de pansements et à la possibilité de désorganisation de la langue de migration, plusieurs auteurs ont opté pour un dépôt unique de leur propre pansement reconstruit dans le lit des plaies au jour de chirurgie (Altman, Yan et al. 2009, Huang, Hsu et al. 2012, Cerqueira, da Silva et al. 2014). Puisque ces trois études ont été faites en étudiant des modèles de plaies pleines épaisseurs murines sans extenseur, il est plus ardu d'effectuer une translation de leurs résultats à notre contexte expérimental. Toutefois, les trois études ont dénoté une augmentation de la néovascularisation des tissus cicatriciels comparativement aux groupes contrôles, ce qui va dans le même sens que les résultats observés dans nos expérimentations.

Bien que les effets positifs de ces pansements contenant des CSTA aient été démontrés dans les modèles utilisant un dépôt unique des pansements, la présence de cellules allogéniques «greffées» comporte des risques de rejets immunologiques. La méthode de changements de pansements que nous proposons permettrait de diminuer fortement les risques de rejet immunologiques, puisque le retrait des pansements aux trois jours empêche une intégration de la matrice extracellulaire et des cellules des pansements vers les tissus de l'hôte. La méthode proposée permettrait également une utilisation, théorique, immédiate des pansements. Puisque l'utilisation de cellules allogéniques est envisageable dans cette stratégie, elle permettrait la production, la standardisation et l'entreposage à moyen terme des produits en amont.

Il est important de mentionner que l'élaboration de pansements autologues reste tout de même une avenue envisageable et attrayante en médecine régénératrice. L'utilisation de cellules autologues demeure en effet un avantage majeur dans une optique de soins. Des études prospectives sur les humains ont déjà testé l'usage

de pansements produits à partir de la méthode d'auto-assemblage en utilisant des fibroblastes dermiques des patients (Boa, Cloutier et al. 2013). Celle-ci s'est montrée très efficace. Les méthodes autologues comportent cependant quelques inconvénients. D'abord, les temps de productions de pansements autologues suite à un diagnostic de plaies chroniques ne permettraient pas une utilisation clinique aussi rapide que des produits déjà accessibles sur les tablettes. Cela a donc un désavantage concurrentiel où d'autres techniques plus rapides et plus accessibles pourraient être préférées. Ensuite, les CSTA devront être extraites de tissus prélevés directement du patient. Bien qu'étant très accessible et peu invasive, l'obtention de biopsies (lipoaspiration, lipectomie, etc.) desquelles des cellules pourraient être extraites créerait inévitablement des plaies additionnelles, et ce, chez des gens souffrant déjà de guérison cutanée retardée. Enfin, il est reconnu que des cellules souches adultes issues de patients ayant un état de santé altéré par l'âge ou par certaines maladies sont habituellement moins nombreuses et moins performantes que celles issues de patients sains. Les travaux présentés par Onate *et al.* en 2012 abondent en ce sens et démontrent que le nombre de CSTA provenant de tissus de patients souffrant d'obésité sévère et de syndrome métabolique est plus faible que le nombre de CSTA provenant de patients sains (Onate, Vilahur et al. 2012). Cette même étude a également mis en lumière, à l'aide d'essais de co-culture *in vitro*, la diminution des propriétés pro-angiogéniques des CSTA issues des groupes de patients malades.

Ainsi, la stratégie des changements de pansements que nous avons mise de l'avant offre une alternative supplémentaire qui s'insère bien parmi les modes d'utilisation des pansements de CSTA dans le traitement de lésion cutanée. Même si le changement de pansements en soi peut s'avérer être un certain désavantage au niveau de la manipulation, celui-ci permet d'empêcher l'intégration de la matrice et des cellules aux tissus de l'hôte lors de la réparation tissulaire. Bien que nous assumions que le retrait physique de la totalité du tissu reconstruit permet d'empêcher l'intégration de celui-ci, ou bien les cellules qu'il contient, des tests seront requis afin de le démontrer hors de tout doute. Toutefois, l'observation de coupe histologique des pansements à la suite de leur passage sur les souris (résultats non présentés) ne semble pas indiquer la présence de migration des cellules du pansement vers le lit de la plaie. Dans une optique de fabrication d'un produit utilisé en clinique, des paramètres permettant la sélection de populations cellulaires performantes devront également être établis. La réalisation d'essais *in vitro* à l'interface air-liquide pourrait permettre de cibler des populations plus adaptées à un contexte de pansements biologiques produits par la méthode d'auto-assemblage, puisque les populations performantes seront celles qui sécrètent de hauts niveaux de molécules bioactives pendant qu'un côté des pansements est en contact avec l'air.

Conclusion

Grâce aux techniques d'auto-assemblage mises au point par l'équipe de Dre Fradette, la fabrication de tissus conjonctifs et de tissus adipeux humains reconstruits à partir des CSTA est possible. Lors de la production de ces tissus, la matrice extracellulaire assemblée par les cellules possède une robustesse et une souplesse qui donne une maniabilité essentielle aux pansements biologiques. Cette malléabilité rend possible le dépôt et le retrait de pansements sur des plaies.

L'utilisation des CSTA demeure une avenue très intéressante en médecine régénératrice de par leur qualité intrinsèque à pouvoir stimuler les processus de réparation tissulaire, mais également grâce à leur abondance et leur accessibilité. L'utilisation du tissu adipeux en tant que tissu pouvant stimuler la réparation cutanée émerge présentement dans la littérature. Ce tissu, jusqu'à ce jour peu étudié pour ses capacités régénératrices, s'avère être une cible de choix dans les études de guérison des plaies.

Les résultats provenant de la quantification de molécules bioactives sécrétées par les pansements confirment d'ailleurs le potentiel des cellules qui les composent. Ces molécules, pro-angiogéniques et pro-prolifératives, expliqueraient les effets observés lors des expériences animales.

Le modèle de guérison des plaies *in vivo* a su être adapté et a confirmé sa validité en permettant l'étude des impacts des pansements biologiques. L'utilisation conjointe du modèle d'étude des plaies pleines épaisseurs avec extenseurs en silicone et des souris K14-H2B-GFP a également permis de répondre à un besoin dans le domaine, soit le développement d'outils adéquats supportant l'évaluation spécifique et précise de l'avancée des langues de migration de kératinocytes dans le temps.

Les deux types de pansements produits se sont montrés tout aussi efficaces à promouvoir l'accélération de la fermeture des plaies observées sur les images macroscopiques. Les modes d'action de cette accélération ont pu être déterminés dans le groupe de plaies traitées avec des pansements adipeux. Les mécanismes soutenant la guérison accélérée se sont révélés être indépendants de la réépithélialisation, mais dépendants de la formation du tissu de granulation et de la néo-vascularisation au site des lésions.

Des études *in vivo* ultérieures portant sur des animaux souffrant de guérison des plaies altérée devront être réalisées afin d'évaluer les impacts des pansements dans des modèles de plaies chroniques qui se rapprochent davantage des cas observés en clinique.

Bibliographie

Abderrahim-Ferkoune, A., O. Bezy, C. Chiellini, M. Maffei, P. Grimaldi, F. Bonino, N. Moustaid-Moussa, F. Pasqualini, A. Mantovani, G. Ailhaud and E. Z. Amri (2003). "Characterization of the long pentraxin PTX3 as a TNFalpha-induced secreted protein of adipose cells." J Lipid Res **44**(5): 994-1000.

Adams, R. H. and K. Alitalo (2007). "Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(6): 464-478.

Ahn, S. T. and T. A. Mustoe (1990). "Effects of ischemia on ulcer wound healing: a new model in the rabbit ear." Ann Plast Surg **24**(1): 17-23.

Ailhaud, G. (2006). "Adipose tissue as a secretory organ: from adipogenesis to the metabolic syndrome." C R Biol **329**(8): 570-577; discussion 653-575.

Altman, A. M., F. J. Abdul Khalek, M. Seidensticker, S. Pinilla, Y. Yan, M. Coleman, Y. H. Song, C. E. Butler and E. U. Alt (2010). "Human tissue-resident stem cells combined with hyaluronic acid gel provide fibrovascular-integrated soft-tissue augmentation in a murine photoaged skin model." Plast Reconstr Surg **125**(1): 63-73.

Altman, A. M., Y. Yan, N. Matthias, X. Bai, C. Rios, A. B. Mathur, Y. H. Song and E. U. Alt (2009). "IFATS collection: Human adipose-derived stem cells seeded on a silk fibroin-chitosan scaffold enhance wound repair in a murine soft tissue injury model." Stem Cells **27**(1): 250-258.

Amos, P. J., S. K. Kapur, P. C. Stapor, H. Shang, S. Bekiranov, M. Khurgel, G. T. Rodeheaver, S. M. Peirce and A. J. Katz (2010). "Human adipose-derived stromal cells accelerate diabetic wound healing: impact of cell formulation and delivery." Tissue Eng Part A **16**(5): 1595-1606.

Argenta, L. C. and M. J. Morykwas (1997). "Vacuum-assisted closure: a new method for wound control and treatment: clinical experience." Ann Plast Surg **38**(6): 563-576; discussion 577.

Aubin, K., C. Vincent, M. Proulx, D. Mayrand and J. Fradette (2014). "Creating capillary networks within human engineered tissues: Impact of adipocytes and their secretory products." Acta Biomater **11C**: 333-345.

Banks-Schlegel, S. and H. Green (1981). "Involucrin synthesis and tissue assembly by keratinocytes in natural and cultured human epithelia." J Cell Biol **90**(3): 732-737.

Bastelica, D., P. Morange, B. Berthet, H. Borghi, O. Lacroix, M. Grino, I. Juhan-Vague and M. C. Alessi (2002). "Stromal cells are the main plasminogen activator inhibitor-1-producing cells in human fat: evidence of differences between visceral and subcutaneous deposits." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(1): 173-178.

Blais, M., P. Levesque, S. Bellenfant and F. Berthod (2013). "Nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3 and glial-derived neurotrophic factor enhance angiogenesis in a tissue-engineered in vitro model." Tissue Eng Part A **19**(15-16): 1655-1664.

Boa, O., C. B. Cloutier, H. Genest, R. Labbe, B. Rodrigue, J. Soucy, M. Roy, F. Arsenault, C. E. Ospina, N. Dube, M. H. Rochon, D. Larouche, V. J. Moulin, L. Germain and F. A. Auger (2013). "Prospective study on the treatment of lower-extremity chronic venous and mixed ulcers using tissue-engineered skin substitute made by the self-assembly approach." Adv Skin Wound Care **26**(9): 400-409.

Borradori, L. and A. Sonnenberg (1999). "Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes." J Invest Dermatol **112**(4): 411-418.

Bourin, P., B. A. Bunnell, L. Casteilla, M. Dominici, A. J. Katz, K. L. March, H. Redl, J. P. Rubin, K. Yoshimura and J. M. Gimble (2013). "Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT)." Cytotherapy **15**(6): 641-648.

Cerqueira, M. T., L. P. da Silva, T. C. Santos, R. P. Pirraco, V. M. Corrello, R. L. Reis and A. P. Marques (2014). "Gellan Gum-Hyaluronic Acid Spongy-like Hydrogels and Cells from Adipose Tissue Synergize Promoting Neoskin Vascularization." ACS Appl Mater Interfaces **6**(22): 19668-19679.

Chen, L., E. E. Tredget, P. Y. Wu and Y. Wu (2008). "Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing." PLoS ONE **3**(4): e1886.

Chen, X., S. W. Cushman, L. K. Pannell and S. Hess (2005). "Quantitative proteomic analysis of the secretory proteins from rat adipose cells using a 2D liquid chromatography-MS/MS approach." J Proteome Res **4**(2): 570-577.

Cherubino, M., J. P. Rubin, N. Miljkovic, A. Kelmendi-Doko and K. G. Marra (2011). "Adipose-derived stem cells for wound healing applications." Ann Plast Surg **66**(2): 210-215.

Collawn, S. S., N. S. Banerjee, J. de la Torre, L. Vasconez and L. T. Chow (2012). "Adipose-derived stromal cells accelerate wound healing in an organotypic raft culture model." Ann Plast Surg **68**(5): 501-504.

Cook, K. S., D. L. Groves, H. Y. Min and B. M. Spiegelman (1985). "A developmentally regulated mRNA from 3T3 adipocytes encodes a novel serine protease homologue." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(19): 6480-6484.

Dallabrida, S. M., D. Zurakowski, S. C. Shih, L. E. Smith, J. Folkman, K. S. Moulton and M. A. Rupnick (2003). "Adipose tissue growth and regression are regulated by angiopoietin-1." Biochem Biophys Res Commun **311**(3): 563-571.

Davidson, J. M. (1998). "Animal models for wound repair." Arch Dermatol Res **290** **Suppl**: S1-11.

Davidson, J. M., F. Yu and S. R. Opalenik (2013). "Splinting Strategies to Overcome Confounding Wound Contraction in Experimental Animal Models." Adv Wound Care (New Rochelle) **2**(4): 142-148.

- Desmouliere, A., C. Chaponnier and G. Gabbiani (2005). "Tissue repair, contraction, and the myofibroblast." Wound Repair Regen **13**(1): 7-12.
- Dobson, D. E., A. Kambe, E. Block, T. Dion, H. Lu, J. J. Castellot, Jr. and B. M. Spiegelman (1990). "1-Butyryl-glycerol: a novel angiogenesis factor secreted by differentiating adipocytes." Cell **61**(2): 223-230.
- Ebrahimian, T. G., F. Pouzoulet, C. Squiban, V. Buard, M. Andre, B. Cousin, P. Gourmelon, M. Benderitter, L. Casteilla and R. Tamarat (2009). "Cell Therapy Based on Adipose Tissue-Derived Stromal Cells Promotes Physiological and Pathological Wound Healing." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(4): 503-510.
- Engel, J. and M. Chiquet (2011). An Overview of Extracellular Matrix Structure and Function. The Extracellular Matrix: an Overview. R. P. Mecham, Springer Berlin Heidelberg: 440 pages.
- Fain, J. N. (2006). "Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells." Vitam Horm **74**: 443-477.
- Fain, J. N., A. K. Madan, M. L. Hiler, P. Cheema and S. W. Bahouth (2004). "Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans." Endocrinology **145**(5): 2273-2282.
- Falanga, V. and M. Sabolinski (1999). "A bilayered living skin construct (APLIGRAF) accelerates complete closure of hard-to-heal venous ulcers." Wound Repair Regen **7**(4): 201-207.
- Falanga, V., D. Schrayner, J. Cha, J. Butmarc, P. Carson, A. B. Roberts and S. J. Kim (2004). "Full-thickness wounding of the mouse tail as a model for delayed wound healing: accelerated wound closure in Smad3 knock-out mice." Wound Repair Regen **12**(3): 320-326.
- Fang, R. C., Z. B. Kryger, D. W. Buck, 2nd, M. De la Garza, R. D. Galiano and T. A. Mustoe (2010). "Limitations of the db/db mouse in translational wound healing research: Is the NONcNZO10 polygenic mouse model superior?" Wound Repair Regen **18**(6): 605-613.
- Fathke, C., L. Wilson, J. Hutter, V. Kapoor, A. Smith, A. Hocking and F. Isik (2004). "Contribution of bone marrow-derived cells to skin: collagen deposition and wound repair." Stem Cells **22**(5): 812-822.
- Fonder, M. A., G. S. Lazarus, D. A. Cowan, B. Aronson-Cook, A. R. Kohli and A. J. Mamelak (2008). "Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings." J Am Acad Dermatol **58**(2): 185-206.
- Fu, X. and H. Li (2009). "Mesenchymal stem cells and skin wound repair and regeneration: possibilities and questions." Cell Tissue Res **335**(2): 317-321.
- Fuchs, E. and H. Green (1980). "Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte." Cell **19**(4): 1033-1042.

