

# Table des matières

Résumé .....	iii
Abstract.....	v
Table des matières .....	vii
Liste des tableaux .....	ix
Liste des figures.....	xi
Liste des abréviations.....	xiii
Remerciements .....	xvii
<b>Chapitre 1 : Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
1.1 Le tissu adipeux humain.....	3
1.1.1 Types de tissus adipeux et distribution dans le corps humain .....	3
1.1.2 Types de cellules composant le tissu adipeux blanc .....	4
1.1.2.1 Les adipocytes.....	5
1.1.2.2 Les cellules endothéliales.....	9
1.1.2.3 Les cellules stromales/souches du tissu adipeux .....	9
1.1.3 Fonction du tissu adipeux blanc.....	10
1.1.3.1 Protection physique et thermogenèse .....	10
1.1.3.2 Emmagasiner d'énergie et métabolisme des lipides.....	11
1.1.3.3 Organe endocrine.....	12
1.2 Formation du réseau vasculaire .....	14
1.2.1 Vasculogenèse .....	14
1.2.2 Angiogenèse.....	15
1.2.3 Réseau vasculaire du tissu adipeux .....	17
1.2.3.1 Relation entre l'adipogenèse et l'angiogenèse .....	17
1.2.3.2 Propriétés angiogéniques du tissu adipeux.....	18
1.2.3.3 Modèles d'étude de l'angiogenèse <i>in vitro</i> .....	21
1.3 La greffe de tissu adipeux .....	23
1.3.1 Modèles de tissus adipeux reconstruits <i>in vitro</i> .....	25
1.3.3 Modèles de tissus adipeux reconstruits enrichis en cellules endothéliales.....	27
1.4 Problématique et objectifs .....	30
<b>Chapitre 2 : Formation de réseaux de capillaires dans des tissus humains produits par génie vasculaire : impact des adipocytes et de leurs produits sécrétés.....</b>	<b>33</b>
2.1 Avant-Propos .....	35
2.2 Résumé.....	37
2.3 Manuscrit soumis pour publication .....	39

2.3.1 Abstract.....	41
2.3.2 Introduction .....	43
2.3.3 Materials and methods.....	45
2.3.3.1 Cell isolation and amplification.....	45
2.3.3.2 Production of human connective and adipose reconstructed tissues .....	45
2.3.3.3 Histological analyses and measurements.....	46
2.3.3.4 Quantification of adipose differentiation by Oil Red O staining .....	46
2.3.3.5 Immunolabelings and analyses on tissue cryosections .....	47
2.3.3.6 Confocal imaging and analyses .....	47
2.3.3.7 Quantification of secreted products from reconstructed tissues (ELISA).....	48
2.3.3.8 Statistical analyses .....	49
2.3.4 Results .....	49
2.3.4.1 Defining optimal conditions for production of endothelialized tissues .....	49
2.3.4.2 Revealing the endothelial networks formed in presence or absence of adipocytes.....	52
2.3.4.3 Determination of capillary's mean diameter.....	56
2.3.4.4 Influence of the tissue microenvironment: kinetics of bioactive molecule secretion.....	57
2.3.4.5 Impact of endothelial cells within the substitutes .....	57
2.3.4.6 Impact of adipocytes.....	59
2.3.4.7 Impact of coculture media.....	59
2.3.5 Discussion.....	60
2.3.6 Conclusion .....	63
2.3.7 Acknowledgments .....	63
2.3.8 References.....	64
<b>Chapitre 3 : Discussion générale .....</b>	<b>69</b>
3.1 Influence des adipocytes sur la formation du réseau de capillaires dans les tissus reconstruits .....	72
3.2 Comparaison des profils de sécrétion de molécules ayant des effets pro-angiogéniques.....	78
3.3 Comparaison avec d'autres modèles.....	81
<b>Chapitre 4 : Conclusion .....</b>	<b>85</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>89</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.1.</b> Facteurs protéiques et non protéiques produits et sécrétés par le tissu adipeux blanc.....	13
<b>Tableau 1.2.</b> Stratégies actuelles utilisées pour la reconstruction de tissus adipeux in vitro par génie tissulaire .....	26
<b>Tableau 1.3.</b> Modèles enrichis de cellules endothéliales pour la reconstruction adipeuse par génie tissulaire	28
<b>Tableau 2.1.</b> Media composition at different steps of tissue production .....	52
<b>Tableau 2.2.</b> Comparison of CD31-labeled structures detected on hrCT and hrAT tissue cryosections .....	57



## Liste des figures

<b>Figure 1.1.</b> Distribution du tissu adipeux brun et blanc dans le corps humain .....	4
<b>Figure 1.2.</b> Composition du tissu adipeux humain .....	5
<b>Figure 1.3.</b> Cascade de facteurs de transcription impliqués dans l'adipogenèse .....	8
<b>Figure 1.4.</b> La vasculogenèse .....	15
<b>Figure 1.5.</b> Étapes impliquées dans le processus de l'angiogenèse par bourgeonnement.....	17
<b>Figure 2.1.</b> Schematic representation of tissue production according to the self-assembly method of tissue engineering.....	50
<b>Figure 2.2.</b> Reconstructed tissue characterization.....	51
<b>Figure 2.3.</b> Detection of tubular structures formed by hMVEC within reconstructed tissues .....	53
<b>Figure 2.4.</b> Confocal imaging of capillary-like networks within engineered tissues .....	54
<b>Figure 2.5.</b> Characterization of the endothelial networks.....	55
<b>Figure 2.6.</b> Determination of capillary diameter .....	56
<b>Figure 2.7.</b> Kinetics of adipokine secretion during production of the reconstructed tissues .....	58
<b>Figure 2.8.</b> Impact of EGM2-containing media on secretory profiles .....	60



