

Ingénierie tissulaire: Mise en oeuvre d'un procédé de fabrication d'une matrice oesophagienne biologique

Guillaume Luc

▶ To cite this version:

Guillaume Luc. Ingénierie tissulaire: Mise en oeuvre d'un procédé de fabrication d'une matrice oesophagienne biologique. Biologie cellulaire. Université de Bordeaux, 2016. Français. NNT: 2016BORD0423. tel-01665813

HAL Id: tel-01665813 https://theses.hal.science/tel-01665813

Submitted on 17 Dec 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Thèse d'Université pour l'obtention

du

grade de

Docteur de l'Université de Bordeaux

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé Spécialité : Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Présentée et soutenue à Bordeaux le 16 Décembre 2016 par

Guillaume LUC

Né le 27 mars 1981 à WISSEMBOURG (67)

Ingénierie tissulaire

Mise en œuvre d'un procédé de fabrication d'une matrice œsophagienne biologique

Sous la direction de : Marlène DURAND

Soutenue le 16 décembre 2016

Membres du Jury:

M. Denis COLLET, PU-PH, Université de Bordeaux

Mme Catherine LE VISAGE, Directeur de Recherche, Université de Nantes

Rapporteur

M. Guillaume PIESSEN, PU-PH, Université de Lille

Rapporteur

M. Philippe LAVALLE, Directeur de Recherche, Université de Strasbourg

Examinateur

Mme Laurence BORDENAVE, PU-PH, Université de Bordeaux

Examinateur

Pour Alice...

Remerciements:

Centre d'Investigation Clinique Innovation Technologique : Laboratoire d'accueil spécialisé dans le développement de biomatériaux. Je remercie ;

- Pr Laurence BORDENAVE
- Dr Marlène DURAND
- Dr Charlotte KALISKI
- Samantha ROQUES
- Sandro CORNET
- Catherine ARTIGES,
- Martine RENARD,
- Fanny BOURREE,
- Claire DARCOS
- Elodie SERIES
- Fanny BLAUDEZ, Guillaume CHARLES

Unité Inserm 1026 BIOTIS: Laboratoire INSERM BIOTIS U1026

- Pr Jean-Christophe FRICAIN
- Dr Joëlle AMEDEE
- Reine BAREILLE
- Murielle REMI
- Robin Siadous
- Jérôme Kalisky
- Damien Le Nihouannen

La PTIB: plateforme technologique d'innovations biologiques

- Le LIRYC
- Delphine Veillot

Les animaleries A1, et A2 et leurs responsables de l'Université de Bordeaux

L'équipe scientifique de ROUILLE.

Table des matières

| Ré | p 9 | | |
|-----------|--|------|--|
| <u>In</u> | Introduction | | |
| 1. | Contexte clinique | p 11 | |
| 2. | Caractéristiques de l'œsophage | p 13 | |
| | 2.1. Embryologie de l'œsophage | p 13 | |
| | 2.2. Anatomie de l'œsophage | p 13 | |
| | 2.3. Histologie de l'œsophage | p 16 | |
| | 2.4. Propriétés mécaniques de l'œsophage | p 18 | |
| 3. | Ingénierie tissulaire | p 20 | |
| | 3.1. Définition | p 20 | |
| | 3.2. Cahier des charges | p 21 | |
| 4. | Les substituts oesophagiens issus de l'ingénierie tissulaire | p 22 | |
| | 4.1. Historique | p 22 | |
| | 4.2. Matrices non résorbables | p 22 | |
| | 4.3. Matrices résorbables synthétiques | p 24 | |
| | 4.4. Matrices décellularisées | p 26 | |
| | 4.5. Synthèse | p 30 | |
| 5. | Maturation et ensemencement cellulaire | p 31 | |
| | 5.1. Maturation | p 31 | |
| | 5.2. Cellularisation | p 33 | |
| 6. | Objectifs | p 35 | |
| | 6.1. Objectif principal | p 35 | |
| | 6.2. Objectifs secondaires | p 35 | |
| <u>M</u> | atériels et Méthodes | p 37 | |
| 1. | Prélèvement œsophagien | p 37 | |
| | 1.1. Modèle animal | p 37 | |
| | 1.2. Œsophagectomie | p 37 | |
| 2. | Décellularisation | p 39 | |
| | 2.1. Chambre de décellularisation | p 39 | |
| | 2.2. Traitements anioniques et enzymatiques | p 39 | |
| | 2.3. Stérilisation et stockage | p 40 | |
| 3. | Caractérisation de la matrice œsophagienne | p 41 | |
| | 3.1. Histologie, immunohistochimie | p 41 | |
| | 3.2. Quantification ADN | p 41 | |
| | 3.3. Quantification des Glycosaminoglycanes | p 42 | |
| | 3.4. Biocompatibilité | p 42 | |
| | 3.5. Tests mécaniques | p 43 | |
| 4. | Cellularisation | p 45 | |
| | 4.1. Adipose-Derived stem cells | p 45 | |

| | 4.2. Cytotoxicité | p 45 |
|-----------|---|-------|
| | 4.3. Test d'attachement | p 47 |
| | 4.4. Production de feuillets | p 48 |
| | 4.5. Ensemencement | p 48 |
| 5. | Maturation | p 49 |
| | 5.1. Modèle animal | p 49 |
| | 5.2. Schéma expérimental | p 49 |
| | 5.3. Histologie | p 50 |
| 6. | Substitution œsophagienne | p 51 |
| | 6.1. Modèle animal | p 51 |
| | 6.2. Schéma expérimental | p 51 |
| | 6.3. Histologie | p 53 |
| 7. | Analyses statistiques | p 54 |
| Ré | <u>ésultats</u> | p 55 |
| 1. | Décellularisation | p 55 |
| | 1.1. Analyse histologique | p 55 |
| | 1.2. Quantification de l'ADN résiduel | p 56 |
| 2. | Caractéristiques de la matrice biologique | p 58 |
| | 2.1. Quantification des Glycosaminoglycanes | p 58 |
| | 2.2. Structures biologiques | p 59 |
| | 2.3. Propriétés mécaniques | p 65 |
| | 2.4. Biocompatibilité | p 69 |
| 3. | Cellularisation | p 74 |
| | 3.1. Cytotoxicité | p 74 |
| | 3.2. Attachement cellulaire | p 75 |
| | 3.3. Ensemencement | p 76 |
| 4. | Maturation | p 80 |
| | 4.1. Etude préclinique | p 80 |
| | 4.2. Effet « temps-cellules » | p 81 |
| 5. | Substitution œsophagienne | p 84 |
| | 5.1. Maturation | p 84 |
| | 5.2. Remplacement œsophagien | p 86 |
| <u>Di</u> | scussion | р 91 |
| 1. | Objectifs | p 91 |
| | 1.1. Objectif principal | p 91 |
| | 1.2. Objectifs secondaires | p 91 |
| 2. | | p 94 |
| | 2.1. Choix des procédés | p 94 |
| | 2.2. Caractérisation de la MD | p 98 |
| | 2.3. Choix du modèle animal | p 101 |

| 3. | Cellularisation | p 106 |
|-----------|---------------------------------|-------|
| | 3.1. Choix des cellules | p 106 |
| | 3.2. Méthode d'ensemencement | p 108 |
| 4. | Maturation | p 110 |
| | 4.1. Le grand épiploon | p 110 |
| | 4.2. Effet « temps-cellules » | p 111 |
| 5. | Implantations | p 113 |
| Co | <u>onclusions</u> | р 115 |
| Ré | <u>éférences</u> | p 116 |
| <u>In</u> | dex des tables et illustrations | p 133 |
| Ar | <u>nnexes</u> | p 137 |

<u>Résumé</u>

<u>Objectifs</u>: L'objectif principal de ce travail était de fabriquer une matrice œsophagienne décellularisée tubulaire implantable dans un modèle porcin.

<u>Méthodes</u>: Des œsophages de porcs étaient prélevés et décellularisés selon un protocole basé sur l'Acide Déoxycholique. La décellularisation devait être confirmée par analyse histologique et quantification de l'ADN résiduel. L'évaluation des Glycosaminoglycanes, des protéines de structures (Collagène, Elastine, Fibronectine et Laminine) était réalisée par étude histologique et immunohistochimique sur les MD. Les tests mécaniques étaient réalisés en traction circonférentielle, longitudinale, et à l'éclatement. La biocompatibilité des MD a été évaluée *in vivo* sur un modèle murin. L'ensemencement était réalisé par des Adipose Derived Stem Cells (ADSCs) appliquées sous forme de feuillets sur les MD tubulaires. L'efficience de la maturation des MD *in vivo* était réalisée sur un modèle murin. L'implantation des MD étaient faites après une œsophagectomie par laparotomie dans un modèle porcin.

<u>Résultats</u>: 103 œsophages ont été décellularisés. Les MD ne présentaient pas de noyau résiduel et leur quantification d'ADN résiduel était inférieure à 50 ng/mg de tissu sec. Les caractéristiques biologiques (quantité, qualité et distribution) étaient préservées après la décellularisation. Le comportement mécanique des MD étaient similaires aux œsophages natifs. L'ensemencement par des ADSCs via l'application de feuillets sur les MD permettait une cellularisation des couches externes. La maturation dans le grand épiploon permettait la vascularisation des MD sans bénéfice d'un ensemencement préalable. L'œsophagectomie était réalisée sur 6 porcs. Un individu est décédé, et 4 porcs ont présentés des complications postopératoires. La régénération tissulaire des MD était confirmée un mois après leur implantation.

<u>Conclusion</u>: La substitution œsophagienne par une MD après une œsophagectomie est réalisable sur un modèle porcin.

Mots clés : Médecine régénératrice, œsophage, décellularisation.

Esophageal tissue engineering

Abstract

Decellularized matrixes (DM) are commonly used to facilitate a constructive remodeling

response in several types of tissue, including the esophagus. Surgical procedure of the

esophagus is often complicated by stricture, but preclinical studies have shown that the use of

a DM can mitigate stricture and promote a constructive outcome.

Recognizing the potential benefits of DM derived from homologous tissue (i.e., site-specific

ECM), the objective of the present study was to prepare, characterize, and assess the in-vivo

remodeling properties of DM from porcine esophagus.

The developed protocol for esophageal DM preparation is compliant with previously

established criteria of decellularization and results in a scaffold that maintains important

biologic components and an ultrastructure consistent with a good mechanical behavior. Stem

cells remained viable when seeded upon the esophageal DM in vitro, and the in-vivo host

response showed a pattern of constructive remodeling when implanted in soft tissue.

<u>Keywords</u>: Regenerative medicine, esophagus, decellularization.

Unité de Recherche:

BIOTIS - INSERM U1026 - 146 Rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux

10

Introduction

1. Contexte clinique

Les pathologies œsophagiennes concernent principalement l'adulte mais touchent également l'enfant [1, 2] :

- En pédiatrie, les principales pathologies néonatales sont représentées par l'atrésie de l'œsophage et les fistules trachéo-œsophagiennes [3]. Son incidence est de 1/3000-4500 naissances. Chez 80 à 85% des patients il existe une atrésie de l'œsophage associant une poche œsophagienne distale et une fistule trachéo-œsophagienne proximale. Concernant les 10 à 15% des patients ne présentant pas ce mode d'anomalies, différentes variations anatomiques ont été décrites. La substitution œsophagienne par le colon ou l'estomac est réalisée en cas de défect supérieur à 3 cm. L'allongement par des plasties œsophagiennes est préféré en première intention [4].
- Chez l'adulte, les principales pathologies sont représentées par les cancers (carcinome épidermoïde et adénocarcinome), les perforations (spontanées ou non) et les brûlures par ingestion de produit chimique (accidentelle ou volontaire).

Le nombre estimé de nouveaux cas de cancer de l'œsophage en 2000 en France est de 4040 chez l'homme et de 928 chez la femme. Le sexe ratio est de plus de 4 [5]. L'évolution du risque est inverse chez l'homme et chez la femme. En effet le nombre de nouveaux cas est passé à 3136 chez l'homme et de 1140 chez la femme en 2011 [6]. Il existe une baisse du taux d'incidence de 2.1% chez l'homme entre 1980 et 2000 et une augmentation de 2.3% chez la femme. En revanche on observe une augmentation de proportion d'adénocarcinome passant de 3.3% (1976-1980) à 22.9% (1996-2000) chez l'homme et de 5.8% à 23.1% chez la femme durant la même période [5]. Bien que l'incidence des cancers de l'œsophage diminue, la France reste un pays à risque élevé de carcinome malpighien. Cette forme histologique représente 74% des types histologiques de cancer de l'œsophage favorisée par une consommation éthylo-tabagique. L'autre forme histologique correspond à l'adénocarcinome. Prise à part, la variation du taux d'incidence de l'adénocarcinome de l'œsophage a augmenté de 70 % chez l'homme et de 100 % chez la femme.

La perforation œsophagienne iatrogène ou spontanée est rare. Sous le terme de perforation œsophagienne (PO) sont regroupées plusieurs entités clinico-pathologiques de pronostic et de traitement différents. La mortalité globale des PO est de 20 %. Ce pronostic

peut être amélioré par un diagnostic précoce et une prise en charge thérapeutique adaptée. Du traitement médical à l'œsophagectomie, les possibilités thérapeutiques sont multiples et de caractère invasif croissant. À mi-chemin entre le traitement médical et la chirurgie ouverte, des options mini-invasives, fondées sur l'endoscopie interventionnelle, tendent actuellement à se positionner. Le choix du traitement des PO dépend de nombreux facteurs tels que l'importance du délabrement œsophagien, du sepsis local et de l'état général du patient. L'existence d'une pathologie œsophagienne sous-jacente conditionne aussi ce choix. Elle limite les chances de préservation œsophagienne à court et à long terme [7].

L'ingestion de caustique peut être une cause d'œsophagectomie. Elle est dans 80% des cas accidentelle chez l'enfant (30 % des patients) et majoritairement volontaire chez l'adulte [8]. Les indications chirurgicales varient selon l'étendue et le grade des lésions générées. L'œsophagectomie peut être réalisée à distance souvent motivée par des sténoses œsophagiennes étendues [9].

Les modalités de l'œsophagectomie sont multiples. L'œsophage étant un organe cervicothoraco-abdominal, son abord chirurgical peut nécessiter ces 3 voies [10]. Le rétablissement de la continuité digestive se fait principalement par gastroplastie avec anastomose œsogastrique ou par interposition d'une portion de colon [11-12]. L'intervention dite de Lewis-Santy (laparotomie et thoracotomie droite, anastomose œsogastrique intra-thoracique) est la plus pratiquée en France [13]. Le taux de morbidité varie entre 40 et 80 % et le taux de mortalité entre 1 et 20 % [14, 15, 16]. Les principales complications sont représentés par les complications pulmonaires, les fistules anastomotiques, les sténoses anastomotiques, les nécroses de plastie, les médiastinites et le reflux gastro-œsophagien [17]. Selon le rapport de la Haute autorité de Santé, le nombre d'œsophagectomies est estimé à 1400 par an en France. Quatre-vingt-dix pourcents sont réalisées par double abord abdominal et thoracique [13].

La substitution de l'œsophage par un segment digestif après son exérèse (estomac, colon ou intestin grèle) est à l'origine de 50% de complications fonctionnelles [18]; le reflux gastro-œsophagien (58%) [19], les sténoses anastomotiques (35%) [20], les dysfonctions gastriques (syndrome du petit estomac, dysphagie, brûlure rétro sternale, satiété précoce, vomissements) [18]. La qualité de vie est médiocre après œsophagectomie sans pour autant l'apprécier de façon objective face aux manques d'outils d'évaluation [18].

2. Caractéristiques de l'œsophage

2.1. Embryologie de l'œsophage

L'œsophage dérive de l'intestin antérieur dès le 22e/23e jour de gestation et s'étend depuis le diverticule respiratoire jusqu'à la dilatation fusiforme de l'estomac. La séparation entre la trachée et l'œsophage par le septum trachéo-œsophagien survient avant la fin de la 5e semaine de gestation. Les fistules œso-trachéales sont dues à un trouble de cette séparation. Très court au début, l'œsophage s'allonge rapidement à cause du développement céphalique et cardiaque, et de la rétroflexion de la tête, pour atteindre sa taille finale à la 7e semaine de gestation. Un défaut de cet allongement entraîne un risque d'atrésie. L'épithélium d'origine endodermique prolifère au cours des 7e et 8e semaines, oblitérant presque totalement la lumière et se reperméabilise à la 10e semaine de gestation (phénomène de vacuolisation mis en cause dans la duplication de l'œsophage). Les tissus de soutien, la musculeuse et la vascularisation sont d'origine mésodermique. Le muscle strié du tiers supérieur de l'œsophage dérive du mésenchyme des 4e et 6e arcs branchiaux caudaux (innervés par la Xe paire crânienne). Le muscle lisse du tiers inférieur de l'œsophage se développe à partir du mésenchyme splanchnique voisin (innervé par le plexus nerveux viscéral splanchnique, dérivé des crêtes neurales). Les anomalies de développement des arcs aortiques peuvent avoir des retentissements sur l'œsophage et notamment dans les cas d'artère sous-clavière droite rétroœsophagienne à l'origine de dysphagie (dysphagia lusoria) [10].

2.2. Anatomie de l'œsophage

L'œsophage est un segment tubulaire composé de 3 couches principales (muqueuse, sous-muqueuse et musculeuse) reliant le pharynx et l'estomac. Il mesure 25 centimètres de longueur et 3 centimètres de diamètres chez l'adulte. Il présente une triple localisation anatomique car il traverse successivement le cou, le thorax, et l'abdomen [10]. La fonction principale de l'œsophage est le transport du bol alimentaire du pharynx à l'estomac. Ce transport se fait grâce au péristaltisme œsophagien défini comme les contractions musculaires coordonnées de sa paroi [22].

Sa limite crâniale correspond au bord inférieur du cartilage cricoïde correspondant, tête en position anatomique, à la 6e vertèbre cervicale (C6). Cette limite supérieure est représentée extérieurement par le faisceau cricoïdien du muscle constricteur inférieur du pharynx (où s'engage le nerf laryngé inférieur). Sa limite caudale correspond au cardia qui est l'ouverture sur l'estomac, au niveau du bord gauche de la $10^{ième}$ ou $11^{ième}$ vertèbre thoracique (TH10 ou

TH11), repérée extérieurement par l'angulation entre le bord gauche de l'œsophage et le fundus. Le trajet de l'œsophage est médian et longe le rachis, il en suit les inflexions jusqu'à la 4e vertèbre thoracique (TH4) puis s'en écarte progressivement. Dans le sens transversal, il présente trois légères courbures. On note une inflexion sur la gauche dans la portion cervicale, une inflexion à droite au niveau TH4, une nouvelle inflexion sur la gauche de la 7e vertèbre thoracique (TH7). La longueur totale de l'œsophage est approximativement de 25 cm, mais elle varie selon le sexe, l'âge et la taille. En pratique, on utilise le repère des mesures d'exploration endoscopique : les incisives supérieures (ou arcade dentaire [AD]), situées approximativement 15 cm au-dessus de la jonction pharyngo-œsophagienne (2 ou 3 cm doivent être rajoutés si le repère est la narine). La limite inférieure de l'œsophage se situe alors à 40 cm des AD. L'œsophage cervical mesure 5 à 6 cm et s'étend de C6 à la 1e vertèbre cervicale (TH1). Sur sa partie initiale, les fibres du muscle constricteur inférieur du pharynx associées à celles du muscle cricopharyngien se mêlent aux fibres circulaires de la musculaire pour constituer le sphincter supérieur de l'œsophage. L'œsophage thoracique s'étend de TH1 à TH10-TH11 et mesure 16 cm (situé de 21 à 37 cm des AD). L'œsophage diaphragmatique traverse l'hiatus œsophagien au niveau de TH10-TH11. L'œsophage abdominal présente une longueur variable selon les auteurs, estimée à 3 cm (situé de 37 à 40 cm des AD). La notion de sphincter inférieur de l'œsophage (SIO) ne correspond pas à l'existence d'un anneau musculaire de la paroi œsophagienne mais à une zone de haute pression mise en évidence par les explorations fonctionnelles manométriques (Figure 1).

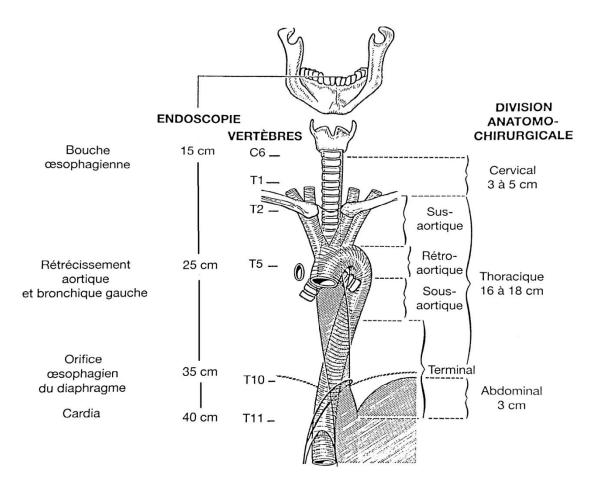


Figure 1: Topographie générale de l'œsophage

Source: Mourot J, Bastian D. Anatomie chirurgicale de l'œsophage. Encycl Med Chir (Elsevier-Masson. Paris). Techniques chirurgicales – Appareil digestif 1987; 40 – 170.

À l'état de vacuité, l'œsophage est aplati d'avant en arrière et plus particulièrement dans sa partie supérieure. Les zones constantes de rétrécissement sont au nombre de trois. Le rétrécissement cricopharyngien est le plus court et le plus serré avec un diamètre de 1,4 à 1,6 cm sur 1,5 cm de hauteur. Le rétrécissement aorto-bronchique correspond au point de contact avec l'aorte et la bronche gauche qui se situe au niveau de TH4-TH5 et s'étend sur 4 à 5 cm; son diamètre est de 1,7 cm. Au niveau de la traversée diaphragmatique, un rétrécissement sur 1 à 2 cm donne à l'œsophage un diamètre de 1,9 cm [10].

2.3. <u>Histologie de l'œsophage</u>

L'œsophage présente 4 couches histologiques fonctionnelles distinctes : la muqueuse, la sous-muqueuse, le musculeuse et l'adventice (**Figure 2**).

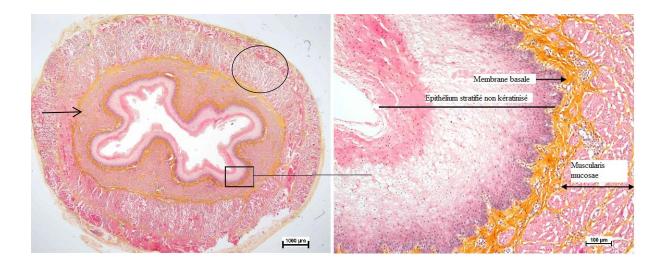


Figure 2: Coupe histologique du tiers moyen d'un œsophage porcin, coloration H.E.S. L'hémalun colore en noir-violet les noyaux, l'érythrosine colore en rouge-rosé le cytoplasme et le safran colore les fibres conjonctives en jaune-orangé. A : Visualisation des 3 couches de l'œsophage, la couche muqueuse (rectangle), la sous-muqueuse (flèche) et la musculeuse (rond) (Grossissement x10), B : Couche muqueuse de l'œsophage (Grossissement x100)

La couche muqueuse œsophagienne est composée de trois couches distinctes. La couche la plus interne est un épithélium épidermoïde stratifié non-kératinisé assis sur une membrane basale. Cet épithélium est humidifié par des sécrétions glandulaires afin de réduire la friction lors du passage du bol alimentaire. En profondeur (membrane basale) les cellules épithéliales sont peu différenciées et ont un haut pouvoir prolifératif. En surface (lumière digestive), ces cellules ont perdu leur pouvoir prolifératif mais sont bien différenciées [21]. La membrane basale sépare l'épithélium du reste de la paroi œsophagienne, et permet la fixation de ce dernier à la lamina propria.

La lamina propria est une fine couche constituée de Collagène de type III, d'Elastine, de vaisseaux, de nerfs et de tissus lymphoïdes [21]. Elle contient de nombreux types cellulaires différents ; cellules structurales (fibroblastes, fibrocytes, cellules vasculaires endothéliales, cellules musculaires lisses), cellules sanguines (granulocytes, macrophages, lymphocyte B et T), cellules épithéliales et endocrines [21]. La lamina propria est bordée sur son versant externe par la muscularis mucosae.

La musculaire mucosae est une fine couche musculaire externe composée de cellules musculaires lisses et de fibres élastiques. Elle est composée de deux couches musculaires lisses (circulaire interne et longitudinale externe) permettant le contrôle de la muqueuse lors du passage du bol alimentaire.

La sous-muqueuse est une couche dense de tissu conjonctif riche en Elastine et Collagène. L'élastine a une distribution circulaire (versant musculeuse) et longitudinale (versant muqueuse) [23]. Le collagène de type III a une orientation circulaire et assure les propriétés élastiques [24]. Cette orientation confère à l'œsophage sa capacité de distension circonférentielle sans perte de force longitudinale [25]. La sous-muqueuse possède des cellules glandulaires sécrétrices dont les canaux traversent la muqueuse et s'abouche dans la lumière permettant la lubrification de l'épithélium, lui assurant une protection physique lors du passage du bol alimentaire [26]. Dans cette couche se situe le plexus de Meissner contrôlant les contractions péristaltiques de la musculaire muqueuse et la sécrétion de mucus.

La musculeuse est une paroi musculaire composée de 2 couches musculaires orientées. La couche musculaire interne adjacente à la sous-muqueuse est orientée de façon circulaire et la couche musculaire externe est orientée de façon longitudinale [23]. Cette orientation spécifique permet les contractions radiales et les raccourcissements longitudinaux lors du péristaltisme. Leur contraction dépend du plexus d'Auerbach [26]. Le type de cellules musculaires change selon la localisation dans l'œsophage [23]. La nature lisse ou striée de cette couche musculaire se modifie selon sa localisation proximale ou distale dans l'œsophage. Dans sa partie proximale la composition en fibres musculaires lisses est faible (3.9 et 6.1% pour les couches circulaires et longitudinales respectivement) en opposition à la partie distale (62.7% et 54.4%). Le tiers moyen correspond à une zone de transition (33% et 40%) [27].

Les fonctions sensitives, motrices et sécrétoires du tube digestif sont contrôlées par un dispositif nerveux installé dans sa paroi [28]. Le système nerveux entérique est organisé en un réseau ou plexus ganglionné où les ganglions contiennent les corps cellulaires des neurones entériques et les cellules de la glie. Les mailles de ce réseau représentent les axones des neurones qui réalisent un circuit complexe des projections locales. Elles reçoivent des afférences du système nerveux central modulant ses effets par des projections sympathiques et parasympathiques mais le système nerveux entérique reste suffisamment autonome pour agir seul de façon coordonnée. On décrit schématiquement deux niveaux pour ce système : le plexus sous-muqueux de Meissner et le plexus myentérique d'Auerbach localisé entre les

deux couches de la musculeuse. Ces deux systèmes fonctionnent de manière tout à fait coordonnée.

La paroi du tube digestif est le siège d'une population de cellules immunitaires comprenant des lymphocytes et des plasmocytes répartis dans l'épithélium (lymphocytes T intraépithéliaux) et dans le tissu conjonctif du chorion de la muqueuse et de la sous-muqueuse (follicules lymphoïdes et cellules lymphoïdes dispersées, où prédominent largement les lymphocytes B et les plasmocytes sécréteurs d'IgA). Le tissu lymphoïde associé au tube digestif (Gut Associated Lymphoid Tissue ou GALT) comporte, en plus des cellules lymphoïdes dispersées et des follicules lymphoïdes, les amygdales, l'appendice iléocæcale et les plaques de Peyer.

2.4. Propriétés mécaniques de l'œsophage

L'œsophage est considéré comme une structure tubulaire stratifiée anisotropique, autrement dit qu'il présente des caractéristiques différentes selon la direction d'application des contraintes [29, 30]. Par sa fonction il est soumis à des variations de contraintes et de déformations.

Vanags et al. [30] ont évalué des caractéristiques biomécaniques lors de mesures effectuées sur 104 œsophages échantillonnés de cadavres humains. Les contraintes, les déformations, les modules d'élasticité ont été établis sur des échantillons [rectangles de 4mm x 25 mm x h (épaisseur de la paroi) mm] dans les directions longitudinales et circonférentielles. Ces mesures ont été obtenues selon l'âge du sujet prélevé et le niveau de coupe œsophagienne. L'œsophage thoracique présentait des forces de contraintes longitudinales de 1.67 MPa et circonférentielles de 1.48 MPa. Les modules d'élasticité maximum enregistrés étaient de 2.3 MPa (longitudinal) et 1.44 MPa (circonférentiel). La déformation de l'œsophage thoracique était évaluée à 57% dans le sens longitudinal et 66% dans le sens circonférentiel. La pression intraluminale de rupture était de 55 kPa, pouvant descendre à 32 kPa. La présence d'une œsophagite diminue les forces de contraintes longitudinales et circonférentielles, mais accroît le module d'élasticité. Egorov et al. [31] ont étudié les propriétés mécaniques de différents segments digestifs dont l'œsophage. Ce dernier était testé dans le sens longitudinal. Les forces maximales de contraintes longitudinales étaient de 1.2 MPa, et la déformation était de 57%. Le module d'élasticité n'était pas évalué. Orvar et al. [32], établissent en 1993 des mesures endoluminales par manométrie œsophagienne. Pour une application de 3.4 kPa (26 mm de diamètre) le module d'élasticité est mesuré à 13.7 kPa.

Chaque couche a un comportement mécanique anisotropique en rapport avec sa composition histologique et l'orientation des fibres de collagènes qui la compose [32, 33]. Natali et al. ont produit un modèle expérimental d'analyse biomécanique de l'œsophage [27]. Ce modèle théorique est évalué en fonction d'un modèle animal (porc). L'œsophage est analysé sur le plan mécanique en 2 couches (ou modules) distinctes représentées sur le plan histologique par la muqueuse/sous-muqueuse et la musculeuse. Des contraintes sont appliquées jusqu'à 3MPa sur la couche muqueuse (1.2 MPa pour la couche musculeuse). Les déformations sont plus importantes dans le sens circonférentiel que longitudinal pour une même contrainte (quel que soit la couche testée). Leur analyse est fondée sur la configuration micro-structurale biologique du tissu. L'orientation des fibres qui composent l'œsophage lui confère ses propriétés biomécaniques. La couche musculeuse est considérée comme orthotropique car l'orientation des fibres musculaires est orthogonale. La couche muqueuse/sous-muqueuse aurait un comportement anisotropique liée au double croisement de deux hélices de collagène [34, 35]. Différents modèles expérimentaux inter-espèces ont montré des valeurs différentes concernant les propriétés mécaniques mais des comportements biomécaniques similaires chez le rat [35, 36], le cochon de guinée [37], le porc [34, 38] et l'être humain [30, 31]. Ces différents modèles démontrent que les contraintes et les modules d'élasticité sont plus importants dans la couche muqueuse/sous-muqueuse. Ergorov et al. a démontré que la couche la plus résistante est la sous-muqueuse [31]. Ces propriétés mécaniques seraient corrélées à la présence de Collagène et d'Elastine et leur distribution spatiale [27].

Afin de proposer une solution plus satisfaisante aux patients ayant subi une œsophagectomie, la fabrication d'un substitut implantable aux propriétés structurelles, biologiques et mécaniques proches de l'œsophage natif est rendu possible grâce à l'ingénierie tissulaire.

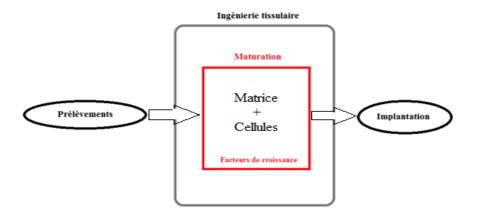
3. <u>Ingénierie tissulaire œsophagienne</u>

3.1. Définition

L'ingénierie tissulaire (IT) peut être définie comme l'application de principes biologiques, physico-chimiques et des fonctions qui mènent de la conception, des études, de l'achat et du contrôle de fabrication des équipements, à la construction et à la mise en service d'un complexe biocompatible ayant pour objectif la réparation, la restauration, ou la régénération des tissus vivants grâce à l'utilisation de biomatériaux, de cellules, et de facteurs seuls ou en association [39].

Les moyens utilisés par l'ingénierie tissulaire sont très variés et comprennent la physique, les mathématiques, l'informatique, la biologie, la médecine ou encore la robotique. Le principal objectif de l'ingénierie tissulaire est le développement d'organes de remplacement mais il peut aussi s'agir de mettre au point des modèles d'étude en 2 ou 3 dimensions pour la biologie. Toutes ces méthodes visent à reproduire dans le tissu artificiel le microenvironnement spécifique à chaque tissu avec des cellules, des facteurs de croissance et une matrice organique ou inorganique.

Les étapes traditionnelles de l'ingénierie tissulaire sont basées sur une matrice (scaffold = échafaudage) et comprennent tout d'abord le prélèvement de cellules chez le patient puis leur mise en culture avec éventuellement une étape de différenciation. Ensuite les cellules sont ensemencées sur un matériau non dégradable (synthétique) ou biodégradable (naturel ou synthétique; matrice) dont les propriétés sont choisies en fonction du tissu à reconstruire. La culture des cellules sur la matrice se fera préférentiellement dans des conditions dynamiques (bioréacteur) afin de favoriser la pénétration des nutriments et les échanges gazeux au sein du biomatériau. A cette étape, des facteurs de croissance et de différenciation peuvent être utilisés pour favoriser la croissance tissulaire. Enfin, après un temps de maturation suffisant, le tissu peut être réimplanté sur le patient. (**Figure 3**).



<u>Figure 3:</u> Principe général de l'ingénierie tissulaire : Après prélèvement, les cellules autologues sont amplifiées et ensemencées sur un matériau naturel ou synthétique en présence de facteurs de croissance. Une phase de maturation *in vitro* ou *in vivo* peut être utilisée avant l'implantation du produit d'ingénierie tissulaire.