Fuchs, E. and K. Weber (1994). "Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease." Annu Rev Biochem **63**: 345-382.

Galiano, R. D., J. t. Michaels, M. Dobryansky, J. P. Levine and G. C. Gurtner (2004). "Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing." Wound Repair Regen **12**(4): 485-492.

Germain, L., F. A. Auger, E. Grandbois, R. Guignard, M. Giasson, H. Boisjoly and S. L. Guerin (1999). "Reconstructed human cornea produced in vitro by tissue engineering." Pathobiology **67**(3): 140-147.

Gimble, J. M., A. J. Katz and B. A. Bunnell (2007). "Adipose-derived stem cells for regenerative medicine." Circ Res **100**(9): 1249-1260.

Goldman, R. (2004). "Growth factors and chronic wound healing: past, present, and future." Adv Skin Wound Care **17**(1): 24-35.

Gottrup, F., J. Apelqvist, T. Bjansholt, R. Cooper, Z. Moore, E. J. Peters and S. Probst (2013). "EWMA document: Antimicrobials and non-healing wounds. Evidence, controversies and suggestions." J Wound Care **22**(5 Suppl): S1-89.

Goulet, F., A. Poitras, M. Rouabhia, D. Cusson, L. Germain and F. A. Auger (1996). "Stimulation of human keratinocyte proliferation through growth factor exchanges with dermal fibroblasts in vitro." Burns **22**(2): 107-112.

Graham, M. L., J. L. Janecek, J. A. Kittredge, B. J. Hering and H. J. Schuurman (2011). "The streptozotocin-induced diabetic nude mouse model: differences between animals from different sources." Comp Med **61**(4): 356-360.

Greenwald, D. P., L. J. Gottlieb, D. P. Mass, S. M. Shumway and M. Temaner (1992). "Full-thickness skin wound explants in tissue culture: a mechanical evaluation of healing." Plast Reconstr Surg **90**(2): 289-294.

Guo, L., L. Degenstein and E. Fuchs (1996). "Keratinocyte growth factor is required for hair development but not for wound healing." Genes Dev **10**(2): 165-175.

Guo, S. and L. A. Dipietro (2010). "Factors affecting wound healing." J Dent Res **89**(3): 219-229.

Harrison, C. A., C. M. Layton, Z. Hau, A. J. Bullock, T. S. Johnson and S. MacNeil (2007). "Transglutaminase inhibitors induce hyperproliferation and parakeratosis in tissue-engineered skin." Br J Dermatol **156**(2): 247-257.

Hauer, H. (2004). "The new concept of adipose tissue function." Physiol Behav **83**(4): 653-658.

Heldin, C. H. (1992). "Structural and functional studies on platelet-derived growth factor." EMBO J **11**(12): 4251-4259.

<http://smart.servier.fr/servier-medical-art>. (2014). "Banque d'image powerpoint." Retrieved décembre 2014.

<http://www.phac-aspc.gc.ca/cd-mc/publications/diabetes-diabete/facts-figures-faits-chiffres-2011/index-fra.php>. (2011). "Le diabète au Canada : Perspective de santé publique sur les faits et chiffres."

Huang, S. P., C. C. Hsu, S. C. Chang, C. H. Wang, S. C. Deng, N. T. Dai, T. M. Chen, J. Y. Chan, S. G. Chen and S. M. Huang (2012). "Adipose-derived stem cells seeded on acellular dermal matrix grafts enhance wound healing in a murine model of a full-thickness defect." Ann Plast Surg **69**(6): 656-662.

Hung, W. W., T. J. Hsieh, T. Lin, P. C. Chou, P. J. Hsiao, K. D. Lin and S. J. Shin (2011). "Blockade of the renin-angiotensin system ameliorates apelin production in 3T3-L1 adipocytes." Cardiovasc Drugs Ther **25**(1): 3-12.

Hunt, J. V., R. T. Dean and S. P. Wolff (1988). "Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing." Biochem J **256**(1): 205-212.

Jean, J., G. Bernard, A. Duque-Fernandez, F. A. Auger and R. Pouliot (2011). "Effects of serum-free culture at the air-liquid interface in a human tissue-engineered skin substitute." Tissue Eng Part A **17**(7-8): 877-888.

Jeffcoate, W. J. and K. G. Harding (2003). "Diabetic foot ulcers." Lancet **361**(9368): 1545-1551.

Jiang, D., Y. Qi, N. G. Walker, A. Sindrilaru, A. Hainzl, M. Wlaschek, S. MacNeil and K. Scharffetter-Kochanek (2013). "The effect of adipose tissue derived MSCs delivered by a chemically defined carrier on full-thickness cutaneous wound healing." Biomaterials **34**(10): 2501-2515.

Kanitakis, J. (2002). "Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin." Eur J Dermatol **12**(4): 390-399; quiz 400-391.

Khan, T., E. S. Muise, P. Iyengar, Z. V. Wang, M. Chandalia, N. Abate, B. B. Zhang, P. Bonaldo, S. Chua and P. E. Scherer (2009). "Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI." Mol Cell Biol **29**(6): 1575-1591.

Kim, I., J. E. Mogford, J. D. Chao and T. A. Mustoe (2001). "Wound epithelialization deficits in the transforming growth factor-alpha knockout mouse." Wound Repair Regen **9**(5): 386-390.

Kim, S. W., H. Z. Zhang, L. Guo, J. M. Kim and M. H. Kim (2012). "Amniotic Mesenchymal Stem Cells Enhance Wound Healing in Diabetic NOD/SCID Mice through High Angiogenic and Engraftment Capabilities." PLoS One **7**(7): e41105.

Kim, W. S., B. S. Park and J. H. Sung (2009). "The wound-healing and antioxidant effects of adipose-derived stem cells." Expert Opin Biol Ther **9**(7): 879-887.

Kim, W. S., B. S. Park, J. H. Sung, J. M. Yang, S. B. Park, S. J. Kwak and J. S. Park (2007). "Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts." J Dermatol Sci **48**(1): 15-24.

Klinger, M., F. Cavaggioli, V. Vinci, A. Salval and F. Villani (2010). "Treatment of chronic posttraumatic ulcers using autologous fat graft." Plast Reconstr Surg **126**(3): 154e-155e.

Klinger, M., M. Marazzi, D. Vigo and M. Torre (2008). "Fat injection for cases of severe burn outcomes: a new perspective of scar remodeling and reduction." Aesthetic Plast Surg **32**(3): 465-469.

Kubo, Y., S. Kaidzu, I. Nakajima, K. Takenouchi and F. Nakamura (2000). "Organization of extracellular matrix components during differentiation of adipocytes in long-term culture." In Vitro Cell Dev Biol Anim **36**(1): 38-44.

L'Heureux, N., S. Paquet, R. Labbe, L. Germain and F. A. Auger (1998). "A completely biological tissue-engineered human blood vessel." FASEB J **12**(1): 47-56.

Labbé, B. (2013). Évaluation de l'impact de nouveaux pansements biologiques sur la guérison de plaies cutanées in vitro. Maîtrise, Université Laval.

Labbe, B., G. Marceau-Fortier and J. Fradette (2011). "Cell sheet technology for tissue engineering: the self-assembly approach using adipose-derived stromal cells." Methods Mol Biol **702**: 429-441.

Langer, A. and W. Rogowski (2009). "Systematic review of economic evaluations of human cell-derived wound care products for the treatment of venous leg and diabetic foot ulcers." BMC Health Serv Res **9**: 115.

Laplante, A. F., L. Germain, F. A. Auger and V. Moulin (2001). "Mechanisms of wound reepithelialization: hints from a tissue-engineered reconstructed skin to long-standing questions." FASEB J **15**(13): 2377-2389.

Larouche, D., A. Lavoie, C. Paquet, C. Simard-Bisson and L. Germain (2010). "Identification of epithelial stem cells in vivo and in vitro using keratin 19 and BrdU." Methods Mol Biol **585**: 383-400.

LE Neures, K. (2009). "Processus Traumatiques; Unité d'enseignement 2.4." Édition Elsevier-Masson: 178.

Le Roith, D. (1997). "Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Insulin-like growth factors." N Engl J Med **336**(9): 633-640.

Levine, J. A., M. D. Jensen, N. L. Eberhardt and T. O'Brien (1998). "Adipocyte macrophage colony-stimulating factor is a mediator of adipose tissue growth." J Clin Invest **101**(8): 1557-1564.

Liang, C. C., A. Y. Park and J. L. Guan (2007). "In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro." Nat Protoc **2**(2): 329-333.

Lim, J. S. and G. Yoo (2010). "Effects of adipose-derived stromal cells and of their extract on wound healing in a mouse model." J Korean Med Sci **25**(5): 746-751.

Lin, Y. C., T. Grahovac, S. J. Oh, M. Ieraci, J. P. Rubin and K. G. Marra (2013). "Evaluation of a multi-layer adipose-derived stem cell sheet in a full-thickness wound healing model." Acta Biomater **9**(2): 5243-5250.

Loder, S., J. R. Peterson, S. Agarwal, O. Eboda, C. Brownley, S. DeLaRosa, K. Ranganathan, P. Cederna, S. C. Wang and B. Levi (2014). "Wound Healing Immediately Post-Thermal Injury Is Improved by Fat and Adipose-Derived Stem Cell Isografts." J Burn Care Res **36**(1): 70-76.

Maas-Szabowski, N., H. J. Stark and N. E. Fusenig (2000). "Keratinocyte growth regulation in defined organotypic cultures through IL-1-induced keratinocyte growth factor expression in resting fibroblasts." J Invest Dermatol **114**(6): 1075-1084.

Machula, H., B. Ensley and R. Kellar (2014). "Electrospun Tropoelastin for Delivery of Therapeutic Adipose-Derived Stem Cells to Full-Thickness Dermal Wounds." Adv Wound Care (New Rochelle) **3**(5): 367-375.

Maeda, K., K. Okubo, I. Shimomura, T. Funahashi, Y. Matsuzawa and K. Matsubara (1996). "cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1)." Biochem Biophys Res Commun **221**(2): 286-289.

Magnan, M., F. Berthod, M. F. Champigny, F. Soucy and S. Bolduc (2006). "In vitro reconstruction of a tissue-engineered endothelialized bladder from a single porcine biopsy." J Pediatr Urol **2**(4): 261-270.

Marston, W. A., J. Hanft, P. Norwood, R. Pollak and G. Dermagraft Diabetic Foot Ulcer Study (2003). "The efficacy and safety of Dermagraft in improving the healing of chronic diabetic foot ulcers: results of a prospective randomized trial." Diabetes Care **26**(6): 1701-1705.

Massague, J. (2012). "TGFbeta signalling in context." Nat Rev Mol Cell Biol **13**(10): 616-630.

Mayrand, D., A. Laforce-Lavoie, S. Larochelle, A. Langlois, H. Genest, M. Roy and V. J. Moulin (2012). "Angiogenic properties of myofibroblasts isolated from normal human skin wounds." Angiogenesis **15**(2): 199-212.

Mehrel, T., D. Hohl, J. A. Rothnagel, M. A. Longley, D. Bundman, C. Cheng, U. Lichti, M. E. Bisher, A. C. Steven, P. M. Steinert and et al. (1990). "Identification of a major keratinocyte cell envelope protein, loricrin." Cell **61**(6): 1103-1112.

Menon, G. and R. Ghadially (1997). "Morphology of lipid alterations in the epidermis: a review." Microsc Res Tech **37**(3): 180-192.

Meruane, M. A., M. Rojas and K. Marcelain (2012). "The use of adipose tissue-derived stem cells within a dermal substitute improves skin regeneration by increasing neoangiogenesis and collagen synthesis." Plast Reconstr Surg **130**(1): 53-63.

Michaels, J. t., S. S. Churgin, K. M. Blechman, M. R. Greives, S. Aarabi, R. D. Galiano and G. C. Gurtner (2007). "db/db mice exhibit severe wound-healing impairments compared with other murine diabetic strains in a silicone-splinted excisional wound model." Wound Repair Regen **15**(5): 665-670.

Michel, M., N. L'Heureux, R. Pouliot, W. Xu, F. A. Auger and L. Germain (1999). "Characterization of a new tissue-engineered human skin equivalent with hair." In Vitro Cell Dev Biol Anim **35**(6): 318-326.

Michel, M., N. Torok, M. J. Godbout, M. Lussier, P. Gaudreau, A. Royal and L. Germain (1996). "Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage." J Cell Sci **109 (Pt 5)**: 1017-1028.

Midwood, K. S. and J. E. Schwarzbauer (2002). "Tenascin-C modulates matrix contraction via focal adhesion kinase- and Rho-mediated signaling pathways." Mol Biol Cell **13(10)**: 3601-3613.

Miki, Y., K. Ono, S. Hata, T. Suzuki, H. Kumamoto and H. Sasano (2012). "The advantages of co-culture over mono cell culture in simulating in vivo environment." J Steroid Biochem Mol Biol **131(3-5)**: 68-75.

Moffatt, C. and P. Vowden (2008). "Document de référence EWMA : Plaies difficiles à cicatriser : une approche globale." MEP LTD 2008: 19 pages.

Moulin, V. J., D. Mayrand, H. Messier, M. C. Martinez, C. A. Lopez-Valle and H. Genest (2010). "Shedding of microparticles by myofibroblasts as mediator of cellular cross-talk during normal wound healing." J Cell Physiol **225(3)**: 734-740.

Munoz, M. J., J. A. Bea, J. F. Rodriguez, I. Ochoa, J. Grasa, A. Perez del Palomar, P. Zaragoza, R. Osta and M. Doblare (2008). "An experimental study of the mouse skin behaviour: damage and inelastic aspects." J Biomech **41(1)**: 93-99.

Murphy, M. B., K. Moncivais and A. I. Caplan (2013). "Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine." Exp Mol Med **45**: e54.

Mustoe, T. (2004). "Understanding chronic wounds: a unifying hypothesis on their pathogenesis and implications for therapy." Am J Surg **187(5A)**: 65S-70S.

Nakamura, T. and S. Mizuno (2010). "The discovery of hepatocyte growth factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine." Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci **86(6)**: 588-610.

Nambu, M., M. Ishihara, S. Kishimoto, S. Yanagibayashi, N. Yamamoto, R. Azuma, Y. Kanatani, T. Kiyosawa and H. Mizuno (2011). "Stimulatory Effect of Autologous Adipose Tissue-Derived Stromal Cells in an Atelocollagen Matrix on Wound Healing in Diabetic db/db Mice." J Tissue Eng **2011**: 158105.

Nambu, M., M. Ishihara, S. Nakamura, H. Mizuno, S. Yanagibayashi, Y. Kanatani, H. Hattori, B. Takase, T. Ishizuka, S. Kishimoto, Y. Amano, N. Yamamoto, R. Azuma and T. Kiyosawa (2007). "Enhanced healing of mitomycin C-treated wounds in rats using inbred adipose tissue-derived stromal cells within an atelocollagen matrix." Wound Repair Regen **15(4)**: 505-510.

