

GUILLAUME MARCEAU FORTIER

**CULTURE « *DYNAMIQUE* » : IMPACT SUR LA  
RECONSTRUCTION DE TISSUS CONJONCTIFS  
PAR GÉNIE TISSULAIRE**

Mémoire présenté  
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de maîtrise en Biologie Cellulaire et Moléculaire  
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)

FACULTÉ DE MÉDECINE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

2010

## Résumé

Des millions de chirurgies de reconstruction sont réalisées chaque année pour remplacer les tissus endommagés. Grâce au génie tissulaire, il est possible de reconstruire du tissu conjonctif humain par la méthode d'auto-assemblage à partir des fibroblastes dermiques (FD) ou des cellules stromales/souches isolées du tissu adipeux (CSTA), sans biomatériau exogène. Dans le but d'optimiser la production des tissus, nous avons évalué l'impact d'une culture dynamique (milieu en mouvement constant) en utilisant une plate-forme agitatrice. Cette approche s'est traduite par la reconstruction de tissus conjonctifs humains 1,8 fois plus épais à partir des CSTA. De plus, cette approche a permis de réduire les délais de reconstruction tissulaire de 2 semaines, ainsi que la production d'équivalents tissulaires plus épais. Bref, la production de tissus conjonctifs humains est donc améliorée par la culture dynamique.

## **Abstract**

Millions of surgical procedures are performed each year to replace damaged tissues. Tissue engineering approaches to create living tissue equivalents have gained considerable attention. Mesenchymal cells such as dermal fibroblasts (DF) or adipose-derived stromal/stem cells (ASCs) can be used to engineer connective tissues by the self-assembly approach, without the need of exogenous biomaterials. In an effort to optimize tissue reconstruction, we evaluated the effect of a dynamic culture (wave-like movement) by using a rotating platform. This approach lead to the production of 1,8 fold thicker constructs with ASCs. Also, this approach resulted in a reduction of the production time by 2 weeks, as well as the reconstruction of thicker tissues. Therefore, the production of human connective tissues was improved by dynamic culture.

## Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier infiniment ma directrice Julie Fradette Ph.D., pour son support inconditionnel, sa patience, sa grande disponibilité, mais surtout pour m'avoir constamment motivé et encouragé. Je remercie également Lucie Germain Ph.D. et Dr François Auger de m'avoir accueilli au LOEX.

Je désire aussi remercier tous les membres de l'équipe LOETA. Un merci spécial à Caroline Vincent, Valérie Trottier, anciennes étudiantes de l'équipe qui sont devenues les assistantes de recherche. Également, je veux remercier Maryse Proulx, Catherine Villeneuve, Benoît M.-Labbé qui sont les autres étudiants sous la supervision de Julie Fradette, pour leur aide précieuse et leurs encouragements très appréciés. Je remercie spécialement Lucie St-Pierre, notre ancienne assistante de recherche, pour son apport précieux à mes travaux. Aussi, je remercie tous les étudiants stagiaires. Je tiens à exprimer ma gratitude à Maud Vallée Ph.D. pour m'avoir appris les principes du PCR et à Robert Gauvin Ph.D. pour avoir réalisé tous les tests mécaniques.

Merci à toute la grande famille du LOEX qui, selon moi, se distingue particulièrement des autres équipes de recherche à l'échelle internationale.

Un merci personnel à ma mère Lucille (*Mom*), mon père Pierre (*Pa*), mon frère Stéphane (*Master*), ma sœur Amélie (*Sister*) et ma grand-mère Thérèse (*Grand-Ma*) et tous mes amis proches pour leur soutien alors que ma présence parmi eux se faisait plus rare.

Finalement, un merci spécial à mon amoureuse Katia (*Babe*) pour sa patience, son soutien moral et surtout pour sa présence à mes côtés dans les moments les plus importants.

*«Laisser vivre vos rêves»*

# Table des matières

<b>Résumé</b> .....	<b>i</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>ii</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>iii</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>v</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>vii</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>ix</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>x</b>

<b>Chapitre 1 : Introduction générale</b> .....	<b>1</b>
1.1 Génie tissulaire.....	2
1.1.1 Reconstruction de tissus conjonctifs in vitro.....	4
1.1.2 Source cellulaire.....	6
1.1.3 Types d'échafaudages disponibles pour la reconstruction tissulaire.....	8
1.2 Éléments du tissu conjonctif.....	14
1.2.1 Collagènes : Biosynthèse et structure.....	14
1.2.2 Glycosaminoglycannes.....	20
1.2.3 Protéoglycannes.....	20
1.2.4 Glycoprotéines.....	21
1.2.5 Intégrines.....	22
1.2.6 Autres composantes.....	22
1.3 Culture dynamique : méthode complémentaire à la reconstruction tissulaire.....	23
1.3.1 Utilité et complexité des bioréacteurs.....	24
1.3.2 Concept du mouvement fluide.....	26
1.3.3 Culture dynamique à partir d'un <i>Spinner Flask</i> .....	27
1.3.4 Autres modèles de tissus conjonctifs reconstruits dans un contexte de culture dynamique.....	28
1.4 Hypothèse et objectifs.....	30
<b>Chapitre 2 : Matériels et méthodes</b> .....	<b>32</b>
2.1 Provenance des cellules.....	33
2.1.1 Cellules stromales/souches isolées du tissu adipeux humain (CSTA).....	33
2.1.2 Fibroblastes dermiques humains (FD).....	33
2.2 Culture cellulaire.....	34
2.3 Reconstruction de feuillets et de tissus conjonctifs par auto-assemblage.....	35
2.3.1 Cinétique de reconstruction des tissus conjonctifs humains.....	36
2.3.2 Reconstruction de feuillets cellulaires humains servant à l'étude des mécanismes impliqués lors de la culture dynamique.....	38
2.4 Homogénéisation des feuillets cellulaires par sonication.....	38
2.5 Analyses histologiques.....	39
2.6 Test de résistance mécanique.....	39
2.7 Évaluation de l'expression des transcrits par RT-PCR quantitatif.....	41
2.8 Dosage des protéines totales par la méthode de microBCA.....	42
2.9 Dosage fluorométrique de l'ADN total par Picogreen.....	43
2.10 Analyse par microscopie électronique à transmission.....	44

2.11 Analyses statistiques .....	44
<b>Chapitre 3 : Résultats .....</b>	<b>45</b>
3.1 Impact de la culture dynamique sur la production de tissus conjonctifs humains.....	46
3.2 Mécanismes influençant la synthèse et l'assemblage des éléments de la MEC en condition dynamique.....	50
3.3 Réduction du temps de production des tissus conjonctifs humains.....	55
3.4 Résistance mécanique des tissus conjonctifs reconstruits .....	63
<b>Chapitre 4 : Discussion.....</b>	<b>67</b>
4.1 Impact de la culture dynamique sur la reconstruction de tissus conjonctifs.....	68
4.2 Avantages et perspectives .....	72
<b>Chapitre 5 : Conclusion.....</b>	<b>75</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>77</b>

## Liste des abréviations

(Termes anglais en *italique*)

AA	Acide ascorbique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ASC	<i>Adipose-derived stem/stromal cells</i>
BMP-1	<i>Bone morphogenetic protein-1</i>
CE	Cellules endothéliales
CSM	Cellules souches mésenchymateuses humaines
CSMO	Cellules souches mésenchymateuses isolées de la moelle osseuse
CSTA	Cellules stromales/souches mésenchymateuses isolées du tissu adipeux
DHA	Déhydroascorbate
FD	Fibroblastes dermiques humains
FN	Fibronectine
FI	Fluide interstitiel
GLUT	<i>Glucose transporter isoform</i>
GAG	Glycosaminoglycannes
HYL	Hydroxylysine
HYP	Hydroxyproline
IMC	Indice de masse corporelle

LOEX	Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale
LH	Lysyl hydroxylase
MEC	Matrice extracellulaire
MMP	Métalloprotéinases
MET	Microscopie électronique à transmission
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
PEG	Polyéthylèneglycol
PG	Protéoglycannes
P4H	Prolyl-4-hydroxylase
PLGA	<i>Poly(lactic-co-glycolic acid)</i>
PBS	Tampon saline phosphate
RE	Réticulum endoplasmique
RT-PCR	Réaction en chaîne par polymérase en temps réel
SIS	<i>Small intestine submucosa</i>
SVCT	<i>Sodium-dependent vitamin C transporter</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i>
TIMP	<i>Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
UTS	<i>Ultimate tensile strength</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.1</b> : Composition et localisation des différents types de collagènes présents dans les tissus conjonctifs .....	15
<b>Tableau 2.1</b> : Caractérisation des populations cellulaires de CSTA utilisées. ....	33
<b>Tableau 2.2</b> : Caractérisation des populations cellulaires FD utilisées. ....	34
<b>Tableau 2.3</b> : Amorces utilisées pour les RT-PCR quantitatifs .....	42
<b>Tableau 3.1</b> : Évaluation du pourcentage de feuillets cellulaires manipulables et utilisables pour la reconstruction des tissus conjonctifs humains. ....	58
<b>Tableau 3.2</b> : Comparaison de la périodicité et de la densité des fibres de collagène contenues dans les tissus conjonctifs humains reconstruits selon la condition de culture. ....	66

## Liste des figures

<b>Figure 1.1</b> : Diversité des approches développées par le génie tissulaire.....	3
<b>Figure 1.2</b> : Multipotence des cellules stromales/souches mésenchymateuses isolées du tissu adipeux.....	7
<b>Figure 1.3</b> : Principe de la décellularisation .....	12
<b>Figure 1.4</b> : Principe de l'auto-assemblage en génie tissulaire.....	13
<b>Figure 1.5</b> : Interaction entre les différents éléments de la MEC et avec la surface des cellules présentes dans le tissu conjonctif.....	14
<b>Figure 1.6</b> : Étapes de la synthèse, de la sécrétion et de l'assemblage des fibres de collagène .....	17
<b>Figure 1.7</b> : Mécanisme d'intégration de la vitamine C dans la cellule .....	19
<b>Figure 1.8</b> : Modélisation de l'interaction entre une molécule de décorine et le collagène.....	21
<b>Figure 1.9</b> : Concept de la culture dynamique à l'aide de bioréacteurs.....	25
<b>Figure 1.10</b> : <i>Spinner Flask</i> .....	27
<b>Figure 2.1</b> : Plate-forme agitatrice 3D .....	35
<b>Figure 2.2</b> : Schématisation de la production des tissus conjonctifs par la méthode d'auto-assemblage .....	36
<b>Figure 2.3</b> : Représentation schématique des principales étapes de reconstruction des feuillets et tissus conjonctifs humains en condition de culture statique et dynamique.....	37
<b>Figure 2.4</b> : Étapes effectuées lors du test de résistance mécanique .....	40
<b>Figure 3.1</b> : Aspect histologique représentatif des tissus conjonctifs reconstruits par auto-assemblage selon les conditions de culture utilisées.....	47
<b>Figure 3.2</b> : Épaisseur des tissus conjonctifs humains reconstruits avec les CSTA et les FD selon la méthode de culture statique ou dynamique .....	48
<b>Figure 3.3</b> : Pourcentage de contraction des tissus conjonctifs reconstruits à partir des CSTA selon la méthode de culture statique ou dynamique .....	49
<b>Figure 3.4</b> : Contenu en ADN des feuillets et tissus conjonctifs produits selon les différentes conditions de culture.....	50
<b>Figure 3.5</b> : Ratio des valeurs d'expression relative des transcrits par RT-PCR quantitatif à partir de feuillets cellulaires de 7 jours selon les conditions de culture.....	52
<b>Figure 3.6</b> : Ratio des valeurs d'expression relative des transcrits par RT-PCR quantitatif à partir de tissus conjonctifs de 35 jours selon les conditions de culture .....	53
<b>Figure 3.7</b> : Aspect histologique représentatif des tissus conjonctifs reconstruits en condition dynamique par auto-assemblage pendant différentes périodes de culture .....	56
<b>Figure 3.8</b> : Épaisseur des tissus conjonctifs humains reconstruits sur une période de 21, 28 et 35 jours selon les conditions de culture .....	57
<b>Figure 3.9</b> : Contenu en ADN mesuré dans des feuillets cellulaires cultivés, à différentes périodes (14, 21 et 28 jours), selon les conditions de culture .....	59
<b>Figure 3.10</b> : Influence de la culture dynamique sur le dépôt des protéines totales selon le temps de culture. ....	61
<b>Figure 3.11</b> : Résistance mécanique des tissus conjonctifs humains reconstruits en culture dynamique et statique .....	63

**Figure 3.12** : Aspect en microscopie électronique à transmission d'un tissu conjonctif  
reconstruit avec les CSTA en culture statique et dynamique .....65

# **Chapitre 1 : Introduction générale**

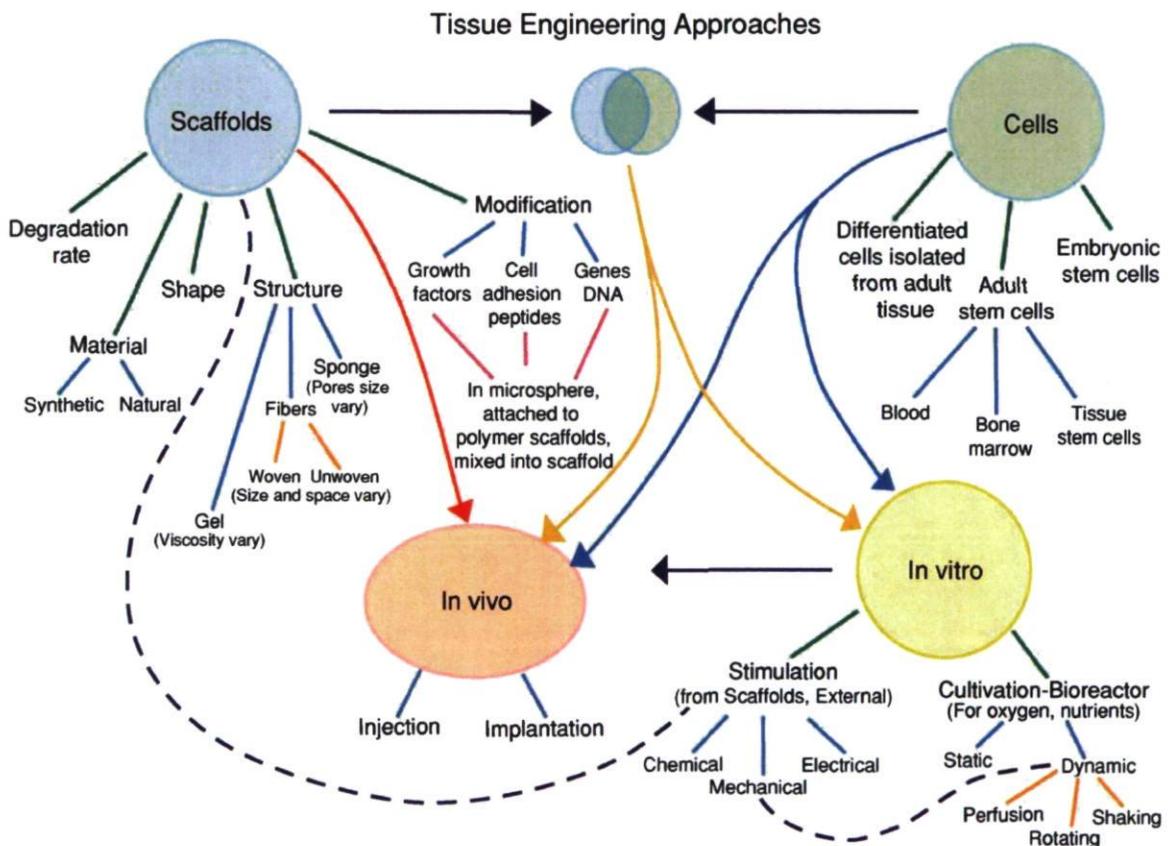
## 1.1 Génie tissulaire

Chaque année, des millions de chirurgies de reconstruction sont réalisées ([www.plasticsurgery.org](http://www.plasticsurgery.org)) à la suite de la perte de tissus causée par des accidents, des brûlures ou bien suite à la résection de tissu cancéreux. Pour combler la perte des tissus lésés, les médecins effectuent des transplantations de tissus sains pouvant régénérer les parties endommagées. Lorsqu'il est possible de le faire, des greffes de tissus d'un site anatomique sain du patient vers le site lésé sont réalisées. Dans ce cas précis, il est question de greffe autologue. Par exemple, pour des patients ayant subi des brûlures au niveau de la peau, ce type d'intervention s'avère approprié. Par contre, lorsqu'il est impossible de prélever des biopsies de tissus sains (sites donneurs) en raison de la gravité des brûlures pouvant atteindre jusqu'à 90 % du corps, alors on peut avoir recours à l'utilisation de tissus sains provenant d'une autre personne (allogreffe) ou bien du corps d'un cadavre (Cuono et al. 1986) ou d'un animal (xéno greffe) comme le porc (Elliott et al. 1973). Toutes ces alternatives, en considérant la greffe de tissu réalisable, s'avèrent en réalité des approches difficiles à effectuer en raison de la rareté et de la pénurie des tissus disponibles. Le génie tissulaire, qui est une approche multidisciplinaire en pleine expansion, représente donc une stratégie intéressante et originale pour combler le besoin grandissant de tissus et d'organes nécessaires lors de chirurgies de reconstruction. L'un des principaux buts du génie tissulaire est de créer des équivalents tissulaires in vitro qui serviront de substituts de remplacement.

Le terme « génie tissulaire » a été employé pour la première fois en 1980. À l'époque, le génie tissulaire représentait les technologies se spécialisant dans la fabrication de substituts et de prothèses synthétiques. Les études étaient réalisées dans le but d'explorer le comportement des cellules dans une matrice non biologique. Ce concept d'étude a évolué depuis. Les connaissances du comportement cellulaire lors des processus de formation tissulaire dans un contexte tridimensionnel ont grandement avancées depuis ce temps.

Bref, le génie tissulaire apporte d'une certaine manière une solution innovatrice à la pénurie d'organes et de tissus qui se font rares pour des greffes. La figure 1.1 illustre bien les

différentes approches développées pour tenter de produire des tissus biologiques qui se rapprochent le plus possible des conditions *in vivo*. En fait, le génie tissulaire est un domaine de la recherche médicale qui combine deux aspects principaux, soit la connaissance approfondie des biomatériaux, et la compréhension accrue du comportement cellulaire. En combinant ces deux aspects, il est possible de produire des équivalents biologiques par ingénierie tissulaire.



**Figure 1.1 :** Diversité des approches développées par le génie tissulaire [tirée de (Levenberg et al. 2004)].

### **1.1.1 Reconstruction de tissus conjonctifs in vitro**

Le tissu conjonctif est, par définition, un tissu d'origine mésodermique servant de support et de soutien. Il est présent dans la majorité des sites anatomiques du corps humain. Il est principalement composé d'une matrice extracellulaire (MEC) formée majoritairement de collagène de type I sécrété et assemblé par les cellules mésenchymateuses telles que les fibroblastes ou les cellules stromales. Des macrophages, de même que des cellules endothéliales qui forment un réseau de capillaires sanguins responsable de l'apport en nutriments et en oxygène, y sont aussi présents. Il existe plusieurs types de tissus conjonctifs dont ceux de type lâche, de type dense ainsi que ceux de type cartilagineux. Le tissu conjonctif lâche est représenté par le tissu adipeux et le derme de la peau. Le tissu conjonctif dense est présent dans les muscles et les os. Le tissu conjonctif de type cartilagineux est particulier puisqu'il est formé d'une matrice entièrement composée de collagène de type II.

À noter que dans le présent travail, une attention particulière est portée sur les composantes principales de la MEC de même que sur les cellules présentes dans le tissu conjonctif. Dans le contexte de reconstruction d'un tissu conjonctif par génie tissulaire, les biomatériaux représentent la MEC dans laquelle se retrouvent les cellules. La production d'un tissu implique donc la création d'un substitut biologique dans un contexte tridimensionnel. L'importance du contexte tridimensionnel réside dans le fait que les cellules, par exemple les fibroblastes, se comportent différemment lorsqu'ils sont cultivés en 2 dimensions versus en 3 dimensions (Cukierman et al. 2001). D'ailleurs, les tissus reconstruits in vitro dans un contexte tridimensionnel ont l'avantage de se rapprocher encore plus des conditions biologiques in vivo.

La reconstruction de tissus conjonctifs par génie tissulaire peut être réalisée selon trois grandes stratégies. La première consiste à utiliser des biomatériaux naturels ou synthétiques capables de soutenir les cellules pendant leurs activités de régénération. Pour ce faire, l'utilisation d'échafaudages comme les gels, les hydrogels de collagènes et les éponges sont nécessaires. La deuxième approche consiste à utiliser une matrice décellularisée dont la

structure est complètement assemblée afin de servir de support aux cellules. La troisième stratégie, nommée l'auto-assemblage, se veut une approche originale et prometteuse pour enrayer les problèmes liés aux réactions immunologiques lors de la greffe de tissu. Cette dernière stratégie permet de reconstruire, entre autres, des substituts composés de matrice extracellulaire entièrement naturelle. L'auto-assemblage se base sur le fait que les propres cellules mésenchymateuses d'un patient ont la capacité de se régénérer et de produire leur propre MEC (Grinnell et al. 1989, Hata et al. 1989, Ishikawa et al. 1997, L'Heureux et al. 1998). C'est l'une des principales propriétés qui distinguent cette stratégie de celles qui préconisent l'emploi des biomatériaux. Au Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale (LOEX), la méthode d'auto-assemblage a été développée depuis les 15 dernières années afin de reconstruire différents types de tissus *in vitro* sans l'utilisation des biomatériaux exogènes. Grâce à cette technologie, il est possible de reconstruire des dermes de type conjonctifs servant de tissus de remplacement. Ces dermes ou stroma peuvent ainsi servir de support pour la reconstruction de tissus spécialisés tels que la peau (Michel et al. 1999, Trottier et al. 2008) et des substituts urologiques (Bouhout et al. 2010, Magnan et al. 2009).

Il ne faut pas oublier que le choix du type cellulaire influence largement le type d'organe ou de tissu à reconstruire. Dans le domaine de la reconstruction de tissu conjonctif par génie tissulaire, les fibroblastes dermiques constituent une source classique de cellules utilisées notamment pour la reconstruction dermique (Auger et al. 1995). Avec la découverte de cellules post-natales multipotentes provenant de la moelle osseuse ou du tissu adipeux, de nouvelles opportunités sont maintenant disponibles afin de produire des tissus conjonctifs spécialisés tels que les os et le tissu adipeux. Les cellules souches mésenchymateuses isolées de la moelle osseuse (CSMO) décrites par Caplan (Caplan 1991) sont les premières cellules post-natales à avoir été exploitées en génie tissulaire. Ces cellules souches de source mésenchymateuse (CSM) sont reconnues comme étant multipotentes. Une autre source de cellules souches mésenchymateuses a été identifiée depuis 2001. Il s'agit des cellules stromales/souches mésenchymateuses isolées du tissu adipeux (CSTA) (Zuk et al. 2002, Zuk et al. 2001). Les CSTA représentent une population de cellules souches adultes très populaire actuellement en génie tissulaire, mais également en médecine régénératrice,

par exemple pour la thérapie cellulaire. Aussi, les CSTA sont utilisées lors d'étude comportementale des cellules souches (Zuk 2010).

### **1.1.2 Source cellulaire**

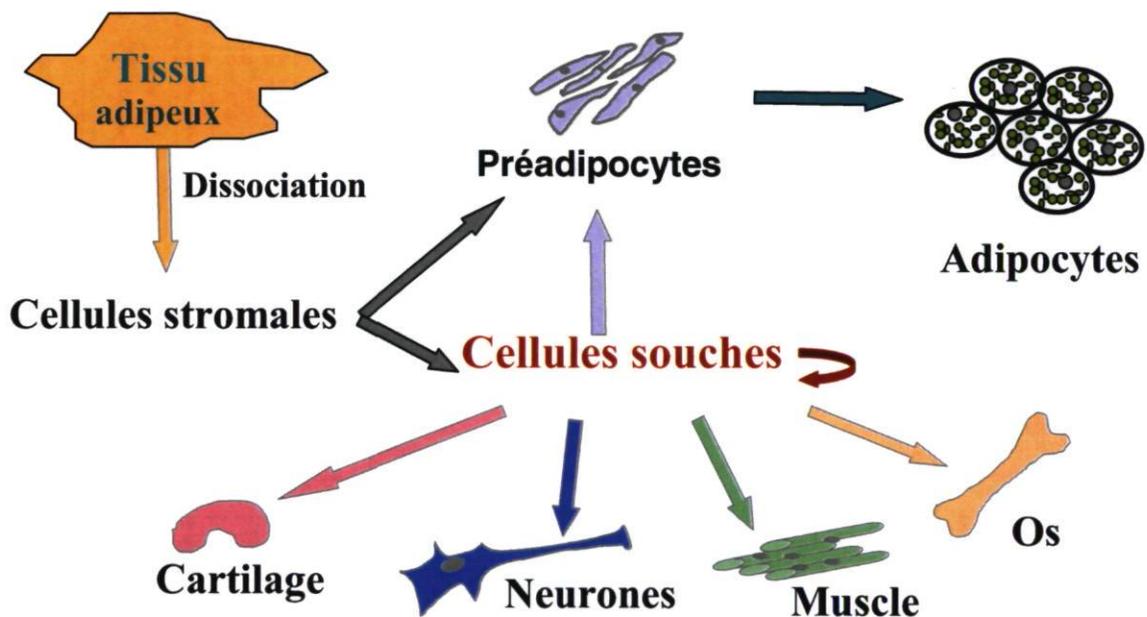
#### **Fibroblastes dermiques humains (FD)**

Les fibroblastes sont d'origine mésenchymateuse et ils se retrouvent dans une multitude de sites anatomiques. Ils sont facilement amplifiés et conservent leur morphologie fusiforme en culture. Ce type de cellule sécrète la matrice extracellulaire, c'est-à-dire les éléments qui forment le tissu conjonctif comme les fibres de collagènes, les glycoprotéines et les protéoglycannes. En fait, le fibroblaste joue un rôle primordial dans la synthèse de la MEC. Ces cellules possèdent une multitude d'autres fonctions biologiques. Elles sécrètent des facteurs de croissance ainsi que des cytokines influençant la prolifération cellulaire. Les fibroblastes expriment une panoplie de récepteurs de surface leur permettant de répondre aux stimuli produits par l'environnement extérieur (Sorrell et al. 2009). Ainsi, ces cellules mésenchymateuses interagissent avec les autres types cellulaires tels que les kératinocytes qui constituent la partie de la couche épidermique de la peau. Les FD sont notamment utilisés en génie tissulaire afin de reconstruire des substituts cutanés (Auger et al. 1995, Bell et al. 1981, Lamme et al. 2000).

