

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Liste des illustrations.....	x
Liste des abréviations et des symboles.....	xii
Remerciements.....	xv
Avant-propos.....	xvi
Contributions.....	xvi
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1. Le génie tissulaire dans la reconstruction cutanée.....	2
1.2. Le génie tissulaire et la clinique.....	4
1.2.1 Le système immunitaire.....	4
1.2.1.1 Le complexe majeur d'histocompatibilité.....	5
1.2.1.1 La réponse immunitaire.....	6
1.2.1.2 Les différents types de transplantation.....	7
1.2.1.3 Les aspects du rejet de greffe.....	7
1.2.1.4 Les types de rejet.....	10
1.2.2 La transplantation et la tolérance immunologique.....	11
1.2.2.1 Les immunosuppresseurs.....	11
1.2.2.2 La tolérance immunitaire.....	12
1.3 La biodisponibilité et les techniques de production des substituts cutanés.....	13
1.3.1 L'approche dite « <i>Top-Down</i> ».....	15
1.3.1.1 Le modèle de gel de collagène.....	16
1.3.1.2 Le modèle d'éponge.....	16
1.3.1.3 Le modèle de polymères biosynthétiques.....	17
1.3.1.4 Les dermes décellularisés.....	17
1.3.2 L'approche dite « <i>Bottom-up</i> ».....	18
1.3.2.1 Le modèle par auto-assemblage.....	18
1.3.2.2 Le modèle par bio-impression.....	19
1.3.3 Les propriétés mécaniques de la peau.....	21
1.3.3.1 La déformation non-linéaire.....	21
1.3.3.2 La viscoélasticité.....	22
1.3.3.3 La pré-tension et l'anisotropie.....	22
1.3.3.4 L'hétérogénéité ultrastructurale des propriétés mécaniques de la peau.....	23
1.3.4 Les substituts cutanés : application clinique et modèle d'étude pour la recherche et développement (R&D).....	24
1.3.4.1 Les substituts dermiques pour le soin clinique.....	26

1.3.4.3	Les substituts épidermiques pour le soin clinique	33
1.3.4.4	Les substituts cutanés bilamellaires pour le soin clinique	34
1.3.4.5	Les modèles pour la recherche (translation clinique, pharmaceutique ou cosmétique)	
	36	
1.4	Le LOEX et les peaux reconstruites par auto-assemblage (l'approche dite « <i>Bottom-up</i> »)	
	40	
1.4.1	L'épiderme simple (kératinocyte)	40
1.4.2	L'épiderme pigmenté (kératinocytes + mélanocytes)	42
1.4.3	La jonction dermo-épidermique	45
1.4.4	Le derme	45
1.5	La pertinence et les objectifs du projet de recherche	47
1.5.1	Le besoin clinique	47
1.5.2	Le temps de production	49
1.5.3	La pigmentation	50
1.5.4	Les propriétés mécaniques	51

Chapitre 2 : Le génie tissulaire par auto-assemblage dans le recouvrement au long terme des plaies	54	
2.1	Résumé en français	55
2.2	Article	56
2.2.1	Résumé (anglais)	57
2.2.2	Introduction	58
2.2.3	Résultats	59
2.2.4	Discussion	68
2.2.5	Matériels et méthodes	70
2.2.6	Matériels et méthodes supplémentaires	74
2.2.7	Remerciements	75
2.2.8	Références	75

Chapitre 3 : Mélanocyte et pigmentation, une part importante de notre identité et de notre survie	78	
3.1	Résumé en français	79
3.2	Article	80
3.2.1	Résumé (anglais)	81
3.2.2	Introduction	82
3.2.3	Matériel et méthodes	84
3.2.4	Résultats	88
3.2.5	Discussion	95
3.2.6	Conclusion	97
3.2.7	Remerciements	97
3.2.8	Références	97

Chapitre 4 : Substituts cutanés reconstruits par génie tissulaire, un outil pour l'étude de l'élastogenèse	101	
4.1	Résumé en français	102
4.2	Article	103
4.2.1	Résumé (anglais)	104

4.2.2	Introduction	105
4.2.3	Matériel et méthodes.....	107
4.2.4	Résultats	110
4.2.5	Discussion.....	117
4.2.6	Conclusion	118
4.2.7	Remerciements	118
4.2.8	Références.....	119
Chapitre 5 : Discussion et Conclusions.....		122
5.1.	L'immunité et la biodisponibilité de tissus reconstruits par auto-assemblage	123
5.2.	La pigmentation : Esthétique et protection	126
5.3.	Propriétés mécaniques et impact sur la reconstruction tissulaire.....	129
5.4.	Conclusions	132
Bibliographie (Chapitres 1 et 5).....		134
Annexe 1 : Biocompatibility and Functionality of a Tissue-Engineered Living Corneal Stroma Transplanted in the Feline Eye		146
A1.1	Résumé en français.....	147
A1.2	Résumé en anglais.....	148

Liste des illustrations

Chapitre 1

Figure 1.1 : Structure de la peau. Vue tridimensionnelle de la peau et des tissus sous-cutanés. Figure tirée du livre Anatomie et physiologie humaine 5ème édition Pearson ERPI (Marieb Elaine, 2015).	2
Figure 1.2 : Représentation schématique des mécanismes de rejet de greffes cutanées. Figure tirée de Cahalan MD. Imaging transplant rejection: a new view. Nat Med. 2011;17(6):662-3 (Cahalan M. D., 2011).....	8
Figure 1.3 : Le génie tissulaire selon l'approche Bottom-up vs. Top-down. Figure tirée de Tiruvannamalai-Annamalai R, Armant DR, Matthew HWT (2014) A Glycosaminoglycan Based, Modular Tissue Scaffold System for Rapid Assembly of Perfusable, High Cell Density, Engineered Tissues. PLoS ONE 9(1): e84287. doi:10.1371/journal.pone.0084287 (Tiruvannamalai-Annamalai R. et al., 2014).....	15
Tableau 1.1 : Substituts dermiques décellularisés d'origine humaine pour le soin clinique.....	27
Tableau 1.1 (Suite) : Substituts dermiques décellularisés d'origine humaine pour le soin clinique ..	27
Tableau 1.2 : Substituts dermiques décellularisés d'origine animale pour le soin clinique.....	28
Tableau 1.2 (Suite) : Substituts dermiques décellularisés d'origine animale pour le soin clinique....	29
Tableau 1.3 : Substituts dermiques biosynthétiques acellulaires pour le soin clinique.....	30
Tableau 1.3 (Suite) : Substituts dermiques biosynthétiques acellulaires pour le soin clinique.....	31
Tableau 1.4 : Substituts dermiques biologiques avec fibroblaste dermique humain pour le soin clinique.....	32
Tableau 1.5 : Substituts épidermiques pour le soin clinique.....	33
Tableau 1.6 : Substituts cutanés bilamélaires pour le soin clinique	34
Tableau 1.6 (Suite) : Substituts cutanés bilamélaires pour le soin clinique	35
Tableau 1.7 : Substituts épidermiques pour la recherche et développement.....	37
Tableau 1.8 : Substituts épidermiques pigmentés pour la recherche et développement.....	38
Tableau 1.9 : Substituts cutanés bilamélaires pour la recherche et développement.....	39

Chapitre 2

Figure 2.1 : Histological analysis of TESs and tissue-engineered dermis.....	60
Figure 2.2 : 19 days engraftment of TESs in C3H/HeN mice.....	61
Figure 2.3 : 56 days engraftment of TESs in C3H/HeN mice.....	62
Figure 2.4 : Primary immune response in TES 19 and 56 days after grafting.....	66
Figure 2.5 : 19 days engraftment of TES in C3H/HeN mice primed with BALB/c epithelial cells	67
Figure 2.6 : Secondary immune response in TESs 19 days after grafting on C3H/HeN mice primed with BALB/c epithelial cells.....	67

Table 2.1: Cells used for the reconstruction of tissue-engineered dermis grafted in C3H/HeN mice	74
Table 2.2: Cells used for the reconstruction of TESs grafted in C3H/HeN mice	74
Table 2.3: Cells used for the reconstruction of TESs grafted in primed C3H/HeN mice	75

Chapitre 3

Figure 3.1: Tissue-engineered skin at 14 and 21 days of maturation at the air-liquid interface	88
Figure 3.2: Evolution of white, black and non-pigmented TESs <i>in vitro</i>	89
Figure 3.3: Evolution of melanocyte density in TESs over of the air-liquid interface culture time	90
Figure 3.4: Evolution of white and black TESs after 21 days of grafting on CD1 athymic mice	91
Figure 3.5: Melanin density analysis of black and white TESs at 14 and 21 days of maturation at the air-liquid interface after UVR-exposure.....	92
Table 3.1: DNA damage in Caucasian skin type TESs	93
Table 3.2: DNA damage in African skin type TESs	94

Chapitre 4

Figure 4.1: Representative immunofluorescence observations of pigmented (melanocytes and keratinocytes) and non-pigmented (keratinocytes) tissue-engineered skin at 10, 21 and 35 days of aging at the air-liquid interface cultivated with (treated) or without (not-treated) a combination of aldosterone (50nM) and spironolactone (2µM) in presence of ascorbic acid (50µg/ml).....	111
Figure 4.2: Transmission electron micrographs of tissue-engineered skin cultured without (A, C) or with a combination of aldosterone (50nM) and spironolactone (2µM) (B, D).	112
Figure 4.3: Histological analysis of Masson's trichrome staining of tissue-engineered dermis. All substitutes were cultivated for 21 days in the presence of 50, 25 and 5 µg/ml ascorbic acid, combined with or without 50nM aldosterone or 2µM spironolactone.	114
Figure 4.4: Mechanical properties of non-pigmented TES (black) produced with ascorbic acid (50µg/ml); non-pigmented (red) and pigmented (blue) TESs treated with a combination of aldosterone (50nM) and spironolactone (2µM) and ascorbic acid (50µg/ml), after 10, 21 and 35 days of culture at the air-liquid interface.	116
Table 4.1: Elastic Fiber analysis at 21 days at the air-liquid interface of TESs non-treated.....	113
Table 4.2: Elastic Fiber analysis at 21 days at the air-liquid interface of TESs treated with aldosterone (50nM) and spironolactone (2µM)	113
Table 4.3: Elastic Fiber analysis from the native newborn skin	114

Liste des abréviations et des symboles

°C	Degré Celcius
2D	<i>Two-dimensional</i> (deux dimensions)
3D	<i>Three-dimensional</i> (trois dimensions)
6-4PP	Photoproduits de pyrimidines (6-4) pyrimidone
ADCC	<i>Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i> (cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps)
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i> (facteur de croissance basique des fibroblastes)
BPE	<i>Bovine Pituitary Extract</i> (extrait pituitaire bovine)
CCA	<i>Congenital contractural arachnodactyly</i> (congénitale contractuel arachnodactyly)
CEA	<i>Cultured epithelial autograft</i> (culture épithéliale autologue)
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellules présentatrices d'antigène
CPD	Cyclobutanes de pyrimidines
CTL	Lymphocytes T CD8+ cytotoxiques
DEJ	Dermo-epidermal junction
DEM	Dose érythémateuse minimale
DH	DMEM (<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>) and Ham's F12
DHI	Dihydroxyindole
DHICA	Acide dihydroxyindole carboxylique
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> (milieu modifié Dulbecco de Eagle)
DRT	<i>Dermal Regeneration Template</i>
DT	<i>Delayed tanning</i> (bronzage retardé)
ECM	<i>Extracellular matrix</i> (matrice extracellulaire)
EDTA	<i>Ethylendiaminetetraacetic acid</i> (acide éthylène diamine tétraacétique)
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> (facteur de croissance épidermique)
EMILIN-1	<i>Elastin microfibril interfacier 1</i>
EMU	<i>Epidermal melanin unit</i> (unité épidermique de melanisation)
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> (sérum de veau foetal)
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (sérum de veau foetal)
FDA	Food and Drug Administration
FoxP3	<i>Forkhead box3</i>
GAG	<i>Glycosaminoglycan</i> (Glycosaminoglycane)
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i> (facteur de croissance des hepatocytes)
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> (antigènes des leucocytes humains)
i3T3	<i>irradiated "3-day transfer, inoculum 3 x 10⁵ cells"</i> (3T3 irradiés)
IFN-γ	<i>Inteferon gamma</i> (interferon gamma)
IGF-I	<i>insulin-like growth factor</i> (facteur de croissance 1 ressemblant à l'insuline)
IPD	<i>Immediate pigment darkening</i> (pigmentation immédiate persistante)
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyphénylalanine
LC	<i>Langerhans cells</i> (cellules de Langerhans)
LIFT	<i>Laser-Induced Forward Transfer</i> (transfert induit par laser)

LOEX	Laboratoire d'organogénèse expérimentale
LOX	Lysyl oxidase
MART-1	<i>Melanoma antigen recognized by T cells 1</i>
MED	<i>Minimal erythema dose</i> (dose minimal érythémateuse)
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (complexe majeur d'histocompatibilité)
MIT	<i>Massachusetts institute of technology</i>
MITF	<i>Microphthalmia- associated Transcription Factor</i> (facteur de transcription associé à la microphthalmie)
mL	Millilitre
MMP	Métalloprotéinases
MR	<i>Mineralocorticoid receptor</i> (récepteur des minéralocorticoïdes)
MRC1	<i>c-type mannose receptor 1</i> (récepteur au mannose de type c-1)
NER	<i>nucleotide excision repair</i> (réparation par excision de nucléotides)
NGF	<i>Nerve growth factor</i> (facteur de croissance des nerfs)
NK	<i>Natural Killer</i> (tueur naturel)
OCT	<i>Optimal cutting temperature</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (tampon phosphate salin)
PGA	<i>Poly(glycolic acid)</i>
PMA	<i>Phorbol Myristate Acetate</i>
Pmel17	<i>Premelanosome protein 17</i>
POMC	Pro-opiomélanocortine
PPD	<i>Persistent pigment darkening</i> (pigmentation persistante)
PXE	<i>Pseudoxanthoma elasticum</i>
RcT	Receptor T-cell (récepteurs des cellules T)
RHE	<i>Reconstructed Human Epidermis</i> (épiderme reconstruit humain)
rhFGF-B	<i>human recombinant Basic Fibroblast Growth Factor</i> (facteur de croissance basique recombinant humain des fibroblastes)
RHPE	<i>Reconstructed Human Pigmented Epidermis</i> (épiderme pigmenté reconstruit humain)
SCC	<i>Squamous cell carcinoma</i> (carcinome épidermoïde)
SCF	<i>Stem cell factor</i> (facteur de croissance des cellules souches)
SD	<i>Standard deviation</i> (écart type)
SMC	<i>Smooth muscle cell</i> (cellules du muscle lisse)
SPF	<i>Sun protection factor</i> (facteur de protection solaire)
SSR	<i>Solar-simulated radiation</i> (simulateur solaire)
SVAS	<i>Supravalvular aortic stenosis</i> (sténose aortique supravalvulaire)
TCR	Récepteurs des cellules T
TE	Tropoélastine
TES	<i>Tissue-engineered skin substitute</i> (substitut de peau par ingénierie tissulaire)
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i> (facteur de croissance transformant de type bêta)
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> (facteur de nécrose tumorale)
Treg	Lymphocytes T régulateurs
TRP-1	<i>Tyrosinase-related protein-1</i>
TRP-2	<i>Tyrosinase-related protein-2</i>
TYR	Tyrosinases
UTS	<i>Uniaxial tensile strength</i> (force de tension uniaxiale)
UV	Ultraviolet

UVA	Ultraviolet de type A
UVB	Ultraviolet de type B
UVC	Ultraviolet de type C
UVR	Ultraviolet radiation
α -MSH	Hormone mélanotrope
μ g	Microgramme
μ L	Microlitre
μ m	Micromètre
μ M	Micromolaire

Remerciements

Mon intérêt pour la recherche scientifique débuta dans mes plus jeunes années d'existence, lesquelles furent insatiablement marquées par un simple et unique mot, à savoir « pourquoi ». Ce mot remettait en question absolument tout et a fini par m'amener sur la voie des sciences et plus particulièrement de la biologie. Une discipline complexe qui semble infinie. Par contre, je dois bien avouer que je ne porte que peu d'intérêt pour les réponses à mes multiples questions, car le ou les chemins pouvant m'amener à celles-ci sont tellement plus enrichissants.

Étant parvenu au sommet des études universitaires, je tiens à marquer sur la roche la directe et indirecte contribution de ma mère sans laquelle je n'aurais jamais pu espérer aller au Canada et encore moins mener de si nombreuses années d'études. Bien évidemment, un remerciement de tout cœur envers Lucie Germain qui m'a accueilli au sein de son équipe de recherche et m'a amplement permis de m'instruire dans le domaine de la reconstruction cutanée. Sans oublier Stéphanie Proulx qui a élargi mon expertise de travail avec une touche de recherche sur la cornée. Sans oublier Patrick J. Rochette sans qui je n'aurais jamais pu effectuer un volet de recherche sur les rayons UV.

Je tiens à remercier les membres de mon centre de recherche (LOEX-CMDGT) et spécialement les assistants de recherche qui ont grandement contribué aux « processing » de mes échantillons histologiques. Aux milliers de lames coupées et colorées par l'équipe de coloration (Véronique Racine, Valérie Trottier, Cindy Perron, Manon Labrecque) et aux coupes OCT interminables réalisées par Israël Martel. Aux notes d'encouragement laissées à l'improviste par Catherine Villeneuve, ainsi que le temps précieux consacré par Sébastien Larochelle dans l'établissement de nouveaux protocoles expérimentaux. Un remerciement bien mérité à Amélie Lavoie, Israël Martel (une nouvelle fois), Francis Bisson et à Carolyne Simard-Bisson pour avoir participé à cœur ou à contrecœur au montage de mes milliers de feuillets dermiques. Sans oublier les étudiants et stagiaires post-doctoraux qui ont été de passage au cours de mes 7 années passées dans ce centre de recherche, tels qu'Ulysse Pereira, Sébastien Cadau et Éloïse Rochefort... Il est malheureusement fort possible que j'oublie de citer certaines personnes, svp, ne m'en portez pas rigueur.

Dix années passées au Canada dont sept uniquement au centre LOEX. Ces années seront inoubliables de même que les connaissances durement acquises.

Avant-propos

Contributions

Cet avant-propos énumère mes contributions personnelles ainsi que celles de mes co-auteurs aux chapitres 2 à 4 ainsi qu'à l'annexe 1 présentées dans cette rédaction. Ces chapitres correspondent à des articles qui ont été ou sont en attente de publication dans des revues scientifiques évaluées par des pairs.

Chapitre 2

L'étude intitulée " *Immune tolerance of tissue-engineered skin produced with allogeneic or xenogeneic fibroblasts and syngeneic keratinocytes grafted on mice*" est en cours de processus de soumission dans la revue *Journal of Dermatology* (juillet 2017). Danielle Larouche a révisé le design expérimental, ainsi que le manuscrit. Lors de cette étude, Dr Kim et Dr Bernier ont apporté leur expertise en dermatologie et pathologie pour l'évaluation. Dr Auger a contribué, pour sa part, à la révision du manuscrit qui vous est présenté. Dr Germain en tant que superviseur de recherche a contribué aussi bien à l'établissement des protocoles de recherche qu'à la révision du manuscrit.

Pour ma part, en tant que premier auteur, j'ai contribué majoritairement à la création des protocoles ainsi qu'à leurs exécutions. J'ai généré expérimentalement ainsi qu'analysé et interprété l'ensemble des résultats ayant mené aux figures présentées dans le manuscrit, excepté la coloration hématoxyline éosine réalisée par des professionnels de recherche. Le manuscrit fut rédigé et révisé par ma personne dans son intégralité. Ma contribution personnelle à ce travail s'évalue à environ 90 %.

Chapitre 3

L'étude intitulée "*Impact of melanocyte density on a self-assembled tissue-engineered skin substitute in vitro and after grafting in vivo*" est en cours de processus de soumission dans la revue *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (juillet 2017). Lors de cette étude, Ulysse Pereira a contribué en tant que prédécesseur sur le projet à l'établissement originel des premiers protocoles de recherche et leur application expérimentale, ainsi qu'à la révision du manuscrit. Danielle Larouche a révisé le design expérimental, ainsi que le manuscrit. Patrick J. Rochette a apporté son soutien aux travaux impliquant l'irradiation *in vitro* des peaux reconstruites en autorisant l'utilisation de son simulateur solaire et en fournissant les protocoles expérimentaux pour les analyses des différents dommages à l'ADN. Il a aussi participé à la révision des résultats des dommages à l'ADN et a participé à la révision du manuscrit. Ludovic Martin a collaboré à l'initiation, l'élaboration et le suivi de ce projet. Il a également contribué à la révision du manuscrit. Dr Germain en tant que superviseur de recherche a contribué aussi bien à l'établissement des protocoles de recherche qu'à la révision du manuscrit.

Pour ma part, en tant que premier auteur, j'ai contribué majoritairement à la création des protocoles ainsi qu'à leurs exécutions. J'ai généré expérimentalement ainsi qu'analysé et interprété l'ensemble des résultats ayant mené aux figures présentées dans le manuscrit, excepté la coloration hématoxyline éosine réalisée par des professionnels de recherche. Le manuscrit fut rédigé et révisé par ma personne dans son intégralité. Ma contribution personnelle à ce travail s'évalue à environ 90 %.

Chapitre 4

L'étude intitulée "*Skin substitute model to study the aging and organization of the elastin network*" est en cours de processus de soumission dans la revue *Biomaterials* (juillet 2017). Lors de cette étude, Ulysse Pereira a contribué en tant que prédécesseur sur le projet à l'établissement originel des premiers protocoles de recherche et leur application expérimentale, ainsi qu'à la révision du manuscrit. Ludovic Martin a collaboré à l'initiation, l'élaboration et le suivi de ce projet. Il a également contribué à la révision du manuscrit. Danielle Larouche a aussi révisé le design expérimental, ainsi que le manuscrit. Dr Ruel a apporté son expertise en génie mécanique pour l'analyse des propriétés

mécaniques des tissus. Dr Germain en tant que superviseur de recherche a contribué aussi bien à l'établissement des protocoles de recherche qu'à la révision du manuscrit.

Pour ma part, en tant que premier auteur, j'ai contribué majoritairement à la création des protocoles ainsi qu'à leurs exécutions. J'ai généré expérimentalement ainsi qu'analysé et interprété l'ensemble des résultats ayant mené aux figures présentées dans le manuscrit, excepté la coloration hématoxyline éosine réalisée par des professionnels de recherche. Le manuscrit fut rédigé et révisé par ma personne dans son intégralité. Ma contribution personnelle à ce travail s'évalue à environ 90 %.

Annexe 1

L'étude intitulée "*Biocompatibility and functionality of a tissue-engineered living corneal stroma transplanted in the feline eye*" a été publiée dans la revue *Investigative Ophthalmology & Visual Science* en septembre 2014. Ce projet issu d'une collaboration entre ma co-directrice de recherche Stéphanie Proulx et Isabelle Brunette m'a amené à collaborer avec Marie Boulze Pankert, alors étudiante dans l'équipe de recherche d'Isabelle Brunette et ainsi être second auteur de son manuscrit.

Isabelle Brunette, ainsi que Stéphanie Proulx, ont été en charge de l'élaboration du design expérimental, l'interprétation des données, ainsi que la révision du manuscrit. J'ai pour ma part été en charge, lors de cette étude, de la partie *in vitro* de la production des stromas cornéens, ainsi que de toutes les analyses histologiques et d'immunofluorescences qui ont mené à la réalisation de la figure 2 de ce manuscrit. Les expériences et analyses *in vivo* ont été menées par Marie Boulze Pankert, qui a aussi été responsable de la rédaction du manuscrit. Ma contribution personnelle à la rédaction de ce manuscrit fut minime et a été essentiellement sous la responsabilité de ma co-directrice de recherche. J'ai tout de même eu l'occasion de participer à sa révision. Fatima Zaguia et Marie-Claude Perron ont assisté aux analyses des données, à leurs interprétations, ainsi qu'à la révision du manuscrit. Myriam Bareille a porté assistance au suivi clinique et à la récolte des données. Xinling Liu a contribué à la revue de la littérature, ainsi qu'à la récolte des données. J. Douglas Cameron a, pour sa part, aidé aux analyses histopathologiques, aux analyses en microscopie électronique à transmission et à la révision du manuscrit. Au final, ma contribution personnelle à la réalisation de ce manuscrit fut d'environ 40 %.

Chapitre 1 : Introduction

1.1. Le génie tissulaire dans la reconstruction cutanée

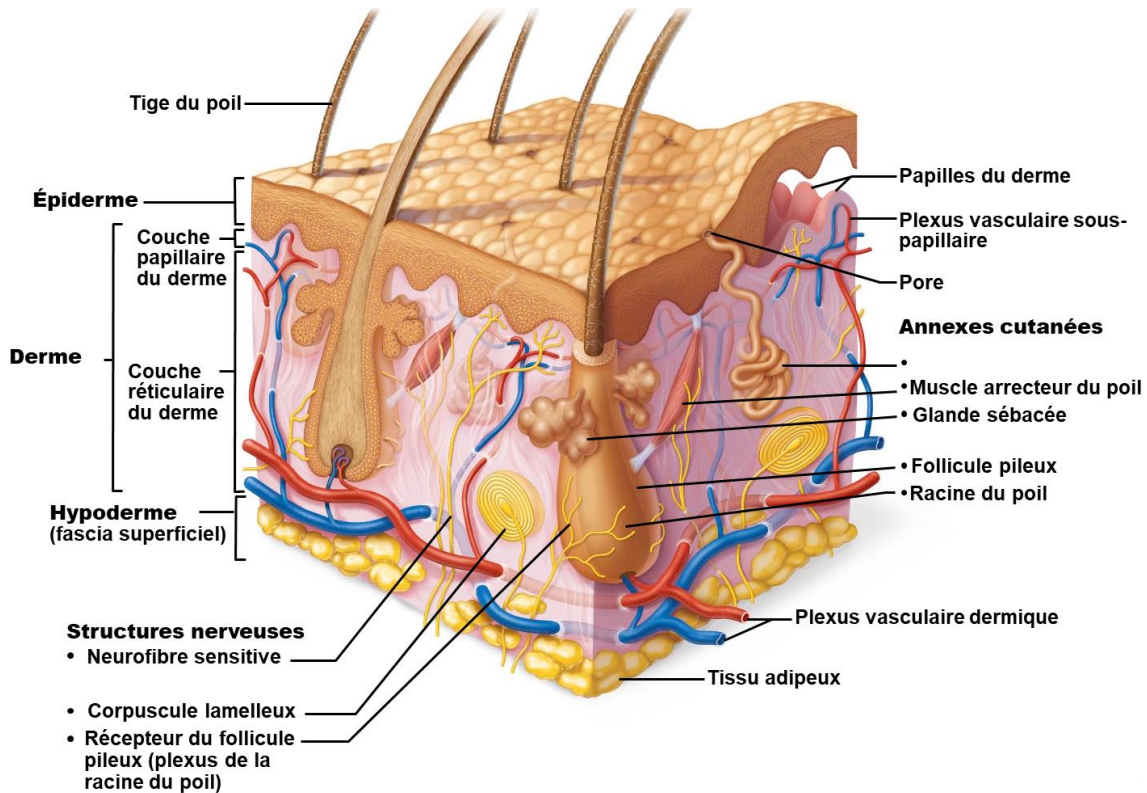


Figure 1.1 : Structure de la peau. Vue tridimensionnelle de la peau et des tissus sous-cutanés. Figure tirée du livre Anatomie et physiologie humaine 5ème édition Pearson ERPI (Marieb Elaine, 2015).

La peau est composée de nombreux types cellulaires spécialisés qui forment chacun différentes unités structurales de l'ordre du dixième de micromètres s'assemblant pour former un hypoderme, un derme, un épiderme, ainsi que différentes annexes cutanées. Ces structures communiquent entre elles afin de former des structures plus complexes (organe) dont l'épaisseur variera de 1,5 à 4 mm chez l'homme. Cet organe complexe constitue une enveloppe quasi imperméable au milieu extérieur offrant une protection contre les agressions d'origine chimique et microbienne. Elle est aussi le siège de nombreux processus métaboliques et assure des fonctions sensorielles, immunitaires et thermorégulatrices. Cet organe vital est constitué de trois compartiments distincts d'origine embryonnaire différente : l'épiderme provient de l'ectoderme, sauf au niveau de la région naso-frontale, d'où il provient de la partie la plus antérieure des bourrelets neuraux. Le derme a, quant à lui, quatre origines différentes : (1) la région dorsale de la tête se forme à partir du mésoderme paraxial dès le niveau de la placode otique (ou somitomères) ; (2) la partie antérieure de la tête provient des crêtes

neurales ; (3) les membres et la région antérieurs du corps proviennent du mésoderme somatopleural latéral, alors que (4) la région dorsale est formée à la suite de la migration des cellules du dermatome des somites. L'hypoderme, quant à lui, provient du mésoderme.

La reconstruction tridimensionnelle *ex vivo* de tissus promouvant des interactions cellulaires, la déposition de la matrice extracellulaire et une architecture physiologique native, sont les buts premiers du génie tissulaire. D'abord mis au point pour les greffes des grands brûlés (Gallico G. G., 3rd et al., 1984; Green H. et al., 1979; Rheinwald J. G. et al., 1975; Rheinwald J. G. et al., 1977), différents types de substituts dermiques et épidermiques simples, ainsi que bilamellaires (derme + épiderme) ont été commercialisés.

Les substituts cutanés sont obtenus par la culture de kératinocytes à la surface de dermes reconstruits ou analogues (Auger F. A. et al., 1995; Bell E. et al., 1981; Boyce S. et al., 1990; Saintigny G. et al., 1993; Shahabeddin L. et al., 1990). On peut classer les substituts dermo-épidermiques en fonction des matériaux utilisés pour reconstruire la structure de la peau. On retrouve principalement les modèles de gel de collagène, d'éponge, de polymères synthétiques, de dermes acellulaires dé-épidermisés, et d'auto-assemblage. Ces tissus destinés à la clinique peuvent aussi être utilisés pour la recherche. Contrairement aux modèles animaux, ils permettent de contrôler la composition structurale et cellulaire, permettant de diminuer le niveau de complexité afin d'analyser chaque sous-type structural indépendamment et leurs interrelations avec les autres (Nelson C. M. et al., 2005). En principe, un échafaudage tridimensionnel de composition et d'organisation connues peut fournir la structure et le microenvironnement nécessaire à l'organisation cellulaire afin d'assurer la fonction du tissu ou de l'organe (Ott H. C. et al., 2008). Ceci présente un avantage, car les cellules se comportent différemment quand elles sont cultivées en trois dimensions dans une matrice extracellulaire (Escamez M. J. et al., 2004; Kremer M. et al., 2001; Smalley K. S. et al., 2006; Sun T. et al., 2006; Sun T. et al., 2007). Cependant, une reconstruction *de novo* aussi complexe ne peut à ce jour être réalisée.

1.2. Le génie tissulaire et la clinique

Les substituts cutanés produits pour la clinique doivent répondre à certaines exigences, lesquelles peuvent être séparées en deux catégories selon leurs :

1. Biocompatibilité : ces substituts devront être acceptés par le receveur d'un point de vue immunologique, posséder des propriétés mécaniques d'élasticité et de résistance à l'étirement, être physiologiquement actifs, imperméables, être capables d'autorenouvellement, et surtout être constitués de composants biorésorbables
2. Propriétés intrinsèques : on parlera ici essentiellement de leur temps de production, de leur prise effective sur le receveur ainsi que facilité d'utilisation.

Afin de répondre aux critères de biocompatibilité, les chercheurs et cliniciens portent une importance primordiale au système immunitaire. En effet, les progrès en transplantation ont été effectués conjointement au développement des immunosuppresseurs. L'immunosuppression qui accompagne les greffes non autologues (voir section 1.2.1.2 Les différents types de transplantation) est nécessaire puisqu'au-delà des difficultés techniques chirurgicales, il est apparu, dès les premières tentatives de transplantation, que les greffons devenaient non fonctionnels dans un délai relativement court du fait de conflits immunitaires. Ces conflits sont liés à des différences antigéniques entre les tissus et cellules du donneur et du receveur. Lorsque le donneur appartient à la même espèce que le receveur, on parle d'alloréactivité, dont l'origine principale est l'extrême polymorphisme des gènes codant pour les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Dans les cas très rares où le donneur et le receveur sont identiques génétiquement (jumeaux monozygotes), il s'agit d'une transplantation isogénique et aucune réaction immunitaire n'apparaît. La xenoréactivité est remarquée lorsque le donneur et le receveur n'appartiennent pas à la même espèce.

1.2.1 Le système immunitaire

L'organisme possède deux mécanismes de défense pour assurer sa protection : l'immunité innée, qui entre en action rapidement, mais qui n'est pas spécifique et l'immunité adaptative, moins rapide, qui

est une défense spécifique de par la reconnaissance du complexe majeur d'histocompatibilité « unique » à chaque individu.

1.2.1.1 Le complexe majeur d'histocompatibilité

Les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité codent pour des molécules qui s'expriment à la surface des cellules et qui influencent le rejet d'allogreffe. En effet, les molécules du CMH sont différentes d'un individu à l'autre (à condition que ces individus soient génétiquement différents) et servent donc de « carte d'identité » immunitaire.

Les molécules du CMH peuvent être divisées en trois grandes classes :

- (1) Les molécules de classe I, lesquelles appartiennent au système HLA-A, B et C (acronyme de la terminologie anglaise pour *Human Leukocyte Antigen locus A, B and C*) chez l'humain et H-2K, D et L chez la souris. Elles sont exprimées sur toutes les cellules somatiques et leur reconnaissance est restreinte aux récepteurs des cellules T (TCR) CD8+.
- (2) Les molécules de classe II, telles que les HLA-DP, DQ et DR chez l'humain et I-A et I-E chez la souris, s'expriment de manière constitutive sur les lymphocytes B, les cellules dendritiques et les cellules de l'épithélium thymique. Les macrophages et les myoblastes peuvent aussi exprimer le CMH de classe II après induction à l'interféron- γ . Ces molécules se retrouvent aussi sur les lymphocytes T activés chez l'humain, mais pas chez la souris. La liaison d'un CMH de classe II est restreinte à un TCR exprimé sur les lymphocytes T CD4+. La fonction phagocytaire des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), exprimant les CMH de classe II, permet la présentation de peptides exogènes par ces molécules (Murphy K., 2011).
- (3) Les molécules de classe III sont, quant à elles, des protéines présentes dans les liquides biologiques sériques, comme le TNF (acronyme de la terminologie anglaise pour *Tumor necrosis factor*). Les antigènes issus des gènes de classe III ne jouent pas de rôle dans le rejet du greffon (Murphy K., 2011).

Le polymorphisme des CMH de classe I et II est fortement lié au rejet des greffes. C'est pourquoi leur caractérisation préalable et leur appariement entre le donneur et le receveur sont essentiels pour assurer la survie à long terme du greffon.

1.2.1.1 *La réponse immunitaire*

On distingue trois types cellulaires majeurs impliqués de manière active dans le système immunitaire : les lymphocytes T, B, et les phagocytes. Les lymphocytes sont impliqués dans les mécanismes de défense spécifiques tandis que les phagocytes se partagent les défenses innées. Toutes les cellules du système immunitaire originent de cellules souches hématopoïétiques (cellules présentes dans la moelle osseuse). Ces cellules souches peuvent se différencier en cellules progénitrices, qui donneront ensuite naissance à différents types cellulaires. Les progénitrices lymphoïdes donnent naissance aux lymphocytes et aux cellules NK. Les progénitrices myéloïdes sont les précurseurs des granulocytes, des macrophages, des cellules dendritiques et des mastocytes du système immunitaire (Murphy K., 2011).

Les cellules dites « phagocytaires », telles que les macrophages et les cellules dendritiques ont pour rôle de présenter des antigènes étrangers aux lymphocytes T afin de générer une réponse immunitaire. Elles représentent l'immunité innée et sont résidentes de nombreux tissus dans l'organisme comme la peau. D'autres types cellulaires comme les neutrophiles, les mastocytes et les cellules NK (« Natural Killer ») seront aussi impliqués dans certaines fonctions du système immunitaire, mais ne seront pas discutés dans ce présent document. Les lymphocytes T et B, sont les cellules responsables de la reconnaissance spécifique des antigènes. On retrouve deux types de lymphocytes T : (1) les CD4+, aussi appelés T « helper », qui ont comme fonction principale d'activer les autres lymphocytes en sécrétant des protéines solubles appelées cytokines et (2) les CD8+, qui ont une activité cytolytique et éliminent les cellules étrangères ou les cellules infectées par un virus ou un parasite intracellulaire. Les lymphocytes B sécrètent, pour leur part, des anticorps spécifiques aux antigènes étrangers et servent de cellules présentatrices d'antigène (CPA) en captant les protéines circulantes pour activer une réponse immunitaire (Murphy K., 2011).

Le système immunitaire possède ainsi plusieurs caractéristiques qui augmentent son efficacité. En premier lieu, la spécificité de reconnaissance des antigènes discrimine entre les antigènes du soi et ceux du « non-soi » et élimine ainsi les invasions étrangères. Les lymphocytes stimulés possèdent aussi une « mémoire » qui leur permet de répondre rapidement à une rencontre subséquente du même antigène.

1.2.1.2 *Les différents types de transplantation*

Plusieurs types de transplantation peuvent être définis en fonction de l'espèce et de la provenance des tissus greffés et des receveurs (Murphy K., 2011) :

1. **Autogreffe** : le donneur et le receveur sont le même individu. Les tissus transplantés ne sont pas rejetés.
2. **Isogreffe** : transplantation de tissus entre individus génétiquement identiques. Ce type de greffe peut s'effectuer chez l'humain, lorsque les sujets sont des jumeaux identiques (monozygote), ou chez les animaux, lorsqu'on est en présence de souches syngéniques. Les CMH de ces individus sont identiques et il n'y a pas de rejet immunitaire.
3. **Allogreffe** : transplantation de tissus entre individus génétiquement non-identiques, appartenant à une même espèce. Dans la plupart des cas, ces tissus transplantés seront rejetés par le système immunitaire à cause des polymorphismes des CMH et d'autres antigènes mineurs.
4. **Xénogreffe** : transplantation entre individus d'espèces différentes. Ce type de greffe est rejeté très rapidement.

1.2.1.3 *Les aspects du rejet de greffe*

Le rejet des greffes est principalement médié par une réponse immune spécifique de type cellulaire contre les antigènes allogéniques exprimés sur les cellules du greffon, tel qu'illustré à la figure 1.1. Le rejet se divise en deux phases principales : (1) la phase de sensibilisation, qui correspond à l'activation des lymphocytes et (2) la phase effectrice, dans laquelle la destruction du tissu greffé prend place.

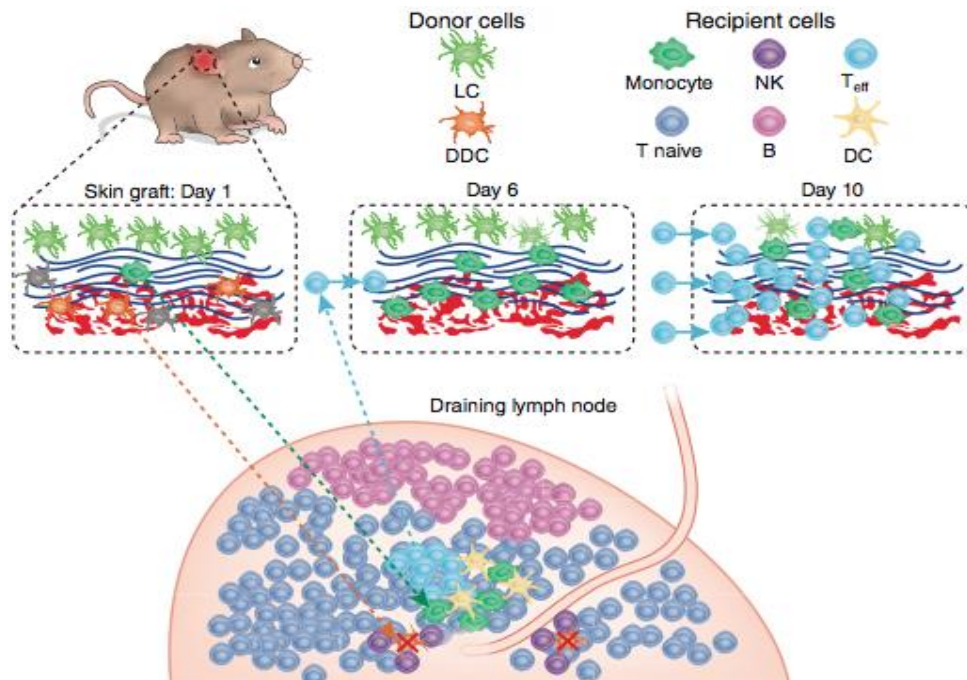


Figure 1.2 : Représentation schématique des mécanismes de rejet de greffes cutanées. Figure tirée de Cahalan MD. Imaging transplant rejection: a new view. Nat Med. 2011;17(6):662-3 (Cahalan M. D., 2011)

Dynamique cellulaire dans le rejet de la peau. L'image du site de la greffe de peau (en haut à gauche) et la participation des cellules donneuses et du greffon (en haut à droite) discuté par Celi et coll. (Celi S. et al., 2011). Le premier jour de greffe (encadré gauche), les monocytes (vert) migrent vers le greffon, et les cellules dendritiques dermiques du donneur disparaissent peu à peu (orange devient gris) éliminé par les cellules NK, laissant les cellules dendritiques (vert clair), les fibres de collagènes (bleu) et les vaisseaux lymphatiques (rouge) intacts. Dans le ganglion lymphatique (en bas), les monocytes (vert), ainsi que les cellules dendritiques (jaune) de l'hôte vont agir en tant que cellule présentatrice d'antigène (CPA) afin d'activer une réponse immunitaire spécifique, laquelle fera intervenir essentiellement les lymphocytes T (bleu foncé). La reconnaissance spécifique des antigènes étrangers par des lymphocytes les activera, devenant ainsi des cellules dites effectrices (bleu clair) qui migreront jusqu'au greffon. Au jour 6 (encadré central), une infiltration immunitaire massive de monocyte se produit, suivie par les lymphocytes T effecteurs (CD4 et CD8). Au jour 10 (encadré de droite), les lymphocytes T CD8 ont détruit les cellules étrangères du greffon menant à la nécrose et au rejet.

Pendant la phase de sensibilisation, la présentation des antigènes allogéniques aux lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ mène à leurs activations, ce qui induit leurs proliférations. Cette présentation peut s'effectuer par les cellules du donneur et/ou les cellules de l'hôte, déterminant une présentation directe ou indirecte respectivement (Richard A. Goldsby Thomas J. Kindt, Barbara A. Osborne, Janis Immunology Kuby 2000). La réponse directe implique les leucocytes passagers issus du tissu greffé. Ces leucocytes sont des CPA exprimant les CMH du donneur. Suite à la greffe, ces CPA migrent aux nœuds lymphatiques ou autres organes lymphoïdes secondaires, où elles activeront les cellules T

CD4+ « helper ». La réponse indirecte, quant à elle, se produit à cause des bris tissulaires engendrés par l'implantation du greffon, ce qui entraîne la phagocytose de protéines allogéniques par les CPA du receveur. Ces CPA vont ensuite migrer aux organes lymphoïdes secondaires pour les présenter aux cellules T « helper » et ainsi les activer (Murphy K., 2011).

La phase effectrice se compose d'une variété de mécanismes dont les plus communs seront les réactions d'hypersensibilités retardées et la réaction de cytotoxicité induite par les lymphocytes T CD8+. Les réactions d'hypersensibilité retardée sont causées par la sécrétion de certaines cytokines par les T CD4+ « helper » qui induisent une forte réaction inflammatoire localisée. Cette réaction est caractérisée par un influx massif de cellules inflammatoires, où les macrophages sont les principaux intervenants, provoquant le dommage du tissu greffé. Suite à l'activation spécifique des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (CTL) par les CPA du donneur ou du receveur, ainsi que par les T « helper », les CTL prolifèrent et migrent dans la circulation pour trouver leur cible. Lorsqu'un CTL reconnaît sa cible en reliant son TCR avec le CMH de classe I des cellules du greffon, il détruit cette dernière, soit en induisant l'apoptose par Fas, soit en relâchant des enzymes (perforine et granzyme) qui percent la membrane et fragmentent l'ADN (Murphy K., 2011). Ainsi, le meilleur moyen pour vérifier si un tissu greffé est en processus de rejet est d'effectuer une biopsie et de vérifier la présence de lymphocytes infiltrants par immunohistochimie.

Des mécanismes moins communs de la phase effectrice de rejet sont la lyse par le système du complément et l'ADCC (acronyme de la terminologie anglaise pour *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*). Le système du complément fait partie de l'immunité innée et est composé de 35 protéines, dont 12 seront directement impliquées dans l'élimination des pathogènes. Ainsi, lorsque des anticorps spécifiques, produits par les lymphocytes B, se fixent aux antigènes du greffon, il y a activation d'une cascade du complément qui mène à la lyse de la cellule cible. Lors de l'ADCC, les anticorps liés à leur cible pourront activer certaines cellules cytotoxiques, telles que les cellules NK, les macrophages, les monocytes, les neutrophiles et les éosinophiles, via leur récepteur à la région Fc des immunoglobulines. La majorité de ces cellules lyseront leur cible en relâchant des enzymes cytolytiques ou en sécrétant le TNF (Murphy K., 2011).

1.2.1.4 Les types de rejet

On distingue trois types de rejet immunitaire suite à une greffe : le rejet hyperaigu, aigu et chronique.

Le rejet hyperaigu peut apparaître dans les premières minutes suivant la greffe et concerne uniquement les greffes vascularisées. Ce rejet, très rapide, est caractérisé par une thrombose des vaisseaux ce qui provoque la nécrose du greffon. Ce rejet est dû à la présence chez le receveur d'anticorps anti-donneur préformés. Il n'y a pas dans ce cas d'infiltration cellulaire au niveau du greffon. Les anticorps entraînent l'activation du complément et une stimulation des cellules endothéliales qui vont sécréter, entre autres, le facteur procoagulant Von Willebrand provoquant l'adhésion et l'agrégation des plaquettes. Cette série de réactions va engendrer une thrombose intravasculaire aboutissant à la formation des lésions et à la perte du greffon (Cai J. et al., 2005; Cai J. et al., 2005).

Le rejet aigu peut survenir une semaine à plusieurs mois après la transplantation selon le site de greffe. Ce rejet cellulaire implique une réponse immunitaire spécifique médiée par les lymphocytes du receveur contre les antigènes allogéniques du donneur dans un contexte CMH et est diagnostiqué par une biopsie de l'organe greffé (Marks R. et al., 2006). Actuellement, grâce aux traitements immunosuppresseurs, les épisodes de rejet aigu surviennent dans moins de 15 % des transplantations chez les patients non immunisés (Marks R. et al., 2006). Le rejet aigu peut être le résultat de deux mécanismes immunologiques qui peuvent agir seuls ou ensemble :

- un processus dépendant des lymphocytes T, CD4+ et CD8+, qui correspond au rejet cellulaire aigu ;
- un processus dépendant des lymphocytes B générant le rejet humoral aigu.

Le rejet chronique survient plusieurs mois voire plusieurs années après la transplantation durant lesquelles les fonctions du greffon apparaîtront normales. Il n'existe à l'heure actuelle aucun médicament permettant de contrer ce phénomène qui se produit chez 50 % des patients transplantés (Hayry P. et al., 1993). Le rejet chronique est caractérisé par une occlusion lente, constante et irréversible des artères, des veines et des autres structures tubulaires du tissu greffé. Cette occlusion vasculaire finira par atteindre un point critique, causant une ischémie menant à la nécrose et la fibrose tissulaire.