Nambu, M., S. Kishimoto, S. Nakamura, H. Mizuno, S. Yanagibayashi, N. Yamamoto, R. Azuma, S. Nakamura, T. Kiyosawa, M. Ishihara and Y. Kanatani (2009). "Accelerated wound healing in healing-impaired db/db mice by autologous adipose tissue-derived stromal cells combined with atelocollagen matrix." Ann Plast Surg **62(3)**: 317-321.

Nauta, A., C. Seidel, L. Deveza, D. Montoro, M. Grova, S. H. Ko, J. Hyun, G. C. Gurtner, M. T. Longaker and F. Yang (2013). "Adipose-derived stromal cells overexpressing vascular endothelial growth factor accelerate mouse excisional wound healing." Mol Ther **21**(2): 445-455.

Nelson, L. R. and S. E. Bulun (2001). "Estrogen production and action." J Am Acad Dermatol **45**(3 Suppl): S116-124.

Nelson, W. G. and T. T. Sun (1983). "The 50- and 58-kdalton keratin classes as molecular markers for stratified squamous epithelia: cell culture studies." J Cell Biol **97**(1): 244-251.

Nishino, T., Y. Horii, H. Shiiki, H. Yamamoto, Z. Makita, R. Bucala and K. Dohi (1995). "Immunohistochemical detection of advanced glycosylation end products within the vascular lesions and glomeruli in diabetic nephropathy." Hum Pathol **26**(3): 308-313.

Norton, P. A. and R. O. Hynes (1987). "Alternative splicing of chicken fibronectin in embryos and in normal and transformed cells." Mol Cell Biol **7**(12): 4297-4307.

Onate, B., G. Vilahur, R. Ferrer-Lorente, J. Ybarra, A. Diez-Caballero, C. Ballesta-Lopez, F. Moscatiello, J. Herrero and L. Badimon (2012). "The subcutaneous adipose tissue reservoir of functionally active stem cells is reduced in obese patients." FASEB J **26**(10): 4327-4336.

Ornitz, D. M. and N. Itoh (2001). "Fibroblast growth factors." Genome Biol **2**(3): REVIEWS3005.

Park, S. J., S. H. Moon, H. J. Lee, J. J. Lim, J. M. Kim, J. Seo, J. W. Yoo, O. J. Kim, S. W. Kang and H. M. Chung (2013). "A comparison of human cord blood- and embryonic stem cell-derived endothelial progenitor cells in the treatment of chronic wounds." Biomaterials **34**(4): 995-1003.

Peramo, A., C. L. Marcelo, S. A. Goldstein and D. C. Martin (2009). "Novel organotypic cultures of human skin explants with an implant-tissue biomaterial interface." Ann Biomed Eng **37**(2): 401-409.

Planat-Benard, V., C. Menard, M. Andre, M. Pucoat, A. Perez, J. M. Garcia-Verdugo, L. Penicaud and L. Casteilla (2004). "Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells." Circ Res **94**(2): 223-229.

Pouliot, R., D. Larouche, F. A. Auger, J. Juhasz, W. Xu, H. Li and L. Germain (2002). "Reconstructed human skin produced in vitro and grafted on athymic mice." Transplantation **73**(11): 1751-1757.

Proksch, E., J. M. Brandner and J. M. Jensen (2008). "The skin: an indispensable barrier." Exp Dermatol **17**(12): 1063-1072.

Prost-Squarcioni, C. (2006). "Histologie de la peau et des follicules pileux." Médecine sciences **22**(2): 6.

Rega, G., C. Kaun, S. Demyanets, S. Pfaffenberger, K. Rychli, P. J. Hohensinner, S. P. Kastl, W. S. Speidl, T. W. Weiss, J. M. Breuss, A. Furnkranz, P. Uhrin, J. Zaujec, V. Zilberfarb, M. Frey, R. Roehle, G. Maurer, K. Huber and J. Wojta (2007). "Vascular endothelial growth factor is induced by the inflammatory cytokines

interleukin-6 and oncostatin m in human adipose tissue in vitro and in murine adipose tissue in vivo." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(7): 1587-1595.

Rehman, J., D. Traktuev, J. Li, S. Merfeld-Clauss, C. J. Temm-Grove, J. E. Bovenkerk, C. L. Pell, B. H. Johnstone, R. V. Considine and K. L. March (2004). "Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells." Circulation **109**(10): 1292-1298.

Ren, L., B. Zhou and L. Chen (2012). "Silicone Ring Implantation in an Excisional Murine Wound Model." WOUNDS **24**(2): 36-42.

Rendl, M., L. Polak and E. Fuchs (2008). "BMP signaling in dermal papilla cells is required for their hair follicle-inductive properties." Genes Dev **22**(4): 543-557.

Rich, L. and P. Whittaker (2005). "Collagen and Picrosirius Red Staining : A Polarized Light Assessment of Fibrillar Hue and Spatial Distribution." Journal of Morphological Sciences **22**(2): 97-104.

Ring, B. D., S. Scully, C. R. Davis, M. B. Baker, M. J. Cullen, M. A. Pellemounter and D. M. Danilenko (2000). "Systemically and topically administered leptin both accelerate wound healing in diabetic ob/ob mice." Endocrinology **141**(1): 446-449.

Sader, S., M. Nian and P. Liu (2003). "Leptin: a novel link between obesity, diabetes, cardiovascular risk, and ventricular hypertrophy." Circulation **108**(6): 644-646.

Safford, K. M., K. C. Hicok, S. D. Safford, Y. D. Halvorsen, W. O. Wilkison, J. M. Gimble and H. E. Rice (2002). "Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells." Biochem Biophys Res Commun **294**(2): 371-379.

Saiki, A., F. Watanabe, T. Murano, Y. Miyashita and K. Shirai (2006). "Hepatocyte growth factor secreted by cultured adipocytes promotes tube formation of vascular endothelial cells in vitro." Int J Obes (Lond) **30**(11): 1676-1684.

Salgado, A. J., R. L. Reis, N. J. Sousa and J. M. Gimble (2010). "Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine." Curr Stem Cell Res Ther **5**(2): 103-110.

Sasagawa, T., T. Shimizu, S. Sekiya, M. Yamato and T. Okano (2014). "Comparison of angiogenic potential between prevascular and non-prevascular layered adipose-derived stem cell-sheets in early post-transplanted period." J Biomed Mater Res A **102**(2): 358-365.

Schittny, J. C. and P. D. Yurchenco (1989). "Basement membranes: molecular organization and function in development and disease." Curr Opin Cell Biol **1**(5): 983-988.

Schmidt, B. A. and V. Horsley (2013). "Intradermal adipocytes mediate fibroblast recruitment during skin wound healing." Development **140**(7): 1517-1527.

Seite, S., H. Zucchi, D. Septier, S. Igondjo-Tchen, K. Senni and G. Godeau (2006). "Elastin changes during chronological and photo-ageing: the important role of lysozyme." J Eur Acad Dermatol Venereol **20**(8): 980-987.

Shevchenko, R. V., S. L. James and S. E. James (2010). "A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction." J R Soc Interface **7**(43): 229-258.

Sierra-Honigmann, M. R., A. K. Nath, C. Murakami, G. Garcia-Cardena, A. Papapetropoulos, W. C. Sessa, L. A. Madge, J. S. Schechner, M. B. Schwabb, P. J. Polverini and J. R. Flores-Riveros (1998). "Biological action of leptin as an angiogenic factor." Science **281**(5383): 1683-1686.

Singer, A. J. and R. A. Clark (1999). "Cutaneous wound healing." N Engl J Med **341**(10): 738-746.

Singh, S. K., R. Kurfurst, C. Nizard, S. Schnebert, E. Perrier and D. J. Tobin (2010). "Melanin transfer in human skin cells is mediated by filopodia--a model for homotypic and heterotypic lysosome-related organelle transfer." FASEB J **24**(10): 3756-3769.

Skardal, A., D. Mack, E. Kapetanovic, A. Atala, J. D. Jackson, J. Yoo and S. Soker (2012). "Bioprinted amniotic fluid-derived stem cells accelerate healing of large skin wounds." Stem Cells Transl Med **1**(11): 792-802.

Skurk, T., Y. M. Lee and H. Hauner (2001). "Angiotensin II and its metabolites stimulate PAI-1 protein release from human adipocytes in primary culture." Hypertension **37**(5): 1336-1340.

Skurk, T., V. van Harmelen and H. Hauner (2004). "Angiotensin II stimulates the release of interleukin-6 and interleukin-8 from cultured human adipocytes by activation of NF-kappaB." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(7): 1199-1203.

Stallmeyer, B., H. Kampfer, N. Kolb, J. Pfeilschifter and S. Frank (1999). "The function of nitric oxide in wound repair: inhibition of inducible nitric oxide-synthase severely impairs wound reepithelialization." J Invest Dermatol **113**(6): 1090-1098.

Stallmeyer, B., H. Kampfer, M. Podda, R. Kaufmann, J. Pfeilschifter and S. Frank (2001). "A novel keratinocyte mitogen: regulation of leptin and its functional receptor in skin repair." J Invest Dermatol **117**(1): 98-105.

Stefansson, S. and D. A. Lawrence (1996). "The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin alpha V beta 3 binding to vitronectin." Nature **383**(6599): 441-443.

Steinberg, J. P., S. J. Hong, M. R. Geringer, R. D. Galiano and T. A. Mustoe (2012). "Equivalent effects of topically-delivered adipose-derived stem cells and dermal fibroblasts in the ischemic rabbit ear model for chronic wounds." Aesthet Surg J **32**(4): 504-519.

Stoff, A., A. A. Rivera, N. Sanjib Banerjee, S. T. Moore, T. Michael Numnum, A. Espinosa-de-Los-Monteros, D. F. Richter, G. P. Siegal, L. T. Chow, D. Feldman, L. O. Vasconez, J. Michael Mathis, M. A. Stoff-Khalili and D. T. Curiel (2009). "Promotion of incisional wound repair by human mesenchymal stem cell transplantation." Exp Dermatol **18**(4): 362-369.

Strem, B. M. and M. H. Hedrick (2005). "The growing importance of fat in regenerative medicine." Trends Biotechnol **23**(2): 64-66.

Sultan, S. M., J. S. Barr, P. Butala, E. H. Davidson, A. L. Weinstein, D. Knobel, P. B. Saadeh, S. M. Warren, S. R. Coleman and A. Hazen (2012). "Fat grafting accelerates revascularisation and decreases fibrosis following thermal injury." J Plast Reconstr Aesthet Surg **65**(2): 219-227.

Takahashi, K., S. Mizuarai, H. Araki, S. Mashiko, A. Ishihara, A. Kanatani, H. Itadani and H. Kotani (2003). "Adiposity elevates plasma MCP-1 levels leading to the increased CD11b-positive monocytes in mice." J Biol Chem **278**(47): 46654-46660.

Tandara, A. A. and T. A. Mustoe (2011). "MMP- and TIMP-secretion by human cutaneous keratinocytes and fibroblasts--impact of coculture and hydration." J Plast Reconstr Aesthet Surg **64**(1): 108-116.

Teng, M., Y. Huang and H. Zhang (2014). "Application of stems cells in wound healing-an update." Wound Repair Regen **22**(2): 151-160.

Touhami, A., M. A. Di Pasquale, T. Kawatika, M. Del Valle, R. H. Rosa, Jr., S. Dubovy and S. C. Tseng (2005). "Characterisation of myofibroblasts in fibrovascular tissues of primary and recurrent pterygia." Br J Ophthalmol **89**(3): 269-274.

Trottier, V., G. Marceau-Fortier, L. Germain, C. Vincent and J. Fradette (2008). "IFATS collection: Using human adipose-derived stem/stromal cells for the production of new skin substitutes." Stem Cells **26**(10): 2713-2723.

Usui, M. L., J. N. Mansbridge, W. G. Carter, M. Fujita and J. E. Olerud (2008). "Keratinocyte migration, proliferation, and differentiation in chronic ulcers from patients with diabetes and normal wounds." J Histochem Cytochem **56**(7): 687-696.

van der Rest, M. and R. Garrone (1991). "Collagen family of proteins." FASEB J **5**(13): 2814-2823.

Ventre, M., F. Mollica and P. A. Netti (2009). "The effect of composition and microstructure on the viscoelastic properties of dermis." J Biomech **42**(4): 430-435.

Vermette, M., V. Trottier, V. Menard, L. Saint-Pierre, A. Roy and J. Fradette (2007). "Production of a new tissue-engineered adipose substitute from human adipose-derived stromal cells." Biomaterials **28**(18): 2850-2860.

Volk, S. W., S. A. Iqbal and A. Bayat (2013). "Interactions of the Extracellular Matrix and Progenitor Cells in Cutaneous Wound Healing." Adv Wound Care (New Rochelle) **2**(6): 261-272.

Wallez, Y. and P. Huber (2008). "Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis." Biochim Biophys Acta **1778**(3): 794-809.

White, W. L., G. S. Brody, A. A. Glaser, R. D. Marangoni, T. G. Beckwith, J. S. Must and J. A. Lehman, Jr. (1971). "Tensiometric studies of unwounded and wounded skin: results using a standardized testing method." Ann Surg **173**(1): 19-25.

Widelitz, R. B., T. X. Jiang, A. Noveen, S. A. Ting-Berreth, E. Yin, H. S. Jung and C. M. Chuong (1997). "Molecular histology in skin appendage morphogenesis." Microsc Res Tech **38**(4): 452-465.

Wong, V. W., M. Sorkin, J. P. Glotzbach, M. T. Longaker and G. C. Gurtner (2011). "Surgical approaches to create murine models of human wound healing." J Biomed Biotechnol **2011**: 969618.

Wu, Y., L. Chen, P. G. Scott and E. E. Tredget (2007). "Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis." Stem Cells **25**(10): 2648-2659.

Yu, J., Y. K. Tu, Y. B. Tang and N. C. Cheng (2014). "Stemness and transdifferentiation of adipose-derived stem cells using L-ascorbic acid 2-phosphate-induced cell sheet formation." Biomaterials **35**(11): 3516-3526.

Yun, I. S., Y. R. Jeon, W. J. Lee, J. W. Lee, D. K. Rah, K. C. Tark and D. H. Lew (2012). "Effect of human adipose derived stem cells on scar formation and remodeling in a pig model: a pilot study." Dermatol Surg **38**(10): 1678-1688.

Zhang, Q. X., C. J. Magovern, C. A. Mack, K. T. Budenbender, W. Ko and T. K. Rosengart (1997). "Vascular endothelial growth factor is the major angiogenic factor in omentum: mechanism of the omentum-mediated angiogenesis." J Surg Res **67**(2): 147-154.

Zhang, Y., H. Hao, J. Liu, X. Fu and W. Han (2012). "Repair and regeneration of skin injury by transplanting microparticles mixed with Wharton's jelly and MSCs from the human umbilical cord." Int J Low Extrem Wounds **11**(4): 264-270.

Zonari, A., T. M. Martins, A. C. Paula, J. N. Boeloni, S. Novikoff, A. P. Marques, V. M. Correlo, R. L. Reis and A. M. Goes (2015). "Polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate structures loaded with adipose stem cells promote skin healing with reduced scarring." Acta Biomater.