#### **Cellules stromales/souches mésenchymateuses du tissu adipeux humain (CSTA)**

Le tissu adipeux est composé d'adipocytes remplis de lipides et d'un stroma constitué de fibroblastes, de préadipocytes, de cellules endothéliales et de macrophages. Dans ce mélange hétérogène, une population de cellules souches multipotentes s'y retrouvent (Zuk et al. 2002, Zuk et al. 2001). Jusqu'à 2 % des cellules stromales du tissu adipeux seraient des cellules souches, comparativement à 0,002 % dans le cas de la moelle osseuse; source la plus connue, mais moins accessible de cellules souches mésenchymateuses (Strem et al. 2005). Ces cellules stromales/souches adultes sont d'origine mésenchymateuse et elles ont une morphologie qui se rapproche de celle des fibroblastes. Elles sont multipotentes et ont la capacité de s'auto-renouveler, de proliférer et de se différencier en chondrocytes, en neurones (Anghileri et al. 2008, Ashjian et al. 2003, Safford et al. 2002), en cellules

musculaires (Mizuno et al. 2002a), en ostéoblastes et en adipocytes lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu contenant un cocktail d'inducteurs spécifiques (Zuk et al. 2002, Zuk et al. 2001) (Figure 1.2). Les CSTA sont reconnues pour sécréter une panoplie de facteurs de croissance dont le VEGF (*vascular endothelial growth factor*), des interleukines, des adipokines, le TNF-alpha (*tumor necrosis factor-alpha*) et même le NGF (*nerve growth factor*) (Salgado et al. 2010). C'est cette fonction endocrine qui les rend si intéressantes pour les thérapies cellulaires.



**Figure 1.2 :** Multipotence des cellules stromales/souches mésenchymateuses isolées du tissu adipeux. (© Julie Fradette, LOEX)

En 2006, *The Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy* a proposé un minimum requis de critères pour définir les CSM en général. Premièrement, les CSM doivent adhérer au plastique lorsqu'elles sont maintenues en culture dans des conditions standards de culture cellulaire. Deuxièmement, elles doivent exprimer les marqueurs de surface cellulaire CD105, CD73 et CD90 et elles ne doivent pas exprimer CD45, CD34, CD14 qui sont, entre autres, des marqueurs de cellules hématopoïétiques. Troisièmement, les CSM doivent pouvoir se différencier en ostéoblastes, en adipocytes et en chondroblastes *in vitro* (Dominici et al. 2006).

En 2008, *The International Federation of Adipose Therapeutics and Science (IFATS)*, société multidisciplinaire internationale axée sur la biologie des cellules stromales/souches issues du gras humain, a défini que le terme ASC (*adipose-derived stem/stromal cells*) serait utilisé pour identifier les CSTA (Daher et al. 2008), car de multiples équipes utilisaient des terminologies différentes pour le même type de cellules.

Les CSTA font partie de la famille des cellules souches adultes ou des cellules somatiques. Les premières cellules souches adultes ont été découvertes en 1963 (Becker et al. 1963) et, en fait, elles étaient des cellules de type hématopoïétiques. Par la suite, les CSMO ont été découvertes en 1968 (Friedenstein et al. 1968). En 1985, des cellules souches adultes ont été découvertes dans le cordon ombilical (Emerson et al. 1985) et en 1992, l'équipe de Reynolds et ses collaborateurs (Reynolds et al. 1992) a démontré la pluripotence des cellules souches neuronales. Ce n'est qu'au début des années 2000 qu'ont été découvertes les CSTA par l'équipe de Marc H. Hedrick (Zuk et al. 2002, Zuk et al. 2001).

Les cellules souches adultes sont typiquement isolées à partir de la moelle osseuse ou du sang. Les procédures pour obtenir les CSMO peuvent être douloureuses et elles peuvent nécessiter une opération médicale avec anesthésie. Il faut préciser que dans le cas du prélèvement des CSMO, l'opération s'avère très pénible pour les patients. Toutefois, dans le cas du prélèvement des CSTA par lipoaspiration, les procédures sont moins invasives. De plus, cette population cellulaire a l'avantage d'être facilement accessible en plus d'être abondante. Grâce à la multipotence des CSTA, ces cellules sont grandement intéressantes pour diverses applications en génie tissulaire (Gimble et al. 2007).

### **1.1.3 Types d'échafaudages disponibles pour la reconstruction tissulaire**

Une panoplie de types d'échafaudage ou de biomatériaux furent développés dans le but d'étudier le comportement des cellules dans un contexte tridimensionnel. Ces modèles ont aussi été produits afin de fournir un environnement mimant les conditions des tissus natifs dans lesquelles les cellules prolifèrent et se différencient pour former des tissus spécialisés fonctionnels tels que les os, la peau, le cartilage et bien d'autres. Chaque type

d'échafaudage possède des avantages et des inconvénients d'où la création et le développement d'une aussi grande variété de biomatériaux afin de rencontrer les spécificités de chaque tissu à l'étude. Ils sont catégorisés en trois groupes. Le premier, et probablement le plus couramment utilisé, consiste à cultiver les cellules à l'intérieur de biomatériaux produits à partir de substances naturelles ou synthétiques. Différents biomatériaux ont été développés et divisés en plusieurs groupes dont les gels, les hydrogels et les éponges de collagène. La seconde catégorie pour produire des structures d'échafaudage consiste à utiliser tout simplement la matrice extracellulaire d'un tissu existant, puis de retirer toutes les cellules par un procédé nommé décellularisation. Ainsi, il est possible d'obtenir une matrice entièrement naturelle, avec des structures déjà établies, dans laquelle des cellules voulues peuvent y être ajoutées à nouveau. La dernière catégorie nommée auto-assemblage consiste à stimuler les cellules à sécréter et à organiser leur propre MEC in vitro (Grinnell et al. 1989, Hata et al. 1989, Ishikawa et al. 1997, L'Heureux et al. 1993), sous l'action de l'acide ascorbique, dans le but de produire une matrice entièrement naturelle. À l'aide de cette approche, il est même possible de produire des substituts cutanés en ajoutant des cellules épidermiques (kératinocytes) sur le derme reconstruit par génie tissulaire (Michel et al. 1999). En outre, l'un des avantages les plus intéressants de l'auto-assemblage réside dans l'absence d'utilisation de biomatériaux exogènes, ce qui élimine la majorité des problèmes liés aux réactions immunologiques à la suite d'une greffe de tissu, si les cellules proviennent du patient même.

### **Gels de collagène**

Le gel de collagène peut être conçu à partir de collagène bovin ou même de collagène recombinant humain. Ce type de biomatériau peut servir comme matière de délivrance graduelle de drogues (Wallace et al. 2003). En 1962, Grillo et Gross (Grillo et al. 1962) furent les premiers à proposer l'utilisation du gel en tant qu'implant médical. Ce biomatériau est couramment employé et a l'avantage d'être simple à produire. En dépit de leurs avantages, les gels de collagènes ont des limitations. Ils sont fragiles lors de manipulations chirurgicales en plus de ne supporter que de faibles charges extensibles in vivo (Wallace et al. 2003). Le gel de collagène peut également servir comme tissu de

remplacement pour traiter des ulcères cutanés sur les pieds de patients diabétiques. Au Canada, des entreprises spécialisées dans la vente de produits biologiques comme le Neomem<sup>®</sup>, une membrane à base de collagène bovin de la compagnie Cytagenix, produisent des tissus de remplacement réalisés à base de gel de collagène.

## Hydrogels

Les hydrogels sont constitués d'un réseau de chaînes polymères préalablement solubles dans l'eau dans lesquels des cellules y sont ajoutées ou non. Après un processus de réticulation (*cross-linking*), les substances deviennent insolubles et les cellules s'y retrouvent emprisonnées. Ce type d'échafaudage est particulièrement intéressant pour son potentiel de rétention d'eau très élevé. Ainsi, lors de l'utilisation de tels matériaux comme tissu de recouvrement temporaire pour traiter de sévères brûlures, ces biomatériaux représentent d'excellents pansements pour maintenir un environnement humide (Burd 2007).

Il existe différents types d'hydrogels dont certains sont formés de polymères naturels et d'autres synthétiques. Les polymères naturels sont fabriqués à partir d'éléments de la MEC tels que le collagène, la fibrine ou bien l'acide hyaluronique. Ceux à base de fibrine sont reconnus pour être de bons modèles d'échafaudage pour la différenciation des CSTA (Park et al. 2010). Les polymères synthétiques sont formés à partir de PLGA (*poly(lactic-co-glycolic acid)*), PEG (*poly(ethylene glycol)*) et PVA (*poly(vinyl alcohol)*) (Lee et al. 2001). Les hydrogels représentent des matériaux facilement manipulables dont la fabrication s'avère rapide. Cependant, ces produits fabriqués à partir de substances synthétiques peuvent occasionner des problèmes de toxicité en plus d'induire des réactions immunologiques lors de la greffe de tissus, entre autres, tel que vu chez la souris (Cronin et al. 2004). Les hydrogels conçus à partir de substances naturelles tels que les collagènes bovins peuvent également produire des réactions antigéniques. Lors du choix d'un biomatériau pour la reconstruction d'un tissu, il ne faut pas oublier les coûts liés à l'utilisation de certaines substances dispendieuses comme le collagène purifié ou bien recombinant.

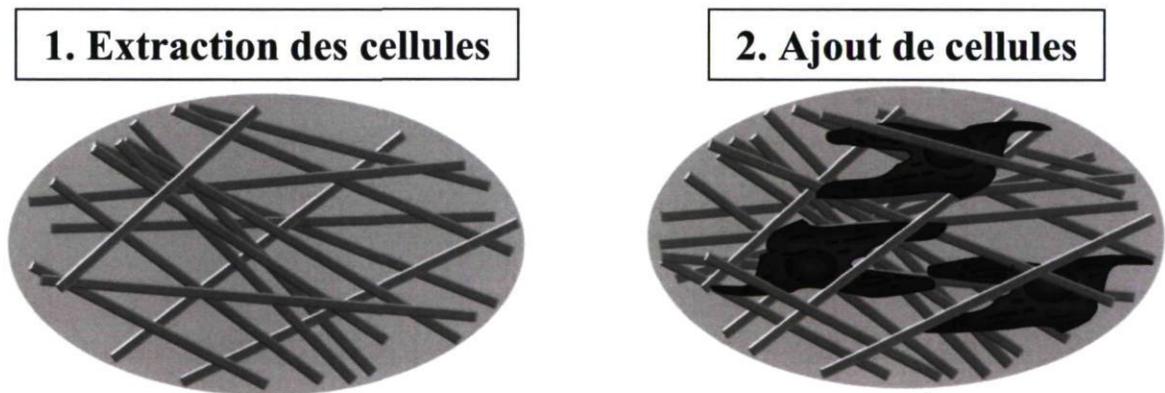
## **Éponge de collagène**

L'éponge de collagène lyophilisé (Chvapil 1977, Yannas et al. 1980) peut servir pour le revêtement temporaire de plaies causées par des brûlures (Berthod et al. 1997, Damour et al. 1994). Elle est également reconnue en tant qu'agent chemoattractant pour les cellules inflammatoires. Plusieurs méthodes physiques ou chimiques pour réticuler le collagène sont réalisables après l'étape de lyophilisation. L'irradiation aux UV et la déshydratation par un traitement thermique constituent les approches physiques (Lew et al. 2007, Weadock et al. 1983) tandis que l'utilisation du glutaraldéhyde (Weadock et al. 1983) et du polyéthylèneglycol (PEG) (Doillon et al. 1994) représente des méthodes chimiques. Le glutaraldéhyde s'avère toutefois moins intéressant dû à son effet cytotoxique bien qu'il soit le plus fréquemment employé. C'est d'ailleurs la principale raison pour laquelle les biomatériaux utilisés cliniquement sont réticulés selon les méthodes physiques plutôt que chimiques. Le collagène peut aussi être réticulé avec le chitosane. D'un point de vue mécanique, l'éponge de collagène a le désavantage d'être très rigide, c'est-à-dire qu'elle ne possède pratiquement pas de propriétés élastiques qui sont nécessaires pour reconstruire des vaisseaux sanguins ou des équivalents vésicaux, par exemple (Magnan et al. 2006).

## **Décellularisation**

La décellularisation est un procédé qui permet d'obtenir une matrice mature déjà assemblée, naturelle et dépourvue de cellules. Par la suite, la matrice décellularisée est utilisée pour y ensemercer divers types cellulaires et reconstruire différents tissus par génie tissulaire (Figure 1.3). La matrice décellularisée est obtenue à la suite d'une série de rinçages qui éliminent les cellules. Cependant, cette étape engendre des risques de réactions immunologiques lors de greffe puisqu'il peut y avoir des résidus toxiques qui restent emprisonnés dans la matrice provenant des produits de rinçage. L'un des avantages de cette technique s'inscrit dans l'utilisation d'une matrice mature bien définie et assemblée. Comme modèle de matrice décellularisée, le placenta représente un tissu abondant et très vascularisé. Il a été montré que ce dernier peut servir de modèle pour la reconstruction d'un tissu adipeux (Flynn et al. 2006). La décellularisation de l'os trabéculaire est un autre

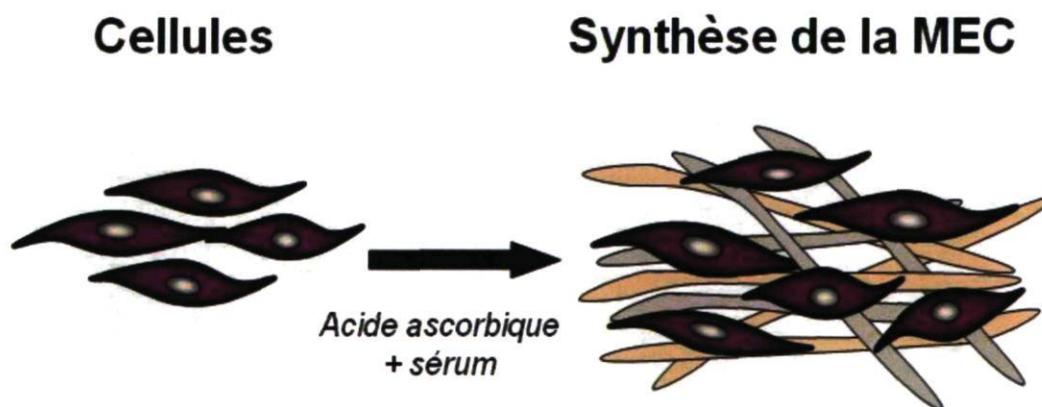
exemple concret de biomatériau utilisé en génie tissulaire pour la reconstruction de tissus osseux et ce à cause de sa composition et de ses propriétés mécaniques. Ce type de matrice est employé, entre autres, pour accroître la différenciation des cellules souches mésenchymateuses humaines en cellules osseuses (hMSC) (Grayson et al. 2008). Le SIS (*small intestine submucosa*) représente un troisième modèle de tissu décellularisé utilisable en génie tissulaire comme tissu de remplacement (Brown-Etris et al. 2002). Cette matrice préalablement stérilisée, dans laquelle des cellules peuvent y croître (Badylak et al. 1998), est obtenue à la suite d'une série d'étapes de rinçage. La capacité du biomatériau à soutenir la guérison et la réparation tissulaire demeure présente à la suite des rinçages répétitifs (Voytik-Harbin et al. 1997). Une panoplie d'études a été publiée concernant l'utilisation de cette matrice décellularisée et montre qu'il est même possible de reconstruire un substitut vésical (Kropp et al. 1996), de même qu'un équivalent osseux (Suckow et al. 1999) à partir de SIS.



**Figure 1.3** : Principe de la décellularisation [modifiée de (Green et al. 2007)].

## Méthode d'auto-assemblage en génie tissulaire

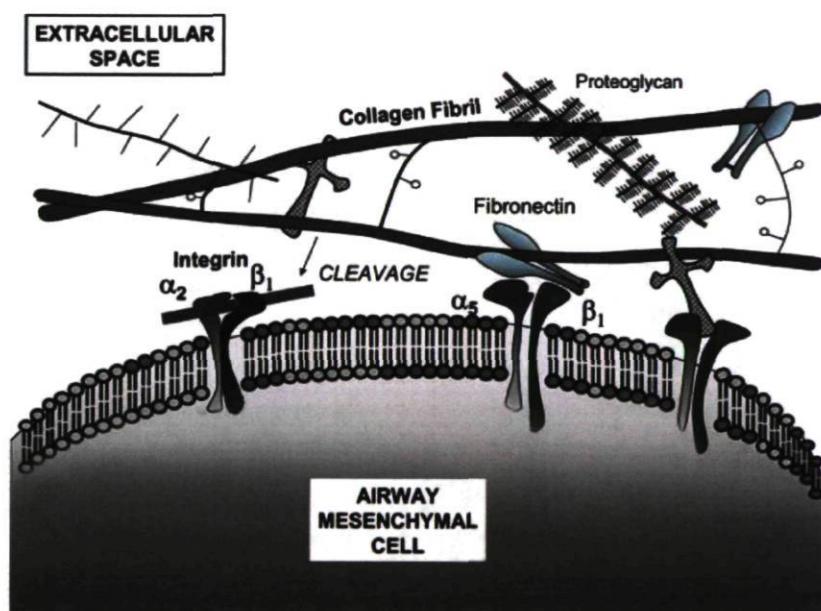
La méthode d'auto-assemblage exploite le potentiel des cellules mésenchymateuses à sécréter, à assembler et à organiser leur propre matrice extracellulaire afin de former un feuillet ou un tissu manipulable, sans l'utilisation de biomatériaux exogènes (Figure 1.4) (Grinnell et al. 1989, Hata et al. 1989, Ishikawa et al. 1997, L'Heureux et al. 1998). La formation de la matrice nécessite l'utilisation d'un milieu de culture contenant de l'acide ascorbique (cofacteur) et du sérum pour l'apport en facteurs de croissance. Bien que cette méthode nécessite plusieurs semaines de culture pour l'obtention d'un équivalent tissulaire, les risques de réactions immunologiques sont grandement réduits dans des circonstances où le tissu est greffé. La présence de l'acide ascorbique dans le milieu de culture est la base du principe de l'auto-assemblage puisqu'il est un cofacteur de la prolyl-4-hydroxylase (P4H). L'acide ascorbique, en transférant ses électrons aux enzymes (oxydation), facilite la conversion de certains acides aminés du procollagène lors du processus de maturation du collagène (Gould et al. 1957). L'action de la P4H et de son cofacteur (acide ascorbique), qui est impliqué dans la biosynthèse des fibres de collagène et qui constitue l'élément structurel majeur de la MEC, est expliquée plus en détail à la section suivante (1.2.1).



**Figure 1.4 :** Principe de l'auto-assemblage en génie tissulaire.

## 1.2 Éléments du tissu conjonctif

Le tissu conjonctif est composé d'une matrice extracellulaire (MEC) abondante qui entoure les cellules. Cette MEC est constituée de plusieurs éléments, dont les fibres de collagènes, les glycoprotéines, les protéoglycannes (PG), les glycosaminoglycannes (GAG), le système élastique, qui comprend notamment l'élastine et la fibrilline. Également, des enzymes comme les métalloprotéinases se retrouvent dans la MEC et sont responsables du remodelage de la matrice. L'interaction entre la MEC et les cellules s'effectue par le biais des intégrines. La figure 1.5 illustre bien les interactions entre les différentes composantes de la MEC de même que l'interaction des cellules avec la MEC.



**Figure 1.5 :** Interaction entre les différents éléments de la MEC et avec la surface des cellules présentes dans le tissu conjonctif [modifiée de (Fernandes et al. 2006)].

### 1.2.1 Collagènes : Biosynthèse et structure

La fonction principale du collagène est de maintenir l'intégrité et la stabilité du tissu. Il soutient les cellules dans le tissu. Jusqu'à ce jour, 30 types de collagène ont été définis et regroupés dans deux grandes familles, soit les fibrillaires et les non fibrillaires

(membranaires). Les collagènes fibrillaires sont des collagènes de type I, II, III, V et X (Ricard-Blum et al. 2005). Ceux de type I, II et III sont en partie responsables de l'organisation structurale de la MEC. Le collagène de type I est majoritairement présent dans tous les types de tissu conjonctif à l'exception du cartilage où l'on y retrouve principalement du collagène de type II. Les collagènes fibrillaires possèdent une structure particulière qui les distingue des autres types de collagènes non fibrillaires. Le collagène est d'abord assemblé en hélice par l'association de trois chaînes alpha polypeptidiques. Les acides aminés tels que Glycine-X-Y sont assemblés selon une répétition particulière. La plupart du temps, X et Y sont remplacés par la proline et l'hydroxyproline respectivement. De plus, les chaînes polypeptidiques sont composées d'environ 33 % de glycine et de 10 à 13 % d'hydroxyproline (Stenzel et al. 1974). Le tableau 1.1 présente les principaux collagènes de la famille fibrillaire, ainsi que leur localisation dans les différents tissus conjonctifs. Pour produire une fibre de collagène, il faut une association entre plusieurs fibrilles qui est le résultat de l'enchaînement de plusieurs protéines de tropocollagène tel qu'illustré à la figure 1.6.

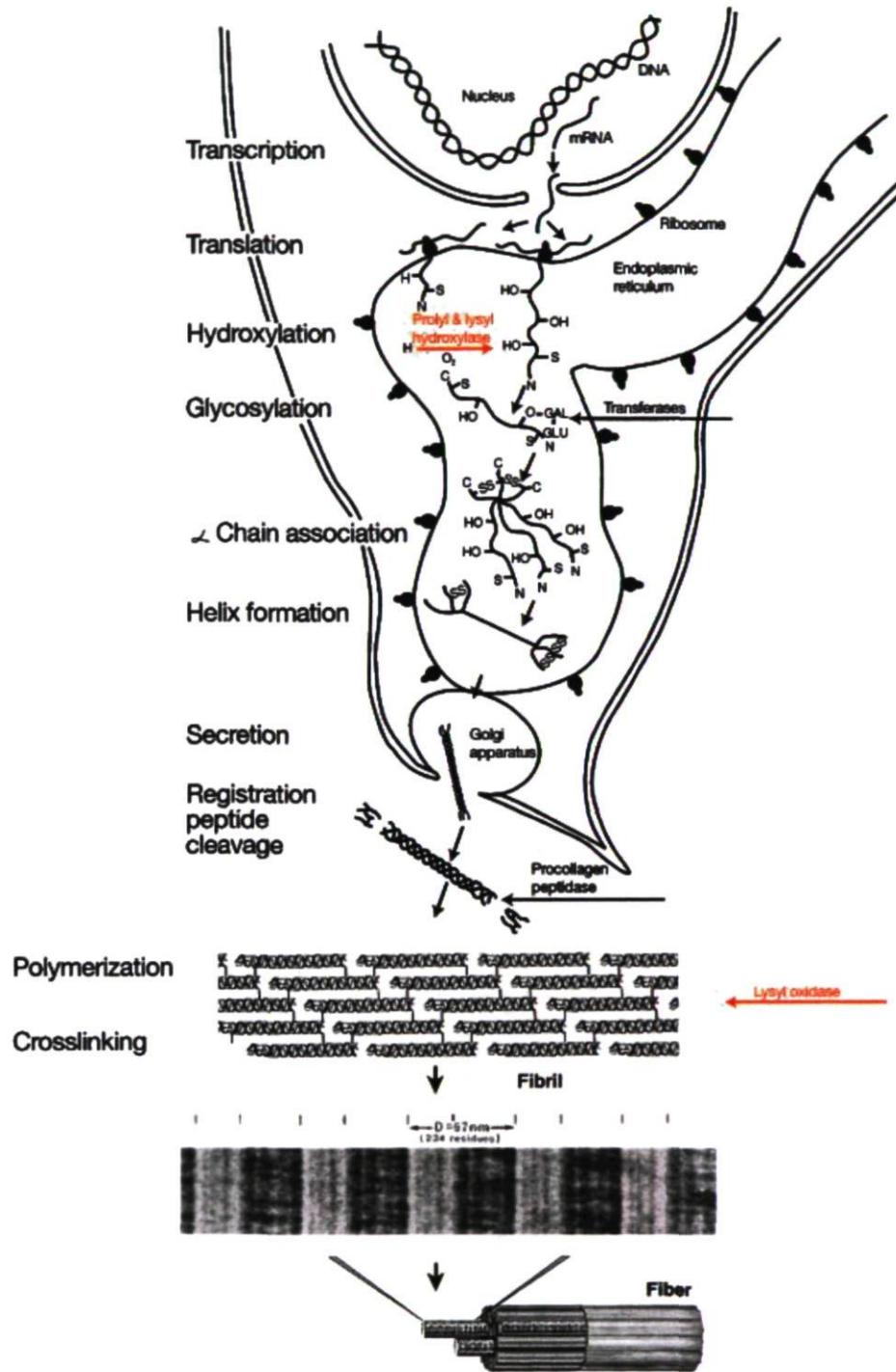
Certains collagènes de types non fibrillaires sont plutôt responsables de la liaison des collagènes structuraux entre eux. Il existe également des collagènes typiques des membranes basales tel que le collagène de type IV.

**Tableau 1.1 :** Composition et localisation des différents types de collagènes présents dans les tissus conjonctifs [modifié de (Abraham et al. 2008)].

Type	Constituant	Composition	Localisation
I	$\alpha 1$	$(\alpha 1)_2, \alpha 2$	Derme, os, cornée, ligament, tendon
	$\alpha 2$	$(\alpha 1)_3$	
II	$\alpha 1$	$(\alpha 1)_3$	Cartilage
III	$\alpha 1$	$(\alpha 1)_3$	Derme, vaisseaux sanguins
V	$\alpha 1$	$(\alpha 1)_2, \alpha 2$	Interaction avec le collagène de type I
	$\alpha 2$	$\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3$	
	$\alpha 3$	$(\alpha 1)_3$	
	$\alpha 4$	$\alpha 1, \alpha 4$	

Les étapes de la synthèse et de l'assemblage des fibres de collagène sont illustrées à la figure 1.6. Une brève explication de la synthèse et de l'assemblage du collagène de type I est présentée en exemple afin de mieux comprendre les nombreux processus qui mènent à la formation des fibres de collagène dans le tissu conjonctif.

