



**OPTIMISATION DE SUBSTITUTS DE TISSUS
UROLOGIQUES ENTIÈREMENT HUMAINS
RECONSTRUITS PAR GÉNIE TISSULAIRE AVEC
LES CELLULES ISOLÉES DU TISSU ADIPEUX**

Mémoire

Alexandre Rousseau

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

Québec, Canada

© Alexandre Rousseau, 2013

Résumé

La vessie est un organe qui est sujet à diverses maladies ou malformations nécessitant parfois des chirurgies pour remédier aux problèmes. Ces chirurgies ont souvent pour but d'augmenter le volume utile de la vessie pour protéger les reins. Plusieurs substituts de tissu urologique existent, mais aucun ne possède les qualités suffisantes pour répondre aux conditions physiologiques auxquelles ces tissus seront soumis. L'objectif du projet consiste à créer un substitut entièrement humain par la méthode d'auto-assemblage et à caractériser ce tissu. De plus, la possibilité de produire ce substitut à l'aide des cellules stromales isolées du tissu adipeux a été étudiée. Le potentiel de ces cellules pourrait permettre d'optimiser la greffe de ces substituts. Nos résultats montrent qu'il est possible de reconstruire un substitut entièrement humain par la méthode d'auto-assemblage et que les cellules stromales isolées du tissu adipeux peuvent être utilisées pour participer à la reconstruction d'un substitut vésical.

Remerciements

Premièrement, je tiens à remercier mon directeur de recherche Dr. Stéphane Bolduc pour m'avoir donné la chance de poursuivre mes études en effectuant ma maîtrise dans son laboratoire sur un sujet qui est quasiment de l'ordre de la science-fiction, mais aussi d'avoir été très disponible tout au long de ce projet. J'aimerais remercier aussi Mme Julie Fradette, ma codirectrice de recherche, pour tout son temps et les judicieux conseils qu'elle m'a donnés.

Un merci à tous les étudiants et stagiaires qui ont été de passage dans l'équipe du Dr Bolduc soit Valérie Cattan, Jonathan Cloutier, Gabrielle Ouellette, Sara Bouhout, Stéphane Chabaud, Marie Baud, Lorène Mottier, Thomas-Louis Marcoux, Marie-Pier D. Rompré et Amélie Morissette durant ces belles sessions inscrits à la maîtrise. Un merci très spécial à Geneviève Bernard qui premièrement a été en mesure de me former à mon arrivée, mais aussi qui a toujours été présente pour me donner un coup de main lorsque les journées étaient longues ou seulement pour m'écouter durant les périodes difficiles.

Merci à Rémi Parenteau, Jean-Michel Bourget, Caroline Simard-Bisson, Francis Bisson, Maryse Proulx, Guillaume Marceau Fortier, Benjamin Goyer, Rina Guignard, Éloïse Rochefort, Marie-Ève Ouellette, ainsi qu'à tous les membres du LOEX pour votre aide, votre présence, l'ambiance très ensoleillée, que vous donnez au CMDGT ainsi qu'au vieux LOEX.

Je remercie les organismes suivants pour leur soutien financier : FRSQ, IRSC, la Fondation Canadienne du Rein et le réseau THÉCELL.

Finalement, un merci plus que mérité à ma famille qui m'a toujours soutenu et encouragé dans toutes mes décisions. C'est grâce à vous si je suis ici aujourd'hui.

Table des matières

Résumé	iii
Remerciements.....	v
Table des matières	VII
Liste des figures	IX
Liste des tableaux	XI
Table 1: Primary antibodies used	XI
Liste des abréviations	XI
1. LE SYSTÈME URINAIRE	1
1.1.1 Description et fonctionnement	1
1.1.2 Les reins.....	1
1.1.3 L'urine.....	2
1.1.4 Toxicité de l'urée	3
1.2 LA VESSIE	4
1.2.1 La musculature de la vessie	6
1.2.2 La matrice extracellulaire de la vessie.....	6
1.2.2.1 Les collagènes.....	7
1.2.2.2 Autres éléments matriciels.....	7
1.3 L'UROTHÉLIUM	8
1.3.1 Le rôle de l'urothélium	9
1.3.2 La différenciation de l'urothélium.....	10
1.3.3 Les uroplakines (UP)	13
1.4 PROBLÉMATIQUES VÉSICALES	16
1.4.1 STRATÉGIES DE RECONSTRUCTION VÉSICALE	17
1.4.1.1 L'utilisation de tissus natifs	17
1.4.1.2 L'utilisation de matériaux synthétiques	19
1.4.1.3 Les utilisations mixtes.....	20
1.5 ORIGINE DE L'AUTO-ASSEMBLAGE.....	23
1.6 ÉVOLUTION DU MODÈLE D'AUTO-ASSEMBLAGE DE L'ÉQUIVALENT VÉSICAL AU LOEX	24
1.7 CELLULES STROMALES ISOLÉES DU TISSU ADIPEUX	27
1.7.1 Obtention facile des CSTA	28
1.7.2 Production rapide de matrice dans des conditions dynamiques de culture.....	28
1.7.3 Sécrétion de médiateurs angiogéniques.....	28
1.7.4 Sécrétion de médiateurs anti-inflammatoires	29
1.7.5 Population riche en cellules souches	29
1.9 HYPOTHÈSE DE RECHERCHE	30
1.10 OBJECTIFS DE MON PROJET DE RECHERCHE.....	30
2. Adipose-Derived Stromal Cells for the Reconstruction of a Human Vesical Equivalent	31
2.1 AVANT-PROPOS	31

2.2 RÉSUMÉ DE L'ARTICLE.....	31
2.3 Abstract.....	32
2.4 Introduction	33
2.5 Methods.....	35
2.5.1 Extraction and culture of human cells	35
2.5.2 Construction of vesical equivalents	35
2.5.3 Histology	37
2.5.4 Immunohistochemistry.....	38
2.5.5 Permeability studies.....	39
2.5.6 Mechanical testing.....	40
2.5.7 Scanning electron microscopy	41
2.6 Results.....	42
2.6.1 Histology of the human VE constructs.....	42
2.6.2 Matrix and urothelial cell protein expressions within human VE constructs.....	42
2.6.3 Barrier function.....	45
2.6.4 Mechanical resistance.....	47
2.6.5 Scanning electron microscopy	50
2.7 Discussion.....	51
2.8 Acknowledgements:.....	55
2.9 Bibliography	56
3. DISCUSSION.....	59
3.1 La matrice.....	60
3.2 L'urothélium.....	65
3.3 Conclusion et projets futurs.....	67
BIBLIOGRAPHIE	71

Liste des figures

Figure 1 : Anatomie du bas appareil urinaire masculin.....	5
Figure 2 : Histologie de l'urothélium pseudostratifié.....	9
Figure 3 : Schéma des cellules urothéliales de la couche superficielle de l'urothélium partiellement différenciées et différenciées.....	12
Figure 4 : Maturation et organisation des uroplakines.....	15
Figure 5 : Schéma de la méthode de reconstruction par auto-assemblage.....	26
Figure 6 : Representation of the vesical equivalent models and histological cross-sections of the human tissue-engineered vesical equivalents	37
Figure 7 : Scheme of the Franz cell for the barrier function test	39
Figure 8 : Mechanical testing	41
Figure 9 : Characterization by immunostaining of the extracellular matrix and basement membrane components expressed by the human ASC-VE, Fb-VE and Hybrid-VE	43
Figure 10 : Expression of the proteins associated to urothelial cells differentiation of the human Fb-VE and Hybrid-VE	44
Figure 11 : Curves of permeated cumulative percentage using ¹⁴ C-urea in vitro	46
Figure 12 : Mechanical properties of the engineered vesical equivalents.....	48
Figure 13 : Superficial urothelial cells in engineered VE after maturation	50
Figure 14 : Exemples de manipulations chirurgicales	64

Liste des tableaux

Table 1: Primary antibodies used38

Liste des abréviations

AG : appareil de Golgi
AKT : protéine kinase B
ASC-VE : équivalent vésical composé de CSTA
CMDGT : Centre Multidisciplinaire de Développement du Génie Tissulaire
CSTA / ASC : Cellules stromales / souches isolées du tissu adipeux (adipose-derived stromal/stem cells)
DV : vésicule discoïdale
Fb : fibroblaste dermique
Fb-VE : équivalent vésical composé de fibroblastes
FV : vésicule fusiforme
GAG : glycoaminoglycanes
Gly-X-Y : peptide glycine-non spécifique-tyrosine
HGF : facteur de croissance des hépatocytes (hepatocyte growth factor)
Hybrid-VE : équivalent vésical composé de fibroblastes et de CSTA
LOEX : Laboratoire d'Organogenèse Expérimentale
Ly : lysosome
kDa : kilo Dalton
MEC / ECM : matrice extracellulaire (extracellular matrix)
PEG : polyéthylène glycol
PGA : acide polyglycolique
PLGA : acide poly(lactique-glycolique)
PLA : acide polylactique
PLC : polycarbonatelactone
PU : polyuréthane
PUU : polyuréthane d'urée
RE : réticulum endoplasmique
RGD : peptide arginine-glycine-aspartate
SDF-1 : facteur dérivé des cellules stromales 1 (stromal cell derived factor-1)
SDS : dodécylsulfate de sodium
SIS : sous muqueuse du petit intestin (submucosa of th small intestin)
TMD : domaine transmembranaire
Uc : cellules urothéliales
UP : uroplakine
UTS : force de tension ultime (ultimate tensile strength)
VE : équivalent vésical
VEGF : facteur de croissance vasculaire endothélial (vascular endothelial growth factor)
ZO-1 : *Zonula Occludens-1*

1. LE SYSTÈME URINAIRE

1.1.1 Description et fonctionnement

Le rôle principal du système urinaire est l'évacuation hors de l'organisme de la majorité des déchets toxiques produits par le métabolisme. Il se compose d'un ensemble d'organes, dont les reins, les uretères, la vessie et l'urètre, qui permettent la filtration, le stockage puis l'évacuation sécuritaire de ces déchets. Le système urinaire partage aussi des éléments avec le système circulatoire et sanguin : la veine cave inférieure, les artères, les veines rénales, l'aorte abdominale et le sang, qui non seulement transportent les produits à éliminer, mais aussi les nutriments destinés aux tissus.

1.1.2 Les reins

Les reins, au début du système urinaire, permettent de rééquilibrer la composition du sang et la concentration des produits composant l'urine. D'un point de vue anatomique, le glomérule est la structure qui fait la jonction entre le système sanguin et le néphron. Le néphron est l'unité fonctionnelle du rein qui permet la filtration du sang. Sommairement, le néphron traverse trois couches tissulaires distinctes dans le rein, le cortex, la médulla externe et la médulla interne. Chaque couche tissulaire a un rôle spécifique de réabsorption par transport actif ou passif. Ce système de réabsorption permet de récupérer des molécules ou ions importants (NaCl, H₂O, glucose...) en même temps qu'il se débarrasse de produits pouvant être néfastes pour l'organisme (H⁺, NH₃⁺, K⁺...). Comme dans tout système biologique, les mécanismes tendent vers une stabilisation et l'équilibre du pH et de l'osmolarité, ce qui permet le bon fonctionnement de l'organisme.

Tous les systèmes biologiques sont interconnectés et fonctionnent de concert pour assurer l'homéostasie du corps et le système urinaire ne fait pas défaut à cette règle.

Outre le rôle des reins dans la fonction d'excrétion du système urinaire, leur fonctionnement peut être soumis à des stimuli externes. Par exemple, lors d'une baisse de la pression sanguine, les reins vont pallier passivement cette dépression en absorbant le plus d'eau possible pour rétablir une pression sanguine adéquate. La structure physiologique du rein permet de créer une boucle pouvant augmenter l'osmolarité du liquide interstitiel de [300 mmol/L] à [1200 mmol/L]. Comme le sang a une osmolarité d'environ [300 mmol/L], la différence hypertonique entre ces deux solutions permet l'excrétion des déchets azotés en perdant le moins d'eau possible. Cette boucle est surtout due au transport actif du NaCl et du transport passif de l'urée. Une fois l'urine concentrée au niveau du néphron, elle prend le chemin du bassinet du rein pour être acheminée par les uretères vers la vessie où elle sera entreposée temporairement, jusqu'à la prochaine miction (i.e. lorsque l'on urine). (Campell, 1995)

1.1.3 L'urine

L'urine est le liquide qui résulte de la filtration du sang par les reins. Sa composition peut varier en fonction de plusieurs facteurs : l'alimentation, l'hydratation, le comportement et l'état de santé. En règle générale, l'urine est constituée d'urée, d'acide urique, de créatine, de glucides, d'hormones, d'acide gras, d'ions inorganiques (Na^+ , K^+ , Cl^- , Mg^{2+} , Ca^{2+} , NH_4^+ , SO_4^{2-} , PO_4^{3-}). Ces constituants de l'urine sont dilués dans une grande quantité d'eau. (Putnam, 1971)

Hormis l'eau, le principal composant de l'urine est l'urée, le plus important déchet azoté produit par les mammifères terrestres. (Shoemaker et al., 1992) Quelle est son origine? Les atomes d'azote sont aussi essentiels que le carbone ou l'oxygène à la vie, car ils forment la base de la structure des acides aminés et des acides nucléiques. Chez les mammifères, l'azote est intégré par l'alimentation. Les acides aminés composant la nourriture sont récupérés par les intestins et transformés par le foie. Ce dernier est en mesure de métaboliser plus d'une mole de groupes aminés par jour. Les déchets azotés proviennent du catabolisme des protéines et des acides nucléiques. Leur transport sécuritaire pour l'organisme nécessite une énorme quantité d'eau. Afin de pallier les effets néfastes de l'ammoniac, celui-ci est combiné au dioxyde de carbone pour

produire de l'urée, une molécule nettement moins toxique. De plus, l'urée nécessite également moins d'eau pour son transport, car elle est plus soluble.

1.1.4 Toxicité de l'urée

La toxicité de l'urée provient des diverses interactions qu'elle peut avoir avec des molécules telles que les protéines. Cette caractéristique est d'ailleurs largement utilisée en biochimie. L'urée est tout d'abord un agent chaotropique qui est en mesure de rompre des interactions de types hydrophobes, ces dernières sont un élément clé de la structure des protéines. (Nozaki and Tanford, 1963, Yancey and Somero, 1979) Sans ces interactions hydrophobes, les fonctions enzymatiques telles que la vitesse et l'affinité par exemple, seront perturbées ou altérées. (Yancey and Somero, 1979) De plus, l'urée est en mesure de se lier à certaines protéines modifiant leurs conformations stériques. Cette liaison modifie les propriétés d'hydratation de la surface de la protéine, ce qui peut aussi produire un repliement inadéquat de la protéine. (Creighton, 1991) L'urée peut aussi atténuer les interactions électrostatiques d'une protéine pour son substrat. (Bolen and Fisher, 1969) En concentration élevée, elle est en mesure de générer des modifications post-traductionnelles sur les protéines comme la carbamoylation, c'est-à-dire l'ajout d'un groupement CON_2H sur le N-terminal. (Kraus and Kraus, 2001, Nystrom, 2005) Elle peut rendre les membranes trop fluides ou même instables en déstabilisant les queues hydrophobes des phospholipides. (Barton et al., 1999)

L'urée, à forte concentration, active certaines voies de signalisation incluant des éléments centraux des voies de signalisation comme la phospholipase C_δ , la kinase AKT et la phosphatidylinositol 3- kinase dans les cellules de la médulla. (Cohen et al., 1996, Zhang et al., 2000) Toutes ces conséquences peuvent engendrer une défaillance générale de l'organisme pouvant aller jusqu'à la mort de celui-ci. Malgré tous ces effets négatifs, l'urée est un osmolyte nécessaire pour le maintien du gradient de concentration osmotique des reins chez les mammifères à une concentration variant de 400 à 600 mM. (Yancey et al., 1982, Ballantyne et al., 1997) Il existe plusieurs

hypothèses dans la littérature qui décrivent comment des chaperons moléculaires compensent les effets néfastes de l'urée, mais l'organisme a su développer des stratégies de défense élaborées pour se préserver, notamment en mettant en place un réservoir étanche pour stocker l'urine et ces déchets : c'est le rôle de la vessie, tapissée d'un urothélium. (Yancey and Somero, 1979)

1.2 LA VESSIE

La vessie est l'élément central du système urinaire en permettant le stockage des déchets avant leur excrétion. Le bon fonctionnement de la vessie est primordial pour assurer le maintien de l'homéostasie de l'organisme. Son rôle est fort simple, servir de réservoir étanche pour emmagasiner l'urine produite par les reins, avant son expulsion lors de la miction. La vessie est constituée de plusieurs couches bien distinctes de tissus. Le péritoine entourant la vessie est une couche de tissu séreuse composée de cellules épithéliales formant un tissu conjonctif. Trois couches de tissus musculaires lisses entourent la sous muqueuse vésicale. Cette dernière, elle-même composée d'une fine couche de fibroblastes et de matrice extracellulaire, permet de faire le pont entre les muscles et l'épithélium vésical (l'urothélium) en formant avec ce dernier la lame basale. Cet assemblage essentiel de matrice très spécifique permet la prolifération et la différenciation adéquate des cellules urothéliales. (Fig. 1)

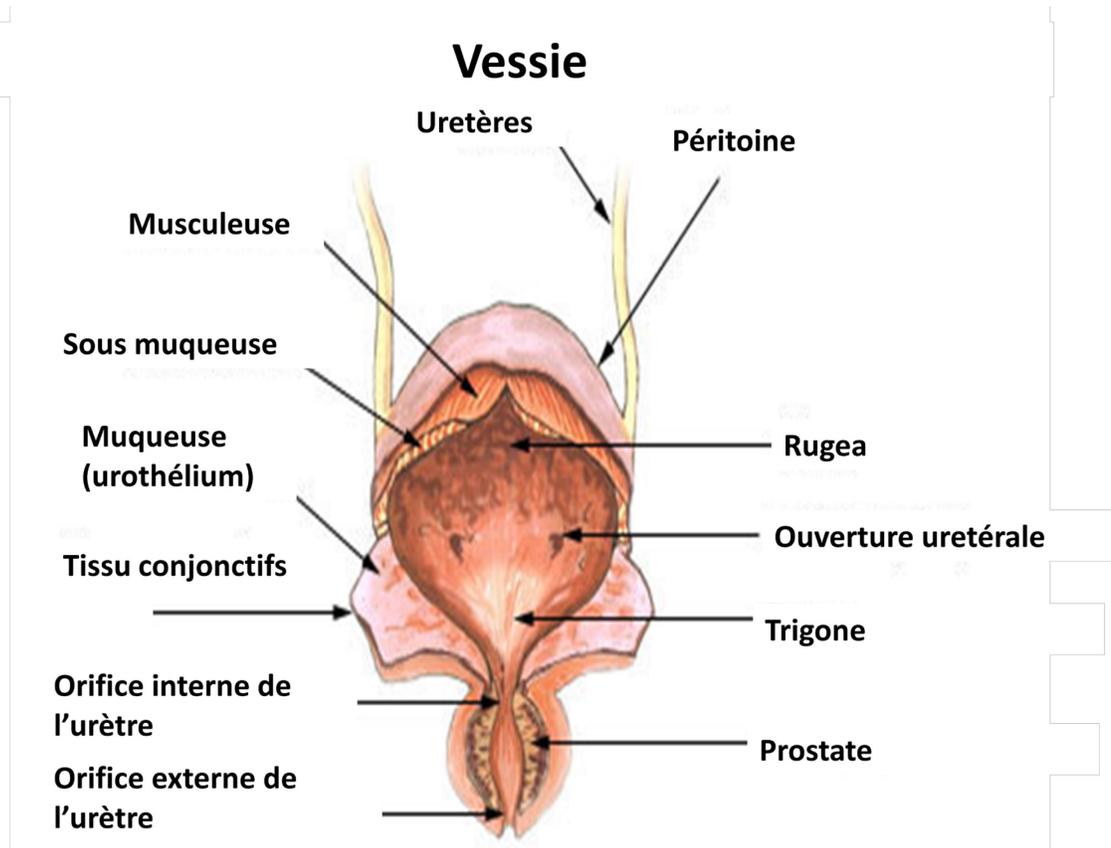


Figure 1 : Anatomie du bas appareil urinaire masculin

Les uretères acheminent l'urine des reins vers la vessie. Le péritoine recouvre la vessie. Sous le péritoine la musculature formée de trois couches de muscles lisses. Puis la sous muqueuse et la muqueuse ou l'urothélium.

Source : Image modifiée du site SEER training (<http://training.seer.cancer.gov/>)

1.2.1 La musculature de la vessie

Bien que la vessie soit un organe avec la fonction simple d'entreposer les toxines de l'organisme, il n'en demeure pas moins que celle-ci est en constante adaptation face son environnement. Le comportement de cet organe est principalement dû à l'état de sa musculature. La musculature vésicale est composée de trois couches de cellules musculaires lisses : la couche externe composée de fibres alignées longitudinalement, une médiane composée de fibres alignées circulairement puis la couche interne également composée de fibres alignées longitudinalement. Ces couches musculaires sont contrôlées par le système nerveux sympathique et parasympathique. De cette manière, la vessie peut autoréguler sa compliance pour permettre le maintien d'une basse pression interne malgré l'augmentation du volume d'urine que celle-ci entrepose. Plusieurs désordres métaboliques peuvent survenir lorsqu'il y a une mauvaise régulation de ces mécanismes de contraction et relaxation de la musculature vésicale. (Campbell, 1995)

1.2.2 La matrice extracellulaire de la vessie

Bien qu'elle ait une structure assez simple, la vessie doit être en mesure d'accomplir des tâches très complexes. Notamment, elle doit se distendre pour pouvoir accommoder le volume d'urine qu'elle emmagasine entre les mictions, tout en résistant physiquement et biologiquement à la présence de l'urine et des toxines qui la composent. Ces propriétés lui sont conférées, entre autres, par sa matrice extracellulaire (MEC). (Aitken and Bagli, 2009a) La MEC joue plusieurs rôles pour le maintien du bon fonctionnement de cet organe. La MEC n'est pas une structure immobile, elle est perpétuellement en remodelage : adhésion et migration cellulaire, production et dégradation des éléments matriciels très divers soit lorsque la cellule est à l'état quiescent soit lorsqu'elle est activée par son environnement. Sa structure influence aussi bien la signalisation intracellulaire que intercellulaire : elle constitue non seulement une réserve de facteurs de croissance et cytokines, qui peuvent être libérés au moment opportun notamment sous l'effet de protéases, mais ses éléments ou leurs produits de dégradation interagissent avec des récepteurs et des molécules d'adhésion pour moduler les réponses cellulaires. La MEC de la vessie est composée de

protéoglycans et glycosaminoglycans, mais surtout de protéines de structure, parmi lesquelles les plus abondantes sont les collagènes.