3.2. Cahier des charges

La matrice est un complexe (naturel ou synthétique) biocompatible permettant le support cellulaire. Sa morphologie, sa géométrie, son épaisseur et sa porosité (taille des pores) sont connues pour influencer l'adhésion cellulaire, leur prolifération, l'organisation tissulaire, l'angiogenèse et la constitution de la matrice extracellulaire [21, 40]. La porosité et la taille des pores de la matrice déterminent les phénomènes de fibrose et l'angiogenèse [41]. La taille des pores doit être comprise entre 50 et 200 µm permettant la prolifération cellulaire, le transport des nutriments et l'élimination des déchets. Des pores de 35 à 70 µm doivent être présents afin de promouvoir l'angiogenèse [42]. Le scaffold œsophagien doit être biocompatible, biodégradable, et résistant à l'acidité gastrique présente dans l'œsophage de manière physiologique [42]. Il ne doit pas engendrer d'infection, d'inflammation et sa dégradation doit être compatible avec la régénération cellulaire [21]. En attendant la régénération cellulaire, le scaffold doit servir de substitut fonctionnel à l'œsophage. Il doit donc posséder des propriétés mécaniques et de suturabilité adaptées aux forces de pression exercées lors du passage du bolus alimentaire. Sa viscoélasticité doit supporter les phases de contraction-relaxation du péristaltisme.

Différentes approches sur la fabrication d'une matrice en ingénierie tissulaire œsophagienne ont été réalisées depuis le début du siècle dernier ; la première approche consistait en l'utilisation de matériaux non résorbables, puis de polymères synthétiques et enfin de matrices naturelles décellularisées.

4. <u>Les substituts œsophagiens issus de l'ingénierie tissulaire</u>

4.1. Historique

Les techniques de substitution œsophagiennes sont décrites depuis plus de 150 ans. Les premiers rapports faisaient état de l'utilisation de tube d'ivoire décalcifiés. En 1887, Symonds est le premier à utiliser des prothèses [43] puis Guisez [44] en 1914, Souttar [45] en 1924, Coyas [46] et Kropff [47] en 1954. Il s'agissait dans ces cas précis de stents œsophagiens sous différentes formes.

Dans les années 1950, Berman rapportait une série de remplacements œsophagiens chez le chien par une prothèse de méthacrylate comparée à une prothèse de polyéthylène [48]. Les tubes étaient renforcés aux extrémités par des « cuffs » couvertes de nylon. L'alimentation des chiens n'avait « pas posé de problème » et un cas de fistule avait été rapporté. Fryfogle et al. [41] étudiaient en 1963 le remplacement du tiers moyen de l'œsophage par une prothèse en Dacron-silicone chez le chien. Tous les chiens avaient présenté une sténose proximale. La même équipe rapportait le cas d'un homme de 74 ans chez qui avait été implanté le même type de prothèse. Le patient était en vie à 6 semaines [49]. Lister et al. [50] étudiaient les prothèses de polyéthylène associé à du collagène ou à un lambeau musculaire comme substitut œsophagien chez le chien. Le polyéthylène migrait avant 3 mois et s'en suivait une sténose anastomotique.

4.2. Matrices non résorbables

En 1983, Fukushima et al. étaient les premiers à utiliser un tube de silicone entouré d'une « mesh » de Dacron [51]. Ces tubes étaient implantés chez 16 chiens. Le taux de survie est de 44% à un an et de 25% à 6 ans. Ils notaient une régénération de la sous-muqueuse et de la muqueuse au contact des anastomoses. Cependant la partie centrale du tube était constituée de tissu fibrosé. Il n'y avait pas de glandes ni de tissu musculaire. Ces travaux princeps ont permis de montrer que le matériel non résorbable ne permettait pas une croissance tissulaire similaire au tissu natif [52]. Le développement de structures tubulaires en double couche composées de collagène et de silicone semblait être une alternative dans les années 90 [40]. Takimoto et al. présentaient en 1993 les résultats à long terme d'une structure tubulaire composée d'une couche externe de collagène et d'une couche interne de silicone implantée chez le chien [53]. La couche interne se comportait comme un stent et était retiré au bout de 4 semaines permettant ainsi de limiter les sténoses anastomotiques. Selon le délai écoulé entre l'implantation du tube et l'ablation du stent, Takimoto et al. observaient une régénération

tissulaire similaire au tissu œsophagien natif [54]. En 1995, la même équipe proposait la même stratégie avec un segment d'œsophage plus long que précédemment (10 cm vs 5 cm) avec des résultats encourageants [55]. Enfin en 1998 ils publiaient des données suggérant la possibilité d'obtention d'un néo-œsophage composé d'un épithélium stratifié, et surtout d'une musculeuse striée disposée en couche circulaire interne et longitudinale externe [56]. Natsume et al. rapportaient en 1990 et 1993 leurs résultats sur l'implantation de tubes double couche similaires à Takimoto et al. mais en y ajoutant des cellules épithéliales autologues d'origine buccale [57, 58]. Enfin Liang et al. réalisaient un tube double couche mais remplaçaient le collagène par du nitinol [59, 60]. Ils observaient la formation d'un épithélium malpighien stratifié péri-anastomotique après 1 à 2 mois de suivi avec un taux de sténose de 60% [59].

Le tableau 1 résume les différentes publications relatives à l'IT œsophagienne basée sur du matériel non résorbable (**Tableau 1**).

<u>Tableau 1</u>: Travaux de substitution œsophagienne utilisant des matériaux non résorbables

| Auteurs | Année | Matériel | Longueur | Modèle |
|-----------------------|-------|--------------------|----------|--------|
| Fukushima et al. [51] | 1983 | Silicone/Dacron | NR | Chien |
| Natsume et al. [57] | 1990 | Silicone/Collagène | 5 cm | Chien |
| Natsume et al. [58] | 1993 | Silicone/Collagène | 5 cm | Chien |
| Takimoto et al. [53] | 1993 | Silicone/Collagène | 5 cm | Chien |
| Takimoto et al. [54] | 1994 | Silicone/Collagène | 5 cm | Chien |
| Takimoto et al. [55] | 1995 | Silicone/Collagène | 10 cm | Chien |
| Takimoto et al. [56] | 1998 | Silicone/Collagène | 5 cm | Chien |
| Liang et al. [59] | 2009 | Silicone/Nitinol | 8 cm | Porc |
| Liang et al. [60] | 2010 | Silicone/Nitinol | 8 cm | Porc |

L'absence de biodégradation et de biocompatibilité au long terme se traduisant par des sténoses, des infections, des fistules et une faible croissance tissulaires sont le principal écueil des matériaux non résorbables. Les matrices résorbables synthétiques ou naturelles apparaissent comme une alternative aux inconvénients des matériaux non biodégradables.

4.3. Matrices résorbables synthétiques

Les scaffolds polymériques offrent des avantages en termes de propriétés biomécaniques, de prolifération cellulaire et de néo angiogenèse [40]. Des polymères synthétiques comme le poly(L-lactic acid) (PLLA), poly(lactide-co-glycolide) (PLGA, 75/25, 50/50), poly(caprolactone) (PCL), PCL/PLLLA, poly(L-lactide-co-caprolactone) (PLLC) et le poly(glycolic acid) (PGA) ont été utilisés dans l'élaboration de substituts œsophagiens. Cependant leur dégradation altérait leurs propriétés mécaniques et leur porosité.

Zhu et al. démontraient la biocompatibilité du PCL modifié ou non sur l'adhésion des cellules épithéliales [61]. Ils modifiaient le PCL avec du collagène IV modifié associé à du 1, 6-hexanediamine et du glutaraldéhyde. Ils démontraient ainsi une meilleure adhésion et prolifération cellulaire accrue confirmées par microscopie électronique à balayage (SEM). Enfin la quantification d'ADN était meilleure sur le PLC-collagène que sur les témoins (PLC seul et polystyrène). La même équipe [62] avait étudié le PLLC. La production de nanofibres de PLLC était faite par électrospinning et était modifiée avec de la fibronectine. Ces nanofibres présentaient un module d'élasticité en rapport avec la fragilité du scaffold modifié. Cependant l'étude du scaffold par SEM confirmait la meilleure adhésion, prolifération, et cohésion cellulaire en présence de fibronectine (versus le témoin PLLC seul). Enfin Zhu et al. avaient comparé en 2006 le comportement des trois lignées cellulaires œsophagiennes (cellules épithéliales, cellules musculaires lisses, et fibroblastes) ensemencées sur du PLLC seul, du PLLC-collagène et du PLLC-fibronectine [63]. L'adhésion et la prolifération cellulaires étaient meilleures sur le PLLC modifié, grâce à la présence de RGD (R-Arginine, G-Glycine, D-Aspartic acid), motifs présents dans le collagène et la fibronectine [64].

Les membranes de PLLA sont produites par des méthodes chimiques (solvants) [65]. Ces dernières peuvent être modifiées avec du collagène via des liaisons covalentes utilisant le glutaraldéhyde ou la génipine. La culture de cellules musculaires lisses était évaluée sur du PLLA modifié ou pas. L'adhésion et la prolifération des cellules musculaires lisses étaient meilleures sur le PLLA associé à du collagène. Ces résultats démontrent l'intérêt de la

présence de motifs de type RGD identique aux matrices extracellulaires facteur essentiel à l'ingénierie tissulaire [64].

La porosité des scaffolds synthétiques conditionne l'adhésion, la prolifération et les liaisons cellulaires. Beckstead et al. avaient développé des scaffolds de porosités différentes composés de PLLA, PCL, et de PGLA (75/25 ou 50/50) [65]. Ils avaient étudié des paramètres tels que la taille des pores, la concentration en calcium et la présence de protéines (collagène I et IV, fibronectine, laminine, et ostéopontine) pouvant influencer l'adhésion et la prolifération cellulaires (cellules épithéliales d'œsophage de rat). Ils avaient comparé leur résultats à un témoin (Alloderm®, derme humain décellularisé et réticulé). Une faible concentration en calcium permettait une meilleure prolifération et une meilleure différenciation (Ca2+<0.1mM). La taille des pores influençait l'organisation architecturale des cellules épithéliales. Des pores larges permettaient une meilleure organisation d'un épithélium stratifié. L'adhésion était favorisée par la présence de Collagène I > Collagène IV > fibronectine > laminine > ostéopontine. Enfin le scaffold Alloderm® offrait une architecture (sans modification préalable) plus favorable à l'organisation de l'épithélium.

Des scaffolds à base de fibres de PGA [66-72] ont été développés associés ou non à des unités cellulaires. Ces unités étaient formées de noyaux mésenchymateux entourés de cellules épithéliales. Ces derniers étaient implantés sur des rats permettant d'objectiver le développement d'un néo-œsophage similaire à l'œsophage natif [66]. Nakase et al. avaient développé deux types de scaffold afin de réaliser un remplacement circonférentiel de l'œsophage intra-thoracique chez un modèle canin [67]. Le premier type (KF-) était constitué de PGA associé à un feuillet de membrane amniotique sur lequel était ajouté du tissu musculaire lisse. Le deuxième type (KF+) était similaire au précédent à l'exception de l'ajout de kératinocytes autologues et de fibroblastes. Les scaffolds étaient enroulés autour d'un tube de polypropylène implanté dans le grand épiploon. Le type KF- était responsable de sténose moins d'une semaine après l'implantation, complications absentes dans le groupe KF+.

L'avantage de ces scaffolds polymériques est la promotion d'une ré-épithélialisation des extrémités au contact de l'œsophage natif. Cependant cette épithélialisation est lente (3 à 4 semaines).

Le tableau 2 résume les différentes publications relatives à l'IT œsophagienne basée sur un scaffold polymérique (**Tableau 2**)

<u>Tableau 2</u> : Travaux d'ingénierie tissulaire œsophagienne utilisant des scaffolds polymériques résorbables.

| Auteurs | Année | Matrice | Modèle | Cellules |
|-----------------------|-------|---|----------|--|
| Sato et al. [68] | 1994 | PGA-Collagène | Rats | Cellules épithéliales |
| Shinhar et al. [69] | 1998 | PGA-Collagène | Chiens | Acellulaire |
| Miki et al. [70] | 1999 | PGA-Collagène | Rats | Cellules épithéliales / Fibroblastes |
| Komuro et al. [71] | 2002 | PGA-Collagène | Porc | Acellulaire |
| Griskchiet et al. | 2003 | PGA-Collagène | Rats | Cellules épithéliales + |
| [66] | | | | noyaux mésenchymateux |
| Jansen et al. [72] | 2004 | PGA / PVDF | Lapins | Acellulaire |
| Beckstead et al. [65] | 2005 | PGA / PLLA / PLGA / PCL / Alloderm® | In vitro | Cellules épithéliales |
| Zhu et al. [64] | 2006 | PLLC-Collagène | In vitro | Cellules épithéliales / Fibroblastes / Cellules Musculaires Lisses |
| Zhu et al. [63] | 2007 | PLLA-Collagène | In vitro | Cellules Musculaires Lisses |
| Zhu et al [62] | 2007 | PLLC- Fibronectine | In vitro | Cellules épithéliales |
| Nakase et al. [67] | 2008 | PGA-Muscle lisse | Chiens | Fibroblastes/kératinocytes |
| Zhu et al [73] | 2009 | PLLC | In vitro | Cellules Epithéliales / Fibroblastes |
| Zhu et al. [61] | 2009 | PCL-Collagène | In vitro | Cellules Epithéliales |

[PGA: poly(glycolic) acid, PLLC : poly(L-lactide-co-6-caprolactone), PCL : polycaprolactone, BMM® : Matrigel, PLLA : poly(L-lactide) acid, PLGA : poly(lactic-co-glycolic) acid, PVDF : polyvinylidene fluoride]

4.4. Matrices décellularisées

Les matrices décellularisées (MD) contiennent un certain nombre de composants de la matrice extracellulaire (MEC) et sont riches en collagène, élastine, fibronectine, laminine, et facteurs de croissance. Les MD miment les fonctions biologiques et mécaniques de la MEC native et ont une architecture tridimensionnelle associée à un microenvironnement propice à la croissance, la prolifération, et l'orientation cellulaire [74, 75]. Les MD sont donc extrêmement employées dans l'ingénierie tissulaire vasculaire, valvulaire cardiaque, cutanée, et urologique [76].

La préparation des MD est réalisée par méthodes chimiques et physiques [76]. Les techniques chimiques d'élimination cellulaire employées sont représentées principalement par le Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), le tert-octylphényl-polyoxyéthylène (Triton X-100), l'acide déoxycholique (DEOX), l'acide per-acétique et la trypsination [77]. Ozeki et al. ont comparé ces méthodes et concluaient à la supériorité du DEOX au Triton X-100. Le DEOX permettait une diminution plus importante de la quantité d'ADN résiduels [78]. Les procédés de décellularisation permettent de réduire l'inflammation, et la calcification du scaffold après implantation parce qu'il y a parallèlement à la décellularisation une réduction du Complexe Majeure d'Histocompatibilité (CMH) [79]. Les MD utilisés dans l'IT œsophagienne dérivent de tissus tels que la vessie, l'œsophage, l'intestin grèle, l'estomac, le derme, ou l'aorte [80].

En 2001, Isch et al. avaient utilisé du derme humain décellularisé (Alloderm®) comme patch comblant un défect œsophagien de 2 cm x 1 cm dans un modèle canin [81]. Tous les chiens avaient survécu sans fistule, sténose, infection ou dysphagie objectivés par un transit pharyngo-œsophagien. L'analyse histologique des œsophages montrait épithélialisation associée à une néovascularisation du site substitué un mois après la chirurgie. En 2006, Bhrany et al. avaient développé une MD œsophagienne contenant les protéines de la MEC (présence de collagène, élastine, laminine, et fibronectine confirmée par étude histologique) et y avaient implantée des cellules épithéliales de rat [82]. Ils avaient constaté la présence d'un épithélium stratifié (5 à 7 couches cellulaires) après 11 jours de culture. Cette MD n'engendrait pas de réaction immunitaire. La même équipe a par la suite stabilisé leurs scaffolds par « cross-linking » avec du glutaraldéhyde ou de la génipine afin de leurs conférer des forces mécaniques satisfaisantes. Le glutaraldéhyde engendrait une toxicité cellulaire non retrouvée avec la génipine [83]. Les DM œsophagiens permettent également la croissance de tissus musculaires lisses. La culture de CMLs autologues associée à des MD œsophagiens a permis l'obtention de fascicules musculaires lisses avec une réponse inflammatoire minime. L'obtention de ces couches musculaires est attribuée à la sécrétion de facteur de croissance par les CMLs autologues [84]. L'utilisation de MD gastriques (MDG) a permis l'obtention de résultats satisfaisant dans le remplacement de vessie et d'intestin grèle [21]. Des patchs de MDG implantés au niveau de l'œsophage abdominal de rat montraient une bonne régénération muqueuse confirmée par Bromodéoxyuridine. La constitution d'un épithélium kératinisé était complète 2 semaines après l'implantation. Il n'y avait pas de sténose ou de dilatation [85]. Badylak et al. démontraient la possibilité d'utiliser des MD dérivées de vessie. Ces dernières associées à du tissus musculaire lisse permettaient le remplacement d'un long segment œsophagien [86]. L'utilisation de MD de vessie seule ou de tissu musculaire seul engendrait un tissu cicatriciel responsable de sténose. L'association du MD et du tissu musculaire permettait la régénération tissulaire proche de l'œsophage natif. L'utilisation de sous-muqueuse d'intestin grèle décellularisée (SIS) comme MD offrait des résultats encourageants. Lopes et al. avaient remplacé un défect œsophagien semi-circulaire chez le rat par des SIS lyophilisées ou fraîches. Les deux formes de SIS permettaient une bonne cicatrisation et la formation d'un œsophage normal [87]. La réponse inflammatoire était modérée après 8 semaines post-implantation. Wei et al. avaient développé un patch de SIS associé à des cellules épithéliales. Le défect œsophagien créé chez un modèle canin était remplacé par le patch de SIS associé ou pas aux cellules épithéliales. La cicatrisation était satisfaisante dans les deux groupes avec cependant une ré-épithélialisation complète lors de l'ajout de cellules épithéliales [88].

Le tableau 3 résume les différentes matrices décellularisées utilisées dans la confection de substituts œsophagiens (**Tableau 3**).

<u>Tableau 3</u>: Travaux d'ingénierie tissulaire portant sur les matrices naturelles décellularisées.

| Auteurs | Année | Matrice | Animal | Cellules |
|----------------------|-------|---------------------|------------|-----------------------|
| Macchiarini et al. | 1995 | UBM porcine | Chien | Cellules musculaires |
| [89] | | | | lisses |
| Badylak et al. [90] | 2000 | UBM et SIS porcines | Chien | Acellulaire |
| Kajitani et al. [91] | 2001 | Aorte porcine | Chien | Acellulaire |
| Isch et al. [81] | 2001 | Alloderm® | Chien | Acellulaire |
| Badylak et al. [86] | 2005 | UBM porcine | Chien | Cellules musculaires |
| | | | | striées |
| Lopes et al. [87] | 2006 | SIS porcine | Rat | Acellulaire |
| Ozeki et al. [78] | 2006 | EAM rat | In vitro | Cellules épithéliales |
| Bhrany et al. [82] | 2006 | EAM rat | Rat (sous- | Cellules épithéliales |
| | | | cutanée) | |
| Marzaro et al. [84] | 2006 | EAM porcine | Porc | Cellules musculaires |
| | | | | lisses |
| Urita et al. [85] | 2007 | GAM rat | Rat | Acellulaire |
| Bhrany et al. [83] | 2008 | EAM rat | Rat (sous- | Cellules épithéliales |
| | | | cutanée) | |
| Wei et al. [88] | 2009 | SIS porcine | Chien | Cellules épithéliales |
| Gaujoux et al. [92] | 2010 | Aorte porcine | Porc | Acellulaire |
| Tan et al. [93] | 2012 | SIS porcine | Chien | Cellules souches |

(UBM : Urinary Bladder Matrix, SIS : Small intestinal submucosa, EAM : Esophageal Acellular Matrix, GAM : Gastric Acellular Matrix, Alloderm®: Derme humain décellularisé)

4.5. Synthèse

L'analyse bibliographique précédente a fait l'objet d'une revue de la littérature publiée en 2014 [39]. Les matrices décellularisées (MD) semblaient être la meilleure option dans le choix d'une matrice œsophagienne (**Tableau 4**). La décellularisation permettrai de diminuer la réponse immunitaire tout en préservant les caractéristiques intrinsèques du tissu natif [21, 39]. Elle offre également la possibilité d'un ensemencement cellulaire par des cellules autologues. La prolifération cellulaire semblerait supérieure sur les MD [65].

<u>Tableau 4</u>: Avantages et inconvénients des différents types de matrices utilisées dans l'ingénierie tissulaire de l'œsophage

| | Avantages | Inconvénients |
|--------------------------|---------------------------------|----------------------------|
| | Bonne tenue mécanique dans | Nécessité de les retirer |
| Matrices non résorbables | le temps | Réaction inflammatoire |
| | Recul suffisant | Faible cellularisation |
| | Choix de différents | Tenue mécanique dans le |
| | matériaux | temps |
| Matrices polymériques | Contrôle des paramètres | Pas de contrôle de la |
| | favorables à la cellularisation | résorption |
| | Paramètres mécaniques | Cytotoxicité des matériaux |
| | maîtrisables | peu évaluée |
| | Similitudes à la structure | Procédés multiples |
| | native | Cytotoxicité |
| Matrices décellularisées | Conditions favorables à la | Tenue mécanique peu |
| | cellularisation | évaluée |
| | Faible réaction inflammatoire | Temps de dégradation mal |
| | | connue |

5. Maturation et ensemencement cellulaire

5.1. Maturation

La maturation en ingénierie tissulaire semblerait nécessaire pour obtenir une vascularisation adéquate à la survie du néo-tissu [94]. Deux approches sont décrites ; (i) l'approche *in-vitro* et (ii) l'approche *in-situ*.

L'approche *in-vitro* implique l'adjonction cellulaire préalable sous formes d'ensemencement « traditionnel », de formation de sphéroïdes cellulaires au sein du matériau ou l'ajout de feuillets cellulaires. Toutes ces entités sont centrées par le même paradigme consistant en l'ajout de cellules endothéliales plus ou moins organisées. Le principal écueil demeure le prélèvement de cellules endothéliales difficilement réalisable en pratique clinique [95]. De plus les caractéristiques intrinsèques de ces cellules diffèrent selon leur localisation princeps [94].

L'approche *in-situ* consiste en l'implantation du matériau dans un site anatomique richement vascularisé et facile d'accès en pratique clinique. Les sites d'implantation sont multiples mais principalement représentés par le tissu sous-cutané [96] et le grand épiploon [97]. Les techniques de lambeaux musculaires et de « boucles artério-veineuses » entrent également dans le cadre nosologique de la maturation *in-situ* [94]. Le principal défaut de cette approche est la nécessité d'une, voire deux interventions chirurgicales supplémentaires.

Le grand épiploon (GE) ou grand omentum est considéré comme le gardien de l'abdomen. Ces capacités de cicatrisation/régénération sont observées en pratique clinique depuis plus d'un siècle [98]. Le GE est localisé dans la cavité péritonéale, et se compose de 2 feuillets de tissus adipeux constitué de « cellules immunitaires » appelées « milky spots » proches des macrophages [99]. Les bénéfices de l'épiploplastie (omental transposition des anglo-saxons) sont reconnus pour le contrôle de l'inflammation [100], le traitement des infections [101], et favoriser la revascularisation [102, 103].

Le GE est utilisé pour favoriser la régénération et/ou la (re)construction de tissus comme le tissu nerveux [104], pancréatique [105], hépatique [106], rénal [107], et cardiaque [108]. Ses domaines d'application sont largement utilisés en ingénierie tissulaire pour la construction d'organes tels que la trachée [109], l'œsophage [67], la vessie [110] et l'intestin [111]. Sa position anatomique intra-abdominale permet de recevoir le substitut et de le transposer aisément par des techniques chirurgicales reproductibles [112].

Malgré des effets bénéfiques constatés dans beaucoup d'études, les mécanismes exercés par le GE dans les différents phénomènes de régénération sont encore peu connus. Des études chez le rat ont suggéré qu'en présence de corps étranger intra-abdominal, il existait une activation du GE permettant une migration cellulaire [113]. Ces cellules stromales nongraisseuses sécrètent des facteurs de croissance tels que le FGF (Fibroblast Growth Factor) et le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Elles expriment des marqueurs de cellules souches adultes (SDF-1α, CXCR4, WT-1) et des marqueurs de cellules embryonnaires (Nanog, Oct-4, SSEA-1) [113, 114]. Plus récemment, Shah et al. [100] ont caractérisé de manière plus précise les 3 types cellulaires activés dans les mécanismes de régénération induits par le GE. Les sous-types cellulaires étaient classés selon l'expression des marqueurs CD45 et CD34 (CD45+/CD34-; CD45-/CD34+; CD45-/CD34-). Le type CD45+ déjà décrit et appelé myelioid derived suppressor cells (MDSCs) [115] regroupe des granulocytes, des monocytes et des cellules dendritiques. Ils jouent un rôle dans la réponse immunitaire par suppression de la prolifération des cellules T CD4+ et CD8+ et Th1 [116]. L'activation des cellules CD45+ est dépendante de l'inducible nitric oxide synthase (iNOC) [117]. Le type CD45- joue un rôle dans la prolifération et l'activation des Cellules Th17. Le sous-type CD45-CD34+ est la source principale de cellules souches issues du GE [100]. En effet les cellules CD34+ ont déjà été décrites chez la souris comme immunorégulatrices [118], et sont considérées comme des cellules souches mésenchymateuses (MSCs). Les MSCs décrites initialement dans la moelle osseuse ont été décrites et caractérisées dans le tissu adipeux [119]. Leur capacité de différenciation dans des lignées méso, endo et ectodermiques a été largement décrite [120-125]. Les MSCs sécrètent des facteurs immunosuppresseurs [126] et favorisent la régénération des tissus lésés [127].

Le GE a la capacité de former des vaisseaux permettant la néovascularisation de tissus implantés tels que les îlots pancréatiques ou des cellules hépatiques [128, 129]. Des études suggèrent que le GE permet une angiogenèse adaptée à l'organe implanté témoignant d'une grande adaptabilité [130, 131]. Dans l'ingénierie tissulaire œsophagienne, l'utilité du GE sur la vascularisation du futur transplant est débattue et peu étudiée [39, 132]. L'utilisation du GE dans l'IT œsophagienne permettrait ; la vascularisation du futur transplant limitant ainsi les risques ischémiques, la limitation des réactions inflammatoires, la cellularisation de la matrice avant son implantation.

5.2. Cellularisation

L'ajout de cellules quel que soit la matrice utilisée permettrait de réduire l'inflammation, de promouvoir l'angiogénèse et de réduire les sténoses cicatricielles [39]. Les cellules utilisées peuvent être différenciées ou « à potentiel souches ». En ingénierie tissulaire œsophagienne [133], les cellules utilisées étaient principalement différenciées et représentées par des cellules épithéliales [78, 82, 83], des cellules musculaires lisses [84, 89], des cellules musculaires striées [86, 134] et des fibroblastes [64]. L'utilisation de cellules souches a été décrite dans l'ingénierie tissulaire œsophagienne [93]. Il s'agissait dans cette étude préclinique de Tan et al. de cellules autologues issues de la moelle osseuse dans un modèle canin. Le groupe expérimental (SIS + cellules) présentait une meilleure cicatrisation et une moindre inflammation que le groupe contrôle (SIS seule) [93].

L'utilisation de cellules paraît nécessaire dans les remplacements circulaires œsophagiens sans pour autant clairement identifier le type cellulaire à utiliser [39]. Les Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs) apparaissent comme des cellules souches « idéales » [135]. Les ADSCs sont des cellules souches mésenchymateuses multipotentes issus du tissu adipeux. Les deux principaux avantages (outre leurs capacités de différenciation) sont une accessibilité simple en pratique clinique [136] et une approche éthique facilitée par sa disponibilité chez l'adulte [137].

Les ADSCs ont été identifiées et décrites en 2001 [138]. Zuk et al. décrivaient une population de cellules multipotentes appelée PLA (Processed Lipoaspirate Cells) car elles étaient issues des lipoaspirations réalisées en chirurgie esthétique. Ces cellules souches étaient isolées à partir de la digestion enzymatique de la SVF (Stromal Vascular Fraction) du tissu adipeux. La culture de la SVF permet l'obtention d'une population rapidement adhérente à la boîte de culture. Zuk et al suggéraient que cette population de cellules adhérentes contenait un nombre significatif de cellules à potentiel souche [138]. (**Figure 4**)

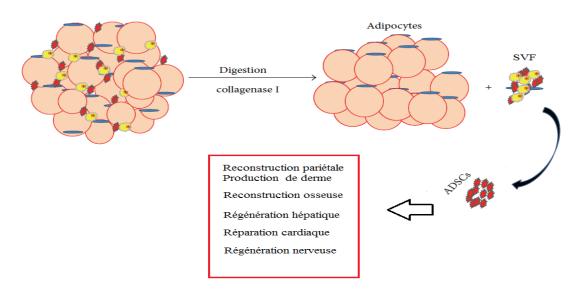


Figure 4 : Représentation schématique de l'isolation des ADSCs et de leurs applications

L'utilisation des ADSCs en médecine régénératrice œsophagienne n'est pas encore décrite. Leur abondance, la facilité de prélèvement et d'isolement, et leur pouvoir de différenciation [139] en font des cellules de choix.

6. Objectifs

6.1. Objectif principal

L'objectif principal de ce travail était de fabriquer une matrice œsophagienne décellularisée tubulaire implantable dans un modèle porcin. Il s'agissait de mettre au point et de valider un procédé de décellularisation simple et reproductible d'un œsophage porcin.

Le critère de jugement principal était de valider la décellularisation effective de l'œsophage selon les standards internationaux [76] par analyse histologique après coloration H.E.S et quantification de l'ADN résiduel dans la matrice.

6.2. Objectifs secondaires

Les objectifs secondaires étaient :

De préciser les caractéristiques physico-biologiques de la MD.

- Les caractéristiques mécaniques de la matrice étaient évaluées et comparées à l'œsophage avant décellularisation (natif).
- La présence et la cohésion des structures de la structure tissulaire de la matrice étaient comparées à l'œsophage natif.
- La quantité et la distribution des glycosaminoglycanes étaient évaluer et comparer avant et après la décellularisation.
- Les principales protéines de structure étaient caractérisées dans la MD et comparées à l'œsophage natif.
- La biocompatibilité de la MD était testée après implantation « in-vivo » dans un modèle murin.

De permettre l'ensemencement de la MD par des cellules souches

- La cytotoxicité de la MD était évaluée ainsi que l'attachement cellulaire.
- Les cellules souches devaient être ensemencées de manière simple et reproductible grâce à la fabrication de feuillets cellulaires.

D'évaluer l'intérêt de la maturation de la MD dans un bioréacteur.

- La cellularisation et la vascularisation de la MD étaient évaluées après implantation de cette dernière dans le grand épiploon sur un modèle murin.
- Le temps de maturation était déterminé selon la balance cellularisation/vascularisation et dégradation de la MD.
- Le bénéfice d'un ensemencement de la MD par des feuillets cellulaires avant maturation était évalué et comparé à l'absence d'ensemencement préalable.

De tester la faisabilité d'une substitution œsophagienne par une MD sur un modèle porcin.

- La suturabilité de la MD pour une substitution œsophagienne était testée cher le porc.
- Les suites opératoires d'une œsophagectomie associée à l'implantation de la MD étaient évaluées sur un modèle porcin.
- La pertinence clinique d'une maturation préalable de la MD dans le grand épiploon était évaluée sur un modèle porcin.

Matériels et Méthodes

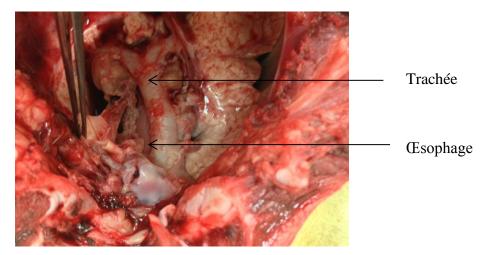
1. Prélèvement œsophagien

1.1. Modèle animal

Le modèle animal retenue était le porc domestique. Les animaux étaient jeunes (moins de 6 mois) et devaient avoir un poids inférieur à 50 kilogrammes (kg). Afin de réduire le nombre d'animaux sacrifiés (conformément à la législation en vigueur depuis Février 2013), les œsophages étaient prélevés sur des porcs sacrifiés sous anesthésie générale (dans les 30 minutes précédant le prélèvement) dans le cadre d'expérimentation cardiaque au sein de l'IHU-Lyric. Le comité d'éthique régional n'a pas jugé nécessaire la validation du protocole car il était réalisé sur des animaux sacrifiés dans le cadre d'une expérimentation autorisée.

1.2. Œsophagectomie

Tous les prélèvements ont été réalisés par des personnes ayant la qualification d'expérimentation animale de niveau 1. L'œsophagectomie était réalisée sur des porcs décédés dans les suites d'un prélèvement de cœur par sternotomie. Cette voie d'abord était donc utilisée pour prélever l'œsophage. La plèvre gauche était ouverte et le poumon gauche récliné après section du ligament triangulaire. L'adventice était ouverte puis un passage rétro-œsophagien était réalisé par digitoclasie à son tiers inférieur. La dissection était poursuivie jusqu'au hiatus œsophagien permettant une ascension de la Jonction Œsogastrique en intra-thoracique. L'œsophage était sectionné au cardia puis la libération était poursuivie au-dessus de la crosse de la grande veine azygos et aortique. L'œsophage était sectionné à son tiers supérieur. La sternotomie était refermée par un surjet passé au Mersuture® 1. Le cadavre était ensuite évacué selon les protocoles en vigueur au sein de la PTIB. (Figure 5)



<u>Figure 5</u>: Vue opératoire inversée (tête de l'animal en bas) d'un prélèvement œsophagien par sternotomie.

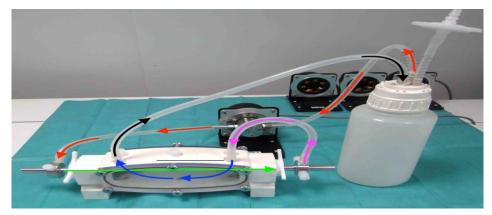
Une fois prélevé, l'œsophage était rincé au Phosphate-Buffered Saline (PBS). Les tissus environnementaux prélevés (nerfs et adventice) étaient enlevés par dissection chirurgicale. Tous les œsophages étaient coupés à chacune de leurs extrémités afin d'obtenir des échantillons d'une longueur maximale de 12 centimètres. Enfin l'œsophage était placé dans du PBS (Gibco©) associé à 1% d'antibiotiques (A.A.S, Sigma©) à 4°C dans l'obscurité.