## Liste des abréviations

<b>ADM</b>	Matrice acellulaire de derme ( <i>Acellular dermal matrix</i> )
<b>Ang-1</b>	Angiopoïétine-1
<b>Ang-2</b>	Angiopoïétine-2
<b>aP2</b>	<i>adipocyte protein 2</i>
<b>AsA</b>	Acide ascorbique ( <i>Ascorbic acid</i> )
<b>ASC (ou CSTA)</b>	Cellules stromales/souches extraites du tissu adipeux ( <i>Adipose-derived stromal/stem cells</i> )
<b>AT</b>	Tissu adipeux ( <i>Adipose tissue</i> )
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>BM-MSC (ou MSC)</b>	Cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse ( <i>Bone marrow mesenchymal stem cells</i> )
<b>BMP</b>	Protéine morphogénétique osseuse ( <i>Bone morphogenetic protein</i> )
<b>BSA</b>	Albumine de sérum bovin ( <i>Bovine serum albumin</i> )
<b>C/EBP</b>	<i>CCAAT/enhancer binding protein</i>
<b>cAMP</b>	Adénosine monophosphate cyclique ( <i>Cyclic adenosine monophosphate</i> )
<b>DH</b>	Milieu DMEM/HAM ( <i>Dulbecco's modified Eagle Medium : Ham's F-12</i> )
<b>DMEM</b>	Milieu d'Eagle modifié par Dulbecco ( <i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i> )
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde
<b>EGF</b>	Facteur de croissance épidermique ( <i>Epidermal growth factor</i> )
<b>EGM2</b>	Milieu de croissance pour cellules endothéliales ( <i>Endothelial Cell Growth Media</i> )
<b>ELISA</b>	Dosage d'immunoabsorption par enzyme liée ( <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
<b>EPC</b>	Précurseurs de cellules endothéliales ( <i>Endothelial precursor cells</i> )
<b>FABP</b>	Protéine liant les acides gras ( <i>Fatty acid binding protein</i> )
<b>FAS</b>	Synthase des acides gras ( <i>Fatty acid synthase</i> )
<b>FBS</b>	Sérum bovin foetal ( <i>Foetal bovine serum</i> )
<b>bFGF (ou FGF-2)</b>	Facteur de croissance basique des fibroblastes ( <i>Basic fibroblast growth factor</i> )
<b>FSV (ou SVF)</b>	Fraction stroma-vasculaire du tissu adipeux ( <i>Stromal vascular fraction</i> )
<b>GLUT4</b>	Transporteur de glucose de type 4 ( <i>Glucose transporter type 4</i> )
<b>HDMVEC (ou hMVEC)</b>	Cellules endothéliales microvasculaires dermiques ( <i>Human dermal microvascular endothelial cells</i> )
<b>HGF</b>	Facteur de croissance des hépatocytes ( <i>Hepatocyte Growth Factor</i> )
<b>HUVEC</b>	Cellules endothéliales de veine de cordon ombilical ( <i>Human umbilical vein endothelial cells</i> )
<b>IBMX</b>	3-isobutyl-1-méthylxanthine (ou isobutylméthylxanthine)
<b>IGF</b>	Facteur de croissance apparenté à l'insuline ( <i>Insuline-like growth factor</i> )
<b>IgG</b>	Immunoglobuline de type G
<b>IL-6</b>	Interleukine-6
<b>IMC (ou BMI)</b>	Indice de masse corporelle ( <i>Body mass index</i> )
<b>LOEX</b>	Laboratoire d'organogenèse expérimentale
<b>LPL</b>	Lipoprotéine lipase

<b>MEC (ou ECM)</b>	Matrice extracellulaire ( <i>Extracellular matrix</i> )
<b>MMP</b>	Métalloprotéinase matricielle
<b>NEFA</b>	Acide gras non estérifié ( <i>Non-esterified fatty acid</i> )
<b>NG2</b>	Antigène neural/glial 2 ( <i>Neural/Glial Antigen 2</i> )
<b>OCT</b>	<i>Optimum cutting temperature</i>
<b>OEC</b>	<i>Outgrowth epithelial cells</i>
<b>ORO</b>	Coloration à l'huile rouge ( <i>Oil Red O staining</i> )
<b>PAI-1</b>	Inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1 ( <i>Plasminogen activator inhibitor type 1</i> )
<b>PIGF</b>	Facteur de croissance du placenta ( <i>Placenta growth factor</i> )
<b>PBS</b>	Tampon phosphate salin ( <i>Phosphate buffered saline</i> )
<b>PDGF</b>	Facteur de croissance dérivé des plaquettes ( <i>Platelet-derived growth factor</i> )
<b>PDGFR</b>	Récepteur du PDGF
<b>PECAM (ou CD31)</b>	Molécule d'adhésion de cellule plaquettaire-1 ( <i>Platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i> )
<b>PECK</b>	Phosphoénolpyruvate carboxykinase
<b>PPAR</b>	Récepteurs activés par les proliférateurs de peroxisomes ( <i>Peroxisome proliferator-activated receptors</i> )
<b>RLE</b>	Cellules endothéliales extraites de poumons de rat ( <i>Rat lung endothelial cell</i> )
<b>SCD</b>	Stéaroyl-CoA désaturase
<b>SVF (ou FCS)</b>	Sérum de veau foetal ( <i>Fetal calf serum</i> )
<b>T3</b>	Triiodothyronine
<b>TAR (ou hrAT)</b>	Tissu adipeux reconstruit ( <i>human reconstructed adipose tissue</i> )
<b>TCR (ou hrCT)</b>	Tissu conjonctif reconstruit ( <i>human reconstructed connective tissue</i> )
<b>TGF<math>\beta</math></b>	Facteur de croissance transformant $\beta$ ( <i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i> )
<b>TIE</b>	Tyrosine kinase avec des domaines de type immunoglobuline et EGF ( <i>Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like motifs</i> )
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Facteur de nécrose tumorale $\alpha$ ( <i>Tumor Necrosis Factor <math>\alpha</math></i> )
<b>UCP-1</b>	<i>Uncoupling protein-1</i>
<b>VEGF</b>	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire ( <i>Vascular endothelial growth factor</i> )
<b>VEGFR-1 (Flt-1)</b>	Récepteur 1 du VEGF
<b>VEGFR-2 (Flk-1)</b>	Récepteur 2 du VEGF
<b>VEGFR-3 (Flt-4)</b>	Récepteur 3 du VEGF
<b>VLDL</b>	Lipoprotéine de très basse densité ( <i>Very low-density lipoprotein</i> )
<b>ZO-1</b>	<i>Zona occludens-1</i>



*« Il n'y a que deux façons de vivre sa vie :  
l'une en faisant comme si rien n'était un  
miracle, l'autre, en faisant comme si tout  
était un miracle. »  
- Albert Einstein*



# Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier chaleureusement ma directrice de recherche, Dr Julie Fradette, de m'avoir accueillie dans son équipe le temps d'un stage, puis d'avoir accepté de poursuivre l'aventure avec moi le temps d'une maîtrise. Ses conseils, son appui et sa grande disponibilité ont été des outils précieux lors de mon cheminement. En tant que mentore, elle m'a permis de me dépasser et de progresser autant au niveau personnel que professionnel. Je remercie également Dr François Auger et Dr Lucie Germain de m'avoir accueillie au LOEX.