1.2.2.1 Les collagènes

Tous les collagènes fibrillaires sont constitués de répétitions d'acides aminés Gly-X-Y, où X et Y peuvent être des prolines ou des hydroxyprolines. Cette séquence permet la formation de la structure hélicoïdale du monomère de collagène qui facilitera l'association de trois monomères pour former, après l'association des propeptides et leur clivage subséquent, la triple hélice des fibres de collagènes. Les principaux collagènes de la MEC de la vessie sont de type I et III.(Aitken and Bagli, 2009a) La lxyloxydase est responsable de la solidité des fibres de collagène. Cette enzyme permet de relier les lysines sur les fibrilles qui forment la fibre de collagène. Les collagènes fibrillaires sont principalement responsables de la structure et de la résistance mécanique de la MEC. En raison entre autres de ses propriétés mécaniques, un dépôt adéquat du collagène est primordial pour le bon fonctionnement de la vessie. (Longhurst et al., 1992) Le collagène III est plus présent dans la vessie humaine comparativement à celle d'autres mammifères.(Aitken and Bagli, 2009a) En absence de collagène III, le diamètre des fibres de collagène I suit une distribution aléatoire. Par contre en présence de collagène III, il y a formation d'un réseau de fibres de collagène I et III dans lequel les fibres de collagène ont un diamètre plus uniforme. (Liu et al., 1997) Du collagène IV est également présent mais seulement au niveau de la lame basale située entre l'urothélium qui est l'épithélium vésical, et la matrice extracellulaire. La structure de ce collagène est différente de celle du collagène I car il est organisé en feuillets.(Gelse et al., 2003) Ce collagène est d'ailleurs aussi retrouvé autour des capillaires. Comme c'est le cas dans les vaisseaux sanguins, cette protéine aide à la formation de la lame basale et sert à polariser la sous muqueuse vésicale pour permettre la prolifération et la différenciation des cellules urothéliales. (Pauly et al., 1994)

1.2.2.2 Autres éléments matriciels

Dans la MEC de la vessie, on retrouve également des fibres élastiques produites à partir de tropoélastine. (Hinek and Rabinovitch, 1994) L'élastine est intégrée partout dans la

MEC de la vessie. Elle est liée aux fibrilles composant la MEC de façon aléatoire via la lysyloxidase. Ces fibres élastiques permettent de donner à la vessie la compliance nécessaire à l'accomplissement de son rôle.

Il y a aussi présence de plusieurs laminines dans la composition de la vessie.(Aitken and Bagli, 2009a) Les laminines sont de grosses protéines trimériques d'environ 900 kDa formées par une des 15 formes de chaînes α , β et δ .(Barczyk et al., 2010) La sous unité $\beta 1$ se retrouve partout dans la vessie. (Saban et al., 2007) La fibronectine, une glycoprotéine, fait aussi partie de l'ensemble des protéines de la MEC et elle y joue un rôle critique lors de la formation des fibres de collagène I, permettant de relier le collagène IV et le collagène I, dans la migration et dans l'adhésion cellulaire. (Gee et al., 2008, Stander et al., 1999) Finalement la décorine est un protéoglycan qui décore (d'où son nom) les fibres de collagène. Elle est essentielle à la formation des fibrilles de collagènes. (Stander et al., 1999) Plusieurs autres protéines constituent également la MEC de la vessie, mais celles décrites dans cette section sont les composantes majeures. Toutes ces protéines jouent des rôles cruciaux pour le dépôt de la matrice, son remodelage, la signalisation cellulaire, la migration, l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaire, notamment celle de l'urothélium.

1.3 L'UROTHÉLIUM

L'urothélium est l'épithélium qui procure la fonction de barrière de la vessie permettant de protéger les tissus des déchets toxiques contenus dans l'urine. (Fig. 2) Cet épithélium ultra spécialisé empêche les échanges entre le système sanguin et l'urine. Cette caractéristique permet la conservation de l'homéostasie en empêchant la recirculation des déchets dans le système sanguin. (Kreft et al., 2010) L'urothélium est formé par les cellules urothéliales aux taux de renouvellement variables passant de 30h au début de la vie à 40 semaines à l'âge adulte. (Walker, 1960, Jost, 1989, Hicks, 1975) Les cellules de cet épithélium pseudostratifié se différencient en trois couches principales. La couche basale où l'on retrouve les cellules les moins différenciées, puis un stade intermédiaire et finalement des cellules superficielles allongées appelées « umbrella cells » ou cellules parapluies. À ce stade, elles sont considérées comme

étant matures et pleinement différenciées. La différenciation des cellules urothéliales est accompagnée par l'expression de diverses protéines impliquées dans les jonctions serrées, de lipides, des glycanes à la surface, mais plus spécifiquement des uroplakines qui seront discutées plus loin.

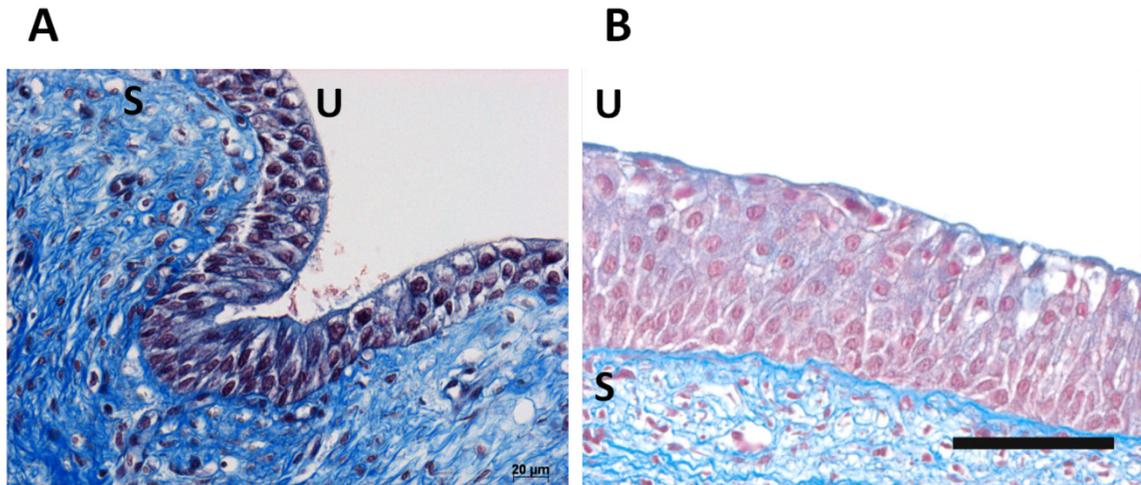


Figure 2 : Histologie de l'urothélium pseudostratifié

A : Coupe de 5 µm colorée au trichrome de Masson d'une vessie native de porc. **B** : Coupe de 5µm colorée au trichrome de Masson d'un équivalent vésical reconstruit par génie tissulaire (Hybride-VE). U représente la section de l'urothélium et S la section de la matrice extracellulaire ou stromale. La barre est de 100 µm.

Source : Images modifiées de Geneviève Bernard et Alexandre Rousseau.

1.3.1 Le rôle de l'urothélium

Tout d'abord, la fonction principale de l'urothélium est l'imperméabilité. Si des molécules comme l'eau, l'ammoniac et l'urée sont en mesure de franchir les membranes assez facilement, elles ne sont pas, et ne doivent pas être, en mesure de traverser facilement l'urothélium. (Negrete et al., 1996) La fonction barrière est surtout due à la couche superficielle, les cellules parapluies. Dans la littérature, la résistance transépithéliale est utilisée pour juger de la perméabilité d'un tissu. Celle de l'urothélium oscille entre 10 000 et 75 000 $\Omega \text{ cm}^2$. (Negrete et al., 1996, Lewis and Diamond, 1976) À titre de comparaison, la résistance de la barrière hémato-encéphalique est de l'ordre de 1000 à 2000 $\Omega \text{ cm}^2$ et celle de la muqueuse intestinale

100 à 400 $\Omega \text{ cm}^2$.(Negrete et al., 1996) Cette résistance de l'urothélium est la plus élevée connue; cet épithélium serait donc la membrane la plus imperméable du corps. (Butt et al., 1990) Mis à part son étanchéité, l'urothélium pourrait jouer des rôles additionnels tel que participer à modifier la concentration de l'eau dans la composition de l'urine et agir comme un senseur pour les système nerveux et musculaire reliés à la vessie. (Khandelwal et al., 2009) La présence des aquaporines 4 et 7 a récemment été observée au niveau de l'urothélium humain permettant la réabsorption de l'eau se trouvant dans l'urine vers le système sanguin. (Khandelwal et al., 2009)

1.3.2 La différenciation de l'urothélium

L'étanchéité de l'urothélium peut être expliquée par divers facteurs. L'un d'eux est la présence des jonctions serrées : un réseau complexe et dense qui relie entre elles les protéines cytoplasmiques, des éléments du cytoplasme et des protéines transmembranaires. *Zonula Occludens-1* (ZO-1) est une protéine majeure dans ce complexe.(Matter and Balda, 2003) Elle permet l'établissement d'un échafaudage liant les protéines transmembranaires au cytosquelette d'actine. De plus, ZO-1 pourrait être impliquée dans la voie de signalisation de la jonction serrée. (Matter and Balda, 2003) L'assemblage est complété, entre autres, par les occludines et les claudines qui forment un périmètre étanche autour de l'apex cellulaire. (Furuse and Tsukita, 2006) C'est la combinaison des différentes protéines présentes qui va conférer à la jonction serrée ses propriétés. Les claudines 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 12, 14, 16 ainsi que l'occludine seraient présentes à un moment ou à un autre sur l'urothélium dans le système urinaire. (Khandelwal et al., 2009) Le grand nombre de claudines pourrait expliquer pourquoi les jonctions serrées de la couche superficielle de l'urothélium sont si imperméables. L'expression de ZO-1 ainsi que de la claudine-4 est très précoce et pourrait avoir un rôle dans la différenciation des cellules parapluies en amenant un réarrangement du cytosquelette d'actine. (Romih et al., 1999, Kreft et al., 2006, Acharya et al., 2004) Un autre facteur est l'expression de la kératine 20 qui modifie l'arrangement du cytosquelette. Un joueur, également essentiel dans l'acquisition de l'imperméabilité vésicale, est la formation de la plaque d'uroplakines, protéines spécifiques des cellules urothéliales, qui seront décrites un peu plus loin. (Fig. 3) Des glycosaminoglycans sont

également présents à la surface apicale de l'urothélium comme les sulfates de chondroïtine et d'héparane. (Kresse and Schonherr, 2001)

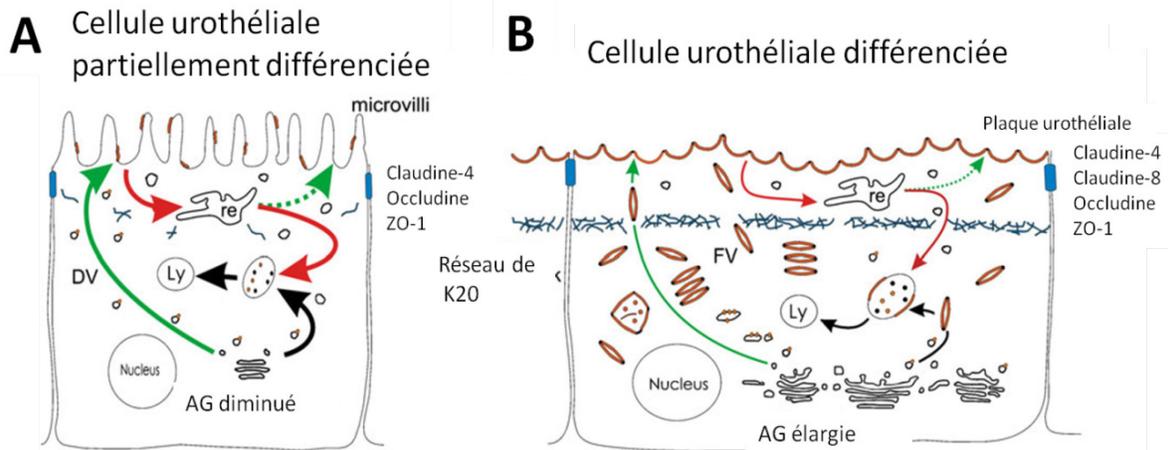


Figure 3 : Schéma des cellules urothéliales de la couche superficielle de l'urothélium partiellement différenciées et différenciées

A : Schématisation d'une cellule urothéliale partiellement différenciée. La membrane plasmique présente des microvilli sur lesquels il y a quelques unités asymétriques de la plaque urothéliale. Des vésicules discoïdes (DV) sont également observables. Ces vésicules renferment des unités asymétriques qui ne sont pas toutes matures. Des jonctions serrées sont mises en évidence par la présence des protéines claudine-4, occludine et ZO-1. Les unités asymétriques ne sont pas toutes matures : certaines sont sécrétées, mais plusieurs sont détruites via les lysosomes (Ly). **B** : Schématisation d'une cellule urothéliale différenciée. Les microvilli ont été remplacés par une plaque urothéliale composée d'unités asymétriques. Il y a présence d'un réseau dense de kératine 20 (K20) dans la partie apicale de la cellule. L'appareil Golgien a subi une réorganisation et sa taille a augmenté. Il y a présence de DV, mais aussi de vésicules fusiformes (FV) en grand nombre. Celles-ci contiennent uniquement des unités asymétriques matures. Il y a aussi des jonctions serrées avec la présence de claudine-4 et 8, l'occludine et ZO-1. Comme pour une cellule partiellement différenciée, les lysosomes (Ly) jouent un rôle dans le recyclage des unités asymétriques.

Source : Image modifiée de Kreft *et al.*, 2010, Formation and maintenance of blood-urine barrier in urothelium

1.3.3 Les uroplakines (UP)

Les uroplakines sont des protéines très importantes pour l'urothélium. Elles sont transportées à la surface apicale de la membrane plasmique par un système très complexe et font partie intégrante de la membrane des cellules de la couche superficielle. Les cellules matures, ou parapluies, permettent la formation d'une plaque qui bloque, empêche et réduit le passage de molécules par la voie transcellulaire, tandis que les jonctions serrées bloquent le passage de molécules dans les espaces intercellulaires. (Hicks, 1975, Minsky and Chlapowski, 1978, Lewis and Kleine, 2000, Apodaca, 2004) Cette plaque, comme les jonctions serrées, vient empêcher la diffusion des déchets contenus dans l'urine. (Hicks, 1965, Staehelin et al., 1972, Min et al., 2003, Min et al., 2006)

Cette plaque est formée d'unités protéiques hexagonales d'une taille de 16 nm (Kachar et al., 1999) constitués des quatre uroplakines majeures UPIa (27 kDa), UPIb (28 kDa), UPII (15 kDa), et UPIIIa (47 kDa). (Wu and Sun, 1993, Lin et al., 1994, Yu et al., 1994) L'UPIIIb, qui est très faiblement exprimée, est une uroplakine mineure. (Yu et al., 1994, Wu et al., 1990, Deng et al., 2002) Cette plaque recouvre près de 90 % de la surface apicale des cellules urothéliales. Le reste de la surface constitue des régions charnières ou des régions permettant la connexion entre les différentes unités protéiques du complexe de la plaque. Les unités formant cette plaque sont décrites dans la littérature par « asymmetric unit membrane » ou unités membranaires asymétriques, car elles augmentent l'épaisseur apparente de la membrane cytoplasmique du côté extracellulaire. (Fig. 4A)

Les UP Ia et Ib ont toutes les deux 4 domaines transmembranaires (TMD) qui s'étendent jusqu'à l'extérieur du cytoplasme. (Yu *et al.*, 1994) Elles font partie de la famille des tétraspanines et possèdent des antigènes de différenciation de leucocytes. (Hemler, 2005) UPII possède un peptide signal en N-terminal qui est fortement glycosylé. Ce signal sert de substrat pour une modification post-traductionnelle dans le trans-Golgi permettant la maturation de la protéine. Le domaine C-terminal, non glycosylé, est transmembranaire. (Lin et al., 1994) Finalement, UPIIIa possède un seul

domaine transmembranaire. L'extrémité N-terminale est fortement glycosylée avec des glucides complexes et la section cytoplasmique est pourvue de plusieurs sérines, thréonines et tyrosines pouvant être phosphorylées. (Wu and Sun, 1993, Lin et al., 1994) Ce potentiel de phosphorylation laisse présager un rôle dans la signalisation et le comportement de la plaque urothéliale, mais cette voie est toujours inconnue à ce jour. Toutes ces protéines vont agir de concert, depuis leur traduction jusqu'à leur exportation en unité asymétrique membranaire à la surface apicale des cellules parapluies. UPII et UPIa vont se dimériser dans le réticulum endoplasmique comme UPIb et UPIIIa.(Wu et al., 2009) Ces deux hétérodimères seront transportés dans le Golgi pour subir des modifications post-traductionnelles qui permettent la formation de tétramères comprenant maintenant les 4 sous-unités UP Ia, Ib, II, IIIa.(Wu et al., 1990) Ensuite, il y a oligomérisation de ces tétramères dans le trans-Golgi pour former les particules de 16 nm. (Kachar et al., 1999) Les unités asymétriques sont ensuite transportées dans les vésicules discoïdes, puis celles-ci se transforment en vésicules fusiformes, une forme de vésicule plus mature, lorsqu'elle est saturée en unités asymétriques, pour finalement être exportée et aller former la plaque urothéliale à la surface des cellules superficielles. (Fig. 4)

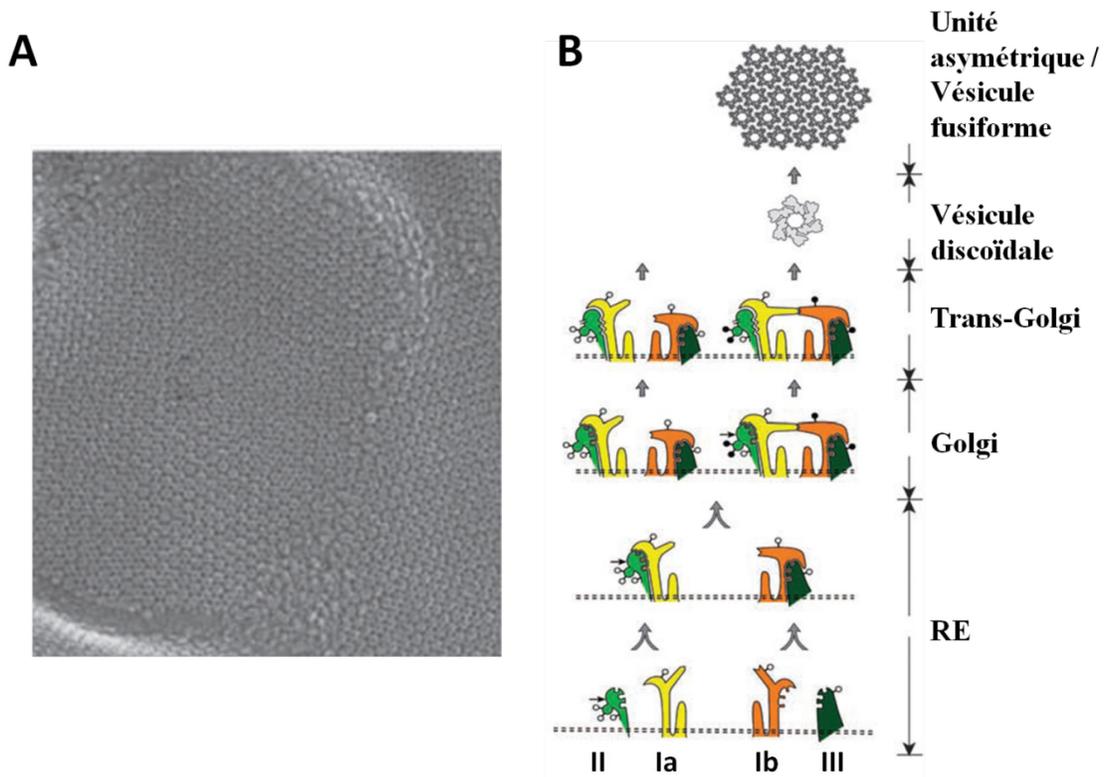


Figure 4 : Maturation et organisation des uroplakines

A : Image en microscopie électronique à balayage d'un urothélium mature de souris. Sur cette image, il est possible de voir les unités asymétriques de la plaque d'uroplakines. **B** : Maturation des uroplakines au cours de leur transport dans les cellules urothéliales matures. Dans le réticulum endoplasmique (RE), les uroplakines Ia et II se dimérisent, ainsi que Ib et III. Puis, ces deux complexes sont transportés dans le Golgi pour être glycosylés ce qui provoque un réarrangement stérique des deux dimères permettant la formation d'un tétramère. Ces tétramères forment une unité asymétrique après avoir été transportés du trans-Golgi vers la vésicule discoïdale. Finalement, cette dernière devient fusiforme et les unités asymétriques peuvent être exportées et prendre place dans la membrane au sein des plaques d'uroplakines.
Source : Image modifiée de Wu et al., 2009, Uroplakins in urothelial biology, function, and disease

Bien que plusieurs découvertes et avancées technologiques concernant l'urothélium et son rôle aient été réalisées récemment, notamment au niveau de l'exportation des protéines ou du rôle de récepteur neuronal dans la fonction vésicale de l'uroplakine UPIIIa, ces nouvelles fonctions ne seront pas abordées dans ce mémoire, car elles en déborderaient le cadre. Il est évident que de nombreuses questions restent à élucider concernant l'urothélium et les protéines qui y sont exprimées.

1.4 PROBLÉMATIQUES VÉSICALES

L'origine de la plupart des problèmes affectant la vessie est reliée, sans exclusivité, à des désordres neurologiques, tels, le myéloméningocèle (spina-bifida), le dysraphisme spinal occulte et la vessie neurogénique acquise. (Guys et al., 1999) Ces pathologies sont dues à un mauvais développement du système nerveux ou une blessure de la moelle épinière entraînant une perte de signaux nerveux. Un bris dans la communication nerveuse engendre des anomalies de fonctionnement de la vessie généralement classées en deux groupes principaux : les problèmes d'incontinence et les problèmes de rétention. Les problèmes d'incontinence peuvent être dus à une défaillance des muscles du plancher pelvien ce qui engendre une mauvaise fermeture des sphincters lors des activités quotidiennes. De plus, l'hyperactivité de la vessie entraîne des contractions involontaires des muscles de la vessie. Il arrive aussi que l'incontinence soit due à une combinaison des deux causes. Dans les deux types de problèmes, les signaux nerveux ne sont pas bien interprétés ou tout simplement pas reçus par le cerveau, ce qui provoque le mauvais fonctionnement des muscles et ainsi une mauvaise rétention de l'urine. (Guys et al., 1999, Adzick et al., 2011, Mayer et al., 2010)

Une vessie neurogène est un terme définissant une vessie qui fonctionne mal, généralement causée par un trouble d'ordre neurologique. Les symptômes varient selon l'atteinte des différents tissus atteints : muscles ou nerfs. Pour traiter ces patients, plusieurs thérapies médicamenteuses existent, mais en cas d'échec, il faut envisager, comme l'une des dernières options, la reconstruction ou l'augmentation vésicale.

