



**Production et greffe
de substituts urétraux lagomorphes produits
par la méthode d'auto-assemblage**

Mémoire

Amélie Morissette

Maîtrise en biologie cellulaire et moléculaire
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

© Amélie Morissette, 2015

Résumé

En urologie clinique, les malformations congénitales et les traumatismes constituent des cas de figure où il est parfois nécessaire de procéder à des reconstructions urétrales. Afin de pallier au manque de tissu disponible pour effectuer des chirurgies adéquates, le génie tissulaire permet de développer un biomatériau autologue, vivant et sans matériaux exogènes, constitué à partir de cellules de lapin. Après avoir optimisé la méthode d'auto-assemblage pour les cellules de lapin, des tissus manipulables ont pu être fabriqués grâce à une production accrue de matrice extracellulaire. Ces tissus ont permis de construire des substituts urétraux tubulaires mécaniquement résistants, suturables et greffables. Lors des tests préliminaires, quatre lapins ont été greffés et les résultats ont permis de valider notre modèle, puis de découvrir ses forces et faiblesses afin de poursuivre son optimisation. Lors des études à long terme chez le lapin, le substitut urétral reconstruit par auto-assemblage pourra être amélioré pour éviter les sténoses.

Table des matières

Résumé.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	xi
Remerciements.....	xiii
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1 Le système urinaire.....	1
1.1.1 Les organes et fonctions du haut appareil urinaire.....	1
1.1.2 Les organes et fonctions du bas appareil urinaire.....	2
1.1.2.1 La vessie.....	2
1.1.2.1.1 La sous-muqueuse et les muscles vésicaux.....	2
1.1.2.1.2 L'urothélium.....	4
1.1.2.2 L'urètre.....	8
1.1.2.2.1 La structure du stroma et des muscles urétraux.....	9
1.1.2.2.2 La structure de l'épithélium urétral.....	10
1.1.3 Les composantes matricielles.....	11
1.1.3.1 Les rôles de la matrice extracellulaire.....	11
1.1.3.2 La matrice extracellulaire et ses composantes.....	12
1.1.3.3 Les collagènes.....	13
1.1.3.3.1 Les collagènes en culture cellulaire.....	17
1.1.3.3.2 Le dosage des collagènes.....	18
1.1.3.3.3 Les différences entre les collagènes humains et lapins.....	19
1.1.4 Les pathologies et malformations.....	20
1.2 Les méthodes de reconstruction urétrale.....	22
1.2.1 Les chirurgies de reconstruction standard.....	22
1.2.2 Le génie tissulaire.....	23
1.2.2.1 Les matrices décellularisées.....	24
1.2.2.2 Les biomatériaux.....	26
1.2.2.2.1 Les biomatériaux naturels.....	27
1.2.2.2.2 Les biomatériaux synthétiques.....	29
1.2.2.2.3 Les biomatériaux mixtes.....	30
1.3 La méthode d'auto-assemblage, une technique unique au LOEX.....	35
1.3.1 La multidisciplinarité du LOEX.....	35
1.3.2 Le modèle de substitut urétral humain.....	37

1.4	Problématique, hypothèse et objectifs.....	38
Chapitre 2	: Matériels et méthodes.....	39
2.1	L'extraction enzymatique des cultures primaires	39
2.2	L'auto-assemblage, la méthode traditionnelle adaptée aux cellules de lapin.....	40
2.3	Le dosage des collagènes	42
2.3.1	Le dosage du collagène par la coloration au <i>Sirius Red</i>	43
2.3.2	Le dosage de l'hydroxyproline	43
2.3.3	Le dosage de l'ADN	43
2.4	Les analyses microscopiques.....	44
2.4.1	L'histologie	44
2.4.2	Les immunofluorescences sur coupes minces	44
2.4.3	Les immunofluorescences sur lamelles de verre	45
2.5	Les tests mécaniques	46
2.6	Les chirurgies de reconstruction sur le lapin.....	49
2.7	Les analyses statistiques.....	50
Chapitre 3	: Résultats	51
3.1	L'optimisation des conditions de culture des cellules mésenchymateuses de lapin pour la production de MEC	51
3.1.1	La coloration au <i>Sirius Red</i>	52
3.1.2	Le dosage de l'hydroxyproline	53
3.2	L'optimisation de la méthode d'auto-assemblage pour les cellules de lapin.....	55
3.2.1	Rendre le modèle spécifique à l'organe ciblé	55
3.2.2	L'amélioration de la fusion des feuillets et préservation de la longueur des substituts urétraux 57	
3.2.2.1	Le choix du sérum	57
3.2.2.2	La modification du temps de maturation des tubes reconstruits.....	59
3.2.3	La modification du type de couche nourricière pour la culture des cellules urothéliales	65
3.3	La greffe urétrale complète chez le lapin	66
3.3.1	La caractérisation microscopique des tubes pré-implantation.....	66
3.3.1.1	Les propriétés mécaniques des substituts urétraux greffés.....	67
3.3.1.2	Les résultats des greffes sur le lapin et les complications associées	68
3.3.1.3	La caractérisation des greffons post-implantation.....	70
Chapitre 4	: Discussion	75
Conclusion.....		95
Bibliographie.....		97

Liste des tableaux

Tableau 1 : Résumé de l'expression des kératines de l'urothélium selon leur emplacement dans l'urothélium et leur classification normale dans la littérature.	7
Tableau 2 : Résumé des biomatériaux utilisés pour la reconstruction d'urètre.	31
Tableau 3 : Tableau des anticorps primaires utilisés en fonction des techniques réalisées.	45
Tableau 4 : Nombres de substituts urétraux testés lors des tests mécaniques.	46
Tableau 5 : Résultats et complications des greffes urétrales chez le lapin.	69

Liste des figures

Figure 1 : Maturation des vésicules d'uroplakines du Golgi à la membrane plasmique.	6
Figure 2 : Anatomie et histologie de l'urètre.	8
Figure 3 : Disposition anatomique des sphincters de l'urètre chez l'homme.	10
Figure 4 : Conformation du procollagène.	15
Figure 5 : Assemblage du collagène.	16
Figure 6 : Représentation schématique de l'hypospadias.	21
Figure 7 : Méthode traditionnelle de production des substituts urétraux.	41
Figure 8 : Tests mécaniques effectués sur les substituts urétraux pré-implantation.	47
Figure 9 : Formule de l'estimation de la pression d'éclatement (P).	48
Figure 10 : Représentation schématique des tests de rétention de suture.	48
Figure 11 : Chirurgie de reconstruction urétral chez le lapin.	50
Figure 12 : Quantification des cellules présentes dans les échantillons selon les additifs utilisés. ...	52
Figure 13 : Dosage, par la coloration au <i>Sirius Red</i> et de l'hydroxyproline, du collagène déposé selon les additifs ajoutés pour la culture de tissus de lapin reconstruits.	54
Figure 14 : Caractérisation des cellules mésenchymateuses dermiques.	56
Figure 15 : Caractérisation des cellules mésenchymateuses de stroma vésical.	57
Figure 16 : Substituts urétraux selon le sérum utilisé pour une période de maturation de 3 semaines.	58
Figure 17 : Graphique de la longueur des substituts urétraux selon le temps de maturation en fonction des différents types de sérum.	59
Figure 18 : Caractérisation de la résistance mécanique des substituts urétraux reconstruits pré- implantation, selon le type de reconstruction et du nombre de semaines de maturation.	60
Figure 19 : Représentation sous forme de mosaïque des substituts urétraux après 3, 5 et 7 semaines de maturation sur mandrin, pour les 2 types de constructions.	61
Figure 20 : Problèmes associés à une longue maturation des substituts urétraux sur les mandrins. .	62
Figure 21 : Persistance des cellules épithéliales dans les substituts reconstruits après 3, 5 et 7 semaines de maturation.	64
Figure 22 : Utilisation de couche nourricière pour la culture des cellules urothéliales de vessie de lapin.	65
Figure 23 : Caractérisation des substituts urétraux pré-implantation, après 3 semaines de maturation.	67
Figure 24 : Caractérisation des greffons post-implantation.	70
Figure 25 : État des vessies des lapins greffés suite à la nécropsie.	71
Figure 26 : Présence de cellules épithéliales dans les tissus reconstruits greffés chez le lapin pré- implantation.	73

Liste des abréviations

µg/ml	Microgramme par millilitre
ADN	Acide désoxyribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
bFGF	Basic fibroblast growth factor (facteur de croissance des fibroblastes basique)
BGS	Bovin growth serum (sérum de boeuf)
CMDGT	Centre multidisciplinaire du développement du génie tissulaire
CML	Cellule musculaire lisse
CSTA	Cellules stromales/souches du tissu adipeux
Ctl	Contrôle
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium, supplémenté de 10% BGS, de 100 U/ml de pénicilline et de 25 µg/ml de gentamicine.
DMEM-Ham complet	Dulbecco's Modified Eagle Medium :Ham F12 (3:1), 10% BGS, 5 µg/ml d'insuline, 0.4 µg/ml d'hydrocortisone, 10-10 M de toxine du choléra, 10 µg/ml de facteur de croissance épidermique (EGF) de 100 U/ml pénicilline et de 25 µg/ml de gentamicine
EDTA	(Ethylene dinitrilo) tetraacetic acid, disodium salt, dihydrate
EGF	Epithelial growth factor (facteur de croissance épithélial)
Env.	Environ
fb	Fibroblaste
fd	Tissus reconstruit avec des fibroblastes dermiques
FDA	Food and Drug Administration
Fr	French
g/f	Gramme par force
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
Hrs	Heures
hyP	Hydroxyproline
IGF	Insuline-like growth factor (Facteur de croissance analogue à insuline)
Jr (s)	Jour (s)
LOEX	Laboratoire d'organogénèse expérimentale
LPA	Acide lysophosphatidique
M (µM)	Molaire (micromolaire)

MEC	Matrice extracellulaire
mg/kg	Milligramme par kilogramme
Mix	Tissu reconstruit avec des fibroblastes dermiques et vésicaux (1: 1)
mm (nm)	Millimètre (Nanomètre)
MMP	Métalloprotéinase
mm/s	Millimètre par seconde
mmHg	Millimètres de mercure
N	Newtons
ng/ml	Nanogramme par millilitre
PBS	Solution saline tamponnée au phosphate
PEG	Polyéthylène glycol (polymère)
PGA	Acidepolyglycolique (polymère)
PLA	Acide polylactique (polymère)
PLC	Polycarbonatelactone (polymère)
PLGA	Acide polylactique-co-glycolique (polymère)
psi	Pounds per square inch (livre par pouce carré)
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
Qté	Quantité
S3T3	Fibroblastes irradiés de peaux de souris
Shh	Sonic HedgeHog
SIS	Small intestinal submucosa (Sous-muqueuse d'intestin grêle de porc décellularisée)
SLA	Sclérose latérale amyotrophique
SVF	Sérum de veau fœtal
UPIa,	
UPIb,	
UPII,	Uroplakine de type Ia, Ib, II, IIIa, IIIb.
UPIIIa,	
UPIIIb,	
ZO-1	Zona occludens -1
α-SMA	Alpha-smooth muscle actin (alpha actine du muscle lisse)

Remerciements

Suite à près de dix années d'université, l'achèvement de ce quatrième diplôme universitaire n'aurait pas été possible sans la contribution de plusieurs personnes qui sont très chères à mes yeux. Je souhaite d'abord remercier mes parents parce qu'ils ont cru en moi, ils n'ont jamais douté de mes capacités à poursuivre aux études graduées. Ils m'ont surtout permis de m'y consacrer à temps plein ce qui est, de nos jours, un grand privilège. Un merci particulier à mon ami Jean-François, qui me côtoie depuis mes débuts à l'université. Merci JF pour ton écoute, tes bons conseils et ton tempérament festif, parfait pour me changer les idées. Je te remercie de faire encore partie de ma vie après toutes ces années. Ma vie universitaire n'aurait pas été aussi divertissante et enrichissante sans la présence de ces fameux collègues Biomed: Simon, Eve, Nic, Jessica, Éric, etc. Je ne suis pas près de vous oublier.

Bien entendu, tout le travail derrière ce mémoire n'aurait pas été possible sans la participation de mon équipe de recherche et c'est pourquoi je tiens en premier lieu à remercier mon directeur, le Dr. Stéphane Bolduc, de m'avoir fait confiance malgré mon parcours non conventionnel. Merci Stéphane pour ton dynamisme, ton authenticité et ta grande disponibilité, malgré ton horaire très chargé. C'est un honneur d'avoir fait partie du *team* Uro! Un merci particulier à Stéphane Chabaud pour ses bons conseils et son esprit critique, essentiel et même indispensable à la création de bonnes argumentations scientifiques. Impossible de passer sous silence les contributions importantes de Geneviève Bernard et d'Alexandre Rousseau, qui ont été mes mentors depuis le tout début de ce périple. En plus de m'avoir tout appris, vous m'avez épaulé, conseillé, aidé et surtout "enduré". Merci d'avoir été à mes côtés et d'y être encore aujourd'hui en tant qu'amis, vous êtes des gens très précieux pour moi. Merci à tous les autres membres du LOETU que j'ai côtoyés pendant ces années ainsi qu'aux assistants de recherche, très importants pour l'avancement des connaissances des étudiants. Je pense notamment à Sébastien Larochelle, qui m'a très souvent soutenu pour la mise sur pied de plusieurs protocoles expérimentaux. Je tiens finalement à remercier tous les membres du LOEX qui forment la grande famille rassembleuse qui a animé mon quotidien pendant 3 ans et qui continue de m'entourer de belle façon chaque jour.

Chapitre 1 : Introduction

1.1 Le système urinaire

1.1.1 Les organes et fonctions du haut appareil urinaire

Comme tous les êtres vivants, l'humain se nourrit de toutes sortes d'aliments et génère des déchets métaboliques lors de la digestion, surtout lors de l'utilisation des nutriments qu'elle contient. Le système urinaire est un ensemble d'organes qui permet à notre corps d'éliminer les agents toxiques grâce à la formation de l'urine et de son excrétion. Ce système est composé des reins, des uretères, de la vessie et de l'urètre. Tout le tractus urinaire reçoit des affluences du système nerveux autonome, le sympathique et le parasympathique. (Birder 2013)

Les reins sont le point de départ du système urinaire et ont des rôles très importants à jouer, dont une partie de la régulation de la pression sanguine, la régulation acido-basique du sang, la production et la sécrétion de certaines hormones, la filtration du sang, la réabsorption des ions, du glucose et de l'eau et finalement la sécrétion des déchets par l'urine. (Pocock & Richard 2004) Les reins sont anatomiquement positionnés de part et d'autre de la colonne vertébrale dans la partie supérieure de l'abdomen. Ils sont divisés en deux régions distinctes autant dans leur anatomie que dans leur fonction : le cortex rénal, contenant les glomérules, et les médulla externe et interne, contenant les tubules rénaux jusqu'au pelvis rénal. (Gartner & Hiatt 2006)

Les reins produisent de 1 à 1,5 L d'urine par jour. Ce liquide stérile et toxique pour l'organisme a une composition chimique très variable, modifiée selon l'alimentation. Les principaux constituants de l'urine sont l'eau, l'urée, des ions d'ammoniaque, le calcium, le potassium, le sodium, le chlore et son pH se situe entre 4,6 et 7,5. (Pocock & Richard 2004) Normalement, on n'y retrouve aucune protéine, elles restent dans le sang puisqu'elles sont trop volumineuses, ni aucune molécule de glucose, rapidement réabsorbées par le rein au cours du processus. La présence de ces molécules dans l'urine est un signe pathologique et demande une investigation médicale. L'urine est élaborée lors du passage du sang à travers le néphron, l'unité fonctionnelle du glomérule. Le filtrat obtenu passe ensuite dans les tubules contournés et les tubules collecteurs, jusqu'à son arrivée dans le pelvis rénal, où l'urine est acheminée vers la vessie par les uretères.

Les uretères sont des structures tubulaires de 25 à 30 cm de longueur, capables de contractions péristaltiques et recouvertes à l'intérieur par un épithélium spécialisé, l'urothélium. Ce dernier borde d'ailleurs tout le système urinaire, du pelvis rénal, au tiers proximal de l'urètre. (Le Normand et al.

2005) Une description détaillée de cet urothélium se retrouve dans la section 1.1.2.1.2 du présent mémoire. Sous cet épithélium se retrouve une sous-muqueuse composée d'une lamina propria, de matrice extracellulaire (MEC) et de fibroblastes, puis une portion musculaire. Cette musculature est plus précisément formée d'une couche de muscles lisses longitudinale interne, d'une circulaire moyenne, puis d'une dernière couche de muscle qui débute seulement dans le dernier tiers de l'uretère, une longitudinale externe. Ce sont des couches de muscles qui assurent le transport actif de l'urine jusqu'à la vessie par des ondes péristaltiques. (Osman et al. 2009)

1.1.2 Les organes et fonctions du bas appareil urinaire

1.1.2.1 La vessie

La vessie est l'organe du système urinaire qui emmagasine l'urine jusqu'au moment de la miction. Elle possède des propriétés viscoélastiques qui lui confèrent sa capacité de garder une pression interne basse, inférieure à 15 cm d'eau, tout au long du remplissage, de sorte que les reins soient protégés en tout temps. (Le Normand et al. 2005) En condition normale, le reflux de l'urine vers les reins n'est pas possible, car la pression dans le tiers inférieur des uretères est plus élevée que dans la vessie, soit d'environ 25 à 30 cm d'eau. La structure de la vessie ressemble beaucoup à celle des uretères, l'intérieur est bordé par un épithélium, l'urothélium, suivi d'une sous-muqueuse, de la musculature, puis recouvert d'une adventice de MEC et de fibroblastes.

La vessie des lagomorphes, donc des lapins, n'est pas très différente de celle de l'homme. La couche musculaire semble plus mince, mais l'urothélium est tout de même typique.

1.1.2.1.1 La sous-muqueuse et les muscles vésicaux

Sous l'urothélium de la vessie, se trouve le stroma vésical composé de la sous-muqueuse et des muscles vésicaux. Comme les uretères, la vessie est un organe composé de muscles lisses anatomiquement disposés de la même façon que dans l'uretère décrit en section 1.1.1. Le regroupement des muscles de la vessie, appelé le detrusor, est toutefois beaucoup plus volumineux et davantage fort que dans les uretères, afin de pouvoir propulser l'urine qu'elle contient à l'extérieur du corps. Les muscles vésicaux sont innervés par les afférences du système nerveux autonome : le parasympathique régit le relâchement des muscles, tandis que le système nerveux sympathique est responsable des contractions vésicales. Entre la partie musculaire de la vessie et l'urothélium se trouve une section importante appelée la sous-muqueuse. Elle comprend la lame basale sur laquelle s'appuient l'urothélium et un stroma de tissus conjonctif lâche juste en dessous, contenant des

fibroblastes. Des vaisseaux sanguins et certaines fibres nerveuses se retrouvent aussi dans la sous-muqueuse. Celle-ci joue plusieurs rôles dont celui de permettre l'étirement de la vessie en phase de remplissage, grâce à sa structure flexible et élastique. (Cao et al. 2009) Cette section du stroma vésical est effectivement composée de MEC dont le collagène de type I, très fortement concentré sous la lamina propria, et de collagène de type III, localisé davantage autour des fascias de muscles lisses lorsque l'on se rapproche de la musculature de la vessie. (Brown et al. 2005) Les fibres de collagène de type III prennent une conformation différente selon l'état plus ou moins rempli de la vessie : les fibres semblent désorganisées et aléatoires lorsque la vessie est vide, alors qu'elles sont plutôt alignées avec l'urothélium lorsque la vessie est très distendue. (Chang et al. 1998) Le même phénomène se produit pour les fibres de collagène de type I. Ces dernières sont aussi reconnues pour apporter au tissu une bonne résistance mécanique, ainsi qu'une structure qui supporte la compliance de la vessie. Les fibres d'élastine participent pour leur part au processus de rétrécissement de la vessie après la miction. (Aitken & Bāgli 2009)

Entre le stroma vésical et l'urothélium, la communication est à double sens et chacun exprime des facteurs importants dans l'organisation et la différenciation de l'autre. En effet, le stroma peut envoyer des signaux et/ou des facteurs de croissance aux cellules urothéliales attachées à la membrane basale. (Yamany et al. 2014) Il semblerait que la différenciation de l'urothélium passe par les signaux de régulation de l'acide rétinoïque présent et produit dans le stroma, autant au niveau embryologique qu'au stade adulte. (Gandhi et al. 2013) À leur tour, les cellules urothéliales envoient aussi des signaux de différenciation aux cellules du stroma vésical, afin de provoquer la différenciation des cellules mésenchymateuses en cellules musculaires lisses. (Cao et al. 2009; Baskin et al. 1996) Ce phénomène, qui mettrait en œuvre la voie de signalisation de Sonic HedgeHog (Shh), implique un gradient de concentration où une forte concentration de Shh inhibe la formation de cellules musculaires lisses (CML), alors qu'une faible concentration modifie le phénotype des cellules mésenchymateuses qui acquièrent les caractéristiques des CML. (Shiroyanagi et al. 2007) Ce processus, qui s'effectue autant lors de l'embryogénèse qu'à l'âge adulte, permet la formation de la sous-muqueuse située juste en dessous de l'urothélium, contenant des fibroblastes et aucun CML. La communication entre l'urothélium et les cellules mésenchymateuses du stroma est aussi bien visualisée lors de l'utilisation de ces types cellulaires en génie tissulaire. (Brown et al. 2005) Une plus grande infiltration des CML dans les matrices de collagène lors de l'ajout de cellules urothéliales dans les modèles est un bon exemple de ce genre de coopération entre les différents types cellulaires.

1.1.2.1.2 L'urothélium

L'urothélium est sans contredit la partie la plus spécialisée de la vessie de par sa complexité, son unicité et son important rôle de barrière étanche contre l'entrée de l'urine dans les tissus environnants. C'est la barrière la plus imperméable du corps humain avec une résistance électrique transépithéliale d'un maximum de $75\,000\ \Omega/\text{cm}^2$. (Wu et al. 2009; Lewis & Diamond 1976; Negrete et al. 1996) À titre indicatif, la peau peut atteindre une résistance transépithéliale de $3\,940 \pm 0.27\ \Omega/\text{cm}^2$. (Davies et al. 2004) Chez à peu près tous les mammifères (Firth & Hicks 1973), l'urothélium est composé de trois couches de cellules : la couche basale contient les cellules progénitrices; la couche intermédiaire pouvant contenir de un à quatre niveaux de cellules en voie de maturation ; la couche superficielle où l'on retrouve les cellules parapluies. Ces dernières sont les cellules fonctionnelles et les seules qui soient complètement différenciées de l'urothélium. (Yamany et al. 2014) (Figure 2C)

L'urothélium est un épithélium de type transitionnel, où toutes les cellules le composant devraient avoir une attache à la lame basale. (Moll et al. 2008; Alonso et al. 2009) Depuis l'avènement de la microscopie électronique, ce fait pourtant bien établie est contredit par certaines équipes. (Wu et al. 2009; Yamany et al. 2014) L'avenue la plus plausible semble être celle qui préconise que la majorité des cellules des deux premières couches sont attachées à la membrane basale, tandis que les cellules superficielles ne le sont pas. (Romih et al. 2005; Yamany et al. 2014) Dans ce cas, l'appellation d'épithélium transitionnel devrait être abandonné. (Wu et al. 2009)

Étant donné que tous les organes du système urinaire n'ont pas la même origine embryologique, il est fort probable que l'urothélium qui les tapisse soit aussi d'origines différentes. Effectivement, l'urothélium du pelvis rénal et des uretères ont une origine mésodermique, tandis que l'urothélium de la vessie et de l'urètre proximal proviennent de l'endoderme. (Batourina et al. 2005; Staack et al. 2005) Selon le Dr. Seifert, la portion distale de l'urètre proviendrait aussi de l'endoderme. (Seifert et al. 2008) Selon leur organe respectif, les cellules urothéliales sont donc différentes par leur expression des uroplakines et par leur susceptibilité aux agressions chimiques. (Wu et al. 2009) En considérant ce fait, il est logique de s'interroger sur la source idéale des cellules urothéliales à utiliser pour la reconstruction de tissus *in vitro*. Selon le Dr. Atala, la vessie est la source de choix pour extraire ces cellules pour leur utilisation en génie tissulaire, à condition d'avoir besoin qu'un urothélium recouvre le tissu reconstruit pré-implantation. (Atala et al. 2006) (Voir la section 1.2.2) Puisque nous désirons utiliser les cellules urothéliales dans notre modèle d'urètre reconstruit par

génie tissulaire, nous procédons aussi à l'extraction de ces cellules à partir de biopsie de vessie et c'est pourquoi la section suivante sur les cellules urothéliales vésicales est très détaillée.

Les cellules urothéliales ont plusieurs rôles, même plus que ce qui était imaginé au départ. Récemment, il a été démontré que les cellules urothéliales ont une activité sécrétoire qui leur permet de communiquer entre elles et leur environnement. (Wu et al. 2009; Apodaca 2004) Elles ont, entre autre, la capacité de modifier la composition de l'urine. (Shafik et al. 2005) Néanmoins, leur rôle premier est de rendre la paroi vésicale étanche aux agents toxiques, et ce sont des protéines transmembranaires appelées uroplakines (UP) qui leur confèrent leur grande capacité d'imperméabilité. Elles se retrouvent en petite quantité dans les cellules intermédiaires, mais davantage abondantes dans les cellules parapluies, où elles sont un marqueur important de la différenciation terminale de ces cellules hautement spécialisées. Certaines uroplakines sont exprimées par les cellules intermédiaires de l'urothélium chez les rongeurs, mais ce n'est pas le cas chez l'humain. (Firth & Hicks 1973) De plus, ce sont des protéines hautement conservées au cours de l'évolution des mammifères. (Wu et al. 1994; Garcia-España et al. 2006; Veranic et al. 2004)

Les uroplakines sont au nombre de cinq isotypes : l'uroplakine Ia, (UPIa), l'uroplakine Ib (UPIb), l'uroplakine II (UPII), l'uroplakine IIIa (UPIIIa) et l'uroplakine IIIb (UPIIIb), faiblement exprimée. (Sun 1999; Wu et al. 1990) Elles s'organisent entre elles de façon très complexe, afin de former une structure rigide à la surface apicale des cellules superficielles, nommée plaque asymétrique, une traduction du terme anglais "*asymmetric unit membrane*", qui recouvre 90 % de la surface apicale. (Hicks 1965; Koss 1969)

Les étapes de la formation de la plaque asymétrique se produisent au fil du passage des protéines du réticulum endoplasmique jusqu'à la membrane apicale. Les uroplakines, traduites dans le réticulum endoplasmique rugueux, y subissent certaines modifications post-traductionnelles où des sucres sont ajoutés aux isoformes afin qu'elles s'hétérodimérisent. Les paires d'uroplakines, UPIa/ UPII et UPIb/ UPIIIa, peuvent ensuite entrer dans le Golgi où d'autres glycosylations ont lieu pour former des tétramères d'uroplakines. Les vésicules contenant les UPs cheminent dans le trans-Golgi où les protéines s'oligomérisent. Les vésicules discoïdes, qui bourgeonnent du réseau trans-golgien, contiennent des plaques immatures d'UP. (Hudoklin et al. 2011) (Figure 1) Au fil de la formation de la plaque asymétrique, qui consiste à l'assemblage des tétramères, les vésicules rondes s'allongent pour devenir des vésicules fusiformes, qui iront rejoindre la membrane plasmique. Lorsque la vessie prend de l'expansion, les vésicules contenant des plaques matures s'externalisent à la membrane apicale de la cellule urothéliale. (Wu et al. 2009) Yu et al. ont démontré en 2009 que

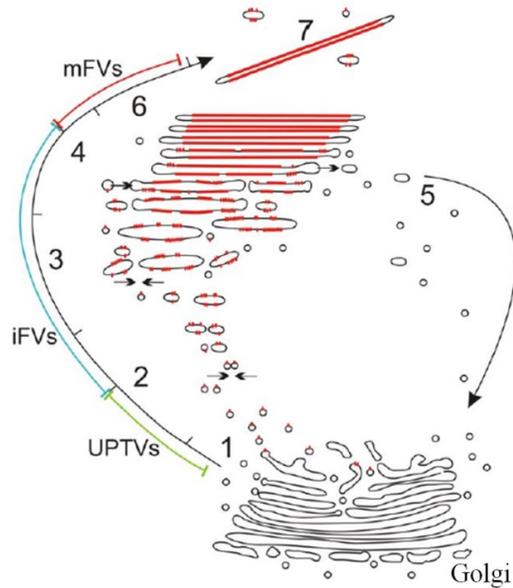


Figure 1 : Maturation des vésicules d'uroplakines du Golgi à la membrane plasmique.

(1) Les vésicules contenant des hétérodimères d'uroplakines (UPTVs) quittent le Golgi, puis fusionnent (2) pour former des vésicules fusiformes immatures (iFVs) (3). Au long du parcours, les petites plaques d'UP commencent à se former (4), en rouge, jusqu'à former les plaques matures d'UP qui sont complètes seulement dans les vésicules fusiformes matures (mFVs) (6) prêtes à leur externalisation à la membrane plasmique (7). Modifiée de Hudoklin S. et al. 2011.

la stimulation mécanique exercée sur la paroi, stimule l'exocytose des vésicules fusiformes et le transport d'ions dans les cellules parapluies. (Yu et al. 2009; Truschel et al. 2002) C'est via l'exocytose des vésicules matures que ces cellules ont la capacité d'augmenter leur surface jusqu'à 50%, lorsque la vessie est à son volume maximum. (Yamany et al. 2014) *In vitro*, la différenciation complète des cellules urothéliales est très difficile à atteindre, voire impossible. Néanmoins, notre groupe, (Cattan et al. 2011) a réussi à générer un urothélium exprimant des plaques d'UP matures grâce à la stimulation mécanique en bioréacteur, renforçant l'idée que les mécanorécepteurs de la vessie ont un grand rôle à jouer dans le processus. (Olsen et al. 2011)

Les cellules parapluies sont des cellules polarisées qui expriment les UPs en grande quantité, mais qui sont aussi caractérisées par d'autres marqueurs d'importance qui les distinguent des autres types de cellules urothéliales. Des liens très étroits entre ces cellules créent une bonne barrière grâce aux jonctions serrées (ZO-1, occludine, claudine 4, 8 et 12) (Acharya et al. 2004; Kreft et al. 2006) Les cellules basales quant à elles, sont attachées aux cellules intermédiaires par des desmosomes, tandis que les cellules basales sont attachées fortement à la lame basale grâce aux hémidesmosomes. (Jones. J. C. R. 2001)

Les cellules urothéliales expriment un regroupement unique de cytokératines (CK) propre à l'urothélium qui suscite encore beaucoup de discussion dans la littérature. En effet, elles expriment des CK que l'on retrouve normalement strictement dans les épithéliums simples telles que CK20, CK17, CK8/CK18 et CK7/CK19, ce qui renforce l'idée que l'urothélium est de type transitionnel et non de type stratifié. (Moll et al. 1982) De plus, on trouve CK19 et CK14 dans les cellules des épithéliums malpigiens, stratifiés, mais non-kératinisés. (Moll et al. 2008; Alonso et al. 2009) Les kératines spécifiques des épithéliums stratifiés sont aussi exprimées dans l'urothélium, mais d'avantage au niveau des cellules basales. On y retrouve effectivement les CK13, CK 5/CK14.

Les seules cellules à exprimer la CK20 sont les cellules parapluies complètement différenciées. (Romih et al. 1998; Sun et al. 1979) Les CK20 forment un réseau dense de filaments intermédiaires qui guident les vésicules fusiformes vers la membrane apicale des cellules parapluies. (Alonso et al. 2009; Veranic & Jezernik 2002) Ce réseau de kératines très dense remplace complètement le réseau de filaments d'actine qui disparaît alors de la surface apicale des cellules parapluies. (Romih et al. 1999) Le Tableau 1 résume les types de kératines exprimées dans l'urothélium, leur emplacement et leur classification normale, selon le type d'épithélium qu'elles représentent dans la classification des kératines selon Moll, Southgate et Alonso. (Southgate et al. 1999; Alonso et al. 2009; Moll et al. 2008)

	Épithélium simple	Épithélium stratifié
Urothélium complet	8/18-7/19	
Couches superficielles	20	
Couches intermédiaires		13
Couches basales	17	5/14-13

Tableau 1 : Résumé de l'expression des kératines de l'urothélium selon leur emplacement dans l'urothélium et leur classification normale dans la littérature.

Les cellules basales et certaines cellules intermédiaires de l'urothélium exprimant le marqueur P63 seraient donc des progénitrices unipotentes (Yamany et al. 2014; Larsson et al. 2014) et peuvent même être considérées par certains comme les cellules souches de l'urothélium. (Pignon et al. 2013)

La culture de cellules urothéliales est assez diversifiée, au point où chaque équipe a développé sa propre technique de culture. Elles sont cultivées avec une couche nourricière et avec du sérum dans certains cas (Chamorro et al. 2014; Cattan et al. 2011; Larsson et al. 2014) ou dans un milieu sans sérum contenant des extraits de glandes pituitaires. (Orabi et al. 2013) Peu importe de quel organe et de quelle façon elles sont extraites, (voir la section 1.2.2) le but est de développer un urothélium mature dans les substituts urétraux reconstruits par génie tissulaire. Comme mentionné plus haut, seulement une situation *in vitro* permet la différenciation terminale des cellules parapluies : la stimulation mécanique. (Southgate et al. 1999; Cattan et al. 2011) Effectivement, cette stimulation peut reproduire les cycles de contraction et d'expansion de la vessie et ainsi permettre l'organisation du réseau de cytokératines et de protéines de transport des vésicules pour former un urothélium exprimant à sa surface la plaque d'uroplakine.

1.1.2.2 L'urètre

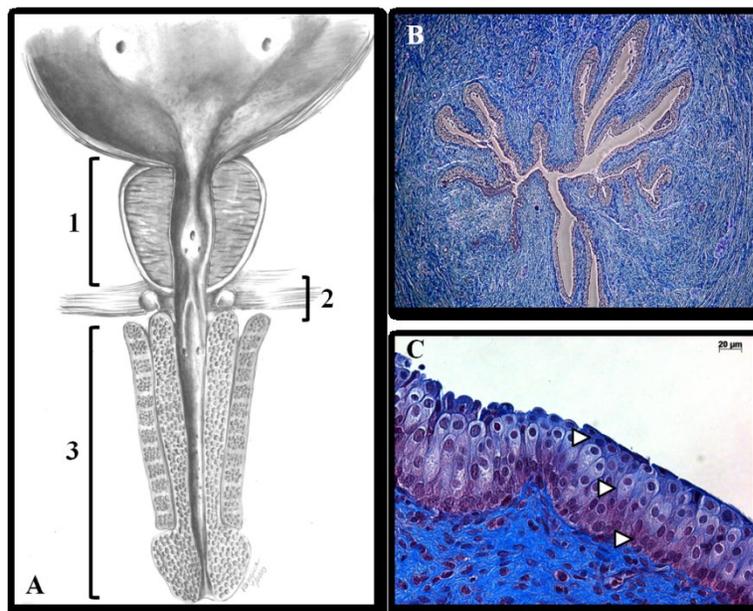


Figure 2 : Anatomie et histologie de l'urètre.

A) Représentation schématique de l'urètre mâle. 1- Portion prostatique. 2- Portion membraneuse. 3- portion pénienne. B) Trichrome de Masson d'une coupe transversale d'un urètre de lapin. Grossissement de 40X. C) Trichrome de Masson d'un urètre de lapin. Les têtes de flèche représentent (de haut en bas) les cellules superficielles ou parapluies, les cellules intermédiaires et les cellules basales.

L'urètre est le dernier organe par lequel l'urine chemine jusqu'à son élimination complète du corps. (Gartner & Hiatt 2006) Cette structure tubulaire d'environ 3.5 cm chez la femme et 15 cm chez l'homme est représentée en coupe transversale dans la Figure 2B (urètre de lapin) où il est possible d'apprécier les différentes structures anatomiques qui la composent. L'urètre de la femme, très

court, est presque entièrement recouvert d'un épithélium stratifié non kératinisant et peu de chirurgie sont consacrée à sa reconstruction, les exceptions étant le plus souvent des cas de traumatismes graves. L'urètre mâle est pour sa part divisé en trois parties bien distinctes : l'urètre prostatique, l'urètre membraneux et l'urètre pénien. (Figure 2A) C'est cette dernière partie qui est touchée par la malformation congénitale appelée hypospadias qui sera traitée dans la section 1.1.4 . C'est donc une partie de l'urètre pénien que l'on tente de reconstruire avec les substituts urétraux reconstruits par génie tissulaire.

L'anatomie de l'urètre de lapin est presque en tous points identique à celle de l'homme et il est recouvert du même épithélium. Cependant, certaines caractéristiques macroscopiques de l'urètre du lapin doivent être prises en compte lors de la manipulation en chirurgie. La paroi dorsale de l'urètre est en contact étroit avec le corps caverneux, ce qui la rend très mince et très fragile comparée à la paroi ventrale. Par ailleurs, les structures tissulaires qui entourent l'urètre de lapin ont des aspects différents de chez l'humain. Il a un pénis recouvert d'un fourreau et ses testicules se situent au dessus du pénis, mais nos pratiques chirurgicales ne sont pas affectées par ces caractéristiques physiques différentes.

1.1.2.2.1 La structure du stroma et des muscles urétraux

Comme les autres structures du bas système urinaire, l'urètre est composé de trois couches de muscles : une longitudinale interne, une circulaire moyenne et une longitudinale externe. Les fibres internes et moyennes proviennent de prolongements des fibres musculaires du detrusor de la vessie, tandis que les fibres longitudinales externes sont plutôt composées de muscles striés. Comme il n'y a pas de péristaltisme, ni de contraction importante de ces muscles, comme dans l'uretère et la vessie respectivement, la couche musculaire de l'urètre est donc moins développée. Son rôle n'est pas moins important pour autant, puisqu'elle est directement responsable de la continence urinaire. (Leroi & Normand 2005) C'est plus précisément par les deux sphincters que les muscles urétraux peuvent s'opposer à une éventuelle contraction de la vessie. (Figure 3) Le premier sphincter, composé de muscles lisses, est contrôlé par le système nerveux autonome et se trouve à la jonction entre le col de la vessie et l'urètre proximal, c'est le sphincter urétral interne. Le deuxième, le sphincter externe ou strié du périnée, se retrouve au niveau de la membrane périnéale et est dirigé par le système nerveux somatique, plus précisément par le nerf moteur périphérique appelé nerf pudendal. (Leroi & Normand 2005; Yiou 1994)

Juste au-dessus de la couche musculaire de l'urètre se trouve la sous-muqueuse. Sa composition rappelle celle de la sous-muqueuse de la vessie avec une forte prédominance de MEC, de fibroblastes, de vaisseaux sanguin et de fibres nerveuses.

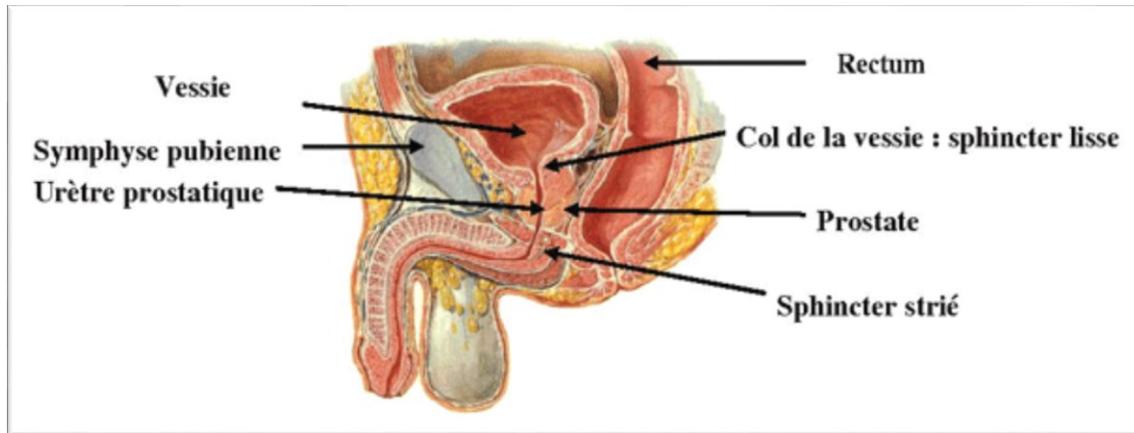


Figure 3 : Disposition anatomique des sphincters de l'urètre chez l'homme.

Le sphincter urétral interne composé de muscle lisse se trouve au col de la vessie tandis que le sphincter strié est plus distal, au niveau du périnée. Modifiée de : <http://www.sphere-sante.com/incontinence-information/incontinence-chez-homme.html>

1.1.2.2.2 La structure de l'épithélium urétral

La nature de l'épithélium qui recouvre la lumière de l'urètre n'est pas clairement définie. Chez l'humain, la grande majorité des études proposent qu'il y ait deux types d'épithéliums qui se succèdent le long de l'urètre. (Romih et al. 2005; Liang et al. 2005; Sun 1999; Staack et al. 2005) La partie proximale, le premier tiers, serait recouvert d'un urothélium très semblable à celui de la vessie, tandis que les deux autres tiers seraient protégés par un épithélium stratifié non-kératinisant et ce, jusqu'à la jonction avec la peau du prépuce. Il est fort probable que cet épithélium soit différent chez les rongeurs. En effet, les études de Romih en 2005 démontrent que chez la souris, l'urothélium arrête assez nettement à l'intérieur du col de la vessie pour ensuite laisser place à un épithélium stratifié non kératinisant pour l'urètre proximal et distal. (Romih et al. 2005) L'absence de l'urothélium dans la majorité de l'urètre s'explique assez bien. Premièrement, les sphincters bloquent en quasi permanence le passage de l'urine vers l'urètre, qui n'est donc pas continuellement exposé à l'urine plus ou moins toxique. Deuxièmement, l'urètre, partagée par le système urinaire et

génital, possède des glandes connexes qui lubrifient la lumière de façon à protéger l'épithélium qui le recouvre. C'est pourquoi celui-ci n'a pas besoin d'être aussi spécialisé que celui de la vessie.