La décellularisation était effectuée dans les 96 heures suivant le prélèvement et la mise en condition des échantillons.

2. <u>Décellularisation</u>

2.1. Chambre de décellularisation

La décellularisation œsophagienne était réalisée sur banc Bose Biodynamic Test® (Fig. 6).



<u>Figure 6</u>: Banc Bose Biodynamic Test® utilisé pour la décellularisation. Les flèches représentent le sens d'écoulement des réactifs. Les flèches indiquent le sens de circulation du liquide

La chambre est la cavité interne du banc BOSE® dans laquelle circulent les solutions de détersion en circuit fermé (**Figure 6**). Les solutions sont contenues dans un réservoir relié à une pompe à engrenages : l'aspiration se fait en suivant les flèches rouges. La solution arrive dans le premier collecteur inox, passe dans la lumière de l'œsophage et sort par un second collecteur inox (flèche verte). Une boucle (flèches roses) permet un deuxième passage de la solution dans la chambre du banc et assure le contact des solutions avec la surface externe de l'œsophage (flèches bleues). Une fois ce double passage effectué, la solution est aspirée au niveau d'un orifice sur la face supérieure de la chambre en direction du réservoir (flèches noires). Pour éviter les problèmes de surpression et permettre l'amorçage de la pompe, le réservoir dispose d'une mise à l'air filtrée à 0,2 μm.

2.2. <u>Traitements anioniques et enzymatiques</u>

La décellularisation durait 5 jours et comportait trois phases de détersions anioniques et enzymatiques entrecoupées de rinçages.

Dans un premier temps, un rinçage avec antibiotiques (eau osmosée + 1% (v/v) A.A.S, Sigma©) était réalisé durant 6 heures. La chambre était vidangée et une première solution de détersion était utilisée pendant 12 heures (eau osmosée + 10% (p/v) de sodium azide 99,9% (Sigma©). Un second rinçage (eau osmosée + 1% (v/v) A.A.S, Sigma©) était réalisé pendant 6 heures avant contact avec la deuxième solution.

La deuxième phase de détersion durait 24 heures et comportait de l'acide déoxycholique (DEOX) (eau osmosée + 4% (p/v) de DEOX (Sigma©)). Suite à ce traitement, un pré-rinçage à l'eau osmosée était réalisé avant le troisième rinçage avec antibiotiques (eau osmosée + 1% (v/v) A.A.S, Sigma©) de 6 heures.

La dernière détersion durait 12 heures et correspondait à la phase enzymatique (eau osmosée + 10% (p/v) NaCl et 2000 KUI de DNAse de type I (Sigma©)). Une série de 4 rinçages avec antibiotiques (eau osmosée + 1% (v/v) A.A.S, Sigma©) après le traitement par DNAse était réalisée pendant 8 heures à raison de 2 heures par rinçage.

Un ultime rinçage de 24 heures était effectué avec de l'eau osmosée (eau osmosée + 1% (v/v) A.A.S, Sigma©) ou du milieu de culture (DMEM, 10% (v/v) SVF, 1% (v/v) PSA).

À la suite de la décellularisation, les œsophages décellularisés étaient conditionnés dans des tubes Falcon® 50ml contenant 40ml de PBS 1X et 1% (v/v) d'antibiotiques (A.A.S, Sigma©). Les œsophages décellularisés étaient ensuite stérilisés par irradiation Gamma.

2.3. Stérilisation et stockage

La stérilisation par irradiation gamma était réalisée à l'aide d'un irradiateur Gammacell 3000 Elan MDS, Nordion (**Figure 7**).



Figure 7: irradiateur Gammacell 3000 Elan MDS, Nordion

La dose de 25 kGy était administrée en fractionnement sur 72 heures.

Au terme de l'irradiation Gamma, les échantillons étaient maintenus dans les tubes Falcon® 50ml contenant 40ml de PBS 1X et 1% (v/v) d'antibiotiques (A.A.S, Sigma©). Les tubes étaient placés dans l'obscurité à 4°C.

3. <u>Caractérisation de la matrice œsophagienne</u>

3.1. Histologie et immunohistochimie

Les échantillons étaient fixés dans du formaldéhyde (4%) à 4°C pendant 48 heures. Après fixation, les échantillons étaient déshydratés dans des bains d'éthanol de concentration croissante (70, 80, 90 et 100%) puis inclus en paraffine et coupés au microtome (épaisseur 7μm). Une fois les échantillons inclus, le marquage commençait par un déparaffinage des tissus par 3 bains de 5 minutes chacun dans du Xylène suivis de 2 bains successifs de 5 minutes chacun dans de l'alcool à 95° puis à 100°. Les échantillons étaient colorés à l'Hématéine Eosine Safran (HES), au bleu Alcian et/ou au trichrome de Masson. Pour la coloration H.E.S, un lavage à l'eau courante était effectué pendant 1 à 2 minutes suivi d'une coloration dans l'hématoxyline pendant 4 min. Un second rinçage à l'eau courante était effectué suivi d'un bain dans une solution d'eau lithinée. Un troisième rinçage à l'eau courante avait lieu suivi d'une coloration dans une solution aqueuse d'éosine à 1% pendant 5 à 7 minutes (ou d'Erythrosine pendant 30 secondes). Le tissu était rincé rapidement à l'eau courante, à l'alcool 70° puis 95° et à l'alcool absolu. La dernière étape consistait à baigner l'échantillon pendant 1 à 8 minutes dans une solution alcoolique de safran avant un ultime rinçage à l'alcool absolu et aux xylènes.

Pour l'étude immunohistochimique, les échantillons étaient bloqués après déparaffinage pendant 60 minutes dans du sérum de veau fétal 5% (Invitrogen, Life Technologies©) à température ambiante dans du PBS associé à du Triton-X 0,3% (Sigma-Aldrich©). Les échantillons étaient ensuite incubés toute la nuit à 4°C avec l'Anticorps primaire aux concentrations respectives: Laminin (1:100; Abcam Ab11575), Elastin (1:50; Abcam Ab21610), Fibronectin (1:100; Abcam Ab6328), Collagen I 1:100 (Ab34710), Collagen IV (1:100; Abcam Ab6586), MHC I (1:20; AbcamAb22367 FITC-conjugated), MHCII (1:100; Abcam Ab23990). Les échantillons étaient rincés à 3 reprises dans du PBS puis l'Anticorps secondaire était appliqué pendant une heure à température ambiante : Goat-anti-rabbit (1:500; Life Technologies; a11037), Goat-anti-mouse (1:500; Life Technologies; a11032).

3.2. Quantification ADN

La quantification de l'ADN résiduel était réalisée selon 2 méthodes répondant aux critères internationaux [76]. Des fragments homogènes d'œsophage décellularisé étaient prélevés (1 cm²) puis déshydratés. La première méthode suivait les instructions du kit commercialisé par Qiagen® (Dneasy Blood and Tissu Kit). La deuxième méthode consistait en la migration sur

gel d'agarose afin de quantifier le nombre de paires de bases résiduelles. Les mesures étaient réalisées sur trois échantillons différents. (Annexe 1)

3.3. Quantification des Glycosaminoglycanes

La quantification des glycosaminoglycanes GAGs était réalisée de façon semi-quantitative par histologie et coloration au bleu Alcian et par méthode quantitative selon les instructions du kit industriel commercialisé à cet effet (kit BlyscanTM GAGs Assay). L'extraction des GAGs était faite sur des échantillons de MD lyophilisée. Chaque échantillon était préparé par digestion par protéinase K dans une solution buffer pendant 48 heures à 50 °C. Les mesures étaient ensuite faites selon les instructions du kit. Les mesures étaient réalisées sur trois échantillons différents. (Annexe 2)

3.4. Biocompatibilité

La biocompatibilité de la matrice était évaluée « in-vivo » sur des rats Wistar en accord avec la législation en vigueur concernant l'expérimentation animale (animalerie A1, Université de Bordeaux). Chaque rat (femelle : 250 – 350g) était sous anesthésie générale (Isoflurane 1,5 – 3%) et maintenue sur une table chirurgicale chauffée. Le site chirurgical était rasé puis désinfecté par de la polyvidone iodée. Deux incisions médianes distinctes abdominales étaient faites au niveau latéral droit et gauche. Un espace était créé entre les muscles obliques et le muscle transverse. Un échantillon de 1 cm² était placé dans chaque espace créé. Chaque animal était porteur d'un fragment de MD et d'un fragment d'œsophage natif. La peau était fermée par des points séparés de Vicryl 3/0. Les rats étaient euthanasiés à J14 et J35. Chaque échantillon était excisé avec son tissu environnant puis placé dans du formaldéhyde à 4% pendant au moins 48 heures. Chaque échantillon était inclus en paraffine avant d'être coupé à une épaisseur de 6 micromètres.

Les échantillons étaient analysés par méthode histologique semi-quantitative après coloration H.E.S. L'analyse histo-morphologique comprenait l'évaluation de l'infiltration cellulaire, la présence de cellules géantes multinucléées, la vascularisation, le tissu conjonctif, l'encapsulation et la dégradation des implants. Des critères de scoring quantitatif étaient utilisés à J14 et J35 (**Tableau 5**). Selon les scores obtenus, les échantillons étaient classés en trois groupes : (i) réponse inflammatoire chronique et à corps étranger (score < 5), (ii) réponse inflammatoire modérée (5 < score < 10) et intégration (score > 10).

<u>Tableau 5</u>: « Scoring » histologique utilisé afin d'évaluer de manière semi-quantitative l'intégration de biomatériaux en coloration H.E.S à 14 et 35 jours de l'implantation

| Score à J14 | 3 | 2 | 1 | 0 |
|-------------------------|---------------|-----------------|------------|-----------|
| Infiltration cellulaire | >150 | 75 - 150 | 1 - 75 | 0 |
| Organisation du tissu | Très organisé | Moyennement | Non | MD intact |
| conjonctif | | organisé | organisé | |
| Dégradation | MD absente | Traces MD | Moyen | Non |
| Encapsulation | Absente | Minime | Modérée | Dense |
| Cellules géantes | 0 | 1 | 2-5 | >5 |
| multi nucléées | | | | |
| Vascularisation | >10 | 6 - 10 | 2 - 5 | 0 - 1 |
| Score à J35 | 3 | 2 | 1 | 0 |
| Organisation tissus | Très organisé | Moyennement | Non | MD intact |
| conjonctif | | organisé | organisé | |
| Dégradation | MD absente | Traces MD | Moyen | Non |
| Encapsulation | Absente | Minime | Modérée | Dense |
| Cellules géantes | 0 | 1 | 2-5 | >5 |
| multi nucléées | | | | |
| Croissance | Organisation | Cellules | Cellules | Pas de |
| musculaire | musculaire | musculaire dans | musculaire | muscle |
| | MD | la MD | en | |
| | | | périphérie | |

Tous les comptes réalisés étaient faits sur 10 champs à grossissement x40. MD : matrice décellularisée

3.5. Tests mécaniques

La caractérisation mécanique a été réalisée sur les œsophages natifs porcins à l'état frais et sur les matrices œsophagiennes porcines décellularisées (28 porcs ont été utilisés à cette seule fin après avis favorable du comité d'éthique régional). La longueur, le diamètre et l'épaisseur de chaque échantillon étaient mesurés avant les tests mécaniques. Les tests étaient effectués en traction longitudinale et en traction circonférentielle. Un test d'éclatement a été également réalisé. Les contraintes étaient exprimées en méga pascals (MPa), les forces en Newton (N), la

déformation en pourcentage (%) et le module d'élasticité en MPa. Les pressions endoluminales étaient exprimées en millimètres de mercure et en kilo pascals (kPa).

Les tests en traction longitudinale et circonférentielle étaient réalisés sur Frame2 MTS 858 Table top System en milieu physiologique dans une solution tamponnée (pour 6 litres, 48g NaCl / 1.2g KCl / 6.9g Na2HPO4, 2H2O / 1.2g KH2PO4) à 37 °C. (**Figure 8**) Ces tests ont été réalisés par la Société Rescoll®.

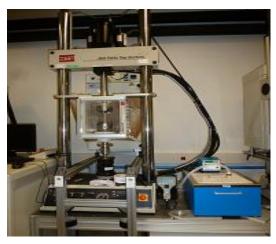


Figure 8: Test en traction longitudinale sur banc d'essai Frame 2 MTS 858

Les tests d'éclatement ont été réalisés sur un banc d'essai BOSE Biodynamic Test© en milieu physiologique dans une solution de DPBS X 1 à 37 °C. Les variations de diamètre ont été mesurées par un scanner micrométrique laser LSM 5035 Mitutoyo® (**Figure 9**). Les tests d'éclatement ont été réalisés au CIC-IT Bordeaux.



<u>Figure 9</u>: Test d'éclatement sur banc BOSE Biodynamic et mesure des variations de diamètres par scanner micrométrique laser LSM 5035

4. Cellularisation

4.1. Adipose derived stem cells

Les ADSCs ont été isolées à partir du tissu adipeux humain selon la technique de Zuk et al. [138] avec quelques modifications. Les prélèvements de tissu adipeux étaient obtenus à partir de patients ayant une abdominoplastie. Ces prélèvements étaient acheminés en conditions stériles puis découpés et placés dans des flacons de 250 mL. Une digestion à la collagénase de type I 250 U/mg était ensuite réalisée sous agitation mécanique au shaker (250 rpm) pendant 90 minutes à 37°C. Après 5 min de centrifugation à 900 rpm, la couche lipidique supérieure était retirée et la fraction vasculaire stromale ainsi obtenue était traitée pendant 10 min avec un tampon ELB (Erythrocytes Lysis Buffer, composé de 155 mM NH4CL, 5,7 mM KH2PO4, 0,1 mM). Une fois traitée, la FVS était filtrée sur un tamis cellulaire de 100 µm avant d'être centrifugée pendant 10 min à 1 100 rpm. Le culot était remis en suspension dans un milieu de base (DMEM/F12) complété avec 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF) et successivement filtré sur des tamis cellulaires de 70 et 40 µm. La suspension cellulaire obtenue était placée dans des boîtes de culture de 150 cm² en atmosphère humide enrichie avec 5% de CO2 à 37°C. Le milieu de culture était renouvelé tous les 2-3 jours. A confluence, les cellules adhérentes au plastique correspondantes aux ADSCs étaient détachées par l'action d'une enzyme (solution de trypsine/EDTA (0,125% (p/v) – 0,0625% (v/p))) puis réensemencées à raison de 10 000 cellules/cm2 dans des flacons de culture pour amplification.

4.2. Cytotoxicité

Deux techniques étaient utilisées pour évaluer la cytotoxicité des produits de relargage générés par la décellularisation et/ou la stérilisation : le test au MTT (bromure de 3-(4-5 diméthylthiasol-2-yl)diphényl tétrazolium)) permettant de quantifier une activité métabolique et le test au Rouge Neutre (RN) évaluant la viabilité cellulaire. Au préalable de ces deux tests, les ADSC étaient ensemencées en plaque 96 puits à haute densité (5 000 cellules/puits afin d'obtenir rapidement la sous-confluence) dans leur milieu de culture classique. Elles étaient placées en incubateur à 37°C enrichi à 5% de CO2 pendant 24 heures avant d'être mises au contact des véhicules d'extraction purs et testées pendant 24 heures.

La cytotoxicité éventuelle des MD envers les ADSCs était recherchée en étudiant l'effet provoqué par les véhicules d'extractions des MD. Ces véhicules d'extractions étaient obtenus par immersion des MD pendant différents temps (24, 48 et 72h) et permettaient de mettre en évidence un éventuel effet toxique lié au relargage de substances (provenant potentiellement

de la phase de décellularisation). Les extraits étaient préparés dans le respect de la norme européenne EN 10993-5 fixant un rapport surface apparente immergée de l'échantillon/volume du véhicule d'extraction allant de 3 à 6 cm²/ml (le rapport étant variable selon la géométrie et le type d'échantillons à tester).

Le MTT (bromure de 3-(4-5 diméthylthiasol-2-yl)diphényl tétrazolium)) est un sel de tétrazodium de couleur jaune en solution aqueuse à pH neutre. Il est réduit en cristaux bleus de formazan par les succinates déshydrogénases mitochondirales des cellules vivantes. La quantité de formazan générée par les cellules après leur incubation avec le MTT est directement liée à leur activité métabolique. Le véhicule d'extraction déposé dans les puits préalablement ensemencés était aspiré et la couche cellulaire rincée avec la solution de Hank's. La solution de travail de MTT, obtenue par dilution de la solution mère (5 mg/ml dans du PBS 0,1M, pH 7,4) au 1/5ème dans du DMEM, était déposée à raison de 125 µl par puits. Les plaques de culture ont été placées dans l'incubateur pendant 3 heures à 37°C et 5% de CO2. Une fois incubés, les surnageants étaient aspirés et les cellules lysées à l'aide de 100 µl de DMSO afin de solubiliser les cristaux de formazan intracellulaires. La lecture de l'intensité de la coloration était réalisée à 540 nm.

Le rouge neutre est un colorant vital qui se fixe par liaison électrostatique sur les sites anioniques de la matrice lysosomiale et toute diminution de l'incorporation de ce colorant traduit une altération de l'intégrité membranaire de ce compartiment. Le véhicule d'extraction déposé dans les puits préalablement ensemencés était aspiré. La solution de travail de rouge neutre, obtenue par dilution au 1/80ème dans l'IMDM sans rouge de phénol de la solution mère (4 mg/ml dans du PBS 0,1M, pH 7,4), était déposée à raison de 100 μl par puits. Les plaques de culture étaient placées dans l'incubateur pendant 3 heures à 37°C et 5% de CO2. Une fois incubées, les surnageants étaient aspirés et les cellules lavées avec de la solution de Hank's. La lyse des cellules était réalisée par l'addition de 100 μl de solution de lyse (50% (v/v) éthanol, 1% (v/v) acide acétique 40% (v/v) H2O). La lecture de l'intensité de la coloration a été faite à 540 nm.

Le test au Rouge Neutre et le test MTT devaient objectiver des valeurs de viabilité cellulaire supérieures à 70% (seuil en dessous duquel le matériau testé est considéré comme cytotoxique selon la norme EN 10993-5). Les viabilités cellulaires étaient exprimées en pourcentages et étaient calculées par rapport à un témoin négatif (ADSCs dans leur milieu de

culture sans véhicule d'extraction) représentant la viabilité cellulaire maximale (valeur 100 %). Le témoin positif de cytotoxicité (Triton) permet de vérifier la réactivité des cellules testées.

4.3. Test d'attachement

L'adhésion des cellules après ensemencement a été testée sur 3 temps (3, 6 et 24 heures) en conditions statiques sur témoin plastique et sur les MD. L'ensemencement a été réalisé à partir d'échantillons de 1 cm² déposés en plaques de culture de 48 puits sur 4 à 6 échantillons de matériaux et 4 à 6 puits témoins de 1 cm² pour chaque temps.

Les MD utilisées pour ce test étaient séparées manuellement en deux unités distinctes (muqueuse + sous-muqueuse et musculeuse) afin d'évaluer l'attachement cellulaire sur chacune d'elles. Une fois séparées, les faces étaient repérées et découpées en disques de 8 mm de diamètre à l'emporte-pièce. Deux gouttes d'agarose étaient déposées au fond des puits recevant les échantillons afin d'empêcher l'attachement spontané des ADSCs au plastique. Trois plaques de culture de 48 puits ont été ainsi préparées correspondant aux temps 3, 6 et 24 heures. Les disques de MD ont été placés dans les puits et du milieu de culture a été rajouté à raison de 500 μL par puits (IMDM sans rouge de phénol). Les plaques ainsi préparées ont été pré-incubées pendant 24h dans l'incubateur à 37°C enrichie à 5% CO2. Les ADSCs ont ensuite été ensemencées à raison de 100 000 cellules par puits et les plaques remises à l'incubateur pour 3, 6 ou 24 heures selon le temps prévu par plaque.

Après 3, 6 et 24 heures de contact ADSC/témoin plastique et ADSC/MD dans une étuve à 37°C et 5% de CO2, l'adhésion était quantifiée par le dosage de l'activité d'une enzyme lysosomiale, la N-acétyl-β-D-hexosaminidase [48]. À chaque temps de l'analyse, 240 μl de substrat de cette enzyme (p-nitrophénol- N-acétyl-β-D-glucosamidine 7,5 nM, citrate de sodium 0,1 mM pH 5, Triton-X100 5% (v/v)) étaient ajoutés dans chaque puit et incubés pendant 2 heures à 37°C et 5% de CO2. La réaction était ensuite arrêtée par l'addition de 360 μl d'un tampon glycine 50 mM, EDTA 5 mM, pH 10,4 et la quantification de l'activité était réalisée après lecture de l'absorbance à 405 nm. Les résultats étaient exprimés en pourcentage d'attachement cellulaire sur matériau par rapport à la surface témoin (polystyrène des boîtes de culture).

4.4. Production de feuillets

Les ADSCs en P2 étaient ensemencés à raison de 10 000 cellules/ cm2 dans des flacons de culture T150 pelables afin de faciliter le prélèvement du feuillet. Le milieu utilisé pour la production de feuillets était composé de DMEM-HAM'S (3:1), 10% (v/v) SVF, 1% (v/v) A.A.S, (Sigma©) et 50 µg/mL d'acide ascorbique. Les flacons de culture étaient placés dans une étuve en atmosphère humide à 37°C enrichie à 5% de CO2. Les milieux étaient changés 3 fois par semaine. Un système de lest était nécessaire afin d'éviter le décollement précoce des feuillets de la boîte de culture. Ce système consistait en l'utilisation de barreaux aimantés recouverts de PTFE et de rondelles en fer. Deux rondelles étaient disposées sous le flacon de culture et des barreaux aimantés stériles étaient placés dans le flacon au-dessus des rondelles (Figure 10).



Figure 10 : Lestage des feuillets avant leur application sur l'œsophage décellularisé

4.5. Ensemencement

L'ensemencement des MD via les feuillets était réalisé sur la face interne et externe en maintenant la structure tubulaire de la MD. L'ensemencement de la face externe était fait en déposant la MD à la partie supérieure du feuillet en place dans la boîte de culture (**Figure 10**). Le feuillet adhérait à la MD et permettait un enroulement progressif jusqu'à 2 à 3 circonvolutions. Le procédé d'ensemencement de la face interne était similaire mais nécessitait au préalable l'éversion manuelle de la MD. La face interne était alors à l'extérieur de la MD et inversement. L'éversion de la MD se faisait dans premier temps permettant l'ensemencement de la phase interne. L'ensemble était maintenu en culture pendant 14 jours puis éversé de nouveau permettant l'ensemencement de la face externe. Une fois les deux faces ensemencées, les complexes MD/feuillets étaient maintenus dans les boîtes de culture T150 associé à un milieu de culture similaire à celui des ADSCs pendant 21 jours. L'analyse du complexe MD/feuillets était faite par histologie en coloration H.E.S à J0, J14, J21, J28 et J35.

5. Maturation

5.1. Modèle animal

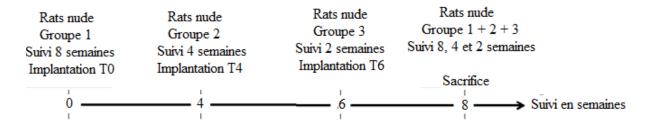
Afin d'évaluer l'effet du grand épiploon sur la MD, ces dernières étaient implantées dans le grand épiploon de rats « nude » après accord du comité d'éthique conformément à la législation en vigueur (Animalerie A2 de l'Université de Bordeaux). Six MD différentes étaient utilisées afin de s'assurer de la reproductibilité de l'expérience. Des échantillons de MD étaient préparés en conditions stériles afin d'obtenir des fragments de 1 cm². Selon l'attribution des groupes, les MD étaient ensemencées comme décrit précédemment en extemporané de l'implantation.

Les rats étaient placés sous anesthésie générale (Isoflurane 1,5-3%) et maintenus sur une table chirurgicale chauffée sous hotte à flux laminaire. Une laparotomie médiane permettait d'accéder au grand épiploon. Un échantillon de MD était enroulé dans le grand épiploon puis fixé par un point de fil monofilament non résorbable (Prolène 4/0). Le plan aponévrotique était fermé par un surjet de fil tressé résorbable (Vicryl 3/0). La peau était fermée par des points séparés de fil tressé résorbable (Vicryl 4/0).

Les rats étaient sacrifiés à 2, 4 ou 8 semaines suivant l'implantation. Une exérèse de l'implant était réalisée puis analysée en histologie après inclusion et coloration H.E.S.

5.2. Schéma expérimental

L'étude de la maturation préalable d'une MD *in situ* avait pour objectifs de déterminer le temps optimal de cette dernière et le besoin d'une cellularisation préalable. Les critères de jugement reposaient sur l'analyse histologique de l'inflammation, de la vascularisation, et de la cellularisation selon le temps de maturation et la réalisation d'un ensemencement préalable. Trois groupes de rats nude étaient formés selon le temps de suivi ; 2, 4 et 8 semaines. (**Figure 11**) Dans chaque groupe, la moitié des individus était implantée avec une MD ensemencée avec un feuillet et l'autre moitié avec une MD seule.



<u>Figure 11</u>: Schéma expérimental évaluant le temps de maturation dans un bioréacteur sur un modèle murin d'une matrice biologique en fonction de sa cellularisation préalable.

5.3. Histologie

Lors du sacrifice des animaux, une laparotomie était réalisée après le constat de décès de l'individu selon la législation en vigueur. L'implant était prélevé en monobloc avec l'épiploon attenant. Chaque échantillon était placé dans du Formaldéhyde à 4%. Pendant au moins 36 heures. L'analyse histologique était réalisée en H.E.S après inclusion et coupe de 6 µm. L'évaluation semi-quantitative de l'inflammation, la vascularisation et la dégradation de la MD était réalisée selon les critères du **Tableau 5** (page 40).

6. Substitution œsophagienne

6.1. Modèle animal

Le modèle animal retenu était le porc domestique. Les animaux étaient jeunes (moins de 6 mois) et devaient avoir un poids inférieur à 50 kilogrammes (kg). Afin de réduire le nombre d'animaux sacrifiés (conformément à la législation en vigueur depuis Février 2013), le prélèvement œsophagien était réalisé comme décrit précédemment (paragraphe 1.1).

Les porcs devant avoir une substitution œsophagienne étaient opérés sous anesthésie générale selon les modalités suivantes : *Prémédication* : Kétamine 10 mg/kg IM, Azapérone 2 mg/kg IM. *Induction* : Pentobarbital 10 mg/kg IV. *Intubation* : après nébulisation de lidocaïne en solution à 4 %. *Entretien*: Isoflurane 2%, Oxygène 100%. (Curare) : Vercuronium 0,1 mg/kg bolus toutes les 30 minutes. *Analgésie multimodale* : Fentanyl 25 μg/kg/h + Kétoprofen 2 mg/kg + Bupivacaine locale 2 mg/kg. (Hypnotique/sédatif): Kétamine + midazolam 1 mg/kg/h + 0,05 mg/kg/h. *Monitoring* : Contrôle continu de la saturation en oxygène de l'hémoglobine. Un électrocardiogramme évaluait la fonction cardiaque de l'animal et permettait de corriger le plus rapidement possible d'éventuels troubles du rythme.

6.2. Schéma expérimental

Le but de ce protocole expérimental était d'évaluer la faisabilité d'une œsophagectomie par laparotomie dont le remplacement œsophagien était assurée par une MD préalablement maturée ou non. Deux groupes de porcs étaient réalisés. Parmi les deux groupes, le premier était opéré à 2 reprises par laparotomie médiane à 4 semaines d'intervalle (**Figure 12**).

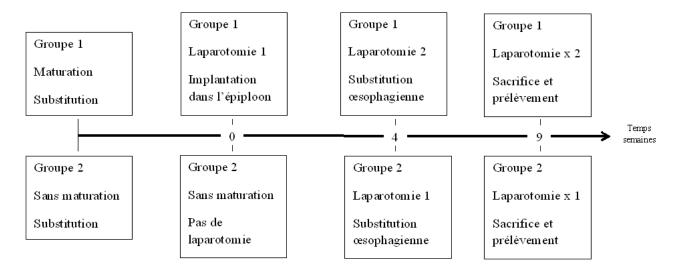


Figure 12: Schéma expérimental évaluant la faisabilité d'une substitution œsophagienne chez le porc domestique par un œsophage hétérotopique préalablement décellularisé. Seuls les MD du groupe 1 étaient implantées dans l'épiploon 4 semaines avant la substitution œsophagienne.

La première laparotomie permettait l'exposition du grand épiploon et l'enroulement de la MD fixée à ses extrémités par des points de fil mono-filament non résorbable (Prolène 4/0). La lumière de chaque MD était tutorisée (la maintenant ouverte) avant son implantation par une sonde de Foley charrière 20 Fr. La fermeture du plan aponévrotique était assurée par deux hémi-surjets de Vicryl 1. Le plan cutané était réalisé par des points de Blair-Donati au Vicryl 3/0 rapide. Lors de la seconde laparotomie une oesophagectomie était pratiquée. La MD était placée entre l'œsophage thoracique et l'œsophage abdominal. Les anastomoses MD-œsophagiennes étaient termino-terminales à points séparés de fils monofilament à résorption lente (PDS 4/0). Dans le premier groupe la MD située dans le grand épiploon était transposée en respectant la vascularisation du grand épiploon vers la MD. Dans le deuxième groupe une épiploplastie de recouvrement était réalisée autour de la MD implantée.

Le suivi était réalisé quotidiennement pendant un mois postopératoire. Les animaux étaient pesés tous les deux jours. La réalimentation s'est faite dès le lendemain de l'intervention. La dysphagie, l'hypersialorhée, les vomissements et la température de l'animal faisaient parties de la surveillance.

6.3. Histologie

Lors du sacrifice des animaux après un mois de suivi, une laparotomie était réalisée après le constat de décès de l'individu selon la législation en vigueur. L'implant était prélevé en monobloc avec l'épiploon attenant et les organes sus et sous-jacents. Chaque échantillon était placé dans du Formaldéhyde à 4%. Pendant au moins 36 heures. L'analyse histologique était réalisée en H.E.S après inclusion et coupe de 6 µm.

7. Analyses statistiques

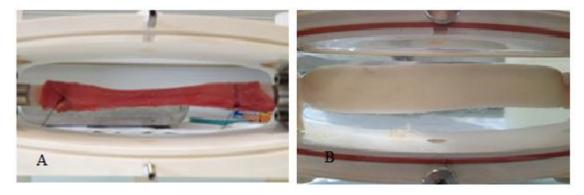
La distribution des échantillons étaient considérée comme normal. La comparé de deux pourcentages était faite selon le test du Chi2 et la comparaison de deux moyennes selon le test de Student. La différence était significative pour une valeur de p < 5%.

Résultats

1. <u>Décellularisation</u>

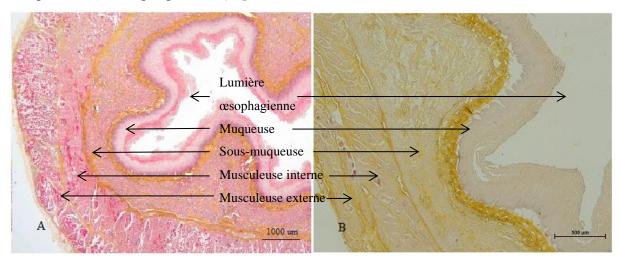
1.1. Analyse histologique

L'aspect macroscopique des échantillons se modifiait entre chaque cycle de détersion (**Figure 13**). L'aspect final était une structure tubulaire translucide. Le nombre d'œsophage porcin décellularisée était de 103.



<u>Figure 13</u>: Aspect macroscopique de l'échantillon lors de la décellularisation. A : aspect de l'œsophage porcin avant sa décellularisation, B : aspect de la MD en fin de décellularisation

L'analyse histologie après coloration H.E.S n'objectivait pas de noyau intact résiduel après la décellularisation. La trame structurelle de l'œsophage décellularisé était conservée en comparaison à l'œsophage natif. (**Figure 14**)



<u>Figure 14</u>: Coupes histologiques après coloration H.E.S d'un œsophage porcin avant et après sa décellularisation. A : œsophage porcin natif (Grossissement x10), B : œsophage porcin décellularisé (Grossissement x40)

Les 3 couches distinctes de l'œsophage natif étaient préservées après la décellularisation. La coloration au trichrome de Masson révélait la présence persistante de Collagène dont la conformation était similaire à l'organe natif. (**Figure 15**)

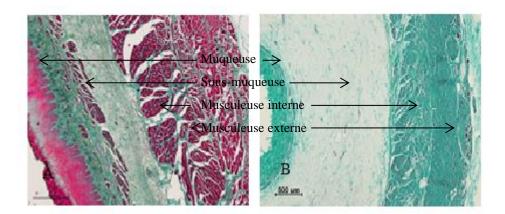
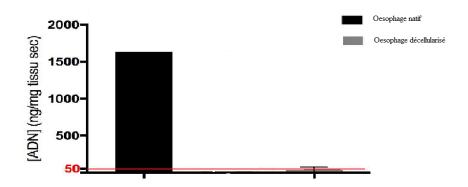


Figure 15 : Coupe histologique après coloration au trichrome de Masson d'un œsophage porcin avant et après sa décellularisation. A : œsophage porcin natif (Grossissement x 40), B : œsophage porcin décellularisé, persistance de la trame conjonctive (Grossissement x 40)

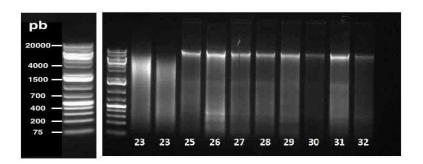
1.2. Quantification de l'ADN résiduel

Les quantifications de l'ADN résiduel étaient réalisées sur des échantillons lyophilisés issus de 4 MD différentes et d'un œsophage natif témoin. (**Figure 16**) La concentration moyenne d'ADN résiduel était de 50 ng/mg de tissu sec pour les MD, et de 1630 ng/mg de tissu sec pour l'œsophage natif.