Dans un premier temps, les gènes codants pour les différentes chaînes alpha polypeptidiques tels que COL1 $\alpha$ 1 et COL1 $\alpha$ 2 sont transcrits en ARN messagers puis traduits dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE) à l'aide des ribosomes se trouvant dans la membrane du RE. Par la suite, différentes modifications vont se produire via le passage des chaînes alpha dans le RE (Trackman 2005). D'abord, une étape d'hydroxylation par la prolyl-4-hydroxylase (P4H) (Kivirikko et al. 1998) et la lysylhydroxylase (LH) avec l'aide de l'acide ascorbique (vitamine C), agissant comme cofacteur, est effectuée pour transformer les prolines et les lysines en hydroxyprolines (HYP) et en hydroxylysines (HYL). Ensuite, les polypeptides vont transiter dans l'appareil de Golgi et subir une étape de glycosylation qui permet d'ajouter des sucres (glucose et galactose) sur les HYL via la glycosyl-transférase et la galactosyl-transférase respectivement. Ceci sert à réguler le diamètre des fibres par encombrement stérique. Une fois ces modifications apportées aux chaînes polypeptidiques alpha, trois chaînes vont se lier afin de former une hélice avec des extrémités C et N-terminales particulières et produire des précurseurs de collagène nommés procollagène I. Par la suite, le procollagène I est dirigé à l'extérieur de la cellule où ses extrémités sont clivées par les enzymes procollagène C protéase connues sous le terme BMP-1 (*bone morphogenetic protein-1*) et la procollagène N protéase. Cette étape de clivage modifie le procollagène en tropocollagène. La polymérisation en fibrille de collagène se produit grâce à la lysyl oxydase (LOX) qui crée des liaisons covalentes entre les résidus de lysines et d'hydroxylysines situés aux extrémités du tropocollagène. Par la suite, plusieurs fibrilles vont s'unir pour former une fibre de collagène qui confère à la matrice une certaine rigidité (Kolacna et al. 2007).



**Figure 1.6 :** Étapes de la synthèse, de la sécrétion et de l'assemblage des fibres de collagène [modifiée de (Culav et al. 1999, Stadelmann et al. 1998)].

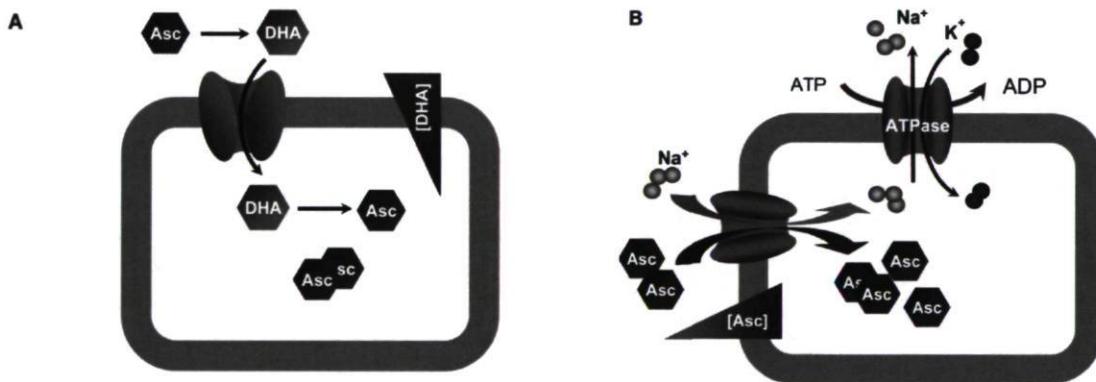
La **prolyl-4-hydroxylase** est l'enzyme clef de l'assemblage précoce du collagène. Elle catalyse l'hydroxylation des résidus proline en HYP pour former des groupements OH qui sont responsables de la stabilité des fibres de collagène. Une modification de l'hydroxylation engendre la rétention des chaînes alpha dans le RE (Walmsley et al. 1999).

La **lysyl oxydase** est un enzyme extracellulaire qui catalyse la formation d'aldéhydes sur les résidus de lysine du collagène. Les aldéhydes sont très réactifs et créent des réactions chimiques instantanées avec d'autres résidus d'aldéhydes. Le résultat de la modification des résidus de lysine produit la réticulation (*cross-linking*) des collagènes et permet de stabiliser et de conserver l'intégrité des fibres de collagènes. Il existe plus de cinq formes de lysyl oxydase dont la LOX représentant la forme la plus abondante et quatre autres protéines *LOX-Like* (LOXL1-4) (Kim et al. 1995).

La **périodicité représentative** des fibres de collagène observée en microscopie électronique à transmission (MET) est déterminée par l'assemblage spécifique des tropocollagènes. Tel qu'illustré à la figure 1.6, les tropocollagènes s'associent latéralement et transversalement via des liens covalents. L'extrémité C-terminale d'une molécule de tropocollagène se lie à l'extrémité N-terminale de la molécule de tropocollagène juste en dessous, en se décalant d'environ 1/4 de sa longueur. Ceci crée un petit espace qui sépare la tête d'un tropocollagène par rapport à la queue d'un autre tropocollagène. Ainsi, la périodicité est définie par la mesure entre l'espace sombre et l'espace clair. Normalement, la périodicité d'une fibre de collagène de type I est d'environ 67 nm.

L'**acide ascorbique** (AA) ou vitamine C est une molécule qui n'est pas produite par le corps humain. Les humains et les primates sont incapables de sécréter cette vitamine à cause d'une mutation du gène codant pour l'enzyme L-glucono-gamma-lactone oxydase requis pour sa biosynthèse (Dayan 2008). Ainsi, le seul moyen de fournir le corps en vitamine C est par l'absorption de nutriments provenant des légumes et des agrumes. Une carence de cette vitamine engendre des modifications de la MEC et peut mener à la maladie du scorbut qui peut être fatal à long terme. Dans l'organisme, on retrouve deux formes de vitamine C, soit l'AA sous forme réduite et la déhydroascorbate (DHA) sous forme oxydée.

La vitamine C est une céto-lactone de six carbones possédant une structure semblable au glucose et autres hexoses. À la suite d'une oxydation impliquant la perte d'électrons, l'AA se transforme en DHA. La vitamine C est internalisée par les récepteurs spécifiques GLUT (*glucose transporter isoform*) et SVCT (*sodium-dependent vitamin C transporter*) présents sur la membrane cellulaire (Figure 1.7). La forme oxydée pénètre dans la cellule via des récepteurs hexoses GLUT 1, 3 et 4 (Rumsey et al. 2000, Rumsey et al. 1999). Une fois internalisée, elle est retransformée en vitamine C à l'intérieur de la cellule. La forme réduite de la vitamine C est quant à elle internalisée par un mécanisme actif qui requiert les récepteurs SVCT1 et 2. Ces récepteurs sont des glycoprotéines membranaires faisant partie de la famille des *Solute Carrier Family*. Ce sont en fait des *sodium dependent transporters* responsables du transfert et de la distribution des vitamines dans le corps humain. L'AA est intégré par un gradient électrochimique (Savini et al. 2008). Les récepteurs SVCT ont plus d'affinités avec l'AA que les récepteurs GLUT en ont pour la DHA.



**Figure 1.7 :** Mécanisme d'intégration de la vitamine C dans la cellule. Internalisation via les récepteurs GLUT (A) et les récepteurs SVCT (B) [tirée de (Li et al. 2007)].

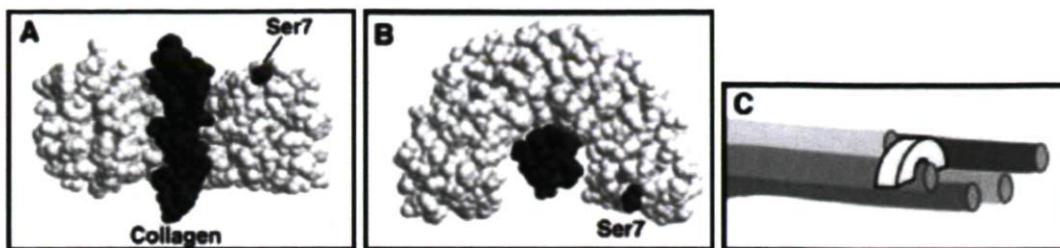
### 1.2.2 Glycosaminoglycannes

Les glycosaminoglycannes (GAG) sont formés de polymères de disaccharides portant des carboxylates ou des sulfates. En s'associant, ils forment des réseaux responsables de la viscoélasticité. Les GAG sont unis aux différents PG. Les principaux GAG présents dans la MEC sont l'acide hyaluronique, le sulfate d'héparine et le sulfate de chondroïtine.

### 1.2.3 Protéoglycannes

Les protéoglycannes (PG) sont des protéines associées à un ou plusieurs GAG. Grâce à la grande diversité structurale des PG combinés avec différents GAG, ceci permet de produire différents sites protéiques pouvant interagir de manière spécifique avec d'autres composants de la MEC ou bien avec des récepteurs cellulaires (Hardingham et al. 1992). Les PG sont divisés en deux groupes. Il y a ceux de type *aggregating* tels que l'aggrécan, le versican et il y a ceux de type *non-aggregating* tels que la décorine, le biglycane et le perlécan.

La **décorine** est associée avec un seul GAG et elle est considérée comme le plus petit PG. La forme de cette protéine ressemble à un demi-cercle dans lequel une fibre de collagène peut s'insérer (Figure 1.8). L'une des fonctions de la décorine est de se lier aux fibres de collagène de type I et III et d'influencer la régulation de la fibrillogenèse (Reed et al. 2002). Elle serait également impliquée dans l'activation ou l'inhibition du TGF- $\beta$ 1 (*Transforming growth factor beta*) qui est impliqué dans le contrôle de la prolifération. Une étude suggère qu'une modification de la décorine pourrait impliquer un dérèglement du TGF- $\beta$  et occasionner le syndrome de Marfan reconnu comme une maladie génétique du tissu conjonctif (Pulkkinen et al. 1990). Le syndrome de Marfan peut résulter d'une fragmentation des fibres élastiques ou d'une mutation du gène FBN1 (fibrilline-1), l'une des composantes intervenant avec les intégrines dans l'adhésion cellulaire à la MEC. Le gène codant pour la décorine humaine est désigné par DCN.



**Figure 1.8 :** Modélisation de l'interaction entre une molécule de décorine et le collagène. (A et B) Vues tridimensionnelles d'une molécule de décorine liée à une fibre de collagène. (C) Attachement de la décorine sur la partie C-terminale d'un tropocollagène [modifiée de (Reed et al. 2002)].

### 1.2.4 Glycoprotéines

Les glycoprotéines sont caractérisées par des structures répétitives. Elles peuvent s'unir entre elles ou bien s'associer avec d'autres protéines présentes dans la MEC. Par exemple, les glycoprotéines telles que la fibronectine s'unissent normalement avec des intégrines. Deux catégories de glycoprotéines sont définies selon leur rôle. Les protéines telles que la fibronectine et la laminine constituent le premier ensemble dont la fonction principale est de soutenir et maintenir l'intégrité de la MEC. La fibronectine (FN) existe sous deux formes. La forme soluble se retrouve dans le plasma sanguin et la forme insoluble est présente dans la matrice extracellulaire du tissu conjonctif lâche, notamment celui du tissu adipeux (Kubo et al. 2000). La fibronectine est une protéine dimérique en forme de V dont les extrémités C-terminales sont reliées par des ponts disulfures. Chaque chaîne est composée d'environ 2500 acides aminés. La FN est une protéine de structure qui contribue à l'organisation de la matrice extracellulaire et à l'adhésion cellulaire via les intégrines. Elle peut également se lier aux autres éléments de la matrice telles que les fibrilles de collagène (I, II, III et V) et même à d'autres protéines de fibronectine pour former un réseau fibrillaire (Wierzbicka-Patynowski et al. 2003). Le second groupe de glycoprotéines est défini comme étant de type matricellulaire. Dans ce groupe on retrouve SPARC, la ténascine C et X, CCN1, la thrombospondine 1-2 et l'ostéopontine. Les fonctions de ces glycoprotéines sont plus élargies et impliquent des processus cellulaires tels que la migration, la différenciation et la prolifération cellulaire. Ce sont des glycoprotéines au même titre que la laminine et la

fibronectine, mais qui ne contribuent pas directement à la structure et au maintien des propriétés physiques de la matrice extracellulaire. Ces protéines sont généralement surexprimées durant le développement embryonnaire, puis réduite et même absente durant la vie normale sauf lors d'une réponse à la suite d'une blessure. Ces protéines matricellulaires réapparaîtraient lors d'une réponse immunitaire et lors de la croissance d'une tumeur cancéreuse (Bornstein et al. 2004).

### 1.2.5 Intégrines

Les **intégrines** sont responsables de la connexion entre la MEC et les cellules. Elles agissent comme récepteurs d'adhésion cellulaire. Ces protéines transmembranaires sont constituées d'une sous-unité alpha ( $\alpha$ ) et d'une sous-unité bêta ( $\beta$ ) et constituent une famille d'intégrines de 24 hétérodimères  $\alpha\beta$  (Barczyk et al. 2010). La région extra-cellulaire d'une intégrine interagit avec l'environnement extérieur et l'autre extrémité interagit avec des composantes intracellulaires. Les intégrines se lient aux molécules de la matrice extracellulaire comme la fibronectine et le collagène. Également, ces protéines transmembranaires servent comme transducteurs mécano-chimiques. Les signaux sont propagés via différentes voies de signalisation dont celle incluant l'activation des Rho GTPase (Rac, Cdc42 et Rho). Ces GTPases jouent des rôles majeurs en régulant le comportement cellulaire en réponse aux changements de l'environnement extracellulaire (DeMali et al. 2003). Par la suite, une série de réactions en chaîne vont mener à la modification du cytosquelette de la cellule ou à une modification de la production de protéines structurales comme le collagène.

### 1.2.6 Autres composantes

Les **métalloprotéinases** (MMP) sont des enzymes impliqués dans le remodelage de la MEC, la dégradation de molécules de surface cellulaire, mais aussi dans des processus de régulation du comportement cellulaire tels que la prolifération, la migration et la

différenciation (Streuli 1999). Les MMP sont également connues pour être des promoteurs dans la modulation du cancer (Sternlicht et al. 2000). Les MMP sont des endopeptidases qui font partie de la famille des metzincin à cause de leur dépendance aux ions métalliques responsables d'activer une réaction catalytique (Stocker et al. 1995). Ces protéines de dégradation, lorsque sécrétées par la cellule, sont d'abord présentées sous forme inactive (zymogène), puis elles sont activées par d'autres MMP actives ou bien par des sérines protéinases. L'activité protéolytique des MMP se divise en trois étapes. La première se veut l'expression du gène et de la sécrétion en protéine. La deuxième étape, est l'activation de l'enzyme et la troisième étape consiste en l'inhibition de l'activité enzymatique via des protéines telles que les TIMPs (*Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase*) (Bauer et al. 1975). Il existe une variété de MMP regroupées selon leurs activités enzymatiques : les collagénases (MMP 1, 8 et 13), les gélatinases (MMP 2 et 9), les stromélysines (MMP 3, 10 et 11) et les élastases. D'ailleurs, MMP-1 est reconnue pour être impliquée dans la dégradation des collagènes de type I, II et III.

### **1.3 Culture dynamique : méthode complémentaire à la reconstruction tissulaire**

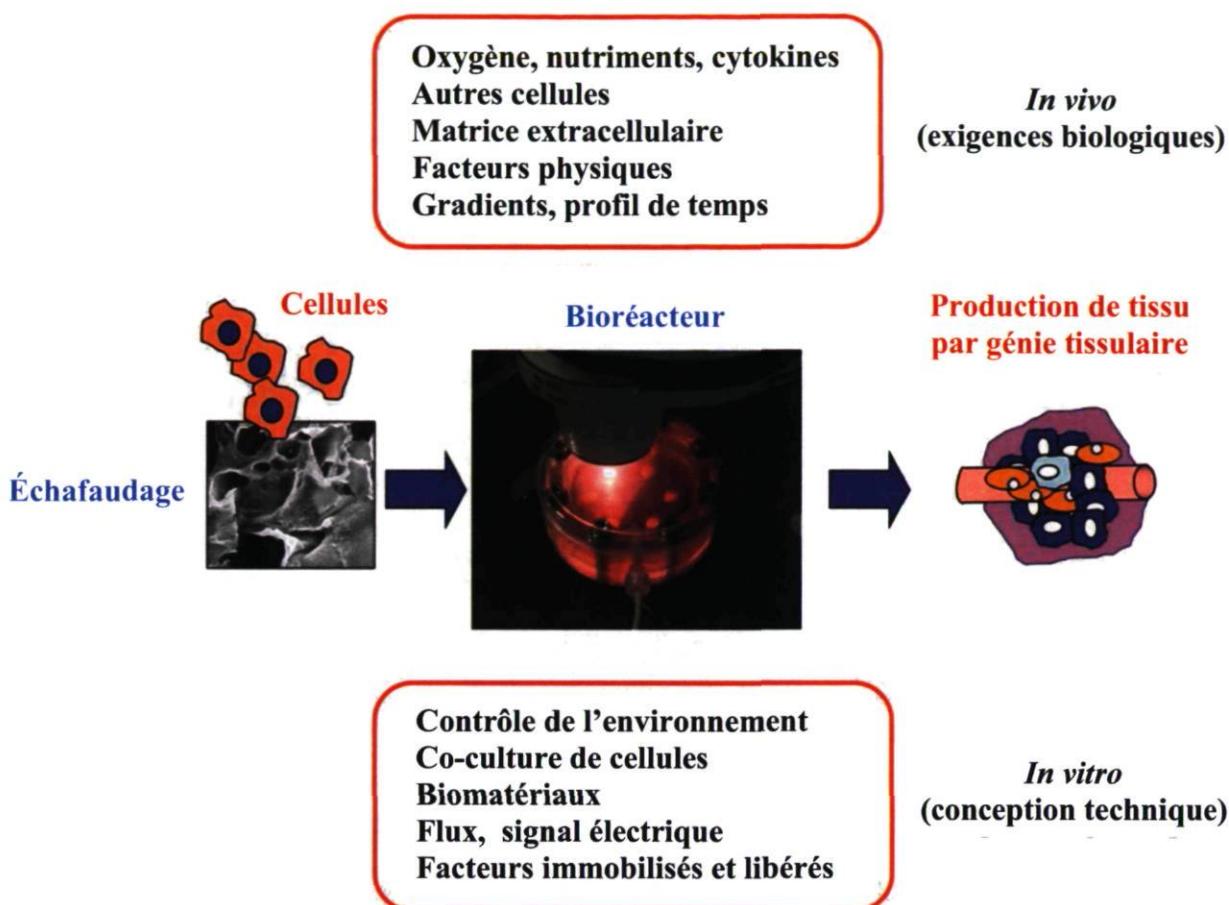
En génie tissulaire, plusieurs méthodes de culture dynamique ont été développées afin de mimer le mieux possible les conditions environnantes des tissus natifs lors de la production d'équivalents tissulaires. En fait, le concept de la culture dynamique se veut une approche originale pour laquelle le milieu de culture est propagé sur les échantillons de manière à produire un flux. Ce flux peut être continu, pulsé ou induire une pression (Brown 2000). Ainsi, ce concept dans lequel le milieu se déplace constamment de façon spécifique permet d'engendrer soit une modification de la prolifération (Mizuno et al. 2002b, Wang et al. 2003), soit des changements au niveau de la différenciation cellulaire (Bancroft et al. 2002) et/ou un remodelage de la MEC (Connelly et al. 2010, Elhadj et al. 2002, Gemmiti et al. 2009, Wang et al. 2003, Zhao et al. 2009). Également, les méthodes de culture employées pour imiter les conditions *in vivo* et pour améliorer la reconstruction tissulaire ont nécessité l'emploi de bioréacteurs. La culture dynamique représente donc un moyen habile pour

tenter de reconstruire des tissus comme les os et les vaisseaux sanguins structurellement et physiologiquement comparables aux tissus natifs.

### **1.3.1 Utilité et complexité des bioréacteurs**

Dans un premier temps, il faut comprendre l'importance de l'utilisation des bioréacteurs. En effet, grâce à ces appareils, il est possible de contrôler plusieurs paramètres simultanément. Par exemple, le pH, la température, de même que la concentration des différents éléments ajoutés dans le milieu de culture représentent les quelques exemples de paramètres de culture contrôlables. Des facteurs de croissance peuvent également être ajoutés via les bioréacteurs à différentes périodes.

Dans un deuxième temps, l'utilisation des bioréacteurs a permis de développer des méthodes de culture pour lesquelles il est possible d'instaurer des conditions de culture expérimentales spécifiques au tissu qui est à l'étude. Ainsi, en appliquant différentes forces mécaniques, brièvement décrites et résumées par Brown (Brown 2000), il est intéressant de constater les effets induits sur les cellules et leur environnement composé d'un biomatériau ou d'une matrice extracellulaire produite par les cellules. Différents stress mécaniques sont produits pour induire une réponse cellulaire. Ces stress peuvent être de type compression, à étirement longitudinal ou à étirement bi-axial. Il y a aussi ceux dans lesquels un fluide permet de déformer les biomatériaux composés de cellules ou ceux dans lesquels le milieu de culture circule de façon fluide à intervalle constant pour être pulsé comme dans les vaisseaux sanguins. La figure 1.9 illustre bien le concept des bioréacteurs et de la culture dynamique.



**Figure 1.9 :** Concept de la culture dynamique à l'aide de bioréacteurs [modifiée de (Grayson et al. 2009)].

Plusieurs équipes de recherche ont exploité le concept de la culture dynamique dans différents types de bioréacteurs et à partir de différents types cellulaires. Ils ont utilisé les cellules souches mésenchymateuses provenant de la moelle osseuse (CSMO) (Bancroft et al. 2002, Connelly et al. 2010, Datta et al. 2006, Grayson et al. 2008, Knippenberg et al. 2005, Kreke et al. 2008) et les CSTA (Frye et al. 2006, Knippenberg et al. 2005) pour tenter de reconstruire des tissus fonctionnels de type osseux, cartilagineux et adipeux. Ces modèles de culture dynamique se sont avérés prometteurs puisqu'ils ont permis d'accroître la différenciation des cellules et d'augmenter la synthèse de la matrice extracellulaire (Bancroft et al. 2002, Connelly et al. 2010, Datta et al. 2006, Frye et al. 2006, Grayson et al. 2008, Knippenberg et al. 2005, Kreke et al. 2008).

### 1.3.2 Concept du mouvement fluidique

À l'origine, les modèles de culture dynamique avec un mouvement fluidique ont surtout été utilisés pour l'étude du comportement des cellules endothéliales (CE) présentes dans les vaisseaux sanguins. Récemment, certaines études ont été réalisées en exploitant le potentiel des CSTA à se différencier en CE dans un contexte de culture dynamique (Fischer et al. 2009, Stolberg et al. 2009). Toutes ces recherches ont non seulement montré qu'il était possible d'augmenter la prolifération, la différenciation et la synthèse de la matrice extracellulaire, mais aussi que ces modèles pourraient servir pour faire des études physiologiques *in vitro*.

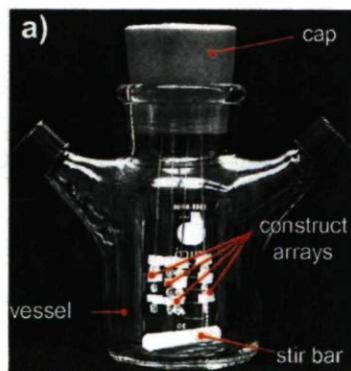
Dans la littérature, on retrouve plusieurs études qui ont été réalisées pour caractériser différents modèles de culture dynamique. Il y en a qui produisent un mouvement orbital ou de balancier (Berson et al. 2008, Sucosky et al. 2004, Zhou et al. 2010). Les modèles imitant un fluide dynamique orbital ont montré qu'il pouvait engendrer une activation de la prolifération, une augmentation de la différenciation des cellules et, dans certains cas, une augmentation de la synthèse des éléments de la MEC (Dardik et al. 2005, Elhadj et al. 2002, Yamamoto et al. 2003).

D'autres modèles de culture dynamique ont été développés, cette fois-ci, dans le but de mimer les forces mécaniques présentes *in vivo* dans les tissus. Cette force est définie comme le fluide interstitiel (FI) (Chary et al. 1989). Ce fluide transfère les différents éléments moléculaires présents dans la matrice extracellulaire du tissu conjonctif par exemple (Rutkowski et al. 2007). Évidemment, les vaisseaux sanguins sont responsables d'une bonne partie du transport des nutriments et de l'oxygène vers les cellules, mais le fluide interstitiel représente lui aussi une autre source de transport. Les forces mécaniques présentes dans les tissus à cause du FI permettent de maintenir un gradient moléculaire et affectent le comportement des cellules. Ces changements physiques jouent un rôle sur l'environnement cellulaire et ils sont cruciaux pour le développement du tissu puisqu'ils remodelent la matrice extracellulaire (Rutkowski et al. 2007). Ce type de mouvement fluidique semble plus représentatif pour la reconstruction de tissu par génie tissulaire, en particulier pour la reconstruction de tissu conjonctif à l'aide de biomatériaux.

Il ne faut surtout pas oublier que l'épaisseur des biomatériaux peut s'avérer un obstacle important en réduisant la diffusion des nutriments et de l'oxygène. En l'absence d'une vascularisation, les tissus reconstruits par génie tissulaire d'épaisseur supérieure à 150-200  $\mu\text{m}$  constituent des modèles où l'on retrouve de l'hypoxie et nécessitent donc l'implantation d'un système de perfusion qui alimente les cellules en oxygène (Folkman et al. 1973, Grayson et al. 2009). Bref, les modèles de culture dynamique via l'utilisation de bioréacteurs permettent d'augmenter la diffusion des nutriments et de l'oxygène qui sont essentiels aux cellules lors de la prolifération, de la différenciation et même de l'activation de la synthèse des éléments de la MEC (Buckley et al. 2010).

### 1.3.3 Culture dynamique à partir d'un *Spinner Flask*

En génie tissulaire, le bioréacteur de type *Spinner flask* est très utilisé. Une illustration de ce type de bioréacteur est présentée à la figure 1.10. Cet appareil a la particularité d'avoir des échantillons fixés de manière permanente durant toute la période de culture. Le milieu de culture circulant produit un vortex, c'est-à-dire qu'il forme un mouvement fluide constant qui permet d'augmenter la diffusion des nutriments et améliore l'apport en oxygène. Ce type de bioréacteur permet de cultiver des tissus formés à partir de biomatériaux, par exemple une éponge, dans un contexte tridimensionnel.