J'aimerais aussi remercier les autres membres de l'équipe LOETA : Dominique Mayrand et Valérie Trottier, deux ressources indispensables dans l'équipe, qui sont toujours là pour répondre à toutes les petites questions, et avec qui il est toujours stimulant de travailler. Un merci spécial à Maryse Proulx, étudiante au sein de l'équipe, avec qui j'ai eu la chance de travailler en étroite collaboration sur ce projet et qui m'a été d'une aide précieuse. Merci aux autres étudiants de l'équipe : Pascal Morissette Martin et Marie-Ève Ouellette, avec qui les discussions animées et les fous rires ont grandement aidé à progresser, mais également à relâcher la pression. Nous avons chacun nos forces, nos faiblesses et nos manies, mais nous nous complétons bien et nous formons une belle équipe. J'ai eu la chance de travailler avec des amis, et mon passage ici n'aurait pas été le même sans vous! Merci pour votre aide et tous vos conseils. Merci également aux stagiaires ayant participé aux projets, soit Meryem Safoine et Marc Allen-Martin.

Merci à tous mes collègues du LOEX, que j'ai eu le plaisir de côtoyer jour après jour.

Un merci spécial à ma famille, mes parents Réjean et Lorraine, et mes sœurs Valérie et Carole-Anne, de m'avoir épaulée, chacun à votre façon, au cours de mes études. Ce mémoire n'aurait jamais pris forme sans vos encouragements.

Enfin, merci à mon amoureux, Luc, d'être toujours présent et de savoir trouver les mots qu'il faut.



# Chapitre 1 : Introduction générale



# 1.1 Le tissu adipeux humain

## 1.1.1 Types de tissus adipeux et distribution dans le corps humain

Le tissu adipeux, présent en grande quantité chez les mammifères, est surtout connu pour permettre de survivre à des épisodes d'apports caloriques limités en emmagasinant de l'énergie excédentaire sous forme de lipides lors de périodes d'abondance. Les adipocytes, principales cellules composant le tissu adipeux, sont les seules cellules qui sont spécialisées et parfaitement adaptées pour accumuler les lipides sans compromettre leur intégrité fonctionnelle grâce à leur machinerie enzymatique appropriée (Fonseca-Alaniz et al. 2007). Il existe deux types de tissus adipeux qui sont fondamentalement différents par leur distribution, leurs fonctions et leur histologie : le tissu adipeux brun et le tissu adipeux blanc.

Le tissu adipeux brun joue un rôle important dans la régulation de la thermogénèse grâce à la grande quantité de protéines UCP-1 (*uncoupling protein-1*) ou thermogénine que l'on y retrouve. Cette protéine, située dans la membrane interne des mitochondries, agit à titre de canal à protons. Elle permet d'éliminer la différence de potentiel à la membrane, empêchant ainsi la production d'ATP (adénosine triphosphate) par l'ATPase. L'énergie résiduelle est alors libérée sous forme de chaleur (Cannon and Nedergaard 2004). La grande quantité de mitochondries dans la cellule peut être à l'origine de leur couleur brunâtre. Les adipocytes composant le tissu adipeux brun ont un diamètre variant entre 30 et 40  $\mu\text{m}$ , contiennent plusieurs gouttelettes lipidiques de tailles variées et ont un cytoplasme relativement abondant (Fonseca-Alaniz et al. 2007).

Les humains, tout comme les rongeurs, possèdent des dépôts de tissu adipeux brun. Très localisés, on les retrouve chez les fœtus et les nouveau-nés, dans les régions axillaires, cervicales, périnéales et surrénales (Cannon and Nedergaard 2004). Bien que le tissu adipeux brun soit présent tout au long de la vie du rongeur, on croyait traditionnellement que les dépôts chez l'humain s'atrophiaient au cours des premières années de vie de l'enfant, jusqu'à devenir négligeables à l'âge adulte (Gesta et al. 2007). Cependant, l'utilisation de la tomographie à émission de positrons au fluorodéoxyglucose (FDG PET) en oncologie a permis de mettre en évidence la persistance de dépôts de gras brun chez l'adulte. En effet, le traceur utilisé se concentre dans des régions métaboliquement très actives, disposées symétriquement dans le haut du corps, soit dans le cou, sous les clavicules et le long de la colonne vertébrale (Figure 1.1A) (Nedergaard et al. 2007). L'intérêt envers ce tissu est grandissant car ce dernier pourrait devenir une cible dans l'élaboration d'un traitement contre l'obésité en tirant profit de la dépense énergétique qu'il entraîne, puisqu'il a été démontré que l'activité du gras brun peut être stimulée chez l'humain (Ouellet et al. 2012, van Marken Lichtenbelt et al. 2009).

Le tissu adipeux blanc est le tissu adipeux prédominant chez les mammifères. Il représente entre 9 et 18 % du poids corporel chez un homme sain et entre 14 et 28% chez une femme saine [indice de masse corporelle (IMC) < 25] jusqu'à excéder 22% pour un homme et 32% pour une femme en surpoids (IMC = 25-30) ou obèse (IMC ≥ 30) (Hausman D. B. et al. 2001). La distribution du tissu adipeux blanc varie selon les espèces. Chez les mammifères, on le retrouve principalement sous forme de deux dépôts : sous-cutané (abdominal, glutéal et fémoral), ou viscéral, comprenant les dépôts mésentérique, omental et rétropéritonéal (Figure 1.1B) (Cinti 1999, Gesta et al. 2007). Bien que le tissu adipeux blanc ne participe pas activement à la thermogénèse, son effet isolant et sa distribution à travers le corps va contribuer à conserver la chaleur corporelle. Bien qu'il ne soit possible d'observer que des différences subtiles au niveau de l'expression génique, il existe des variations importantes entre les différents dépôts de tissu adipeux blanc au niveau de leur structure, de leur composition, de leur métabolisme ainsi que de l'impact qu'ils ont sur les organes environnants (Kirkland et al. 1996). Par exemple, des études morphologiques révèlent la présence d'une plus grande quantité de vaisseaux sanguins et de fibres nerveuses dans le gras omental que le gras sous-cutané, suggérant une plus grande activité métabolique (Hauner 2004).