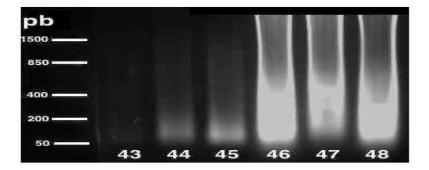
<u>Figure 16</u>: Graphique d'illustration de la quantification de l'ADN résiduel exprimée en ng/mg de tissu lyophilisé d'un œsophage décellularisé

Les migrations sur gel d'agarose des solutions d'extraction de l'ADN résiduel sur l'œsophage natif révélaient la présence d'une bande très nette au début du gel correspondant à une taille de 20 000 paires de bases. (**Figure 17**)



<u>Figure 17</u>: Migrations sur gel d'agarose de solutions d'extraction de l'ADN résiduel sur un œsophage natif d'origine porcine

Les migrations des solutions d'extraction de l'ADN résiduel issue des MD mettaient en évidence une concentration importante de fragments d'ADN compris entre 50 et 200 paires de bases (pistes 43 - 45). Des smears étaient observés sur les pistes de migration (pistes 46 - 48) pour l'œsophage témoin. (**Figure 18**)



<u>Figure 18</u>: Migrations des solutions d'extraction de l'ADN résiduel issue d'œsophage décellularisé (pistes 43 - 45) et d'œsophage natif (pistes 46 - 48)

2. <u>Caractéristiques de la matrice biologique</u>

2.1. Glycosaminoglycanes (GAGs)

L'évaluation histologique au Bleu Alcian révélait une diminution importante mais non quantifiable des GAGs après décellularisation. Il persistait une coloration des GAGs dans la sous-muqueuse après la décellularisation. (**Figure 19**)

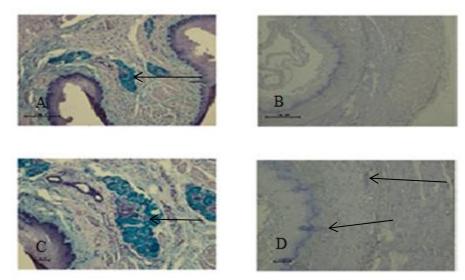
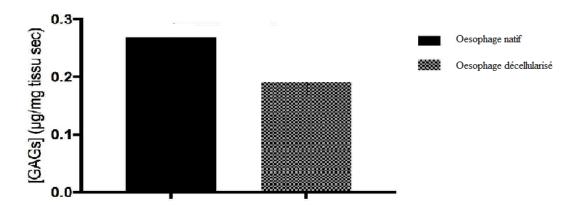


Figure 19: Coloration histologique au bleu Alcian d'un œsophage natif et décellularisé. La présence de glycosaminoglycanes est plus importante dans l'œsophage natif. A: Glycosaminoglycanes présents dans la sous-muqueuse (flèche) d'un œsophage porcin natif (Grossissement x10), B: Absence de visualisation de GAGs dans la sous-muqueuse d'un œsophage porcin décellularisé (Grossissement x10), C: GAGs présents dans la sous-muqueuse (flèche) d'un œsophage porcin natif (Grossissement x40), D: Traces de GAGs présents dans la sous-muqueuse (flèches) d'un œsophage porcin décellularisé (Grossissement x40)

Les concentrations en GAGs étaient de 0,26 µg/mg de tissu sec pour l'œsophage natif et de 0,19 µg/mg de tissu sec pour les MD. Il n'y avait pas de différence significative entre ses deux valeurs. La baisse constatée était de 27% de GAGs mesurés en moins après décellularisation. (**Figure 20**)

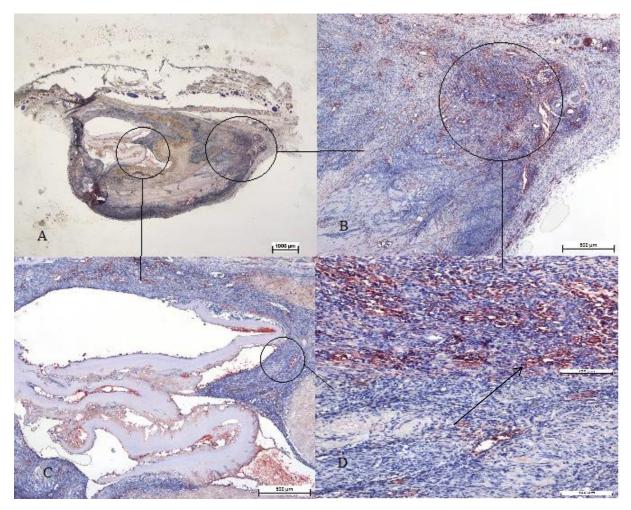


<u>Figure 20</u>: Graphique d'illustration de la quantité mesurée de glycosaminoglycanes résiduels dans des échantillons d'œsophages porcins avant et après décellularisation

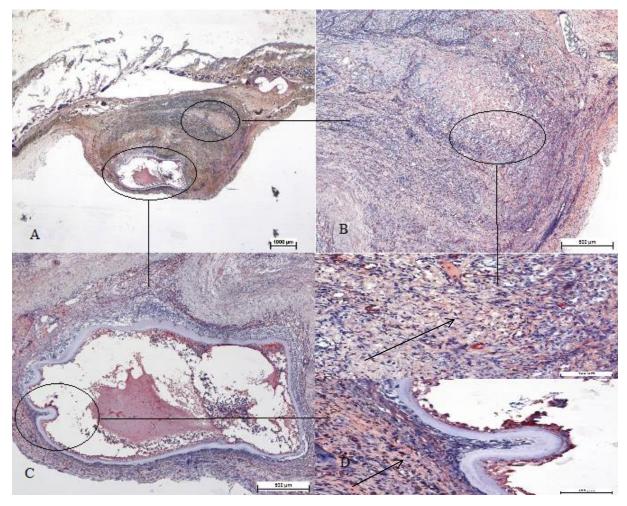
2.2. Structures biologiques

Les protéines de structures de la matrice extracellulaire (Laminine, Elastine, et fibronectine) étaient présentes avant et après la décellularisation. Le collagène IV, protéine de la membrane basale, n'avait pas pu être mis en évidence sur les œsophages natifs et décellularisés.

La laminine était présente dans la sous-muqueuse et la musculeuse. Après décellularisation la laminine était toujours présente et répartie comme dans la structure native. (**Figures 21 et 22**)



<u>Figure 21</u>: Analyse immunohistochimique de la laminine dans un œsophage porcin natif. A : marquage de la laminine (Grossissement x4), B : Marquage de la laminine dans la sousmuqueuse (Grossissement x10), C : Marquage de la laminine dans la musculeuse (Grossissement x10), D : Marquage de la laminine (flèche) dans la sous-muqueuse et la musculeuse (Grossissement x200).



<u>Figure 22</u>: Analyse immunohistochimique de la laminine dans un œsophage porcin décellularisé. A : marquage de la laminine (Grossissement x4), B : Marquage de la laminine dans la sous-muqueuse (Grossissement x10), C : Marquage de la laminine dans la musculeuse (Grossissement x10), D : Marquage de la laminine (flèches) dans la sous-muqueuse et la musculeuse (Grossissement x200).

L'élastine était présente dans toutes les couches œsophagiennes. Elle était observée en bordure des vaisseaux sanguins avant et après la décellularisation. (**Figures 23 et 24**)

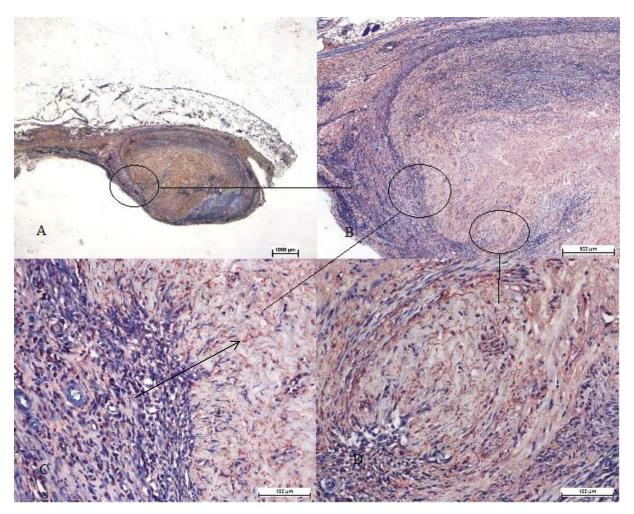
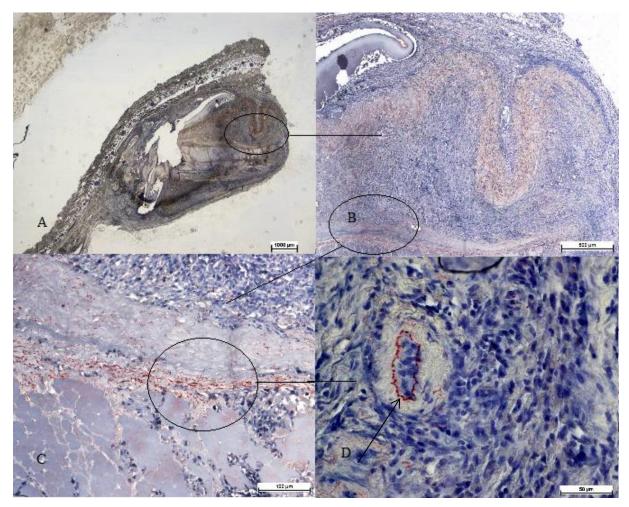
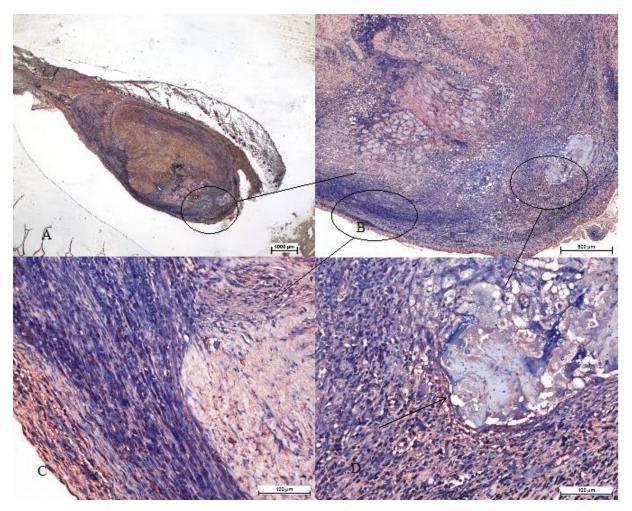


Figure 23 : Analyse immunohistochimique de l'élastine dans un œsophage porcin natif. A : marquage de l'élastine (Grossissement x4), B : Marquage de l'élastine dans la musculeuse (Grossissement x10), C : Marquage de l'élastine (flèche) dans la musculeuse (Grossissement x200), D : Marquage de l'élastine dans la sous-muqueuse et la musculeuse (Grossissement x200)



<u>Figure 24</u>: Analyse immunohistochimique de l'élastine dans un œsophage porcin décellularisé. A : marquage de l'élastine (Grossissement x4), B : Marquage de l'élastine dans la musculeuse (Grossissement x10), C : Marquage de l'élastine dans la musculeuse (Grossissement x200), D : Marquage de l'élastine dans la sous-muqueuse au pourtour des capillaires (flèche) (Grossissement x400)

La fibronectine était principalement présente dans la musculeuse avant et après la décellularisation. (Figure 25 et 26)



<u>Figure 25</u>: Analyse immunohistochimique de la fibronectine dans un œsophage porcin natif. A : marquage de la fibronectine (Grossissement x4), B : Marquage de la fibronectine dans la musculeuse (Grossissement x40), C : Marquage de la fibronectine dans la musculeuse (Grossissement x200), D : Marquage de la fibronectine dans la sous-muqueuse et la musculeuse (Flèche) (Grossissement x200)

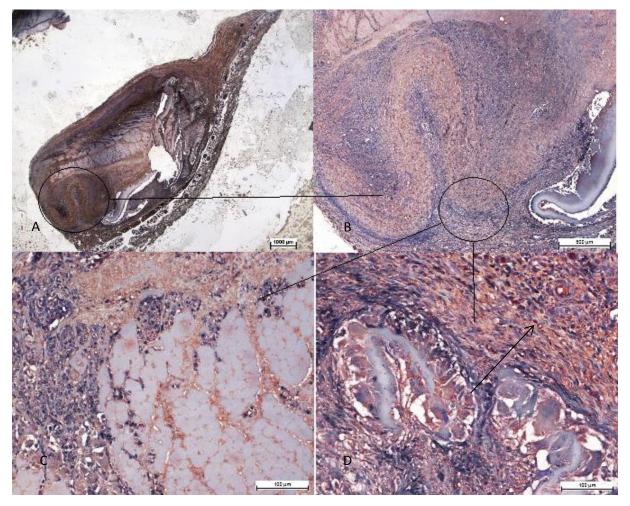


Figure 26 : Analyse immunohistochimique de la fibronectine dans un œsophage porcin décellularisé. A : marquage de la fibronectine (Grossissement x4), B : Marquage de la fibronectine dans la musculeuse (Grossissement x40), C : Marquage de la fibronectine dans la musculeuse (Grossissement x200), D : Marquage de la fibronectine dans la sous-muqueuse et la musculeuse (flèche) (Grossissement x200)

Les trois protéines de structures testées (Laminine, elastine et fibronectine) étaient présentes avant et après la décellularisation. La structure architecturale des MD étaient préservée et cohésive après décellularisation. Leurs répartitions dans les différentes couches œsophagiennes étaient respectées et observées avant et après la décellularisation.

2.3. Propriétés mécaniques

Les enregistrements des déformations longitudinales et circonférentielles objectivaient un comportement anisotropique de l'œsophage natif. Les déformations maximales observées étaient de 104 % et 95 % dans l'axe circonférentiel et dans l'axe longitudinal, respectivement. La MD avait un comportement mécanique similaire à l'œsophage natif, avec des déformations

maximales observées de 65 % et 387 % dans les directions circonférentielles et longitudinales, respectivement. (**Figure 27**)







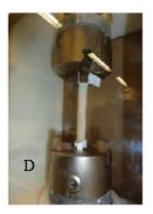


Figure 27: Caractérisation mécanique d'œsophages porcins avant et après décellularisation. A : test mécanique en traction circonférentielle sur un œsophage porcin natif, B : test mécanique en traction circonférentielle sur un œsophage porcin décellularisé, C : test mécanique en traction longitudinale sur un œsophage porcin natif, D : test mécanique en traction longitudinale sur un œsophage porcin décellularisé

Les tests étaient réalisés sur 14 œsophages dans chaque axe. Sept œsophages natifs et 7 œsophages décellularisés étaient testés dans l'axe circonférentiel et longitudinal, soit 28 œsophages. Les échantillons testés mesuraient 7 à 8 cm de grand axe et l'intégrité de la structure tubulaire était conservée. Le **tableau 6** résume les résultats obtenus pour les caractéristiques telles que la déformation, la contrainte, le module d'élasticité et la force.

<u>Tableau 6</u>: Caractéristiques mécaniques en traction longitudinale et circonférentielle de 28 œsophages porcins avant et après décellularisation

| | Axe Longitudinal | | | Axe Circonférentiel | | |
|------------------|------------------|----------------|---------|---------------------|---------------|---------|
| Caractéristiques | Œsophage | Œsophage | | Œsophage | Œsophage | |
| | natif | décellularisé | p | natif | décellularisé | p |
| | (n=7) | (n = 7) | | (n = 7) | (n = 7) | |
| Déformation, | 0.5 | 10 11 | 0.004 | 100 11 | | 0.000 |
| moyenne ± écart | 95 ± 20 | 42 ± 11 | < 0.001 | 102 ± 16 | 366 ± 254 | 0.033 |
| type | | | | | | |
| Contrainte, | 200 60 | 1204 022 | 0.001 | 160 44 | 146 22 | 0.540 |
| moyenne ± écart | 280 ± 69 | 1384 ± 932 | < 0.001 | 160 ± 44 | 146 ± 32 | 0.548 |
| type | | | | | | |
| Module | | | | | | |
| d'élasticité, | 621 ± 149 | 5974 ± 2551 | 0.001 | 279 ± 16 | 89 ± 53 | < 0.001 |
| moyenne ± écart | | | | | | |
| type | | | | | | |
| Force, | | | | | | |
| moyenne ± écart | 33 ± 7 | 68 ± 13 | < 0.001 | 107 ± 25 | 93 ± 23 | 0.289 |
| type | | | | | | |

(La déformation est exprimée en pourcentage (%), la contrainte en kilo-pascal (kPa), le module d'élasticité en kilo-pascal (kPa) et la force en Newton (N). *p* exprime la significativité (< 0,05) du test de Student utilisé pour comparer les moyennes)

Sept œsophages natifs et 7 MD correspondants au tiers moyen et inférieur de l'œsophage ont subi un test d'éclatement. La rupture était définie après l'observation macroscopique d'une fuite de produit de contraste ou d'un éclatement brutal. (**Figure 28**)

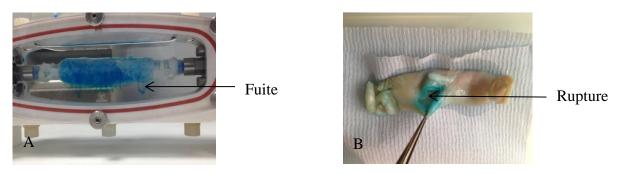
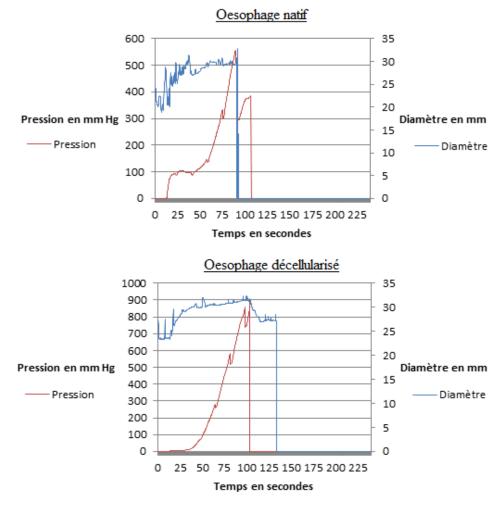


Figure 28 : Test d'éclatement d'œsophage porcin réalisé sur banc Bose Biodynamic Test®. A : visualisation d'une fuite, B : éclatement, témoins de la pression endoluminale maximale.

La pression endoluminale maximale moyenne était de 79.2 kPa (écart-type = 20.9 kPa) pour les œsophages natifs et de 108.3 kPa (écart-type = 17.9 kPa) pour les MD. (**Figure 29**) Il n'y avait pas de différence significative entre les pressions endoluminales de l'æsophage avant et après décellularisation (p = 0.386).

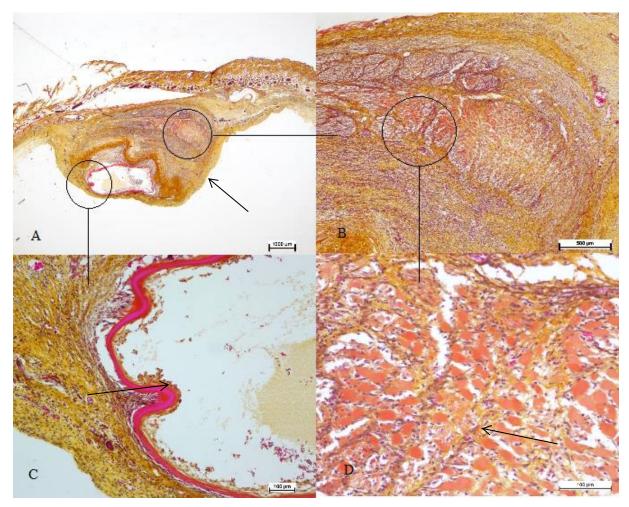


<u>Figure 29</u>: Illustrations graphiques des tests d'éclatement réalisés sur 7 œsophages natifs porcins et 7 œsophages décellularisés porcins.

2.4. Biocompatibilité

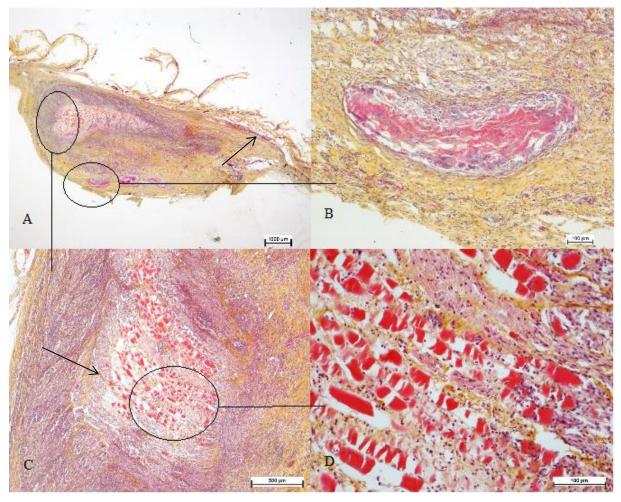
La biocompatibilité de la matrice était évaluée *in vivo*. Douze rats étaient opérés sous anesthésie générale. Un échantillon de MD et un échantillon d'œsophage était implanté distinctement sur chaque rat. Six rats étaient sacrifiés 14 jours après l'implantation. Les six derniers rats étaient sacrifiés 35 jours après l'implantation. Aucune complication postopératoire n'était constatée. Tous les individus avaient survécu.

L'analyse histologique après coloration H.E.S des fragments de MD à J14 objectivait un score d'intégration (**Tableau 5**) variant de 11 à 13. L'analyse des MD objectivait une infiltration cellulaire de moyenne abondance, un tissu conjonctif moyennement organisé, une faible dégradation de la matrice, une encapsulation minime voire absente, une faible présence de cellules géantes multinucléées et une vascularisation de faible abondance. (**Figure 30**)



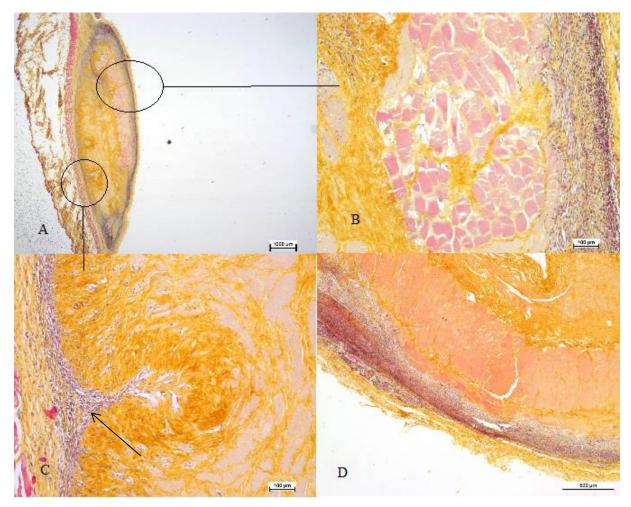
<u>Figure 30</u>: Analyse histologique après coloration en H.E.S d'un fragment d'œsophage décellularisé implanté 14 jours dans la paroi musculaire d'un rat. A : Absence d'encapsulation (flèche) (grossissement x10), B : réaction inflammatoire et infiltration cellulaire de la musculeuse résiduelle (grossissement x 40), C : infiltration cellulaire et dégradation de l'épithélium (flèche) (grossissement x 100), D : infiltration cellulaire de la musculeuse (flèche) (grossissement x 200)

L'analyse histologique après coloration H.E.S des fragments d'œsophages natifs à J14 objectivait un score d'intégration variant de 9 à 11. L'analyse des œsophages natifs objectivait une infiltration cellulaire de moyenne abondance, un tissu conjonctif moyennement organisé, une faible dégradation du fragment, une encapsulation modérée, la présence de cellules géantes multinucléées et une vascularisation de faible abondance. (**Figure 31**)



<u>Figure 31</u>: Analyse histologique après coloration en H.E.S d'un fragment d'œsophage natif implanté 14 jours dans la paroi musculaire d'un rat. A : encapsulation modérée et absence d'organisation du tissu conjonctif (flèche) (grossissement x10), B : réaction inflammatoire et infiltration cellulaire de la musculeuse résiduelle (grossissement x 40), C : infiltration cellulaire et dégradation de la musculeuse (flèche) (grossissement x 100), D : infiltration cellulaire de la musculeuse (grossissement x 200)

L'analyse histologique après coloration H.E.S des fragments de MD à J35 objectivait un score d'intégration (**Tableau 5**) variant de 6 à 11. L'analyse des MD objectivait un tissu conjonctif moyennement organisé, une faible dégradation de la matrice, une encapsulation minime voire absente, une faible présence ou l'absence de cellules géantes multinucléées et l'absence d'organisation de tissu musculaire au sein de la MD. (**Figure 32**)



<u>Figure 32</u>: Analyse histologique après coloration en H.E.S d'un fragment d'œsophage décellularisé implanté 35 jours dans la paroi musculaire d'un rat. A : musculeuse et sous muqueuse présentes (Grossissement x10), B : absence d'encapsulation (Grossissement x100), C : réaction inflammatoire périphérique minime au contact de l'épithélium résiduel (flèche) (Grossissement x100), D : Faible organisation du tissu conjonctif (Grossissement x40)

L'analyse histologique après coloration H.E.S des fragments d'œsophage natif à J35 objectivait un score d'intégration (**Tableau 5**) variant de 6 à 10. L'analyse des fragments d'œsophage natif objectivait un tissu conjonctif organisé, une dégradation de l'œsophage, une encapsulation souvent absente, une faible présence de cellules géantes multinucléées et l'absence d'organisation de tissu musculaire au sein de l'œsophage natif. (**Figure 33**)

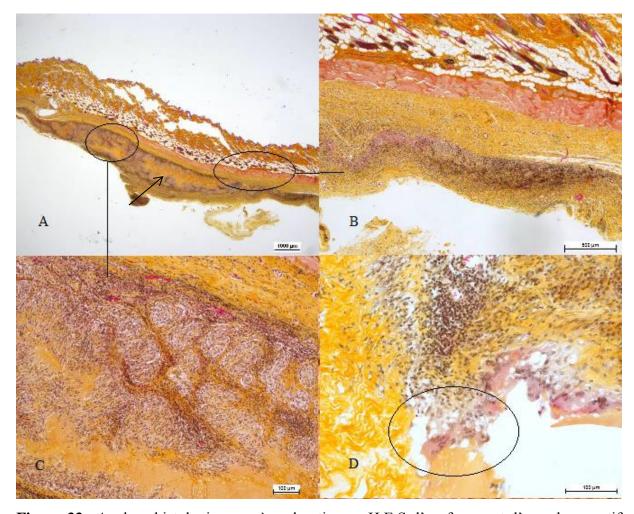


Figure 33: Analyse histologique après coloration en H.E.S d'un fragment d'œsophage natif implanté 35 jours dans la paroi musculaire d'un rat. A : œsophage fortement dégradé (flèche) (Grossissement x10), B : organisation du tissu conjonctif (Grossissement x40), C : réaction inflammatoire périphérique minime au contact de l'épithélium résiduel (Grossissement x100), D : Présence de cellules géantes multinucléées (cercle) (Grossissement x200)

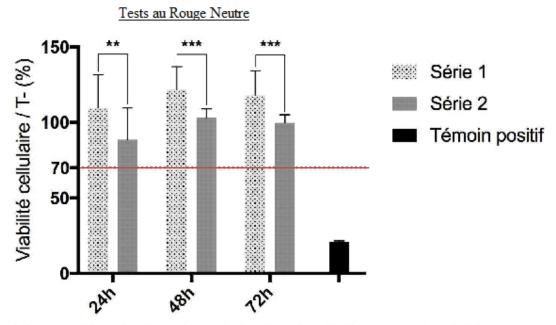
Les MD présentaient un score histologique de biocompatibilité à J14 d'intégration tissulaire (score > 10) pour les 3 échantillons implantés. Le score à J35 révélait une inflammation modérée pour une MD (5 < score < 10) et une bonne intégration pour 2 MD (score > 10). Les scores histologiques de biocompatibilité des œsophages natifs à J14 révélaient une inflammation modérée pour un échantillon (5 < score < 10) et une intégration tissulaire pour les 2 autres échantillons (score > 10). Deux fragments d'œsophages natifs à J35 présentaient une infection suppurative localisée ne modifiant pas le score histologique. Deux échantillons d'œsophages natifs présentaient une inflammation modérée (5 < score < 10) et un échantillon présentait une intégration tissulaire (score > 10).

3. Cellularisation

3.1. Cytotoxicité

Les tests au Rouge Neutre et au MTT étaient réalisés sur 2 séries de 3 MED. Les MD de la série 1 avaient eu le dernier rinçage du procédé de décellularisation à l'eau osmosée tandis que les MD de la série 2 avaient eu un rinçage composé de milieu de culture d'ADSC (DMEM, 10% (v/v) SVF, 1% (v/v) PSA).

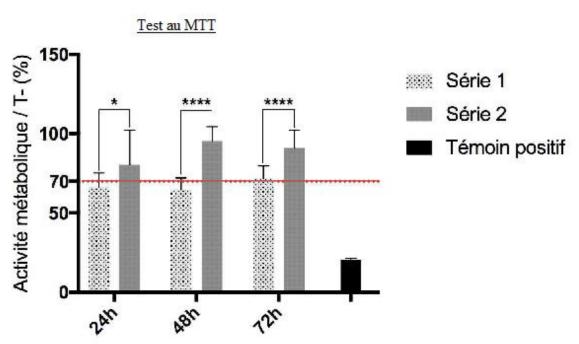
Le test au Rouge Neutre objectivait des taux de viabilité cellulaire moyens mesurés en fonction des temps d'incubation des véhicules d'extraction pour la série 1 de 110% à 24h, 121% à 48h et 117% à 72h (supérieurs au seuil de 70%). Sur la série 2, les taux moyens de viabilité cellulaire en fonction des temps d'incubation des véhicules d'extraction étaient de 88% à 24h, 103% à 48h et 100% à 72h (supérieurs au seuil de 70%). Il existait une baisse significative des résultats obtenus pour la série 2 par rapport à la série 1. (**Figure 34**)



Temps d'incubation des véhicules d'extration avec les MD

<u>Figure 34</u>: Cytotoxicité évaluée par le test au Rouge Neutre sur deux séries d'œsophages décellularisés dont la nature du dernier rinçage diffère

Le test au MTT objectivait pour la série 1 (n=3) une activité métabolique moyenne de 66, 64 et 71% pour les temps 24, 48 et 72h, respectivement (pour un seuil positif supérieur à 70%). La série 2 (n=3) avait des activités métaboliques moyennes de 80% à 24h, 95% à 48h et 91% à 72h (pour un seuil positif supérieur à 70%). Il existait une augmentation significative de l'activité métabolique des MD issues de la série 2 comparées aux MD de la série 1. (**Figure 35**)



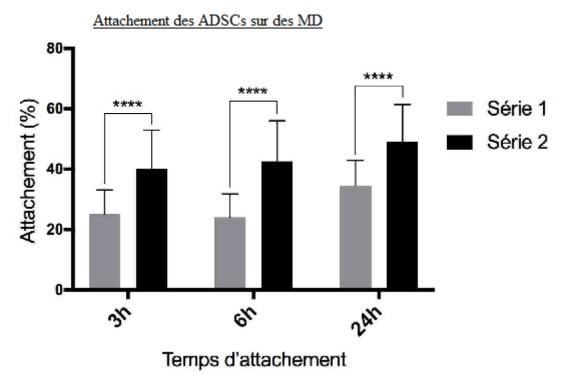
Temps d'incubation des véhicules d'extration avec les MD

<u>Figure 35</u>: Cytotoxicité évaluée par le test au MTT sur deux séries d'œsophages décellularisés dont la nature du dernier rinçage diffère

3.2. Attachement cellulaire

De façon similaire à la cytotoxicité, les tests d'attachement étaient réalisés sur 2 séries de 3 MD. Les MD de la série 1 avaient eu le dernier rinçage du procédé de décellularisation à l'eau osmosée tandis que les MD de la série 2 avaient eu un rinçage composé de milieu de culture d'ADSC (DMEM, 10% (v/v) SVF, 1% (v/v) PSA).

Les pourcentages d'attachement des ADSCs sur les MD de la série 1 étaient de 25% à 3 heures, 24% à 6 heures et 34% à 24 heures. Les pourcentages d'attachements des ADSCs sur les MD de la série 2 étaient de 40% à 3 heures, 43% à 6 heures et 49% à 24 heures. La série 2 présentait un pourcentage d'attachement significativement supérieur à la série 1. (**Figure 36**)

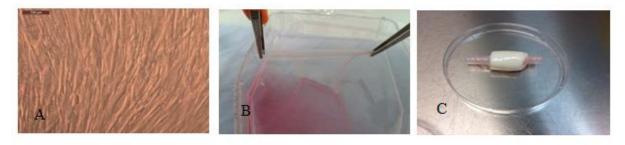


<u>Figure 36</u>: Attachement des ADSCs sur des œsophages décellularisés évalué sur deux séries d'œsophages décellularisés dont la nature du dernier rinçage diffère

3.3. Ensemencement

L'ensemencement des MD étaient réalisé à partir de feuillets cellulaires d'ADSCs obtenus après 3 à 7 semaines de culture.