Les mécanismes physiopathologiques du rejet chronique impliquent des facteurs non-immunologiques et immunologiques. Les facteurs non-immunologiques peuvent être liés au greffon (lésions induites par le stress oxydatif de l'ischémie/reperfusion), à l'hôte (âge, hypertension artérielle, infections, hyperlipidémie) et aux traitements immunosuppresseurs (toxicité directe sur le greffon). Tandis que les facteurs immunologiques incluent le taux de compatibilités CMH entre le donneur et le receveur, la présence préalable d'anticorps anti-CMH, les épisodes de rejet aigu et un traitement immunosuppresseur suboptimal. Le rejet chronique ne peut pas être contrôlé par les traitements immunosuppresseurs disponibles et est actuellement la principale cause d'échec des transplantations.

1.2.2 La transplantation et la tolérance immunologique

1.2.2.1 *Les immunosuppresseurs*

L'emploi d'immunosuppresseurs permet la survie prolongée des greffons. Toutefois, malgré le développement de nouvelles formulations chimiques d'immunosuppresseurs de plus en plus efficaces pour contrôler le rejet cellulaire, leur usage s'accompagne d'effets secondaires néfastes. En effet, les patients sous traitement immunosuppresseur sont plus sujets aux infections et au développement de cancer, puisque tout leur système de défense est déprimé, dû à l'action non spécifique de ces drogues. De plus, l'emploi de certains immunosuppresseurs peut être néphrotoxique et neurotoxique (Klintmalm G. B. et al., 1995; McCauley J., 1993; Wijdicks E. F. et al., 1994).

Dans le but d'augmenter la spécificité de l'immunosuppression, certains anticorps monoclonaux ou polyclonaux ont été développés. La plupart d'entre eux sont dirigés contre des récepteurs sur les lymphocytes, plus particulièrement les T, provoquant la chute de leur nombre. Ces anticorps sont surtout utilisés lors d'épisodes de rejet aigu, car leur emploi est associé à des effets secondaires importants comme des réactions allergiques et un risque élevés d'infections.

1.2.2.2 *La tolérance immunitaire*

La tolérance se définit comme l'absence de réactivité immunitaire destructrice envers des antigènes spécifiques étrangers. On distingue deux types de tolérance (Murphy K., 2011) :

- La tolérance centrale qui aboutit à la délétion clonale de lymphocytes réactifs vis-à-vis les antigènes du soi, au niveau du thymus pour les lymphocytes T, ou au niveau de la moelle osseuse pour les lymphocytes B. L'acquisition de la tolérance centrale se déroule lors des processus de différenciation des lymphocytes T et B.
- La tolérance périphérique qui repose sur plusieurs mécanismes dont notamment la suppression de la réponse immune par les lymphocytes T régulateurs.

L'induction d'une tolérance immunitaire dite « périphérique » au greffon serait une situation idéale, car elle ne nécessiterait pas l'emploi d'immunosuppresseurs, tout en maintenant l'immunocompétence de l'hôte. Théoriquement, l'acceptation des greffons pourrait perdurer tout au long de la vie du patient à l'instar des immunosuppresseurs qui permettent la survie prolongée des organes greffés. Cette tolérance peut résulter du manque de signaux de costimulation sur la CPA lors de la formation du complexe peptide/CMH avec un lymphocyte T. Les lymphocytes partiellement activés deviendront anergiques, c'est-à-dire, qu'ils ne pourront induire de réponse immune complète même lors d'une restimulation ultérieure avec ce même antigène. Un second mécanisme implique la présence de lymphocytes T régulateurs, souvent abrégés « Treg », soit naturels (produit par le thymus) ou induits (produits en périphérie).

Les Treg naturels jouent un rôle important dans l'établissement de la tolérance foeto-maternelle. Ils ont été identifiés comme étant une sous-population lymphocytaire T CD4+. Ils expriment constitutivement la chaîne alpha du récepteur à l'interleukine 2, le CD25, ainsi que le facteur de transcription FoxP3 (Forkhead box3) dont le niveau et la stabilité corréleront avec leur fonction suppressive. Les Treg naturels sont donc identifiés comme étant CD4+, CD25+ et FoxP3+ (Murphy K., 2011). Toutefois, l'expression de FoxP3 chez l'homme n'est pas limitée aux Treg naturels. En effet, les lymphocytes T activés peuvent exprimer faiblement et transitoirement FoxP3 sans pour autant posséder de fonction suppressive.

Les lymphocytes Treg induits se développent dans la périphérie à partir de lymphocytes T CD4+ naïfs. Ils ont pour rôle de contrôler les lymphocytes T naïfs autoréactifs ayant échappé à la sélection thymique. La perte de ces cellules peut être associée à des maladies auto-immunes et inflammatoires chroniques, surtout au niveau du tube digestif où elles jouent un rôle important dans le maintien de la flore microbienne. La fonction suppressive de ces lymphocytes Treg induits passe entre autres par l'IL-10, leur capacité à réduire la production d'IL-2, ainsi que dans leur capacité à réduire le niveau d'expression des molécules du CMH et des molécules costimulatrices des CPA (Murphy K., 2011).

Les travaux expérimentaux présentés au chapitre 2 ont permis de mettre en évidence le devenir spécifique des fibroblastes et des kératinocytes en condition de greffe allogénique et xénogénique dans un modèle de substitut cutané bilamellaire produit selon la méthode d'auto-assemblage.

1.3 La biodisponibilité et les techniques de production des substituts cutanés

Les substituts cutanés ont été développés afin d'améliorer la prise en charge des grands brûlés. Tout commença en 1975 par la découverte de la culture des cellules épithéliales cutanées puis deux années plus tard par la mise au point d'une technique de production de feuillet épidermique (Rheinwald J. G. et al., 1975; Rheinwald J. G. et al., 1977). Puisque ceux-ci pouvaient être autologues, ils ont eu pour nom « *cultured epithelial autograft* (CEA) ». Cette technique a révolutionné la prise en charge des grands brûlés, car elle permet de reconstituer l'architecture initiale de la couche superficielle de la peau (épiderme), en employant des kératinocytes propres au patient lorsque les autogreffes ne sont pas en nombre suffisant pour recouvrir les plaies du patient.

Dans certaines situations, les cultures de kératinocytes seuls sont insuffisantes, que ce soit en termes de prise de greffe ou du résultat fonctionnel et esthétique, dû essentiellement à l'absence du derme. En effet, *in vivo*, on note une forte interrelation physiologique entre le derme et l'épiderme. Par exemple, une réponse de type inflammatoire induite par la sécrétion de cytokines de l'épiderme stimulera la production de facteurs de croissance au niveau des fibroblastes, qui à leur tour vont

stimuler la prolifération des cellules épidermiques (Dantzer E. et al., 2003; Idrus R. B. et al., 2014; van Zuijlen P. P. et al., 2001). Par conséquent, afin de remédier au manque d'activité physiologique d'un simple épithélium cutané, différents laboratoires ont développé des tissus associant une base dermique et épidermique, soit des fibroblastes et des kératinocytes autologues et/ou allogéniques.

La technique traditionnelle de bio-ingénierie tissulaire, illustrée à la figure 1.2 à la page suivante, emploie l'approche dite « *Top-down* », laquelle consiste à ensemercer des cellules sur un échafaudage de polymère biosynthétique (l'acide polyglycolique (PGA)) ou biologique (collagène), qui servira à recréer le tissu conjonctif, ou encore à décellularisé un tissu.

L'approche inverse, dite « *Bottom-up* » se distingue de la technique précédente par l'utilisation de sous-unités structurales biomimétiques qui seront assemblées afin d'obtenir une structure plus large ou complexe. Ces sous-unités seront produites par différentes techniques, telles que l'agrégation cellulaire (Dean D. M. et al., 2007), la microfabrication à base d'hydrogel (Yeh J. et al., 2006), la création de feuillets cellulaires par auto-assemblage (L'Heureux N. et al., 1998) ou encore la bio-impression (Mironov V. et al., 2003). Une fois ces sous-unités créées, elles peuvent être assemblées en unités plus larges ou complexes par des méthodes, telles que l'assemblage aléatoire (McGuigan A. P. et al., 2006; McGuigan A. P. et al., 2006; McGuigan A. P. et al., 2007; McGuigan A. P. et al., 2008) ou dirigé (Du Y. et al., 2008) et la superposition de feuillets (L'Heureux N. et al., 1998; L'Heureux N. et al., 2007).

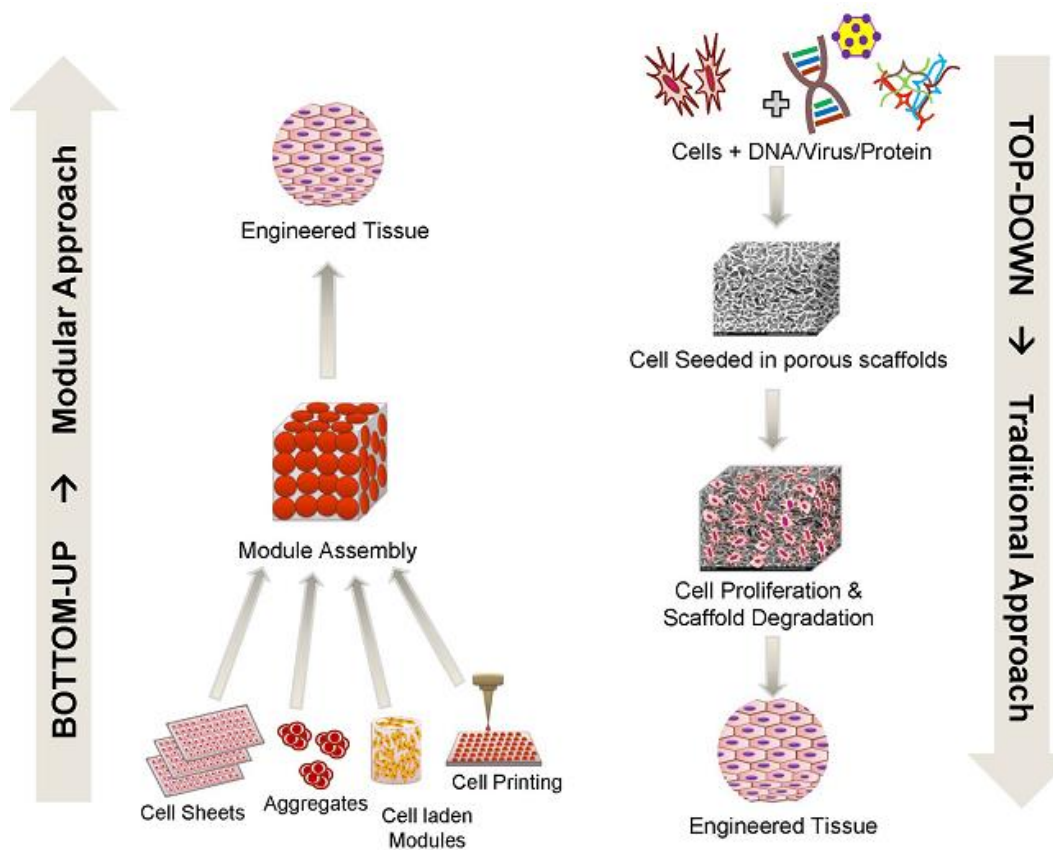


Figure 1.3 : Le génie tissulaire selon l'approche Bottom-up vs. Top-down. Figure tirée de Tiruvannamalai-Annamalai R, Armant DR, Matthew HWT (2014) A Glycosaminoglycan Based, Modular Tissue Scaffold System for Rapid Assembly of Perfusable, High Cell Density, Engineered Tissues. PLoS ONE 9(1): e84287. doi:10.1371/journal.pone.0084287 (Tiruvannamalai-Annamalai R. et al., 2014)

La traditionnelle approche « *Top-down* » (droite) implique l'ensemencement de cellules à l'intérieur d'une matrice artificielle poreuse. Cette approche pose de nombreuses limitations comme une vascularisation ralentie, une migration et un défaut de distribution cellulaire. En revanche, l'approche modulaire ou « *Bottom-up* » (à gauche) implique l'assemblage de petits modules (collagène, cellules agrégées) pour former de plus grandes structures et ainsi éliminer les défauts identifiés de l'approche traditionnelle.

1.3.1 L'approche dite « *Top-Down* »

Tout a débuté en 1978 dans le laboratoire d'E. Bell au MIT (acronyme de la terminologie anglaise pour *Massachusetts Institute of Technology*) à Boston (Bell E. et al., 1979). Un de ces étudiants cultiva des fibroblastes dans une matrice de gel de collagène et constata que ces cellules interagissaient avec les fibres de collagène. Une rétraction du gel se produisit pour former progressivement un disque résistant

au sein duquel les fibroblastes développaient de longs prolongements cellulaires, s'accrochant aux fibres de collagène, exactement comme ils le font *in vivo* dans la peau humaine. Cette découverte a été à l'origine du développement de la bio-ingénierie cellulaire.

Les premiers travaux réalisés ont permis de montrer que les fibroblastes cultivés dans ces matrices se rapprochaient de ceux de la peau humaine. En effet, une fois inclus dans ces matrices, ils ne se divisent que pendant 5 ou 6 jours, puis une inhibition des mitoses se manifeste alors que ces cellules restent bien séparées les unes des autres tout au long de la culture (Sarber R. et al., 1981). Ces résultats ont contribué au développement de quatre grands modèles de tissu cutané basés soit sur le gel de collagène développé dans le laboratoire d'E. Bell, soit d'éponge développée par l'équipe de Yannas et Burke, soit de polymère biosynthétique ou soit de la décellularisation de peaux natives.

1.3.1.1 Le modèle de gel de collagène

Le premier modèle d'équivalents dermiques a été développé par l'association des constituants cellulaires et protéiques principaux du derme soient les fibroblastes et le collagène d'origine animale, humaine ou recombinante (Auger F. A. et al., 1995; Bell E. et al., 1979; Browne Shane et al., 2013; Karasek M. A. et al., 1971). Afin d'obtenir un substitut cutané, une suspension de kératinocytes estensemencée à la surface du derme reconstruit permettant ainsi d'obtenir un épiderme. Le substitut cutané est alors porté à l'interface air-liquide pour amener les kératinocytes à se différencier et former un épithélium stratifié comprenant des desmosomes et des tonofilaments (Bell E. et al., 1981; Prunieras M. et al., 1983). Des éléments nutritifs fournis par la matrice de collagène contribuent à cette différenciation (Benathan M. et al., 1998). Toutefois, ce modèle possède une faible résistance aux collagénases.

1.3.1.2 Le modèle d'éponge

Le premier modèle d'éponge a été développé par l'équipe de Yannas et Burke (Burke J. F. et al., 1981). La matrice dermique est obtenue en lyophilisant un gel de collagène bovin et de chondroïtines-6-sulfate, dont la structure est maintenue par des liens covalents avec du glutaraldéhyde. L'ajout de fibroblastes dermiques au sein de l'éponge, ainsi que de kératinocytes, par-dessus cette matrice

dermique, permet de reconstruire un substitut cutané bilamellaire (Boyce S. T. et al., 1988; Hansbrough J. F. et al., 1989). Un autre type d'éponge a été développé en liant ioniquement du collagène bovin à des chondroïtines par du chitosane, un polysaccharide non-toxique contrairement au glutaraldéhyde (Berthod F. et al., 1993; Damour O. et al., 1994; Saintigny G. et al., 1993; Shahabeddin L. et al., 1990). Les liaisons ioniques entre le chitosane et les autres composantes sont responsables des bonnes propriétés mécaniques de l'éponge (Berthod F. et al., 1993). Le réseau de collagène de ces éponges prévient la contraction en diamètre permettant ainsi d'obtenir une production plus reproductible. Ces peaux reconstruites, après greffe sur des modèles animaux, se révèlent être biocompatibles avec la présence d'une membrane basilaire bien formée, des fibrilles d'ancrage d'apparence normale et l'expression d'antigènes propres à la peau (Boyce S. T. et al., 1988; Boyce S. T. et al., 1993; Harriger M. D. et al., 1995).

1.3.1.3 Le modèle de polymères biosynthétiques

Les polymères biosynthétiques sont facilement manufacturables et possèdent de bonnes propriétés de conservation. Ils sont donc particulièrement appréciés pour leur biodisponibilité dans un contexte où le temps d'intervention influe grandement sur le taux de survie des patients.

La conception de supports dermiques résorbables, comme le PGA, qui est plus résistant à la dégradation enzymatique, permet à la matrice d'être colonisée plus efficacement par les fibroblastes avant qu'elle ne soit résorbée (Cooper M. L. et al., 1991). Par contre, le processus de cicatrisation est retardé dû au support moins adapté à la migration cellulaire.

1.3.1.4 Les dermes décellularisés

Un derme décellularisé peut être obtenu par des méthodes enzymatiques, physiques ou chimiques. Le but de ces techniques est d'enlever toutes traces cellulaires tout en conservant l'architecture micro- et macro- moléculaire du tissu d'origine. Ces tissus décellularisés peuvent être transplantés sans rejet significatif puisque les composants non-cellulaires du derme possèdent une faible immunogénicité. Par contre, ces techniques ne permettent pas d'éliminer à 100 % toutes traces cellulaires. En effet, des traces résiduelles d'ADN, de l'ordre de 1 à 3 %, vont persister (Capito A. E. et al., 2012).

Ces dermes ont été utilisés pour des études physiologiques ou physiopathologiques. En effet, ce modèle a permis d'étudier la rétraction des fibroblastes, fonction cellulaire qui n'était pas facile à étudier à cette époque. Il a aussi permis d'étudier les interactions cellules/matrice extracellulaire. L'ajout d'un épiderme à ce modèle a pu voir le jour suite aux travaux de H. Green, en 1975, qui a décrit, trois années auparavant, avec J. Rheinwald, une méthode permettant de cultiver et surtout de sous-cultiver de grandes quantités de kératinocytes en co-culture avec des fibroblastes murins, les 3T3 préalablement irradiées (Rheinwald J. G. et al., 1975). Il n'a donc pas été surprenant qu'E. Bell et son équipe ajoutent une composante épidermique sur leur modèle de gel de collagène dès 1981 (Bell E. et al., 1981). L'intérêt principal de ce modèle bilamellaire (derme + épiderme) aura été de pouvoir étudier les interactions entre ces deux couches tout d'abord avec des cellules de peaux saines, puis pathologiques. Plus tard, ces différents modèles ont été utilisés extensivement en clinique pour la gestion de plaies cutanées.

1.3.2 L'approche dite « *Bottom-up* »

L'origine historique de cette approche remonte aux techniques de microencapsulation, comme l'encapsulation de cellules d'îlots pancréatiques dans du gel d'alginate (Lim F. et al., 1980). Chaque cellule microencapsulée agit comme une unité fonctionnelle qui lorsqu'assemblée avec d'autres capsules agira comme une structure artificielle biologique. Cependant, cette technique ne crée pas de structure tissulaire capable de mimer le tissu natif, car il manque une microvasculature et une matrice extracellulaire.

1.3.2.1 *Le modèle par auto-assemblage*

Ce modèle repose sur la capacité des fibroblastes dermiques à sécréter et à assembler leur propre matrice extracellulaire. Ceci est possible seulement en présence d'acide ascorbique, plus communément appelé vitamine C, qui est un cofacteur enzymatique hydrosoluble que le corps humain ne peut synthétiser (Chatterjee I. B., 1978). L'acide ascorbique est indispensable à la réaction d'hydroxylation nécessaire à la synthèse de l'hydroxyproline et l'hydroxylysine (Cardinale G. J. et al., 1974). L'hydroxyproline est essentielle dans le maintien de la structure en triple hélice du collagène (Shoulders M. D. et al., 2009) puisqu'un minimum de 35 % des résidus prolyl dans le collagène est

hydroxylé (Rosenbloom J. et al., 1973). Ainsi, l'absence de cette vitamine rendra la structure du collagène instable (Berg R. A. et al., 1973; Jimenez S. et al., 1973). L'hydroxylysine est, quant à elle, nécessaire à la formation des réticulations intermoléculaires dans le collagène (Eyre D. R., 1980).

En moyenne, trois à quatre semaines de culture *in vitro* de fibroblastes dermiques en présence d'acide ascorbique sont nécessaires afin d'obtenir un feuillet dermique manipulable. L'épaisseur de ce derme reconstruit pourra être modulée par l'empilement de plusieurs feuillets dermiques, lesquels fusionneront par remodelage matriciel qui s'effectue grâce à des métalloprotéinases, enzymes synthétisées par les fibroblastes, ainsi que par les kératinocytes, capables de dégrader la matrice extracellulaire. Une fois le derme reconstruit, il sera possible d'ajouter des cellules épithéliales afin d'obtenir un substitut cutané bilamellaire (derme + épiderme) exempt de matériaux exogènes (L'Heureux N. et al., 1998; Michel M. et al., 1999).

1.3.2.2 *Le modèle par bio-impression*

La bio-impression est une technique automatisée assistée par ordinateur qui permet la déposition prédéfinie de cellules vivantes, biomatériaux et facteurs de croissance grâce à des systèmes de type extrusion, de jet d'encre, de laser ou encore de microvalves (Chua C.K. and Yeong, W.Y., 2015), afin de fabriquer un tissu tridimensionnel ressemblant au natif sur demande avec un haut degré de flexibilité et de répétabilité (Murphy S. V. et al., 2014). Cette technique permet de paramétrer des micro environnements caractéristiques, tels que les crêtes épidermiques et modulations de surface, et ainsi recréer un tissu possédant des propriétés mécaniques et biochimiques paramétrables à volonté pouvant jouer un rôle dans l'alignement et la différenciation cellulaire (Guillot B. et al., 2011). De nombreux biomatériaux ont été évalués, incluant des polymères (Lee Sanghyun et al., 2016; Vaezi Mohammad et al., 2015), métaux (Sing Swee Leong et al., 2016; Sing Swee Leong et al., 2016; Sing S. L. et al., 2016), hydrogels (Murphy Sean V. et al., 2013; Ng Wei Long et al., 2016) et céramiques (Yeong W. Y. et al., 2013). À date, les techniques par laser et microvalve ont été utilisées afin de reconstruire des tissus cutanés bilamellaires (derme et épiderme) dont le collagène est la base matricielle (Koch Lothar et al., 2012; Lee Vivian et al., 2013; Lee Wonhye et al., 2009; Michael Stefanie et al., 2013).

Odde et Renn ont été les premiers à introduire la technique de bio-impression assistée par laser sous le nom de « *Laser-Guided Direct Writing* » en 2000 (Odde D. J. et al., 2000). Ce dispositif comporte un rayon laser et un système de focalisation qui permet de guider la déposition des cellules vivantes sur un substrat à une localisation précise. Toutefois, un contact prolongé et direct au laser influe négativement sur la survie cellulaire (Odde D. J. et al., 2000). Ainsi, un procédé à l'origine appliqué aux métaux intitulé « *Laser-Induced Forward Transfer (LIFT)* », signifiant transfert induit par laser a été adapté à la bio-impression. Le LIFT consiste à décoller sélectivement une couche mince de matériau sous forme de goutte dont la taille peut être ajustée et à la déposer sur un substrat sous l'effet d'un rayonnement laser (Skardal A. et al., 2015). Cette configuration présente un taux de survie cellulaire supérieur à 95 % puisque les cellules ne sont pas en contact direct avec le rayon laser.

Le type jet d'encre ou extrusion utilise, quant à lui, des cartouches semblables au système d'impression à encre traditionnelle, à l'exception que celles-ci sont chargées indépendamment avec des cellules et biomatériaux. Ce système commandé par informatique génère une pression au niveau des cartouches afin de créer un flux liquidien qui sera, par la suite, distribué en goutte soit par un système thermique ou piézoélectrique (Faulkner-Jones A. et al., 2013; Malda J. et al., 2013). Contrairement au procédé de type jet d'encre, la technique par extrusion ne génère pas de goutte pour disposer les cellules ou biomatériaux, mais un flux liquidien continu contrôlé par un système de pression (Skardal A. et al., 2015). L'approche la plus courante dans ce procédé est l'utilisation d'un polymère thermosensible qui se fluidifie lorsque chauffé et redevient solide lorsque refroidie, tel que le polycaprolactone. Toutefois, même si ce matériau possède de bonnes propriétés mécaniques et mime la physiologie native, il ne permet pas la déposition simultanée des cellules lors de la bio-impression.

Les systèmes de bio-impression reposent sur la polymérisation rapide des biomatériaux qui sont déposés soit goutte à goutte, soit en flux continu avec la composante cellulaire, permettant ainsi la stabilisation de la structure sur un plan tridimensionnel (Skardal A. et al., 2015). Parmi les biomatériaux les plus utilisés, on retrouve le collagène, les gels d'alginate et de fibrines, ainsi que les hydrogels (Moon S. et al., 2010; Nakamura M. et al., 2010).

De manière générale, la traditionnelle approche « *Top-down* » implique l'ensemencement de fibroblastes à l'intérieur d'une matrice artificielle ou native décellularisée poreuse. Cette approche

innovante et très documentée possède, toutefois, certaines limitations, telles qu'une vascularisation ralentie après greffe comparativement à une autogreffe, une migration et une distribution cellulaire dermique hétérogène *in vitro*. L'approche modulaire ou « *Bottom-up* », quant à elle, implique le plus souvent la synthèse et l'assemblage matriciel par les cellules elles-mêmes afin de reconstituer le derme. Cette approche « jugée » plus physiologique veut ainsi éliminer les défauts identifiés de l'approche traditionnelle. L'autre aspect moins discuté dans le développement de ces différents substituts concerne leurs propriétés mécaniques. En effet, ces propriétés dépendent directement de la composition et de l'architecture de la matrice extracellulaire et seront ainsi quelque peu variables d'une technologie à l'autre. Afin d'apporter quelques éclaircissements sur ces propriétés, la section suivante vous donnera les notions importantes pour comprendre l'importance et la complexité de ces propriétés.

1.3.3 Les propriétés mécaniques de la peau

La peau humaine est connue comme un matériau de comportement mécanique complexe. Il est non linéaire, viscoélastique, anisotrope et de pré-tension. Les propriétés varient en fonction des localisations anatomiques (Gniadecka M. et al., 1994) et tendent à diminuer lors du vieillissement (Agache P. G. et al., 1980; Finlay B., 1970).

1.3.3.1 *La déformation non-linéaire*

C'est en 1861 que Langer a conclu que l'extension de la peau n'est pas proportionnelle à la force appliquée (Langer K., 1861). La non-linéarité de la relation force-déplacement est caractérisée par quatre phases différentes (Wilkes G. L. et al., 1973). Tout d'abord, une grande extension de la peau se manifeste après une faible traction. Cette déformation est environ de 50 % chez des enfants et 30 % chez des personnes âgées. Ce comportement est dû à la réorientation des fibres d'élastines qui sont initialement irrégulièrement réparties dans la couche réticulaire du derme. En deuxième phase, les fibres de collagènes possédant une grande résistance commencent à se déformer, ceci caractérise la rigidité cutanée. La troisième phase est caractérisée par une stabilisation de la rigidité. Une relation linéaire a été trouvée. La dernière phase est la phase de rupture. Cette dernière phase n'est évidemment pas identifiée *in vivo*. La non-linéarité a été démontrée plus tard par plusieurs équipes *in*

vivo avec diverses techniques (Delalleau A. et al., 2006; Diridollou S. et al., 2000; Hendriks F. M. et al., 2003; Zheng Y. et al., 1999).

1.3.3.2 *La viscoélasticité*

En rhéologie, science qui étudie les déformations et l'écoulement de la matière, le comportement d'un matériau viscoélastique est intermédiaire entre ceux d'un solide élastique idéal symbolisé par un ressort, dont l'allongement est proportionnel à la force soumise et celui d'un liquide visqueux newtonien, caractérisé par une vitesse de déformation linéaire. L'élasticité d'un matériau traduit sa capacité à conserver et restituer de l'énergie après déformation. La viscosité d'un matériau traduit sa capacité à dissiper de l'énergie. Les polymères comme la plupart des matériaux ont un comportement viscoélastique.

Les évaluations de la viscoélasticité de la peau humaine *in vivo* ont démontré que son comportement visqueux était essentiellement dû à l'hydratation dermique, à la présence d'une faible concentration de mucopolysaccharides et de l'acide hyaluronique au niveau de la matrice extracellulaire (Wilkes G. L. et al., 1973).

1.3.3.3 *La pré-tension et l'anisotropie*

L'état de pré-tension ou de tension naturelle, ainsi que l'anisotropie de la peau ont été encore une fois démontré par les travaux de Langer en 1861 (Langer K., 1861). Après avoir découpé à l'aide d'un outil chirurgical circulaire, plusieurs morceaux de peau de diamètre connu, il a caractérisé morphologiquement les plaies et explants cutanés.

L'apparence ovalaire des plaies et explants a dans un premier temps défini l'anisotropie du tissu. Par la suite, la mesure des diamètres des axes principaux des plaies et des explants a révélé que les plaies étaient plus grandes que le diamètre de l'outil chirurgical et que les explants étaient, quant à eux, plus petits. D'un point de vue mécanique, ce sont les pré-tensions existantes dans la peau qui ont fait diminuer l'explant. Cet état de pré-tension naturelle est directement influencé par le réseau de fibres de collagène qui confère aux tissus une résistance mécanique à l'étirement, grâce à leur propriété contractile (Wilkes G. L. et al., 1973).

En travaillant sur plusieurs cadavres, Langer a dessiné un plan des lignes, « les lignes de Langer », selon lesquelles la peau est plus résistante à la tension (Langer K., 1861). Ce plan a été corrélé *in vivo* par la méthode de tension uni-axiale simple (Gibson T. et al., 1969; Stark H. L., 1977).

1.3.3.4 *L'hétérogénéité ultrastructurale des propriétés mécaniques de la peau*

La peau est constituée de trois couches principales dont la composition cellulaire et l'ultrastructure sont très différentes. Ainsi, l'épiderme, le derme et l'hypoderme contribueront différemment à la résistance et l'élasticité globale de la peau.

Tout d'abord, l'épiderme, la couche la plus externe, peut être subdivisé selon ses propriétés mécaniques en deux sous-couches, soit : (1) la couche cornée (partie morte) et (2) la partie vivante de l'épiderme. C'est la couche cornée de l'épiderme qui influera directement sur les propriétés mécaniques où l'influence de la partie vivante sera négligeable (Leveque J. L. et al., 1984). De plus, la contribution de la couche cornée au comportement mécanique de la peau humaine *in vivo* sera elle-même influencée par son hydratation (Leveque J. L. et al., 2013; Leyva-Mendivil M. F. et al., 2015). Le derme, quant à lui, est responsable de la résistance en tension de la peau (Wilkes G. L. et al., 1973). Son ultrastructure s'apparente à un réseau complexe tridimensionnel de fibres de collagène et élastiques. Mécaniquement, les fibres de collagène sont hautement résistantes, tandis que les fibres élastiques ont une grande extensibilité (Fung Yuan-Cheng, 1993). L'hypoderme n'a, pour sa part, aucune influence directe sur la résistance et l'élasticité de la peau humaine. Il pourra, cependant, absorber une partie de l'énergie mécanique sous forme d'énergie de déformation.

Les paramètres biomécaniques de la peau varient significativement avec l'âge (Agache P. G. et al., 1980; Leveque J. L. et al., 1980). Le module de Young, utilisé pour déterminer les propriétés élastiques d'un matériau, représente la constante qui relie la contrainte de traction (ou de compression) et le début de la déformation du matériau. Cette constante a été démontrée stable jusqu'à l'âge de 30 ans pour une valeur d'environ 4.2 MPa puis augmente rapidement de près de 50 % à 8.5 MPa caractérisant une diminution de l'élasticité de la peau laquelle est associée à une augmentation de la rigidité du derme (Agache P. G. et al., 1980; Grahame R. et al., 1969).

La matrice extracellulaire, les cellules dermiques et épidermiques auront un impact majeur sur les propriétés finales des peaux reconstruites. De plus, les différences mécaniques selon les sites anatomiques nécessitent préférentiellement des greffons ayant des capacités résorbables pouvant être aisément remodelées après greffe et ainsi s'intégrer à l'environnement physiologique du site de greffe. Toutefois, afin que le greffon soit accepté mécaniquement, il faut au minimum qu'il possède des propriétés comparables, voire supérieures à la peau du receveur. Les faibles propriétés mécaniques constatées après la greffe d'un épithélium cutané simple, par exemple, peuvent causer des hypertrophies et induire une mobilité diminuée des membres du receveur. Ce phénomène marque l'importance de contrôler les différentes propriétés mécaniques et de pouvoir s'approcher de celles d'un tissu natif. Ainsi, les travaux expérimentaux présentés au chapitre 4 étudient les propriétés mécaniques d'un modèle de substitut cutané bilamellaire produit selon la méthode d'auto-assemblage, ainsi que différentes voies d'optimisation de ces propriétés.

1.3.4 Les substituts cutanés : application clinique et modèle d'étude pour la recherche et développement (R&D)

Les substituts cutanés peuvent être acellulaires ou cellulaires. Les produits acellulaires, tels que les tissus conjonctifs décellularisés, contiennent une matrice extracellulaire formée majoritairement de collagène, de fibres élastiques, d'acide hyaluronique et de fibronectine. Ces tissus conjonctifs acellulaires peuvent différer de nombreuses manières, incluant l'espèce (animale, humaine), la source tissulaire (cutanée, péricarde, muqueuse intestinale), les additifs (antibiotique, surfactant), l'hydratation (déshydraté ou frais) et requièrent une préparation (rinçage, désinfection, réhydratation).

Les produits cellulaires contiennent, quant à eux, de nombreuses cellules telles que les fibroblastes, responsables majoritairement de la synthèse et de l'assemblage de la matrice extracellulaire des tissus conjonctifs et les kératinocytes, constituant à 90 % l'épiderme cutané et responsables de l'imperméabilité de la peau. Les cellules présentes dans ces produits peuvent être autologues, allogéniques ou xénogéniques. Les reconstructions tissulaires peuvent être composées d'un tissu conjonctif cellularisé ou non combiné à un épiderme ou une membrane biosynthétique et pourront fournir des facteurs de croissance afin de stimuler le processus de cicatrisation. Enfin, ces

reconstructions pourront être utilisées de manière temporaire, afin d'accélérer ou d'améliorer le processus de cicatrisation ou permanente dans le cadre de traumatismes sévères.

Il existe de nombreuses applications possibles pour les tissus issus de la bio-ingénierie. Une des plus représentées de nos jours est la gestion des plaies qui ne cicatrisent pas, telles que les ulcères diabétiques neuropathiques, vasculaires, les escarres et les plaies thermiques étendues (supérieures à 50 % de la superficie corporelle). De telles blessures ne guérissent pas en juste proportion avec les soins standards, accentuant la morbidité et le risque de mortalité.

1.3.4.1 Les substituts dermiques pour le soin clinique

Les substituts dermiques décellularisés humains (Tableau 1.1), animaux (Tableau 1.2) ou acellulaires (Tableau 1.3) permettent d'accélérer le processus de cicatrisation en apportant une structure matricielle et des facteurs de croissance. Lorsqu'ALLODERM (Tableau 1.1) est appliqué sur des plaies, une néovascularisation, ainsi qu'un envahissement du greffon par les fibroblastes de l'hôte surviennent. Il s'ensuit une croissance des cellules épithéliales de l'épiderme (Pomahac B. et al., 1998). Ce phénomène a été identifié sur tous les produits dermiques commercialisés.

Tableau 1.1 : Substituts dermiques décellularisés d'origine humaine pour le soin clinique

Marque	Compagnie	Description du produit	Utilisation
Alloderm®	LifeCell Co.	Derme décellularisé (1,2 mm) : derme humain de cadavre.	Long-terme <ul style="list-style-type: none"> • Plaies cutanées profondes (Wainwright D. et al., 1996) • Reconstruction après ablation chirurgicale (Achauer B. M. et al., 1998) • Rhinoplasty (Erol O. O., 2001) • Reconstruction abdominale (Buinewicz B. et al., 2004) • Reconstruction mammaire (Breuing K. H. et al., 2005) • Site donneur (Sinha U. K. et al., 2002) • Reconstruction vaginale (Clemons J. L. et al., 2003)
AlloMax™ Surgical Graft	Bard Davol	Derme décellularisé (1 mm) : derme humain de cadavre.	Long-terme <ul style="list-style-type: none"> • Reconstruction après ablation chirurgicale (mammaire, abdominale...) (Carruthers C. A. et al., 2015; Chauviere M. V. et al., 2014)
FlexHD®	Ethicon	Derme décellularisé (1.25-2.9 mm) : derme humain de cadavre hydraté.	Long-terme <ul style="list-style-type: none"> • Chirurgie complexe de la hernie (Ethicon US LLC., 2010)

Tableau 1.1 (Suite) : Substituts dermiques décellularisés d'origine humaine pour le soin clinique

Marque	Compagnie	Description du produit	Utilisation
DermaCell™	LifeNet Health	Derme décellularisé (0.2-1 mm) : <ul style="list-style-type: none"> • Derme humain de cadavre hydraté décellularisé par Matracell (procédé breveté utilisant une solution anionique et des endonucléases) qui élimine plus de 97% de l'ADN sans compromettre la physiologie matricielle (Capito A. E. et al., 2012). • Préservé à température pièce par Preservon®. 	Temporaire <ul style="list-style-type: none"> • Plaies chroniques diabétiques (Health. LifeNet, 2016)
DermaMatrix™	Synthes	Derme décellularisé (0.6-1.25 mm) : derme humain de cadavre.	Long-terme <ul style="list-style-type: none"> • Reconstruction après ablation chirurgicale (mammaire, abdominale...) (Synthes Inc., 2006).
DermaPure™	Tissue Regenix Wound Care Inc.	Derme décellularisé (1 mm) : <ul style="list-style-type: none"> • Derme humain de cadavre hydraté. • Décellularisé par la technologie dCELL® (procédé breveté) • Préservé à température pièce 	Long-terme <ul style="list-style-type: none"> • Plaies aiguës • Plaies chroniques (Incorporated Tissue Regenix Wound Care, 2017)

Tableau 1.2 : Substituts dermiques décellularisés d'origine animale pour le soin clinique

Marque	Compagnie	Description du produit	Utilisation
Oasis™ Wound Matrix	Cook Biotech	Derme décellularisé : matrice dermique dérivée de derme porcine de la muqueuse intestinale	Long-terme <ul style="list-style-type: none"> • Plaies d'épaisseur partielle et totale • Plaies ulcères diabétiques • Plaies chirurgicales (Smith & Nephew Inc., 2015)
Helicoll™	EnColl	Derme décellularisé : <ul style="list-style-type: none"> • Matrice dermique dérivée de derme bovin fœtal (riche en collagène de type I). • Préservé à température pièce 	Long-terme <ul style="list-style-type: none"> • Plaies d'épaisseur partielle et totale • Plaies ulcères diabétiques • Plaies chirurgicales (EnColl, 2013)
PriMatrix™	TEI Biosciences	Derme décellularisé : <ul style="list-style-type: none"> • Matrice dermique dérivée de derme bovin fœtal (riche en collagène de type III). • Préservé à température pièce 	Long-terme <ul style="list-style-type: none"> • Plaies d'épaisseur partielle et totale • Plaies ulcères diabétiques • Plaies chirurgicales (Corporation Integra LifeSciences, 2016)

Tableau 1.2 (Suite) : Substituts dermiques décellularisés d'origine animale pour le soin clinique

Marque	Compagnie	Description du produit	Utilisation
SurgiMend®	TEI Biosciences	Derme décellularisé : matrice dermique dérivée de derme bovin fœtal (riche en collagène de type III).	Long-terme <ul style="list-style-type: none"> • Plaies d'épaisseur partielle et totale • Plaies ulcères diabétiques • Plaies chirurgicales (LifeSciences Integra, 2016)
Strattice™	LifeCell Co.	Derme décellularisé : <ul style="list-style-type: none"> • Matrice dermique hydratée et non réticulée dérivée de derme porcin • Préservé à température pièce 	Long-terme <ul style="list-style-type: none"> • Plaies d'épaisseur partielle et totale • Plaies ulcères diabétiques • Plaies chirurgicales (KCI, 2016)
Permacol™	Covidien	Derme décellularisé : matrice dermique réticulée dérivée de derme porcin	Long-terme <ul style="list-style-type: none"> • Plaies d'épaisseur partielle et totale • Plaies ulcères diabétiques • Plaies chirurgicales (Medtronic, 2016)

Contrairement aux dermes décellularisés illustrés précédemment, certaines compagnies telles qu'Integra Life Science ont préféré reconstruire en laboratoire un derme biocompatible et résorbable. Ces dermes seront composés, pour la plupart, de glycoaminoglycanes et de collagène d'origine animale (Tableau 1.3). Leurs comportements après greffe seront similaires aux matrices décellularisées précédentes, à savoir, l'invasion de fibroblastes et la prolifération des cellules épidermiques du patient ou greffe subséquente d'épiderme.

Tableau 1.3 : Substituts dermiques biosynthétiques acellulaires pour le soin clinique

Marque	Compagnie	Description du produit	Utilisation
Biobrane®	Bertek Pharmaceuticals Inc.	Derme acellulaire : membrane de silicone transparente composée d'une matrice tri-filamentaire en nylon d'une épaisseur de 6 µm et d'un mélange de peptides purifiés dérivés du collagène porcin d'une épaisseur de 360 µm	Temporaire <ul style="list-style-type: none"> • Plaies cutanées superficielles • Plaies cutanées semi-profondes • Site donneur (Gerding R. L. et al., 1988; Mandal A., 2007)
Integra® DRT (Dermal Regeneration Template)	Integra Lifesciences	Derme acellulaire : fin film de silicone de polysiloxane (0.1 mm) couvrant une matrice poreuse (2 mm) de collagène réticulé de glycoaminoglycanes, la chondroïtine-6-sulfate, grâce à la glutaraldéhyde	Long-terme <ul style="list-style-type: none"> • Plaies cutanées semi-profondes • Plaies cutanées profondes • Reconstruction après ablation chirurgicale (Burke J. F. et al., 1981; Hansen S. L. et al., 2001; Heimbach D. et al., 1988; van der Veen V. C. et al., 2010)
Matriderm®	Skin and Health Care AG	Derme acellulaire (1-2 mm) : matrice non dénaturée composée de fibres de collagène de type I, III et V provenant du derme bovin avec de l'élastine provenant du ligament nucal bovin par hydrolyse de celui-ci.	Long-terme <ul style="list-style-type: none"> • Plaies cutanées semi-profondes • Plaies cutanées profondes • Plaies chroniques (Schneider J. et al., 2009)
Hyalomatrix®	Fidia Advanced Biopolymers	Derme acellulaire (2 mm) : <ul style="list-style-type: none"> • Ester benzylique d'acide hyaluronique • Film flexible d'élastomère 	Long-terme <ul style="list-style-type: none"> • Plaies cutanées semi-profondes • Plaies cutanées profondes • Reconstruction après ablation chirurgicale (Myers S. R. et al., 2007)

Tableau 1.3 (Suite) : Substituts dermiques biosynthétiques acellulaires pour le soin clinique

Marque	Compagnie	Description du produit	Utilisation
Renoskin	Symatèse	Derme acellulaire (2 mm) : fin film de silicone couvrant une matrice poreuse de collagène de type I réticulé.	Long-terme <ul style="list-style-type: none"> • Plaies cutanées semi-profondes • Plaies cutanées profondes (Druecke D. et al., 2004; Pieper J. S. et al., 2000)
ProDerm	Laboratoire Genévrier	Derme acellulaire (2 mm) : matrice de collagène, de type I d'origine équine, réticulé de chitosane et de chondroïtine-6-sulfate.	Long-terme <ul style="list-style-type: none"> • Plaies cutanées semi-profondes • Plaies cutanées profondes • Plaies chroniques (Braye F. M. et al., 2001; Damour O. et al., 1994)

Certaines de ces matrices seront volontairement réticulées afin d'accroître les propriétés mécaniques du tissu, tandis que d'autres le seront involontairement lors du processus de décellularisation (Cornwell K. G. et al., 2009). Ce phénomène aura pour influence de bloquer la dégradation enzymatique par les MMPs et ainsi réduire son incorporation au long terme chez l'hôte.

Ces matrices dermiques sans composante cellulaire font l'objet de beaucoup de développement, car elles peuvent être facilement manufacturées. Cependant, elles ne peuvent être appliquées sur des plaies profondes ou le derme de l'hôte est très atteint, car l'absence de fibroblastes empêchera la cicatrisation de s'effectuer. De plus, l'absence d'épiderme rend ces matrices non-viables pour une utilisation sur des plaies étendues, supérieures à 30 % de superficie corporelle, à moins d'effectuer une greffe supplémentaire épidermique.

DERMAGRAFT (Tableau 1.4), produit à parti de matériaux biosynthétiques, aura été le premier substitut dermique cellularisé à être commercialisé. Ce substitut répond de manière similaire aux matrices décellularisées par la présence d'une invasion évidente de capillaires dans le derme, la

prolifération des cellules épidermiques et la formation d'une membrane basilaire (Freedlander E., 1998). Les fibres de VicrylG, composante biosynthétique, disparaîtront quant à elles de deux à quatre semaines après la greffe. Hyalograft 3D est composé, quant à lui, d'acide hyaluronique, un des principaux polysaccharides de la matrice extracellulaire. Cette matrice jouera un rôle important dans la migration et la prolifération des fibroblastes et des kératinocytes (Price R. D. et al., 2007) permettant ainsi d'accélérer le processus de cicatrisation. Cliniquement, ces matrices ont été d'abord utilisées pour le traitement de plaies d'ulcères diabétiques plantaires en combinaison avec un épiderme autologue reconstruit, tel que Laserskin sans résultat satisfaisant contrairement à leur utilisation sur des plaies thermiques (Caravaggi C. et al., 2003) (Tableau 1.6).

Tableau 1.4 : Substituts dermiques biologiques avec fibroblastes dermiques humains pour le soin clinique

Marque	Compagnie	Description du produit	Utilisation
Transcyte® Dermagraft®	Advanced Tissue Sciences/Advanced Biohealing	Substitut dermique : <ul style="list-style-type: none"> • Fibroblastes humains cultivés sur un polymère biosynthétique d'acide polyglycolique (Vicryl) • Cryopréservé dans une solution physiologique qui contient 10 % de DMSO (diméthylsulfoxyde) et du sérum bovin 	Temporaire <ul style="list-style-type: none"> • Plaies cutanées superficielles • Plaies cutanées semi-profondes censées guérir par elles-mêmes. (van der Veen V. C. et al., 2010)
Hyalograft 3D	Fidia Advanced Biopolymers	Substitut dermique : <ul style="list-style-type: none"> • Fibroblastes humains autologues cultivés sur une matrice d'acide hyaluronique 	Temporaire <ul style="list-style-type: none"> • Plaies cutanées superficielles • Plaies cutanées semi-profondes censées guérir par elles-mêmes. (van der Veen V. C. et al., 2010)

1.3.4.3 Les substituts épidermiques pour le soin clinique

Les substituts épidermiques (Tableau 1.5) sont réalisés à partir de culture de kératinocytes du patient, permettant ainsi d'éliminer le risque de rejet de greffe (Kamolz L. P. et al., 2009). Ils sont le plus souvent manufacturés en feuillet sur des films biosynthétiques ou encore biologiques. Leurs épaisseurs de 2 à 8 cellules en font un produit délicat à manipuler, lequel nécessite 2 à 3 semaines de production avant la greffe.