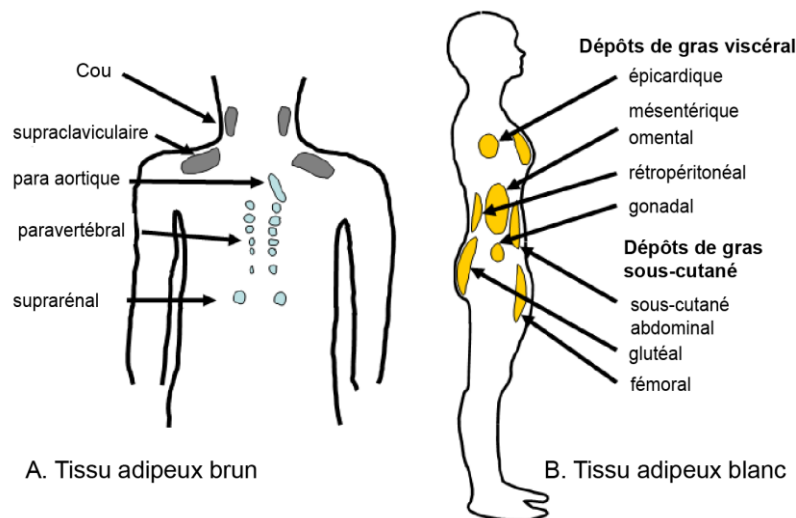


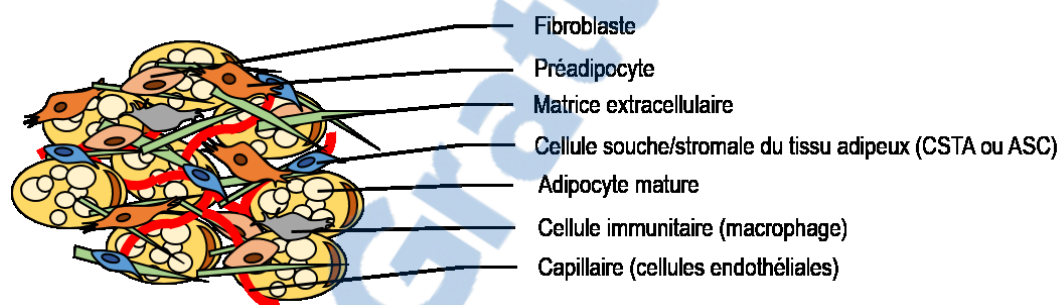
Figure 1.1. Distribution du tissu adipeux brun et blanc dans le corps humain [traduit de (Awada et al. 2013)].

### 1.1.2 Types de cellules composant le tissu adipeux blanc

Tel qu'abordé précédemment, il existe plusieurs types de tissus adipeux dans le corps humain localisés en divers dépôts et possédant chacun leurs caractéristiques propres. Le tissu adipeux blanc sous-cutané sera davantage abordé dans ce mémoire.



Le tissu adipeux est un tissu conjonctif lâche composé de plusieurs types cellulaires et de matrice extracellulaire (MEC) (fibres de collagène, entre autres). Les adipocytes matures remplis de lipides composent environ le tiers du tissu adipeux. Ils sont entourés d'un stroma vascularisé enrichi de plusieurs populations cellulaires distinctes, incluant des fibres nerveuses, des ganglions lymphatiques, des cellules immunitaires (leucocytes et macrophages), des péricytes, des fibroblastes et des préadipocytes (cellules adipeuses non différenciées) (Ahima and Flier 2000) (Figure 1.2). Il a également été démontré que le tissu adipeux représentait une source non négligeable de cellules stromales/souches multipotentes, capables de se différencier en plusieurs types cellulaires dérivés du mésoderme, entre autres, révélant un potentiel nouveau pour ce tissu souvent sous-estimé (Gimble et al. 2007, Mizuno et al. 2002, Planat-Benard et al. 2004, Rangappa et al. 2003, Safford et al. 2002, Zuk et al. 2002).



**Figure 1.2. Composition du tissu adipeux humain.** Plusieurs types cellulaires composent le tissu adipeux humain. On y retrouve des adipocytes matures gorgés de lipides, mais également un stroma composé de fibroblastes, de préadipocytes, de matrice extracellulaire, de cellules stromales/souches, de cellules immunitaires ainsi que de cellules endothéliales formant les capillaires sanguins. © KAubin

### 1.1.2.1 Les adipocytes

Les adipocytes du tissu adipeux blanc sont les cellules différenciées qui possèdent la machinerie cellulaire nécessaire à l'accumulation des lipides. Leur taille peut varier, mais elle peut atteindre plus de 100 fois celle d'un globule rouge, soit de 60 à 100  $\mu\text{m}$  en moyenne, et même atteindre plus de 120  $\mu\text{m}$  chez les personnes obèses (Hauner 2004). Les gouttelettes lipidiques contenues dans la cellule peuvent atteindre 85 à 90 % de la masse cellulaire, repoussant les autres constituants du cytosol (organelles, noyau) au pourtour de la cellule. Dans le tissu adipeux, chacun des adipocytes est à proximité de capillaires.

Le tissu adipeux est doté d'une grande plasticité qui lui est unique. Pour pouvoir assurer l'homéostasie de l'énergie en fonction de l'apport et des dépenses énergétiques, il doit pouvoir s'adapter facilement. Ainsi, en présence d'une balance énergétique positive, l'énergie supplémentaire peut être accumulée sous forme de

triglycérides dans les cellules adipeuses existantes, qui augmenteront alors en taille (hypertrophie) ou encore nécessiter la différenciation de nouveaux adipocytes à partir de précurseurs pour répondre à la demande (hyperplasie). Il existe un équilibre entre les deux phénomènes. Bien qu'on estime le nombre d'adipocytes relativement constant à l'âge adulte, l'adipogenèse est essentielle pour assurer le renouvellement et l'intégrité du tissu adipeux. Chez un adulte, on estime que 10% des cellules adipeuses se renouvelleront annuellement (Spalding et al. 2008).