Zuk, P. A., M. Zhu, P. Ashjian, D. A. De Ugarte, J. I. Huang, H. Mizuno, Z. C. Alfonso, J. K. Fraser, P. Benhaim and M. H. Hedrick (2002). "Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells." Mol Biol Cell **13**(12): 4279-4295.

Zuk, P. A., M. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, J. W. Futrell, A. J. Katz, P. Benhaim, H. P. Lorenz and M. H. Hedrick (2001). "Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies." Tissue Eng **7**(2): 211-228.

Annexe

Avant-propos

Ce manuscrit intitulé «Enhancing repair of full-thickness excisional wounds: impact of tissue-engineered biological dressings featuring human differentiated adipocytes» a été soumis au journal *Acta Biomaterialia* (numéro de soumission : AB-14-2310) le 29 novembre 2014.

Les pansements adipeux sont au cœur des résultats présentés à l'intérieur de ce manuscrit. La puissance statistique des analyses pour ce groupe expérimental a permis la présentation de ces résultats en mettant de l'avant la nouveauté liée à leur utilisation.

J'ai contribué à la production du manuscrit à tous les niveaux : conception et réalisation des expériences, analyses des tissus, interprétation des résultats et montage des différentes figures. J'ai également activement participé à la rédaction du manuscrit, sous la supervision étroite de Dre Julie Fradette.

La contribution des coauteurs a également été importante. Ceux-ci ont tous prodigué une aide précieuse lors de la réalisation de plusieurs étapes auxquelles je participais également, tels que la production des pansements biologiques (Amandine Maux), l'exécution des expériences animales (Amandine Maux), la réalisation des tests de traction uniaxiale (Véronique Laterreur et Amandine Maux), l'analyse des propriétés mécaniques des tissus (Véronique Laterreur), la réalisation des analyses des tissus par immunofluorescence (Dominique Mayrand et Valérie Gagné), la prise de photographie au microscope (Dominique Mayrand et Valérie Gagné), le montage des figures de l'article (Dominique Mayrand), la conception des expériences (Julie Fradette, Dominique Mayrand et Véronique Moulin), la rédaction (Julie Fradette) et la révision du manuscrit (Véronique Moulin et Dominique Mayrand).

Enhancing repair of full-thickness excisional wounds: impact of tissue-engineered biological dressings featuring human differentiated adipocytes

Pascal Morissette Martin ^{a,b}, Amandine Maux ^{a,b}, Véronique Laterreur ^{a,b,d}, Dominique Mayrand ^{a,b}, Valérie L. Gagné ^{a,b}, Véronique J. Moulin ^{a,b,c} and Julie Fradette ^{a,b,c*}

^aLaval University Tissue Engineering Laboratory / LOEX,

^bDivision of regenerative medicine, CHU de Quebec Research Centre

^cDepartment of Surgery, Faculty of Medicine, Laval University

^d Department of Mechanical Engineering, Faculty of Sciences and Engineering, Laval University, Québec, QC, Canada

* Corresponding author:

Julie Fradette, PhD,
CMDGT/LOEX, Aile -R
CRCHU de Québec - Hôpital Enfant-Jésus
1401, 18e Rue
Québec, Qc, G1J 1Z4
Tél: 418-990-8255 Poste 1713 (office)
Fax: 418-990-8248
julie.fradette@chg.ulaval.ca
www.loex.qc.ca

Authors' email addresses:

pascal.morissette-martin.1@ulaval.ca
am.maux@gmail.com
veronique.laterreur.1@ulaval.ca
dominique.mayrand.1@ulaval.ca
valerie.l-gagne.1@ulaval.ca
veronique.moulin@chg.ulaval.ca
julie.fradette@chg.ulaval.ca

Running title: Tissue-engineered dressings containing adipocytes promote wound repair

Abstract

Promotion of skin repair for acute or chronic wounds through the use of tissue-engineered products is an active field of research. This study evaluates the effects mediated by tissue-engineered biological dressings containing human in vitro-differentiated adipocytes and adipose-derived stromal cells (ASCs). Re-epithelialization, granulation tissue formation and neovascularization of full-thickness cutaneous wounds were specifically assessed using a murine model featuring a fluorescent epidermis. In comparison to wounds that did not receive an adipocyte-containing biological dressing, treated wounds displayed a slight but significantly faster wound closure rate based on macroscopic observations over 18 days. Non-invasive imaging of GFP-expressing keratinocytes determined that the kinetics of re-epithelialization were similar for both groups. Treated wounds featured thicker granulation tissues (1.7 fold, $P < 0.0001$) enriched in collagens (1.3 fold, $P < 0.0104$). In addition, wound cryosections labeled for detection of CD31-expressing cells indicated a 2.2 fold ($P < 0.0002$) increased neovascularization for the treated wounds at the time of terminal biopsy. This is in accordance with the secretion of pro-angiogenic factors detected in media conditioned by the dressings. Taken together, these results establish that a new type of engineered substitutes featuring a mixture of adipocytes and ASCs can promote cutaneous healing when applied as temporary dressings, suggesting their potential relevance for chronic wound management studies.

Keywords: skin; wound healing; adipose-derived stromal/stem cells; adipocytes; tissue engineering

1. Introduction

Chronic wounds and skin ulcers are major burdens for health care systems, in particular in the context of aging populations with an increasing proportion of diabetic patients (Sen, Gordillo et al. 2009). During their lifetime, 15% to 25% of diabetic patients will develop at least one diabetic foot ulcer (Fonder, Lazarus et al. 2008). Among novative methods developed to promote cutaneous healing, strategies relying on the therapeutic properties of mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) are actively investigated (reviewed in (Teng, Huang et al. 2014)). Indeed, it has been reported that MSC derived from bone-marrow (Fathke, Wilson et al. 2004, Wu, Chen et al. 2007, Stoff, Rivera et al. 2009), cord blood and cord stroma (Zhang, Hao et al. 2012, Park, Moon et al. 2013), amniotic fluid (Kim, Zhang et al. 2012, Skardal, Mack et al. 2012) and adipose tissue (AT) (Kim, Park et al. 2007, Lim and Yoo 2010) contribute to wound healing by acting upon the complex repair processes mediating wound closure, which comprise re-epithelialization, granulation tissue formation and angiogenesis. In particular, the paracrine effects of MSCs after their injection/implantation were reported to enhance repair in various context of tissue injury through the secretion of growth factors and angiogenic modulators (Salgado, Reis et al. 2010, Murphy, Moncivais et al. 2013).

Among MSCs, human adipose-derived stromal/stem cells (ASCs) are excellent candidates for cell-based therapies and tissue-engineering applications. Indeed, subcutaneous adipose tissue (AT) is abundant and easily harvested using a syringe or a minimally invasive lipoaspiration procedure. Regenerative strategies based on ASCs that have been described to improve skin wounds include topical application of pre-conditioned medium (Chen, Tredget et al. 2008), delivery of cell suspensions inside the wound beds (Amos, Kapur et al. 2010) as well as intradermal injection of cells at the periphery of the wound margins (Kim, Zhang et al. 2012). Cellular approaches have investigated ASC's capacity to enhance repair of incisional (Stoff, Rivera et al. 2009), full-thickness (Amos, Kapur et al. 2010, Kim, Zhang et al. 2012) and ischemic (Steinberg, Hong et al. 2012) wounds. Tissue-engineered constructs comprising ASCs seeded into matrices such as silk fibroin-chitosan scaffolds (Altman, Yan et al. 2009), acellular dermal matrix grafts (Huang, Hsu et al. 2012), and gellan gum-hyaluronic acid hydrogels (Cerqueira, da Silva et al. 2014) have also been evaluated.

Interestingly, AT itself has been associated with the improvement of skin conditions after fat grafting procedures (Coleman 2006). Medical case reports have revealed that subcutaneous lipoinjections could enhance the appearance of both mature and evolving scar tissues (Klinger, Marazzi et al. 2008) and trigger healing of refractory chronic ulcers (Klinger, Caviggioli et al. 2010). Although the precise mechanisms of action or the specific role that adipocytes may play are not fully understood, evidence point out that fat grafting could accelerate revascularization and reduce fibrosis surrounding the injection sites (Rigotti, Marchi et al. 2007, Sultan, Stern et al. 2011, Sultan, Barr et al. 2012, Loder, Peterson et al. 2014).

Using human ASCs, our team has previously demonstrated the production of manipulatable cell sheets and tissues using the self-assembly approach of tissue engineering (Vermette, Trottier et al. 2007, Labbe, Marceau-Fortier et al. 2011). Using this method, ascorbic acid and serum stimulate the cells to produce an endogenous collagen-rich extracellular matrix, leading to the formation of manipulatable cell sheets without exogenous or synthetic biomaterials. We also demonstrated that ASCs could be differentiated into adipocytes during cell sheet production, leading to reconstructed tissues featuring functional mature adipocytes embedded into human matrix containing remaining undifferentiated ASCs (Vermette, Trottier et al. 2007).

While implantation of ASCs-containing cell sheets have been explored before (Cerqueira, Pirraco et al. 2013, Jiang, Qi et al. 2013, Lin, Grahovac et al. 2013, Sasagawa, Shimizu et al. 2014, Yu, Tu et al. 2014), the use of adipocyte-containing biological dressings has not yet been investigated for wound healing applications. In this study, we postulate that the cellularized biological dressings produced using the self-assembly approach can be used in a temporary manner to promote endogenous skin repair mechanisms. Full-thickness splinted murine cutaneous wounds were treated with repeated applications of the biological dressings in comparison with untreated wounds of the control groups. Interestingly, the specific investigation of re-epithelialization kinetics was achieved using a mouse strain featuring a fluorescent epidermis (Rendl, Polak et al. 2008). This K14-H2B-GFP mouse strain expresses Green Fluorescent Protein (GFP) conjugated to histone 2B (H2B) under the keratin 14 (K14) promoter: therefore epidermal and follicular keratinocytes appear fluorescent. In addition to re-epithelialization, granulation tissue formation, neovascularization and the mechanical properties of the regenerated skin were also assessed. Our results indicate a beneficial impact of these novative tissue-engineered constructs featuring adipocytes and ASCs through enhanced granulation tissue formation and neovascularization.

2. Material and methods

2.1 Production of human tissue engineered dressings

All protocols were approved by the Institutional review board of the research centre of CHU de Québec. Human adipose dressings were produced by tissue engineering using a cell sheet technology previously described (Labbe, Marceau-Fortier et al. 2011), with minor modifications. Briefly, ASCs extracted from lipoaspirated subcutaneous adipose tissue of a 38 year-old female donor of body mass index of 29.5 were seeded at a density of $6.7-8.0 \times 10^4$ cells/cm² for in vitro expansion and batch cryopreservation after primary culture (passage 0). Thawed ASCs were cultured in expansion media consisting of standard DMEM-Ham's-based culture medium with 10% fetal calf serum (FCS; HyClone Laboratories, Logan, UT, USA) in Nunc culture flasks (Thermo scientific, Ottawa, ON, Canada) and then seeded at passage 3 at a density of 2.34×10^4 cells/cm² in 12-well plates (Becton Dickinson Labware, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes,

NJ, USA) for the production of the dressings with media changes every two or three days. Each well contained a cell-sheet anchorage device allowing easy manipulation of the constructs (Whatman filter paper, GE Healthcare, Ottawa, ON, Canada) (Labbe, Marceau-Fortier et al. 2011). Expansion media supplemented with a 50 µg/ml freshly prepared ascorbic acid solution (AsA; Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) was then used for six days until adipogenic induction. In order to produce cellular sheets containing differentiated adipocytes from ASCs, cultures were exposed to a standard induction medium, followed by the use of an adipocyte maintenance medium supplemented with AsA for the rest of the culture period (Labbe, Marceau-Fortier et al. 2011). Twenty-four days after seeding and 18 days after induction of differentiation, the resulting adipose cell sheets were lifted and stacked in groups of three sheets to form a thicker adipose dressing. These constructs were maintained in culture until being used in animal experiments, which was between 36 and 55 days after initial cell seeding.

2.2 Quantification of secreted molecules

Culture media conditioned by the adipose dressings for 24 hours was assayed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) directed against human leptin, hepatocyte growth factor (HGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), angiopoietin-1 (Ang-1) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) (DuoSets®, R&D systems, Minneapolis, MN, U.S.A.). Conditioned media were analysed at two time points, namely 36 days and 58 days after cell seeding (30 and 52 days after adipogenic induction respectively). These days represent the culture period during which the dressings were maintained in culture prior to their use in vivo.

2.3 Animal experiments

Homozygous transgenic K14-H2B-GFP founder mice were kindly provided by Dr Elaine Fuchs (Rockefeller University, New-York City, NY, USA). Following a caesarean derivation, a colony was established in the animal facility of the research center of CHU de Québec (QC, Canada). All procedures involving animals were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee. For wound healing studies, a silicone-splinted full-thickness wound model (Galiano, Michaels et al. 2004) was adapted in order to be compatible with the repeated applications of new dressings every three days. The use of silicone rings importantly reduces contraction upon wounding, allowing loose-skinned mammals to heal by secondary intention processes more reminiscent of human wound healing (Davidson, Yu et al. 2013). Silicone rings with an internal diameter of 13 mm were cut from 0.5 mm thick 13 x 18 cm silicone sheets (Grace Bio-Labs, Bend, OR, USA) and then

sterilized. One or two days prior to surgery, mice were anesthetized and depilated. Under isoflurane anaesthesia, two full-thickness wounds per mice were created on their mid-back with 8 mm diameter Acuderm® biopsy punches (Acuderm® inc., Fort Lauderdale, FL, USA). Removal of the *panniculus carnosus* covering the bared muscle was performed. Silicone rings were centered on the wound margins, fixed with surgical glue (Dermabond advanced™, Ethicon, Johnson & Johnson Medical, Markham, ON, Canada) and secured with 8 monofilament silk sutures (Ethicon, Johnson & Johnson Medical, Markham, ON, Canada) (Fig. 1A).

Two distinct animal experiments were performed using 18 weeks-old K14-H2B-GFP mice. The first experiment comprised seven male mice. Their wounds were harvested for histological analyses at the day of terminal biopsy (on the 18th day). The second experiment included 8 female mice for which the harvested scar tissues were used for mechanical testing (on the 21st day). For each experiment, two experimental groups were compared: one group treated with an in vitro engineered adipose dressing deposited onto each silicone ring (total for both experiments: 6 mice, 12 wounds) while the reference group was handled similarly but did not receive any dressing (total for both experiments: 9 mice, 18 wounds). After surgery, the following steps were performed on both experimental groups (Fig 1C and D): 1) each wound of the treated group received an adipocyte-containing dressing (no dressings for the control group); 2) 1 x 1 cm sterile pre-cut MEPITEL® silicone mesh (Mölnlycke Health Care, Oakville, ON, Canada) was added to facilitate atraumatic dressing removal; 3) approximately 0.1 mL of osmotic gel NORMLGEL® (Mölnlycke Health Care, Oakville, ON, Canada) was applied for wound hydration; 4) A 6 x 7 Tegaderm™ transparent film (3M, London, ON, Canada) trimmed to fit each mouse was then layed down to cover both wounds. To protect the underlying montage, mice were wrapped in a small layer of cohesive bandage (AMD Ritmed, Lachine, QC, Canada) and put back in their cages. The bandages allowed free range of motion for the mice.