Afin de reconstruire un substitut urétral par génie tissulaire, (Voir la section 1.2.2) il est donc possible de choisir deux types d'épithélium à ensemercer à l'intérieur des greffons : l'épithélium malpighien que l'on peut prélever de la muqueuse buccale et l'urothélium qu'on obtient à partir d'une biopsie de vessie, d'uretère ou d'urètre. Étant donné qu'il est difficile de déterminer l'endroit où le type d'épithélium change le long de l'urètre, ce type de biopsie est probablement le choix le moins judicieux, d'autant plus qu'il amènerait des doutes au niveau du phénotype cellulaire. (Romih et al. 2005) Une biopsie des uretères comprend possiblement des cellules urothéliales avec un profil d'expression des uroplakines différents, il est donc éliminé de nos choix de biopsie. (Larsson et al. 2014) Chez l'humain, afin d'obtenir un greffon contenant un épithélium capable de rapidement contrer l'invasion de l'urine dans les tissus lors d'une greffe, les cellules utilisées proviennent donc de biopsies de vessie. (Cattan et al. 2011)

Malheureusement, les greffons de lapins étant encore à un stade précoce de développement, aucune cellule urothéliale n'a encore été ensemençée pour les greffes sur le lapin présentées dans le présent mémoire. (Voir Chapitre 2)

1.1.3 Les composantes matricielles

Qu'elles proviennent de la sous-muqueuse de la vessie ou du derme de la peau, la matrice extracellulaire (MEC) est une composante essentielle des tissus que l'on désire reconstruire. C'est pourquoi on lui accorde, dans cette section, une attention particulière. Qu'elle provienne du lapin ou de l'humain n'a pas d'importance, la spécificité de la MEC étant définie pour chacun des organes. En effet, la composition de la matrice dépend du rôle qu'elle joue dans un tissu donné.

1.1.3.1 Les rôles de la matrice extracellulaire

Les cellules mésenchymateuses synthétisent et assemblent la majorité de la MEC, ce qui leur permet, entre autres, de se créer un environnement propice à la survie. De ce fait, cette MEC est donc fortement impliquée dans la communication avec ces mêmes cellules. Les différents acteurs composant la MEC jouent un rôle dans la localisation cellulaire, l'induction de la migration, la différenciation, la prolifération et même l'apoptose. (Fernandes et al. 2006) La signalisation cellulaire entre la MEC et les cellules enchevêtrées à l'intérieur est assurée soit directement par les récepteurs membranaires, soit par les facteurs de croissance qui y sont séquestrés. La MEC sert alors de stockage moléculaire qui peut, par exemple, être essentiel pour la création et la

maintenance du réseau vasculaire (Berthod et al. 2012) essentiel à l'apport de nutriments pour les cellules résidentes. De plus, la matrice extracellulaire a un rôle important de soutien mécanique puisqu'en créant l'architecture du tissu, elle permet de maintenir son intégrité autant dans le mouvement du tissu que lors de l'absorption des chocs.

1.1.3.2 La matrice extracellulaire et ses composantes

Les composantes de la MEC sont très nombreuses et diffèrent d'un tissu à l'autre. On y retrouve entre autres les polysaccharides, qui regroupent les glycosaminoglycanes et les protéoglycanes, les glycoprotéines d'adhérence et les protéines de structure.

Les glycoaminoglycanes (GAG), des molécules composées de chaînes complexes de sucres, sont représentés par l'acide hyaluronique, le chondroïtine-sulfate, le dermatane-sulfate, l'héparane-sulfate et l'héparine. La quantité de GAG dans un tissu donné est directement liée à la force mécanique absorbée par ce tissu. Par exemple, les cartilages articulaires contiennent beaucoup plus de GAG que les tendons qui en contiennent très peu, car ils ne sont pas soumis à des forces de compression. (Culav et al. 1999) L'acide hyaluronique interagit autant avec des récepteurs membranaires qu'avec d'autres composantes de la MEC tels que les collagènes, les laminines et la fibronectine. Le dermatane sulfate est pour sa part, un polysaccharide linéaire qui s'assemble en dipolysaccharides et qui en s'associant avec les fibres de collagène, apporte une stabilité mécanique au tissu. (Hardingham & Fosang 1992) L'héparane sulfate est plutôt impliqué dans la croissance cellulaire. Il est localisé et même attaché à la membrane plasmique et séquestre les facteurs de croissance tel que le facteur de croissance des fibroblastes basique (bFGF). (Bishop et al. 2007; Mohammadi et al. 2005; Héroult et al. 2004)

Les protéoglycanes sont des protéines fortement chargées négativement contenant des polysaccharides. Parmi les plus abondantes, on retrouve la décorine et le perlecan. Ce dernier est retrouvé au niveau de la membrane basale, tandis que la décorine est très ubiquitaire. Plusieurs rôles sont attribués aux protéoglycanes, tels que la rétention de l'hydratation de la MEC et la capacité de stabiliser les réseaux de collagènes, et ainsi augmenter les caractéristiques mécaniques d'un tissu. De plus, ces glycoprotéines ont la capacité de gérer la biodisponibilité de certains facteurs de croissance. (Bornstein et al. 2004)

Les laminines et la fibronectine sont des glycoprotéines d'adhérence, surtout impliquées dans la communication entre les cellules mésenchymateuses et la MEC. De plus, la fibronectine est une protéine présente dans tous les tissus conjonctifs et possède des sites de liaison avec les collagènes

et l'héparine entre autre. (Wierzbicka-Patynowski & Schwarzbauer 2003) Elle est responsable d'une partie importante des communications entre la MEC et les cellules résidentes par ses sites de liaison avec les intégrines. (Gee et al. 2008) Ces récepteurs sont la source de la motilité cellulaire par la création des points focaux d'adhésion avec la MEC et la modification du cytosquelette. La fibronectine aurait même un rôle important dans la stimulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire. (Wierzbicka-Patynowski & Schwarzbauer 2003) Les laminines quant à elles, sont un groupe de protéines impliquées dans la formation de la lame basale. (Timpl et al. 1979) La laminine 5 plus précisément, interagit avec les hémidesmosomes et crée un lien très solide entre la lame basale et les premières cellules d'un épithélium. (Hohenester & Yurchenco 2013)

Les dernières composantes qui seront abordées dans cet ouvrage sont les protéines fibreuses dites de structure : l'élastine et les collagènes. L'élastine est la composante majeure des fibres élastiques qui sont dispersée aléatoirement dans les tissus conjonctifs. En microscopie optique, il est possible de les voir seulement avec des colorations histologiques spéciales comme l'orcéine et l'hématoxyline de Verhoeff, par exemple. Le nom des fibres élastiques définit leur rôle : elles apportent l'élasticité au tissu grâce aux réseaux fibrillaires qu'elles forment en s'enchevêtrant avec plusieurs autres glycoprotéines. C'est grâce à l'élastine que les tissus qui composent des organes comme la vessie ont la capacité de retrouver un état de relaxation suite à un étirement. (Dass et al. 1999) Malheureusement, en culture, il est difficile d'obtenir un réseau d'élastine complexe et fonctionnel dû à la présence d'acide ascorbique dans les milieux de culture. (Davidson et al. 1997) En effet, des études démontrent que l'acide ascorbique diminue la stabilité de l'ARN de l'élastine, ainsi que la transcription de son gène. Or, il est nécessaire de mettre les fibroblastes en présence d'acide ascorbique, afin de provoquer la synthèse et l'assemblage du collagène *in vitro*. Bien que l'élastine soit importante, dans la catégorie des fibres de structure, les collagènes représentent la composante dominante.

1.1.3.3 Les collagènes

Les collagènes forment une grande famille totalisant de 26 à 28 types différents de collagènes selon les auteurs. (Ricard-Blum 2011; Brodsky & Persikov 2005; Gelse et al. 2003; Myllyharju & Kivirikko 2004) La composition en acides aminés et la structure des collagènes diffèrent selon leur type. Ils peuvent être regroupés dans des groupes distincts tels que les collagènes fibrillaires, formant de grandes fibres solides (I, II, III, V, VI), les fibrilles associés aux collagènes, les collagènes qui s'organisent en réseaux (IV), les courtes et les longues fibrilles, etc. (Gelse et al. 2003) Peu importe leur type, tous les collagènes contiennent une structure faite de trois chaînes

peptidiques en hélice α reliées entre elles. (Piez 1984) Rassemblés, les collagènes représentent environ un tiers du poids de toutes les protéines du corps humain. (Ricard-Blum 2011) Alors que certains sont ubiquitaires, d'autres sont assignés à un type de tissu précis. Par exemple, les collagènes de type II et XI sont présents dans les cartilages, le type V dans la cornée et le type IV est retrouvé dans toutes les membranes basales. D'autres types de collagènes ont été découverts plus tardivement tels que les types XVI, XIX, XX, XXI et XXII. (Ricard-Blum et al. 2000; Koch et al. 2004) Ce sont des collagènes avec des domaines en l'hélice alpha qui alternent avec des domaines globulaires. Ils ne seront toutefois pas traités dans ce mémoire. Les collagènes fibrillaires sont ceux qui nous intéressent le plus, car ils sont produits dans les tissus reconstruits par génie tissulaire suivant la méthode d'auto-assemblage. Ils sont composés soit par des homotrimères, c'est-à-dire trois chaînes α identiques, ou par des hétérotrimères. (Fraser et al. 1979) Les collagènes fibrillaires de types I et III sont les plus abondants dans les stromas vésicaux et urétraux; ils sont donc ici abordés plus en détails.

Le collagène de type I est de loin le plus abondant de tous les types. Il est composé de deux chaînes peptidiques $\alpha 1$ et de une $\alpha 2$ ce qui génère une fibre complète de 50 nm de diamètre. (Matthews et al. 2002) Le collagène de type I apporte une stabilité et une grande résistance mécanique aux tissus où il est majoritaire. Il est présent dans les tendons, les os et les tissus mous comme le derme, ainsi que dans tous les autres tissus conjonctifs sauf le cartilage hyalin, le corps vitré de l'œil et le cerveau. (Gelse et al. 2003)

Le collagène de type III est aussi assez présent dans le derme et beaucoup d'autres tissus conjonctifs et il est généralement retrouvé en association avec le collagène de type I. (Fleischmajer et al. 1990) De plus, il est concentré autour des faisceaux de muscles lisses dans les organes comme la vessie par exemple. (Brown et al. 2005) Le collagène de type III apporte une élasticité aux tissus, c'est pourquoi il est en plus grande quantité dans les organes tels que la peau et les vaisseaux sanguins. (von der Mark 1981; Mayne 1986) Sa structure est caractérisée par la présence de trois chaînes $\alpha 1$ identiques.

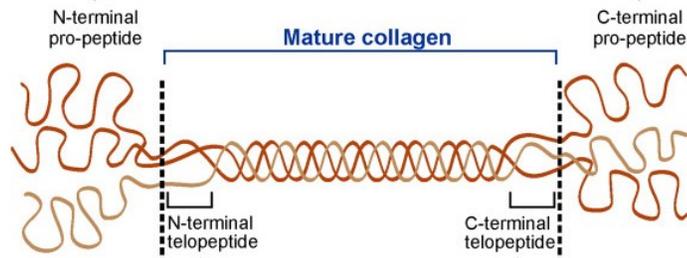


Figure 4 : Conformation du procollagène.

Le procollagène contient, en plus de sa triple hélice, des pro-peptides globulaires qui sont clivés suite à sa sécrétion dans l'espace intercellulaire, où il devient le tropocollagène. Ce dernier est désigné comme étant le collagène mature, composé de la triple hélice et de télépeptides situés aux extrémités C et N-terminales. Figure modifiée de : Fan et al. 2012

Bien que certains types de cellules épithéliales (Van Agtmael & Bruckner-Tuderman 2010) et les cellules endothéliales (Anderson & Hinds 2012) peuvent synthétiser les collagènes, ce sont les cellules mésenchymateuses qui en produisent le plus. De plus, les différents collagènes fibrillaires ont sensiblement la même composition et sont assemblés de la même façon. Ils sont toujours composés de trois chaînes peptidiques arrangées en hélice alpha avec des domaines globulaires se trouvant seulement aux extrémités terminales. (Figure 4) (Ricard-Blum & Ruggiero 2005) La nature des chaînes et leur composition en acides aminés diffèrent selon les types, mais elles sont toujours composées d'une répétition d'un triplet d'acides aminés commençant par une glycine (Gly-X-Y)_n. (Kolácná et al. 2007) Le X est très fréquemment une proline, tandis que le Y est le plus souvent une hydroxyproline. Cet acide aminé est en fait une proline qui a subi une modification post-traductionnelle conduisant à son hydroxylation. Les collagènes fibrillaires comprennent entre 33 et 40 % de glycine, entre 10 et 13 % d'hydroxyproline et environ 14% de proline. (Brodsky & Persikov 2005; Traub & Plez 1971)

Les gènes codants pour les collagènes ont des promoteurs activés par plusieurs facteurs de croissance et quelques cytokines, dépendant du type cellulaire. Après leur transcription dans le noyau, les ARN messagers sont traduits à leur entrée dans le réticulum endoplasmique rugueux. (Figure 5) Les molécules de procollagène y subissent une suite de modifications post-traductionnelles jusqu'à leur sortie du Golgi. Une modification très importante est catalysée par les enzymes prolyl-4-hydroxylase et lysyl-hydroxylase qui hydroxylient les prolines et les lysines respectivement. (Kivirikko & Myllyharju 1998) Ces ajouts sont d'une importance cruciale pour la stabilisation thermique de la triple hélice de collagène. (Némethy & Scheraga 1986) En effet, les résidus hydroxylés des prolines permettent la formation des liens hydrogènes intermoléculaires qui renforcent la triple hélice. Dans les collagènes fibrillaires, environ 50 % des prolines sont

hydroxylées en position 4 du cycle aromatique. Les hydroxylysines sont, pour leur part, le lieu de transfert de certains sucres et servent à renforcer les liens intermoléculaires entre les fibrilles de collagène.

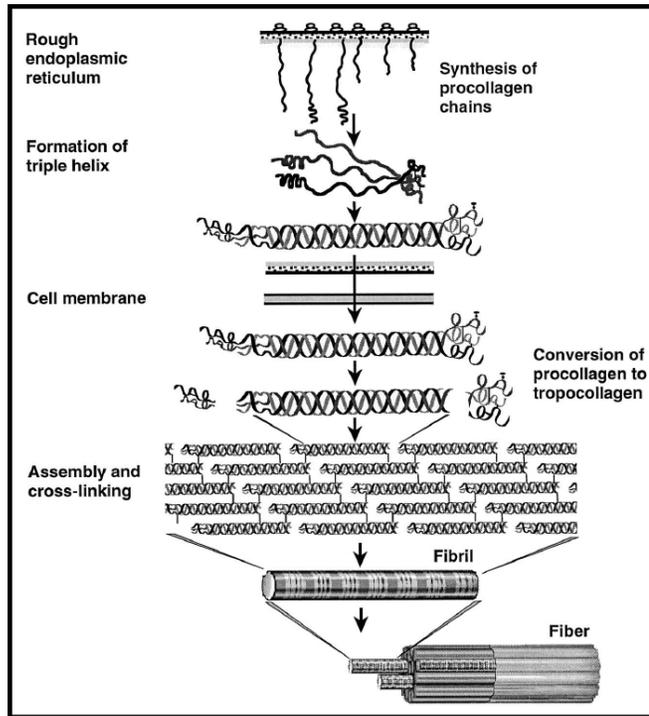


Figure 5 : Assemblage du collagène.

Tiré de Culav 1999. Les détails de l'assemblage du collagène sont présentés dans le paragraphe ci-dessous.

La liaison des trois chaînes de procollagène est initiée par l'alignement des extrémités C-terminales. Ensuite, des ponts hydrogènes sont formés entre les hydroxyprolines, afin de créer la structure en triple hélice. Les trimères de collagène sont excrétés du Golgi vers l'espace extracellulaire où les extrémités globulaires, les propeptides, sont clivées. Le clivage du propeptide en C-terminal régulerait la formation des fibrilles de collagène. (Gelse et al. 2003) La stabilisation des fibres de collagène est ensuite due à l'hydroxylation des résidus lysines des télépeptides par la lysyl-oxidase. En effet, ce sont les télépeptides, de forme non-hélicale, qui sont directement impliqués dans l'assemblage des fibres de tropocollagène par la création de liens covalents très solides. Plus les lysines des télépeptides sont hydroxylées, plus le collagène forme une structure solide de sorte que presque toutes les lysines portent un groupement OH dans le cartilage, tandis que dans la peau, elles sont presque indétectables. (Culav et al. 1999) Les télépeptides sont aussi très importants dans

l'interaction avec les autres composantes de la MEC. C'est l'alternance entre les fibres ordonnées par l'assemblage plus ou moins dense du réseau de tropocollagène qui provoque un motif strié, où s'alternent des bandes claires et sombres, lorsque l'on observe le collagène en microscopie. (Hulmes & Miller 1981) Cette périodicité des fibres est par exemple de 67 nm pour le collagène de type I.

1.1.3.3.1 Les collagènes en culture cellulaire

En culture cellulaire, la production de collagène par les fibroblastes dans un laps de temps raisonnable demande inévitablement la présence d'acide ascorbique. (Ishikawa et al. 1997) Elle est un cofacteur important de la prolyl-4-hydroxylase et de la lysyl-hydroxylase, mais cette vitamine essentielle n'est pas produite par les cellules humaines et doit donc être ajoutée. Depuis longtemps, plusieurs chercheurs ont prouvé que grâce à l'addition de ce facteur en culture, les fibroblastes avaient la capacité d'assembler la triple hélice de collagène et de faire les liaisons covalentes nécessaires à la solidité des fibres *in vitro*. (Grinnell et al. 1989; Hata & Senoo 1989) De plus, l'acide ascorbique aurait aussi la capacité d'augmenter l'expression génique des collagènes de type I et III dans les fibroblastes dermiques humains. (Geesin et al. 1988) Dans une situation où la cellule aurait un manque prolongé d'acide ascorbique, les prolyl-4-hydroxylases ne pourraient plus modifier les prolines et les monomères de collagène mal repliés seraient dégradés ou pourraient s'accumuler dans la cellule et être dégradés par le protéasome. (Walmsley et al. 1999; Switzer & Summer 1972)

Différentes molécules sont connues pour augmenter la synthèse, l'assemblage et le dépôt du collagène par des cellules mésenchymateuses *in vitro*. Dans le présent projet, certains de ces produits ont été sélectionnés et leur effet a été testé sur les fibroblastes et cellules musculaires lisses de lapin : l'adénosine, l'acide lysophosphatidique (LPA) et l'œstrogène.

L'adénosine est connue pour son implication dans la sclérodermie où son action, par l'entremise des récepteurs A_{2A}, engendre l'augmentation de la production de collagène par les fibroblastes dermiques. (Lazzerini et al. 2012; Nakav et al. 2009) Cet additif est généralement étudié dans les maladies caractérisées par une fibrose de différents organes comme le foie, la peau et les poumons, par exemple. Néanmoins, son action peut être appliquée au génie tissulaire afin d'augmenter la production de matrice dans les tissus reconstruits. Par contre, l'adénosine inhiberait la libération de l'ATP dans les cellules urothéliales de lapin à une concentration endogène de 0.6µM. (Dunning-Davies et al. 2013) La relâche d'ATP est un processus important qui est induit lors de la phase de remplissage de la vessie. Comme il ne faut pas créer d'interférence avec ce système, il sera important de retirer l'adénosine lors de l'ajout des cellules urothéliales dans le modèle.

Le LPA, quant à lui, est un lipide bioactif naturellement présent dans les membranes cellulaires. Aussi impliqué dans certaines maladies fibrotiques, (Castelino et al. 2011; Pradère et al. 2008) il prend part au processus de dépôt du collagène produit par les fibroblastes dermiques humains. De plus, les cellules dermiques cultivées en présence de LPA ont une expression réduite en alpha-actine du muscle lisse (α -SMA), ce qui est intéressant, car la contraction des tissus reconstruits est un processus à éviter et l' α -SMA est un joueur important dans ce type de réaction tissulaire. Finalement, notre équipe a déjà montré son efficacité dans la méthode d'auto-assemblage. (Chabaud et al. 2013) (Voir la section 1.3)

L'œstrogène est largement reconnue pour son effet fibrosant dans la sclérodermie, par exemple. Par l'activation des récepteurs E2, l'œstrogène agit sur les fibroblastes dermiques de plusieurs façons. Premièrement, cette hormone augmente les taux de synthèse de TGF- β dans les fibroblastes dermiques, ce qui influence directement la production de collagène par la cellule. (Ashcroft et al. 1997) De plus, l'œstrogène augmente significativement la quantité de collagène, de fibronectine et de laminine dans les cultures de fibroblastes dermiques humains. (Soldano et al. 2010) Il semble même qu'elle accélère le processus de réparation de la peau. (Gilliver et al. 2007) C'est donc pour toutes ces raisons que l'œstrogène a été choisie pour améliorer la quantité de MEC dans les cultures de fibroblastes de lapin. Néanmoins, il sera important de porter une attention particulière à l'utilisation de ce produit lors de la culture des cellules urothéliales. En effet, les cellules de l'urothélium ont des récepteurs pour l'œstrogène et répondent aux stimuli endogènes et exogènes en modulant les sensations envoyées par la vessie lors de son remplissage. (Blakeman et al. 2000) L'œstrogène est aussi impliquée dans la prolifération des épithéliums et l'urothélium ne fait pas exception. (Teng et al. 2008)

1.1.3.3.2 Le dosage des collagènes

Le collagène peut être dosé par une multitude de méthodes dans plusieurs buts différents. En médecine, il est intéressant de le doser à des fins diagnostiques. Sa quantification est plutôt pour nous une méthode d'analyse, afin de déterminer quelles conditions de cultures des cellules mésenchymateuses permettent un plus grand dépôt de collagène. Plusieurs méthodes de dosage du collagène existent dans la littérature comme la colorimétrie, la chromatographie liquide de haute performance, la radioactivité, la spectrométrie de masse (Tredget et al. 1990), l'enzymologie (Ito et al. 1985), etc. Ces techniques diffèrent entre elles par leur spécificité, leur sensibilité, leur reproductibilité, leur complexité et, bien sûr, par leur approche expérimentale. Dans ce mémoire, les

deux techniques préconisées utilisent la colorimétrie et elles ont été choisies pour leur simplicité autant dans le matériel utilisé que dans l'exécution.

La première méthode est le dosage du collagène par la coloration au *Sirius Red*. Cette technique permet de doser seulement les collagènes solubles dans l'acide faible, qui ne sont pas très fortement assemblés. Effectivement, la pepsine, utilisée pour cliver les télépeptides du tropocollagène, n'a pas la capacité de cliver la triple hélice de collagène. Le collagène qui a subi plusieurs étapes de maturation et dans lequel les fibrilles sont fortement assemblées ne pourra pas être dosé par cette méthode. (Bailey et al. 1974) Normalement utilisé en microscopie, le *Sirius Red* est un colorant anionique rouge qui se fixe à la suite d'acide aminés Gly-X-Y de la triple hélice de collagène. Il agit de la même façon lorsqu'il est utilisé pour colorer du collagène en solution, ce qui permet de doser le colorant emprisonné dans les hélices par colorimétrie.

La deuxième technique utilisée dans ces travaux est le dosage de l'hydroxyproline (hyP). Comme cet acide aminé est en majorité présent dans les collagènes, la quantité d'hydroxyproline dans un tissu est très révélatrice de la quantité de collagène qu'il contient. De plus, l'hyP est reconnue pour être un acide aminé relativement facile à doser, ce qui permet d'obtenir une technique de dosage sensible. (Reddy & Enwemeka 1996) Beaucoup de protocoles de dosage de l'hydroxyproline utilisent la radioactivité, mais ce genre de techniques tend à être éliminé, car il nécessite davantage d'installations et de protection. C'est pourquoi nous avons plutôt mis sur pied un protocole de dosage par colorimétrie inspiré de ce qui se faisait dans la littérature. (Badadani et al. 2007) Cette technique nous permettra de doser le collagène total des tissus reconstruits, c'est-à-dire les fibres matures et immatures nouvellement assemblées. C'est donc une méthode plus sensible et davantage reproductible que le dosage par la coloration au *Sirius Red*, mais les deux techniques nous donnent des informations différentes au sujet du collagène que contiennent les tissus analysés.

1.1.3.3.3 Les différences entre les collagènes humains et lapins

En général, la composition du collagène de lapin est très semblable à celle des autres mammifères. Il présente quelques petites différences, surtout au niveau des télépeptides. (Bornstein & Nesse 1970) En effet, les extrémités C-terminales des chaînes α présenteraient des différences dans la composition en acides aminés comparativement au rat et au veau. Néanmoins, la séquence en N-terminal de la chaîne $\alpha 1$ du lapin est identique à celle du rat et presque identique à celle de l'humain à trois acides aminés près. (Traub & Plez 1971) L'extrémité N-terminale de la chaîne $\alpha 2$ du lapin est cependant différente de celle du rat, de l'humain et du poulet. (Becker et al. 1975) Rien n'indique

dans la littérature que les séquences des portions hélicales des chaînes α du lapin diffèrent de celles de l'humain. La périodicité du collagène chez le lapin est aussi la même que chez l'humain, soit 67 nm. (Choi et al. 2012) Toutefois, malgré sa grande ressemblance avec le collagène humain et murin, le collagène de la peau de lapin est moins soluble que les autres, possiblement dû à des différences au niveau des liens covalents qui permettent l'assemblage des fibres entre elles. (Bornstein & Nesse 1970)

1.1.4 Les pathologies et malformations

En urologie, la malformation congénitale la plus courante est l'hypospadias (

figure 6B) avec une prévalence de 1 mâle sur 150 à 300 selon les pays et ethnies. (Caione 2009; Pierik et al. 2002; Virtanen et al. 2001) Différents degrés de sévérité (

Figure 6C) sont associés à cette pathologie qui est cependant toujours caractérisée par un développement inachevé de l'urètre pénien au cours de l'embryogénèse. L'ouverture de l'urètre se retrouve donc à la face ventrale du pénis plutôt que d'aboutir à l'extrémité distale du gland. La sévérité de la malformation est reliée à l'endroit où s'ouvre l'urètre : dans la partie antérieure du pénis sous le gland, pour les cas mineurs, au niveau du corps du pénis dans les cas moyens, ou davantage en partie postérieure, à la jonction pénoscrotale, au niveau du scrotum ou du périnée pour les cas les plus contraignant. (van Rooij et al. 2013) Les cas d'hypospades s'accompagnent généralement d'une absence ou d'une malformation du prépuce en face ventrale, ainsi que de cordée (courbure pénienne ventrale) plus ou moins sévère selon la gravité des cas. (Lund et al. 2009) Les causes de l'hypospadias ne sont pas encore connues, mais la présence de cas familiaux suggère, entre autres, une composante génétique qui pourrait correspondre à 9 à 10 % des cas. (Kalfa et al. 2008; Geller et al. 2014; Van de Putte et al. 2014) Selon une étude de Feitz, les cas d'hypospades familiaux correspondraient aux troubles davantage antérieurs et moyens. De plus, plusieurs facteurs de risques reliés à certaines conditions de la femme pendant la grossesse sont mis en évidence. Parmi ceux-ci sont cités l'obésité, la prise de contraceptifs hormonaux, les accouchements prématurés, l'hypertension, les grossesses multiples, la déficience placentaire, etc. (van Rooij et al. 2013)

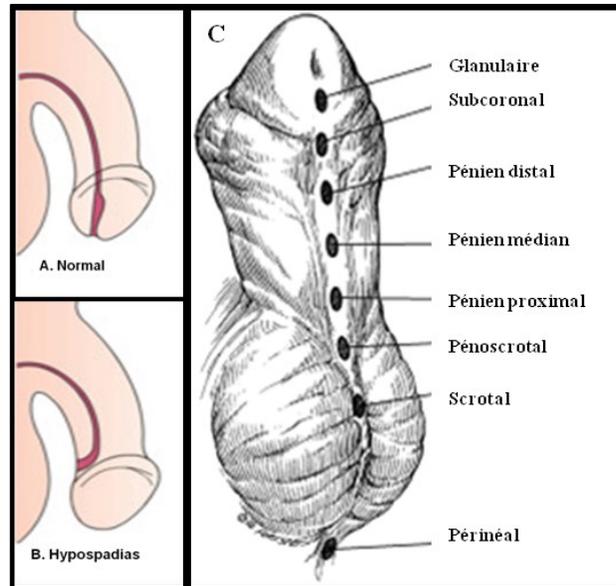


Figure 6 : Représentation schématique de l'hypospadias.

A) Le pénis normal avec l'urètre qui aboutit dans la partie la plus distale du gland. B) Le pénis atteint d'hypospadias où l'urètre aboutit dans la partie ventrale de celui-ci. C) Différents stades de gravité de l'hypospadias. Modifiée du site Internet suivant : <http://quizlet.com/6385842/male-genital-flash-cards/> / ©StéphaneBolduc.

Une étude longitudinale d'une durée de 28 ans au Danemark décrit une augmentation significative de la prévalence annuelle de l'hypospadias de 2.4%. (Lund et al. 2009) Cette réalité est expliquée par l'avènement de la fertilisation *in vitro*, ainsi que par l'augmentation des traitements à la progestérone et aux œstrogènes, afin de faciliter la conception. (Holmes et al. 2004; Klip et al. 2002; Reefhuis et al. 2009) La présence accrue de pesticides (Baskin et al. 2001) qui se retrouvent autant dans les eaux, les poissons, les animaux ou autres aliments, ainsi que certaines habitudes alimentaires des femmes gestantes telle qu'une diète végétarienne riche en phyto-œstrogènes, seraient tous des facteurs de risques de l'hypospadias. (North & Golding 2000) Comme plusieurs malformations génitales chez l'homme, l'augmentation de la prévalence de l'hypospadias peut être causée par plusieurs facteurs environnementaux jusqu'ici soupçonnés, mais mal compris. Par exemple, plusieurs substances chimiques interférant avec les hormones endogènes pourraient provoquer des dérangements hormonaux au cours de l'embryogénèse, menant à ces malformations. (Yiee & Baskin 2010)

Bien que nous travaillions essentiellement à la mise en œuvre d'un substitut urétral destiné à la reconstruction des hypospadias, notre substitut sera en mesure de corriger d'autres pathologies qui

sont dites acquises. Notons ici les cas de cancers ou de traumatismes, tels que les fractures péniennes, des traumas internes graves ou des sténoses urétrales provoquées par des manipulations médicales quelconques. Tous ces troubles qui amènent une dysurie peuvent conduire à la pose de cathéter suprapubien pour détourner l'urine dans les cas de sténoses complètes ou de perte d'un segment de l'urètre. La reconstruction de l'urètre vise donc à redonner une qualité de vie au patient et lui permettant d'être de nouveau continent.

Les techniques standards de reconstruction chirurgicale sont choisies en fonction de la nature de la blessure ou de la malformation, de la longueur de l'urètre à reconstruire, du choix et de l'expérience du chirurgien. Selon certains urologues, la réussite de la greffe est souvent attribuée à la compétence du chirurgien. (Farrokhyar et al. 2010; Oerlemans et al. 2013; Fossum & Nordenskjöld 2010)

1.2 Les méthodes de reconstruction urétrale

1.2.1 Les chirurgies de reconstruction standard

Plusieurs types de chirurgies de reconstruction sont pratiquées de nos jours pour restaurer l'apparence et la fonctionnalité des tissus péniens et malheureusement, la majorité sont accompagnées d'une morbidité importante et de plusieurs conséquences associées à la chirurgie et au type de tissu utilisé pour chacune d'elles.

On peut avoir recours à un remplacement de toute la circonférence de l'urètre ou encore d'une partie de la circonférence, lorsque l'urètre est partiellement endommagé. On peut aussi devoir reconstruire une portion plus ou moins grande de l'urètre. Malheureusement, dans les cas de reconstruction de longs défauts urétraux, le taux de réussite est d'environ 50%. (Raya-Rivera, Esquiliano, Yoo, Lopez-bayghen, et al. 2011) De plus, le Dr. Feitz insiste sur le fait que même si le chirurgien est expérimenté, le taux de complications à long terme (plus de 10 ans) pour la reconstruction d'hypospade en pédiatrie est d'environ 54%. (Nuininga et al. 2005) Normalement, les enfants ayant un hypospade sont opérés entre l'âge de 6 et 12 mois. (Wein et al. 2011)

Toutes les caractéristiques physiques de la malformation doivent être prises en compte dans la prise de décision du protocole de chirurgie. Les méthodes de reconstruction sont nombreuses et à la discrétion du chirurgien. Pour la reconstruction de courts segments urétraux, les chirurgiens peuvent utiliser le prépuce, s'il est présent, ou procéder avec les tissus environnants. Dans les cas où la section à reconstruire est plus grande, d'autres avenues doivent être envisagées. En effet, il est

possible d'utiliser des morceaux de peau génitale, comme une portion du scrotum (Mangera & Chapple 2013) ou encore des morceaux de peau provenant d'ailleurs sur le corps. (Zinman 1997; Sugita et al. 2001) Dans les deux cas, la complication la plus fréquente est la pousse de poil dans le greffon pouvant provoquer la formation de lithiases. (L. Xie et al. 2013) C'est aussi un facteur de risque d'infection post-greffe. Pour éviter ces complications récurrentes, les chirurgiens optent maintenant pour de nouvelles approches comme l'utilisation de la muqueuse buccale.

Les chirurgies de reconstruction urétrales proposant l'utilisation de cellules de la muqueuse buccale, de préférence de l'intérieur des joues, du dessous de la langue (Mangera & Chapple 2013) ou de l'intérieur des lèvres, comportent des avantages considérables. (Caldamone et al. 1998) Le plus important étant sans contredit l'absence de poil dans ce type de muqueuse et donc l'impossibilité de repousse de poil à l'intérieur de l'urètre, ce qui n'est pas le cas lors de l'utilisation de la peau par exemple. (Barbagli et al. 2014) Néanmoins, il est important de préciser que l'utilisation de la muqueuse buccale n'est pas sans risque de complications du site donneur. En effet, des infections, des pertes de sensation, des troubles de salivation, une perte de l'amplitude d'ouverture de la bouche, la douleur et d'autres problèmes peuvent survenir. (Dublin & Stewart 2004) Bien que cette technique soit présentement l'avenue la plus utilisée pour les longs défauts urétraux, la reconstruction doit avoir lieu en deux temps, ce qui implique davantage de risques opératoires.

Pour contrer le problème, le génie tissulaire est un choix judicieux pour reconstruire les tissus lésés, fibrosés ou complètement inexistant. Le manque de tissus pour procéder aux chirurgies de reconstruction est sans doute la contrainte majeure amenant les médecins à se tourner vers le génie tissulaire pour trouver d'autres sources de tissus.

1.2.2 Le génie tissulaire

Le génie tissulaire est une partie intégrante de la médecine régénératrice, une branche de la médecine moderne décrite en 1999 par William Haseltine qui a pour but de restaurer la fonction biologique d'un organe altéré ou inexistant. (Garriboli et al. 2014) Le génie tissulaire allie l'ingénierie et les sciences biologiques, afin de nous permettre de reconstruire des tissus vivants ou inertes pouvant remplacer ceux du corps ayant perdu leur intégrité. (Haseltine 1999) Le génie tissulaire sert très bien le domaine urologique en permettant la reconstruction de vessies, d'uretères et d'urètres, construits avec une multitude de biomatériaux différents, et pouvant être greffés sur l'animal ou l'humain selon les besoins.

Plus précisément, le génie tissulaire permet de reconstruire des urètres à partir de matériaux manipulables, ensemencés ou non avec des cellules autologues de plusieurs sources différentes. Notons entre autre l'utilisation de cellules souches de l'uretère récoltées par biopsie (Larsson et al. 2014), des cellules souches de l'urine (Bharadwaj et al. 2013) ou des cellules somatiques provenant de lavement de vessie (Fossum et al. 2012) ou encore de biopsie de vessie. (Cross et al. 2005; Raya-Rivera, Esquiliano, Yoo, Lopez-bayghen, et al. 2011; Cattan et al. 2011) Certains préfèrent utiliser uniquement des cellules mésenchymateuses (Micol et al. 2012), tandis que d'autres privilégient l'ensemencement de cellules urothéliales à l'intérieur de leurs greffons avant l'implantation (Imbeault et al. 2013). Les matériaux utilisés pour la production des urètres reconstruits peuvent être de fabrication synthétique, à base de fibres naturelles, être une conception mixte ou encore provenir d'organes décellularisés animaux ou humains. Le Tableau 2 recense une bonne partie des essais *in vivo* de reconstructions d'urètres effectuées à partir de toutes ces classes de biomatériaux.

1.2.2.1 Les matrices décellularisées

En général, les matrices décellularisées à partir d'organes humains ou animaux sont une bonne alternative, car elles consistent en une matrice semblable au tissu natif avec la capacité d'être colonisées assez rapidement par les cellules de l'hôte, à condition d'être greffées dans un endroit richement vascularisé. (Mangera & Chapple 2013) Il s'agit de biomatériaux intéressants puisqu'ils contiennent naturellement des facteurs pro-angiogéniques, comme le VEGF, ayant la capacité d'améliorer la prise de la greffe. (Hodde et al. 2001) Les matrices décellularisées sont aussi reconnues pour contenir, même après la décellularisation, des facteurs de croissance en assez grande quantité pour améliorer les résultats post-greffe. (Chun et al. 2007; Hurst & Bonner 2001) Bien que les matrices décellularisées soient un environnement propice pour les cellules qui y sont ensemencées, les traitements qu'elles subissent pour être lavées de toutes les cellules et de l'ADN qu'elles contiennent affectent sans aucun doute leur composition et structure matricielle. (Reing et al. 2010)

Depuis environ 10 ans, plusieurs équipes travaillent à produire un substitut urétral reconstruit à partir de sous-muqueuse d'intestin de porc décellularisée (SIS) avec un succès parfois bon, parfois très faible et rarement excellent. La majorité des chirurgies recensées dans le Tableau 2 sont effectuées chez l'humain. Néanmoins, certains chercheurs ont auparavant tenté les chirurgies sur les animaux, notamment sur le lapin. (Sievert et al. 2000; Kropp et al. 1998; Hill et al. 1994) Plusieurs équipes sont d'avis que les greffes auraient davantage de succès si les matrices étaient recellularisées de façon autologue avant l'implantation. De plus, le SIS peut être colonisé *in vitro*

par les cellules urothéliales et les cellules musculaires lisses. (Zhang et al. 2000) Par contre, on ne peut plus parler ici de « *off-the-self product* » ou « produit tablette », car le temps requis pour construire le biomatériau est allongé de quelques semaines et le coût de production est plus élevé, soit environ six fois plus. (Mangera & Chapple 2013) Étant donné les résultats très peu encourageants des greffes de SIS décellularisés, l'équipe du Dr. Atala, entre autres, s'est tournée vers les matrices de sous-muqueuse de vessie de porc décellularisées.

Les sous-muqueuses de vessie de porc sont décellularisées à l'aide d'un protocole qui s'étend sur plus de deux semaines. C'est à l'aide d'eau, d'enzymes (trypsine), de détergent (Triton X-100) et d'hydroxyde d'ammonium que les sous-muqueuses, préalablement micro-disséquées, sont lavées de toutes les cellules qu'elles contiennent. Malheureusement, les matrices de collagènes ainsi créées contiennent encore des particules d'ADN (0.206-0.244 ng/mg) potentiellement immunoréactives une fois greffées. (De Filippo et al. 2002; Dorin et al. 2008; Orabi et al. 2013)

L'équipe du Dr. Atala démontre aussi que ces matrices décellularisées, avant d'être greffées doivent être préalablementensemencées au minimum avec des cellules musculaires lisses, avec ou sans cellules urothéliales. Cette étape semble critique pour atteindre un recouvrement complet par les cellules urothéliales de l'hôte pour une reconstruction de plus de 0,5 cm de longueur sur le lapin. (Dorin et al. 2008) La même preuve de concept est avancée pour la reconstruction de longs segments urétraux dans un modèle animal de plus grande taille. En effet, Orabi et al. démontre, chez le chien Beagle, qu'il est possible d'utiliser une matrice décellularisée de vessie de porc réensemencée avec les cellules urothéliales et musculaires lisses autologues. (Orabi et al. 2013) Par contre, il paraît clair que le même matériel, sans l'ajout de cellules pré-implantation, ne peut être utilisé sans complications graves telles que de la fibrose, des fistules aux sites d'anastomoses et des sténoses irréversibles évoluant jusqu'à la fermeture de la lumière du greffon. (Orabi et al. 2013; De Filippo et al. 2002; Gu et al. 2012) Le même phénomène est observé dans une autre étude sur le lapin avec une matrice de collagène générée à partir de vessie de lapin décellularisée,ensemencée avec des kératinocytes de prépuce autologues. (Fu et al. 2007) En général, aucune étude n'a démontré de bons résultats d'une greffe animale d'un long segment urétral composé de matrice décellularisée dépourvue de cellules pré-implantation. À l'opposé, les résultats à court terme, un à six mois, sont généralement encourageants lorsque ces mêmes matériaux sontensemencés de façon autologue avant la greffe. (De Filippo et al. 2012; Gu et al. 2012; Fu et al. 2007) Aucune étude chez l'humain n'a jusqu'ici été réalisée avec des matrices décellularisées provenant de vessies animales. Certaines équipes ont toutefois préféré travailler avec des matrices humaines.