L'adipogenèse se compose de deux phases principales. La première phase, nommée détermination, consiste en la prolifération des cellules souches mésenchymateuses du tissu adipeux et de leur engagement dans la voie de différenciation adipocytaire pour former les précurseurs des adipocytes (préadipocytes). Bien que le phénotype cellulaire change peu lors de cette étape, les préadipocytes commencent à exprimer des marqueurs précoces de la différenciation adipocytaire. Les processus cellulaires responsables de la détermination des cellules souches vers cette voie de différenciation sont encore incertains (Butterwith 1994, Gregoire et al. 1998, Guilak et al. 2006). Des études ont cependant mis en évidence l'implication de certains facteurs de transcription tels que Zfp423 et Zfp467 (Protéine à doigt de zinc 423 et 467, ou *Zinc finger protein 423 et 467*) comme régulateurs potentiels dans le recrutement des préadipocytes par leur action sur l'expression de protéines clés de l'adipogenèse (Cawthorn et al. 2012, Gupta et al. 2010, Quach et al. 2011).

La différenciation des préadipocytes en adipocytes matures constitue la deuxième phase de l'adipogenèse (Butterwith 1994). Elle est caractérisée par une augmentation de l'activité lipogénique, qui nécessite une machinerie enzymatique appropriée permettant le transport des lipides, la sensibilité à l'insuline et la sécrétion de protéines spécifiques aux adipocytes (Butterwith 1994). On observe également l'adoption graduelle d'une morphologie uniloculaire caractéristique de l'adipocyte mature qui remplace la morphologie fibroblastique associée aux préadipocytes. *In vitro*, les cellules doivent atteindre la confluence et cesser leur croissance en phase G1/S du cycle cellulaire pour engendrer de tels changements (Ailhaud et al. 1989, Amri et al. 1986). Plusieurs signaux extracellulaires peuvent mener à l'adipogenèse, mais la cascade de signalisation impliquant les facteurs de transcription de la famille des récepteurs activés par les proliférateurs de peroxisomes (PPAR) et de la famille C/EBP (CCAAT/*enhancer binding protein*) joue un rôle déterminant (Figure 1.3).

Les lignées cellulaires 3T3-L1 et 3T3-F422A ont grandement contribué à la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'adipogenèse (Green and Kehinde 1975, 1976) et des études effectuées sur le gras humain et murin ont confirmé que ce modèle était approprié pour l'étude générale de la formation de l'adipocyte chez l'animal. Bien que l'utilisation de telles cellules offre l'avantage de travailler avec une population cellulaire homogène au niveau du stade de différenciation, les processus cellulaires étudiés à l'aide de lignées

cellulaires sont parfois moins représentatifs que ceux retrouvés dans des préadipocytes humains (Ali et al. 2013).

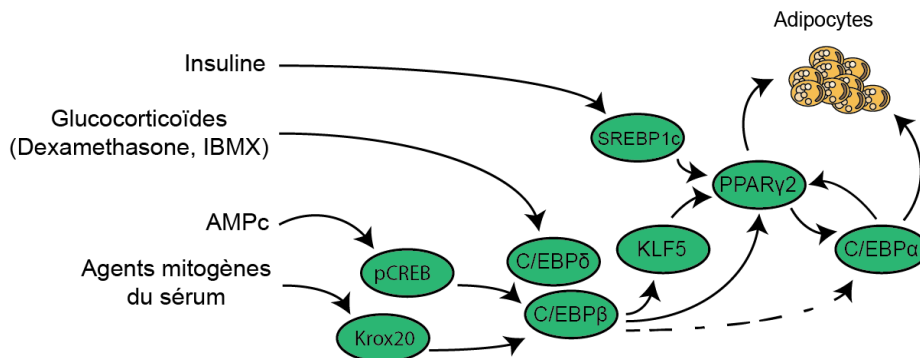
Les membres de la famille des PPARs sont des récepteurs nucléaires jouant le rôle de facteurs de transcription. Ils agissent sur le métabolisme des lipides et des acides gras, ces derniers étant des ligands naturels des PPARs (surtout l'acide arachidonique et ses métabolites) (Obregon 2008). On dénombre plusieurs membres de la famille des PPARs : PPAR $\alpha$ , qui régule la  $\beta$ -oxydation, le catabolisme des lipides et l'inflammation, PPAR $\beta/\delta$ , dont le rôle physiologique est moins bien connu, mais qui semble être impliqué dans le catabolisme des lipides dans le muscle squelettique et la sensibilité à l'insuline, et PPAR $\gamma$  (Grimaldi 2007, Obregon 2008). Il existe deux isoformes de la protéine PPAR $\gamma$ , soit PPAR $\gamma$ 1 et PPAR $\gamma$ 2, qui sont identiques, bien que PPAR $\gamma$ 2 soit doté de 30 acides aminés supplémentaires à l'extrémité N-terminale (Fajas et al. 1997). PPAR $\gamma$ 1 est retrouvé dans plusieurs tissus alors que le PPAR $\gamma$ 2 est exprimé presque exclusivement dans le tissu adipeux (Farmer 2006). PPAR $\gamma$  est le régulateur majeur de l'adipogenèse et est nécessaire pour le maintien d'un état différencié de la cellule (Rosen and MacDougald 2006). Le mode d'action de ce récepteur nucléaire nécessite la formation d'un hétérodimère avec le récepteur X de l'acide rétinoïque (RXR), activant ainsi l'élément de réponse à PPAR (PPRE), que l'on retrouve dans le promoteur de plusieurs gènes cibles de l'adipogenèse, dont l'« *adipocyte protein* » 2 (aP2), la synthase des acides gras (*fatty acid synthase*, FAS), la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK), la lipoprotéine lipase (LPL), la stéaroyl-CoA désaturase (SCD), etc (Obregon 2008). PPAR $\gamma$  induit également l'expression d'un isoforme protéique de la famille des « basic leucine zipper », C/EBP $\alpha$ , un autre gène clé de l'adipogenèse. PPAR $\gamma$  est capable d'induire l'adipogenèse dans des cellules déficientes en C/EBP $\alpha$ , mais l'inverse ne s'applique pas (Rosen et al. 2002), faisant de PPAR $\gamma$  le facteur déterminant de l'adipogenèse.