La première série de MD (n = 5) était ensemencée uniquement sur la face externe pendant 5 à 9 jours. Les MD étaient enroulées (et fixées par des points aux extrémités) dans le feuillet de manière à réaliser 2 à 3 circonvolutions. (**Figure 37**)



<u>Figure 37</u>: A : vue en microscopie optique d'un feuillet d'ADSCs en cours de culture à J14 (Grossissement x200), B : vue macroscopique d'un feuillet d'ADSCs en cours de culture à J21, C : vue macroscopique d'un œsophage décellularisé après enroulement d'un feuillet d'ADSCs sur sa face externe

La « cellularisation » n'était pas effective sur la face externe de manière systématique. Dans 3 cas l'absence de cellularisation était liée à l'absence d'adhésion du feuillet sur la MD. (**Figure 38**)

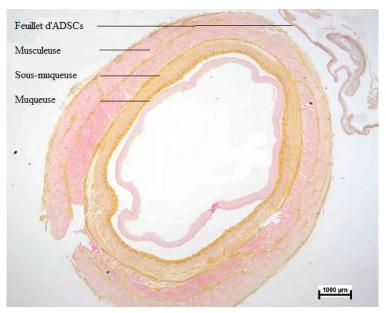


Figure 38: Coupe histologique après coloration H.E.S d'un œsophage décellularisé ensemencé sur sa face externe par un feuillet d'ADSCs (Grossissement x10). Absence d'adhésion du feuillet après 9 jours de culture

Deux MD sur les 5 ensemencées sur leurs faces externes présentaient une cellularisation débutante de la musculeuse. Les feuillets étaient adhérents à la MD. (**Figure 39**)

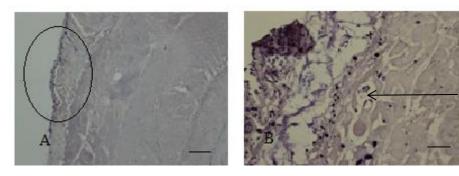
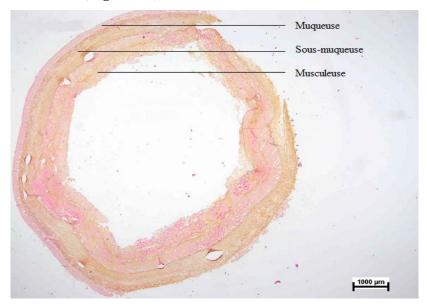


Figure 39: Coupe histologique après coloration Hémalun d'un œsophage décellularisé mise en culture 5 jours après ensemencement de sa face externe avec un feuillet d'ADSCs. A : Adhésion du feuillet (Grossissement x20), B : Visualisation des noyaux dans la couche musculeuse externe (flèche) au contact du feuillet (Grossissement x10)

La deuxième série d'ensemencement (n = 3) qui consistait à cellulariser la face interne puis la face externe n'a pas permis d'objectiver la présence des feuillets sur la face interne sur les coupes réalisées à J14. (**Figure 40**).



<u>Figure 40</u>: Coupe histologique après coloration H.E.S d'un œsophage décellularisé éversé ensemencé par un feuillet d'ADSCs à J14 (Grossissement x10). Absence de visualisation du feuillet

Les coupes histologiques réalisées à J21 montraient la matrice de retour dans sa configuration anatomique. Le feuillet était visible mais n'était constitué que de matrice secrétée par les ADSCs. Les ADSCs restants ne semblaient pas viables en rapport avec la faible présence de noyaux pour la plupart déformés et l'aspect granuleux des cellules. (**Figure 41**)

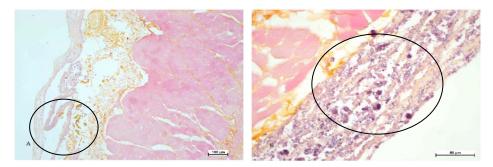


Figure 41: Coupe histologique après coloration H.E.S d'un œsophage décellularisé éversé ensemencé par un feuillet d'ADSCs à J21. A : présence du feuillet (cercle) sur la face externe (Grossissement x40), B : Absence de migration cellulaire dans la musculeuse à partir du feuillet (cercle) (Grossissement x400)

Les coupes histologiques à J28 objectivaient des feuillets présents mais non adhérents. Les cellules présentes semblaient peu viables. A J35, les feuillets étaient présents sur la face interne et externe. Des cellules étaient encore présentes mais ne semblaient pas viables. Elles étaient présentes en faible quantité dans la MD. (**Figures 42 et 43**)

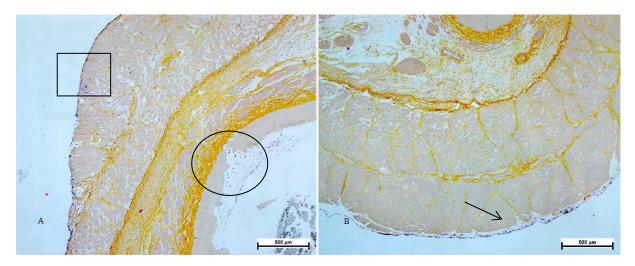


Figure 42: Coupe histologique après coloration H.E.S d'un œsophage décellularisé ensemencé par un feuillet d'ADSCs à J35. A : présence du feuillet sur la face externe (rectangle) et interne (cercle) (Grossissement x40), B : Absence de migration cellulaire dans la musculeuse (flèche) (Grossissement x40).

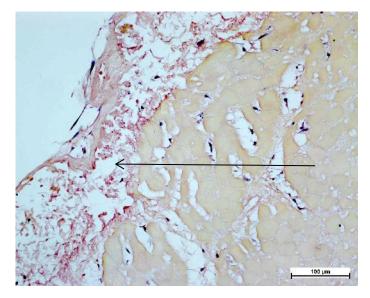


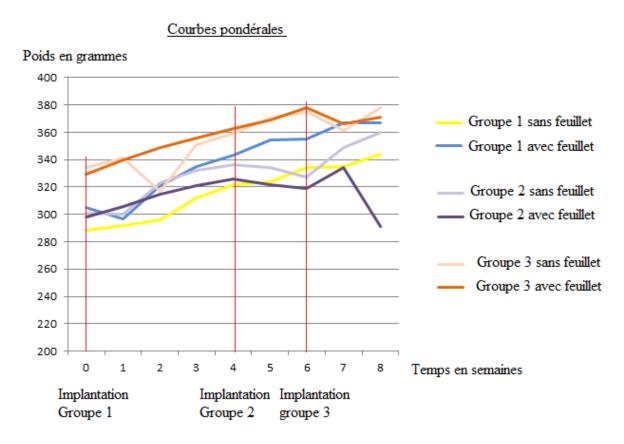
Figure 43: Coupe histologique après coloration H.E.S d'un œsophage décellularisé ensemencé par un feuillet d'ADSCs à J35. Présence du feuillet sur la face externe (flèche) et de cellules dans la musculeuse (Grossissement x400)

4. Maturation

4.1. Etude préclinique

Afin d'évaluer l'effet du grand épiploon comme bioréacteur sur les MD, 30 rats nude étaient utilisés comme receveur de MD. Les 30 rats étaient répartis en 3 groupes de 10 individus. Dans chaque groupe, 5 rats recevaient un échantillon de MD de 1 cm² (plan) et 5 rats recevaient le même échantillon ensemencé par un feuillet d'ADSCs en extemporané de l'implantation. Le groupe 1 correspondait au suivi de 8 semaines, le groupe 2 au suivi de 4 semaines et le groupe 3 à celui de 2 semaines.

Les 30 rats survécurent à l'intervention. Aucune complication postopératoire n'avait été constatée. Les courbes pondérales des poids sont résumées dans la **Figure 44**.



<u>Figure 44</u>: Courbes pondérales des 30 rats nude sur 8 semaines de suivi après implantation d'œsophage porcin décellularisé associé ou pas à des feuillets d'ADSCs

Après chaque implantation les rats perdaient entre 0 et 3,2% du poids de leur corps. La perte pondérale était observée la première semaine suivant l'implantation. Dans chaque groupe une évolution pondérale normale était constatée à partir de la deuxième semaine suivant l'implantation. Un individu du groupe 2 avec feuillet présenta une perte pondérale supérieure à 10 % du poids de son corps en une semaine.

4.2. Effet « temps-cellules »

L'évaluation de la maturation était basée sur 2 critères histologiques principaux associant la vascularisation et l'infiltration cellulaire. La dégradation de la MD était également évaluée de manière qualitative.

Deux semaines après l'implantation, la MD apparaissait intact et conservait son organisation histologique initiale (muqueuse/sous-muqueuse et musculeuse). Parmi les 10 explants, 2 MD n'avaient pas pu être analysées. Les deux MD non analysées appartenaient au sous-groupe avec feuillet. L'absence d'analyse était liée à une rétraction de la MD trop importante dans un cas et à la nécrose de la MD dans l'autre cas. L'infiltration cellulaire était évaluée à 111 cellules / 10 champs (écart-type = 37) dans le sous-groupe sans feuillet et de 99 cellules / 10 champs (écart-type = 44) dans le sous-groupe avec feuillet (p = NS). La vascularisation n'était pas modifiée selon la présence de feuillets ou pas. Elle était en moyenne de 2,5 (écart-type = 1) sans feuillet et de 2 (écart-type = 0) avec feuillets (p = NS). Il existait une vascularisation importante de la musculeuse.

Quatre semaines après l'implantation, la MD était présente et conservait comme à 2 semaines son organisation histologique initiale (muqueuse/sous-muqueuse et musculeuse). La musculeuse apparaissait en cours de dégradation. Parmi les 10 explants, deux MD n'avaient pas pu être analysées. La première MD non analysée appartenait au sous-groupe avec feuillet. L'absence d'analyse était liée à la nécrose de la MD. La seconde MD appartenait au groupe sans feuillet et n'avait pas été retrouvée. L'infiltration cellulaire était évaluée à 61 cellules / 10 champs (écart-type = 15) dans le sous-groupe sans feuillet et de 65 cellules / 10 champs (écart-type = 8) dans le sous-groupe avec feuillet (p = NS). L'infiltration cellulaire était marquée de la périphérie de l'implant vers le centre. La sous-muqueuse présentait une infiltration cellulaire qui n'était pas présente à 2 semaines. La vascularisation n'était pas modifiée selon la présence de feuillets ou pas. Elle était en moyenne de 1,75 (écart-type = 0,5) sans feuillet et de 1,5 (écart-type = 1) avec feuillets (p = NS). (**Figure 45**)

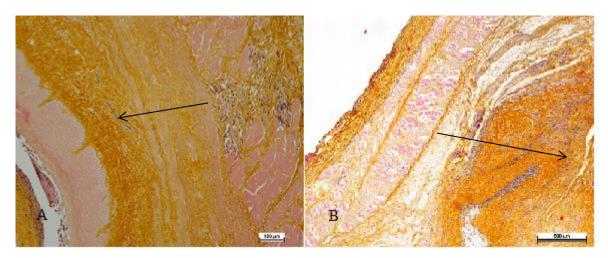
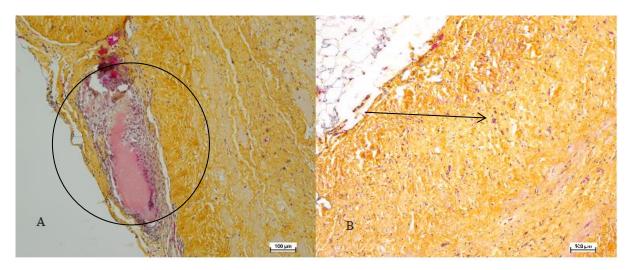


Figure 45 : Coupe histologique après coloration HES d'un œsophage décellularisé implanté 4 semaines dans le grand épiploon d'un rat nude. A : MD implantée sans feuillet (Grossissement X40), B : MD implantée avec feuillet (Grossissement x100). Présence de cellules jusque dans la sous-muqueuse (flèches)

Huit semaines après l'implantation, seules quatre MD sur les 10 implantées étaient encore présentes. La dégradation des MD était avancée et des résidus de musculeuse et d'épithélium étaient retrouvés. L'organisation architecturale de la MD initiale n'était plus conservée. L'infiltration cellulaire était évaluée à 44,5 cellules / 10 champs (écart-type = 18) dans le sous-groupe sans feuillet et de 55 cellules / 10 champs (écart-type = 24) dans le sous-groupe avec feuillet (p = NS). L'infiltration cellulaire était marquée de la périphérie de l'implant vers le centre. La sous-muqueuse présentait une infiltration cellulaire qui n'était pas similaire à celle présente à 4 semaines. La vascularisation n'était pas modifiée selon la présence de feuillets ou pas. Elle était en moyenne de 2,5 (écart-type = 0,5) sans feuillet et de 2 (écart-type = 0) avec feuillets (p = NS). (**Figure 46**)



<u>Figure 46</u>: Coupe histologique après coloration HES d'un œsophage décellularisé implanté 8 semaines dans le grand épiploon d'un rat nude. A : MD implantée sans feuillet (Grossissement x10), B : MD implantée avec feuillet (Grossissement x100). Présence de cellules (flèche) et d'une zone nécrosée (cercle)

5. Substitution œsophagienne

5.1. Maturation

Afin d'évaluer la faisabilité de la substitution œsophagienne sur modèle porcin, 6 porcs domestiques étaient utilisés. Deux groupes étaient formés de 3 individus chacun. Le premier groupe avait une phase de maturation préalable de 4 semaines dans le grand épiploon. La longueur des MD implantées étaient de 8 cm. La lumière était tutorisée par une sonde de Faucher 20 Fr avant l'implantation. (**Figure 47**)

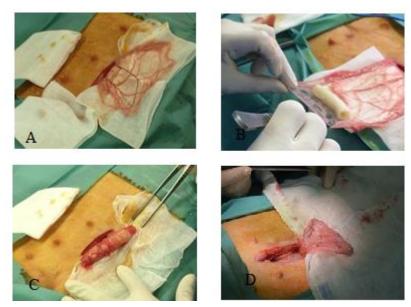


Figure 47: Vues opératoires de l'implantation dans le grand épiploon d'un porc d'un œsophage décellularisé. A : grand épiploon extériorisé après laparotomie médiane, B : enroulement de la MD dans le grand épiploon, C : aspect avant la réintroduction intra-abdominale da la MD enroulée dans le grand épiploon, D : aspect macroscopique de la MD après 4 semaines de maturation

Tous les individus avaient survécu à l'intervention. Aucune complication postopératoire n'était constatée lors des 4 semaines de suivi.

Lors de la seconde laparotomie, l'implant était facilement retrouvé dans la cavité péritonéale. Il y avait peu d'adhérences intrapéritonéales et l'implant était facilement mobilisable en vue de la substitution. (**Figure 47**, photo D) Les vaisseaux de l'épiploon étaient macroscopiquement visualisables et la pédiculisation de l'implant était techniquement réalisable. Avant la substitution œsophagienne, les extrémités des MD avec de l'épiploon étaient prélevées pour une analyse histologique.

L'analyse histologique des MD maturées objectivait une infiltration cellulaire de la périphérie vers le centre. Elle était plus importante dans la musculeuse mais l'infiltrat

s'étendait jusque dans la sous-muqueuse. La vascularisation de la MD était présente principalement dans la musculeuse. Une encapsulation minime était observée par la présence de plusieurs couches de fibroblastes. (**Figure 48**) Cette dernière était objectivée sur le plan macroscopique par le caractère légèrement fibreux des MD maturées.

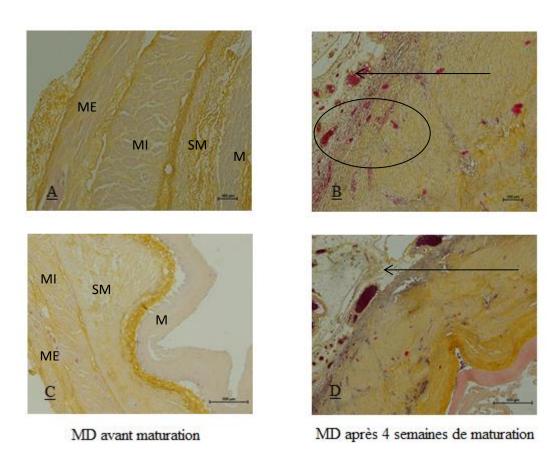
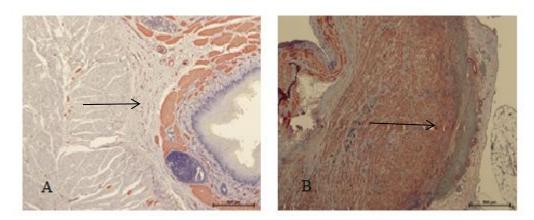


Figure 48: Coupes histologiques après coloration H.E.S d'un œsophage décellularisé avant son implantation dans le grand épiploon (A, C) (M: muqueuse, SM: sous-muqueuse, MI: musculeuse interne, ME: musculeuse externe) et 4 semaines après sa maturation (B, D). A: œsophage décellularisé porcin, couches musculeuses et sous-muqueuse (Grossissement x40), B: visualisation de l'infiltration cellulaire (flèche) et de la vascularisation (cercle) après 4 semaines de maturation dans le grand épiploon (Grossissement x40), C: œsophage décellularisé porcin avant son implantation, conservation architecturale des 3 couches histologiques natives (Grossissement x10), D: Jonction entre le grand épiploon et l'œsophage décellularisé, infiltration cellulaire de la périphérie vers le centre (cercle), épiploon « fusionné à l'œsophage décellularisé (flèche), (Grossissement x10)

Une analyse immunohistochimique de la MD maturée objectivait la présence de cellules exprimant l'Alpha-Actine. Ces cellules pouvaient correspondre à des cellules musculaires et des myofibroblastes. (**Figure 49**)



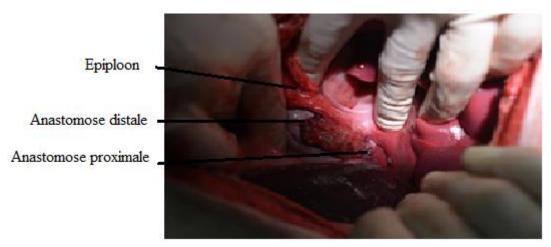
<u>Figure 49</u>: Coupe immunohistochimique d'un œsophage décellularisé après 4 semaines de maturation dans le grand épiploon. A : Visualisation de cellules exprimant l'Alpha-Actine dans les différentes couches histologiques (flèche) (Grossissement x40), B : Visualisation de cellules exprimant l'Alpha-Actine dans les différentes couches histologiques (flèche) (Grossissement x10)

5.2. Remplacement œsophagien

La substitution œsophagienne était réalisée chez 6 porcs domestiques jeunes (10 à 12 semaines de vie). Deux groupes de 3 individus étaient formés. Le premier groupe avait eu une première laparotomie 4 semaines avant l'œsophagectomie afin d'implanter la MD dans le grand épiploon (groupe maturation). Le deuxième groupe (groupe sans maturation) n'avait pas eu d'intervention préalable.

L'œsophagectomie était réalisée par laparotomie médiane. Le caractère « Redux » de la laparotomie du groupe maturation n'engendrait pas de difficultés techniques supplémentaires. Le temps moyen d'intervention était de 45 minutes. Le hiatus œsophagien était facilement retrouvé, et l'œsophage thoracique aisément mobilisé. L'œsophagectomie emportait 5 centimètres d'œsophage et la jonction œsogastrique était laissée en place. La MD était suturée à l'œsophage thoracique et à l'œsophage abdominal par des points séparés de PDS 4/0. La MD était facilement suturable et se tenait très bien lors de la mise en tension des fils (absence de section inopinée par le fil). Les inégalités de congruence étaient corrigées par l'élasticité de la MD et de l'œsophage. Une épiploplastie de recouvrement était réalisée dans le groupe

n'ayant pas eu une maturation préalable de la MD. Dans le groupe maturation, la MD maturée était plus fibreuse et présentait une moindre élasticité. La suturabilité demeurait bonne et la qualité du tissu très bonne. Quel que soit le groupe, la plèvre gauche était systématiquement ouverte lors de l'œsophagectomie. Aucun drainage n'était laissé en place au niveau abdominal ou thoracique. (**Figure 50**)



<u>Figure 50</u>: Vue opératoire après substitution œsophagienne par un œsophage décellularisé implanté 4 semaines dans le grand épiploon sur un modèle porcin

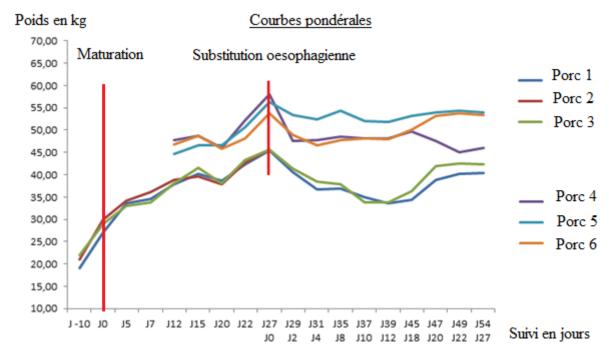
Le suivi postopératoire était réalisé sur 1 mois. Un individu du groupe maturation était décédé le lendemain de l'œsophagectomie. La cause du décès n'avait pas pu être formellement identifiée. Une laparotomie exploratrice post-mortem avait objectivé la présence d'un « textilome ». Parmi les 5 individus survivants, 4 avaient présenté des complications postopératoires (**Tableau 7**).

<u>Tableau 7</u>: Tableau clinique de suivi d'évènements postopératoires.

| | Groupe maturation | | | Groupe sans maturation | | | |
|---------------|-------------------|-----|-----|------------------------|-----|-----|--|
| Individu | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | |
| Mortalité | Non | Oui | Non | Non | Non | Non | |
| Complications | Oui | - | Oui | Oui | Non | Oui | |
| - Fistule | 1 | | 0 | 1 | 0 | 0 | |
| - Abcès | 1 | | 1 | 1 | 0 | 0 | |
| - Sténose | 0 | | 1 | 0 | 0 | 1 | |
| - Dilatation | 0 | | 1 | 0 | 0 | 1 | |
| - Pulmonaire | 0 | | 0 | 1 | 0 | 0 | |

| - Perte de poids | 26 | 26 | 17 | 7 | 11 |
|------------------|----|----|----|---|----|
| maximale, (%) | | | | | |

Le suivi pondéral était réalisé une fois par semaine. Au terme du mois de suivi tous les individus sauf un avaient repris leur poids de forme malgré les complications postopératoires. Les complications étaient représentaient par 2 fistules anastomotiques (proximales), 2 sténoses associées à 2 dilatation œsophagienne d'amont, 3 abcès et une infection pulmonaire. La perte de poids maximale observée était de 26% du poids de forme initial. (**Figure 51**)



<u>Figure 51</u>: Courbes pondérales des 6 porcs opérés d'une substitution œsophagienne par œsophage décellularisé plus ou moins implanté 4 semaines au préalable dans le grand épiploon

Au terme du mois de suivi les animaux étaient sacrifiés et une laparotomie exploratrice était réalisée afin d'effectuer un prélèvement œsogastrique de la région substituée. Ce prélèvement était analysé en histologie après inclusion et coloration au trichrome de Masson.

L'analyse histologique après coloration au trichrome de Masson des MD implantées au préalable dans l'épiploon objectivait une cellularisation des zones péri-anastomotiques proximales (versant œsophagien) et distale (versant gastrique) de la MD. La structure architecturale des couches muqueuses/sous-muqueuses était préservée et l'aspect de la MD

était comparable à l'œsophage natif du porc receveur. Des vaisseaux sanguins étaient observés dans la musculeuse et dans la sous-muqueuse. Le tissu conjonctif n'était pas bien organisé. Dans la musculeuse le tissu musculaire était en cours d'organisation. (**Figure 52**)

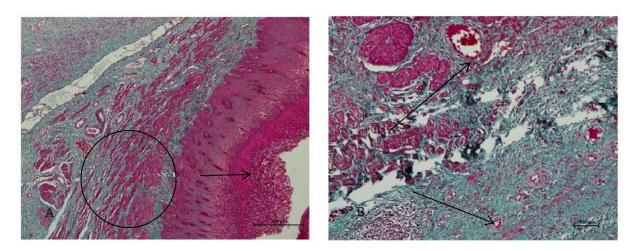
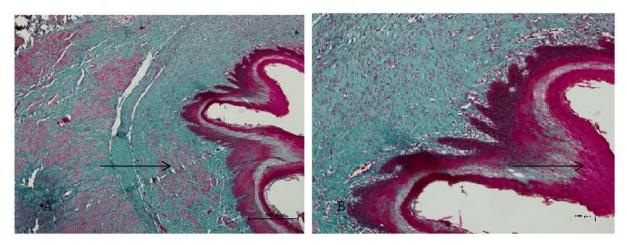


Figure 52: Coupes histologiques d'un œsophage décellularisé avec maturation préalable implanté après œsophagectomie sur un modèle porcin après un mois de suivi. A : zone périanastomotique œsophagienne. Les 3 couches histologiques sont reconnaissables. La muqueuse apparaît épaissie associée à une zone en surface hyper-kératinisée (flèche). Le tissu musculaire de la couche musculeuse interne est en voie d'organisation (cercle) (Grossissement x10), B : Couche musculeuse circulaire interne en cours d'organisation. La vascularisation est présente dans la musculeuse et la sous-muqueuse (flèches) (Grossissement x40).

L'analyse histologique après coloration au trichrome de Masson des MD sans implantation préalable dans l'épiploon objectivait une cellularisation des zones périanastomotiques proximales (versant œsophagien) et distale (versant gastrique) de la MD. La
structure architecturale des couches muqueuses/sous-muqueuses était préservée. La
musculeuse présentait peu de fibres musculaires. Des vaisseaux sanguins étaient observés
dans la musculeuse et dans la sous-muqueuse. Le tissu conjonctif n'était pas bien organisé.
Dans la musculeuse le tissu musculaire n'était pas organisé ou absent, et l'infiltration de
cellules inflammatoires était importante. (**Figure 53**)



<u>Figure 53</u>: Coupes histologiques d'un œsophage décellularisé sans maturation préalable implanté après œsophagectomie sur un modèle porcin après un mois de suivi. A : zone péri-anastomotique œsophagienne. Les 3 couches histologiques sont identifiables. Le tissu musculaire de la couche musculeuse interne est peu présent (flèche) (Grossissement x10), B : La couche muqueuse est bien cellularisée. Une hyper-kératinisation est présente dans la lumière œsophagienne (flèche). La vascularisation est présente dans sous-muqueuse (Grossissement x40).

Discussion

1. Objectifs

1.1. Objectif principal

L'objectif principal de ce travail de recherche était la création d'un substitut œsophagien circulaire implantable dans un modèle porcin. Le critère de jugement principal était la confirmation de la décellularisation des œsophages porcins selon les critères internationaux représentés par (i) l'absence de noyau en coloration histologique de routine (H.E.S/trichrome de Masson) ou en DAPI, et (ii) la présence de 50 ng ou moins d'ADN résiduel par mg de tissu sec. L'ADN résiduel devait être constitué de 200 paires de bases ou moins [76]. Les analyses histologiques après coloration H.E.S (ou trichrome de Masson) ont permis de confirmer l'absence de noyau cellulaire résiduel après le protocole de décellularisation employé. Les matrices décellularisées (MD) ainsi fabriquées avaient un poids d'ADN résiduel de 50 ng / mg de tissu sec. L'ADN résiduel était constitué de fragments de moins de 200 paires de bases. La décellularisation effective des œsophages porcins selon les critères retenus était ainsi confirmée autorisant l'appellation de matrice décellularisée (MD) le produit d'ingénierie tissulaire fabriqué.

1.2. Objectifs secondaires

Les objectifs secondaires étaient dans un premier temps de préciser les caractéristiques physico-biologiques de la MD. Les propriétés mécaniques de la MD étaient similaires à l'œsophage natif à l'éclatement. Les valeurs observées des tests des œsophages avant et après décellularisation différaient dans l'axe circonférentiel et longitudinal. Les MD présentaient des valeurs de contraintes, d'élasticité et de force supérieures aux œsophages avant décellularisation. La déformation des MD était inférieure dans l'axe longitudinal et supérieure dans l'axe circonférentiel. L'élasticité de la MD était moindre que l'œsophage natif dans l'axe circonférentiel. Ces propriétés mécaniques de la MD sont corrélées à une conservation de la structure tissulaire et de la cohésion des différents tissus comme observé sur les coupes histologique après décellularisation. La quantité des glycosaminoglycanes étaient similaires avant et après la décellularisation. La distribution de ces derniers dans la sous-muqueuse ne pouvait être précisée sur les MD. Quatre protéines de structure étaient recherchées dans l'œsophage natif. La laminine, l'élastine et la fibronectine étaient mises en évidence dans les œsophages natifs et les MD. Le collagène IV (protéine de la membrane basale) n'était pas

observé dans les œsophages avant ou après la décellularisation laissant penser à un problème de manipulation secondaire à l'Anticorps utilisé. La biocompatibilité *in-vivo* des MD après implantation chez le rat permettait d'affirmer une bonne intégration « biologique » de ces dernières. Leur « meilleure » biocompatibilité n'était cependant pas démontrer comparativement aux œsophages natifs témoins implantés dans les mêmes conditions.

Secondairement à la caractérisation vue précédemment, la cytotoxicité des MD étaient évaluées par deux tests standardisés au Rouge Neutre et au MTT. Ces derniers ont permis de démontrer que les MD ne présentaient pas de toxicité cellulaire empêchant leur ensemencement. Cependant une adaptation du protocole de décellularisation était nécessaire en modifiant le dernier rinçage (remplacement de l'eau osmosée par du milieu de culture). L'attachement et la viabilité des ADSCs sur les MD étaient compatibles avec un ensemencement de ces dernières par ce type cellulaire. Afin de permettre un ensemencement simple et reproductible, les ADSCs étaient cultivées de façon à en obtenir des feuillets facilement manipulables. Ces derniers étaient appliqués manuellement sur les MD dont la conformation tubulaire (de l'œsophage initial) demeurait intacte. L'éversion des MD était nécessaire afin d'appliquer les feuillets sur la face interne tout en respectant l'intégrité tubulaire de la MD. La cellularisation des MD n'était pas satisfaisante sur les faces internes. Cependant l'analyse histologique des couches externes permettait d'objectiver des migrations cellulaires du feuillet vers la MD. L'adhésion du feuillet à la MD semblait être un facteur important de migration cellulaire.

Avant la substitution œsophagienne, le troisième objectif secondaire était d'évaluer l'intérêt de la maturation de la MD dans un bioréacteur représenté par le grand épiploon. La présence de vaisseaux sanguins et la présence d'un infiltrat cellulaire étaient constatées quel que soit le temps d'implantation. Cependant après deux semaines de maturation, l'infiltration était principalement en rapport avec des cellules inflammatoires et la vascularisation était comparable à celle observée à 4 semaines. En revanche après 4 semaines de maturation l'infiltration cellulaire était moindre et la MD conservait une architecture proche de la structure native. Après 8 semaines de maturation les MD étaient dégradées ou n'étaient pas retrouvées. Ainsi le temps de maturation de 4 semaines apparaissait comme le meilleur compromis assurant une vascularisation de la MD observée jusque dans la couche sousmuqueuse. L'adjonction de feuillet cellulaire sur les MD avant leur maturation ne permettait pas d'affirmer un bénéfice en termes d'inflammation et de vascularisation.

L'ultime objectif de ce travail était de tester la faisabilité d'une substitution œsophagienne par une MD sur un modèle porcin. L'œsophagectomie par voie abdominale avec anastomose œsophagienne intra-thoracique était techniquement faisable chez le porc et semblait même plus simple que chez l'homme (profondeur de champ). Les suites opératoires étaient compliquées chez 4 individus sur 5 survivants. Le décès postopératoire était attribué (faute de meilleurs éléments) à l'oubli d'une compresse abdominale, faute technique attribuable à l'opérateur et non excusable compte tenu du faible effectif de l'étude. La reprise pondérale après l'intervention était encourageante malgré un taux de complications postopératoires rédhibitoires. La maturation des MD dans l'épiploon 4 semaines avant la substitution n'avait pas permis d'observer des suites opératoires plus simples. Elle semblait au contraire engendrer une perte pondérale plus importante.

2. <u>Décellularisation</u>

2.1. Choix des procédés

Le travail réalisé était axé sur la fabrication d'une matrice (scaffold) sur laquelle pouvait être ensemencée des cellules différenciées ou pas. Cette matrice devait être implantable sur un modèle préclinique préférentiellement proche de l'Homme. Une revue de la littérature a permis dans un premier temps d'identifier les grands axes de recherche [39]. Le choix de la décellularisation plutôt qu'une matrice synthétique s'appuyait sur plusieurs postulats scientifiques décrits dans le chapitre Introduction (Paragraphe 4.5). L'étude de Beckstead et al. [65] a largement participé au choix d'un œsophage décellularisé. Le SWOT (Strenght / Weakness / Opportunities / Threats) a permis une évaluation globale et synthétique du procédé de décellularisation (Tableau 8).

<u>Tableau 8</u>: SWOT des matrices œsophagiennes décellularisées

Avantages

- Reproduction identique de la structure native
- Propriétés mécaniques proches de la structure native
- Faible immunogénicité
- Recellularisation possible par différents types cellulaires (cellules spécialisées et souches)
- Matrice xénogénique
- Faible coût

Inconvénients

- Cytotoxicité potentiellement élevée
- Evaluation de l'immunogénicité hétérogène et aléatoire
- Disponibilité des matrices limitée
- Mise en place d'une chambre d'ensemencement spécifique
- Matrice hétérologue, xénogénique

Opportunités

- Evaluation du pouvoir de différenciation de la matrice in-vitro
- Réalisation d'études précliniques à court terme
- Industrialisation du procédé

Risques

- Devenir de la matrice à long terme
- Effet du stockage sur les propriétés mécaniques
- Devenir et contrôle des cellules souches ensemencées (cancérisation) à long terme

Les MD composées de matrice extracellulaire (ECM) sont utilisées dans plusieurs applications chirurgicales et de plus en plus utilisées en médecine régénératrice [140, 141]. L'ECM représentée comme le produit de sécrétions des cellules environnantes [142] est dans un état dynamique réciproque avec ses cellules. Le microenvironnement cellulaire que forme l'ECM affecte la migration cellulaire, leur prolifération et leur différenciation [143]. La décellularisation doit donc reposer sur la préservation maximale de l'ECM [144]. L'influence de l'ECM sur les mitoses cellulaires [142, 143], la différenciation cellulaire [143, 145-150] et sur la réponse du remodelage tissulaire de l'hôte [151-153] est largement décrite. Les méthodes de décellularisation sont nombreuses [154] et par conséquent aucune ne peut être considérée comme idéale. La décellularisation peut être un procédé physique représenté principalement par la congélation-décongélation. Ce procédé a l'avantage d'éviter l'utilisation d'agent chimique critiqué pour leur pouvoir cytotoxique (par définition). Il semble préserver les propriétés mécaniques du tissu [155] mais l'efficience de la décellularisation semble aléatoire. De plus son utilisation en ingénierie tissulaire œsophagienne n'avait pas été évaluée. Les autres procédés de décellularisation physique sont l'immersion/agitation à laquelle est associée des agents chimiques, et l'hyperpression hydrostatique qui limite comme la congélation l'utilisation de détergents [154]. La dernière méthode physique, peu étudiée est l'utilisation de fluide supercritique comme le dioxyde de carbone. La mise en condition de ce dernier (température 32 °C, pression 7,4 MPa) permettait à Sawada et al. [156] de décellulariser une aorte en une heure de traitement. Les autres méthodes de décellularisation sont toutes chimiques. En ingénierie tissulaire œsophagienne plusieurs agents chimiques ont été étudiés (**Tableau 9**) et même comparés sur leur efficacité de décellularisation [78].