Tableau 1.5 : Substituts épidermiques pour le soin clinique

Marque	Compagnie	Description du produit	Utilisation
Epicel®	Genzyme	Épiderme : kératinocytes autologues recouvert d'une gaze paraffinée	Long-terme <ul style="list-style-type: none"> • Plaies cutanées semi-profondes • Plaies cutanées profondes supérieures ou égales à 30% de superficie. (Bryant R. A.; Nix, D. P. , 2012)
Laserskin	Fidia Advanced Polymer	Épiderme : kératinocytes autologues sur un feuillet d'acide hyaluronique estérifié	Long-terme <ul style="list-style-type: none"> • Plaies cutanées semi-profondes • Plaies cutanées profondes supérieures ou égales à 30% de superficie. (Bryant R. A.; Nix, D. P. , 2012)
Keragraf	Healpoint	Épiderme : kératinocytes autologues	Long-terme <ul style="list-style-type: none"> • Plaies cutanées semi-profondes • Plaies cutanées profondes supérieures ou égales à 30% de superficie. (Bryant R. A.; Nix, D. P. , 2012)
Myskin	Altrika	Épiderme : kératinocytes autologues sur un film de silicone	Long-terme <ul style="list-style-type: none"> • Plaies cutanées semi-profondes • Plaies cutanées profondes supérieures ou égales à 30% de superficie. (Bryant R. A.; Nix, D. P. , 2012)

1.3.4.4 Les substituts cutanés bilamellaires pour le soin clinique

Les substituts cutanés bilamellaires (derme et épiderme) (Tableau 1.6) offrent l'avantage d'agir activement et passivement sur la cicatrisation. Ils sont analogues à la peau native et permettent d'accélérer la cicatrisation améliorant ainsi la prise en charge des plaies traumatiques profondes et étendues.

Tableau 1.6 : Substituts cutanés bilamellaires pour le soin clinique

Marque	Compagnie	Description du produit	Utilisation
Apligraf®	Organogenesis	Derme : Fibroblastes de nouveau-nés combinés à du collagène de type I bovin. Épiderme : Kératinocytes de nouveau-nés	Long-terme <ul style="list-style-type: none"> • Plaies cutanées semi-profondes • Plaies cutanées profondes • Plaies chroniques • Plaies diabétiques • Épidermolyse bulleuse • Site donneur (van der Veen V. C. et al., 2010)
OrCel®	FortiCell Bioscience	Derme : Fibroblastes combinés à du collagène de type I bovin. Épiderme : Kératinocytes	Long-terme <ul style="list-style-type: none"> • Plaies chroniques • Plaies cutanées semi-profondes • Site donneur (Eisenberg M. et al., 1998; Still J. et al., 2003; van der Veen V. C. et al., 2010).

Tableau 1.6 (Suite) : Substituts cutanés bilamélaires pour le soin clinique

Marque	Compagnie	Description du produit	Utilisation
StrataGraft®	StrataTech	Derme : Fibroblastes combinés à du collagène de type I non bovin. Épiderme : Kératinocytes immortalisés (NIKS).	Temporaire • Couverture de plaies avant greffe permanente (Schurr M. J. et al., 2009)
TheraSkin®	Soluble Systems	Peau native cryopréservée dans une solution contenant 10% de glycérol : • Composante cellulaire viable (fibroblastes et kératinocytes)	Long-terme Conçus pour accélérer le processus de cicatrisation en apportant des facteurs de croissance, cytokines et une matrice extracellulaire Cibles thérapeutiques : • Plaies cutanées semi-profondes • Plaies diabétiques • Plaies chroniques (Landsman A. S. et al., 2011).

La compagnie Organogenesis Inc. a développé APLIGRAF (anciennement GRAFTSKiN) (Tableau 1.6) composée de fibroblastes de nouveau-nés de prépuce incorporés dans une matrice de collagène de type I. Une fois le derme formé, des kératinocytes de nouveau-nés sontensemencés à sa surface où ils proliféreront et se différencieront pour former un épiderme fonctionnel, c'est-à-dire offrant une fonction barrière efficace aux agents extérieurs (chimique ou microbien). Les essais précliniques, sur des souris athymiques, et cliniques, chez l'humain, de ces peaux reconstruites ont montré leur excellent taux de prise au site de greffe (Hansbrough J. F. et al., 1994). De plus, ils se sont montrés efficaces dans le traitement d'ulcères veineux réfractaires ou de plaies graves (Kirsner R. S., 1998; Trent J. F. et al., 1998). Toutefois, ces substituts allogéniques ne peuvent pas être utilisés dans le cadre de gestion de plaie du 3^e degré.

1.3.4.5 Les modèles pour la recherche (translation clinique, pharmaceutique ou cosmétique)

La recherche fondamentale implique de plus en plus une translation des résultats vers la clinique. Ceci est fortement valorisé par les Universités, ainsi que les organismes subventionnaires. Toutefois, les coûts importants associés aux essais précliniques chez l'animal, et cliniques chez l'humain, ainsi que les réglementations associées à ces essais ne permettent pas toujours de mener à terme les projets de recherche. Les substituts reconstruits offriront ainsi une alternative intéressante et à coût moindre en tant qu'outils de translation préclinique.

C'est en Europe et plus particulièrement en France que le domaine de l'ingénierie tissulaire a pris une expansion phénoménale. En effet, depuis 2013, les marques de cosmétiques européennes sont contraintes d'adopter des méthodes alternatives pour ne plus tester leurs produits sur les animaux (EUR-Lex, 2011). C'est le cas du Groupe L'Oréal qui a pris l'initiative d'acquérir Episkin en 1996, une société d'ingénierie cutanée qui a créé le premier kit commercial de substituts (RHE) deux années auparavant (Tableau 1.7). Dix ans plus tard, L'Oréal fait l'acquisition de SkinEthic, une société créée en 1992 et inscrite au Marché Libre d'Euronext Paris. Cette société s'était démarquée à l'époque par sa production et sa commercialisation de substituts épidermiques simples et bilamellaires (derme + épiderme) destinés à effectuer des tests *in vitro* afin d'évaluer la sécurité et l'efficacité de nombreux produits cosmétiques et pharmaceutiques. SkinEthic sera absorbé par Episkin et deviendra un des chefs de file sur le marché de l'ingénierie tissulaire.

Dans la même période, MatTek, une compagnie formée en 1985 par deux chimistes du MIT, proposa dès 1993 « EpiDerm », un modèle épidermique simple pour la réalisation de tests cutanés tels que d'irritation, de corrosion ou de perméabilité (Tableau 1.7).

Tableau 1.7 : Substituts épidermiques pour la recherche et développement

Marque	Compagnie	Description du produit	Utilisation
RHE (Reconstructed Human Epidermis)	SkinEthic	Épiderme : kératinocytes humains normaux sur un film de polycarbonate inerte.	<ul style="list-style-type: none"> • Test de corrosion • Test d'irritation • Test de phototoxicité • Test d'absorption percutanée • Test de perméabilité • Effet des rayons UV(SkinEthic, 2016)
EpiDerm	MatTek	Épiderme : Kératinocytes	<ul style="list-style-type: none"> • Test de corrosion • Test d'irritation • Test de phototoxicité • Test d'absorption percutanée • Test de perméabilité (MatTek, 2016)
Human Epidermis Equivalent epiCS	CellSystems Biotechnologie GmbH	Épiderme : • kératinocytes humains normaux sur un film de polycarbonate inerte.	<ul style="list-style-type: none"> • Test de corrosion • Test d'irritation (GmbH CellSystems Biotechnologie Vertrieb, 2016)

En continuité de leur recherche et développement, SkinEthic, MatTek, ainsi que CellSystems (Tableau 1.8) ont quelques années plus tard proposé de nouveaux modèles épidermiques simples, non plus constitués uniquement de kératinocytes, mais avec ajout de mélanocytes afin de former des substituts pigmentés. Ces nouveaux modèles seront plus particulièrement utilisés pour la réalisation de tests en lien avec la photoprotection et plus particulièrement afin de tester des agents bloquants les UV.

Tableau 1.8 : Substituts épidermiques pigmentés pour la recherche et développement

Marque	Compagnie	Description du produit	Utilisation
RHPE (Reconstructed Human Pigmented Epidermis)	SkinEthic	Épiderme pigmenté : <ul style="list-style-type: none"> • Kératinocytes • Mélanocytes de phototypes II, IV et VI humains normaux (ratio K/M 10:1) sur un film de polycarbonate inerte. 	<ul style="list-style-type: none"> • Évaluation de formulation d'induction de pigmentation (Phototypes II et IV) • Évaluation de formulation de blanchiment cutané (Phototype VI) (SkinEthic, 2016)
MelanoDerm™	MatTek	Épiderme pigmenté : <ul style="list-style-type: none"> • kératinocytes humains normaux • Mélanocytes normaux humains cutanés de nouveau-nés caucasiens, noirs ou asiatiques sur un film de collagène de 9mm	<ul style="list-style-type: none"> • Évaluation de formulation d'induction de pigmentation • Évaluation de formulation de blanchiment cutané (MatTek, 2016)
epiCS-M / Human Epidermis Equivalent with Melanocytes	CellSystems Biotechnologie GmbH	Épiderme pigmenté : <ul style="list-style-type: none"> • kératinocytes humains normaux • Mélanocytes normaux humains cutanés de nouveau-nés caucasiens, afro-américains ou asiatiques sur un film de polycarbonate inerte.	<ul style="list-style-type: none"> • Évaluation de formulation d'induction de pigmentation • Évaluation de formulation de blanchiment cutané (GmbH CellSystems Biotechnologie Vertrieb, 2016)

L'évolution des connaissances et plus particulièrement de l'interrelation des réponses biologiques entre le derme et l'épiderme ont amené les compagnies à complexifier encore plus leur modèle (Tableau 1.9). Le point commun de tous les produits commercialement disponibles est l'utilisation de collagène xénogénique ou recombinant pour la reconstruction dermique.

Tableau 1.9 : Substituts cutanés bilamélaires pour la recherche et développement

Marque	Compagnie	Description du produit	Utilisation
Episkin	SkinEthic	Derme : Fibroblastes combinés à du collagène de type I, III et IV bovin. Épiderme : Kératinocytes	<ul style="list-style-type: none"> • Test de corrosion • Test d'irritation • Test de phototoxicité • Test d'absorption percutanée • Test de perméabilité • Effet des rayons UV (SkinEthic, 2016)
EpidermFT	MatTek	Derme : Fibroblastes combinés à du collagène de type I recombinant. Épiderme : Kératinocytes	<ul style="list-style-type: none"> • Test de corrosion • Test d'irritation • Test de phototoxicité • Test d'absorption percutanée • Test de perméabilité • Effet des rayons UV (MatTek, 2016)
StrataTest	StrataTech	Derme : Fibroblastes combinés à du collagène de type I non bovin. Épiderme : Kératinocytes immortalisés (NIKS).	<ul style="list-style-type: none"> • Test de corrosion • Test d'irritation • Test de phototoxicité • Test d'absorption percutanée • Test de perméabilité (Stratatech, 2016)

1.4 Le LOEX et les peaux reconstruites par auto-assemblage (l'approche dite « *Bottom-up* »)

Tel que mentionné à la section 1.3.2.1, ce modèle repose sur la capacité des fibroblastes dermiques à sécréter et à assembler leur propre matrice extracellulaire en présence d'acide ascorbique. Dans ces modèles en trois dimensions, les fibroblastes retrouvent un état de différenciation proche de celui *in vivo* (Coulomb B. et al., 1983). Après ajout de kératinocytes sur la matrice dermique, leur expansion en culture immergée et leur différenciation pendant un délai minimal de 10 jours en phase air-liquide, un épiderme différencié et fonctionnel sera obtenu. Ce modèle de tissu cutané possède des propriétés mécaniques analogues au tissu natif (Proulx S. et al., 2011), ainsi que la présence de cellules souches épithéliales (Lavoie A. et al., 2013) contribuant à assurer la survie au long terme. Ces modèles permettent d'étudier *in vitro*, les effets d'agents pharmacologiques, des physiopathologies cutanées, mais aussi peuvent servir de substituts vivants pour la greffe des grands brûlés.

1.4.1 L'épiderme simple (kératinocyte)

L'épiderme simple, ou feuillet épidermique, est caractérisé *in vivo* par un épithélium pluristratifié, pavimenteux, kératinisé et avasculaire, constitué à plus de 90 % de kératinocytes dont l'épaisseur moyenne de 100 µm varie de 50 µm sur les paupières à 1 mm sur les paumes des mains.

Morphologiquement, l'épiderme se divise en 4 couches différentes : la couche basale, épineuse, granuleuse et cornée. La taille des kératinocytes augmente avec leur différenciation et leur forme évolue. D'abord cuboïde, puis polygonale au niveau de la couche épineuse pour enfin devenir de plus en plus fusiforme et aplatie dans les couches les plus superficielles et former des squames qui s'exfolient. La taille du noyau diminue jusqu'à disparaître, les organites cytoplasmiques et la chromatine se raréfient tandis que des filaments de kératines remplissent le cytoplasme.

Au niveau de la couche basale, les kératinocytes sont ancrés à la membrane basilaire de la jonction dermo-épidermique par l'intermédiaire d'hémidesmosomes (Murray J. C. et al., 1979). Après une division cellulaire, les kératinocytes basaux quittent la membrane basilaire, perdent leur capacité de

division, migrent et entament leur programme de différenciation. La formation de l'enveloppe cornée débute dès la couche épineuse superficielle où l'on retrouve un marqueur précoce de la différenciation : l'involucrine. Les transglutaminases de type 1 et 5 établissent une structure « support » par la déposition de l'involucrine à partir des plaques internes des desmosomes.

D'un point de vue moléculaire, les kératinocytes subissent aussi des changements. En effet, ces cellules contiennent toutes des filaments dits intermédiaires de 8 à 10 nm de diamètre (entre les filaments de 6 nm d'actine et de 23 nm des microtubules) qui sont constitués de kératines acides (type I, de K9 à K21) s'associant avec des kératines basiques ou neutres (type II, de K1 à K8). Ces dimères de kératines diffèrent selon l'état de différenciation de la cellule. Au niveau de l'assise basale, les kératinocytes synthétisent la paire de kératines K5 et K14, et plus irrégulièrement la kératine K15. Avec l'initiation du programme de différenciation apparaissent les paires de kératines de différenciation terminale K1/K10, ainsi que K2/K11, dès la couche suprabasale, pendant que l'expression des molécules précédentes est réprimée.

Au niveau de la couche granuleuse, la membrane plasmique des kératinocytes est renforcée sur sa surface cytoplasmique d'une couche fine contenant de l'involucrine, ainsi que de la loricrine et de la filaggrine. Lors de la différenciation des cellules granuleuses, il y a la formation d'une zone de transition séparant les couches vivantes de l'épiderme de la couche cornée qui est une couche morte. C'est dans cette zone que les constituants de la couche granuleuse sont remodelés et deviennent des cornéocytes.

La formation de l'enveloppe cornée mature s'établit progressivement, incluant l'incorporation par des pontages covalents de plusieurs protéines précurseurs telles que les protéines riches en proline (SPR), et plusieurs protéines appartenant à la famille xp5, telles que l'élafine, la cystatine et enfin la loricrine. Les filaments intermédiaires de kératines, agrégés par la filaggrine, sont également associés à l'enveloppe cornée mature pour renforcer le cytosquelette. La membrane plasmique s'épaissit pour devenir une enveloppe cornée. Les lipides déversés par les corps d'Odland dans les espaces intercellulaires s'organisent en bicouches lamellaires et forment le ciment intercornéocytaire. Les cornéodesmosomes, qui sont apparentés aux desmosomes, assurent la cohésion des cornéocytes qui sont, dans un premier temps, retenus puis secondairement libérés au niveau des couches les plus superficielles par un phénomène appelé la desquamation.

L'homéostasie de l'épiderme est régulée par une balance entre la croissance et la mort cellulaire. La prolifération est continue dans la couche basale de l'épiderme grâce à deux types de kératinocytes : (1) les cellules souches qui ont une capacité illimitée de renouvellement et (2) les cellules amplificatrices transitoires destinées à quitter le cycle cellulaire pour se différencier après quelques divisions (Hall P. A. et al., 1989; Potten C. S. et al., 1988). Les kératinocytes s'engagent alors dans le processus de différenciation terminale lorsqu'ils traversent les couches suprabasales pour se diriger vers la surface de l'épiderme.

1.4.2 L'épiderme pigmenté (kératinocytes + mélanocytes)

La classification de Fitzpatrick, créée en 1975, permet de subdiviser en 6 catégories les individus en fonction de leur susceptibilité à attraper un coup de soleil, à bronzer et de leur carnation suite à une exposition solaire (Fitzpatrick T. B., 1988). Cette classification permet d'estimer la dose érythémale minimale (DEM) ainsi que le SPF (acronyme de la terminologie anglaise pour *sun protection factor*) des crèmes solaires à utiliser. D'un point de vue physiologique, ces différentes catégories seront caractérisées par la variation en nombre, taille, composition et distribution des mélanosomes produits par les mélanocytes.

Les mélanocytes cutanés originent de cellules pluripotentes de la crête neurale qui selon l'origine précise, crânial, du tronc dorsal ou ventral, forment un groupe hétérogène de cellules (Ernfors P., 2010; O'Rahilly R. et al., 2007). Ces cellules différenciées ont un aspect ovale ou fusiforme, plus petit que les kératinocytes, possédant des prolongements cytoplasmiques dendritiques. Ils représenteront 2 à 4 % des cellules de l'épiderme et seront localisés au niveau de la membrane basilaire. Ils ont, de plus, moléculairement reconnaissables par l'expression caractéristique de la tyrosinase (TYR), de protéines spécifiques aux mélanosomes, tels que Pmel17 (acronyme de la terminologie anglaise pour *Premelanosome protein 17*) ou encore de protéines de surface, telles que MART-1 (acronyme de la terminologie anglaise pour *Melanoma antigen recognized by T cells 1*) (Plonka P. M. et al., 2009). Ils ont pour fonction principale : la mélanogénèse. Chez l'Homme, ce processus aboutit à la formation de la phaéomélanine, un pigment jaune-rouge, et de l'eumélanine, un pigment brun-noir. Ces pigments sont, tout d'abord, stockés au sein d'organelles spécifiques, les mélanosomes, puis transférés aux kératinocytes voisins, au-dessus de leurs noyaux afin de les protéger des effets nocifs des rayons

ultra-violets (Lin J. Y. et al., 2007). En moyenne, un mélanocyte fournit en pigments de mélanine environ 36 kératinocytes.

La longévité de la pigmentation cutanée indique la présence de cellules souches. Ces cellules souches « adultes » servant à régénérer les mélanocytes sont appelées « cellules souches de mélanocytes » et se retrouvent au niveau du renflement (bulge) de chaque follicule pileux, site où se localisent aussi les cellules souches épithéliales de kératinocyte (White R. M. et al., 2008). Elles peuvent soit proliférer pour se renouveler, soit migrer vers le bulbe pileux pour donner des mélanocytes différenciés. De façon permanente, il y a toujours au moins une cellule souche de mélanocyte en quiescence : elle(s) constitue(nt) un réservoir de précurseurs de mélanocytes. Les nombreux problèmes de dépigmentation sont le résultat de la perte de ces cellules.

Il a aussi été rapporté que la fonction des mélanocytes dépasse la simple synthèse de la mélanine (Plonka P. M. et al., 2009). En effet, dans le corps humain, la présence de mélanocytes n'a pas seulement été répertoriée au niveau de l'épiderme, des poils et de l'iris où ils sont connus pour conférer la pigmentation de ces structures, mais aussi au niveau de l'oreille interne, du système nerveux, du cœur et probablement d'autres sites anatomiques (Brito F. C. et al., 2008; Tachibana M., 1999).

D'un point de vue de la reconstruction cutanée, il est important d'associer les mélanocytes appartenant au phototype du receveur. En effet, les mélanocytes cutanés de phototype VI possèdent plus d'eumélanine et de phéomélanine que les mélanocytes de phototype I en culture *in vitro* comme *in vivo* (Wenczl E. et al., 1998). De même, les mélanocytes isolés d'épidermes d'origine asiatique possèdent plus d'eumélanine et de phéomélanine que les mélanocytes isolés d'épidermes d'Européens (Hunt G. et al., 1995).

La mélanogénèse correspond au processus par lequel les mélanocytes synthétisent les pigments de mélanine. La tyrosinase, tout particulièrement, sera une enzyme clé, car elle régule les premières étapes de la synthèse de la phéomélanine et de l'eumélanine. Elle est synthétisée sous la forme d'un précurseur inactif qui sera activé lorsque les mélanocytes sont stimulés par l'hormone mélanotrope (α -MSH) via l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). Cette hormone est produite par épissage

alternatif de la pro-opiomélanocortine (POMC) aussi bien par les kératinocytes que par les mélanocytes (Iyengar B. et al., 1995; Thody A. J. et al., 1983; Wintzen M. et al., 1996).

In vitro, l' α -MSH ne stimule pas l'activité de la tyrosinase dans des biopsies cutanées, quel que soit leur phototype (Burchill S. A. et al., 1990). En effet, il semble que l' α -MSH nécessite la présence du facteur de croissance des fibroblastes bFGF (acronyme de la terminologie anglaise pour *Basic fibroblast growth factor*), sécrété par les fibroblastes, pour augmenter l'activité dopa-oxydase (tyrosinase), nécessaire à la conversion de la L-tyrosine en L-3,4-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) qui est oxydée en dopaquinone (précurseur de l'eumélanine et la phéomélanine) et la quantité de pigment de mélanine produit par les mélanocytes en culture (Hedley S. J. et al., 1998). Les taux d' α -MSH (Iyengar B. et al., 1995; Schauer E. et al., 1994) ainsi que le taux de bFGF (Halaban R. et al., 1992) sont augmentés après irradiation, induisant une augmentation du nombre de pigments de mélanine et par extension le teint de la peau. L' α -MSH peut, de plus, influencer le ratio eumélanine/phéomélanine (Hunt G. et al., 1995).

L'eumélanine résulte de la copolymérisation du DHI (dihydroxyindole, précurseur de l'eumélanine) et du DHICA (acide dihydroxyindole carboxylique) en proportions variables par la TRP-1 (acronyme de la terminologie anglaise pour *tyrosinase-related protein-1*, une DHICA-oxydase) et la TRP-2 (une dopachrome tautomérase) (Halaban R. et al., 1990; Tobin D. et al., 1994). La voie de la phéomélanogénèse, quant à elle, fait intervenir des composés soufrés, le plus souvent sous la forme du glutathion, un tripeptide, qui sous l'action d'une glutamyl-transpeptidase peut libérer une cystéine. La phéomélanine est obtenue par la réaction spontanée de la cystéine avec le dopachrome. Ceci explique que la culture de mélanocytes en milieu MCDB153, riche en cystéine, favorise la phéomélanogénèse (Hunt G. et al., 1995).

Les travaux expérimentaux présentés au chapitre 3 révèlent la présence d'un seuil minimal en mélanocytes nécessaire lors de la reconstruction d'un épiderme cutané afin d'obtenir une pigmentation homogène et une photoprotection.

1.4.3 La jonction dermo-épidermique

La jonction dermo-épidermique est une structure acellulaire, complexe et unique assurant l'ancrage de l'épiderme au derme. La synthèse de cette région acellulaire et son organisation ultra-structurale dépendent d'une interaction étroite entre les kératinocytes basaux et les fibroblastes du derme superficiel. L'analyse ultrastructurale a permis de distinguer trois compartiments distincts de la surface à la profondeur : (1) les hémidesmosomes, situés sur la face épidermique de la membrane basilaire, dont la fonction est d'assurer l'attache des cellules épithéliales à la matrice extracellulaire (2) la lame basale épidermique, comprenant elle-même deux feuilletts : la lamina lucida et densa, (3) la zone fibrillaire sous-basale, constituée de fibrilles d'ancrage, tel que le collagène de type VII.

1.4.4 Le derme

Le derme est un tissu conjonctif dense, c'est-à-dire qu'il contient très peu de substance fondamentale par rapport à un tissu conjonctif dit lâche. Il est responsable de la souplesse, de l'élasticité et de l'hydratation de la peau et sert de support nourricier à l'épiderme. Il joue également un rôle primordial dans la thermorégulation et la cicatrisation. Ce dernier est classiquement composé d'une faible quantité de cellules laissant une large place à la matrice extracellulaire, composé d'un réseau de fibres de collagène et élastiques, entouré d'une substance fondamentale de glycoprotéines (fibronectine, laminine), de glycoaminoglycanes (dont l'acide hyaluronique) et de protéoglycanes.

D'un point de vue quantitatif, le contenu dermique est représenté à environ 65 % d'eau, de 30 % de protéines et à 5 % cellulaire (Silver F. H. et al., 1992). Plus précisément, la partie protéique est constituée à 27.5 % de fibres de collagènes (Silver F. H. et al., 1992) et à environ 2 à 4 % de fibres élastiques (Fung Yuan-Cheng, 1993). Bien que les fibres de collagènes constituent moins du tiers du contenu dermique, ils représentent tout de même 70 % du volume de ce dernier (Silver F. H. et al., 2001; Vitellaro-Zuccarello L. et al., 1994) ce qui est équivalent à 75 % du poids sec de la peau.

Plus spécifiquement, la matrice extracellulaire dermique est composée :

- **De fibres de collagène** qui auront pour rôle principal de façonner la structure tridimensionnelle de la peau et d'être résistantes à la tension. Les principaux types de collagènes retrouvés sont les types I, III, IV, V, VI, VII. Bien qu'il existe quatorze types de collagènes différents, les types I et III sont les plus représentés dans la peau humaine, à des taux atteignant respectivement 80-85 % et 15-20 %.
- **D'un réseau élastique** qui confère la résilience et comprend trois sortes de fibres, caractérisées par la quantité de protéines d'élastine (substance amorphe) associée à son réseau de microfibrilles : (1) les fibres oxytalanes, dans le derme papillaire, exclusivement constituées de microfibrilles tubulaires, elles forment de fines arborisations perpendiculaires à la jonction dermo-épidermique, (2) les fibres d'élaunines, immatures et contenant peu de substance amorphe, elles forment un plexus sous-papillaire parallèle à la jonction dermo-épidermique au niveau de la jonction entre le derme papillaire et le derme réticulaire. Elles sont anastomosées avec les fibres oxytalanes et les fibres élastiques matures, leur diamètre est de l'ordre de 0.7-1 μm pour des longueurs de 20-150 μm (Frances C. et al., 1990) et (3) les fibres élastiques proprement dites, matures, situées dans le derme réticulaire, elles contiennent beaucoup de substance amorphe (90 % de la fibre), leurs diamètres s'élèvent à 2-5 μm pour une longueur moyenne avoisinant 140 μm (Frances C. et al., 1990).
- **De glycoprotéines de structure**, dont les principales sont la fibronectine, une glycoprotéine dimérique impliquée dans la cicatrisation, la migration et l'adhésion cellulaire, et la fibrilline. Ces protéines sont composées de longues chaînes polypeptidiques interagissant avec les composants de la matrice extracellulaire, tels que les collagènes, les protéoglycanes, et les intégrines.
- **De protéoglycanes et glycosaminoglycanes** qui sont des molécules très hygroscopiques et qui forment la substance fondamentale. Ces molécules permettent au derme de résister aux forces de compression.

Le derme peut être divisé en deux régions distinctes : le derme papillaire et le derme réticulaire. Toutefois, cette distinction histologique clairement visible par le marquage des fibres élastiques sur un tissu natif ne peut l'être en reconstruction cutanée lorsque ce réseau est absent. Histologiquement, nous devrions retrouver :

- Un derme papillaire ou superficiel de faible épaisseur (entre 20 et 50 μm) qui est en contact direct avec l'épiderme. Ce tissu lâche est constitué de fibres de collagène, de fibres oxytalanes et est traversé par un riche réseau sanguin, lymphatique et nerveux. Il est le siège des échanges métaboliques et nutritifs avec l'épiderme.
- Un derme réticulaire ou profond représente la majeure partie du derme (4/5^{ème} de l'épaisseur totale du derme). Il est composé de fibres élastiques et de collagènes disposés parallèlement à la surface de la peau formant un réseau qui se densifie en profondeur. Il assure une fonction de soutien et est responsable des qualités mécaniques de la peau.

Les fibroblastes sont les principales cellules du derme. Ils sont responsables de la biosynthèse et de la dégradation de la matrice extracellulaire et représentent une population hétérogène selon leur localisation. Ils s'attachent à la matrice collagénique directement par des intégrines membranaires ou par l'intermédiaire de fibronectine selon le type de collagène. Typiquement, ils sont allongés, bipolaires, à noyau central, présentant de nombreux prolongements cytoplasmiques dont leur taille augmente avec la profondeur de la localisation dermique. On peut définir trois sous-populations de fibroblastes : (1) les fibroblastes du derme réticulaire (2) les fibroblastes du derme papillaire et (3) les fibroblastes associés aux follicules pileux. Enfin, les fibroblastes participent également à la régulation par voie paracrine de la prolifération et de la différenciation des kératinocytes par la synthèse de facteurs solubles tels que des cytokines et des facteurs de croissance.

1.5 La pertinence et les objectifs du projet de recherche

1.5.1 Le besoin clinique

La cicatrisation des plaies est un processus complexe impliquant plusieurs stades qui se chevauchent. Cela inclut l'inflammation, la formation de tissus de granulation, la ré-épithélialisation, la formation du derme et enfin le processus de remodelage des plaies. Ainsi, les brûlures semi-profondes ou profondes étendues dépassant 50 % de la superficie totale du corps nécessitent l'utilisation de substituts cutanés.

La culture de feuillets épidermiques a révolutionné la prise en charge des grands brûlés, car elle permet de reconstituer l'architecture initiale de la couche superficielle de la peau (épiderme), en employant des kératinocytes propres au patient lorsque les autogreffes ne sont plus une option suffisante. Malheureusement, cette méthode comprend plusieurs contraintes. Outre les coûts élevés reliés à la production ou à l'achat des feuillets épidermiques (Epicel, Genzyme Inc., Cambridge, Mass.), un des inconvénients de cette méthode est un délai obligatoire de 2 à 3 semaines pour obtenir un nombre suffisant de feuillets épidermiques pour commencer la transplantation (Wood F. M. et al., 2006). De plus, le taux de prise peut varier entre 0 et 100 % selon l'équipe chirurgicale, de l'importance des plaies et de l'état du patient. Finalement, l'absence de derme pourra entraîner une rétraction cutanée importante aux sites de greffe ce qui pourra nuire aux résultats fonctionnels et esthétiques de la peau.

Étant donné que le processus de cicatrisation implique le derme et sa composante cellulaire, les fibroblastes, différentes compagnies ont commercialisé des substituts uniquement dermiques d'abord décellularisés puis cellularisés, pouvant être conservés à plus ou moins long terme, afin d'aider à la gestion des plaies thermiques ou en tant qu'élément pour combler la perte de tissu suite à des réductions chirurgicales (mastectomie, cancer). L'avantage de ces produits est leur utilisation immédiate avec un minimum d'attention de préparation. Toutefois, l'absence d'épiderme ne permet pas la gestion au long terme des plaies thermiques et le risque d'infection demeurera élevé.

Malgré l'avancement de la bio-ingénierie tissulaire de ces deux dernières décennies, les produits bilamellaires disponibles commercialement et approuvés par la FDA (acronyme de la terminologie anglaise pour *Food and Drug Administration*) sont toujours essentiellement constitués d'une matrice à base de collagène et de glycosaminoglycanes d'origine bovine. Toutefois, il existe en recherche et développement plusieurs autres modèles, dont certains sont constitués d'une matrice à base d'acide hyaluronique ou de polymères biosynthétiques ou encore de plasma humain coagulé dans lesquels des fibroblastes et des kératinocytes autologues et parfois des mélanocytes sont cultivés (Scuderi N. et al., 2009). Bien que présentant tous des délais de production similaires, ces différents produits peuvent se différencier par leurs propriétés physiologiques et mécaniques. De plus, tous les modèles proposés pour la clinique sont dépourvus *in vitro* de vascularisation, de pigmentation, de glandes et de follicules pileux.

Les différentes approches de production ne permettent pas actuellement de recréer un substitut cutané identique à la peau native. Toutefois, l'approche de type « *Bottom-up* » est la plus prometteuse et plus particulièrement la technique d'auto-assemblage, qui repose sur la capacité de l'acide ascorbique à promouvoir l'assemblage de la matrice extracellulaire sécrétée par les fibroblastes dermiques. Cependant, cette technique présente le désavantage de nécessiter un temps de production long (supérieur à 8 semaines), un manque de photoprotection de par l'absence de pigmentation, c'est-à-dire sans ajout de cellules pigmentogènes (mélanocytes), et peu ou pas de réseau de fibres élastiques, essentiel aux propriétés mécaniques cutanées. Mon projet de doctorat découle de ces 3 problématiques.

1.5.2 Le temps de production

La production de substituts cutanés autologues par la méthode de l'auto-assemblage est selon l'expertise du centre de recherche en organogénèse expérimentale (LOEX) la plus prometteuse technique pouvant mimer la structure cutanée native et ainsi offrir une solution de couverture au long terme pour la gestion des plaies thermiques. Cependant, leur temps de production est une limitation importante à leur utilisation pour la clinique.

En effet, le temps de production du derme, de l'isolement des cellules, à l'expansion, à la production de la matrice extracellulaire, nécessite de six à sept semaines. Alors que le temps de production de l'épiderme nécessite environ deux semaines (temps minimal pour l'expansion sur le derme et la formation d'un épiderme pluristratifié présentant des marqueurs tardifs de différenciation, tels que la loricine et la filaggrine). C'est donc le temps de production du derme qui est problématique. Ne serait-il pas idéal de pouvoir éliminer cette étape de production en possédant des dermes reconstruits prêts en tout temps? Pour se faire, il faudrait travailler de manière allogénique.

Il est bien connu que l'épiderme cutané engendre une réponse immunitaire caractérisée par le rejet systématique des peaux allogéniques (Fabre J. W. et al., 1989). Néanmoins, il existe peu de certitude sur l'immunogénicité des fibroblastes. Hansbrough et al., en 1992, ont démontré que les substituts dermiques, tels que Dermagraft, n'étaient pas rejetés par l'hôte (Hansbrough J. F. et al., 1992). Par

contre, ces substituts étant cryopréservés, il est difficile de conclure sur la réponse immunitaire effective, car les fibroblastes ont été éliminés lors du processus de cryopréservation (Cooper M. L. et al., 1991; Mansbridge J. et al., 1998; Naughton G. K. et al., 1999). En 1997, Reagan et al. ont, quant à eux, comparé l'immunogénicité des dermes allogéniques vivants (avec cellules) et inertes (décellularisés) après greffe chez un modèle porcin. Ils ont révélé que les dermes natifs vivants provoquaient une réponse immunitaire. Toutefois, lors de leurs analyses, ils ont identifié que cette réponse était dirigée sur les éléments folliculaires intradermiques résiduels après déplétion de l'épiderme et non contre les fibroblastes (Reagan B. J. et al., 1997).

Pour le chapitre 2, nous avons émis l'hypothèse qu'il était possible d'utiliser un derme allogénique sans induire de rejet et sans avoir à utiliser d'immunosuppresseurs.

L'objectif général du chapitre 2 est de diminuer le temps de production des substituts cutanés. Les objectifs spécifiques du chapitre 2 sont : (1) d'étudier la possibilité d'utiliser un derme cellularisé allogénique et d'y associer un épiderme autologue ; (2) d'évaluer leur tolérance *in vivo*, après greffe sur un modèle de souris immunocompétentes; (3) d'évaluer l'infiltration immunitaire des greffons, ainsi que la réponse immunitaire suite à la préimmunisation du modèle murin avec les antigènes allogéniques.

1.5.3 La pigmentation

L'épiderme est un tissu à renouvellement très rapide ce qui le rend sensible aux expositions aux rayonnements ionisants (rayons gamma γ et X) et non ionisants (rayons UV) émis par le soleil. Ces radiations produisent directement ou par l'intermédiaire des espèces réactives à l'oxygène des lésions dans l'ADN. En l'absence de réparation, ces lésions pourront provoquer des altérations dans les gènes clés du contrôle de la prolifération cellulaire comme les gènes suppresseurs de tumeurs et les oncogènes, entraînant le développement de cancers. Les trois principaux types de cancers de la peau ont pour origine : les kératinocytes pour les carcinomes basocellulaires et les carcinomes spinocellulaires, et les mélanocytes pour les mélanomes.

Les carcinomes sont les cancers cutanés les plus fréquents, ils sont aussi les moins dangereux puisqu'ils ne forment pratiquement jamais de métastases, soit moins de 1 % (Crowson A. N., 2006). Les mélanomes sont, quant à eux, plus agressifs et dangereux et seront responsables de près de 65 % des décès causés par ce cancer de la peau (Cummins D. L. et al., 2006).

Lors de la reconstruction de l'épiderme *in vitro*, le taux de mélanocytes est insuffisant (moins de 1 %) pour assurer la pigmentation. Il en résulte une hétérogénéité de la coloration de la peau, ainsi qu'une déficience en photoprotection. De plus, le rôle des mélanocytes ne s'arrête pas seulement à leur synthèse de pigments puisqu'ils sont aussi directement impliqués dans la formation des follicules pileux ainsi que dans le maintien de l'état souche des cellules épithéliales cutanées (Rabbani P. et al., 2011; Tanimura S. et al., 2011). Il sera ainsi primordial dans un avenir proche de pouvoir proposer pour la clinique un modèle de substitut pigmenté possédant des critères en matière de photoprotection minimalement analogues au tissu natif de l'hôte.

Pour le chapitre 2, nous avons émis l'hypothèse qu'il était possible de concevoir un substitut cutané bilamellaire pigmenté par l'ajout de mélanocytes lors de la reconstruction de l'épiderme.

L'objectif général du chapitre 3 est d'induire une pigmentation homogène dans un substitut cutané bilamellaire permettant d'offrir une photoprotection. Les objectifs spécifiques du chapitre 3 sont : (1) de déterminer les paramètres idéaux de production en vue de reconstruire des substituts pigmentés. À cette fin, différentes populations cellulaires d'origines caucasiennes et d'Afrique noire seront utilisées et évaluées *in vitro* et *in vivo* et (2) d'évaluer l'impact de la densité en mélanocytes sur la capacité de pigmentation (synthèse de pigment de mélanine) et de photoprotection après une exposition aux UV des substituts.

1.5.4 Les propriétés mécaniques

Les substituts cutanés, produits sur le principe de l'auto-assemblage, sont résistants et viscoélastiques à un niveau comparable au tissu natif (Proulx S. et al., 2011). Toutefois, ce modèle présente peu ou pas de réseau de fibres élastiques matures. En effet, *in vivo* le phénomène d'élastogenèse se déroule

essentiellement au cours de la vie embryonnaire et se termine lors de la petite enfance (Long J. L. et al., 2003). Plusieurs éléments ont été identifiés, tels que : (1) la faible production de tropoélastine (TE) des cellules adultes (Akhtar K. et al., 2010) ; (2) des phénomènes d'oxydation de la TE qui empêchent son pontage sur le réseau de microfibrilles (Davidson J. M. et al., 1997) et (3) l'impact négatif de l'acide ascorbique sur la stabilité de l'ARNm et le pontage de la TE sur le réseau de microfibrille (Uitto J., 2008).

L'acide ascorbique est pourtant une molécule indispensable dans la production des tissus du fait qu'elle induit l'assemblage de la matrice extracellulaire (essentiellement, du collagène). Tandis que le collagène et les polymères de glycosaminoglycanes (p. ex. hyaluronane) assurent les propriétés de force mécanique (contractilité) et l'hydratation appropriée respectivement, les fibres élastiques sont, quant à elles, responsables de son élasticité (Michel M. et al., 1996; Michel M. et al., 1999; Pouliot R. et al., 2002). Ainsi, un substitut cutané exempt d'un réseau de fibres élastiques subira les contraintes de son réseau de collagène (Michel M. et al., 1996; Michel M. et al., 1999; Pouliot R. et al., 2002) pouvant provoquer, si non contrôlées, post-greffe des lésions cicatricielles inesthétiques et dysfonctionnelles.

Induire l'élastogénèse dans un substitut cutané n'améliorerait pas seulement ses propriétés mécaniques, mais permettrait aussi la création d'un modèle d'étude *in vitro*. L'environnement, le vieillissement, les expositions aux UV, la génétique sont autant de facteurs qui peuvent influencer sur l'élastogénèse et la dégradation des fibres élastiques. Actuellement, il n'existe pas de modèle tridimensionnel reconstruit permettant l'étude de ces processus (Hinderer S. et al., 2015; L'Heureux N. et al., 2006; Opitz F. et al., 2004; Weber B. et al., 2013).

La méthode de l'auto-assemblage s'avère être la technique la plus prometteuse pour réaliser ces études même si son principe de base, l'acide ascorbique, s'oppose directement au processus de l'élastogénèse. Cette technique se divise en trois phases principales :

- (1) une phase de production dermique, en milieu de culture DMEM (acronyme de la terminologie anglaise pour *Dulbecco's modified Eagle's medium*, milieu modifié Dulbecco de Eagle) additionné de sérum, d'antibiotique et d'acide ascorbique,

- (2) une phase d'épidermisation du derme reconstruit, d'abord immergé, dans un milieu de culture DH (acronyme de la terminologie anglaise pour *Dulbecco's modified Eagle's and Ham's F12 medium*) additionné de sérum, d'EGF (acronyme de la terminologie anglaise pour *Epidermal Growth Factor* ; facteur de croissance épidermique), d'insuline, d'hydrocortisone, de toxine de choléra, d'antibiotique et d'acide ascorbique, puis finalement
- (3) une phase de différenciation épidermique en air-liquide, dans un milieu de culture DH additionné de sérum, d'insuline, d'hydrocortisone, de toxine de choléra, d'antibiotique et d'acide ascorbique.

Deux types de milieux de culture sont ainsi principalement utilisés, le milieu DMEM et DH. Chacun contenant un minimum d'additifs permettant, d'une part, la croissance cellulaire et, d'autre part, l'assemblage matriciel. Afin d'induire l'élastogénèse dans notre modèle de substituts cutanés, il a été envisagé de tester l'ajout de molécules au cours de la production. Plusieurs cibles ont été identifiées au cours de la dernière décennie. Toutefois, la plus prometteuse vient des travaux de Bunda et al., publiés en 2007. En effet, son étude a démontré l'impact positif des minéralocorticoïdes à travers la voie de l'*insulin-like growth factor* (IGF), telle que l'aldostérone, sur la synthèse de l'élastine en 2D sur des fibroblastes et par la suite sur des explants cutanés (Bunda S. et al., 2007; Mitts T. F. et al., 2010).

Pour le chapitre 4, nous avons émis l'hypothèse qu'il était possible d'induire l'élastogénèse par l'ajout de molécules agissant sur la voie de l'*Insulin-like growth factor-I* (IGF-I)

L'objectif général du chapitre 4 est d'améliorer les propriétés mécaniques des substituts cutanés bilamellaires. Les objectifs spécifiques du chapitre 4 sont : (1) d'évaluer l'impact de l'aldostérone et de son inhibiteur compétitif, la spironolactone, sur la production de substituts cutanés pigmentés et non pigmentés par la méthode d'auto-assemblage (épaisseur dermique, quantité de fibres élastiques) et (2) d'évaluer les propriétés mécaniques des substituts traités comparativement aux non traités (rétraction, résistance à la tension, module d'élasticité).

Chapitre 2 : Le génie tissulaire par auto- assemblage dans le recouvrement au long terme des plaies

2.1 Résumé en français

La peau est une source de cellules épithéliales et stromales qui peuvent être utilisées pour la production de substituts cutanés. En effet, les fibroblastes peuvent *in vitro* former des feuillets de matrice extracellulaire sur lesquels un épithélium peut être ajouté. Cependant, le potentiel immunogène des fibroblastes en condition de greffe allogénique n'est pas très bien compris. Nous avons ainsi évalué le rejet de substituts cutanés reconstruits produits avec des fibroblastes allogéniques et syngéniques associés à des cellules épithéliales syngéniques après transplantation sur un modèle murin immunocompétent. Les substituts composés de fibroblastes allogéniques, xénogéniques ou syngéniques associés soit avec des cellules épithéliales allogéniques, xénogéniques ou syngéniques ont été produits et transplantés comme greffe primaire. Un système de rejet de greffe secondaire a été aussi investigué par la greffe des substituts précédemment énoncés après injection de cellules épithéliales allogéniques. Après 19 et 56 jours de greffe, la tolérance des substituts a été évaluée par des analyses histologiques et l'immunodétection de marqueurs de cellules immunes. Comme attendu, les substituts composés d'un épiderme non autologue ont été rejetés et une infiltration de lymphocytes T CD8+ a été observée 19 jours après la greffe. En contraste, les substituts composés de fibroblastes allogéniques ou xénogéniques associés à des cellules épithéliales syngéniques ont été détectés 56 jours après greffe. Ce travail révèle que les substituts composés de fibroblastes allogéniques associés à des cellules épithéliales syngéniques ne sont pas rejetés après transplantation et permettent donc une utilisation à long terme sur des plaies.

2.2 Article

Immune tolerance of tissue-engineered skin produced with allogeneic or xenogeneic fibroblasts and syngeneic keratinocytes grafted on mice

Benjamin Goyer^{1,2,4}, Danielle Larouche^{1,2,4}, Dong Hyun Kim^{*1,2,4}, Vincent Bernier³, François A. Auger^{1,2,4}, and Lucie Germain^{1,2,4}

¹Centre de recherche en organogénèse expérimentale de l'Université Laval / LOEX, ²Department of Surgery and ³Department of molecular biology, medical biochemistry and pathology, Faculty of Medicine, Université Laval, Québec, QC, Canada, ⁴Centre de recherche du CHU de Québec - Université Laval, regenerative medicine division.

Correspondence: Prof. Lucie Germain, LOEX, Aile-R, CHU de Québec – Université Laval, 1401, 18^e rue, Québec, Québec, Canada, G1J 1Z4.

Phone (418) 649-0252 #61696 or #61646

Fax (418) 990-8248

E-mail: lucie.germain@fmed.ulaval.ca

**Current address: CHA Bundang Medical Center, CHA university Department of dermatology, Seoul, Korea.*

2.2.1 Résumé (anglais)

Skin is a source of epithelial and stromal cells that can be used for the production of tissue substitutes. Indeed, stromal fibroblasts *in vitro* can form sheets of extracellular matrix on which an epithelium can be reformed. However, immunogenicity of allogeneic fibroblasts is not well understood. We evaluated the immune rejection of tissue-engineered skin (TES) produced with allogeneic fibroblasts and syngeneic epithelial cells after transplantation in immunocompetent mice. TES composed of allogeneic, xenogeneic or syngeneic fibroblasts associated with allogeneic, xenogeneic, or syngeneic epithelial cells were transplanted in mice as primary grafts. Secondary graft rejection was also investigated by grafting in mice previously injected with allogeneic epithelial cells. After 19 and 56 days, the TES tolerance was evaluated by histological analysis and immunodetection of immune response mediators. As expected, TES composed of non-autologous epidermis were rejected, and an infiltration of CD8-expressing cells was observed 19 days post-grafting. In contrast, TES composed of syngeneic, allogeneic or xenogeneic fibroblasts underlying a syngeneic epidermis were still present 56 days after grafting. This work indicates that TES composed of autologous epithelial cells and allogeneic fibroblasts are not rejected after transplantation and allow for permanent wound coverage.

2.2.2 Introduction

The loss of skin tissue can occur for many reasons, including trauma, chronic or acute wounds, genetic disorders and surgical interventions, and is still one of the most challenging problems in healthcare, especially when the defect exceeds 50–60% of the total body surface area (Loss et al., 2000). Currently, the standard treatment for extensive full-thickness skin wounds is the use of split-thickness skin autografts harvested from an uninjured donor site (Andreassi et al., 2005, Stanton and Billmire, 2002, Supp and Boyce, 2005). When skin tissue loss exceeds 50% of the total body surface area, donor sites are limited and surgeons must harvest the same donor site several times. Furthermore, a maximum of three to four split-thickness skin autograft harvests are usually possible from the same donor site and re-cropping can delay wound healing or lead to a full-thickness wound (Atiyeh and Costagliola, 2007). As an alternative to skin autografts, tissue engineered skin have been developed, composed of both a dermis and an epidermis (Halim et al., 2010).