2.4 Macroscopic and fluorescent imaging of the wounds

After surgery and every third day thereafter, the wounds of isoflurane-anaesthetized mice were monitored and the dressings were replaced. After careful layer-by-layer montage removal, macroscopic pictures of individual wounds were taken with an EOS Rebel XSi camera (Canon Canada Inc., Mississauga, ON, Canada). Global wound residual areas were measured using ImageJ (NIH, <http://imagej.nih.gov/>) on macroscopic images. Global wound closure rates are expressed as a percentage of the wound residual area at a given day relative to the wound area on the day of surgery (mean ± SD). An IVIS® Lumina II In Vivo Imaging System (Caliper Life Sciences (a PerkinElmer Company), Hopkinton, MA, U.S.A) was also used to image the fluorescence emitted by the GFP-expressing keratinocytes forming the neoepidermis of individual wounds. Mice were

individually monitored and exposition times were automatically set up by the system with a binning of 2 for all animals and each time point. Images were acquired and analyzed using Living Image software (Caliper Life Sciences). Re-epithelialization rates are expressed as a percentage of the wound epidermis residual area at a given day relative to the epidermal wound area measured on the day of surgery (mean \pm SD). Following imaging, new adipose dressings that were maintained in culture were deposited onto the wounds and the overlying montage was performed as described above (Fig. 1 C and D). This sequence was repeated every three days over a 18 day period as illustrated on Figure 1A.

2.5 Histological analysis of paraffin embedded tissues

On day 18th after surgery, the wounds of the male cohort were harvested with 2 to 5 mm margins, bisected and processed for analyses. Tissue samples were fixed in 3.7% buffered formaldehyde solution immediately after sampling, and then embedded in paraffin. Five μm -thick microtome transversal sections (RM2245, Leica, Concord, ON, Canada) were stained using either Masson's trichrome revealing collagens in blue and cells in pink, or picrosirius red staining, allowing histological visualization of collagen fibers (Rich and Whittaker 2005). Photographs were taken with an AxioCam ICc1 camera mounted on a Zeiss Imager M2 microscope (Zeiss Canada, Toronto, ON, Canada), and a polarized light was used for imaging the picrosirius red staining. Several microscopic images were merged using the repositioning photomerge function of Photoshop CS4 allowing the reconstitution of the entire regenerated area flanked by intact skin. The surface occupied by stained collagen fibers within the granulation tissues was quantified on picrosirius red-stained transversal sections using ImageJ. The entire area corresponding to granulation tissue was delimited and included measurements were performed. Tissue thickness, excluding the epidermal compartment, was determined on Masson's trichrome stained sections using the ImageJ software for 11 to 17 wounds per experimental conditions (with a minimum of 12 measurements per sample).

2.6 Immunolabelings and analyses on tissue cryosections

Tissue samples were also embedded in Tissue-Tek OCT compound (Sakura Finetek, Torrance, CA, U.S.A.), immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . They were then cut using a cryostat microtome (JUNG RM2035, Leica, Concord, ON, Canada) into 10 μm transversal sections. After fixation in acetone, indirect immunofluorescence labelings were performed. The primary antibodies used included rat, rabbit and chicken monoclonal or polyclonal antibodies directed against the following murine molecules: Keratin 14 (K14;

catalogue number: PRB-155P, Covance Inc, Montréal, Canada), collagens type IV (catalogue number: Ab6586, Abcam, Toronto, ON, Canada) and type III (Institut Pasteur donation), the endothelial cell marker CD31 (catalogue number: 553370, BD Pharmingen, Mississauga, ON, Canada), α -smooth-muscle actin (α -SMA; catalogue number: Ab5694, Abcam), the leucocyte marker CD45 (Ab10558, Abcam), as well as the mesenchymal cell marker vimentin (Novus Biological, Oakville, ON, Canada). Negative controls were performed either by using the corresponding isotypic antibodies (Rabbit IgG, catalogue number: Ab-105-c, R&D systems; Rat IgG, EMD Millipore, CBL605, Billerica, MA, U.S.A.) or by omission of the primary antibody. Each antibody was diluted in phosphate-buffered saline (PBS) containing 1% (mass/vol) bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). Detection was carried out using either a chicken anti-rabbit secondary antibody conjugated to Alexa 594 (catalogue number: A-21442, Molecular Probes, Eugene, OR, U.S.A.), a goat anti-rat secondary antibody conjugated to Alexa 594 (catalogue number: A-11007, Molecular Probes) or a goat anti-chicken secondary antibody conjugated to rhodamine (AP406-KC, EMD Millipore). Nuclei were stained with a 5 mg/ml Hoechst solution (Sigma-Aldrich).

Immunofluorescence images were acquired with an AxioCam HRm camera mounted on a Zeiss Imager M2 microscope (Zeiss Canada, Toronto, ON, Canada). An ApoTome device of the Zeiss Imager M2 microscope was used to image CD31, collagen type III and vimentin labelings on cryosections. The merging of several images from the same cryosection was performed using the repositioning photomerge function of Photoshop CS4. The surface occupied by CD31-expressing structures within the delimited granulation tissues was measured using ImageJ. A mean vascular area density was calculated, corresponding to the area of CD31-positive structures per area of granulation tissue. Six (treated group) to 8 (untreated group) tissue samples were evaluated, using 3 cryosections per sample.

Finally, the ImageJ Automatic Nuclei Counter plug-in (<http://www.bioimage.ucsb.edu/>) was used to count CD45-positive cells within the delimited granulation tissue areas. Six (treated group) to 8 (untreated group) tissue samples were evaluated, using two cryosections per sample.

2.7 Evaluation of wounds mechanical properties

Uniaxial tensile tests were performed in order to evaluate the mechanical properties of the tissues. The wounds were harvested 21 days after surgery, without the underlying muscle layer, with 10 to 15 mm margins (8 untreated and 5 treated scar tissues). They were first cut into the shape of a dog bone using a custom-made die. When cutting the samples, care was taken to ensure that the scar tissues were located in the central and thinner section of the bone-shaped specimen. The extremities of each sample were then clamped to a tensile

tester (Instron E1000, Instron Corp, Norwood, MA) and the specimen was stretched at a rate of 0.2 mm/s until failure. During a test, the length of the bone-shaped sample as well as the load required to induce the deformation were measured with a $\pm 50\text{N}$ load cell (Instron 2530-437, Instron Corp, Norwood, MA) and recorded by the system. Three types of mechanical properties were evaluated with this data. The first property is the ultimate tensile strength (expressed in MPa), which was evaluated by dividing the load recorded at the failure of the specimen by its measured thickness multiplied by the width of the sample in its central section. The failure strain (expressed as a percentage) was also calculated as difference between the failure and initial length of the specimen divided by its initial length. Finally, the modulus of elasticity (expressed in MPa) was calculated as the slope of the stress-strain curve in its linear region. To evaluate dermal thickness, scar tissues in close proximity to the sample tested were harvested, fixed and stained with Masson's trichrome as described above.

2.8 Statistical analyses

Unless specified otherwise, data are represented as mean \pm standard deviation (SD). Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) and details are specified in each figure's caption. The confidence interval was set at 95% ($P < 0.05$).

3. Results

3.1 Tissue-engineered dressings secrete growth factors and pro-angiogenic molecules in vitro

The tissue-engineered adipose dressings produced using the self-assembly approach consist of endogenous human extracellular matrix secreted by the cells themselves, providing a scaffolding to the numerous lipid-filled adipocytes present among ASCs that remained undifferentiated (Fig. 1B). Once engineered, the dressings were maintained in culture pending their use onto wounds. Their functionality was assessed in regard of their production of bioactive molecules. The secretion of leptin, HGF, VEGF, Ang-1 and PAI-1 was quantified in conditioned media harvested at two time points encompassing the entire culture period, namely on the first day of their use in vivo (D0) and 21 days later (D21) (Table 1). All these mediators were detected and an increase in their production levels was observed over time, correlating with the in vitro maturation of the adipose dressings and therefore establishing the functionality of the engineered tissues.

3.2 Global wound closure is enhanced by the adipose dressings without impacting on the reepithelization rate

In order to better study the *in vivo* contribution of the re-epithelialization, granulation tissue formation and neovascularization processes, a silicone-splinted model limiting the contraction associated with rodent skin was used in addition to a mouse strain featuring a fluorescent epidermis due to keratinocytes expressing a H2B-GFP fusion protein (Fig. 1A and Fig. 3B). The full-thickness cutaneous wounds were monitored every three days to establish the kinetics of healing. The global appearance of the wounds was assessed from macroscopic images (Fig. 2A) and the measurements of residual wound areas over time generated a global wound closure rate (Fig. 2B). Treated wounds consistently displayed smaller residual wound areas compared to the untreated group, resulting in a 3-day accelerated wound closure rate compared to untreated wounds (Fig. 2A and B).

Specific measurements of keratinocyte migration were possible using non-invasive macroscopic imagery of fluorescence since the epidermal cells of the K14-H2B-GFP mice express nuclear GFP (Fig. 3A and B). Strong signals emitted by the keratinocytes are represented in shades of yellow, moderate to low signals appear in shades of red, while shades of grey revealed the underneath black and white picture, representing an absence of signal (Fig. 3A). In spite of the slight significant difference observed on the 18th day, the overall re-epithelialization kinetics were comparable between the two groups (Fig. 3C).

3.3 Granulation tissue formation is impacted by the biological dressings

On the 18th day after surgery, when more than 90% of wound closure had been reached, the wound areas flanked by margins of intact skin were harvested. Examination of the entire length of the neodermis and epidermis for each wound revealed distinctive features between the experimental groups (delimited by arrowheads, Fig. 4 A and E). After Masson's trichrome staining of matricial elements in blue and cellular components in pink, a higher-density granulation tissue was noted for the wounds treated with adipose dressings (Fig. 4F vs B). In addition, granulation tissue appearance was consistently more homogenous for the treated compared to the untreated wounds (Fig. 4E vs A). Thickness measurements showed that untreated wounds presented a neodermis that was 1.7 times thinner compared to the neodermis of treated wounds or to the dermis of intact skin present at the wound margins (Fig. 5Q). The collagen content and fibers arrangement within the granulation tissue compartment were best visualized after picrosirius staining (Fig. 5A-E and I-M). Indeed, collagens were generally more abundantly expressed (1.3 fold) for the wounds treated with adipose

dressings (Fig. 5I vs A) as determined by a semi-quantitative evaluation from picrosirius stained tissue sections (Fig. 5R). Immunofluorescence staining confirmed the abundant expression of collagen type III in the wounds (Fig. 5F and N). A basic characterization of the cells populating the neodermis determined that, as expected, the majority of these cells were from a mesenchymal lineage and expressed vimentin (Fig. 5G and O). As for the presence of infiltrating immune cells, the number of CD45-expressing leukocytes within the granulation tissue areas was similar between the treated (1170 ± 201 CD45⁺ cells/mm²) and untreated wounds (1205 ± 321 CD45⁺ cells/mm²)(Fig. 5H, P and S).

3.4 Neovascularization is promoted by the biological dressings

At the time of terminal biopsy (18 days post-wounding), neovascularization into the wounded tissues was evaluated by immunofluorescence detection of CD31-expressing endothelial cells on transversal cryosections (Fig. 6A to D). Blood vessel structures can be clearly visualized within the granulation tissue areas and were used to determine the percentage of neodermis coverage by CD31-expressing structures. A 2.2 fold higher vascular area density was measured for the wounds treated with the adipose dressings compared to untreated wounds, translating into an increased neovascularization induced by the biological dressings (Fig. 6I). Presence of collagen type IV-expressing structures also indicated that endothelial cells produced a basement membrane around the microcapillaries of the neodermis (Fig. 6E and G). Finally, α -SMA-expressing cells surrounding CD31-positive structures were observed (Fig. 6F and H), suggesting the presence of smooth muscle cells and/or pericytes around some blood vessels, while few to none α -SMA⁺-myofibroblast-like cells were identified in the granulation tissue for both types of wounds at 18th day post wounding.

3.5 Mechanical properties of the healed wounds

A preliminary investigation of the mechanical properties of the regenerated skin 21 days after wounding was performed using a subgroup of animals (female mice). The data recorded during the uniaxial tensile tests was used to evaluate the mechanical properties of the scar tissue samples (Supplementary Fig.1). The ultimate tensile strength, which represent the maximal stress that a specimen may sustain before failure and thus its strength, was not different between the two experimental groups. The failure strain, which measures the elongation a specimen will experience before failure, was 1.3 fold higher in the treated than the untreated group (Suppl. Fig. 1B). This property is related to the ability of the tissue to withstand deformation. On the other hand, the modulus of elasticity, an indication of the rigidity, was similar in both treated and untreated groups (Suppl. Fig. 1C). Overall, these preliminary data suggest that skin resistance and skin rigidity were not

affected by the dressings at this time-point. However, dressings seemed to slightly enhance the skin's ability to withstand deformation.

4. Discussion

Optimal wound repair depends on the coordinated contribution of multiple cellular processes (migration, proliferation, collagen synthesis and deposition) that are influenced by inflammatory responses as well as growth factor and cytokine production. Various cell-based therapies and tissue engineering strategies are developed to provide the most adequate treatment options for patients suffering from chronic wounds or acute skin trauma (reviewed in (Shevchenko, James et al. 2010, Nathoo, Howe et al. 2014)). Biological products that are commercially available are mainly engineered using dermal fibroblasts such as Dermagraft® (Marston, Hanft et al. 2003), Apligraf® (Eaglstein, Alvarez et al. 1999), and ICX-SKN® (Boyd, Flasz et al. 2007). More recently, mesenchymal stem cell-based therapies have emerged as promising strategies to promote skin wound healing in light of the therapeutic effects associated with their important secretion of potent soluble mediators. In particular, human ASCs have been used for in vitro engineering of skin (Trottier, Marceau-Fortier et al. 2008, Keck, Haluza et al. 2011, Sanchez-Munoz, Granados et al. 2014) or dermal/connective substitutes (Altman, Yan et al. 2009, Nambu, Kishimoto et al. 2009, Huang, Hsu et al. 2012, Cerqueira, da Silva et al. 2014, Machula, Ensley et al. 2014) that are relevant either as permanent replacement tissues or as substitutes stimulating endogenous cell repair mechanisms.

Based on the expected therapeutic benefits mediated by adipocytes and ASCs, we investigated for the first time the use of multilayered engineered tissues as temporary and removable dressings containing both human mature adipocytes and undifferentiated ASCs. The data obtained from the macroscopic observations of the wounds indicate that repeated applications of the adipose dressings onto silicone-splinted full-thickness skin defects globally enhance cutaneous healing, resulting in a faster wound closure rate (by 3 days) in comparison to the untreated group. While analysis of macroscopic images reflects the contribution of all the processes participating to wound closure (inflammation, re-epithelialization, granulation tissue formation and angiogenesis), our experimental design allowed the specific assessment of re-epithelialization throughout the entire healing period. Monitoring the progression of a thin epidermal migration tongue is usually challenging on macroscopic images. To circumvent this problem, we used non-invasive imaging of fluorescence emitted by the epidermis of the K14-H2B-GFP mice to precisely follow keratinocyte migration every third day during 18 days. Surprisingly, our data indicated comparable keratinocyte migration rates onto the wound beds independently of the treatment. Among the various adipokines secreted by the adipose dressings, high amounts of leptin are produced. Given that leptin has previously been reported to have mitogenic effects on

keratinocytes and to stimulate re-epithelialization of diabetic murine wounds (Frank, Stallmeyer et al. 2000, Ring, Scully et al. 2000, Stallmeyer, Kampfer et al. 2001, Murad, Nath et al. 2003), a potential impact of the dressing could have been expected. However, our murine model of normal healing in a moist environment (even in the absence of dressings) is favourable to keratinocyte migration in comparison to conditions of impaired healing. Also, the impact of the dressing's growth factor production on the wound bed cellular responses is the result of a complex interplay of signalling cascades. Importantly, it cannot be excluded that keratinocyte migration was disturbed by frequent dressing removal, but the constant migration of the epithelium observed over the course of healing suggests the impact was minimal.