C'est donc à partir de dermes humains cadavériques décellularisés et réensemencés avec des cellules autologues de la muqueuse buccale, que 5 patients ont été greffés en 2008 par une équipe du Royaume-Uni avec des résultats moyens impliquant des cas de fibroses. (Bhargava et al. 2008) La technique visait la production et le stockage d'un biomatériau tubulaire déjà prêt à l'utilisation. (Chapple et al. 2013) Dre Magdalena Fossum a publié en 2010 une étude sur des patients pédiatriques qui, malgré quelques embuches, montre aussi la fonctionnalité d'un substitut reconstruit à partir de derme humain cadavérique décellularisé. L'avantage de ce modèle est qu'il est réensemencé avec des cellules urothéliales autologues obtenues par lavage vésical avant l'implantation. (Fossum & Nordenskjöld 2010) Il est très intéressant de constater qu'il y a une possibilité de réduire le nombre d'interventions exercées sur un même patient en utilisant le lavage vésical plutôt qu'une biopsie pour extraire les cellules, surtout pour les patients pédiatriques. L'utilisation de techniques moins invasives est préconisée pour limiter les interventions chirurgicales et permet de réduire les risques d'infections et de complications post-opératoires.

Malheureusement, certains démontrent qu'il est impossible de retirer tous les segments d'ADN et de laver complètement les matrices décellularisées et qu'ils provoquent des réactions inflammatoires accrues menant à des échecs de greffe. (Feil et al. 2006) La sécurité de ce genre de matériel utilisé comme greffe allogénique ou encore comme xéno greffe, en ce qui a trait à la transmission de virus, de bactéries et d'autres pathogènes, est discutable. Certains croient plus sécuritaire l'utilisation des biomatériaux exogènes totalement conçus *in vitro*, tels que les matrices de fibres naturelles et les polymères synthétiques. (Chapple et al. 2013) Réduire le risque de transmission des maladies du donneur vers le receveur de la greffe apparaît pour certains une raison suffisante de se tourner vers les biomatériaux exogènes. (Selim et al. 2011)

1.2.2.2 Les biomatériaux

Les biomatériaux sont composés d'éléments naturels ou synthétiques qui servent de support pour la conception des organes reconstruits par génie tissulaire. Ils se doivent de rencontrer des exigences précises afin de potentiellement être greffés et intégrés au corps de l'hôte. Le meilleur biomatériau doit donc posséder plusieurs caractéristiques surtout reliées à la biocompatibilité. En effet, il doit permettre l'adhésion, la communication, la différenciation et la migration des cellules qu'il contient. Dans certains cas, ces cellules sont ensemencées dans le biomatériau avant l'implantation, mais la biocompatibilité est aussi importante pour la migration des cellules de l'hôte à l'intérieur du néo-tissu. Ces cellules procéderont aussi au remodelage du biomatériau, à sa vascularisation et à la guérison de la plaie. (Burdick & Vunjak-Novakovic 2009; Hubbell 2003) Le biomatériau idéal doit

donc aussi être résorbable et permettre la reconstruction du tissu sans provoquer de réaction immunitaire lorsqu'il est implanté. (Kim 2000) Le matériel utilisé doit être biodégradable dans un temps raisonnable, s'apparentant à la cinétique de régénération du tissu cicatriciel et ne doit pas engendrer de produits de dégradation toxiques pour l'hôte.

De nos jours, on peut plus facilement jouer sur la grosseur des pores et les propriétés mécaniques des biomatériaux, afin de rencontrer les caractéristiques idéales, se rapprochant le plus possible de celles du tissu à reconstruire. Un des avantages des biomatériaux est la possibilité de leur donner la forme désirée, soit en tissus plans ou avec une structure tubulaire par exemple. (Bouhout et al. 2013) Il est important de souligner qu'il doit être assez résistant pour être manipulé et surtout suturé ou collé aux tissus de l'hôte. (Garriboli et al. 2014) Les biomatériaux sont certainement appréciés pour leur plus grande reproductibilité que les tissus décellularisée, leur coût peu élevé et la possibilité de les utiliser comme un produit disponible en tout temps. De plus, l'utilisation des biomatériaux donne la possibilité d'incorporer des facteurs de croissance ou d'autres molécules, telles que des peptides et protéines, susceptibles d'améliorer la migration et la croissance cellulaire, ainsi que la vascularisation des greffons. (Lorentz et al. 2012; Ono et al. 1999; Nuininga et al. 2010)

1.2.2.2.1 Les biomatériaux naturels

Les biomatériaux peuvent être composés de polymères naturels provenant de plusieurs sources différentes comme les plantes (Carletti et al. 2011), les animaux (Gingras et al. 2003; Gauvin et al. 2011) et les insectes. (Mano et al. 2007; Chung et al. 2014) Ce type de biomatériau propose plusieurs avantages concurrentiels par rapport aux biomatériaux synthétiques. En effet, il présente une biodégradabilité sans métabolites inconnus, une biocompatibilité accrue, puisqu'il a une structure semblable avec la MEC déjà en place et dans la majorité des cas, il n'est pas susceptible de provoquer de réactions inflammatoires chroniques, comme le font les synthétiques. Leur application dans le domaine de l'urologie est encore récente et utilise majoritairement les protéines animales.

Le collagène est un bon candidat de polymère naturel, car il est mécaniquement très résistant, il est fortement hydrophile, il possède une faible antigénicité, car c'est une protéine très bien conservée au cours de l'évolution et sa biocompatibilité est évidemment très élevée. Plusieurs équipes tentent donc de reconstruire des substituts urétraux à l'aide de gel de collagène. (Mano et al. 2007) L'équipe du Dr. Feitz démontre qu'il est possible de reconstruire des substituts urétraux à base d'hydrogel de collagène (0.5%) contenant des cellules musculaire lisses. Ils démontrent que le modèle est greffable sur le lapin et que bien qu'un petit nombre de complications surviennent, il est prometteur

d'utiliser ce genre de biomatériau. Ils démontrent même que les cellules implantées dans le greffon persistent au moins trois mois post-greffe. (Arenas da Silva et al. 2014) Des chirurgies très semblables sur le lapin avaient été réalisées quelques années plus tôt avec un échafaudage de collagène de type I de queue de rat compressé, mais les résultats étaient moins concluants, car le support matriciel n'était pas en mesure d'être suturé à cause des faibles propriétés mécaniques du collagène dans ces conditions. (Micol et al. 2012)

Les résultats des greffes d'urètres reconstruits sur le lapin faits à partir de gels de collagène de type I de tendon bovin sont comparables à ceux obtenus avec du SIS (Nuininga et al. 2003), mais le risque de réactions immunitaires incontrôlées et de transmission de maladies sont considérablement réduits. De plus, il est possible d'ajouter des facteurs de croissance à l'intérieur des gels, afin d'améliorer la rapidité de la prise de la greffe. (Nuininga et al. 2010) Les gels de fibrine peuvent aussi être additionnés de facteurs de croissance comme le facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF), mais leur efficacité n'est pas encore prouvée *in vivo*. (Lorentz et al. 2012)

Produit par une larve de papillon, le *Bombyx Mori* ou Bombyx du murier, la fibroïne de soie est une protéine en feuillet bêta très résistante qui peut aussi être utilisée en génie tissulaire. Elle est mécaniquement résistante (M. Xie et al. 2013) et possède les caractéristiques de biocompatibilité nécessaires à l'adhésion et la migration cellulaire, comme en témoignent plusieurs publications sur l'agrandissement vésicale sur le rat et le porc. (Seth et al. 2013; Tu et al. 2013; Mauney et al. 2011) De plus, la fibroïne de soie a été utilisée sur des chien Beagle femelle, pour effectuer des reconstructions urétrales qui démontrent, six mois post-opération, une réépithélialisation complète du segment reconstruit et empêche totalement l'apparition de sténose et de fistule. (M. Xie et al. 2013)

La fibroïne de soie est moins immunogène que les matrices de sous-muqueuses décellularisées de porc lors de greffes sur le lapin. (Chung et al. 2014) Cette étude très récente démontre bien la capacité des cellules de l'hôte à régénérer un urothélium et des faisceaux de muscles lisses après six mois de suivi. Bien que les résultats semblent très prometteurs, un suivi à long terme ainsi qu'un plus grand nombre de lapins (>11 lapins) seraient souhaitable pour conclure que ce tissu est vraiment performant pour réparer un hypospadias (patch). En effet, aucune sténose, abcès, lithiase ou fistule n'a été remarqué dans le suivi des animaux de cette étude, ce qui est une très belle performance pour un remplacement urétral.

1.2.2.2.2 Les biomatériaux synthétiques

Dans le domaine de la reconstruction des tissus urologiques, plusieurs types de polymères sont utilisés, mais les plus populaires sont de la famille de l'acide polyglycolique (PGA) tel que l'acide polylactique (PLA), le polyéthylène glycol (PEG), l'acide polylactique-co-glycolique (PLGA) et le polycarbonatelactone (PLC). (Garriboli et al. 2014) Comme pour les polymères naturels, la possibilité de modifier les fibres synthétiques en leur ajoutant des peptides ou des protéines est presque infinie, de sorte qu'il est possible d'améliorer les caractéristiques de chaque matériel, afin qu'il interagisse mieux avec chaque type cellulaire avec lequel il est en contact. (Cook et al. 1997) Souvent obtenus par rotation électrostatique, les échafaudages de polymères synthétiques doivent subir différentes étapes de stérilisation avant d'être greffés. Les techniques les plus efficaces semblent être celles utilisant les rayons gamma ou l'acide peracétique. (Selim et al. 2011) Malheureusement, la stérilisation des polymères affecte toujours leur résistance mécanique. Toutefois, les biomatériaux synthétiques sont tout de même reconnus pour être plus résistants que les polymères naturels ou les matrices décellularisées. Pour la reconstruction d'urètre, seuls quelques types de matériel furent utilisés jusqu'ici et l'étude la plus récente est celle de l'équipe Dr. Antony Atala. (Raya-Rivera, Esquiliano, Yoo, Lopez-bayghen, et al. 2011)

Parue dans Lancet en 2011, cette étude regroupe cinq cas de jeunes adolescents entre onze et quatorze ans présentant des urètres abimés par traumatismes, nécessitant une reconstruction de l'urètre postérieur de quatre à six cm de long. Le biomatériau testé était composé d'un support de PLGA recouvert d'un liquide composé à 50:50 de PGA:PLGA qui a polymérisé autour. L'échafaudage de polymère était au préalableensemencé avec des cellules urothéliales et des CML autologues. Après un suivi à long terme sur six ans, l'étude ne démontra aucune complication majeure, avec un retour de la capacité d'uriner sans incontinence pour tous les patients. Deux d'entre eux ont tout de même subi des chirurgies subséquentes pour corriger une sténose et la perte de fonction du sphincter vésico-urétral. Plusieurs équipes démontrent le potentiel de ce genre de biomatériaux à êtreensemencé par des cellules autologues, (Shim et al. 2010; Baker et al. 2009) un net avantage permettant de réduire le risque de sténoses et de fistules. (Olsen et al. 1992; Raya-Rivera, Esquiliano, Yoo, Lopez-bayghen, et al. 2011) L'addition de cellules dans l'échafaudage augmente, entre autres, l'élasticité du tissu. (Selim et al. 2011)

Malgré le succès du PLGA, Feng et al. décrivaient en 2009 qu'une matrice décellularisée provenant du corps spongieux de porc était mécaniquement plus résistante qu'un matériel composé uniquement de PLGA. (Feng et al. 2009) De plus, les cellules urothéliales et les cellules

musculaires lisses présentaient une meilleure capacité de colonisation du tissu *in vitro* comparé au matériel synthétique. Malheureusement, bien que ce genre de matériel soit accepté pour faire des études cliniques chez l'humain, des études démontrent que les métabolites créés lors de la dégradation de ces matériaux dans le corps produisent des agents toxiques qui peuvent exacerber les réactions inflammatoires. (Ceonzo et al. 2006; In Jeong et al. 2004) Afin de contrer le problème, certains chercheurs ont intégré les polymères naturels aux polymères synthétiques afin de profiter des avantages des deux types de biomatériaux.

1.2.2.2.3 Les biomatériaux mixtes

Les biomatériaux mixtes procurent l'avantage de garder les bonnes propriétés mécaniques des polymères synthétiques (Plotkin et al. 2014) tout en améliorant leur biocompatibilité en leur ajoutant un revêtement de matériel naturel susceptible de diminuer les attaques du système immunitaire contre le biomatériau exogène. (Fu et al. 2009) D'autres caractéristiques importantes des biomatériaux peuvent être améliorées en combinant des matières naturelles et synthétiques. (Nakanishi et al. 2003) C'est le cas d'un groupe qui amalgame un échafaudage de PLGA avec du collagène de type I de queue de rat compressé. (Ajalloueian et al. 2014) La présence de collagène permet une meilleure croissance des cellules urothéliales de porc dans le biomatériau. De plus, l'ajout de PLGA au centre des gels de collagène augmente considérablement, presque six fois, les propriétés mécaniques du biomatériau. Bien que l'équipe vise la reconstruction vésicale avec ce modèle, il serait sans doute adaptable pour la reconstruction de l'urètre.

Tableau 2 : Résumé des biomatériaux utilisés pour la reconstruction urétrale.

Types de biomatériaux	Matériel utilisé	Caractéristiques spéciales	Greffe : nombre et caractéristiques des sujets	Résultats	Références
Naturels	Collagène de type I de tendon bovin	Matrice SIS commerciale vs matrice de collagène Patch de 0.5 X 1 cm	Greffe sur 24 lapins	1, 3, 9 mois de suivi 1/6 lapin a une sténose dans chacun des modèles Urothélium recouvre après 1 mois, pas de CML après 9 mois.	Nuininga et al. 2003 (Feitz)
	Gel de collagène de type I, modifié	Addition de facteurs de croissance (VEGF, FGF-2) greffon tubulaire de 1 cm	Greffe sur 32 lapins	2 mois de suivi Meilleure vascularisation et migration cellulaire dans les greffons de collagène contenant les facteurs de croissance.	Nuininga et al. 2010 (Feitz)
	Collagène de type I de queue de rat	Gel de collagène compressé ensemencé ou non avec des CML autologues Greffon de 1 cm	Greffe sur 16 lapins	Suivi de 1 et 3 mois Fistules et sténoses mineures, meilleurs résultats avec les greffons ensemencés. Recouvrement par les urothéliales après 1 mois.	Micol et al. 2012 (Frey)
	Treillis de collagène de type I de queue de rat.	Ensemencé ou non de cell. épithéliales (feuille) et CML autologues de muqueuse buccale	Greffe sur 20 chiens	Suivi de 12 semaines Pas de fistule, ni de sténose Recouvrement complet des urothéliales après 12 semaines.	Mikami et al. 2012
	Gel de fibrine 3D modifié	Addition de insulin-like growth factor	Non greffé	Amélioration de la migration et de la croissance cellulaire à l'intérieur du matériel.	Lorentz et al. 2012 (Hubbel)
	Gel de collagène de type I de tendon bovin	Ensemencé ou non de CML autologues de vessie	Greffe sur 16 lapins	Suivi de 1 et 3 mois Fistules et sténoses mineures, meilleurs résultats avec les greffons ensemencés. Recouvrement par les urothéliales après 1 mois.	Arenas da Silva et al. 2014 (Feitz)
	Fibroïne de soie construit par électrospinning	Ensemencée avec cellules urothéliales autologues Patch 3.2 X 1.2 cm	Greffe sur 9 chiennes Beagle	Aucune sténose ni fistule. Après 6mois de suivi, les cellules urothéliales reforment un urothélium stratifié.	M. Xie et al. 2013
	Fibroïne de soie	Sans cellule, 2 épaisseurs vs SIS Patch 1 X 2 cm	Greffe sur 11 lapins	Suivi de 6 mois, beaucoup moins de réaction inflammatoire avec la soie comparé au SIS.	Chung et al. 2014

Synthétiques	Acide polyglycolique/ Acide polylactique-glycolique (PGA/PLGA)	Ensemencé avec cellules urothéliales et CML autologues de vessie	Grefe sur 5 patients humains	Suivi de 71 mois (36 mois pour un des patient) Biopsies démontrent une bonne organisation de l'urothélium et des faisceaux de CML. Très bons résultats	Raya-Rivera et al. 2011 (Atala)
	Échafaudage de polyglactine recouvert d'acide polyhydroxybutyrique	Sans cellule Grefe tubulaire de 4 cm	Grefe sur des chiens Nombre de chien?	12 mois de suivi Recouvrement complet par les cell. urothéliales, pas de fistule, ni sténoses.	Olsen et al. 1992
Mixte	Acide poly L-polylactique recouvert de chitosan	Ensemencé avec cellules urothéliales autologues	Grefe sur 32 lapins	Suivi de 6 mois Sans fistule ni sténose.	Fu et al. 2009
Organes décellularisés	Sous-muqueuse de vessie humaine décellularisée	Sans cellule Patch	Grefe sur 4 patients humain de 4 à 20 ans	Traitement d'hypospadias sévère dont 1 patient sur 15 cm de long, qui est la seule fistule du groupe	Atala et al. 1999; Chen et al. 2000
	Sous-muqueuse d'intestin grêle de porc (SIS)	Sans cellule Greffon jusqu'à 10 cm de long	Grefe sur patients humains 4 hommes et 1 femme	Pas sténose sur 16 mois de suivi. Seul a avoir traité une femme sur 3 cm de long	Mantovani et al. 2003
		Sans cellule	Grefe sur 9 patients humain Tous fracture pelvis	2 patients ok avec suivi de 2 ans 6 sténoses sur 3 mois. Grefe endoscopique.	Le Roux 2005
		Sans cellule Patch	Grefe sur 9 patients humains	Suivi de 18 mois. 1/9 sténose après 6 mois .	Donkov et al. 2006
		Sans cellule	Grefe sur 5 patients humains	Pour 4/5 patients, échec de la greffe pour infection, sténose complète ou autres problème grave.	Hauser et al. 2006
		Sans cellule Avec greffon de 3 à 7.7 cm	Grefe sur 20 patients humains	Suivi de 21 mois en moyenne 85% des cas sont réussis, c.-à-d. sans réintervention sur 21 mois Beaucoup de fibrose dans le greffon. Échec avec greffe de plus de 5.7 cm.	Palminteri et al. 2007

Organes décellularisés	Sous-muqueuse d'intestin grêle de porc (SIS)	Sans cellule	Greffe sur 50 patients humains	80% de succès avec 31 mois de suivi mais sténose à 6 mois	Fiala et al. 2007
		Sans cellule	Greffe sur 25 patients humains	Suivi de 71 mois où 24% des cas ont dû subir une 2ème intervention (100% échec pour cas de greffon > 4 cm)	Palminteri et al. 2012
	Sous-muqueuse de vessie de porc	Substitut 1 cm avec ou sans cellules urothéliales et CML de vessies autologues	Greffe sur 24 lapins	Suivi de 1 mois Sténose du greffon lorsqu'il n'y a pas de cellules préalablement ensemencées	De Filippo et al. 2002
		Substituts de 0.5, 1, 2, 3 cm, sans cellule	Greffe sur 16 lapins	Suivi de 1, 3, 4 semaines : incapacité de régénération si greffon >0.5cm 0.5 cm: recouvrement des urothéliales après 1 mois	Dorin et al. 2008 (atala)
		Substitut avec ou sans cellules de vessies autologues	Greffe sur 24 lapins	Suivi 1, 3, 6 mois Sténose du greffon lorsqu'il n'y a pas de cellule préalablement ensemencée.	De Filippo et al. 2012
		Avec et sans cellules (urothéliales et CML) 6 cm de long	Greffe sur 15 chiens Beagle	Suivi après 1, 3, 6, 12 mois. Sténose et mauvaise régénération tissulaire si pas de cellule ensemencée dans le greffon, tubularisé. Pas de sténose s'il y a cellules pré-implantation	Orabi et al. 2013 (Atala)
	Vessie de lapin	Avec kératinocytes de prépuce vs sans cellule	Greffe sur 18 lapins	Suivi après 1, 2 et 6 mois Meilleur recouvrement par les urothéliales et meilleure organisation de faisceaux de muscles lisses pour les greffons ensemencés avec les épithéliales	Fu et al. 2007
		Ensemencé ou non avec cellules mésothéliales de l'omentum greffon de 1.5 cm de long .	Greffe sur 18 lapins	Suivi de 1, 2, 6 mois Avec matrices recellularisées, aucune sténose, groupe contrôle sans cellule, tous sténosés.	Gu et al. 2012
		Avec cellules souches mésenchymateuse et musculaires lisses de vessie	Greffe sur 24 lapins	Suivi de 2, 4, 8, 16 semaines À 8 semaines, recouvrement par les urothéliales, à 16 sem, comme urètre natif avec muscle. Pas de sténose ni fistule.	Li et al. 2013

Organes décellularisés	Peau humaine cadavérique	Sans cellule	Greffe sur 16 patients humains trauma et non hypospade	75 % de succès avec suivi de 45 mois. Sténose pour 3 patients.	Lin et al. 2005
		Ensemencé avec urothéliales autologues de lavage vésical, tubularisé	Greffe sur 5 et 6 enfants humains de 14 à 44 mois	Suivi entre 5 et 7.25 ans Tous les patients ont un urètre ouvert, peuvent uriner en position normale, avec un flux normal et apparence normale. Avant intervention corrective : 1 sténose, 2 fistules. Érection normale.	Fossum et al. 2007; Fossum et al. 2012
		Derme dé-épithélialisé stérile avec fibroblastes et kératinocytes autologues de muqueuse buccale	Greffe sur 5 patients humains avec sténose provoqué par lichen scléreux	Suivi de 33 mois Tous les patients ont eu des interventions secondaires à la greffe à cause de contraction du greffon, retrait du greffon sur 2 patients.	Bhargava et al. 2008
	Corps spongieux de porc	Ensemencé ou non avec kératinocytes sublinguaux, et/ou CML corps spongieux autologues, patch	Greffe sur 18 lapins	Sans cellule : fibrose et sténose, mais pas recouvrement total par urothéliales après 6 mois. Avec 2 types cellulaires, pas sténose, ni fibrose et urothélium normal à 6 mois.	Feng 2011
	Matrice d'os déminéralisée, de donneur humain cadavérique (MOD)	Muqueuse buccale vs MOD de 2 à 18 cm de greffon	Greffe sur 28 patients humains de 21 à 59 ans	25 mois de suivi en moyenne La muqueuse buccale donne des meilleurs résultats surtout lorsque le lit de la plaie est mal vascularisé.	El-Kassaby et al. 2008 (Atala)

1.3 La méthode d'auto-assemblage, une technique unique au LOEX

La méthode d'auto-assemblage est une technique de génie tissulaire utilisée au centre de recherche le LOEX, le Centre de recherche en organogénèse expérimental de l'Université Laval. Dès les tous débuts du laboratoire en 1985, le Dr. François Auger et le Dr. Lucie Germain travaillaient à l'élaboration d'une méthode innovatrice permettant de produire des substituts épidermiques autologues, afin de greffer les patients grands brûlés des hôpitaux du Québec. Les premières greffes ont d'ailleurs été pratiquées en 1986.

Cette technique très avant-gardiste est basée sur la capacité des cellules mésenchymateuses à produire, assembler et déposer la matrice extracellulaire de façon à former des feuillets tissulaires manipulables. (Auger et al. 1995; Auger 2002; Auger et al. 2004) Cette technique se démarque des autres car elle n'emploie aucun biomatériau exogène, évitant les problèmes de rejet immunitaire lorsque les reconstructions tissulaires sont greffées. De plus, les modèles créés au LOEX sont autologues et seulement une minorité de produits utilisés lors de la production sont d'origines bactérienne ou animale. Les cellules utilisées proviennent de biopsie de peau, facile à obtenir et non invalidante pour le patient. Malgré le coût élevé de sa production et le temps nécessaire à son élaboration, la méthode d'auto-assemblage est sans doute une technique très prometteuse.

Au fil du temps, la méthode s'est améliorée et diversifiée, afin de s'étendre à plusieurs domaines de la médecine. Aujourd'hui, plus de dix modèles de tissus différents sont reconstruits par la technique d'auto-assemblage et produits *in vitro*, dans les locaux à la fine pointe de la technologie, du nouveau centre multidisciplinaire du développement du génie tissulaire de Québec, le CMDGT/LOEX.

1.3.1 La multidisciplinarité du LOEX

Le LOEX regroupe maintenant plus de 10 chercheurs de plusieurs domaines tels que l'urologie, la santé cardio-vasculaire, la neurochirurgie, la chirurgie plastique, la pharmacie, la biochimie, etc. Chacune des équipes s'affaire à adapter le modèle d'auto-assemblage afin de générer des modèles destinés à la greffe ou encore utilisés pour étudier des maladies. Une première avancée majeure de ce modèle est sans aucun doute la production de substituts destinés à la greffe de peau chez l'humain, afin de traiter les grands brûlés. Pour réussir cet enjeu, le LOEX est un centre technologique qui héberge des salles blanches permettant d'effectuer des transplantations d'épidermes et des essais cliniques sur la transplantation de peau bilamellaire. (La peau bilamellaire est constituée d'épiderme et de derme.) De plus, un nouvel essai clinique de phase un et deux vient

d'être mis sur pied, afin de procéder à des greffes de cornées autologues, sur des patients ayant une déficience en cellules souches, pour qui d'autres traitements ont échoués. (Proulx et al. 2010; Carrier et al. 2009)

La méthode d'auto-assemblage a l'avantage de pouvoir utiliser plusieurs types cellulaires différents; il est, entre autres, possible d'utiliser des cellules provenant du gras humain. Effectivement, les cellules stromales multipotentes isolées du tissu adipeux (CSTA) sont utilisées afin de produire des substituts de peau ayant une portion qui s'apparente à l'hypoderme, avec des cellules adipeuses différenciées *in vitro*. (Labbé et al. 2011; Vermette et al. 2007; Trottier et al. 2008) Ces tissus cultivés en conditions statiques ou dynamiques, (Fortier et al. 2013) permettent l'étude de l'adipogénèse, de l'angiogénèse et servent même de modèle pour différents tests pharmacologiques.

Plusieurs modèles *in vitro* ont été créés pour étudier la physiopathologie de certaines maladies de la peau, comme le psoriasis (Jean et al. 2009), les cicatrices hypertrophiques (Simon et al. 2012) et la sclérodermie. (Chabaud & Moulin 2011; Chabaud et al. 2011; Corriveau et al. 2009) Le modèle de peau reconstruite par la méthode d'auto-assemblage permet aussi une meilleure compréhension de la physiopathologie de la cicatrisation. (Dube et al. 2010; Moulin et al. 2010) Il est aussi possible d'utiliser les différents modèles pour étudier les interactions entre les types cellulaires qui les composent dans des contextes sains ou pathologiques.

D'autres modèles plus spéciaux, créés à partir de cellules de patients malades, permettent même l'étude de maladies du système nerveux telle que la sclérose latérale amyotrophique (SLA). La technique d'auto-assemblage permet aussi la production de valves cardiaques complexes qui possèdent des propriétés mécaniques étonnantes. (Tremblay et al. 2014)

Une des techniques les plus anciennes du centre LOEX est la reconstruction de tissus vasculaires qui reproduit grossièrement un vaisseau sanguin avec une média et une adventice. (L'heureux et al. 1998; Bourget et al. 2012) Ce modèle est utilisé comme outil pour tester des produits pharmaceutiques agissant sur la vasoconstriction ou la vasodilatation. (L'heureux et al. 2001) De plus, les substituts vasculaires sont destinés à la greffe sur des patients dialysés, avec des pathologies coronariennes ou toutes autres maladies du système cardio-vasculaire demandant une greffe de vaisseaux sanguins.

Grâce à l'arrivée de l'équipe du Dr. Bolduc au LOEX, la production de tissus urologiques va bon train. En clinique, cet urologue pédiatrique a été interpellé par le manque de solutions chirurgicales satisfaisantes pour procéder à certaines interventions, souvent chez des enfants en bas âge. En effet,

comme mis en contexte à la section 1.1.4, certaines pathologies congénitales nécessitent des reconstructions tissulaires et le manque de tissus disponibles afin de procéder à ces chirurgies est récurrent. La production de tissus autologues *in vitro* semblait, pour le Dr. Bolduc, la meilleure avenue à envisager. Déjà, le modèle de vessie reconstruite avec la méthode d'auto-assemblage est prometteur de par son imperméabilité et sa résistance mécanique adéquate. (Bouhout et al. 2011; Bouhout et al. 2010; Magnan et al. 2006) Des substituts vésicaux ont aussi été créés à partir de CSTA (Rousseau et al. 2013)] et des structures tubulaires ont été reconstruites pour traiter la maladie de Peyronie. (Imbeault et al. 2011) Le modèle de l'équipe du Dr. Bolduc qui cheminera le plus rapidement de la recherche vers les études cliniques est sans doute celui des substituts urétraux reconstruits, une adaptation du modèle vasculaire précédemment mentionné.

1.3.2 Le modèle de substitut urétral humain

Les substituts urétraux reconstruits par auto-assemblage à partir de cellules humaines ont déjà fait leurs preuves dans la littérature. Ils sont capables de résister à une pression interne qui va au-delà de la pression physiologique tolérée par les tissus urétraux *in vivo*. (Magnan et al. 2009) De plus, leur grande résistance mécanique permet de les suturer facilement. L'étude de Cattan et al. démontre que le modèle permet non seulement la croissance des cellules urothéliales à l'intérieur de la lumière des substituts, mais aussi la capacité de ces cellules à former un urothélium différencié. (Cattan et al. 2011) En effet, grâce à une stimulation mécanique en bioréacteur, les urètres reconstruits acquièrent un niveau de maturation jamais égalé dans la littérature. Les cellules parapluies du modèle de Cattan exprimaient la CK20 et les uroplakines sous forme de plaque mature à leur surface apicale tel que décrit dans la section 1.1.2.1.2. Une autre étude a permis de démontrer, grâce à des chirurgies sur des souris nues, que les substituts étaient davantage vascularisés *in vivo*, lorsqu'ils étaient reconstruits avec des cellules endothéliales intégrées aux cellules mésenchymateuses du stroma. (Imbeault et al. 2013)

1.4 Problématique, hypothèse et objectifs

Maintenant que le modèle d'urètre reconstruit à partir de cellules humaines est prêt pour la greffe chez l'humain, il nous faut prouver aux agences réglementaires que le modèle est bel et bien sécuritaire et qu'il répond à leurs exigences, en passant tout d'abord par les greffes chez les animaux. Des tests préliminaires permettront d'accéder aux tests précliniques qui, une fois terminés, mèneront à la phase clinique du projet dans quelques années.

Le premier animal choisi pour effectuer les tests préliminaires est le lapin et plusieurs raisons ont guidées notre choix. Tout d'abord, c'est un animal d'une grosseur acceptable, autant pour l'hébergement que pour les chirurgies. En effet, le pénis de lapin, bien qu'il ait une anatomie un peu différente de celle de l'humain, est d'une grosseur comparable à celle d'un jeune garçon. De plus, c'est un modèle animal très utilisé dans la littérature lors de chirurgies de reconstructions urétrales comme le montre le Tableau 2. Le lapin semble donc être un animal de choix pour ce type de chirurgie d'autant plus que son utilisation nous permettra de nous comparer aux autres modèles proposés.

Mon hypothèse est donc que la méthode d'auto-assemblage permettrait de reconstruire des substituts urétraux à partir de cellules de lapin, afin de prouver la faisabilité de la greffe de reconstruction urétrale autologue chez le lapin.

À l'heure actuelle, il n'existe pas de lapins immunodéficients qui pourraient nous permettre d'effectuer des xénogreffes avec des tissus reconstruits humains. Dans un lapin ayant un système immunitaire normal, ce type de greffe provoquerait des réactions immunitaires incontrôlables et probablement mortelles pour l'hôte. Malheureusement, les conditions de culture du LOEX ont été optimisées pour produire des tissus à partir de cellules humaines. Par conséquent, lorsque l'on désire créer des tissus à base de cellules animales, les conditions de culture doivent être modifiées, afin de permettre une bonne croissance cellulaire et une production de MEC optimale.

C'est dans cette optique que prenait forme le premier objectif de ce projet : l'optimisation des conditions de culture, afin d'augmenter l'épaisseur des feuillets de MEC produits par les cellules mésenchymateuses de lapin. Le deuxième objectif de mon projet était d'adapter et d'améliorer les méthodes employées tout au cours de la production des substituts urétraux humains, afin d'obtenir les meilleurs substituts lagomorphes possible. Et finalement, le dernier objectif de ma maîtrise était de prouver la faisabilité de la greffe de reconstruction urétrale chez le lapin à l'aide des greffons reconstruits *in vitro* par la méthode d'auto-assemblage.

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

2.1 L'extraction enzymatique des cultures primaires

Les cultures primaires sont obtenues à partir de vessies et de peaux de lapins de race New Zealand (Charles River, Montréal, Canada) selon un protocole bien établi au LOEX. (Germain et al. 1993; Auger et al. 1995; Magnan et al. 2006) C'est après plusieurs tentatives infructueuses d'extraction avec des protocoles provenant de la littérature que nous avons arrêté notre choix sur celui du LOEX utilisé pour extraire les cellules de la peau, avec quelques modifications. Toutefois, certaines améliorations devront encore être apportées, afin d'isoler des populations cellulaires pures.

Les biopsies de vessies et de peaux sont traitées avec le même protocole, mais des types cellulaires différents y sont extraits. De la peau, on récolte des fibroblastes dermiques seulement. Des cellules urothéliales et mésenchymateuses sont, pour leur part, extraites de la vessie des lapins. Les substituts urétraux peuvent donc être reconstruits à l'aide des cellules dermiques et vésicales qui correspondent au même lapin. Les biopsies sont tout d'abord rincées avec une solution tampon phosphate isotonique (PBS) (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 6.5 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄) contenant 100 U/ml de pénicilline (Sigma, Oakville, ON, Canada), 25 mg/ml de gentamicine (Schering, Pointe-Claire, QC, Canada) et 0.5 mg/ml de fungizone (Bristol-Myers Squibb, Montréal, QC, Canada). Les morceaux sont ensuite coupés en pièces d'environ 0.25 cm² et incubés dans une solution de thermolysine 500 µg/ml (Sigma) diluée dans un tampon HEPES à pH 7.4 supplémenté avec 1 mM de CaCl₂ (Sigma), pendant une nuit à 4°C. Les épithéliums sont ensuite délicatement retirés des dermes et des stromas vésicaux, puis l'urothélium est digéré avec 20 ml de trypsine 0.05%, 0.1% EDTA pendant 30 min à 37°C, tandis que l'épithélium de la peau est jeté. Les cellules urothéliales sontensemencées à environ 4 x 10⁴ cellules/cm² dans un milieu DMEM-Ham complet (Dulbecco's Modified Eagle Medium : Ham F12 (3:1), 10% de sérum bovin (BGS; HyClone, Life technologies, Burlington, ON, Canada), 5 µg/ml d'insuline (Sigma), 0.4 µg/ml d'hydrocortisone (Calbiochem, San Diego, CA, USA), 10⁻¹⁰ M de toxine du choléra (Sigma), 10 µg/ml de facteur de croissance épidermique (EGF) (Austral Biologicals, San Ramon, CA, USA), de 100 U/ml pénicilline et de 25 µg/ml de gentamicine). Les cellules urothéliales sont toujours cultivées avec une couche nourricière composés de fibroblastes dermiques de lapin irradiés ensemencés à 6.5 x 10³ cellules/cm². Normalement, il est préconisé d'utiliser des fibroblastes irradiés murins, les S3T3. Néanmoins, nos résultats démontrent que les cellules urothéliales de lapin prolifèrent plus rapidement et donnent un meilleur rendement lorsqu'elles sont cultivées en présence d'une couche nourricière de fibroblastes de lapin. Les stromas vésicaux et dermiques, ils sont recoupés en plus

petits morceaux et digérés dans une solution de collagénase H à 0.125 U/ml (Roche diagnostics, Laval, QC, Canada) pendant 4 heures à 37°C. Les suspensions cellulaires obtenues sont filtrées et centrifugées. Les cellules mésenchymateuses dermiques et vésicales sont ensuiteensemencées à une concentration de 4×10^4 cellules/cm² dans un milieu DMEM, (Dulbecco's Modified Eagle Medium, supplémenté de 10 % BGS, de 100 U/ml de pénicilline et de 25 µg/ml de gentamicine). Toutes les cultures cellulaires de lapin sont incubées à 38.5°C dans des incubateurs à 8 % de CO₂ et les milieux de culture sont changés trois fois par semaine. Les cellules mésenchymateuses sont utilisées aux passages 3 à 7 et les cellules urothéliales aux passages 2 à 4.

2.2 L'auto-assemblage, la méthode traditionnelle adaptée aux cellules de lapin.

Comme le chapitre 1.3 l'explique, la méthode d'auto-assemblage permet la création de tissus manipulables qui sont composés de MEC et de cellules mésenchymateuses. Comme au fil du temps la méthode traditionnelle à été modifiée pour la culture des cellules de lapin, les modifications apportées seront bien décrites tout au cours de la description de la méthode. La méthode classique est schématisée à la Figure 7.

La méthode traditionnelle d'auto-assemblage préconise l'utilisation des fibroblastes dermiques pour leur facilité de prélèvement chez le patient. Par contre, comme ce sont des tissus urologiques que nous tentons de reconstruire, il est logique de vouloir rendre le modèle davantage spécifique de l'organe ciblé en utilisant des fibroblastes et les CML de vessie dans la construction des tubes. La réalisation des substituts avec des cellules mésenchymateuses de vessie uniquement n'est pas possible pour l'instant, car ces cellules produisent un quantité insuffisamment de MEC pour produire des feuillets manipulables dans un temps raisonnable.

Suite à une étape d'amplification, les fibroblastes dermiques et vésicaux sontensemencés à 10^4 cellules/cm² dans des plaques de culture de 500 cm². Les cellules dermiques humaines sont normalement cultivées dans un milieu DMEM additionné de 50 µg/ml d'acide ascorbique (Sigma) et de 10 % de BGS. Les cellules de lapin produisent très peu de matrice dans ce milieu de culture, elles sont donc cultivées dans du milieu DMEM-Ham complet aussi supplémenté de 10 % de BGS, de 50 µg/ml d'acide ascorbique et de 100 µM d'adénosine (Sigma). Ces additifs sont ajoutés à chaque changement de milieu, c'est-à-dire trois fois par semaine pour une période variant selon la provenance des cellules. Bien que le temps de production des feuillets tissulaires de cellules humaines soit de 21 à 28 jours, celui des lapins est beaucoup plus court en raison de tous les additifs

présents dans le milieu. Les cellules fibroblastiques peuvent être cultivées pendant 11 jours avant d'atteindre une structure maniable. Lorsque le feuillet est suffisamment manipulable, il est roulé autour d'un mandrin d'un diamètre externe de 6.2 mm et d'une longueur de 9 cm, dimensions qui correspondent à celles de l'urètre d'un lapin adulte. Les deux types de constructions ont été comparés, soit celle produite avec des fibroblastes dermiques de lapin seulement et celle formée des fibroblastes de derme et de vessie mélangés avec un ratio 1:1. Cette dernière condition est appelée "Mix" au cours de ce mémoire.

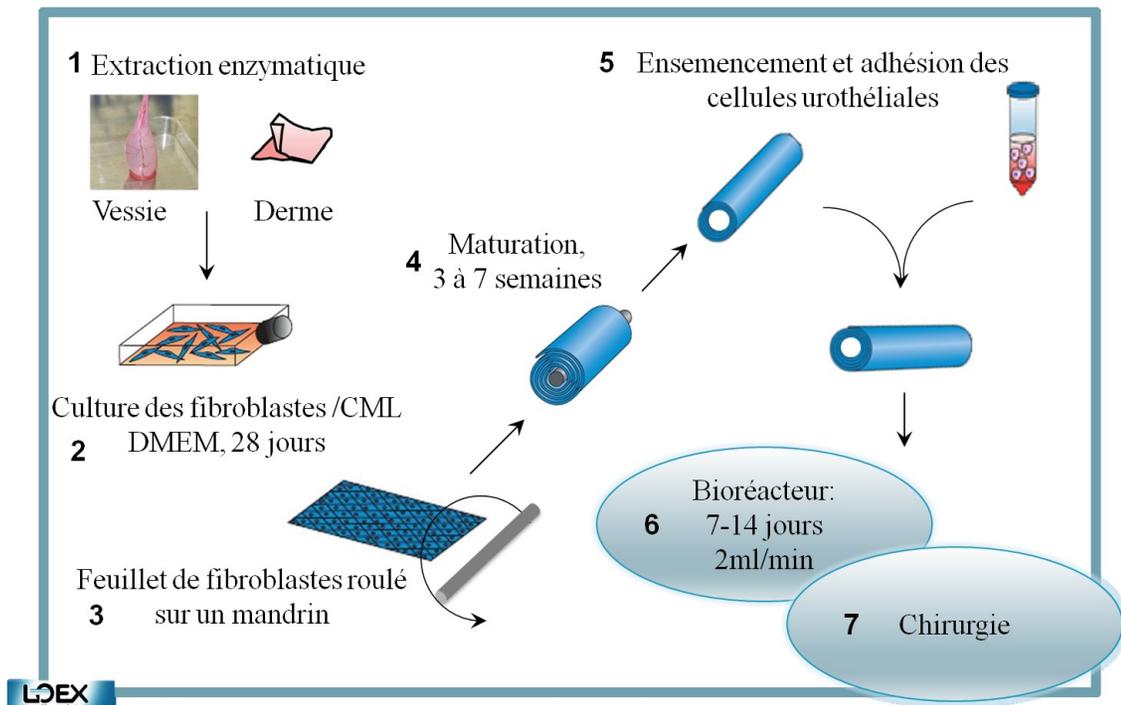


Figure 7 : Méthode traditionnelle de production des substituts urétraux.