To offer a physical barrier to bacteria and creation of a moist wound environment, skin allografts and xenografts are widely used as temporary dressing for the treatment of extensively burned patients while waiting for the availability of skin autografts (or other permanent skin substitutes). However, allografts and xenografts are rejected by the immune system and the onset of necrosis usually appears within two weeks (Sheridan and Moreno, 2001). The phenomenon of skin allograft rejection was first described by Medawar in the rabbit (Medawar, 1944), and highlighted by Billingham who discovered the critical role of the major histocompatibility complex (MHC) in triggering the immune response in mice (Billingham, 1959). The MHC are composed of cell surface proteins that allow the immune system to discriminate foreign cells from its own cells. The strong immunogenicity of endothelial cells and keratinocytes is well known, these cell types must be autologous for permanent integration of the graft into the host (Dvorak et al., 1980, Dvorak et al., 1979). In contrast, fibroblasts express low levels of markers responsible for acute rejection and some indications suggest that allogeneic fibroblasts grown on tissue-engineered scaffolds do not lead to rejection after grafting (Cuono et al., 1987, Hickerson et al., 1994). However, data are not conclusive regarding immunogenicity of human allogeneic fibroblasts alone and it is unclear whether allogeneic fibroblasts persist in grafted tissue, or if they are replaced by host cells after grafting (Falanga et al., 1998, Hickerson et al., 1994, Hull et al., 1983, Reagan et al., 1997, Sher et al., 1983).

Our group has developed a scaffold-free bilayered tissue-engineered skin (TES) produced using keratinocytes and fibroblasts that can be harvested from a small skin biopsy. Our approach called the self-assembly approach of tissue engineering (Michel et al., 1999), is based on the capacity of mesenchymal cells to form their own extracellular matrix (ECM) *in vitro* in the presence of ascorbic acid (L'Heureux et al., 1998). After the addition of keratinocytes and culture at the air-liquid interface, TES present a fully differentiated epidermis. This method also sustains growth of murine cells (Larouche et al., 2011). Therefore, grafting this TES model on mice offers the possibility to characterize the immune response as a function of the cell source (autologous, allogeneic or xenogeneic) used for their production. The objective of this study was to determine the immunogenicity of TESs produced with allogeneic or xenogeneic fibroblasts, associated with syngeneic epithelial cells. To do so, we grafted the different TES combinations in immunocompetent mice without immunosuppressive drug treatment. The results presented here demonstrate that allogeneic fibroblasts persist in the tissue-engineered skin 56 days after grafting without adverse effects on tissue regeneration.

2.2.3 Résultats

Engraftment of tissue-engineered skin substitute on C3H/HeN mice

TESs were produced by the self-assembly approach of tissue engineering (Michel et al., 1999). In order to test the hypothesis that allogeneic stromal cells allowed for long-term skin engraftment, different combinations of TES were produced using autologous (syngeneic) or non-autologous (allogeneic or xenogeneic) cells. C3H/HeN mice were chosen as graft recipients. Syngeneic (C3H/HeN fibroblasts and epithelial cells), allogeneic (BALB/c fibroblasts and epithelial cells), xenogeneic (human fibroblasts and epithelial cells) and chimeric (C3H/HeN epithelial cells and BALB/c fibroblasts, C3H/HeN epithelial cells and human fibroblasts, BALB/c epithelial cells and C3H/HeN fibroblasts) TESs were produced. Before grafting, all TESs appeared histologically as homogenous tissues with an epidermis covering the dermal component. The four typical layers of the epidermis (stratum basale, spinosum, granulosum and corneum) were observed in all substitutes (Figure 2.1). Of note, human epithelial cells produced a thicker epidermis (Figure 2.1C) than mouse epithelial cells (Figure 2.1A, B, D, E and F), reflecting the differences between these two species. The dermal component of all TESs appeared as a homogenous ECM-rich tissue containing fibroblasts.

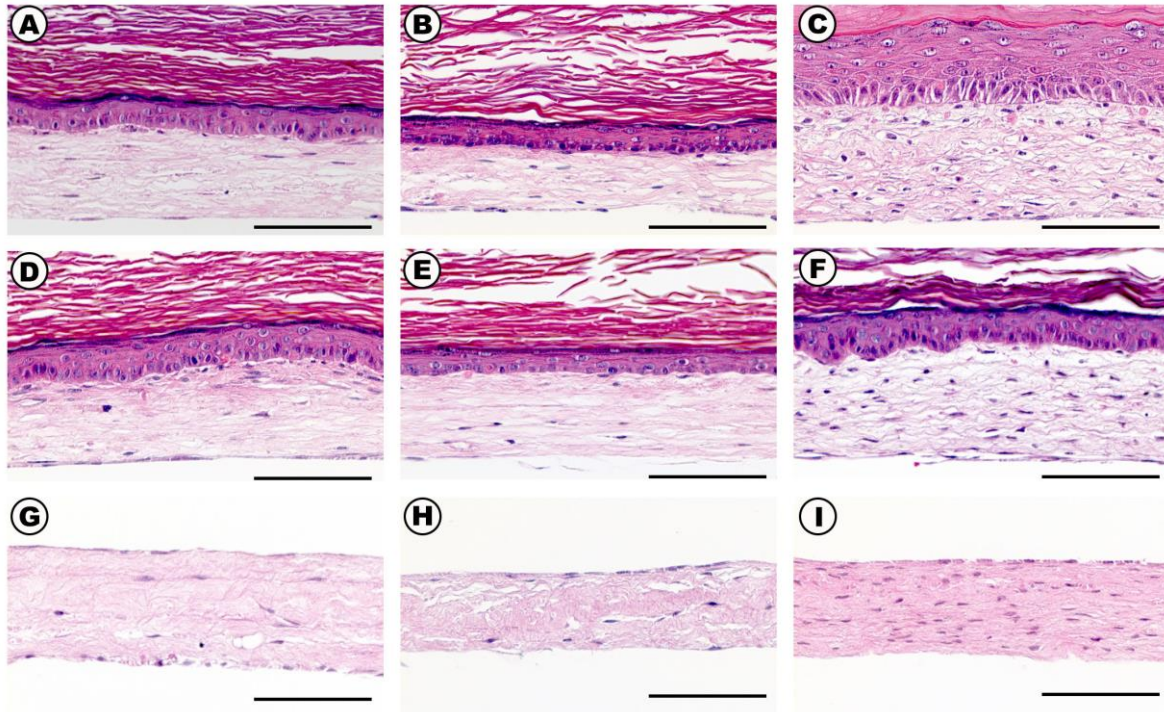


Figure 2.1: Histological analysis of TESs and tissue-engineered dermis

Representative histologic results of *in vitro* cultured TESs at 14 days of maturation at the air-liquid interface (A-F), and tissue-engineered dermis at 21 days of maturation (G-I). Engineered tissues were composed of: A) C3H/HeN fibroblasts and epithelial cells (syngeneic TES), B) BALB/c fibroblasts and epithelial cells (allogeneic TES), C) human fibroblasts and epithelial cells (xenogeneic TES), D) BALB/c fibroblasts and C3H/HeN epithelial cells (D, E and F are chimeric TESs), E) C3H/HeN fibroblasts and BALB/c epithelial cells, F) Human fibroblasts and C3H/HeN epithelial cells, G) C3H/HeN fibroblasts, H) BALB/c fibroblasts, and I) Human fibroblasts. TED, Tissue-Engineered Dermis. Scale bars: 100 μ m.

Allogeneic fibroblasts survive 8 weeks after transplantation

TESs were transplanted onto the dorsal muscular fascia of adult mice surrounded by a Fusenig's silicon chamber to prevent epithelial cell migration from the recipient skin tissue. Fifteen (data not shown) and 19 days after grafting, histologic analysis revealed the complete absence of the epidermis in TESs produced with allogeneic (Figure 2.2D and F) or xenogeneic epithelial cells (Figure 2.2E) indicating rejection, as expected. The presence of immune cell infiltration within the tissue engineered dermis remained visible (Figure 2.2B and C). Interestingly, chimeric TESs produced with syngeneic epithelial cells and allogeneic or xenogeneic fibroblasts showed no sign of rejection and were similar to TESs produced with syngeneic epithelial cells and fibroblasts (Figure 2.2A).

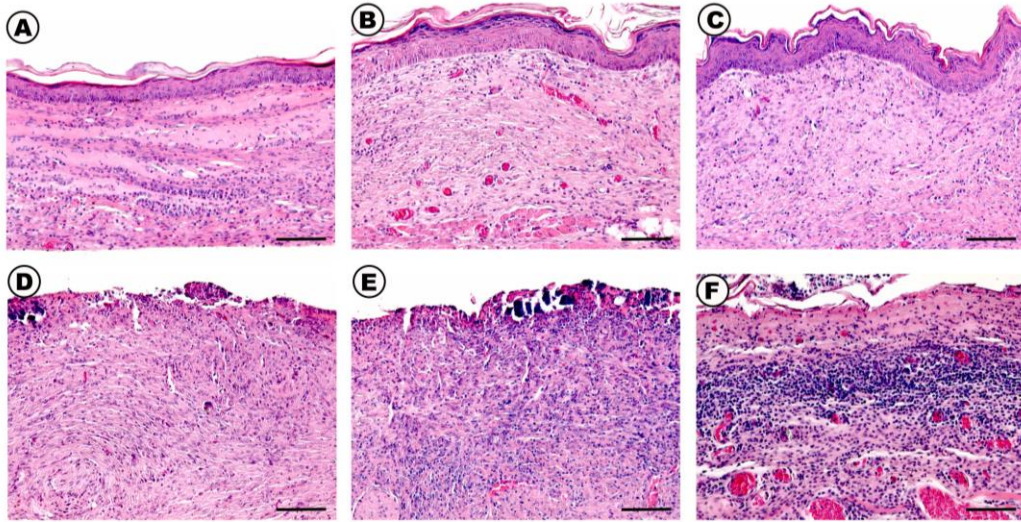


Figure 2.2: 19 days engraftment of TESs in C3H/HeN mice

Representative histologic results 19 days after grafting TES on C3H/HeN mice. Engineered tissues were composed of: A) C3H/HeN fibroblasts and C3H/HeN epithelial cells (syngeneic TES), B) BALB/c fibroblasts and C3H/HeN epithelial cells (chimeric TES), C) human fibroblasts and C3H/HeN epithelial cells, D) BALB/c fibroblasts and BALB/c epithelial cells (allogeneic TES), E) human fibroblasts and epithelial cells (xenogeneic TES), and F) C3H/HeN fibroblasts and BALB/c epithelial cells. Scale bars: 100 μ m.

Syngeneic and allogeneic tissue-engineered dermis, without epithelial cells, were also produced. These tissue-engineered dermis were transplanted subcutaneously to evaluate the immune response against fibroblasts in the absence of keratinocytes. Microvessels and some immune cells were observed in all tissue-engineered dermis 19 and 56 days after grafting (Figure S2.1). Collectively, these results indicate that, unlike epithelial cells, non-autologous fibroblasts included in tissue-engineered substitutes do not lead to tissue rejection.

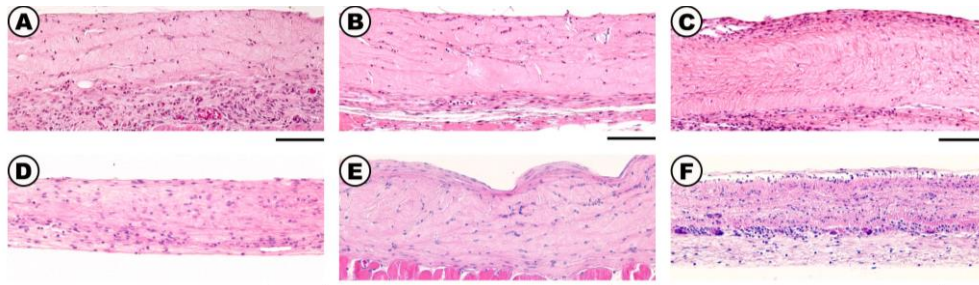


Figure S2.1: Tissue-engineered dermis 19 and 56 days after grafting on C3H/HeN mice

Representative histologic results of TED 19 days (A-C) and 56 days (D-F) after grafting on C3H/HeN mice. Tissue-engineered dermis were composed of: A) C3H/HeN fibroblasts, B) BALB/c fibroblasts, C) human fibroblasts, D) C3H/HeN fibroblasts, E) BALB/c fibroblasts, and F) human fibroblasts. Scale bars: 100 μ m.

The physical barrier between TES and mouse skin, Fusenig's chamber, was removed 21 days post-grafting. After 35 (data not shown) and 56 days, TESs that were not rejected had a normal skin appearance, with the presence of blood vessels distributed throughout the tissue-engineered dermis, and without evidence of immune cell infiltration (Figure 2.3A to C). After the removal of the silicone chamber, the host epithelial cells migrated and reformed an epithelium to replace the epithelium of the allogeneic or xenogeneic TESs initially rejected. A decrease of the immune cell infiltration was observed in these tissues (Figure 2.3D and E).

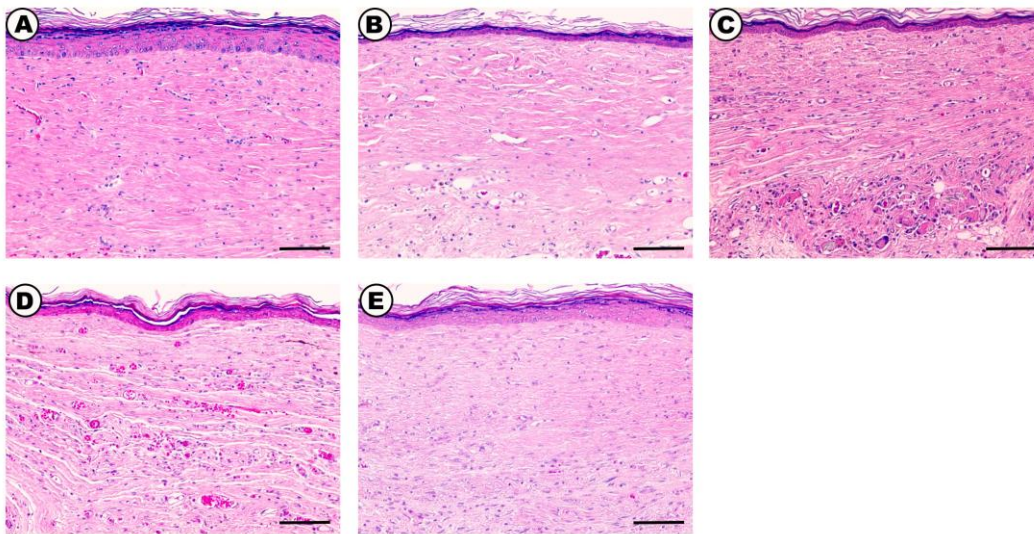


Figure 2.3: 56 days engraftment of TESs in C3H/HeN mice

Representative histologic results of TES 56 days after grafting on C3H/HeN mice. Engineered tissues were composed of: A) C3H/HeN fibroblasts and epithelial cells (syngeneic TES), B) BALB/c fibroblasts and C3H/HeN epithelial cells (chimeric TES), C) human fibroblasts and C3H/HeN epithelial cells, D) BALB/c fibroblasts and epithelial cells (allogeneic TES), and E) human fibroblasts and epithelial cells (xenogeneic TES). Scale bars: 100 μ m.

The persistence of allogeneic and human fibroblasts within the tissue-engineered dermis 19 and 56 days after grafting was confirmed by labelling the haplotype respective to each species (Figure S2.2 and S2.3). Syngeneic and allogeneic tissue-engineered dermis grafted subcutaneously seemed stable after 35 (data not shown) and 56 days (Figure S2.1) without signs of immune cell infiltration or ECM tissue degradation. However, immune cell infiltration was frequently observed within xenogeneic tissue-engineered dermis produced with xenogeneic fibroblasts, and the ECM appeared remodeled at day 56 (Figure S2.1F) compared to tissue-engineered dermis composed of syngeneic or allogeneic fibroblasts (Figure S2.1D and E).

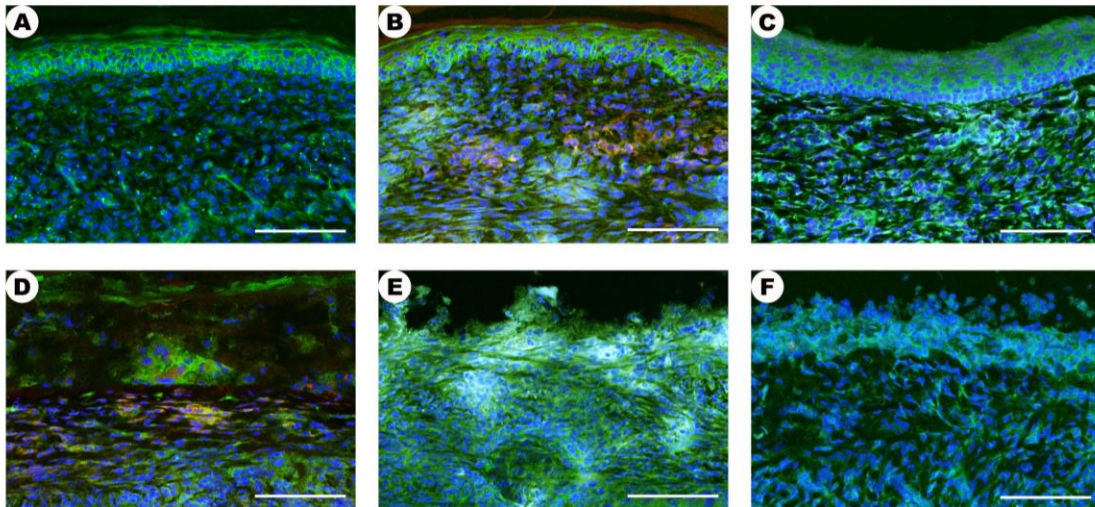


Figure S2.2: MHC Immunolabeling in TESs 19 days after grafting on C3H/HeN mice

Immunofluorescence staining of TESs 19 days after grafting on C3H/HeN mice with anti-H2^d specific to BALB/c cells (red), anti-H2^k specific to C3H/HeN cells (green) and anti-HLA-ABC specific to human cells (white) antibodies. TESs were composed of: A) C3H/HeN fibroblasts and epithelial cells (syngeneic TES), B) BALB/c fibroblasts and C3H/HeN epithelial cells (chimeric TES), C) human fibroblasts and C3H/HeN epithelial cells, D) BALB/c fibroblasts and epithelial cells (allogeneic TES), E) human fibroblasts and epithelial cells (xenogeneic TES), and F) C3H/HeN fibroblasts and BALB/c epithelial cells. Cell nuclei were counterstained with Hoechst (blue). Scale bars: 100 μ m.

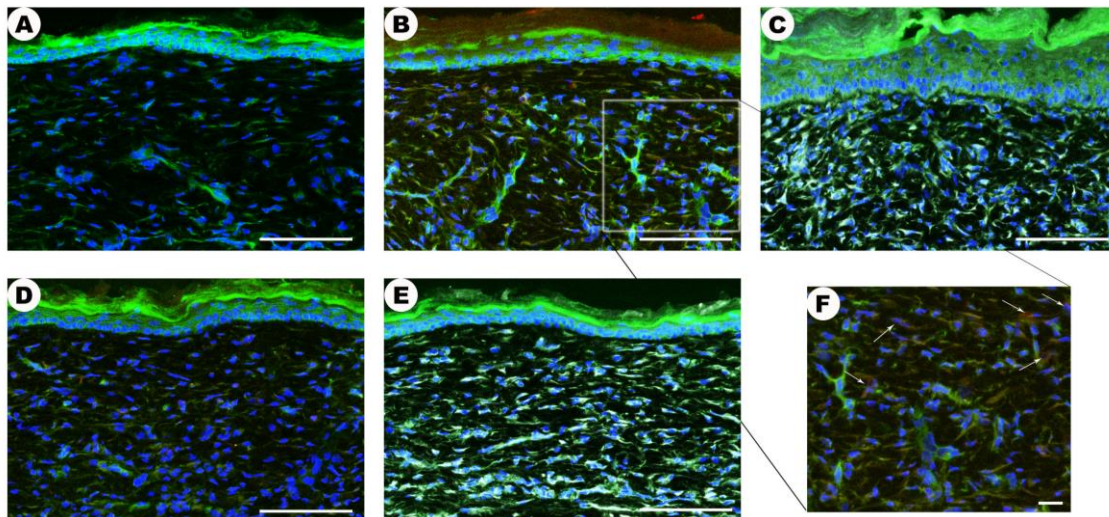


Figure S2.3: Immunolabeling for the MHC in TESs 56 days after grafting on C3H/HeN mice

Immunofluorescence staining of TESs 56 days after grafting on C3H/HeN mice with anti-H2^d specific to BALB/c cells (red), anti-H2^k specific to C3H/HeN cells (green) and anti-HLA-ABC specific to human cells (white) antibodies. TES were produced from: A) C3H/HeN fibroblasts and epithelial cells (syngeneic TES), B) BALB/c fibroblasts and C3H/HeN epithelial cells (chimeric TES), C) human fibroblasts and C3H/HeN epithelial cells, D) BALB/c fibroblasts and epithelial cells (allogeneic TES), and E) human fibroblasts and epithelial cells (xenogeneic TES), F) Zoom of the box in B. Cell nuclei were counterstained with Hoechst (blue). A to E: Scale bars: 100 μ m. F: Scale bar: 20 μ m.

Specialized immune cells migrate into TESs after grafting

The innate immune response was evaluated by direct immunofluorescence labelling of CD206, also known as MRC1 (c-type mannose receptor 1), a receptor present on the surface of M2 macrophages, while the adaptive immune response was assessed by immunolabelling of CD4, CD8 and FOXP3.

Nineteen days after grafting, we observed that the number of M2 macrophages was similar between the syngeneic, allogeneic and xenogeneic tissue engineered dermis grafted subcutaneously (Figure S2.2) as well as between syngeneic, allogeneic and chimeric TESs (Figure 2.4). In contrast, the immunolabeling of CD4, CD8 (Figure 2.4) and FOXP3-expressing cells (data not shown), showed 4.5 times more CD8-expressing cells per mm² in allogeneic TESs compared with syngeneic TESs (Figure 4, p value=0.036). However, the number of CD8-expressing cells in chimeric TESs composed of syngeneic epithelial cells and allogeneic fibroblasts was comparable to fully syngeneic TESs. Within syngeneic, allogeneic and xenogeneic TE dermis grafted subcutaneously, very few CD4, CD8 (Figure S2.4) and FOXP3-expressing cells (data not shown) were present, but no significant difference was detected between conditions.

After 56 days, the number of CD4-expressing cells decreased, while CD8 were not detected. The number of M2 macrophages significantly increased in allogeneic compared to syngeneic and chimeric TESs (Figure 2.4).

Collectively, these observations show that allogeneic fibroblasts alone or in combination with autologous epithelial cells do not induce graft rejection mediated by CD8-expressing cells.

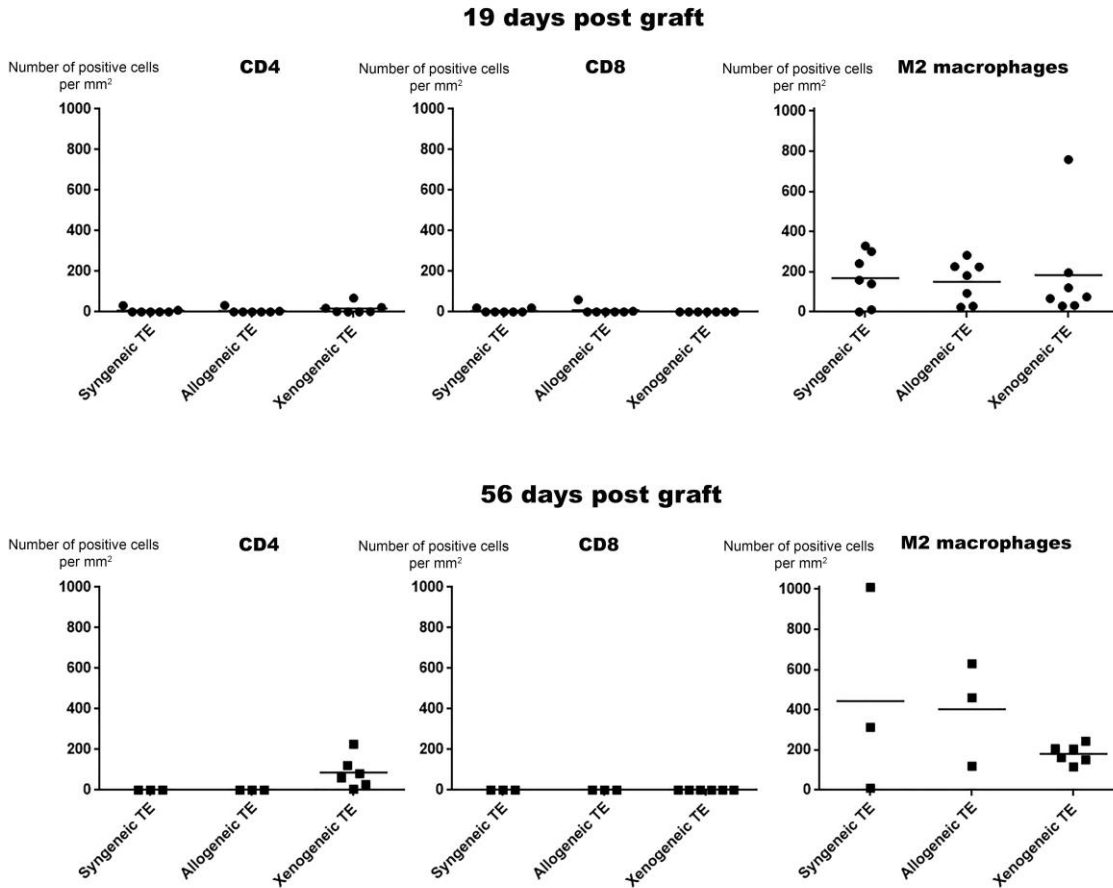


Figure S2.4: Primary immune response in tissue-engineered dermis 19 and 56 days after grafting

Number of cells expressing CD4, CD8a and CD206 (M2 macrophages) in tissue engineered dermis composed of C3H/HeN fibroblasts (syngeneic), BALB/c fibroblasts (allogeneic), and human fibroblasts (xenogeneic) 19 and 56 days after grafting on C3H/HeN mice. TED: Tissue engineered dermis.

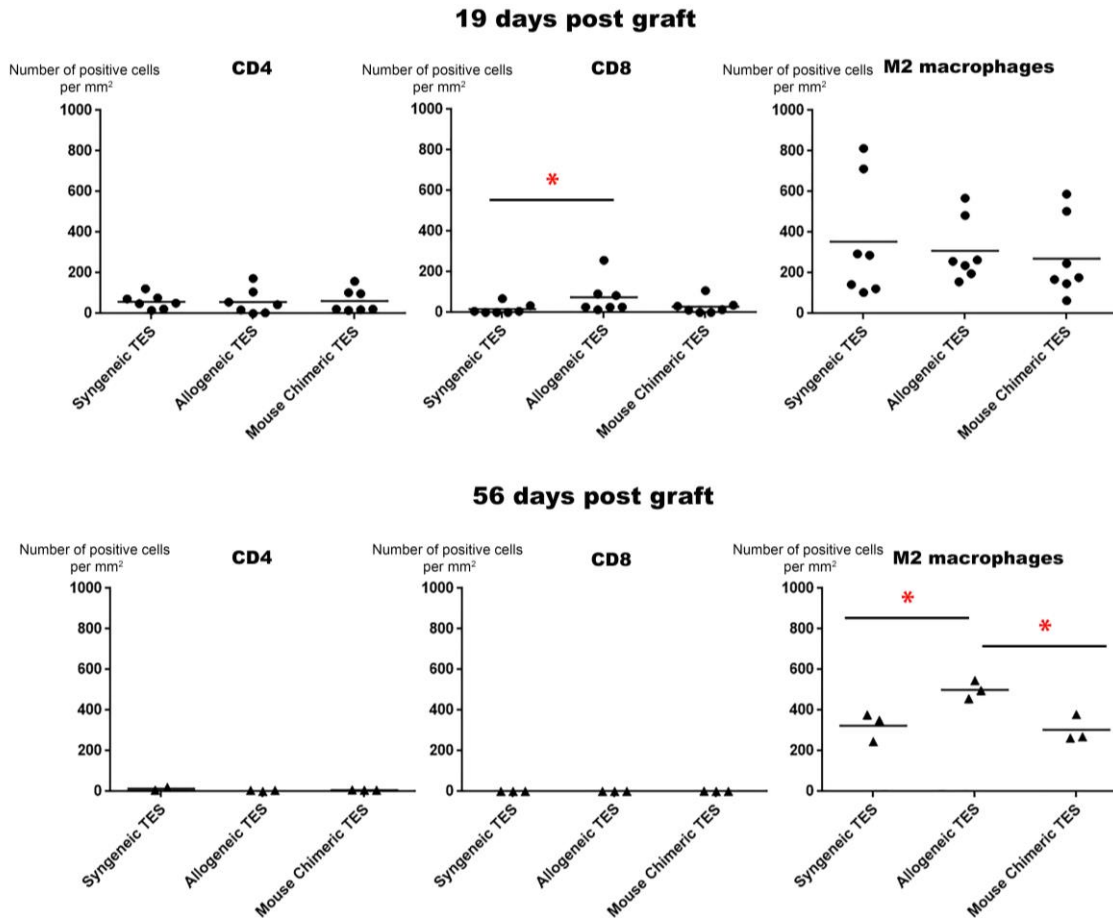


Figure 2.4: Primary immune response in TES 19 and 56 days after grafting

Number of cells expressing CD4, CD8a and CD206 (M2 macrophages) in TESs composed of C3H/HeN fibroblasts and epithelial cells (syngeneic TES), BALB/c fibroblasts and epithelial cells (allogeneic TES), and BALB/c fibroblasts and C3H/HeN epithelial cells (chimeric TES) 19 and 56 days after grafting on C3H/HeN mice. TES: Tissue Engineered Skin Substitute. * $p < 0.05$

Pre-immunized C3H/HeN mice reject allogeneic TESs but not chimeric TESs with autologous epithelial cells.

To evaluate the secondary immune response after repeated contact with antigens corresponding to the genetic background of the allogeneic fibroblasts present in the TES, BALB/c epithelial cells were injected subcutaneously in C3H/HeN mice three weeks before grafting the syngeneic, allogeneic and chimeric (allogeneic fibroblasts and autologous epithelial cells) TESs. By day five, no tissue graft rejection was observed (data not shown) while, CD144-positive microvessels (data not shown) were noticed in allogeneic and chimeric TESs. On day 19 post-grafting, allogeneic TESs were rejected

(Figure 2.5C), while both chimeric (Figure 2.5B) and syngeneic TESs (Figure 2.5A) presented a fully differentiated epithelium without sign of rejection.

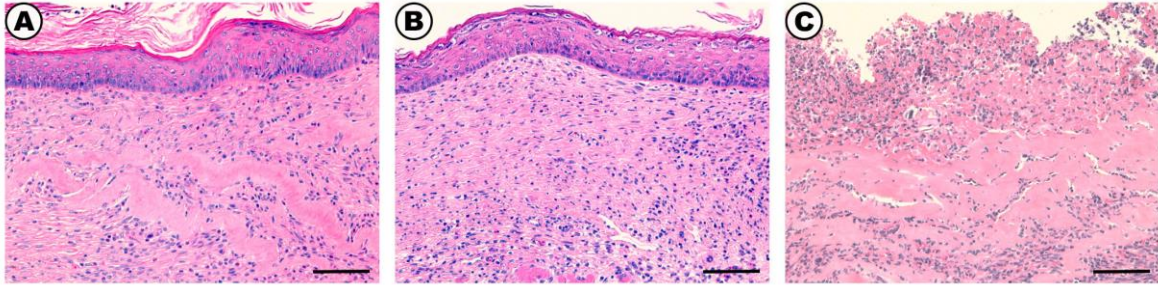


Figure 2.5: 19 days engraftment of TES in C3H/HeN mice primed with BALB/c epithelial cells

Representative histologic results of TES 19 days after grafting on C3H/HeN mice primed with BALB/c epithelial cells. TESs were composed of: A) C3H/HeN fibroblasts and C3H/HeN epithelial cells (syngeneic TES), B) BALB/c fibroblasts and C3H/HeN epithelial cells (chimeric TES), and C) BALB/c fibroblasts and BALB/c epithelial cells (allogeneic TES). Scale bars: 100μm.

By day 19, M2 macrophages and CD4-expressing cells were observed in syngeneic, allogeneic and chimeric TES, but no statistical difference was detected. In contrast, cytotoxic lymphocytes, CD8-expressing cells were only detected in allogeneic TES (Figure 2.6).

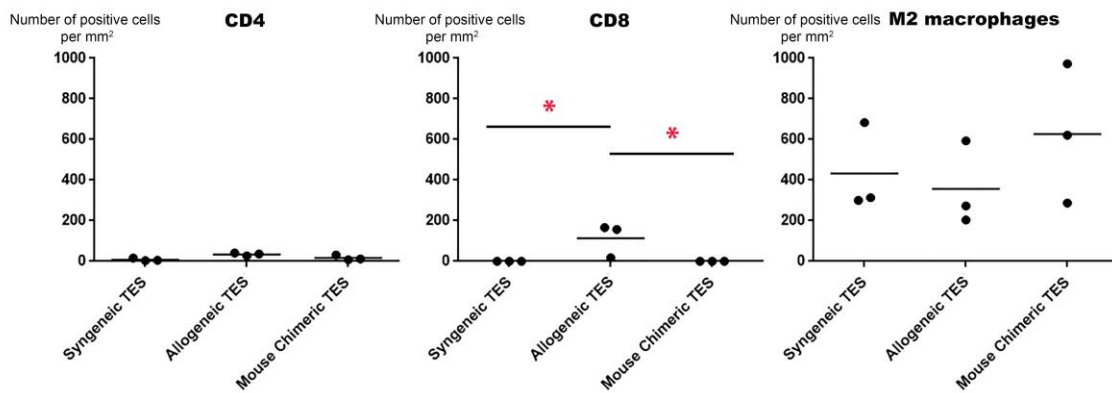


Figure 2.6: Secondary immune response in TESs 19 days after grafting on C3H/HeN mice primed with BALB/c epithelial cells

Number of cells expressing CD4, CD8a and CD206 (M2 macrophages) in TESs composed of C3H/HeN fibroblasts and epithelial cells (syngeneic TES), BALB/c fibroblasts and epithelial cells (allogeneic TES), and BALB/c fibroblasts and C3H/HeN epithelial cells (chimeric TES) 19 days after grafting on C3H/HeN mice primed with BALB/c epithelial cells. TES: Tissue Engineered Skin Substitute. *p<0.05

2.2.4 Discussion

The present study demonstrates that TESs composed of allogeneic fibroblasts and syngeneic epithelial cells allow the permanent coverage of full-thickness skin wounds. No rejection occurred in immunocompetent mice in the absence of immunosuppressive drugs. We also observed that a mesenchymal tissue substitute produced from allogeneic cells could be implanted subcutaneously without inducing graft rejection. These findings open the possibility of using allogeneic fibroblasts to produce ECM scaffolds with multiple applications in regenerative medicine. Notably, ready to use tissue-engineered dermal substitutes, which could be implanted or serve as dermal support for the seeding of patient's epithelial cells for the rapid production of chimeric TES that could be ready for grafting within 16 days.

Major histocompatibility complex antigens are known as initiators of allograft rejection (Benichou et al., 2011). After being exposed by antigen-presenting cells, MHC antigens are recognized by T cells that induce a cytotoxic response through the activation of CD8 lymphocytes (Benichou et al., 2011, Ingulli, 2010, Sherman and Chattopadhyay, 1993). Epithelial cells are highly immunogenic. Cultured epithelial grafts are rejected even if only a minor antigen differentiate the donor from the recipient (Rouabhia M. et al., 1993). It has been reported that rejection of grafts composed of cultured epithelial cells can be prevented by the use of immunosuppressive drugs such as cyclosporine (Fabre and Cullen, 1989). However, the rejection process is rapidly induced after cessation of immunosuppressive therapy (Fabre and Cullen, 1989). Consistent with the fact that keratinocytes express high levels of HLA class II (Czernielewski and Bagot, 1986, Fabre and Cullen, 1989, Kinn et al., 1990, Pye, 1988), epidermis of allogeneic TESs were completely rejected 19 days after grafting in our experiments. However, allogeneic fibroblasts survived within the dermal component after 56 days suggesting that even if the adaptive immune response against allogeneic epithelial cells had taken place, allogeneic or xenogeneic fibroblasts were spared. The absence of CD8 expressing lymphocytes concomitant with the presence allogeneic fibroblasts in chimeric TESs 8 weeks after grafting confirmed that allogeneic fibroblasts did not trigger the CD8-mediated immune rejection response.

Allogeneic fibroblasts embedded in our tissue-engineered substitutes showed very low immunogenicity after transplantation. Even if MHC-I and MHC-II at the surface of fibroblasts can be up-regulated during an immune response (Gruschwitz and Vieth, 1997, Wassenaar et al., 1997), especially in the presence of interferon- γ (Kern et al., 2001, Navarrete Santos et al., 1997), *in vitro* studies have shown that interferon- γ -induced MHC expression on fibroblasts does not trigger unprimed T-cell or lymphocyte response (Johnson et al., 1997, Theobald et al., 1993). However, allogeneic fibroblasts have been shown to induce T-cell proliferation if T-cells are previously primed with fibroblast's superficial alloantigens (Shimabukuro et al., 1996). In our study, chimeric TESs grafted on mice that have been previously exposed to MHC antigens specific to the genetic background of allogeneic fibroblasts composing the dermal portion of the TES have not been rejected. This result indicates that several consecutive batches of TESs composed of allogeneic fibroblasts and autologous epithelial cells can be transplanted without inducing the secondary immune response.

In our study, we observed that the chimeric TES composed of allogeneic fibroblasts and syngeneic epidermis induced an inflammatory response of the same magnitude as the fully syngeneic TES after grafting. The survival of allogeneic cells over time in the chimeric TES graft is consistent with the presence of FOXP3 positive cells which are known as a master regulator of the regulatory T cell development and function (Fontenot et al., 2003, Fontenot et al., 2005, Hori et al., 2003). Besides, similar to the syngeneic TES, the histologic features of chimeric TES was characterized by the persistence of a dense ECM and an epidermis which self-renewed and differentiated normally over the 8-week follow-up period.

In conclusion, the results presented here demonstrate that allogeneic living fibroblasts composing the dermal portion of TES are tolerated by the immune system after grafting and that it would be possible to overcome the use of autologous fibroblasts in the production of TES by the self-assembly approach. Faster availability of TESs opens the possibility to shorten the time necessary for the definitive wound coverage of severely burned patient, while avoiding multiple autograft harvesting of donor sites which are painful and enlarge the wounded area during the 14 days necessary to heal these donor sites. Indeed, about 13-17 days are required for *in vitro* amplification of fibroblasts to obtain enough cells for the initiation of the production of bi-layered tissue-engineered skin substitutes, a process which requires three to five weeks depending on the method used (Larouche et al., 2016). Thus, the standard protocol

initially proposed, which includes cell extraction from the initial patient's skin biopsy, cell amplification and the production of the first autologous TES batch, requires 62 to 69 days. The results presented here would allow achieving the first batch of TESs within 31 days after the initial biopsy. The subsequent batches would require 21 days.

In the field of tissue engineering, this opens the possibility of selecting human fibroblast or mesenchymal cell populations based on their advantageous biological properties (population time doubling, thickness of the stromal substitute, rapidity of ECM assembly) and adequate biosafety (pathogen-free, validated non-tumorigenicity, cell culture stability), in order to standardize the manufacturing process of engineered tissues.

2.2.5 Matériels et méthodes

Additional methods are available in the Supplementary Appendix.

Biological specimens

This study was conducted according to our institutions guidelines and the Declaration of Helsinki. All protocols were approved by the institution's animal care and use committee (Comité de protection des animaux de l'Université Laval, Québec, Canada) and by the institution's committee for the protection of human subjects (Comité d'éthique de la recherche du CHU de Québec - Université Laval).

Isolation and culture

Human cells were obtained from healthy skin biopsies harvested from the scalp of two adult donors (37 and 55 years old). Briefly, skin fragments were digested with 500 µg/mL thermolysin (Sigma Chemicals, St-Louis, MO) in the HEPES buffer [10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulfonic acid (MP Biomedicals Inc., QC, Canada), 6.7 mM potassium chloride, 142 mM sodium chloride, and 1 mM calcium chloride] at 4°C overnight. The dermis was then separated from the epidermis with forceps. Keratinocytes were dissociated from the epidermis in a trypsin/ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution [0.05% trypsin 1–500 (Intergen, ON, Canada) and 0.01% EDTA/ disodium salt (Sigma-

Aldrich) prepared in phosphate-buffered saline (PBS)] at 37°C for 15 min, while fibroblasts were dissociated from the dermis in a collagenase enzymatic solution (1 mg/ml) [collagenase H (Roche)/Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen, ON, Canada)], at 37°C for 3 hours. Cells were amplified in culture flasks until passage 4 and cryopreserved with freezing medium consisting of 90% fetal calf serum (HyClone) and 10% dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma Chemicals). Mouse cells were obtained from healthy C3H/HeN and BALB/c adult and newborn mice. Fibroblasts were isolated from three dorsal skin of one-month old female. Epithelial cells were isolated from the entire skin of one- to two-days old newborn mice.

For fibroblast isolation, dorsal skin was shaved and an area of ten cm² was harvested, washed in 70% ethanol and sterile PBS. The skin sample was placed in a Petri dish and incubated at 4°C overnight in a 0.25% trypsin solution with 40 µg/mL of DNase (Sigma-Aldrich). The day after, the epidermis was peeled off and the dermis was scratched with a scalpel to avoid epithelial cell contamination. The dermis was then incubated in a 1 mg/ml collagenase/DMEM solution at 37°C for 3 hours. Dissociated cells were cultured in DMEM with 10% FCS until passage 3 and cryopreserved.

Mouse epithelial cells were extracted from the epidermis using the method by Yuspa and Harris (Yuspa and Harris, 1974) with slight modifications. Briefly, after being euthanized, newborn mice were washed in 70% ethanol (Les Alcools de commerce, QC, Canada) and in 10% proviodine (Rougier Pharma, QC, Canada). After amputation of the limbs and the tail, a longitudinal incision was performed on the ventral side, the skin was first peeled laterally, and then flayed away. The skin pieces were then washed in sterile PBS and placed in a 0.25% trypsin solution with 40 µg/mL DNase at 4°C overnight. The day after, all epidermis were peeled off from the dermis using forceps and gently scraped in a DMEM and Ham's F12 medium (Invitrogen, ON, Canada) (cDME-Ham) to detach epithelial cells. Epithelial cells were then layered onto a Lympholyte-M cushion (Cedarlane Laboratories, Canada) and centrifuged (1800 g, 30 min). Cells in the middle of the Lympholyte-M were harvested, suspended in 0.1% trypsin, transferred into a trypsinization unit (Celstir suspension culture flask; Wheaton Sciences Products, NJ) and incubated under agitation at 37°C for 10 min. The cell suspension was recuperated after trypsin inactivation with fresh cDME-Ham supplemented with 5% Fetal Clone II serum (HyClone, Logan, UT) to obtain the dissociated epithelial cells.

Tissue engineered skin production and grafting

Murine or human fibroblasts between their 2nd and 4th passages were used for the production of dermal substitutes. Briefly, fibroblasts were cultivated 28 days in DME with 10% FCS supplemented with 50 µg/mL of ascorbic acid (Sigma Chemicals, Mississauga, ON, Canada). According to the self-assembly approach of tissue engineering (Larouche et al., 2009, Michel et al., 1999, Pouliot et al., 2002), four fibroblast-derived ECM sheets were superimposed to obtain a thicker tissue engineered dermis onto which 200,000 human or 600,000 freshly extracted mouse epithelial cells per cm² were seeded. The resulting TESs were cultured submerged in cDME-Ham during 7 days. Then TES were raised at the air-liquid interface and cultured for 14 more days in epidermal growth factor-free cDME-Ham before analysis or grafting.

To evaluate the immune tolerance *in vivo*, C3H/HeN mice (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) were chosen as recipients. Each tissue-engineered dermis was grafted subcutaneously onto the dorsal muscular fascia and recovered by mouse recipient skin. TESs were grafted onto the dorsal muscular fascia in a Fusenig's silicon chamber (Germain et al., 1995, Pouliot et al., 2002). The silicon chamber was removed 21 days after grafting. Animals were observed periodically. However, the absence of desquamation within the silicone chamber impaired the macroscopic evaluation of rejection due to corneocyte accumulation. On days 15, 19, 35 and 56 animals were euthanized and biopsies were then collected to monitor of the grafts early after rejection (15 and 19 days) or their long-term evolution (35 and 56 days).

To evaluate secondary graft rejection caused by pre-existing exposure to allogeneic antigens, one million newborn BALB/c epithelial cells were injected subcutaneously onto C3H/HeN mice three weeks before grafting syngeneic, allogeneic and chimeric TESs. Biopsies were taken at five and 19 days.

Histological analysis

Tissue samples were fixed in 3.7% formaldehyde (ACP Chemicals, QC, Canada) and were processed for paraffin embedding. Sections (five µm) were stained with Hematoxylin Eosin. Digital images were acquired using an Axio Imager.Z2 microscope (Carl Zeiss Canada Ltd, ON, Canada). Histological evaluation was performed by two experienced specialists, a dermatologist (blind observer to determine rejection without knowing the experimental conditions) and a pathologist.

Direct immunofluorescence analysis

Samples were also embedded in Tissue-Tek OCT Compound (Miles, Inc., IN), cooled in liquid nitrogen, and conserved at -80°C for further immunofluorescence analysis. Direct immunofluorescence assays were performed on 12 µm-thick cryosections. For the detection of CD19, CD206, CD3, CD4, CD45R/B220, CD8a and I-A/I-E, cryosections were fixed ten minutes in 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich). A mouse IgG blocking reagent (Fitzgerald) diluted in a normal mouse serum (Fitzgerald) was added for 30 minutes. Fc receptors were blocked using anti-mouse CD16/32 (TruStain fcX, Biolegend) for 30 minutes. Antibodies were applied and incubated two hours. The following antibodies were used: anti-mouse/human CD45R/B220 conjugated to Alexa Fluor 488 (Clone RA3-6B2), anti-mouse CD8a conjugated to Alexa Fluor 594 (Clone 53-6.7), anti-mouse CD206 conjugated to Alexa Fluor 647 (Clone C068C2), anti-mouse CD3 conjugated to Alexa Fluor 594 (Clone 17A2), anti-mouse CD19 conjugated to Alexa Fluor 488 (Clone 6D5), anti-mouse H-2D^d conjugated to Alexa Fluor 647 (clone 34-2-12) from Biolegend. For the detection of H-2K^k, H-2D^d and HLA-ABC staining, cryosections were immunostained without previous fixation. Finally, cell nuclei were counterstained with Hoechst reagent 33258 (Sigma). Fluorescence was observed using a LSM700 confocal microscope (Zeiss, ON, Canada). Images were processed with Adobe Photoshop CC 2015 software (Adobe System, CA).

Statistical analysis

Quantified data represent the mean \pm SD where applicable, while figures show mean with each individual result. Statistical significance was determined using the non-parametric Wilcoxon rank-sum with two-tail parameters and a 95% level confidence (GraphPad Prism version 5). A p-value under 0.05 was considered significant. When repeated measures were null, the same previous test was used with one-tail parameter and a 90% level confidence.