**Figure 1.10** : *Spinner Flask* [tirée de (Sucosky et al. 2004)].

Meinel et ses collaborateurs (Meinel et al. 2004) ont étudié l'influence d'un tel appareil sur le comportement des cellules souches mésenchymateuses provenant de la moelle osseuse combinées à différents biomatériaux à base de collagène. Ils ont démontré que le *spinner flask* permettait d'augmenter la sécrétion du calcium, un élément important de la différenciation des CSMO vers le type ostéoblastique. Fischbach et ses collaborateurs (Fischbach et al. 2004) ont comparé deux types de culture dynamique. L'une d'elles consistait à cultiver des préadipocytes ajoutés dans un polymère (PLGA) et de les placer sur une plate-forme agitatrice à mouvement orbital. L'autre méthode consistait à cultiver les échantillons dans un *spinner flask*. Ainsi, à partir des résultats qu'ils ont obtenus, ils ont montré que la culture dynamique (*spinner flask* ou plaque agitatrice) représentait un moyen efficace pour augmenter la différenciation cellulaire des préadipocytes.

#### **1.3.4 Autres modèles de tissus conjonctifs reconstruits dans un contexte de culture dynamique**

Certaines équipes de recherche en génie tissulaire se sont intéressées à la formation d'un tissu conjonctif à partir de différents biomatériaux et ce, dans des conditions de culture dynamique diverses (perfusion, orbital). En 2003, Wang et ses collaborateurs (Wang et al. 2003) ont montré qu'en cultivant des fibroblastes dans un polymère, à l'intérieur d'un *spinner flask*, il était possible d'augmenter la prolifération cellulaire, de même que le dépôt des GAG et des collagènes. Une autre étude réalisée en 2010 par Wang et ses collaborateurs (Wang et al. 2010) a montré qu'en utilisant différents types de matériaux synthétiques, il était possible de contrôler la formation du tissu tout en affectant la prolifération et le dépôt des collagènes. Pour cette étude, ils se sont intéressés à la formation du tissu conjonctif, avec différents polymères, à partir de cellules stromales provenant du tissu adipeux. Une autre équipe, celle de Zhao et ses collaborateurs (Zhao et al. 2009), a constaté que la diffusion du milieu par un système de perfusion affectait le développement du tissu reconstruit à partir de cellules souches mésenchymateuses humaines (CSM) cultivées dans un polymère. De façon générale, les résultats présentés dans ces articles suggèrent que la culture dynamique augmente la production de la matrice et favorise la prolifération cellulaire.

Il est à noter que pour tous les modèles mentionnés dans cette section, les travaux de recherche ont été réalisés en utilisant des biomatériaux et qu'aucune étude combinant la méthode d'auto-assemblage et la culture dynamique n'a été tentée jusqu'à présent dans un contexte tridimensionnel. De plus, aucune étude comparative entre le comportement des FD et des CSTA pour reconstruire des tissus conjonctifs n'a été réalisée jusqu'à ce jour d'où l'intérêt de mes travaux de recherche.

## 1.4 Hypothèse et objectifs

Nous avons vu qu'il existe une forte demande pour la production de supports matriciels et de tissus pour combler les besoins croissants en chirurgie de reconstruction. C'est pour cette raison, d'ailleurs, que différents types d'échafaudage servant à l'élaboration de tissus de remplacement ont été développés. La nature des composantes utilisées pour reconstruire des tissus peut toutefois causer des réactions immunologiques. La méthode d'auto-assemblage permet la reconstruction de tissus dont la matrice naturelle est produite à partir des cellules même du patient. Malgré des périodes de culture relativement longues, cette méthode permet de produire des tissus malléables et riches en éléments de la MEC humaine.

Il existe une panoplie de bioréacteurs servant à augmenter la diffusion des nutriments et de l'oxygène pour ainsi accroître la prolifération et la production de la MEC. Ainsi, une stratégie favorisant l'augmentation de la synthèse des éléments de la matrice via une méthode de culture dynamique, sans l'emploi de biomatériaux exogènes et sans l'utilisation de bioréacteur dispendieux et complexe, serait avantageuse.

Pour ce projet, deux types cellulaires ont été utilisés et comparés pour la production de tissus conjonctifs humains : les fibroblastes dermiques (FD), une source cellulaire classique employée abondamment dans le domaine cutané, de même que les cellules stromales/souches isolées du tissu adipeux (CSTA), une source cellulaire récente utilisée par notre équipe.

L'**objectif général** de mon projet de maîtrise était de vérifier si la méthode d'auto-assemblage en génie tissulaire, développée au LOEX, pouvait être optimisée à l'aide d'une culture dite dynamique. Notre **hypothèse** est que la culture dynamique, qui induit un mouvement continu du milieu de culture, aurait un impact sur la reconstruction des tissus conjonctifs: 1) au niveau cellulaire via une modification de la prolifération, une augmentation de la synthèse de la MEC et/ou un effet post-traductionnel; 2) au niveau physique via une augmentation du dépôt des collagènes et d'autres éléments de la MEC.

Le premier objectif spécifique consistait à produire des tissus conjonctifs par génie tissulaire en condition dynamique et en condition statique usuelle. Une fois fait, l'épaisseur des équivalents tissulaires a été mesurée puis comparée. De plus, nous avons vérifié si la culture dynamique exerçait un effet sur la reconstruction des tissus et si cet effet provenait de la prolifération, la synthèse et/ou l'organisation accrue de certains éléments majeurs de la MEC.

Le deuxième objectif spécifique consistait à vérifier si la culture dynamique permettait de réduire le temps requis pour produire des tissus conjonctifs manipulables. Comme analyses, l'épaisseur des tissus a été évaluée et des tests de résistance mécanique ont été réalisés à partir des tissus reconstruits durant différents temps.

Ces travaux ont permis aussi de faire une étude comparative entre le comportement des FD et des CSTA lors de la reconstruction de tissus conjonctifs. Il est important d'optimiser la production par génie tissulaire de ces tissus étant donné leur grand potentiel en médecine régénératrice. De plus, l'utilisation d'une autre source cellulaire que les FD, c'est-à-dire les CSTA, ouvre la porte à de nouveaux développements en génie tissulaire.

## **Chapitre 2 : Matériels et méthodes**

## 2.1 Provenance des cellules

### 2.1.1 Cellules stromales/souches isolées du tissu adipeux humain (CSTA)

Les CSTA utilisées pour la reconstruction de tissus conjonctifs proviennent d'une banque cellulaire établie par l'équipe de Julie Fradette Ph.D (LOEX). Les cellules proviennent de lipoaspirations (LA) de gras sous-cutané de femmes en santé ayant subi une chirurgie cosmétique. L'indice de masse corporelle (IMC) moyen des patientes est de  $22,6 \pm 1,8$ . Ces valeurs, situées entre 21 et  $25 \text{ kg/m}^2$ , représentent la moyenne établie pour être considéré sans embonpoint. L'âge moyen des patientes est de  $37,0 \pm 4,8$  ans. Les étapes d'extraction des cellules sont décrites plus en détail dans l'article de Vermette et ses collaborateurs (Vermette et al. 2007). Les cellules fraîchement extraites sont cultivées durant un passage (P0) puis conservées dans l'azote liquide jusqu'à leur utilisation.

**Tableau 2.1** : Caractérisation des populations cellulaires de CSTA utilisées.

Population cellulaire	Âge	IMC	Passage utilisé (P)	Types d'analyses *
200705LA33	33	21	3 à 6	H, M, Q
070207LA35	35	23,2	3 à 6	A, H, M, Pr, Q, T
070207LA36	36	25	3 à 6	A, H, M, Pr, Q, T
140605LA44	44	21,5	3	A, H

\* **A**: Dosage de l'ADN, **H**: Histologie, **M**: Test mécanique, **Pr**: Dosage protéique, **Q**: RT-PCR quantitatif  
**T**: Microscopie électronique à transmission, **IMC**: indice de masse corporelle

### 2.1.2 Fibroblastes dermiques humains (FD)

Les fibroblastes dermiques proviennent de biopsies de peau issues de réductions mammaires et sont extraits tel que décrit par Auger et ses collaborateurs (Auger et al. 1995) à l'exception de la population 200705FLP33 qui provient de la banque cellulaire de Julie Fradette Ph.D et qui a été extraite de façon similaire aux CSTA. D'ailleurs, ces cellules

sont issues de la même patiente pour laquelle les 200705LA33 ont été extraites. La moyenne d'âge des FD utilisés est de  $29,6 \pm 10,4$  ans. Les cellules fraîchement extraites sont cultivées durant un passage (P0) puis conservées dans l'azote liquide jusqu'à leur utilisation.

**Tableau 2.2 :** Caractérisation des populations cellulaires FD utilisées.

Population cellulaire	Âge	Passage utilisé (P)	Types d'analyses *
FMUi638X	38	3 à 6	A, H, M, Pr, Q, T
FMhE718X	18	3 à 6	A, H, M, Pr, Q, T
200705FLP33	33	3 à 6	H, M, Q

\* A: Dosage de l'ADN, H: Histologie, M: Test mécanique, Pr: Dosage protéique, Q: RT-PCR quantitatif  
T: Microscopie électronique à transmission

## 2.2 Culture cellulaire

Les cellules sont amplifiées et trypsinées sur quelques passages pour accroître la quantité de cellules disponibles pour reconstruire plusieurs tissus conjonctifs. Les étapes d'amplification cellulaire consistent à ensemercer  $8 \times 10^3$  cellules/cm<sup>2</sup> dans des flacons de 75 cm<sup>2</sup> NUNC. Tout au long de la culture, les cellules sont immergées dans un milieu 1 :1 Dulbecco's modified Eagle's medium (DME) : Ham's F12 (H) medium (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF, Hyclone, Logan, UT, USA) et des antibiotiques (100 UL/mL pénicilline et 25 ug/mL de gentamicine, Sigma-Aldrich, St-Louis). Durant la période d'expansion, les cellules ont été incubées à 37°C avec 8 % de CO<sub>2</sub> et le milieu de culture a été changé à tous les 2 ou 3 jours. Après 7 jours de culture, qui correspond à la période où les cellules ont atteint la confluence, les cellules ont été trypsinées (0,5 %, Intergen), puis des comptes au bleu de trypan et au Coulter (Coulter, Counter, Beckman Coulter, FL, USA) ont été effectués pour déterminer le nombre de cellules, évaluer la grosseur et la viabilité. Les cellules ont été utilisées entre les passages 3 et 6.

## 2.3 Reconstruction de feuillets et de tissus conjonctifs par auto-assemblage

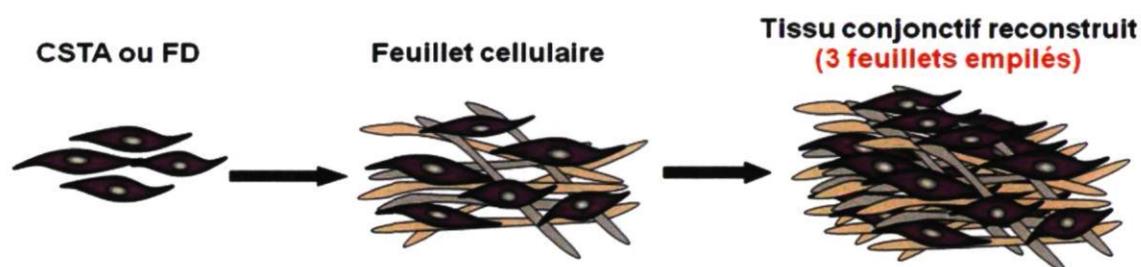
Tout d'abord, les CSTA et FD amplifiés en culture sont ensemencés dans des plaques six puits NUNC (VWR international, Mississauga, ON, Canada) contenant un ancrage de papier filtre (Whatman, Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) dont l'intérieur a été découpé et forme un espace vide pour que les feuillets cellulaires puissent s'y former. La présence de l'ancrage est un atout important puisqu'il facilite la manipulation des feuillets lors de l'empilement de ceux-ci et réduit l'effet de contraction qui peut survenir en l'absence d'ancrage lors de la culture en présence d'AA. Les cellules sont ensemencées à une densité de  $1,57 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> et des lingots sont ajoutés sur les ancrages pour les retenir au fond du puits. À partir du premier jusqu'au dernier jour de culture, les cellules ont été cultivées dans le milieu de base décrit à la section 2.2. Ce milieu a été supplémenté de 50 µg/mL d'acide ascorbique fraîchement préparé pour stimuler la sécrétion et l'organisation de la matrice extracellulaire et ainsi, obtenir des feuillets facilement manipulables. Les cultures de cellules dédiées à la culture dynamique ont été cultivées 24 heures en condition statique (classique) pour s'assurer que les cellules adhèrent au fond des puits, puis placées sur une plate-forme agitatrice tridimensionnelle (Ocelot Rotator, Fisher Scientific) (Figure 2.1). Celle-ci produit un mouvement constant de 35 rotations par minute (RPM) et avec un angle de variation maximale de 9°.



**Figure 2.1** : Plate-forme agitatrice 3D (Ocelot Rotator, Fisher Scientific)

### 2.3.1 Cinétique de reconstruction des tissus conjonctifs humains

La figure 2.2 représente une schématisation de la reconstruction de tissus conjonctifs par la méthode d'auto-assemblage. L'ajout d'acide ascorbique et de sérum durant toute la période de culture dans le milieu permet aux cellules de sécréter et d'assembler les éléments de la matrice extracellulaire et finalement de produire un feuillet cellulaire manipulable. Par la suite, trois feuillets sont superposés afin de former un tissu conjonctif humain plus épais reconstruit in vitro sans biomatériau exogène. Par ce procédé, il est possible de reconstruire un derme à l'aide de FD (Michel et al. 1999) ou bien un stroma à partir des CSTA (Vermette et al. 2007).

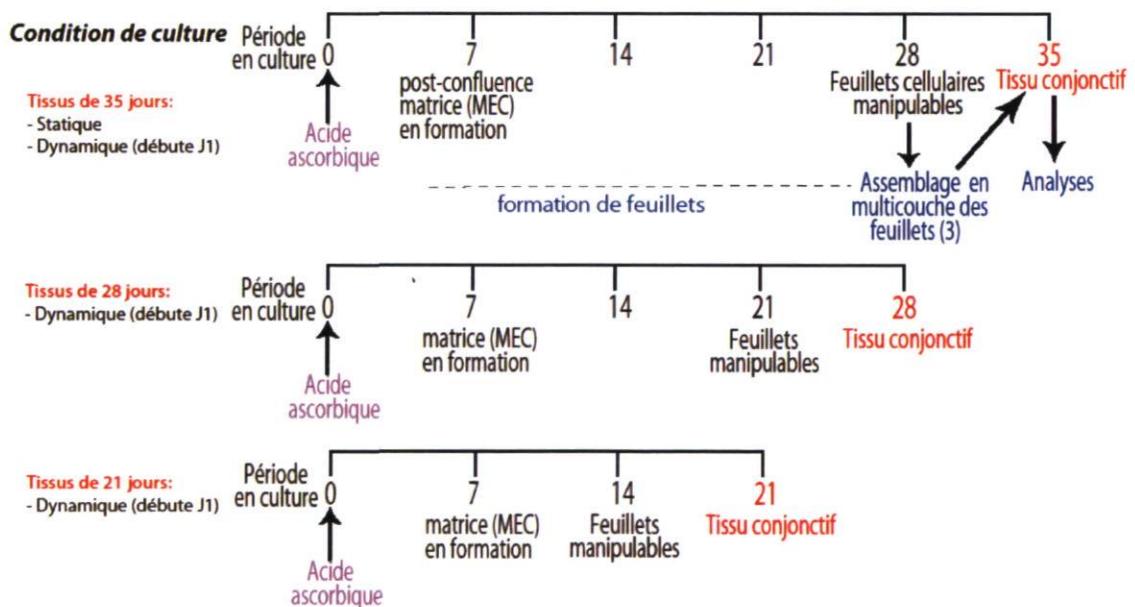


**Figure 2.2** : Schématisation de la production des tissus conjonctifs par la méthode d'auto-assemblage

Pour répondre au premier objectif spécifique, des tissus conjonctifs humains ont d'abord été reconstruits sur une période de 35 jours en condition de culture dynamique et statique. Ce temps correspond à la période de culture standard utilisée par notre équipe (Figure 2.3). Les CSTA et les FD ont tous été cultivés de manière classique (condition statique) pendant 24 heures, puis la moitié des échantillons ont été placés sur la plate-forme agitatrice et ce jusqu'au dernier jour de culture (35 jours). Après 28 jours, trois feuillets cellulaires facilement manipulables ont été superposés afin de former un empilement, puis cultivés durant 7 jours supplémentaires pour leur permettre d'adhérer entre eux et ainsi améliorer la cohésion. Pour ce qui est des tissus produits en condition dynamique, ceux-ci ont été gardés en condition statique environ 16 heures suite à l'empilement. Ceci permet aux feuillets d'adhérer entres-eux. Puis, les empilements ont été placés à nouveau sur la plate-forme pour une période supplémentaire de 6 jours de culture (au total, N=3 populations par type

cellulaire, n=6 tissus conjonctifs reconstruits par condition pour chaque population). Différentes analyses ont été réalisées à partir de ces tissus conjonctifs cultivés pendant 35 jours et elles sont détaillées dans les sections qui suivent (2.5, 2.6, 2.7, 2.9 et 2.10).

En plus de reconstruire des tissus conjonctifs sur une période de 35 jours, d'autres tissus ont été produits lors des mêmes expériences pour répondre au deuxième objectif spécifique qui était de réduire la période de culture requise. Ainsi, des tissus produits sur une période de 21 ou 28 jours ont aussi été reconstruits en condition de culture dynamique (au total, N=3 populations par type cellulaire, n=5 tissus conjonctifs reconstruits par condition pour chaque population). Les étapes de reconstruction sont illustrées à la figure 2.3. Différentes analyses ont été réalisées à partir des tissus conjonctifs cultivés pendant 21 ou 28 jours et elles sont détaillées aux sections 2.5 et 2.6.



**Figure 2.3 :** Représentation schématique des principales étapes de reconstruction des feuillets et tissus conjonctifs humains en condition de culture statique et dynamique (© Guillaume Marceau Fortier, LOEX).

### **2.3.2 Reconstruction de feuillets cellulaires humains servant à l'étude des mécanismes impliqués lors de la culture dynamique**

Afin d'évaluer l'impact de la culture dynamique tout au long du processus de la reconstruction des tissus conjonctifs, la prolifération cellulaire par dosage indirect de l'ADN et le dosage des protéines totales déposées ont été évalués lors d'une même expérience. Pour ce faire, les analyses ont été réalisées à partir de feuillets cellulaires cultivés durant 7, 14, 21 et 28 jours en condition statique et dynamique culture (N=2 populations par type cellulaire, n=3 feuillets par condition pour chaque population cellulaire). Les feuillets conjonctifs (7, 14, 21 et 28 jours) ont été récoltés à l'aide d'un poinçon métallique de 19 mm de diamètre (fabrication artisanale) pour s'assurer de récolter le même volume d'échantillon. Les équivalents tissulaires ont préalablement été rincés avec un tampon saline phosphate (PBS), puis ils ont été congelés instantanément dans l'azote liquide avant d'être entreposés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Les détails des analyses sont expliqués aux sections 2.4, 2.8 et 2.9.

De plus, une étude sur l'évaluation des niveaux d'expression des transcrits codant pour des gènes impliqués dans la synthèse de la MEC a été effectuée à partir de feuillets reconstruits seulement après 7 jours de culture. Les détails des analyses sont expliqués à la section 2.7.

## **2.4 Homogénéisation des feuillets cellulaires par sonication**

Les feuillets cellulaires cultivés pendant 7, 14, 21 et 28 jours et consacrés au dosage fluorométrique de l'ADN (voir section 2.9) et au dosage des protéines totales déposées (voir section 2.8) ont d'abord été dissociés à l'aide d'un sonicateur (Sonicator Branson 450, Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, USA). Dans un premier temps, les feuillets (N=2 populations par type cellulaire, n=3 tissus par condition) ont été rincés avec un tampon salin phosphate (PBS) puis soniqué dans 500 µL de PBS. Le processus de sonication a été effectué selon les paramètres suivant : 20% d'amplitude avec 3 cycles de 10 secondes et des intervalles de 10 secondes entre les cycles, puis une deuxième fois avec 2 cycles de 10 secondes. Pour s'assurer de ne pas dénaturer les échantillons par la chaleur

générée par le sonicateur et pour diminuer l'activité enzymatique des protéases, les tubes contenant les feuillets ont été placés sur la glace. Une fois la sonication effectuée, les échantillons ont été divisés en deux parties à volume égal. Puis, ils ont été congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$  avant d'effectuer les tests de dosage protéique total et de dosage d'ADN expliqué plus en détail aux sections 2.8 et 2.9.

## **2.5 Analyses histologiques**

Au temps voulu (21, 28 ou 35 jours de culture au total), des biopsies ont été effectuées sur les tissus reconstruits (3 feuillets) à partir des CSTA et des FD en condition dynamique et statique. Une lanière centrale de tissu a d'abord été prélevée, puis recoupée en quatre morceaux pour ensuite être fixée au formol tamponné 3,7 %. Par la suite, les échantillons ont été enrobés dans la paraffine, puis des coupes transversales de  $5\ \mu\text{m}$  ont été prélevées et déposées sur une lame pour coloration au trichrome de Masson. Grâce à ce type de coloration, il est possible d'évaluer l'aspect histologique des tissus. À la suite de la coloration des tissus, des observations ont été réalisées au microscope Nikon Eclipse Ts100, puis des photos ont été prises avec une caméra Nikon Coolpix 4500 (Nikon, Montréal, CA) installée sur le microscope. À partir des images prises sur les coupes histologiques, des mesures d'épaisseur ont été effectuées à l'aide du logiciel Image J (NIH, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Environ 48 photos ont été prises pour chacun des équivalents tissulaires analysés. Par la suite, trois mesures d'épaisseur ont été effectuées à différents endroits sur chacune des photos.

## **2.6 Test de résistance mécanique**

Les propriétés mécaniques des tissus conjonctifs reconstruits en condition statique (35 jours) et dynamique (21, 28, 35 jours) ont été évaluées ( $N=3$  populations par type cellulaire,  $n=2-3$  tissus conjonctifs reconstruits par condition pour chaque population) par des tests d'étirement uniaxial à l'aide d'un appareil de traction (Tytron<sup>TM</sup> 250, MTS System Corporation, MN). Le test consiste à appliquer une force sur l'équivalent tissulaire et de mesurer la force d'étirement maximale jusqu'à sa rupture. À partir de ce test, il est possible

de mesurer la résistance (UTS), le module d'élasticité (Modulus) et le pourcentage de déformation lors de la rupture de l'équivalent. Les tissus dédiés aux tests mécaniques ont d'abord été découpés uniformément à l'aide d'un poinçon métallique avec une forme particulière illustrée à la figure 2.4 (A). Par la suite, les échantillons ont été placés entre les deux ancrages de l'appareil, dont l'un est fixe et l'autre est mobile à une vitesse constante de 0,2 mm/seconde (Figure 2.4 B, C). À l'aide d'un ordinateur, les mesures de forces (Newton) appliquées ont été compilées de même que la distance de déplacement (mm) de l'ancrage mobile. Une courbe de la force en fonction de la distance de déplacement a été réalisée. Les valeurs obtenues en Newton ont été converties en unité de pression ( $\text{N}/\text{mm}^2 = \text{MPa}$ ) en considérant l'épaisseur moyenne des équivalents mesurée sur les coupes histologiques colorées au trichrome de Masson et analysée avec le logiciel Image J (NIH). Ainsi, en convertissant les données en MPa, les propriétés mécaniques de chaque tissu ont pu être comparées puisqu'elles tiennent compte de l'aire transversale du tissu sur laquelle la force d'étirement a été appliquée. Les mesures d'épaisseurs de la zone centrale correspondant au site de rupture ont été utilisées pour le calcul de l'UTS. De plus, les données de déplacement recueillies en millimètre ont été converties en pourcentage de déformation. Bref, la résistance des différents tissus est représentée par la force la plus haute mesurée lors de la rupture de l'échantillon.



**Figure 2.4 :** Étapes effectuées lors du test de résistance mécanique. (A) Tissu coupé en languette pour le test de résistance. (B) Déplacement à vitesse constante de l'ancrage mobile (0,2 mm/seconde). (C) Déformation du tissu lors du test d'étirement uniaxial.

## 2.7 Évaluation de l'expression des transcrits par RT-PCR quantitatif

Les tissus (35 jours) et les feuillets (7 jours) dédiés pour mesurer l'expression des transcrits ont été congelés instantanément dans l'azote liquide puis entreposés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'au jour de l'extraction de l'ARN. Des feuillets de 7 jours (N=1 population par type cellulaire, n=3 feuillets par condition) et des tissus conjonctifs reconstruits après 35 jours avec les FD et les CSTA (N=3 populations par type cellulaire, n=1 tissu par condition), ont été dissociés en utilisant le QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN, Hilden, Germany) et homogénéisés avec un appareil de type Tissue Ruptor (QIAGEN, Mississauga, ON, Canada). Ensuite, l'ARN total a été isolé et purifié en utilisant le RNeasy Lipid tissue Mini Kit (QIAGEN, Maryland, USA) en suivant les indications fournies par le fabricant. L'ARN extrait a été élué dans 30  $\mu\text{L}$  d'eau apyrogène et la concentration a été mesurée à l'aide d'un NanoDrop Spectrophotometer (NanoDrop Technologie, Wilmington, DE). La procédure d'extraction d'ARN inclut une étape de traitement à la DNase I (QIAGEN, Hilden, Germany) pour s'assurer de retirer toute forme d'ADN génomique. Par la suite, 1  $\mu\text{g}$  d'ARN total a été utilisé pour générer l'ADN complémentaire (ADNc) en se servant d'oligo(dT) comme brin d'amorce (Ambion, Austin, USA) et de la Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, CA). Une fois l'ADNc synthétisé, l'expression des gènes a été évaluée par RT-PCR quantitatif à l'aide d'un appareil Corbett Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Mortlake, Australia) et ce en suivant les instructions du fabricant fournies avec le réactif de QuantiTect SYBR Green PCR (QIAGEN, Hilden, Germany). Les courbes standards ont été générées à partir de plusieurs points dilués en série (0,01 ng à 0,1 fg). Pour chaque test de PCR effectué, un contrôle négatif contenant de l'eau apyrogène a été ajouté pour remplacer l'ADNc. De plus, tous les tests de RT-PCR quantitatifs ont été réalisés en duplicata sur chaque échantillon ainsi que pour chaque point de la courbe standard. Les séquences des amorces qui ont servi à l'analyse d'expression des transcrits sont décrites au tableau 2.3. Comme contrôle interne pour normaliser les valeurs d'expression, l'ARN polymérase II humaine, sous-unité A (POLR2A), a été utilisée de même que les gènes constitutifs glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) et beta-2-microglobuline (B2M) (Catalan et al. 2007, Mehta et al. 2010). Tous les résultats présentés dans ce mémoire sont normalisés avec POLR2A et

rapportés en ratio par rapport aux deux conditions de culture. L'analyse des données a été effectuée à l'aide du logiciel Rotor-Gene 6000 Series 1.7 (Corbett Research, Mortlake, Australia). Les séquences des brins d'amorces présentées au tableau 2.3 ont toutes été construites en utilisant le logiciel Universal ProbeLibrary Assay Design Center ([www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com)), puis analysées par le logiciel BLAST (NCBI). De plus, les produits d'amplification obtenus par PCR ont été conservés pour le séquençage qui a été effectué au Centre de Recherche du CHUL (CRCHUQ, Université Laval) via la plateforme de séquençage et génotypage des génomes. Ensuite, les résultats ont été analysés avec le logiciel FlinchTV ([www.geospiza.com](http://www.geospiza.com)) pour s'assurer de la spécificité des produits d'amplification.