1) Extraction enzymatique des populations cellulaires de la vessie et de la peau de lapin. 2) Culture des cellules mésenchymateuses jusqu'à l'atteinte d'un feuillet manipulable. 3) Roulage du feuillet de MEC et de cellules autour d'un mandrin. 4) Maturation des constructions tissulaires. 5) Ensemencement des cellules urothéliales à l'intérieur des tubes. 6) Perfusion des substituts urétraux à l'intérieur d'un bioréacteur. 7) Implantation des substituts urétraux chez le lapin.

Une fois roulé autour du mandrin, le tissu est tenu en place et compressé par des éponges stériles de type Merocel (Labtician, Oakville, ON, Canada) pour 48 hrs, afin de débiter la fusion des différentes couches qui composent le tube. La maturation prend un minimum de trois semaines, mais peut être échelonnée sur cinq ou sept semaines, afin que la fusion soit bel et bien terminée. Pendant cette étape, les substituts sont cultivés dans le milieu DMEM-Ham complet avec un ajout

de sérum différent. Le 10% BGS du DMEM-Ham standard est remplacé par un mélange de sérum, 5% BGS et 5% sérum de veau fœtal (H; FetalCloneII, Hyclone, Life technologies, Burlington, ON, Canada). Plusieurs sérums ont été testés pour cette étape. (Voir la section résultats dans le Chapitre 3) Normalement, la prochaine étape du processus de production des substituts urétraux devrait être l'ensemencement des cellules urothéliales à l'intérieur de ceux-ci, puis la maturation de l'urothélium grâce à la perfusion dans un bioréacteur. Comme nous sommes au début de ce projet, les résultats obtenus jusqu'à maintenant concernent des substituts urétraux sans urothélium, c'est pourquoi les étapes 5 et 6 de la Figure 7 ne sont pas complétées. Les tubes ont été utilisés directement pour la greffe sur le lapin suite aux trois semaines de maturation sur le mandrin. Tous les substituts urétraux qui ont servi pour les greffes ont été analysés lors de tests mécaniques, de colorations histologiques et d'immunofluorescences sur coupes minces.

2.3 Le dosage des collagènes

Étant donné que les cellules mésenchymateuses de lapin produisent moins de MEC que les cellules humaines correspondantes, plusieurs additifs ont été testés afin de provoquer une plus grande synthèse et un assemblage plus efficace du collagène. Afin de déterminer les concentrations idéales pour chacun des produits sélectionnés, deux tests quantitatifs ont été optimisés, le dosage du collagène par la coloration au *Sirius Red* et le dosage de l'hydroxyproline.

Les conditions de culture étaient très exactement les mêmes pour les 2 tests. Les biopsies pour le dosage du *Sirius Red*, de l'hydroxyproline et du dosage d'ADN étaient récoltées dans le même tissu à l'aide de poinçon à biopsie. Les cellules ont été cultivées dans des plaques 12 puits, avec des ancrages de papier pour éviter la contraction du tissu, pendant 12 jours. Les deux types de constructions correspondantes à celles des tubes reconstruits furent testées, c'est-à-dire avec des fibroblastes dermiques seuls et les mix. Toutes les cellules ont été cultivées dans un milieu DMEM-Ham complet avec 50 µg/ml d'acide ascorbique qui fut changé trois fois par semaine. Il y avait trois échantillons pour chacune des conditions et des contrôles (n=3), pour lesquels aucun autre additif n'avait été ajouté. Les échantillons ont été produits avec les cellules de trois lapins différents (N=3). Les différentes conditions de culture testées étaient les suivantes : 5 et 10 µM de LPA (Sigma), 50, 100 et 200 µM d'adénosine (Sigma) et 5, 10 et 20 ng/ml d'œstrogène (Sigma). Ces conditions de cultures ont été choisies en fonction de ce qu'il s'est déjà fait dans la littérature ainsi qu'à partir de tests préliminaires effectués préalablement. (Chabaud et al. 2013) Les tissus ont été rincés au PBS et congelés à sec dans l'azote au moment de la récolte, puis décongelés dans un bain marie à 37 °C pendant 5 min, au moment des analyses.

2.3.1 Le dosage du collagène par la coloration au *Sirius Red*

Les tissus de 6 mm de diamètre ont été incubés dans une solution de pepsine 10 mM EDTA (Capitol Scientific, J.T.Baker, Austin, TX, USA), 0.5 M d'acide acétique pendant 12 hrs environ, à 37 °C sous agitation constante. Après centrifugation, 100 µl de surnageant, contenant le collagène acide soluble, furent incubés avec le colorant *Sirius Red* pour 30 min. Le précipité alors formé entre le colorant et le collagène est centrifugé, rincé et récupéré. Après sa solubilisation dans le KOH, le *Sirius Red* a été dosé au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 540 nm. (Keira et al. 2004)

2.3.2 Le dosage de l'hydroxyproline

Les tissus de 4 mm de diamètre ont été déposés dans les inserts de verre de 200 µl d'un tube à chromatographie muni d'un bouchon de PTFE (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) et d'un septa de teflon (Waters, Mississauga, ON, Canada). Une hydrolyse acide dans le HCl 12 M a été effectuée à l'autoclave dans un cycle de 60 min à 121°C et 30 psi. Après avoir été filtré au charbon activé, les solutions de tissus digérés étaient traitées suivant les différentes étapes du kit Hydroxyproline Assay kit (Biovision, Milpitas, CA, USA). 40 µl de chaque échantillon ont été séchés dans des plaques 96 puits à 60°C jusqu'à évaporation complète de l'acide, qui pourrait interférer avec les réactifs des étapes subséquentes. L'ajout de la chloramine T provoquait l'oxydation des hydroxyprolines et la formation de pyrroles. En ajoutant le réactif de Ehrlich contenant du (Diméthylamino) benzaldehyde (DMAB) dans une solution d'acide perchlorique, un chromophore jaune était formé, permettant de doser l'hydroxyproline au spectrophotomètre à 560 nm. (Stegemann & Stalder 1967)

2.3.3 Le dosage de l'ADN

Étant donné qu'il est probable que les additifs utilisés pour augmenter la production de collagène augmentent aussi la prolifération cellulaire, il est important de déterminer le nombre de cellules présentes dans les échantillons. Pour ce faire, un test de dosage de l'ADN avec un intercalant fluorescent nommé Picogreen (Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits, Invitrogen, Oregon, USA) a été effectué sur les tissus reconstruits. (Singer et al. 1997) Des biopsies de 4 mm ont été récoltées dans les mêmes spécimens ayant servis aux tests de dosage des collagènes, puis ont été congelés. Pour l'expérimentation, les morceaux étaient décongelés et incubés à 56 °C pendant au moins 16 hrs dans une solution de protéinase K (QIAGEN, Hilden, Germany) concentrée à 10 %, afin de complètement hydrolyser les protéines composant le tissu. Les bases azotées de l'ADN et

de l'ARN sont les seules molécules qui ne sont pas dégradées par cette enzyme. Afin de doser seulement l'ADN, une incubation en présence de RNase A (Invitrogen) a été exécutée. Finalement, les échantillons furent incubés avec le réactif Picogreen pour 5 min, puis la fluorescence émise était captée à l'aide d'un fluoromètre (Varioskan Flash, Thermo, Vantaa, Finland). Tous les échantillons, ainsi qu'une courbe standard, ont été réalisés en duplicata.

2.4 Les analyses microscopiques

Afin de pouvoir apprécier la qualité de la matrice et des cellules composant les tissus produits, chacun des substituts urétraux ont été analysés par histologie et immunofluorescence. Les observations ont été faites avec un microscope droit de Zeiss (Axio Imager.M2, Zeiss, Toronto, ON, Canada) et toutes les images ont été traitées avec le programme AxioVision V4.8.2.0 (Zeiss).

2.4.1 L'histologie

Les échantillons de substituts urétraux récoltés sous forme d'anneaux ont été fixés sur un mandrin dans une solution tamponnée de formol 3.7 % pour 24 heures minimum pour être ensuite inclus dans la paraffine. Des tranches de 5 µm d'épaisseur ont été coupées au microtome, puis colorées avec un trichrome de Masson. Cette coloration permet de bien visualiser l'organisation des fibres de collagène colorées en bleu. Les noyaux des cellules sont plutôt colorés en rouge ou en rose foncé. Une fois les coupes montées avec lamelles dans un milieu de montage à base de solvant organique, Mounting medium (Thermoscientific, Canada) les coupes ont été observées au microscope droit à champ clair et les images prises avec une caméra AxioCam ICc1. (Zeiss, Toronto, ON, Canada). Certaines images ont aussi été captées par une caméra AxioCam ERc5s (Zeiss) installée sur un binoculaire Zeiss Discovery.V8.

2.4.2 Les immunofluorescences sur coupes minces

Pour procéder aux immunofluorescences sur coupes congelées, les échantillons doivent être inclus dans un polymère à base d'eau appelé OCT (Tissue-Tek, Somagen, Edmonton, AB, Canada) qui protège les tissus lors de la congélation. Des coupes de 5 µm d'épaisseur ont ensuite été effectuées au cryostat, puis fixées au méthanol 100% à -20°C, juste avant de procéder à l'immunofluorescence. Une étape de blocage des épitopes avec une solution de PBS contenant 3 % d'albumine bovine (BioBasic, Markham, ON, Canada) et 0.3 % de triton précède l'incubation des coupes avec les anticorps primaires (voir le

Tableau 3ci-dessous), dilués dans la même solutions de PBS-BSA-triton. Les anticorps secondaires sont couplés avec les fluorochromes Alexa 594, qui émettent dans le rouge et Alexa 488 qui émettent dans le vert. (Molecular probes, Life Technnologies, Eugene, OR, USA) Les noyaux sont marqués au Hoechst (Sigma) et les contrôles négatifs étaient des coupes où l'anticorps primaire a été omis.

Antigènes	Compagnie	Techniques	Dilutions
Collagène de type I	Calbiochem	IF-C	1:250
α-actine du muscle lisse	Millipore	Lamelles, IF-C	1:1000
Pan-cytokératines (AE1/AE3)	Millipore	Lamelles, IF-C, IF-P	1:1000
Calponine	SantaCruz	Lamelles	1:250

Tableau 3 : Tableau des anticorps primaires utilisés en fonction des techniques employées.

IF-C : Immunofluorescence sur coupes congelées, IF-P : Immunofluorescence sur coupes paraffinées.
Lamelles : Immunofluorescence sur lamelles de verre.

Suite aux nécropsies des lapins, leur pénis, contenant les greffons, ont tous été fixés dans le formol 3.7 % et inclus dans la paraffine afin de faire des coupes longitudinales de toute la longueur du pénis. Pour procéder aux immunofluorescences, ces coupes ne pouvaient donc pas être traitées de la même façon que les coupes de tissus congelées dans l'OCT. En effet, une fois les coupes déparaffinées et réhydratées, une étape de démasquage est nécessaire pour libérer les épitopes reconnus par les anticorps qui ont été masqués par la fixation au formol. Les lames ont été incubées dans un tampon Tris avec 2.94 g/L de sodium citrate et 0.05 % de Tween20, à pH 6, à 91°C, pendant 30 minutes avant l'immunofluorescence. Les étapes subséquentes étaient les mêmes qu'une immunofluorescence sur coupes congelées. Toutes les photos ont été prises avec une caméra AxioCam HRm. (Zeiss, Toronto, ON, Canada) en épifluorescence.

2.4.3 Les immunofluorescences sur lamelles de verre

Afin de caractériser les cellules employées pour la création des substituts urétraux, elles ont été préalablementensemencées sur des lamelles de verre. Cette analyse nous permet d'estimer leur pureté, le phénotype de chaque population, ainsi que de voir les différences entre les mêmes types cellulaires d'individus différents. La caractérisation des cellules sur lamelles de verre emploie les mêmes anticorps que ceux utilisés sur coupes minces. Les cellules mésenchymateuses, à une confluence d'environ 50 à 80%, ont été rincées au PBS supplémenté avec du CaCl₂ et fixées dans le

méthanol 100 % pendant 10 min à -20 °C. Une période de 30 minutes d'incubation dans une solution de PBS-3 % BSA-0.3 % triton est nécessaire avant l'incubation avec les anticorps primaires (

Tableau 3) et secondaires. Les anticorps secondaires utilisés sont couplés avec le fluorochrome Alexa 594 et les noyaux ont été marqués avec un intercalant de l'ADN, le Hoechst (Sigma). Le microscope et la caméra utilisée pour prendre les clichés sont les mêmes que pour les immunofluorescences standards sur coupes minces.

2.5 Les tests mécaniques

Tous les tests mécaniques sont effectués à l'aide d'un appareil appelé Instron E1000 (Norwood, MA, USA) (Figure 8E) possédant une cellule de charge de ± 50 N et toutes les données furent traitées par le programme d'analyse Matlab. Deux tests différents sont proposés afin de déterminer les différentes caractéristiques mécaniques des substituts urétraux (Figure 8A) : des tests de tractions sur anneaux et des tests de rétention de suture. Le nombre de substituts urétraux testés pour chacun des types de construction est résumé dans le

Tableau 4. Les cellules utilisées proviennent de lapins différents selon les cas (N= 1 à 3). Cependant, pour les temps de maturation de cinq et sept semaines, un ou deux substituts seulement ont été testés.

	3 semaines	5 semaines	7 semaines
fd	5 N=3	2 N=2	1 N=1
Mix	6 N=2	1 N=1	1 N=1

Tableau 4 : Nombres de substituts urétraux testés lors des essais mécaniques.

fd : fibroblastes dermiques. Mix : Fibroblastes dermiques et vésicaux mélangés. N : Nombre d'individus différents d'où proviennent les cellules utilisées. Le nombre de semaines correspond à la durée de maturation sur le mandrin avant d'être analysés.

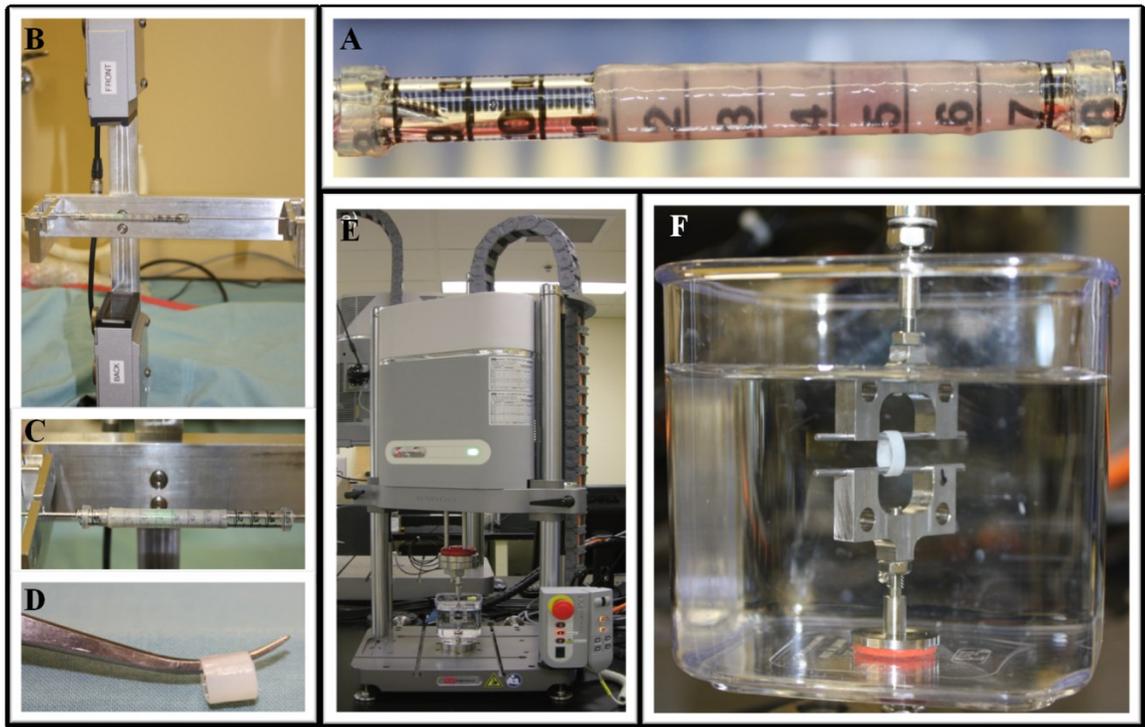


Figure 8 : Tests mécaniques effectués sur les substituts urétraux pré-implantation.

A) Substitut avant les tests sur le mandrin initial. B-C) Substitut urétral installé sur le montage pour la prise de mesure de l'épaisseur. D) Anneau de tissu qui sera installé sur les crochets métalliques de l'appareil de traction. E) Appareil pour effectuer les tests mécaniques de traction et de rétention de suture. F) Montage réalisé pour les tests de traction sur un échantillon de substitut urétral. Modifiées de Laterreur, V. et al. (2014)

Les essais de traction (Figure 8F) consistent à installer un anneau de tissu (Figure 8D) d'environ 5 à 6 mm de large, sur deux crochets qui se séparent à une vitesse de 0.2 mm/s, jusqu'à la rupture du tissu. Un pré-conditionnement de 20 % a été appliqué sur les anneaux, afin de diminuer la variabilité entre les propriétés mécaniques mesurées pour chacune des constructions. Les données recueillies lors du test de traction sont la force à la rupture (N) et le déplacement des tiges, ce qui correspond à la variation de circonférence de l'anneau. À partir de ces données, il est possible de calculer l'élasticité du tissu reconstruit, son pourcentage de déformation et sa pression d'éclatement. Pour chacun des échantillons testés, 3 anneaux ont été prélevés.

La pression d'éclatement des différentes constructions a été estimée grâce à la loi de Laplace, représentée par les formules de la Figure 9 décrit par Laterreur et al.. (Laterreur et al. 2014) Selon cette étude, afin d'estimer correctement la pression d'éclatement d'un biomatériau grâce à la loi de Laplace, il est important de tenir compte du diamètre de l'anneau à la rupture de celui-ci, plutôt que le diamètre interne au repos.

$$P = \frac{F}{L_0 D_i}$$

Figure 9 : Formule de l'estimation de la pression d'éclatement (P).

F = Force maximale atteinte à la rupture de l'anneau en N. Lo = Largeur de l'anneau de tissu. Di =Diamètre de l'anneau à la rupture. Modifié de Laterreur, V. et al. (2014)

L'épaisseur du tissu a été mesurée par un micromètre digital de haute précision, représenté dans la Figure 8 B-C). L'épaisseur finale du tissu est une soustraction de la moyenne de six mesures prises avec le tissu sur le mandrin et de la moyenne de six autres mesures du mandrin seul, divisé par deux. Les données concernant les épaisseurs de chaque tissu permettent de les comparer entre eux et d'éventuellement soulever certaines hypothèses lors de résultats inattendus.

Les essais de rétention de suture furent effectués à partir d'une portion du tube où trois fils de suture sont installés suivant le schéma de la Figure 10. Les trois fils sont équidistants et insérés dans le tissu à 2 mm de l'extrémité du tube. L'appareil tire sur chacun des fils successivement à une vitesse de 2 mm/sec. Le substitut est retenu sur le mandrin à l'aide d'un collet de serrage.

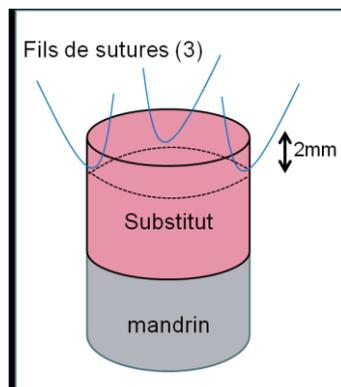


Figure 10 : Représentation schématique des tests de rétention de suture.

2.6 Les chirurgies de reconstruction sur le lapin

Des chirurgies de reconstruction ont été pratiquées sur quatre lapins New-Zealand avec un poids moyen de 2.69 ± 0.05 kg. Toutes les manipulations étaient régies par un protocole approuvé par le comité de protection des animaux de l'Université Laval. Les conditions d'hébergements furent contrôlées de façon stricte, la température est tenue à 18°C et le taux d'humidité à environ 40 %. Les cycles diurnes/nocturnes étaient de 12 hrs / 12hrs. Le temps d'adaptation des lapins avant la chirurgie fut de 7 jours.

Ces chirurgies constituent une preuve de concept et servent à évaluer les embuches à prévoir lors de tests à plus long terme, c'est pourquoi il n'y a que quatre lapins. Deux lapins ont reçu un greffon produit par des cellules mésenchymateuses dermiques et vésicales mélangés 1:1, tandis que deux autres ont été greffés avec des tissus formés par des fibroblastes dermiques seulement. Tous les lapins ont subi une urétrectomie circonférentielle de 1 cm et le segment fut remplacé par un substitut tubulaire reconstruit de 1.5 cm, afin de contrer une éventuelle contraction longitudinale (

Figure 11A-B). Tous les animaux étaient sous anesthésie générale, fait avec de la kétamine 30mg/kg et du Midazolam 0.3 mg/kg par des injections sous-cutanées. Une fois le substitut mis en place grâce au cathéter (10 Fr) (

Figure 11C), le chirurgien pratiquait les anastomoses distale et proximale respectivement, à l'aide de fils Maxon 7-0. (

Figure 11 D). Le fourreau du pénis était ensuite refermé avec un fil de Vicryl rapide 5-0. (

Figure 11E). Tous les fils sont résorbables et aucune intervention subséquente ne fut nécessaire. Tous les sujets ont reçu une dose d'antibiotique en prophylaxie au moment de l'opération. Un antidouleur, le Maloxicam, a été administré pré-opération à une concentration de 0.3 mg/kg, pour trois jours suivant l'intervention à une concentration de 0.2 mg/kg, puis pour les cinq jours subséquents à 0.1 mg/kg. Un collet Élisabéthain a été utilisé pour empêcher les animaux de se lécher et de retirer le cathéter intra-vésical qui resta en place de 5 à 10 jours selon la tolérance et la condition physique de l'animal. (Voir chapitre Chapitre 3) Des cystoscopies (7 ou 9 FR) ont été pratiquées après trois et sept semaines postopératoires, afin de détecter les éventuelles sténoses et de pouvoir sacrifier l'animal avant qu'il y ait une fermeture complète de l'urètre. Les animaux furent

anesthésiés avec 1 mg/kg d'Acépromazine avant l'intervention et l'anesthésie a été maintenue avec un masque à l'isoflurane 2-3 %.

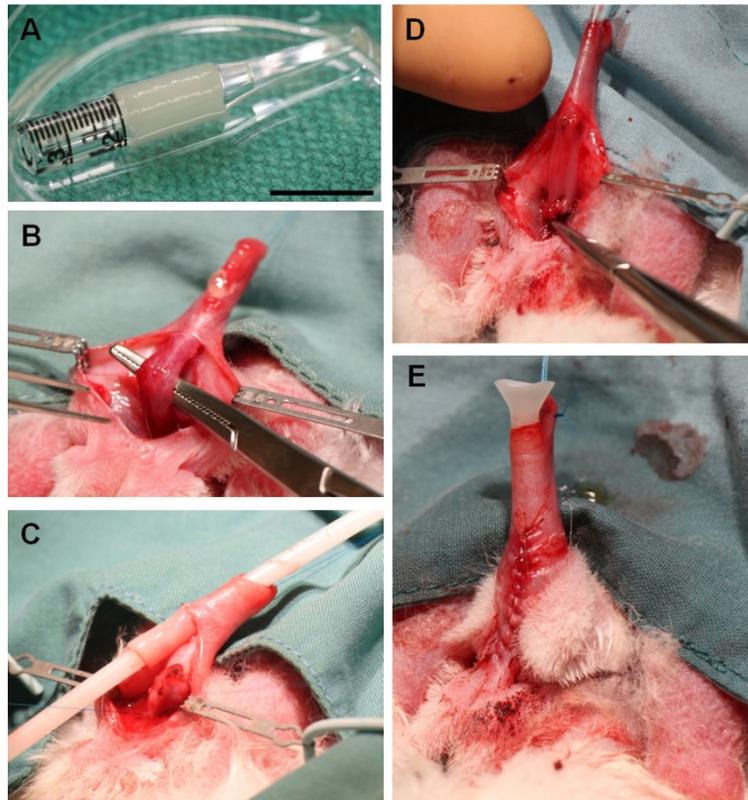


Figure 11 : Chirurgie de reconstruction urétrale chez le lapin.

A) Substitut urétral de 1.5 cm. B) Section de 1 cm de long d'urètre natif résectuée. C) Mise en place du greffon à l'aide du cathéter. D) Anastomoses distales et proximales entre le greffon et l'urètre natif. E) Suture du fourreau par dessus le greffon.

2.7 Les analyses statistiques

Les résultats des tests de dosage des collagènes ainsi que les tests de résistance mécaniques ont été analysés avec le logiciel GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc, La Jolla CA, USA). Des tests d'analyse de variance de type ANOVA ont été fait sur les résultats exprimés en moyenne \pm SEM. Ensuite, des post-tests de Tukey ont été utilisés, afin de déterminer les conditions significativement différentes lorsque 2 conditions ou plus étaient comparées. Les valeurs de significativité étaient les suivantes : $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) et $p < 0.001$ (***)

Chapitre 3 : Résultats

3.1 L'optimisation des conditions de culture des cellules mésenchymateuses de lapin pour la production de MEC

Le premier objectif de ce mémoire était de trouver les conditions de culture optimales pour augmenter l'épaisseur des feuillets de MEC produits par les fibroblastes vésicaux et dermiques de lapin afin de rendre les tissus manipulables. Plus précisément, deux méthodes de dosage du collagène ont été utilisées afin de connaître les effets de divers additifs sur la dépôt du collagène dans les tissus reconstruits. C'est donc à partir des mêmes tissus que le collagène a été dosé par la coloration des fibres au *Sirius Red* et que l'hydroxyproline a été dosée par la coloration avec le DMAB. Les trois additifs testés étaient le LPA (5 et 10 μM), l'adénosine (50, 100 et 200 μM) et l'œstrogène (5, 10 et 20 ng/ml) comme décrit dans la section de la méthode au chapitre 2.3. Toutes les conditions comprenaient trois tissus (n=3) et trois populations cellulaires (N=3). De plus, pour chacune des conditions, des feuillets dermiques et mix étaient comparés. Des tests ont été effectués pour s'assurer que les additifs n'augmentaient pas la prolifération cellulaire dans nos tissus. Nous désirons plutôt doser la variation de collagène en fonction d'une aire de tissu donnée, ce qui permet d'éviter le plus de biais possible. Un dosage de l'ADN a donc permis de calculer le nombre de cellules par échantillon et d'ainsi constater qu'il n'y avait pas un nombre plus élevé de cellules dans les échantillons par rapport au contrôle sans additif. (Figure 12) Surprenamment, les traitements avec les additifs provoquent même, à quelques reprises, l'effet contraire et diminuent (< 20%) la quantité de cellules dans les tissus pour une aire donnée, surtout pour les conditions mix.

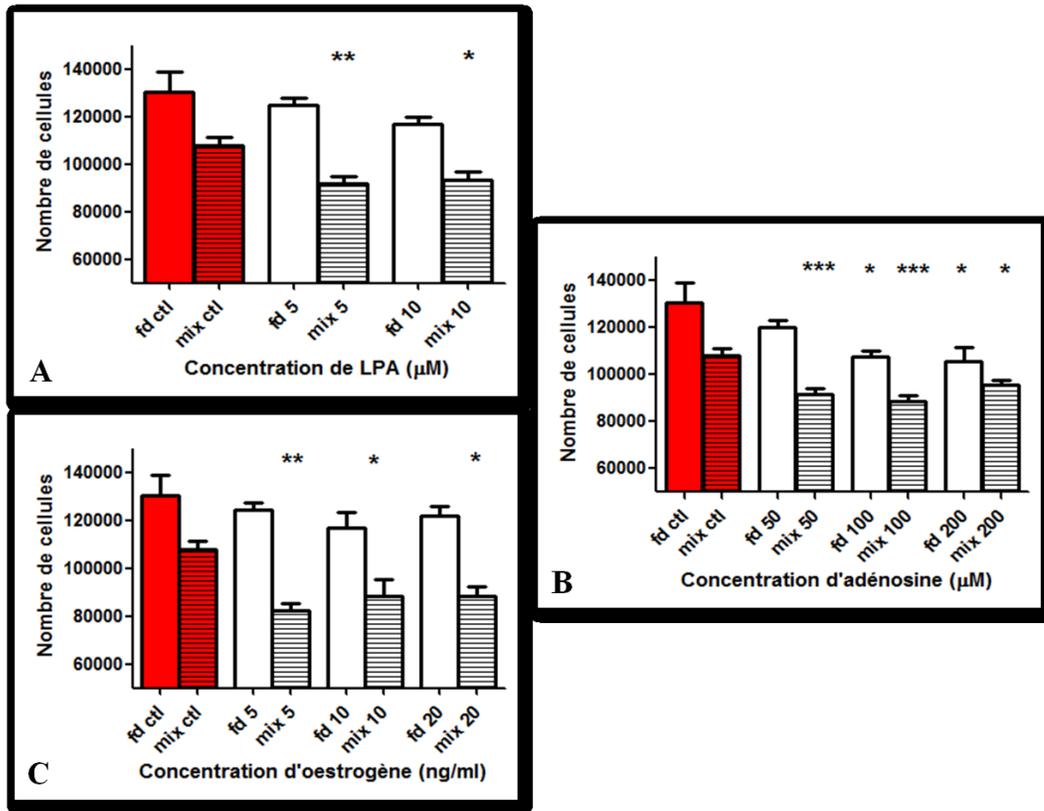


Figure 12 : Quantification des cellules présentes dans les échantillons selon les additifs utilisés.

A) Tissus cultivés avec le LPA aux concentrations de 5 et 10 µM. B) Tissus cultivés avec l'adénosine aux concentrations de 50, 100 et 200 µM. C) Tissus cultivés avec l'oestrogène aux concentrations de 5, 10 et 20 ng/ml. fd : Fibroblastes dermiques. mix : Fibroblastes dermiques et vésicaux mélangés (1:1). Ctl : milieu DH complet sans additif. N = 3 populations cellulaires, n = 3 tissus par conditions (*p < 0.05, **p < 0.01 ***p < 0.001)

3.1.1 La coloration au *Sirius Red*

Le dosage du collagène par la coloration au *Sirius Red*, une méthode qui dose seulement des fibrilles de collagène qui ne sont pas fortement assemblées, donne des résultats quelque peu décevants. En effet, l'augmentation attendue de collagène déposé dans les tissus cultivés avec le LPA et l'adénosine n'a été pas observée, tel que le démontre la Figure 13. Pour le LPA, on observe même une baisse significative du collagène dosé par rapport au contrôle, lorsque les cellules étaient en présence de 5 µM. (Figure 13 A) Néanmoins, pour la concentration plus élevée de 10 µM, une hausse significative de la quantité de collagène était perçue, mais seulement pour la condition qui contenait des cellules dermiques et vésicales mélangées (mix). Un phénomène contraire aux attentes est aussi observé dans le dosage du collagène des tissus reconstruits en présence d'adénosine et ce,

pour toutes les concentrations et de façon inversement proportionnelle à l'augmentation de la concentration utilisée. (Figure 13 B) Plus la concentration d'adénosine ajoutée était grande, moins il y avait de collagène doser par cette méthode. Pour ce qui est des conditions de culture où on avait ajouté de l'œstrogène, les résultats étaient davantage encourageants. (Figure 13C) En effet, il y avait une augmentation significative de la quantité de fibrilles de collagène dosée pour toutes les concentrations, lorsqu'utilisées avec les mix. Seulement la concentration de 5 ng/ml d'œstrogène engendrait une augmentation significative du dépôt de fibrilles de collagène faiblement assemblées dans les cultures de fibroblastes dermiques de lapin. En général, il n'y avait pas de différence importante entre la quantité de collagène dans les échantillons fd et mix. Par contre, si l'on tient compte de la quantité de cellules dosée dans chaque condition, la quantité de collagène faiblement assemblée dans les conditions mix serait un peu plus grande que celle retrouvée dans les tissus de fd. À la lumière des résultats obtenus par le dosage du collagène par la coloration au *Sirius Red*, les additifs suivant devraient être utilisés pour la culture des cellules mésenchymateuses de lapin : 10 μ M de LPA et 5 ng/ml d'œstrogène.

3.1.2 Le dosage de l'hydroxyproline

Lorsque l'on regarde les résultats du dosage de l'hydroxyproline, on ne retrouve pas le même patron de variation du collagène dosé qu'avec la première méthode de dosage mais encore une fois, l'augmentation de collagène dans les tissus reconstruits n'est pas à la hauteur de nos attentes. Il n'y a pas de hausse significative de la quantité d'hydroxyproline dans les conditions où l'on a cultivé les cellules avec du LPA et de l'adénosine. (Figure 13D, E) Néanmoins, il y a une plus grande quantité de collagène dans les tissus construits mix, en présence d'œstrogène et ce, pour toutes les concentrations. Seulement la concentration de 20 ng/ml d'œstrogène permet une augmentation significative du collagène déposé dans les tissus reconstruits avec les fibroblastes dermiques. Il est intéressant de constater que la quantité d'hydroxyproline, donc de collagène, était toujours beaucoup plus élevée dans les feuillets mix que dans les feuillets fd. Si l'on se rapporte aux résultats du nombre de cellules par tissu (Figure 12), cet écart était encore plus important, car il y avait davantage de cellules dans les feuillets de fd qu'il y en avait dans les mix. On remarque donc le même phénomène que dans les dosages par la coloration au *Sirius Red*. En tenant compte de tous ces résultats, seul l'œstrogène à 20 ng/ml serait choisi pour la production des feuillets de cellules mésenchymateuses de lapin.

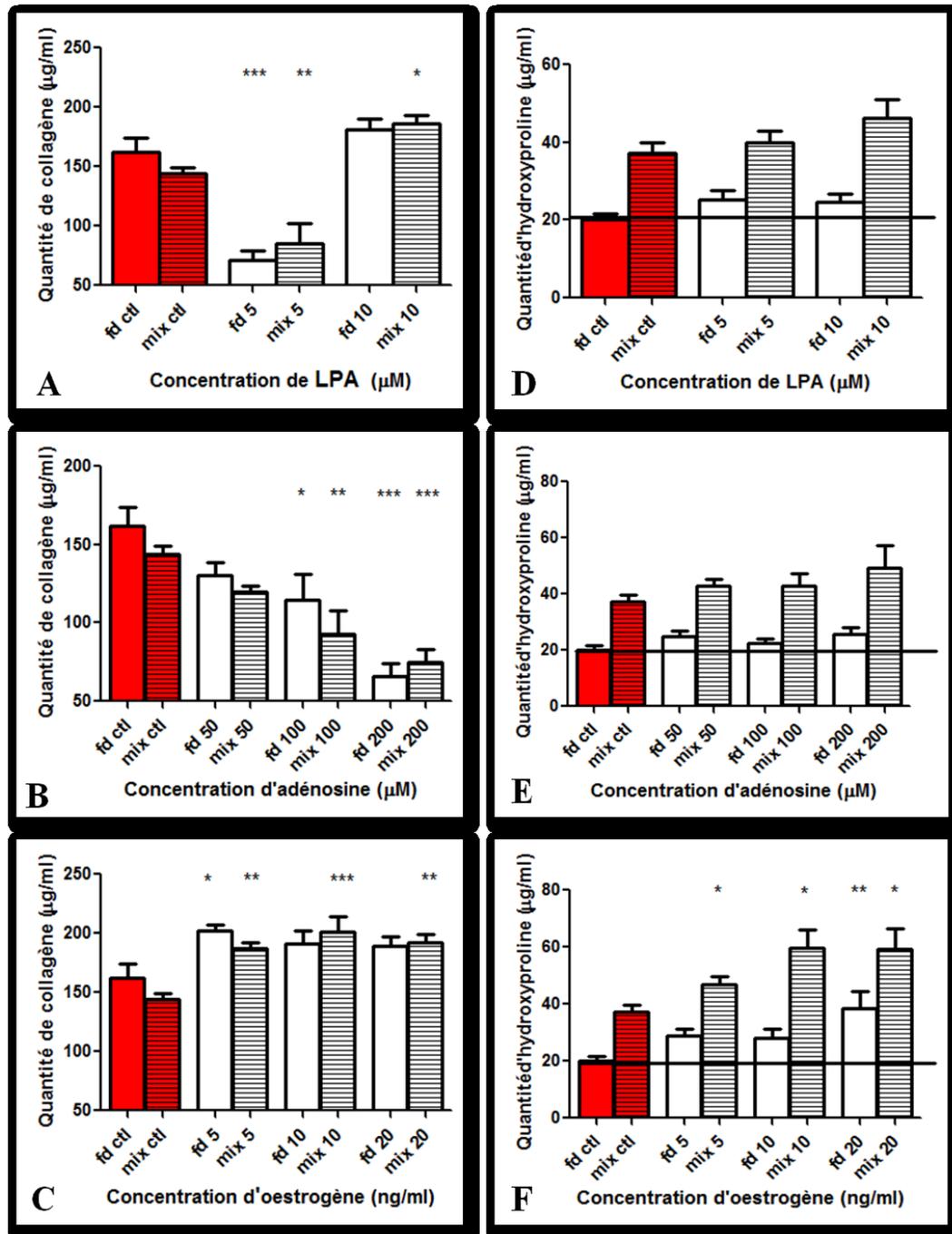


Figure 13 : Dosage, par la coloration au *Sirius Red* et de l'hydroxyproline, du collagène déposé selon les additifs ajoutés pour la culture de tissus de lapin reconstruits.

A, D) Tissus cultivés avec le LPA aux concentrations de 5 et 10 µM. B, E) Tissus cultivés avec l'adénosine aux concentrations de 50, 100 et 200 µM. C, F) Tissus cultivés avec l'oestrogène aux concentrations de 5, 10 et 20 ng/ml. fd : Fibroblastes dermiques. mix : Fibroblastes dermiques et vésicaux mélangés. Ctl : milieu DH complet sans additifs. N = 3 populations cellulaires, n = 3 tissus par conditions (*p < 0.05, **p < 0.01 ***p < 0.001)

3.2 L'optimisation de la méthode d'auto-assemblage pour les cellules de lapin

3.2.1 Rendre le modèle spécifique à l'organe ciblé

Dans la méthode standard de production de substituts urétraux humains, ceux-ci sont constitués uniquement de cellules mésenchymateuses extraites de derme. Étant donné que des fibroblastes et des cellules musculaires lisses de vessie ont été ajoutés au modèle, il est donc important de comparer les cellules extraites de dermes et de vessies de lapin. Cela permettra de constater les possibles différences morphologiques entre les deux. Les cellules caractérisées dans les Figure 14 et Figure 15 sont les mêmes qui ont été utilisées pour la construction des substituts urétraux greffés et analysés dans le présent mémoire. Une grande proportion des fibroblastes dermiques des lapins 26 et 27 expriment probablement aussi l' α -SMA, mais un problème technique est survenu lors de l'immunofluorescence.