L'augmentation vésicale est une procédure chirurgicale qui a pour objectif très simple d'augmenter la capacité volumique vésicale, c'est-à-dire, le volume d'urine que la vessie peut entreposer entre les mictions. Il y a principalement deux raisons pour effectuer cette opération majeure. La première a un objectif préventif. Dans le cas d'une vessie qui a perdu une grande capacité volumique, ou qui n'en a jamais eu, cette procédure permettra de protéger l'intégrité des reins qui « purifie » le sang en éliminant les déchets qui s'y accumulent. Un reflux d'urine à long terme peut endommager de façon permanente les reins. En effet, comme tout organe du corps, à l'exception de la vessie normale, le contact prolongé avec les déchets métaboliques qui composent l'urine et la pression accrue affecteront les reins. Dans ces conditions, les reins ne pourront plus jouer leur rôle de filtre et le patient devra être dialysé, une pratique médicale coûteuse et invalidante. Il existe d'autres désordres pouvant mener à la reconstruction vésicale, comme l'hypertrophie de la couche musculaire de la vessie appelée : détroisor, et dans la plupart de ces cas, la vessie perd son élasticité. La vessie devient alors souvent trop rigide et n'est plus en mesure de jouer son rôle efficacement.

1.4.1 STRATÉGIES DE RECONSTRUCTION VÉSICALE

Afin de pallier aux principaux problèmes liés à des vessies défaillantes, différentes stratégies chirurgicales de reconstruction, principalement des augmentations, ont été mises au point et testées sur des patients. Elles peuvent être séparées en trois grands groupes selon les substituts utilisés : biologiques, synthétiques ou mixtes.

1.4.1.1 L'utilisation de tissus natifs

À l'origine, à cause de l'état des connaissances en médecine et en biologie, les premiers substituts à avoir été utilisés étaient de nature biologique. Un des premiers substituts biologiques, décrit dès 1943, est le sigmoïde, une partie du colon se trouvant près du rectum. (Bisgard, 1943) Quelques années plus tard, des cystectomies sont des opérations pour agrandir la capacité volumique de la vessie, ont été tentées en utilisant

les petits intestins ou des parties de celui-ci comme l'iléum. (Bricker et al., 1954, Staehler, 1952a, Staehler, 1952b) Les intestins ont souvent été utilisés comme tissus de remplacement, car bien que nécessaires pour la survie, ils constituent un tissu abondant. Des greffes de la partie séromusculaire des intestins ont aussi été tentées. (Grotzinger and Shoemaker, 1956) Néanmoins, dès cette époque, plusieurs problèmes ont été décelés suite à l'utilisation de ce tissu comme l'inflammation, la formation de pierre vésicale, la perforation du tissu ainsi que la nécessité de procéder de nouveau à une opération pour tenter de régler les problèmes créés lors de la première intervention. (Murphy and Schwegman, 1956, Murphy et al., 1956) Dans les années soixante, la littérature fait apparaître clairement une préférence pour l'utilisation de l'iléum par les chirurgiens pour agrandir la vessie.

D'autres stratégies ont été expérimentées comme l'utilisation de peau allogénique congelée et décellularisée, mais sans succès. (Novick et al., 1977) Dans la quête d'un substitut biologique adéquat, l'utilisation de tissus stomacaux a également été expérimentée, mais également sans connaître de grand succès. (Nguyen and Mitchell, 1991, Hauri, 1994) Dans les années quatre-vingt, le groupe du Dr Badylak a mis au point une nouvelle stratégie utilisant des segments de la sous muqueuse du petit intestin (SIS) lors de reconstruction de vaisseaux sanguins. (Badylak et al., 1989) Quelques années plus tard, ce groupe s'est servi du même tissu pour reconstruire une vessie dans le cadre d'un modèle canin. L'équipe de Badylak a alors poursuivi le développement du SIS qui semblait être un tissu de choix pour la reconstruction vésicale. (Kropp et al., 1996) Ce tissu, utilisé pour des expérimentations pour les reconstructions vasculaires, n'était pas décellularisé, mais maintenant, avec l'évolution des connaissances en immunologie lors de la préparation du SIS, il y a un traitement pour le décellulariser préalablement à la reconstruction vésicale.

Devant le manque de tissus urologiques disponibles pour les greffes, l'iléum du petit intestin reste encore souvent utilisé par les chirurgiens lors de reconstructions vésicales. L'utilisation de tissus natifs présente néanmoins certains désavantages. Bien que l'utilisation du SIS permet de résoudre le problème de biodisponibilité, l'ablation d'un

segment intestinal et son utilisation au niveau de la vessie génèrent des complications non seulement au niveau de la vessie, mais également au site de prélèvement. (Metcalf et al., 2006b) En 2006, le Dr Metcalfe a fait une revue de 500 cas d'augmentations vésicales. Sur les 500 patients, 169 ont eu des complications. Les principales complications observées étaient la perforation spontanée, le blocage intestinal, la nécessité d'une seconde augmentation, la formation de pierres et la croissance maligne du greffon. (Metcalf et al., 2006a) Dans le but d'atténuer ces complications, des substituts commerciaux d'origine porcine ont été développés. Il s'agissait d'une matrice décellularisée du SIS, d'origine porcine, principalement formée de collagène. (Gardiner, 2000, Santucci and Barber, 2005) En dépit des avantages de ce tissu, qui préserve notamment l'intestin du patient, plusieurs problèmes lui ont été également associés : son origine porcine, sa faible capacité mécanique et des problèmes structuraux lors du processus de remodelage de la matrice, etc. Ces désavantages entraînent la défaillance fonctionnelle du tissu greffé menant à l'échec de cette opération.

1.4.1.2 L'utilisation de matériaux synthétiques

La deuxième catégorie de substituts utilisés pour la reconstruction vésicale est d'origine synthétique. Ce sont des matrices créées sur la base de protéines normalement présentes dans la MEC comme le collagène, ou de polymères : acide poly(lactique-glycolique) (PGLA), polycarbonatelactone (PLC), polyuréthane d'urée (PUU), polyuréthane (PU) acide polyglycolique (PGA), acide polylactique (PLA), polyéthylène glycol (PEG). (Atala, 2008, Aitken and Bagli, 2009b) Il y a aussi eu des tentatives d'utilisation de substituts contenant du Téflon ou des éponges à base de vinyle ou de chitosan. Plusieurs facteurs peuvent modifier la nature de ces matrices synthétiques; on en dénombre deux catégories. La première touche les caractéristiques physiques des matériaux utilisés, comme la technique de polymérisation employée, la composition, la densité des composés utilisés, la grosseur des pores créés et la rigidité de la surface. La seconde catégorie de modification est de nature biologique, comme l'ajout de protéines, tel que le collagène ou la fibronectine, l'ajout de facteurs de

croissance comme le facteur angiogénique « *vascular endothelial growth factor* » (VEGF), ou encore par l'addition d'acide hyaluronique.

L'équipe de Dr Harrington démontra que l'ajout de séquences RGD améliora l'adhésion cellulaire. (Harrington et al., 2006) Certaines procédures peuvent augmenter les liens à l'intérieur de la matrice. (Geutjes et al., 2006, Becker et al., 2006) Ces techniques vont influencer la capacité des cellules à infiltrer et intégrer la matrice. Pour sa part, l'addition d'acide hyaluronique permet la réduction du nombre de pores. (Cartwright et al., 2006) Il a été démontré que les cellules urothéliales croissent facilement sur des matrices de collagène I très réticulées. (Becker et al., 2006, Brehmer et al., 2007) Par contre, les cellules de muscles lisses semblent préférer une matrice moins interconnectée, de grands pores et une faible élasticité. (Brehmer et al., 2007) De leur côté, les cellules nerveuses préfèrent les matrices à base de chitosan. (Drewa et al., 2008) La cohabitation des différents types cellulaires dans une même matrice demande donc des conditions particulièrement contrôlées. Du polyester uréthane électrofilé « *electrospun* » combiné avec un peptide RGD semble donner davantage de résistance mécanique à la matrice et améliore l'intégration des cellules. (Stankus et al., 2008) En effet, l'utilisation de l'électrospinning permet d'obtenir une surface plus régulière ce qui augmente la résistance mécanique et affecte la différenciation cellulaire. (Li et al., 2007, Han and Gouma, 2006)

Malgré les espoirs suscités par ces substituts, ils n'ont pas donné les résultats escomptés à cause des complications provoquées par l'absence d'adhésion ou de développement d'un urothélium mature. Sans cet urothélium, il n'y a pas de protection efficace contre l'urine.

1.4.1.3 Les utilisations mixtes

Les substituts mixtes sont générés par la combinaison de plusieurs techniques et matériaux dans le but de créer le meilleur substitut possible pour la reconstruction vésicale. Ce groupe de substituts est composé d'un amalgame des deux autres : des matrices biologiques qui sont décellularisées, puis peuvent être, ou non, réensemencées avec des cellules. Ces matrices peuvent aussi être traitées avec divers produits. De plus,

les matrices synthétiques sont fréquemment réensemencées avec des cellules musculaires lisses, des fibroblastes, des cellules urothéliales ou des cellules souches. (Aitken and Bagli, 2009b, Atala, 2011)

Lors de l'utilisation de matrices biologiques, plusieurs facteurs influencent les comportements du substitut greffé. Tout d'abord, l'origine du tissu utilisé aura des conséquences sur la prise de la greffe. Généralement les tissus utilisés proviennent du tractus intestinal. Chaque segment réagit différemment dans l'environnement vésical. Les caractéristiques du tissu comme l'épaisseur ou la distension du tissu vont aussi influencer le greffon. (Metcalfé et al., 2006b, Aitken and Bagli, 2009b) Même si dans le cas d'une matrice biologique décellularisée, l'origine du tissu est importante, la technique de décellularisation a encore davantage d'influence sur la prise et la qualité de la greffe. Il existe plusieurs techniques, mais celle utilisant les détergents semble être préconisée dans la littérature.(Aitken and Bagli, 2009b, Atala, 2011) Les principaux détergents sont le SDS et le Triton-X-100. (Aitken and Bagli, 2009b) L'utilisation du SDS engendre la perte des glycosaminoglycanes (GAG) du tissu natif ce qui n'est pas observé avec le Triton-X-100. (Gilbert et al., 2006) Le SDS donne une charge négative aux matrices décellularisées ce qui semble repousser les cellules lors du réensemencement, par contre, cette charge négative attire les facteurs de croissance chargés positivement. (Wang et al., 2008) Si la MEC est endommagée lors des procédures de décellularisation, il peut y avoir des répercussions sur le comportement des cellules. Premièrement, le retrait du tissu de son environnement natif engendre une réponse inflammatoire, telle que l'activation de métalloprotéinases, de sérine-protéases et d'hyaluronidases. Sans le maintien du tissu à une température inférieure à 4 °C, ces protéases vont dégrader la MEC. (Cowan et al., 2005) L'exposition de la séquence arginine-glycine-aspartate a des effets sur la prolifération et l'angiogenèse. (Faye et al., 2009) Une décellularisation partielle peut laisser de l'ADN dans les matrices. La présence d'îlots CpG peut être suffisante pour induire une réponse immunitaire via les récepteurs *Toll-like* provoquant de l'inflammation. (Evren et al., 2010) Si l'on recouvre cette matrice avec une charge anionique, il semble qu'il soit possible de diminuer la réponse inflammatoire. (Rocha et al., 2002) Les irrégularités structurales dans la

matrice peuvent engendrer une croissance et une synthèse chaotique des fibroblastes pouvant mener à la fibrose. (Egles et al., 2008)

Les substituts non biologiques ou les biomatériaux servent de canevas ou de matrice extracellulaire dans l'optique d'y ajouter des cellules, des facteurs bioactifs et de faciliter la régénération naturelle. L'utilisation des substituts synthétiques semble attrayante grâce aux avantages nombreux qu'ils procurent tels que la reproductibilité du matériel, sa rapidité de production et la capacité de fabriquer un substitut « personnalisé » (forme, taille, degré d'élasticité, etc). Plusieurs matériaux synthétiques ont été utilisés comme les substituts de polyvinyle, de silicone, de Téflon et plusieurs autres. Par contre, ces matériaux n'avaient pas les qualités requises telles que la capacité mécanique et la compatibilité, pour permettre une bonne prise du greffon. (Atala, 2011) Plusieurs polymères synthétiques (PGA, PLLA, PLGA, PLC, PU) ont été testés seuls ou en combinaisons pour trouver l'amalgame parfait qui pourrait servir de base à un substitut complet. En plus de la nature même du polymère, sa surface semble jouer un rôle très important pour la migration ou l'adhérence des cellules urothéliales sur le polymère de synthèse. Des augmentations vésicales ont été effectuées à l'aide d'une matrice de collagène et de PGAensemencée avec des cellules urothéliales d'un patient par l'équipe du Dr Atala. Cette technique a un potentiel clinique, ce qui reste un exploit en soi, car il est le premier à avoir réussi ce type de greffe. (Atala et al., 2006)

Pour envisager l'utilisation d'un biomatériau à des fins cliniques, il doit être biodégradable, biorésorbable, avoir des propriétés mécaniques similaires à celles du tissu natif et ne doit pas provoquer d'inflammation. (Atala, 2011) La combinaison d'une matrice de PLGAensemencée avec des cellules souches du tissu adipeux différenciées en cellules musculaires lisses a permis la construction d'un substitut contractile chez le rat. (Jack et al., 2005)

D'autres approches comme la nanotechnologie sont utilisées pour optimiser les tissus synthétiques. La nanotechnologie pourrait faire le pont entre les échafaudages synthétiques et naturels. Par exemple, la combinaison du SIS et du PLGA aurait pour

effet d'améliorer la croissance cellulaire et la formation de la matrice extracellulaire. De plus, dans ce modèle, l'ajout de l'acide hyaluronique, qui est connu pour promouvoir la guérison sans la formation de cicatrice, améliorerait les capacités angiogéniques du substitut greffé. (Roth et al., 2010) Il est même possible d'ajouter des segments de peptide, comme le RDG par exemple, qui favorisent l'adhésion cellulaire sur le biomatériau.

L'évolution de la littérature dans ce domaine démontre clairement que les matrices ensemencées de cellules semblent être plus appropriées pour la reconstruction vésicale que celles non ensemencées. Cependant, vu la complexité de la MEC, très hétérogène dans la vessie, les matériaux synthétiques ne semblent pas encore suffisamment développés pour permettre de régénérer un substitut idéal. D'autres types de procédures comme des thérapies cellulaires ont été expérimentées en injectant des cellules pour aider la régénération naturelle de la vessie. (Huang et al., 2010) De tous les modèles discutés plus haut, seulement deux modèles mixtes, utilisant des matrices vésicales d'origine porcine, ont été approuvés par l'autorité de réglementation américaine, la « *Food and Drug Administration* », pour effectuer des augmentations vésicales. De plus, dans les dernières années, seule l'équipe du Dr. Atala a tenté des agrandissements avec des matrices synthétiques ensemencées avec des cellules autologues. Tous les modèles présentés ont des avantages et des inconvénients, aucun n'est idéal. Nous avons donc tenté de développer un modèle en utilisant une méthode différente, soit l'auto-assemblage.

1.5 ORIGINE DE L'AUTO-ASSEMBLAGE

Le génie tissulaire est un secteur en émergence en biologie. L'objectif final du génie tissulaire est de pallier au manque d'organes ou de tissus pour des greffes. Ce concept de pouvoir recréer l'Homme ou des parties de celui-ci sans passer par la reproduction, mais plutôt par le savoir, a toujours fait partie des rêves de l'humanité. Déjà, dans la Grèce antique, la légende de Prométhée faisait part de ce rêve. Plusieurs autres histoires ont le même engouement dont Adam et Ève et la guérison de Justinien. Puis vint

l'époque des sciences où Paracelse von Hohenheim tenta de créer la recette de la vie humaine et Johann Wolfgang von Goethe décrit la création de l'Homuncule dans ses écrits intitulés Faust. Depuis les années soixante-dix, la fiction tend de plus en plus vers la réalité grâce à une meilleure compréhension de la biologie. Le Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale (LOEX) est un laboratoire multidisciplinaire (biologie, chimie, ingénierie, pharmacie, biochimie) spécialisé en génie tissulaire. Son objectif principal consiste en l'élaboration de nouveaux substituts cutanés, cornéens, vésicaux et vasculaires. De plus, le LOEX utilise le génie tissulaire pour concevoir de nouveaux modèles d'étude comme pour la cicatrisation et le psoriasis. Au fil des années, le LOEX a développé et perfectionné la méthode d'auto-assemblage qui est à la base de la plupart des modèles des équipes du LOEX. Cette méthode permet aux cellules de produire leur propre environnement en produisant leur matrice extracellulaire. (Auger et al., 2002)

1.6 ÉVOLUTION DU MODÈLE D'AUTO-ASSEMBLAGE DE L'ÉQUIVALENT VÉSICAL AU LOEX

À cause du manque de substituts appropriés pour la reconstruction de tissus urologiques, le docteur Stéphane Bolduc, chirurgien urologue pédiatrique dans la région de Québec, a entamé des recherches au sein du LOEX. L'objectif principal de son équipe est le développement d'un tissu conçu par génie tissulaire, en quantités suffisantes pour permettre des reconstructions vésicales, tout en engendrant moins de complications que les substituts alternatifs aujourd'hui disponibles. Dans un premier temps, il s'est inspiré d'un des modèles du LOEX élaboré par l'équipe du docteur Berthod. (Gingras et al., 2003) Ce premier modèle était basé sur le principe d'une éponge de collagène-chitosanensemencée de cellules de porc. Cette éponge servait de support à la prolifération des fibroblastes pour former le stroma du substitut. Puis, des cellules urothéliales étaient ensemencées sur la partie supérieure du stroma. Suite à une phase de prolifération épithéliale, le modèle était placé à l'interface air/liquide pour permettre la différenciation d'une couche de cellules urothéliales en un urothélium mature. Même si cet échafaudage en éponge présentait une histologie similaire au tissu

natif, il ne permettait pas de reproduire des propriétés mécaniques suffisantes pour résister à des manipulations chirurgicales. (Magnan et al., 2006) Pour tenter de résoudre ce problème, l'élaboration d'un substitut vésical prit alors une nouvelle direction avec l'utilisation de la méthode de génie tissulaire par auto-assemblage. Cette technique n'utilise aucun matériau biologique ou synthétique exogène. L'absence de ces matériaux, combiné à l'utilisation de cellules autologues, devrait permettre une diminution de l'inflammation et d'autres complications associées à la réponse immunitaire de l'hôte. (Badylak and Gilbert, 2008) Cet équivalent vésical est reconstruit avec des fibroblastes dermiques humains et des cellules urothéliales porcines par la méthode d'auto-assemblage décrite au chapitre 2. (Bouhout et al., 2009) Brièvement, les cellules sont cultivées avec de l'acide ascorbique pour favoriser le dépôt de la matrice ce qui permet de générer des feuillets cellularisés avec les fibroblastes ou les cellules stromales. Trois semaines plus tard, ces feuillets sont superposés. Suite à la fusion des feuillets, des cellules urothéliales sontensemencées sur le tissu. (Fig. 5) Une fois la différenciation des cellules urothéliales achevée, l'équivalent est caractérisé. Comme pour le premier modèle, l'histologie était similaire à celle d'un tissu natif. Des tests mesurant la perméabilité de l'équivalent à une solution contenant de l'urée marquée au C^{14} ont permis de démontrer que celle-ci était similaire à celle d'une vessie native de porc. De plus, contrairement au premier modèle, ce tissu reconstruit a des propriétés mécaniques suffisantes pour supporter des manipulations chirurgicales. (Bouhout et al., 2009) Nous avons souhaité poursuivre l'amélioration de ce modèle en lui incorporant premièrement des cellules humaines et deuxièmement des cellules stromales isolées du tissu adipeux (CSTA).

Méthode de construction par auto-assemblage

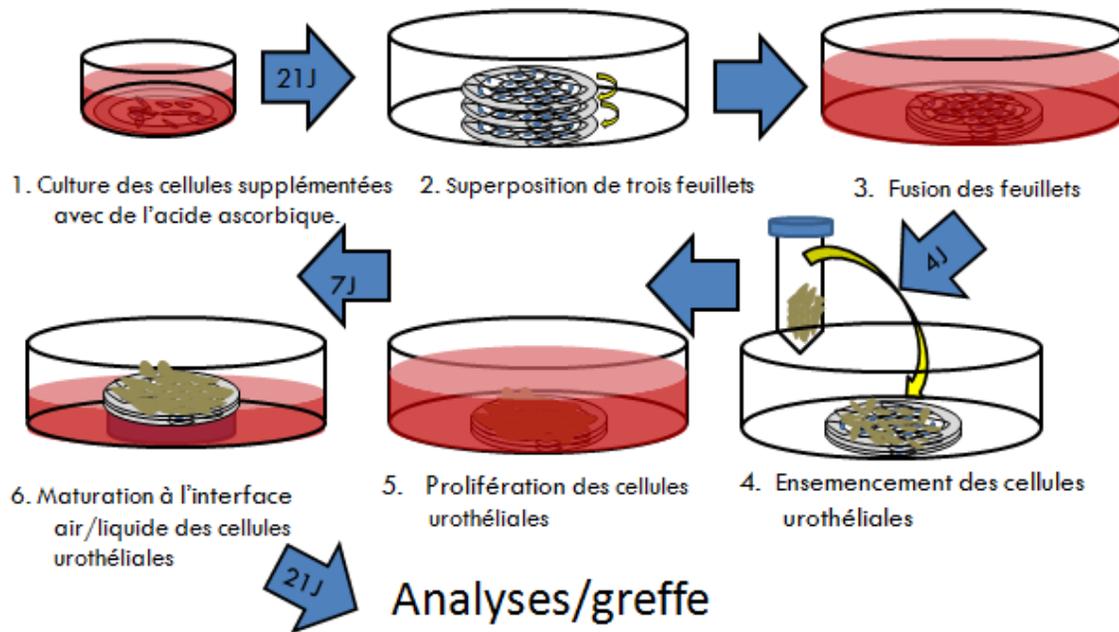


Figure 5 : Schéma de la méthode de reconstruction par auto-assemblage

Schéma des principales étapes de la reconstruction d'un équivalent vésical par la méthode d'auto-assemblage. **1** : La culture des cellules se fait avec de l'acide ascorbique [50 µg/ml]. Celui-ci sert de cofacteur à la prolyl-hydroxylase, qui permet la formation de fibres de collagène matures. **2** : Après 21 jours de culture, trois feuillets sont superposés pour former une tricouche. La composition de la tricouche peut différer selon le modèle reconstruit. **3** : Fusion des feuillets. Ce processus est effectué par les cellules de façon autonome. **4** : 4 jours suivant la superposition des feuillets, il y a ensemencement des cellules urothéliales. **5** : La construction est submergée pour permettre la prolifération des cellules urothéliales pendant 7 jours. **6** : Suite à la prolifération, les équivalents sont placés à l'interface air/liquide pendant 21 jours pour permettre la formation et la différenciation de l'urothélium. Après ce temps de maturation, des analyses pour la caractérisation sont effectuées ou dans certains cas on procède à des greffes pour effectuer d'autres types d'analyses.