2.2.6 Matériels et méthodes supplémentaires

Experimental group repartition

Table 2.1: Cells used for the reconstruction of tissue-engineered dermis grafted in C3H/HeN mice

	<i>Fibroblasts</i>	Number of graft				<i>Total</i>
		per time points				
		<i>15d</i>	<i>19d</i>	<i>35d</i>	<i>56d</i>	
<i>Syngeneic TED</i>	C3H/HeN	1	7	3	3	14
<i>Allogeneic TED</i>	BALB/c	1	7	3	3	14
<i>Xenogeneic TED</i>	Human	1	7	3	3	14

TED: Tissue-Engineered Dermis.

Table 2.2: Cells used for the reconstruction of TESs grafted in C3H/HeN mice

	<i>Fibroblasts</i>	<i>Epithelial cells</i>	Number of mice per time				<i>Total</i>
			points				
			<i>15d</i>	<i>19d</i>	<i>35d</i>	<i>56d</i>	
<i>Syngeneic TES</i>	C3H/HeN	C3H/HeN	1	7	2	3	13
<i>Allogeneic TES</i>	BALB/c	BALB/c	2	7	2	3	14
<i>Xenogeneic TES</i>	Human	Human	2	7	2	2	13
<i>Chimeric TES</i>	BALB/c	C3H/HeN	1	7	3	3	14
<i>Mouse Chimeric-2 TES</i>	C3H/HeN	BALB/c	0	6	0	0	6
<i>Human Chimeric TES</i>	Human	C3H/HeN	1	7	3	2	13

TES : Tissue-Engineered Skin Substitute

Table 2.3: Cells used for the reconstruction of TESs grafted in primed C3H/HeN mice

	<i>Fibroblasts</i>	<i>Epithelial cells</i>	Number of mice per time points 19d	<i>Total</i>
<i>Syngeneic TES</i>	C3H/HeN	C3H/HeN	3	3
<i>Allogeneic TES</i>	BALB/c	BALB/c	3	3
<i>Chimeric TES</i>	BALB/c	C3H/HeN	3	3

TES : Tissue Engineered Skin Substitute

2.2.7 Remerciements

The authors gratefully thank Drs. Alphonse Roy, Félix-André Têtu, and Maurice Bouchard for providing skin biopsies; as well as Israël Martel, Amélie Lavoie, Francis Bisson, Carolyne Simard-Bisson, and Anne-Marie Moisan for their expert technical assistance. This work was supported by the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) grant MOP-12087 and FDN-143213 (L.G.), Fondation des Pompiers du Québec pour les Grands Brûlés (FPQGB), the Fonds de Recherche du Québec-Santé (FRQS), and the Réseau de thérapie cellulaire et tissulaire (ThéCell) du FRQS. L.G. is the recipient of a Tier 1 Canadian Research Chair on Stem Cells and Tissue Engineering and a Research Chair on Tissue-Engineered Organs and Translational Medicine of the Fondation de l'Université Laval.

2.2.8 Références

- Andreassi A, Bilenchi R, Biagioli M, D'Aniello C. Classification and pathophysiology of skin grafts. *Clin Dermatol* 2005;23(4):332-7.
- Atiyeh BS, Costagliola M. Cultured epithelial autograft (CEA) in burn treatment: three decades later. *Burns* 2007;33(4):405-13.

- Benichou G, Yamada Y, Yun SH, Lin C, Fray M, Tocco G. Immune recognition and rejection of allogeneic skin grafts. *Immunotherapy* 2011;3(6):757-70.
- Billingham RE. Reactions of grafts against their hosts. *Science* 1959;130(3381):947-53.
- Cuono CB, Langdon R, Birchall N, Barttelbort S, McGuire J. Composite autologous-allogeneic skin replacement: development and clinical application. *Plast Reconstr Surg* 1987;80(4):626-37.
- Czernielewski JM, Bagot M. Class II MHC antigen expression by human keratinocytes results from lympho-epidermal interactions and gamma-interferon production. *Clinical and Experimental Immunology* 1986;66(2):295-302.
- Dvorak HF, Mihm MC, Jr., Dvorak AM, Barnes BA, Galli SJ. The microvasculature is the critical target of the immune response in vascularized skin allograft rejection. *J Invest Dermatol* 1980;74(5):280-4.
- Dvorak HF, Mihm MC, Jr., Dvorak AM, Barnes BA, Manseau EJ, Galli SJ. Rejection of first-set skin allografts in man. the microvasculature is the critical target of the immune response. *J Exp Med* 1979;150(2):322-37.
- Fabre JW, Cullen PR. Rejection of cultured keratinocyte allografts in the rat. Clinical implications and a possible clue to the enigma of skin graft rejection. *Transplantation* 1989;48(2):306-15.
- Falanga V, Margolis D, Alvarez O, Auletta M, Maggiasimo F, Altman M, et al. Rapid healing of venous ulcers and lack of clinical rejection with an allogeneic cultured human skin equivalent. Human Skin Equivalent Investigators Group. *Arch Dermatol* 1998;134(3):293-300.
- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4(4):330-6.
- Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 2005;22(3):329-41.
- Germain L, Guignard R, Rouabhia M, Auger FA. Early basement membrane formation following the grafting of cultured epidermal sheets detached with thermolysin or Dispase. *Burns* 1995;21(3):175-80.
- Gruschwitz MS, Vieth G. Up-regulation of class II major histocompatibility complex and intercellular adhesion molecule 1 expression on scleroderma fibroblasts and endothelial cells by interferon-gamma and tumor necrosis factor alpha in the early disease stage. *Arthritis Rheum* 1997;40(3):540-50.
- Halim AS, Khoo TL, Mohd Yussof SJ. Biologic and synthetic skin substitutes: An overview. *Indian J Plast Surg* 2010;43(Suppl):S23-8.
- Hickerson WL, Compton C, Fletchall S, Smith LR. Cultured epidermal autografts and allodermis combination for permanent burn wound coverage. *Burns* 1994;20 Suppl 1:S52-5; discussion S5-6.
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299(5609):1057-61.
- Hull BE, Sher SE, Rosen S, Church D, Bell E. Fibroblasts in isogeneic skin equivalents persist for long periods after grafting. *J Invest Dermatol* 1983;81(5):436-8.
- Ingulli E. Mechanism of cellular rejection in transplantation. *Pediatr Nephrol* 2010;25(1):61-74.
- Johnson DL, Rose ML, Yacoub MH. Immunogenicity of human heart valve endothelial cells and fibroblasts. *Transplant Proc* 1997;29(1-2):984-5.
- Kern A, Liu K, Mansbridge J. Modification of fibroblast gamma-interferon responses by extracellular matrix. *J Invest Dermatol* 2001;117(1):112-8.
- Kinn SR, Curtis A, Dow JA. Detection and quantitation of HLA class II molecules on keratinocytes by quantitative immunofluorescence. *Journal of immunological methods* 1990;134(2):243-51.

- L'Heureux N, Paquet S, Labbe R, Germain L, Auger FA. A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J* 1998;12(1):47-56.
- Larouche D, Cuffley K, Paquet C, Germain L. Tissue-engineered skin preserving the potential of epithelial cells to differentiate into hair after grafting. *Tissue Eng Part A* 2011;17(5-6):819-30.
- Larouche D, Paquet C, Fradette J, Carrier P, Auger FA, Germain L. Regeneration of skin and cornea by tissue engineering. *Methods Mol Biol* 2009;482:233-56.
- Loss M, Wedler V, Kunzi W, Meuli-Simmen C, Meyer VE. Artificial skin, split-thickness autograft and cultured autologous keratinocytes combined to treat a severe burn injury of 93% of TBSA. *Burns* 2000;26(7):644-52.
- Medawar PB. The behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits: A report to the War Wounds Committee of the Medical Research Council. *J Anat* 1944;78(Pt 5):176-99.
- Michel M, L'Heureux N, Pouliot R, Xu W, Auger FA, Germain L. Characterization of a new tissue-engineered human skin equivalent with hair. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1999;35(6):318-26.
- Navarrete Santos A, Riemann D, Thiele K, Kehlen A, Navarrete Santos A, Langner J. Constitutive expression of HLA class II mRNA in synovial fibroblast-like cells from patients with rheumatoid arthritis. *Immunol Lett* 1997;58(1):53-8.
- Pouliot R, Larouche D, Auger FA, Juhasz J, Xu W, Li H, et al. Reconstructed human skin produced in vitro and grafted on athymic mice. *Transplantation* 2002;73(11):1751-7.
- Pye RJ. Cultured keratinocytes as biological wound dressings. *Eye* 1988;2(2):172-8.
- Reagan BJ, Madden MR, Huo J, Mathwich M, Staiano-Coico L. Analysis of cellular and decellular allogeneic dermal grafts for the treatment of full-thickness wounds in a porcine model. *J Trauma* 1997;43(3):458-66.
- Rouabhia M, Germain L, Auger FA. Cultured epithelium for skin trauma treatment: clinical and experimental studies. *Transplant Proc.* 1993;25(3):2348-9.
- Sher SE, Hull BE, Rosen S, Church D, Friedman L, Bell E. Acceptance of allogeneic fibroblasts in skin equivalent transplants. *Transplantation* 1983;36(5):552-7.
- Sheridan RL, Moreno C. Skin substitutes in burns. *Burns* 2001;27(1):92.
- Sherman LA, Chattopadhyay S. The molecular basis of allorecognition. *Annu Rev Immunol* 1993;11:385-402.
- Shimabukuro Y, Murakami S, Okada H. Antigen-presenting-cell function of interferon gamma-treated human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res* 1996;31(3):217-28.
- Stanton RA, Billmire DA. Skin resurfacing for the burned patient. *Clin Plast Surg* 2002;29(1):29-51.
- Supp DM, Boyce ST. Engineered skin substitutes: practices and potentials. *Clin Dermatol* 2005;23(4):403-12.
- Theobald VA, Lauer JD, Kaplan FA, Baker KB, Rosenberg M. "Neutral allografts"--lack of allogeneic stimulation by cultured human cells expressing MHC class I and class II antigens. *Transplantation* 1993;55(1):128-33.
- Wassenaar A, Snijders A, Abraham-Inpijn L, Kapsenberg ML, Kievits F. Antigen-presenting properties of gingival fibroblasts in chronic adult periodontitis. *Clin Exp Immunol* 1997;110(2):277-84.
- Yuspa SH, Harris CC. Altered differentiation of mouse epidermal cells treated with retinyl acetate in vitro. *Exp Cell Res* 1974;86(1):95-105.

Chapitre 3 : Mélanocyte et pigmentation, une part importante de notre identité et de notre survie

3.1 Résumé en français

Dans notre laboratoire, nous utilisons depuis de nombreuses années des substituts cutanés dits bilamélaires produits par la méthode appelée « auto-assemblage », utilisant seulement des fibroblastes dermiques et des cellules kératinocytaires épidermiques. Cette méthode est basée sur la capacité de cellules mésenchymateuses à synthétiser et à assembler leur propre matrice extracellulaire en présence de l'acide ascorbique. Ces substituts sont mécaniquement et histologiquement similaires à la peau native. Les mélanocytes survivent dans la culture des cellules épidermiques au cours de la production des substituts. Toutefois, leur quantité n'est pas suffisante afin d'assurer une pigmentation homogène après greffe. Notre objectif était de produire des substituts cutanés pigmentés par ajout de mélanocytes provenant de peaux caucasiennes et africaines et d'évaluer les dommages à l'ADN de ces différentes conditions suite à une irradiation solaire *in vitro*. Différentes densités de mélanocytes (100, 200, 1500 mélanocytes par mm²) ont été incorporées lors de la reconstruction de l'épiderme. Les substituts pigmentés ont été cultivés 49 jours à l'interface air-liquide ou transplantés pendant 42 jours sur un modèle de souris athymique. Nous avons observé la présence de mélanocytes au niveau de la couche basale de l'épiderme dans toutes nos conditions supplémentées, avec une accumulation de pigments de mélanine au niveau suprabasale des kératinocytes. La pigmentation des substituts augmente avec le temps et est plus homogène après greffe sur souris. À la densité de 200 mélanocytes par mm², la pigmentation des substituts est similaire au phototype de la peau native et confère une protection aux dommages à l'ADN suite à une irradiation solaire aussi bien au niveau du derme que de l'épiderme. Nos résultats mettent en évidence que l'ajout de mélanocytes dans la production de substituts cutanés assure une pigmentation homogène et confère une photoprotection aux dommages à l'ADN, représentant ainsi un bénéfice significatif pour la clinique.

3.2 Article

Impact of melanocyte density on a self-assembled tissue-engineered skin substitute *in vitro* and after grafting *in vivo*

Benjamin Goyer^{1,2,3}, Ulysse Pereira^{1,2,3,4}, Danielle Larouche^{1,2,3}, Patrick J. Rochette^{1,3,5}, Ludovic Martin⁴, Lucie Germain^{1,2,3*}

¹Centre de recherche en organogénèse expérimentale de l'Université Laval / LOEX, ²Department of Surgery and ⁵Département d'ophtalmologie et d'oto-rhino-laryngologie – chirurgie cervico-faciale, Faculty of Medicine, Université Laval, Québec, QC, Canada, ³Centre de recherche du CHU de Québec - Université Laval, regenerative medicine division, ⁴Service de Dermatologie, CHU d'Angers, Université d'Angers, Angers, France. *Current address: CHA Bundang Medical Center, CHA University Department of Dermatology, Seoul, Korea.

*Correspondence to: Prof. Lucie Germain, LOEX, Aile-R, CHU de Québec – Université Laval, 1401, 18^e rue, Québec, Québec, Canada, G1J 1Z4.

Phone (418) 649-0252 #61696 or #61646

Fax (418) 990-8248

lucie.germain@fmed.ulaval.ca

3.2.1 Résumé (anglais)

In our laboratory, we use bilayered tissue-engineered skin substitute (TES) that are produced by dermal fibroblasts and epidermal cells, using an approach named “the self-assembly approach of tissue engineering”. This method is based on the capacity of mesenchymal cells to create their own extracellular matrix *in vitro* in the presence of serum and ascorbic acid. The TES share similar mechanical and histological properties with native skin. Melanocytes survive in the epidermal cell culture during the production process. However, their amount in TES is suboptimal and the TES pigmentation is absent or heterogeneous after grafting. Our objectives was to produce melanocyte-containing TESs from different pigmentation skin types (Caucasian and African skin) to achieve a homogeneous pigmentation and to evaluate DNA lesions following ultraviolet radiation (UVR) *in vitro*. Different amount of melanocytes (100, 200, 1500 melanocytes per mm²) were incorporated in the TES epidermis. Melanocyte-containing TESs were cultured up to 49 days at the air-liquid interface or grafted on athymic mice for 42 days. We observed melanocytes localized in the basal epidermal cell layer of TESs, with melanin accumulation in a supranuclear position in keratinocytes. Pigmentation of TESs increased overtime and was more homogeneous after grafting on mice. From 200 melanocytes per mm², the pigmentation of TESs corresponded to the skin phototype of the cell donor and conferred protection against UVR-induced DNA damages in fibroblasts and keratinocytes. Our results indicate that the addition of melanocytes in TES produced by the self-assembly approach confers uniform pigmentation and protection against UVR-induced DNA damages, which may have a significant clinical benefit.

3.2.2 Introduction

Progress in tissue engineering has led to the development of bilayered tissue-engineered skin substitutes (TES) composed of both a dermis and an epidermis. These models reproduce key structures of native skin and have shown clinical success to facilitate wound repair or as permanent graft to close full-thickness skin loss (Duranceau, *et al.*, 2014). However, some improvements could be made to optimize pigmentation in order to avoid the irregular distribution of melanocytes in grafts which could lead to vitiligo-like hypopigmentation or to scattered pigmented patches (Boyce, *et al.*, 1993, Boyce, *et al.*, 2006, Swope, *et al.*, 1997, Swope, *et al.*, 2006). To achieve a homogenous pigmentation in reconstructed tissues, melanocytes and keratinocytes can be grown separately before their incorporation in the engineered skin substitutes (Bottcher-Haberzeth, *et al.*, 2013, Swope, *et al.*, 2002).

The successful integration of normal melanocytes in skin substitutes reproducing the epidermal melanin unit (EMU) provided a significant improvement in the tissue engineering field (Bessou-Touya, *et al.*, 1998, Regnier, *et al.*, 1999). Indeed, melanocytes crosstalk with keratinocytes (Duval, *et al.*, 2002, Hirobe, 2005) and respond to environmental cues such as ultraviolet radiation (UVR) exposure (Duval, *et al.*, 2003). Furthermore, it has been shown that the dermal composition, including fibroblasts and extracellular matrix (ECM), influences melanocyte proliferation, survival, morphology, and melanogenesis (Balafa, *et al.*, 2005, Buffey, *et al.*, 1994, Cario-Andre, *et al.*, 2006).

Physiologically, epidermal melanocytes are responsible for the synthesis of eumelanin and pheomelanin pigments and their subsequent transfer into adjacent keratinocytes by lysosome-like organelles called melanosomes (Boissy, 2003, Thong, *et al.*, 2003). Within melanocytes or keratinocytes, melanin accumulates as a nuclear cap protecting the cells from ultraviolet radiation (UVR) exposure that induces DNA damage. Melanocyte number is independent of human skin colour but varies, as well as the amount of melanin, with the body site (Yamaguchi, *et al.*, 2006). African skin type, which is the darker skin phototype, typically contains four to six folds more melanin throughout the epidermis compared with the caucasian skin type. In dark skin, melanin is deposited in large non-aggregated melanosomes in all epidermal layers while in light skin, small melanin-containing

melanosomes are aggregated and restricted to the basal and first suprabasal layers (Alaluf, *et al.*, 2001, Brenner and Hearing, 2008).

DNA, amino acids and melanins of the human skin epidermis are important chromophores. They are very susceptible to absorb solar UVR and thus easily damaged (Young, *et al.*, 1998). The cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) is the most common DNA lesion (approximately 70-80 %), while the (6-4) pyrimidine-pyrimidone photoproduct (6-4 PP), Dewar isomers and 8-oxo 7,8-dihydroguanine (8-oxoGua) accounts for about 20 % (Premi, *et al.*, 2015). Unrepaired DNA lesions may result in characteristic mutations, e.g. C → T transitions in the case of CPD, which can lead to skin cancer (Halliday, 2010). Furthermore, these damages may trigger non-genetic effects such as erythema that is associated with dermal blood vessel dilation and characterized by the presence of sunburn cells (apoptotic keratinocytes), immunosuppression by the depletion of antigen-presenting Langerhans cells (LC) in the epidermis and photoaging (Gibbs, *et al.*, 2008, Halliday, 2010).

UVR induce melanogenesis is the skin's photoprotective response to UVR exposure. UVA represents 95% of the UVR reaching the surface of the earth (Anna, *et al.*, 2007). UVA induces immediate pigment darkening (IPD), that last for a maximum of 2 hours, persistent pigment darkening (PPD), which appears within 3 to 5 days after exposure, and delayed tanning response (DT), that becomes apparent 2 to 3 days after exposure and may persist for months (Sklar, *et al.*, 2013). In contrast, UVB-induced tanning is known to offer greater photoprotection against erythema and DNA damages (Coelho, *et al.*, 2013) compared to IPD and PPD induced by the UVA. Finally, UVCs are completely absorbed by the ozone layer and atmosphere and no association with melanogenesis has been reported.

Photoaging is the most visual effect of chronic UVR-exposure and may take decades to manifest clinically. Photoaging is characterized by wrinkles, roughness, laxity and heterogeneous pigmentation appearance. Skin wrinkling results from the degradation of dermal structural proteins, such as collagen and elastin, by matrix metalloproteinases (MMP), especially MMP-1 (Han, *et al.*, 2014).

In most of the pigmented models of engineered skin substitutes, melanocytes are seeded at 330 melanocytes per mm² (Duval, *et al.*, 2001, Lee, *et al.*, 2003, Okazaki, *et al.*, 2005) or at a greater density

such as 1,000 melanocytes per mm² (Bottcher-Haberzeth, *et al.*, 2015) approaching the skin normal density which is around 1,000 to 1,500 melanocytes per mm² (Rosdahl and Rorsman, 1983) . But the time necessary to obtain such a high number of melanocytes in culture could be challenging when a large area of skin substitutes has to be produced..

The aim of this study was to produce melanocyte-containing TESs by the self-assembly approach. This tissue-engineering method is based on the capacity of mesenchymal cells to form their own extracellular matrix (ECM) *in vitro* in the presence of serum and ascorbic acid (L'Heureux, *et al.*, 1998). In the present study, we focused on the contribution of different density of melanocytes from different pigmentation skin phototype (light and dark skin) to achieve a homogeneous pigmentation and to evaluate DNA lesions following ultraviolet radiation (UVR) *in vitro*.

3.2.3 Matériel et méthodes

Biological specimens

This study was conducted according to our institutions guidelines and the Declaration of Helsinki. All protocols were approved by the institution's animal care and use committee (Comité de protection des animaux de l'Université Laval, Québec, Canada) and by the institution's committee for the protection of human subjects (Comité d'éthique de la recherche du CHU de Québec - Université Laval).

Isolation and culture

Human keratinocytes, melanocytes and fibroblasts cells were obtained from foreskin specimens originating from surgical procedures. The three cell types were isolated from African skin (two- and five-day-old donors) and Caucasian skin type (two- and 45-year-old donors). Briefly, for keratinocyte and melanocyte isolation, skin fragments were digested with 500 µg/mL thermolysin (Sigma Chemicals, St-Louis, MO, Canada) in the HEPES buffer [10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulfonic acid (MP Biomedicals Inc., Montreal, QC, Canada), 6.7 mM potassium chloride, 142 mM sodium chloride, and 1 mM calcium chloride] at 4°C overnight. Then, the dermis was separated from the epidermis with forceps. Keratinocytes and melanocyte were dissociated from the epidermis in a trypsin/ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution [0.05% trypsin 1–500 (Intergen, Toronto,

ON, Canada) and 0.01% EDTA/ disodium salt prepared in phosphate-buffered saline (PBS)] at 37°C for 15 min. The isolated cell population containing both keratinocytes and melanocytes were seeded to initiate both cultures. Fibroblasts were dissociated from the dermis in a 1 mg/ml collagenase/Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) solution at 37°C for 3 hours.

Amplification of keratinocytes was performed on lethally irradiated 3T3 fibroblasts (i3T3) in a keratinocyte culture medium consisting of a 3:1 mixture of the DMEM and Ham's F12 medium (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) supplemented with 5% Fetal Clone II serum (HyClone, Logan, UT), insulin, hydrocortisone, cholera toxins, epidermal growth factor (EGF), and antibiotics as previously described (Larouche, *et al.*, 2009). Melanocytes, however, were purified from keratinocytes by adding 0.1mg/mL geneticin (G418) (Sigma Chemicals, St-Louis, MO) during two days to the melanocyte culture medium consisting of Melanocyte basal medium (Lonza) and Melanocyte growth supplements (Lonza) (0.5% Fetal Bovin serum, calcium, Bovine Pituitary Extract (BPE), recombinant human Basic Fibroblast Growth Factor (rhFGF-B), recombinant human insulin, hydrocortisone, phorbol Myristate Acetate (PMA) and gentamicin). Finally, fibroblasts were cultured in a fibroblast medium (DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclone)).

Tissue-engineered skin production and grafting

Human fibroblasts were used at their fourth passage to reconstruct a 3D ECM. Briefly, fibroblasts were cultivated 28 days in DME with 10% FBS supplemented with 50 µg/mL of ascorbic acid (Sigma Chemicals). According to the self-assembly approach of tissue engineering (Larouche, *et al.*, 2009, Michel, *et al.*, 1999, Pouliot, *et al.*, 2002), three fibroblast-derived matricial sheets were superimposed to obtain a thicker 3D matrix, referred to as tissue-engineered dermis, onto which 200,000 keratinocytes per cm² and 100, 200 and 1,500 melanocytes per mm² were seeded to recreate a pigmented epidermis. Resulting TESs were cultured 7 days submerged in cDME-Ham and then raised at the air-liquid interface in epidermal growth factor-free cDME-Ham and cultured up to 49 days. Biopsies from *in vitro* TESs were taken at 14, 21, 28, 35, 42 and 49 days at the air-liquid interface.

To evaluate *in vivo* evolution, CD1 Nu mice (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) were chosen as graft recipients. Each TES, cultured at the air-liquid interface during 14 days, was grafted for 42 days onto the dorsal muscular fascia in a fusenig's silicone chamber, which prevent re-epithelialization of the graft bed by surrounding mouse skin (Germain, *et al.*, 1995, Pouliot, *et al.*, 2002). Fusenig's silicone chamber was removed 21 days after grafting. Biopsies were taken at 42 days post graft.

In vitro UVR irradiation

TESs were exposed to 13 and 32.5 J/cm² UVR exposure (5% UVB and 95% UVA) with a Solar simulator class A Oriel (MICRO-CONTROLE Spectra-Physics) at 21 and 28 days of maturation at the air-liquid interface. These doses are specifically known to induce a MED (Minimal Erythema Dose), which is the minimal dose being able to cause a sunburn and thus damage in the DNA.

Histology

Tissue samples were fixed in 3.7% formaldehyde (ACP Chemicals, QC, Canada). Sections (5 µm) were stained with Hematoxylin Eosin or Fontana-Masson method. Digital images were acquired using Axio Imager.Z2 microscope (Carl Zeiss Canada Ltd, ON, Canada) and photographed with an Axiocam digital camera. Biopsies were taken after 10, 21, 35 and 42 days post graft.

Indirect immunofluorescence analysis

Tissue samples were embedded in Tissue-Tek OCT Compound (Miles, Inc., IN), cooled in liquid nitrogen, and conserved at -80°C for further direct immunofluorescence analysis. For the immunofluorescence labeling of DNA damages, 12 µm thick cryosections were fixed with ethanol (70%), permeabilized with 0.3% Triton X-100, treated with 100 µg/mL RNase A and 10 µg/mL proteinase K, and DNA was denatured using an alkaline solution (0.07 NaOH in 70% ethanol). Following this treatment, tissue sections were incubated with a mouse anti-Cyclobutane Pyrimidine Dimers (CPDs) monoclonal antibody (Clone TDM-2) (CosmoBio), a mouse anti- (6-4) Photoproducts (6-4PPs) (Clone 64M-2) (CosmoBio) or a mouse anti-Dewar Photoproducts (DewarPPs) (Clone DEM-1) (CosmoBio). For the immunofluorescence staining of melanocytes, 12 µm thick cryosections or whole-mounted TES epidermis were fixed with acetone (10 min at -20°C). Mouse anti-Mel5 (clone Ta99) (ATCC, HB-8704) antibody was used to label melanin pigments. Finally, double-immunofluorescence labelling of collagen VII (rabbit anti-Collagen type VII (Millipore Calbiochem)) and Mel-5. The following secondary antibodies were used: Alexa 594 conjugated donkey anti-mouse (Invitrogen, Burlington, ON, Canada), Alexa 488 F(ab')₂ conjugated donkey anti-rabbit (Abcam, Toronto, ON, Canada). Negative controls consisted in the omission of the primary antibody during the staining reaction. Fluorescence was observed using a LSM700 confocal microscope (Zeiss, Toronto, ON, Canada) and photographed with an Axiocam digital camera. Images were processed with Adobe Photoshop CC 2015 software (Adobe System, San Jose, CA).

Quantification of fluorescent signals

Fluorescent signals from CPDs, 6-4PPs and DewarPPs within UVR exposed TESs were quantified with ImageJ using a previously published method (McCloy, *et al.*, 2014). Briefly, dermis and epidermis in its entirety for each TES were selected. Area, integrated density and mean grey values from the dermis and the epidermis was collected in order to determine the corrected total fluorescence emitted by damaged DNA and total DNA. To normalize CPDs, 6-4PPs and DewarPPs signals on total DNA quantity, damaged DNA was quantified as the proportion of damaged DNA over Total DNA. Then a mean ratio was established by averaging the different results of a sole specimen, which was used to establish an average ratio for the entire population of each tissue. Finally, for a given UVR exposure, the effect of the presence of melanocytes in TESs was expressed as a ratio of the mean damaged DNA proportion obtained for each melanocyte-containing TES group, over the mean proportion obtained for non-pigmented TES which represent the maximum DNA damage observed.

Melanin content

Melanin quantity was analyzed on Fontana-Masson staining with ImageJ. Briefly, a specific area in the stratum spinosum of the epidermis in each section was selected and the intensity grey value density areas were collected after a thresholding in order to eliminate the background staining.

Statistical analysis

Quantified data represent the mean (SD) where applicable. Note that each TES of different cell donors can be considered as independent biological specimen and a technical replicates of three sample were used as repeated measurements of the same specimen. Statistical significance was determined using the non-parametric Wilcoxon rank-sum (GraphPad Prism version 5). A p-value under 0.05 was considered significant.

3.2.4 Résultats

Melanocyte density in TES produced by the self-assembly approach

To investigate the minimal melanocyte density required to induce a skin colour similar to the native one in the TES, we have reconstructed white and black TESs with 100, 200, 1500 melanocytes per mm² and evaluated their *in vitro* and *in vivo* maturation.

We first showed *in vitro* that the histological features of the pigmented TES were similar to the non-pigmented TES (Figure 3.1 A-B and C-D, respectively), with the presence of melanocytes (black arrows). African skin type melanocytes were visible in the basal layer of TESs (Figure 3.1 C-D) without specific staining to reveal them. In both African and Caucasian skin type melanocyte-containing TESs, melanocytes were located in the basal layer of the epidermis and showed dendrites projecting into the upper layers (black arrows).

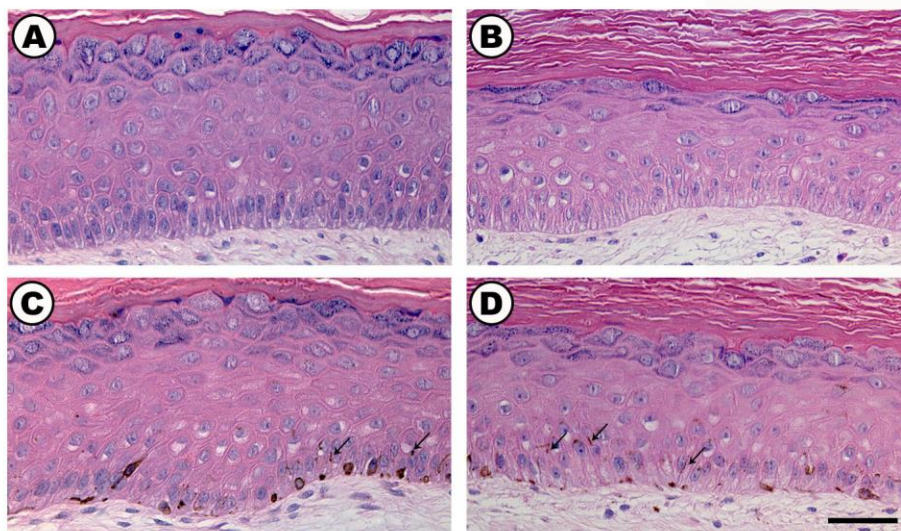


Figure 3.1: Tissue-engineered skin at 14 and 21 days of maturation at the air-liquid interface

Representative histological results of non-pigmented (A, B) and African (C, D) TESs cultured 14 (A, C) and 21 days (B, D) at the air-liquid interface. Coloration: Haematoxylin eosin. Arrows are pointing to melanocytes dendrites. African TESs were seeded with 1500 melanocytes per mm². TES: Tissue Engineered Skin. Scale bar: 20µm.

Macroscopically, we observed a pigmentation that increased over time in all melanocyte-containing TESs, and the color of pigments corresponded to the origin of the melanocytes (Figure 3.2). The Caucasian TES pigments appeared brown while the African TES pigments appeared black. All tested seeding densities (100, Figure 3.2, 200, and 1500 (data not shown) melanocytes per mm²) resulted in visually similar pigmentation.

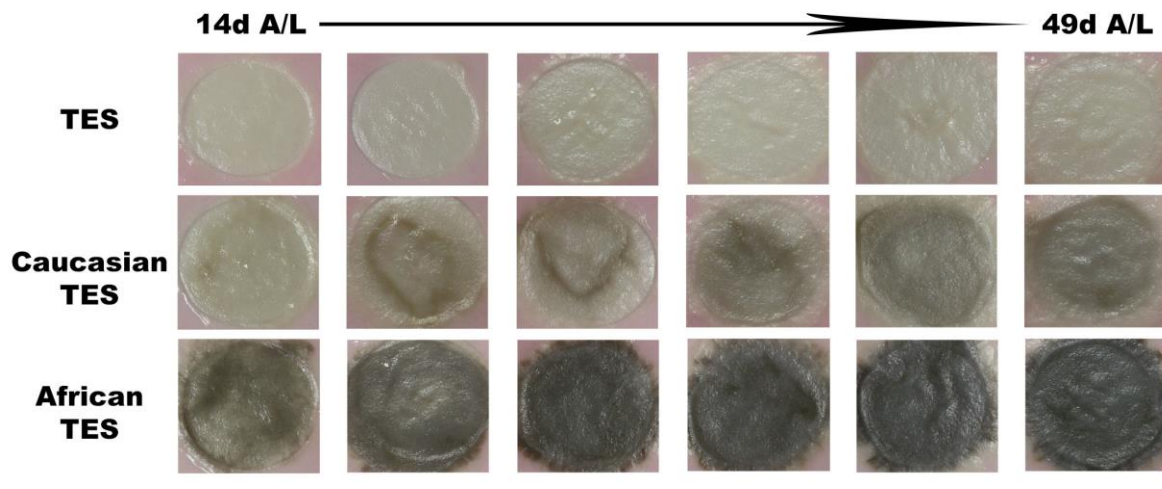


Figure 3.2: Evolution of white, black and non-pigmented TESs *in vitro*

Representative macroscopic pictures of TESs cultured for 14 to 49 days at the air-liquid interface. Caucasian and African TESs were seeded at 100 melanocytes per mm². Each picture represents a different TES, and each column is one week apart. d A/L: days of maturation at the air-liquid interface. TES: Tissue Engineered Skin. Scale bar: 1cm.

To evaluate if the number of melanocytes distributed within TESs corresponded to their seeding density, we counted melanocyte density in TESs at 14, 21 and 28 days of maturation at the air-liquid interface (Figure 3.3). Combining the whole mount technique with the immunolabeling of TYRP1, also known as MEL-5, an enzyme found in melanocytes, allowed us to visualize melanocytes within all TES surface. In TESs seeded with 100 melanocytes per mm², 1808 (± 161) melanocytes per mm² were counted at 14 days of maturation at the air-liquid interface, which was significantly lower than TESs seeded with 200 and 1500 melanocytes per mm², where the number of melanocytes counted were 2656 (± 317) and 2587 (± 40) melanocytes per mm², respectively (Figure 3.3). This melanocyte density might be a threshold because after 21 and 28 days of maturation at the air-liquid interface, the number of melanocytes counted in each melanocyte-containing TES neared this number regardless of the melanocyte seeding density (Figure 3.3).

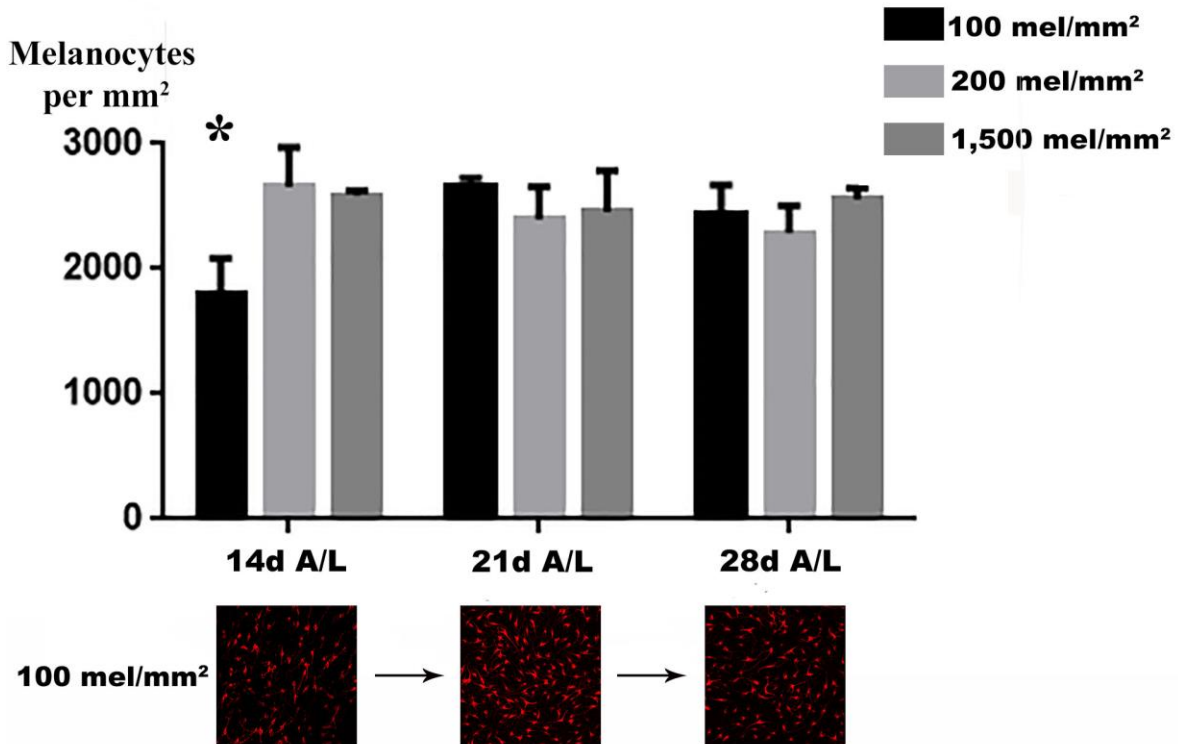


Figure 3.3: Evolution of melanocyte density in TESs over of the air-liquid interface culture time

Quantitative analysis of the number of melanocytes per mm² counted on a whole mount preparation of the epidermis of TESs seeded with 100, 200 and 1,500 melanocytes per mm², and cultured during 14, 21 and 28 days at the air-liquid interface, after immunolabeling of Tyrosinase-related protein 1. d A/L: days of maturation at the air liquid interface, mel: melanocyte. Data are presented as Mean ± SD. Two independent experiments were performed in technical triplicate (for each independent experiment, the cell population came from a different donor). Data are presented as means ± SD. *p<0.05

Twenty-one days after transplantation onto athymic mice, all melanocyte-containing TESs showed homogenous pigmentation whose color corresponded to the original donor skin type (Figure 3.4). No irregularities and no hypo- or hyperpigmented zones were observed. Histological analysis of melanocyte-containing TESs showed normal skin architecture with a multilayered and correctly stratified epidermis (data not shown).

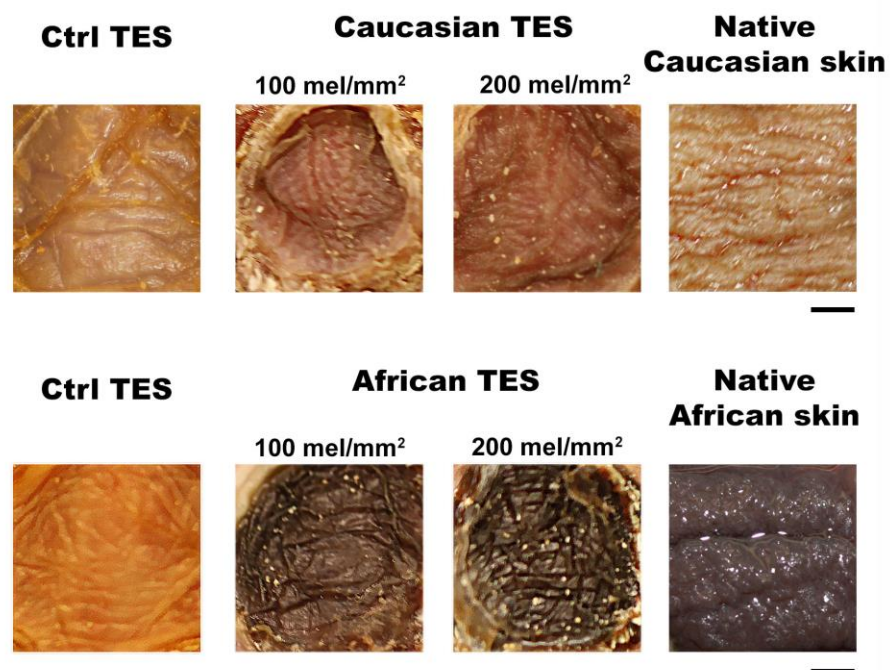


Figure 3.4: Evolution of white and black TESs after 21 days of grafting on CD1 athymic mice

Representative macroscopic pictures of TESs after 21 days of grafting on CD1 athymic mice. African and Caucasian TESs were seeded at 100 and 200 melanocytes per mm^2 . A picture of the initial skin biopsy used to extract cells composing the TES of the corresponding line is presented in the last column. TES: Tissue Engineered Skin, mel: melanocyte. Ctrl: control. Scale bar: 1cm.

DNA damage in white and black TESs

To evaluate if the pigmentation of melanocyte-containing TESs can be modulated by UVR, TESs with 100, 200, 1500 melanocytes per mm^2 cultured until 14 or 21 days at the air-liquid interface were exposed to a solar simulator (5% UVB and 95% UVA) at 13 and 32.5 J/cm^2 . The amount of melanin is increased and this increase is quantified by image analysis, following Fontana-Masson staining (staining revelation of melanin granules). First, we observed that melanin quantity in Caucasian and African melanocyte-containing TES increased with time without UVR-exposure (0 J/cm^2) (Figure 3.5). Second, an exposition to 13 and 32.5 J/cm^2 of UVR induced the transfer of melanin from melanocytes to keratinocyte within TESs since the amount of melanin is increased immediately after exposure which was superior in African than Caucasian TES. Third, the amount of melanin quantified in Caucasian TESs increased with the density of melanocytes seeded at 14 or 21 days at the air-liquid interface comparatively in African TESs where their amount wasn't different at 14 days and only increased with

1500 melanocytes per mm² culture at 21 days. These results suggest that the IPD is induced in melanocytes composing TESs following a UVR exposure.

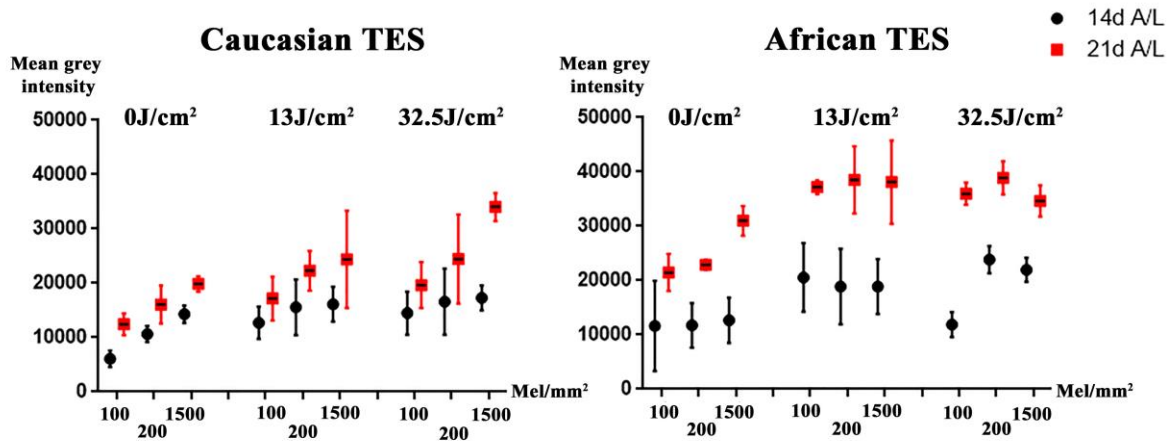


Figure 3.5: Melanin density analysis of black and white TESs at 14 and 21 days of maturation at the air-liquid interface after UVR-exposure

Quantitative analysis of melanin content in Caucasian and African TESs seeded with 100, 200 and 1,500 melanocytes per mm² and cultured 14 (black) and 21 (red) days at the air-liquid interface, immediately after an exposition to 0, 13 and 32.5J/cm² UVR (5% UVB and 95% UVA). Melanin density was evaluated on TES tissue-sections colored with Fontana-Masson after image analysis of the gray intensity value. d A/L: days of maturation at the air liquid interface. TES: Tissue Engineered Skin. Two independent experiments were performed in technical triplicate (for each independent experiment, the cell population came from a different donor).

UV irradiation of human skin results in three major types of DNA lesions: CPD, 6-4PP and DewarPP. In this study, we measured those lesions within fibroblasts and keratinocytes composing Caucasian and African melanocyte-containing TESs following UVR-exposure within the dermis and epidermis.

The relative change in CPD, 6-4PP and DewarPP percentage between melanocyte-containing TESs and control non-pigmented TESs after 13 and 32.5 J/cm² of UVR is shown in Table 3.1 for white, and table 3.2 for black TESs. In response to the two tested UVR doses, data showed a CPD decrease in fibroblasts and keratinocytes from a density of 200 in Caucasian, and 100 melanocytes per mm² in African TESs cultured 14 and 21 days at the air-liquid interface. Data also showed mostly less 6,4PP and DewarPP DNA damage in the dermis and epidermis after 13 and 32.5 J/cm² of UVR from Caucasian and African TESs at 14 and 21 days at the air-liquid interface.