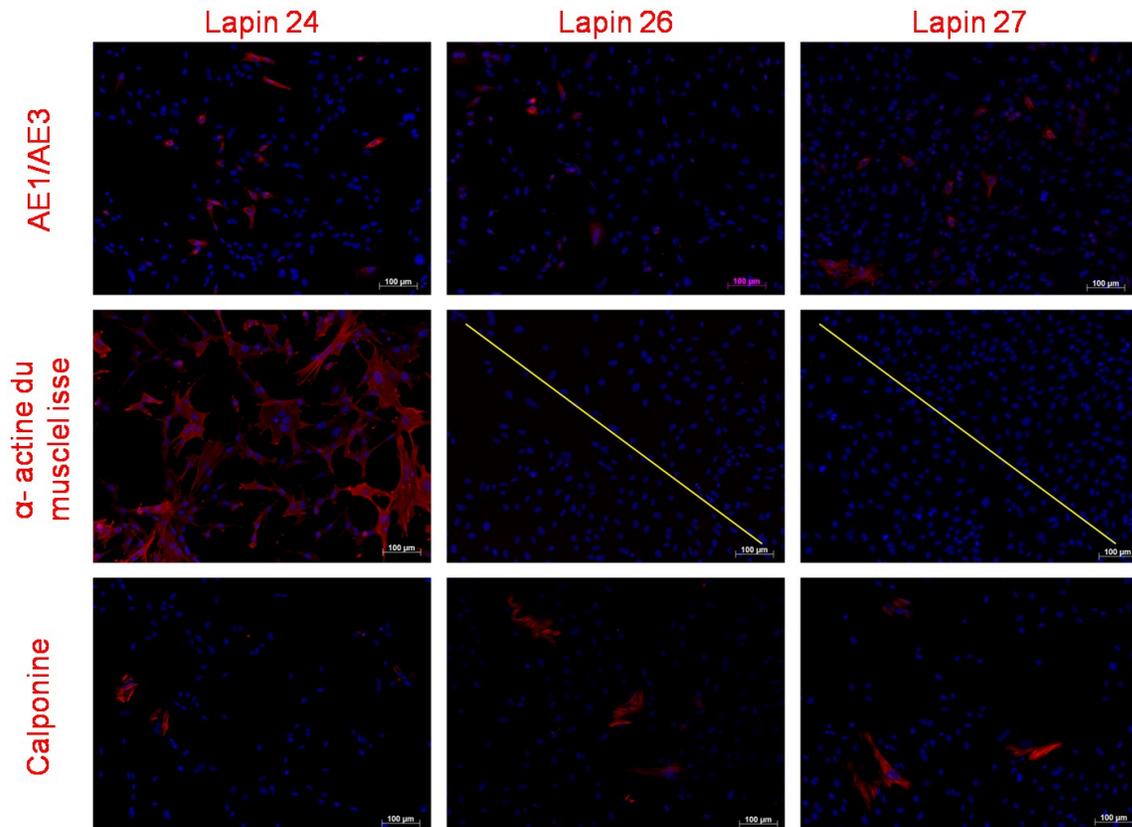


Figure 14 : Caractérisation des cellules mésenchymateuses dermiques.

Immunofluorescences dirigées contre les cytokératines (AE1/AE3), l' α -SMA et la calponine sur les cellules mésenchymateuses extraites de dermes de peau de lapins.

Ce qui est mis en évidence par les immunofluorescences est que les cellules mésenchymateuses d'origines vésicale et dermique avaient des phénotypes relativement semblables. (Figure 14, Figure 15) Celles-ci exprimaient l' α -SMA dans des proportions élevées et similaires. Certaines de ces cellules exprimaient aussi la calponine, un marqueur de CML, mais seulement pour un faible pourcentage de celles-ci. De plus, la pureté des 2 populations cellulaires a pu être vérifiée grâce à des immunofluorescences dirigées contre les cytokératines (AE1/AE3) qui identifiaient les cellules épithéliales qui contaminaient les populations de cellules mésenchymateuses. Il y avait environ 10 % de cellules épithéliales, autant dans les cellules dermiques (kératinocytes) que vésicales (urothéliales). Ce pourcentage est une approximation en regard de la quantité totale de noyaux observés sur les images des Figure 14 et Figure 15. Comme les cellules mésenchymateuses issues des différents organes ne montrent pas un phénotype différent, les substituer dans le modèle ne devrait pas apporter de changements négatifs. Pour vérifier cette hypothèse, des constructions créées à partir des deux populations seront comparées tout au long des analyses des substituts urétraux lagomorphes.

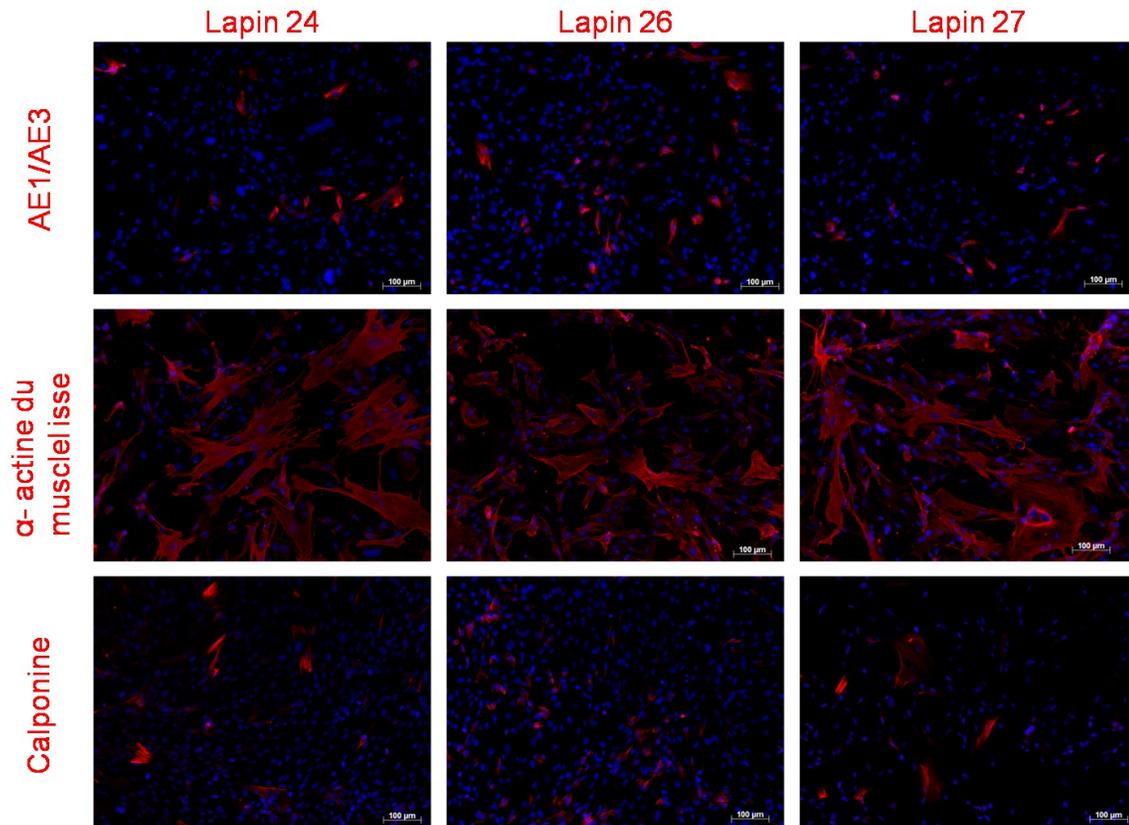


Figure 15 : Caractérisation des cellules mésenchymateuses de stroma vésical.

Immunofluorescences dirigées contre les cytokératines (AE1/AE3), l' α -SMA et la calponine sur les cellules mésenchymateuses extraites de stromas vésicaux de vessie de lapin.

3.2.2 L'amélioration de la fusion des feuillets et préservation de la longueur des substituts urétraux

3.2.2.1 Le choix du sérum

Comme il a déjà été mentionné, les conditions de culture utilisées pour la production des substituts urétraux ont auparavant été optimisées pour les cellules humaines. Ces conditions de culture ont donc été modifiées, afin de résoudre certains problèmes rencontrés lors de la production des feuillets composés de cellules de lapin. L'une de ces embuches majeures apparaissait lors de la phase de maturation des substituts de lapin sur les mandrins. À ce moment là, les couches du feuillet avaient de la difficulté à fusionner les unes avec les autres lorsque l'on utilisait du milieu supplémenté de 10 % de sérum veau fœtal (SVF; Life technologies, Burlington, ON, Canada), condition standard pour les substituts humains. Le tissu de lapin était plus glissant et étant donné qu'il y avait une moins bonne tension lors du roulage, le feuillet de fibroblastes ne fusionnait pas

assez rapidement sur lui-même. Par la suite, du milieu venait se loger entre les différentes couches, créant des tubes qui manquaient de tenue comme l'illustre la Figure 16 A. De plus, on remarque que la frange finale de tissu se fusionnait difficilement avec le reste de la construction tubulaire en présence de 10 % de SVF. (Figure 16 B) Ayant d'autres sérums à portée de main, les constructions à base de cellules de lapin ont donc été maturées dans un milieu à 10 % de sérum H, un sérum de type SVF, d'une autre compagnie. (Figure 16 C) Malheureusement, les tissus ont abondamment contracté en longueur sur le mandrin ce qui réduisait considérablement la quantité de tissu utilisable pour les greffes. La troisième condition testée pour la maturation des substituts était un mélange de 5 % de BGS et 5 % de sérum H. Dans ces conditions, les constructions étaient davantage uniformes, restaient d'une longueur appréciable et les différentes couches fusionnaient beaucoup mieux entre elles.

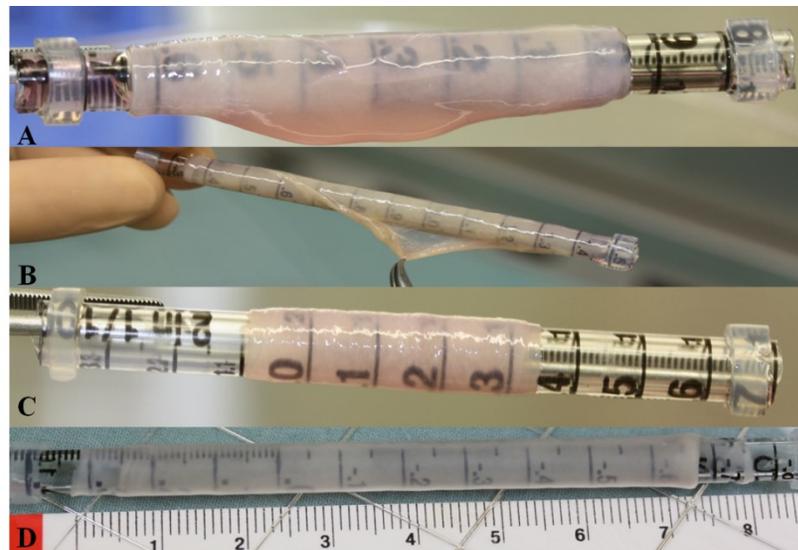


Figure 16 : Substituts urétraux selon le sérum utilisé pour une période de maturation de 3 semaines.

A-B) SVF. C) H. D) 5% BGS +5% H. Toutes les constructions étaient cultivées dans du milieu DMEM-Ham complet

Le graphique de la Figure 17 démontre bien l'impact des différents sérums sur la longueur des substituts selon le nombre de jours de maturation. Il est important de noter que pour les conditions avec les sérums H et SVF, les courbes du graphique étaient dessinées à partir des longueurs initiales et finales (après 41 jours de culture) et ce, pour un seul spécimen par condition (tests préliminaires). Néanmoins, toutes les constructions montraient une contraction importante sur le sens de la longueur avec 10 % de SVF ou 10 % de H. Pour ce qui est des conditions où 5 % de BGS et 5 % de

sérum H étaient mélangés, le nombre de spécimens de départ était de 12 pour les fd et de 8 pour les mix, puis leur nombre diminuait avec le temps suite au sacrifice des semaines précédentes, de sorte que le n après 47 jours était de un pour chaque condition. En définitive, on a remarqué une nette amélioration au niveau de la contraction, qui était plus ou moins importante selon les spécimens.

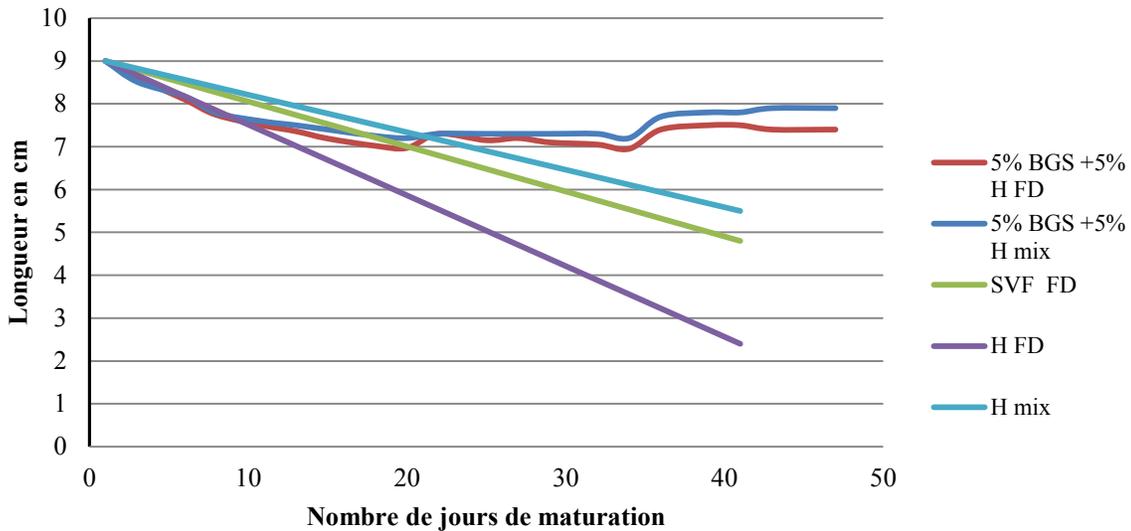


Figure 17 : Graphique de la longueur des substituts urétraux selon le temps de maturation en fonction des différents types de sérum.

Le pourcentage de sérum total de chaque condition est de 10% dans un milieu DMEM-Ham complet.

Finalement, pour une meilleure fusion des feuillets et pour une longueur finale de tube la plus longue possible, la condition qui a été préconisée pour la culture était celle où l'on supplémentait le DMEM-Ham avec 5 % de BGS et 5 % de sérum H. Les substituts urétraux greffés ont donc été maturés avec ce mélange de sérum. Il importait ensuite de déterminer pendant combien de temps cette étape de maturation devait durer, afin que la fusion des feuillets de lapin soit optimale.

3.2.2.2 La modification du temps de maturation des tubes reconstruits

Afin d'améliorer encore d'avantage la fusion des différentes couches de tissu reconstruit qui composaient les substituts urétraux, une autre avenue avait été explorée, celle d'augmenter le temps de maturation des substituts sur les mandrins. Notre hypothèse était que si les tubes étaient mieux fusionnés, leur résistance mécanique serait améliorée. Des tests mécaniques ont donc été effectués sur des constructions de lapin, maturées pendant trois, cinq ou sept semaines dans un milieu

DMEM-Ham complet supplémenté de 5 % de BGS et 5 % de sérum H, d'adénosine 100 μ M et d'acide ascorbique 50 μ g/ml. Encore une fois, des tubes construits avec des fd et des mix ont été comparés. Les statistiques étaient calculées par rapport à la condition correspondante à trois semaines de maturation. Les tests de rétention de suture indiquaient qu'en général, les constructions mix possédaient une meilleure capacité à être suturées que les fd. (Figure 18 A) De plus, les mix obtenaient une amélioration significative de leur capacité de rétention des sutures après cinq et sept semaines de maturation comparés aux mix à trois semaines, tandis que les constructions de fibroblastes dermiques étaient significativement plus résistantes après sept semaines qu'à trois semaines.

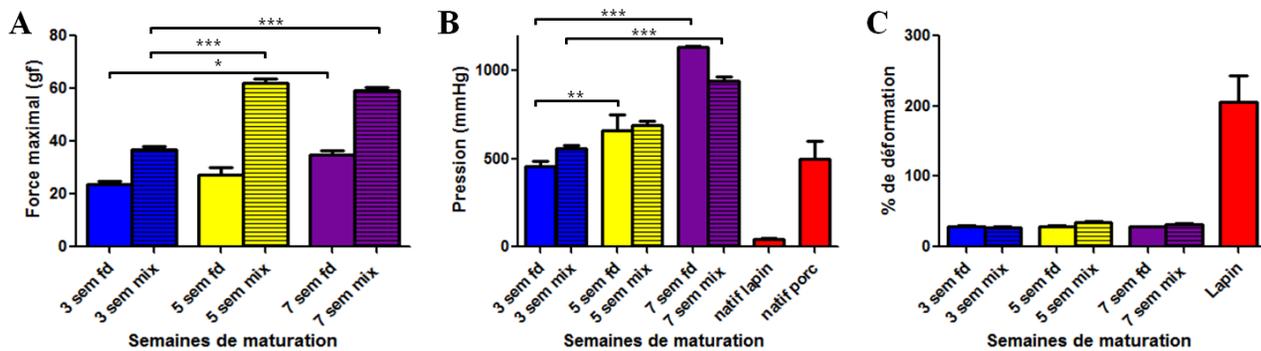


Figure 18 : Caractérisation de la résistance mécanique des substituts urétraux reconstruits pré-implantation, selon le type de reconstruction et du nombre de semaines de maturation.

A) Capacité de rétention de suture des tissus en g/force. B) Pression d'éclatement estimée en mmHg. C) Pourcentage de déformation. fd : Fibroblastes dermiques. mix : Fibroblastes dermiques et vésicaux mélangés. Les contrôles pour les tests statistiques sont les conditions respectives à trois semaines de maturation. (* $p < 0.05$)

Le graphique qui représente la pression d'éclatement en fonction du nombre de semaine de maturation des substituts démontre qu'encore une fois, plus les constructions tissulaires étaient mûrées longtemps, plus elles étaient mécaniquement résistantes. (Figure 18 B) Effectivement, la pression d'éclatement interne tolérée par les substituts de la condition fd augmentait significativement entre trois et cinq semaines, puis encore entre cinq et sept semaines de maturation pour atteindre un maximum de $1135,9 \pm 6,9$ mmHg. L'augmentation de la pression d'éclatement tolérée par les substituts mix était significative entre trois et sept semaines pour un maximum de $944,83 \pm 34,06$ mmHg. Si l'allongement du temps de maturation augmentait la force mécanique tolérée par le tissu, elle ne modifiait pas le pourcentage de déformation de celui-ci. Bien que plus

rigides que l'urètre natif de lapin, nos substituts conservaient un pourcentage de déformation très similaire au fil du temps. (Figure 18 C)

À partir des résultats de ces tests mécaniques, on ne peut pas conclure que les cellules mésenchymateuses de vessie de lapin produisent des tissus plus forts que les fibroblastes dermiques seuls, puisque c'est seulement au test de suture que les mix sont significativement plus fort que les fd. Par contre, l'ajout de fibroblastes de vessie dans le modèle n'affectait pas négativement les propriétés mécaniques des constructions finales.

Ces tests mécaniques démontraient que plus le tissu était soumis à une grande période de maturation, plus il est fort mécaniquement. Une coloration au trichrome de Masson de coupes paraffinées des substituts urétraux a permis de déterminer si oui ou non ces tissus étaient mieux fusionnés au fil du temps.

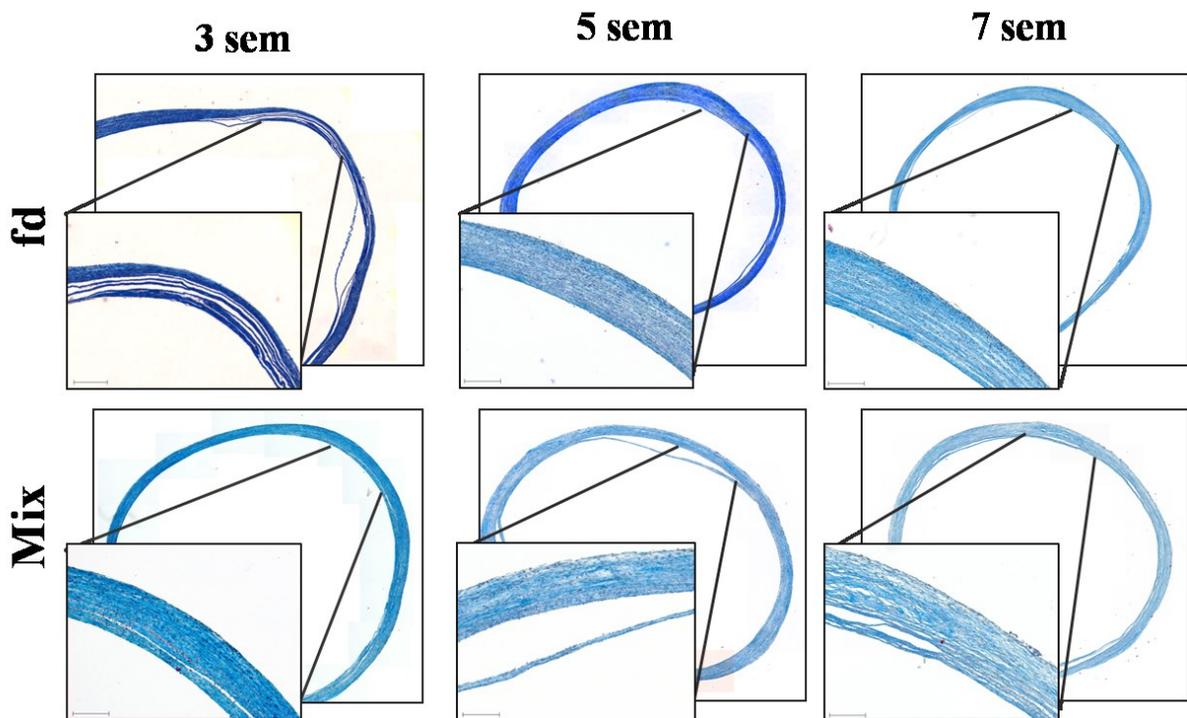


Figure 19 : Représentation sous forme de mosaïque des substituts urétraux après 3, 5 et 7 semaines de maturation sur mandrin, pour les 2 types de constructions.

Les grandes images sont des mosaïques de photos prises à 5X, tandis que les encadrés représentent des agrandissements du tissu. Encadré : Image des substituts à 5X, barre de mesure = 200µm. fd : fibroblastes dermiques. mix : fibroblastes dermiques et vésicaux mélangés.

C'est donc les mêmes tubes que ceux utilisés pour les tests mécaniques qui sont présentés à la Figure 19, après trois, cinq et sept semaines de maturation sur mandrin. Ces tissus ont été préalablement inclus dans la paraffine puis coupés et colorés avec un trichrome de Masson, afin qu'on puisse apprécier l'organisation générale de la matrice. On remarque qu'à 3 semaines, il y avait clairement une mauvaise fusion des couches tissulaires qui composaient les substituts urétraux dermiques comparativement aux substituts mix, car on y remarque beaucoup d'espaces blancs entre les fibres de collagènes colorées en bleu. Les cellules étaient pour leur part colorées en rose-rouge. Le phénomène de délamination était visiblement moins prononcé dans les tubes mix. Pour les temps de maturation de cinq et sept semaines, les substituts étaient beaucoup plus fusionnés et formaient davantage un tissu homogène qu'à trois semaines, autant pour les fd que pour les mix. (Figure 19) Néanmoins, une mince couche interne semblait ne pas être fusionnée avec le reste de la construction dans les deux cas de figure. À sept semaines de maturation, les feuillets de tissu du substitut urétral composé de fibroblastes dermiques étaient très bien fusionnés, alors qu'on commençait à remarquer, même à faible grossissement, une dégradation de la matrice dans le substitut mix. La Figure 20 présente, à plus fort grossissement, les problèmes associés à une longue maturation des substituts urétraux sur les mandrins.

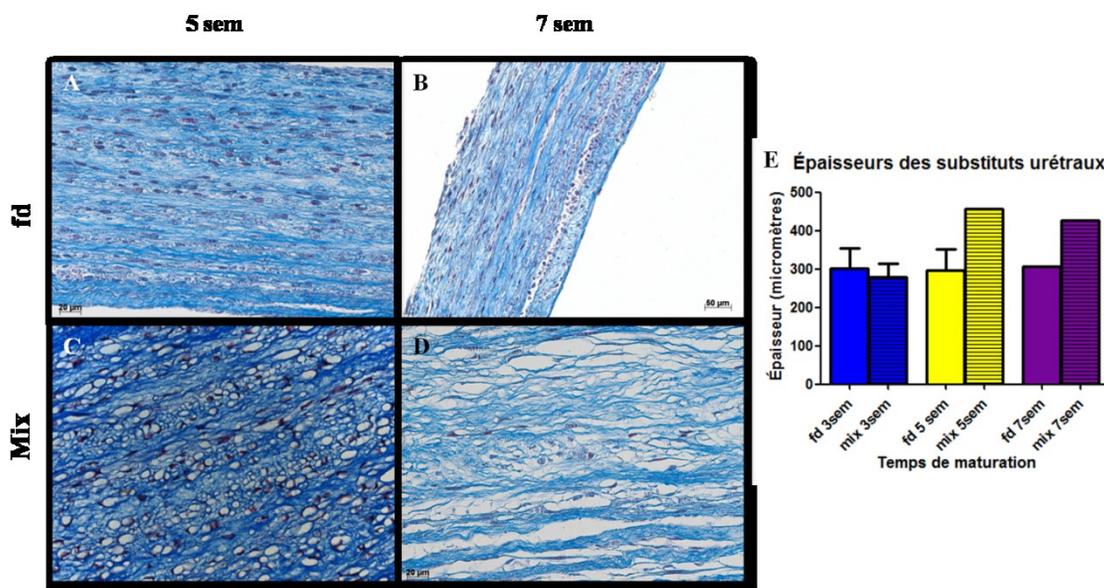


Figure 20 : Problèmes associés à une longue maturation des substituts urétraux sur les mandrins.

A-C) Cinq semaines de maturation. B-D) sept semaines de maturation. E) Épaisseur des substituts en fonction du nombre de semaines de maturation. fd : Fibroblastes dermiques. Mix : Fibroblastes dermiques et vésicaux mélangés.

Dans la partie inférieure du trichrome de Masson à la Figure 20 A, on voit bien que les cellules dans le substitut commençaient à mourir. (Figure 20) En effet, une perte de noyaux, ou plutôt une fragmentation de ceux-ci était visible autant à cinq semaines de maturation, en A, qu'à sept semaines, en B, dans les reconstructions produites par les fibroblastes dermiques. Les tubes fait à partir de cellules mésenchymateuses de vessie et de derme mélangés montraient aussi des signes de mort cellulaire, additionnés à d'autres phénomènes entourant la matrice. En effet, à cinq semaines de maturation (n=1), le tissu avait un aspect très différent avec des vacuoles qui s'étaient formées à l'intérieur de la matrice, localisé davantage autour des noyaux des cellules. Cette dégradation semblait être accentuée après sept semaines de maturation (n=1), en plus d'être accompagnée d'une perte importante de cellules. Les substituts mix étaient donc davantage abimés à cinq et sept semaines que les substituts fd. Il est intéressant de constater que ces mêmes substituts mix étaient aussi ceux qui étaient les plus épais, comme le montre le graphique en E (Figure 20), et aussi les plus résistants. (Figure 18)

Étant donné qu'il a été démontré que des populations de cellules épithéliales étaient mélangées aux cellules mésenchymateuses vésicales et dermiques (Figure 14 et Figure 15), il était possible de retrouver ces mêmes cellules dans les tissus reconstruits. Bien que leur présence ne soit pas souhaitée, la

Figure 21E -F) démontre que même après sept semaines de maturation sur le mandrin, que les cellules épithéliales persistaient dans les tissus. À ce stade, les cellules urothéliales (mix) et les kératinocytes (fd et mix) avaient migrées vers les faces externes des tubes de façon à s'y regrouper, mais elles n'étaient malheureusement pas éliminées au cours du processus. Laisser plus longtemps les tissus en maturation n'éliminait donc pas les cellules épithéliales qu'ils contenaient. Qualitativement, à partir des immunofluorescences réalisées sur les tissus après trois, cinq et sept semaines de maturation, les substituts urétraux reconstruits avec les fibroblastes dermiques seulement semblaient contenir une plus grande quantité de cellules épithéliales que les constructions mixtes. (

Figure 21)

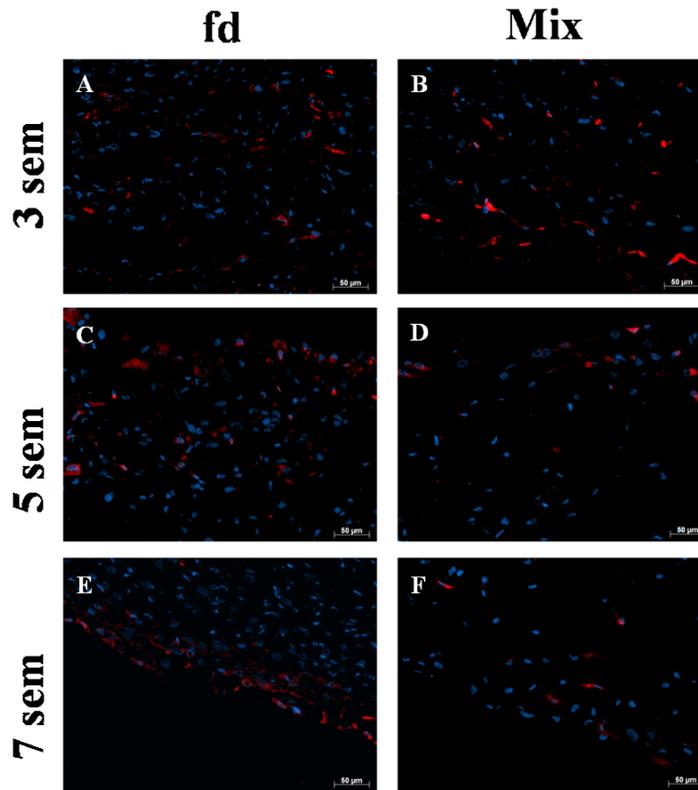


Figure 21 : Persistance des cellules épithéliales dans les substituts reconstruits après trois, cinq et sept semaines de maturation.

fd : Fibroblastes dermiques. Mix : Fibroblastes dermiques et vésicaux mélangés.

À la lumière de ces résultats, il serait pertinent de modifier la méthode d'auto-assemblage standard pour la production de substituts urétraux de lapin de sorte que les tubes aient un temps de maturation sur le mandrin de cinq semaines plutôt que trois. Les constructions seraient davantage résistantes mécaniquement et leurs couches mieux fusionnées. Toutefois, l'épaisseur des tissus devrait, dans ce cas, être révisée, afin d'éviter la perte cellulaire et matricielle. Quoi qu'il en soit, les cellules épithéliales présentes dans les populations de cellules mésenchymateuses devront être retirées avant la culture des feuillets, car elles persistent dans les substituts jusqu'au sacrifice et pourraient être un problème lorsque les substituts urétraux seront implantés. Les cellules urothéliales devront plutôt être ensemencées à l'intérieur des tubes et leur culture *in vitro* doit auparavant être optimisée.

3.2.3 La modification du type de couche nourricière pour la culture des cellules urothéliales

Dans la méthode standard de culture des cellules urothéliales humaines, une couche nourricière de S3T3 murin est souvent utilisée dans la littérature et aussi par notre équipe. Cependant, pour la culture des cellules urothéliales de lapin, cette technique ne donnait pas des résultats aussi productifs qu'ils auraient dû l'être. Une couche nourricière de fibroblastes (fb) dermiques de lapin a donc été utilisée afin d'augmenter le rendement de prolifération des cellules urothéliales de lapin. Après plusieurs tests, il a été démontré qu'une concentration de 6.5×10^3 cellules/cm² fb irradiés était la meilleure condition pour toutes les populations de cellules urothéliales testées. (n=3) (Figure 22) La veille de l'expérience, des flacons de fibroblastes confluents étaient irradiés, puis trypsinés et réensemencés à 6.5×10^3 cellules/cm² dans 20 ml DMEM. Le lendemain, 10 ml de milieu était retirés et 10 ml de DMEM-Ham complet était ajouté avec les cellules urothéliales. La Figure 22 illustre une meilleure croissance des urothéliales de lapin sur les fb de lapins irradiés comparée aux fb murins irradiés et ce, après seulement trois jours de culture. Il est important de mentionner que les substituts urétraux greffés n'avaient pas de cellules urothéliales à l'intérieur, car le projet est très précoce. Néanmoins, il est maintenant possible de cultiver ces cellules efficacement, afin de les ensemenecer dans les substituts dans un avenir rapproché.

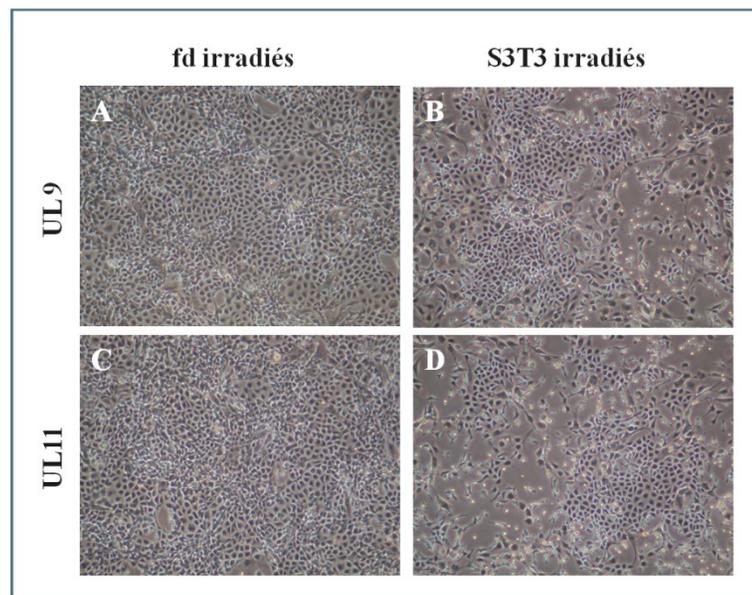


Figure 22 : Utilisation de couche nourricière pour la culture des cellules urothéliales de vessie de lapin.

A-C) Cellules urothéliales en P2 cultivées sur des fibroblastes dermiques de lapin irradiés. B-D) Cellules urothéliales en P2 cultivées avec des fibroblastes de souris irradiés. (S3T3)

3.3 La greffe urétrale complète chez le lapin

3.3.1 La caractérisation microscopique des tubes pré-implantation

Suite à la reconstruction des substituts urétraux par la méthode d'auto-assemblage, il était essentiel de démontrer qu'il était possible de greffer ces tissus chez le lapin. Ces résultats étaient une façon de montrer leur fonctionnalité, ainsi que la faisabilité de la technique de greffe. Avant de commenter les résultats de la greffe proprement dite, voici une caractérisation des tissus reconstruits pré-implantation.

Premièrement, les Figure 23 A et B illustrent une immunofluorescence dirigée contre le collagène de type I qui permet de mieux comprendre le phénomène de délamination des couches de tissus qui survient dans certains spécimens à trois semaines de maturation sur mandrin. Effectivement, les tours de tissu des substituts fd ne sont pas fusionnés, ce qui cause les espaces vides entre les couches où du milieu de culture ou du sang peuvent se loger. (Figure 23 A, C et E) Les greffons mix étaient beaucoup mieux fusionnés au même temps de maturation. (Figure 23, B, D et F) En second lieu, un marquage contre l' α -SMA suggère que les substituts fd contenaient davantage de cellules qui exprimaient l' α -SMA comparés aux substituts mix. Néanmoins, la présence de ces cellules est souhaitable dans ce modèle, afin de recréer *in vivo* des structures de muscles lisses qui composent l'urètre après l'implantation, mais elles peuvent aussi participer au processus de contraction du greffon qui a lieu lors des sténoses urétrales.

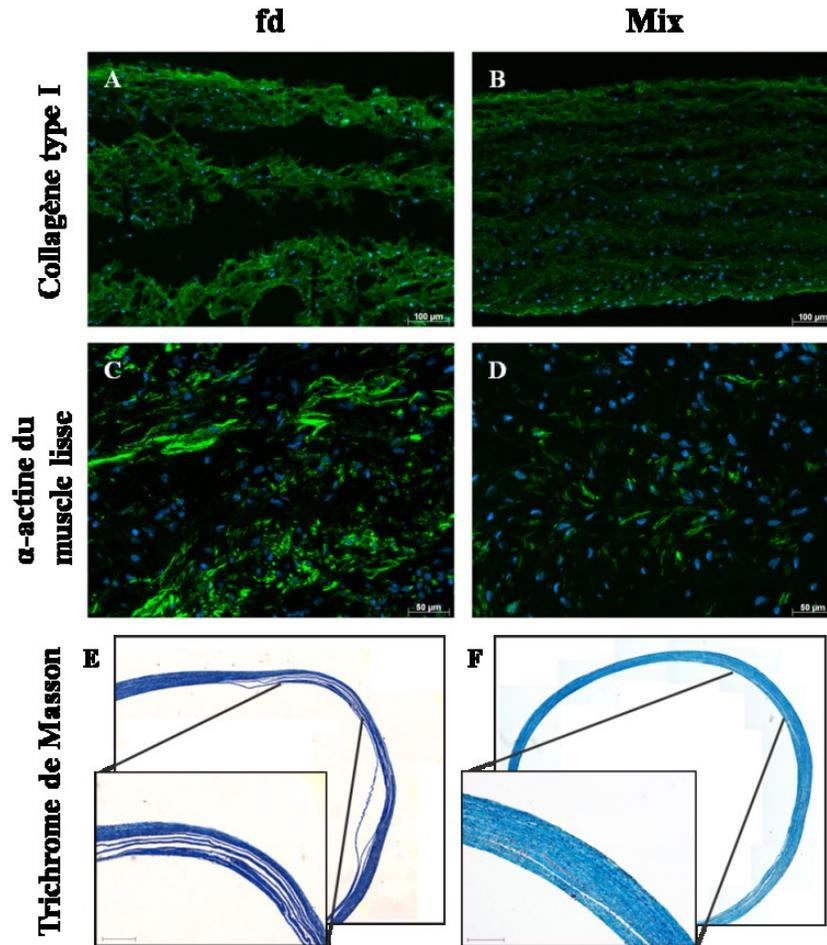


Figure 23 : Caractérisation des substituts urétraux pré-implantation, après 3 semaines de maturation.

A-B) Immunofluorescence contre le collagène de type I. C-D) Immunofluorescence contre l' α -SMA. E-F) Trichrome de Masson. fd : Fibroblastes dermiques. mix : Fibroblastes dermiques et vésicaux mélangés.

3.3.1.1 Les propriétés mécaniques des substituts urétraux greffés

Ayant passé seulement trois semaines en maturation sur les mandrins, les substituts urétraux greffés dans les lapins n'étaient pas les plus résistants mécaniquement comparativement aux substituts qui étaient restés cinq et sept semaines, mais ils étaient toutefois assez résistants pour être suturés par le chirurgien. (Figure 18) Les constructions produites à partir des fibroblastes dermiques atteignaient une pression d'éclatement moyenne de $458,40 \pm 101,62$ mmHg et les mix de $559,18 \pm 73,60$ mmHg, soit environ la moitié de ce qui est tolérée par les substituts après sept semaines de maturation. Les tests de rétention de suture sur ces mêmes constructions donnent des résultats plus faibles que ce à

quo nous nous attendions soit de $23,64 \pm 3,99$ g/f pour les substituts fait de fd et de $36,75 \pm 5,74$ g/f pour les constructions mixtes. On remarque que les substituts des deux catégories ont presque le même pourcentage de déformation qui reste d'ailleurs très constant peu importe le nombre de semaines de maturation à environ $28,82 \pm 2,85$ % pour les fd et $29,16 \pm 3,53$ % pour les mix.

3.3.1.2 Les résultats des greffes sur le lapin et les complications associées

Les greffons produits par la méthode d'auto-assemblage ont donc été greffés à l'urètre de quatre lapins. (Tableau 5) Ces greffes de reconstructions urétrales avaient pour but de remplacer toute la circonférence de l'urètre sur une longueur de 1 cm. Cette longueur d'urètre a été excisée, puis remplacée par un tissu plus long, de 1.5 cm, afin de contrer une éventuelle contraction longitudinale du greffon. La chirurgie a prouvé que nos greffons étaient d'une circonférence et d'une épaisseur adéquate pour ce type de reconstruction et que les dimensions convenaient bien à la grosseur et au poids des lapins utilisés. Les résultats obtenus ne sont pas sans complication, mais ils nous donnent un bon aperçu de la faisabilité de la chirurgie effectuée, ainsi que de notre capacité à la réaliser avec les moyens dont nous disposons.

Les greffes de substituts urétraux nous ont aussi permis de constater que les tissus de lapins reconstruits *in vitro* étaient assez solides pour être manipulés par un chirurgien et surtout d'être suturés aux tissus natifs environnants. Malheureusement, certains tissus reconstruits étaient plus fragiles que d'autres et c'est le cas du substitut composé de fibroblastes dermiques du lapin #1. En effet, comme il est illustré dans la Figure 23, cette reconstruction n'était pas complètement fusionnée et le tissu s'était alors délaminé au moment de procéder aux anastomoses. De plus, le lapin a perdu son cathéter très tôt après la chirurgie. (Tableau 5) Ce sont probablement les causes de la sténose urétrale précoce qui a menée à l'échec de la greffe de ce sujet, puisqu'il a été le seul lapin à décéder prématurément des suites d'une sténose complète de son greffon. Malheureusement, les résultats et les images des tissus péniens du lapin #1, suite à la nécropsie, ne sont pas disponibles, car le traitement de la biopsie s'est mal déroulé. Néanmoins, suite aux résultats des autres sujets, on peut supposer que l'inflammation aurait été davantage importante étant donné le cours lapse de temps entre la chirurgie et le décès spontané du lapin, c'est-à-dire 19 jours. Tous les résultats concernant les sujets greffés sont regroupés dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Résultats et complications des greffes urétrales sur le lapin.

Lapin	Type de substitut	Type de décès	Nombre jrs (semaines) de survie	Raison du décès	Remarques
1	fd	Fortuite	19 jrs (3)	Sténose complète	Perdu le cathéter après 5 jrs, petite qté. de sang dans l'urine, rétention urinaire.
2	Mix	Sacrifice	54 jrs (7.7)	Sténose partielle détectée après 49 jrs	Sang dans l'urine, retrait du cathéter après 9 jrs car anorexie et perte de poids, diverticule à la vessie, muscle vésical hypertrophique.
3	Mix	Sacrifice	76 jrs (11)	Fin du protocole	Sang dans l'urine env. 10 jrs jusqu'au retrait du cathéter après 14 jrs, difficile à enlever, pierre dans l'urètre, retiré sans problème.
4	fd	Sacrifice	27 jrs (4)	Sténose partielle détectée après 21jrs	Petite qté. de sang dans l'urine, retrait du cathéter après 9 jours, car anorexie et perte de poids, légère cordée.