**Tableau 2.3** : Amorces utilisées pour les RT-PCR quantitatifs

Nom des transcrits (Symbol)	No. Gene Bank	Séquence des amorces (5'-3')	Taille (nt)
Collagène, type 1, alpha 1 ( <b>COL1A1</b> )	NM_000088.3	G: CCAATGTGAAATTGCTCCCA D: GGGGCAAGACAGTGATTGAA	254
Collagène, type III, alpha 1 ( <b>COL3A1</b> )	NM_000090.3	G: CAGGAAGCTGTTGAAGGAGG D: TATGTCATCGCAGAGAACGG	123
Collagène, type 5, alpha 2 ( <b>COL5A2</b> )	NM_000393.3	G: TACGAAGACCCCGAAGACC D: AGCTTCCACGGGCTTCTT	60
Prolyl 4-hydroxylase, chaîne alpha I ( <b>P4HA1</b> )	NM_001017962.1	G: GATCTGTGACTTCTGAAAGATT D: CGATCTAACTTCTGCCCATT	86
Lysyl oxydase ( <b>LOX</b> )	NM_002317.5	G: GGATACGGCACTGGCTACTT D: GACGCCTGGATGTAGTAGGG	71
Décorine ( <b>DCN1</b> )	NM_001920.3	G: CTTGATGGCAACAAAATCAGC D: GGTCCAAGTGAAGCTCCCTCA	150
ARN polymérase II humaine, sous-unité A ( <b>POLR2A</b> )	NM_000937.4	G: CTACATCGGGCCTTGCAAATA D: GGGTAGCCAGGACGTTCTTG	101
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase ( <b>GAPDH</b> )	NM_002046.3	G: TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG D: TCCTTGGAGGCCATGTGGCCAT	240
Beta-2-microglobuline ( <b>B2M</b> )	NM_004048.2	G: GGCTATCCAGCGTACTCCAAG D: CAACTCAATGTCGGATGGATG	116

## **2.8 Dosage des protéines totales par la méthode de microBCA**

Pour déterminer la concentration de protéines totales contenues dans les feuillets reconstruits pendant 7, 14, 21 ou 28 jours, préalablement dissociés par sonication (voir section 2.4), puis conservées dans un tampon d'échantillonnage (20% glycérol, 62 mM Tris, 6% SDS à pH 6,8), les dosages ont été effectués à l'aide d'un kit de détection microBCA (Thermo Scientific, Rockford, USA) en suivant les indications fournies par le fabricant. Les échantillons ont été incubés à 37°C pendant 60 minutes, puis une lecture de l'absorbance a été réalisée au SpectroMax Plus (Molecular Devices) avec le logiciel SoftmaxPro.Ver 4.7.1 avec des plaques de 96 puits à fond plat (BD Falcon, New Jersey, USA) à une longueur d'onde de 562 nm. Tous les échantillons ont été mesurés en duplicata de même que les points de la courbe standard qui ont été dilués en série entre 200 µg/mL et 3,125 µg/mL.

## **2.9 Dosage fluorométrique de l'ADN total**

Pour digérer les protéines, la protéinase K (QIAGEN, Hilden, Germany) a été ajoutée dans chaque tube contenant les feuillets cultivés pendant 7, 14, 21 ou 28 jours préalablement homogénéisés (voir section 2.4). De plus, la protéinase K a aussi été ajoutée aux échantillons de tissus conjonctifs cultivés pendant 35 jours préalablement rincés au PBS et récoltés avec un poinçon de 19 mm de diamètre. La période d'incubation avec la protéinase K s'effectue sur une plaque à 56°C durant une nuit entière. Par la suite, une étape d'inactivation de l'activité enzymatique a été réalisée en chauffant les échantillons à 75°C. Pour s'assurer de doser uniquement l'ADN, une étape de digestion à la RNase a été effectuée en incubant 2 heures sur une plaque chauffante à 37°C. Une fois les échantillons préparés pour le dosage, une courbe standard a été préparée en diluant en série, entre 0,5 et 8 ng/uL, une solution mère d'ADN de 16 ng/uL (Invitrogen, Oregon, USA). Comme les feuillets et les tissus contiennent énormément de cellules, les échantillons analysés ont été dilués de façon appropriée. Tous les tests ont été réalisés en duplicata de même que les points de la courbe standard. Les échantillons ont été placés en présence du réactif PicoGreen (Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits, Invitrogen, Oregon, USA)

en suivant les directives du fabricant. La lecture des plaques blanches de 96 puits (Thermo, Fischer Scientific, USA) a été réalisée à l'aide d'un fluoromètre (Varioskan Flash, Thermo, Vantaa, Finland) à 540 nm.

## **2.10 Analyse par microscopie électronique à transmission**

Des petits échantillons d'environ 2 mm<sup>2</sup> ont été prélevés sur des tissus conjonctifs reconstruits de 35 jours de culture en condition dynamique et statique. Les échantillons (N=2-3 populations par type cellulaire, n=1 par condition) ont été fixés dans une solution de glutaraldéhyde diluée à 2,5 % dans un tampon de cacodylate de 0,1M. Par la suite, l'enrobage a été effectué par le service de microscopie électronique (Université Laval). Les échantillons ont été observés au microscope électronique à transmission (JEOL 1230). Trois photos par condition et par population cellulaire ont été prises à différents grossissements, puis analysées à l'aide du logiciel Image J (NIH). Six mesures ont été prises par photo pour évaluer la périodicité et 12 mesures par photos ont été effectuées pour évaluer la densité des fibres de collagène dans les tissus reconstruits.

## **2.11 Analyses statistiques**

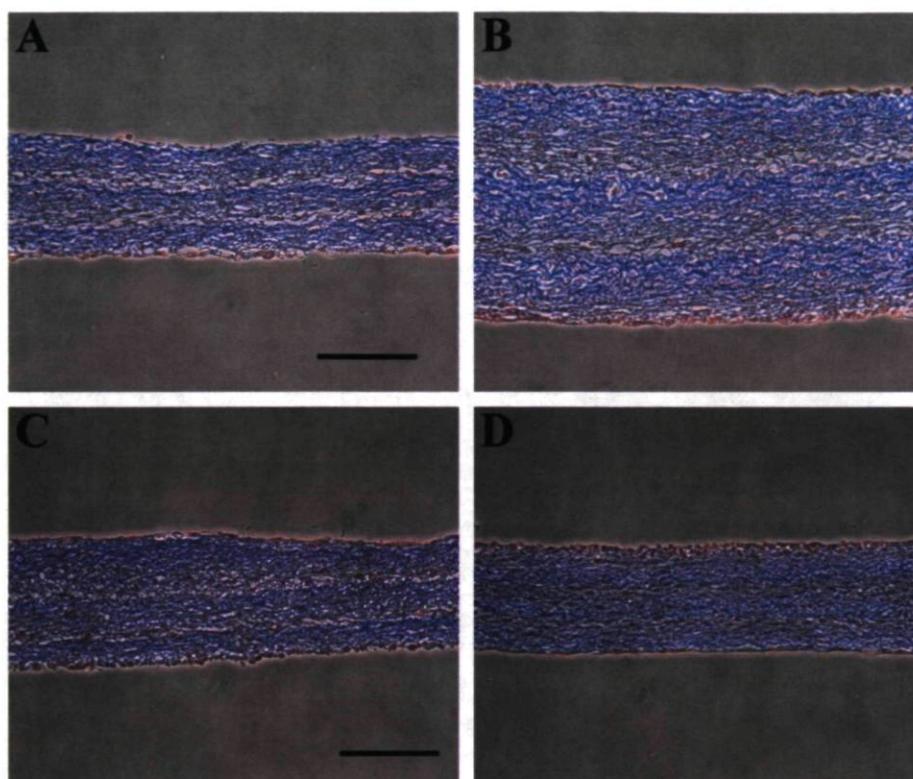
Les tests statistiques (Test de Student non pairé, One-way ANOVA suivi des post-tests Tukey ou Dunnett) ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc, La Jolla CA, USA). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM ou en ratio avec ces valeurs de significativité,  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) et  $p < 0.001$  (\*\*\*). Le fait de rapporter les valeurs en ratio, permet d'éliminer les variations interpersonnelles des différentes populations cellulaires utilisées.

## **Chapitre 3 : Résultats**

### **3.1 Impact de la culture dynamique sur la production de tissus conjonctifs humains**

Le premier objectif spécifique de mon projet de maîtrise consistait à évaluer si la culture dynamique permettait de produire des tissus plus épais. Pour ce faire, des CSTA et des FD ont été cultivés en conditions dynamique et statique. D'abord, les feuillets cellulaires ont été produits en les cultivant dans un milieu contenant du sérum et de l'acide ascorbique afin d'induire la formation et l'organisation de la matrice extracellulaire (MEC). Par la suite, les feuillets ont été superposés par groupe de trois pour former un tissu conjonctif. Après 35 jours de culture au total, les équivalents tissulaires ont été analysés. La reconstruction de tissus conjonctifs humains sur une période de 35 jours a été réalisée à plusieurs reprises et avec plusieurs populations cellulaires (N=3). Mes travaux montrent qu'à l'aide de la culture dynamique, il est possible de produire des tissus conjonctifs humains plus épais à partir des CSTA, mais non pas à partir des FD dont l'épaisseur ne varie pas (Figure 3.1 et 3.2). Également, les résultats montrent que l'épaisseur des tissus reconstruits avec des CSTA en condition statique n'est pas différente de celle des tissus produits à partir des FD en statique (Figure 3.2).

L'apparence histologique des tissus cultivés pendant 35 jours est le premier paramètre à avoir été analysé. Pour ce faire, une coloration au trichrome de Masson a été réalisée. Un exemple de l'aspect histologique des tissus produits selon la condition de culture est présenté à la figure 3.1. Le bleu représente le collagène sécrété et assemblé par les cellules, alors qu'en rose sont représentées les cellules. Il y a une bonne cohésion entre les feuillets superposés. Une quantité plus importante de matrice extracellulaire semble être produite par les CSTA dans la condition dynamique (Figure 3.1, B) en comparaison à la condition standard de culture (Figure 3.1, A).

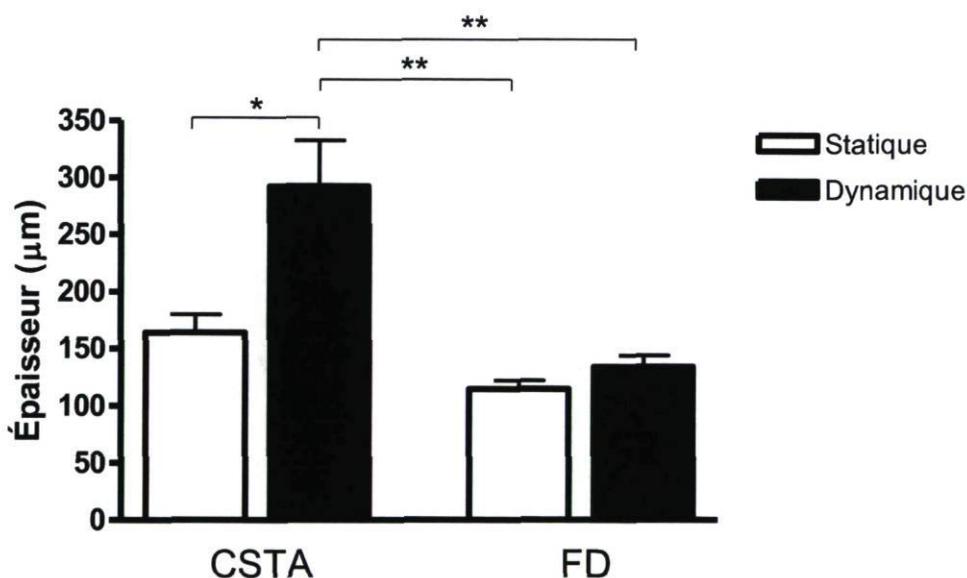


**Figure 3.1 :** Aspect histologique représentatif des tissus conjonctifs reconstruits par auto-assemblage selon les conditions de culture utilisées. Coupes histologiques, colorées au trichrome de Masson, d'équivalents tissulaires produits en culture statique (A, C) et dynamique (B, D). Tissus conjonctifs humains reconstruits avec les CSTA (A, B) et avec les FD (C, D). (N=3 populations par type cellulaire, n=2-3 tissus par condition pour chaque population). Barre de mesure = 100  $\mu\text{m}$ .

À partir des coupes histologiques, l'épaisseur des tissus a été mesurée à l'aide du logiciel Image J. Les tissus reconstruits avec les CSTA en culture statique mesurent  $164,2 \pm 15,6 \mu\text{m}$ , alors que ceux en condition dynamique mesurent  $292,2 \pm 40,0 \mu\text{m}$  (Figure 3.2). Il y a une différence significative entre l'épaisseur des tissus produits en statique et ceux en dynamique. En fait, les équivalents produits en dynamique sont 1,8 fois plus épais que ceux en condition statique. Par conséquent, la culture dynamique semble favoriser la production d'éléments de la matrice extracellulaire. Autre point à préciser, la variation de l'épaisseur mesurée sur les tissus conjonctifs reconstruits avec les CSTA semble plus élevée en condition dynamique ( $\pm 40,0 \mu\text{m}$ ). Ceci s'expliquerait par le fait que les tissus sont moins

épais au centre par rapport aux extrémités. Cet aspect a été observé sur les différentes photos prises sur les coupes histologiques. Il y aurait donc une plus grande variation d'épaisseur sur les tissus reconstruits en dynamique à partir des CSTA. Par contre, ce n'est pas le cas pour les tissus produits avec les FD.

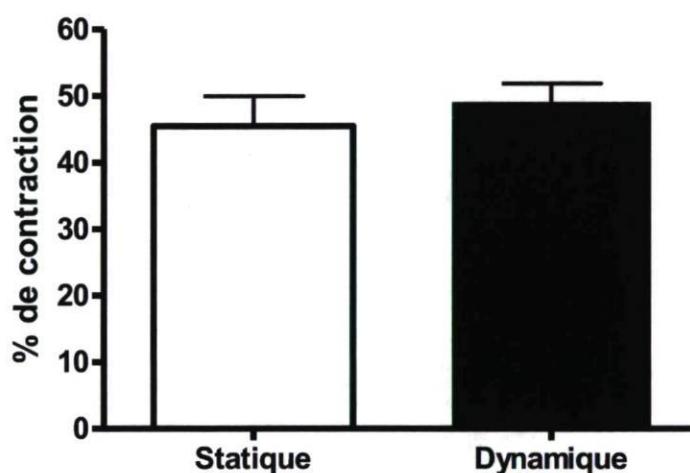
Les tissus conjonctifs produits avec les FD en condition statique mesurent  $114,6 \pm 7,3 \mu\text{m}$ , tandis que ceux en condition dynamique mesurent  $133,7 \pm 10,0 \mu\text{m}$  (Figure 3.2). Il n'y a pas de différence d'épaisseur significative entre les deux conditions de culture ( $p = 0.19$ ). D'autre part, les équivalents produits avec les CSTA en culture dynamique sont environ 2,1 fois plus épais que les tissus reconstruits avec les FD. Ainsi, les CSTA permettent de produire des tissus plus épais par auto-assemblage.



**Figure 3.2 :** Épaisseur des tissus conjonctifs humains reconstruits avec les CSTA et les FD selon la méthode de culture statique ou dynamique. (N=3 populations par type cellulaire, n=2-3 tissus par condition pour chaque population). One-way ANOVA, post-test Tukey effectué (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ).

Pour s'assurer que l'augmentation d'épaisseur des tissus obtenus en condition dynamique à partir des CSTA n'est pas causée par un effet de contraction des tissus, une évaluation du pourcentage de contraction pour chaque tissu a été réalisée lors du prélèvement des biopsies

des différents échantillons. Pour ce faire, l'aire interne des ancrages soutenant les équivalents tissulaires a été mesurée. Une fois les tissus découpés autour de l'ancrage, l'aire de la surface des échantillons, légèrement contractés, a été mesurée. La figure 3.3 présente les valeurs de pourcentage de contraction des tissus cultivés en condition statique et dynamique. En général, les équivalents contractent environ à 47 % de la surface initiale peu importe la condition de culture. Ces résultats confirment que la contraction des tissus conjonctifs produits avec les CSTA n'est pas la cause de l'augmentation significative de l'épaisseur des équivalents tissulaires obtenus en condition de culture dynamique.



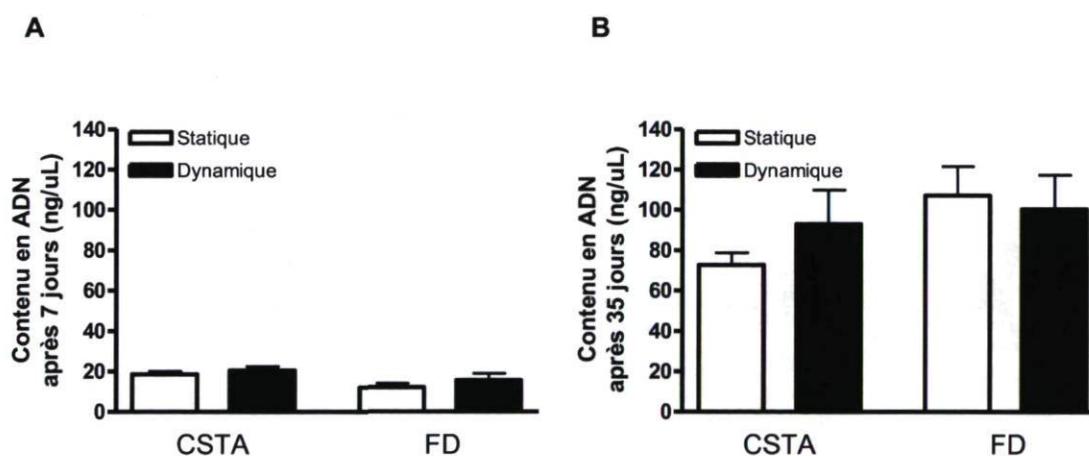
**Figure 3.3 :** Pourcentage de contraction des tissus conjonctifs reconstruits à partir des CSTA selon la méthode de culture statique ou dynamique. (N=3 populations cellulaires, n=2-5 tissus par condition pour chaque population). Test de Student, non pairé effectué.

Puisque la culture dynamique influence la reconstruction des tissus conjonctifs humains à partir des CSTA via une augmentation de l'épaisseur des équivalents, une étude plus approfondie sur les mécanismes pouvant influencer ce phénomène a été réalisée. Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer si les différences d'épaisseur sont dues à un effet cellulaire que ce soit par une augmentation de la prolifération et/ou par une modification de l'expression des transcrits impliqués dans la synthèse et l'assemblage de la matrice extracellulaire.

### 3.2 Mécanismes influençant la synthèse et l'assemblage des éléments de la MEC en condition dynamique

#### Prolifération cellulaire

Comme les équivalents tissulaires sont produits sur une longue période, une étude de la prolifération cellulaire a été réalisée en début de culture et à la toute fin de la reconstruction des tissus. Pour évaluer l'impact de la culture dynamique sur la prolifération cellulaire, un dosage indirect du nombre de cellules, en quantifiant l'ADN total contenu dans les tissus par essai Picogreen, a été réalisé. Les résultats illustrés à la figure 3.4 présentent des données de concentration d'ADN mesurées sur des feuillets cellulaires cultivés durant 7 jours et sur des tissus reconstruits (tricouches) après 35 jours de culture.



**Figure 3.4 :** Contenu en ADN des feuillets et tissus conjonctifs produits selon les différentes conditions de culture. Dosage de l'ADN total effectué par la méthode Picogreen sur des feuillets cultivés durant 7 jours (A) et sur des tissus cultivés pendant 35 jours (B). (N=2-3 populations par type cellulaire, n=2-3 feuillets ou tissus par condition pour chaque population). One-way ANOVA, post-test Tukey effectué.

Après 7 jours de culture, les résultats montrent que le contenu en ADN reste inchangé, peu importe la méthode de culture utilisée pour produire les feuillets cellulaires. Les concentrations d'ADN pour les feuillets reconstruits avec des CSTA ( $18,64 \pm 1,38$  ng/μL en condition statique et  $20,54 \pm 1,91$  ng/μL en condition dynamique) ne sont pas

significativement différentes (Figure 3.4, A). Pour ce qui est des feuillets produits avec les FD, les valeurs de concentration d'ADN sont de  $12,13 \pm 1,93$  ng/ $\mu$ L en condition statique  $15,58 \pm 9,49$  ng/ $\mu$ L en dynamique. Ces valeurs ne sont pas significativement différentes. Ces résultats suggèrent donc que la culture dynamique par rapport à la culture statique, au début (7 jours) du processus de production des feuillets cellulaire n'entraîne pas une augmentation de la prolifération.

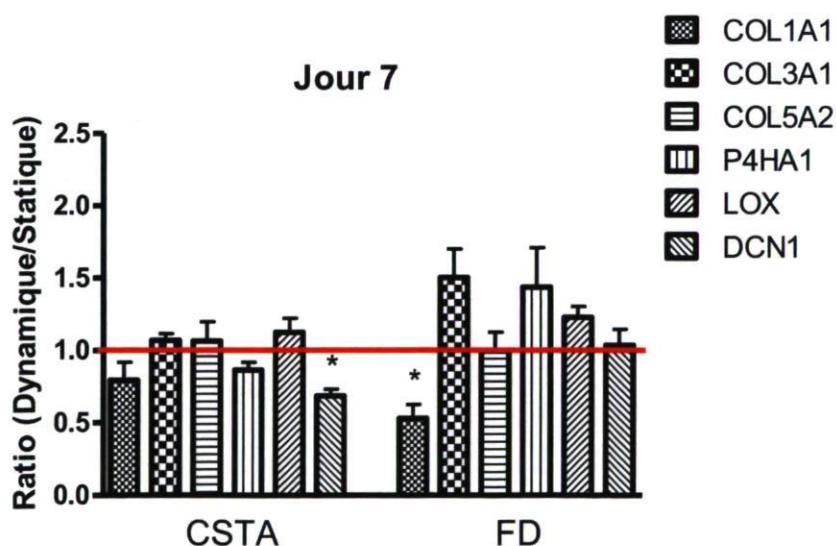
Les résultats des concentrations d'ADN provenant des tissus composés de trois feuillets superposés (Figure 3.4, B) montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux conditions de culture. La concentration d'ADN contenu dans les tissus produits avec des CSTA est de  $72,75 \pm 5,98$  ng/ $\mu$ L en condition statique et de  $92,94 \pm 17,03$  ng/ $\mu$ L en condition dynamique ( $p = 0.29$ ). Pour ce qui est des feuillets produits avec les FD, les valeurs de concentration d'ADN se situent, en culture statique, à  $107,2 \pm 14,36$  ng/ $\mu$ L et à  $100,30 \pm 17,00$  ng/ $\mu$ L en condition dynamique ( $p = 0.76$ ). Donc, ces résultats suggèrent que peu importe la méthode de culture utilisée, la prolifération cellulaire ne varie pas au tout début ni à la fin du processus de formation des tissus conjonctifs humains par auto-assemblage. Cependant, une légère augmentation du nombre de cellules est observée entre les résultats obtenus après 7 jours de culture et ceux obtenus après 35 jours totaux de culture, peu importe la méthode utilisée.

Enfin, la culture dynamique permet de produire des tissus plus épais, à partir des CSTA, sans toutefois provenir d'une prolifération cellulaire accrue. À la suite de ces résultats et des conclusions qui ont été tirées, les prochaines analyses concernant l'étude de l'influence cellulaire ont été réalisées, cette fois-ci, dans le but d'évaluer les niveaux d'expression de transcrits impliqués dans la synthèse et l'assemblage des collagènes.

### **Expression des transcrits**

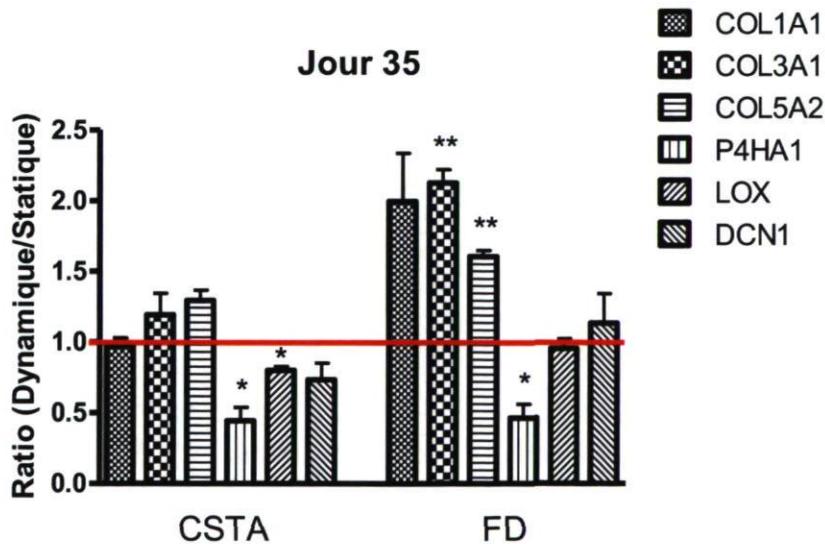
Le tissu conjonctif étant composé d'une panoplie d'éléments matriciels distincts, nous avons ciblé le collagène, l'élément majeur de la MEC dans les tissus conjonctifs humains, pour évaluer l'impact de la culture dynamique au niveau de l'expression des transcrits.