Table 3.1: DNA damage in Caucasian skin type TESs

Melanocyte density	UV dose	Time	Dermis			Epidermis		
			CPD	6-4PPs	DewarPP	CPD	6-4PPs	DewarPP
			Mean (\pm SD)	Mean (\pm SD)	Mean (\pm SD)	Mean (\pm SD)	Mean (\pm SD)	Mean (\pm SD)
Non pigmented	13J/cm ²	14d A/L	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00
100 mel/mm ²			0,62* \pm 0,08	0,86 \pm 0,30	0,92 \pm 0,25	0,56 \pm 0,33	0,92 \pm 0,09	0,98 \pm 0,04
200 mel/mm ²			0,31* \pm 0,19	0,80 \pm 0,23	0,83 \pm 0,15	0,37* \pm 0,27	0,83* \pm 0,10	0,66* \pm 0,05
1500 mel/mm ²			0,09* \pm 0,06	0,74 \pm 0,25	0,71* \pm 0,14	0,07* \pm 0,05	0,72* \pm 0,13	0,43* \pm 0,16
Non pigmented	32,5J/cm ²	14d A/L	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00
100 mel/mm ²			0,92 \pm 0,46	0,86 \pm 0,28	0,68 \pm 0,24	0,93 \pm 0,32	0,71 \pm 0,29	0,62* \pm 0,05
200 mel/mm ²			0,72 \pm 0,36	0,86 \pm 0,38	0,83* \pm 0,09	0,52 \pm 0,39	0,35* \pm 0,14	0,64* \pm 0,07
1500 mel/mm ²			0,33* \pm 0,09	0,90 \pm 0,37	0,78 \pm 0,14	0,49* \pm 0,29	0,44* \pm 0,09	0,50* \pm 0,08
Non pigmented	13J/cm ²	21d A/L	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00
100 mel/mm ²			0,80 \pm 0,59	1,02 \pm 0,29	0,69 \pm 0,01	0,60* \pm 0,19	0,99 \pm 0,30	0,68* \pm 0,06
200 mel/mm ²			0,25* \pm 0,27	1,07 \pm 0,11	1,01 \pm 0,15	0,16* \pm 0,28	0,92 \pm 0,14	0,85* \pm 0,02
1500 mel/mm ²			0,39* \pm 0,11	0,83 \pm 0,39	0,77 \pm 0,13	0,03* \pm 0,06	0,92 \pm 0,09	0,81 \pm 0,13
Non pigmented	32,5J/cm ²	21d A/L	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00
100 mel/mm ²			0,90 \pm 0,27	0,95 \pm 0,02	0,92* \pm 0,08	0,90 \pm 0,19	0,93 \pm 0,15	0,97 \pm 0,25
200 mel/mm ²			0,50* \pm 0,18	0,91 \pm 0,14	0,81 \pm 0,31	0,54 \pm 0,31	0,94 \pm 0,15	0,99 \pm 0,15
1500 mel/mm ²			0,41* \pm 0,36	0,94 \pm 0,11	0,71* \pm 0,17	0,17* \pm 0,12	0,71* \pm 0,11	0,87 \pm 0,11

Quantitative CPD, 6-4PPs and DewarPP analysis of immunohistofluorescence of TESs cultured for 14 and 21 days at the air-liquid interface after 13 and 32.5 J/cm² UVR exposure (5% UVB and 95% UVA). To normalize CPDs, 6-4PPs and DewarPPs signals on total DNA quantity, damaged DNA was quantified as the proportion of damaged DNA over Total DNA. Two independent experiments were performed in technical triplicate (for each independent experiment, the cell population came from a different donor). Data are presented as means \pm SD. *p<0.05 when compared to the non-pigmented TESs

Table 3.2: DNA damage in African skin type TESs

Melanocyte density	UV dose	Time	Dermis			Epidermis		
			CPD	6-4PPs	DewarPP	CPD	6-4PPs	DewarPP
			Mean (\pm SD)	Mean (\pm SD)	Mean (\pm SD)	Mean (\pm SD)	Mean (\pm SD)	Mean (\pm SD)
Non pigmented	13J/cm ²	14d A/L	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00
100 mel/mm ²			0,09* \pm 0,07	0,76 \pm 0,19	0,60 \pm 0,30	0,00* \pm 0,00	0,81 \pm 0,18	0,90 \pm 0,17
200 mel/mm ²			0,05* \pm 0,02	0,47 \pm 0,36	0,37* \pm 0,17	0,00* \pm 0,00	0,72* \pm 0,17	0,78 \pm 0,28
1500 mel/mm ²			0,00* \pm 0,00	0,49* \pm 0,07	0,52* \pm 0,05	0,00* \pm 0,00	0,61 \pm 0,18	0,76* \pm 0,08
Non pigmented	32,5J/cm ²	14d A/L	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00
100 mel/mm ²			0,54* \pm 0,17	0,92 \pm 0,10	1,05 \pm 0,05	0,08* \pm 0,14	1,04 \pm 0,03	0,93 \pm 0,23
200 mel/mm ²			0,11* \pm 0,04	0,91 \pm 0,06	0,96 \pm 0,14	0,00* \pm 0,00	0,73 \pm 0,26	1,09 \pm 0,13
1500 mel/mm ²			0,10* \pm 0,02	0,97 \pm 0,18	0,82 \pm 0,27	0,02* \pm 0,02	0,58* \pm 0,23	1,05 \pm 0,13
Non pigmented	13J/cm ²	21d A/L	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00
100 mel/mm ²			0,02* \pm 0,04	0,91 \pm 0,23	0,43 \pm 0,38	0,19* \pm 0,33	0,93 \pm 0,14	1,22 \pm 0,16
200 mel/mm ²			0,00* \pm 0,00	0,74* \pm 0,11	0,43* \pm 0,16	0,00* \pm 0,00	0,85 \pm 0,30	0,99 \pm 0,12
1500 mel/mm ²			0,08* \pm 0,13	0,59 \pm 0,29	0,55* \pm 0,01	0,00* \pm 0,00	0,84 \pm 0,21	0,84* \pm 0,04
Non pigmented	32,5J/cm ²	21d A/L	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00
100 mel/mm ²			0,70 \pm 0,29	0,80 \pm 0,20	0,70* \pm 0,10	0,64 \pm 0,46	0,85 \pm 0,19	0,82 \pm 0,12
200 mel/mm ²			0,50* \pm 0,18	0,79 \pm 0,27	0,70* \pm 0,08	0,34* \pm 0,17	0,61 \pm 0,27	0,73* \pm 0,15
1500 mel/mm ²			0,24* \pm 0,41	0,44* \pm 0,08	0,70 \pm 0,22	0,44* \pm 0,15	0,56* \pm 0,19	0,58* \pm 0,21

Quantitative CPD, 6-4PPs and DewarPP analysis of immunohistofluorescence of TES at 14 and 21 days at the air-liquid interface after 13 and 32.5 J/cm² UVR exposure (5% UVB and 95% UVA) with a Solar simulator class A Oriel. To normalize CPDs, 6-4PPs and DewarPPs signals on total DNA quantity, damaged DNA was quantified as the proportion of damaged DNA over Total DNA. Two independent experiments were performed with a triplicate experimental condition (for each independent experiment, the cell population came from a different donor). Data are presented as means \pm SD. *p<0.05 when compare to the non-pigmented TESs.

Overall levels of CPD, 6-4PP and DewarPP first showed the best photoprotection conferred by African skin type melanocytes after 32.5 J/cm² of UVR-exposure which was quite similar to that of Caucasian skin type after 13 J/cm² of UVR-exposure. For a given melanocyte cultured in TESs (100, 200, 1500 melanocytes per mm²), no statistical difference was found in their resulting number at 14 and 21 days at the air-liquid interface. These observations suggested that TES containing melanin is protected against DNA damages induced immediately after an UVR-exposure. Furthermore, in melanocyte-containing TESs, melanin pigments had a photoprotective effect against UV-induced CPDs greater than against 6-4PP and DewarPP, and this effect is more important in dark TESs. Since the amount of melanin pigments was similar between Caucasian and African TESs, this observation confirm that the African skin type melanin pigments are more efficient than Caucasian melanin pigments. Furthermore, DNA damages were essentially found in the upper epidermal cell layers of melanocyte-containing TESs (data not shown), indicating that the photoprotective effect of melanin occurred in the basal layer and was greater in African TESs compared with white TESs.

3.2.5 Discussion

The present study was designed to produce a pigmented skin substitute for clinical applications. TESs produced by the self-assembly method have been tested in human and proven to meet clinical considerations such as the effective graft take, the ease of use during surgical sessions and the production delay. Furthermore, the preservation of epithelial stem cells during procedures of harvesting, isolation, amplification and culture of cells used to produce the TES to ensure its long-term regeneration after its grafting was previously confirmed (Lavoie, *et al.*, 2013).

Melanocytes are an important component of the epidermis for more than cosmetic reasons. Indeed, melanin pigments produced by melanocytes protect skin cells from persistent solar radiation. Melanin pigments are incorporated and stored in keratinocytes, above the cell nuclei, in the well-described functional epidermal melanin unit (EMU) (Nordlund, 2007). They protect the DNA against harmful UVR and reduce the risk of mutations (Boissy, 2003, Hearing, 1999).

UVA and UVB independently initiate a cascade of signalling events that lead to a pigmentary response which is determined by the light intensity and exposure duration (Miyamura, *et al.*, 2007). Nevertheless, UVB rays don't penetrate beyond the epidermis, while UVA rays, due to their high penetration properties, reach deeper parts of the skin and affect the dermal compartment. Keratinocytes and fibroblasts contribute to enhance the melanin production by the secretion of several factors that potentiate the melanosome transfer (Yamaguchi and Hearing, 2009). Among these factors, endothelin-1, stem cell factor (SCF), and nerve growth factor (NGF) from keratinocytes are known to converge at the Microphthalmia-associated Transcription Factor (MITF) and to upregulate melanogenesis (Yamaguchi and Hearing, 2009).

Fibroblasts, on the other hand, respond to UVR exposure by upregulating the secretion of promelanogenic factors, such as basic fibroblast growth factor (bFGF) and stem cell factor (SCF) (Yamaguchi and Hearing, 2009). The earliest UVR exposure response occurs within minutes and leads to the redistribution of melanosomes in the outer epidermal cell layers (Moan, *et al.*, 2012). In our TESs produced with melanocytes from black or white skin, an increase melanin distribution in keratinocytes was observed after a unique 13 J/cm² UVR exposure.

In this study, DNA damages in melanocyte-containing TESs followed UVR exposure was compared to TESs without melanocytes to determine the photoprotective role of melanin newly secreted. The UVR doses used were based on the minimal erythema dose (MED) known to induce perceptible skin redness 24 hours after exposure *in vivo* (Young, *et al.*, 1998). We observed that cyclobutane pyrimidine dimers (CPD) represented the predominant forms of DNA damage within TESs. The number of Dewar photoproducts (DewarPP), on the other hand, was higher than the number of pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts (6-4PP), which is consistent with the capacity of UVA rays to induce photoisomerisation (Tyrrell and Keyse, 1990). The three damage types were lower in melanocyte-containing TESs compared to non-pigmented TESs and their relative quantity was associated with the melanocyte number and the TES maturation time. However, there are factors other than melanin quantity that define skin cancer susceptibility, such as melanin type, DNA repair and antioxidant capacity. Furthermore, personal sun exposure behaviour requires consideration. Altogether, our results suggest that the addition of between 100 and 1500 melanocytes per mm² in TESs restores a pigmentation conferring a protection against the principal UVA- and UVB-induced DNA damages.

3.2.6 Conclusion

Bioengineered skin substitutes offer tools for biological, photobiological, and pharmacological research purposes (Groeber, *et al.*, 2011) as well as treatment alternative for the permanent coverage of full-thickness skin wounds. However, without the addition of the appropriate number of melanocytes within skin constructs, pigmentation after their grafting is absent or irregular, which compromises the protection against UVR and the cosmetic aspect of the healed skin substitute. Furthermore, current research tends to indicate that melanocytes stem cell play a role in epithelial stem cell preservation and hair follicle development (Nishimura, 2011), which would be an asset for skin substitutes. Our study reveals the possibility to produce pigmented TESs for autologous grafting purpose that will offer solar protection and a more normal coloration.

3.2.7 Remerciements

The authors gratefully thank Drs. Alphonse Roy, Félix-André Têtu, and Maurice Bouchard for providing skin biopsies, as well as Israël Martel, Amélie Lavoie, Francis Bisson, Carolyne Simard-Bisson, and Anne-Marie Moisan for their expert technical assistance. This work was supported by the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) grant MOP-12087 and FDN-143213 (L.G.), the Fondation des Pompiers du Québec pour les Grands Brûlés (FPQGB), the Fonds de Recherche du Québec-Santé (FRQS), and the Réseau de thérapie cellulaire et tissulaire (ThéCell) du FRQS. L.G. is the recipient of a Tier 1 Canadian Research Chair on Stem Cells and Tissue Engineering and a Research Chair on Tissue-Engineered Organs and Translational Medicine of the Fondation de l'Université Laval.

3.2.8 Références

- Alaluf S, Heath A, Carter N, *et al.* 2001, Variation in melanin content and composition in type V and VI photoexposed and photoprotected human skin: the dominant role of DHI, *Pigment Cell Res*, **14** (5): 337-347.
- Anna B, Blazej Z, Jacqueline G, *et al.* 2007, Mechanism of UV-related carcinogenesis and its contribution to nevi/melanoma, *Expert review of dermatology*, **2** (4): 451-469.

- Balafa C, Smith-Thomas L, Phillips J, *et al.* 2005, Dopa oxidase activity in the hair, skin and ocular melanocytes is increased in the presence of stressed fibroblasts, *Exp Dermatol*, **14** (5): 363-372.
- Bessou-Touya S, Picardo M, Maresca V, *et al.* 1998, Chimeric human epidermal reconstructs to study the role of melanocytes and keratinocytes in pigmentation and photoprotection, *J Invest Dermatol*, **111** (6): 1103-1108.
- Boissy RE. 2003, Melanosome transfer to and translocation in the keratinocyte, *Exp Dermatol*, **12 Suppl 2**: 5-12.
- Bottcher-Haberzeth S, Biedermann T, Klar AS, *et al.* 2015, Characterization of pigmented dermo-epidermal skin substitutes in a long-term in vivo assay, *Exp Dermatol*, **24** (1): 16-21.
- Bottcher-Haberzeth S, Klar AS, Biedermann T, *et al.* 2013, "Trooping the color": restoring the original donor skin color by addition of melanocytes to bioengineered skin analogs, *Pediatr Surg Int*, **29** (3): 239-247.
- Boyce ST, Greenhalgh DG, Kagan RJ, *et al.* 1993, Skin anatomy and antigen expression after burn wound closure with composite grafts of cultured skin cells and biopolymers, *Plast Reconstr Surg*, **91** (4): 632-641.
- Boyce ST, Kagan RJ, Greenhalgh DG, *et al.* 2006, Cultured skin substitutes reduce requirements for harvesting of skin autograft for closure of excised, full-thickness burns, *J Trauma*, **60** (4): 821-829.
- Brenner M, Hearing VJ. 2008, The protective role of melanin against UV damage in human skin, *Photochem Photobiol*, **84** (3): 539-549.
- Buffey JA, Messenger AG, Taylor M, *et al.* 1994, Extracellular matrix derived from hair and skin fibroblasts stimulates human skin melanocyte tyrosinase activity, *Br J Dermatol*, **131** (6): 836-842.
- Cario-Andre M, Pain C, Gauthier Y, *et al.* 2006, In vivo and in vitro evidence of dermal fibroblasts influence on human epidermal pigmentation, *Pigment Cell Res*, **19** (5): 434-442.
- Coelho SG, Zmudzka BZ, Yin L, *et al.* 2013, Non-invasive diffuse reflectance measurements of cutaneous melanin content can predict human sensitivity to ultraviolet radiation, *Exp Dermatol*, **22** (4): 266-271.
- Duranceau L, Genest H, Bortoluzzi P, *et al.* 2014, Successful grafting of a novel autologous tissue-engineered skin substitutes (dermis and epidermis) on twelve burn patients, *Journal of Burn Care and Research*, **35** (S121).
- Duval C, Regnier M, Schmidt R. 2001, Distinct melanogenic response of human melanocytes in mono-culture, in co-culture with keratinocytes and in reconstructed epidermis, to UV exposure, *Pigment Cell Res*, **14** (5): 348-355.
- Duval C, Schmidt R, Regnier M, *et al.* 2003, The use of reconstructed human skin to evaluate UV-induced modifications and sunscreen efficacy, *Exp Dermatol*, **12 Suppl 2**: 64-70.
- Duval C, Smit NP, Kolb AM, *et al.* 2002, Keratinocytes control the pheo/eumelanin ratio in cultured normal human melanocytes, *Pigment Cell Res*, **15** (6): 440-446.
- Germain L, Guignard R, Rouabhia M, *et al.* 1995, Early basement membrane formation following the grafting of cultured epidermal sheets detached with thermolysin or Dispase, *Burns*, **21** (3): 175-180.
- Gibbs NK, Tye J, Norval M. 2008, Recent advances in urocanic acid photochemistry, photobiology and photoimmunology, *Photochem Photobiol Sci*, **7** (6): 655-667.
- Groeber F, Holeiter M, Hampel M, *et al.* 2011, Skin tissue engineering--in vivo and in vitro applications, *Adv Drug Deliv Rev*, **63** (4-5): 352-366.

- Halliday GM. 2010, Common links among the pathways leading to UV-induced immunosuppression, *J Invest Dermatol*, **130** (5): 1209-1212.
- Han A, Chien AL, Kang S. 2014, Photoaging, *Dermatol Clin*, **32** (3): 291-299, vii.
- Hearing VJ. 1999, Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization, *J Invest Dermatol Symp Proc*, **4** (1): 24-28.
- Hirobe T. 2005, Role of keratinocyte-derived factors involved in regulating the proliferation and differentiation of mammalian epidermal melanocytes, *Pigment Cell Res*, **18** (1): 2-12.
- Khavari PA. 2006, Modelling cancer in human skin tissue, *Nat Rev Cancer*, **6** (4): 270-280.
- L'Heureux N, Paquet S, Labbe R, et al. 1998, A completely biological tissue-engineered human blood vessel, *FASEB J*, **12** (1): 47-56.
- Larouche D, Paquet C, Fradette J, et al. 2009, Regeneration of skin and cornea by tissue engineering, *Methods Mol Biol*, **482**: 233-256.
- Lavoie A, Fugere C, Beauparlant A, et al. 2013, Human epithelial stem cells persist within tissue-engineered skin produced by the self-assembly approach, *Tissue Eng Part A*, **19** (7-8): 1023-1038.
- Lee DY, Lee JH, Lee ES, et al. 2003, Fibroblasts play a stimulatory role in keratinocyte proliferation but an inhibitory role in melanocyte growth and pigmentation in a skin equivalent system from skin type IV, *Arch Dermatol Res*, **294** (10-11): 444-446.
- McCloy RA, Rogers S, Caldon CE, et al. 2014, Partial inhibition of Cdk1 in G 2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events, *Cell Cycle*, **13** (9): 1400-1412.
- Michel M, L'Heureux N, Pouliot R, et al. 1999, Characterization of a new tissue-engineered human skin equivalent with hair, *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, **35** (6): 318-326.
- Miyamura Y, Coelho SG, Wolber R, et al. 2007, Regulation of human skin pigmentation and responses to ultraviolet radiation, *Pigment Cell Res*, **20** (1): 2-13.
- Moan J, Nielsen KP, Juzeniene A. 2012, Immediate pigment darkening: its evolutionary roles may include protection against folate photosensitization, *FASEB J*, **26** (3): 971-975.
- Nishimura EK. 2011, Melanocyte stem cells: a melanocyte reservoir in hair follicles for hair and skin pigmentation, *Pigment Cell Melanoma Res*, **24** (3): 401-410.
- Nordlund JJ. 2007, The melanocyte and the epidermal melanin unit: an expanded concept, *Dermatol Clin*, **25** (3): 271-281, vii.
- Okazaki M, Suzuki Y, Yoshimura K, et al. 2005, Construction of pigmented skin equivalent and its application to the study of congenital disorders of pigmentation, *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, **39** (6): 339-343.
- Pouliot R, Larouche D, Auger FA, et al. 2002, Reconstructed human skin produced in vitro and grafted on athymic mice, *Transplantation*, **73** (11): 1751-1757.
- Premi S, Wallisch S, Mano CM, et al. 2015, Photochemistry. Chemiexcitation of melanin derivatives induces DNA photoproducts long after UV exposure, *Science*, **347** (6224): 842-847.
- Regnier M, Duval C, Galey JB, et al. 1999, Keratinocyte-melanocyte co-cultures and pigmented reconstructed human epidermis: models to study modulation of melanogenesis, *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, **45** (7): 969-980.
- Rosdahl I, Rorsman H. 1983, An estimate of the melanocyte mass in humans, *J Invest Dermatol*, **81** (3): 278-281.
- Sklar LR, Almutawa F, Lim HW, et al. 2013, Effects of ultraviolet radiation, visible light, and infrared radiation on erythema and pigmentation: a review, *Photochem Photobiol Sci*, **12** (1): 54-64.
- Swope VB, Supp AP, Boyce ST. 2002, Regulation of cutaneous pigmentation by titration of human melanocytes in cultured skin substitutes grafted to athymic mice, *Wound Repair Regen*, **10** (6): 378-386.

- Swope VB, Supp AP, Cornelius JR, *et al.* 1997, Regulation of pigmentation in cultured skin substitutes by cytometric sorting of melanocytes and keratinocytes, *J Invest Dermatol*, **109** (3): 289-295.
- Swope VB, Supp AP, Schwemberger S, *et al.* 2006, Increased expression of integrins and decreased apoptosis correlate with increased melanocyte retention in cultured skin substitutes, *Pigment Cell Res*, **19** (5): 424-433.
- Thong HY, Jee SH, Sun CC, *et al.* 2003, The patterns of melanosome distribution in keratinocytes of human skin as one determining factor of skin colour, *Br J Dermatol*, **149** (3): 498-505.
- Tyrrell RM, Keyse SM. 1990, New trends in photobiology. The interaction of UVA radiation with cultured cells, *J Photochem Photobiol B*, **4** (4): 349-361.
- Yamaguchi Y, Hearing VJ. 2009, Physiological factors that regulate skin pigmentation, *Biofactors*, **35** (2): 193-199.
- Yamaguchi Y, Takahashi K, Zmudzka BZ, *et al.* 2006, Human skin responses to UV radiation: pigment in the upper epidermis protects against DNA damage in the lower epidermis and facilitates apoptosis, *FASEB J*, **20** (9): 1486-1488.
- Young AR, Chadwick CA, Harrison GI, *et al.* 1998, The similarity of action spectra for thymine dimers in human epidermis and erythema suggests that DNA is the chromophore for erythema, *J Invest Dermatol*, **111** (6): 982-988.

Chapitre 4 : Substituts cutanés reconstruits par génie tissulaire, un outil pour l'étude de l'élastogenèse

4.1 Résumé en français

Le modèle de substitut cutané produit au LOEX par la méthode d'auto-assemblage est basé sur la capacité des fibroblastes dermiques de produire et d'assembler leur propre matrice extracellulaire en présence d'acide ascorbique. Cependant, le réseau de fibres élastiques dans le derme reconstruit est rudimentaire. Le but de ce travail était d'optimiser la maturation et l'organisation du réseau de fibres élastiques dans nos substituts. Ces substituts ont été produits en utilisant des cellules adultes et de nouveau-nés. Pour stimuler l'élastogénèse, par la voie de l'*insulin-like growth factor-1* (IGF-I), de l'aldostérone et du spironolactone ont été ajoutés dans le milieu de culture au cours du processus de production. Les kératinocytes, avec ou sans mélanocytes, ont été utilisés afin de reconstruire l'épiderme. Les analyses immunohistologiques des composants du réseau de fibres élastiques dans les substituts sans mélanocytes ont révélé que l'élastine et la fibrilline-2 étaient pratiquement indétectables chez l'adulte, mais fortement exprimées chez le nouveau-né. L'aldostérone et la spironolactone associées avec l'acide ascorbique augmentent l'expression de la fibrilline-2 et de l'élastine. L'ajout de mélanocytes augmente le nombre de fibres élastiques dans les substituts cutanés produits à partir de cellules de nouveau-nés avec et sans présence de l'aldostérone et du spironolactone. Nous concluons que l'optimisation de la procédure de production des substituts cutanés est un outil prometteur pour l'étude du vieillissement et de l'organisation du réseau de fibres élastiques.

4.2 Article

Skin substitute models to study the aging and organization of the elastin network

Benjamin Goyer^{a, b, c}, Ulysse Pereira^{a, b, d}, Danielle Larouche^{a, b, c}, Martin Ludovic^d, Jean Ruel^e, Lucie Germain^{a, b, c*}

^a Centre de recherche en organogénèse expérimentale de l'Université Laval / LOEX Québec, QC, Canada

^b Department of Surgery, Faculty of Medicine Université Laval, Québec, QC, Canada

^cCentre de recherche du CHU de Québec - Université Laval, regenerative medicine division, Québec, QC, Canada

^dService de Dermatologie, CHU d'Angers, Université d'Angers, Angers, France

^eDépartement de Génie Mécanique, Faculté des Sciences et de Génie, Université Laval, Québec, QC, Canada

*Corresponding author. Prof. Lucie Germain, LOEX, Aile-R, CHU de Québec – Université Laval, 1401, 18^e rue, Québec, Québec, Canada, G1J 1Z4.

Phone (418) 649-0252 #61696 or #61646

Fax (418) 990-8248

E-mail address: lucie.germain@fmed.ulaval.ca (L. Germain).

4.2.1 Résumé (anglais)

The skin model engineered using the LOEX self-assembly approach of tissue engineering (tissue-engineered skin; TES) consists in cultivating dermal fibroblasts in the presence of ascorbic acid. The presence of ascorbic acid promotes extracellular matrix assembly and allows the formation of thick sheets of collagenous tissue. However, the elastin network of the engineered dermis is rudimentary. The aim of this work was to optimize the aging and organization of the elastin network in the TES. TESs were produced using newborn and adult human cells. To stimulate the elastogenesis through the IGF1 pathway, aldosterone and spironolactone were added to the culture medium throughout the culture process. Keratinocytes, with or without melanocytes, were used to reconstruct the epidermis. Immunohistochemical analysis of elastic fiber components in the TES without melanocyte revealed that elastin and fibrillin-2 staining was practically undetectable in adult, but strong in newborn TESs. Aldosterone and spironolactone combined with ascorbic acid increased the fibrillin-2 and elastin expression organized as a microfibrillar network. Addition of melanocytes increased the number of elastic fibers in newborn TESs cultured with or without aldosterone and spironolactone. We conclude that the new conditions developed to produce TESs offer a promising tool to study the aging and the organization of the elastin network.

4.2.2 Introduction

Tissue flexibility and extensibility are critical to the function of many tissues, such as arteries (which undergo repeated cycles of extension and recoil), lungs, skin and all other dynamic connective tissues [1]. This function of elastic fibers complements collagen fibrils, which impart tensile strength to tissues. Together with the collagen, elastic fibers are the main component of the extracellular matrix (ECM) that composes connective tissue.

The ECM is a complex assembly of structural and functional proteins that are maintained by the resident cells. The cells not only secrete and assemble the ECM, but also respond to cues from the ECM that can modify the cell behaviour and tissue homeostasis. Collagen is the most abundant protein found in the ECM of human connective tissues, accounting for 75% of the dry skin weight [2] where type I collagen is the principal tensile stress-bearing component [3, 4]. In this fibrillar type collagen the collagen triple helices, also called collagen molecules, are assembled in fibrils and cross linked via the amino acids lysine and hydroxyl lysine present in their telopeptide regions [3]. Ascorbic acid is essential for ECM assembly since it is a required component in the synthesis of hydroxyproline and hydroxylysine [5]. Ascorbic acid deficiency results in structurally unstable collagen [6]. In contrast to collagen, elastic fibers make up only for 0.6% of dry human skin weight [7]. Elastic fibers are the major insoluble ECM structures that enable the deformation and the passive recoil of connective tissues. Genesis of elastic fibres in early development involves deposition of tropoelastin, the soluble precursor of mature elastin, on a preformed microfibrillar scaffold consisting of fibrillin, fibulins, microfibril-associated glycoproteins, and numerous accessory and regulatory proteins and GAGs building the interface between elastin and microfibrils or the cell surfaces [8, 9]. Mature elastic fibres are thus a protein and polysaccharide complex structure fibrillin-rich microfibrils cross-linked to the elastin and appearing amorphous in transmission electron microscopy [10].

Several cell types can produce elastic fibres components including skin fibroblasts and keratinocytes as well as smooth muscle cells, endothelial cells and chondrocytes [11]. Elastic fibers produced during development maintain the elastic function for a lifetime [11]. However, various enzymes (matrix metalloproteinases and serine proteases) are able to cleave elastic fiber molecules [12]. Loss of elasticity due to degradation is a major factor involved in the ageing of connective tissues, in the

development of aortic aneurysms and lung emphysema, and in degenerative changes of sun-damaged skin [13]. The importance of elastic fibres is further highlighted by the severe heritable connective tissue diseases caused by mutations in components of elastic fibres [14]. Among others, fibrillin-1 mutations cause Marfan syndrome, which is associated with skin, cardiovascular, ocular (ectopia lentis) and skeletal defects; fibrillin-2 mutations cause congenital contractural arachnodactyly (CCA) with overlapping skin, skeletal and ocular symptoms; and elastin mutations cause Williams syndrome, supravalvular stenosis (SVAS) and cutis laxa [15].

Aldosterone was shown to stimulate elastogenesis via IGF-IR signalling in cultures of human cardiac and skin fibroblasts, even in the presence of the MR-antagonist spironolactone [16]. Previous study showed that a three-dimensional co-culture model of fibroblasts and keratinocytes on a synthetic nylon mesh generated a microfibrillar network. However, no elastin was detected in this model, while elastic fibers were generated by dermal fibroblasts after 4 weeks in culture in fibrin and collagen gels treated with TGF- β , insulin, and plasmin [17]. Other studies also reported elastogenesis in a skin substitute based on co-cultured dermal fibroblasts and keratinocytes seeded on a porous dermal substrate made of collagen, glycosaminoglycans, and chitosan. Nonetheless, only microfibrils were generated when fibroblasts were cultured alone [18]. These data revealed that dermal fibroblasts cultured on synthetic or collagen based gels were not able to assemble elastic fibers. Furthermore, the presence of keratinocytes was not sufficient to trigger elastin depositions on microfibrils, suggesting that the dermal macromolecular environment (components and porous structure) plays a major role on the deposition and organization of the ECM [18].

Our group has developed a three-dimensional (3D) tissue-engineered skin (TES) using the self-assembly approach of tissue engineering which is based on the capacity of mesenchymal cells to form their own ECM *in vitro* in the presence of serum and ascorbic acid [19]. In a previous study, we showed the presence of elastin in these TES. However, elastin-positive fibers were thin and the network appeared immature, as assessed using transmission electron microscopy [20]. The aim of this study was to optimize the aging and organization of the elastic fiber network in the TES produced *in vitro*.

4.2.3 Matériel et méthodes

Biological specimens

This study was conducted according to our institution's guidelines and the Declaration of Helsinki. All protocols were approved by the institution's committee for the protection of human subjects (Comité d'éthique de la recherche du CHU de Québec-Université Laval).

Cells and monolayer cultures

Human dermal fibroblasts were obtained from three newborn (2, 4, and 7 days old) and three adults (21, 22, and 45 years old) healthy skin donors, amplified *in vitro* and cryopreserved until use. To induce the formation of insoluble elastin, aldosterone (50 nM) and spironolactone (2 μ M) were added alone or in combination, with or without ascorbic acid (5, 25 and 50 μ g/mL), to monolayer cultures of newborn or adult fibroblasts at their fourth passage for ten to twenty-one days in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Invitrogen, Mississauga, ON, Canada) with 10% fetal bovine serum. Elastin expression was analysed on ten days treatment culture while

Tissue-engineered skin production

For the production of TESs, human dermal fibroblasts, epithelial cells and melanocyte were obtained from three newborn (2, 4, and 7 days old) and three adults (21, 22, and 45 years old) healthy skin donors, amplified *in vitro* and cryopreserved until use. Human fibroblasts were used at their fourth passages to reconstruct the dermal component of the TES according to the self-assembly approach of tissue engineering. Briefly, fibroblasts were cultivated 28 days in DMEM (Invitrogen, ON, Canada) with 10% fetal bovine serum supplemented with 50 μ g/mL of ascorbic acid (Sigma Chemicals, Mississauga, ON, Canada). Three dermals sheets were superimposed to obtain a thicker sheet, referred to as tissue-engineered dermis, onto which human epithelial cells were seeded at a density of 200,000 cells/cm², with or without melanocytes. Melanocytes were added at the same time at a density of 150,000 cells/cm². The resulting TESs were cultured seven days submerged in cDMEM-Ham (Dulbecco's modified Eagle's medium and Ham's F12) (Invitrogen, ON, Canada) and then raised at the air-liquid interface in epidermal growth factor-free cDMEM-Ham up to 42 days. To stimulate elastic fiber formation, 50 nM aldosterone (Sigma Chemicals) at and 2 μ M spironolactone (Sigma Chemicals) were added to the culture medium all along the TES culture process.

Tissue contraction measurements

The contractile behaviour of TESs was analysed as described [21]. Square specimens were cut out, using an in-house designed stainless steel instrument (30x30 mm). Each TES was transferred from air-liquid culture to a soft gel substrate (1% agar (Sigma Chemicals) in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics). Contraction was evaluated by the calculation of surface area of the specimen using the freehand tool of Image JW software (NIH, Bethesda, MD, USA) over a twelve hour period on sequential pictures. The initial area was determined as 100% and all subsequent measurements were expressed as a ratio to this value.

Mechanical strength

TESs were subjected to failure strain and repeated loading-unloading cycles in order to obtain the uniaxial tensile strength (UTS) and hysteresis stress-strain curves on the Instron ElectroPuls® E1000 Test Instruments (Instron Corporation, Norwood, MA, Canada) as described in [21]. Each TES was cut into a 1 cm long hourglass shape sample and mounted between two hooks adapted to the mechanical tester device. For each sample, the hook-to-hook distance was determined as the gauge length corresponding to a tensile strength of 0.02N. To obtain hysteresis curves, each sample was first preconditioned with three cyclic loading sequences at an estimated 10% of the failure strain before testing, then subjected to 10% amplitude deformations with a repeated loading-unloading cycles at 0.5 mm/s for a total of 25 cycles. Curves were analyzed using an in-house developed Matlab script (The Mathworks), allowing to monitor the load-bearing capacity of each TES and to characterize the elastic behaviour. Finally, UTS parameters were obtained by first preconditioning the samples as before, then loading up to failure with a displacement rate of 0.5 mm/s. UTS and failure strain were defined by the peak stress and the maximum deformation withstood by the samples before failure. Linear modulus was defined as the slope of the linear portion of the stress-strain curve comprised between 25% and 80% of the UTS of the sample. Note that engineering stresses were calculated by dividing the recorded loads by the cross-sectional area of the sample using initial construct dimensions and that engineering strain was used to measure the deformation of the sample. Stress-strain curves were plotted and analyzed using an in-house developed Matlab script.

Histology

TES biopsies were taken after 10, 21, 35 days of aging at the air-liquid interface. For histological analysis, TES samples were fixed in 3.7% formaldehyde (ACP Chemicals, Montréal, QC, Canada) and processed for paraffin embedding. Sections (5 μm) were stained with Masson's trichrome and Hematoxylin Eosin. Digital images were acquired using Axio Imager.Z2 microscope (Carl Zeiss Canada Ltd, Toronto, Ontario, Canada) and photographed with an Axiocam digital camera.

Immunofluorescence staining and imaging

TES samples were embedded in Tissue-Tek OCT Compound (Miles, Inc., Elkhart, IN), cooled in liquid nitrogen, and conserved at -80°C . Immunofluorescence assays were performed on 20 μm thick cryosections permeabilized with acetone (10 min at -20°C). The cell nuclei were counterstained with Hoechst reagent 33258 (Sigma). The antibodies used were as follows: mouse anti-elastin (B10) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), rabbit anti-tropoelastin (Elastin Products Company, Owensville, MO, USA), chicken anti-vimentin (Novus Biologicals, Oakville ON, Canada), goat anti-fibrillin-1 (Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-fibrillin-2 (Elastin Products Company), mouse anti-fibulin-1 (Santa Cruz Biotechnology), goat anti-fibulin-4 (Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-fibulin-5 (Santa Cruz Biotechnology), mouse anti-mel-5 (Covance, Burlington, ON, Canada), rabbit anti-collagen VII (Millipore Calbiochem, Billerica, MA). The following secondary antibodies were used: Alexa 594 conjugated donkey anti-mouse (Invitrogen, Burlington, ON, Canada), Alexa 488 F(ab')₂ conjugated donkey anti-rabbit (Abcam, Toronto, ON, Canada), Alexa 647 conjugated donkey anti-chicken (Jackson IRL), Alexa 647 F(ab')₂ conjugated donkey anti-goat (Abcam). Negative controls consisted in the omission of the primary antibody. Fluorescence was observed using a LSM700 confocal microscope (Zeiss, Toronto, ON, Canada) and photographed with an Axiocam digital camera. Images were processed with Adobe Photoshop CC 2015 software (Adobe System, San Jose, CA).

Elastic fiber image analysis

The number of elastic fibers within TESs was quantified by a freehand tool, called AnalyseSkeleton, of Image JW software (NIH, Bethesda, MD, USA), which allows analyzing 3D skeleton images. 3D images of the elastic network were transformed to binary data by the "Yen method" and then "skeletonized", which implies that all pixel/voxels in a skeleton image were tagged and analyzed. Results displayed all junctions, triple points, and branches, and maximum fibers length.

Statistical analysis

Three independent experiments were performed with three replicate samples for each condition. Quantified data represent the mean (SD) where applicable. The non-parametric Mann-Whitney U-test (GraphPad Prism version 5) was used to compare difference between groups. A p-value below 0.05 was considered significant.

4.2.4 Résultats

Newborn and adult human TESs produced by the self-assembly approach

Human TES is a bilayered skin construct that contains fibroblasts and keratinocytes as main cellular components. The TES shared many histological characteristics with normal human skin. However, immunofluorescence analysis revealed less elastin-positive fibers in TESs produced with adult cells (aTES) compared with TESs produced with newborn cells (nTES), whereas tropoelastin was detected in both, aTESs and nTES (data not shown). A strong expression of fibrillin-2, a major protein of the microfibrillar structure, was observed in both aTESs (data not shown) and nTES (Fig.4.1 first column).

Stimulation of elastogenesis in TESs

To induce the formation of insoluble elastin, aldosterone (50 nM) and spironolactone (2 μ M) were added alone or in combination, with or without ascorbic acid (50 μ g/mL), to monolayer cultures of newborn or adult fibroblasts. We noticed in immunofluorescence analysis that the number of elastic fibers increased when aldosterone or spironolactone were used with or without ascorbic acid (data not shown) compared with ascorbic acid only. However only condition with ascorbic acid was capable of assembling an extracellular matrix composed of collagen. Indeed, elastic fiber formation depends not only on sufficient tropoelastin synthesis, but also on proper matrix assembly and crosslinking. We therefore performed immunofluorescence staining to determine the presence of important elastogenesis-associated proteins in our tissue-engineered tissue and identified that after a 28 days culture of isolated skin fibroblasts with ascorbic acid combine with aldosterone and spironolactone, fibrillin-1 and -2, fibronectin, fibulin-4 and -5 and EMILIN-1, as well as the cross-linking enzyme LOX were all produced in parallel of collagen-I the major collagenic protein of the ECM in the skin (data not shown).

Tissue Engineered Skin

Cell nuclei
Elastin
Fibrillin-2

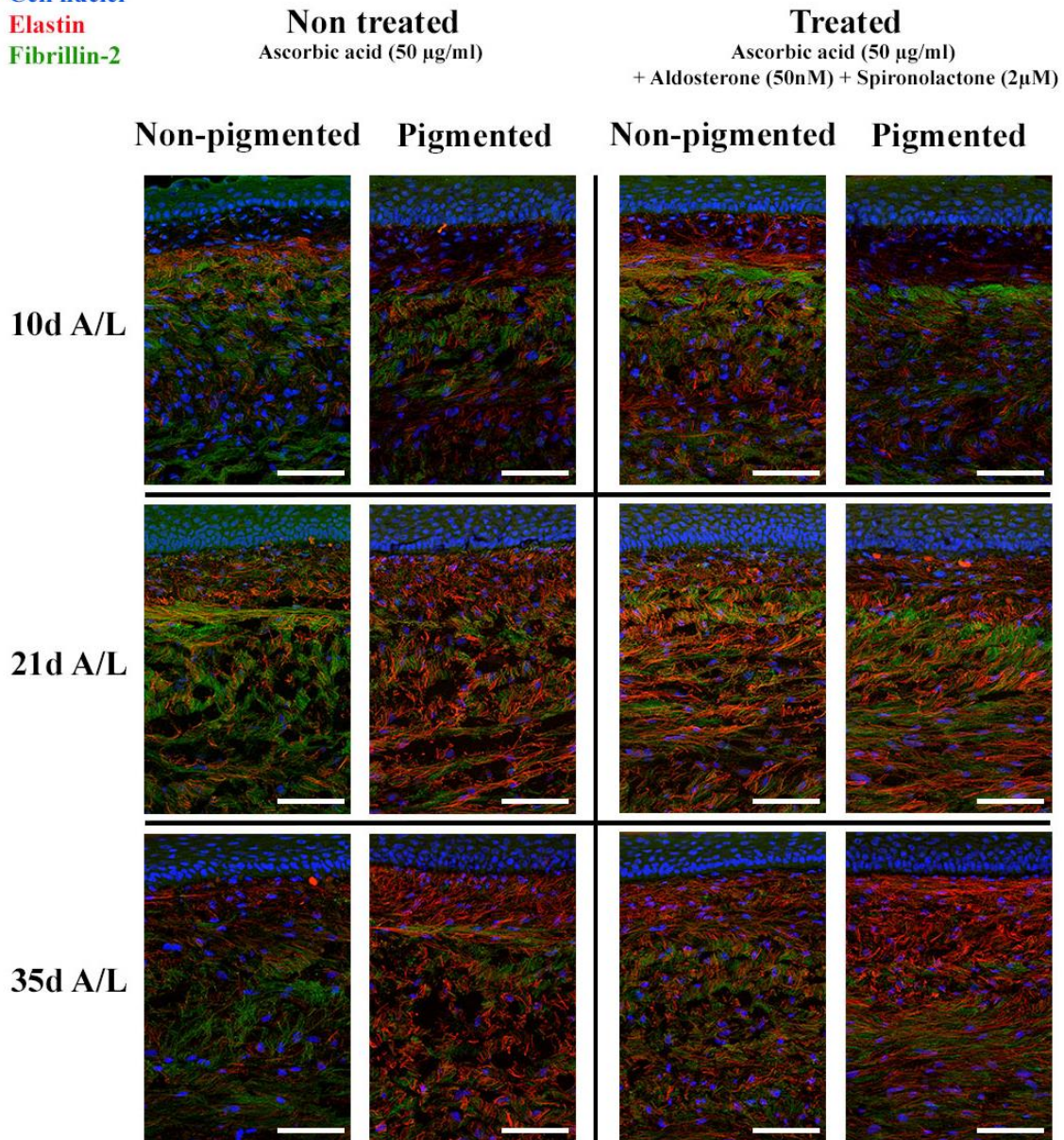


Figure 4.1: Representative immunofluorescence observations of pigmented (melanocytes and keratinocytes) and non-pigmented (keratinocytes) tissue-engineered skin at 10, 21 and 35 days of aging at the air-liquid interface cultivated with (treated) or without (not-treated) a combination of aldosterone (50nM) and spironolactone (2µM) in presence of ascorbic acid (50µg/ml).

Scale bar 100µm.

Since the epidermis plays a major role in the regulation of ECM architecture, components, such as fibronectin, laminin, collagen, tropoelastin, microfibrils and remodeling [22, 23][24], we investigated the elastic fiber organization in non-pigmented and pigmented TESs after 10, 21 and 35 days of aging at the air-liquid interface.

Immunofluorescence labelling of elastin and fibrillin-2 revealed a higher number of elastic fibers in tissue-engineered dermis compared to TESs containing or not melanocytes cultured with aldosterone and spironolactone for 10 days at the air-liquid interface (data not shown) This is consistent with an ECM remodelling following the addition of keratinocytes. After 21 days of aging at the air-liquid interface, elastic fibers in non-pigmented TES produced with ascorbic acid alone (Fig. 4.1 first column), were concentrated below the dermo-epidermal junction (DEJ), and appeared to be increasing in pigmented TESs (Fig. 4.1 second column), suggesting a direct or an indirect positive role for melanocytes in the elastogenesis process. Furthermore, elastic fibers orientation below the DEJ tended to be perpendicular to the epidermis, such as it is found in native tissue. Beside, a more extensive elastic fiber network was observed in pigmented and non-pigmented TESs treated with aldosterone and spironolactone compared with non-treated TESs (Fig. 4.1 third and fourth column). After 35 days of aging at the air-liquid interface, the number of elastic fibers drop in treated and non-treated condition essentially in the non-pigmented TES (Fig. 4.1 first and third column). The presence of mature elastic fibers in TESs was confirmed by transmission electron microscopy (Fig. 4.2). Indeed, amorphous material was present close to the bundles of parallel microfibrils, which is a typical feature of elastic fibers (Fig. 4.2).

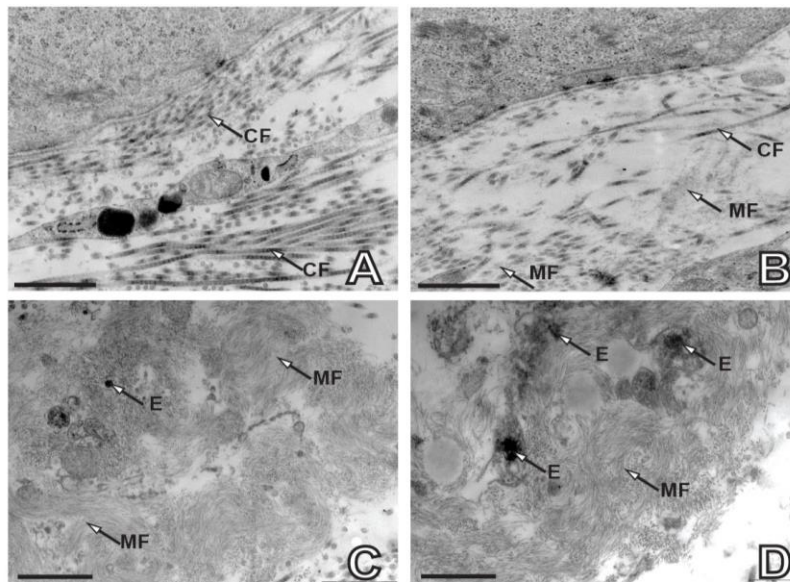


Figure 4.2: Transmission electron micrographs of tissue-engineered skin cultured without (A, C) or with a combination of aldosterone (50nM) and spironolactone (2µM) (B, D).

Note that the density of collagen fibers (CF) is greater below the dermal-epidermal junction of tissue-engineered skin cultured without aldosterone and spironolactone compared with those cultured with aldosterone and spironolactone (B). Microfibrils (MF) network is increased with more elastin (E) deposition when aldosterone and spironolactone were used (D). Scale bar: 1µm

We next evaluated the length and number of elastic fibers observed in TESs after 10, 21 and 35 days of aging at the air-liquid interface (data shown only at 21 days (Table 4.1 and 4.2)). We showed as well that pigmented TES treated or not counted more elastic fibers compared to non-pigmented TES treated or not which, furthermore, were longer and comparable to the native skin at 21 days of the air-liquid interface aging (Tables 4.2 and 4.3).

Table 4.1: Elastic Fiber analysis at 21 days at the air-liquid interface of TESs non-treated

group length (μm)	Non-pigmented		Pigmented	
	Nbr fiber	Mean \pm SD	Nbr fiber	Mean \pm SD
0 - 20	3832	4 \pm 4	4775	4 \pm 5
21 - 50	112	33 \pm 9	129	38 \pm 10
51 - 100	17	71 \pm 14	21	85 \pm 16
101 - 150	3	123 \pm 9	0	0 \pm 0
151 - 200	1	174 \pm 0	2	151 \pm 0
201 - 250	2	240 \pm 1	1	281 \pm 0
250 - 300	0	0 \pm 0	1	393 \pm 0
301 - 350	0	0 \pm 0	0	0 \pm 0
351 - 400	0	0 \pm 0	0	0 \pm 0
401 - 450	0	0 \pm 0	0	0 \pm 0
451 - 500	0	0 \pm 0	0	0 \pm 0
sup 500	1	563 \pm 0	2	625 \pm 80

Table 4.2: Elastic Fiber analysis at 21 days at the air-liquid interface of TESs treated with aldosterone (50nM) and spironolactone (2 μM)

group length (μm)	Non-pigmented		Pigmented	
	Nbr fiber	Mean \pm SD	Nbr fiber	Mean \pm SD
0 - 20	4699	4 \pm 5	5411	4 \pm 4
21 - 50	136	36 \pm 10	174	36 \pm 9
51 - 100	15	80 \pm 14	26	84 \pm 16
101 - 150	3	127 \pm 4	2	143 \pm 6
151 - 200	0	0 \pm 0	1	171 \pm 0
201 - 250	1	239 \pm 0	0	0 \pm 0
250 - 300	1	324 \pm 0	0	0 \pm 0
301 - 350	0	0 \pm 0	1	320 \pm 0
351 - 400	0	0 \pm 0	1	360 \pm 0
401 - 450	0	0 \pm 0	0	0 \pm 0
451 - 500	0	0 \pm 0	0	0 \pm 0
sup 500	1	616 \pm 0	1	525 \pm 0

Table 4.3: Elastic Fiber analysis from the native newborn skin

group length (μm)	Nbr fiber	Mean \pm SD
0 - 20	1982	8 \pm 7
21 - 50	272	45 \pm 12
51 - 100	77	99 \pm 20
101 - 150	0	0 \pm 0
151 - 200	15	175 \pm 15
201 - 250	8	232 \pm 19
250 - 300	0	0 \pm 0
301 - 350	3	303 \pm 21
351 - 400	3	398 \pm 0
401 - 450	0	0 \pm 0
451 - 500	3	458 \pm 42
sup 500	1	803 \pm 0

Mechanical properties

The impact of ascorbic acid concentration on the thickness of tissue-engineered dermis was first evaluated. The thickness of tissue-engineered dermis produced with 50 (the usual dose) or 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ascorbic acid was similar (Fig. 4.3). In contrast, a 50% thickness decrease was measured with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. These results led us to assume that 25 to 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of ascorbic acid used in the self-assembly approach were the range of concentration that maximally stimulated collagen biosynthesis. Aldosterone, spironolactone alone or in combination with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of ascorbic acid had no significant impact on the dermal thickness (Fig. 4.3).