<u>Tableau 9</u>: Principaux protocoles de décellularisation étudiés en ingénierie tissulaire œsophagienne

| Espèces | Rat (Sprague– Dawley) | Rats (Fischer 344) | Porc (nouveau- né) | Rat (Wistar) | Porc | Porc |
|---|---|--|--|---|--|--|
| Forme tissulaire | Paroi intacte | Paroi intacte | Paroi intacte | Paroi intacte | Paroi intacte | muqueuse/sous- muqueuse |
| Méthode d'application des solutions de décellularisatio | Immersion/perfusio n endoluminale | Immersion/agitatio n Non précisé | Immersio n | Immersion/agitatio n Non précisé | Perfusion endoluminale | Immersion/agitati on Rotation = 300 rpm |
| Protocole | 2 cycles: 30' 4% DEOX 30' DNase 30' eau osmosée 60' PBS | 48 h 10 mM Tris 48 h 1% Triton X- 100 6 h 400 U/mL DNase-I/ .125 mg/mL RNase-A 48 h .5% SDS | 5 cycles: 72 h distilled water, 4 h 4% DEOX, 3 h 2000 kU DNase-I | 24 h 4% DEOX, 12 h 2 mg/mL DNase-1 | 3 cycles: 24 h eau osmosée, 4 h 4% DEOX, 3 h 2000 kU DNase-I | 1 h 1% trypsin/.05% EDTA, 30 min 1 M sucrose, 48 h 3% Triton X-100, 4 h 10% DEOX 2 h .1% acide peracétique/4% Ethanol 2 h 100 U/mL DNase-I |
| Evaluation | Absence de noyau en DAPI ADN résiduel = 500 ng / mg | Absence de noyau en H.E.S | Absence de noyau en H.E.S Disparitio n des antigènes du CMH | Absence de noyau en H.E.S ADN résiduel = 140 ng / mg | Absence de noyau en H.E.S ADN résiduel = 500 ng / mg | Absence de noyau en H.E.S ADN résiduel = 50 ng / mg |
| Auteurs | Sjöqvist et al. [1] | Bhrany et al. | Marzaro et al. | Ozeki et al. [78] | Totellini et al. [2] | Keane et al. [161] |

(DEOX : acide déoxycholique, EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétra-acétique, SDS : Sodium-Dodecil Sulfate)

Les deux principaux agents utilisés dans la décellularisation œsophagienne sont l'acide déoxycholique (DEOX) et le TRITON X-100. Le TRITON X-100, agent anionique, est largement utilisé dans d'autres applications de médecine régénératrice [154]. Le succès de la décellularisation avec ce détergent est variable selon l'architecture des tissus et leur nature. Grauss et al. [157] rapportaient l'absence de décellularisation d'une valve aortique dans un modèle murin suite à l'utilisation de 1 à 5% de TRITON X-100 contrairement à Liao et al. qui obtenaient la décellularisation effective d'une valve porcine avec 1% du même détergent [158]. Le TRITON X-100 demeure très employé aux prix d'une altération établie de l'ECM et de la dégradation des fibres de collagène [159]. Ozeki et al. avaient en 2006 [78] évalué et comparé le DEOX et le TRITON X-100 sur l'efficience de la décellularisation œsophagienne sur un modèle murin. La quantité d'ADN résiduel était significativement inférieure dans le groupe DEOX. Enfin le TRITON pourrait être à l'origine d'une dégradation des GAGs, composants qui sembleraient devoir être préservés lors de la décellularisation [160]. Face à

ses éléments et à l'utilisation importante du DEOX dans la décellularisation œsophagienne [161], le choix de cet acide s'imposait. Le DEOX présente également des inconvénients mais ses verrous biologiques pouvaient être levés en adaptant les doses, la durée d'exposition et les temps de rinçage. De plus la méthode d'exposition de l'œsophage aux différentes solutions de décellularisation utilisées dans ce travail faisait suite à des essais de décellularisation œsophagienne en immersion/agitation qui avait conduit à la présence persistante de noyau après analyse histologique (résultats préliminaires non publiés). Le positionnement de l'œsophage dans une chambre de perfusion assurant le passage d'un flux dynamique interne et externe demeurait la meilleure modification du protocole sans y ajouter de détergents de toutes sortes. Les résultats sur la décellularisation furent immédiats sans pour autant modifier le protocole « chimique ». Ce protocole était issu d'une publication princeps par Meezan et al. [161].

Le choix de la stérilisation était au même titre que le protocole de décellularisation un élément clé dans la production d'une MD implantable. La stérilisation devait respecter les normes européennes en vigueur. Les méthodes de stérilisation pouvant être employées étaient, à l'instar des méthodes de décellularisation, assez nombreuses et par conséquent aucune ne semblait idéale. Elle devait répondre à des contraintes de normes (ISO...), à des contraintes biologiques et à des contraintes économiques. L'acide peracétique peut être utilisé comme agent de stérilisation. Son principal avantage est son double emplois ; à la fois comme agent de décellularisation et comme agent de stérilisation. Cependant sa pénétration au sein de la matrice est insuffisante afin d'assurer une stérilisation efficace (normes de la FDA: ISO/DIS 1135-1, ISO/DIS 1137-1) et son action sur la dénaturation de l'ECM est établie [163]. Trois autres méthodes principales de stérilisation de MD sont décrites. L'exposition à l'oxide d'éthylène semblait une option viable [76, 154]. Malgré, semblerait-il une légère altération de l'ECM son efficacité sur la stérilisation était établie [164]. Sa classification récente en substance mutagène et cancérigène ne permettait pas raisonnablement une utilisation à des fins cliniques. Le dioxyde de carbone supercritique a été étudié comme agent de stérilisation de MD [165]. Les résultats semblaient encourageants avec peu de relargage de résidus toxiques et l'absence d'altération de l'ECM. Cependant pour des raisons techniques et le manque de recul scientifique du procédé (travail de recherche en soit), cette technique prometteuse n'a pas été retenue.

Malgré des inconvénients bien connus et étudiés, le choix de l'irradiation Gamma répondait aux normes en vigueur concernant les dispositifs médicaux implantables et la technique d'irradiation était parfaitement maîtrisée. Il a été démontrée qu'à des doses infé rieures à 15 kGy, l'irradiation augmentait la force et le module d'élasticité de l'ECM. A des doses supérieures à 15 kGy, les propriétés mécaniques étaient altérées de manière « dosedépendante » [166]. Le changement structurel de l'ECM a été observé après irradiation Gamma [167]. La dégradation de l'ECM pourrait être attribuable en partie au cross-linking du Collagène à partir de faible dose (5 kGy) [168]. Plus les doses augmentent, plus les ruptures des chaînes de Collagène sont importantes impactant sur les qualités mécaniques des MD [169]. La cytotoxicité constatait après irradiation Gamma pourrait être liée à une accélération des dégradations enzymatiques et à la formation de structures lipidiques résiduelles [170-172]. Afin de mieux appréhender les effets de l'irradiation sur les MD, nous aurions dus effectuer tous les tests de caractérisation avant et après irradiation. Cela n'était pas réalisable sur le plan pratique pour des raisons principalement logistiques et économiques. L'influence des résultats sur la caractérisation des MD (biologique et mécanique) aux vues de la littérature et des doses administrées (25kGY) aux MD paraît assez logique.

2.2. <u>Caractérisation de la MD</u>

La décellularisation d'un tissu répond à des critères ne faisant pas l'objet d'un consensus scientifique international. Selon les équipes de recherche, les conditions à remplir sont très variables [154]. La décellularisation a été définie comme l'absence sur le tissu testé de noyau cellulaire intact et l'absence d'antigène cellulaire (eg; CMH I). D'autres définitions y ajoutaient une réduction « significative » de l'ADN résiduel comparé au tissu natif. L'augmentation incessante de l'utilisation de MD en pratique clinique (d'origine industrielle) devait faire émerger une définition de critères objectifs d'une décellularisation effective. Crapo et al. en 2011 [76] ont donc après analyse de la littérature établi ces critères de manière plus ou moins arbitraire. La décellularisation d'un tissu était effective si ce dernier ne présentait pas de noyau cellulaire intact en H.E.S ou en DAPI, si la quantité d'ADN résiduel n'était pas supérieure à 50 ng/mg de tissu sec et si l'ADN résiduel n'excédait pas 200 paires de bases. La relation entre ces critères et la réponse de l'hôte était suggérée par Keane et al. [162]. Cette réponse de l'hôte semble être étroitement liée à la réponse inflammatoire en rapport avec le ratio et la distribution des macrophages M1 et M2 [34].

Ces critères (retenus dans le travail présent) peuvent paraître trop restrictifs, trop larges ou encore adaptés, mais ont le mérite d'exister et permettre ainsi de comparer les travaux des

différentes équipes et les protocoles de décellularisation employés. Ils devront être à l'avenir « affinés » en intégrant d'autres composants cellulaires qui participent à la réaction pro-inflammatoire de l'hôte (eg ; activité mitochondriale résiduelle) [172]. Nous avons opté pour ces critères [76, 162] car ils apparaissaient comme les plus simples à objectiver mais également les plus précis.

Les glycosaminoglycanes (GAGs) sont des polymères saccharidiques linéaires à longue chaîne présents dans pratiquement tous les tissus. L'unité de base des GAGs est un disaccharide, constitué d'un hexose (acide hexuronique en général) lié à une hexosamine. Cette classe ubiquiste de composés a été découverte dans les tissus conjonctifs et étudiée par le biochimiste américain d'origine allemande Karl Meyer dès 1930. Une des caractéristiques de ces chaînes oligosaccharides est leur très grande hétérogénéité. En effet, la longueur variable des chaînes et leurs modifications structurales (sulfatations, épimérisations) conduit à un nombre de combinaisons quasi-infini. Selon la nature des oses et la manière dont les disaccharides sont reliés entre eux, les GAGs une fois liés à une protéine (protéoglycane) sont classés en 5 grandes familles : les héparines et les héparanes sulfates, l'acide hyarulonique, les chondroïtines sulfates, les dermatanes sulfates et les kératanes sulfates (Source: Société chimique de France). Leur détérioration a été étudiée surtout en chirurgie cardiaque et plus précisément sur les prothèses aortiques décellularisées d'origine porcine. Les GAGs sembleraient devoir être préservés lors de la décellularisation pour deux raisons principales : (i) ils font partis de l'ECM et ont un rôle important dans la tenue mécanique du tissu [160]. (ii) Ils joueraient un rôle dans l'attraction du calcium en raison de leur forte charge négative. Leur absence favoriserait l'apparition de phosphate de calcium responsable de la calcification du tissu [173]. Par extrapolation et manque de données en ingénierie tissulaire œsophagienne, la préservation des GAGs semblerait un élément important en vue d'une implantation tissulaire. L'étude histologique après coloration au bleu Alcian n'avait pas permis une conclusion satisfaisante quant à la préservation des GAGs au sein des MD. Leur quantification sur échantillon sec a confirmé leur préservation dans les MD comparé aux esophages natifs.

Deux études ont analysé et comparé les propriétés mécaniques de MD [74, 86]. Badylak et al. [86] ont réalisé un test d'éclatement et un test de traction longitudinale et circonférentielle. Les mesures étaient effectuées et comparées avant et après implantation de la matrice dans un modèle canin. Leur matrice était issue de vessie de porc. Les

caractéristiques mécaniques étaient exprimées en pourcentage par rapport à l'œsophage natif. Les forces de résistance longitudinale correspondaient à 1000% et circonférentielle à 400% de celles mesurées sur l'œsophage natif. Ces forces diminuaient dans le temps après implantation. Les variations de diamètres en fonction de la pression intraluminale de leur matrice étaient comparables à celles de l'œsophage natif. Bhrany et al. [74] ont réalisé des tests d'éclatement sur leur matrice œsophagienne décellularisée dans un modèle murin. Les pressions d'éclatement étaient de 83.4 kPa pour l'œsophage natif et de 61.4 kPa pour leur matrice (sans différence statistiquement significative). Nos résultats ne sont pas comparables à ceux de Badylak [86] pour deux raisons principales : leur matrice correspondait à de la vessie porcine (modèle canin) et les tests en traction étaient réalisés sur des échantillons rectangulaires. L'originalité de nos tests reposait sur la mise en traction de la structure tubulaire complète et non sur un échantillon « plan ». En traction longitudinale, nos MD présentaient des contraintes plus élevées associées à une augmentation du module d'élasticité. Ces caractéristiques n'étaient pas retrouvées en traction circonférentielle mais une tendance inverse était observée. Nos tests d'éclatement sont proches de ceux de Bhrany et al. [74]. Cependant nous avons observé des contraintes intraluminales supérieures pour les MD (108 kPa versus 79.2 kPa, p = 0.363). Cette supériorité était également observée en traction longitudinales. En effet nos MD supportaient des contraintes et des forces de traction supérieures aux œsophages natifs. Ces résultats confirment que les propriétés mécaniques de l'œsophage sont supportées par la matrice extracellulaire. Le collagène et l'élastine ont un rôle central dans le comportement mécanique de l'œsophage [26]. L'organisation hélicoïdale des fibres de collagène de la muqueuse lui confère ses caractéristiques anisotropiques alors que l'organisation orthogonale des travées musculaires confère à la musculeuse son caractère orthotropique [27]. Yang et al. [38] ont testé les caractéristiques mécaniques sur des œsophages porcins. Leurs échantillons étaient rectangulaires, leurs tests étaient réalisés sur la muqueuse et la musculeuse séparément. Les contraintes de la muqueuse et de la musculeuse en traction longitudinale étaient de 9.4 MPa et de 1.5 MPa respectivement. En traction circonférentielle, les contraintes de la muqueuse et de la musculeuse étaient de 5.3 MPa et 1.2 MPa. Ces différences avec nos valeurs peuvent être expliquées par l'échantillonnage des œsophages. Enfin le nombre d'échantillons testés était insuffisant dans notre étude pour en tirer des conclusions statistiquement fiables (n < 30 par condition). Ce manque d'échantillon est expliqué par la volonté d'effectuer les tests mécaniques sur l'œsophage dans sa forme initiale et non sur des échantillons en 2 dimensions (rectangulaires). L'échantillonnage d'un œsophage en plusieurs pièces aurait permis de multiplier les tests mais n'aurait pas été

représentatif du comportement mécanique *in-situ*. Nous constatons cependant un comportement mécanique similaire avec des contraintes plus importantes en traction longitudinal et des pourcentages de déformation similaires. Ces propriétés sont maintenues après la décellularisation dans notre étude. Ces différentes valeurs mécaniques diffèrent de celles de l'œsophage humain [30]. Vanags et al. [30] ont établi des mesures en traction longitudinale et circonférentielle sur des œsophages humains (cadavres frais). Les contraintes en traction longitudinal et circonférentielle étaient estimées à 1.67 MPa et 1.48 MPa respectivement. Nos résultats sont inférieurs à ceux de Vanags et al. en traction circonférentielle (0.146 MPa en traction circonférentielle). Cependant le comportement mécanique de l'œsophage porcin diffère de l'œsophage humain rendant caduque la comparaison des MD à l'œsophage humain.

L'évaluation de la biocompatibilité in vivo dans un modèle murin a déjà été utilisée en ingénierie tissulaire œsophagienne [34]. L'utilisation d'un score histologique permettait d'évaluer la qualité d'intégration du tissu. Cette méthode est basée sur des critères histologiques (**Tableau 5**) 14 et 35 jours après l'implantation des MD chez le rat (paroi musculaire). Les résultats observés permettaient de conclure à une bonne biocompatibilité des MD (score > 10) à J14 et J35 (à l'exception d'une MD à J35, score = 9). Ce test est seulement semi-quantitatif et ne peut donner qu'une approximation de l'intégration d'un biomatériau. L'équipe de Badylak et al. [34] avait couplé ce test à une quantification des macrophages M1 et M2. Le phénotype M1 était identifié par la présence des marqueurs CD68+ CD86+ (M1 phenotype) et le phénotype M2 par les marqueurs CD68+ CD206+ (M2 phenotype). Le ratio M2/M1 évaluait l'inflammation. Plus le ratio était haut, plus l'intégration tissulaire était bonne. La globalité de ces deux tests permet de mieux affirmer l'intégration biologique d'un matériau biologique. Nous n'avions pas les moyens technologiques d'effectuer la quantification et le calcul automatisé du ratio macrophagique.

2.3. Choix du modèle animal

Le choix du porc comme modèle expérimental d'une décellularisation œsophagienne était fondé sur sa ressemblance « biologique » à l'œsophage humain [39]. Le modèle animal devait se rapprocher au maximum de l'Homme afin de permettre un transfert des protocoles en pratique clinique sans modifications majeures de ces derniers. Les protocoles de décellularisation doivent être adaptés aux caractéristiques morphologiques et biologiques de chaque tissu traité [78, 154, 174].

L'œsophage porcin présente des caractéristiques morphologiques (poids, longueur, épaisseur) similaire à l'œsophage humain. Ses caractéristiques histologiques sont également similaires en tout point à l'œsophage humain. Cependant les caractéristiques histologiques des œsophages canins et murins sont très proches de l'Homme (**Tableau 10**).

<u>Tableau 10</u>: Caractéristiques mécaniques et histologiques des œsophages dans les principaux modèles animaux utilisés en ingénierie tissulaire œsophagienne

| Espèc | es | Caractéristiques |
|--------|------------------------|--|
| Chien | [175] | |
| - | Histologie (3 couches) | Muqueuse: épithélium stratifié non-kératinisé. |
| | | Sous-muqueuse: glandes muqueuses ubiquitaires |
| | | Musculeuse: Muscle strié |
| - | Mécanique | 300-400 mm Hg |
| - | Différences | Muqueuse: muscularis mucosae présente dans le tiers sup |
| | | puis absente |
| | | Musculeuse: Muscle strié |
| Porc | [39] | |
| - | Histologie (3 couches) | Muqueuse: épithélium stratifié kératinisé. |
| | | Sous-muqueuse: glandes muqueuses dans le tiers |
| | | supérieur |
| | | Musculeuse: Muscles striés au tiers supérieur, striés et |
| | | lisses au tiers moyen et lisses au tiers inférieur |
| - | Mécanique | 600-800 mm Hg |
| - | Différences | Muqueuse: pas de muscularis mucosae au tiers supérieur |
| Rat [] | 176, 177] | |
| - | Histologie | Muqueuse: épithélium stratifié kératinisé. |
| | | Musculeuse: Muscles striés au tiers supérieur, striés et |
| | | lisses au tiers moyen et lisses au tiers inférieur |
| - | Mécanique | 5-15 mm Hg |
| - | Différences | Muqueuse: pas de muscularis micosae |
| | | Sous-muqueuse: pas de glande |

Le modèle canin était très utilisé en Asie dans l'ingénierie tissulaire œsophagienne, les caractéristiques de l'œsophage canin étant très proches de l'œsophage humain [39]. Pour des raisons strictement culturelles son utilisation dans ce travail de recherche était exclue. Le modèle murin permettait une approche scientifique satisfaisante. Sjöqvist et al. illustrent dans un travail très abouti [1] la méthodologie de décellularisation œsophagienne ainsi que les phases de caractérisations nécessaires avant un passage à la clinique. Deux principales critiques peuvent être formulées envers leurs travaux ; (i) la preuve de la décellularisation ne répond pas aux critères retenues notamment en quantité d'ADN résiduel et en nombres de paires de bases sur cet ADN, et (ii) le modèle animal est murin et ne permet pas un transfert de protocole en l'état à un œsophage humain. Les 3 modèles animaux du **Tableau 10** ont été utilisés dans l'ingénierie tissulaire œsophagienne avec des résultats scientifiques satisfaisants (**Tableau 11**).

<u>Tableau 11</u>: Principales études précliniques en ingénierie tissulaire utilisant des matrices biologiques

| Auteurs | Animaux (n) | Matrice (protocole) | Localisation Défect (mm) | Cellules (source) | Suivi (mois) | Morbidité Mortalité | Histologie |
|------------------------------|----------------|--|--|---|-----------------|------------------------|---|
| Badylak et al. 2000 [90] | Chien (15) | SIS Versus UBS (peracetic acid) | Cervicale Patch (30x50) Circonférentiel (50) | Non | 15 | 4 0 | Muqueuse Musculeuse |
| Kajitani et al. 2001 [91] | Porc (10) | Aorte (porc) (Triton X-100) | Thorax Patch (20) | Non | 4 | 1 0 | Muqueuse Musculeuse |
| Isch et al. 2001 [81] | Chien (12) | Alloderm | Cervical Patch (10x20) | Non | 3 | 1 0 | Muqueuse |
| Badylak et al. 2005 [86] | Chien (22) | UBM (porc) (peracetic acid) | Cervical Circonférentiel (70) | Musculeuse externe (autologue) | 7 | 12 0 | Muqueuse Sous-muqueuse Musculeuse |
| Lopes et al. 2006 [87] | Rat (67) | SIS (porc) | Cervical Abdominal Patch (½Circonférentiel) | No | 5 | 0 4 | Muqueuse Sous-muqueuse Musculeuse |
| Marzaro et al. 2006 [84] | Porc (6) | EAM (porc) (DEOX) | Thorax Patch muscularis (20) | CML (autologue) | 1 | 0 | Musculeuse |
| Urita et al. 2007 [85] | Rat (27) | GAM (rat) (DEOX) | Abdominal ½ Circonférentiel 1 (40) | Omentum | 18 | 3 3 | Muqueuse |
| Wei et al. 2009 [88] | Chien (12) | SIS (porc) (DEOX) | Cervical ½ Circonférentiel (50) | Cellules épithéliales (autologue) | 2 | 0 | Muqueuse |
| Gaujoux et al. 2010 [92] | Porc (27) | Aorte (porc) | Cervical Circonférentiel (20) | Non | 12 | 16 10 | Muqueuse |
| Tan et al. 2012 [100] | Chien (12) | SIS (Porc) (SDS) | Cervical ½ Circonférentiel (50) | BMSCs (autologue) | 3 | 0 | Muqueuse Sous-muqueuse Musculeuse |
| Sjöqvist et al. 2014 [1] | Rat (-) | EAM (Rat) (DEOX) | Circonférentiel (15) | BMSCs (hétérologue) | 14 jours | 0 | Muqueuse Sous-muqueuse Musculeuse |

[UBS: Urinary bladder submucosa; SIS: Small intestinal submucosa; EAM: Esophageal acellular matrix; GAM: Gastric acellular matrix; Alloderm®: decellularized human dermis;

BMSCs: Bone Marrow Stem Cells; CML: cellules musculaires lisses]

Le parti pris du présent travail était le choix du gros animal le plus proche anatomiquement de l'Homme. Le choix du porc exposait cependant à deux contraintes majeures non scientifiques. La première était économique, le porc en soi ne représente pas un investissement trop important, en revanche la logistique autour de ce dernier et surtout son suivi est un surcoût important limitant ainsi le nombre d'individus employé. Le deuxième verrou était logistique et propre à l'Aquitaine jusqu'en 2016. Aucune structure animalière

n'avait l'agrément dans le suivi porcin postopératoire. Ce « désagrément » a représenté un véritable frein à la bonne avancée des travaux. Cependant les arguments scientifiques morphologiques et histologiques ont fait du porc le modèle de choix du présent travail. La délocalisation des procédures d'expérimentation animale s'est imposée avec toutes les contraintes logistiques, humaines et matérielles que cela peut engendrer.

3. Cellularisation

3.1. Choix des cellules

Le choix de la cellularisation de la MD précédant son implantation répondait à des arguments scientifiques tels que la diminution de la fibrose post-implantation et une meilleure régénération tissulaire de la MD implantée [39, 93]. Le choix du type cellulaire était relativement étroit, et s'orientait (i) vers un (ou plusieurs) type(s) cellulaire(s) différencié(s) ou (ii) vers un type cellulaire « souche ». La majorité des substitutions œsophagiennes étant nécessaire après œsophagectomie pour cancer, le prélèvement de cellules épithéliales ou musculaires lisses autologues d'origine « intestinales » apparaissait critiquable. De plus le potentiel de transformation des cellules souches en différentes lignées rendait le choix de ces dernières plus simples à mettre en œuvre. Parmi les cellules souches, le choix entre des cellules souches embryonnaires, adultes ou IPS (Induced pluripotent Stem Cell) était en faveur des cellules souches adultes. Ces dernières offraient des avantages éthiques (prélèvement) et pratiques (disponible en plus grande quantité). La facilité technique de prélèvement (procédure chirurgicale peu invasive) était également un critère important. Les Adipose Derived Stem Cells (ADSCs) répondaient à toutes ces attentes.

Selon l'IFATS (International Federation for Adipose Therapeutics), une cellule souche est caractérisée par sa capacité d'auto-régénération et son potentiel multipotent. Une cellule progénitrice est limitée en termes de potentiels de prolifération mais est capable de se différencier en un ou plusieurs types cellulaires spécialisés [178]. Les adipose-derived stem cells (ADSCs) et la Fraction Vasculaire Stromale (SVF) sont deux entités distinctes mais étroitement liées en médecine régénératrice [179]. La SVF est une population cellulaire mésenchymateuse comprenant 4 types cellulaires différents identifiés par leurs marqueurs cellulaires de surface analysés par cytométrie en flux [180]. La SVF comprend: (1) des cellules hématopoïétiques CD45+ (leucocytes) ; (2) des cellules vasculaires endothéliales CD31+/CD34+/CD45-; (3) des cellules souches = ADSCs CD31-/CD34+/CD45-; et (4) des péricytes et fibroblastes CD31-/CD34-/CD45-. Li et al. [181] ont quantifié les souspopulations cellulaires de la SVF déterminant que les ADSCs représentaient 67.60 ± 29.7% des cellules. Stilleart et al. [182] étaient les premiers à observer que l'utilisation de la SVF en ingénierie tissulaire dans un modèle murin induisait une angiogénèse secondaire à la sécrétion de facteurs angiogéniques. Les ADSCs sécrètent une grande variété de facteurs de croissance et angiogéniques (eg ; VEGF = vascular endothelial growth factor), favorisant l'angiogénèse en milieu ischémique [183]. Les ADSCs joueraient également un rôle immunitaire en inhibant la prolifération des cellules-T et les cytokines pro-inflammatoires en bloquant les prostaglandines E2 [184]. Les ADSCs sont déjà utilisés en pratique clinique et notamment en chirurgie plastique et reconstructrice [185]. En chirurgie digestive (traitement des fistules dans la maladie de Crohn) [186], des essais cliniques sont en cours, et leur utilisation dans les années à venir en cardiologie, hépatologie et orthopédie est envisageable [179]. Les ADSCs apparaissaient donc comme les cellules souches de choix en vue de cellulariser une MD œsophagienne. Leur isolation, leur caractérisation et leur culture était déjà largement maîtrisées au sein du laboratoire.

Les tests de cytotoxicité ont donc été réalisés à partir des ADSCs. Ces tests ont démontré initialement une forte toxicité des MD. Le MTT, premier test réalisé (démontrant une forte toxicité) a été réitéré à 7 reprises avec à chaque fois une adaptation du protocole de décellularisation. Ces modifications portaient sur le rinçage (durée et nombre) nous obligeant à sans cesse augmenter le nombre de rinçage et leur durée. Nous ne souhaitions pas modifier les doses de « détergents » car les résultats sur la décellularisation effective auraient été affectés (critère principal de jugement). Le test Rouge Neutre réitéré également à deux reprises, nous a amené à modifier le dernier rinçage des MD. Ce dernier rinçage, composé d'eau osmosée initialement a été modifié au profit de milieu de culture d'ADSCs. Le postulat était d'imbiber les MD de ce milieu afin de favoriser l'adhésion/prolifération/migration des ADSCs. Ainsi, les deux tests devaient être négatifs (viabilité cellulaire et activité métabolique supérieures à 70%) afin de considérer les MD comme non cytotoxiques. Ces tests ont donc été réalisés sur deux séries de MD qui différaient, comme expliqué précédemment, par la solution utilisée pour le dernier rinçage de 24h. Les résultats obtenus pour la série 1 indiquaient une viabilité cellulaire globale de l'ordre de 110%. Ce pourcentage de viabilité cellulaire est supérieur au témoin et pourrait être le signe d'une augmentation de l'activité lysosomiale : cette activité serait due à l'activation de mécanismes de mort cellulaire [193] déclenchés par un stress amené par les véhicules d'extraction. L'activité métabolique moyenne mesurée sur les ADSCs au contact des mêmes véhicules d'extraction a été inférieure à 70%, allant dans le sens de l'hypothèse proposée. Les résultats obtenus pour la série 2 ont montré une viabilité cellulaire globale de 100% et une activité métabolique de 90% : ils reflètent la bonne vitalité des ADSCs au contact des véhicules d'extraction et donc la non-cytotoxicité des MD de cette série avec une viabilité cellulaire de $99 \pm 5\%$ et d'activité métabolique de $91 \pm 10\%$ à 24h. Ces données mettent en avant l'importance de la dernière phase de rinçage des MD lors de la décellularisation : l'imprégnation des matrices par des molécules (facteurs de croissances dans le sérum de veau fétal et nutriments) du milieu de culture pourrait favoriser l'adhésion et la survie des ADSCs.

3.2. Méthode d'ensemencement

La méthode d'ensemencement devait être applicable en pratique clinique et facilement reproductible. Inspirés de la technique d'ingénierie tissulaire par auto-assemblage réalisée par l'équipe du Laboratoire d'organogénèse expérimental (LOEX) au Canada, nous avons réalisé des feuillets de matrice extracellulaire dérivés de culture primaire d'ADSCs humains. Ce procédé d'ingénierie tissulaire a déjà permis la réalisation de structures vasculaires [188, 189] aux propriétés mécaniques proches des vaisseaux natifs [190], possédants des propriétés vasoactives [191] et la mise au point de substituts cornéens et urologiques [192, 193].

La fonction des feuillets cellulaires dans notre travail était d'être un « vecteur » cellulaire. Il permettait de cellulariser une structure tubulaire de façon à priori homogène. La première étape était donc d'appliquer les feuillets sur la face externe de la MD. Les premiers résultats histologiques étaient encourageants et des cellules étaient visualisées dans la partie externe de la musculeuse (**figure 43**, page 69). Cependant la partie interne était un verrou technique à un double ensemencement interne et externe. Ainsi l'éversion de la MD permettait de positionner la face interne à l'extérieur de la MD. La présence de cellules dans la couche muqueuse après 14 jours d'application du feuillet sur la MD n'était clairement pas objectiver. La couche interne (couche muqueuse) de l'œsophage correspond cependant à une « barrière » au même titre que d'autres épithéliums de notre organisme. Ce rôle de barrière se fait dans un état d'équilibre global (renouvellement cellulaire, sécrétion glandulaire de la sous-muqueuse, péristaltisme) que nous pensions rompre grâce à la décellularisation. La présence de cellules dans la muqueuse correspondait aux passages de celle-ci dans des zones de rupture architecturales de la muqueuse de la MD (Figure 42 A, page 69). L'élément « positif » est que le concept de cellularisation par les feuillets est viable. Le temps de mise en culture du feuillet avec la MD demeure à déterminer ainsi que les conditions de culture (dynamique ou statique). La cellularisation interne de notre MD pourrait être réalisée dans une chambre de perfusion similaire à celle utilisée pour la décellularisation. La face externe pourrait dans le même temps bénéficier de l'application de feuillets cellulaires. Afin de faciliter leur manipulation les feuillets avaient été lestés pour qu'ils ne se « détachent» pas trop tôt de la boîte de culture. Ce soulèvement du feuillet survenait à la troisième de semaine de culture. Les feuillets ne présentaient pas pour la plupart les résistances mécaniques suffisantes pour résister à une manipulation. Leur lestage avait permis 50 jours de culture les rendant plus

propice à l'enroulement. Cependant la question du délai de culture optimale des feuillets en vue d'une telle application est à définir.

La cellularisation préalable d'une matrice (naturelle ou synthétique) présente des intérêts bien connus. La fonction des cellules restent cependant à mieux déterminer. La différenciation des cellules souches au sein des matrices n'est pas clairement démontrée dans tous les types de matrices décellularisées [195] et leur effet pourrait être également paracrine [196, 197]. Le pouvoir des ADSCs sur le microenvironnement pourrait avoir une action conjointe à leur propre différenciation une fois dans une matrice biologique [195]. L'utilisation de cellules souches autologues tels que les ADSCs posent le problème de la cancérogénèse de ces cellules surtout prélevées sur des patients déjà porteurs d'un cancer [179]. L'utilisation des ADSCs dans de telles conditions cliniques a déjà fait l'objet d'études cliniques et montrait des résultats encourageants [198]. Les ADSCs semblent cependant stimuler la multiplication cellulaire tumorale en inhibant la mort cellulaire dans des conditions *in-vivo* [199]. Les mécanismes exacts de l'effet des ADSCs autologues sur des patients porteurs d'un cancer évolutif sont inconnus. Leur utilisation en pratique clinique oncologique chirurgicale doit être prudente et contrôlée, sans pour autant l'interdire car actuellement leur potentiel méfait n'est pas scientifiquement prouvé [179].

4. Maturation

4.1. Le grand épiploon

Son utilisation a été justifiée dans l'introduction (paragraphe 5.1, pages 26-27). Elle reposait avant toute justification scientifique [98, 100-103] à une conviction clinique empirique. L'utilisation du grand épiploon en chirurgie digestive est courante et l'apprentissage des modalités de sa mise en œuvre fait partie du cursus de la spécialité chirurgicale.

Afin d'évaluer un éventuel bénéfice d'une implantation des MD dans le grand épiploon, nous avons réalisé une étude préclinique sur un modèle murin (rat Nude). Ce choix était basé sur la nécessité d'utiliser un mammifère (car tous possèdent un grand épiploon [98]), mais préférentiellement de petite taille pour des raisons de suivi et économiques. Ainsi, nous avons pu constituer trois groupes de 10 individus afin d'étudier l'effet temps (2, 4 et 8 semaines) sur l'évolution des MD. La caractéristique Nude était nécessaire car en plus du temps nous souhaitions évaluer l'effet d'ajouter des feuillets autour des MD. Ces feuillets étaient constitués d'ADSCs humains, la MD étant non immunogène (mais d'origine porcine) cela nécessité un individu peu immunocompétent. Les résultats nous ont permis d'établir le bénéfice d'une telle stratégie sur le plan tissulaire sans inconvénients cliniques majeures. Le poids des animaux faisait partie des critères de jugement secondaire afin d'estimer la répercussion clinique d'une procédure chirurgicale surajoutée. Tous les rats ont survécu et leurs courbes pondérales apparaissaient comme normales. Un seul individu avait présenté un infléchissement de sa courbe non attribuable à l'intervention (dernière semaine de suivi et analyse histologique n'objectivant pas d'infection ou de nécrose). Ces données précliniques permettent d'apprécier la faisabilité de la procédure en conditions cliniques. Nous avons objectivé la présence de cellules dans les MD jusque dans la sous-muqueuse. Cet infiltrat cellulaire était composé de cellules principalement inflammatoire ou fibroblastique. Ces données étaient nécessaires afin de confirmer la possibilité d'une cellularisation des MD. De plus la présence de capillaire sanguin dans les MD jusque dans les couches sous-muqueuses permettait en partie d'envisager une solution à la vascularisation des MD.