Pour ce faire, une étude comparative des niveaux d'expression des transcrits codants pour des gènes des différentes chaînes alpha pour les collagènes I (COL1A1), III (COL3A1), V (COL5A2) a été réalisée ainsi que pour des gènes codant pour des protéines impliquées dans l'assemblage du collagène telles que la prolyl-4-hydroxylase (P4HA1), la lysyl oxydase (LOX) et la décorine (DCN1). Pour corrélérer les résultats de la prolifération obtenus au début et à la toute fin du processus de reconstruction tissulaire, une quantification des niveaux d'expression des transcrits a été réalisée à partir de feuillets cellulaires cultivés sur une période de 7 jours (Figure 3.5) et sur des tissus cultivés durant 35 jours (Figure 3.6). Les résultats présentés aux figures 3.5 et 3.6 sont rapportés en ratio afin d'éliminer les variations interpersonnelles des populations. Initialement, les valeurs représentent des données relatives par rapport au gène constitutif POLR2A avant d'être rapportées en ratio. Le gène POLR2A code pour la plus grande sous-unité de l'ARN polymérase II responsable de la synthèse des ARNm dans les cellules eucaryotes. Ce gène constitutif est connu dans la littérature pour servir à normaliser les données grâce à sa stabilité d'expression, notamment dans les tissus adipeux d'où sont extraites les CSTA (Mehta et al. 2010).



**Figure 3.5 :** Ratio des valeurs d'expression relative des transcrits déterminée par RT-PCR quantitatif à partir de feuillets cellulaires de 7 jours selon les conditions de culture. Analyse effectuée pour les gènes codants pour COL1A1, COL3A1, COL5A2, P4HA1, LOX et DCN1 (N=1 population cellulaire par type cellulaire, n=3 feuillets par condition en duplicata technique). One-sample t-test effectué par rapport à la valeur de référence 1 (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ).

Les résultats d'expression relative obtenus pour les feuillets produits avec les CSTA, présentés à la figure 3.5 montrent qu'il n'y a pas de différence d'expression pour les gènes codant pour COL1A1, COL3A1 et COL5A2 de même que pour P4HA1 et LOX et ce, peu importe les conditions de culture utilisées. Les valeurs présentées à la figure 3.5 représentent des résultats d'expressions relatives obtenues en condition dynamique par rapport à celles obtenue en condition statique. Ainsi, à partir des moyennes des ratios, il est possible de vérifier s'il y a des différences significatives ou non par rapport à la valeur de référence correspondant à 1. Concernant les résultats pour les feuillets reconstruits à partir de FD, COL1A1 est davantage exprimé en condition statique. Comme ces résultats sont obtenus à partir d'échantillons récoltés à un temps précoce par rapport au long processus de formation de la MEC afin de produire des feuillets cellulaires manipulables, il n'est pas surprenant d'obtenir de tels résultats. C'est pourquoi l'analyse des résultats d'expression relative des transcrits pour des tissus conjonctifs de 35 jours est important si l'on veut corréler les données d'expression relative des transcrits avec celles d'épaisseur évaluées précédemment.



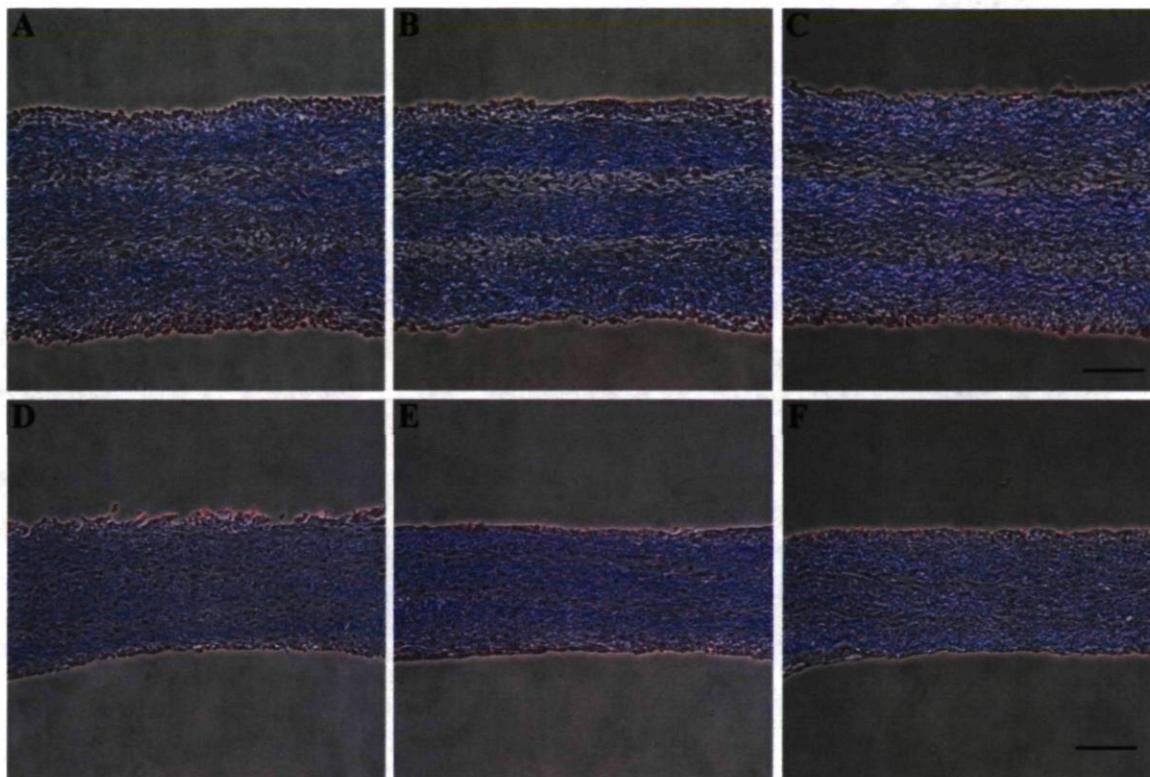
**Figure 3.6 :** Ratio des valeurs d'expression relative des transcrits déterminée par RT-PCR quantitatif à partir de tissus conjonctifs de 35 jours selon les conditions de culture. Analyses effectuées pour les gènes codants pour COL1A1, COL3A1, COL5A2, P4HA1, LOX et DCN1 (N=3 populations cellulaires en duplicata technique). One-sample t-test effectué par rapport à la valeur de référence 1 (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ).

Les résultats présentés à la figure 3.6 montrent qu'il n'y a pas d'augmentation significative des niveaux d'expression pour les transcrits codant pour les collagènes I, III et V en condition dynamique pour les tissus produits avec les CSTA. Par contre, la P4HA1 et la LOX sont davantage exprimées en condition statique. Les résultats obtenus pour les gènes codant pour COL1A1, COL3A1 et COL5A2 sont, en quelque sorte, surprenants puisqu'ils ne corrént pas avec l'augmentation d'épaisseur des tissus produits avec les CSTA (Figure 3.2). Pour ce qui est des résultats obtenus pour LOX et P4HAI, il est difficile d'expliquer de tels résultats. Cependant, il ne faut pas oublier que ces composantes de la MEC possèdent une activité enzymatique qui serait, dans le cas présent, intéressante à évaluer. Les résultats obtenus à partir de tissus reconstruits avec les FD sont surprenants. L'expression des transcrits codant pour COL3A1 et COL5A2 est significativement plus élevée en condition dynamique, malgré le fait que l'épaisseur des tissus ne varie pas selon les conditions de culture. Pour ce qui est de l'expression de COL1A1 en condition dynamique, il est plutôt question d'une augmentation tendancielle ( $p = 0.10$ ).

En résumé, pour les tissus reconstruits avec les CSTA, l'effet de la culture dynamique ne semble pas agir via une augmentation de la prolifération, ni via une augmentation de l'expression des transcrits de certaines composantes majeures de la MEC. Donc, pour expliquer la différence d'épaisseur, il faudra vérifier les niveaux protéiques plus en profondeur. Cet aspect a été partiellement évalué dans la section 3.3. D'après les mécanismes analysés dans la première partie de ce mémoire, il est intéressant de constater que les CSTA ne semblent pas se comporter de la même manière que les FD dans un contexte de culture dynamique. Bref, comme les tissus conjonctifs reconstruits à partir des CSTA sont 1,8 fois plus épais, nous avons considéré la possibilité de réduire les délais de production des tissus à l'aide de la culture dynamique. Dans la deuxième partie des résultats, des travaux concernant la reconstruction de tissus conjonctifs par la méthode d'auto-assemblage en culture dynamique pendant différents temps de culture sont présentés.

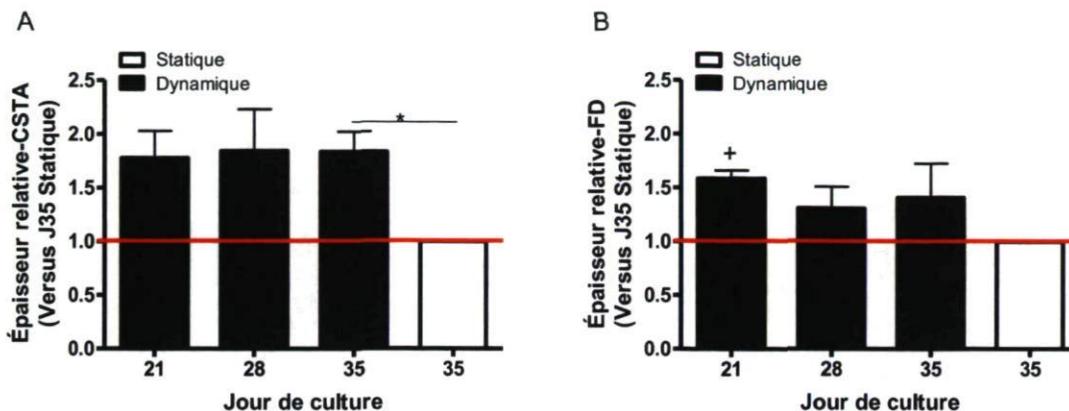
### **3.3 Réduction du temps de production des tissus conjonctifs humains**

Cette partie présente les différentes analyses effectuées pour répondre au deuxième objectif spécifique de mon mémoire. Cet objectif consistait à tenter de reconstruire des tissus, à partir des CSTA et des FD, en moins de temps, dans un contexte de culture dynamique. Des tissus conjonctifs humains ont été produits par la méthode d'auto-assemblage, en condition dynamique pendant différentes périodes correspondant à 21, 28 et 35 jours de culture et selon la condition statique en 35 jours. Pour produire un tissu, trois feuillets cellulaires manipulables ont été superposés aux jours 14, 21 et 28 puis cultivés 7 jours supplémentaires pour permettre aux feuillets d'adhérer entre eux. Par la suite, différentes analyses ont été effectuées sur ces derniers. Nos travaux montrent que les tissus conjonctifs reconstruits avec les CSTA, après 21 et 28 jours, ont la même épaisseur que ceux produits après 35 jours en condition dynamique (Figure 3.7 et 3.8). De plus, les tissus produits à divers temps, avec les FD, ont tous la même épaisseur (Figure 3.7 et 3.8). L'aspect histologique des équivalents tissulaires a été analysé à la suite d'une coloration au trichrome de Masson et l'épaisseur a été mesurée à l'aide du logiciel Image J. En bleu, les fibres de collagène sont représentées et en rose, ce sont les cellules. De manière générale, il y a une bonne cohésion entre les trois feuillets superposés pour produire les tissus (Figure 3.7). Cependant, une différence d'épaisseur est observée lorsque les tissus produits avec les CSTA sont comparés avec ceux reconstruits avec les FD peu importe la durée de la période de culture. À la suite de ces observations, nous avons procédé à la mesure de l'épaisseur des équivalents tissulaires.



**Figure 3.7 :** Aspect histologique représentatif des tissus conjonctifs reconstruits en condition dynamique par auto-assemblage pendant différentes périodes de culture. Coupes histologiques colorées au trichrome de Masson de tissus produits en condition de culture dynamique avec des CSTA (A, B, C) et des FD (D, E, F). (A, D) Tissus reconstruits sur une période de 21 jours, (B, E) 28 jours et (C, F) 35 jours (N=2-3 populations par type cellulaire, n=2-3 tissus par condition pour chaque population). Barre de mesure = 100  $\mu\text{m}$ .

La moyenne d'épaisseur des tissus reconstruits en condition dynamique avec les CSTA aux différents temps de culture est de  $303,2 \pm 7,4 \mu\text{m}$ . Ces valeurs sont supérieures à la valeur obtenue pour les tissus produits en culture statique après 35 jours présentée précédemment (Figure 3.2), avec une augmentation significative pour les tissus produits pendant 35 jours en condition dynamique (Figure 3.8). De plus, il n'y a pas de différence significative entre l'épaisseur mesurée de tissus reconstruits avec les FD (Figure 3.8) en condition dynamique selon les différents temps de culture.



**Figure 3.8 :** Épaisseur des tissus conjonctifs humains reconstruits sur une période de 21, 28 et 35 jours selon les conditions de culture. (A) Tissus produits à partir des CSTA. (B) Tissus reconstruits à partir des FD. (N=2-3 populations par type cellulaire sauf + où N=2, n=2-3 tissus par condition pour chaque population). One-sample t-test effectué (\*  $p < 0.05$ ) par rapport à la valeur de référence 1 (épaisseur des tissus au J35 statique).

Ces résultats montrent qu'il est possible de reconstruire des tissus conjonctifs en peu de temps à partir des CSTA de même qu'avec des FD. Par contre, ces résultats ne révèlent pas le réel avantage d'utiliser les CSTA pour la reconstruction de tissus conjonctifs par rapport au FD. En fait, la reconstruction des tissus à partir des FD s'avère moins efficace que celle réalisée avec les CSTA. Le tableau 3.1 présente le pourcentage des feuillets qui ont été manipulés avec succès, soit sans déchirure de ces derniers lors de l'étape d'empilement pour reconstruire un tissu de trois feuillets cellulaires. Après seulement 14 jours de culture, plus de 90% des feuillets produits avec les CSTA sont manipulables, contrairement aux feuillets produits avec des FD où seulement 57% de ceux-ci s'avèrent manipulables. De plus, à partir de 21 jours et plus de culture en condition dynamique, la totalité des feuillets produits avec les CSTA sont malléables sans bris pour reconstruire un tissu conjonctif humain. Par contre, les feuillets produits avec les FD sont seulement maniés 94.4% du temps lors de l'étape d'empilement, au jour 28, peu importe la condition de culture.

**Tableau 3.1** : Évaluation du pourcentage de feuillets cellulaires manipulables et utilisables pour la reconstruction des tissus conjonctifs humains.

Condition	Jours de culture	CSTA		FD	
		%	n=feuillets utilisés nt=feuillets totaux	%	n=feuillets utilisés nt=feuillets totaux
Dynamique	14	<b>93,3</b>	n=56 nt=60	<b>57,1</b>	n=24 nt=42
	21	<b>100</b>	n=54 nt=54	<b>86,4</b>	n=57 nt=66
	28	<b>100</b>	n=69 nt=69	<b>94,4</b>	n=51 nt=54
Statique	28	<b>100</b>	n=69 nt=69	<b>94,4</b>	n=51 nt=54

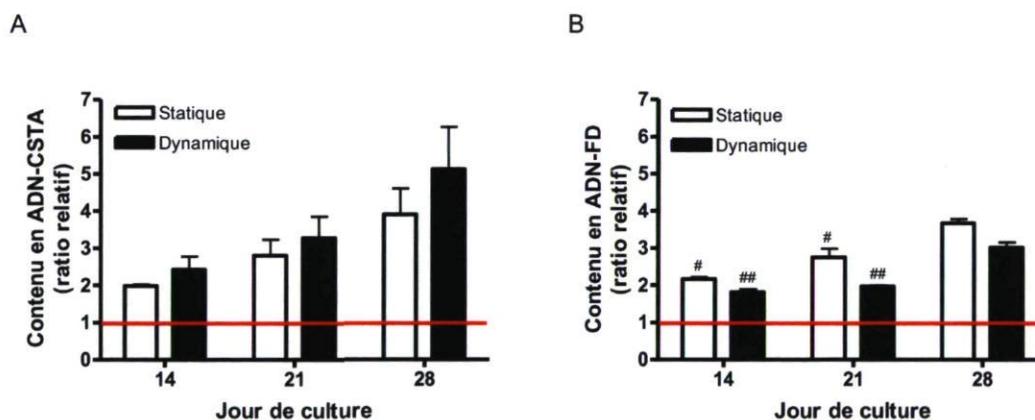
N=3-4 populations par type cellulaire

Les résultats des mesures d'épaisseurs étant intrigant, une étude plus approfondie permettant d'expliquer l'écart d'épaisseur des tissus reconstruits avec les CSTA, à différents temps, en condition dynamique en comparaison à la condition statique, a été réalisée. D'abord, l'impact cellulaire a été considéré pour l'évaluation de la prolifération cellulaire. Pour ce faire, des feuillets cellulaires ont été cultivés pendant différents temps. Les feuillets ont été cultivés, soit en condition statique, soit en condition dynamique. À partir des échantillons produits, une analyse indirecte de la prolifération cellulaire a été faite par dosage de l'ADN total de même qu'une analyse des concentrations de protéines totales déposées. Les concentrations d'ADN ont été mesurées par la méthode Picogreen. Par la suite, la quantité de protéines totales extraites pour chaque équivalent a été dosée par microBCA.

### Impact de la culture dynamique sur la prolifération cellulaire selon le temps de culture

Dans un premier temps, des feuillets ont été fabriqués en culture statique et dynamique durant différents temps. Les jours 14, 21 et 28 de culture sont très importants puisqu'ils correspondent aux moments consacrés à la superposition de 3 feuillets lors de la

reconstruction des tissus conjonctifs humains. Cependant, pour cette partie d'analyse, seulement des feuillets cellulaires à différents temps ont été produits. Lors de la prise de biopsies, des échantillons de feuillets ont été prélevés avec un poinçon de 19 mm de diamètre afin de s'assurer de récolter la même surface d'échantillon. Pour s'assurer de l'égalité du nombre de cellulesensemencées pour chacune des conditions de culture, un dosage d'ADN a été effectué par fluorométrie au Picogreen ainsi qu'un dénombrement cellulaire à l'aide d'un appareil Coulter après 1 jour de culture en condition statique. Les valeurs ont été rapportées en ratio afin de comparer l'augmentation du nombre de cellules pour chaque population par rapport au nombre de cellules présentes au départ (jour 1). Afin de s'assurer que nos techniques de dosage d'ADN et de dénombrement cellulaire étaient précises, nous avons évalué que la quantité d'ADN contenue dans une cellule équivalait à environ 7,5 pg d'ADN. D'ailleurs, cette valeur correspond à celle obtenue dans la littérature (Ackland et al. 1988).



**Figure 3.9 :** Contenu en ADN mesuré dans des feuillets cellulaires cultivés, à différentes périodes (14, 21 et 28 jours), selon les conditions de culture. Ratios calculés pour les feuillets produits avec les CSTA (A) et les FD (B). (N=2 populations par type cellulaire, n=3 feuillets produits par condition pour chaque population). Test de Student non païré effectué pour comparer les deux conditions de culture. One-way ANOVA, post-test Tukey effectué pour comparer les différents jours selon la condition de culture (# condition statique  $p < 0,05$  versus J28 et ## condition dynamique  $p < 0,01$  versus J28).

Dans un premier temps, une analyse comparative des ratios mesurés entre la condition statique et dynamique a été effectuée pour chaque type cellulaire utilisé lors de la production de feuillets. À la figure 3.9A, les résultats montrent qu'il n'y a pas d'écart

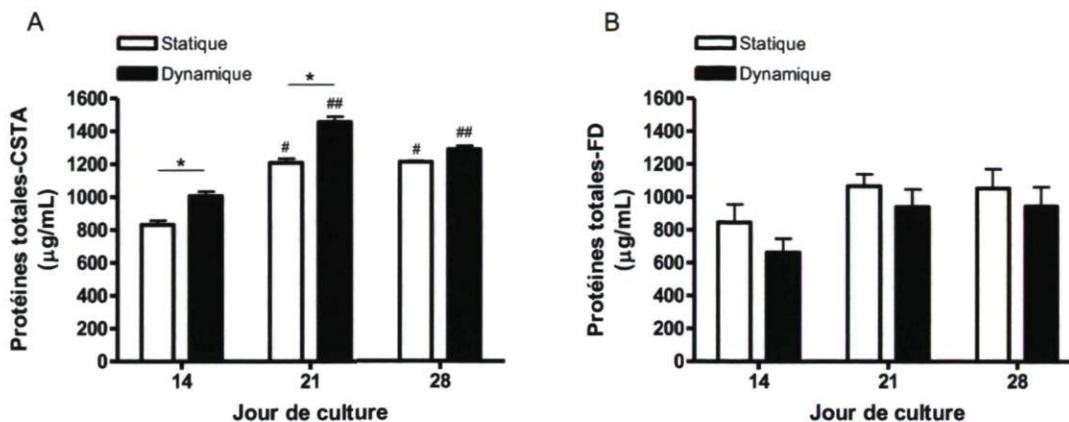
significatif entre les deux conditions de culture. Donc, si l'on compare uniquement les données de ratios relatifs d'ADN pour les deux conditions de culture, on peut dire que les CSTA ne prolifèrent pas davantage dans un contexte où le milieu est en mouvement constant. Concernant les résultats présentés à la figure 3.9B, il n'y a pas de différence significative entre les deux conditions de culture pour les tissus reconstruits avec les FD.

Dans un deuxième temps, une analyse de la prolifération cellulaire par rapport aux différents temps de culture correspondant aux jours 14, 21 et 28 a été réalisée. Aucune augmentation significative de la prolifération ne fut démontrée pour les feuillets reconstruits avec les CSTA (Figure 3.9, A). Les résultats mesurés pour les feuillets produits avec les FD montrent qu'il y a une légère augmentation significative des concentrations d'ADN avec le temps (Figure 3.9, B). Cependant, cette prolifération cellulaire par rapport au jour 1 de culture s'avère très minime sur la longue période de culture.

Il reste à vérifier la concentration des protéines totales composant les feuillets cellulaires afin de la corréler aux mesures d'épaisseur obtenues pour les tissus conjonctifs produits en culture dynamique à différents temps.

### Corrélation entre l'augmentation d'épaisseur des tissus et l'augmentation de la sécrétion et du dépôt de protéines

Afin de démontrer que la différence d'épaisseur observée pour des tissus reconstruits avec les CSTA en culture dynamique est due à une augmentation du dépôt et/ou de l'assemblage des protéines de la MEC, l'évaluation de la concentration des protéines totales par la méthode de dosage microBCA a été réalisée ainsi que le dosage de l'ADN total à partir des mêmes échantillons de feuillets cellulaires préalablement homogénéisés et divisés en deux parties à volume égal (voir section 2.4). Bien sûr, cette approche ne permet pas de déterminer précisément quel élément matriciel est le plus abondant dans la matrice extracellulaire des feuillets cellulaires. Par contre, elle donne un aperçu général de la densité protéique totale contenue dans les feuillets cellulaires.



**Figure 3.10 :** Influence de la culture dynamique sur le dépôt des protéines totales selon le temps de culture. Concentrations mesurées à partir d'homogénats de feuillets cellulaires reconstruits à différentes périodes de culture (14, 21 et 28 jours). Feuilletts produits avec les CSTA (A) et les FD (B). (N=2 populations par type cellulaire, n=3 feuillets cellulaires par condition pour chaque population). Test de Student non païré effectué pour comparer les deux conditions de culture (\* p < 0,05). One-way ANOVA, post-test Tukey effectué pour comparer les différents jours selon la condition de culture (# condition statique p < 0,01 versus J14 et ## condition dynamique p < 0,01 versus J14).

Premièrement, les résultats de la concentration protéique totale concernant les feuillets reconstruits à partir des CSTA (Figure 3.10, A) montrent qu'il y a davantage de protéines déposées en condition dynamique versus la condition statique aux jours 14 et 21. En comparant ces résultats avec ceux obtenus pour la prolifération cellulaire (figure 3.9, A), on constate que la culture dynamique affecte uniquement le dépôt protéique. La quantité moins élevée de protéines totales mesurées au jour 14 par rapport aux autres jours corrèle avec le fait qu'il y a un plus faible taux de réussite d'empilement des feuillets à ce temps (Tableau 3.1). Ceci est probablement d  à la plus faible quantité de protéines matricielles tel que le collagène qui contribue à la force de la MEC. De plus, puisque les équivalents reconstruits plus tôt (14 jours) sont aussi épais que les tissus reconstruit après 28 et 35 jours; et puisqu'il y a moins de protéines totales déposées, il se pourrait que ces tissus produits plus tôt (J14) soient moins denses. C'est-à-dire qu'ils pourraient être composés de plus de molécules d'eau au lieu de protéines de collagène par exemple. Étrangement, il ne semble pas y avoir de différence de concentration protéique entre les deux conditions de culture au jour 28. Il semble y avoir atteint d'un plateau. Les données obtenues à ce stade tardif (28 jours) de la production des feuillets cellulaires sont surprenantes puisqu'elles ne concordent

pas directement avec les valeurs d'épaisseur mesurées sur les tissus reconstruits après 35 jours (Figure 3.2 et 3.8), issus de l'empilement de trois feuillets produits après 28 jours. Par conséquent, il se pourrait que la culture dynamique dans un contexte tridimensionnel (tricoche) ait une influence sur la production de protéine de la MEC qui se reflèterait par la production de tissus plus épais.