Les facteurs de transcription C/EBP, pour « CCAAT/enhancer binding protein », possèdent un domaine commun de liaison à l'ADN et existent en plusieurs isoformes : C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$ , C/EBP $\gamma$ , et CHOP (facteur de transcription homologue aux C/EBP) (Rosen and MacDougald 2006). Ces facteurs sont exprimés de manière temporelle lors de la différenciation adipocytaire. L'expression précoce de C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  active C/EBP $\alpha$  dans les préadipocytes (Cao Z. et al. 1991, Christy et al. 1989, Yeh et al. 1995), entraînant ainsi l'activation de gènes spécifiques à l'adipogenèse tels que aP2 et Glut4 (transporteur de glucose de type 4) et l'accumulation de triglycérides (Lin and Lane 1992, Mandrup and Lane 1997). Plusieurs gènes spécifiques à l'adipogenèse possèdent des domaines de liaison à C/EBP dans leur promoteur (Christy et al. 1989). L'activation de C/EBP $\alpha$  maintient également l'expression de PPAR $\gamma$  (Figure 1.3).

Des travaux précédents ont montré des évidences selon lesquelles la protéine liant CRE (*cAMP regulatory element-binding protein* ou CREB), qui est activée lors du processus de l'adipogenèse dans les cellules 3T3-

L1, participant à l'activation de C/EBP $\beta$  (Zhang J. W. et al. 2004). Cette observation supporte le rôle de l'AMPc dans l'activation de C/EBP $\beta$  (Cao Z. et al. 1991) et explique l'utilisation de l'isobutylméthylxanthine (IBMX), activateur de l'AMPc, dans les milieux de culture induisant la différenciation adipogénique. Des molécules liant PPAR $\gamma$ , telles la rosiglitazone et la dexaméthasone, sont utilisées pour favoriser la différenciation adipogénique en culture.

Bien que l'adipogenèse nécessite une signalisation intracellulaire associée aux facteurs de transcription mentionnés précédemment, plusieurs signaux extracellulaires différents peuvent stimuler ce processus biologique. Par exemple, l'insuline joue un rôle important dans les stades précoces de l'adipogenèse. Son action implique le récepteur 1 du facteur de croissance apparenté à l'insuline (*Insulin-like growth factor-1*, ou IGF1), exprimé en abondance par les préadipocytes (Smith et al. 1988), et qui stimulerait l'expression de PPAR $\gamma$  chez les préadipocytes humains *in vitro* (Rieusset et al. 1999). Ensuite, l'hormone thyroïdienne triiodothyronine (T3) est physiologiquement produite par la glande thyroïde et est impliquée dans la régulation de mécanismes métaboliques. Elle régule certains processus liés à l'adipogenèse comme la lipogenèse et la lipolyse (Ailhaud et al. 1992, Oppenheimer et al. 1991). Selon les conditions de culture ou les partenaires d'interaction, le facteur de croissance transformant  $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* , ou TGF $\beta$ ), exprimé dans les adipocytes en culture et le tissu adipeux, peut promouvoir ou non l'adipogenèse par l'inhibition de la différenciation des préadipocytes ou encore par son interaction avec SMAD3. La transcription des C/EBPs est alors inhibée, entravant ainsi la fonction de PPAR $\gamma$ . Les BMPs (*Bone Morphogenetic Proteins*) peuvent également avoir des effets variés. BMP4 et BMP2 stimulent l'adipogenèse en entraînant les cellules souches mésenchymateuses vers la différenciation adipocytaire pour le premier, et en interagissant avec divers partenaires, comme le TGF $\beta$  et l'insuline, pour le deuxième (Rosen and MacDougald 2006).



**Figure 1.3. Cascade de facteurs de transcription impliqués dans l'adipogenèse.** L'exposition à différents facteurs tels que l'insuline, des glucocorticoïdes comme la dexaméthasone et l'isobutylméthylxanthine (IBMX), l'AMP cyclique (AMPc) ainsi que le sérum foetal bovin induit l'expression de plusieurs facteurs de transcription convergeant vers PPAR $\gamma$  et C/EBP $\alpha$ . L'action combinée de ces facteurs de transcription induira la différenciation adipogénique des cellules stromales/souches et des préadipocytes [modifié de (Farmer 2006)].

### 1.1.2.2 Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales dérivent du mésoderme et tapissent la couche la plus interne des vaisseaux sanguins. Elles jouent un rôle important, entre autres, dans l'homéostasie du tissu, la fibrinolyse et la coagulation, les échanges entre le tissu et le sang, l'activation des cellules sanguines ainsi que la migration de ces dernières lors de processus physiologiques ou pathologiques (Risau 1995). Elles expriment le marqueur cellulaire CD31, une protéine de la superfamille des immunoglobulines, aussi retrouvée sous le nom de *platelet endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM-1). On la retrouve à la surface des cellules endothéliales, mais également à la surface des plaquettes et d'autres cellules immunitaires, telles que les macrophages, les cellules T et NK (*Natural Killer*), les lymphocytes et les neutrophiles (Ilan and Madri 2003). Le tissu adipeux est un organe grandement vascularisé pour répondre efficacement et rapidement aux signaux reliés au métabolisme énergétique. Le pôle luminal (en contact avec le sang) des cellules endothéliales composant les capillaires du tissu adipeux expose des protéines nécessaires au bon fonctionnement de l'organe. Ainsi, on y retrouve la lipoprotéine lipase (LPL) dont le rôle est d'hydrolyser les triglycérides contenus dans les lipoprotéines de très basse densité (VLDL, ou *very low-density lipoprotein*) et permet l'approvisionnement et l'emmagasinage des lipides dans les adipocytes. Une fois hydrolysés, les acides gras non estérifiés (NEFA, ou *non-esterified fatty acids*) sont importés dans l'adipocyte en traversant la couche de cellules endothéliales des capillaires. Les mécanismes par lesquels d'autres molécules comme des hormones et des adipokines emprunteraient la voie transendothéliale sont encore mal connus, mais contribueraient au contrôle hormonal de l'activité métabolique du tissu adipeux ainsi qu'à son activité sécrétoire (Bouloumié and Galitzky 2013).