La vascularisation de matrices est un verrou dans l'ingénierie tissulaire [200, 201]. Cette vascularisation est nécessaire afin d'assurer le transport de l'oxygène et des nutriments au sein des matrices [200]. Cela permet ainsi de favoriser la migration cellulaire au sein du biomatériau. L'utilisation de l'épiploon levait ainsi le verrou technologique de la

vascularisation. Le principal écueil de cette méthode était l'absence *quasi* complète du contrôle de la maturation. La modulation de la maturation passait donc par le temps d'implantation des MD dans l'épiploon et l'ajout de cellules préalables sur les MD.

4.2. Effets « temps-cellules »

Le temps nécessaire à la maturation des MD étaient à définir. La littérature était large sur le sujet avec des temps d'implantation allant d'une à 12 semaines [56, 202]. A 2 semaines de maturation la réaction inflammatoire était importante. La présence d'un infiltrat maximum à ce temps suggérait que le délai était trop court. Nous souhaitions attendre le paroxysme de la réaction inflammatoire souvent présente au 14^{ième} jour postopératoire même sans implantation de matériau. Cependant il était intéressant de noter que la vascularisation de la MD était déjà présente après seulement 2 semaines de maturation. A 4 semaines la vascularisation était présente dans les mêmes proportions avec cependant une régression de l'infiltrat cellulaire. Les cellules étaient présentes jusque dans la couche sou-muqueuse des MD. Les MD présentaient des signes de dégradation mais leur architecture était conservée. Après 8 semaines de maturation, plus de la moitié des MD n'étaient pas retrouvées confirmant la nature dégradable de la MD, mais confirmant que ce délai était trop long. Cette observation permet d'émettre deux hypothèses : la première est que la maturation doit être inférieure à deux semaines et la substitution réalisée avant la phase maximum d'inflammation car la vascularisation est déjà présente. La deuxième hypothèse est la nécessité de passer cette phase inflammatoire afin de réaliser la substitution dans une phase inflammatoire moindre. Le délai de 4 semaines a donc été retenu comme période optimale de maturation de nos MD.

L'ajout de feuillet autour des MD avant l'implantation n'avait pas permis d'observer une modulation de l'infiltration cellulaire. La vascularisation des MD étaient inchangées sans bénéfice ou inconvénient clairement objectivé après analyse histologique. L'infiltrat cellulaire était présent jusque dans la sous-muqueuse à 4 semaines de maturation sans modification en quantité ou en qualité de cet infiltrat. Le réel bénéfice d'un ensemencement cellulaire des MD avant leur maturation n'est clairement pas démontré dans notre étude malgré des avis contraires de la littérature [39, 67]. Les hypothèses expliquant l'absence de bénéfice seraient la méthode de cellularisation, le type cellulaire et le modèle animal. La méthode de cellularisation avait cependant été testée avec des résultats *in-vitro* encourageant, sa remise en cause ne doit pas être exclue pour autant. Le type cellulaire ADSCs n'est pas remis en question mais sa source en revanche est très critiquable. En effet la source de prélèvement des

ADSCs devrait être porcine et autologue. Cela entrainerait un changement de modèle animal. Idéalement et afin de pouvoir formuler des conclusions plus fiables, des ADSCs porcins devraient être cultivés en feuillet, placé sur la MD, elle-même implantée dans le grand épiploon du porc « donneurs » d'ADSCs. A cette seule condition les conclusions pourraient être fiables sans forcément être extrapolable à l'Homme.

Le grand épiploon demeure un bon bioréacteur car il est facilement accessible, les techniques chirurgicales permettant son utilisation déjà implémenter en clinique, et il possède des qualités intrinsèques clairement démontrées [100-103] permettant son utilisation en médecine régénératrice.

5. Implantations

L'implantation de nos MD après œsophagectomie était le « but » de cette étude. La première étape était d'évaluer si une telle intervention était réalisable par laparotomie. Ce choix (exérèse du tiers inférieur de l'œsophage) était motivé par un besoin clinique. En effet l'augmentation d'incidence des Adénocarcinomes de l'œsophage concerne le tiers inférieur. La substitution cervicale aurait été plus simple à tout point de vue (technique, suivi) mais ne répondait pas réellement à un besoin clinique. Cette intervention par voie abdominale n'était pas décrite dans la littérature (sur un modèle animal). Sa faisabilité chirurgicale nous a paru bonne. En effet la profondeur de champ (hiatus œsophagien) est moins importante chez le porc que chez l'homme et l'accessibilité de l'œsophage abdominal et thoracique est aisée en laparotomie. Cependant les rapports entre l'œsophage et les plèvres (surtout gauche) semblent plus étroites, se soldant pas un pneumothorax gauche peropératoire systématique. La suturabilité des MD était très bonne (non réalisé sur le plan mécanistique) mais l'utilisation de PDS 4/0 ne coupé pas les MD, signes pour un chirurgien digestif d'une bonne tenue du matériau.

Le premier groupe de porcs avait eu une maturation des MD dans leur grand épiploon au préalable (aucun groupe n'a eu d'ensemencement préalable). Nous avons ainsi pu estimer l'impact clinique d'une laparotomie supplémentaire (aussi petite soit-elle). La courbe de poids des trois animaux semblait se casser (Figure 52, page 77). L'inconvénient est que le suivi pondéral du deuxième groupe sans maturation n'a pas pu être réalisé pour des raisons purement financière. Cependant l'âge des 6 porcs était similaire à quelques jours prêts et nous avons constaté une différence pondérale au moment de la substitution œsophagienne avec un avantage pour le groupe sans maturation. Ces données nous incitent à beaucoup de prudence sur l'innocuité d'une phase de maturation in-vivo. De plus cette phase de maturation de 4 semaines avait sensiblement modifiée l'élasticité des MD. Ces dernières étaient plus fibreuses ajoutant une contrainte technique lors du remplacement œsophagien. En effet l'incongruence de calibre entre l'œsophage et la MD était facilement corriger sans maturation, cela était plus difficile après la maturation lié au caractère fibreux des MD. La réalisation d'une épiploplastie n'a posée aucun problème technique même 4 semaines après une première laparotomie. La vascularisation des MD au travers de l'épiploon était macroscopiquement visible et le respect de cette dernière était aisé sur le plan chirurgical.

La reprise de l'alimentation avait été autorisée le soir même de l'intervention sous forme de fraction liquide hypercalorique. Dès le lendemain et lors de la première semaine l'alimentation se faisait de la même manière sans restriction en quantité. Cette stratégie postopératoire de « réhabilitation précoce » permettait de se passer d'un support nutritionnel entéral ou parentéral. La stratégie de réhabilitation précoce est en cours d'étude en chirurgie œsogastrique [203] mais a déjà fait preuve de son efficacité dans d'autres spécialités chirurgicales [204]. Un individu est décédé à J1 de l'intervention, l'autopsie a permis l'extraction d'un champ abdominal intrapéritonéal localisé en hypochondre gauche. Ce décès a été mis sur le compte de ce « textilome » faute d'une autre explication. Le porc présentait une hyperthermie lors de son décès. Un seul individu n'a pas présenté de complications postopératoires, 2 ont présenté une fistule, 3 un abcès et 2 avaient une sténose. Les résultats cliniques sont mitigés. Néanmoins le seul individu n'ayant pas présenté de complications avait une perte de poids maximal observée de seulement 7%. L'analyse histologique de la MD implantée objectivée une régénération tissulaire de la MD très proche de l'œsophage natif. Cette régénération a été observée de manière systématique chez tous les individus. Les zones intéressées par les fistules et abcès présentées en revanche un remaniement inflammatoire et fibreux très important ne permettant de conclusions fiables.

Conclusions

Nous avons réussi à élaborer un substitut œsophagien d'origine biologique répondant aux critères internationaux en terme de produits d'ingénierie tissulaire appelés matrice décellularisée. Ces dernières avaient les caractéristiques protéiques et architecturales similaires à un œsophage porcin natif. Elles étaient biocompatibles et leur cytotoxicité autorisait leur ensemencement par des cellules adultes mésenchymateuses. L'ensemencement des MD passé par la constitution de feuillets d'ADSC permettant une application manuelle et reproductible du procédé de recellularisation tout en préservant la structure tubulaire de la MD intacte. La maturation des MD a permis leur vascularisation de manière efficiente sans empêcher la substitution œsophagienne.

La poursuite des travaux devraient passer par de nouveaux essais précliniques sur le gros animal. Le principal essai devrait reposer sur la substitution œsophagienne par des MD au préalable maturées dans le grand épiploon avec une cellularisation préalable. Cette dernière devra être optimisée principalement sur le versant interne avec la nécessité d'utiliser une chambre de perfusion prévue à cet effet. La bonne application des feuillets sur la face externe devra passer par le recours à des artifices comme la colle de fibrine par exemple. Cette dernière est déjà commercialisée en pratique clinique. La fixation par des points de monofilament n'est pas satisfaisante.

Ce travail de recherche a permis l'élaboration d'une méthode de décellularisation d'un organe tubulaire représenté dans ce cas précis par l'œsophage. Nous pensons qu'il n'y a pas de méthodes de décellularisation idéales en l'état actuel des connaissances. En revanche un large choix permet d'adapter un protocole et sa mise en œuvre en fonction de l'organe choisi. La caractérisation répond à une démarche logique et répond à des critères qui ont le mérite d'être précis à défaut d'être consensuels. Les critères actuelles de décellularisation vont évoluer (s'étoffer) avec un cahier des charges de plus en plus précis. Le choix du modèle animal est crucial et il doit être au plus proche de l'Homme dans la fonction étudiée. L'Homme est resté au centre de ce travail en pensant à chaque étape si cela était réalisable, acceptable et si les patients pourraient bénéficier rapidement de nos avancés scientifiques.

Références

- 1. Sjöqvist S, Jungebluth P, Lim ML, Haag JC, Gustafsson Y, Lemon G et al. Experimental orthotopic transplantation of a tissue-engineered oesophagus in rats. Nature Communications. 5, 3562-3577 (2014)
- 2. Totonelli G, Maghsoudlou P, Georgiades F, Garriboli M, Kiron Koshy K, Mark Turmaine M et al. Detergent enzymatic treatment for the development of a natural acellular matrix for oesophageal regeneration. Pediatr Surg Int 29, 87–95 (2013)
- 3. G. Knottenbelt, A. Skinner, C. Seefelder. Tracheo-oesophageal fistula (TOF) and oesophageal atresia (OA). Best Pract Res Clin Anaesthesiol, 24, 387-401 (2010)
- 4. Lirussi Borgnon J, Sapin E. Anomalies congénitales de l'oesophage. EMC Pédiatrie Maladies infectieuses 2011:1-20 [Article 4-017-A-10] (2011)
- 5. Faivre J, Lepage C, Bouvier AM. Recent data on the epidemiology of esophageal cancer. Gastroenterol Clin Biol. 29, 534-539 (2005)
- 6. Faivre J, Drouillard A. Epidémiologie des cancers de l'œsophage. Cancer de l'œsophage. Monographie de l'Association Française de Chirurgie. Arnette (2013)
- 7. Chirica M, Champault A, Dray X, et al. Esophageal perforations. J Visc Surg 2010; 147: e117-28.
- 8. Lachaux A, Mas E, Breton A, Barange Ket al. Consensus in digestive endoscopy: treating caustic oesophagitidis. Acta Endosc. 41, 303-308 (2011)
- 9. Bonavinal L, Chirica M, Skrobic O, Kluger Y et al. Foregut caustic injuries: results of the world society of emergency surgery consensus conference. World Journal of Emergency Surgery 10, 44-54 (2015)
- 10. Collet D, Mariette C, Meunier B. Monographie de l'association Française de Chirurgie. Cancer de l'œsophage. Edition Arnette. (2013)
- 11. Mariette C, Piessen G, Triboulet J-P. Therapeutic strategies in oesophageal carcinoma: Role of surgery and other modalities. Lancet 8, 545–553 (2007)
- 12. Yildirim S, Koksal H, Celayir F, Erdem L, Oner M, Baykan A. Colonic interposition vs. gastric pull-up after total esophagectomy. J Gastrointest Surg. 8, 675–678 (2004)
- 13. Haute Autorité de Santé. Œsophagectomie avec oesophagogastroplastie, par thoracoscopie Rapport d'évaluation. © Haute Autorité de Santé (2010)

- 14. Hulscher JB, van Sandick JW, de Boer AG, et al. Extended transthoracic resection compared with limited transhiatal resection for adenocarcinoma of the esophagus. N Engl J Med 347, 1662–1669 (2002)
- 15. Sauvanet A, Mariette C, Thomas P, et al. Mortality and morbidity after resection for adenocarcinoma of the gastroesophageal junction: predictive factors. J Am Coll Surg 201, 253–262 (2005)
- 16. Swisher SG, Deford L, Merriman KW, et al. Effect of operative volume on morbidity, mortality, and hospital use after esophagectomy for cancer. J Thorac Cardiovasc Surg 119, 1126 1132 (2000)
- 17. Mariette C, Triboulet JP. Complications following esophagectomy: mechanism, detection, treatment and prevention. J chir. 142, 348-354 (2005)
- 18. Lerut TE, van Lanschot JJ. Chronic symptoms after subtotal or partial oesophagectomy: diagnosis and treatment. Best Pract Res Clin Gastroenterol.18, 901–915 (2004)
- 19. Hashimoto M, Imamura M, Shimada Y et al. Twenty-four hour monitoring of pH in the gastric tube replacing the resected esophagus. J Am Coll Surg. 180, 666–672 (1995)
- 20. Orringer MB, Marschall B, Lannettoni MD. Eliminating the cervical esophagogastric anastomotic leak with a side-to-side stapled anastomosis. J Thorac Cardiovasc Surg. 119, 277–288 (2000)
- 21. Tan JY, Chua CK, Leong KF, Chian KS, Leong WS, Tan LP. Esophageal tissue engineering: an in-depth review on scaffold design. Biotechnol Bioeng. 109, 1-15 (2011)
- 22. Meyer GW, Austin RM, Brady CE, Castell DO. Muscle anatomy of the human esophagus. J Clin Gastroenterol. 8, 131–134 (1986)
- 23. Kerr JB. Atlas of functional histology. London: Mosby. 402 p (1999)
- 24. Rice TW, Bronner MP. The esophageal wall. Thorac Surg Clin. 21, 299–305 (2011)
- 25. Schulze K, Ellerbroek S, Martin J. Matrix composition in opossum esophagus. Dig Dis Sci. 46, 968–975 (2001)
- 26. Sokolis DP, Stavropoulou EA, Dafalias YF. Biomechanical and histological characteristics of passive esophagus: Experimental investigation and comparative constitutive modeling. J Biomech. 42, 2654–2663 (2009)

- 27. Natali A.N, Carniel E.L, Gregersen H. Biomechanical behaviour of oesophageal tissues: Material and structural configuration, experimental data and constitutive analysis. Med Eng Phys. 31, 1056–1062 (2009)
- 28. Mourot J, Bastian D. Anatomie chirurgicale de l'œsophage. Encycl Med Chir (Elsevier-Masson. Paris). Techniques chirurgicales Appareil digestif. 40 170 (1987)
- 29. Liao D, Zhao J, Fan Y, Gregersen H. Two-layered quasi-3D finite element model of the oesophagus. Med Eng Phys. 26, 535–543 (2004)
- 30. Vanags I, Petersons A, Ose V, Ozolanta I, Kasyanov V, Laizans J, et al. Biomechanical properties of oesophagus wall under loading. J Biomech. 36, 1387–1390 (2003)
- 31. Egorov VI, Schastlivtsev IV, Prut EV, Baranov AO, Turusov RA. Mechanical properties of the human gastrointestinal tract. J Biomech. 35, 1417-1425 (2002)
- 32. Orvar KB, Gregersen H, Christensen J. Biomechanical Characteristics of the human esophagus Dig Dis Sci. 38, 197-205 (1993)
- 33. Yang J, Zhao J, Zeng Y, Gregersen H. Biomechanical properties of the rat oesophagus in experimental type-1 diabetes. Neurogastroenterol Motil. 16:195–203 (2004)
- 34. Keane TJ, Londono R, Carey RM, Carruthers CA, Reing JE, Dearth CL, et al. Reparation and characterization of a biologic scaffold from esophageal mucosa. Biomaterials. 34, 6729-6737 (2013)
- 35. Liao D, Fan Y, Zeng Y, Gregersen H. Stress distribution in the layered wall of the rat oesophagus. Med Eng Phys. 25, 731–738 (2003)
- 36. Fan Y, Gregersen H, Kassab GS. A two-layered mechanical model of the rat esophagus. Experiment and theory. BioMed Eng OnLine 3, 40 (2004)
- 37. Liao DH, Gregersen H, Fung YC. Determination of homeostatic elastic moduli in two layers of the esophagus. J Biomech Eng. 130, 011005 (2008)
- 38. Yang W, Fung TC, Chian KS, Chong CK. Directional, regional, and layer variations of mechanical properties of esophageal tissue and its interpretation using a structure-based constitutive model. J Biomech Eng. 128, 409–418 (2006)
- 39. Luc G, Durand M, Collet D, Guillemot F, et al. Esophageal tissue engineering. Expert Rev. Med. Devices 11, 225–241 (2014)
- 40. Kuppan P, Sethuraman S, Krishnan UM. Tissue engineering interventions for esophageal disorders Promises and challenges. Biotechnol Adv. 30, 1481–1492 (2012)

- 41. Ritchie AC, Chian KS, Ratner BD, Beckstead BL. Esophagus— a tissue engineering challenge. In: Fisher JP, Mikos AG, Bronzino JD, editors. Tissue engineering. USA: CRC Press; p. 1-24 (2006)
- 42. Marshall A, Barker T, Sage E, Hauch K, Ratner B. Pore size controls angiogenesis in subcutaneously implanted porous matrices. Proceedings of the 7thWorld Biomaterials Congress in Sydney, Australia; (2004)
- 43. Symonds C.J. The Treatment of Malignant Stricture of the Esophagus by Tubage or Oral Catheterization. Br Med J. 1, 870-873 (1887)
- 44. Guisez J. De l'intubation de Caoutchoutte Œsophagienne. Presse Med. 22, 85, (1914)
- 45. Souttarh S. Treatment of Carcinoma of the Esophagus Based on One-hundred Cases and Eighteen Post Mortem Reports. Br J Surg. 15:76 (1927)
- 46. Coyas A. Palliative intubation in Carcinoma of the Esophagus. Lancet 269, 647-649 (1955)
- 47. Kropff G. Esophageal intubation with plastic tube followed by radium therapy in treatment of cancer of esophagus. Mem Acad Chir. 80, 628-634 (1954).
- 48. Berman EF. The Experimental Replacement of Portions of the Esophagus by a Plastic Tube. Ann Surg. 135, 337-343 (1952)
- 49. Fryfogle JD, Cyrowski GA, Rothwell D, Rheault G, Clark T. Replacement of the middle third esophagus with a silicone rubber prosthesis. Dis chest 43, 464-475 (1963)
- 50. Lister J, Altman RP, Allison WA. Prosthetic substitution of thoracic esophagus in puppies. Ann Surg. 162, 812-824 (1965).
- 51. Fukushima M, Kako N, Chiba K, et al. Seven-year follow-up study after the replacement of the esophagus with an artificial esophagus in the dog. Surgery. 93, 70-77 (1983)
- 52. Zani A, Pierro A, Elvassore N, De Coppi P. Tissue engineering: an option for esophageal replacement? Seminars in Pediatric Surgery. 18, 57-62 (2009)
- 53. Takimoto Y, Okumura N, Nakamura T, Natsume T, Shimizu Y. Long-term follow-up of the experimental replacement of the esophagus with a collagen–silicone composite tube. ASAIO J. 39, 736–9 (1993)
- 54. Takimoto Y, Teramachi M, Okumura N, Nakamura T, Shimizu Y. Relationship between stenting time and regeneration of neoesophageal submucosal tissue. ASAIO J. 40, 793–797 (1994)

- 55. Takimoto Y, Nakamura T, Teramachi M, Kiyotani T, Shimizu Y. Replacement of long segments of the esophagus with a collagen–silicone composite tube. ASAIO J. 41, 605–608 (1995)
- 56. Takimoto Y, Nakamura T, Yamamoto Y, Kiyotani T, Teramachi M, Shimizu Y. The experimental replacement of a cervical esophageal segment with an artificial prosthesis with the use of collagen matrix and a silicone stent. J Thorac Cardiovasc Surg. 116, 98-106 (1998)
- 57. Natsume T, Ike O, Okada T, Takimoto N, Shimizu Y, Ikada Y, et al. Experimental studies of a hybrid artificial esophagus combined with autologous mucosal cells. ASAIO Trans. 36, 435–437 (1990)
- 58. Natsume T, Ike O, Okada T, Takimoto N, Shimizu Y, Ikada Y. Porous collagen sponge for esophageal replacement. J Biomed Mater Res. 27, 867–875 (1993)
- 59. Liang J, Zhou X, Zheng Z, Liang X. Long-term form and function of Neoesophagus after experimental replacement of thoracic esophagus with nitinol composite artificial esophagus. ASAIO J. 56, 232–234 (2010)
- 60. Liang J, Zhou X, Zheng Z, Liang X. Polyester connecting ring improves outcome in nitinol composite artificial esophagus. ASAIO J. 55, 514–518 (2009)
- 61. Zhu Y, Ong WF. Epithelium regeneration on collagen (IV) grafted polycaprolactone for esophageal tissue engineering. Mater Sci Eng C. 29, 1046–1050 (2009)
- 62. Zhu Y, Leong MF, Ong WF, Chan-Park MB, Chian KS. Esophageal epithelium regeneration on fibronectin grafted poly(L-lactide-co-caprolactone) (PLLC) nanofiber scaffold. Biomaterials. 28, 861–868 (2007)
- 63. Zhu Y, Chan-Park MB. Density quantification of collagen grafted on biodegradable polyester: its application to esophageal smooth muscle cell. Anal Biochem. 363, 119–127 (2007)
- 64. Zhu Y, Chian KS, Chan-Park MB, Mhaisalkar PS, Ratner BD. Protein bonding on biodegradable poly(L-lactide-co-caprolactone) membrane for esophageal tissue engineering. Biomaterials. 27, 68–78 (2006)
- 65. Beckstead BL, Pan S, Bhrany AD, Bratt-Leal AM, Ratner BD, Giachelli CM. Esophageal epithelial cell interaction with synthetic and natural scaffolds for tissue engineering. Biomaterials. 26, 6217–6228 (2005)
- 66. Grikscheit T, Ochoa ER, Srinivasan A, Gaissert H, Vacanti JP. Tissue-engineered esophagus: experimental substitution by onlay patch or interposition. J Thorac Cardiovasc Surg. 126, 537–544 (2003)

- 67. Nakase Y, Nakamura T, Kin S, Nakashima S, Yoshikawa T, Kuriu Y, et al. Intrathoracic esophageal replacement by in situ tissue-engineered esophagus. J Thorac Cardiovasc Surg. 136, 850–859 (2008)
- 68. Sato M, Ando N, Ozawa S, Miki H, Kitajima M. An artificial esophagus consisting of cultured human esophageal epithelial cells, polyglycolic acid mesh, and collagen. ASAIO J 40, 389–392 (1994)
- 69. Shinhar D, Finaly R, Niska A, Mares AJ. The use of collagen-coated vicryl mesh for reconstruction of the canine cervical esophagus. Pediatr Surg Int. 13, 84–87 (1998)
- 70. Miki H, Ando N, Ozawa S, Sato M, Hayashi K, Kitajima M. An artificial esophagus constructed of cultured human esophageal epithelial cells, fibroblasts, polyglycolic acid mesh, and collagen. ASAIO J 45, 502–508 (1999)
- 71. Komuro H, Nakamura T, Kaneko M, Nakanishi Y, Shimizu Y. Application of collagen sponge scaffold to muscular defects of the esophagus: an experimental study in piglets. J Pediatr Surg. 37, 1409-1413 (2002)
- 72. Jansen PL, Klinge U, Anurov M, Titkova S, Jansen M, Mertens PR. Surgical mesh as a scaffold for tissue regeneration in the esophagus. Eur Surg Res 36, 104–111 (2004)
- 73. Zhu Y, Ong WF, Chan W, Li Y, Liu Y. Construct of asymmetrical scaffold and primary cells for tissue engineered esophagus. Mater Sci Eng C. 30, 400–406 (2009)
- 74. Bhrany AD, Beckstead BL, Lang TC, Farwell DG, Giachelli CM, Ratner BD. Development of an esophagus acellular matrix tissue scaffold. Tissue Eng. 12, 319–330 (2006)
- 75. Bhrany AD, Lien CJ, Beckstead BL, Futran ND, Muni NH, Giachelli CM, et al. Crosslinking of an oesophagus acellular matrix tissue scaffold. J Tissue Eng Regen Med. 2, 365–372 (2008)
- 76. Crapo P.M, Gilbert T.W, Badylak S.F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. Biomaterials. 32, 3233-3243 (2011)
- 77. Syed O, Walters NJ, Day RM, Kim HW, Knowles JC. Evaluation of decellularization protocols for production of tubular small intestine submucosa scaffolds for use in oesophageal tissue engineering. Acta Biomater. 10, 5043-5054. (2014)
- 78. Ozeki M, Narita Y, Kagami H, Ohmiya N, Itoh A, Hirooka Y, et al. Evaluation of decellularized esophagus as a scaffold for cultured esophageal epithelial cells. J Biomed Mater Res A. 79, 771–778 (2006)
- 79. Hawkins JA, Hillman ND, Lambert LM, Jones J, Di Russo GB, Profaizer T, et al. Immunogenicity of decellularized cryopreserved allografts in pediatric cardiac

- surgery: comparison with standard cryopreserved allografts. J Thorac Cardiovasc Surg. 126, 247–52 (2003)
- 80. Langer R, Tirrell D.A. Designing materials for biology and medicine. Nature. 428, 487 492 (2004)
- 81. Isch JA, Engum SA, Ruble CA, Davis MM, Grosfeld JL. Patch esophagoplasty using alloderm as a tissue scaffold. J Pediatr Surg. 36, 266–268 (2001)
- 82. Bhrany AD, Beckstead BL, Lang TC, Farwell DG, Giachelli CM, Ratner BD. Development of an esophagus acellular matrix tissue scaffold. Tissue Eng. 12, 319-330 (2006)
- 83. Bhrany AD, Lien CJ, Beckstead BL, Futran ND, Muni NH, Giachelli CM, et al. Crosslinking of an oesophagus acellular matrix tissue scaffold. J Tissue Eng Regen Med. 2, 365–372 (2008)
- 84. Marzaro M, Vigolo S, Oselladore B, Conconi MT, Ribatti D, Giuliani S, et al. In vitro and in vivo proposal of an artificial esophagus. J Biomed Mater Res. 77, 795–801 (2006)
- 85. Urita Y, Komuro H, Chen G, Shinya M, Kaneko S, Kaneko M, et al. Regeneration of the esophagus using gastric acellular matrix: an experimental study in a rat model. Pediatr Surg Int. 23, 21–26 (2007)
- 86. Badylak SF, Vorp DA, Spievack AR, Simmons-Byrd A, Hanke J, Freytes DO, et al. Esophageal reconstruction with ECM and muscle tissue in a dog model. J Surg Res. 128, 87–97 (2005)
- 87. Lopes MF, Cabrita A, Ilharco J, Pessa P, Patricio J. Grafts of porcine intestinal submucosa for repair of cervical and abdominal esophageal defects in the rat. J Invest Surg. 19, 105–111 (2006)
- 88. Wei RQ, Tan B, Tan MY, Luo JC, Deng L, Chen XH, et al. Grafts of porcine small intestinal submucosa with cultured autologous oral mucosal epithelial cells for esophageal repair in a canine model. Exp Biol Med. 234, 453–461 (2009)
- 89. Macchiarini P, Mazmanian GM, de Montpreville V, Dulmet E, Fattal M, Lenot B, et al. Experimental tracheal and tracheoesophageal allotransplantation. J Thorac Cardiovasc Surg. 110, 1037–1046 (1995)
- 90. Badylak SF, Meurling S, Chen M, Spievack A, Simmons-Byrd A, Lafayette W. Resorbable bioscaffold for esophageal repair in a dog model. J Pediatr Surg. 35, 1097–1103 (2000)

- 91. Kajitani M, Wadia Y, Hinds MT, Teach J, Swartz KR, Gregory KW. Successful repair of esophageal injury using an elastin based biomaterial patch. ASAIO J. 47, 342–345 (2001)
- 92. Gaujoux S, Le Balleur Y, Bruneval P, Larghero J, Lecourt S, Domet T, et al. Esophageal replacement by allogenic aorta in a porcine model. Surgery. 148, 39–47 (2010)
- 93. Tan B, Wei RQ, Tan MY, et al. Tissue engineered esophagus by mesenchymal stem cell seeding for esophageal repair in a canine model. J Surg Res. 182, 40-48 (2013)
- 94. Laschke MW, Menger MD. Prevascularization in tissue engineering: Current concepts and future directions. Biotech Adv. 34, 112 121 (2016)
- 95. Baldwin J, Antille M, Bonda U, De-Juan-Pardo EM, et al. In-vitro pre-vascularization of tissue-engineered constructs. A co-culture perspective. Vasc. Cell. 6, 16 29 (2014)
- 96. Kokemueller H, Spalthoff S, Nolff M, Tavassol F, et al. Prefabrication of vascularized bioartificial bone grafts in vivo for segmental mandibular reconstruction: experimental pilot study in sheep and first clinical application. Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 39, 379 387 (2010)
- 97. Litbarg NO, Gudehithlu KP, Sethupathi P, Arruda JA, Dunea G, et al. Activated omentum becomes rich in factors that promote healing and tissue regeneration. Cell Tissue Res. 328, 487–497 (2007)
- 98. Morison R. Remarks on some functions of the omentum. Br Med J. 1, 76–78 (1906)
- 99. Liebermann-Meffert D (2000) The greater omentum. Anatomy, embryology, and surgical applications. Surg Clin North Am. 80, 275–293 (2000)
- 100. Shah S, Lowery E, Braun RK, Martin A, Huang N, Medina M, et al. Cellular basis of tissue regeneration by omentum. PLoS one. 7, e38368 (2012)
- 101. Moreschi AH, Macedo Neto AV, Barbosa GV, Saueressig MG. Aggressive treatment using muscle flaps or omentopexy in infections of the sternum and anterior mediastinum following sternotomy. J Bras Pneumol. 34, 654–660 (2008)
- 102. Vatansev C, Ustun ME, Ogun CO, Tastekin G, Karabacakoglu A, et al. Omental transposition decreases ischemic brain damage examined in a new ischemia model. Eur Surg Res. 35, 388–394 (2003)
- 103. Maloney CT Jr., Wages D, Upton J, Lee WP. Free omental tissue transfer for extremity coverage and revascularization. Plast Reconstr Surg. 111, 1899–1904 (2003)

- 104. Zhang YG, Huang JH, Hu XY, Sheng QS, et al. Omentum-wrapped scaffold with longitudinally oriented micro-channels promotes axonal regeneration and motor functional recovery in rats. PLoS one. 6, e29184 (2011)
- 105. Rogers SA, Chen F, Talcott M, Hammerman MR. Islet cell engraftment and control of diabetes in rats after transplantation of pig pancreatic anlagen. Am J Physiol Endocrinol Metab. 286, 502–509 (2004)
- 106. Lee H, Cusick RA, Utsunomiya H, Ma PX, Langer R, et al. Effect of implantation site on hepatocytes heterotopically transplanted on biodegradable polymer scaffolds. Tissue Eng. 9, 1227–1232 (2003)
- 107. Hammerman MR. Renal organogenesis from transplanted metanephric primordia. J Am Soc Nephrol. 15, 1126–1132 (2004)
- 108. Shevach M, Soffer-Tsur N, Fleischer S, Shapira A, et al. Fabrication of omentum-based matrix for engineering vascularized cardiac tissues. Biofabrication 6: 024101 (2004)
- 109. Kim JH, Kim J, Kong WH, Seo SW. Factors affecting tissue culture and transplantation using omentum. ASAIO J. 56, 349-55 (2010)
- 110. Baumert H, Simon P, Hekmati M, Fromont G, et al. Development of a seeded scaffold in the great omentum: feasibility of an in vivo bioreactor for bladder tissue engineering. Eur Urol. 52, 884-90 (2007)
- 111. Grikscheit TC, Ochoa ER, Ramsanahie A, Alsberg E, et al. Tissue-engineered large intestine resembles native colon with appropriate in vitro physiology and architecture. Ann Surg. 238, 35–41 (2003)
- 112. Collins D, Hogan AM, O'Shea D, Winter DC. The omentum: anatomical, metabolic, and surgical aspects. J Gastrointest Surg 13, 1138–1146 (2009)
- 113. Litbarg NO, Gudehithlu KP, Sethupathi P, Arruda JA, et al. Activated omentum becomes rich in factors that promote healing and tissue regeneration. Cell Tissue Res 328, 487–497 (2007)
- 114. Singh AK, Patel J, Litbarg NO, Gudehithlu KP, Sethupathi P, et al. Stromal cells cultured from omentum express pluripotent markers, produce high amounts of VEGF, and engraft to injured sites. Cell Tissue Res. 332, 81–88 (2008)
- 115. Peranzoni E, Zilio S, Marigo I, Dolcetti L, et al. (2010) Myeloidderived suppressor cell heterogeneity and subset definition. Curr Opin Immunol. 22, 238–244 (2010)