1.7 CELLULES STROMALES ISOLÉES DU TISSU ADIPEUX

Depuis plusieurs années maintenant, les cellules souches sont à l'avant-scène dans plusieurs secteurs de la recherche. Leur potentiel thérapeutique donne espoir, qu'une fois bien utilisées, elles permettront de trouver des solutions à plusieurs maladies qui sont encore à ce jour incurables par des méthodes plus conventionnelles. Ces cellules ont plusieurs qualités dont celles d'être multipotentes. Elles sont en mesure de s'auto-renouveler presque indéfiniment dans les conditions appropriées, mais peuvent perdre ce potentiel lors de culture *in vitro*. Elles peuvent se différencier en plusieurs types cellulaires. (Zuk et al., 2001) Dans le cadre de ce projet de recherche, des populations de cellules stromales isolées du tissu adipeux (CSTA) ont été utilisées. Dans ces populations il y a la présence de cellules stromales et d'une sous population de cellules souches. La première observation des CSTA a été décrite dans les années 70 dans un article décrivant la croissance et les fonctions métaboliques des cellules dérivées du tissu adipeux humain. (Dixon-Shanies et al., 1975) La recherche et l'utilisation des CSTA ont explosé après la parution de deux articles phares qui démontrent que les cellules souches du tissu adipeux ont le même potentiel que les cellules souches mésenchymateuses ou de la moelle osseuse. (Zuk et al., 2001, Zuk et al., 2002) Des études ultérieures ont montré qu'une sous population au sein des cellules du tissu adipeux possédait de grandes qualités pouvant être utilisées dans le cadre de la thérapie cellulaire, comme c'est le cas des cellules souches. Dans l'optique d'optimiser notre équivalent vésical autologue, les CSTA semblaient pouvoir nous aider grâce à leur facilité d'obtention, leur sécrétion de médiateurs angiogéniques et anti-inflammatoires et leurs sous population riches en cellules souches. (Zuk et al., 2001) Ce projet fait suite à une étude précédente, soit l'utilisation des CSTA pour la reconstruction d'un derme par la méthode d'auto-assemblage. (Trottier et al., 2008) Il a été démontré que les CSTA pouvaient être utilisés pour former stroma servant d'assise à un modèle de peau reconstruit par génie tissulaire avec la méthode auto-assemblage.

1.7.1 Obtention facile des CSTA

Contrairement à la plupart des cellules souches adultes (moelle osseuse, peau), l'obtention des CSTA se fait grâce à une chirurgie qui implique une courte convalescence. De plus, dans la quasi-totalité des cas, le gras est un tissu présent en bonne quantité chez la majorité des adultes. Il y a deux principales techniques pour obtenir les CSTA : la lipoaspiration et la résection chirurgicale (lipectomie). À la base, ces deux techniques étaient effectuées pour obtenir des bénéfices principalement esthétiques. Avec peu de volume tissulaire, il est possible d'obtenir un grand nombre de CSTA, il est donc plus facile d'obtenir des CSTA comparativement à d'autres types cellulaires, par exemple les cellules souches de la moelle osseuse. (Yoshimura et al., 2006, Zuk et al., 2002)

1.7.2 Production rapide de matrice dans des conditions dynamiques de culture

Les CSTA ont plusieurs avantages, mais elles ont démontré la capacité d'être influencées par un environnement dynamique à l'aide d'un agitateur 3D de type *gyrotwister*. (Fortier et al., 2011) Cette caractéristique permettrait la réduction du temps de culture des équivalents, car en condition dynamique il est possible de réduire le temps de culture de cinq semaines à trois semaines sans perdre l'intégrité structurelle ou mécanique de la matrice produite par les CSTA.

1.7.3 Sécrétion de médiateurs angiogéniques

Les cellules stromales isolées du tissu adipeux sont capables de sécréter des facteurs importants pour déclencher et accentuer l'angiogenèse. Cet aspect d'accélération de l'angiogenèse est indispensable à long terme pour notre projet. L'angiogenèse se définit par la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Plusieurs groupes ont démontré que les CSTA sécrètent du *vascular endothelial growth factor* (VEGF), du *hepatocyte growth factor* (HGF), du *fibroblast growth factor* (FGF) et la *chimiokine stromal-cell derived factor-1* (SDF-1). (Ebrahimian et al., 2012, Hsiao et al., 2012, Strassburg et al., 2012) Les VEGF, HGF, FGF sont des facteurs de croissance qui jouent des rôles substantiels dans la prolifération cellulaire et le processus

d'angiogenèse. La chimiokine SDF-1 a un rôle encore méconnu dans l'angiogenèse, mais semble promouvoir la migration des cellules endothéliales. (Salcedo et al., 1999) Donc, SDF-1 pourrait, indirectement, jouer un rôle important pour la formation de nouveaux capillaires. Le fait de pouvoir relier le greffon, reconstruit par génie tissulaire, le plus rapidement possible au système sanguin de l'hôte assure une meilleure prise du greffon et réduit la probabilité de nécrose du tissu en permettant l'apport de nutriments et d'oxygène. Ces hypothèses ont déjà été vérifiées par plusieurs équipes. (Ebrahimian et al., 2009, Blasi et al., 2011)

1.7.4 Sécrétion de médiateurs anti-inflammatoires

Lors de la caractérisation des cellules souches isolées du tissu adipeux, certains groupes ont observé la sécrétion de facteurs immunomodulateurs comme TGF- β , TIMP-1 et TIMP-2 par exemple. (Kuhbier et al., 2010, Kang et al., 2008) Ces médiateurs semblaient permettre la diminution de l'inflammation dans les voies respiratoires en diminuant la production de mucus et de cytokines Th2 dans un modèle de souris. (Park et al., 2010) Il a été montré que, malgré l'activation de la réponse immune par la présence de TNF- α , le milieu conditionné de CSTA a un effet anti-inflammatoire sur la lignée U937. (Blasi et al., 2011, Kilroy et al., 2007)

1.7.5 Population riche en cellules souches

Les CSTA contiennent approximativement 2 % de cellules souches. (Strem and Hedrick, 2005) Ces cellules pourront jouer un rôle important à long terme dans les tissus reconstruits en permettant le renouvellement cellulaire du stroma ainsi qu'en assurant sa vascularisation et en réduisant la réponse immunitaire non souhaitée. Donc, pour toutes ces raisons, nous avons jugé important de vérifier l'intégration des CSTA à notre modèle et vérifier si elles pouvaient améliorer les qualités de notre équivalent vésical.

1.8 OBJECTIFS DE L'ÉQUIPE DE RECHERCHE

Le but à long terme de l'équipe du Dr. Bolduc est la reconstruction de tissus urologiques autologues via une biopsie d'un patient nécessitant une reconstruction soit de l'uretère, de la vessie ou de l'urètre, à l'aide du génie tissulaire, par la méthode d'auto-assemblage. Les cellules nécessaires à la reconstruction du tissu seront extraites d'une biopsie du patient. Dans le cadre de ma maîtrise les objectifs étaient de confirmer la possibilité de reconstruire un substitut urologique produit par génie tissulaire et de vérifier si l'utilisation des CSTA pour améliorer le substitut du aux grands potentiels de ces cellules.

1.9 HYPOTHÈSE DE RECHERCHE

Notre équipe croit que la reconstruction d'un tissu autologue et fonctionnel sans biomatériau ou échafaudage synthétique permettra de réduire l'incidence des complications engendrées lors de l'augmentation ou de la reconstruction vésicale. De plus, l'utilisation des cellules stromales isolées du tissu adipeux (CSTA) pourrait améliorer la prise du greffon grâce au grand potentiel de ces cellules, bien décrit et toujours à l'étude dans la littérature.

1.10 OBJECTIFS DE MON PROJET DE RECHERCHE

Le but de ma maîtrise était de vérifier la possibilité de produire un équivalent vésical entièrement humain, contenant ou non des cellules isolées du tissu adipeux pour la formation du stroma. L'optimisation des méthodes de production et d'analyses structurales et fonctionnelles des substituts faisait partie intégrante de mon projet en vue d'améliorer les modèles déjà existants.

2. Adipose-Derived Stromal Cells for the Reconstruction of a Human Vesical Equivalent

2.1 AVANT-PROPOS:

J'ai pris part à la totalité des aspect de cet article (conception des expériences, résultats, analyses, écriture) lors de ma maîtrise. Cet version modifier de l'article est intitulé « **Adipose-Derived Stromal Cells for the Reconstruction of a Human Vesical Equivalent** » ou « L'utilisation des cellules stromales isolées du tissu adipeux pour la reconstruction d'un équivalent vésical humain » a été accepté et publié dans le « *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* ». (Rousseau et al., 2013)

2.2 RÉSUMÉ DE L'ARTICLE :

Le génie tissulaire offre une variété de modèles pour la reconstruction vésical, chacun ayant leurs avantages et leurs limites de fonctionnalité, souvent attribués à l'absence d'urothélium. En utilisant le génie tissulaire, nous démontrons la possibilité de reconstruire un équivalent vésical complètement humain sans utiliser de matrices exogènes. Trois modèles sont évalués en caractérisant leur matrice, leur fonctionnalité et leurs propriétés mécaniques. Chaque modèle montrait un stroma riche en collagène de type I et III. Deux modèles montrent la présence d'un urothélium différencié et fonctionnel avec la présence d'uroplakines et de jonctions serrées. Chaque modèle d'équivalent vésical montre des propriétés mécaniques distinctes. Les équivalents vésicaux reconstruits sans l'apport de matrices exogènes, en condition *in vitro* montrent qu'ils sont en mesure de supporter un stress mécanique et forment un urothélium fonctionnel qui possède une fonction barrière contre l'urée. Ces avantages pourraient jouer un rôle clef dans la réduction des complications dans les cas de reconstruction vésicale.

Authors

Alexandre Rousseau, M.Sc. Julie Fradette, Ph.D, Geneviève Bernard, M.Sc., Robert Gauvin, Ing. Ph.D, Véronique Laterreur, Ing. M.Sc. and Stéphane Bolduc, MD

2.3 Abstract

Despite a wide panel of tissue engineering models available for vesical reconstruction, the lack of a differentiated urothelium remains their main common limitation. For the first time to our knowledge, an entirely human vesical equivalent, free of exogenous matrix, has been reconstructed using the self-assembly method. Moreover, we tested the contribution of adipose-derived stromal cells, an easily available source of mesenchymal cells featuring many potential advantages, by reconstructing three types of equivalent, named fibroblast vesical equivalent, adipose-derived stromal cell vesical equivalent and hybrid vesical equivalent –the latter containing both adipose-derived stromal cell and fibroblasts. The new substitutes have been compared and characterised for matrix composition and organisation, functionality and mechanical behavior. Although all three vesical equivalents displayed an adequate collagen type I and III expression, only two of them, fibroblast vesical equivalent and hybrid vesical equivalent, sustained the development of a differentiated and functional urothelium. Presence of uroplakins Ib, II and III and tight junction marker ZO-1 was detected and correlated with impermeability. Mechanical resistance of these tissues was sufficient to ensure their use by surgeons. We present here in vitro tissue-engineered vesical equivalents, built without the use of any exogenous matrix, able to sustain mechanical stress and to support the formation of a functional urothelium, i.e. able to display a barrier function similar to the one of a native tissue.

Keywords: tissue engineering, bladder reconstruction, adipose-derived stromal cell, barrier function, urology, uroplakins

Abbreviations:

Uc : urothelial cells

VE : vesical equivalent

ASC : adipose-derived stromal cells

Fb : fibroblast

ECM : extracellular matrix

P : passage

Fb-VE : fibroblast vesical equivalent

ASC-VE : adipose-derived stromal cells vesical equivalent

Hybride-VE : Hybrid vesical equivalent

UP : uroplakin

UTS : ultimate tensile strength

2.4 Introduction

Despite recent progress in tissue engineering, the need for a functional tissue substitute for bladder reconstruction still remains a reality. Currently, tissues from the gastro-intestinal tract are used as the gold standard for bladder augmentation or replacement. However, alternative substitutes have been recently described to circumscribe the well-documented complications (Atala et al., 2006, Petrovic et al., 2011). In these cases, the use of exogenous matrices in tissue-engineered substitutes can also lead to diverse complications. The most frequently observed are inflammation, immune responses and lack of vascularisation leading to contraction and necrosis of the substitute (Metcalf et al., 2006a, Evren et al.). Our group has recently reported the *in vitro* reconstruction of an engineered tissue that can be elaborated from potential patients in an autologous fashion (Bouhout et al., 2009). This model produces tissue using the tissue engineering self-assembly approach. Addition of ascorbic acid in culture medium stimulated dermal fibroblasts to produce and

assemble their own extracellular matrix, without the addition of any exogenous biomaterial (Auger et al., 2002, Vermette et al., 2007). Moreover, the addition of porcine urothelial cells (Uc) on the top of the self-assembled stroma leads to the development of a functional vesical equivalent (VE) which could greatly improve the clinical outcome for this technology (Bouhout et al., 2010). Here, we have successfully reconstructed the vesical equivalents using only cells of human origin. Moreover, we investigated the possibility of using human adipose-derived stromal cells (ASC) as an additional mesenchymal cell source instead of dermal fibroblasts for vesical reconstruction. The successful use of ASCs for the reconstruction of the stromal compartment of human skin substitutes using the self-assembly approach (Trottier et al., 2008), combined to their advantageous matrix deposition during the self-assembly approach compared to dermal fibroblasts (Fortier et al., 2011) prompted us to verify the hypothesis that ASCs could improve the actual fibroblast-based vesical equivalent model. Therefore, our goal was to compare totally human vesical equivalents reconstructed using fibroblasts, ASC or a combination of both cell types to generate the stromal compartment unto which Uc cells are seeded. We evaluated the composition of the matrix, the function and structure of the urothelium as well as the mechanical properties of these reconstructed human tissues.

2.5 Methods

2.5.1 Extraction and culture of human cells

Fibroblasts (Fb) (N=3) were isolated from three distinct human skin biopsies as previously described.(Germain et al., 1993, Auger et al., 1995) ASCs were extracted and cultured as previously detailed (Vermette et al., 2007, Zuk et al., 2001, Hauner et al., 1989) from lipoaspirated subcutaneous adipose tissues of female donors (N=3 cell populations). Human Uc were extracted from a cadaveric human bladder biopsies using the procedure previously described (Magnan et al., 2006). All protocols were approved by the local Ethical Research Committee of the Centre Hospitalier *Affilié* Universitaire de Québec (CHA).

2.5.2 Construction of vesical equivalents

The Fbs and ASCs were used between their passages fourth and sixth. Cells were seeded at 2×10^4 cells/cm² and cultured under media motion (35 rpm, GyrotwisterTM, Woodbridge, NJ). Cultures were placed onto a 3D shaker (GyrotwisterTM) that is generating a wave-like media motion to which the ASC respond by producing thicker tissues (enhanced collagen deposition) than dermal fibroblast cultures. Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium supplemented with 10% foetal bovine serum, antibiotics: 100 U/ml penicillin (Sigma, Oakville, Ontario) and 25 µg/ml gentamicin (Schering, Pointe-Claire, Canada), and 50 µg/ml of ascorbic acid (Sigma) to stimulate the formation of extracellular matrix (ECM), as previously described (Fortier et al., 2011, Bouhout et al., 2010, Vermette et al., 2007). After 21 days in culture, Fbs and ASCs formed a cell sheet that could then be assembled into thicker tissues. For each VE, three cell sheets were superimposed and cultured for 4 days in DMEM-Ham containing 10% of Fetal clone II serum (Hyclone, Logan, UT) to favour cohesion between the cell sheets. Three models were reconstructed

and compared (Figure 6): 1) ASC-VE were composed of three ASCs cell sheets; 2) Fb-VE were composed of three Fb cell sheets; 3) Hybrid-VE were composed of one Fb cell sheet on the top of two ASCs cell sheets. Then, 2×10^4 cells/cm² of human urothelial cells at P3, were seeded on top of each construct and cultured for 7 days in DMEM-Ham containing 10% FBS (Hyclone), 5 µg/ml insulin (Sigma), 0.4 µg/ml hydrocortisone (Calbiochem, San Diego, CA), 10^{-10} M cholera toxin (Sigma), 10 µg/ml epidermal growth factor (Austral Biologicals, San Ramon, CA) and antibiotics. VE were further matured 21 days at the air/liquid interface. For the entire culture period, VE were placed in a humidified incubator at 37°C with 8% CO₂ and media containing 50 µg/ml of ascorbic acid (Sigma) were changed three times a week. Each of the constructs VE were assembled using 3 different cellular populations (N) of Fb and/or ASCs and each condition was repeated in triplicates (n).

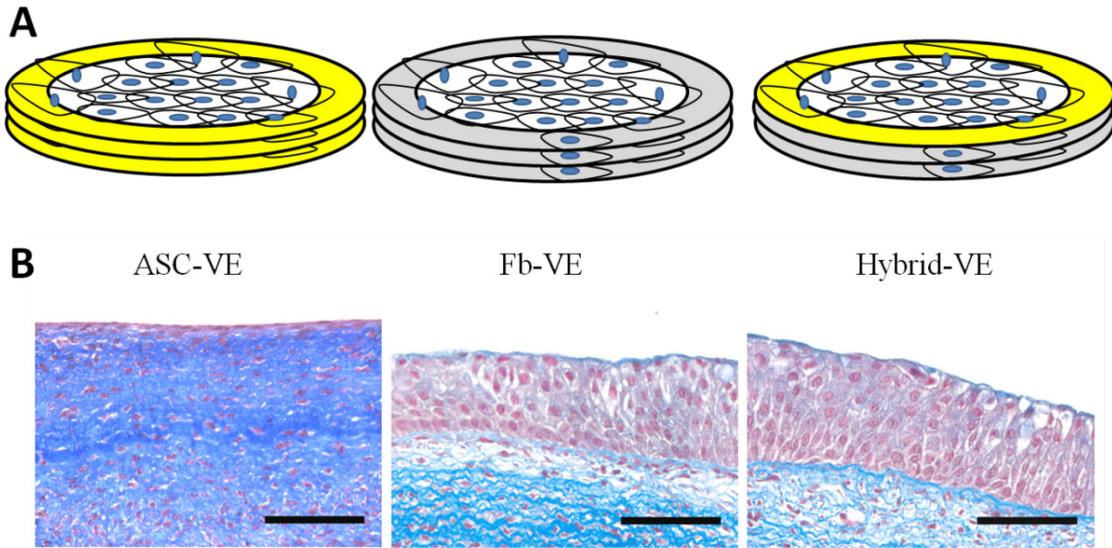


Figure 6 : Representation of the vesical equivalent models and histological cross-sections of the human tissue-engineered vesical equivalents

A : Representation of the vesical equivalent model. ASC-VE is composed of three ASC cell sheet. The Fb-VE is composed of three Fb cell sheet. The Hybrid-VE is composed of one Fb cell sheet over two ASC cell sheet. **B** : Samples stained with Masson's trichrome show urothelial cells (purple) firmly anchored to the underlying stroma composed of ECM (blue) for the ASC-VE, Fb-VE and Hybrid-VE. Scale bars: 100 μ m.

2.5.3 Histology

Samples of each VE were fixed in a 3.7% neutral buffered formaldehyde solution for 24 hours and embedded in paraffin. Histological sections (5 μ m) were cut using a microtome and stained using Masson's Trichrome.

2.5.4 Immunohistochemistry

Immunolabellings were performed on OCT-embedded samples of each VE (frozen tissue medium OCT compound, Tissue-Tek, Bayer, Etobicoke, Canada). Sections (5 µm-thick) of frozen VE were fixed in 100% methanol, blocked in phosphate buffered saline containing 1% (w/v) bovine serum albumin (Sigma) and incubated with primary antibodies. The primary antibodies used are described in Table 1. Secondary antibodies were coupled with Alexa 594 or Alexa 488 fluorochromes (Molecular Probes, Grand-Island, NY). For the immunolabelling of the uroplakins (UP) Ib, II and III, paraffin-embedded samples of the VE were used. Deparaffinization was first performed using xylene and then samples were placed in 0.1M citric buffer for 30 min at 91°C. The primary antibodies were omitted for controls. Nuclei were stained with Hoechst nuclear dye (Sigma). The specimens were examined with a Nikon eclipse E600 epifluorescence microscope (Nikon, Tokyo, Japan) and images were processed with AxioVs 40 V4.8.2.0 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH).

Table 1: Primary antibodies used

Specificity	Dilution	Source
Type I collagen	1:400	ARP, Billerica, MA
Type III collagen	1:200	Cedarlane, Burlington, Ontario
Fibronectin	1:100	ATCC, Manassas, VA
Laminin	1:200	Abcam, Cambridge, MA
Laminin 5	1:600	Chemicon, Cambridge, MA
Keratin 8/18	1:100	Calbiochem, San Diego, CA
Uroplakin Ib	1:50	Santa Cruz, Santa Cruz, CA
Uroplakin II	1:50	Santa Cruz, Santa Cruz, CA
Uroplakin III	1:50	Santa Cruz, Santa Cruz, CA
ZO-1	1:50	Transduction Lab., NJ, USA

2.5.5 Permeability studies

Tissue permeability was evaluated using Franz cells and ^{14}C -urea, at multiple time points for a maximum of eight hours as previously described (Bouhout et al., 2010, Franz, 1975). Fb-VE, ASC-VE and Hybrid-VE cultured for 21 days at the air/liquid interface were compared to native porcine bladders. The amount of radioactivity was determined by analysis of the medium in the receiver compartment at selected time intervals with a scintillation counter (Beckmann, Fullerton, CA). Values are expressed as mean percentage \pm standard error of the mean. (Figure 7)

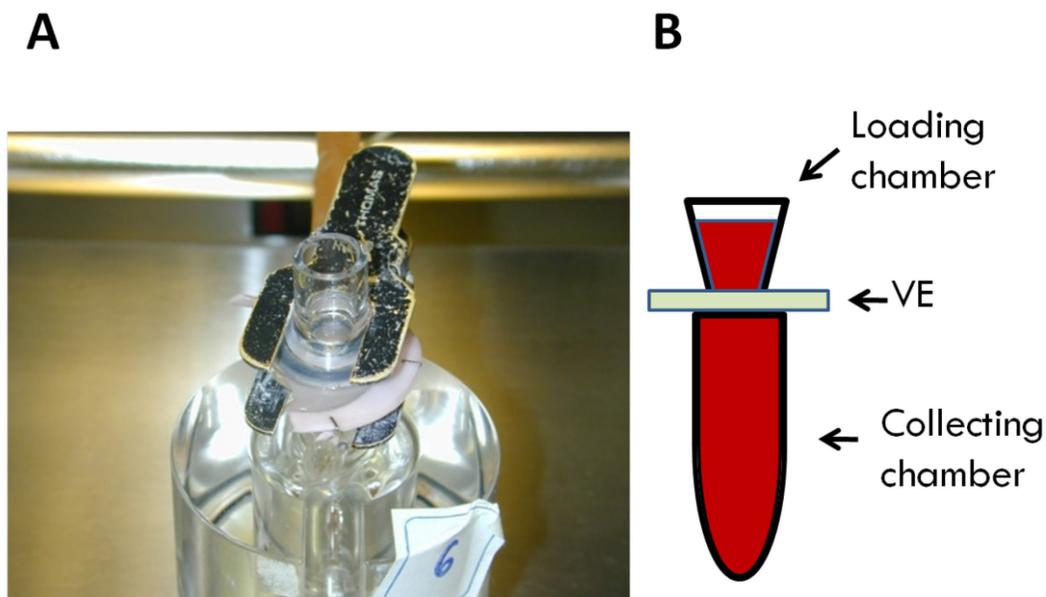


Figure 7 : Scheme of the Franz cell for the barrier function test

A : Picture of Franz cell. **B** : Scheme of the Franz cell. The VE is squeezed between the loading chamber, where the ^{14}C -urea is added, and the collecting chamber.