Nonetheless, the adipocyte-containing dressings stimulated two very important endogenous repair mechanisms, namely granulation tissue formation and neovascularization. The wounds treated with the adipose dressings featured thicker granulation tissues presenting an increased fibrillar collagen content. Preliminary assessment of their mechanical properties (White, Brody et al. 1971, Munoz, Bea et al. 2008) suggested a better ability to withstand mechanical deformation in comparison to the untreated wounds. Inflammatory cell infiltration by CD45-positive leucocytes was not increased in the wounds by the use of human-containing cellular dressings in comparison to the untreated group. Importantly, an increased presence of CD31-positive blood vessel structures was observed for the wounds that were in contact with the adipose dressings.

In our study, adipocytes were embedded into the matrix of the biological dressings deposited on the wound's surface and probably acted in a paracrine fashion as suggested by the *in vitro* secretion of VEGF, Ang-1, HGF, PAI-1 and leptin by the adipose dressings. Aside from its traditional known role in satiety and weight gain, leptin has been shown to possess angiogenic activity *in vitro* and *in vivo* (Sierra-Honigmann, Nath et al. 1998, Ring, Scully et al. 2000, Murad, Nath et al. 2003, Liapakis, Anagnostoulis et al. 2008). Of note, the adipose dressings we produced still comprised a significant proportion of undifferentiated ASCs expected to contribute to the healing process. Indeed, studies using ASCs under various formulations (topical applications, injections, engineered grafts) have highlighted the beneficial impact of those cells on dermal repair and angiogenesis (Kim, Park et al. 2007, Altman, Yan et al. 2009, Kim, Zhang et al. 2012, Yun, Jeon et al. 2012, Park, Moon et al. 2013). It has also been previously reported that fat grafting enhanced revascularisation and seemed to reduce fibrosis associated with thermal injuries and radiation damages to skin (Sultan, Stern et al. 2011, Sultan, Barr et al. 2012) although the precise contribution of adipocytes remains elusive. Few studies directly addressed the putative roles played by adipocytes during cutaneous wound healing and which mechanisms they actually trigger. A recent study focused on the relevance and the role of adipocyte lineage cells during

acute skin wound healing. In particular, using murine models of impaired adipogenesis (either by genetic or pharmacological inhibition of adipocyte formation), the authors reported an important role for mature adipocytes (Schmidt and Horsley 2013). Their results indicate that during the proliferative phase of wound healing, adipocytes are necessary for the recruitment of fibroblasts into the wounds. In absence of adipocytes, fibroblast presence and extracellular matrix deposition were abrogated into the wounds leading to abnormal dermal remodeling/regeneration. Direct intercellular communication between adipocytes and fibroblasts could therefore contribute to appropriate fibroblast migration during healing, revealing an important functional role for adipocytes.

Taken together, our results are consistent with the capacity of ASCs and adipocytes to synthesize and release mitogens and potent angiogenic modulators such as VEGF, HGF, Ang-1, PAI-1 and leptin (Fain, Madan et al. 2004, Ailhaud 2006, Fain 2006, Salgado, Reis et al. 2010) modulating the cellular responses within the wound beds. In particular, given that impaired angiogenesis represents a clinically significant problem in diabetic patients, strategies improving this outcome are of utmost importance. Future work investigating the impact of the adipose dressings in a context of impaired healing will determine if a promising use can be foreseen for such engineered constructs to stimulate repair and regeneration of non-healing ulcers and other types of chronic or acute wounds.

5. Conclusion

These findings indicate that tissue-engineered dressings comprising both human mature adipocytes and ASCs can stimulate reparative cell behaviours such as cell migration, matrix production and deposition as well as angiogenic processes. Further studies are needed to assess the potential of the adipose dressings to improve healing of chronic wounds and validate the potential clinical relevance of these new substitutes.

Disclosures

No competing financial interests exist for the authors.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the valuable contribution of V. Trottier, M. Allen Martin, K. Aubin and VL. Gagné, V. Racine and the histology team for their timely assistance, as well as AM. Moisan and M. Labrecque for their help with the animal experiments. We also thank M. Baron, Y. Bélanger, R. Gauvin, L. Germain and T. Galbraith for helpful discussions. We also thank Drs F-A. Têtu and A. Roy for providing human tissue samples as well as Dr Elaine Fuchs (Rockefeller University, New-York City, USA) for the K14-H2B-GFP transgenic founder mice. This study was supported by grants from the Fondation du CHU de Québec, in part by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) grant #111233. We acknowledge the support of the Centre de recherche du CHU de Québec du Fonds de la recherche du Québec - Santé (FRQS) and of the Réseau Thécell du FRQS. P.M.M. is grateful to the CHIR and FRQS for graduate scholarships. J.F. is grateful to FRQS for a Junior 2 Career Award.

Tables

Table 1 Pro-proliferative and angiogenic factors secreted by the adipose dressings

Molecules	Secretion (pg/mL)		<i>P</i> -value (unpaired t-tests)
	D0 (first day of dressing use)	D21 of animal experiment	
Leptin	23 295 (5195)#	36 428 (2186)	<i>P</i> < 0.0099
Hepatocyte growth factor (HGF)	2176 (165)	3042 (103)	<i>P</i> < 0.0001
Vascular endothelial grow factor (VEGF)	306 (35)	458 (41)	<i>P</i> < 0.0013
Angiopietin-1 (Ang-1)	6716 (695)	8802 (544)	<i>P</i> < 0.0032
Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)	48 573 (2954)	53 367 (1891)	<i>P</i> < 0.0340

Results are expressed as mean (SD).

Figure captions

Fig. 1. In vivo studies experimental design. (A) Two full-thickness excisional wounds were created on the back of K14-H2B-GFP mice. Adipose dressings were deposited on the wounds with the anchorage device juxtaposed to the silicone ring. Every 3 days the wounds were photographed and new dressings were applied. (B) Macroscopic and microscopic appearance of an adipose dressing. The black arrow points to the tissue-engineered dressing surrounded by a peripheral anchorage device. Schematic representation of the montage for (C) mice that received an adipose dressing and (D) the untreated group. a: anchorage device. Bars = 5 mm (B, left), 50 μm (B, right).

Fig. 2. Kinetics of wound healing. (A) Representative macroscopic images showing the progression of healing over 18 days of an untreated wound (left) and a wound treated with an adipose dressing (right). (B) Global wound closure rate determined from the measurements of the wound residual areas at each time-point. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$. Bars: 5 mm.

Fig. 3. Kinetics of wound re-epithelialization. (A) Imaging of fluorescence over 18 days for an untreated wound (left) and a wound treated with an adipose dressing (right). Strong signals emitted by the GFP-keratinocytes are represented in shades of yellow and moderate to low signals appear in shades of red. The absence of fluorescent signal uncovers the corresponding black and white macroscopic picture. (B) Transversal section of a regenerated epidermis: (a) keratinocytes expressing the H2B-GFP fusion protein, (b) immunolabeling for K14, (c) Hoechst nuclear staining, (d) superposition of the labelings. (C) Wound re-epithelialization rate determined from fluorescence imaging measurements. ** $P < 0.006$. Bars: (A) 5 mm, (B) 100 μm .

Fig. 4 Histological appear of the wounds 18 days after surgery. (A and E) Representative examples after Masson's trichrome staining of full-length transversal wound sections. (A-D) Untreated wound. (E-H) Wound treated with an adipose dressing. The sites of initial tissue injury are indicated by arrowheads. (B-C-D) and (F-H-G) are magnifications of the corresponding boxed areas shown in (A) and (E) respectively. Bars: (A, E) 1 mm, (B-D, F-H) 250 μm .

Fig. 5. Enhancement of the granulation tissue formation for wounds treated with adipose dressings. (A-E and I-M) Representative images of the wounds visualized after picosirius red staining of paraffin-embedded tissue sections. (A and I) Full-length transversal wound sections for (A) an untreated and (I) an adipose-dressing treated wound. (B-E) and (J-M) are magnifications of the corresponding boxed areas shown in (A) and (I) respectively. (F and N) Collagen type III detection after immunolabeling of cryosections for (F) untreated and (N) treated wounds. Immunodetection of (G and O) vimentin and (H and P) CD45-expressing cells present in the granulation tissue of (G-H) untreated and (O-P) adipose dressing-treated wounds, respectively. Hoechst nuclear staining appears in blue. Bars: (A and I) 1 mm, (B-E and J-M) 250 μm , (F-H and N-P) 200 μm . (Q) Tissue thickness of the neodermis and dermis of the adjacent wound margins. *** $P < 0.0001$. (R) Percentage of the granulation tissue area occupied by collagen fibers. * $P = 0.0104$. (S) Number of CD45-positive cells within the neodermis.

Fig. 6. Assessment of wound vascularization. Transversal wound cryosections immunolabeled for the detection of (A-D) CD31-expressing cells, (E and G) Collagen type IV and (F and H) α -smooth muscle actin for (A, E and F) untreated wounds and (C, G and H) wounds that received adipose dressings. (B and D) are magnifications of the corresponding boxed areas shown in (A) and (C), respectively. Hoechst stained nuclei appear in blue. (A and C) Epithelial localization of the H2B-GFP fusion protein appears in green. Bars: (A and C) 500 μm , (B, D and E-H) 200 μm . (K) Vascular area density determined from quantification of CD31-positive structures present in the granulation tissue. *** $P < 0.0002$.

Supplementary Fig.1. Mechanical properties of the wounds measured by uniaxial tensile testing on scar tissues. (A) Ultimate tensile strength. (B) Failure strain. (C) Modulus of elasticity. * $P < 0.0302$.