Dans l'ensemble, toutes les greffes s'étaient bien déroulées et tous les lapins ont survécu à l'intervention. Pour tous les lapins, il y avait une très légère perte de sang dans les urines qui perdurait souvent jusqu'au retrait du cathéter. Seul le cathéter du lapin #3 s'était bouché avant son retrait. D'ailleurs, la plupart des lapins ont eu de la difficulté à supporter le cathéter, puisque cette mesure implique le port du collet Élisabéthain, qui les empêchait de lécher leurs plaies, l'urine et les fèces qui restaient collées à leurs poils. Ils finissaient par perdre l'appétit, puis cessaient de manger. Une légère perte de poids provoquait automatiquement une prise en charge du sujet, afin qu'on lui retire le cathéter. À ce moment là, un bain de siège était donné et de la crème anti-irritation était appliquée sur les rougeurs. Lors des cystoscopies, une observation inattendue a été fait au niveau des fils de suture utilisés pour les anastomoses entre l'urètre natif avec le greffon. Dans tous les cas, il y avait effectivement dans la lumière de l'urètre, des morceaux de fils de suture qui provoquaient la formation de dépôt de calcaire et à une occasion, une pierre au centre du greffon. (Lapin #3) Cette dernière a été retirée lors de la 2ème cystoscopie, sept semaines post-opératoire.

3.3.1.3 La caractérisation des greffons post-implantation

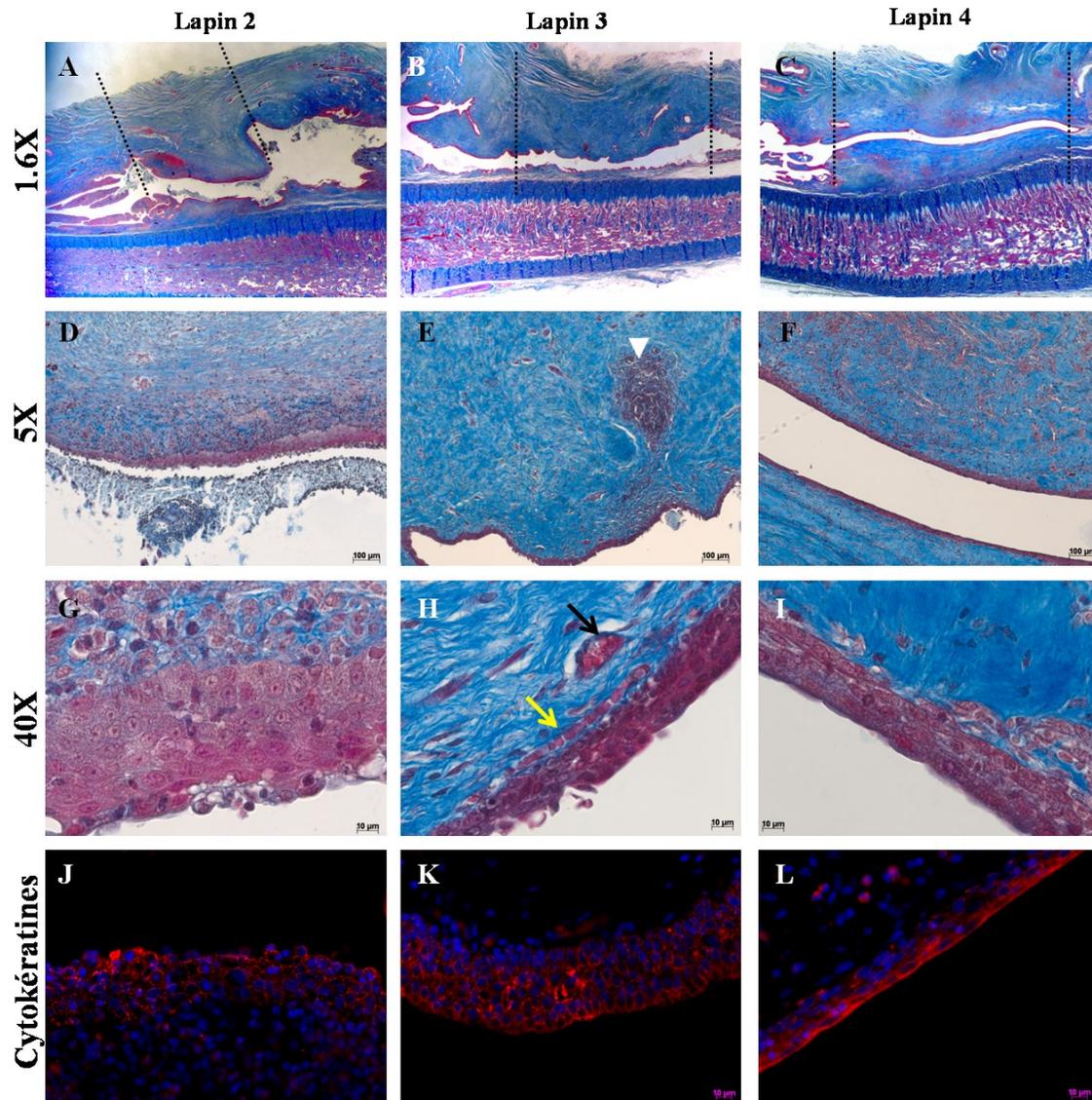


Figure 24 : Caractérisation des greffons post-implantation.

Trois premières rangées : Coloration au trichrome de Masson des coupes paraffinées de pénis des lapins # 2, #3 et #4, suite à la nécropsie. Images prises à 1.6X (binoculaire), 5X et 40X. Les pointillés représentent les marges des greffons. La tête de flèche indique un foyer d'inflammation. Les flèches noir et jaune montrent des néo-vaisseaux. Dernière rangée : Immunofluorescence dirigées contre les cytokératines sur des coupes paraffinées de pénis des lapins 2, 3 et 4, suite à la nécropsie.

La Figure 24 présente les histologies et immunofluorescences effectuées suite à la nécropsie des lapins #2, #3 et #4 sur les pénis entiers fixés dans le formol et inclus dans la paraffine. Les images de la première rangée illustrent l'allure générale des greffons en coupe longitudinale où l'on remarque assez aisément les sténoses urétrales plus ou moins prononcée selon le sujet. Les lignes

pointillées délimitent le début et la fin des greffons. On remarque que le greffon du lapin #2 avait contracté longitudinalement comparé aux autres lapins. Ce sujet présente une distension de l'urètre proximal en amont du greffon. De plus, l'état hypertrophié du muscle vésical suggère que la sténose était installée depuis quelques temps, car des mécanismes de compensation étaient déjà en place. Des contractions soutenues de la vessie ont aussi provoqué l'apparition d'un diverticule sur la face dorsale de la vessie. Les autres reconstructions urétrales des lapins #3 et #4 donnaient des résultats plus uniformes. Le lapin #4 présente aussi une sténose au niveau du greffon, tandis que l'urètre du lapin #3 semble normal.

Ces sténoses urétrales ne sont pas sans conséquence, puisque l'état de la vessie de chacun des lapins après leur sacrifice semble refléter assez bien la gravité de la contraction circonférentielle du greffon. Le lapin #1, décédé des suites d'une sténose complète, avait une vessie très endommagée où l'urothélium était complètement dégarni laissant la sous-muqueuse directement en contact avec l'urine : ceci laisse suspecter un décès par sepsis. Ensuite, le lapin #4 avait une sténose urétrale précoce et la vessie n'a simplement pas été atteinte, ce qui n'est pas le cas du lapin #2, qui était un cas beaucoup plus sérieux. En effet, comme c'était le cas des tissus péniens, l'inflammation était abondamment présente au niveau du stroma vésical, de sorte que 50 % de la surface de l'urothélium était elle-même détruite. Bien entendu, le lapin #3 avait une vessie normale avec un urothélium sain, car il n'avait pas, à première vue, de sténose.

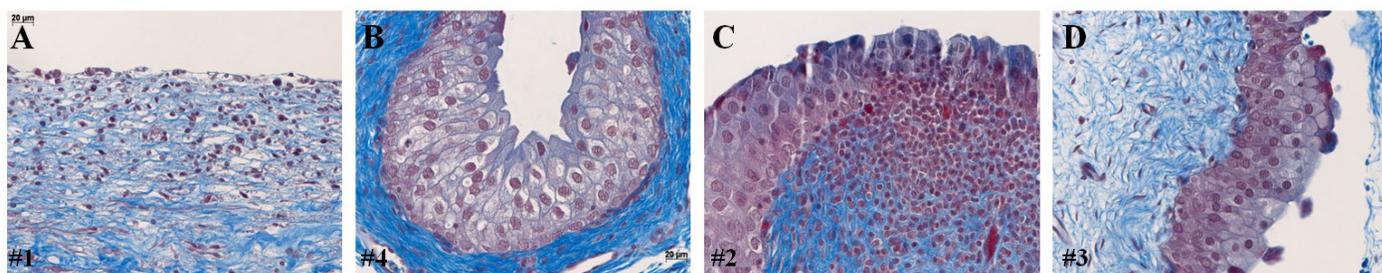


Figure 25 : État des vessies des lapins greffés suite à la nécropsie.

Coloration par un trichrome de Masson de coupes de vessies des lapins greffés avec les substituts urétraux reconstruits. Grossissement 20X. A-D) dans l'ordre de sacrifice des lapins aux semaines 3, 4, 7.7 et 11 post-greffe respectivement. Le chiffre dans le bas de la photo à gauche indique le numéro de lapin.

Dans les greffons urétraux et les tissus environnants, la présence d'inflammation était inévitable compte tenu du fait que les mécanismes de guérison des plaies étaient en marche suite à l'intervention chirurgicale. Normalement, les résultats attendus auraient présenté une inflammation décroissante plus le sacrifice du lapin était tardif. Toutefois, ce n'est pas ce qui s'est produit, puisque les tissus du lapin #2 contenaient une inflammation plus exacerbée que ceux du lapin #4, qui était pourtant décédé avant lui. (Figure 24, ligne 2) Néanmoins, ce sont des réactions immunitaires qui étaient normales et non incontrôlées. Les réactions inflammatoires du lapin #3, qui a été sacrifié en dernier, semblaient réduites à quelques foyers isolés, ce qui est encourageant et nous indique que le processus de guérison est possible entre nos greffons produits par génie tissulaire et les tissus natifs du lapin.

Des résultats très intéressants sont illustrés par la Figure 24 (ligne 3), qui représentent des observations des coupes colorées avec un trichrome de Masson à un plus fort grossissement, des greffons des lapins #2, #3 et #4. Les greffons de ces lapins, sacrifiés aux semaines 7.7, 11 et 4 respectivement, présentaient tous un recouvrement complet du greffon par l'urothélium natif du lapin. Ayant migrées des berges des anastomoses, ces cellules urothéliales avaient un état de différenciation et d'organisation qui était directement corrélé avec le nombre de semaines post-greffe. Plus un lapin avait vécu longtemps après la greffe, plus l'urothélium qui avait colonisé le tissu reconstruit contenait un nombre élevé de couches de cellules, comme en témoigne l'immunofluorescence contre les cytokératines du greffon du lapin #3. (Figure 24, ligne 4) En effet, après 11 semaines post-greffe, son urothélium était davantage développé et les couches basales, intermédiaires et superficielles mieux organisées. On constate d'ailleurs que l'urothélium du lapin #4 était moins épais et que les cellules étaient plus aplaties, comme si leur migration était récente et leur organisation inachevée. Le greffon du lapin #2, après 7.7 semaines, était recouvert d'un urothélium qui avait débuté sa stratification, mais qui n'était pas encore totalement organisé.

Bien que nous ne puissions pas effectuer d'immunofluorescences dirigées contre les protéines des vaisseaux sanguins, puisque les manipulations n'ont pas été encore mises au point, nous pouvons quand même apprécier la vascularisation des greffons grâce à la coloration au trichrome de Masson. Comme le démontre la troisième ligne de la Figure 24, des capillaires (flèche jaune) et des petits vaisseaux (flèche noire) ont migré dans les tissus reconstruits. Évidemment, plus le sacrifice s'est effectué tardivement, plus il y a de vascularisation dans les greffons. Toutefois, il y a déjà une vascularisation qui s'était établie dans les greffons après 4 semaines et aucun signe de nécrose ne fut observé pour tous les sujets.

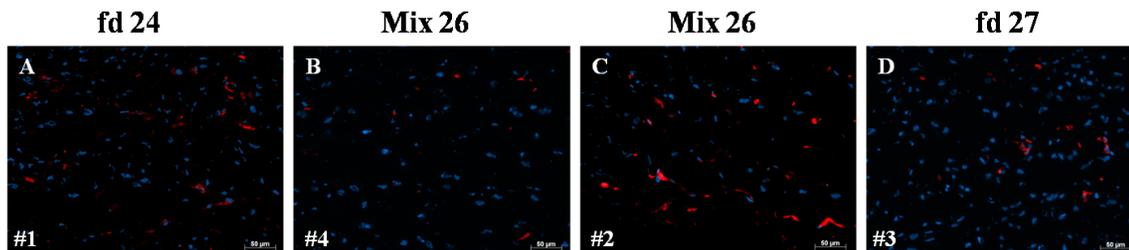


Figure 26 : Présence de cellules épithéliales dans les tissus reconstruits greffés chez le lapin pré-implantation.

Immunofluorescence contre les cytokératines. A-D, dans l'ordre de sacrifice des lapins aux semaines 3, 4, 7.7 et 11 post-greffe respectivement. fd : Fibroblastes dermiques. mix : Fibroblastes dermiques et vésicaux mélangés. Les chiffres qui suivent le type de greffon correspondent au numéro de la population cellulaire utilisée tandis que les chiffres dans le coin en bas à gauche dans les images correspondent au numéro du lapin.

Comme mentionné plus haut, la présence de cellules épithéliales dans les substituts urétraux reconstruits par la méthode d'auto-assemblage était visible jusqu'à 7 semaines de maturation. Toutefois nous n'avons pas été en mesure d'établir une relation directe entre la présence dans les tissus reconstruits de ces cellules épithéliales, que ce soit d'origine dermique ou vésicale, et le degré de réussite de la greffe. La Figure 26 présente des immunofluorescences contre les cytokératines sur les substituts greffés pré-implantation, présentées dans l'ordre de décès des lapins. Il n'y avait pas de différence très frappante entre la quantité de cellules épithéliales marquées pour chacun des tissus. Malheureusement, le caractère qualitatif de ces analyses ne nous permet pas de tirer des conclusions plus poussées à ce sujet et des analyses biochimiques devront être effectuées afin de voir s'il y a une corrélation entre les cellules épithéliales présentes dans les tissus et les degrés d'inflammation et de complication de chaque sujet.

À la lumière des présents résultats, il n'y a pas de corrélation qui a été découverte entre la réussite de la greffe et le type de greffon utilisé. Il sera important pour les futures études, d'augmenter le nombre de sujets de chacune des catégories et de préconiser les greffes autologues, afin de minimiser les réactions inflammatoires qui ne sont pas causées par la chirurgie elle-même. Néanmoins, il est clair que même si beaucoup de travail reste à faire, ces greffes de reconstructions urétrales complètes chez le lapin sont du domaine du possible. Nous avons prouvé qu'il est faisable de produire et de greffer les tissus de lapin reconstruits par auto-assemblage et d'autres chirurgies permettront de raffiner la méthode, afin de poursuivre les recherches vers les études précliniques.

Chapitre 4 : Discussion

Produire un tissu, exempt de biomatériau, à partir de cellules mésenchymateuses de lapin, qui soit assez résistant pour nous permettre de créer un substitut urétral, puis de procéder à la greffe de celui-ci, était un défi de taille. Effectivement, tout était à faire et il fallait commencer au tout début par la production de tissus reconstruits par la méthode d'auto-assemblage. Cette technique complexe a été optimisée pour trouver les conditions de culture idéales qui nous permettent d'obtenir une plus grande quantité de collagène déposé dans les tissus, ce qui les rend facilement manipulables. Ensuite, une étape supplémentaire a été franchie dans le processus par l'ajout des cellules mésenchymateuses de vessie afin de rendre le modèle plus spécifique de l'organe ciblé et apporte déjà plusieurs caractéristiques intéressantes aux tissus de lapin. Ces étapes seront d'ailleurs discutées ci-dessous. En dernier lieu, la conclusion de ce projet était de prouver que les substituts urétraux reconstruits avaient les caractéristiques nécessaires pour être greffés chez le lapin. Cette preuve de concept, étape préliminaire indispensable, nous a permis de repérer les imprévus et surtout de prouver que le modèle d'urètre reconstruit par auto-assemblage pouvait se comparer avantageusement avec les autres modèles utilisés de nos jours en génie tissulaire.

Le modèle d'urètre reconstruit humain avait jusqu'ici été produit à partir de fibroblastes dermiques dans un milieu de culture de base, composé uniquement de DMEM et de 10 % SVF, additionné d'acide ascorbique. (Cattan et al. 2011; Magnan et al. 2009) Les substituts étaient en mesure de résister à une grande pression interne (3 semaines de maturation = 1133 ± 76 mmHg) et avaient la capacité d'être suturés très efficacement. (Magnan et al. 2009) De plus, les études effectuées par notre équipe démontrent qu'ils permettaient une assise adéquate pour la différenciation d'un urothélium mature (Imbeault et al. 2013; Cattan et al. 2011) et même qu'ils pouvaient être endothélialisés (Imbeault et al. 2013), tout cela dans le but ultime d'accélérer la prise rapide du greffon chez l'hôte. Avec la complexité de la méthode, le temps de production trop long est un des rares points négatifs relié à ce modèle de tissu urétral reconstruit. Effectivement, la production du substitut humain peut s'échelonner sur 60 à 90 jours selon les conditions de maturation choisies et ce, de la prise de biopsie à la mise en bioréacteur, jusqu'à la maturation complète du greffon. L'amélioration des conditions de culture pour les cellules de lapin avait donc deux buts ; rendre les tissus de lapin manipulables et diminuer le temps de culture des feuillets pour réduire le temps total de production de ces substituts. Suite à l'ajout des additifs tels que l'adénosine, l'insuline, l'hydrocortisone et l'EGF, le tout dans un milieu de culture enrichi de Ham F12, la production des feuillets de cellules mésenchymateuses de lapin est maintenant de huit à onze jours. C'est une

réduction substantielle si l'on considère que dans les anciennes conditions de culture, cette étape, avant le roulage des tubes, pouvait durer jusqu'à 28 jours.

Optimisation de techniques biochimiques de dosage du collagène dans les tissus de lapin

L'utilisation des immunobuvardages de type Western aurait certainement été l'outil d'analyse adéquat dans ce cas-ci mais malheureusement, il nous est impossible de les utiliser pour l'instant avec les tissus reconstruits de lapin pour deux raisons. La première est qu'il nous est impossible d'homogénéiser ces tissus sans hydrolyser les protéines qu'ils contiennent et la deuxième raison concerne un manque d'anticorps spécifiquement dirigés contre les protéines de lapin présentement disponibles sur le marché. C'est pourquoi deux techniques alternatives de dosage ont été optimisées : La coloration au *Sirius Red* ainsi que le dosage par colorimétrie de l'hydroxyproline. La coloration au *Sirius Red* permet de doser les collagènes qui sont moins fortement assemblés entre eux, où les fibrilles ne forment pas encore de fibres volumineuses, plus facilement attaquables par la pepsine. Comme le démontra Perumal et al., l'architecture circulaire des fibres de collagène mature est fait de façon à protéger la protéine de la dégradation par les enzymes. (Perumal et al. 2008) Plus les fibres sont matures et moins ces dernières ont accès aux sites de clivage, car ils deviennent cachés au centre de la fibre. Donc, le collagène dosé dans les tissus par la coloration au *Sirius Red* n'est pas représentatif de la quantité de collagène total formant le tissu, mais plutôt de la quantité de collagène nouvellement formé ou plus faiblement assemblé. Lors des manipulations, on remarque d'ailleurs qu'il y a, selon les conditions, des portions plus ou moins importantes de tissus qui ne sont pas digérées après le traitement à la pepsine. Ce phénomène peut aussi être expliqué par la présence de glycoaminoglycanes sur les fibres de collagènes qui diminuent la dégradation des fibres par les enzymes et augmente la stabilité du collagène. (Kirk et al. 2013) Une étape supplémentaire dans le protocole permettrait de démasquer les sites de clivages de la pepsine au départ recouverts, avant de digérer le tissu. (TAŞKIRAN et al. 1999) Même si la technique nous donne pour l'instant une bonne indication de la quantité de collagène nouvellement assemblé dans nos tissus, l'amélioration de celle-ci nous permettra d'en apprendre davantage sur la matrice extracellulaire reconstruite par les cellules mésenchymateuses de lapin. Dans une autre mesure, la technique de dosage du collagène par la quantification de l'hydroxyproline nous informe de la quantité totale de collagène présente dans les tissus de lapin, puisque les protéines sont complètement digérées en acides aminés. Comme en général moins de 2 % d'hydroxyprolines sont retrouvées dans les protéines des mammifères et que presque seul le collagène et l'élastine en contiennent (Némethy & Scheraga 1986), cette technique s'avère une méthode précise pour choisir quel additif présent dans notre milieu de culture induit une plus grande production de collagène. Il est important de préciser que la production de

l'élastine est fortement inhibée par l'acide ascorbique (Davidson et al. 1997) présente dans les milieux de culture utilisés pour la production des tissus ce qui fait de cette technique un indicateur précis de la quantité de collagène produite dans les différentes conditions.

Les résultats des dosages d'ADN démontrent que les trois additifs ici utilisés n'augmentaient pas la prolifération cellulaire et n'avaient pas le même impact délétère sur la croissance des cellules. Par exemple, on observe une baisse plus importante du nombre de cellules dans les tissus reconstruits en présence d'œstrogène que de LPA. En conséquence, on ne peut pas utiliser ces données comme contrôle interne afin d'ajuster les dosages de collagène en fonction du nombre de cellules par tissu. Néanmoins, suite aux traitements avec les additifs, la quantité de cellules n'augmentait pas, ce qui nous indique qu'ils n'agissaient pas en tant que molécules pro-prolifératives. Ceci est plutôt une caractéristique positive pour la structure de nos tissus, car une hyperprolifération de cellules, qui produiraient et déposeraient du collagène, pourrait conduire à une fibrose. Bien que l'œstrogène soit une hormone qui est reconnue pour augmenter la croissance des fibroblastes en culture, avec une concentration plus faible que celle que nous utilisons (Soldano et al. 2010), étonnamment, elle n'a pas d'effet sur nos fibroblastes dermiques et elle diminue même significativement la croissance des fibroblastes mix (tissu reconstruit à l'aide de fibroblastes dermiques et vésicaux dans un ratio 1:1). Cet effet est sans conséquence puisque la quantité de collagène dans ces tissus est tout de même augmentée. Il faudra néanmoins, avant le transfert de notre technologie à l'humain et bien que les malformations de l'urètre touchent très majoritairement des garçons, effectuer des tests avec des cellules provenant d'individus mâles et femelles pour s'assurer qu'il n'existe pas d'effets, potentiellement néfastes, selon le sexe. Cette diminution du nombre de cellules est retrouvée dans la plupart des conditions de culture, qu'elle soit attendue (Chabaud et al. 2013) ou non. La différence importante du nombre de cellules à l'intérieur des tissus, entre les conditions mix et celles composées de fibroblastes dermiques seulement (fd) est difficilement explicable. Les additifs provoquent une diminution 30 % du nombre de cellules dans les feuillets mix par rapport aux feuillets dermiques. Même si d'autres tests seront nécessaires afin de le prouver, on peut déjà s'attendre à ce que les additifs utilisés aient un impact plus important sur les fibroblastes vésicaux que sur les fibroblastes dermiques. La grosseur et le phénotype des cellules pourraient être vérifiés par cytométrie de flux d'expériences futures. La présence de cellules plus volumineuses dans les populations de cellules vésicales pourrait expliquer une inhibition de contact plus rapide pour ce type cellulaire et donc donner au final un nombre de cellules moindre.

L'optimisation des conditions de culture permet d'augmenter le dépôt de collagène dans les tissus reconstruits de lapin.

Afin d'améliorer la qualité et surtout la quantité de matrice extracellulaire (MEC) produite par les cellules mésenchymateuses de lapin, des tests ont été effectués sur les deux types de feuillets reconstruits pour trois additifs à plusieurs concentrations différentes comme la section 3.1 l'explique plus en détails. L'adénosine (Lazzerini et al. 2012), l'acide lysophosphatidique (Castelino et al. 2011; Pradère et al. 2008) et l'œstrogène (Zong et al. 2007; Zong et al. 2009) sont des agents impliqués dans des pathologies caractérisées par une fibrose des tissus conjonctifs à différents niveaux de gravité. Toutefois un ensemble de tests biologiques et biochimiques ont été effectués pour s'assurer que dans nos conditions de culture et aux doses utilisées, les phénotypes pathologiques de ces maladies ne sont pas reproduits, mais plutôt que l'on tire profit d'une caractéristique qui leur est commune : l'augmentation de la production de MEC par les cellules mésenchymateuses. De façon générale, le dosage de l'hydroxyproline démontre qu'il y avait une plus grande quantité de collagène dans les conditions mixtes comparativement aux conditions avec les fibroblastes dermiques seuls. Ce phénomène survient pour toutes les concentrations et pour tous les additifs, ce qui suggère une fois de plus que les cellules mésenchymateuses de vessie répondent plus fortement aux additifs en produisant et déposant plus de collagène.

Lors des tests visant à déterminer la concentration optimale d'œstrogène, permettant d'augmenter la production de collagène dans nos tissus, aucune relation dose dépendante n'a été repérée. Les résultats sont néanmoins le reflet de la littérature en ce qui a trait à l'augmentation de collagène, puisque pour les 2 techniques de dosage, il y avait une augmentation significative de la quantité de collagène par rapport au contrôle, pour toutes les concentrations. Il y avait autant de jeunes fibres dans les cultures de fb mix que les cultures de fb dermiques, mais plus de fibres matures dans les mix que les fd (dosage hyP). Malheureusement, ces résultats sont difficilement explicables, puisqu'il n'est pas encore possible de savoir s'il y a plus de récepteurs pour l'œstrogène dans les tissus dermiques par rapport aux tissus vésicaux. (Taylor & F 2000) De plus, la signalisation cellulaire pourrait emprunter des chemins différents dans les cellules de derme et de vessie. L'œstrogène est reconnue pour accélérer la cicatrisation des plaies cutanées (Ashcroft et al. 1995), moduler la production de collagène et réguler la protéolyse (MMP) (Ashcroft et al. 1997; Ashcroft et al. 1999), protéger les fibroblastes contre le stress oxydatif (Bottai et al. 2013), etc. Tous ces effets sont bénéfiques pour la prise de la greffe, mais étant donné que l'œstrogène est utilisée en culture, ses effets se limitent donc à la production des tissus et non à la greffe chez les lapins mâles, ce qui réduit donc les effets secondaires potentiels. Dans un futur rapproché, il sera intéressant de

déterminer si l'augmentation du collagène dans les matrices reconstruites en présence d'œstrogène est due à une plus grande synthèse de collagène ou à une inhibition du remodelage de la matrice par une diminution de la production et/ou sécrétion des MMP. (Zong et al. 2007) Le dosage de ces MMP serait donc utile pour avoir une idée du taux de dégradation des fibres déjà assemblées.

En regardant plus en détail les résultats relatifs au LPA, on constate qu'il n'augmente pas la quantité total de collagène dans les tissus reconstruits aux concentrations testées, comme le prévoit l'hypothèse de départ. De plus, une diminution significative de la prolifération cellulaire a été observée ce qui était toutefois prévisible, puisque le phénomène était relaté dans la littérature. (Chabaud et al. 2013) Impliqué dans les maladies fibrosantes (Castelino et al. 2011), le LPA aurait possiblement la capacité d'engendrer de la fibrose dans nos tissus suite à la greffe par le recrutement de fibroblastes et de macrophages pro-inflammatoires. (Pradère et al. 2008) Heureusement, notre équipe a déjà démontré avec des fibroblastes humains qu'une sécrétion plus élevée de collagène *in vitro*, s'arrête rapidement lorsque l'on supprime la supplémentation en LPA dans les cultures. (Chabaud et al. 2013) De plus, les cellules expriment moins l' α -SMA en présence de LPA, réduisant ainsi les phénotypes contractiles indésirables des tissus reconstruits qui composent les substituts urétraux. (Desmoulière et al. 2005) Dans un autre ordre d'idées, le dosage de collagène effectué par la coloration au *Sirius Red* a démontré une moins grande proportion de fibres immatures lors de l'utilisation de la concentration la plus faible (5 μ M) comparée à la plus concentrée (10 μ M). Pourtant, le dosage du collagène total est presque identique entre les deux conditions. Notre hypothèse sur ce phénomène n'a pas été vérifiée, mais propose que les fibres de collagène produites en présence de 5 μ M de LPA étaient assemblées de façon plus complexe et plus mature empêchant la pepsine de digérer le tissu. Des tests mécaniques sur des tissus reconstruits en présence des différents additifs pourraient nous indiquer quelles conditions génèrent les feuillets les plus solides et donc où la MEC est la plus mature. Ce phénomène est également observé avec les tissus cultivés en présence d'adénosine.

Les résultats des dosages de collagène par la coloration au *Sirius Red* indiquent clairement que plus la concentration d'adénosine utilisée est grande, moins il y a de collagène dans les tissus. Cette relation dose dépendante suggère que la diminution du collagène par rapport au contrôle est due une fois de plus à une différence dans l'assemblage des fibrilles de collagène dans le tissu reconstruit. La technique du *Sirius Red* n'arrive donc pas à doser ce collagène. Ce fait est supporté par le dosage de l'hydroxyproline qui était constant peu importe la concentration d'adénosine utilisée. Malheureusement, aucune donnée dans la littérature ne permet d'expliquer l'effet de l'adénosine sur l'augmentation de la réticulation des fibrilles de collagène. Un dosage de la lysiloxydase, qui

provoque la liaison covalente entre les fibres de tropocollagène, pourrait nous donner une bonne indication de la force avec laquelle sont assemblées les fibres entre elles. (Kato et al. 2013) Ce dosage pourra éventuellement nous éclairer sur les différents états du collagène généré par les différentes conditions de culture. D'autre part, on sait que les glycoaminoglycans sur les fibres de collagènes masquent les sites de clivage pour la pepsine. (TAŞKIRAN et al. 1999) Un lien entre l'augmentation de ces sucres fixés au collagène *in vitro* et la diminution de collagène dosé par le *Sirius Red* pourrait aussi être une piste à explorer.

Suite à ces réflexions et à la lumière des résultats obtenus, les meilleures concentrations d'additifs qui devraient être utilisées pour la production des feuillets matriciel à partir de cellules mésenchymateuses de lapin sont 200 μ M d'adénosine, 20 ng/ml d'œstrogène et 5 μ M de LPA. Toutefois, notre hypothèse qui prétendait que tous ces additifs augmentaient considérablement la quantité de collagène dans les tissus n'est pas vérifiée, car les tests ne démontrent pas de très bons résultats dans ce sens pour des cultures avec le milieu DMEM-Ham. Cependant, il est important de mentionner que, comparées aux cellules de lapin cultivées dans le DMEM, les améliorations sont impressionnantes, tellement que les feuillets créés dans ces conditions ne peuvent pas être manipulés. Dans les conditions de culture utilisées pour les tests présentés ici, les additifs apportent tout de même des améliorations positives non-négligeables dans les tissus reconstruits de lapin. Un travail reste à faire afin de trouver les concentrations optimales à utiliser dans le futur. De plus, la combinaison de l'ajout d'additifs, tel que l'insuline, et de la culture en hypoxie serait une voie intéressante à explorer puisqu'elle favorise la production d'un collagène plus dense et mécaniquement plus résistant en augmentant la synthèse de la 4-prolyl-hydroxylase. (Bjork et al. 2012)

Il est important de mentionner que les feuillets formés par les cellules de lapin qui ont servis à l'élaboration des substituts urétraux greffés et analysés dans ce mémoire ne sont pas produits avec les concentrations d'additifs préconisées par les dosages du collagène. Ces résultats n'étaient pas encore disponibles au moment de la production. Néanmoins, ils ont été produits avec une concentration d'adénosine de 100 μ M, déterminée avec des tests préliminaires.

L'ajout de cellules mésenchymateuses de vessie dans le modèle d'urètre reconstruit le rend plus spécifique de l'organe ciblé sans affecter sa qualité.

Au départ produits à l'aide de fibroblastes dermiques seulement, les substituts urétraux humains avaient déjà des caractéristiques intéressantes tant au niveau de la qualité de la matrice produite (collagènes de type I et VII) que des propriétés mécaniques qu'ils possédaient. (Cattan et al. 2011;

Magnan et al. 2009) Néanmoins, l'ajout de cellules mésenchymateuses de vessie dans le modèle pouvait apporter de nouvelles qualités au tissu. C'est à l'aide du modèle chez le lapin que cet ajout a été expérimenté. Cependant, l'ajout des cellules mésenchymateuses de vessie à l'intérieur des urètres reconstruits par la méthode d'auto-assemblage implique qu'il faudra prendre 2 biopsies sur des sites anatomiques différents : la peau et la vessie. Les chirurgies de reconstruction suite à un hypospadias sévère, c'est-à-dire avec un long défaut urétral, s'effectuent souvent en deux temps pour corriger d'autres problèmes tel qu'une courbure pénienne trop prononcée par exemple. Donc, une anesthésie supplémentaire ne serait pas toujours nécessaire pour faire la deuxième biopsie, qui serait effectuée au moment de la première intervention.

En culture *in vitro*, les cellules mésenchymateuses de lapin du derme et de la vessie ne sont pas très différentes du point de vue morphologique, mais complètement différentes selon leur origine tissulaire. L'origine des cellules utilisées pour la reconstruction par auto-assemblage a un impact majeur sur le résultat final. (Carrier et al. 2009) L'ajout de fibroblastes vésicaux dans les tissus devrait permettre de créer un tissu physiquement et moléculairement plus près de ce qu'est la vessie native, en optimisant l'échange de signaux entre les différents types de cellules et entre les cellules et la MEC. (Rousseau et al. 2013) L'origine des cellules utilisées est si importante qu'elle provoque des différences dans la réponse à des stimuli et ce au sein d'un même tissu. (Varkey et al. 2014) L'importance de se rapprocher le plus possible du tissu natif dans toutes les étapes du développement d'un substitut est même mise en évidence dans l'utilisation des matrices décellularisées. Clairement, les meilleurs résultats ont été obtenus avec les sous-muqueuses de vessies décellularisées comparativement au SIS, pour la reconstruction de tissus urologiques *in vitro* destinés à la greffe. (voir Tableau 2) Les tissus reconstruits, faits à partir de cellules d'origine différente, répondent de la même façon aux conditions de culture, permettant de comparer les deux modèles sur d'autres plans tels que leur résistance mécanique, la viabilité des cellules ou encore leur degré de fusion pour un temps de maturation donné.

En général, les tests mécaniques démontrent que les constructions mix avaient des propriétés mécaniques supérieures ou égales aux substituts composés de fibroblastes dermiques. D'ailleurs, les tissus produits avec les fibroblastes mix ont été plus performants au test de rétention de sutures que ceux produits avec les fd. L'addition des fibroblastes vésicaux dans le modèle n'est donc pas délétère au niveau des propriétés mécaniques des tissus reconstruits de lapin. Ce phénomène est néanmoins difficile à expliquer pour l'instant. Plusieurs hypothèses pourraient être avancées pour expliquer les meilleurs propriétés mécaniques des tissus mix, mais peu de travail a été fait jusqu'ici afin de valider ces hypothèses. Par exemple, une meilleure fusion des couches dans les conditions

mix pourrait être attribuée à une moins grande quantité de cellules épithéliales emprisonnées dans le tissu au départ, qui peuvent retarder la fusion des tissus en libérant des MMP. (Kratz et al. 1995) De plus, il est possible que les cellules de vessie produisent et assemblent plus rapidement le collagène requis pour le remodelage et la fusion des couches de tissus les unes aux autres. En somme, l'hypothèse voulant que les tissus mieux fusionnés soient plus résistants s'avère tout à fait vraie. Les substituts fd de lapin ne sont pas bien fusionnés après 3 semaines de maturation. Pour ce type de substitut, l'option d'allonger le temps de maturation à cinq ou sept semaines était nécessaire pour compléter le remodelage de la MEC. Une fois de plus, l'ajout des cellules mésenchymateuses de vessie dans le modèle devient très intéressante puisqu'elle permet de conserver un temps de maturation plus court de trois semaines, tout en produisant des substituts fusionnés et mécaniquement plus résistants qu'avec le modèle de base (fd). D'autre part, les résultats histologiques révèlent que plus les tissus restaient longtemps en culture, plus les cellules et la MEC à l'intérieur des constructions étaient désagrégées. Plus les tissus étaient épais, plus les dommages cellulaires, puis matriciels, apparaissaient rapidement. Selon les tests de pression d'éclatement, les tissus les plus résistants avaient sept semaines de maturation, mais les cellules à l'intérieur avaient complètement disparues. À la lumière de ces résultats et parce que le tissu idéal doit être solide et vivant, un compromis doit être fait et il convient donc de choisir un substitut un peu plus fragile mais avec des cellules en bon état. Il n'y a actuellement pas de donnée dans la littérature qui démontre jusqu'à combien de micromètres d'épaisseur un tissu peut encore être nourri par les nutriments du milieu de culture. L'oxygène et les nutriments ne diffusent pas plus profondément qu'environ 100 μm d'épaisseur (Sekine et al. 2011) et c'est une des raisons qui pousse certains chercheurs faisant de la médecine régénératrice à adapter leur méthode afin de réduire l'épaisseur de leurs tissus. (Owaki et al. 2014)

Indépendamment du type cellulaire utilisé (dermique ou vésical), en augmentant le temps de maturation, on augmente la fusion des feuillets ainsi que la force mécanique maximale tolérée par les tissus. En augmentant le temps de maturation, on augmente aussi la possibilité que les fibres de collagène soient plus fortement reliées entre elles par d'autres types de liaisons covalentes comme la glycation. Ce processus est engendré par la liaison des sucres du milieu de culture avec des amines libres des lysines dans les triples hélices de collagène contenues dans les tissus. La glycation est un processus indépendant des enzymes qui augmente de beaucoup les capacités mécaniques du tissu. (Mason & Reinhart-King 2013) De plus, il est prouvé qu'elle s'opère en culture dans un milieu est très concentrée en glucose tel que le notre. (Murillo et al. 2009)

Étonnamment, le pourcentage de déformation des tissus reste le même au fil du temps même si les tissus deviennent plus résistant mécaniquement et ce pour les deux types de construction. Donc, même si les fibres sont plus matures ou fortement assemblées entre elles, elles gardent la même capacité à se déformer malgré tout. C'est une propriété intéressante puisqu'elle nous permet d'obtenir des tissus résistants, mais souples, qui se manipulent davantage comme un tissu natif ou décellularisé qu'un biomatériau synthétique rigide. (Feng et al. 2009)

Extraire les cellules urothéliales à partir d'une biopsie de vessie apporte plusieurs avantages non-négligeables au modèle.

Étant donné le grand nombre de méthodes qu'il est possible d'utiliser pour extraire les cellules urothéliales ainsi que leurs diverses origines, nous avons dû faire un choix qui a été celui d'extraire des cellules urothéliales de biopsie de vessie. Procéder à un prélèvement de cellules au niveau de la vessie plutôt que dans l'urètre est une évidence. Moins invalidant pour le patient et plus simple à prélever, ce type de biopsie est largement utilisé par les chirurgiens qui pratiquent la reconstruction de tissus urologiques. (De Filippo et al. 2002; Atala et al. 2006; Raya-Rivera, Esquiliano, Yoo, Lopez-Bayghen, et al. 2011; Magnan et al. 2006) De plus, en utilisant la vessie comme source de cellules urothéliales, on s'assure de connaître le phénotype des cellules récoltées. Étant donné que l'urètre humain est recouvert d'urothélium seulement pour le premier tiers proximal, tandis que les deux autres tiers sont de type malpighien, le risque d'obtenir des populations mélangées de kératinocytes et de cellules urothéliales est élevé. Cet épithélium stratifié non-kératinisé est aussi retrouvé au niveau de la muqueuse buccale, où certains chirurgiens préfèrent prendre les biopsies, dans le but de procéder à des reconstructions urétrales. (Bhargava et al. 2008; Feng 2011; El-Kassaby et al. 2008) Dans la mesure où un défaut urétral serait corrigé au niveau de la partie la plus distale du pénis, il serait logique de penser qu'une reconstruction à partir de la muqueuse buccale serait plus appropriée. Cependant, la fabrication d'un tissu capable de contrer les attaques de l'urine dès l'implantation et pour les premières semaines est ici visée, c'est pourquoi les cellules urothéliales sont préconisées. Elles peuvent former un urothélium plus imperméable que la muqueuse buccale. (Wu et al. 2009) Certains cliniciens ont utilisé une avenue différente qui consiste à utiliser les kératinocytes du prépuce pour ensemercer, pré-implantation, des greffons composés de matrice décellularisées de vessie pour une reconstruction urétral chez le lapin. (Fu et al. 2007) Après un suivi de six mois, les résultats démontrent un meilleur recouvrement des cellules urothéliales de l'hôte et surtout une meilleure organisation musculaire dans les greffons préalablementensemencés de cellules épithéliales. La source de prélèvement des cellules

épithéliales proposée par ce groupe n'est pas à négliger, puisque la résection du prépuce, un tissu non-essentiel, peut éviter une chirurgie plus invasive.