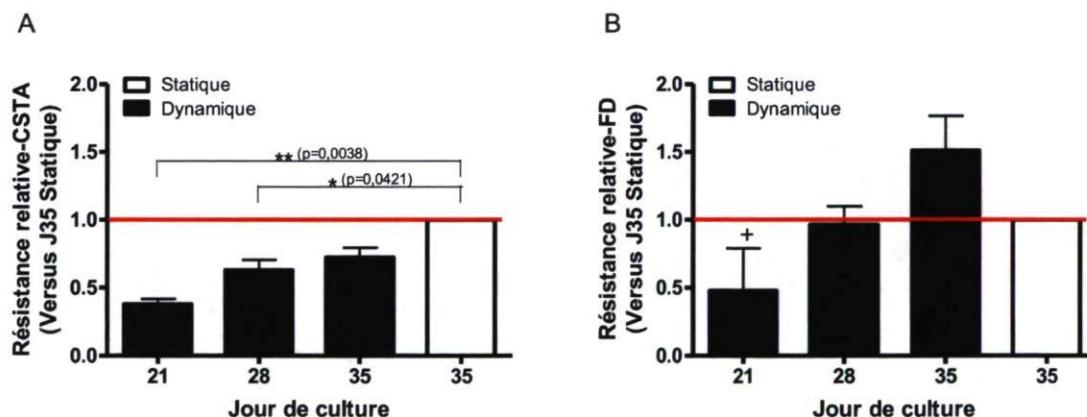
Deuxièmement, les résultats de la concentration protéique totale concernant les feuillets reconstruits à partir des FD (Figure 3.10, B) montrent qu'il n'y a pas de différence significative lorsque les deux conditions de culture sont comparées pour chaque période de culture. Lorsque les données de concentration protéique totale sont comparées selon les temps de culture, il n'y a pas d'augmentation significative. Ceci corrèle bien avec la similarité des épaisseurs mesurées pour les tissus reconstruits à différents temps (Figure 3.7 et 3.8).

Troisièmement, les valeurs de concentrations protéiques totales des feuillets produits avec les CSTA en condition dynamique et selon la durée de culture ont été comparées à celles obtenues à partir des FD. Après 14 et 21 jours, il y a environ 1,5 fois plus de protéines totales déposées dans les feuillets produits avec les CSTA par rapport aux feuillets reconstruits avec les FD. Après 28 jours, l'écart est de 1,4 fois. Par conséquent, il semble y avoir plus de protéines dans les feuillets produits avec les CSTA contrairement aux feuillets reconstruits à partir des FD dans un contexte de culture dynamique.

En résumé, les tissus reconstruits avec les CSTA à différents temps en condition de culture dynamique sont plus épais que ceux produits avec les FD et les concentrations totales protéiques mesurées corrèlent avec ces mêmes observations.

### 3.4 Résistance mécanique des tissus conjonctifs reconstruits

Après avoir reconstruit des tissus conjonctifs humains plus épais, dans un délai raccourci, une étude de la fonctionnalité des équivalents tissulaires a été réalisée. Cette étude sert à connaître les propriétés mécaniques des différents tissus. Ces données sont importantes dans une perspective d'application clinique telle que la greffe de tissu. Cette caractérisation de fonctionnalité tissulaire sert à vérifier s'il y a des différences mécaniques entre les tissus plus épais reconstruits à l'aide de la plateforme à mouvement giratoire et ceux fabriqués en culture statique. Tout d'abord, des tissus conjonctifs (tricouche) ont été reconstruits avec les CSTA et les FD à différentes périodes (21, 28 et 35 jours) en condition dynamique et statique (35 jours). Par la suite, ils furent soumis à un test de traction. Ce test permet d'évaluer la résistance de chacun des équivalents. Les données ainsi obtenues servent au calcul de la résistance mécanique maximale du tissu testé et définie par l'UTS (*Ultimate tensile strength*). Les valeurs d'UTS tiennent compte de l'épaisseur du tissu testé. Les mesures d'épaisseur de la zone centrale correspondant au site de rupture ont été utilisées pour le calcul de l'UTS.



**Figure 3.11** : Résistance mécanique des tissus conjonctifs humains reconstruits en culture dynamique et statique. Test d'étirement uniaxial effectué sur des tissus produits à partir des CSTA (A) et des FD (B). (N=3 populations par type cellulaire sauf + où N=2, n=1-3 tissus par condition pour chaque population). One-sample t-test effectué par rapport à la valeur de référence 1 (J35 statique).

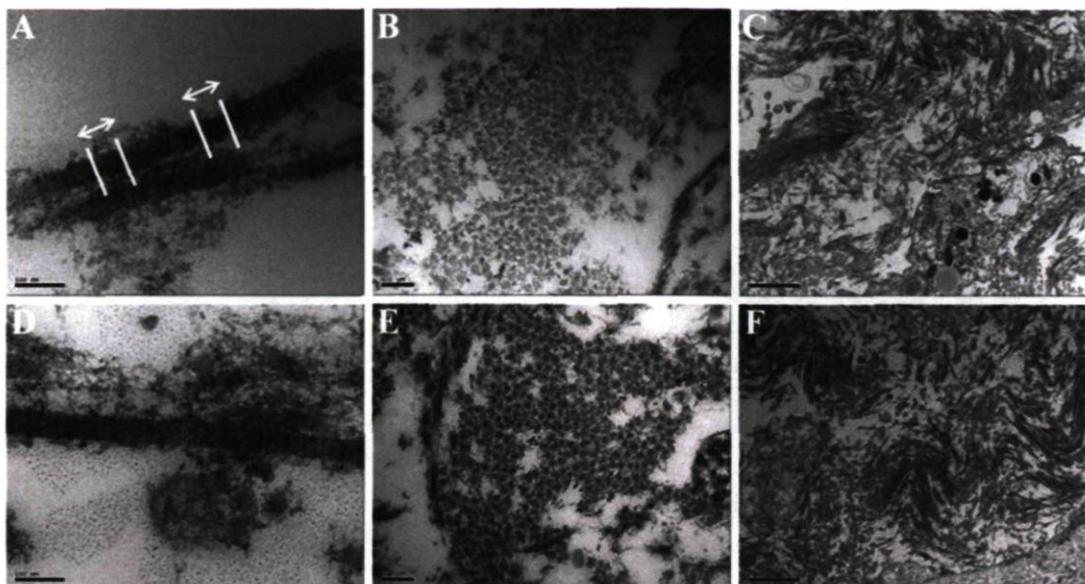
Les résultats illustrés à la figure 3.11A montrent que les tissus reconstruits avec les CSTA sont aussi résistants en condition dynamique et statique après 35 jours de culture. Les

valeurs calculées d'UTS sont de  $0,545 \pm 0,100$  MPa en condition statique et  $0,405 \pm 0,079$  MPa en condition dynamique. Malgré le fait que les tissus produits avec les CSTA soient plus épais après 21 et 28 jours en condition dynamique par rapport aux tissus produits après 35 jours en statique (Figure 3.8, A), ils ne sont pas plus résistants. En fait la résistance des tissus de 21 et 28 jours équivaut à 38% et 62% par rapport à celle calculée pour les tissus reconstruits en condition statique après 35 jours de culture. Les résultats illustrés à la figure 3.11B montrent que les tissus reconstruits avec les FD en culture dynamique aux jours 35 sont aussi résistants que ceux produits en statique après 35 jours. Les valeurs calculées d'UTS sont de  $0,547 \pm 0,268$  MPa en condition statique et  $0,701 \pm 0,218$  MPa en condition dynamique. De plus les résultats montrent que les tissus reconstruits après seulement 21 et 28 jours en condition dynamique sont aussi résistants que ceux de 35 jours cultivés en condition statique. Le petit nombre d'échantillons au J21 ne permet pas de conclure de façon certaine, mais reflète la difficulté à reconstruire des tissus manipulables en si peu de temps avec les FD.

Comme la résistance des tissus produits avec les CSTA durant différents temps en condition dynamique varie, il se pourrait que ce soit causé par une modification des composantes retrouvées dans la MEC telles que la fibronectine ou la décorine. Un autre élément à considérer qui pourrait influencer la résistance concerne l'ultrastructure des fibres de collagène dans les tissus. Il se pourrait que les fibres de collagène assemblées en condition dynamique ne soient pas similaires au niveau de la périodicité et de la densité, ce qui modifierait la résistance des tissus.

### **Ultrastructure des fibres de collagène**

Afin de consolider les résultats de résistance au jour 35 (similaire entre les deux conditions de culture), une analyse de l'ultrastructure des fibres de collagène a été réalisée. À partir des tissus reconstruits dans un délai de 35 jours en condition de culture statique et dynamique, des échantillons ont été analysés par microscopie électronique à transmission (MET). L'apparence des tissus reconstruits, avec les CSTA, en statique (Figure 3.12, A-C) semblait similaire aux tissus fabriqués en condition dynamique (Figure 3.12, D-F).



**Figure 3.12 :** Aspect en microscopie électronique à transmission d'un tissu conjonctif reconstruit avec les CSTA en culture statique et dynamique. Tissus reconstruit en culture statique (A-C) et dynamique (D-F). La périodicité (A, D), le diamètre/densité (B, E) et l'organisation générale des tissus (C, F) sont présentées. Barres = 100 nm (A, D), 0,2  $\mu\text{m}$  (B, E) et 2  $\mu\text{m}$  (C, F). Les flèches représentent la périodicité (A).

À la suite des observations réalisées à partir des photos prises en MET, des mesures pour la périodicité et le diamètre des fibres de collagène ont été réalisées à l'aide du logiciel Image J. La périodicité moyenne des fibres présentes dans les tissus reconstruits avec les CSTA et FD a été évaluée (Tableau 3.2) en mesurant la distance entre l'espace sombre et l'espace clair qui sépare la tête d'un tropocollagène par rapport à la queue d'un autre tropocollagène. Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre la périodicité des fibres de collagènes contenues dans les tissus produits en statique et ceux en dynamique. De plus, les valeurs mesurées se rapprochent de la valeur standard de 67 nm normalement retrouvée pour les tissus natifs (Abraham et al. 2008). Le diamètre des fibres de collagène a également été évalué (Tableau 3.2) et les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux conditions de culture analysées. Lorsque la périodicité et le diamètre moyen mesuré pour les fibres de collagène contenues dans les tissus conjonctifs reconstruits avec les CSTA sont comparés avec ceux des tissus produits à partir des FD, aucune différence significative n'est observée.

**Tableau 3.2 :** Comparaison de la périodicité et de la densité des fibres de collagène contenues dans les tissus conjonctifs humains reconstruits selon la condition de culture.

Type cellulaire	Paramètre	Culture	
		Statique	Dynamique
CSTA	Périodicité (nm)	54.7 ± 1.3	55.2 ± 1.3 <sup>a</sup>
	Diamètre (nm)	39.4 ± 2.9	38.6 ± 0.5 <sup>b</sup>
FD	Périodicité (nm)	54.4 ± 2.6	53.1 ± 0.1 <sup>a</sup>
	Diamètre (nm)	54.1 ± 8.7	46.1 ± 8.9 <sup>b</sup>

Test de Student, non pairé effectué entre la condition statique et dynamique pour la périodicité (a) et le diamètre (b) des fibres de collagène. Moyenne ± SEM, N=2-3 populations par type cellulaire, n=2-3 tissus par condition pour chaque population, 3 photos par condition, n=6-12 mesures par photo.

Comme des différences significatives de la résistance des tissus reconstruits selon la période de culture en condition dynamique à partir des CSTA ont été montrées précédemment (Figure 3.11, A), il serait intéressant de comparer la périodicité et le diamètre des fibres de collagène pour ces mêmes tissus cultivés à différentes périodes.

## **Chapitre 4 : Discussion**

## **4.1 Impact de la culture dynamique sur la reconstruction de tissus conjonctifs**

Les travaux réalisés lors de mon projet de maîtrise et présentés dans ce mémoire m'ont permis d'atteindre l'objectif principal qui consistait à vérifier si la méthode d'auto-assemblage, développée au LOEX (L'Heureux et al. 1998), pouvait être optimisée à l'aide d'une culture dite dynamique. Les premiers résultats présentés de reconstruction de tissus conjonctifs humains en culture dynamique et statique ont démontré clairement que les CSTA formaient des tissus 1,8 fois plus épais en condition dynamique tandis que les FD ne formaient pas de tissu plus épais, après 35 jours de culture. Non seulement les tissus sont plus épais, avec une épaisseur approximative de 300  $\mu\text{m}$  comparativement à 160  $\mu\text{m}$  en condition statique, mais ils sont également facilement manipulables.

À la suite des analyses effectuées et des résultats obtenus sur les tissus plus épais, nous avons considéré la possibilité de reconstruire des feuillets en moins de temps. Les résultats présentés ont montré qu'il était possible de réduire de 2 semaines les délais de production tissulaire.

En plus d'évaluer l'aspect histologique des tissus conjonctifs humains reconstruits en condition statique et dynamique, nous avons évalué la fonctionnalité de ces derniers en effectuant un test de résistance mécanique. Les résultats ont montré que les tissus produits après 35 jours à partir des CSTA ou des FD en condition statique et dynamique étaient aussi résistants. D'ailleurs, l'évaluation de l'ultrastructure des fibres de collagènes pour le diamètre et la périodicité a montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre les deux conditions de culture et ceci a permis de consolider les résultats de résistance mécanique après 35 jours de culture.

La résistance des tissus produits en 21 et 28 jours de culture équivaut à 38% et 62% par rapport à celle calculée pour les tissus reconstruits après 35 jours de culture statique. Toutefois, cette diminution n'est pas critique si l'on considère ces tissus en tant que matériaux de base pour la reconstruction de tissus spécialisés tel que pour la vessie ou la peau. Puisque les cellules épithéliales de ces tissus spécialisés remodelent la MEC, alors la

résistance initiale des tissus conjonctifs reconstruits s'avère un indicateur utile mais non final de la résistance mécanique qui caractérisera le tissu avant son utilisation clinique.

Il est important de noter que pour la majorité des expériences réalisées pour ce projet de maîtrise, nous avons choisi de travailler avec plusieurs donneurs différents afin de s'assurer que les observations réalisées pour chaque population individuellement étaient également observables pour la population en général. Bien sûr, ceci a augmenté la variabilité pour chaque paramètre étudié, mais ceci a permis d'établir quels effets étaient vraiment significatifs pour toutes les populations cellulaires étudiées.

Comme la culture dynamique a eu un impact important au niveau de l'épaisseur des tissus, une étude plus approfondie visant à déterminer quels mécanismes en étaient responsables a été menée. Par le fait même, des réponses aux deux hypothèses de travail ont pu être obtenues. La première hypothèse était que l'application d'un milieu en mouvement sur les équivalents aurait une influence au niveau cellulaire. Tel que vu pour d'autres études, cet effet se répercuterait, soit par une modification de la prolifération cellulaire (Mizuno et al. 2002b, Wang et al. 2003), soit par des modifications post-transductionnelles ou par une augmentation de la synthèse d'éléments de la matrice extracellulaire (Connelly et al. 2010, Elhadj et al. 2002, Gemmiti et al. 2009, Zhao et al. 2009). La deuxième hypothèse était que l'augmentation d'épaisseur serait due à un effet physique. L'application d'un flux dans les cultures pourrait engendrer une augmentation de l'efficacité de l'assemblage des fibrilles/tropocollagènes. Ces modifications se refléteraient par une augmentation du dépôt des éléments de la matrice extracellulaire (Lareu et al. 2007a, Lareu et al. 2007b, Peng et al. 2010, Saeidi et al. 2009).

Premièrement, l'hypothèse selon laquelle la culture dynamique aurait un effet physique a été légèrement écartée. Rappelons que l'effet physique suggéré par Lareu et ses collaborateurs (Lareu et al. 2007a, Lareu et al. 2007b) est défini par une augmentation de la densité des composantes insolubles retrouvées dans le milieu de culture. Ceci aurait pour effet d'augmenter l'association des procollagènes entre eux. De plus, il est suggéré que cet effet physique augmenterait les contacts entre les procollagènes et les enzymes responsables de la réticulation telle que la lysyl oxydase (LOX). Ainsi, une culture dynamique qui augmenterait les contacts protéines-protéines insolubles comme il est

suggéré dans la littérature (Lareu et al. 2007a, Lareu et al. 2007b, Peng et al. 2010) aurait donc pour conséquence d'augmenter le dépôt des collagènes de la MEC. Par conséquent, l'épaisseur des tissus conjonctifs humains reconstruits serait augmentée. D'une part, le fait de montrer que l'épaisseur des tissus à partir des FD cultivés après 35 jours en condition dynamique et statique ne varie pas, représente une preuve de l'absence d'un effet physique causé par la culture dynamique. Comme nous n'avons pas évalué la présence des procollagènes insolubles dans le milieu de culture, ceci n'écarte pas l'hypothèse selon laquelle les CSTA réagiraient différemment au traitement de la culture dynamique en sécrétant plus d'éléments matriciels. C'est pourquoi, il serait intéressant de doser les éléments insolubles dans les surnageants de culture. Pour ce faire, nous pourrions utiliser le réactif Sirius Red pour doser les collagènes non déposés dans la MEC. Il existe un protocole couramment utilisé pour ce type d'analyse (Lai et al. 2009, Lareu et al. 2010, Lee et al. 1998, Nerurkar et al. 2010, Wang et al. 2005). Également, il serait intéressant d'analyser l'activité enzymatique de la LOX. Celle-ci est notamment responsable de la réticulation des tropocollagènes en fibrilles de collagène (Kolacna et al. 2007).

Deuxièmement, l'hypothèse selon laquelle la culture dynamique aurait un effet au niveau cellulaire a été étudiée. Évidemment, d'autres facteurs non considérés lors de mon projet de maîtrise restent à être évalués. Dans la littérature, des études réalisées pour la production de tissus conjonctifs à partir de fibroblastes (Mizuno et al. 2002b, Wang et al. 2003) ou de cellules souches mésenchymateuses (Wang et al. 2010, Zhao et al. 2009) ont démontré que la culture dynamique (perfusion, flux, etc) favorisait la prolifération cellulaire et pouvait augmenter la synthèse et le dépôt du collagène dans la matrice extracellulaire. Nos résultats suggèrent que ces processus ne seraient pas majoritairement responsables de l'augmentation de l'épaisseur des tissus dans notre système.

D'abord, nous avons évalué si la culture dynamique avait un effet au niveau de la prolifération et ensuite sur la synthèse de la MEC. Pour la prolifération cellulaire, nous avons vu qu'il n'y avait pas de différence entre les deux conditions de culture analysées après 35 jours, et ce peu importe le type cellulaire utilisé pour reconstruire un tissu conjonctif. Comme aucune différence n'a été observée, nous avons vérifié la prolifération cellulaire entre la condition de culture statique et dynamique à partir de feuillets produits

plus tôt, soit après 7 jours de culture. Encore une fois, aucune différence n'a été observée. Comme il n'y avait pas de différence à la fin et au tout début du processus de reconstruction des tissus conjonctifs, nous avons vérifié après 14, 21 et 28 jours à partir de feuillets cellulaires. Les résultats présentés à la figure 3.9A ont montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre les deux conditions de culture pour les feuillets produits avec les CSTA après 14, 21 et 28 jours de culture. Donc, la culture avec un mouvement tridimensionnel continu ne semble pas avoir d'impact important au niveau de la prolifération cellulaire comparativement à la culture statique et ce, tout au long du processus de formation des tissus produits à partir des CSTA.

Par la suite, nous avons évalué si la culture dynamique avait un impact au niveau de la synthèse de la MEC. Pour ce faire, une étude sur l'expression des transcrits codant pour des gènes impliqués dans la synthèse de la MEC a été réalisée. Cette évaluation a d'abord été effectuée à partir des tissus reconstruits durant 35 jours selon les conditions de culture statique et dynamique. Comme le collagène représente l'élément majeur dans les tissus conjonctifs humains, il s'est avéré une cible de choix pour l'étude de la synthèse de la MEC. Après 35 jours, les résultats ont montré qu'il n'y avait pas de différence significative pour l'expression des gènes COL1A1, COL3A1 et COL5A2 pour les tissus reconstruits avec les CSTA. Par contre, COL3A1, COL5A2 se sont avérés davantage exprimés en condition dynamique pour les équivalents tissulaires produits avec les FD. Normalement, plus il y a d'ARNm, plus il y a de protéines synthétisées. Cependant, les résultats ne corrélaient pas avec cette affirmation au jour 35 lorsque l'épaisseur des tissus est prise en considération. Ces résultats de QPCR au jour 35 suggèrent aussi que le processus de formation de la MEC est probablement modifié plus tôt par la culture dynamique. C'est pourquoi nous avons vérifié les mêmes paramètres au tout début de la culture (7 jours). Nous n'avons obtenu aucune différence encore une fois. Bien que l'augmentation de l'épaisseur des tissus produits avec les CSTA ne corrèle pas avec une augmentation des transcrits, il se peut, dans ce cas-ci, que les ARNm ne reflètent pas les niveaux protéiques obtenus. Dans la littérature, des constats semblables (Trackman 2005) sont suggérés. Enfin, il est fort probable qu'à la suite d'analyse par immunobuvardage (*Western blot*) sur des protéines de la MEC tel que pour les collagènes I, III et V, nous observions des différences entre les conditions de culture statique et dynamique. Ces tests restent à faire.

Comme les mécanismes conduisant à une augmentation de l'épaisseur des tissus conjonctifs humains reconstruits à partir des CSTA n'ont pu être déterminés précisément, il reste que dans la MEC, une grande variété de protéines structurelles s'y retrouve. Bien que nous ayons concentré nos efforts sur l'étude des gènes codant pour des collagènes importants et présents dans la matrice extracellulaire de tissus conjonctifs, il va de soit que d'autres protéines comme la fibronectine et/ou la décorine pourraient être considérées. Ces protéines pourraient être responsables de l'augmentation de la MEC. Également, elles pourraient faire varier d'autres molécules qui font elles-mêmes augmenter la synthèse ou la dépôt, l'assemblage de la MEC. La fibronectine est d'ailleurs reconnue pour être présente en grande proportion dans les tissus adipeux contenant les CSTA (Kubo et al. 2000).

Également, il serait intéressant d'effectuer des tests recourant à la protéomique afin de déterminer précisément les protéines majoritaires contenues dans les tissus reconstruits selon les conditions de culture. Comme il n'existe actuellement pas de micro-puces de type «*Protein array*» pour les protéines de la MEC, nous pourrions dans un premier temps effectuer des tests avec des micro-puces à ADN à partir d'équivalents tissulaires produits en condition de culture dynamique et statique, pour ensuite vérifier les gènes intéressants au niveau protéique.

## **4.2 Avantages et perspectives**

Le modèle de tissus conjonctifs humains reconstruits à partir de CSTA est très intéressant pour la reconstruction de tissus spécialisés tels que la peau, la vessie et même la cornée. D'ailleurs, ces tissus spécialisés ont déjà été reconstruits dans le passé par la méthode d'auto-assemblage à partir des FD (Bouhout et al. 2010, Carrier et al. 2009, Magnan et al. 2009, Michel et al. 1999, Vermette et al. 2007).

Également, le modèle de tissus conjonctifs reconstruits avec les CSTA en condition dynamique pourrait être appliqué pour tenter de produire des tissus plus épais vascularisés et ainsi combler le besoin en nutriments et en oxygène des cellules contenues dans le tissu. Il est reconnu que les cellules stromales du tissu adipeux sécrètent des facteurs importants favorisant l'angiogenèse (Rehman et al. 2004). Merfeld-Clauss et ses collaborateurs

(Merfeld-Clauss et al. 2010) ont montré que l'interaction de cellules stromales isolées du tissu adipeux et des cellules endothéliales favorisait la formation de tubules vasculaires. Comme notre équipe travaille déjà sur l'élaboration d'équivalents tissulaires adipeux vascularisés (Vincent 2010), il serait intéressant de poursuivre les recherches en cultivant des CSTA, issues du tissu adipeux, en présence de cellules endothéliales dans un contexte de culture dynamique pour aider au développement d'un système vasculaire dans un tissu conjonctif nouvellement reconstruit.

De plus, comme les CSTA contiennent une population de cellules souches (Strem et al. 2005), elles ont été utilisées pour reconstruire des tissus spécialisés adipeux (Fischbach et al. 2004) ou osseux (Knippenberg et al. 2005) en condition dynamique. Notre équipe, qui reconstruit aussi de tel tissus (Trottier et al. 2008, Vallee et al. 2009, Vermette et al. 2007) travaille maintenant à l'élaboration de ces équivalents à partir de la même plate-forme agitatrice utilisée lors de mon projet de maîtrise.

D'un point de vue économique, le fait de réduire considérablement les délais de reconstruction tissulaire a un impact important au niveau des coûts de production. Comme la méthode d'auto-assemblage nécessite l'utilisation d'un milieu de culture supplémenté de sérum dispendieux lors de la culture des tissus, il va de soi qu'en diminuant le temps requis pour produire un tissu conjonctif humain *in vitro*, nous diminuons grandement les coûts de production.

Il a déjà été montré qu'un stroma remplaçant le derme de la peau pouvait être reconstruit avec les CSTA (Trottier et al. 2008). D'un point de vue clinique, en raccourcissant de 2 semaines la production des tissus par la méthode d'auto-assemblage, ceci aurait des conséquences importantes pour un patient en attente de greffe de peau. Ainsi, les risques d'infections cutanées bactériennes au *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* seraient énormément réduits. Par conséquent, les problèmes d'infections, qui sont l'une des principales causes menant au décès des grands brûlés en attente de greffe (Church et al. 2006, Sharma 2007), seraient largement diminués. Par ailleurs, l'utilisation d'un tissu reconstruit sans l'emploi de biomatériau exogène permettrait de diminuer les risques de réactions immunologiques.

Non seulement la culture dynamique est bénéfique pour la reconstruction de tissus conjonctifs par la méthode d'auto-assemblage avec les CSTA, mais il faut mentionner que la plate-forme agitatrice 3D (Fisher Scientific Ocelot Rotator) représente une alternative intéressante à l'utilisation de bioréacteurs. Ce type d'appareil a l'avantage d'être simple et facile à manipuler. Il permet de produire simultanément un nombre considérable d'échantillons contrairement aux bioréacteurs dans lesquels l'échantillonnage demeure restreint faute d'espace suffisant. Ainsi, ce n'est seulement qu'un faible nombre d'équivalents qui sont reconstruits dans les mêmes conditions sur la même période de temps lorsqu'un bioréacteur classique est utilisé. Enfin, la plate-forme agitatrice, qui est peu dispendieuse contrairement aux bioréacteurs, nécessite peu de connaissances en ingénierie due à sa simplicité d'utilisation.

Finalement, l'utilisation des CSTA s'est avérée plus prometteuse que celle avec les FD puisqu'elles réagissaient positivement à une culture en mouvement continu, résultant en la production de tissus facilement malléables, plus épais et produits en 40% moins de temps.

## **Chapitre 5 : Conclusion**

Cette étude qui avait pour but d'évaluer l'impact de la culture dynamique sur la reconstruction de tissus conjonctifs par génie tissulaire a montré qu'il était possible de produire des tissus plus épais en peu de temps à partir de CSTA à l'aide de cette approche facile à utiliser. Toutefois, les résultats obtenus lors de cette étude soulèvent plusieurs questions quant aux mécanismes impliqués dans la formation du tissu reconstruit en culture dynamique.