2.5.6 Mechanical testing

Ultimate tensile strength (UTS), modulus, as well as failure strain and strength of the tissue-engineered VE were measured as previously described using a mechanical tester (Tytron 250, MTS Systems Corporation, MN, USA)(Bouhout et al., 2010). The thickness was measured on histological sections using the ImageJ software (NIH, Bethesda, MD). Cross-sectional areas were obtained by multiplying the thickness and width of specimens. Samples were analyzed by uniaxial tensile testing, conducted without any slippage or failure at the grips during the testing procedures. Rupture points were observed in the gage length (middle part) for all samples tested. Stress-strain curves displayed a characteristic toe-part followed by a linear region and a failure load, indicating the viscoelastic behaviour of the tissues. Kruskal-Wallis test was used for statistical comparison of the mechanical properties of the engineered tissues. Results are presented as mean +/-standard error of the mean, with a p-standard of $p < 0.05$ signifying statistical significance (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$). (Figure 8)

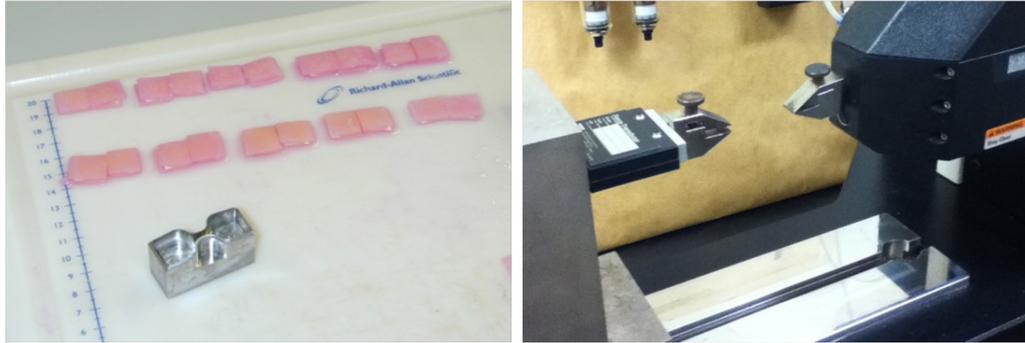
A**B**

Figure 8 : Mechanical testing

A: Preparation of the tissue with a bone shaped punch. Then the tissue is placed between the grips of the Tytron 250 TM. **B :** Schematic of the mechanical test. The tissue is stretched until it ruptured in the middle section.

2.5.7 Scanning electron microscopy

Samples were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4) for 24 hours, washed in cacodylate buffer, and postfixed in 1% osmium tetroxide for 30 min. Scanning electron microscopy (SEM) was performed on gold-coated specimens and observed with a JEOL JSM-63060LV electron microscope (Soquelec, Montréal, Canada).

2.6 Results

2.6.1 Histology of the human VE constructs

Each VE showed the presence of a dense and well-organized ECM (Fig.6B), in particular for VE containing ASC's (Fig.6B, right panel). All VE models supported Uc growth but only the Fb-VE and the Hybrid-VE allowed the formation of a transitional and well-differentiated urothelium (Fig.6B, mid and left panel). Macroscopically, each type of VE featured a homogenous tissue structure and surface.

2.6.2 Matrix and urothelial cell protein expressions within human VE constructs

The ECM components expressed by the VE stromal compartment and basement membrane were characterised by immunolabelling. Type I and III collagens were expressed by all VEs (Fig.9A to C and D to F respectively), as well as fibronectin and laminin (Fig.9G to I and J to L respectively). Two major differences were noticed between the ASC-VE and the other VE. The ASC-VE did not express laminin 5 (Fig.9M) and keratin 8/18 (Fig.9P). In contrast, the Fb-VE and Hybrid-VE featured laminin 5 expression (Fig.9N and O) and the presence of Uc labelled with keratin 8/18 (Fig.9Q and R). Urothelial cells of the Fb-VE and the Hybrid-VE also expressed differentiation and maturation markers such as UP Ib, II, III (Fig.10A) as well as *Zonula Occludens* (ZO)-1 (Fig.10B) at the superficial Uc boundaries.

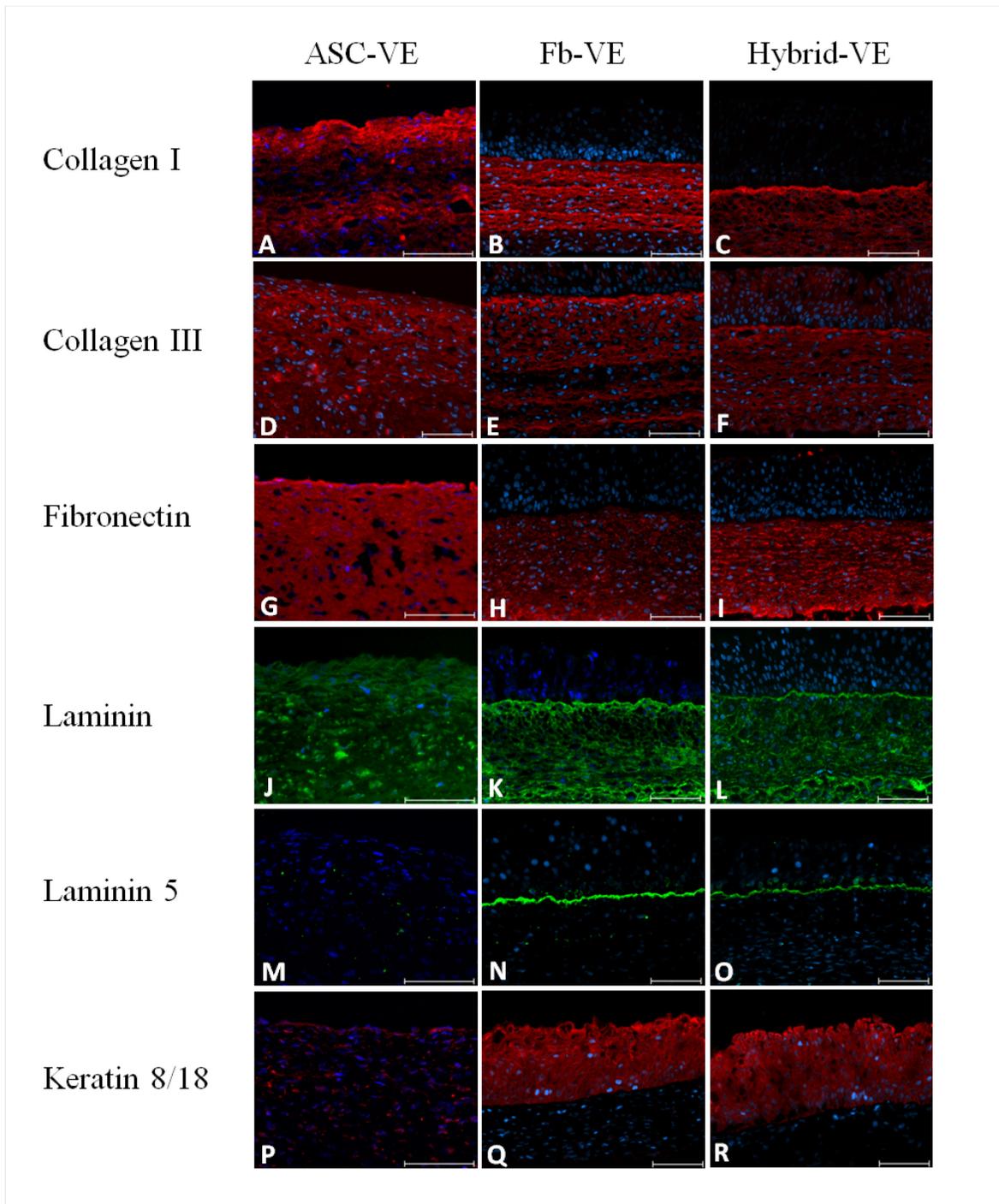


Figure 9 : Characterization by immunostaining of the extracellular matrix and basement membrane components expressed by the human ASC-VE, Fb-VE and Hybrid-VE

Expression of type I (A-C) and III (D-F) collagens, fibronectin (G-I) and laminin (J-L) was almost identical for every VE models, confirming a uniform and well-organized ECM. Laminin 5 (green) (M-O) is one of the main constituents of the basal membrane and was predominantly observed between the stroma and the urothelium of Fb-VE and Hybrid-VE. Keratin 8/18 (red) (P-R) is expressed by epithelial cells (urothelial cells in this model) and

was observed mainly on Fb-VE and Hybrid-VE. The upper portion of each image represents the urothelial lining and the lower portion, the stromal compartment. Scale bars: 100 μm

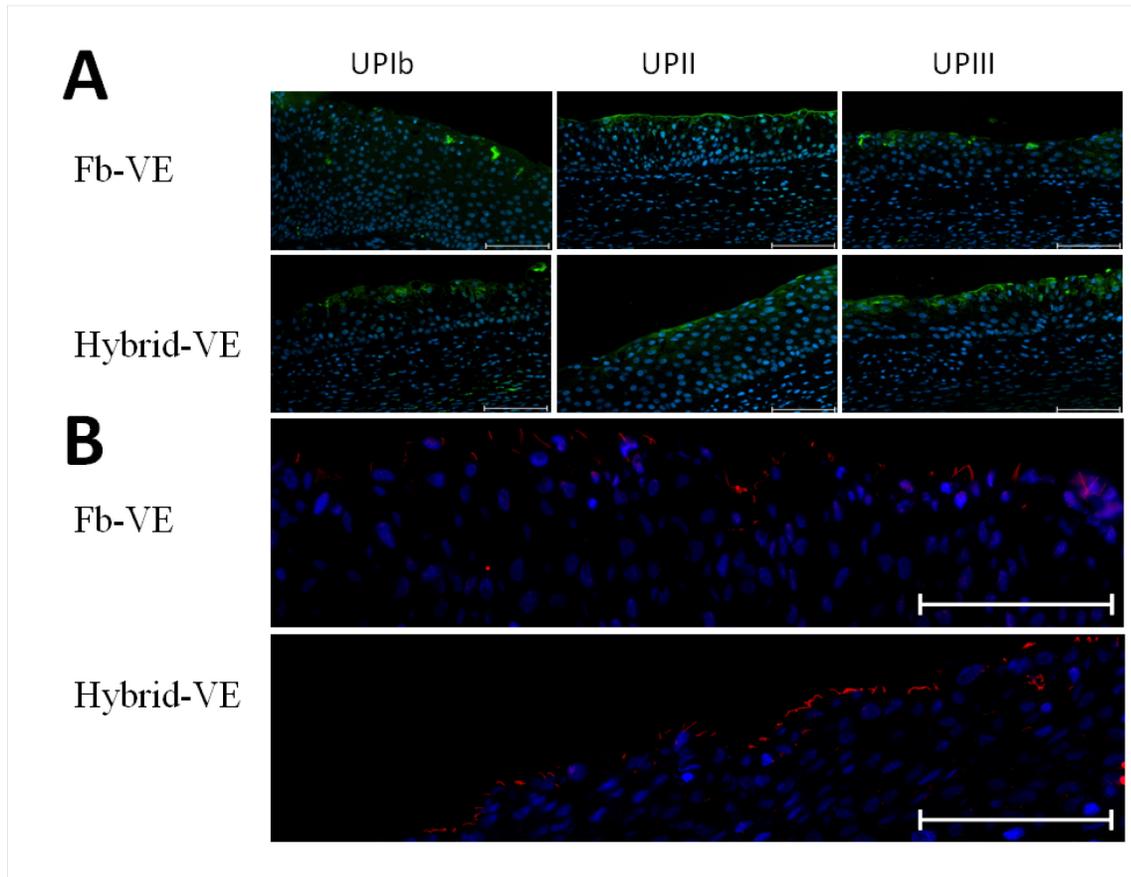


Figure 10 : Expression of the proteins associated to urothelial cells differentiation of the human Fb-VE and Hybrid-VE

A: Uroplakin Ib, II and III) are mainly expressed by the superficial urothelial cells of the human Fb-VE and Hybrid-VE. **B:** The tight junction protein ZO-1 staining is shown on top of those superficial urothelial cells. Scale bars: 100 μm

2.6.3 Barrier function

The measured permeability of the VE reflected its structural characteristics (also depicted by histology and immunolabelling). The ASC-VE were significantly more permeable at every time point examined. Both the Fb-VE and Hybrid-VE featured permeability to the radioactive probe comparable to the native bladder tissues with no significant difference after 8 hours (Fig.11).

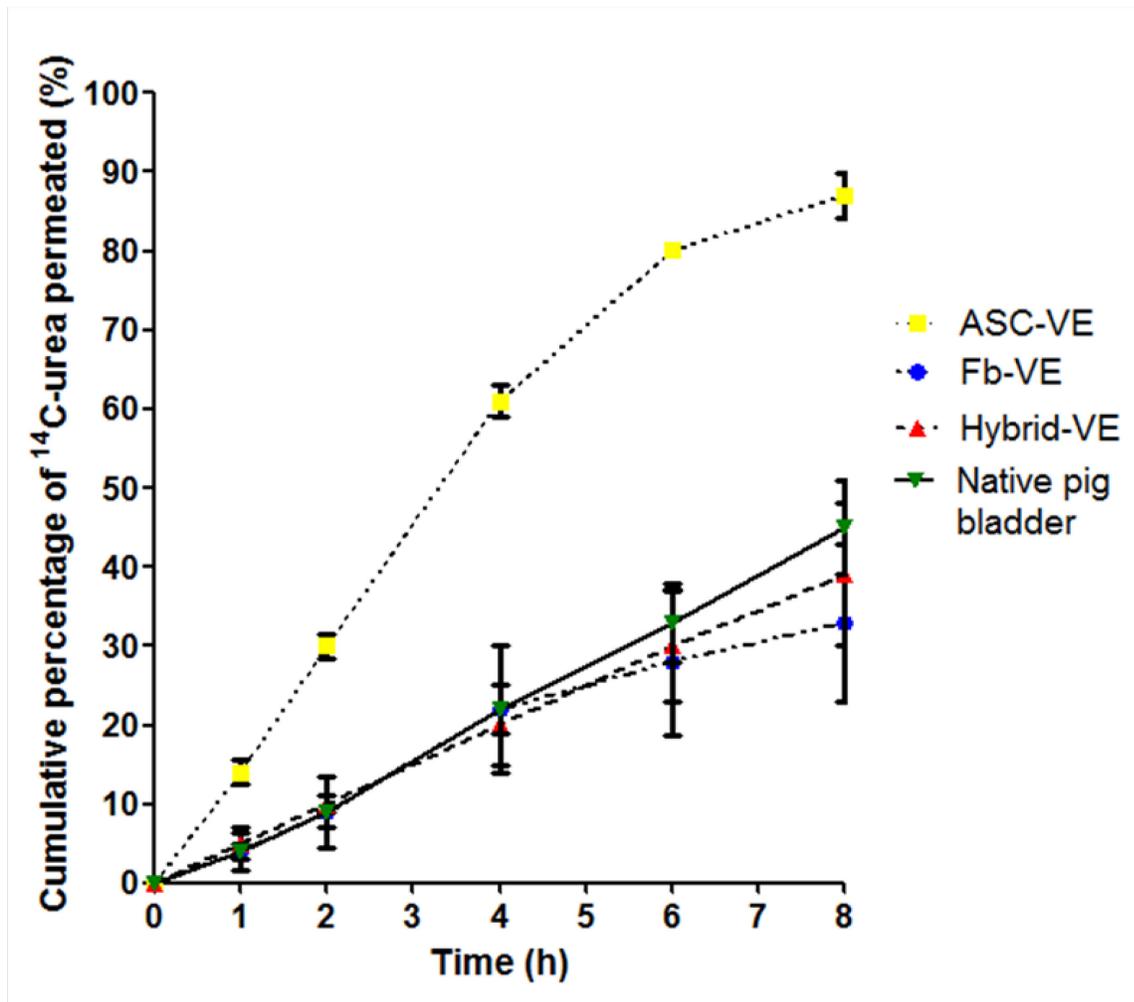


Figure 11 : Curves of permeated cumulative percentage using ^{14}C -urea *in vitro*

The permeability of each engineered VE was compared to native porcine bladder over 8 hours. Tests were performed using 3 different cellular populations (N) for Fbs and ASCs. Every construct and pig bladder were tested in triplicates (n=3). Each point represents a mean +/- standard error of the mean.

2.6.4 Mechanical resistance

All three constructs were cultured for the same length of time and under the same conditions. Stromal thickness of the Fb-VE and Hybrid-VE was significantly lower than the ASC-VE (Fig. 12A). The UTS was significantly higher for the Fb-VE and the Hybrid-VE compared to the ASC-VE (Fig. 12B). The Hybrid-VE featured the highest modulus, indicating greater elasticity compared to the ASC-VE (Fig. 12C). Interestingly, the Fb-VE and Hybrid-VE displayed similar mechanical behavior for all these parameters (Fig. 12). Failure strength, which represents the strength required to rupture the VE was higher for the ASC-VE (Fig. 12D). The failure strains were not significantly different between of the VE (Fig. 12E).

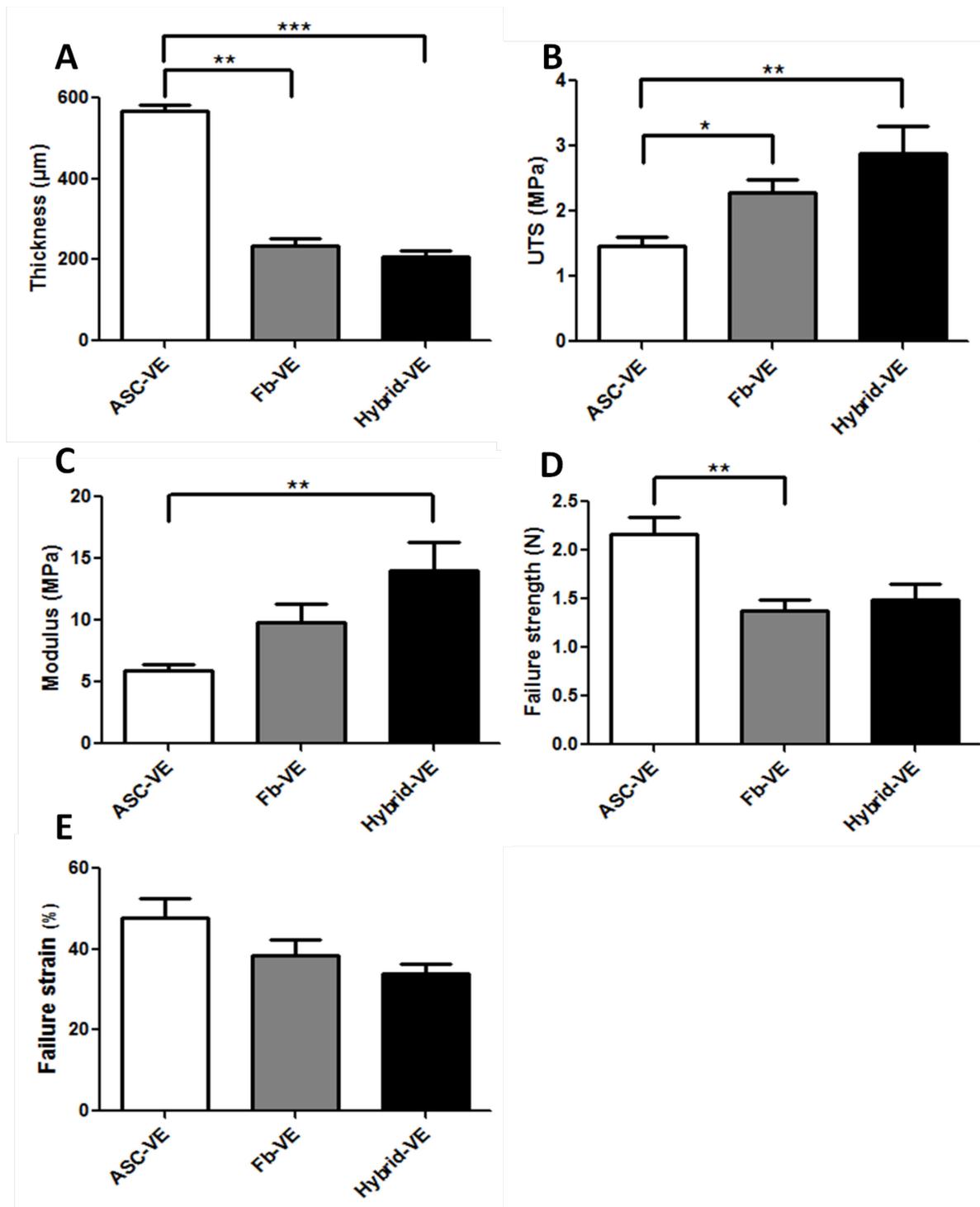


Figure 12 : Mechanical properties of the engineered vesical equivalents.

A: Stromal thickness of the Fb-VE and Hybrid-VE were found to be significantly smaller than the ASC-VE. **B:** The UTS of the Fb-VE and Hybrid-VE was significantly higher compared to the ASC-VE. **C:** The modulus (elasticity) was significantly higher for the Hybrid-VE compare to the ASC-VE. **D:** Failure strength was higher for the ASC-VE. **E:** The failure strains were not significantly different between VEs. Tests were performed using 3 different cellular populations (N) for Fbs and ASCs and each construct was

produced in triplicate (n). Each column represents mean +/-standard error of the mean, with $p < 0.05$ indicating significance (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ ***, $p < 0.001$).

2.6.5 Scanning electron microscopy

The apical Uc of the human Fb-VE and Hybrid-VE were observed by SEM (Fig. 13). The surface was completely covered by a high density of microvilli, creating a characteristic granular aspect which is associated to an intermediate maturation of the urothelial cells. The cell boundaries and the tight junctions separating each apical cell were easily seen on the VE (Fig. 13, arrows).