Afin d'éviter une intervention chirurgicale supplémentaire, l'équipe du Dre Fossum préconise la récolte des cellules urothéliales par lavage vésical. (Chamorro et al. 2014; Fossum et al. 2012; Fossum & Nordenskjöld 2010) Bien que non douloureuse, cette technique non-invasive requière le plus souvent une anesthésie générale surtout chez les jeunes enfants. (Chamorro et al. 2014) L'avantage de cette technique est d'éviter au maximum la contamination des cultures par les fibroblastes de la sous-muqueuse vésicale. Par contre, la probabilité d'obtenir des cellules urothéliales de la couche basale, où se trouve la majorité des précurseurs importants dans la régénération de l'urothélium, est très faible. De ce fait, les adeptes de ce genre de méthode doivent utiliser les cellules urothéliales à faibles passages (P4 maximum) afin de procéder à la reconstruction urétrale par génie tissulaire. (Fossum & Lundberg 2005) La possibilité d'utiliser des cellules souches provenant de l'urine a aussi été testée par certaines équipes dont celle du Dr. Atala. (Bharadwaj et al. 2013) Suite à la récolte de plusieurs litres d'urine, l'expansion clonale d'une cellule souche d'origine rénale est effectuée, puis la différenciation en cellules urothéliales s'opère grâce à un cocktail d'induction. Cependant, la technique est très exhaustive et le temps requis pour avoir une quantité suffisante de cellules pour ensemercer une construction est très long avec cette technique. La nature des cellules urothéliales et la façon de les récolter sont donc propres à chaque équipe. Nous avons arrêté notre choix sur les biopsies vésicales, car elles apportent plusieurs avantages comme nous permettre de récolter les cellules basales, les précurseurs/cellules souches et une grande quantité de cellules, tel qu'expérimenté avec les biopsies de peau, pour un prélèvement de moins de 0.25 cm² de superficie. (Germain et al. 1993) L'expansion des cellules urothéliales à partir de vessie n'est pas préconisée dans les cas où celle-ci est atteinte par une pathologie (e.g. cancer, hypertrophie musculaire, troubles neurologiques). (Subramaniam et al. 2011) Dans le cas de patients atteints d'hypospadias, la vessie est tout à fait normale, ce qui devrait assurer une croissance normale des cellules urothéliales recueillies.

Cultiver les cellules urothéliales avec une couche nourricière permet d'obtenir des cellules de meilleure qualité.

Suite à la biopsie de vessie, les cellules urothéliales sont mises en culture suivant différentes méthodes et chacune possède des avantages et des inconvénients. Bien que la méthode soit un sujet de controverse, il est préconisé dans notre laboratoire d'utiliser une couche nourricière pour mettre en culture les cellules épithéliales autant pour les kératinocytes que les cellules urothéliales.

L'équipe du Dre. Fossum utilise seulement une couche nourricière d'origine murine (S3T3) pour l'extraction primaire et la retire pour les passages subséquents. (Chamorro et al. 2014) Il semblerait que leurs S3T3 n'ont pas complètement perdu la capacité de se diviser. Une éventuelle contamination de leurs populations de cellules urothéliales par des cellules de souris peut devenir préoccupante dans l'optique d'effectuer une greffe autologue de ces cellules ultérieurement. Pour notre part, notre méthode d'irradiation des fibroblastes murins servant de couche nourricière pour la culture des cellules urothéliales est depuis longtemps considérée comme efficace et sécuritaire. (Germain et al. 1993) Il est aussi intéressant de constater qu'il est possible de remplacer les fibroblastes murins par des populations de fibroblastes dermiques humains irradiés testées négatives pour la plupart des pathogènes connus pouvant être transmis lors d'une greffe éventuelle. (Bisson & Rochefort 2013) Cette étude a été effectuée pour la culture de kératinocytes et étant donné que nous utilisons les mêmes conditions de culture pour les cellules urothéliales humaines, les chances que l'utilisation de couches nourricières de fibroblastes humains irradiés fonctionne bien avec de bon rendement de croissance est très vraisemblable. De plus, la culture de cellules épithéliales sur couche nourricière permet de cultiver les cellules à de plus hauts passages sans affecter la durée de vie. Les risques de tumorigénicité ne sont pas augmentés (Thépot et al. 2011) et une plus grande quantité de cellules souches/progénitrices dans les cultures est conservée. (Lavoie et al. 2013) Pour l'instant, étant donnée que les biopsies nous permettent d'obtenir une bonne quantité de cellules urothéliales et qu'elles sont cultivées et utilisées à bas passages, les risques de transformation, de modifications de caryotype ou l'apparition de l'expression de gènes de sénescence sont faibles. (Chamorro et al. 2014; Fossum & Lundberg 2005) Personne n'avait jamais auparavant procédé à l'irradiation de fibroblastes dermiques de lapin dans le but de produire une couche nourricière efficace pour la culture de cellules épithéliales de lapin. D'après les résultats obtenus, ce type de cellules est un choix pertinent pour cultiver les urothéliales de lapin et pour obtenir un rendement de prolifération très élevé. Plusieurs tests sont à faire pour quantifier les améliorations obtenues avec les fibroblastes dermiques irradiés de lapin. Une bonne caractérisation autant au niveau génétique que protéique devra être planifiée. Il faudra aussi prouver que l'intégrité chromosomale est préservée, que la télomérase est toujours efficiente et que les cellules expriment encore les marqueurs spécifiques aux cellules urothéliales tels que les uroplakines. Suite à ces expérimentations, les cellules urothéliales de lapin pourront êtreensemencées dans la lumière des greffons tubulaires et ainsi les protéger de l'exposition à l'urine lors de leur implantation chez le lapin.

Parallèlement à l'optimisation de ce modèle d'urètre reconstruit chez le lapin, il faut être conscient que la méthode ne doit pas être trop modifiée, pour éviter qu'elle ne corresponde plus à celle utilisée pour la production de tissus humains. Il faut garder en tête que le but de ces tests sur le modèle animal autologue est de le faire approuver pour des études cliniques.

La greffe des substituts urétraux chez le lapin prouve leur fonctionnalité.

Au total, 4 greffes de remplacement urétral circonférentiel ont été effectuées chez le lapin. Ces chirurgies constituaient une preuve de concept et nous ont permis de valider les caractéristiques physiques et les propriétés mécaniques de notre modèle. En conséquence, nos substituts urétraux semblent d'une épaisseur et d'un diamètre appropriés pour procéder à ce genre de reconstruction par rapport à l'âge et au poids des lapins utilisés. Ils s'anastomosent efficacement aux tissus natifs urétraux, car ils sont assez résistants pour être suturés solidement. De plus, les vaisseaux sanguins de l'hôte sont en mesure de migrer assez rapidement dans les greffons, ce qui permet d'éviter les nécroses. Seulement 1 mois après la chirurgie, les cellules urothéliales ont complètement recouvert les greffons grâce à la migration des cellules urothéliales à partir des sites d'anastomoses vers le centre du tissu. Toutes ces observations sont encourageantes au point de vue de la guérison, qui se fait rapidement même si les greffes étaient de type allogénique. On peut donc s'attendre à ce qu'elles se déroulent dans le même sens lorsqu'elles seront autologues. Suite à ces premières chirurgies, il n'y avait pas de différence entre les greffons composés de fibroblastes dermiques (n=2) et ceux faits de fibroblastes dermiques et vésicaux (mix) (n=2). L'utilisation des cellules de vessie ne laisse pas présager d'éventuels problèmes et même si le lapin en santé (sans sténose) avait été greffé avec un substitut mix, l'échantillonnage est trop petit pour tirer une conclusion à ce sujet. Les substituts dermiques semblaient moins bien fusionner et donc moins résistants pour la rétention des sutures ce qui a probablement engendré la suite d'événements menant au décès prématuré du lapin #1, greffé avec le substitut le plus fragile des quatre, de type fd. Cette hypothèse n'a pu être vérifiée suite à la nécropsie, car le greffon n'a pas été traité de façon à observer les tissus en coupe longitudinale.

Le recouvrement complet du greffon par les cellules urothéliales.

Tel que décrit dans la littérature, les cellules urothéliales ont la capacité de migrer sur les greffons lors de reconstruction urétrale et ce, de façon plus ou moins efficace selon le type de biomatériau utilisé. Par exemple, sur une matrice de sous-muqueuse d'intestin grêle de porc décellularisée (SIS) greffée chez le lapin, une migration urothéliale est amorcée déjà après une semaine post-greffe, mais le recouvrement est complété seulement après un mois de suivi. (Dorin et al. 2008) Les reconstructions faites à partir de greffon à base de gels de collagène de queue de rat (Micol et al.

2012) et de tendon bovin (Arenas da Silva et al. 2014) donnent des résultats très similaires avec un recouvrement par les cellules urothéliales de l'hôte un mois suivant la chirurgie. Malheureusement, ces modèles ont tous les mêmes types de problématiques post-opératoires: l'apparition de fistules et/ou de sténoses. Outre le type de matériel utilisé pour la fabrication des greffons, sa longueur semble directement associée à la capacité des cellules urothéliales à migrer sur sa surface interne. (Dorin et al. 2008) En effet, Dorin et al. démontrent que, dans le cas de SIS non ensemencé *in vitro*, tubularisé et greffé à l'urètre antérieur de lapin, la réépithélialisation des greffons est impossible si celui-ci mesure plus de 0.5 cm de longueur. Il est donc très intéressant de constater que nos substituts de lapin reconstruits par auto-assemblage, qui contiennent des fibroblastes à l'intérieur de la MEC mais pas de cellules urothéliales, permettent la migration urothéliale, même s'ils ont une longueur initiale de 1.5 cm. Ce biomatériau, constitué de cellules vivantes, est donc un meilleur stroma au niveau de la migration cellulaire que les SIS de porc décellularisées. Nos résultats montrent que les cellules épithéliales des lapins ont complètement recouvert la surface de la lumière des substituts 4 semaines suivant la greffe. De plus, l'organisation des cellules épithéliales ayant migrées sur les greffons est d'autant plus évoluée que l'animal a survécu longtemps après l'intervention. La visualisation des marqueurs de différenciation des cellules urothéliales aurait été nécessaire afin de déterminer avec certitude la nature des cellules épithéliales qui ont migrées sur les substituts. Des immunofluorescences dirigées contre les uroplakines seront réalisées dans un futur rapproché. De plus, l'analyse des greffons par microscopie électronique et autres techniques d'imagerie auraient permis de caractériser le niveau de différenciation des cellules épithéliales (urothéliales) par l'observation d'une plus ou moins grande quantité de vésicules fusiformes à la surface apicale des cellules superficielles. (Zupančič et al. 2014) Quoi qu'il en soit, l'inflammation créée par le contact entre l'urine et le stroma urétral devra être réduite plus précocement afin de diminuer la charge inflammatoire totale induite par la chirurgie, puis améliorer le succès des greffes.

La présence d'inflammation dans les tissus diminue avec le temps.

Au cours de l'analyse post-greffe, il fallait s'attendre à retrouver de l'inflammation dans les tissus urétraux étant donné qu'elle fait partie intégrante du processus de guérison des plaies. Néanmoins, les réactions inflammatoires résiduelles étaient de type lymphocytaires, signe que la phase aigue d'inflammation était déjà résorbée pour laisser place à l'inflammation secondaire. Les tissus reconstruits n'ont pas été rejetés, mais l'inflammation secondaire a permis d'éliminer les quelques cellules épithéliales, considérées comme du non soi, qui se logeaient dans les stromas depuis leur conception. Des analyses en immunofluorescence pourront être faites afin de valider ces résultats

observés en histologie. Quoi qu'il en soit, même si les greffes étaient de type allogénique, les fibroblastes et la matrice greffés n'ont pas été rejetés et la guérison a pu s'effectuer normalement. On attribue ce résultat au fait que le système immunitaire des lapins était confronté à une première exposition face à ces nouveaux antigènes du non-soi. (Sher et al. 1983; Hultman et al. 1996) De plus, les greffes allogéniques démontrent généralement que les fibroblastes sont peu immunogéniques et même que des fibroblastes allogènes greffés peuvent survivent 2.5 ans chez le nouvel hôte sans rejet. (Otto et al. 1995) Néanmoins, la greffe de cellules allogéniques dans des substituts dermiques provoque une augmentation de l'inflammation contrairement aux greffes autologues. (Lamme et al. 2002) On peut donc poser l'hypothèse qu'il y aura encore moins d'inflammation lorsque les greffes seront autologues, ce qui peut réduire l'apport de cellules immunitaires et une diminution de la libération de cytokines qui peuvent induire une fibrose et ensuite une sténose urétrale plus importante.

La présence de cellules épithéliales dans les tissus reconstruits pourrait provoquer des problèmes de sténoses lors de la chirurgie.

Comme il a été mentionné au Chapitre 3, les populations de cellules mésenchymateuses dermiques et vésicales de lapin n'étaient pas pures et contenaient des cellules épithéliales. Les tissus construits avec ces populations en renfermaient donc nécessairement et leur présence était même encore observée après plusieurs semaines *in vitro* (jusqu'à 7 semaines). Les tissus allogéniques greffés contenaient donc sans aucun doute des cellules épithéliales, réputées comme étant plus immunogènes que les fibroblastes lors de greffes non autologues (Hull et al. 1990; Nanchahal et al. 2002) Notre hypothèse est que les substituts urétraux de type fd, qui semblaient contenir un ratio un peu plus élevé de cellules épithéliales, ont donné des résultats moins encourageant que les substituts mix. En effet, les sténoses les plus précoces ont été observées dans les urètres reconstruits avec les substituts dermiques. Nous ne pouvons pas à cette étape, conclure sur le phénomène à l'origine de ces sténoses. Est-ce que les cellules épithéliales à l'intérieur des tissus ont induit une plus grande réaction inflammatoire conséquence des sténoses? (Stramer et al. 2007) D'une autre façon, la libération de MMP par les cellules épithéliales enchevêtrées dans les tissus pourrait compromettre la fusion des couches et ainsi diminuer les propriétés mécaniques du tissu. (Kratz et al. 1995) Une équipe a démontré que du milieu conditionné de kératinocytes diminuait l'expression de collagène par les fibroblastes dermiques. (Ghaffari et al. 2009) Lors de la phase de maturation des tubes sur les mandrins, du collagène doit être synthétisé afin de permettre le remodelage du tissu pour que les couches fusionnent ensemble. Une baisse de synthèse de collagène à cette étape pourrait rendre la fusion difficile. C'est donc pour toutes ces raisons que la présence des cellules épithéliales à

l'intérieur de la matrice de nos substituts reconstruits peut possiblement mener à l'échec d'une greffe, comme dans le cas du lapin #1.

L'ensemencement de cellules épithéliales pré-implantation pour éviter les sténoses précoces.

Les cellules urothéliales sont un problème lorsqu'elles sont éparses au centre de nos tissus, mais leur présence pourrait être très bénéfique si elles formaient un urothélium mature *in vitro* capable de contrer les attaques de l'urine envers le stroma une fois implanté *in vivo*. Effectivement, l'urine est considérée cytotoxique pour les cellules qui ne seraient pas suffisamment différenciées et donc incapables de se protéger contre elle. (Adamowicz et al. 2012) Plusieurs études démontrent que l'ensemencement de cellules urothéliales *in vitro* sur un polymère synthétique (Feng et al. 2009) ou encore sur une matrice décellularisée humaine (Fossum et al. 2007; Fossum et al. 2012) suffit pour réduire presque totalement les risques de fistule et de sténose lors de greffes chez le lapin et l'humain. Parallèlement, l'utilisation de kératinocytes de prépuce ensemencés dans la lumière de substituts urétraux de sous-muqueuse de vessie de lapin décellularisée permet d'améliorer les résultats des greffes chez le lapin, à plusieurs niveaux. (Fu et al. 2007) En effet, les greffons présentaient une meilleure vascularisation et une organisation supérieure des fibres musculaires qui les composaient lorsqu'ils étaient pré-ensemencés de kératinocytes. Cette étude chez 18 individus met en relief l'importance de protéger le greffon des agressions de l'urine pré-implantation pour éviter les sténoses et ce, même si le type d'épithélium utilisé est différent du tissu natif. Après 6 mois suivant la greffe, les cellules urothéliales prennent totalement la place de l'épithélium de prépuce, qui n'est pas fait pour résister aux conditions du système urinaire. En ce sens, il apparaît clair que l'ensemencement des cellules urothéliales à l'intérieur des substituts est la meilleure avenue à entreprendre afin d'optimiser la réussite de la greffe. La présence d'un épithélium mature, capable de contrer l'entrée de l'urine à l'intérieur du stroma matriciel, permettra une diminution du risque de fibrose caractéristique des sténoses urétrales. Si cette avenue doit être révisée, l'ensemencement de kératinocytes de peau ou de prépuce pourrait devenir une option envisageable.

Autres causes possibles de sténose.

Dans un autre ordre d'idée, il n'est pas exclu que les sténoses que nous avons repérées suite aux greffes de nos substituts urétraux soient attribuées au fait que celles-ci soient de type allogénique. En effet, des éponges de collagène ensemencées avec des fibroblastes autologues contractent moins lors de greffes sur le dos de cochon d'inde que leur équivalent allologues. (Morimoto et al. 2005) Aussi, le même phénomène est remarqué lors de greffes de peau autologue chez les grands brûlés. (Boyce et al. 1995) Il sera donc très intéressant d'éventuellement comparer le nombre de sténoses

obtenues lors de greffes allogéniques comparativement aux greffes de reconstructions urétrales autologues chez le lapin pour apprécier l'impact de l'origine des cellules utilisées pour la construction des tissus.

En général, une grande proportion des tentatives de reconstructions urétrales effectuées à partir de tissus tubularisés aboutissent à des sténoses de gravités différentes selon la méthode utilisée (Pansadoro & Emiliozzi 2002) Chez l'humain, Atala et al. ont obtenu des cas de sténoses qui étaient réversibles avec le temps ou qui n'évoluaient pas vers une sténose complète. (Raya-Rivera, Esquiliano, Yoo, Lopez-Bayghen, et al. 2011) Étant donné que les lapins ont ici été sacrifiés aussitôt qu'une sténose était détectée pour éviter le plus possible de souffrance à l'animal, il est impossible de déterminer comment aurait évolué cette complication dans le temps. De plus, avec leur modèle d'urètre fait de PGA, le cathéter doit rester en place pendant 4 semaines après la chirurgie. Un patient à qui ils avaient enlevé le cathéter après deux semaines a dû être réopéré suite à une sténose grave. Laisser le cathéter plus longtemps pour protéger les greffons est donc une autre option à envisager pour les prochaines chirurgies mais les conditions hygiéniques des lapins ont tendance à se détériorer.

Normalement, les cas de sténoses sont associés aux matrices non-ensemencées pré-implantation (Palminteri et al. 2012; Fiala et al. 2007; Gu et al. 2012; Feng 2011), il est donc surprenant de remarquer l'apparition de ces sténoses dans le modèle d'auto-assemblage qui propose une matrice enchevêtrée de cellules mésenchymateuses. L'utilisation d'additif fibrosant tels que l'adénosine (Lazzerini et al. 2012) et l'insuline (Harrison et al. 2006) pour la culture des substituts de lapin pourraient être à l'origine de ces rétrécissements prématurés de la lumière des substituts. En effet, ce phénomène n'est pas rencontré dans le modèle humain (Cattan et al. 2011), où le milieu de culture utilisé pour la phase de maturation ne contient pas ce genre d'additifs et où le diamètre des constructions demeure le même tout au long du processus. Une fois nos populations de fibroblastes bien purifiées dès le début de la culture cellulaire, une meilleure caractérisation des greffons post-implantation devra être effectuée pour démontrer s'il y a une trop grande quantité de fibrose dans les greffons par rapport au tissu natif environnant avant de déterminer si celle-ci est bel et bien une cause possible des sténoses urétrales.

La formation de lithiase dans l'urètre.

Les lithiases vésicales sont des complications très fréquentes des chirurgies d'agrandissement effectuées à l'aide de biomatériaux que ce soit d'origine synthétique (Oberpenning et al. 1999; Nuininga et al. 2004) ou naturelle. (Seth et al. 2013) Il n'est donc pas très étonnant de rencontrer cet

obstacle mineur lors de nos chirurgies. Il est important de préciser que l'urine du lapin est systématiquement alcaline (pH entre 8,0 et 8,4), qu'elle est opaque et souvent dite crémeuse lorsque comparée à de l'urine humaine. Cette caractéristique des lagomorphes est provoquée par un métabolisme du calcium différent des autres mammifères, qui engendre une charge de calcium très élevée dans les urines par un mécanisme encore mal compris. (Brown 2006) Il semble que l'absorption du calcium à travers la barrière intestinale chez le lapin n'est pas régulée de sorte que le taux de calcium sanguin peut être jusqu'à 50 % plus élevé que le taux normal pour les autres espèces animales. En contact avec les biomatériaux de remplacement, l'urine de lapin semble souvent provoquer des lithiases. Bien qu'il soit moins fréquent de retrouver une pierre au niveau de l'urètre, la présence de bouts de fils de suture à l'intérieur de la lumière pourrait être un facteur de risque de la formation de pierre (lapin #3). De plus, la consommation de nourriture déshydratée et le manque d'activité physique peuvent être d'autres facteurs de risques de faire des lithiases urinaires chez les lapins. (Proença & Mayer 2014) La supplémentation en vitamine C pourrait être envisagée afin de diminuer les risques de formation de pierre. Néanmoins, prise à temps, cette complication est mineure et facilement traitable.

Les substituts urétraux reconstruits par auto-assemblage peuvent être avantageusement comparés avec les autres biomatériaux utilisés en génie tissulaire.

Tous les types de biomatériaux ne sont pas équivalents à notre modèle de substitut urétral reconstruit par auto-assemblage puisque, la plupart du temps, leurs caractéristiques physiques et leur conception sont très différentes. Néanmoins, il est possible de soulever les points forts et les points faibles du modèle par rapport à ce qui se fait présentement en génie tissulaire.

Étant donné que l'hypospadias est une malformation congénitale qui n'est pas retrouvée chez le lapin de laboratoire, les reconstructions urétrales doivent s'effectuer à partir d'individus sains. Une équipe a donc chirurgicalement créé deux modèles de lapin ayant un hypospadias afin que d'autres puissent tester leurs différentes chirurgies de reconstruction. (Lalla et al. 2007) Ces modèles permettent d'étudier les propriétés biomécaniques et fonctionnelles des urètres avant et après les reconstructions, nous permettant de tester la fonctionnalité de nos substituts.

Au delà de toutes les caractéristiques de notre modèle, il se distingue parmi les autres grâce à son origine complètement autologue. (Les greffes préliminaires jusqu'ici effectuées étaient allogènes pour une question pratique, mais ce sont bien des greffes autologues qui sont visées.) Jusqu'à maintenant, aucune autre équipe n'a été en mesure de créer des tissus urétraux ne contenant aucune matrice exogène biologique ou synthétique. Les substituts urétraux expérimentés normalement

contiennent au minimum un échafaudage de matrice extracellulaire obtenu par la décellularisation d'une sous muqueuse d'un organe comme le petit intestin ou la vessie. Les greffes de reconstruction exécutées à l'aide de ces biomatériaux sont de types xénogénique ou allogénique. Les risques de rejet, bien que faibles, sont présents, surtout si l'on veut procéder à une intervention subséquente suite à des complications. Néanmoins, les modèles constitués de matrices décellularisées sont ceux qui se rapprochent le plus du substitut créé par la méthode d'auto-assemblage du point de vue de l'organisation de la structure matricielle qui est très ressemblante au tissu natif. La réticulation des fibres de collagène et la présence de facteurs de croissance séquestrés à l'intérieur de celles-ci sont entre autre, des facteurs à ne pas négliger dans la création d'un environnement propice pour les cellules qui y sontensemencées. Lorsque la méthode d'auto-assemblage est utilisée, étant donné que les cellules produisent et organisent la MEC qui les entourent, nous sommes assurés d'obtenir une organisation optimale et physiologique des composantes du tissu. Cette caractéristique unique permet une meilleure signalisation moléculaire entre les cellules et la matrice, permettant une migration optimale des cellules de l'hôte dans le tissu lors de l'implantation. (Sutherland et al. 1996; Lee et al. 2014)

Certaines équipes ont tenté l'utilisation de matériaux synthétiques pour la reconstruction de substituts urétraux. (Atala 2011; Olsen et al. 1992) Les résultats obtenus chez les humains ne sont pas mauvais, mais aucune autre étude de reconstruction urétrale n'a été réalisée avec ce type de biomatériau depuis 2011. Le défi majeur avec ce genre de polymère (PGLA) est de créer un échafaudage propice à la migration cellulaire, afin que le néo-tissu soit complètement colonisé par les cellulesensemencées à l'intérieur avant la greffe ou encore bien vascularisé après la greffe. C'est un biomatériau approuvé par la FDA pour sa biocompatibilité et sa biodégradabilité (Astete & Sabliov 2006) ce qui ne veut pas dire qu'il est le meilleur échafaudage pour la reconstruction d'organe. C'est pourquoi certains tentent d'améliorer la migration des cellules épithéliales sur ce genre d'échafaudage en le recouvrant de collagène. (Rho et al. 2006) Notre tissu urologique a l'avantage d'être déjà un environnement propice pour les cellules fibroblastiques qui le colonisent et ne nécessite pas d'optimisation de ce côté là, puisque la matrice produite est tout à fait naturelle. Cependant, les biomatériaux synthétiques sont plus reproductibles au niveau de leur aspect macroscopique que les tissus reproduits par auto-assemblage puisque leur conception peut être automatisée. Une équipe du Japon a réussi à créer un procédé automatique permettant de produire des tissus plans par technique d'auto-assemblage, mais l'adaptation de cette technique pour la conception de structures tubulaires n'est pas pour aujourd'hui (Owaki et al. 2014) De plus, le temps de production est moins long pour les biomatériaux synthétiques et ils peuvent être entreposés.

Néanmoins, toutes ces caractéristiques intéressantes ne surpassent pas l'avantage d'être autologue, sans matériau exogène et sans risque de toxicité lors du remodelage de la matrice par le corps de l'hôte. La production des tissus urologiques par auto-assemblage est certes longue, mais c'est en améliorant la technique de culture qu'il est possible de réduire les délais avant la greffe et ce mémoire est la preuve de l'avancement de ces travaux.

Une dernière caractéristique vraiment importante que possède ce substitut urétral reconstruit par auto-assemblage est sa grande résistance aux contraintes mécaniques. La plupart des biomatériaux naturels issus de matrices décellularisées ont des capacités mécaniques faibles puisque les techniques utilisées pour retirer les cellules des tissus modifient la structure voir la composition de la MEC. (Reing et al. 2010) De plus, ces tissus sont très minces et donc difficiles à suturer avec les tissus natifs. La même problématique est retrouvée avec l'utilisation des gels de collagène qui ont des caractéristiques intéressantes pour la migration cellulaire, mais qui ont une résistance mécanique très faible. Par exemple, les tissus greffés sur nos lapins, maturés pendant seulement 3 semaines, sont 20 fois plus résistants que les hydrogels de collagènes utilisés par Micol et al. (Micol et al. 2012) De plus, ces propriétés physiques permettent d'éviter l'apparition des fistules, une complication importante souvent retrouvée avec les biomatériaux de faible résistance mécanique.

Pour toutes ces raisons, le modèle d'urètre reconstruit par auto-assemblage chez le lapin est un substitut avec un grand potentiel chirurgical qui porte à croire qu'il est un biomatériau ayant beaucoup d'avenir dans le génie tissulaire et la reconstruction de tissus urologiques. Il y a certainement du travail à effectuer afin que les greffes chez le lapin soient autologues. Suite à l'amélioration des techniques d'extraction cellulaire, lorsque les populations cellulaires seront davantage pures, les greffes autologues pourront être effectuées sans risque pour les lapins. Tous risques d'inflammation inutiles seront éliminés pour laisser place à un greffon complètement autologue, sans biomatériau exogène, étant le plus représentatif de la réalité avec un stroma urétral et un urothélium mature à l'intérieur. Les essais précliniques à long terme pourront alors être débutés chez le lapin.

Conclusion

L'hypothèse de ce projet de recherche était basée sur la possibilité de produire, par la méthode d'auto-assemblage, un tissu à partir de cellules de lapin qui permettrait de construire des substituts urétraux et de prouver la faisabilité de la greffe de ce substitut chez le lapin. Cette dernière a effectivement été vérifiée puisque premièrement, l'auto-assemblage peut permettre de produire un tissu de lapin et deuxièmement, il a été greffé. Bien qu'il ait fallu beaucoup d'efforts pour améliorer la méthode de culture de cellules d'origine lagomorphe pour obtenir des substituts qui se rapprochaient de ceux créés par les cellules humaines, l'aptitude qu'a ce modèle à être greffé chez le lapin confirme notre succès. Le fait de procéder à une greffe de reconstruction urétrale circumférentielle complète chez le lapin démontre le potentiel chirurgical du tissu reconstruit par la méthode d'auto-assemblage.

Il est important de mentionner qu'au départ de ce projet, il nous était impossible de produire les tissus conjonctifs par la technique d'auto-assemblage à partir de cellules mésenchymateuses de lapin. Maintenant, avec une adaptation de la méthode et beaucoup de travail, il nous a été possible de greffer ces tissus chez quatre lapins afin de prouver la fonctionnalité de ceux-ci.

L'optimisation de la technique par l'utilisation des cellules mésenchymateuses vésicales et l'ajout dans le milieu de culture de l'insuline et de l'adénosine s'est concrétisée par la réduction du temps de production des substituts d'environ deux semaines. L'apport des cellules vésicales de lapin nous permet aussi de conserver un temps de maturation des tubes de trois semaines, ce qui n'est pas encore possible avec les cellules dermiques de lapin, cellules de base du modèle d'urètre reconstruit humain. Avec ces améliorations considérables, le coût de la méthode est diminué et les lapins peuvent être greffés plus rapidement.

En définitive, même si le projet a beaucoup cheminé, un travail considérable reste à faire car il en est encore à ses tous premiers développements. L'amélioration du rendement des extractions primaires, la purification des populations standards de cellules, ainsi que la caractérisation des cellules provenant des sources complémentaires, sont les trois premières étapes à entreprendre avant de continuer l'amélioration des substituts en tant que telle. Il faudra ensuite trouver les bonnes concentrations d'additifs à ajouter aux cultures ou trouver d'autres produits encore plus efficaces. Les feuillets devront être amincis, tout en conservant les mêmes propriétés mécaniques, afin d'éviter le développement d'une nécrose lorsque l'on conserve les substituts en culture au delà de trois semaines. Il faudra améliorer la fusion des feuillets de MEC qui composent les tubes et réussir à

ensemencer les cellules urothéliales de lapin à l'intérieur avant l'implantation. Les chirurgies ont déjà permis d'envisager les différentes embuches à prévoir pour la suite. Il serait très intéressant de trouver une méthode pour garder les cathéters plus longtemps en place pour protéger les plaies, tout en permettant au lapin d'avoir une hygiène convenable pendant ce temps. De plus, la grosseur des fils de sutures devra être revue pour éviter les lithiases urétrales. À long terme, toutes ces améliorations permettront d'obtenir les meilleurs résultats de greffes possibles en utilisant ces tissus urétraux reconstruits par auto-assemblage. Même si jusqu'à maintenant il est raisonnable de croire que ce modèle a un grand avenir dans le génie tissulaire, il est important de le perfectionner jusqu'à ce que l'on soit satisfait au point de le greffer à une grande cohorte de lapin et pour un suivi à long terme de plus de six mois. Ensuite, la voie vers les études cliniques chez des patients humains sera ouverte pour le futur de ce modèle prometteur.

Bibliographie

- Acharya, P. et al., 2004. Distribution of the tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudin-4, -8, and -12 in bladder epithelium. *American journal of physiology. Renal physiology*, 287, pp.305–318.
- Adamowicz, J. et al., 2012. Urine is a highly cytotoxic agent: Does it influence stem cell therapies in urology? *Transplantation Proceedings*, 44, pp.1439–1441.
- Van Agtmael, T. & Bruckner-Tuderman, L., 2010. Basement membranes and human disease. *Cell and Tissue Research*, 339, pp.167–188.
- Aitken, K.J. & Bāgli, D.J., 2009. The bladder extracellular matrix. Part I: architecture, development and disease. *Nature reviews. Urology*, 6, pp.596–611.
- Ajallouelian, F. et al., 2014. Constructs of electrospun PLGA, compressed collagen and minced urothelium for minimally manipulated autologous bladder tissue expansion. *Biomaterials*, 35(22), pp.5741–5748.
- Alonso, A., Iking, U. & Kartenbeck, J., 2009. Staining patterns of keratins in the human urinary tract. *Histology and histopathology*, 24(11), pp.1425–1437.
- Anderson, D.E.J. & Hinds, M.T., 2012. Extracellular matrix production and regulation in micropatterned endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 427(1), pp.159–64.
- Apodaca, G., 2004. The uroepithelium: Not just a passive barrier. *Traffic*, 5, pp.117–128.
- Arenas da Silva, F.L. et al., 2014. Is There a Need for Smooth Muscle Cell Transplantation in Urethral Reconstruction? *Tissue engineering. Part A*, 20(9-10), pp.1542–1549.
- Ashcroft, G., Horan, M. & Ferguson, M.W.J., 1995. The effects of ageing on cutaneous wound healing in mammals. *Journal of anatomy*, 187, pp.1–26.
- Ashcroft, G.S. et al., 1997. Estrogen accelerates cutaneous wound healing associated with an increase in TGF-beta1 levels. *Nature medicine*, 3(11), pp.1209–1215.
- Ashcroft, G.S. et al., 1999. Topical Estrogen Accelerates Cutaneous Wound Healing in Aged Humans Associated with an Altered Inflammatory Response. *American journal of pathology*, 155(4), pp.1137–1146.
- Astete, C. & Sabliov, C., 2006. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *Journal of Biomaterials Science, Polymer ...*, 17, pp.247–289.
- Atala, A., 2011. Tissue engineering of human bladder. *British Medical Bulletin*, 97, pp.81–104.
- Atala, A. et al., 2006. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet*, 367(9518), pp.1241–1246.

- Atala, A., Guzman, L. & Retik, A.B., 1999. A novel inert collagen matrix for hypospadias repair. In *Journal of Urology*. pp. 1148–1151.
- Auger, F.A., 2002. A truly new approach for tissue engineering: the LOEX self-assembly technique. *ernest Schering FoundWorkShop*, 35, pp.73–88.
- Auger, F.A. et al., 1995. Skin equivalent produced with human collagen. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, 31, pp.432–439.
- Auger, F.A. et al., 2004. Tissue-engineered skin substitutes: from in vitro constructs to in vivo applications. *Biotechnology and applied biochemistry*, 39, pp.263–275.
- Badadani, M., Sureshbabu, S. V & Shetty, K.T., 2007. Optimum conditions of autoclaving for hydrolysis of proteins and urinary peptides of prolyl and hydroxyprolyl residues and HPLC analysis. *Journal of chromatography B*, 847, pp.267–274.
- Bailey, A.J., Robins, S.P. & Bailian, G., 1974. Biological significance of the intermolecular crosslinks of collagen. *Nature*, 251, pp.105–109.
- Baker, S.C. et al., 2009. The relationship between the mechanical properties and cell behaviour on PLGA and PCL scaffolds for bladder tissue engineering. *Biomaterials*, 30, pp.1321–1328.
- Barbagli, G. et al., 2014. Prediction of early and late complications after oral mucosal graft harvesting: multivariable analysis from a cohort of 553 consecutive patients. *The Journal of urology*, 191(3), pp.688–693.
- Baskin, L.S. et al., 1996. Role of mesenchymal–epithelial interactions in normal bladder development. *The Journal of urology*, 156, pp.1820–1827.
- Baskin, L.S., Himes, K. & Colborn, T., 2001. Hypospadias and endocrine disruption: is there a connection? *Environmental health perspectives*, 109, pp.1175–1183.
- Batourina, E. et al., 2005. Apoptosis induced by vitamin A signaling is crucial for connecting the ureters to the bladder. *Nature genetics*, 37, pp.1082–1089.
- Becker, U. et al., 1975. Non-Helical Sequences of Rabbit Collagen. *European journal of biochemistry*, 54, pp.359–366.
- Berthod, F. et al., 2012. Spontaneous fibroblast-derived pericyte recruitment in a human tissue-engineered angiogenesis model in vitro. *Journal of cellular physiology*, 227(5), pp.2130–2137.
- Bharadwaj, S. et al., 2013. Multi-Potential Differentiation of Human Urine-Derived Stem Cells : Potential for Therapeutic Applications in Urology. *Stem cells*, 9, pp.1840–1856.
- Bhargava, S. et al., 2008. Tissue-engineered buccal mucosa urethroplasty-clinical outcomes. *European urology*, 53(6), pp.1263–9.
- Birder, L.A., 2013. Nervous network for lower urinary tract function. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association*, 20(1), pp.4–12.

- Bishop, J.R., Schuksz, M. & Esko, J.D., 2007. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature*, 446, pp.1030–1037.
- Bisson, F. & Rochefort, É., 2013. Irradiated Human Dermal Fibroblasts Are as Efficient as Mouse Fibroblasts as a Feeder Layer to Improve Human Epidermal Cell Culture Lifespan. *international journal of molecular sciences*, 14, pp.4684–4704.
- Bjork, J.W. et al., 2012. Hypoxic Culture and Insulin Yield Improvements to Fibrin-Based Engineered Tissue. *Tissue engineering. Part A*, 18(7-8), pp.785–795.
- Blakeman, P.J., Hilton, P. & Bulmer, J.N., 2000. Oestrogen and progesterone receptor expression in the female lower urinary tract, with reference to oestrogen status. *B*, 86, pp.32–38.
- Bornstein, P., Agah, A. & Kyriakides, T.R., 2004. The role of thrombospondins 1 and 2 in the regulation of cell-matrix interactions, collagen fibril formation, and the response to injury. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36, pp.1115–1125.
- Bornstein, P. & Nesse, R., 1970. The Comparative Biochemistry of Collagen: The Structure of Rabbit Collagen and its relevance to immunochemical studies of collagen. *Archives of biochemistry and biophysics*, 138, pp.443–450.
- Bottai, G. et al., 2013. 17 β -Estradiol Protects Human Skin Fibroblasts and Keratinocytes Against Oxidative Damage. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*, 27(10), pp.1236–43.
- Bouhout, S. et al., 2011. Bladder substitute reconstructed in a physiological pressure environment. *Journal of Pediatric Urology*, 7, pp.276–282.
- Bouhout, S. et al., 2013. From Bench to Patients: Advances in Genitourinary Regenerative Medicine chapitre2013. In R. R. SINGH, ed. *Handbook of genitourinary medicine new research*. New York: Nova Science Publishers, Inc, pp. 69–95.
- Bouhout, S. et al., 2010. In Vitro Reconstruction of an Autologous, Watertight, and Resistant Vesical Equivalent. *Tissue engineering. Part A*, 16(5), pp.1539–1548.
- Bourget, J.-M. et al., 2012. Human fibroblast-derived ECM as a scaffold for vascular tissue engineering. *Biomaterials*, 33(36), pp.9205–9213.
- Boyce, S.T. et al., 1995. Comparative assessment of cultured skin substitutes and native skin autograft for treatment of full-thickness burns. *Annals of surgery*, 222(6), pp.743–52.
- Brodsky, B. & Persikov, A. V, 2005. Molecular structure of the collagen triple helix. *Advances in protein chemistry*, 70(04), pp.302–333.
- Brown, A.L. et al., 2005. Bladder acellular matrix as a substrate for studying in vitro bladder smooth muscle – urothelial cell interactions. *Biomaterials*, 26, pp.529–543.
- Brown, S., 2006. Bladder Stones and Bladder Sludge in Rabbits. *House rabbit society*.