### 1.1.2.3 Les cellules stromales/souches du tissu adipeux

Le tissu adipeux dérive du mésenchyme embryonnaire, tout comme la moelle osseuse dont sont extraites des cellules souches bien connues, les BM-MSK (*Bone marrow mesenchymal stem cells*) (Pittenger 2008). Zuk *et al.* ont mis en évidence la présence d'une population cellulaire isolée de la fraction stromale vasculaire du tissu adipeux (fraction séparée des adipocytes matures par centrifugation à la suite d'une digestion enzymatique du tissu) et capable de se différencier en adipocytes, ostéoblastes et chondrocytes (Zuk *et al.* 2001). Pour accéder au titre de cellules souches mésenchymateuses, les cellules doivent répondre à trois critères : adhérer au plastique lorsque mises en culture, exprimer des antigènes de surface spécifiques et être multipotentes (Dominici *et al.* 2006). Les cellules stromales extraites du tissu adipeux répondent à ces critères et leur profil d'expression de marqueurs correspond à celui des cellules souches mésenchymateuses (positives pour CD29, CD44, CD71, CD90 et CD105) sans toutefois exprimer les marqueurs relatifs aux cellules hématopoïétiques (CD34, CD14 et CD45) et endothéliales (CD31) (Dominici *et al.* 2006, Zuk *et al.* 2002). On appelle alors les

cellules stromales/souches extraites du tissu adipeux CSTA ou ASC pour *Adipose-derived stem cells* (Daher et al. 2008). D'autres marqueurs tels que CD106 et CD36 peuvent être ajoutés à la liste pour les distinguer des BM-MSc, puisque les CSTA expriment CD36, sans toutefois exprimer CD106 (Bourin et al. 2013). Cependant, la présence du marqueur CD34 reste controversée (Baer 2014). Son expression est grandement dépendante des conditions de culture. Certaines équipes avancent que les CSTA seraient originaires d'une population de péricytes exprimant l'antigène en question (Traktuev et al. 2008) et qu'il serait présent *in vivo*, mais que son expression diminuerait de manière drastique dans un contexte *in vitro* (Maumus et al. 2011). Les travaux de Maumus et al. suggèrent que les CSTA n'exprimeraient pas de marqueurs de péricytes (NG2 et CD140b) dans leur environnement natif, mais que la mise en culture induirait leur expression (Maumus et al. 2011). Davantage d'études seront nécessaires pour clarifier la situation, étant donné que le profil d'expression antigénique des CSTA est grandement dépendant du contexte dans lequel les cellules se trouvent.

En plus de la différenciation adipocytaire, les cellules stromales/souches extraites du tissu adipeux démontrent la capacité d'adopter des phénotypes spécifiques aux cellules myogéniques, neurales, endothéliales et cardiomyogéniques (Mizuno et al. 2002, Planat-Benard et al. 2004, Rangappa et al. 2003, Safford et al. 2002).

Le potentiel du tissu adipeux humain comme source de cellules stromales/souches est non négligeable. En effet, on retrouverait jusqu'à 2% des cellules dans la fraction stromale du tissu qui possèderaient un caractère souche une fois en culture. En comparaison, les BM-MSc constitueraient environ 0,002% de la moelle osseuse (Strem and Hedrick 2005). De plus, la morbidité associée à l'acte chirurgical nécessaire à l'obtention des cellules souches du tissu adipeux, la lipoaspiration, est moindre que la ponction de moelle osseuse nécessaire pour extraire les BM-MSc. L'utilisation des CSTA, d'un point de vue éthique, est également intéressante étant donné que ce sont des cellules souches adultes dont l'utilisation en laboratoire est bien acceptée dans la communauté scientifique. Elles offrent également la possibilité d'être utilisées de manière complètement autologue dans un contexte de médecine régénératrice et de génie tissulaire.

### **1.1.3 Fonction du tissu adipeux blanc**

#### **1.1.3.1 Protection physique et thermogénèse**

Le tissu adipeux, en général, offre une protection physique au froid relativement considérable. En effet, la conductivité du tissu adipeux au froid est environ deux fois moins élevée que celle du tissu musculaire, ce qui diminuerait les pertes en chaleur du corps lorsqu'il est exposé à des températures froides (Anderson G. S. 1999). Bien que les propriétés isolantes du tissu adipeux soient essentielles et pleinement exploitées par les

animaux marins (baleines, phoques), son efficacité et sa nécessité sont encore controversées chez les animaux terrestres et l'humain. Bien que le tissu adipeux blanc ait un effet isolant, l'adaptation au climat froid par l'humain semble être davantage reliée à l'augmentation du métabolisme que par l'amélioration de l'isolation du corps (Stini 1981). Par contre, le tissu adipeux blanc offre une protection essentielle au corps contre les diverses forces mécaniques auxquelles il fait face quotidiennement (Gimble et al. 1998). Par exemple, le gras orbital offre une protection mécanique aux globes oculaires et le gras sous-cutané protège les organes et structures internes lors d'une chute (Klaus 2001).

### 1.1.3.2 Emmagasiner d'énergie et métabolisme des lipides

Le tissu adipeux est constitué principalement d'adipocytes, des cellules spécialisées pour emmagasiner l'énergie sous forme de lipides, plus particulièrement sous forme de triglycérides. Ces derniers, constitués de trois acides gras estérifiés reliés à une molécule de glycérol, possèdent plusieurs caractéristiques qui en font des molécules de choix pour emmagasiner l'énergie. En plus de leur nature hydrophobe, ils possèdent une haute densité calorifique et sont très peu hydratés, comparativement au glycogène ou aux protéines, lesquelles nécessitent jusqu'à cinq fois leur poids en eau associée (Klaus 2001). Les triglycérides contiennent donc davantage d'énergie tout en occupant un volume et un poids moindre.