Figures

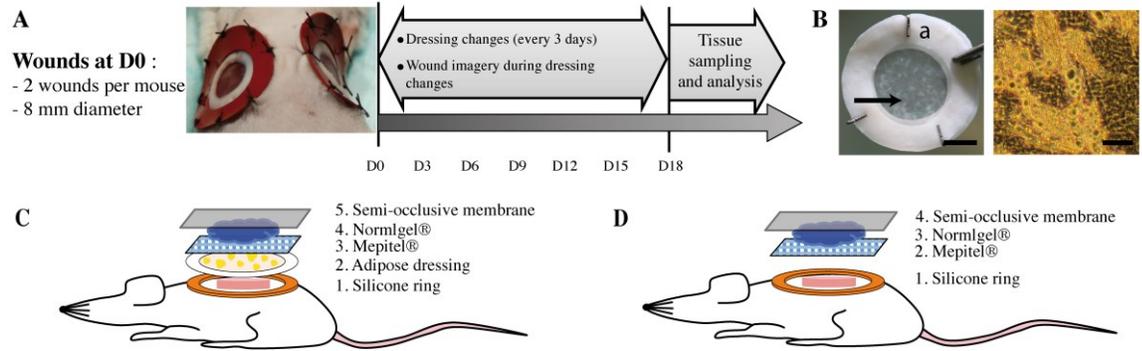


Figure 1

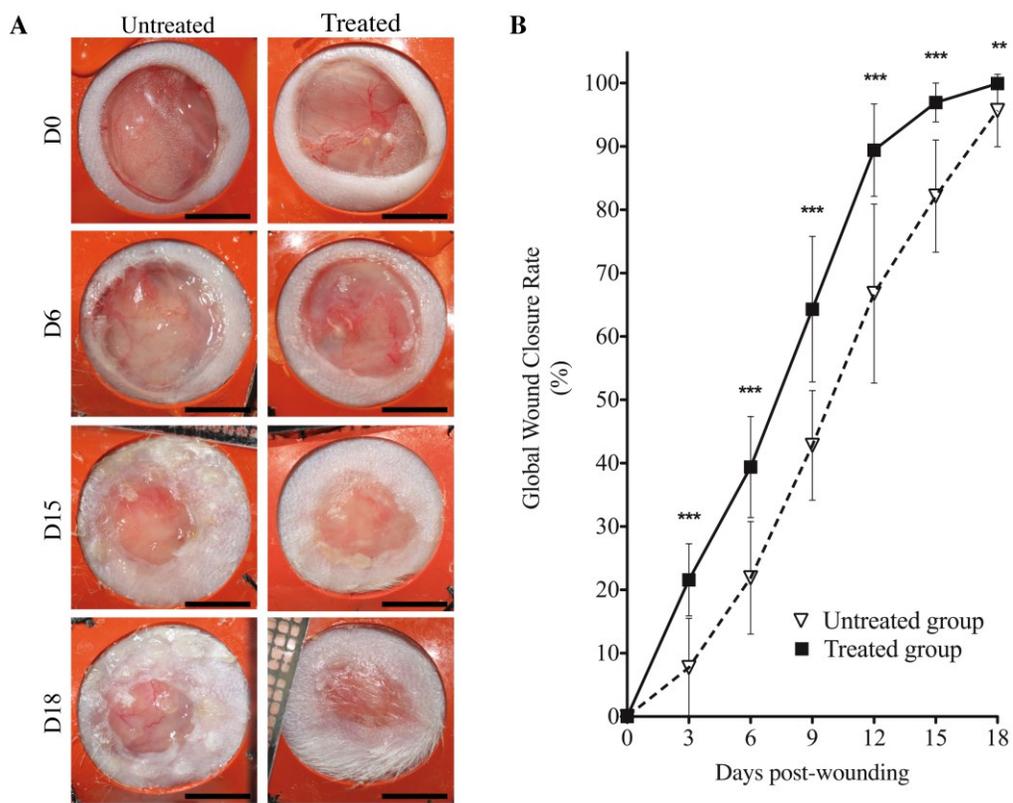


Figure 2

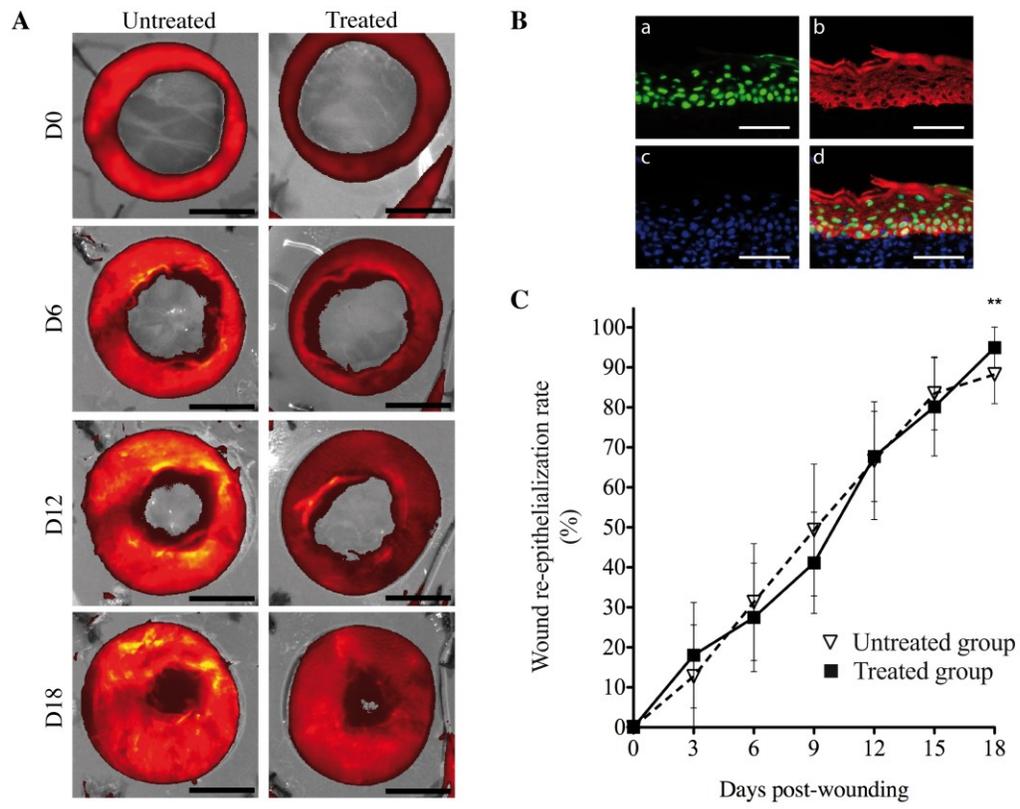


Figure 3

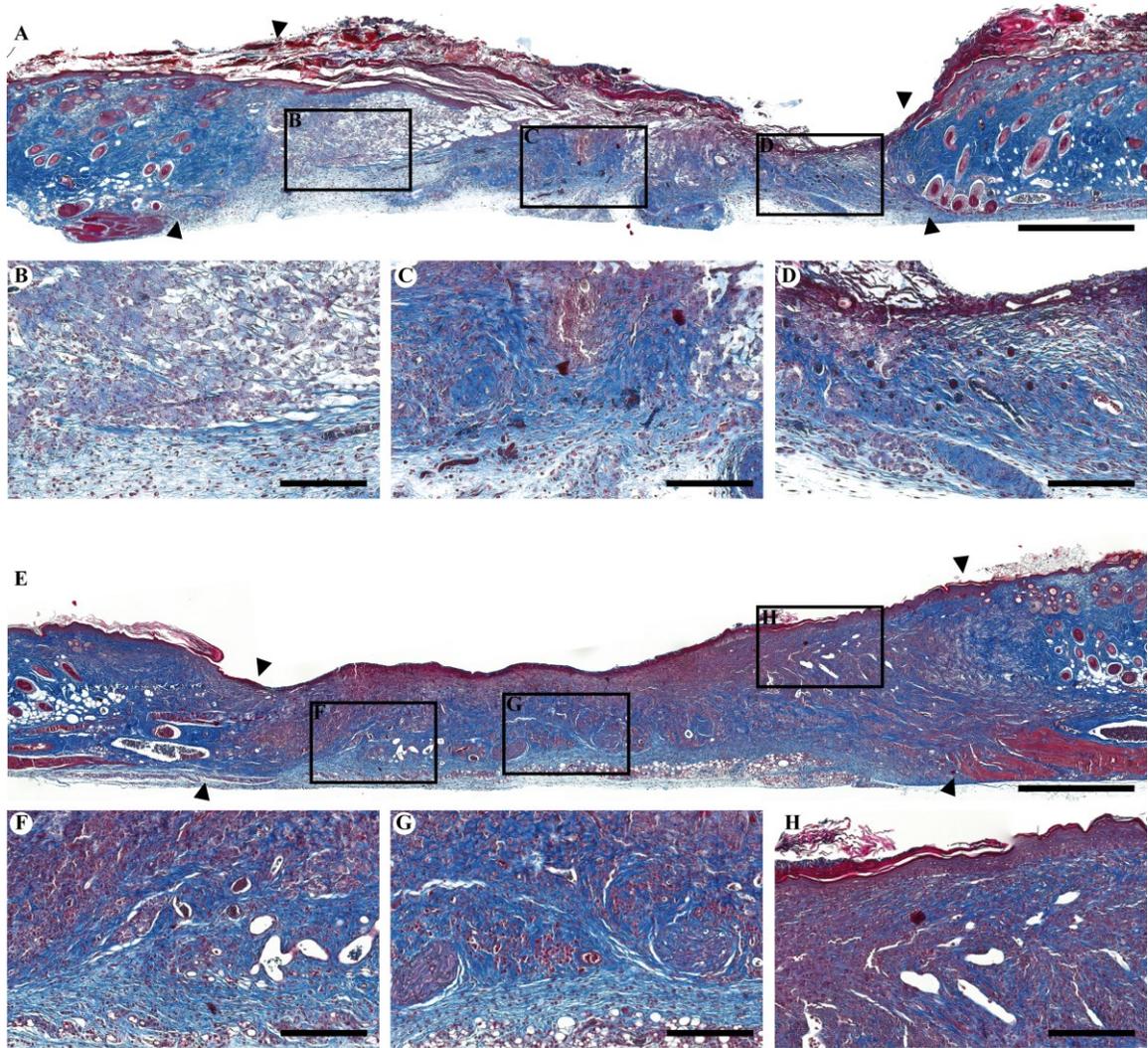


Figure 4

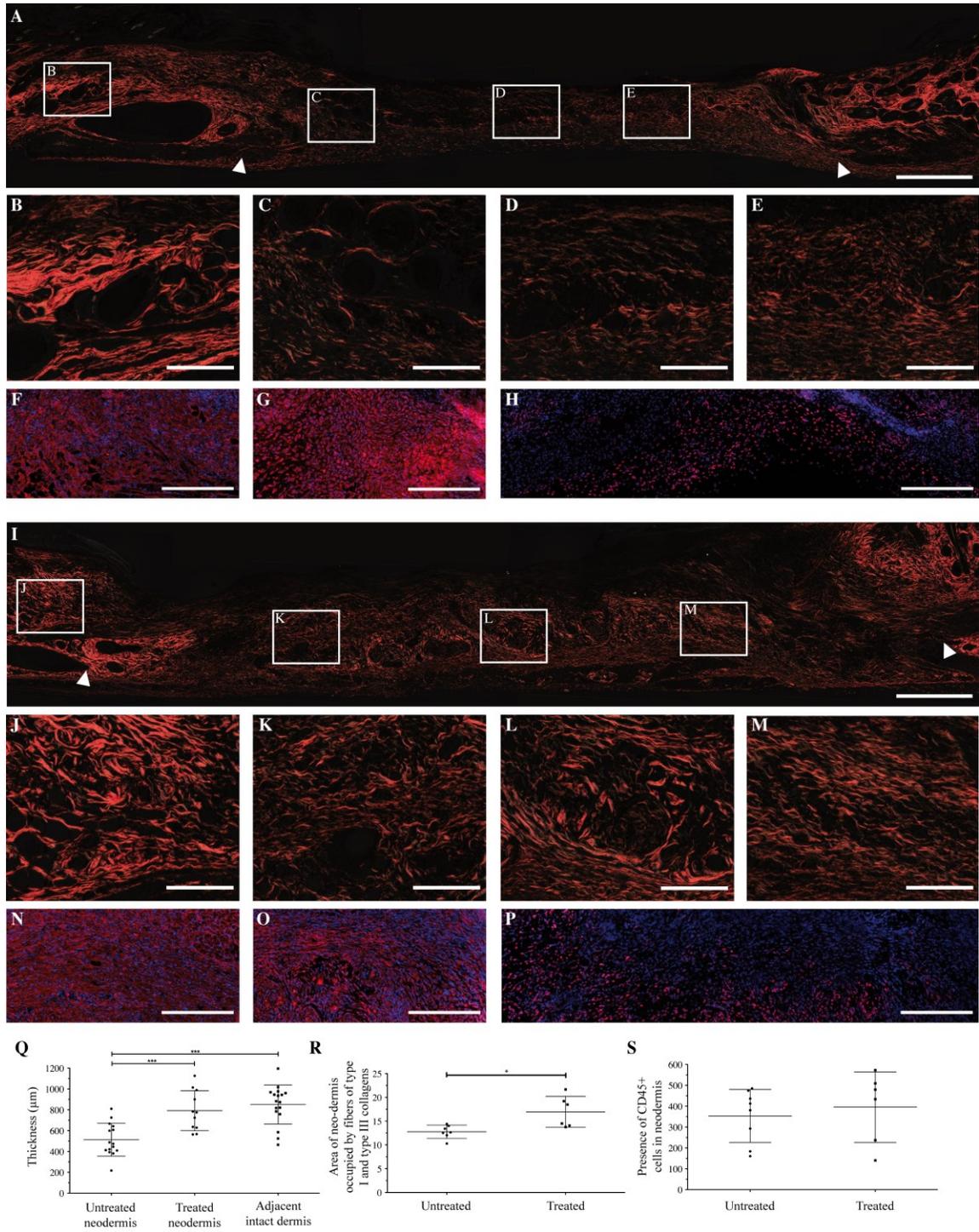


Figure 5

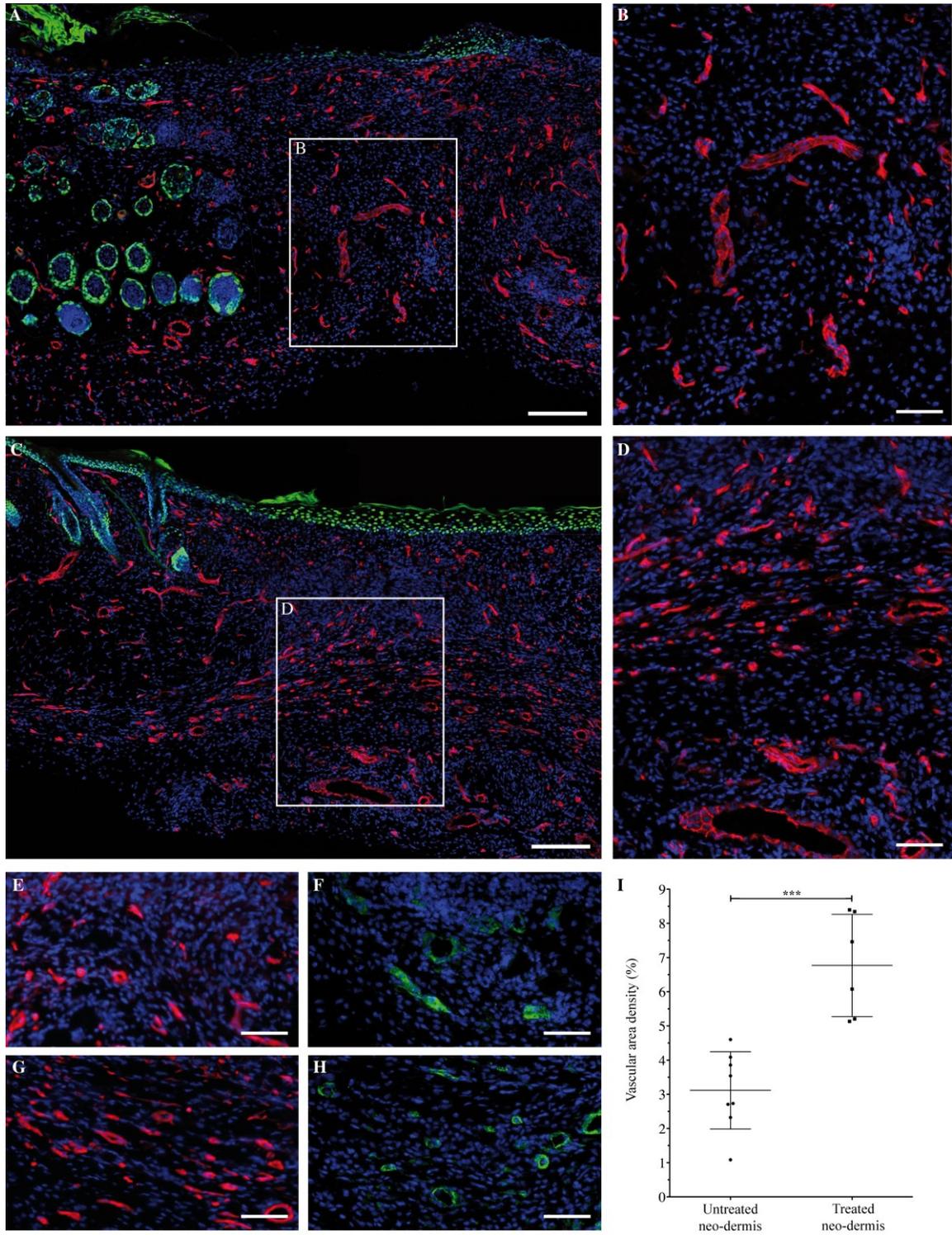
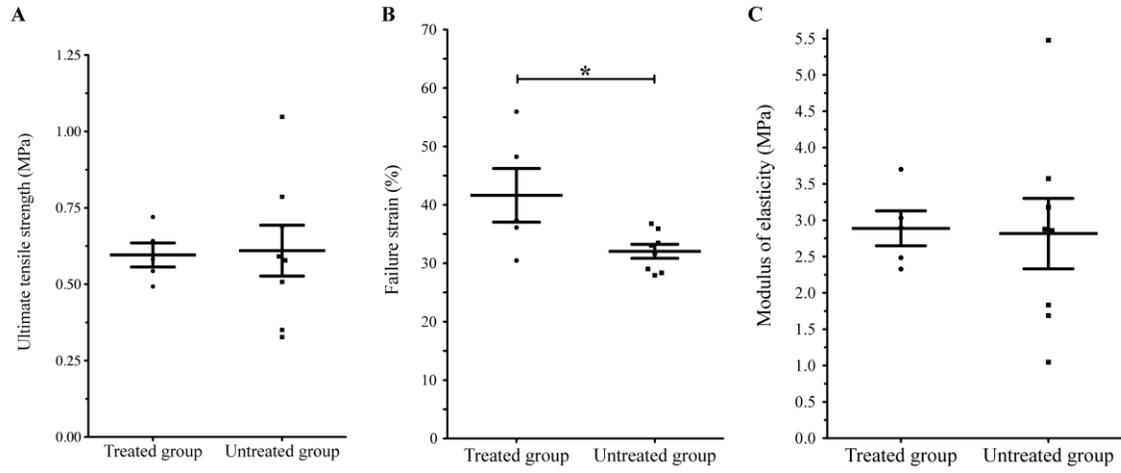


Figure 6



Supplementary figure 1

References

- Ailhaud, G. (2006). "Adipose tissue as a secretory organ: from adipogenesis to the metabolic syndrome." C R Biol **329**(8): 570-577; discussion 653-575.
- Altman, A. M., Y. Yan, N. Matthias, X. Bai, C. Rios, A. B. Mathur, Y. H. Song and E. U. Alt (2009). "IFATS collection: Human adipose-derived stem cells seeded on a silk fibroin-chitosan scaffold enhance wound repair in a murine soft tissue injury model." Stem Cells **27**(1): 250-258.
- Amos, P. J., S. K. Kapur, P. C. Stapor, H. Shang, S. Bekiranov, M. Khurgel, G. T. Rodeheaver, S. M. Peirce and A. J. Katz (2010). "Human adipose-derived stromal cells accelerate diabetic wound healing: impact of cell formulation and delivery." Tissue Eng Part A **16**(5): 1595-1606.
- Boyd, M., M. Flasz, P. A. Johnson, J. S. Roberts and P. Kemp (2007). "Integration and persistence of an investigational human living skin equivalent (ICX-SKN) in human surgical wounds." Regen Med **2**(4): 363-370.
- Cerqueira, M. T., L. P. da Silva, T. C. Santos, R. P. Pirraco, V. M. Correlo, R. L. Reis and A. P. Marques (2014). "Gellan Gum-Hyaluronic Acid Spongy-like Hydrogels and Cells from Adipose Tissue Synergize Promoting Neoskin Vascularization." ACS Appl Mater Interfaces **6**(22): 19668-19679.
- Cerqueira, M. T., R. P. Pirraco, T. C. Santos, D. B. Rodrigues, A. M. Frias, A. R. Martins, R. L. Reis and A. P. Marques (2013). "Human adipose stem cells cell sheet constructs impact epidermal morphogenesis in full-thickness excisional wounds." Biomacromolecules **14**(11): 3997-4008.
- Chen, L., E. E. Tredget, P. Y. Wu and Y. Wu (2008). "Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing." PLoS ONE **3**(4): e1886.
- Coleman, S. R. (2006). "Structural fat grafting: more than a permanent filler." Plast Reconstr Surg **118**(3 Suppl): 108S-120S.
- Davidson, J. M., F. Yu and S. R. Opalenik (2013). "Splinting Strategies to Overcome Confounding Wound Contraction in Experimental Animal Models." Adv Wound Care (New Rochelle) **2**(4): 142-148.
- Eaglstein, W. H., O. M. Alvarez, M. Auletta, D. Leffel, G. S. Rogers, J. A. Zitelli, J. E. Norris, I. Thomas, M. Ironto, J. Fewkes, J. Hardin-Young, R. G. Duff and M. L. Sabolinski (1999). "Acute excisional wounds treated with a tissue-engineered skin (Apligraf)." Dermatol Surg **25**(3): 195-201.
- Fain, J. N. (2006). "Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells." Vitam Horm **74**: 443-477.
- Fain, J. N., A. K. Madan, M. L. Hiler, P. Cheema and S. W. Bahouth (2004). "Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans." Endocrinology **145**(5): 2273-2282.