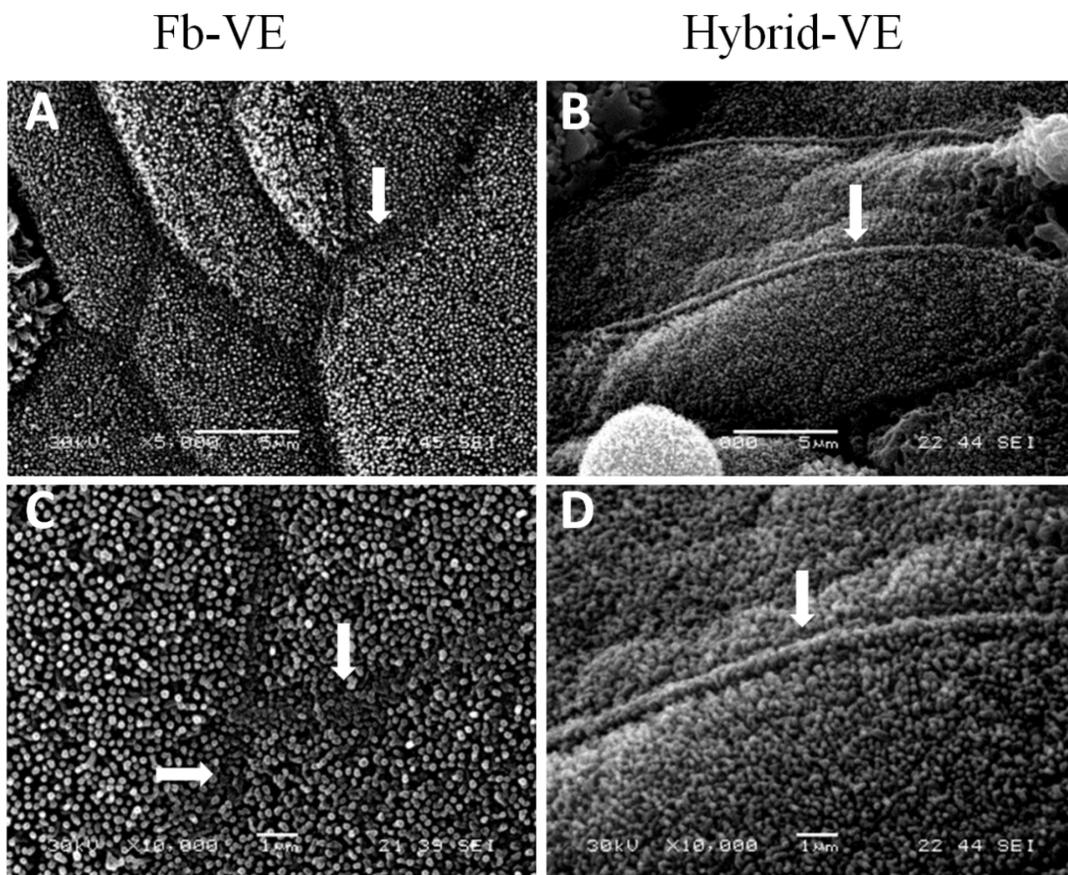


Figure 13: Superficial urothelial cells in engineered VE after maturation

A high density of microvilli is visible (granular aspect on the cell surface) as well as the cell boundaries/tight junctions (white arrows) both for Fb-VE (A, C) and Hybrid-VE (B, D). (C, D) represent higher magnification of (A, B). Scale bars: 5 μm (A, B) and 1 μm (C, D).

2.7 Discussion

We present here the first model of human tissue engineered vesical equivalent reconstruction free of exogenous cells and biomaterials. This work represents the first step of a long-term project which final goal is the production and use of the safest alternative to the gold standard used now. The tissue engineered VE by the self-assembly method presents many advantages, notably: it is a living tissue and then could growth with the patient, a very large surface could be produced if needed, therefore avoiding the problem of availability. Moreover, it could be produced for autologous therapy, reducing the risks of rejection and inflammatory reactions.

In order to optimize our human VE model before initiating animal grafting, an evaluation of the possible benefits associated with the use of ASCs as substitutes for dermal Fbs was performed. ASCs are cells available and abundant in patients (Zuk et al., 2001, Hodgkinson et al., 2009). They are easily extracted and amplified in culture from lipoaspirated fat samples. ASCs are also particularly performant at matrix production and deposition in the context of the self-assembly approach of tissue engineering (Fortier et al., 2011). ASCs comprise a subpopulation of multipotent mesenchymal stem cells which would represent approximately 2% of the stromal cells (Strem and Hedrick, 2005). Under our tissue engineering protocol, which does not include specific induction agonists, no spontaneous ASC differentiation was noted. As expected, their contribution to the reconstructed tissue was mainly to the structural components (matrix and cells) of the reconstructed stroma. Although not verified yet in our models, we also believe that ASCs could have a positive impact after implantation due to their secretion of angiogenic, anti-inflammatory and anti-apoptotic mediators (Murohara et al., 2009, Kuhbier et al., 2010, Rehman et al., 2004).

Another example of the use of ASCs in urology, is their injection and incorporation into the bladder smooth muscle layer without problem for the animals (Jack et al., 2005). All these characteristics represent great potential advantages of ASCs not only for the engineering of the bladder, but also to insure the survival and incorporation of the graft for long-term tissue regeneration.

In the present work, the VE featuring a stroma formed by ASCs alone did not sustain the formation of a differentiated urothelium, likely due to the lack of a complete basement membrane. This outcome was unexpected since, under slightly different culture conditions, ASCs have already been successfully used as stromal compartment for keratinocytes, another type of epithelial cells, which lead to the engineering of skin substitutes (Trottier et al., 2008). Similarly to skin, the basement membrane play an important role in the establishment and the differentiation of the urothelial cells (Nishiyama et al., 2000). In skin, laminin 5 is a key player for the formation of the anchoring complex which allows communication and stability between both epidermal and dermal compartments (Nishiyama et al., 2000). The laminin 5 expressed in the basement membrane of the VE may have the same important role for the establishment of the urothelium, and its absence leads to the formation of a deficient urothelium. The cell-cell communication between the Uc and stromal cells will need further investigation. The Fb-VE and Hybrid-VE, which clearly expressed laminin 5, showed a differentiated urothelium as seen in a normal bladder mucosa.

After a culture period at the air-liquid interface, VE containing a Fb-derived cell sheet seemed to promote an adequate differentiation of Uc. Indeed, whether the entire stroma was formed by Fb sheets or when one Fb sheet was placed on top of two ASC sheets (composing the Hybrid-VE), the Uc formed a typical and functional urothelium. UCs in the

Fb-VE and Hybrid-VE expressed the markers UP Ib, II and III for urothelial maturation and provided a barrier function to the tissue (Kreft et al., 2010). Furthermore, ZO-1, a tight junction marker, was expressed in the Fb-VE and Hybrid-VE. ZO-1 is important for the polarization of the epithelium leading to its maturation (Ikenouchi et al., 2007). Scanning electron microscopy showed the tight junction structure which is one of the first signs of urothelial cell differentiation (Veranic et al., 2009). The differentiation potential provided by these proteins lead to excellent impermeability for the *in vitro* reconstructed VE, which was shown to be similar to porcine native bladder tissue.

Every VE had adequate mechanical resistance to tensile loads, allowing manipulation for surgical implantation. Compared to the ASC-VE, the Fb-VE and Hybrid-VE presented a reduced stromal thickness but had a higher tensile strength (UTS). This could be due to the presence of an epithelium, since it is well known that the latter can induce a profound remodelling of extracellular matrix and may also change the mechanical behaviour of the stroma (Bellemare et al., 2005). The modulus for the hybrid-VE was also the highest measured construct, corresponding to the elasticity of the tissue. For these reasons, the hybrid-VE model could become a serious alternative for the bladder reconstruction or augmentation. In addition it will be useful for *in vitro* studies of several urological diseases. The origin of the cells used to reconstruct the VE *in vitro* has a significant impact on the maturation of the VE and its behavior after implantation. One limitation of our model is the fact that we are using dermal Fbs or ASCs that are of non-bladder origin. On the other hand, bladder-sourced cells may not always be suitable for such applications, specifically in patients with bladder cancer. Tissue engineering strategies such as the one highlighted in this study require small biopsies and lead to time- and cost-related issues associated to cell extraction and amplification in order to produce VE. Nevertheless, except for rare

emergencies, time is not a key factor when considering the reconstruction or augmentation of a bladder, and this limitation would be overcome by the benefits related to the implantation of a completely biological and autologous vesical equivalent.

All the vesical equivalents were reconstructed without the use of exogenous matrix (synthetic or biologic) and were exclusively composed of human cells and their own secreted ECM. The presence of an *in vitro* differentiated urothelium at the surface of the engineered VE is a significant advantage after implantation since it helps minimize complications resulting from inadequate barrier function. This differentiated urothelium showed a similar capacity to retain ^{14}C -urea, which is comparable to native bladder. The combination of fibroblasts and ASCs for vesical engineering within the Hybrid-VE could lead to faster graft take due to the multiple properties of ASCs. Considering the unique features of our reconstructed human vesical substitutes, it could become an interesting treatment option in the near future. Therefore, our next goal is to evaluate the long-term potency of such VE following grafting in an animal model.

2.8 Acknowledgements:

The authors would like to thank Valérie Cattan, Stéphane Chabaud, Brigitte Pellerin and Guillaume Marceau Fortier for technical assistance and helpful discussions. We are grateful to the microscopy service of Université Laval for their assistance with sample processing for electron microscopy, in particular to M. Richard Janvier. The authors have no conflict of interest. This study was supported by the Canadian Institutes of Health Research grant 191900 to SB, the Kidney foundation grant to SB, and in part by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), grant NRF-326987 to JF. JF and SB are Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) scholars. Dr. Stéphane Bolduc was a recipient of the Canadian Urological Association Scholarship Fund.

2.9 Bibliography

- ATALA, A., BAUER, S. B., SOKER, S., YOO, J. J. & RETIK, A. B. 2006. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet*, 367, 1241-6.
- AUGER, F. A., LOPEZ VALLE, C. A., GUIGNARD, R., TREMBLAY, N., NOEL, B., GOULET, F. & GERMAIN, L. 1995. Skin equivalent produced with human collagen. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 31, 432-9.
- AUGER, F. A., REMY-ZOLGHADRI, M., GRENIER, G. & GERMAIN, L. 2002. A truly new approach for tissue engineering: the LOEX self-assembly technique. In: A. HAVERICH, H. G. (ed.) *Stem cell transplantation and tissue engineering*. 2002/01/31 ed. Berlin, GER: Springer-Verlag.
- BELLEMARE, J., ROBERGE, C. J., BERGERON, D., LOPEZ-VALLE, C. A., ROY, M. & MOULIN, V. J. 2005. Epidermis promotes dermal fibrosis: role in the pathogenesis of hypertrophic scars. *J Pathol*, 206, 1-8.
- BOUHOUT, S., PERRON, E., GAUVIN, R., BERNARD, G., OUELLET, G., CATTAN, V. & BOLDUC, S. 2010. In Vitro Reconstruction of an Autologous, Watertight, and Resistant Vesical Equivalent. *Tissue Eng Part A*, 16, 1539-48.
- EVREN, S., LOAI, Y., ANTOON, R., ISLAM, S., YEGER, H., MOORE, K., WONG, K., GORCZYNSKI, R. & FARHAT, W. A. Urinary bladder tissue engineering using natural scaffolds in a porcine model: role of Toll-like receptors and impact of biomimetic molecules. *Cells Tissues Organs*, 192, 250-61.
- FORTIER, G. M., GAUVIN, R., PROULX, M., VALLEE, M. & FRADETTE, J. 2011. Dynamic culture induces a cell type-dependent response impacting on the thickness of engineered connective tissues. *J Tissue Eng Regen Med*.
- FRANZ, T. J. 1975. Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. *J Invest Dermatol*, 64, 190-5.
- GERMAIN, L., ROUABHIA, M., GUIGNARD, R., CARRIER, L., BOUVARD, V. & AUGER, F. A. 1993. Improvement of human keratinocyte isolation and culture using thermolysin. *Burns*, 19, 99-104.
- HAUNER, H., ENTENMANN, G., WABITSCH, M., GAILLARD, D., AILHAUD, G., NEGREL, R. & PFEIFFER, E. F. 1989. Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest*, 84, 1663-70.
- HODGKINSON, T., YUAN, X. F. & BAYAT, A. 2009. Adult stem cells in tissue engineering. *Expert Rev Med Devices*, 6, 621-40.
- IKENOUCI, J., UMEDA, K., TSUKITA, S. & FURUSE, M. 2007. Requirement of ZO-1 for the formation of belt-like adherens junctions during epithelial cell polarization. *J Cell Biol*, 176, 779-86.
- JACK, G. S., ALMEIDA, F. G., ZHANG, R., ALFONSO, Z. C., ZUK, P. A. & RODRIGUEZ, L. V. 2005. Processed lipoaspirate cells for tissue engineering of the lower urinary tract: implications for the treatment of stress urinary incontinence and bladder reconstruction. *J Urol*, 174, 2041-5.
- KREFT, M. E., HUDOKLIN, S., JEZERNIK, K. & ROMIH, R. 2010. Formation and maintenance of blood-urine barrier in urothelium. *Protoplasma*, 246, 3-14.
- KUHBIER, J. W., WEYAND, B., RADTKE, C., VOGT, P. M., KASPER, C. & REIMERS, K. 2010. Isolation, Characterization, Differentiation, and Application of Adipose-Derived Stem Cells. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 123, 55-105.

- MAGNAN, M., BERTHOD, F., CHAMPIGNY, M. F., SOUCY, F. & BOLDUC, S. 2006. In vitro reconstruction of a tissue-engineered endothelialized bladder from a single porcine biopsy. *J Pediatr Urol*, 2, 261-70.
- METCALFE, P. D., CAIN, M. P., KAEFER, M., GILLEY, D. A., MELDRUM, K. K., MISSERI, R., KING, S. J., CASALE, A. J. & RINK, R. C. 2006. What is the need for additional bladder surgery after bladder augmentation in childhood? *J Urol*, 176, 1801-5; discussion 1805.
- MUROHARA, T., SHINTANI, S. & KONDO, K. 2009. Autologous adipose-derived regenerative cells for therapeutic angiogenesis. *Curr Pharm Des*, 15, 2784-90.
- NISHIYAMA, T., AMANO, S., TSUNENAGA, M., KADOYA, K., TAKEDA, A., ADACHI, E. & BURGESSON, R. E. 2000. The importance of laminin 5 in the dermal-epidermal basement membrane. *J Dermatol Sci*, 24 Suppl 1, S51-9.
- PETROVIC, V., STANKOVIC, J. & STEFANOVIC, V. 2011. Tissue engineering of the urinary bladder: current concepts and future perspectives. *ScientificWorldJournal*, 11, 1479-88.
- REHMAN, J., TRAKTUEV, D., LI, J., MERFELD-CLAUSS, S., TEMM-GROVE, C. J., BOVENKERK, J. E., PELL, C. L., JOHNSTONE, B. H., CONSIDINE, R. V. & MARCH, K. L. 2004. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*, 109, 1292-8.
- STREM, B. M. & HEDRICK, M. H. 2005. The growing importance of fat in regenerative medicine. *Trends Biotechnol*, 23, 64-6.
- TROTTIER, V., MARCEAU-FORTIER, G., GERMAIN, L., VINCENT, C. & FRADETTE, J. 2008. IFATS collection: Using human adipose-derived stem/stromal cells for the production of new skin substitutes. *Stem Cells*, 26, 2713-23.
- VERANIC, P., ERMAN, A., KEREK-KOS, M., BOGATAJ, M., MRHAR, A. & JEZERNIK, K. 2009. Rapid differentiation of superficial urothelial cells after chitosan-induced desquamation. *Histochem Cell Biol*, 131, 129-39.
- VERMETTE, M., TROTTIER, V., MENARD, V., SAINT-PIERRE, L., ROY, A. & FRADETTE, J. 2007. Production of a new tissue-engineered adipose substitute from human adipose-derived stromal cells. *Biomaterials*, 28, 2850-60.
- ZUK, P. A., ZHU, M., MIZUNO, H., HUANG, J., FUTRELL, J. W., KATZ, A. J., BENHAIM, P., LORENZ, H. P. & HEDRICK, M. H. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 7, 211-28.

3. DISCUSSION

Les résultats de ces recherches portant sur l'optimisation du modèle d'équivalent vésical reconstruit par auto-assemblage de l'équipe du Dr. Bolduc avec les cellules humaines et les CSTA y sont présentés dans ce mémoire. Le premier modèle généré était constitué de trois feuillets de CSTAensemencés de cellules urothéliales. Ce modèle a été comparé au modèle conventionnel constitué de trois feuillets de fibroblastes dermiques. Cette première tentative s'est curieusement avérée infructueuse. Les CSTA avaient été étudiées auparavant par l'équipe du Dr. Fradette pour vérifier la possibilité de les utiliser dans le cadre de reconstruction de peau par génie tissulaire. Les résultats positifs de cette étude ont été publiés dans l'article « **IFATS collection: Using human adipose-derived stem/stromal cells for the production of new skin substitutes** ». (Trottier et al., 2008) Le stroma formé par les CSTA ne modifiait pas la capacité des kératinocytes de la peau à former un épiderme, par contre, les cellules urothéliales présentes sur la surface apicale de l'équivalent ne semblent pas avoir la capacité de proliférer ainsi que de se différencier sur une matrice produite par les CSTA. Les cellules urothéliales ne semblent également pas être en mesure de former une lame basale et de produire un urothélium mature dans ces conditions. Suite à ces résultats, un modèle hybride composé d'un feuillet de Fb, qui serait en contact avec les cellules urothéliales, et de deux feuillets de CSTA sous les Fb fut tenté. Ce modèle a très bien fonctionné puisque les Fb permettent l'établissement d'une lame basale avec les cellules urothéliales et la formation d'un urothélium différencié alors que les CSTA contribuent à la formation d'un stroma épais. Ce nouveau modèle a été comparé au modèle classique (trois feuillets de Fb). La composition en collagène I et III était similaire pour les trois modèles. Par contre, seuls les modèles classiques et hybrides exprimaient la laminine 5, marqueur de la lame basale. Il y a aussi expression des uroplakines Ib, II, III et de ZO-1 sur ces deux modèles. La perméabilité de ces deux modèles était similaire à celle de la vessie native de porc. De plus, le comportement des tissus face à un stress mécanique était assez distinctif entre les trois modèles sûrement dû à la matrice extracellulaire singulière les composant. En raison de leurs propriétés intrinsèques, ces modèles d'équivalents vésicaux pourraient à court et à long terme

diminuer les complications rencontrées par les autres équipes ainsi qu'accroître la prise de la greffe du greffon. Le tout reste évidemment à confirmer par des expérimentations. Lors de ma maîtrise, les objectifs qui étaient de développer un tissu urologique entièrement humain et de démontrer qu'il est possible de reconstruire un équivalent vésical à l'aide des CSTA ont été atteints.

La production de ces nouveaux modèles reconstruits avec les CSTA va permettre de poursuivre l'innovation et l'optimisation du génie tissulaire produit par l'auto assemblage. Contrairement à ce qui a été fait par les autres équipes dans le monde, cette technique permet la reconstruction d'un tissu d'origine humaine sans apport exogène autre que le sérum. Cette distinction avantage ces modèles, car le tissu reconstruit ne contient aucun échafaudage d'origine synthétique ou xénogénique.(Atala, 2008, Aitken and Bagli, 2009b) Les modèles reconstruits par génie tissulaire semblent avoir beaucoup d'avantages. En effet, l'origine cellulaire du tissu est primordiale pour le bon fonctionnement d'un équivalent ou d'un greffon. Une des principales sources du mauvais fonctionnement des greffons est une inflammation de ceux-ci suite à l'implantation chez le patient ou l'animal.(Badylak and Gilbert, 2008, Bricker et al., 1954, Atala, 2011, Aitken and Bagli, 2009b) Cette inflammation endommage le greffon ou réduit sa capacité à bien remplir son rôle protecteur contre l'urine. Ainsi, le fait que les modèles Fb-VE ou hybride-VE soient constitués entièrement de matériel biologique humain réduirait potentiellement l'inflammation lors de la greffe. Par contre, comme dans la plupart des cultures cellulaires, l'utilisation de sérum bovin pourrait engendrer des réponses immunitaires de l'hôte. De plus, comme le but à terme est de reconstruire ce nouveau tissu urologique à l'aide des cellules et du sérum du patient, donc un greffon totalement autologue, le risque de rejet immunitaire devient pratiquement nul.

3.1 La matrice

La matrice des différents équivalents vésicaux reconstruits par auto assemblage, sans être identique, est semblable à la matrice native d'un tissu urologique. Les composants principaux comme les collagènes de type I et III sont présents. Ces protéines sont

principalement retrouvées dans la matrice vésicale native. La laminine et la fibronectine sont également retrouvées dans la matrice de nos trois constructions. Il n'y a pas eu de caractérisation exhaustive des tissus reconstruits donc la présence de protéines et facteurs moins abondants par exemple :élastine, fibrilline, fibuline, ostéopontine n'ont pas encore été confirmées. (Aitken and Bagli, 2009a) L'architecture de cette matrice reconstruite est similaire visuellement à celle de la vessie native. Par contre, elle ne possède pas les caractéristiques mécaniques de la vessie native comme la compliance. Par exemple, un des facteurs indispensables à cette compliance est la fibre d'élastine. Cette fibre permet l'étirement du tissu, mais aussi le retour à l'état de repos du tissu. Le manque d'élastine dans notre modèle pourrait être expliqué par la présence d'acide ascorbique qui est nécessaire pour la formation de la matrice, mais pourrait inhiber la formation des fibres d'élastine. (Davidson et al., 1997)

Les capacités mécaniques des stromas reconstruits ont été analysées à l'aide d'un essai de tension unidirectionnel. Bien que cet essai soit limité pour évaluer un tissu qui subit des tensions dans tous les axes, il permet de caractériser les tissus reconstruits. Le modèle CSTA-VE est le tissu présentant le stroma le plus épais avec 531 μm en moyenne, tandis que les deux autres modèles (Fb-VE et Hybride-VE) ont un stroma d'une épaisseur moyenne de 209 et 205 μm respectivement. Cette première différence est peut-être due à l'absence d'un urothélium dans le modèle composé uniquement de CSTA. Il a en effet été montré que pour la peau reconstruite, l'addition d'un épithélium sur un derme induisait une diminution de l'épaisseur de ce dernier. (Bellemare et al., 2005) Par la suite, les analyses démontrent que le modèle Hybride-VE est le plus fort et le plus élastique. La force de tension ultime (UTS) représente la force nécessaire pour briser un tissu par rapport à son épaisseur. Bien que les CSTA-VE soient de loin plus épais que les Hybride-VE, ces derniers semblent résistants. De plus, les Hybride-VE sont les modèles qui ont le meilleur modulus, qui représente l'élasticité du tissu, comparativement aux deux autres modèles. Les résultats supérieurs des Hybride-VE sont peut-être dus à la coopération entre les différents types cellulaires de sa matrice. Il est possible que plus il y ait de types cellulaires présents, plus la matrice est en mesure de complexifier son réseau protéique et son architecture.

Comme démontré au chapitre 2, les cellules urothéliales ne semblent pas communiquer adéquatement avec les cellules CSTA. Cette communication cellulaire possiblement défaillante pourrait causer l'absence d'expression des protéines de la lame basale située entre les cellules urothéliales et la matrice formée par les CSTA. L'origine des CSTA pourrait être une des hypothèses pouvant expliquer cette mauvaise communication du fait que ces types cellulaires ne sont pas supposés interagir directement : tissus adipeux vs vésicaux. L'épaisseur des équivalents contenant seulement des CSTA, qui était plus du double de l'épaisseur des autres équivalents, pourrait aussi expliquer ce problème. Comme les cellules sont réparties dans la matrice, la probabilité que les cellules urothéliales et les CSTA soient dans une proximité étroite et en quantité suffisante pour échanger certains signaux et ainsi favoriser l'adhésion est largement diminuée. Sans ces échanges, les cellules ne génèrent pas la lame basale et sans elle il n'y aura pas la formation d'urothélium mature. Cette hypothèse pourrait rapidement être vérifiée en réduisant le temps de culture des équivalents reconstruits avec les CSTA et ainsi diminuer l'épaisseur de ceux-ci lors de l'ensemencement des cellules urothéliales ou vérifier si l'ensemencement des cellules urothéliales sur le côté basal des feuillets reconstruit par la technique d'auto assemblage. Ces résultats sont assez inattendus puisque lorsque les CSTA ont déjà été utilisées pour reconstruire de la peau et il y avait une bonne différenciation de l'épithélium formé par les kératinocytes. (Trottier et al., 2008) Peut-être que les cellules urothéliales nécessitent des conditions mieux optimisées pour leur permettre une meilleure différenciation avec les CSTA. Dans le cas des deux autres modèles, les fibroblastes et les cellules urothéliales semblent en mesure de bien communiquer, ce qui se traduit par la formation d'une lame basale, l'expression de la laminine 5 entre le stroma et l'urothélium. Les modèles Fb-VE et Hybride-VE devraient être en mesure d'être plus facilement remodelable par le corps et d'avoir une longue durée de vie utile due à leur composition complètement biologique et autologue.