- Burdick, J.A. & Vunjak-Novakovic, G., 2009. Engineered microenvironments for controlled stem cell differentiation. *Tissue engineering. Part A*, 15, pp.205–219.
- Caione, P., 2009. Prevalence of Hypospadias in European Countries : Is It Increasing? *European Urology*, 55, pp.1027–1029.
- Caldamone, A.A. et al., 1998. Buccal mucosal grafts for urethral reconstruction. *Urology*, 51, pp.15–19.
- Cao, M. et al., 2009. Urothelium Patterns Bladder Smooth Muscle Location. *Pediatric Research*, 64(4), pp.352–357.
- Carletti, E., Motta, A. & Migliaresi, C., 2011. Scaffolds for tissue engineering and 3D cell culture. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 695, pp.17–39.
- Carrier, P. et al., 2009. Impact of cell source on human cornea reconstructed by tissue engineering. *Investigative ophthalmology & visual science*, 50, pp.2645–2652.
- Castelino, F. V. et al., 2011. Amelioration of dermal fibrosis by genetic deletion or pharmacologic antagonism of lysophosphatidic acid receptor 1 in a mouse model of scleroderma. *Arthritis and Rheumatism*, 63(5), pp.1405–1415.
- Cattan, V. et al., 2011. Mechanical Stimuli-induced Urothelial Differentiation in a Human Tissue-engineered Tubular Genitourinary Graft. *European Urology*, pp.1–8.
- Ceonzo, K. et al., 2006. Polyglycolic acid-induced inflammation: role of hydrolysis and resulting complement activation. *Tissue engineering*, 12, pp.301–308.
- Chabaud, S. et al., 2011. Decreased secretion of MMP by non-lesional late-stage scleroderma fibroblasts after selection via activation of the apoptotic fas-pathway. *Journal of Cellular Physiology*, 226, pp.1907–1914.
- Chabaud, S. et al., 2013. Lysophosphatidic acid enhances collagen deposition and matrix thickening in engineered tissue. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, Online.
- Chabaud, S. & Moulin, V.J., 2011. Apoptosis modulation as a promising target for treatment of systemic sclerosis. *International Journal of Rheumatology*, 2011, pp.1–13.
- Chamorro, C.I. et al., 2014. A study on proliferation and gene expression in normal human urothelial cells in culture. *Tissue engineering. Part A*, Online, pp.1–43.
- Chang, S.L. et al., 1998. Role of Type III Collagen in Bladder Filling. *Neurourology and Urodynamics*, 17, pp.135–145.
- Chapple, C.R., Osman, N. & Macneil, S., 2013. Developing Tissue-Engineered Solutions for the Treatment of Extensive Urethral Strictures. *European Urology*, 63, pp.539–541.
- Chen, F., Yoo, J.J. & Atala, A., 2000. Experimental and clinical experience using tissue regeneration for urethral reconstruction. *World journal of urology*, 18, pp.67–70.

- Choi, S. et al., 2012. Short-term nanostructural effects of high radiofrequency treatment on the skin tissues of rabbits. *Lasers in medical science*, 27(5), pp.923–33.
- Chun, S.Y. et al., 2007. Identification and characterization of bioactive factors in bladder submucosa matrix. *Biomaterials*, 28, pp.4251–4256.
- Chung, Y.G. et al., 2014. Acellular bi-layer silk fibroin scaffolds support tissue regeneration in a rabbit model of onlay urethroplasty. *PloS one*, 9(3), pp.1–7.
- Cook, A.D. et al., 1997. Characterization and development of RGD-peptide-modified poly(lactic acid-co-lysine) as an interactive, resorbable biomaterial. In *Journal of Biomedical Materials Research*. pp. 513–523.
- Corriveau, M.P. et al., 2009. The fibrotic phenotype of systemic sclerosis fibroblasts varies with disease duration and severity of skin involvement: Reconstitution of skin fibrosis development using a tissue engineering approach. *Journal of Pathology*, 217, pp.534–542.
- Cross, W.R. et al., 2005. A biomimetic tissue from cultured normal human urothelial cells : analysis of physiological function. *American journal of renal physiology*, 289, pp.459–468.
- Culav, E.M. et al., 1999. Connective tissues: matrix composition and its relevance to physical therapy. *Physical therapy*, 79, pp.308–319.
- Dass, N., McMurray, G. & Brading, a F., 1999. Elastic fibres in the vesicourethral junction and urethra of the guinea pig: quantification with computerised image analysis. *Journal of anatomy*, 195, pp.447–453.
- Davidson, J.M. et al., 1997. Ascorbate Differentially Regulates Elastin and Collagen Biosynthesis in Vascular Smooth Muscle Cells and Skin Fibroblasts by Pretranslational Mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 272(1), pp.345–352.
- Davies, D.J., Ward, R.J. & Heylings, J.R., 2004. Multi-species assessment of electrical resistance as a skin integrity marker for in vitro percutaneous absorption studies. *Toxicology in vitro*, 18(3), pp.351–358.
- Desmoulière, A., Chaponnier, C. & Gabbiani, G., 2005. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair and Regeneration*, 13, pp.7–12.
- Donkov, I.I. et al., 2006. Dorsal onlay augmentation urethroplasty with small intestinal submucosa: Modified Barbagli technique for strictures of the bulbar urethra. *International Journal of Urology*, 13, pp.1415–1417.
- Dorin, R.P. et al., 2008. Tubularized urethral replacement with unseeded matrices: what is the maximum distance for normal tissue regeneration? *World journal of urology*, 26, pp.323–326.
- Dube, J. et al., 2010. Restoration of the transepithelial potential within tissue-engineered human skin in vitro and during the wound healing process in vivo. *Tissue engineering. Part A*, 16(10), pp.3055–3063.

- Dublin, N. & Stewart, L.H., 2004. Oral complications after buccal mucosal graft harvest for urethroplasty. *BJU International*, 94, pp.867–869.
- Dunning-Davies, B.M. et al., 2013. The regulation of ATP release from the urothelium by adenosine and transepithelial potential. *BJU international*, 111(3), pp.505–513.
- El-Kassaby, A., AbouShwareb, T. & Atala, A., 2008. Randomized comparative study between buccal mucosal and acellular bladder matrix grafts in complex anterior urethral strictures. *The Journal of urology*, 179(4), pp.1432–1436.
- Fan, D. et al., 2012. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis & tissue repair*, 5(1), pp.1–13.
- Farrokhyar, F. et al., 2010. Randomized controlled trials of surgical interventions. *Annals of surgery*, 251(3), pp.409–416.
- Feil, G. et al., 2006. Investigations of Urothelial Cells Seeded on Commercially Available Small Intestine Submucosa. *European Urology*, 50, pp.1330–1337.
- Feng, C. et al., 2009. Evaluation of the biocompatibility and mechanical properties of naturally derived and synthetic scaffolds for urethral reconstruction. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 94(1), pp.317–325.
- Feng, C., 2011. Reconstruction of Three-Dimensional Neourethra Using Lingual Keratinocytes and Corporal Smooth Muscle. *Tissue engineering. Part A*, 17(23-24).
- Fernandes, D.J., Bonacci, J. V & Stewart, A.G., 2006. Extracellular matrix, integrins, and mesenchymal cell function in the airways. *Current drug targets*, 7, pp.567–577.
- Fiala, R. et al., 2007. Porcine small intestinal submucosa graft for repair of anterior urethral strictures. *European urology*, 51(6), pp.1702–1708.
- De Filippo, R.E. et al., 2012. Penile urethra replacement with autologous cell-seeded tubularized collagen matrices. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, Online.
- De Filippo, R.E., Yoo, J.J. & Atala, A., 2002. Urethral replacement using cell seeded tubularized collagen matrices. *The Journal of urology*, 168, pp.1789–1793.
- Firth, A. & Hicks, R.M., 1973. Interspecies variation in the fine structure and enzyme cytochemistry of mammalian transitional epithelium Electron microscopy Enzyme cytochemistry. *Journal of anatomy*, 116(1), pp.31–43.
- Fleischmajer, R. et al., 1990. Dermal collagen fibrils are hybrids of type I and type III collagen molecules. *Journal of structural biology*, 105((1-3), pp.162–169.
- Fortier, G.M. et al., 2013. Dynamic culture induces a cell type-dependent response impacting on the thickness of engineered connective tissues. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 7, pp.292–301.

- Fossum, M. et al., 2007. Autologous in vitro cultured urothelium in hypospadias repair {star, open}. *Journal of Pediatric Urology*, 3, pp.10–18.
- Fossum, M. et al., 2012. Prepubertal follow-up after hypospadias repair with autologous in vitro cultured urothelial cells. *Acta paediatrica*, 101, pp.755–760.
- Fossum, M. & Lundberg, F., 2005. Long-Term Culture of Human Urothelial Cells – A Qualitative Analysis. *Cells, tissues, organs*, 181, pp.11–22.
- Fossum, M. & Nordenskjöld, A., 2010. Tissue-engineered transplants for the treatment of severe hypospadias. *Hormone research in paediatrics*, 73(2), pp.148–152.
- Fraser, R.D., MacRae, T.P. & Suzuki, E., 1979. Chain conformation in the collagen molecule. *Journal of molecular biology*, 129(3), pp.463–481.
- Fu, Q. et al., 2007. Urethral replacement using epidermal cell-seeded tubular acellular bladder collagen matrix. *BJU International*, 99, pp.1162–1165.
- Fu, W.-J. et al., 2009. Biodegradable urethral stents seeded with autologous urethral epithelial cells in the treatment of post-traumatic urethral stricture: a feasibility study in a rabbit model. *BJU international*, 104(2), pp.263–268.
- Gandhi, D. et al., 2013. Retinoid signaling in progenitors controls specification and regeneration of the urothelium. *Developmental cell*, 26(5), pp.469–482.
- Garcia-España, A. et al., 2006. Origin of the tetraspanin uroplakins and their co-evolution with associated proteins: Implications for uroplakin structure and function. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41, pp.355–367.
- Garriboli, M., Radford, A. & Southgate, J., 2014. Regenerative Medicine in Urology. *European journal of pediatric surgery*, Online, pp.1–10.
- Gartner, L.P. & Hiatt, J. baltimor., 2006. *Color atlas of histology 4th ed* Lippincott.,
- Gauvin, R. et al., 2011. Comparative study of bovine, porcine and avian collagens for the production of a tissue engineered dermis. *Acta Biomaterialia*, 7(9), pp.3294–3301.
- Gee, E.P.S., Ingber, D.E. & Stultz, C.M., 2008. Fibronectin unfolding revisited: modeling cell traction-mediated unfolding of the tenth type-III repeat. *PloS one*, 3(6), p.e2373.
- Geesin, J.C. et al., 1988. Ascorbic acid specifically increases type I and type III procollagen messenger RNA levels in human skin fibroblast. *The Journal of investigative dermatology*, 90, pp.420–424.
- Geller, F. et al., 2014. Genome-wide association analyses identify variants in developmental genes associated with hypospadias. *Nature genetics*.
- Gelse, K., Poschl, E. & Aigner, T., 2003. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Advanced drug delivery reviews*, 55, pp.1531–1546.

- Germain, L. et al., 1993. Improvement of human keratinocyte isolation and culture using thermolysin. *Burns*, 19, pp.99–104.
- Ghaffari, A., Kilani, R.T. & Ghahary, A., 2009. Keratinocyte-conditioned media regulate collagen expression in dermal fibroblasts. *The Journal of investigative dermatology*, 129, pp.340–347.
- Gilliver, S.C., Ashworth, J.J. & Ashcroft, G.S., 2007. The hormonal regulation of cutaneous wound healing. *Clinics in dermatology*, 25(1), pp.56–62.
- Gingras, M., Paradis, I. & Berthod, F., 2003. Nerve regeneration in a collagen-chitosan tissue-engineered skin transplanted on nude mice. *Biomaterials*, 24, pp.1653–1661.
- Grinnell, F. et al., 1989. Collagen processing, crosslinking, and fibril bundle assembly in matrix produced by fibroblasts in long-term cultures supplemented with ascorbic acid. *Experimental cell research*, 181, pp.483–491.
- Gu, G.L. et al., 2012. Tubularized urethral replacement using tissue-engineered peritoneum-like tissue in a rabbit model. *Urologia Internationalis*, 89, pp.358–364.
- Hardingham, T.E. & Fosang, A.J., 1992. Proteoglycans: many forms and many functions. *The FASEB journal*, 6, pp.861–870.
- Harrison, C. a et al., 2006. Investigation of keratinocyte regulation of collagen I synthesis by dermal fibroblasts in a simple in vitro model. *The British journal of dermatology*, 154(3), pp.401–10.
- Hasetine, W., 1999. A brave new medicine. A conversation with William Haseltine. Interview by Joe Flower. *Health forum J.*, 42(4), pp.28–30, 61–65.
- Hata, R. & Senoo, H., 1989. L-ascorbic acid 2-phosphate stimulates collagen accumulation, cell proliferation, and formation of a three-dimensional tissuelike substance by skin fibroblasts. *Journal of cellular physiology*, 138, pp.8–16.
- Hauser, S. et al., 2006. Small intestine submucosa in urethral stricture repair in a consecutive series. *Urology*, 68, pp.263–266.
- Hérault, M. et al., 2004. Heparin affin regulatory peptide binds to vascular endothelial growth factor (VEGF) and inhibits VEGF-induced angiogenesis. *Oncogene*, 23(9), pp.1745–1753.
- Hicks, R.M., 1965. The fine structure of the transitional epithelium of rat ureter. *The Journal of cell biology*, 26, pp.25–48.
- Hill, G.A., Lewis, A.G. & Sheldon, C.A., 1994. A rabbit model of free bladder mucosal grafting in a damaged urethral bed. *The Journal of urology*, 152, pp.983–986.
- Hodde, J.P. et al., 2001. Vascular endothelial growth factor in porcine-derived extracellular matrix. *Endothelium*, 8, pp.11–24.
- Hohenester, E. & Yurchenco, P.D., 2013. Laminins in basement membrane assembly. *Cell adhesion & migration*, 7, pp.56–63.

- Holmes, N.M., Miller, W.L. & Baskin, L.S., 2004. Lack of defects in androgen production in children with hypospadias. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 89(6), pp.2811–6.
- Hubbell, J.A., 2003. Materials as morphogenetic guides in tissue engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 14, pp.551–558.
- Hudoklin, S. et al., 2011. Urothelial Plaque Formation in Post-Golgi Compartments. *PloS one*, 6(8), pp.1–10.
- Hull, B.E., Finley, R.K. & Miller, S.F., 1990. Coverage of full-thickness burns with bilayered skin equivalents: a preliminary clinical trial.,
- Hulmes, D.. & Miller, A., 1981. Molecular packing in collagen.pdf. *Nature*, 293, pp.239–240.
- Hultman, C.S. et al., 1996. Allogeneic fibroblasts used to grow cultured epidermal autografts persist in vivo and sensitize the graft recipient for accelerated second-set rejection. *The Journal of trauma*, 41, pp.51–58; discussion 58–60.
- Hurst, R.E. & Bonner, R.B., 2001. Mapping of the distribution of significant proteins and proteoglycans in small intestinal submucosa by fluorescence microscopy. *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 12, pp.1267–1279.
- Imbeault, A. et al., 2013. An endothelialized urothelial cell-seeded tubular graft for urethral replacement. *Canadian urology association journal*, 7(1), pp.4–9.
- Imbeault, A. et al., 2011. Surgical Option for the Correction of Peyronie ' s Disease : *International Society for Sexual Medicine*, 8, pp.3227–3235.
- In Jeong, S. et al., 2004. Morphology of elastic poly(L-lactide-co-caprolactone) copolymers and in vitro and in vivo degradation behavior of their scaffolds. *Biomacromolecules*, 5, pp.1303–1309.
- Ishikawa, O. et al., 1997. Morphological and biochemical analyses on fibroblasts and self-produced collagens in a novel three-dimensional culture. *The British journal of dermatology*, 136, pp.6–11.
- Ito, A., Uoji, H. & Mori, Y., 1985. An enzymatic estimation of free hydroxyproline in tissue hydrolysates. *Analytical biochemistry*, 151, pp.510–514.
- Jean, J. et al., 2009. Development of an in vitro psoriatic skin model by tissue engineering. *Journal of Dermatological Science*, 53, pp.19–25.
- Jones. J. C. R., 2001. Hemidesmosomes in bladder epithelial cells. *Urology*, 57(1), p.103.
- Kalfa, N. et al., 2008. Genomic variants of ATF3 in patients with hypospadias. *The Journal of urology*, 180(5), pp.2183–2188.

- Kato, S. et al., 2013. Distinctive collagen maturation process in fibroblasts derived from rabbit anterior cruciate ligament, medial collateral ligament, and patellar tendon in vitro. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA*.
- Keira, S.M. et al., 2004. Experimental model for collagen estimation in cell culture. *Acta Cirurgica Brasileira*, 19, pp.18–22.
- Kim, B.S., 2000. Biomaterials for tissue engineering. *World journal of urology*, 18, pp.2–9.
- Kirk, J.J.F. et al., 2013. Mechanical and biocompatible characterization of a cross-linked collagen-hyaluronic acid wound dressing. *Biomatter*, 3, pp.1–14.
- Kivirikko, K.I. & Myllyharju, J., 1998. Prolyl 4-hydroxylases and their protein disulfide isomerase subunit. *Matrix Biology*, 16, pp.357–368.
- Klip, H. et al., 2002. Hypospadias in sons of women exposed to diethylstilbestrol in utero: A cohort study. *Lancet*, 359, pp.1102–1107.
- Koch, M. et al., 2004. A novel marker of tissue junctions, collagen XXII. *The Journal of biological chemistry*, 279(21), pp.22514–22521.
- Koláčná, L. et al., 2007. Biochemical and biophysical aspects of collagen nanostructure in the extracellular matrix. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 56, pp.S51–S60.
- Koss, L., 1969. The asymmetric unit membranes of the epithelium of the urinary bladder of the rat. An electron microscopic study of a mechanism of epithelial maturation and function. *Laboratory investigation*, 2, pp.54–68.
- Kratz, G. et al., 1995. Keratinocyte conditioned medium stimulates type IV collagenase synthesis in cultured human keratinocytes and fibroblasts. *The British journal of dermatology*, 133, pp.842–846.
- Kreft, M.E., Sterle, M. & Jezernik, K., 2006. Distribution of junction- and differentiation-related proteins in urothelial cells at the leading edge of primary explant outgrowths. *Histochemistry and Cell Biology*, 125, pp.475–485.
- Kropp, B.P. et al., 1998. Rabbit urethra regeneration using small intestinal submucosa onlay grafts. *Urology*, 52(1), pp.138–142.
- L'heureux, N. et al., 1998. A completely biological tissue-engineered human blood. *FASEB journal*, 12, pp.47–56.
- L'heureux, N. et al., 2001. A human tissue-engineered vascular media: a new model for pharmacological studies. *The FASEB journal*, 15, pp.515–524.
- Labbé, B., Marceau-Fortier, G. & Fradette, J., 2011. Cell sheet technology for tissue engineering: the self-assembly approach using adipose-derived stromal cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 702, pp.429–441.

- Lalla, M. et al., 2007. Biomechanical and Biochemical Assessment of Properties of the Anterior Urethra After Hypospadias Repair in a Rabbit Model. *The Journal of urology*, 177(June), pp.2375–2380.
- Lamme, E.N. et al., 2002. Allogeneic fibroblasts in dermal substitutes induce inflammation and scar formation. *Wound Repair and Regeneration*, 10, pp.152–160.
- Larsson, H.M. et al., 2014. Clonal, self-renewing and differentiating human and porcine urothelial cells, a novel stem cell population. *PloS one*, 9(2), pp.1–12.
- Laterreur, V. et al., 2014. Comparison of the direct burst pressure and the ring tensile test methods for mechanical characterization of tissue-engineered vascular substitutes. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 34, pp.253–263.
- Lavoie, A. et al., 2013. Human epithelial stem cells persist within tissue-engineered skin produced by the self-assembly approach. *Tissue engineering. Part A*, 19(7-8), pp.1023–38.
- Lazzerini, P.E. et al., 2012. Adenosine A2A receptor activation stimulates collagen production in sclerodermic dermal fibroblasts either directly and through a cross-talk with the cannabinoid system. *Journal molecular medicine*, 90, pp.331–342.
- Lee, B. et al., 2014. A Three-Dimensional Computational Model of Collagen Network Mechanics. *PloS one*, 9(11), p.e111896.
- Leroi, A. & Normand, L.L.E., 2005. Physiologie de l'appareil sphinctérien urinaire et anal pour la continence. *Progres en urologie*, 123, pp.1–32.
- Lewis, S.A. & Diamond, J.M., 1976. Na⁺ transport by rabbit urinary bladder, a tight epithelium. *The Journal of Membrane Biology*, 28, pp.1–40.
- Li, C.L. et al., 2013. Urethral reconstruction using bone marrow mesenchymal stem cell- and smooth muscle cell-seeded bladder acellular matrix. *Transplantation proceedings*, 45(9), pp.3402–7.
- Liang, F.-X. et al., 2005. Cellular basis of urothelial squamous metaplasia: roles of lineage heterogeneity and cell replacement. *The Journal of cell biology*, 171(5), pp.835–844.
- Lin, J. et al., 2005. Homologous dermal acellular matrix graft for urethral reconstruction in man (report of 16 cases). *Zhonghua yi xue za zhi*, 85, pp.1057–1059.
- Lorentz, K.M. et al., 2012. Engineered insulin-like growth factor-1 for improved smooth muscle regeneration. *Biomaterials*, 33(2), pp.494–503.
- Lund, L. et al., 2009. Prevalence of hypospadias in Danish boys: a longitudinal study, 1977-2005. *European urology*, 55(5), pp.1022–1026.
- Magnan, M. et al., 2006. In vitro reconstruction of a tissue-engineered endothelialized bladder from a single porcine biopsy. *Journal of Pediatric Urology*, 2, pp.261–270.

- Magnan, M. et al., 2009. Tissue Engineering of a Genitourinary Tubular Tissue Graft Resistant to Suturing and High Internal Pressures. *Tissue engineering. Part A*, 15(1), pp.197–203.
- Mangera, A. & Chapple, C.R., 2013. Tissue engineering in urethral reconstruction — an update. *Asian Journal of Andrology*, 15(October), pp.89–92.
- Mano, J.F. et al., 2007. Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. *Journal of the Royal Society*, 4(17), pp.999–1030.
- Mantovani, F. et al., 2003. Reconstructive Urethroplasty Using Porcine Acellular Matrix. *European Urology*, 44, pp.600–602.
- Von der Mark, K., 1981. Localization of collagen types in tissues. *International review of connectif tissue research*, 9, pp.265–324.
- Mason, B.N. & Reinhart-King, C.A., 2013. Controlling the mechanical properties of three-dimensional matrices via non-enzymatic collagen glycation. *Organogenesis*, 9(2), pp.70–75.
- Matthews, J.A. et al., 2002. Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromolecules*, 3, pp.232–238.
- Mauney, J.R. et al., 2011. Evaluation of gel spun silk-based biomaterials in a murine model of bladder augmentation. *Biomaterials*, 32, pp.808–818.
- Mayne, R., 1986. Collagenous proteins of blood vessels. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 6(6), pp.585–593.
- Micol, L.A. et al., 2012. Biomaterials In-vivo performance of high-density collagen gel tubes for urethral regeneration in a rabbit model. *Biomaterials*, 33(30), pp.7447–7455.
- Mikami, H. et al., 2012. Two-layer tissue engineered urethra using oral epithelial and muscle derived cells. *Journal of Urology*, 187, pp.1882–1889.
- Mohammadi, M., Olsen, S.K. & Ibrahimi, O.A., 2005. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine & growth factor reviews*, 16, pp.107–137.
- Moll, R. et al., 1982. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, 31(1), pp.11–24.
- Moll, R., Divo, M. & Langbein, L., 2008. The human keratins : biology and pathology. *Histochem Cell Biol*, 129, pp.705–733.
- Morimoto, N. et al., 2005. Viability and function of autologous and allogeneic fibroblasts seeded in dermal substitutes after implantation. *The Journal of surgical research*, 125(1), pp.56–67.
- Moulin, V.J. et al., 2010. Shedding of microparticles by myofibroblasts as mediator of cellular cross-talk during normal wound healing. *Journal of Cellular Physiology*, 225(3), pp.734–740.

- Murillo, J. et al., 2009. Advanced glycation of type I collagen and fibronectin modifies periodontal cell behavior. *Journal periodontol.*, 79(11), pp.2190–2199.
- Myllyharju, J. & Kivirikko, K.I., 2004. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends in Genetics*, 20, pp.33–43.
- Nakanishi, Y. et al., 2003. Tissue-Engineered Urinary Bladder Wall Using PLGA Mesh-Collagen Hybrid Scaffolds: A Comparison Study of Collagen Sponge and Gel as a Scaffold. In *Journal of Pediatric Surgery*. pp. 1781–1784.
- Nakav, S. et al., 2009. Blocking adenosine A2A receptor reduces peritoneal fibrosis in two independent experimental models. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant*, 24(8), pp.2392–2399.
- Nanchahal, J., Dover, R. & Otto, W.R., 2002. Allogeneic skin substitutes applied to burns patients. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries*, 28(3), pp.254–257.
- Negrete, H.O. et al., 1996. Permeability properties of the intact mammalian bladder epithelium. *The American journal of physiology*, 271, pp.F886–F894.
- Némethy, G. & Scheraga, H.A., 1986. Stabilization of collagen fibrils by hydroxyproline. *Biochemistry*, 25, pp.3184–3188.
- Le Normand, L. et al., 2005. Voie excrétrice supérieure : physiologie , physiopathologie des obstructions et explorations fonctionnelles Upper urinary tract : physiology , pathophysiology of obstructions and clinical investigations. *Annales d'urologie*, 39, pp.30–48.
- North, K. & Golding, J., 2000. A maternal vegetarian diet in pregnancy is associated with hypospadias. *BJU International*, 85(1), pp.107–113.
- Nuininga, J.E. et al., 2004. A rabbit model to tissue engineer the bladder. *Biomaterials*, 25, pp.1657–1661.
- Nuininga, J.E. et al., 2005. Long-term outcome of different types of 1-stage hypospadias repair. *The Journal of urology*, 174, pp.1544–1548; discussion 1548.
- Nuininga, J.E. et al., 2003. Rabbit urethra replacement with a defined biomatrix or Small Intestinal Submucosa. *European Urology*, 44, pp.266–271.
- Nuininga, J.E. et al., 2010. Urethral reconstruction of critical defects in rabbits using molecularly defined tubular type I collagen biomatrices: key issues in growth factor addition. *Tissue engineering. Part A*, 16(11), pp.3319–3328.
- Oberpenning, F. et al., 1999. De novo reconstitution of a functional mammalian urinary bladder by tissue engineering. *Nature Biotechnology*, 17, pp.149–155.
- Oerlemans, A.J.M. et al., 2013. Regenerative Urology Clinical Trials : An Ethical Assessment of Road Blocks and Solutions. *Tissue engineering. Part A*, 19(1), pp.41–47.

- Olsen, L. et al., 1992. Urethral reconstruction with a new synthetic absorbable device. An experimental study. *Scandinavian journal of urology and nephrology*, 26, pp.323–326.
- Olsen, S.M., Stover, J.D. & Nagatomi, J., 2011. Examining the Role of Mechanosensitive Ion Channels in Pressure Mechanotransduction in Rat Bladder Urothelial Cells. *annals of biomedical engineering*, 39(2), pp.688–697.
- Ono, I., Tateshita, T. & Inoue, M., 1999. Effects of a collagen matrix containing basic fibroblast growth factor on wound contraction. *Journal of Biomedical Materials Research*, 48, pp.621–630.
- Orabi, H. et al., 2013. Cell-seeded tubularized scaffolds for reconstruction of long urethral defects: A preclinical study. *European Urology*, 63, pp.531–538.
- Osman, F. et al., 2009. Ureteral motility. *Acta physiologica Hungarica*, 96(4), pp.407–426.
- Otto, W.R. et al., 1995. Survival of allogeneic cells in cultured organotypic skin grafts. *Plastic and reconstructive surgery*, 96, pp.166–176.
- Owaki, T. et al., 2014. Cell sheet engineering for regenerative medicine: current challenges and strategies. *Biotechnology journal*, 9(7), pp.904–14.
- Palminteri, E. et al., 2012. Long-term results of small intestinal submucosa graft in bulbar urethral reconstruction. *Urology*, 79, pp.695–701.
- Palminteri, E. et al., 2007. Small intestinal submucosa (SIS) graft urethroplasty: short-term results. *European urology*, 51(6), pp.1695–1701.
- Pansadoro, V. & Emiliozzi, P., 2002. Which urethroplasty for which results? *Current opinion in urology*, 12, pp.223–227.
- Perumal, S., Antipova, O. & Orgel, J.P.R.O., 2008. Collagen fibril architecture, domain organization, and triple-helical conformation govern its proteolysis. *PNAS*, 105(8), pp.1–6.
- Pierik, F.H. et al., 2002. A high hypospadias rate in The Netherlands. *Human reproduction*, 17, pp.1112–1115.
- Piez, K.A., 1984. *Molecular and aggregate structure of the collagens in: Extracellular Matrix Biology* Reddi., Amsterdam.
- Pignon, J.-C. et al., 2013. P63-Expressing Cells Are the Stem Cells of Developing Prostate, Bladder, and Colorectal Epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, pp.8105–8110.
- Plotkin, M. et al., 2014. The effect of matrix stiffness of injectable hydrogels on the preservation of cardiac function after a heart attack. *Biomaterials*, 35(5), pp.1429–1438.
- Pocock, G. & Richard, C.D., 2004. *Physiologie humaine: les fondements de la médecine* Masson., Paris.

- Pradère, J.-P. et al., 2008. Lysophosphatidic acid and renal fibrosis. *Biochimica et biophysica acta*, 1781, pp.582–587.
- Proença, L.M. & Mayer, J., 2014. Prescription Diets for Rabbits. *Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice*.
- Proulx, S. et al., 2010. Reconstruction of a human cornea by the self-assembly approach of tissue engineering using the three native cell types. *Molecular vision*, 16, pp.2192–2201.
- Van de Putte, R. et al., 2014. Sequencing of the DKK1 gene in patients with anorectal malformations and hypospadias. *European journal of pediatrics*, oct.
- Raya-Rivera, A.M., Esquiliano, D.R., Yoo, J.J., Lopez-bayghen, E., et al., 2011. Tissue-engineered autologous urethras for patients who need reconstruction : an observational study. *The Lancet*, 377(9772), pp.1175–1182.
- Raya-Rivera, A.M., Esquiliano, D.R., Yoo, J.J., Lopez-Bayghen, E., et al., 2011. Tissue-engineered autologous urethras for patients who need reconstruction: An observational study. *The Lancet*, 377, pp.1175–1182.
- Reddy, G.K. & Enwemeka, C.S., 1996. A Simplified Method for the Analysis of Hydroxyproline in Biological Tissues. *Clinical Biochemistry*, 29(3), pp.225–229.
- Reefhuis, J. et al., 2009. Assisted reproductive technology and major structural birth defects in the United States. *Human Reproduction*, 24, pp.360–366.
- Reing, J.E. et al., 2010. The effects of processing methods upon mechanical and biologic properties of porcine dermal extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials*, 31, pp.8626–8633.
- Rho, K.S. et al., 2006. Electrospinning of collagen nanofibers: effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing. *Biomaterials*, 27(8), pp.1452–61.
- Ricard-Blum, S., 2011. The collagen family. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(1), pp.1–19.
- Ricard-Blum, S., Dublet, B. & Van der Rest, M., 2000. *Unconventional collagens: types VI, VII, VIII, IX, X, XII, XIV, XVI and XIX* 1st ed., Oxford: Oxford University Press.
- Ricard-Blum, S. & Ruggiero, F., 2005. The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathologie-biologie*, 53(7), pp.430–42.
- Romih, R. et al., 2005. Differentiation of epithelial cells in the urinary tract. *Cell tissue Res*, 320, pp.259–268.
- Romih, R., Jezernik, K. & Mažera, A., 1998. Uroplankins and cytokeratins in the regenerating rat urothelium after sodium saccharin treatment. *Histochemistry and Cell Biology*, 109, pp.263–269.

- Romih, R., Veranic, P. & Jezernik, K., 1999. Actin filaments during terminal differentiation of urothelial cells in the rat urinary bladder. *Histochemistry and cell biology*, 112, pp.375–380.
- Van Rooij, I. a L.M. et al., 2013. Risk factors for different phenotypes of hypospadias: results from a Dutch case-control study. *BJU international*, 112(1), pp.121–128.
- Rousseau, A. et al., 2013. Adipose-derived stromal cells for the reconstruction of a human vesical equivalent. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, Online.
- Le Roux, P.J., 2005. Endoscopic urethroplasty with unseeded small intestinal submucosa collagen matrix grafts: a pilot study. *The Journal of urology*, 173, pp.140–143.
- Seifert, A.W., Harfe, B.D. & Cohn, M.J., 2008. Cell lineage analysis demonstrates an endodermal origin of the distal urethra and perineum. *Developmental Biology*, 318, pp.143–152.
- Sekine, W. et al., 2011. Biochips & Tissue chips Thickness limitation and cell viability of multi-layered cell sheets and overcoming the diffusion limit by a porous-membrane culture insert. *Biochips & Tissue chips*, pp.1–9.
- Selim, M. et al., 2011. Developing biodegradable scaffolds for tissue engineering of the urethra. *BJU international*, 107(2), pp.296–302.
- Seth, A. et al., 2013. The performance of silk scaffolds in a rat model of augmentation cystoplasty. *Biomaterials*, 34(20), pp.4758–4765.
- Shafik, A. et al., 2005. Changes in the urine composition during its passage through the ureter. A concept of urothelial function. *Urological Research*, 33, pp.426–428.
- Sher, S.E. et al., 1983. Acceptance of allogeneic fibroblasts in skin equivalent transplants. *Transplantation*, 36, pp.552–557.
- Shim, I.K. et al., 2010. Novel three-dimensional scaffolds of poly(L -lactic acid) microfibers using electrospinning and mechanical expansion: Fabrication and bone regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 95, pp.150–160.
- Shiroyanagi, Y. et al., 2007. Urothelial sonic hedgehog signaling plays an important role in bladder smooth muscle formation. *Differentiation; research in biological diversity*, 75, pp.968–977.
- Sievert, K.-D. et al., 2000. Homologous acellular matrix graft for urethral reconstruction in the rabbit: histological and functional evaluation. *The Journal of urology*, 163(6), pp.1958–1965.
- Simon, F. et al., 2012. Enhanced secretion of TIMP-1 by human hypertrophic scar keratinocytes could contribute to fibrosis. *Burns*, 38(3), pp.421–7.
- Singer, V.L. et al., 1997. Characterization of PicoGreen Reagent and Development of a Fluorescence-Based Solution Assay for Double-Stranded DNA Quantitation. *Analytical biochemistry*, 238(249), pp.228–238.

- Soldano, S. et al., 2010. Effects of estrogens on extracellular matrix synthesis in cultures of human normal and scleroderma skin fibroblasts. *annals of academy of sciences*, 1193(Neuroendocrine Immunology in rheumatic diseases), pp.25–29.
- Southgate, J., Harnden, P. & Trejdosiewicz, L.K., 1999. Cytokeratin expression patterns in normal and malignant urothelium: a review of the biological and diagnostic implications. *Histology and histopathology*, 14, pp.657–664.
- Staack, A. et al., 2005. Molecular, cellular and developmental biology of urothelium as a basis of bladder regeneration. *Differentiation*, 73, pp.121–133.
- Stegemann, H. & Stalder, K., 1967. Determination of hydroxyproline. *Clinica chimica acta*, 18, pp.267–273.
- Stramer, B.M., Mori, R. & Martin, P., 2007. The inflammation-fibrosis link? A Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair. *The Journal of investigative dermatology*, 127, pp.1009–1017.
- Subramaniam, R. et al., 2011. Tissue engineering potential of urothelial cells from diseased bladders. *The Journal of urology*, 186(5), pp.2014–20.
- Sugita, Y. et al., 2001. Severe hypospadias repair with meatal based paracoronal skin flap: the modified Koyanagi repair. *The Journal of urology*, 166, pp.1051–1053.
- Sun, T.-T. et al., 1979. Keratin cytoskeletons in epithelial cells of internal organs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(i), pp.2813–2817.
- Sun, T.-T., 1999. Uroplakins as markers of urothelial differentiation. *Advances in experimental medicine and biology*, 462, pp.7–18.
- Sutherland, R.S. et al., 1996. Regeneration of bladder urothelium, smooth muscle, blood vessels and nerves into an acellular tissue matrix. *The Journal of urology*, 156, pp.571–577.
- Switzer, B.R. & Summer, G.K., 1972. Collagen Synthesis in Human Skin Fibroblasts : Effects of Ascorbate , a-Ketoglutarate and Ferrous Ion on Proline Hydroxylation '. *The journal of nutrition*, 102(6), pp.721–728.
- TAŞKIRAN, D. et al., 1999. Quantification of Total Collagen in Rabbit Tendon by the *Sirius Red* Method. *Tr. J of Medical Sciences*, 29, pp.7–9.
- Taylor, A.H. & F, A.-A., 2000. Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *Journal of molecular endocrinology*, 24, pp.145–155.
- Teng, J. et al., 2008. Roles of estrogen receptor alpha and beta in modulating urothelial cell proliferation. *Endocrine-related cancer*, 15(1), pp.351–364.
- Thépot, A. et al., 2011. Assessment of transformed properties in vitro and of tumorigenicity in vivo in primary keratinocytes cultured for epidermal sheet transplantation. *Journal of skin cancer*, 2011, p.936546.

- Timpl, R. et al., 1979. Laminin--a glycoprotein from basement membranes. *The Journal of biological chemistry*, 254, pp.9933–9937.
- Traub, W. & Plez, K.A., 1971. The chemistry and structure of collagen. *Advances in Protein Chemistry*, 25, pp.243–352.
- Tredget, E.E. et al., 1990. Determination of 4-hydroxyproline in collagen by gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical biochemistry*, 190, pp.259–265.
- Tremblay, C. et al., 2014. A New Construction Technique for Tissue-Engineered Heart Valves using the Self-Assembly Method. *Tissue engineering. Part C*, 20(11), pp.905–915.
- Trottier, V. et al., 2008. IFATS collection: Using human adipose-derived stem/stromal cells for the production of new skin substitutes. *Stem cells*, 26(10), pp.2713–2723.
- Truschel, S.T. et al., 2002. Stretch-regulated exocytosis/endocytosis in bladder umbrella cells. *Molecular biology of the cell*, 13, pp.830–846.
- Tu, D.D. et al., 2013. Bladder tissue regeneration using acellular bi-layer silk scaffolds in a large animal model of augmentation cystoplasty. *Biomaterials*, 34, pp.8681–8689.
- Varkey, M., Ding, J. & Tredget, E.E., 2014. Fibrotic remodeling of tissue-engineered skin with deep dermal fibroblasts is reduced by keratinocytes. *Tissue engineering. Part A*, 20(3-4), pp.716–27.
- Veranic, P. & Jezernik, K., 2002. Trajectory organisation of cytokeratins within the subapical region of umbrella cells. *Cell motility and the cytoskeleton*, 53(4), pp.317–325.
- Veranic, P., Romih, R. & Jezernik, K., 2004. What determines differentiation of urothelial umbrella cells? *European journal of biology*, 83, pp.27–34.
- Vermette, M. et al., 2007. Production of a new tissue-engineered adipose substitute from human adipose-derived stromal cells. *Biomaterials*, 28, pp.2850–2860.
- Virtanen, H.E. et al., 2001. The birth rate of hypospadias in the Turku area in Finland. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 109, pp.96–100.
- Walmsley, A.R. et al., 1999. Intracellular Retention of Procollagen within the Endoplasmic Reticulum Is Mediated by Prolyl 4-Hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry*, 274(21), pp.14884–14892.
- Wein, A.J., Kavoussi, L.R. & Novick, A.C., 2011. *Campbell-Walsh Urology* Saunders, ed., St-Louis, MO, USA.
- Wierzbicka-Patynowski, I. & Schwarzbauer, J.E., 2003. The ins and outs of fibronectin matrix assembly. *Journal of cell science*, 116, pp.3269–3276.

- Wu, X. et al., 1990. Large scale purification and immunolocalization of bovine uroplakins I, II, and III. Molecular markers of urothelial differentiation. *The Journal of biological chemistry*, 265, pp.19170–19179.
- Wu, X. et al., 1994. Mammalian Uroplakins. *The Journal of biological chemistry*, 269(18), pp.13716–13724.
- Wu, X. et al., 2009. Uroplakins in urothelial biology , function , and disease. *Kidney International*, 75, pp.1153–1165.
- Xie, L., S, L. & Q, L., 2013. Surgical Treatment and Prevention of Recurrence of Urethral Calculi Associated with Hairballs after Urethroplasty. *Urologia Internationalis*, 91(3), pp.256–60.
- Xie, M. et al., 2013. Evaluation of stretched electrospun silk fibroin matrices seeded with urothelial cells for urethra reconstruction. *The Journal of surgical research*, 184(2), pp.774–781.
- Yamany, T., Van Batavia, J. & Mendelsohn, C., 2014. Formation and regeneration of the urothelium. *Current opinion in organ transplantation*, 19(3), pp.323–330.
- Yiee, J.H. & Baskin, L.S., 2010. Environmental factors in genitourinary development. *The Journal of urology*, 184(1), pp.34–41.
- Yiou, R., 1994. Rappels anatomiques et physiologiques sur la continence urinaire et l ' appareil sphinctérien urétral. , pp.1–9.
- Yu, W., Khandelwal, P. & Apodaca, G., 2009. Distinct Apical and Basolateral Membrane Requirements for Stretch-induced Membrane Traffic at the Apical Surface of Bladder Umbrella Cells. *Molecular biology of the cell*, 20, pp.282–295.
- Zhang, Y. yuan et al., 2000. Coculture of bladder urothelial and smooth muscle cells on small intestinal submucosa : potential applications for tissue engineering technology. *The Journal of urology*, 164, pp.928–935.
- Zinman, L., 1997. Extragenital muscular myocutaneous and fasciocutaneous flaps in urethral reconstruction. *The Urologic clinics of North America*, 24(3), pp.683–698.
- Zong, W. et al., 2007. Regulation of MMP-1 by sex steroid hormones in fibroblasts derived from the female pelvic floor. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 196.
- Zong, W., Meyn, L.A. & Moalli, P.A., 2009. The amount and activity of active matrix metalloproteinase 13 is suppressed by estradiol and progesterone in human pelvic floor fibroblasts. *Biology of reproduction*, 80, pp.367–374.
- Zupančič, D. et al., 2014. Molecular ultrastructure of the urothelial surface: Insights from a combination of various microscopic techniques. *Microscopy research and technique*, 00(April).