Fathke, C., L. Wilson, J. Hutter, V. Kapoor, A. Smith, A. Hocking and F. Isik (2004). "Contribution of bone marrow-derived cells to skin: collagen deposition and wound repair." Stem Cells **22**(5): 812-822.

Fonder, M. A., G. S. Lazarus, D. A. Cowan, B. Aronson-Cook, A. R. Kohli and A. J. Mamelak (2008). "Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings." J Am Acad Dermatol **58**(2): 185-206.

Frank, S., B. Stallmeyer, H. Kampfer, N. Kolb and J. Pfeilschifter (2000). "Leptin enhances wound re-epithelialization and constitutes a direct function of leptin in skin repair." J Clin Invest **106**(4): 501-509.

Galiano, R. D., J. t. Michaels, M. Dobryansky, J. P. Levine and G. C. Gurtner (2004). "Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing." Wound Repair Regen **12**(4): 485-492.

Huang, S. P., C. C. Hsu, S. C. Chang, C. H. Wang, S. C. Deng, N. T. Dai, T. M. Chen, J. Y. Chan, S. G. Chen and S. M. Huang (2012). "Adipose-derived stem cells seeded on acellular dermal matrix grafts enhance wound healing in a murine model of a full-thickness defect." Ann Plast Surg **69**(6): 656-662.

Jiang, D., Y. Qi, N. G. Walker, A. Sindrilaru, A. Hainzl, M. Wlaschek, S. MacNeil and K. Scharffetter-Kochanek (2013). "The effect of adipose tissue derived MSCs delivered by a chemically defined carrier on full-thickness cutaneous wound healing." Biomaterials **34**(10): 2501-2515.

Keck, M., D. Haluza, D. B. Lumenta, S. Burjak, B. Eisenbock, L. P. Kamolz and M. Frey (2011). "Construction of a multi-layer skin substitute: Simultaneous cultivation of keratinocytes and preadipocytes on a dermal template." Burns **37**(4): 626-630.

Kim, S. W., H. Z. Zhang, L. Guo, J. M. Kim and M. H. Kim (2012). "Amniotic Mesenchymal Stem Cells Enhance Wound Healing in Diabetic NOD/SCID Mice through High Angiogenic and Engraftment Capabilities." PLoS One **7**(7): e41105.

Kim, W. S., B. S. Park, J. H. Sung, J. M. Yang, S. B. Park, S. J. Kwak and J. S. Park (2007). "Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts." J Dermatol Sci **48**(1): 15-24.

Klinger, M., F. Caviggioli, V. Vinci, A. Salval and F. Villani (2010). "Treatment of chronic posttraumatic ulcers using autologous fat graft." Plast Reconstr Surg **126**(3): 154e-155e.

Klinger, M., M. Marazzi, D. Vigo and M. Torre (2008). "Fat injection for cases of severe burn outcomes: a new perspective of scar remodeling and reduction." Aesthetic Plast Surg **32**(3): 465-469.

Labbe, B., G. Marceau-Fortier and J. Fradette (2011). "Cell sheet technology for tissue engineering: the self-assembly approach using adipose-derived stromal cells." Methods Mol Biol **702**: 429-441.

Liapakis, I. E., S. Anagnostoulis, A. J. Karayiannakis, D. P. Korkolis, M. Lambropoulou, E. Arnaud and C. E. Simopoulos (2008). "Recombinant leptin administration improves early angiogenesis in full-thickness skin flaps: an experimental study." In Vivo **22**(2): 247-252.

Lim, J. S. and G. Yoo (2010). "Effects of adipose-derived stromal cells and of their extract on wound healing in a mouse model." J Korean Med Sci **25**(5): 746-751.

Lin, Y. C., T. Grahovac, S. J. Oh, M. Ieraci, J. P. Rubin and K. G. Marra (2013). "Evaluation of a multi-layer adipose-derived stem cell sheet in a full-thickness wound healing model." Acta Biomater **9**(2): 5243-5250.

Loder, S., J. R. Peterson, S. Agarwal, O. Eboda, C. Brownley, S. DeLaRosa, K. Ranganathan, P. Cederna, S. C. Wang and B. Levi (2014). "Wound Healing Immediately Post-Thermal Injury Is Improved by Fat and Adipose-Derived Stem Cell Isografts." J Burn Care Res **36**(1): 70-76.

Machula, H., B. Ensley and R. Kellar (2014). "Electrospun Tropoelastin for Delivery of Therapeutic Adipose-Derived Stem Cells to Full-Thickness Dermal Wounds." Adv Wound Care (New Rochelle) **3**(5): 367-375.

Marston, W. A., J. Hanft, P. Norwood, R. Pollak and G. Dermagraft Diabetic Foot Ulcer Study (2003). "The efficacy and safety of Dermagraft in improving the healing of chronic diabetic foot ulcers: results of a prospective randomized trial." Diabetes Care **26**(6): 1701-1705.

Munoz, M. J., J. A. Bea, J. F. Rodriguez, I. Ochoa, J. Grasa, A. Perez del Palomar, P. Zaragoza, R. Osta and M. Doblare (2008). "An experimental study of the mouse skin behaviour: damage and inelastic aspects." J Biomech **41**(1): 93-99.

Murad, A., A. K. Nath, S. T. Cha, E. Demir, J. Flores-Riveros and M. R. Sierra-Honigmann (2003). "Leptin is an autocrine/paracrine regulator of wound healing." FASEB J **17**(13): 1895-1897.

Murphy, M. B., K. Moncivais and A. I. Caplan (2013). "Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine." Exp Mol Med **45**: e54.

Nambu, M., S. Kishimoto, S. Nakamura, H. Mizuno, S. Yanagibayashi, N. Yamamoto, R. Azuma, S. Nakamura, T. Kiyosawa, M. Ishihara and Y. Kanatani (2009). "Accelerated wound healing in healing-impaired db/db mice by autologous adipose tissue-derived stromal cells combined with atelocollagen matrix." Ann Plast Surg **62**(3): 317-321.

Nathoo, R., N. Howe and G. Cohen (2014). "Skin substitutes: an overview of the key players in wound management." J Clin Aesthet Dermatol **7**(10): 44-48.

Park, S. J., S. H. Moon, H. J. Lee, J. J. Lim, J. M. Kim, J. Seo, J. W. Yoo, O. J. Kim, S. W. Kang and H. M. Chung (2013). "A comparison of human cord blood- and embryonic stem cell-derived endothelial progenitor cells in the treatment of chronic wounds." Biomaterials **34**(4): 995-1003.

Rendl, M., L. Polak and E. Fuchs (2008). "BMP signaling in dermal papilla cells is required for their hair follicle-inductive properties." Genes Dev **22**(4): 543-557.

Rich, L. and P. Whittaker (2005). "Collagen and Picrosirius Red Staining : A Polarized Light Assessment of Fibrillar Hue and Spatial Distribution." Journal of Morphological Sciences **22**(2): 97-104.

Rigotti, G., A. Marchi, M. Galie, G. Baroni, D. Benati, M. Krampera, A. Pasini and A. Sbarbati (2007). "Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells." Plast Reconstr Surg **119**(5): 1409-1422; discussion 1423-1404.

Ring, B. D., S. Scully, C. R. Davis, M. B. Baker, M. J. Cullen, M. A. Pelleycounter and D. M. Danilenko (2000). "Systemically and topically administered leptin both accelerate wound healing in diabetic ob/ob mice." Endocrinology **141**(1): 446-449.

Salgado, A. J., R. L. Reis, N. J. Sousa and J. M. Gimble (2010). "Adipose tissue derived stem cells secrete soluble factors and their roles in regenerative medicine." Curr Stem Cell Res Ther **5**(2): 103-110.

Sanchez-Munoz, I., R. Granados, P. Holguin Holgado, J. A. Garcia-Vela, C. Casares and M. Casares (2014). "The Use of Adipose Mesenchymal Stem Cells and Human Umbilical Vascular Endothelial Cells on a Fibrin Matrix for Endothelialized Skin Substitute." Tissue Eng Part A.

Sasagawa, T., T. Shimizu, S. Sekiya, M. Yamato and T. Okano (2014). "Comparison of angiogenic potential between prevascular and non-prevascular layered adipose-derived stem cell-sheets in early post-transplanted period." J Biomed Mater Res A **102**(2): 358-365.

Schmidt, B. A. and V. Horsley (2013). "Intradermal adipocytes mediate fibroblast recruitment during skin wound healing." Development **140**(7): 1517-1527.

Sen, C. K., G. M. Gordillo, S. Roy, R. Kirsner, L. Lambert, T. K. Hunt, F. Gottrup, G. C. Gurtner and M. T. Longaker (2009). "Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy." Wound Repair Regen **17**(6): 763-771.

Shevchenko, R. V., S. L. James and S. E. James (2010). "A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction." J R Soc Interface **7**(43): 229-258.

Sierra-Honigmann, M. R., A. K. Nath, C. Murakami, G. Garcia-Cardena, A. Papapetropoulos, W. C. Sessa, L. A. Madge, J. S. Schechner, M. B. Schwabb, P. J. Polverini and J. R. Flores-Riveros (1998). "Biological action of leptin as an angiogenic factor." Science **281**(5383): 1683-1686.

Skardal, A., D. Mack, E. Kapetanovic, A. Atala, J. D. Jackson, J. Yoo and S. Soker (2012). "Bioprinted amniotic fluid-derived stem cells accelerate healing of large skin wounds." Stem Cells Transl Med **1**(11): 792-802.

Stallmeyer, B., H. Kampfer, M. Podda, R. Kaufmann, J. Pfeilschifter and S. Frank (2001). "A novel keratinocyte mitogen: regulation of leptin and its functional receptor in skin repair." J Invest Dermatol **117**(1): 98-105.

Steinberg, J. P., S. J. Hong, M. R. Geringer, R. D. Galiano and T. A. Mustoe (2012). "Equivalent effects of topically-delivered adipose-derived stem cells and dermal fibroblasts in the ischemic rabbit ear model for chronic wounds." Aesthet Surg J **32**(4): 504-519.

Stoff, A., A. A. Rivera, N. Sanjib Banerjee, S. T. Moore, T. Michael Numnum, A. Espinosa-de-Los-Monteros, D. F. Richter, G. P. Siegal, L. T. Chow, D. Feldman, L. O. Vasconez, J. Michael Mathis, M. A. Stoff-Khalili and D.

T. Curiel (2009). "Promotion of incisional wound repair by human mesenchymal stem cell transplantation." Exp Dermatol **18**(4): 362-369.

Sultan, S. M., J. S. Barr, P. Butala, E. H. Davidson, A. L. Weinstein, D. Knobel, P. B. Saadeh, S. M. Warren, S. R. Coleman and A. Hazen (2012). "Fat grafting accelerates revascularisation and decreases fibrosis following thermal injury." J Plast Reconstr Aesthet Surg **65**(2): 219-227.

Sultan, S. M., C. S. Stern, R. J. Allen, Jr., V. D. Thanik, C. C. Chang, P. D. Nguyen, O. Canizares, C. Szpalski, P. B. Saadeh, S. M. Warren, S. R. Coleman and A. Hazen (2011). "Human fat grafting alleviates radiation skin damage in a murine model." Plast Reconstr Surg **128**(2): 363-372.

Teng, M., Y. Huang and H. Zhang (2014). "Application of stems cells in wound healing-an update." Wound Repair Regen **22**(2): 151-160.

Trottier, V., G. Marceau-Fortier, L. Germain, C. Vincent and J. Fradette (2008). "IFATS collection: Using human adipose-derived stem/stromal cells for the production of new skin substitutes." Stem Cells **26**(10): 2713-2723.

Vermette, M., V. Trottier, V. Menard, L. Saint-Pierre, A. Roy and J. Fradette (2007). "Production of a new tissue-engineered adipose substitute from human adipose-derived stromal cells." Biomaterials **28**(18): 2850-2860.

White, W. L., G. S. Brody, A. A. Glaser, R. D. Marangoni, T. G. Beckwith, J. S. Must and J. A. Lehman, Jr. (1971). "Tensiometric studies of unwounded and wounded skin: results using a standardized testing method." Ann Surg **173**(1): 19-25.

Wu, Y., L. Chen, P. G. Scott and E. E. Tredget (2007). "Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis." Stem Cells **25**(10): 2648-2659.

Yu, J., Y. K. Tu, Y. B. Tang and N. C. Cheng (2014). "Stemness and transdifferentiation of adipose-derived stem cells using L-ascorbic acid 2-phosphate-induced cell sheet formation." Biomaterials **35**(11): 3516-3526.

Yun, I. S., Y. R. Jeon, W. J. Lee, J. W. Lee, D. K. Rah, K. C. Tark and D. H. Lew (2012). "Effect of human adipose derived stem cells on scar formation and remodeling in a pig model: a pilot study." Dermatol Surg **38**(10): 1678-1688.

Zhang, Y., H. Hao, J. Liu, X. Fu and W. Han (2012). "Repair and regeneration of skin injury by transplanting microparticles mixed with Wharton's jelly and MSCs from the human umbilical cord." Int J Low Extrem Wounds **11**(4): 264-270.