Les matrices des équivalents reconstruits n'ont pas le même comportement mécanique que le tissu natif, mais sont tout de même assez fortes pour supporter des manipulations chirurgicales puisque tous ces tissus reconstruits sont facilement suturables. (Fig.14) Il a

même été possible de recréer une mini-vessie *in vitro* durant six mois. (Fig.14 C) De plus, ces reconstructions sont en mesure de permettre la formation et la maturation d'un urothélium.

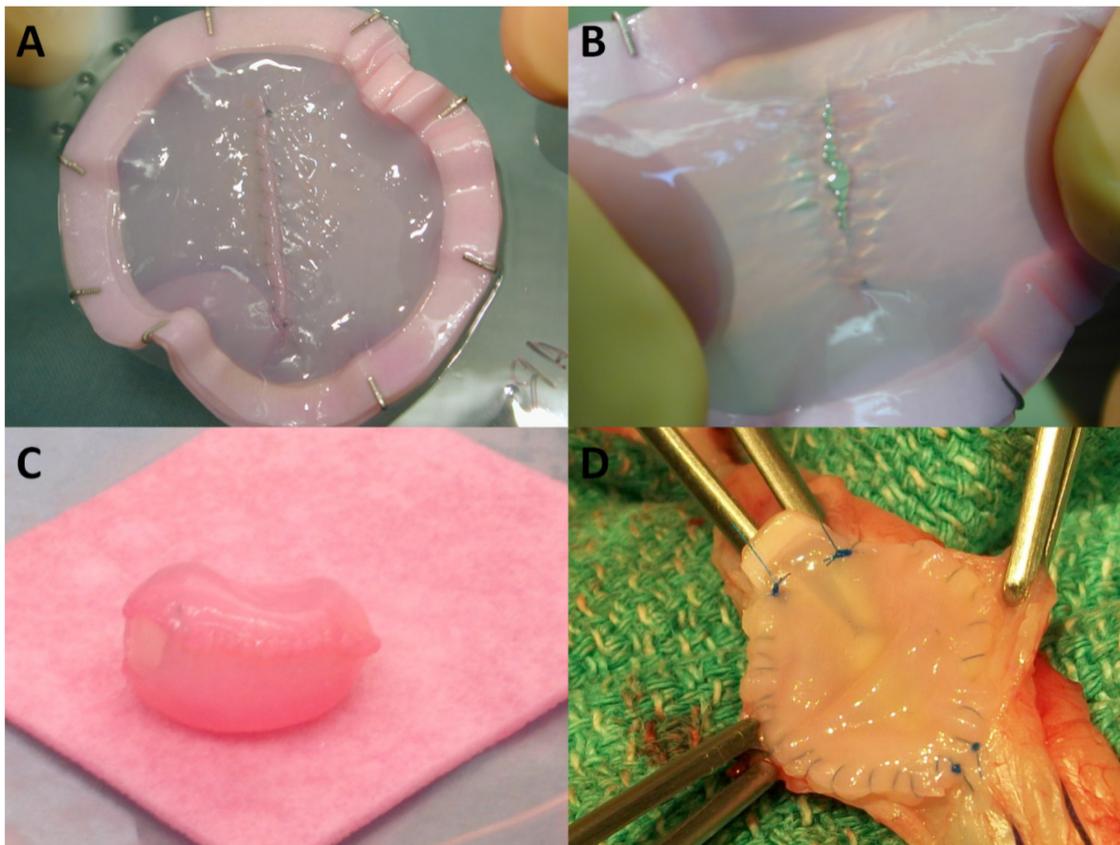


Figure 14 : Exemples de manipulations chirurgicales

A et **B** : Essai de manipulations chirurgicales sur des équivalents vésicaux matures composés de fibroblastes. **A** : L'équivalent a été incisé puis suturé facilement. **B** : Test de rupture pour vérifier la faisabilité et la solidité du tissu reconstruit. Le tissu ne rompt pas sous le fil malgré la tension imposée par le manipulateur. **C** : Reconstruction d'une mini-vessie à l'aide de deux équivalents vésicaux matures sur une prothèse testiculaire en silicone. **D** : Suture d'un équivalent vésical mature sur un uretère au niveau de la jonction pyélo urétérale d'un porc pour vérifier la faisabilité d'anastomoser notre tissu reconstruit à un tissu natif.

3.2 L'urothélium

L'urothélium est essentiel au bon fonctionnement d'un tissu urologique. Ces équivalents (Fb-VE et Hybride-VE) présentent des épithélia vésicaux différenciés. Les modèles reconstruits par auto-assemblage se démarquent de ceux faits par les autres équipes grâce à cet urothélium ainsi qu'il ne contient aucune matrice exogène et qu'à terme il sera autologue. (Atala, 2011, Aitken and Bagli, 2009b) Plusieurs équipes ne semblent pas croire qu'il est pertinent de générer et de laisser un urothélium devenir mature avant l'implantation. La maturation de l'urothélium confère à une vessie ou à un substitut vésical, l'étanchéité et la protection contre les agressions de l'urine sur les tissus. Les modèles Fb-VE et hybride-VE ont une lame basale et ils sont en mesure de permettre la maturation des cellules urothéliales en cellules parapluies qui expriment les trois principales uroplakines (Ib, II, III). Ces protéines forment la plaque asymétrique qui est l'unité fonctionnelle de l'urothélium. Ces protéines sont exprimées sous forme de gradient dans l'urothélium de nos tissus reconstruits contrairement aux tissus natifs où l'expression de ces protéines est seulement dans la couche superficielle de l'urothélium. Plusieurs raisons pourraient expliquer cette observation. Premièrement, les cellules sont obtenues de biopsies et sont utilisées sans faire de sélection suivant leur stade de différenciation. Donc, les cellules urothéliales sont mélangées, un certain pourcentage doit être des cellules basales tandis que les autres doivent être intermédiaires. Les cellules intermédiaires sont en mesure d'exprimer les uroplakines tandis que les cellules basales ne sont pas censées en être capables. (Kreft et al., 2010) D'autre part, la matrice extracellulaire, qui est en contact avec les cellules urothéliales, est produite par des fibroblastes dermiques et non vésicaux ce qui pourrait engendrer des différences dans la maturation de l'épithélium de nos reconstructions. L'origine des fibroblastes utilisés, pour la formation du stroma sous un épithélium, pourrait influencer la maturation de celui-ci, comme cela a déjà été vu pour les cornées ou les peaux psoriasiques reconstruites. (Carrier et al., 2009, Jean et al., 2009) De plus, des additifs comme l'EGF ou l'insuline sont utilisés lors de la culture et la maturation des cellules urothéliales dans nos modèles. Ces additifs sont nécessaires à la prolifération des cellules urothéliales, mais nuisent à la différenciation et à la maturation de l'urothélium. Dans le corps, il y a une fine régulation de tous ces agents prolifératifs, mais *in vitro*, nous n'avons pas un contrôle aussi précis. Finalement, l'environnement air/liquide, dans lequel

les équivalents sont placés pour permettre la « maturation » de l'urothélium, n'est pas un stress physiologique pour les cellules urothéliales et pourrait engendrer des modifications dans le comportement de ces cellules aboutissant à l'apparition de certains caractères cutanés. Par contre, ce stress semble permettre l'expression de certaines protéines fondamentales comme les UP. (Fig.10 A) Le stress mécanique semble aussi être un bon moyen pour induire la différenciation de l'urothélium. (Cattan et al., 2011) Présentement, l'optimisation d'un protocole plus adéquat pour la différenciation des cellules urothéliales est en élaboration par notre équipe. En plus des trois principales uroplakines, la protéine ZO-1 a été observée.(Fig.10 B) Cette protéine est importante pour la formation du complexe des jonctions serrées sur la couche superficielle de l'urothélium. La présence de plusieurs marqueurs de différenciation de l'urothélium dans ces tissus reconstruits est très prometteuse. Par ailleurs, des essais pour vérifier l'imperméabilité de l'urothélium ont été effectués. Tel que prévu, les modèles Fb-VE et Hybride-VE sont très imperméables grâce à la présence des uroplakines et de ZO-1. Ils sont aussi imperméables que les tissus vésicaux natifs de porc. Le modèle composé seulement de CSTA a également donné les résultats attendus. En effet, comme il n'y a pas d'urothélium assurant la fonction barrière, ce tissu est très perméable.

La présence d'un urothélium fonctionnel sur ces tissus reconstruits les distingue des autres équipes dans le domaine. (Atala, 2011, Aitken and Bagli, 2009b, Becker et al., 2006) La plupart de ces équipes se fient aux capacités régénératrices de l'urothélium du patient après la greffe pour la formation et la maturation de ce nouvel urothélium. Contrairement aux autres, nous croyons qu'il est mieux pour le tissu et le patient que le tissu soit déjà fonctionnel au moment de la greffe pour résister aux agressions de l'urine et ainsi, aider la prise de la greffe.

Malgré tous les bénéfices, ces reconstructions possèdent aussi quelques désavantages. Premièrement, l'obtention des cellules pourrait poser certains problèmes dans le cas de cancer vésical ou lorsqu'il y a très peu de tissu disponible pour prélever la biopsie. Pour pallier ces manques, il serait envisageable d'aller chercher les cellules urothéliales ailleurs dans le système urinaire. D'autre part, le temps de production de ce tissu est assez long,

mais contrairement au traitement des grands brûlés, qui ont besoin de peau immédiatement, la chirurgie pour agrandir la vessie d'un patient est prévue et est rarement urgente. Ainsi, la production de notre modèle serait effectuée en prévision d'une opération. Un autre désavantage potentiel est le coût de production très élevé de nos équivalents comparativement aux autres modèles disponibles. Cependant, si l'on prend en considération la durée de vie des autres modèles, les opérations effectuées avec un modèle produit par génie tissulaire par auto assemblage, qui aurait pour but d'augmenter la capacité de la vessie, pourraient s'avérer beaucoup plus économique si son potentiel est démontré lors d'expérimentations *in vivo*. L'argument économique, s'il n'est pas à négliger, peut aussi être mis dans la balance avec la réduction très significative et attendue des effets secondaires à l'implantation du greffon, donc à une réduction des coûts post-opératoires.

3.3 Conclusion et projets futurs

La suite logique de ces travaux est de poursuivre l'analyse des avantages potentiels suivant : meilleure vascularisation et diminution de l'inflammation par l'utilisation des CSTA dans un contexte *in vitro* d'abord et ensuite *in vivo*, mais aussi pour élargir l'utilisation des tissus urologiques reconstruits par génie tissulaire vers le côté clinique de la recherche.

Maintenant que le modèle d'équivalent vésical humain est caractérisé (composition de la matrice, formation d'un urothélium, présence d'uroplakines, imperméabilité du VE, capacité mécanique), il sera possible de vérifier si les CSTA auront un effet sur la vascularisation de l'équivalent vésical comparativement aux fibroblastes dermiques. De nouvelles expériences *in vitro* permettront de déterminer si les CSTA sont en mesure d'améliorer l'angiogenèse et diminuer l'inflammation par la quantification de médiateurs par exemple VEGF, HIF et SDF-1 par rt-PCR, ÉLISA et immunobuvardage de type western à divers temps lors de la culture des feuillets cellulaires. Puis, des expériences *in vivo* seront effectuées pour avoir des données sur la prise du greffon, sa vascularisation et l'inflammation qui pourraient se produire.

La première collaboration, avec l'équipe du Dr Metcalfe de l'Université de l'Alberta à Edmonton, a pour but d'étudier un modèle de vessie hyperactive chez le rat et voir comment les greffons réagiraient dans cet environnement. Cette combinaison de modèles permettra l'étude des mécanismes de guérison reliés à l'agrandissement d'une vessie hyperactive avec la reconstruction Fb-VE. L'agrandissement des vessies hyperactives à l'aide du modèle d'équivalent vésical devrait permettre une augmentation de la capacité de la vessie et une diminution de la pression interne de la vessie. Des données préliminaires montrent que ces hypothèses sont justes. Les données préopératoires d'un rat avec une vessie hyperactive montraient une pression interne de 40 cmH₂O et une capacité volumique de 0.5 ml. Suite à la procédure d'agrandissement avec notre modèle Fb-VE, la pression interne est passée à 10 cmH₂O et à une capacité de 2 ml. Ces données préliminaires permettent de croire que les deux modèles pourront être utilisés comme modèles d'étude de vessies hyperactives neurogènes.

La seconde collaboration sera faite avec l'équipe du Dr. Pouliot, chercheur à l'hôpital de l'Hôtel-Dieu de Québec, spécialisé dans les cancers associés au système génito-urinaire. Le projet consistera à bâtir un modèle permettant l'étude du cancer vésical à tous les stades de son développement. L'ajout de cellules cancéreuses de vessie sur le modèle de VE. Ce modèle permettrait d'établir un outil fiable pour comprendre le fonctionnement et l'évolution du cancer urothélial comparativement à une culture cellulaire habituelle. Comme ce modèle est entièrement humain, il permettrait d'observer l'effet des médicaments anticancéreux dans un contexte *in vitro*, préalablement aux essais cliniques. Des données préliminaires ont permis de confirmer que le modèle VE permet l'établissement de cellules cancéreuses. Celles-ci forment des excroissances sur l'urothélium similaire aux papilles observées dans les cancers vésicaux. Nous croyons qu'avec cette collaboration, nos deux équipes pourraient mener à la mise au point un modèle très intéressant pour des études fondamentales et cliniques des cancers vésicaux.

Le génie tissulaire semble une avenue très prometteuse du point de vue de la production de substitut servant à résoudre le manque criant de tissus urologiques lors de reconstructions vésicales, mais aussi pour l'élaboration de nouveaux modèles de recherche se rapprochant de plus en plus de la réalité.

Je termine ce mémoire par une citation qui résume bien ces travaux :

Heureux qui, comme Ulysse, a fait un beau voyage. (Joachim du Bellay)

BIBLIOGRAPHIE

- ACHARYA, P., BECKEL, J., RUIZ, W. G., WANG, E., ROJAS, R., BIRDER, L. & APODACA, G. 2004. Distribution of the tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudin-4, -8, and -12 in bladder epithelium. *Am J Physiol Renal Physiol*, 287, F305-18.
- ADZICK, N. S., THOM, E. A., SPONG, C. Y., BROCK, J. W., 3RD, BURROWS, P. K., JOHNSON, M. P., HOWELL, L. J., FARRELL, J. A., DABROWIAK, M. E., SUTTON, L. N., GUPTA, N., TULIPAN, N. B., D'ALTON, M. E. & FARMER, D. L. 2011. A randomized trial of prenatal versus postnatal repair of myelomeningocele. *N Engl J Med*, 364, 993-1004.
- AITKEN, K. J. & BAGLI, D. J. 2009a. The bladder extracellular matrix. Part I: architecture, development and disease. *Nat Rev Urol*, 6, 596-611.
- AITKEN, K. J. & BAGLI, D. J. 2009b. The bladder extracellular matrix. Part II: regenerative applications. *Nat Rev Urol*, 6, 612-21.
- APODACA, G. 2004. The uroepithelium: not just a passive barrier. *Traffic*, 5, 117-28.
- ATALA, A. 2008. Bioengineered Tissues For Urogenital Repair In Children. *Pediatr Res*, 5, 569-75
- ATALA, A. 2011. Tissue engineering of human bladder. *Br Med Bull*, 97, 81-104.
- ATALA, A., BAUER, S. B., SOKER, S., YOO, J. J. & RETIK, A. B. 2006. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet*, 367, 1241-6.
- AUGER, F. A., LOPEZ VALLE, C. A., GUIGNARD, R., TREMBLAY, N., NOEL, B., GOULET, F. & GERMAIN, L. 1995. Skin equivalent produced with human collagen. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 31, 432-9.
- AUGER, F. A., REMY-ZOLGHADRI, M., GRENIER, G. & GERMAIN, L. 2002. A truly new approach for tissue engineering: the LOEX self-assembly technique. In: A. HAVERICH, H. G. (ed.) *Stem cell transplantation and tissue engineering*. 2002/01/31 ed. Berlin, GER: Springer-Verlag.
- BADYLAK, S. F. & GILBERT, T. W. 2008. Immune response to biologic scaffold materials. *Semin Immunol*, 20, 109-16.
- BADYLAK, S. F., LANTZ, G. C., COFFEY, A. & GEDDES, L. A. 1989. Small intestinal submucosa as a large diameter vascular graft in the dog. *J Surg Res*, 47, 74-80.
- BALLANTYNE, B., MYERS, R. C. & BLASZCAK, D. L. 1997. Influence of alkalinization of glutaraldehyde biocidal solutions on acute toxicity, primary irritancy, and skin sensitization. *Vet Hum Toxicol*, 39, 340-6.
- BARCZYK, M., CARRACEDO, S. & GULLBERG, D. 2010. Integrins. *Cell Tissue Res*, 339, 269-80.
- BARTON, K. N., BUHR, M. M. & BALLANTYNE, J. S. 1999. Effects of urea and trimethylamine N-oxide on fluidity of liposomes and membranes of an elasmobranch. *Am J Physiol*, 276, R397-406.
- BECKER, C., OLDE DAMINK, L., LAEUFER, T., BREHMER, B., HESCHEL, I. & JAKSE, G. 2006. 'UroMaix' scaffolds: novel collagen matrices for application in tissue engineering of the urinary tract. *Int J Artif Organs*, 29, 764-71.
- BELLEMARE, J., ROBERGE, C. J., BERGERON, D., LOPEZ-VALLE, C. A., ROY, M. & MOULIN, V. J. 2005. Epidermis promotes dermal fibrosis: role in the pathogenesis of hypertrophic scars. *J Pathol*, 206, 1-8.

- BISGARD, J. D. 1943. Substitution of the Urinary Bladder with a Segment of Sigmoid: An Experimental Study. *Ann Surg*, 117, 106-9.
- BLASI, A., MARTINO, C., BALDUCCI, L., SILDARELLI, M., SOLETI, A., NAVONE, S. E., CANZI, L., CRISTINI, S., INVERNICI, G., PARATI, E. A. & ALESSANDRI, G. 2011. Dermal fibroblasts display similar phenotypic and differentiation capacity to fat-derived mesenchymal stem cells, but differ in anti-inflammatory and angiogenic potential. *Vasc Cell*, 3, 5.
- BOLEN, D. W. & FISHER, J. R. 1969. Kinetic properties of adenosine deaminase in mixed aqueous solvents. *Biochemistry*, 8, 4239-46.
- BOUHOUT, S., PERRON, E., GAUVIN, R., BERNARD, G., OUELLET, G., CATTAN, V. & BOLDUC, S. 2009. In vitro reconstruction of an autologous, watertight, and resistant vesical equivalent. *Tissue Eng Part A*, 16, 1539-48.
- BOUHOUT, S., PERRON, E., GAUVIN, R., BERNARD, G., OUELLET, G., CATTAN, V. & BOLDUC, S. 2010. In Vitro Reconstruction of an Autologous, Watertight, and Resistant Vesical Equivalent. *Tissue Eng Part A*, 16, 1539-48.
- BREHMER, B., ROHRMANN, D., BECKER, C., RAU, G. & JAKSE, G. 2007. Different types of scaffolds for reconstruction of the urinary tract by tissue engineering. *Urol Int*, 78, 23-9.
- BRICKER, E. M., BUTCHER, H. & MC, A. C. 1954. Late results of bladder substitution with isolated ileal segments. *Surg Gynecol Obstet*, 99, 469-82.
- BUTT, A. M., JONES, H. C. & ABBOTT, N. J. 1990. Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *J Physiol*, 429, 47-62.
- CAMPELL, N. A. 1995. *Biologie*, The Benjamin/Cummings Publishing Compagny, inc.
- CARRIER, P., DESCHAMBEAULT, A., AUDET, C., TALBOT, M., GAUVIN, R., GIASSON, C. J., AUGER, F. A., GUERIN, S. L. & GERMAIN, L. 2009. Impact of cell source on human cornea reconstructed by tissue engineering. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50, 2645-52.
- CARTWRIGHT, L. M., SHOU, Z., YEGER, H. & FARHAT, W. A. 2006. Porcine bladder acellular matrix porosity: impact of hyaluronic acid and lyophilization. *J Biomed Mater Res A*, 77, 180-4.
- CATTAN, V., BERNARD, G., ROUSSEAU, A., BOUHOUT, S., CHABAUD, S., AUGER, F. A. & BOLDUC, S. 2011. Mechanical stimuli-induced urothelial differentiation in a human tissue-engineered tubular genitourinary graft. *Eur Urol*, 60, 1291-8.
- COHEN, D. M., GULLANS, S. R. & CHIN, W. W. 1996. Urea signaling in cultured murine inner medullary collecting duct (mIMCD3) cells involves protein kinase C, inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3), and a putative receptor tyrosine kinase. *J Clin Invest*, 97, 1884-9.
- COWAN, K. N., LEUNG, W. C., MAR, C., BHATTACHARJEE, R., ZHU, Y. & RABINOVITCH, M. 2005. Caspases from apoptotic myocytes degrade extracellular matrix: a novel remodeling paradigm. *FASEB J*, 19, 1848-50.
- CREIGHTON, T. E. 1991. Molecular chaperones. Unfolding protein folding. *Nature*, 352, 17-8.
- DAVIDSON, J. M., LUVALLE, P. A., ZOIA, O., QUAGLINO, D., JR. & GIRO, M. 1997. Ascorbate differentially regulates elastin and collagen biosynthesis in vascular smooth muscle cells and skin fibroblasts by pretranslational mechanisms. *J Biol Chem*, 272, 345-52.
- DENG, F. M., LIANG, F. X., TU, L., RESING, K. A., HU, P., SUPINO, M., HU, C. C., ZHOU, G., DING, M., KREIBICH, G. & SUN, T. T. 2002. Uroplakin IIIb, a urothelial differentiation marker, dimerizes with uroplakin Ib as an early step of urothelial plaque assembly. *J Cell Biol*, 159, 685-94.
- DIXON-SHANIES, D., RUDICK, J. & KNITTLE, J. L. 1975. Observatons on the growth and metabolic functions of cultured cells derived from human adipose tissue. *Proc Soc Exp Biol Med*, 149, 541-5.