- 116. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. Nat Rev Immunol. 9, 162–174 (2009)
- 117. Mazzoni A, Bronte V, Visintin A, Spitzer JH, Apolloni E, et al. Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism. J Immunol. 168, 689–695 (2002)
- 118. Peister A, Mellad JA, Larson BL, Hall BM, Gibson LF, et al. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. Blood. 103, 1662–1668 (2004)
- 119. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng. 7, 211–228 (2001)
- 120. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. Circulation 105, 93–98 (2002)
- 121. Wang G, Bunnell BA, Painter RG, Quiniones BC, Tom S, et al. Adult stem cells from bone marrow stroma differentiate into airway epithelial cells: potential therapy for cystic fibrosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 102, 186–191 (2005)
- 122. Spees JL, Olson SD, Ylostalo J, Lynch PJ, Smith J, et al. Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. Proc Natl Acad Sci U S A. 100, 2397–2402 (2003)
- 123. Sato Y, Araki H, Kato J, Nakamura K, Kawano Y, et al. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. Blood. 106, 756–763 (2005)
- 124. Munoz JR, Stoutenger BR, Robinson AP, Spees JL, et al. Human stem/progenitor cells from bone marrow promote neurogenesis of endogenous neural stem cells in the hippocampus of mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 102, 18171–18176 (2005)
- 125. Moriscot C, de Fraipont F, Richard MJ, Marchand M, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells can express insulin and key transcription factors of the endocrine pancreas developmental pathway upon genetic and/or microenvironmental manipulation in vitro. Stem Cells. 23, 594–603 (2005)
- 126. Salem HK, Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. Stem Cells. 28, 585–596 (2010)

- 127. Hocking AM, Gibran NS. Mesenchymal stem cells: paracrine signalling and differentiation during cutaneous wound repair. Exp Cell Res. 316, 2213–2219 (2010)
- 128. Kin T, Korbutt GS, Rajotte RV. Survival of islets in omental pouch. Am J Tranplant. 3, 281–285 (2003)
- 129. Lee H, Cusick RA, Utsunomiya H, Ma PX, et al. Effect of implantation site on hepatocytes heterotopically transplanted on biodegradable polymer scaffolds. Tissue Eng. 9, 1227–1232 (2003)
- 130. Hammerman MR. Renal organogenesis from transplanted metanephric primordia. J Am Soc Nephrol. 15, 1126–1132 (2004)
- 131. Takashi Y, Fukui A, Ohashi T, Miyazaki Y, et al. Xenobiotic kidney organogenesis from human mesenchymal stem cells using a growing rodent embryo. J Am Soc Nephrol 17, 1026–1034 (2006)
- 132. Yamamoto Y, Nakamura T, Shimizu Y, Matsumoto K, et al. Intrathoracic esophageal replacement with a collagen sponge--silicone double layer tube: evaluation of omental-pedicle wrapping and prolonged placement of an inner stent. ASAIO J. 46, 734-739 (2000)
- 133. Poghosyan T, Catry J, Luong-Nguyen M, Bruneval P, et al. Esophageal tissue engineering: Current status and perspectives. J Visc Surg. 153, 21 29 (2016)
- 134. Poghosyan T, Sfeir R, Michaud L, Bruneval P, et al. Circumferential replacement using a tube-shaped tissue-engineered substitute. An experimental study in minipigs. Surgery. 158, 266 277 (2015)
- 135. Dai R, Wang Z, Samanipour R, Koo K, et al. Adipose-Derived stem Cells for tissue engineering and regenerative medicine applications. Stem Cells Int. DOI 1155/2016/6737345 (2016)
- 136. Baer PC, Geiger H. Adipose-Derived stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. Stem Cells Int. ID 812693 (2012)
- Wankhade UD, Shen M, Kolhe R, Fulzele S. Advances in Adipose-Derived Stem Cells isolation, characterization, and application in regenerative tissue engineering. Stem Cells Int. ID 3206807 (2016)
- 138. Zuk P.A, Zhu M, Mizuno Het al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Engineering. 7, 211–228 (2001)
- de Villiers JA, Houreld N, Abrahamse H. Adipose Derived Stem Cells and Smooth Muscle Cells: Implications for Regenerative Medicine Stem Cell Rev and Rep. 5, 256–265 (2009)

- 140. Song JJ1, Guyette JP, Gilpin SE, Gonzalez G, Vacanti JP, Ott HC. Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney. Nat Med. 19, 646 651 (2013)
- 141. Ott HC1, Clippinger B, Conrad C, Schuetz C, Pomerantseva I, Ikonomou L, et al. Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. Nat Med. 16, 927 933 (2010)
- 142. Vorotnikova E, McIntosh D, Dewilde A, Zhang J, Reing JE, Zhang L, et al. Extracellular matrix-derived products modulate endothelial and progenitor cell migration and proliferation in vitro and stimulate regenerative healing in vivo. Matrix Biol. 29, 690-700 (2010)
- 143. Bornstein P, Sage EH. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. Curr Opin Cell Biol. 14, 608-616 (2002)
- 144. Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. Extracellular matrix as a biological scaffold material: structure and function. Acta Biomater. 5, 1-13 (2009)
- 145. Allen RA, Seltz LM, Jiang H, Kasick RT, Sellaro TL, Badylak SF, et al. Adrenal extracellular matrix scaffolds support adrenocortical cell proliferation and function in vitro. Tissue Eng Part A. 16, 3363-3374 (2010)
- 146. Cortiella J, Niles J, Cantu A, Brettler A, Pham A, Vargas G, et al. Influence of acellular natural lung matrix on murine embryonic stem cell differentiation and tissue formation. Tissue Eng Part A. 16, 2565-2580 (2010)
- 147. Sellaro TL, Ranade A, Faulk DM, McCabe GP, Dorko K, Badylak SF, et al. Maintenance of human hepatocyte function in vitro by liver-derived extracellular matrix gels. Tissue Eng Part A. 16, 1075-1082 (2010)
- 148. Cheng NC, Estes BT, Awad HA, Guilak F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells by a porous scaffold derived from native articular cartilage extracellular matrix. Tissue Eng Part A. 15, 231-241 (2009)
- 149. Ross EA, Williams MJ, Hamazaki T, Terada N, Clapp WL, Adin C, et al. Embryonic stem cells proliferate and differentiate when seeded into kidney scaffolds. J Am Soc Nephrol. 20, 2338-2347 (2009)
- 150. Stern MM, Myers RL, Hammam N, Stern KA, Eberli D, Kritchevsky SB, et al. The influence of extracellular matrix derived from skeletal muscle tissue on the proliferation and differentiation of myogenic progenitor cells ex vivo. Biomaterials. 30, 2393-2399 (2009)

- 151. Xu CC, Chan RW, Weinberger DG, Efune G, Pawlowski KS. A bovine acellular scaffold for vocal fold reconstruction in a rat model. J Biomed Mater Res A. 92, 18-32.
- 152. Parekh A, Mantle B, Banks J, Swarts JD, Badylak SF, Dohar JE, et al. Repair of the tympanic membrane with urinary bladder matrix. Laryngoscope. 119, 1206-1213 (2009)
- 153. Valentin JE, Turner NJ, Gilbert TW, Badylak SF. Functional skeletal muscle formation with a biologic scaffold. Biomaterials. 31, 7475-7484 (2010)
- 154. Keane TJ, Swinehart IT, Badylak SF. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. Methods. 84, 25-34 (2015)
- Nonaka PN1, Campillo N, Uriarte JJ, Garreta E, Melo E, de Oliveira LV, Navajas D, Farré R. Effects of freezing/thawing on the mechanical properties of decellularized lungs. J Biomed Mater Res A. 102, 413-419 (2013)
- K. Sawada, D. Terada, T. Yamaoka, S. Kitamura, T. Fujisato. Cell removal with supercritical carbon dioxide for acellular artificial tissue. J. Chem. Technol. Biotechnol. 83, 943–949 (2008)
- 157. Grauss R.W, Hazekamp M.G, van Vliet S, Gittenberger-de Groot A.C, DeRuiter M.C. Decellularization of rat aortic valve allografts reduces leaflet destruction and extracellular matrix remodeling. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 126, 2003–2010 (2003)
- 158. Liao J, Joyce E.M, Sacks M.S. Effects of decellularization on the mechanical and structural properties of the porcine aortic valve leaflet. Biomaterials 29, 1065–1074 (2008)
- 159. Vavken P, Joshi S, Murray M.M. TRITON-X is most effective among three decellularization agents for ACL tissue engineering. J. Orthop. Res. 27, 1612–1618 (2009)
- 160. Mendoza-Novelo B, Avila E.E, Cauich-Rodríguez J.V, Jorge-Herrero E, Rojo F.J, Guinea G.V, et al. Decellularization of pericardial tissue and its impact on tensile viscoelasticity and glycosaminoglycan content. Acta Biomater. 7, 1241–1248 (2011)
- 161. Keane T.J, Londono R, Turner N.J, Badylak S.F. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. Biomaterials. 33, 1771–1781 (2012)

- 162. Meezan, E., Hjelle, J. T. and Brendel, K. A simple, versatile, nondisruptive method for the isolation of morphologically and chemically pure basement membranes from several tissues. Life Sci. 17, 1721-1732 (1975)
- 163. Yoganarasimha S, Trahan W.R, Best A.M, Bowlin G.L, Kitten T.O, Moon P.C et al. Peracetic acid: a practical agent for sterilizing heat-labile polymeric tissue-engineering scaffolds. Tissue Eng. C Meth. 20, 714–723 (2014)
- 164. Rosario D.J, Reilly G.C, Ali Salah E, Glover M, Bullock A.J, Macneil S. Decellularization and sterilization of porcine urinary bladder matrix for tissue engineering in the lower urinary tract. Regen. Med. 3, 145–156 (2008)
- 165. Donati I, Benincasa M, Foulc M-P, Turco P, Toppazzini M, Solinas D, et al. Terminal sterilization of BisGMA-TEGDMA thermoset materials and their bioactive surfaces by supercritical CO2. Biomacromolecules. 13, 1152–1160 (2012)
- 166. Gouk SS, Lim TM, Teoh SH, Sun WQ. Alterations of human acellular tissue matrix by gamma irradiation: histology, biomechanical property, stability, in vitro cell repopulation, and remodeling. J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. 84, 205–217 (2008)
- 167. Uriarte JJ, Nonaka PN, CampilloN, Palma RK, Melo E, de Oliveira LVF, et al. Mechanical properties of acellular mouse lungs after sterilization by gamma irradiation. J. Mech. Behav. Biomed. Mater. 40, 168–177 (2014)
- 168. Sun WQ, Leung P. Calorimetric study of extracellular tissue matrix degradation and instability after gamma irradiation. Acta Biomater. 4, 817–826 (2008)
- 169. Bailey AJ, Tromans WJ. Effects of ionizing radiation on the ultrastructure of collagen fibrils. Radiat. Res. 23, 145–155 (1964)
- 170. Moreau MF, Gallois Y, Baslé MF, Chappard D. Gamma irradiation of human bone allografts alters medullary lipids and releases toxic compounds for osteoblast-like cells. Biomaterials. 21, 369–376 (2000)
- 171. Matuska AM, McFetridge PS. The effect of terminal sterilization on structural and biophysical properties of a decellularized collagen-based scaffold; implications for stem cell adhesion. J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. 103, 397-406 (2014)
- 172. Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. Nature. 4, 104-107 (2010)

- 173. Vyavahare N1, Ogle M, Schoen FJ, Zand R, Gloeckner DC, Sacks M, Levy RJ Mechanisms of bioprosthetic heart valve failure: fatigue causes collagen denaturation and glycosaminoglycan loss. J Biomed Mater Res. 46, 44-50 (1999)
- 174. Gilbert TW, Freund JM, Badylak SF. Quantification of DNA in biologic scaffold materials. J Surg Res. 152, 135–139 (2009)
- 175. Asalfy MAM, El-Gendy SAA. Gastroesophageal junction of Anatolian sherperd dog; a study by topographic anatomy, scanning electron and light microscopy. Vet Res Commun 36, 63-69 (2012).
- 176. Gregersen H, Lu X, Zhao J. Physiological growth is associated with esophageal morphometric and biomechanical changes in rat. Neurogastroenterol Motil. 16, 403-412 (2004).
- 177. Nzalak JO, Onyeanusi BI, Samuel AO, Voh AA, Voh I. Gross anatomical, histological and histochemical studies of the esophagus of the african giant rat. J Vet Anat. 3, 55-64 (2010).
- 178. J.M. Yu, E.S. Jun, Y.C. Bae, J.S. JungMesenchymal stem cells derived from human adipose tissues favor tumor cell growth in vivo. Stem Cells Dev, 17, 463–473 (2008)
- 179. Tan SS, Loh W. The utility of adipose-derived stem cells and stromal vascular fraction for oncologic soft tissue reconstruction: Is it safe? A matter for debate. Surgeon. doi: 10.1016/j.surge.2016.09.010. (2016)
- 180. Doi K, Tanaka S, Iida H, Eto H, Kato H, Aoi N, et al. Stromal vascular fraction isolated from lipo-aspirates using an automated processing system: bench and bed analysis. J Tissue Eng Regen Med, 7, 864–870 (2013)
- 181. Li H, L. Zimmerlin L, Marra KG, Donnenberg VS, Donnenberg AD, Rubin JP. Adipogenic potential of adipose stem cell subpopulations. Plastic Reconstr Surg, 128, 663–672 (2011)
- 182. Stillaer F, Findlay M, Palmer J, Idrizi R, Cheang S, Messina A, et al. Host rather than graft origin of Matrigel-induced adipose tissue in the murine tissue-engineering chamber. Tissue Eng, 13, 2291–2300 (2007)
- 183. Hsiao ST, Asgari A, Lokmic Z, Sinclair R, Dusting GJ, Lim SY, et al. Comparative analysis of paracrine factor expression in human adult mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose, and dermal tissue Stem cells Dev, 21 2189–2203 (2012)

- 184. Yanez R, Oviedo A, Aldea M, Bueren JA, Lamana ML. Prostaglandin E2 plays a key role in the immunosuppressive properties of adipose and bone marrow tissuederived mesenchymal stromal cells. Exp Cell Res, 316, 3109–3123 (2010)
- 185. Kølle SF, Fischer-Nielsen A, Mathiasen AB, Elberg JJ, Oliveri RS, Glovinski PV et al. Enrichment of autologous fat grafts with ex-vivo expanded adipose tissuederived stem cells for graft survival: a randomized placebo-controlled trial. Lancet. 382, 1113–1120 (2013)
- 186. Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual I et al. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. Dis. Colon Rectum. 52, 79–86 (2009)
- 187. T. Kirkegaard and M. Jäättelä. Lysosomal involvement in cell death and cancer. Biochim. Biophys. Acta BBA Mol. Cell Res. 4, 746–754 (2009)
- 188. L'Heureux N, Germain L, Labbe, R, Auger F A. In vitro construction of a human blood vessel from cultured vascular cells: a morphologic study. J. Vasc. Surg. 17, 499–509 (1993)
- 189. L'Heureux N, Paquet S, Labbe R, Germain L, and Auger FA. A completely biological tissue-engineered human blood vessel. FASEB J. 12, 47–56 (1998)
- 190. Konig G, McAllister T, Dusserre N, Garrido SA, Iyican C, Marini A, et al. Mechanical properties of completely autologous human tissue engineered blood vessels compared to human saphenous vein and mammary artery. Biomaterials 30, 1542–1550 (2009)
- 191. Laflamme K, Roberge CJ, Pouliot S, D'Orléans-Juste P, Auger FA, Germain L. Tissue-engineered human vascular media produced in vitro by the self-assembly approach present functional properties similar to those of their native blood vessels. Tissue Eng. 12, 2275-2281 (2006)
- 192. Larouche D, Paquet C, Fradette J, Carrier P, Auger F A, et al. Regeneration of skin and cornea by tissue engineering. Methods Mol Biol 482, 233–56 (2009)
- 193. Magnan M, Levesque P, Gauvin R, Dube J, Barrieras D, El-Hakim A, et al. Tissue engineering of a genitourinary tubular tissue graft resistant to suturing and high internal pressures. Tissue Eng Part A 15, 197–202 (2009)
- 194. Kirkegaard T, Jäättelä M. Lysosomal involvement in cell death and cancer. Biochim. Biophys. Acta BBA Mol. Cell Res. 4, 746–754 (2009)
- 195. Agmon G, Christman KL. Controlling stem cell behavior with decellularized extracellular matrix scaffolds. Curr Opin Solid State Mater Sci. 20, 193-201 (2016)

- 196. Hoganson DM, Meppelink AM, Hinkel CJ, Goldman SM, Liu XH, Nunley RM, et al. Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells on decellularized extracellular matrix materials. J Biomed Mater Res A. 2875-2883 (2014)
- 197. Fu RH, Wang YC, Liu SP, Shih TR, Lin HL, Chen YM, et al. Decellularization and recellularization technologies in tissue engineering. Cell Transplant. 23, 621-30 (2014)
- 198. -Cano R, Vranckx JJ, Lasso JM, Calabrese C, Merck B, Milstein AM, et al. Prospective trial of adipose-derived regenerative cell (ADRC)-enriched fat grafting for partial mastectomy defects: the RESTORE-2 trial. Eur J Surg Oncol. 38, 382-389 (2012)
- 199. Yu JM, Jun ES, Bae YC, Jung JS. Mesenchymal stem cells derived from human adipose tissues favor tumor cell growth in vivo. Stem Cells Dev. 17, 463-473 (2008)
- 200. Ko HCH, Milthorpe BK, McFarland CD. Engineering thick tissues--the vascularization problem. Eur Cell Mater. 14:1-18 (2007)
- 201. Griffith LG, Naughton G. Tissue Engineering--Current Challenges and Expanding Opportunities. Science. 295, 1009-1014 (2002)
- 202. Kim JH, Kim J, Kong WH, Seo SW. Factors affecting tissue culture and transplantation using omentum. ASAIO J. 56, 349-55 (2010)
- 203. Findlay JM, Gillies RS, Millo J, Sgromo B, Marshall RE, Maynard ND. Enhanced recovery for esophagectomy: a systematic review and evidence-based guidelines. Ann Surg. 259, 413-31 (2014)
- 204. Stowers MD, Lemanu DP, Hill AG. Health economics in Enhanced Recovery After Surgery programs. Can J Anaesth. 62, 219-30 (2015)

Index des tables et illustrations

Figure 1: Topographie générale de l'œsophage

<u>Figure 2</u>: Coupe histologique du tiers moyen d'un œsophage porcin, coloration H.E.S. L'hémalun colore en noir-violet les noyaux, l'érythrosine colore en rouge-rosé le cytoplasme et le safran colore les fibres conjonctives en jaune-orangé

<u>Figure 3:</u> Principe général de l'ingénierie tissulaire : Après prélèvement, les cellules autologues sont amplifiées et ensemencées sur un matériau naturel ou synthétique en présence de facteurs de croissance. Une phase de maturation in vitro ou in vivo peut être utilisée avant l'implantation du produit d'ingénierie tissulaire

Figure 4 : Représentation schématique de l'isolation des ADSCs et de leurs applications

<u>Figure 5</u>: Vue opératoire inversée (tête de l'animal en bas) d'un prélèvement œsophagien par sternotomie

<u>Figure 6</u>: Banc Bose Biodynamic Test® utilisé pour la décellularisation. Les flèches représentent le sens d'écoulement des réactifs

Figure 7: irradiateur Gammacell 3000 Elan MDS, Nordion

Figure 8: Test en traction longitudinale sur banc d'essai Frame 2 MTS 858

<u>Figure 9</u>: Test d'éclatement sur banc BOSE Biodynamic et mesure des variations de diamètres par scanner micrométrique laser LSM 5035

Figure 10 : Lestage des feuillets avant leur application sur l'œsophage décellularisé

<u>Figure 11</u>: Schéma expérimental évaluant le temps de maturation dans un bioréacteur sur un modèle murin d'une matrice biologique en fonction de sa cellularisation préalable.

Figure 12: Schéma expérimental évaluant la faisabilité d'une substitution œsophagienne chez le porc domestique par un œsophage hétérotopique préalablement décellularisé. Seuls les MD du groupe 1 étaient implantées dans l'épiploon 4 semaines avant la substitution œsophagienne

Figure 13 : Aspect macroscopique de l'échantillon lors de la décullarisation

<u>Figure 14</u>: Coupes histologiques après coloration H.E.S d'un œsophage porcin avant et après sa décellularisation

<u>Figure 15</u>: Coupe histologique après coloration au trichrome de Masson d'un œsophage porcin avant et après sa décellularisation

<u>Figure 16</u>: Graphique d'illustration de la quantification de l'ADN résiduel exprimée en ng/mg de tissu lyophilisé d'un œsophage décellularisé

<u>Figure 17</u>: Migrations sur gel d'agarose de solutions d'extraction de l'ADN résiduel sur un œsophage natif d'origine porcine

<u>Figure 18</u>: Migrations des solutions d'extraction de l'ADN résiduel issue d'œsophage décellularisé (pistes 43 - 45) et d'œsophage natif (pistes 46 - 48)

<u>Figure 19</u>: Coloration histologique au bleu Alcian d'un œsophage natif et décellularisé. La présence de glycosaminoglycanes est plus importante dans l'œsophage natif

<u>Figure 20</u>: Graphique d'illustration de la quantité mesurée de glycosaminoglycanes résiduels dans des échantillons d'œsophages porcins avant et après décellularisation

Figure 21: Analyse immunohistochimique de la laminine dans un œsophage porcin natif

<u>Figure 22</u>: Analyse immunohistochimique de la laminine dans un œsophage porcin décellularisé

Figure 23 : Analyse immunohistochimique de l'élastine dans un œsophage porcin natif

<u>Figure 24</u> : Analyse immunohistochimique de l'élastine dans un œsophage porcin décellularisé

Figure 25 : Analyse immunohistochimique de la fibronectine dans un œsophage porcin natif

<u>Figure 26</u> : Analyse immunohistochimique de la fibronectine dans un œsophage porcin décellularisé

Figure 27 : Caractérisation mécanique d'œsophages porcins avant et après décellularisation

Figure 28: Test d'éclatement d'œsophage porcin réalisé sur banc Bose Biodynamic Test®

<u>Figure 29</u>: Illustrations graphiques des tests d'éclatement réalisés sur 7 œsophages natifs porcins et 7 œsophages décellularisés porcins

<u>Figure 30</u>: Analyse histologique après coloration en H.E.S d'un fragment d'œsophage décellularisé implanté 14 jours dans la paroi musculaire d'un rat

<u>Figure 31</u>: Analyse histologique après coloration en H.E.S d'un fragment d'œsophage natif implanté 14 jours dans la paroi musculaire d'un rat

<u>Figure 32</u>: Analyse histologique après coloration en H.E.S d'un fragment d'œsophage décellularisé implanté 35 jours dans la paroi musculaire d'un rat

<u>Figure 33</u>: Analyse histologique après coloration en H.E.S d'un fragment d'œsophage natif implanté 35 jours dans la paroi musculaire d'un rat

<u>Figure 34</u>: Cytotoxicité évaluée par le test au Rouge Neutre sur deux séries d'œsophages décellularisés selon la solution du dernier rinçage

<u>Figure 35</u>: Cytotoxicité évaluée par le test au MTT sur deux séries d'œsophages décellularisés selon la solution du dernier rinçage

<u>Figure 36</u>: Attachement des ADSCs sur des œsophages décellularisés évalué sur deux séries d'œsophages décellularisés selon la solution du dernier rinçage

Figure 37: A : vue en microscopie optique d'un feuillet d'ADSCs en cours de culture à J14 (Grossissement x200), B : vue macroscopique d'un feuillet d'ADSCs en cours de culture à J21, C : vue macroscopique d'un œsophage décellularisé après enroulement d'un feuillet d'ADSCs sur sa face externe

<u>Figure 38</u>: Coupe histologique après coloration H.E.S d'un œsophage décellularisé ensemencé sur sa face externe par un feuillet d'ADSCs (Grossissement x10). Absence d'adhésion du feuillet après 9 jours de culture

<u>Figure 39</u>: Coupe histologique après coloration Hémalun d'un œsophage décellularisé mise en culture 5 jours après ensemencement de sa face externe avec un feuillet d'ADSCs

Figure 40: Coupe histologique après coloration H.E.S d'un œsophage cellularisé éversé ensemencé par un feuillet d'ADSCs à J14 (Grossissement x10). Absence de visualisation du feuillet

Figure 41 : Coupe histologique après coloration H.E.S d'un œsophage cellularisé éversé ensemencé par un feuillet d'ADSCs à J21. A : présence du feuillet (cercle) sur la face externe (Grossissement x40), B : Absence de migration cellulaire dans la musculeuse (Grossissement x400)

<u>Figure 42</u>: Coupe histologique après coloration H.E.S d'un œsophage cellularisé ensemencé par un feuillet d'ADSCs à J35

<u>Figure 43</u>: Coupe histologique après coloration H.E.S d'un œsophage cellularisé ensemencé par un feuillet d'ADSCs à J35

<u>Figure 44</u>: Courbes pondérales des 30 rats nude sur 8 semaines de suivi après implantation d'œsophage porcin décellularisé associé ou pas à des feuillets d'ADSCs

<u>Figure 45</u>: Coupe histologique après coloration HES d'un œsophage décellularisé implanté 4 semaines dans le grand épiploon d'un rat nude

<u>Figure 46</u>: Coupe histologique après coloration HES d'un œsophage décellularisé implanté 8 semaines dans le grand épiploon d'un rat nude

<u>Figure 47</u>: Vues opératoires de l'implantation dans le grand épiploon d'un porc d'un œso <u>Figure 48</u>: Coupes histologiques après coloration H.E.S d'un œsophage décellularisé avant son implantation dans le grand épiploon (A, C) et 4 semaines après sa maturation (B, D)phage décellularisé

<u>Figure 49</u>: Coupe immunohistochimique d'un œsophage décellularisé après 4 semaines de maturation dans le grand épiploon

<u>Figure 50</u>: Vue opératoire après substitution œsophagienne par un œsophage décellularisé implanté 4 semaines dans le grand épiploon sur un modèle porcin

<u>Figure 51</u>: Courbes pondérales des 6 porcs opérés d'une substitution œsophagienne par œsophage décellularisé plus ou moins implanté 4 semaines au préalable dans le grand épiploon

<u>Figure 52</u>: Coupes histologiques d'un œsophage décellularisé avec maturation préalable implanté après œsophagectomie sur un modèle porcin après un mois de suivi

<u>Figure 53</u>: Coupes histologiques d'un œsophage décellularisé sans maturation préalable implanté après œsophagectomie sur un modèle porcin après un mois de suivi

Tableau 1 : Travaux de substitution œsophagienne utilisant des matériaux non résorbables

<u>Tableau 2</u> : Travaux d'ingénierie tissulaire œsophagienne utilisant des scaffolds polymériques résorbables

<u>Tableau 3</u>: Travaux d'ingénierie tissulaire portant sur les matrices naturelles décellularisées.

<u>Tableau 4</u>: Avantages et inconvénients des différents types de matrices utilisées dans l'ingénierie tissulaire de l'œsophage

<u>Tableau 5</u>: « Scoring » histologique utilisé afin d'évaluer de manière semi-quantitative l'intégration de biomatériaux en coloration H.E.S à 14 et 35 jours de l'implantation

<u>Tableau 6</u>: Caractéristiques mécaniques en traction longitudinale et circonférentielle de 28 œsophages porcins avant et après décellularisation

Tableau 7 : Tableau clinique de suivi d'évènements postopératoires

<u>Tableau 8</u> : SWOT des matrices œsophagiennes décellularisées

<u>Tableau 9</u>: Principaux protocoles de décellularisation étudiés en ingénierie tissulaire œsophagienne

<u>Tableau 10</u>: Caractéristiques mécaniques et histologiques des œsophages dans les principaux modèles animaux utilisés en ingénierie tissulaire œsophagienne

<u>Tableau 11</u>: Principales études précliniques en ingénierie tissulaire utilisant des matrices biologiques

Annexes

Annexe 1

Quantification de l'ADN résiduel des MD

Kit de quantification Qiagen®

Une fois les MD lyophilisées et broyées, 10 mg de tissu ont été pesés puis disposés dans un tube 1,5 ml. Une solution de travail y a été ajoutée à raison de 200 µl par tube afin de permettre la digestion enzymatique des tissus. Cette solution a été obtenue avec 20 µl de protéinase K et 180 µl de Buffer ATL. Ces tubes ont ensuite été placés dans une enceinte à 56°C pour digestion durant 12 heures. Suite à la digestion enzymatique, les tubes ont été vortexés et 200 µl de buffer AL ainsi que 200 µl d'éthanol 96% y ont été ajoutés. De nouveau vortexés, les contenus de chaque tube ont été transvasés dans des colonnes QIAamp ellesmême placées dans des tubes collecteur 2 ml pour centrifugation à 8 000 rpm pendant 1 minute. Les tubes collecteur sont jetés après chaque centrifugation et changés par des nouveaux. Suite à cela, 500 µl de buffer AW1 sont rajoutés dans chaque tube pour centrifugation à 8 000 rpm pendant 1 minute. L'avant dernière étape a consisté en l'ajout de 500 µl de buffer AW2 pour centrifugation à 1 400 rpm pendant 3 minutes. Afin d'obtenir la solution d'intérêt dans laquelle l'ADN sera quantifié, 200 µl de buffer AE ont été ajoutés dans chaque tube en prenant garde de bien viser le centre de la colonne. Les tubes ont été incubés à température ambiante puis centrifugés pour la dernière fois à 8 000 rpm pendant 1 minute. La solution qui a été dans le tube collecteur a pu être utilisée pour lecture au NanoDrop ou conservée à - 20°C pour lecture ultérieure.

Le dosage de l'ADN a été effectué au NanoPhotometerTM Pearl. Cet appareil fonctionne de la même manière qu'un spectrophotomètre à la différence près qu'il permet un dosage plus précis et sur des échantillons de quelques microlitres là où les machines classiques nécessitent entre 100 à 3 500 μl de solution pour des lectures en cuvettes. Il permet de quantifier l'ADN présent dans des solutions en se basant sur une lecture de l'absorbance à 260 nm. La première chose à faire a été de configurer l'appareil selon le type de molécule à quantifier (ADN double brin dans notre cas) ; une fois le NanoPhotometerTM paramétré, le tube contenant la solution a été homogénéisé grâce au mini vortex intégré et 1,5 μl de la solution ont été prélevés puis déposés au niveau de la lentille de lecture. La mesure effectuée, l'appareil a imprimé un ticket récapitulant les valeurs obtenues (quantification en ng/μl, pureté de l'échantillon, spectre

d'absorption). Lorsque la quantité d'ADN a été inférieure au seuil de détection de l'appareil, les échantillons ont été concentrés par évaporation afin de permettre une nouvelle lecture.

Électrophorèse sur gel d'agarose

Pour vérifier la taille des fragments présents dans les MD, des migrations par électrophorèse sur gel d'agarose ont été réalisées.

Le gel d'agarose 1% a été obtenu par dissolution d'1 g d'agarose avec apport calorifique dans 100 ml de TAE 0,5X (Tris Acétate EDTA). Lors de la phase de refroidissement du gel, 10 μl d'un agent intercalant de l'ADN ont été rajoutés (dans notre cas du GelRedTM) avant coulage dans des moules adaptés à la cuve de migration. Un peigne a été mis en place avant polymérisation du gel afin d'y former les puits de dépôt. Une fois polymérisé, le peigne a été retiré, le gel placé dans la cuve de migration puis immergé dans du tampon TAE 0,5X. Les échantillons ont ensuite été préparés pour la migration (le volume final de dépôt étant de 12 μl/puits). Pour faciliter la préparation, cette dernière a été réalisée sur un carré de Parafilm M® et se composait de 2 μl du tampon de charge et 10 μl d'échantillon à tester. Un marqueur de poids moléculaire a été déposé dans le premier puit (afin de permettre l'identification des bandes sur le gel après migration) et les échantillons ont été déposés dans

Un marqueur de poids moléculaire a été déposé dans le premier puit (afin de permettre l'identification des bandes sur le gel après migration) et les échantillons ont été déposés dans les puits suivants en veillant à ne pas déchirer le fond du puit avec la pointe de la pipette. Une fois les dépôts effectués, la cuve a été fermée puis mise sous tension. La manipulation a été arrêtée avant que le colorant du front de migration n'arrive à proximité sur bord du gel (soit après 30 minutes à 100 volts dans notre cas). Le gel a ensuite été retiré de la cuve puis déposé sur une table UV pour vérification de la présence de bandes de migration avant photographie sous lampe UV.

Annexe 2

Protocole de quantification des GAGs des MD

Comme nous ne connaissions par la teneur des MD en GAG, nous avons placé 25 mg de tissu (dose recommandée dans le kit, notice ci-jointe) dans des tubes 1,5 ml contenant 1 ml de la solution tampon. La phase de digestion enzymatique a ensuite été effectuée au bain marie à 65°C pendant 3h. Les tubes ont été centrifugés pendant 10 minutes à 10 000 g avant récupération du surnageant.

Une gamme étalon a été réalisée afin de permettre leur exploitation. Les mesures des DO la constituant ont été effectuées en quadruplicata sur 6 échantillons de concentrations différentes : un blanc (0g) contenant 100 μ l de la solution tampon et 5 tubes contenant 1, 2, 3, 4 et 5 μ g de la solution standard de référence (concentration à 100 μ g/ml soit 10, 20, 30, 40 et 50 μ l par tube) complété QSP 100 μ l avec de la solution tampon.

Afin de quantifier les GAGs présents dans chaque échantillons, $50~\mu l$ du surnageant ont été introduits dans un tube 1,5 ml complété QSP $100~\mu L$ avec de la solution tampon. Le réactif de Blyscan a ensuite été ajouté à raison de 1 ml par tube et les tubes placés au shaker durant 30~m minutes avant centrifugation pendant 10~m minutes à 11~300~g. Le surnageant a été jeté en prenant garde à ne pas toucher au culot (la notice préconise de retourner les tubes et de "les tapoter" sur du papier absorbant). Pour solubiliser les GAG, 0,5~ml de réactif de dissociation ont été insérés dans chaque tube qui ont ensuite été vortexés et incubés 10~m minutes à température ambiante. La dernière étape a consisté à centrifuger les tubes pendant 5~m minutes à 11~300~g avant de les transférer sans faire de bulle dans une plaque 96~p uits à raison de $200~\mu l$ par puits pour lecture de la DO~a~656~nm.