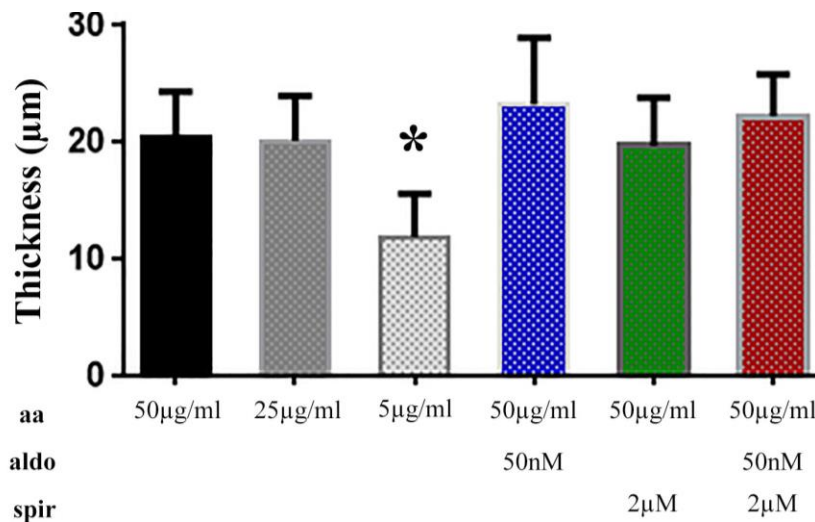


Figure 4.3: Histological analysis of Masson's trichrome staining of tissue-engineered dermis. All substitutes were cultivated for 21 days in the presence of 50, 25 and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ascorbic acid, combined with or without 50nM aldosterone or 2 μM spironolactone.

Note that only a 5µg/ml dose of ascorbic acid significantly decrease the thickness of the tissue-engineered dermis. (Ascorbic acid (aa), aldosterone (aldo), spironolactone (spir)). *Indicates Statistical Significance ($P < 0.05$)

Mechanical properties of non-pigmented TESs, pigmented and non-pigmented TESs treated or not with aldosterone and spironolactone were evaluated after 10, 21 and 35 days of aging at the air-liquid interface. We first evaluated the stability of the TES over a period of twelve hours by measuring TESs surface area after detachment from the anchorage (Fig. 4.4A). We observed that pigmented TESs treated with aldosterone and spironolactone were the less contractile at 10 days of aging at the air-liquid interface. Interestingly, at 21 days, aldosterone and spironolactone further reduced the contraction of non-pigmented TESs (58%) and reduced the contraction of non-pigmented TESs (48%). At 35 days, less than 5% contraction was measured with no difference between conditions.

Second, uniaxial tensile tests (UTS) (Fig. 4.4B) were performed to evaluate mechanical strength of TESs. A mechanical stimulation was performed before performing the rupture test to induce the alignment of the ECM and cytoskeleton components in TESs. Each tissue showed a characteristic stress strain profile comprising a toe region, followed by a linear stress-strain relationship, and a rupturing point typical of viscoelastic biological tissues (data not shown). The mechanical strength increased with culture time for all conditions. Furthermore, non-treated TESs, pigmented or not, tended (Fig. 4.4B, respectively black and blue) to be more rigid compared with TESs treated with aldosterone and spironolactone (Fig. 4.4B red) at 10 and 21 days of aging at the air-liquid interface, but no statistical difference was detected.

Third, the hysteresis curves obtained after repeated 10% strain loading and unloading cycles displayed the viscoelastic Young's modulus attributes (Fig. 4.4C). Results showed a significant lower Young's modulus value for non-pigmented TESs treated with aldosterone and spironolactone at 10 and 21 days of aging at the air-liquid interface (Fig. 4.4C, red) compared with not treated TESs and treated pigmented TESs (Fig. 4.4C, respectively black and blue), indicating that treated non-pigmented TES were more elastic. However, no significant difference was detected between TESs after 35 days of aging at the air-liquid interface.

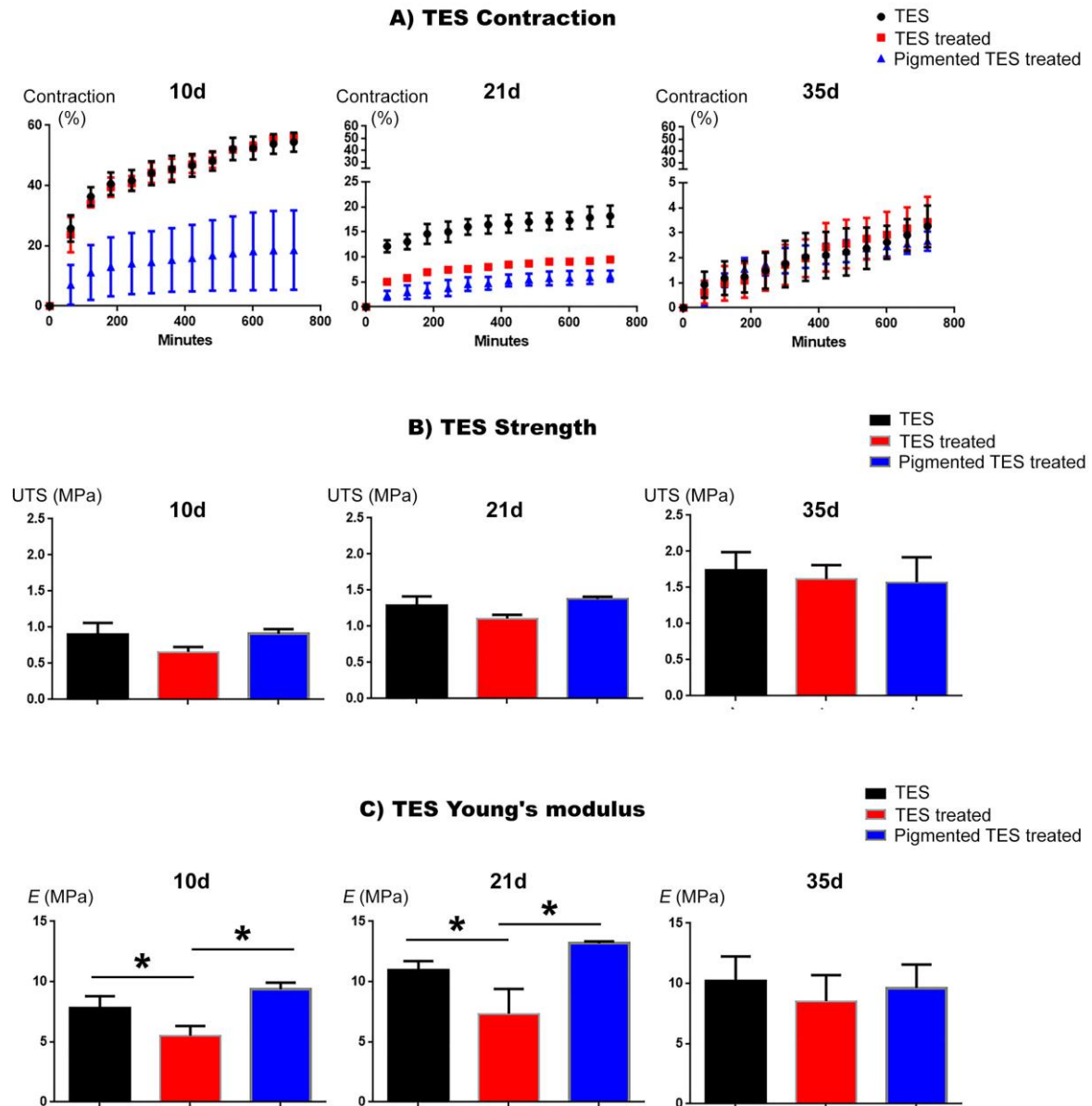


Figure 4.4: Mechanical properties of non-pigmented TES (black) produced with ascorbic acid (50 μ g/ml); non-pigmented (red) and pigmented (blue) TESs treated with a combination of aldosterone (50nM) and spironolactone (2 μ M) and ascorbic acid (50 μ g/ml), after 10, 21 and 35 days of culture at the air-liquid interface.

(A) Contraction kinetics established over a twelve-hour period. **(B)** Bar graphs representing ultimate tensile strength (UTS) (MPa). **(C)** Bar graphs representing the mean Young's Modulus (E) (MPa) obtained after 10% strain loading and unloading cycles.

4.2.5 Discussion

As elastic fibers are responsible for skin resilience, there is a need for treatments that might induce and protect existing elastic fibers from premature degradation and facilitate new elastogenesis in skin. In this study, we developed *in vitro* conditions that allowed to stimulate elastogenesis in our human TES model. We observed that the addition of aldosterone and spironolactone to the culture medium, as well as the incorporation of melanocytes in TES epidermis, have a positive effect on elastogenesis. Furthermore, we showed that the number of elastic fibers in TESs inversely associated with their contraction capability. Finally, results obtained from hysteresis curves suggested that the elastic fibers formed in TESs were functional.

The role of elastic fibers in maintaining skin elasticity is of notable functional and cosmetic interest. Elastic fibers are mainly produced during the second half of fetal development and in early childhood [1], and wrinkling of the skin with ageing has been associated with elastic fiber degeneration [25]. Elastic fibers repair slowly and have limited regenerative capacity [25]. In addition to the normal aging process, exposure to UV irradiation from the sun causes actinic damages [26]. Heavy smokers develop excessively wrinkled skin, a condition that has also been attributed to accelerated elastic fiber destruction [27, 28]. Although new ECM produced during the healing of dermal wounds contains a small amount of elastic fibers, hypertrophic scars and keloids practically does not contain elastic fibers [29].

Previous studies have reported that the initiation of elastin gene transcription is regulated by endogenous factors such as glucocorticoids [30], IGF-1 [31], insulin [32], TGF- β [33], and aldosterone [16], along with a few exogenous factors such as dexamethasone [34], retinoids [35] and ferric ions [36]. However, those studies were mostly conducted on monolayer culture models, which limit conclusions about elastic fiber functionality.

The advent of tissue engineering has stimulated interest in elastic fiber assembly within synthetic matrices in order to confer optimal mechanical properties to reconstructed tissues that require elastic function such as blood vessels or skin. However the generation of skin substitutes containing an ECM

composition similar to the native tissue represents a major challenge in tissue engineering. The human TES produced by the self-assembly approach presents viscoelastic properties similar to native tissue [37]. However, given that the elastic fiber network were rudimentary in the first published TES model [20], observed viscoelastic properties were mainly attributable to collagen. Previous studies showed that ascorbic acid, at concentrations that maximally stimulate collagen synthesis, antagonizes elastin accumulation [38, 39]. Indeed, treatment of aortic or vascular smooth muscle cell and skin fibroblasts cultures with ascorbic acid decreased elastin accumulation [40-42]. Ascorbic acid reduced the transcription of the elastin gene and decreased elastin mRNA stability [43].

Inducing elastogenesis in a tissue-engineered construct would not only enable the production of functional implants but also the generation of advanced human-based *in vitro* testing systems. These elastic fiber-containing systems could either be used to further understand the process of elastic fiber assembly or to study processes that are attributed to elastic fiber degeneration, including ageing.

4.2.6 Conclusion

In conclusion, we demonstrated that the induction of the elastogenesis through the IGF-I pathway by aldosterone and spironolactone increased the number of elastic fibers in TESs. Increasing the number of elastic fibers increased the resilience of TESs, which was correlated with a decrease of rigidity and contractile properties. This technology can be utilized not only for *in vitro* studies of elastogenesis, but also for clinical applications of elastic fiber-rich tissues for grafting.

4.2.7 Remerciements

The authors gratefully thank Drs. Alphonse Roy, Félix André Têtu, and Maurice Bouchard for providing skin biopsies, as well as Israël Martel, Amélie Lavoie, Francis Bisson, Marc-André Plourde-Campagna, Véronique Laterreur and Carolyne Simard-Bisson for their expert technical assistance. This work was supported by the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) grant MOP-12087 and FDN-143213 (L.G.), Fondation des Pompiers du Québec pour les Grands Brûlés (FPQGB), the Fonds de Recherche du Québec-Santé (FRQS), and the Réseau de thérapie cellulaire et tissulaire (ThéCell) du FRQS. L.G.

is the recipient of a Tier 1 Canadian Research Chair on Stem Cells and Tissue Engineering and a Research Chair on Tissue-Engineered Organs and Translational Medicine of the Fondation de l'Université Laval and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

4.2.8 Références

- [1] C.M. Kielty, Elastic fibres in health and disease, *Expert Rev Mol Med* 8(19) (2006) 1-23.
- [2] K. Kadler, Extracellular matrix. 1: fibril-forming collagens, *Protein Profile* 1(5) (1994) 519-638.
- [3] F.H. Silver, J.W. Freeman, G.P. Seehra, Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties, *J Biomech* 36(10) (2003) 1529-53.
- [4] P. Fratzl, K. Misof, I. Zizak, G. Rapp, H. Amenitsch, S. Bernstorff, Fibrillar structure and mechanical properties of collagen, *J Struct Biol* 122(1-2) (1998) 119-22.
- [5] G.J. Cardinale, S. Udenfriend, Prolyl hydroxylase, *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 41(0) (1974) 245-300.
- [6] S. Jimenez, M. Harsch, J. Rosenbloom, Hydroxyproline stabilizes the triple helix of chick tendon collagen, *Biochem Biophys Res Commun* 52(1) (1973) 106-14.
- [7] G.L. Maddox, *The Encyclopedia of Aging: A Comprehensive Resource in Gerontology and Geriatrics*, 3rd ed ed., Springer Berlin Heidelberg 2001.
- [8] M.A. Gibson, G. Hatzinikolas, J.S. Kumaratilake, L.B. Sandberg, J.K. Nicholl, G.R. Sutherland, E.G. Cleary, Further characterization of proteins associated with elastic fiber microfibrils including the molecular cloning of MAGP-2 (MP25), *J Biol Chem* 271(2) (1996) 1096-103.
- [9] J.E. Wagenseil, R.P. Mecham, New insights into elastic fiber assembly, *Birth Defects Res C Embryo Today* 81(4) (2007) 229-40.
- [10] C.M. Kielty, S. Stephan, M.J. Sherratt, M. Williamson, C.A. Shuttleworth, Applying elastic fibre biology in vascular tissue engineering, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 362(1484) (2007) 1293-1312.
- [11] M.J. Sherratt, Tissue elasticity and the ageing elastic fibre, *Age (Dordr)* 31(4) (2009) 305-25.
- [12] J.L. Ashworth, G. Murphy, M.J. Rock, M.J. Sherratt, S.D. Shapiro, C.A. Shuttleworth, C.M. Kielty, Fibrillin degradation by matrix metalloproteinases: implications for connective tissue remodelling, *Biochem J* 340 (Pt 1) (1999) 171-81.
- [13] R.E. Watson, C.E. Griffiths, N.M. Craven, C.A. Shuttleworth, C.M. Kielty, Fibrillin-rich microfibrils are reduced in photoaged skin. Distribution at the dermal-epidermal junction, *J Invest Dermatol* 112(5) (1999) 782-7.
- [14] P.N. Robinson, M. Godfrey, The molecular genetics of Marfan syndrome and related microfibrilopathies, *J Med Genet* 37(1) (2000) 9-25.
- [15] M. Tassabehji, K. Metcalfe, J. Hurst, G.S. Ashcroft, C. Kielty, C. Wilmot, D. Donnai, A.P. Read, C.J. Jones, An elastin gene mutation producing abnormal tropoelastin and abnormal elastic fibres in a patient with autosomal dominant cutis laxa, *Hum Mol Genet* 7(6) (1998) 1021-8.
- [16] T.F. Mitts, S. Bunda, Y. Wang, A. Hinek, Aldosterone and mineralocorticoid receptor antagonists modulate elastin and collagen deposition in human skin, *J Invest Dermatol* 130(10) (2010) 2396-406.
- [17] J.L. Long, R.T. Tranquillo, Elastic fiber production in cardiovascular tissue-equivalents, *Matrix Biol* 22(4) (2003) 339-50.

- [18] F. Duplan-Perrat, O. Damour, C. Montrocher, S. Peyrol, G. Grenier, M.P. Jacob, F. Braye, Keratinocytes influence the maturation and organization of the elastin network in a skin equivalent, *J Invest Dermatol* 114(2) (2000) 365-70.
- [19] D. Larouche, C. Paquet, J. Fradette, P. Carrier, F.A. Auger, L. Germain, Regeneration of skin and cornea by tissue engineering, *Methods Mol Biol* 482 (2009) 233-56.
- [20] R. Pouliot, D. Larouche, F.A. Auger, J. Juhasz, W. Xu, H. Li, L. Germain, Reconstructed human skin produced in vitro and grafted on athymic mice, *Transplantation* 73(11) (2002) 1751-7.
- [21] R. Gauvin, M. Guillemette, T. Galbraith, J.M. Bourget, D. Larouche, H. Marcoux, D. Aube, C. Hayward, F.A. Auger, L. Germain, Mechanical properties of tissue-engineered vascular constructs produced using arterial or venous cells, *Tissue Eng Part A* 17(15-16) (2011) 2049-59.
- [22] M. Xue, C.J. Jackson, Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring, *Advances in Wound Care* 4(3) (2015) 119-136.
- [23] H. Kajiya, N. Tanaka, T. Inazumi, Y. Seyama, S. Tajima, A. Ishibashi, Cultured human keratinocytes express tropoelastin, *J Invest Dermatol* 109(5) (1997) 641-4.
- [24] S.L. Haynes, C.A. Shuttleworth, C.M. Kielty, Keratinocytes express fibrillin and assemble microfibrils: implications for dermal matrix organization, *Br J Dermatol* 137(1) (1997) 17-23.
- [25] J. Uitto, M.J. Fazio, D.R. Olsen, Molecular mechanisms of cutaneous aging. Age-associated connective tissue alterations in the dermis, *J Am Acad Dermatol* 21(3 Pt 2) (1989) 614-22.
- [26] G.J. Fisher, Z.Q. Wang, S.C. Datta, J. Varani, S. Kang, J.J. Voorhees, Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light, *N Engl J Med* 337(20) (1997) 1419-28.
- [27] L. Yin, A. Morita, T. Tsuji, Alterations of extracellular matrix induced by tobacco smoke extract, *Archives of dermatological research* 292(4) (2000) 188-94.
- [28] A. Morita, Tobacco smoke causes premature skin aging, *Journal of dermatological science* 48(3) (2007) 169-75.
- [29] T.P. Amadeu, A.S. Braune, L.C. Porto, A. Desmouliere, A.M. Costa, Fibrillin-1 and elastin are differentially expressed in hypertrophic scars and keloids, *Wound Repair Regen* 12(2) (2004) 169-74.
- [30] I. Ledo, M. Wu, S. Katchman, D. Brown, S. Kennedy, S. Hsu-Wong, J. Uitto, Glucocorticosteroids up-regulate human elastin gene promoter activity in transgenic mice, *J Invest Dermatol* 103(5) (1994) 632-6.
- [31] K.J. Conn, C.B. Rich, D.E. Jensen, M.R. Fontanilla, M.M. Bashir, J. Rosenbloom, J.A. Foster, Insulin-like growth factor-I regulates transcription of the elastin gene through a putative retinoblastoma control element. A role for Sp3 acting as a repressor of elastin gene transcription, *J Biol Chem* 271(46) (1996) 28853-60.
- [32] J. Shi, A. Wang, S. Sen, Y. Wang, H.J. Kim, T.F. Mitts, A. Hinek, Insulin induces production of new elastin in cultures of human aortic smooth muscle cells, *Am J Pathol* 180(2) (2012) 715-26.
- [33] U. Kucich, J.C. Rosenbloom, W.R. Abrams, J. Rosenbloom, Transforming growth factor-beta stabilizes elastin mRNA by a pathway requiring active Smads, protein kinase C-delta, and p38, *Am J Respir Cell Mol Biol* 26(2) (2002) 183-8.
- [34] C.P. Barnett, D. Chitayat, T.J. Bradley, Y. Wang, A. Hinek, Dexamethasone normalizes aberrant elastic fiber production and collagen 1 secretion by Loey's-Dietz syndrome fibroblasts: a possible treatment?, *Eur J Hum Genet* 19(6) (2011) 624-33.
- [35] R.A. Pierce, B. Joyce, S. Officer, C. Heintz, C. Moore, D. McCurnin, C. Johnston, W. Maniscalco, Retinoids increase lung elastin expression but fail to alter morphology or angiogenesis genes in premature ventilated baboons, *Pediatr Res* 61(6) (2007) 703-9.
- [36] S. Bunda, N. Kaviani, A. Hinek, Fluctuations of intracellular iron modulate elastin production, *J Biol Chem* 280(3) (2005) 2341-51.

- [37] S. Proulx, J. Fradette, R. Gauvin, D. Larouche, L. Germain, Stem cells of the skin and cornea: their clinical applications in regenerative medicine, *Curr Opin Organ Transplant* 16(1) (2011) 83-9.
- [38] Y.A. de Clerck, P.A. Jones, The effect of ascorbic acid on the nature and production of collagen and elastin by rat smooth-muscle cells, *Biochem J* 186(1) (1980) 217-25.
- [39] T. Scott-Burden, P.J. Davies, W. Gevers, Elastin biosynthesis by smooth muscle cells cultured under scorbutic conditions, *Biochem Biophys Res Commun* 91(3) (1979) 739-46.
- [40] P.R. Bergethon, P.J. Mogayzel, Jr., C. Franzblau, Effect of the reducing environment on the accumulation of elastin and collagen in cultured smooth-muscle cells, *Biochem J* 258(1) (1989) 279-84.
- [41] D.M. Dunn, C. Franzblau, Effects of ascorbate on insoluble elastin accumulation and cross-link formation in rabbit pulmonary artery smooth muscle cultures, *Biochemistry* 21(18) (1982) 4195-202.
- [42] B. Faris, R. Ferrera, P. Toselli, J. Nambu, W.A. Gonnerman, C. Franzblau, Effect of varying amounts of ascorbate on collagen, elastin and lysyl oxidase synthesis in aortic smooth muscle cell cultures, *Biochim Biophys Acta* 797(1) (1984) 71-5.
- [43] J.M. Davidson, P.A. LuValle, O. Zoia, D. Quaglino, Jr., M. Giro, Ascorbate differentially regulates elastin and collagen biosynthesis in vascular smooth muscle cells and skin fibroblasts by pretranslational mechanisms, *J Biol Chem* 272(1) (1997) 345-52.

Chapitre 5 : Discussion et Conclusions

5.1. L'immunité et la biodisponibilité de tissus reconstruits par auto-assemblage

Au cours des deux dernières décennies, la bio-ingénierie tissulaire a énormément avancé. Le nombre de produits destinés à la clinique a drastiquement augmenté et leurs bienfaits sur la gestion des plaies chroniques et étendues sont de plus en plus documentés. Toutefois, la réelle diversité technologique de ces produits reste pauvre. En effet, ils sont tous issus de la même approche de bio-ingénierie, « *Top-down* » et sont, pour la plupart, obtenus suite à des techniques de décellularisation ou par formation d'éponge et de gels biosynthétiques ou biologiques de protéines animales.

Les substituts bilamellaires « vivants » composés d'un derme contenant des fibroblastes et d'un épiderme de kératinocytes semblent présenter un défi de manufacture. Seule une approche personnalisée de soins pourrait permettre de répondre à tous les critères de production pour le soin au long terme de plaies traumatiques étendues. Par conséquent, la recherche et le développement entrepreneurial se sont focalisés essentiellement sur l'accélération du processus de cicatrisation en apportant un support matriciel dermique aux patients. Ces types de substituts peuvent être biologiques ou biosynthétiques sans composante cellulaire et sont ainsi destinés au soin de plaies superficielles ou chroniques non étendues, tel que les ulcères diabétiques.

Les greffes sur patients avec des plaies étendues peuvent être divisées en deux catégories, soit :

- (1) Greffes en deux étapes distinctes, d'abord, dermique (Alloderm, Oasis™ Wound Matrix, Integra® DRT, Hyalograft 3D), puis épidermique (Epicel, Laserskin). Cependant, le taux de succès de ce type de procédure est variable,
- (2) Greffes en une seule étape par l'utilisation de substituts dits bilamellaires possédant un derme et un épiderme.

Les produits bilamellaires actuels (Apligraf®, OrCel® ou StrataGraft®, etc.) ont des indications identiques à celles des substituts dermiques et épidermiques (plaies semi-profondes, chroniques, et les sites donneurs). En effet, le peu de preuves scientifiques de l'absence d'immunogénicité des fibroblastes dermiques contraignent les entreprises à limiter l'utilisation de leurs produits pour des usages superficiels et temporaires.

En parallèle du développement de l'approche « *Top-down* », le centre de recherche en organogénèse expérimentale de l'Université Laval (LOEX) a développé au cours des deux dernières décennies des tissus cutanés bilamellaires autologues selon l'approche « *Bottom-up* ». Ces tissus sont produits par la technique dite de l'auto-assemblage et ont été d'ores et déjà utilisés pour la clinique après approbation obtenue pour chaque patient de Santé Canada (programme d'accès spécial) pour la couverture à long terme de plaies traumatiques étendues chez les grands brûlés.

Les résultats cumulés des dernières années permettent de positionner ce produit au sommet du marché aussi bien en matière de succès que de qualité de greffe. Cependant, cette approche cellulaire entièrement individuelle (autologue) requiert de nombreuses manipulations et un temps de production extrêmement long, supérieurs à 6 semaines. Étant donné que le temps de production dermique représente les deux tiers de la technique, il a été envisagé de produire un derme avec des fibroblastes allogéniques sur lequel des kératinocytes autologues seront ajoutés.

Mes travaux expérimentaux ont permis de découvrir que ces substituts cutanés bilamellaires chimériques étaient histologiquement similaires aux substituts autologues après greffe sur un modèle murin immunocompétent. Lors des analyses immunohistochimiques, il a été révélé que les cellules immunitaires étaient présentes en plus grand nombre au sein des greffons chimériques qu'au sein des greffons autologues. Toutefois, l'absence de rejet visuel et histologique, ainsi que la présence de cellules positives FOXP3, connue pour être un régulateur dans le développement de cellules T régulatrices impliquées dans la tolérance (Fontenot J. D. et al., 2003; Fontenot J. D. et al., 2005; Hori S. et al., 2003), suggère que notre greffon chimérique a été toléré par l'hôte. Cette évidence est également soutenue par la présence, 8 semaines après la greffe, des fibroblastes allogéniques utilisés pour la production du derme, ainsi que de son épiderme syngénique. De plus, la préimmunisation de notre modèle murin avec les antigènes allogéniques de notre greffon avant greffe a révélé de nouveau la tolérance immunologique des fibroblastes allogéniques. Les greffons chimériques étaient encore une fois similaires aux greffons autologues avec une absence totale de lymphocytes T CD8 impliqués dans le rejet, contrairement aux greffons entièrement allogéniques.

Aucune étude n'avait pu jusqu'à présent clairement démontrer, d'une part, la tolérance immunologique des fibroblastes cutanés, et d'autre part, leur capacité à produire un substitut répondant de manière similaire aux greffons autologues après la greffe. En outre, l'étude menée en parallèle, dont le résumé est joint en annexe 1, sur les kératocytes (fibroblastes du stroma cornéen) responsables elles aussi de la synthèse et de l'assemblage de la matrice extracellulaire, a permis de mettre en évidence la biocompatibilité et la fonctionnalité d'un substitut de stroma reconstruit en utilisant la même technique que pour les dermes cutanés, sans aucun signe de rejet après un délai de quatre mois. Globalement, les résultats obtenus permettent d'envisager la production de dermes reconstruits allogéniques, ainsi que de stromas cornéens, sur lesquels seront ajoutées les cellules épithéliales du patient. Le nouveau délai de production sera ainsi désormais d'environ 3 semaines après la réception de la biopsie du patient.

Les perspectives d'études à court terme comprendront :

- L'évaluation des mécanismes de tolérance immunologique induite par les fibroblastes allogéniques (forte probabilité d'une tolérance périphérique induite avec la présence de lymphocytes T qui exprimeront simultanément le CD4+, le CD25+ et FoxP3) ;
- L'évaluation *in vitro* de l'impact d'un derme allogénique sur le développement épidermique. En effet, l'étude présentée a permis d'évaluer l'immunogénicité des fibroblastes dermiques allogéniques. Toutefois, peu de caractérisations ont été effectuées sur l'impact de ce derme sur le développement de l'épiderme, tel que le nombre de couches cellulaires de chaque compartiment de différenciation et le temps de renouvellement de celui-ci.

Les perspectives d'études à long terme comprendront :

- la caractérisation de plusieurs populations de fibroblastes dermiques, afin de déterminer les caractéristiques de base du produit (épaisseur dermique, propriétés mécaniques) et de standardiser la technique de production ;
- la détermination du temps moyen d'utilisation des fibroblastes allogéniques avant leur remplacement afin de régénérer la réserve de « matières premières » ;

- la détermination des paramètres manufacturiers, c'est-à-dire, le format définitif du produit dermique et sa conservation devront être déterminés afin de correspondre à une production standardisée qui est, pour le moment, toujours personnalisée et variable au cours du temps.

Dans la mesure du possible, une conservation du produit cellularisé dans une solution de conservation adaptée à la congélation à -20 ou -80°C serait préférable. Il sera, dans ces conditions, indispensable de tester différentes solutions de conservation, de déterminer la date de péremption, laquelle dépendra de la mortalité cellulaire résultant de cette conservation, l'impact sur la reconstruction finale (architecture matricielle, propriété mécanique, physiologie globale du tissu) et sur l'aspect après greffe.

5.2. La pigmentation : Esthétique et protection

La vie sur terre a évolué sous l'influence des radiations solaires. Ces radiations sont composées d'un ensemble d'ondes électromagnétiques de longueurs d'onde inférieures à 100 nm (rayons gamma ou X) à 3 000 nm (infrarouges). Ce spectre inclut les UVB (280 à 315 nm), les UVA de basse énergie (315 à 400 nm), la lumière visible (400 à 760-780 nm).

La peau est le premier organe cible des rayonnements solaires (UV-A, -B et -C). Le niveau de pénétration de ces rayons dépend de leur longueur d'onde. Ainsi, plus leurs longueurs d'onde sont élevées plus ils pénétreront profondément dans la peau. Toutefois, leur nocivité est d'autant plus grande que leur longueur d'onde est petite, puisque leur énergie est inversement proportionnelle à celle-ci. Ainsi les UVC sont, par leur énergie, les plus nocifs. Toutefois, ils n'atteignent jamais la surface terrestre, car l'atmosphère, en particulier la couche d'ozone, les absorbe, ainsi que tous les rayons de longueur d'onde inférieure à 300 nm. Par conséquent, les UVB (qui représentent seulement 5 % des UV solaires qui arrivent à la surface de la Terre) seront 1000 fois plus efficaces pour provoquer un coup de soleil que les UVA, qui représentent 95% des UV solaires atteignant la peau (Sage E., 1993).

Les altérations tissulaires après expositions aux rayons UV résultent d'une vaste gamme de réponses photobiologiques cellulaires. L'absorption des UVB par les acides nucléiques et par certains acides aminés entraîne des dommages chimiques directs dans les macromolécules qu'ils composent : l'ADN,

l'ARN et les protéines. Les UVB jouent un rôle majeur dans la mutagenèse, la carcinogenèse, mais aussi dans la pigmentation et l'érythème cutanés (Mitchell D. L. et al., 1989; Parrish J. A. et al., 1982; Tornaletti S. et al., 1996). Les UVA, quant à eux, sont à l'origine des réactions de photo-oxydation qui, de façon indirecte, peuvent endommager l'ADN, les protéines et les lipides insaturés des membranes cellulaires, par la production d'espèces réactives à l'oxygène (Tyrrell R. M., 1996). Ils sont responsables du photovieillessement (Kligman L. H., 1989) et comme les UVB, ils sont impliqués dans la photocarcinogénèse (Agar N. S. et al., 2004).

Les radiations solaires produisent ainsi directement ou indirectement par l'intermédiaire d'espèces réactives à l'oxygène des lésions dans l'ADN. En l'absence de réparation, ces lésions peuvent provoquer des altérations dans les gènes clés du contrôle de la prolifération cellulaire comme les gènes supprimeurs de tumeurs et les oncogènes, entraînant le développement de cancers.

Les modifications oxydatives au niveau de l'ADN après UV sont soit des cassures simple brin, soit des pontages ADN-protéines, soit des modifications de base comme la 8-oxo-7,8- dihydroguanine (Cadet J. et al., 2005; Peak M. J. et al., 1987). Les dommages produits consistent en la formation de photoproduits dimériques entre deux bases pyrimidiques adjacentes (Cadet J. et al., 2005). Il s'agit des dimères de type cyclobutanes de pyrimidines (CPD) et des photoproduits de pyrimidines (6-4) pyrimidone (6-4PP), dont le taux dépend de la dose et du type d'UV (Pfeifer G. P. et al., 1991). En effet, les UVB induisent 1000 fois plus de CPD que les UVA (Kuluncsics Z. et al., 1999; Perdiz D. et al., 2000) et ils sont directement responsables des 6-4PP (Courdavault S. et al., 2005). Enfin, on retrouve l'isomère de valence Dewar qui résulte de la conversion après exposition aux UVA du noyau pyrimidone d'un 6-4PP (Mitchell D. L. et al., 1989).

Il est intéressant de noter que physiologiquement, les cellules sont capables de réparer ces dommages par le processus de « *nucleotide excision repair (NER)* » (réparation par excision de nucléotides). Ce mécanisme passe par l'excision sur le brin endommagé d'un segment de plusieurs nucléotides encadrant la lésion permettant ainsi la réparation de ces dommages dans un délai moyen de 24 heures (Sinha R. P. et al., 2002).

De plus, il ne faut pas oublier de mentionner que le taux de ces dommages est inversement proportionnel au phototype cutané qui est lui-même corrélé avec celui de développer un cancer cutané. S'ajoute à cela, la diminution du nombre de mélanocytes actifs de l'ordre de 10 à 20 % par décennie à partir de 25-30 ans, ainsi que la détérioration de leur morphologie avec une hétérogénéité dans leur taille et dans la distribution du pigment mélanique qui explique la pigmentation altérée et la formation de taches brunes, dites de vieillesse chez les personnes âgées (Cichorek M. et al., 2013). Le vieillissement *in vivo* des mélanocytes se manifeste par une diminution de leur capacité à proliférer et par une modification de leurs interactions avec les kératinocytes engendrant une diminution de la capacité de protection de la peau contre les UV (Cichorek M. et al., 2013). Par conséquent, l'absence de pigmentation cutanée d'un greffon reconstruit pourrait augmenter le risque de cancer cutané puisque les mélanocytes de l'hôte n'auront pas nécessairement la capacité de migrer et de le recoloniser.

Les études menées ici ont permis d'investiguer la faisabilité d'induire la pigmentation cutanée dans un modèle de bio-ingénierie tissulaire basé sur la méthode d'auto-assemblage. La photoprotection conférée par les pigments de mélanine, synthétisés par les mélanocytes provenant de biopsies cutanées de peaux de type caucasien et afro-américain, a été évaluée *in vitro* après irradiation sur un simulateur solaire et *in vivo* après greffe sur un modèle murin. Les résultats ont révélé que le modèle sans ajout de mélanocytes subissait le plus de dommages à l'ADN, lesquels étaient visualisés par la présence au niveau de l'épiderme et du derme de CPD et 6-4PP. L'ajout de mélanocytes a permis, quant à lui, de réduire le taux de CPD et 6-4PP et en moindre importance de valence Dewar *in vitro* suite à une exposition aiguë connue pour causer un érythème cutané. L'augmentation du nombre de pigments de mélanine immédiatement après ces expositions a validé la fonctionnalité des mélanocytes. D'autre part, nous avons corrélé l'effet photoprotecteur des mélanocytes, non pas par la quantité de pigment de mélanine ou leur densité de départ présent dans l'épiderme, mais par le type de pigment qui est directement dépendant du phototype cutané. Ainsi, les substituts de pigmentation Afro-Américaine présentaient moins de dommages à l'ADN que les substituts Caucasiens.

Cette étude nous a permis de déterminer que des densités comprises entre 200 et 1500 mélanocytes par mm² donnaient des résultats similaires sur la photoprotection et l'homogénéité de pigmentation à 14 et 21 jours de maturation en interface air-liquide. De plus, l'homogénéité de la coloration cutanée

après la greffe ainsi que la localisation physiologique des mélanocytes au niveau de la couche basale épidermique *in vitro* et *in vivo* viennent supporter notre hypothèse initiale.

Les perspectives d'études à court terme comprendront :

- l'évaluation de la persistance au long terme de la pigmentation par l'analyse de la présence de cellules souches mélanocytaires ;
- l'étude des interrelations des cellules souches épithéliales de kératinocytes et de mélanocytes, lesquelles partagent les mêmes sites anatomiques (renflement du follicule pileux et crête épidermique). Il a, en effet, été démontré chez la souris que ces deux types cellulaires pouvaient jouer un rôle de préservation mutuelle de leur état souche (Nishimura E. K., 2011) ;
- la caractérisation de l'impact des mélanocytes sur la genèse matricielle ;

Les perspectives d'études au plus long terme comprendront :

- l'étude de pathologies touchant la pigmentation, telle que le Vitiligo ;
- et enfin, la purification des cellules souches mélanocytaires en vue de leur utilisation pour induire une genèse du poil dans un modèle de substituts cutanés *in vitro*.

5.3. Propriétés mécaniques et impact sur la reconstruction tissulaire

Plusieurs chercheurs se sont intéressés à connaître le comportement mécanique des couches cutanées à des fins cliniques et cosmétiques. Les résultats sont toutefois encore dispersés, car il existe de nombreux facteurs qui peuvent modifier ses propriétés. L'ensemble de ces facteurs intrinsèques et extrinsèques engendre des modifications structurelles, fonctionnelles et morphologiques. La peau s'amincit avec l'âge en moyenne d'environ 6 % par décennie accompagnée d'un aplatissement de la jonction dermo-épidermique avec perte des papilles dermiques, ainsi qu'une diminution de la capacité proliférative des kératinocytes et des fibroblastes (Brinckmann J. et al., 1994; Lüllmann-Rauch Renate, 2006).

Avec le vieillissement, les kératinocytes de la couche basale épidermique vont présenter des altérations morphologiques avec une hétérogénéité de taille. Ils vont sécréter moins de cytokines et seront moins sensibles aux facteurs de croissance épidermique. Les couches supérieures, quant à elles, ne présenteront pas d'anomalies morphologiques évidentes, par contre leur propriété de barrière sera altérée en raison de la modification du profil lipidique avec l'âge (diminution et altération du ciment lipidique).

Au niveau du derme, de nombreuses modifications liées à l'âge sont visibles. La matrice extracellulaire apparaît compacte, fortement réticulée et moins bien vascularisée (Lüllmann-Rauch Renate, 2006). Plus spécifiquement :

- D'un point de vue matriciel, les fibrilles de collagène deviennent granuleuses et plus compactes dû à la perte en protéoglycannes. Elles se dissocient et tendent à s'orienter parallèlement à la surface du derme. S'ajoute l'augmentation de l'activité des métalloprotéinases (MMP)-1, -2 et -9, dont le niveau d'expression est quatre fois plus important dans la peau âgée que dans la peau jeune (Frances C. et al., 1990). L'altération des fibres élastiques débute biologiquement dès 25 ans par l'altération de l'activité de la lysyl oxydase associée à l'augmentation de l'activité des élastases qui les dégradent (Braverman I. M. et al., 1982; Frances C. et al., 1990). Toutefois, leurs altérations peuvent débuter bien plus précocement selon le mode de vie (traitements pharmacologiques ou cosmétiques et les expositions répétées et prolongées aux UV) et le phototype cutané des individus. De plus, la diminution des protéoglycannes et des glycosaminoglycannes, en particulier l'acide hyaluronique, ainsi que de la fibronectine induit une altération du processus de cicatrisation, ainsi qu'une sécheresse cutanée (Ashcroft G. S. et al., 1997; Meyer L. J. et al., 1994).
- D'un point de vue cellulaire, le nombre de fibroblastes diminue et ils perdent leur capacité de réponse à plusieurs facteurs de croissance, tels que l'Interleukine 1 et l'EGF. Inversement, leur sensibilité aux inhibiteurs de croissance tels que l'IFN- γ augmente, contribuant à la diminution du potentiel de cicatrisation des sujets âgés (Brinckmann J. et al., 1994; Kurban R. S. et al., 1990). Enfin, leur métabolisme diminue induisant la diminution de leur capacité à synthétiser de la matrice extracellulaire (Brinckmann J. et al., 1994).

Le vieillissement cellulaire a donc un impact important sur la bio-ingénierie tissulaire. Ainsi, l'approche « *Top-down* » dont les produits les plus souvent représentés sont obtenus suite à la décellularisation de peaux humaines cadavériques d'âges avancés a le désavantage de présenter des altérations matricielles. D'un autre côté, les matrices biologiques ou biosynthétiques, issues de cette même approche, ont, quant à elles, le désavantage de ne contenir qu'un nombre limité de protéines matricielles, le plus souvent du collagène de type I d'origine animale.

Seule l'approche de type « *Bottom-up* » permet à l'heure actuelle de recréer *in vitro* une matrice dermique dont les propriétés mécaniques, histologiques et biologiques, la composition en fibres de collagène, de protéoglycanes et de glycosaminoglycanes, sont similaires au tissu natif. Seul le réseau de fibres élastiques présente une déficience (faible voire absent). Ceci s'explique par l'effet de l'acide ascorbique qui est indispensable à la synthèse et l'assemblage des fibres de collagène, mais qui est un inhibiteur de l'élastogénèse. Afin d'induire la synthèse et l'assemblage physiologique de fibres élastiques par les fibroblastes, des molécules ont été ajoutées lors de la production pour activer ou amplifier l'élastogénèse tout en maintenant en parallèle l'acide ascorbique.

L'ajout de molécules agissant sur la voie de l'IGF-I a démontré lors des études menées leurs effets bénéfiques sur la genèse des fibres élastiques. Cet effet a été d'autant plus appréciable chez des fibroblastes extraits de peaux de nouveau-né que d'adulte. Les analyses mécaniques ont ensuite permis de confirmer la fonctionnalité de ce réseau. Toutefois, celui-ci a tendance à décroître avec le temps de culture *in vitro*, mimant l'effet du vieillissement *in vivo*, mais à des échelles plus petites de l'ordre du mois.

En plus d'avoir réussi à améliorer les propriétés mécaniques des substituts cutanés produits par la méthode d'auto-assemblage, l'impact positif de l'ajout des mélanocytes sur l'élastogénèse a été révélé. Leur simple ajout sans aucune induction de l'élastogénèse permet d'augmenter le nombre de fibres élastiques dans les substituts cutanés. Cet effet est d'autant plus visible lors de l'induction de la voie de l'IGF-I.

Les perspectives d'études à court terme comprendront :

- la caractérisation détaillée de la matrice extracellulaire obtenue après traitement (adlostérone + spironolactone) sur les modèles non pigmenté et pigmenté à différents temps de maturation par spectroscopie de masse ;
- l'analyse comparative du profilage génique des conditions précédemment évoquées.

Les perspectives à long terme comprendront :

- la détermination des facteurs *in vitro* contribuant à la perte d'effet des traitements par analyse du profil génique au cours du temps ;
- l'amélioration des paramètres de culture afin d'induire une maturation des fibres élastiques (augmentation de leurs calibres) et de leur préservation à long terme ;
- l'étude *in vitro* comparative de l'induction de l'élastogénèse en peaux reconstruites entre l'utilisation de fibroblastes provenant de biopsies de peaux de nouveau-nés et d'adultes (analyse comparative du profilage génique et de la caractérisation détaillée de la matrice extracellulaire).

5.4. Conclusions

Le travail présenté dans cette thèse apporte de nouvelles perspectives dans la reconstruction cutanée à visée clinique ou recherche. Le premier volet présenté en chapitre 2 et en annexe 1 concernant la survie des fibroblastes allogéniques dermiques et cornéens dans des conditions de greffe sans utilisation d'immunosuppresseurs répond à un doute scientifique depuis longtemps investigué. La tolérance de ces cellules par le système immunitaire permettra à l'avenir de réduire le temps de production en rendant biodisponibles des dermes reconstruits par la méthode d'auto-assemblage auxquels il suffira d'ajouter la composante épithéliale d'origine autologue pour finaliser le produit. Ce dernier pourra ainsi concurrencer les technologies issues de l'approche « *Top-down* », qui étaient jusqu'alors, plus rapides à produire.

Le second volet en chapitre 3 concernant la pigmentation a permis de déterminer la densité minimale de mélanocytes nécessaire afin d'induire une homogénéité de coloration cutanée et de photoprotection permettant ainsi de pouvoir complexifier le modèle 3D sans pour autant alourdir ou allonger le temps de production. De plus, le modèle d'étude possédant une matrice extracellulaire entièrement synthétisée et assemblée par les cellules dermiques a permis de mettre en évidence le rôle potentiel de ces cellules sur la genèse matricielle et, par conséquent, leurs influences sur les propriétés mécaniques de la peau.

Enfin et pas des moindres, les études sur le réseau de fibres élastiques du troisième volet présentées en chapitre 4 de cette thèse mettent en valeur le modèle produit par auto-assemblage et plus particulièrement sa versatilité. En effet, cette technique de production permet aisément d'ajouter des agents protéiques ou chimiques afin d'influencer les cellules pour induire une réponse qui, dans ce cas précis, correspondait à l'activation de l'élastogenèse qui était jusqu'alors défailante.

Ces présents travaux subdivisés en chapitres manuscrits publiés ou en cours de publication ne sont pas à prendre indépendamment, mais combinés afin d'apporter pour la clinique un modèle cutané pigmenté chimérique. D'autre part, la création d'un modèle possédant un réseau de fibres élastiques aura aussi bien un intérêt pour la recherche sur les diverses pathologies touchant le réseau de fibres élastiques, telles que le PXE (acronyme de la terminologie latine pour *Pseudoxanthoma elasticum*) que pour la recherche pharmacologique et cosmétique.