Il est important de souligner que ce genre de tissus conjonctifs reconstruits à partir des CSTA représente des éléments matriciels de base (stroma) pour la reconstruction de substituts cutanés ou vésicaux humains.

L'intérêt de cette méthode de culture dynamique, complémentaire à l'auto-assemblage, est qu'elle permet de réduire considérablement, de 2 semaines, le temps requis en culture pour reconstruire un tissu conjonctif. Par conséquent, les coûts de production sont diminués et ultimement le temps de production des substituts cutanés, par exemple, serait diminué en utilisant cette technique. Ceci réduirait considérablement le temps d'attente pour les patients nécessitant une greffe.

Enfin, les cellules stromales/souches isolées du tissu adipeux (CSTA) représentent donc une source cellulaire complémentaire ou alternative à l'utilisation des fibroblastes dermiques pour la reconstruction d'un tissu conjonctif et ouvre la porte à de nouveaux développements en génie tissulaire. L'avantage principal de l'utilisation de ces cellules provient de leur accessibilité, de leur disponibilité de même que de leur potentiel de différenciation diversifié.

## Bibliographie

- Abraham LC, Zuena E, Perez-Ramirez B, Kaplan DL. Guide to collagen characterization for biomaterial studies. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008 Oct;87(1):264-85.
- Ackland ML, Danks DM, McArdle HJ. Studies on the mechanism of zinc uptake by human fibroblasts. *J Cell Physiol*. 1988 Jun;135(3):521-6.
- Anghileri E, Marconi S, Pignatelli A, Cifelli P, Galie M, Sbarbati A, Krampera M, Belluzzi O, Bonetti B. Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2008 Oct;17(5):909-16.
- Ashjian PH, Elbarbary AS, Edmonds B, DeUgarte D, Zhu M, Zuk PA, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrick MH. In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. *Plast Reconstr Surg*. 2003 May;111(6):1922-31.
- Auger FA, Lopez Valle CA, Guignard R, Tremblay N, Noel B, Goulet F, Germain L. Skin equivalent produced with human collagen. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 1995 Jun;31(6):432-9.
- Badylak SF, Record R, Lindberg K, Hodde J, Park K. Small intestinal submucosa: a substrate for in vitro cell growth. *J Biomater Sci Polym Ed*. 1998;9(8):863-78.
- Bancroft GN, Sikavitsas VI, van den Dolder J, Sheffield TL, Ambrose CG, Jansen JA, Mikos AG. Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Oct 1;99(20):12600-5.
- Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. Integrins. *Cell Tissue Res*. 2010 Jan;339(1):269-80.
- Bauer EA, Stricklin GP, Jeffrey JJ, Eisen AZ. Collagenase production by human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 1975 May 5;64(1):232-40.
- Becker AJ, Mc CE, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*. 1963 Feb 2;197:452-4.
- Bell E, Ehrlich HP, Buttle DJ, Nakatsuji T. Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science*. 1981 Mar 6;211(4486):1052-4.
- Berson RE, Purcell MR, Sharp MK. Computationally determined shear on cells grown in orbiting culture dishes. *Adv Exp Med Biol*. 2008;614:189-98.

- Berthod F, Damour O. In vitro reconstructed skin models for wound coverage in deep burns. *Br J Dermatol*. 1997 Jun;136(6):809-16.
- Bornstein P, Agah A, Kyriakides TR. The role of thrombospondins 1 and 2 in the regulation of cell-matrix interactions, collagen fibril formation, and the response to injury. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Jun;36(6):1115-25.
- Bouhout S, Perron E, Gauvin R, Bernard G, Ouellet G, Cattan V, Bolduc S. In vitro reconstruction of an autologous, watertight, and resistant vesical equivalent. *Tissue Eng Part A*. 2010 May;16(5):1539-48.
- Brown-Etris M, Cutshall WD, Hiles MC. A new biomaterial derived from small intestine submucosa and developed into a wound matrix device. *Wounds-a Compendium of Clinical Research and Practice*. 2002 May;14(4):150-66.
- Brown TD. Techniques for mechanical stimulation of cells in vitro: a review. *J Biomech*. 2000 Jan;33(1):3-14.
- Buckley CT, O'Kelly KU. Maintaining cell depth viability: on the efficacy of a trimodal scaffold pore architecture and dynamic rotational culturing. *J Mater Sci Mater Med*. 2010 May;21(5):1731-8.
- Burd A. Evaluating the use of hydrogel sheet dressings in comprehensive burn wound care. *Ostomy Wound Manage*. 2007 Mar;53(3):52-62.
- Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991 Sep;9(5):641-50.
- Carrier P, Deschambeault A, Audet C, Talbot M, Gauvin R, Giasson CJ, Auger FA, Guerin SL, Germain L. Impact of cell source on human cornea reconstructed by tissue engineering. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009 Jun;50(6):2645-52.
- Catalan V, Gomez-Ambrosi J, Rotellar F, Silva C, Rodriguez A, Salvador J, Gil MJ, Cienfuegos JA, Fruhbeck G. Validation of endogenous control genes in human adipose tissue: relevance to obesity and obesity-associated type 2 diabetes mellitus. *Horm Metab Res*. 2007 Jul;39(7):495-500.
- Chary SR, Jain RK. Direct measurement of interstitial convection and diffusion of albumin in normal and neoplastic tissues by fluorescence photobleaching. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Jul;86(14):5385-9.
- Church D, Elsayed S, Reid O, Winston B, Lindsay R. Burn wound infections. *Clin Microbiol Rev*. 2006 Apr;19(2):403-34.
- Chvapil M. Collagen sponge: theory and practice of medical applications. *J Biomed Mater Res*. 1977 Sep;11(5):721-41.

- Connelly JT, Vanderploeg EJ, Mouw JK, Wilson CG, Levenston ME. Tensile loading modulates bone marrow stromal cell differentiation and the development of engineered fibrocartilage constructs. *Tissue Eng Part A*. 2010 Jun;16(6):1913-23.
- Cronin KJ, Messina A, Knight KR, Cooper-White JJ, Stevens GW, Penington AJ, Morrison WA. New murine model of spontaneous autologous tissue engineering, combining an arteriovenous pedicle with matrix materials. *Plast Reconstr Surg*. 2004 Jan;113(1):260-9.
- Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*. 2001 Nov 23;294(5547):1708-12.
- Culav EM, Clark CH, Merrilees MJ. Connective tissues: matrix composition and its relevance to physical therapy. *Phys Ther*. 1999 Mar;79(3):308-19.
- Cuono C, Langdon R, McGuire J. Use of cultured epidermal autografts and dermal allografts as skin replacement after burn injury. *Lancet*. 1986 May 17;1(8490):1123-4.
- Daher SR, Johnstone BH, Phinney DG, March KL. Adipose stromal/stem cells: basic and translational advances: the IFATS collection. *Stem Cells*. 2008 Oct;26(10):2664-5.
- Damour O, Gueugniaud PY, Berthin-Maghit M, Rousselle P, Berthod F, Sahuc F, Collombel C. A dermal substrate made of collagen--GAG--chitosan for deep burn coverage: first clinical uses. *Clin Mater*. 1994;15(4):273-6.
- Dardik A, Chen L, Frattini J, Asada H, Aziz F, Kudo FA, Sumpio BE. Differential effects of orbital and laminar shear stress on endothelial cells. *J Vasc Surg*. 2005 May;41(5):869-80.
- Datta N, Pham QP, Sharma U, Sikavitsas VI, Jansen JA, Mikos AG. In vitro generated extracellular matrix and fluid shear stress synergistically enhance 3D osteoblastic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Feb 21;103(8):2488-93.
- Dayan N. An integrated approach to biochemistry and product development. *Skin aging handbook 2008*.
- DeMali KA, Wennerberg K, Burridge K. Integrin signaling to the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*. 2003 Oct;15(5):572-82.
- Doillon CJ, Cote MF, Pietrucha K, Laroche G, Gaudreault RC. Porosity and biological properties of polyethylene glycol-conjugated collagen materials. *J Biomater Sci Polym Ed*. 1994;6(8):715-28.

- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
- Elhadj S, Mousa SA, Forsten-Williams K. Chronic pulsatile shear stress impacts synthesis of proteoglycans by endothelial cells: effect on platelet aggregation and coagulation. *J Cell Biochem*. 2002;86(2):239-50.
- Elliott RA, Jr., Hoehn JG. Use of commercial porcine skin for wound dressings. *Plast Reconstr Surg*. 1973 Oct;52(4):401-5.
- Emerson SG, Sieff CA, Wang EA, Wong GG, Clark SC, Nathan DG. Purification of fetal hematopoietic progenitors and demonstration of recombinant multipotential colony-stimulating activity. *J Clin Invest*. 1985 Sep;76(3):1286-90.
- Fernandes DJ, Bonacci JV, Stewart AG. Extracellular matrix, integrins, and mesenchymal cell function in the airways. *Curr Drug Targets*. 2006 May;7(5):567-77.
- Fischbach C, Seufert J, Staiger H, Hacker M, Neubauer M, Gopferich A, Blunk T. Three-dimensional in vitro model of adipogenesis: comparison of culture conditions. *Tissue Eng*. 2004 Jan-Feb;10(1-2):215-29.
- Fischer LJ, McIlhenny S, Tulenko T, Golesorkhi N, Zhang P, Larson R, Lombardi J, Shapiro I, DiMuzio PJ. Endothelial differentiation of adipose-derived stem cells: effects of endothelial cell growth supplement and shear force. *J Surg Res*. 2009 Mar;152(1):157-66.
- Flynn L, Semple JL, Woodhouse KA. Decellularized placental matrices for adipose tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2006 Nov;79(2):359-69.
- Folkman J, Hochberg M. Self-regulation of growth in three dimensions. *J Exp Med*. 1973 Oct 1;138(4):745-53.
- Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 1968 Mar;6(2):230-47.
- Frye CA, Patrick CW. Three-dimensional adipose tissue model using low shear bioreactors. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2006 May-Jun;42(5-6):109-14.
- Gemmiti CV, Guldberg RE. Shear stress magnitude and duration modulates matrix composition and tensile mechanical properties in engineered cartilaginous tissue. *Biotechnol Bioeng*. 2009 Nov 1;104(4):809-20.
- Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*. 2007 May 11;100(9):1249-60.

- Gould BS, Woessner JF. Biosynthesis of collagen; the influence of ascorbic acid on the proline, hydroxyproline, glycine, and collagen content of regenerating guinea pig skin. *J Biol Chem.* 1957 May;226(1):289-300.
- Grayson WL, Bhumiratana S, Cannizzaro C, Chao PH, Lennon DP, Caplan AI, Vunjak-Novakovic G. Effects of initial seeding density and fluid perfusion rate on formation of tissue-engineered bone. *Tissue Eng Part A.* 2008 Nov;14(11):1809-20.
- Grayson WL, Martens TP, Eng GM, Radisic M, Vunjak-Novakovic G. Biomimetic approach to tissue engineering. *Semin Cell Dev Biol.* 2009 Aug;20(6):665-73.
- Green JA, Yamada KM. Three-dimensional microenvironments modulate fibroblast signaling responses. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007 Nov 10;59(13):1293-8.
- Grillo HC, Gross J. Thermal reconstitution of collagen from solution and the response to its heterologous implantation. *J Surg Res.* 1962 Jan;2:69-82.
- Grinnell F, Fukamizu H, Pawelek P, Nakagawa S. Collagen processing, crosslinking, and fibril bundle assembly in matrix produced by fibroblasts in long-term cultures supplemented with ascorbic acid. *Exp Cell Res.* 1989 Apr;181(2):483-91.
- Hardingham TE, Fosang AJ. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J.* 1992 Feb 1;6(3):861-70.
- Hata R, Senoo H. L-ascorbic acid 2-phosphate stimulates collagen accumulation, cell proliferation, and formation of a three-dimensional tissuelike substance by skin fibroblasts. *J Cell Physiol.* 1989 Jan;138(1):8-16.
- Ishikawa O, Kondo A, Okada K, Miyachi Y, Furumura M. Morphological and biochemical analyses on fibroblasts and self-produced collagens in a novel three-dimensional culture. *Br J Dermatol.* 1997 Jan;136(1):6-11.
- Kim Y, Boyd CD, Csiszar K. A new gene with sequence and structural similarity to the gene encoding human lysyl oxidase. *J Biol Chem.* 1995 Mar 31;270(13):7176-82.
- Kivirikko KI, Myllyharju J. Prolyl 4-hydroxylases and their protein disulfide isomerase subunit. *Matrix Biol.* 1998 Feb;16(7):357-68.
- Knippenberg M, Helder MN, Doulabi BZ, Semeins CM, Wuisman PI, Klein-Nulend J. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells acquire bone cell-like responsiveness to fluid shear stress on osteogenic stimulation. *Tissue Eng.* 2005 Nov-Dec;11(11-12):1780-8.

- Kolacna L, Bakesova J, Varga F, Kostakova E, Planka L, Necas A, Lukas D, Amler E, Pelouch V. Biochemical and biophysical aspects of collagen nanostructure in the extracellular matrix. *Physiol Res*. 2007;56 Suppl 1:S51-60.
- Kreke MR, Sharp LA, Lee YW, Goldstein AS. Effect of intermittent shear stress on mechanotransductive signaling and osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells. *Tissue Eng Part A*. 2008 Apr;14(4):529-37.
- Kropp BP, Rippey MK, Badylak SF, Adams MC, Keating MA, Rink RC, Thor KB. Regenerative urinary bladder augmentation using small intestinal submucosa: urodynamic and histopathologic assessment in long-term canine bladder augmentations. *J Urol*. 1996 Jun;155(6):2098-104.
- Kubo Y, Kaidzu S, Nakajima I, Takenouchi K, Nakamura F. Organization of extracellular matrix components during differentiation of adipocytes in long-term culture. In *Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2000 Jan;36(1):38-44.
- L'Heureux N, Germain L, Labbe R, Auger FA. In vitro construction of a human blood vessel from cultured vascular cells: a morphologic study. *J Vasc Surg*. 1993 Mar;17(3):499-509.
- L'Heureux N, Paquet S, Labbe R, Germain L, Auger FA. A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J*. 1998 Jan;12(1):47-56.
- Lai KB, Sanderson JE, Yu CM. Suppression of collagen production in norepinephrine stimulated cardiac fibroblasts culture: differential effect of alpha and beta-adrenoreceptor antagonism. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2009 Aug;23(4):271-80.
- Lamme EN, Van Leeuwen RT, Brandsma K, Van Marle J, Middelkoop E. Higher numbers of autologous fibroblasts in an artificial dermal substitute improve tissue regeneration and modulate scar tissue formation. *J Pathol*. 2000 Apr;190(5):595-603.
- Lareu RR, Arsianti I, Subramhanya HK, Yanxian P, Raghunath M. In vitro enhancement of collagen matrix formation and crosslinking for applications in tissue engineering: a preliminary study. *Tissue Eng*. 2007a Feb;13(2):385-91.
- Lareu RR, Subramhanya KH, Peng Y, Benny P, Chen C, Wang Z, Rajagopalan R, Raghunath M. Collagen matrix deposition is dramatically enhanced in vitro when crowded with charged macromolecules: the biological relevance of the excluded volume effect. *FEBS Lett*. 2007b Jun 12;581(14):2709-14.
- Lareu RR, Zeugolis DI, Abu-Rub M, Pandit A, Raghunath M. Essential modification of the Sircol Collagen Assay for the accurate quantification of collagen content in complex protein solutions. *Acta Biomater*. 2010 Aug;6(8):3146-51.

- Lee DA, Assoku E, Doyle V. A specific quantitative assay for collagen synthesis by cells seeded in collagen-based biomaterials using sirius red F3B precipitation. *J Mater Sci Mater Med*. 1998 Jan;9(1):47-51.
- Lee KY, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering. *Chem Rev*. 2001 Jul;101(7):1869-79.
- Levenberg S, Langer R. Advances in tissue engineering. *Curr Top Dev Biol*. 2004;61:113-34.
- Lew DH, Liu PH, Orgill DP. Optimization of UV cross-linking density for durable and nontoxic collagen GAG dermal substitute. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007 Jul;82(1):51-6.
- Li Y, Schellhorn HE. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *J Nutr*. 2007 Oct;137(10):2171-84.
- Magnan M, Berthod F, Champigny MF, Soucy F, Bolduc S. In vitro reconstruction of a tissue-engineered endothelialized bladder from a single porcine biopsy. *J Pediatr Urol*. 2006 Aug;2(4):261-70.
- Magnan M, Levesque P, Gauvin R, Dube J, Barrieras D, El-Hakim A, Bolduc S. Tissue engineering of a genitourinary tubular tissue graft resistant to suturing and high internal pressures. *Tissue Eng Part A*. 2009 Jan;15(1):197-202.
- Mehta R, Birerdinc A, Hossain N, Afendy A, Chandhoke V, Younossi Z, Baranova A. Validation of endogenous reference genes for qRT-PCR analysis of human visceral adipose samples. *BMC Mol Biol*. 2010;11:39.
- Meinel L, Karageorgiou V, Fajardo R, Snyder B, Shinde-Patil V, Zichner L, Kaplan D, Langer R, Vunjak-Novakovic G. Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: effects of scaffold material and medium flow. *Ann Biomed Eng*. 2004 Jan;32(1):112-22.
- Merfeld-Clauss S, Gollahalli N, March KL, Traktuev DO. Adipose tissue progenitor cells directly interact with endothelial cells to induce vascular network formation. *Tissue Eng Part A*. 2010 Sep;16(9):2953-66.
- Michel M, L'Heureux N, Pouliot R, Xu W, Auger FA, Germain L. Characterization of a new tissue-engineered human skin equivalent with hair. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 1999 Jun;35(6):318-26.
- Mizuno H, Zuk PA, Zhu M, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrick MH. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast Reconstr Surg*. 2002a Jan;109(1):199-209; discussion 10-1.

- Mizuno S, Tateishi T, Ushida T, Glowacki J. Hydrostatic fluid pressure enhances matrix synthesis and accumulation by bovine chondrocytes in three-dimensional culture. *J Cell Physiol.* 2002b Dec;193(3):319-27.
- Nerurkar NL, Sen S, Baker BM, Elliott DM, Mauck RL. Dynamic culture enhances stem cell infiltration and modulates extracellular matrix production on aligned electrospun nanofibrous scaffolds. *Acta Biomater.* 2010 Aug 19.
- Park H, Karajanagi S, Wolak K, Aanestad J, Daheron L, Kobler JB, Lopez-Guerra G, Heaton JT, Langer RS, Zeitels SM. Three-dimensional hydrogel model using adipose-derived stem cells for vocal fold augmentation. *Tissue Eng Part A.* 2010 Feb;16(2):535-43.
- Peng Y, Raghunath M. Learning From Nature: Emulating Macromolecular Crowding To Drive Extracellular Matrix Enhancement For The Creation Of Connective Tissue in vitro. *Tissue Engineering.* 2010;in press.
- Pulkkinen L, Kainulainen K, Krusius T, Makinen P, Schollin J, Gustavsson KH, Peltonen L. Deficient expression of the gene coding for decorin in a lethal form of Marfan syndrome. *J Biol Chem.* 1990 Oct 15;265(29):17780-5.
- Reed CC, Iozzo RV. The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis. *Glycoconj J.* 2002 May-Jun;19(4-5):249-55.
- Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Considine RV, March KL. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation.* 2004 Mar 16;109(10):1292-8.
- Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science.* 1992 Mar 27;255(5052):1707-10.
- Ricard-Blum S, Ruggiero F. The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathol Biol (Paris).* 2005 Sep;53(7):430-42.
- Rumsey SC, Daruwala R, Al-Hasani H, Zarnowski MJ, Simpson IA, Levine M. Dehydroascorbic acid transport by GLUT4 in *Xenopus* oocytes and isolated rat adipocytes. *J Biol Chem.* 2000 Sep 8;275(36):28246-53.
- Rumsey SC, Welch RW, Garraffo HM, Ge P, Lu SF, Crossman AT, Kirk KL, Levine M. Specificity of ascorbate analogs for ascorbate transport. Synthesis and detection of [(125)I]6-deoxy-6-iodo-L-ascorbic acid and characterization of its ascorbate-specific transport properties. *J Biol Chem.* 1999 Aug 13;274(33):23215-22.
- Rutkowski JM, Swartz MA. A driving force for change: interstitial flow as a morphoregulator. *Trends Cell Biol.* 2007 Jan;17(1):44-50.

- Saeidi N, Sander EA, Ruberti JW. Dynamic shear-influenced collagen self-assembly. *Biomaterials*. 2009 Dec;30(34):6581-92.
- Safford KM, Hicok KC, Safford SD, Halvorsen YD, Wilkison WO, Gimble JM, Rice HE. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Jun 7;294(2):371-9.
- Salgado AJ, Reis RL, Sousa NJ, Gimble JM. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2010 Jun;5(2):103-10.
- Savini I, Rossi A, Pierro C, Avigliano L, Catani MV. SVCT1 and SVCT2: key proteins for vitamin C uptake. *Amino Acids*. 2008 Apr;34(3):347-55.
- Sharma BR. Infection in patients with severe burns: causes and prevention thereof. *Infect Dis Clin North Am*. 2007 Sep;21(3):745-59, ix.
- Sorrell JM, Caplan AI. Fibroblasts-a diverse population at the center of it all. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2009;276:161-214.
- Stadelmann WK, Digenis AG, Tobin GR. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. *Am J Surg*. 1998 Aug;176(2A Suppl):26S-38S.
- Stenzel KH, Miyata T, Rubin AL. Collagen as a biomaterial. *Annu Rev Biophys Bioeng*. 1974;3(0):231-53.
- Sternlicht MD, Bissell MJ, Werb Z. The matrix metalloproteinase stromelysin-1 acts as a natural mammary tumor promoter. *Oncogene*. 2000 Feb 21;19(8):1102-13.
- Stocker W, Grams F, Baumann U, Reinemer P, Gomis-Ruth FX, McKay DB, Bode W. The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci*. 1995 May;4(5):823-40.
- Stolberg S, McCloskey KE. Can shear stress direct stem cell fate? *Biotechnol Prog*. 2009 Jan-Feb;25(1):10-9.
- Strem BM, Hedrick MH. The growing importance of fat in regenerative medicine. *Trends Biotechnol*. 2005 Feb;23(2):64-6.
- Streuli C. Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr Opin Cell Biol*. 1999 Oct;11(5):634-40.
- Suckow MA, Voytik-Harbin SL, Terril LA, Badylak SF. Enhanced bone regeneration using porcine small intestinal submucosa. *J Invest Surg*. 1999 Sep-Oct;12(5):277-87.

- Sucosky P, Osorio DF, Brown JB, Neitzel GP. Fluid mechanics of a spinner-flask bioreactor. *Biotechnol Bioeng*. 2004 Jan 5;85(1):34-46.
- Trackman PC. Diverse biological functions of extracellular collagen processing enzymes. *J Cell Biochem*. 2005 Dec 1;96(5):927-37.
- Trottier V, Marceau-Fortier G, Germain L, Vincent C, Fradette J. IFATS collection: Using human adipose-derived stem/stromal cells for the production of new skin substitutes. *Stem Cells*. 2008 Oct;26(10):2713-23.
- Vallee M, Cote JF, Fradette J. Adipose-tissue engineering: taking advantage of the properties of human adipose-derived stem/stromal cells. *Pathol Biol (Paris)*. 2009 Jun;57(4):309-17.
- Vermette M, Trottier V, Menard V, Saint-Pierre L, Roy A, Fradette J. Production of a new tissue-engineered adipose substitute from human adipose-derived stromal cells. *Biomaterials*. 2007 Jun;28(18):2850-60.
- Vincent C. Production de tissus adipeux humains endothélialisés par génie tissulaire [Mémoire de maîtrise]. Québec: Université Laval; 2010.
- Voytik-Harbin SL, Brightman AO, Kraine MR, Waisner B, Badylak SF. Identification of extractable growth factors from small intestinal submucosa. *J Cell Biochem*. 1997 Dec 15;67(4):478-91.
- Wallace DG, Rosenblatt J. Collagen gel systems for sustained delivery and tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003 Nov 28;55(12):1631-49.
- Walmsley AR, Batten MR, Lad U, Bulleid NJ. Intracellular retention of procollagen within the endoplasmic reticulum is mediated by prolyl 4-hydroxylase. *J Biol Chem*. 1999 May 21;274(21):14884-92.
- Wang H, Pieper J, Peters F, van Blitterswijk CA, Lamme EN. Synthetic scaffold morphology controls human dermal connective tissue formation. *J Biomed Mater Res A*. 2005 Sep 15;74(4):523-32.
- Wang H, van Blitterswijk CA. The role of three-dimensional polymeric scaffold configuration on the uniformity of connective tissue formation by adipose stromal cells. *Biomaterials*. 2010 May;31(15):4322-9.
- Wang HJ, Bertrand-de Haas M, van Blitterswijk CA, Lamme EN. Engineering of a dermal equivalent: seeding and culturing fibroblasts in PEGT/PBT copolymer scaffolds. *Tissue Eng*. 2003 Oct;9(5):909-17.
- Weadock K, Olson RM, Silver FH. Evaluation of collagen crosslinking techniques. *Biomater Med Devices Artif Organs*. 1983;11(4):293-318.

- Wierzbicka-Patynowski I, Schwarzbauer JE. The ins and outs of fibronectin matrix assembly. *J Cell Sci.* 2003 Aug 15;116(Pt 16):3269-76.
- Yamamoto K, Takahashi T, Asahara T, Ohura N, Sokabe T, Kamiya A, Ando J. Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress. *J Appl Physiol.* 2003 Nov;95(5):2081-8.
- Yannas IV, Burke JF, Gordon PL, Huang C, Rubenstein RH. Design of an artificial skin. II. Control of chemical composition. *J Biomed Mater Res.* 1980 Mar;14(2):107-32.
- Zhao F, Grayson WL, Ma T, Irsigler A. Perfusion affects the tissue developmental patterns of human mesenchymal stem cells in 3D scaffolds. *J Cell Physiol.* 2009 May;219(2):421-9.
- Zhou X, Liu D, You L, Wang L. Quantifying fluid shear stress in a rocking culture dish. *J Biomech.* 2010 May 28;43(8):1598-602.
- Zuk PA. The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead. *Mol Biol Cell.* 2010 Jun;21(11):1783-7.
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002 Dec;13(12):4279-95.
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001 Apr;7(2):211-28.