- DREWA, T., ADAMOWICZ, J., LYSIK, J., POLACZEK, J. & PIELICHOWSKI, J. 2008. Chitosan scaffold enhances nerve regeneration within the in vitro reconstructed bladder wall: an animal study. *Urol Int*, 81, 330-4.
- EBRAHIMIAN, T. G., POUZOULET, F., SQUIBAN, C., BUARD, V., ANDRE, M., COUSIN, B., GOURMELON, P., BENDERITTER, M., CASTEILLA, L. & TAMARAT, R. 2009. Cell therapy based on adipose tissue-derived stromal cells promotes physiological and pathological wound healing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29, 503-10.
- EBRAHIMIAN, T. G., SQUIBAN, C., ROQUE, T., LUGO-MARTINEZ, H., HNEINO, M., BUARD, V., GOURMELON, P., BENDERITTER, M., MILLIAT, F. & TAMARAT, R. 2012. Plasminogen Activator Inhibitor-1 Controls Bone Marrow Derived Cells Therapeutic Effect Through MMP 9 Signalling: Role in Physiological and Pathological Wound Healing. *Stem Cells*.
- EGLES, C., SHAMIS, Y., MAUNEY, J. R., VOLLOCH, V., KAPLAN, D. L. & GARLICK, J. A. 2008. Denatured collagen modulates the phenotype of normal and wounded human skin equivalents. *J Invest Dermatol*, 128, 1830-7.
- EVREN, S., LOAI, Y., ANTOON, R., ISLAM, S., YEGER, H., MOORE, K., WONG, K., GORCZYNSKI, R. & FARHAT, W. A. Urinary bladder tissue engineering using natural scaffolds in a porcine model: role of Toll-like receptors and impact of biomimetic molecules. *Cells Tissues Organs*, 192, 250-61.
- EVREN, S., LOAI, Y., ANTOON, R., ISLAM, S., YEGER, H., MOORE, K., WONG, K., GORCZYNSKI, R. & FARHAT, W. A. 2010. Urinary bladder tissue engineering using natural scaffolds in a porcine model: role of Toll-like receptors and impact of biomimetic molecules. *Cells Tissues Organs*, 192, 250-61.
- FAYE, C., MOREAU, C., CHAUTARD, E., JETNE, R., FUKAI, N., RUGGIERO, F., HUMPHRIES, M. J., OLSEN, B. R. & RICARD-BLUM, S. 2009. Molecular interplay between endostatin, integrins, and heparan sulfate. *J Biol Chem*, 284, 22029-40.
- FORTIER, G. M., GAUVIN, R., PROULX, M., VALLEE, M. & FRADETTE, J. 2011. Dynamic culture induces a cell type-dependent response impacting on the thickness of engineered connective tissues. *J Tissue Eng Regen Med*.
- FRANZ, T. J. 1975. Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. *J Invest Dermatol*, 64, 190-5.
- FURUSE, M. & TSUKITA, S. 2006. Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends Cell Biol*, 16, 181-8.
- GARDINER, R. A. 2000. Molecular and reconstructive urology: a coming together. *World J Surg*, 24, 1163-6.
- GEE, E. P., INGBER, D. E. & STULTZ, C. M. 2008. Fibronectin unfolding revisited: modeling cell traction-mediated unfolding of the tenth type-III repeat. *PLoS One*, 3, e2373.
- GELSE, K., POSCHL, E. & AIGNER, T. 2003. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev*, 55, 1531-46.
- GERMAIN, L., ROUABHIA, M., GUIGNARD, R., CARRIER, L., BOUVARD, V. & AUGER, F. A. 1993. Improvement of human keratinocyte isolation and culture using thermolysin. *Burns*, 19, 99-104.
- GEUTJES, P. J., DAAMEN, W. F., BUMA, P., FEITZ, W. F., FARAJ, K. A. & VAN KUPPEVELT, T. H. 2006. From molecules to matrix: construction and evaluation of molecularly defined bioscaffolds. *Adv Exp Med Biol*, 585, 279-95.
- GILBERT, T. W., SELLARO, T. L. & BADYLAK, S. F. 2006. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*, 27, 3675-83.
- GINGRAS, M., PARADIS, I. & BERTHOD, F. 2003. Nerve regeneration in a collagen-chitosan tissue-engineered skin transplanted on nude mice. *Biomaterials*, 24, 1653-61.

- GROTZINGER, P. J. & SHOEMAKER, W. C. 1956. Total bladder substitution using reversed seromuscular grafts. *Surg Forum*, 6, 619-23.
- GUYS, J. M., SIMEONI-ALIAS, J., FAKHRO, A. & DELARUE, A. 1999. Use of polydimethylsiloxane for endoscopic treatment of neurogenic urinary incontinence in children. *J Urol*, 162, 2133-5.
- HAN, D. & GOUMA, P. I. 2006. Electrospun bioscaffolds that mimic the topology of extracellular matrix. *Nanomedicine*, 2, 37-41.
- HARRINGTON, D. A., CHENG, E. Y., GULER, M. O., LEE, L. K., DONOVAN, J. L., CLAUSSEN, R. C. & STUPP, S. I. 2006. Branched peptide-amphiphiles as self-assembling coatings for tissue engineering scaffolds. *J Biomed Mater Res A*, 78, 157-67.
- HAUNER, H., ENTENMANN, G., WABITSCH, M., GAILLARD, D., AILHAUD, G., NEGREL, R. & PFEIFFER, E. F. 1989. Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest*, 84, 1663-70.
- HAURI, D. 1994. Gastropouch: bladder substitution with stomach. *Urol Int*, 53, 24-9.
- HEMLER, M. E. 2005. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 801-11.
- HICKS, R. M. 1965. The fine structure of the transitional epithelium of rat ureter. *J Cell Biol*, 26, 25-48.
- HICKS, R. M. 1975. The mammalian urinary bladder: an accommodating organ. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 50, 215-46.
- HINEK, A. & RABINOVITCH, M. 1994. 67-kD elastin-binding protein is a protective "companion" of extracellular insoluble elastin and intracellular tropoelastin. *J Cell Biol*, 126, 563-74.
- HODGKINSON, T., YUAN, X. F. & BAYAT, A. 2009. Adult stem cells in tissue engineering. *Expert Rev Med Devices*, 6, 621-40.
- HSIAO, S. T., ASGARI, A., LOKMIC, Z., SINCLAIR, R., DUSTING, G. J., LIM, S. Y. & DILLEY, R. J. 2012. Comparative analysis of paracrine factor expression in human adult mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose, and dermal tissue. *Stem Cells Dev*, 21, 2189-203.
- HUANG, Y. C., SHINDEL, A. W., NING, H., LIN, G., HARRAZ, A. M., WANG, G., GARCIA, M., LUE, T. F. & LIN, C. S. 2010. Adipose derived stem cells ameliorate hyperlipidemia associated detrusor overactivity in a rat model. *J Urol*, 183, 1232-40.
- IKENOUCI, J., UMEDA, K., TSUKITA, S. & FURUSE, M. 2007. Requirement of ZO-1 for the formation of belt-like adherens junctions during epithelial cell polarization. *J Cell Biol*, 176, 779-86.
- JACK, G. S., ALMEIDA, F. G., ZHANG, R., ALFONSO, Z. C., ZUK, P. A. & RODRIGUEZ, L. V. 2005. Processed lipoaspirate cells for tissue engineering of the lower urinary tract: implications for the treatment of stress urinary incontinence and bladder reconstruction. *J Urol*, 174, 2041-5.
- JEAN, J., LAPOINTE, M., SOUCY, J. & POULIOT, R. 2009. Development of an in vitro psoriatic skin model by tissue engineering. *J Dermatol Sci*, 53, 19-25.
- JOST, S. P. 1989. Cell cycle of normal bladder urothelium in developing and adult mice. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 57, 27-36.
- KACHAR, B., LIANG, F., LINS, U., DING, M., WU, X. R., STOFFLER, D., AEBI, U. & SUN, T. T. 1999. Three-dimensional analysis of the 16 nm urothelial plaque particle: luminal surface exposure, preferential head-to-head interaction, and hinge formation. *J Mol Biol*, 285, 595-608.

- KANG, J. W., KANG, K. S., KOO, H. C., PARK, J. R., CHOI, E. W. & PARK, Y. H. 2008. Soluble factors-mediated immunomodulatory effects of canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 17, 681-93.
- KHANDELWAL, P., ABRAHAM, S. N. & APODACA, G. 2009. Cell biology and physiology of the uroepithelium. *Am J Physiol Renal Physiol*, 297, F1477-501.
- KILROY, G. E., FOSTER, S. J., WU, X., RUIZ, J., SHERWOOD, S., HEIFETZ, A., LUDLOW, J. W., STRICKER, D. M., POTINY, S., GREEN, P., HALVORSEN, Y. D., CHEATHAM, B., STORMS, R. W. & GIMBLE, J. M. 2007. Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. *J Cell Physiol*, 212, 702-9.
- KRAUS, L. M. & KRAUS, A. P., JR. 2001. Carbamoylation of amino acids and proteins in uremia. *Kidney Int Suppl*, 78, S102-7.
- KREFT, M. E., HUDOKLIN, S., JEZERNIK, K. & ROMIH, R. 2010. Formation and maintenance of blood-urine barrier in urothelium. *Protoplasma*, 246, 3-14.
- 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. *Histochem Cell Biol*, 125, 475-85.
- KRESSE, H. & SCHONHERR, E. 2001. Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control. *J Cell Physiol*, 189, 266-74.
- KROPP, B. P., RIPPY, M. K., BADYLAK, S. F., ADAMS, M. C., KEATING, M. A., RINK, R. C. & THOR, K. B. 1996. Regenerative urinary bladder augmentation using small intestinal submucosa: urodynamic and histopathologic assessment in long-term canine bladder augmentations. *J Urol*, 155, 2098-104.
- KUHBIER, J. W., WEYAND, B., RADTKE, C., VOGT, P. M., KASPER, C. & REIMERS, K. 2010. Isolation, Characterization, Differentiation, and Application of Adipose-Derived Stem Cells. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 123, 55-105.
- LEWIS, S. A. & DIAMOND, J. M. 1976. Na⁺ transport by rabbit urinary bladder, a tight epithelium. *J Membr Biol*, 28, 1-40.
- LEWIS, S. A. & KLEINE, T. J. 2000. Urea modifies the permeability of the mammalian urothelium. *J Urol*, 164, 219-23.
- LI, X. H., SHAO, C. L. & LIU, Y. C. 2007. A simple method for controllable preparation of polymer nanotubes via a single capillary electrospinning. *Langmuir*, 23, 10920-3.
- LIN, J. H., WU, X. R., KREIBICH, G. & SUN, T. T. 1994. Precursor sequence, processing, and urothelium-specific expression of a major 15-kDa protein subunit of asymmetric unit membrane. *J Biol Chem*, 269, 1775-84.
- LIU, X., WU, H., BYRNE, M., KRANE, S. & JAENISCH, R. 1997. Type III collagen is crucial for collagen I fibrillogenesis and for normal cardiovascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 1852-6.
- LONGHURST, P. A., EIKA, B., LEGGETT, R. E. & LEVIN, R. M. 1992. Urinary bladder function in the tight-skin mouse. *J Urol*, 148, 1611-4.
- MAGNAN, M., BERTHOD, F., CHAMPIGNY, M. F., SOUCY, F. & BOLDUC, S. 2006. In vitro reconstruction of a tissue-engineered endothelialized bladder from a single porcine biopsy. *J Pediatr Urol*, 2, 261-70.
- MATTER, K. & BALDA, M. S. 2003. Signalling to and from tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 225-36.
- MAYER, S., WEISSER, M., TILL, H., GRAFE, G. & GEYER, C. 2010. Congenital myelomeningocele - do we have to change our management? *Cerebrospinal Fluid Res*, 7, 17.

- METCALFE, P. D., CAIN, M. P., KAEFER, M., GILLEY, D. A., MELDRUM, K. K., MISSERI, R., KING, S. J., CASALE, A. J. & RINK, R. C. 2006a. What is the need for additional bladder surgery after bladder augmentation in childhood? *J Urol*, 176, 1801-5; discussion 1805.
- METCALFE, P. D., CASALE, A. J., KAEFER, M. A., MISSERI, R., DUSSINGER, A. M., MELDRUM, K. K., CAIN, M. P. & RINK, R. C. 2006b. Spontaneous bladder perforations: a report of 500 augmentations in children and analysis of risk. *J Urol*, 175, 1466-70; discussion 1470-1.
- MIN, G., WANG, H., SUN, T. T. & KONG, X. P. 2006. Structural basis for tetraspanin functions as revealed by the cryo-EM structure of uroplakin complexes at 6-A resolution. *J Cell Biol*, 173, 975-83.
- MIN, G., ZHOU, G., SCHAPIRA, M., SUN, T. T. & KONG, X. P. 2003. Structural basis of urothelial permeability barrier function as revealed by Cryo-EM studies of the 16 nm uroplakin particle. *J Cell Sci*, 116, 4087-94.
- MINSKY, B. D. & CHLAPOWSKI, F. J. 1978. Morphometric analysis of the translocation of luminal membrane between cytoplasm and cell surface of transitional epithelial cells during the expansion-contraction cycles of mammalian urinary bladder. *J Cell Biol*, 77, 685-97.
- MUROHARA, T., SHINTANI, S. & KONDO, K. 2009. Autologous adipose-derived regenerative cells for therapeutic angiogenesis. *Curr Pharm Des*, 15, 2784-90.
- MURPHY, J. J., MYINT, M. K., SCHWEGMAN, C. W. & SCOTT, L. B. 1956. Absorption of urinary constituents from various segments of the gastrointestinal tract used as urinary conduits or reservoirs. *Surg Forum*, 6, 604-7.
- MURPHY, J. J. & SCHWEGMAN, C. W. 1956. The problem of bladder substitution. *Pa Med J*, 59, 805-7.
- NEGRETE, H. O., LAVELLE, J. P., BERG, J., LEWIS, S. A. & ZEIDEL, M. L. 1996. Permeability properties of the intact mammalian bladder epithelium. *Am J Physiol*, 271, F886-94.
- NGUYEN, D. H. & MITCHELL, M. E. 1991. Gastric bladder reconstruction. *Urol Clin North Am*, 18, 649-57.
- NISHIYAMA, T., AMANO, S., TSUNENAGA, M., KADOYA, K., TAKEDA, A., ADACHI, E. & BURGESSON, R. E. 2000. The importance of laminin 5 in the dermal-epidermal basement membrane. *J Dermatol Sci*, 24 Suppl 1, S51-9.
- NOVICK, A. C., STRAFFON, R. A., BANOWSKY, L. H., NOSE, Y., LEVIN, H. & STEWART, B. H. 1977. Experimental bladder substitution using biodegradable graft of natural tissue. *Urology*, 10, 118-27.
- NOZAKI, Y. & TANFORD, C. 1963. The Solubility of Amino Acids and Related Compounds in Aqueous Urea Solutions. *J Biol Chem*, 238, 4074-81.
- NYSTROM, T. 2005. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J*, 24, 1311-7.
- PARK, H. K., CHO, K. S., PARK, H. Y., SHIN, D. H., KIM, Y. K., JUNG, J. S., PARK, S. K. & ROH, H. J. 2010. Adipose-derived stromal cells inhibit allergic airway inflammation in mice. *Stem Cells Dev*, 19, 1811-8.
- PAULY, R. R., PASSANITI, A., BILATO, C., MONTICONE, R., CHENG, L., PAPADOPOULOS, N., GLUZBAND, Y. A., SMITH, L., WEINSTEIN, C., LAKATTA, E. G. & ET AL. 1994. Migration of cultured vascular smooth muscle cells through a basement membrane barrier requires type IV collagenase activity and is inhibited by cellular differentiation. *Circ Res*, 75, 41-54.
- PETROVIC, V., STANKOVIC, J. & STEFANOVIC, V. 2011. Tissue engineering of the urinary bladder: current concepts and future perspectives. *ScientificWorldJournal*, 11, 1479-88.

- PUTNAM, D. F. 1971. Composition and concentrative properties of human urine. In: ADMINISTRATION, N. A. A. S. (ed.) *Nasa contractor report*.
- REHMAN, J., TRAKTUEV, D., LI, J., MERFELD-CLAUSS, S., TEMM-GROVE, C. J., BOVENKERK, J. E., PELL, C. L., JOHNSTONE, B. H., CONSIDINE, R. V. & MARCH, K. L. 2004. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*, 109, 1292-8.
- ROCHA, L. B., GOISSIS, G. & ROSSI, M. A. 2002. Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. *Biomaterials*, 23, 449-56.
- ROMIH, R., VERANIC, P. & JEZERNIK, K. 1999. Actin filaments during terminal differentiation of urothelial cells in the rat urinary bladder. *Histochem Cell Biol*, 112, 375-80.
- ROTH, C. C., MONDALEK, F. G., KIBAR, Y., ASHLEY, R. A., BELL, C. H., CALIFANO, J. A., MADIHALLY, S. V., FRIMBERGER, D., LIN, H. K. & KROPP, B. P. 2010. Bladder regeneration in a canine model using hyaluronic acid-poly(lactic-co-glycolic-acid) nanoparticle modified porcine small intestinal submucosa. *BJU Int*, 108, 148-55.
- ROUSSEAU, A., FRADETTE, J., BERNARD, G., GAUVIN, R., LATERREUR, V. & BOLDUC, S. 2013. Adipose-derived stromal cells for the reconstruction of a human vesical equivalent. *J Tissue Eng Regen Med*.
- SABAN, R., SIMPSON, C., VADIGEPALLI, R., MEMET, S., DOZMOROV, I. & SABAN, M. R. 2007. Bladder inflammatory transcriptome in response to tachykinins: neurokinin 1 receptor-dependent genes and transcription regulatory elements. *BMC Urol*, 7, 7.
- SALCEDO, R., WASSERMAN, K., YOUNG, H. A., GRIMM, M. C., HOWARD, O. M., ANVER, M. R., KLEINMAN, H. K., MURPHY, W. J. & OPPENHEIM, J. J. 1999. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: In vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1alpha. *Am J Pathol*, 154, 1125-35.
- SANTUCCI, R. A. & BARBER, T. D. 2005. Resorbable extracellular matrix grafts in urologic reconstruction. *Int Braz J Urol*, 31, 192-203.
- SHOEMAKER, L. R., STRIFE, C. F., BALISTRERI, W. F. & RYCKMAN, F. C. 1992. Rapid improvement in the renal tubular dysfunction associated with tyrosinemia following hepatic replacement. *Pediatrics*, 89, 251-5.
- STAEHELIN, L. A., CHLAPOWSKI, F. J. & BONNEVILLE, M. A. 1972. Lumenal plasma membrane of the urinary bladder. I. Three-dimensional reconstruction from freeze-etch images. *J Cell Biol*, 53, 73-91.
- STAEHLER, W. 1952a. [The artificial bladder of small intestines]. *Z Urol*, 45, 376-80.
- STAEHLER, W. 1952b. [Substitution of cystectomized bladder by small intestine]. *Langenbecks Arch Klin Chir Ver Dtsch Z Chir*, 273, 388-92.
- STANDER, M., NAUMANN, U., WICK, W. & WELLER, M. 1999. Transforming growth factor-beta and p-21: multiple molecular targets of decorin-mediated suppression of neoplastic growth. *Cell Tissue Res*, 296, 221-7.
- STANKUS, J. J., FREYTES, D. O., BADYLAK, S. F. & WAGNER, W. R. 2008. Hybrid nanofibrous scaffolds from electrospinning of a synthetic biodegradable elastomer and urinary bladder matrix. *J Biomater Sci Polym Ed*, 19, 635-52.
- STRASSBURG, S., NIENHUESER, H., STARK, G. B., FINKENZELLER, G. & TORIO-PADRON, N. 2012. Human Adipose-Derived Stem Cells Enhance the Angiogenic Potential of Endothelial Progenitor Cells, But Not of Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Tissue Eng Part A*.
- STREM, B. M. & HEDRICK, M. H. 2005. The growing importance of fat in regenerative medicine. *Trends Biotechnol*, 23, 64-6.

- TROTTIER, V., MARCEAU-FORTIER, G., GERMAIN, L., VINCENT, C. & FRADETTE, J. 2008. IFATS collection: Using human adipose-derived stem/stromal cells for the production of new skin substitutes. *Stem Cells*, 26, 2713-23.
- VERANIC, P., ERMAN, A., KEREK-KOS, M., BOGATAJ, M., MRHAR, A. & JEZERNIK, K. 2009. Rapid differentiation of superficial urothelial cells after chitosan-induced desquamation. *Histochem Cell Biol*, 131, 129-39.
- VERMETTE, M., TROTTIER, V., MENARD, V., SAINT-PIERRE, L., ROY, A. & FRADETTE, J. 2007. Production of a new tissue-engineered adipose substitute from human adipose-derived stromal cells. *Biomaterials*, 28, 2850-60.
- WALKER, B. E. 1960. Renewal of cell populations in the female mouse. *Am J Anat*, 107, 95-105.
- WANG, A. Y., LEONG, S., LIANG, Y. C., HUANG, R. C., CHEN, C. S. & YU, S. M. 2008. Immobilization of growth factors on collagen scaffolds mediated by polyanionic collagen mimetic peptides and its effect on endothelial cell morphogenesis. *Biomacromolecules*, 9, 2929-36.
- WU, X. R., KONG, X. P., PELLICER, A., KREIBICH, G. & SUN, T. T. 2009. Uroplakins in urothelial biology, function, and disease. *Kidney Int*, 75, 1153-65.
- WU, X. R., MANABE, M., YU, J. & SUN, T. T. 1990. Large scale purification and immunolocalization of bovine uroplakins I, II, and III. Molecular markers of urothelial differentiation. *J Biol Chem*, 265, 19170-9.
- WU, X. R. & SUN, T. T. 1993. Molecular cloning of a 47 kDa tissue-specific and differentiation-dependent urothelial cell surface glycoprotein. *J Cell Sci*, 106 (Pt 1), 31-43.
- YANCEY, P. H., CLARK, M. E., HAND, S. C., BOWLUS, R. D. & SOMERO, G. N. 1982. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*, 217, 1214-22.
- YANCEY, P. H. & SOMERO, G. N. 1979. Counteraction of urea destabilization of protein structure by methylamine osmoregulatory compounds of elasmobranch fishes. *Biochem J*, 183, 317-23.
- YOSHIMURA, K., SHIGEURA, T., MATSUMOTO, D., SATO, T., TAKAKI, Y., AIBA-KOJIMA, E., SATO, K., INOUE, K., NAGASE, T., KOSHIMA, I. & GONDA, K. 2006. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol*, 208, 64-76.
- YU, J., LIN, J. H., WU, X. R. & SUN, T. T. 1994. Uroplakins Ia and Ib, two major differentiation products of bladder epithelium, belong to a family of four transmembrane domain (4TM) proteins. *J Cell Biol*, 125, 171-82.
- ZHANG, Z., YANG, X. Y., SOLTOFF, S. P. & COHEN, D. M. 2000. PI3K signaling in the murine kidney inner medullary cell response to urea. *Am J Physiol Renal Physiol*, 278, F155-64.
- ZUK, P. A., ZHU, M., ASHJIAN, P., DE UGARTE, D. A., HUANG, J. I., MIZUNO, H., ALFONSO, Z. C., FRASER, J. K., BENHAIM, P. & HEDRICK, M. H. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 13, 4279-95.
- ZUK, P. A., ZHU, M., MIZUNO, H., HUANG, J., FUTRELL, J. W., KATZ, A. J., BENHAIM, P., LORENZ, H. P. & HEDRICK, M. H. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 7, 211-28.