Bibliographie (Chapitres 1 et 5)

- Achauer BM, VanderKam VM, Celikoz B, Jacobson DG. Augmentation of facial soft-tissue defects with Alloderm dermal graft. *Ann Plast Surg.* 1998;41(5):503-7.
- Agache PG, Monneur C, Leveque JL, De Rigal J. Mechanical properties and Young's modulus of human skin in vivo. *Arch Dermatol Res.* 1980;269(3):221-32.
- Agar NS, Halliday GM, Barnetson RS, Ananthaswamy HN, Wheeler M, Jones AM. The basal layer in human squamous tumors harbors more UVA than UVB fingerprint mutations: a role for UVA in human skin carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(14):4954-9.
- Akhtar K, Broekelmann TJ, Miao M, Keeley FW, Starcher BC, Pierce RA, Mecham RP, Adair-Kirk TL. Oxidative and nitrosative modifications of tropoelastin prevent elastic fiber assembly in vitro. *J Biol Chem.* 2010;285(48):37396-404.
- Ashcroft GS, Horan MA, Ferguson MW. Aging is associated with reduced deposition of specific extracellular matrix components, an upregulation of angiogenesis, and an altered inflammatory response in a murine incisional wound healing model. *J Invest Dermatol.* 1997;108(4):430-7.
- Auger FA, Lopez Valle CA, Guignard R, Tremblay N, Noel B, Goulet F, Germain L. Skin equivalent produced with human collagen. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1995;31(6):432-9.
- Bell E, Ivarsson B, Merrill C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(3):1274-8.
- Bell E, Ehrlich HP, Sher S, Merrill C, Sarber R, Hull B, Nakatsuji T, Church D, Buttle DJ. Development and use of a living skin equivalent. *Plast Reconstr Surg.* 1981;67(3):386-92.
- Benathan M, Labidi-Ubaldi F. [Living epidermal and dermal substitutes for treatment of severely burned patients]. *Rev Med Suisse Romande.* 1998;118(2):149-53.
- Berg RA, Prockop DJ. Purification of (14C) procollagen and its hydroxylation by prolyl-hydroxylase. *Biochemistry.* 1973;12(18):3395-401.
- Berthod F, Hayek D, Damour O, Collombel C. Collagen synthesis by fibroblasts cultured within a collagen sponge. *Biomaterials.* 1993;14(10):749-54.
- Boyce S, Michel S, Reichert U, Shroot B, Schmidt R. Reconstructed skin from cultured human keratinocytes and fibroblasts on a collagen-glycosaminoglycan biopolymer substrate. *Skin Pharmacol.* 1990;3(2):136-43.
- Boyce ST, Christianson DJ, Hansbrough JF. Structure of a collagen-GAG dermal skin substitute optimized for cultured human epidermal keratinocytes. *J Biomed Mater Res.* 1988;22(10):939-57.
- Boyce ST, Medrano EE, Abdel-Malek Z, Supp AP, Dodick JM, Nordlund JJ, Warden GD. Pigmentation and inhibition of wound contraction by cultured skin substitutes with adult melanocytes after transplantation to athymic mice. *J Invest Dermatol.* 1993;100(4):360-5.
- Braverman IM, Fonferko E. Studies in cutaneous aging: I. The elastic fiber network. *J Invest Dermatol.* 1982;78(5):434-43.
- Braye FM, Stefani A, Venet E, Pieptu D, Tissot E, Damour O. Grafting of large pieces of human reconstructed skin in a porcine model. *Br J Plast Surg.* 2001;54(6):532-8.
- Breuing KH, Warren SM. Immediate bilateral breast reconstruction with implants and inferolateral AlloDerm slings. *Ann Plast Surg.* 2005;55(3):232-9.

- Brinckmann J, Bodo M, Brey M, Wolff HH, Muller PK. Analysis of the age-related composition of human skin collagen and collagens synthesized by fibroblast culture. *Arch Dermatol Res.* 1994;286(7):391-5.
- Brito FC, Kos L. Timeline and distribution of melanocyte precursors in the mouse heart. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2008;21(4):464-70.
- Browne S, Zeugolis DI, Pandit A. Collagen: Finding a Solution for the Source. *Tissue engineering Part A.* 2013;19(13-14):1491-4.
- Bryant RAN, D. P. . *Acute & Chronic Wounds: Current Management Concepts.* 4th Edition ed2012.
- Buinewicz B, Rosen B. Acellular cadaveric dermis (AlloDerm): a new alternative for abdominal hernia repair. *Ann Plast Surg.* 2004;52(2):188-94.
- Bunda S, Liu P, Wang Y, Liu K, Hinek A. Aldosterone induces elastin production in cardiac fibroblasts through activation of insulin-like growth factor-I receptors in a mineralocorticoid receptor-independent manner. *Am J Pathol.* 2007;171(3):809-19.
- Burchill SA, Marks JM, Thody AJ. Tyrosinase synthesis in different skin types and the effects of alpha-melanocyte-stimulating hormone and cyclic AMP. *J Invest Dermatol.* 1990;95(5):558-61.
- Burke JF, Yannas IV, Quinby WC, Jr., Bondoc CC, Jung WK. Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Ann Surg.* 1981;194(4):413-28.
- Cadet J, Sage E, Douki T. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutat Res.* 2005;571(1-2):3-17.
- Cai J, Terasaki PI. Humoral theory of transplantation: mechanism, prevention, and treatment. *Hum Immunol.* 2005;66(4):334-42.
- Cai J, Terasaki PI. Human leukocyte antigen antibodies for monitoring transplant patients. *Surg Today.* 2005;35(8):605-12.
- Capito AE, Tholpady SS, Agrawal H, Drake DB, Katz AJ. Evaluation of host tissue integration, revascularization, and cellular infiltration within various dermal substrates. *Ann Plast Surg.* 2012;68(5):495-500.
- Caravaggi C, De Giglio R, Pritelli C, Sommaria M, Dalla Noce S, Faglia E, Mantero M, Clerici G, Fratino P, Dalla Paola L, Mariani G, Mingardi R, Morabito A. HYAFF 11-based autologous dermal and epidermal grafts in the treatment of noninfected diabetic plantar and dorsal foot ulcers: a prospective, multicenter, controlled, randomized clinical trial. *Diabetes Care.* 2003;26(10):2853-9.
- Cardinale GJ, Udenfriend S. Prolyl hydroxylase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1974;41(0):245-300.
- Carruthers CA, Dearth CL, Reing JE, Kramer CR, Gagne DH, Crapo PM, Garcia O, Jr., Badhwar A, Scott JR, Badyak SF. Histologic characterization of acellular dermal matrices in a porcine model of tissue expander breast reconstruction. *Tissue engineering Part A.* 2015;21(1-2):35-44.
- Celli S, Albert ML, Bouso P. Visualizing the innate and adaptive immune responses underlying allograft rejection by two-photon microscopy. *Nat Med.* 2011;17(6):744-9.
- Chatterjee IB. Ascorbic acid metabolism. *World Rev Nutr Diet.* 1978;30:69-87.
- Chauviere MV, Schutter RJ, Steigelman MB, Clark BZ, Grayson JK, Sahar DE. Comparison of AlloDerm and AlloMax tissue incorporation in rats. *Ann Plast Surg.* 2014;73(3):282-5.
- Chua CKaY, W.Y. *Bioprinting: Principles and Applications*2015.
- Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tyminska A. Skin melanocytes: biology and development. *Postepy Dermatol Alergol.* 2013;30(1):30-41.

Clemons JL, Myers DL, Aguilar VC, Arya LA. Vaginal paravaginal repair with an AlloDerm graft. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;189(6):1612-8; discussion 8-9.

Cooper ML, Hansbrough JF. Use of a composite skin graft composed of cultured human keratinocytes and fibroblasts and a collagen-GAG matrix to cover full-thickness wounds on athymic mice. *Surgery.* 1991;109(2):198-207.

Cooper ML, Hansbrough JF, Spielvogel RL, Cohen R, Bartel RL, Naughton G. In vivo optimization of a living dermal substitute employing cultured human fibroblasts on a biodegradable polyglycolic acid or polyglactin mesh. *Biomaterials.* 1991;12(2):243-8.

Cornwell KG, Landsman A, James KS. Extracellular matrix biomaterials for soft tissue repair. *Clin Podiatr Med Surg.* 2009;26(4):507-23.

Corporation IL. PriMatrix 2016 [Available from: <http://www.primatrix.com/products/by-brand/>].

Coulomb B, Dubertret L, Bell E, Merrill C, Fosse M, Breton-Gorius J, Prost C, Touraine R. Endogenous peroxidases in normal human dermis: a marker of fibroblast differentiation. *J Invest Dermatol.* 1983;81(1):75-8.

Courdavault S, Baudouin C, Charveron M, Canguilhem B, Favier A, Cadet J, Douki T. Repair of the three main types of bipyrimidine DNA photoproducts in human keratinocytes exposed to UVB and UVA radiations. *DNA Repair (Amst).* 2005;4(7):836-44.

Crowson AN. Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications. *Mod Pathol.* 2006;19 Suppl 2:S127-47.

Cummins DL, Cummins JM, Pantle H, Silverman MA, Leonard AL, Chanmugam A. Cutaneous malignant melanoma. *Mayo Clin Proc.* 2006;81(4):500-7.

Damour O, Gueugniaud PY, Berthin-Maghit M, Rousselle P, Berthod F, Sahuc F, Collombel C. A dermal substrate made of collagen--GAG--chitosan for deep burn coverage: first clinical uses. *Clin Mater.* 1994;15(4):273-6.

Dantzer E, Queruel P, Salinier L, Palmier B, Quinot JF. Dermal regeneration template for deep hand burns: clinical utility for both early grafting and reconstructive surgery. *Br J Plast Surg.* 2003;56(8):764-74.

Davidson JM, LuValle PA, Zoia O, Quaglino D, Jr., Giro M. Ascorbate differentially regulates elastin and collagen biosynthesis in vascular smooth muscle cells and skin fibroblasts by pretranslational mechanisms. *J Biol Chem.* 1997;272(1):345-52.

Dean DM, Napolitano AP, Youssef J, Morgan JR. Rods, tori, and honeycombs: the directed self-assembly of microtissues with prescribed microscale geometries. *FASEB J.* 2007;21(14):4005-12.

Delalleau A, Josse G, Lagarde JM, Zahouani H, Bergheau JM. Characterization of the mechanical properties of skin by inverse analysis combined with the indentation test. *J Biomech.* 2006;39(9):1603-10.

Diridollou S, Patat F, Gens F, Vaillant L, Black D, Lagarde JM, Gall Y, Berson M. In vivo model of the mechanical properties of the human skin under suction. *Skin Res Technol.* 2000;6(4):214-21.

Druecke D, Lamme EN, Hermann S, Pieper J, May PS, Steinau HU, Steinstraesser L. Modulation of scar tissue formation using different dermal regeneration templates in the treatment of experimental full-thickness wounds. *Wound Repair Regen.* 2004;12(5):518-27.

Du Y, Lo E, Ali S, Khademhosseini A. Directed assembly of cell-laden microgels for fabrication of 3D tissue constructs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(28):9522-7.

Eisenberg M, Llewelyn D. Surgical management of hands in children with recessive dystrophic epidermolysis bullosa: use of allogeneic composite cultured skin grafts. *Br J Plast Surg.* 1998;51(8):608-13.

EnColl. Helicoll™. 2013.

Ernfors P. Cellular origin and developmental mechanisms during the formation of skin melanocytes. *Exp Cell Res.* 2010;316(8):1397-407.

Erol OO. Alloderm used in rhinoplasty. *Plast Reconstr Surg.* 2001;108(6):1827-8.

Escamez MJ, Garcia M, Larcher F, Meana A, Munoz E, Jorcano JL, Del Rio M. An in vivo model of wound healing in genetically modified skin-humanized mice. *J Invest Dermatol.* 2004;123(6):1182-91.

Ethicon US L. FlexHD® STRUCTURAL Acellular Hydrated Dermis 2010 [Available from: <http://www.ethicon.com/healthcare-professionals/products/hernia-repair-and-fixation/hernia-mesh-biologic-mesh/flexhd-structural-acellular-hydrated-dermis#!overview>].

EUR-Lex. Produits cosmétiques (jusqu'en 2013) 2011 [Available from: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=URISERV:l21191#AMENDINGACT>].

Eyre DR. Collagen: molecular diversity in the body's protein scaffold. *Science.* 1980;207(4437):1315-22.

Fabre JW, Cullen PR. Rejection of cultured keratinocyte allografts in the rat. Clinical implications and a possible clue to the enigma of skin graft rejection. *Transplantation.* 1989;48(2):306-15.

Faulkner-Jones A, Greenhough S, King JA, Gardner J, Courtney A, Shu W. Development of a valve-based cell printer for the formation of human embryonic stem cell spheroid aggregates. *Biofabrication.* 2013;5(1):015013.

Finlay B. Dynamic mechanical testing of human skin 'in vivo'. *J Biomech.* 1970;3(6):557-68.

Fitzpatrick TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol.* 1988;124(6):869-71.

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003;4(4):330-6.

Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity.* 2005;22(3):329-41.

Frances C, Branchet MC, Boisnic S, Lesty CL, Robert L. Elastic fibers in normal human skin. Variations with age: a morphometric analysis. *Arch Gerontol Geriatr.* 1990;10(1):57-67.

Freedlander E. New forms of skin grafting: from the laboratory to the clinic. *Hosp Med.* 1998;59(6):484-7.

Fung Y-C. *Biomechanics : Mechanical Properties of Living Tissues.* Second edition ed: Springer New York; 1993. 568 p.

Gallico GG, 3rd, O'Connor NE, Compton CC, Kehinde O, Green H. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N Engl J Med.* 1984;311(7):448-51.

Gerding RL, Imbembo AL, Fratianne RB. Biosynthetic skin substitute vs. 1% silver sulfadiazine for treatment of inpatient partial-thickness thermal burns. *The Journal of trauma.* 1988;28(8):1265-9.

Gibson T, Stark H, Evans JH. Directional variation in extensibility of human skin in vivo. *J Biomech.* 1969;2(2):201-4.

GmbH CBV. epiCS-M / Human Epidermis Equivalent with Melanocytes 2016 [Available from: <http://cellsystems.de/category/epics-m-human-epidermis-equivalent-with-melanocytes>].

GmbH CBV. Human Epidermis Equivalent epiCS (EST1000) 2016 [Available from: <http://cellsystems.de/category/human-epidermis-equivalent-epics-est1000-1>].

Gniadecka M, Gniadecki R, Serup J, Sondergaard J. Skin mechanical properties present adaptation to man's upright position. In vivo studies of young and aged individuals. *Acta Derm Venereol.* 1994;74(3):188-90.

Grahame R, Holt PJ. The influence of ageing on the in vivo elasticity of human skin. *Gerontologia.* 1969;15(2):121-39.

- Green H, Kehinde O, Thomas J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(11):5665-8.
- Guillotin B, Guillemot F. Cell patterning technologies for organotypic tissue fabrication. *Trends Biotechnol*. 2011;29(4):183-90.
- Halaban R, Moellmann G. Murine and human b locus pigmentation genes encode a glycoprotein (gp75) with catalase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(12):4809-13.
- Halaban R, Rubin JS, Funasaka Y, Cobb M, Boulton T, Faletto D, Rosen E, Chan A, Yoko K, White W, et al. Met and hepatocyte growth factor/scatter factor signal transduction in normal melanocytes and melanoma cells. *Oncogene*. 1992;7(11):2195-206.
- Hall PA, Watt FM. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development*. 1989;106(4):619-33.
- Hansbrough JF, Boyce ST, Cooper ML, Foreman TJ. Burn wound closure with cultured autologous keratinocytes and fibroblasts attached to a collagen-glycosaminoglycan substrate. *JAMA*. 1989;262(15):2125-30.
- Hansbrough JF, Dore C, Hansbrough WB. Clinical trials of a living dermal tissue replacement placed beneath meshed, split-thickness skin grafts on excised burn wounds. *J Burn Care Rehabil*. 1992;13(5):519-29.
- Hansbrough JF, Morgan J, Greenleaf G, Parikh M, Nolte C, Wilkins L. Evaluation of Graftskin composite grafts on full-thickness wounds on athymic mice. *J Burn Care Rehabil*. 1994;15(4):346-53.
- Hansen SL, Voigt DW, Wiebelhaus P, Paul CN. Using skin replacement products to treat burns and wounds. *Advances in skin & wound care*. 2001;14(1):37-44; quiz 5-6.
- Harriger MD, Warden GD, Greenhalgh DG, Kagan RJ, Boyce ST. Pigmentation and microanatomy of skin regenerated from composite grafts of cultured cells and biopolymers applied to full-thickness burn wounds. *Transplantation*. 1995;59(5):702-7.
- Hayry P, Isoniemi H, Yilmaz S, Mennander A, Lemstrom K, Raisanen-Sokolowski A, Koskinen P, Ustinov J, Lautenschlager I, Taskinen E, et al. Chronic allograft rejection. *Immunol Rev*. 1993;134:33-81.
- Health. L. Plastic & Reconstructive Surgical Specialties (PRSS) 2016 [Available from: <https://www.lifenethealth.org/skin-and-wound-allograft-institute>].
- Hedley SJ, Gawkrödger DJ, Weetman AP, Morandini R, Boeynaems JM, Ghanem G, Neil SM. alpha-Melanocyte stimulating hormone inhibits tumour necrosis factor-alpha stimulated intercellular adhesion molecule-1 expression in normal cutaneous human melanocytes and in melanoma cell lines. *Br J Dermatol*. 1998;138(3):536-43.
- Heimbach D, Luterman A, Burke J, Cram A, Herndon D, Hunt J, Jordan M, McManus W, Solem L, Warden G, et al. Artificial dermis for major burns. A multi-center randomized clinical trial. *Ann Surg*. 1988;208(3):313-20.
- Hendriks FM, Brokken D, van Eemeren JT, Oomens CW, Baaijens FP, Horsten JB. A numerical-experimental method to characterize the non-linear mechanical behaviour of human skin. *Skin Res Technol*. 2003;9(3):274-83.
- Hinderer S, Shena N, Ringuette LJ, Hansmann J, Reinhardt DP, Brucker SY, Davis EC, Schenke-Layland K. In vitro elastogenesis: instructing human vascular smooth muscle cells to generate an elastic fiber-containing extracellular matrix scaffold. *Biomed Mater*. 2015;10(3):034102.
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003;299(5609):1057-61.
- Hunt G, Kyne S, Ito S, Wakamatsu K, Todd C, Thody A. Eumelanin and pheomelanin contents of human epidermis and cultured melanocytes. *Pigment Cell Res*. 1995;8(4):202-8.

Hunt G, Kyne S, Wakamatsu K, Ito S, Thody AJ. α -melanocyte-stimulating hormone increases the eumelanin:phaeomelanin ratio in cultured human melanocytes. *J Invest Dermatol.* 1995;104(1):83-5.

Idrus RB, Rameli MA, Low KC, Law JX, Chua KH, Latiff MB, Saim AB. Full-thickness skin wound healing using autologous keratinocytes and dermal fibroblasts with fibrin: bilayered versus single-layered substitute. *Advances in skin & wound care.* 2014;27(4):171-80.

Incorporated TRWC. DermaPure 2017 [Available from: <https://www.tissueregenixus.com/products/wound-care/dermapure#dermapure-overview>].

Iyengar B, Misra RS, Subalakshmi. ACTH acts directly on melanocytes to stimulate melanogenesis--an in vitro study. *Indian J Pathol Microbiol.* 1995;38(4):399-402.

Jimenez S, Harsch M, Rosenbloom J. Hydroxyproline stabilizes the triple helix of chick tendon collagen. *Biochem Biophys Res Commun.* 1973;52(1):106-14.

Kamolz LP, Kitzinger HB, Karle B, Frey M. The treatment of hand burns. *Burns.* 2009;35(3):327-37.

Karasek MA, Charlton ME. Growth of postembryonic skin epithelial cells on collagen gels. *J Invest Dermatol.* 1971;56(3):205-10.

KCI. STRATTICE™ Reconstructive Tissue Matrix 2016 [Available from: <http://www.acelity.com/products/strattice-reconstructive-tissue-matrix>].

Kirsner RS. The use of Apligraf in acute wounds. *J Dermatol.* 1998;25(12):805-11.

Kligman LH. Photoaging. Manifestations, prevention, and treatment. *Clin Geriatr Med.* 1989;5(1):235-51.

Klintmalm GB, Gonwa TA. Nephrotoxicity associated with cyclosporine and FK506. *Liver Transpl Surg.* 1995;1(5 Suppl 1):11-9.

Koch L, Deiwick A, Schlie S, Michael S, Gruene M, Coger V, Zychlinski D, Schambach A, Reimers K, Vogt PM, Chichkov B. Skin tissue generation by laser cell printing. *Biotechnology and Bioengineering.* 2012;109(7):1855-63.

Kremer M, Lang E, Berger A. Organotypical engineering of differentiated composite-skin equivalents of human keratinocytes in a collagen-GAG matrix (INTEGRA Artificial Skin) in a perfusion culture system. *Langenbecks Arch Surg.* 2001;386(5):357-63.

Kuluncsics Z, Perdiz D, Brulay E, Muel B, Sage E. Wavelength dependence of ultraviolet-induced DNA damage distribution: involvement of direct or indirect mechanisms and possible artefacts. *J Photochem Photobiol B.* 1999;49(1):71-80.

Kurban RS, Bhawan J. Histologic changes in skin associated with aging. *J Dermatol Surg Oncol.* 1990;16(10):908-14.

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

L'Heureux N, Dusserre N, Konig G, Victor B, Keire P, Wight TN, Chronos NA, Kyles AE, Gregory CR, Hoyt G, Robbins RC, McAllister TN. Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization. *Nat Med.* 2006;12(3):361-5.

L'Heureux N, McAllister TN, de la Fuente LM. Tissue-engineered blood vessel for adult arterial revascularization. *N Engl J Med.* 2007;357(14):1451-3.

Landsman AS, Cook J, Cook E, Landsman AR, Garrett P, Yoon J, Kirkwood A, Desman E. A retrospective clinical study of 188 consecutive patients to examine the effectiveness of a biologically active cryopreserved human skin allograft (TheraSkin(R)) on the treatment of diabetic foot ulcers and venous leg ulcers. *Foot & ankle specialist.* 2011;4(1):29-41.

Langer K. On the anatomy and physiology of the skin. *British Journal of Plastic Surgery*. 1861;31(1):3-8.

Lavoie A, Fugere C, Beauparlant A, Goyer B, Larouche D, Paquet C, Desgagne M, Sauve S, Robitaille H, Dunnwald M, Kim DH, Pouliot R, Fradette J, Germain L. Human epithelial stem cells persist within tissue-engineered skin produced by the self-assembly approach. *Tissue engineering Part A*. 2013;19(7-8):1023-38.

Lee S, Kim H, Won D-J, Lee J, Kim J. On-demand, parallel droplet merging method with non-contact droplet pairing in droplet-based microfluidics. *Microfluidics and Nanofluidics*. 2016;20(1):1.

Lee V, Singh G, Trasatti JP, Bjornsson C, Xu X, Tran TN, Yoo S-S, Dai G, Karande P. Design and Fabrication of Human Skin by Three-Dimensional Bioprinting. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2013;20(6):473-84.

Lee W, Debasitis JC, Lee VK, Lee J-H, Fischer K, Edminster K, Park J-K, Yoo S-S. Multi-layered culture of human skin fibroblasts and keratinocytes through three-dimensional freeform fabrication. *Biomaterials*. 2009;30(8):1587-95.

Leveque JL, de Rigal J, Agache PG, Monneur C. Influence of ageing on the in vivo extensibility of human skin at a low stress. *Arch Dermatol Res*. 1980;269(2):127-35.

Leveque JL, Corcuff P, de Rigal J, Agache P. In vivo studies of the evolution of physical properties of the human skin with age. *Int J Dermatol*. 1984;23(5):322-9.

Leveque JL, Audoly B. Influence of Stratum Corneum on the entire skin mechanical properties, as predicted by a computational skin model. *Skin Res Technol*. 2013;19(1):42-6.

Leyva-Mendivil MF, Page A, Bressloff NW, Limbert G. A mechanistic insight into the mechanical role of the stratum corneum during stretching and compression of the skin. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2015;49:197-219.

LifeSciences I. SurgiMend® 2016 [Available from: <http://www.surgimend.com/products/by-brand/surgimend/>].

Lim F, Sun AM. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science*. 1980;210(4472):908-10.

Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature*. 2007;445(7130):843-50.

Long JL, Tranquillo RT. Elastic fiber production in cardiovascular tissue-equivalents. *Matrix Biol*. 2003;22(4):339-50.

Lüllmann-Rauch R. *Histologie*. 2nd Edition ed: De Boeck; 2006. 637 Pages p.

Malda J, Visser J, Melchels FP, Jungst T, Hennink WE, Dhert WJ, Groll J, Hutmacher DW. 25th anniversary article: Engineering hydrogels for biofabrication. *Adv Mater*. 2013;25(36):5011-28.

Mandal A. Paediatric partial-thickness scald burns--is Biobrane the best treatment available? *International wound journal*. 2007;4(1):15-9.

Mansbridge J, Liu K, Patch R, Symons K, Pinney E. Three-dimensional fibroblast culture implant for the treatment of diabetic foot ulcers: metabolic activity and therapeutic range. *Tissue Eng*. 1998;4(4):403-14.

Marieb E. *Anatomie et physiologie humaines 5ed*2015.

Marks R, Finke J. *Biologics in the prevention and treatment of graft rejection*. Springer Semin Immunopathol. 2006;27(4):457-76.

MatTek. EpiDermFT™ 2016 [Available from: <https://www.mattek.com/products/epidermft/>].

MatTek. EpiDerm™ 2016 [Available from: <https://www.mattek.com/products/epiderm/>].

MatTek. MelanoDerm™ 2016 [Available from: <https://www.mattek.com/products/melanoderm/>].

McCauley J. The nephrotoxicity of FK506 as compared with cyclosporine. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1993;2(4):662-9.

- McGuigan AP, Leung B, Sefton MV. Fabrication of cell-containing gel modules to assemble modular tissue-engineered constructs [corrected]. *Nat Protoc.* 2006;1(6):2963-9.
- McGuigan AP, Sefton MV. Vascularized organoid engineered by modular assembly enables blood perfusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(31):11461-6.
- McGuigan AP, Sefton MV. Design and fabrication of sub-mm-sized modules containing encapsulated cells for modular tissue engineering. *Tissue Eng.* 2007;13(5):1069-78.
- McGuigan AP, Sefton MV. The thrombogenicity of human umbilical vein endothelial cell seeded collagen modules. *Biomaterials.* 2008;29(16):2453-63.
- Medtronic. Permacol™ Surgical Implant 2016 [Available from: <http://www.medtronic.com/covidien/products/hernia-repair/permacol-surgical-implant>].
- Meyer LJ, Stern R. Age-dependent changes of hyaluronan in human skin. *J Invest Dermatol.* 1994;102(3):385-9.
- Michael S, Sorg H, Peck C-T, Koch L, Deiwick A, Chichkov B, Vogt PM, Reimers K. Tissue Engineered Skin Substitutes Created by Laser-Assisted Bioprinting Form Skin-Like Structures in the Dorsal Skin Fold Chamber in Mice. *PLOS ONE.* 2013;8(3):e57741.
- Michel M, Torok N, Godbout MJ, Lussier M, Gaudreau P, Royal A, Germain L. Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage. *J Cell Sci.* 1996;109 (Pt 5):1017-28.
- Michel M, L'Heureux N, Pouliot R, Xu W, Auger FA, Germain L. Characterization of a new tissue-engineered human skin equivalent with hair. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1999;35(6):318-26.
- Mironov V, Boland T, Trusk T, Forgacs G, Markwald RR. Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 2003;21(4):157-61.
- Mitchell DL, Nairn RS. The biology of the (6-4) photoproduct. *Photochem Photobiol.* 1989;49(6):805-19.
- Mitts TF, Bunda S, Wang Y, Hinek A. Aldosterone and mineralocorticoid receptor antagonists modulate elastin and collagen deposition in human skin. *J Invest Dermatol.* 2010;130(10):2396-406.
- Moon S, Hasan SK, Song YS, Xu F, Keles HO, Manzur F, Mikkilineni S, Hong JW, Nagatomi J, Haeggstrom E, Khademhosseini A, Demirci U. Layer by layer three-dimensional tissue epitaxy by cell-laden hydrogel droplets. *Tissue Eng Part C Methods.* 2010;16(1):157-66.
- Murphy K. *Janeway's Immunobiology.* 8th ed: Garland Science; 2011.
- Murphy SV, Skardal A, Atala A. Evaluation of hydrogels for bio-printing applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 2013;101A(1):272-84.
- Murphy SV, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol.* 2014;32(8):773-85.
- Murray JC, Stingl G, Kleinman HK, Martin GR, Katz SI. Epidermal cells adhere preferentially to type IV (basement membrane) collagen. *J Cell Biol.* 1979;80(1):197-202.
- Myers SR, Partha VN, Soranzo C, Price RD, Navsaria HA. Hyalomatrix: a temporary epidermal barrier, hyaluronan delivery, and neodermis induction system for keratinocyte stem cell therapy. *Tissue Eng.* 2007;13(11):2733-41.
- Nakamura M, Iwanaga S, Henmi C, Arai K, Nishiyama Y. Biomatrices and biomaterials for future developments of bioprinting and biofabrication. *Biofabrication.* 2010;2(1):014110.
- Naughton GK, Mansbridge JN. Human-based tissue-engineered implants for plastic and reconstructive surgery. *Clin Plast Surg.* 1999;26(4):579-86, viii.

Nelson CM, Bissell MJ. Modeling dynamic reciprocity: engineering three-dimensional culture models of breast architecture, function, and neoplastic transformation. *Semin Cancer Biol.* 2005;15(5):342-52.

Ng WL, Yeong WY, Naing MW. Polyelectrolyte gelatin-chitosan hydrogel optimized for 3D bioprinting in skin tissue engineering. 2016. 2016;2(1).

Nishimura EK. Melanocyte stem cells: a melanocyte reservoir in hair follicles for hair and skin pigmentation. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011;24(3):401-10.

O'Rahilly R, Muller F. The development of the neural crest in the human. *J Anat.* 2007;211(3):335-51.

Odde DJ, Renn MJ. Laser-guided direct writing of living cells. *Biotechnol Bioeng.* 2000;67(3):312-8.

Opitz F, Schenke-Layland K, Cohnert TU, Starcher B, Halbhuber KJ, Martin DP, Stock UA. Tissue engineering of aortic tissue: dire consequence of suboptimal elastic fiber synthesis in vivo. *Cardiovasc Res.* 2004;63(4):719-30.

Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, Netoff TI, Taylor DA. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med.* 2008;14(2):213-21.

Parrish JA, Jaenicke KF, Anderson RR. Erythema and melanogenesis action spectra of normal human skin. *Photochem Photobiol.* 1982;36(2):187-91.

Peak MJ, Peak JG, Carnes BA. Induction of direct and indirect single-strand breaks in human cell DNA by far- and near-ultraviolet radiations: action spectrum and mechanisms. *Photochem Photobiol.* 1987;45(3):381-7.

Perdiz D, Grof P, Mezzina M, Nikaido O, Moustacchi E, Sage E. Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells. Possible role of Dewar photoproducts in solar mutagenesis. *J Biol Chem.* 2000;275(35):26732-42.

Pfeifer GP, Drouin R, Riggs AD, Holmquist GP. In vivo mapping of a DNA adduct at nucleotide resolution: detection of pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts by ligation-mediated polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(4):1374-8.

Pieper JS, Hafmans T, Veerkamp JH, van Kuppevelt TH. Development of tailor-made collagen-glycosaminoglycan matrices: EDC/NHS crosslinking, and ultrastructural aspects. *Biomaterials.* 2000;21(6):581-93.

Plonka PM, Passeron T, Brenner M, Tobin DJ, Shibahara S, Thomas A, Slominski A, Kadakara AL, Hershkovitz D, Peters E, Nordlund JJ, Abdel-Malek Z, Takeda K, Paus R, Ortonne JP, Hearing VJ, Schallreuter KU. What are melanocytes really doing all day long...? *Exp Dermatol.* 2009;18(9):799-819.

Pomahac B, Svensjo T, Yao F, Brown H, Eriksson E. Tissue engineering of skin. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998;9(3):333-44.

Potten CS, Morris RJ. Epithelial stem cells in vivo. *J Cell Sci Suppl.* 1988;10:45-62.

Pouliot R, Larouche D, Auger FA, Juhasz J, Xu W, Li H, Germain L. Reconstructed human skin produced in vitro and grafted on athymic mice. *Transplantation.* 2002;73(11):1751-7.

Price RD, Berry MG, Navsaria HA. Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2007;60(10):1110-9.

Proulx S, Fradette J, Gauvin R, Larouche D, Germain L. Stem cells of the skin and cornea: their clinical applications in regenerative medicine. *Curr Opin Organ Transplant.* 2011;16(1):83-9.

Prunieras M, Regnier M, Woodley D. Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. *J Invest Dermatol.* 1983;81(1 Suppl):28s-33s.

Rabbani P, Takeo M, Chou W, Myung P, Bosenberg M, Chin L, Taketo MM, Ito M. Coordinated activation of Wnt in epithelial and melanocyte stem cells initiates pigmented hair regeneration. *Cell.* 2011;145(6):941-55.

- Reagan BJ, Madden MR, Huo J, Mathwich M, Staiano-Coico L. Analysis of cellular and decellular allogeneic dermal grafts for the treatment of full-thickness wounds in a porcine model. *J Trauma*. 1997;43(3):458-66.
- Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*. 1975;6(3):331-43.
- Rheinwald JG, Green H. Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. *Nature*. 1977;265(5593):421-4.
- Richard A. Goldsby TJK, Barbara A. Osborne, Janis Immunology Kuby Kuby Immunology. 4th edition ed: W H Freeman & Co (Sd); 2000.
- Rosenbloom J, Harsch M, Jimenez S. Hydroxyproline content determines the denaturation temperature of chick tendon collagen. *Arch Biochem Biophys*. 1973;158(2):478-84.
- Sage E. Distribution and repair of photolesions in DNA: genetic consequences and the role of sequence context. *Photochem Photobiol*. 1993;57(1):163-74.
- Saintigny G, Bonnard M, Damour O, Collombel C. Reconstruction of epidermis on a chitosan cross-linked collagen-GAG lattice: effect of fibroblasts. *Acta Derm Venereol*. 1993;73(3):175-80.
- Sarber R, Hull B, Merrill C, Soranno T, Bell E. Regulation of proliferation of fibroblasts of low and high population doubling levels grown in collagen lattices. *Mech Ageing Dev*. 1981;17(2):107-17.
- Schauer E, Trautinger F, Kock A, Schwarz A, Bhardwaj R, Simon M, Ansel JC, Schwarz T, Luger TA. Proopiomelanocortin-derived peptides are synthesized and released by human keratinocytes. *J Clin Invest*. 1994;93(5):2258-62.
- Schneider J, Biedermann T, Widmer D, Montano I, Meuli M, Reichmann E, Schiestl C. Matriderm versus Integra: a comparative experimental study. *Burns*. 2009;35(1):51-7.
- Schurr MJ, Foster KN, Centanni JM, Comer AR, Wicks A, Gibson AL, Thomas-Virnig CL, Schlosser SJ, Faucher LD, Lokuta MA, Allen-Hoffmann BL. Phase I/II clinical evaluation of StrataGraft: a consistent, pathogen-free human skin substitute. *The Journal of trauma*. 2009;66(3):866-73; discussion 73-4.
- Scuderi N, Anniboletti T, Carlesimo B, Onesti MG. Clinical application of autologous three-cellular cultured skin substitutes based on esterified hyaluronic acid scaffold: our experience. *In Vivo*. 2009;23(6):991-1003.
- Shahabeddin L, Berthod F, Damour O, Collombel C. Characterization of skin reconstructed on a chitosan-cross-linked collagen-glycosaminoglycan matrix. *Skin Pharmacol*. 1990;3(2):107-14.
- Shoulders MD, Raines RT. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem*. 2009;78:929-58.
- Silver FH, Kato YP, Ohno M, Wasserman AJ. Analysis of mammalian connective tissue: relationship between hierarchical structures and mechanical properties. *J Long Term Eff Med Implants*. 1992;2(2-3):165-98.
- Silver FH, Freeman JW, DeVore D. Viscoelastic properties of human skin and processed dermis. *Skin Res Technol*. 2001;7(1):18-23.
- Sing SL, An J, Yeong WY, Wiria FE. Laser and electron-beam powder-bed additive manufacturing of metallic implants: A review on processes, materials and designs. *Journal of Orthopaedic Research*. 2016;34(3):369-85.
- Sing SL, Yeong WY, Wiria FE. Selective laser melting of titanium alloy with 50 wt% tantalum: Microstructure and mechanical properties. *Journal of Alloys and Compounds*. 2016;660:461-70.
- Sing SL, Yeong WY, Wiria FE, Tay BY. Characterization of Titanium Lattice Structures Fabricated by Selective Laser Melting Using an Adapted Compressive Test Method. *Experimental Mechanics*. 2016;56(5):735-48.
- Sinha RP, Hader DP. UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem Photobiol Sci*. 2002;1(4):225-36.

Sinha UK, Shih C, Chang K, Rice DH. Use of AlloDerm for coverage of radial forearm free flap donor site. *Laryngoscope*. 2002;112(2):230-4.

Skardal A, Atala A. Biomaterials for integration with 3-D bioprinting. *Annals of biomedical engineering*. 2015;43(3):730-46.

SkinEthic. RHE / Human Epidermis / Applications 2016 [Available from: <http://www.episkin.com/pageLibre000101b5.asp>].

SkinEthic. RHPE (Reconstructed Human Pigmented Epidermis) 2016 [Available from: <http://www.episkin.com/RHPE.asp>].

SkinEthic. Models / EPISKIN / Applications 2016 [Available from: <http://www.episkin.com/pageLibre000100c5.asp>].

Smalley KS, Lioni M, Herlyn M. Life isn't flat: taking cancer biology to the next dimension. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2006;42(8-9):242-7.

Smith & Nephew I. OASIS® Wound Matrix 2015 [Available from: <http://www.oasiswoundmatrix.com/aboutowm>].

Stark HL. Directional variations in the extensibility of human skin. *Br J Plast Surg*. 1977;30(2):105-14.

Still J, Glat P, Silverstein P, Griswold J, Mozingo D. The use of a collagen sponge/living cell composite material to treat donor sites in burn patients. *Burns*. 2003;29(8):837-41.

Stratatech. StrataTest 2016 [Available from: <http://www.stratatechcorp.com/download/Products/StrataTest.pdf>].

Sun T, Jackson S, Haycock JW, MacNeil S. Culture of skin cells in 3D rather than 2D improves their ability to survive exposure to cytotoxic agents. *J Biotechnol*. 2006;122(3):372-81.

Sun T, Norton D, McKean RJ, Haycock JW, Ryan AJ, MacNeil S. Development of a 3D cell culture system for investigating cell interactions with electrospun fibers. *Biotechnol Bioeng*. 2007;97(5):1318-28.

Synthes I. DermaMatrix Acellular Dermis 2006 [Available from: <http://synthes.vo.llnwd.net/o16/LLNWMB8/US%20Mobile/Synthes%20North%20America/Product%20Support%20Materials/Brochures/MXBRODermaMatrixAcellularJ7237F.pdf>].

Tachibana M. Sound needs sound melanocytes to be heard. *Pigment Cell Res*. 1999;12(6):344-54.

Tanimura S, Tadokoro Y, Inomata K, Binh NT, Nishie W, Yamazaki S, Nakauchi H, Tanaka Y, McMillan JR, Sawamura D, Yancey K, Shimizu H, Nishimura EK. Hair follicle stem cells provide a functional niche for melanocyte stem cells. *Cell Stem Cell*. 2011;8(2):177-87.

Thody AJ, Ridley K, Penny RJ, Chalmers R, Fisher C, Shuster S. MSH peptides are present in mammalian skin. *Peptides*. 1983;4(6):813-6.

Tiruvannamalai-Annamalai R, Armant DR, Matthew HW. A glycosaminoglycan based, modular tissue scaffold system for rapid assembly of perfusable, high cell density, engineered tissues. *PLoS One*. 2014;9(1):e84287.

Tobin D, Quinn AG, Ito S, Thody AJ. The presence of tyrosinase and related proteins in human epidermis and their relationship to melanin type. *Pigment Cell Res*. 1994;7(4):204-9.

Tornaletti S, Pfeifer GP. UV damage and repair mechanisms in mammalian cells. *Bioessays*. 1996;18(3):221-8.

Trent JF, Kirsner RS. Tissue engineered skin: Apligraf, a bi-layered living skin equivalent. *Int J Clin Pract*. 1998;52(6):408-13.

Tyrrell RM. Activation of mammalian gene expression by the UV component of sunlight--from models to reality. *Bioessays*. 1996;18(2):139-48.

- Uitto J. The role of elastin and collagen in cutaneous aging: intrinsic aging versus photoexposure. *J Drugs Dermatol.* 2008;7(2 Suppl):s12-6.
- Vaezi M, Yang S. Extrusion-based additive manufacturing of PEEK for biomedical applications. *Virtual and Physical Prototyping.* 2015;10(3):123-35.
- van der Veen VC, van der Wal MB, van Leeuwen MC, Ulrich MM, Middelkoop E. Biological background of dermal substitutes. *Burns.* 2010;36(3):305-21.
- van Zuijlen PP, Vloemans JF, van Trier AJ, Suijker MH, van Unen E, Groenevelt F, Kreis RW, Middelkoop E. Dermal substitution in acute burns and reconstructive surgery: a subjective and objective long-term follow-up. *Plast Reconstr Surg.* 2001;108(7):1938-46.
- Vitellaro-Zuccarello L, Cappelletti S, Dal Pozzo Rossi V, Sari-Gorla M. Stereological analysis of collagen and elastic fibers in the normal human dermis: variability with age, sex, and body region. *Anat Rec.* 1994;238(2):153-62.
- Wainwright D, Madden M, Luterman A, Hunt J, Monafa W, Heimbach D, Kagan R, Sittig K, Dimick A, Herndon D. Clinical evaluation of an acellular allograft dermal matrix in full-thickness burns. *J Burn Care Rehabil.* 1996;17(2):124-36.
- Weber B, Dijkman PE, Scherman J, Sanders B, Emmert MY, Grunenfelder J, Verbeek R, Bracher M, Black M, Franz T, Kortsmid J, Modregger P, Peter S, Stampanoni M, Robert J, Kehl D, van Doeselaar M, Schweiger M, Brokopp CE, Walchli T, Falk V, Zilla P, Driessen-Mol A, Baaijens FP, Hoerstrup SP. Off-the-shelf human decellularized tissue-engineered heart valves in a non-human primate model. *Biomaterials.* 2013;34(30):7269-80.
- Wenczl E, Van der Schans GP, Roza L, Kolb RM, Timmerman AJ, Smit NP, Pavel S, Schothorst AA. (Pheo)melanin photosensitizes UVA-induced DNA damage in cultured human melanocytes. *J Invest Dermatol.* 1998;111(4):678-82.
- White RM, Zon LI. Melanocytes in development, regeneration, and cancer. *Cell Stem Cell.* 2008;3(3):242-52.
- Wijdicks EF, Wiesner RH, Dahlke LJ, Krom RA. FK506-induced neurotoxicity in liver transplantation. *Ann Neurol.* 1994;35(4):498-501.
- Wilkes GL, Brown IA, Wildnauer RH. The biomechanical properties of skin. *CRC Crit Rev Bioeng.* 1973;1(4):453-95.
- Wintzen M, Yaar M, Burbach JP, Gilchrist BA. Proopiomelanocortin gene product regulation in keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1996;106(4):673-8.
- Wood FM, Kolybaba ML, Allen P. The use of cultured epithelial autograft in the treatment of major burn wounds: eleven years of clinical experience. *Burns.* 2006;32(5):538-44.
- Yeh J, Ling Y, Karp JM, Gantz J, Chandawarkar A, Eng G, Blumling J, 3rd, Langer R, Khademhosseini A. Micromolding of shape-controlled, harvestable cell-laden hydrogels. *Biomaterials.* 2006;27(31):5391-8.
- Yeong WY, Yap CY, Mapar M, Chua CK. State-of-the-art review on selective laser melting of ceramics. *High Value Manufacturing: Advanced Research in Virtual and Rapid Prototyping.* CRC Press; 2013. p. 65-70.
- Zheng Y, Mak AF, Lue B. Objective assessment of limb tissue elasticity: development of a manual indentation procedure. *Journal of rehabilitation research and development.* 1999;36(2):71-85.

Annexe 1 : Biocompatibility and Functionality of a Tissue-Engineered Living Corneal Stroma Transplanted in the Feline Eye

Marie Boulze Pankert, Benjamin Goyer, Fatma Zaguia, Myriam Bareille, Marie-Claude Perron, Xinling
Liu, J. Douglas Cameron, Stéphanie Proulx, Isabelle Brunette

Corresponding author:

Dr Isabelle Brunette, MD, FRCSC

Department of Ophthalmology, Maisonneuve-Rosemont Hospital,

5415 boulevard de L'Assomption, Montreal, QC H1T 2M4 Canada;

A1.1 Résumé en français

Objectif : la faible biodisponibilité de tissu cornéen est un problème qui concerne tous les pays et qui a motivé les chercheurs à œuvrer pour trouver de nouvelles alternatives. Dans cette optique, le génie tissulaire offre de nouvelles possibilités pour la réhabilitation de cornées défectueuses. Le but principal de cette étude était d'évaluer la biocompatibilité et la fonctionnalité d'un stroma reconstruit par auto-assemblage suite à une greffe intra-cornéenne sur un modèle félin.

Méthodologie : les stromas cornéens ont été produits suivants la technique de l'auto-assemblage sans ajout de matériaux exogènes. Huit animaux sains ont été sélectionnés afin de recevoir deux greffes intra-stromales dans un œil, le second œil servant de contrôle. Le suivi postopératoire a été mené par des observations ophtalmologiques à la lampe à fentes et une tomographie optique. De plus, des analyses de sensibilité cornéenne ont été effectuées grâce à un esthésiomètre. Enfin, des analyses immunohistologiques en microscopie confocale et électronique ont été menées sur les greffons récoltés quatre mois après la transplantation.

Résultats : quatre mois après la greffe, les greffons étaient transparents, fonctionnels et bien tolérés par le receveur. Aucun signe de vascularisation ni de rejet n'a été reporté malgré l'administration d'un faible traitement local de type stéroïdien. La sensibilité cornéenne retrouva un niveau basal physiologique et la réinnervation à travers les greffons a été confirmée par microscopie confocale et immunofluorescente. Les analyses histologiques et de microscopie électronique de tous les greffons révèlent une structure matricielle collagénique lamellaire se réarrangeant au cours de la greffe à un niveau similaire au tissu environnant.

Conclusions : les stromas reconstruits par auto-assemblage se sont révélés être biocompatibles, transparents et facilement manipulables offrant ainsi de nouvelles opportunités dans les traitements cornéens.

A1.2 Résumé en anglais

Purpose: Corneal tissue shortage has become a major concern worldwide, which has motivated the search for alternative solutions to eye bank human eyes for corneal transplantation. Minimally invasive lamellar transplantation and tissue engineering may offer new opportunities for the rehabilitation of diseased corneas. The aim of this study was to evaluate the biocompatibility and functionality of stromal lamellar grafts tissue-engineered (TE) in vitro and transplanted in vivo in the cornea of a feline model.

Methods: The corneal stromas were engineered in culture from corneal stromal cells using the self-assembly approach, without the addition of exogenous material or scaffold. Eight healthy animals underwent two intrastromal grafts in one eye and the contralateral eye was used as a control. Animals were followed with slit-lamp ophthalmic examination, corneal esthesiometry and optical coherent tomography. Confocal microscopy, immunofluorescence, histology, and transmission electron microscopy (TEM) were performed at 4 months.

Results: Four months after transplantation, the TE-stromal grafts were transparent, functional, and well tolerated by the eye. All grafts remained avascular, with no signs of immune rejection, despite a short course of low-dose topical steroids. Corneal sensitivity returned to preoperative level and reinnervation of the grafts was confirmed by confocal microscopy and immunofluorescence. Histology and TEM of the TE-grafts showed a lamellar stromal structure with regular collagen fibril arrangement.

Conclusions: These results open the way to an entirely new therapeutic modality. Intracorneal filling using a biocompatible, transparent, and malleable TE-stroma could be the basis for multiple types of novel therapeutic options in corneal interventional surgery.