Trois processus cellulaires majeurs participent au métabolisme des lipides dans l'adipocyte : l'import des acides gras dans la cellule, la lipogenèse (synthèse d'acides gras et de glycérol) et la lipolyse (hydrolyse des triglycérides). Chacun d'eux peut être modulé en réponse à des signaux extracellulaires tels que l'insuline, le cortisol, les hormones de croissance, les acides gras libres, les cytokines, etc. (Avram et al. 2005, Ramsay 1996).

Les acides gras qui sont importés dans l'adipocyte proviennent principalement de ceux fournis par l'apport nutritionnel, contenus dans les chylomicrons et les VLDL, et de ceux produits par l'activité métabolique des adipocytes (lipolyse) (Avram et al. 2005). La lipoprotéine lipase (LPL), retrouvée à la surface des capillaires sanguins du tissu adipeux, libère les acides gras des vésicules de transport qui transitent ensuite dans la cellule par l'intermédiaire de transporteurs membranaires (Proenca et al. 2014, Ramsay 1996). Une fois à l'intérieur de la cellule, les acides gras sont acheminés par les FABPs (*Fatty acid binding protein*), telles que FABP-4 et aP2, au site enzymatique où auront lieu les réactions d'estérification nécessaires à la synthèse des triglycérides lors du processus de lipogenèse. La lipogenèse *de novo* (synthèse d'acide gras et de groupement glycérol dans le cytosol de la cellule adipeuse) est possible, mais à un moindre niveau (Proenca et al. 2014). En période de jeûne, les triglycérides emmagasinés dans les gouttelettes lipidiques sont hydrolysés en acides gras libres et

en glycérol (lipolyse) en impliquant de nombreuses enzymes et autres protéines de la voie des récepteurs adrénergiques (Proenca et al. 2014). Une fois dans la circulation, le glycérol produit est métabolisé par la glycérol kinase dans le foie pour pouvoir former de nouveaux triglycérides. Les acides gras libres, quant à eux, sont oxydés par les tissus métaboliquement actifs, permettant la production d'ATP, une source d'énergie pour la cellule (Avram et al. 2005).

Les adipocytes participent également au métabolisme du glucose. Ils ont la capacité d'exprimer et de réguler le transporteur de glucose dépendant à l'insuline GLUT4. L'entrée de glucose dans la cellule adipeuse permet la synthèse *de novo* des acides gras et du glycérol (lipogénèse) par la voie glycolytique (Avram et al. 2005).

### 1.1.3.3 Organe endocrine

Bien longtemps, le tissu adipeux a été considéré comme un organe dont la fonction principale consistait à emmagasiner les lipides. La découverte de la leptine, hormone régulant entre autres la satiété dans le corps et sécrétée par le tissu adipeux (Zhang Y. et al. 1994), a changé la vision que l'on avait de ce tissu conjonctif. L'intérêt envers le tissu adipeux n'a cessé de croître depuis qu'une fonction endocrine importante impliquant la sécrétion de plusieurs autres protéines et molécules lui est associée (Tableau 1.1). On y retrouve des cytokines comme le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* , ou TNF $\alpha$ ) et l'interleukine-6 (IL-6), ainsi que des facteurs de croissance tels que le TGF $\beta$ . Le tissu adipeux sécrète également des molécules impliquées dans la coagulation sanguine, telles que l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1 (*plasminogen activator inhibitor -1* ou PAI-1), dans la régulation de la glycémie (adiponectine, leptine) ainsi que dans l'angiogénèse (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, ou *vascular endothelial growth factor* (VEGF)) (Fonseca-Alaniz et al. 2007, Fruhbeck et al. 2001) (Tableau 1.1). Le tissu adipeux blanc accumule le cholestérol et est impliqué dans le métabolisme des hormones stéroïdiennes. Bien que le tissu ne synthétise pas les hormones *de novo*, il exprime les enzymes impliquées dans la conversion des glucocorticoïdes et des hormones sexuelles, qui sont par la suite sécrétées (Mohamed-Ali et al. 1998, Trayhurn and Beattie 2001). Les facteurs sécrétés par le tissu adipeux blanc ayant un effet pro-angiogénique seront davantage abordés à la section 1.2.3.2.



**Tableau 1.1. Facteurs protéiques et non protéiques produits et sécrétés par le tissu adipeux blanc<sup>&</sup>**

Molécule	Effet biologique
Leptine	Envoi de signaux au système nerveux central concernant la balance énergétique du corps
Adiponectine	Accroît la sensibilité à l'insuline, possède une action anti-inflammatoire et atténue la progression de l'athérosclérose
Résistine	Accroît la résistance à l'insuline
TNF $\alpha$	Stimule la lipolyse, augmente la consommation d'énergie et réduit la sensibilité à l'insuline
Interleukine-6	Action pro-inflammatoire, stimule la lipolyse, réduit la sensibilité à l'insuline
Adipsine	Active la voie alternative du complément
ASP	Stimule la synthèse des triacylglycérols dans le tissu adipeux blanc
Angiotensinogène	Précurseur de l'angiotensine II, impliqué dans la régulation de la pression sanguine artérielle
PAI-1	Inhibe l'activation du plasminogène, empêche la fibrinolyse
Facteur tissulaire	Initie la cascade de coagulation
VEGF	Stimule la prolifération vasculaire (angiogenèse) dans le tissu adipeux blanc
Visfatine	Effet insulino mimétique (abaisse la glycémie), produit principalement par le gras viscéral
Monobutyrine*	Effet vasodilatateur et inducteur de la néoformation de vaisseaux sanguins
TGF $\beta$	Régule une série de processus dans le tissu adipeux blanc, incluant la prolifération et la différenciation des préadipocytes, ainsi que le développement et l'apoptose des adipocytes
IGF-1	Stimule la prolifération et la différenciation des préadipocytes
HGF	Stimule la différenciation et le développement des adipocytes
MIF	Immunorégulateur avec action paracrine dans le tissu adipeux blanc
LPL <sup>#</sup>	Stimule l'hydrolyse enzymatique des triacylglycérols dans les lipoprotéines (chylomicrons et VLDL)
CETP <sup>#</sup>	Transfert des esters de cholestérol entre les lipoprotéines
Apo-E <sup>#</sup>	Protéine composant les lipoprotéines, en particulier les VLDL
Prostaglandines*	Régulent plusieurs processus biologiques, actives lors de l'inflammation, la coagulation sanguine, l'ovulation et la sécrétion d'acide gastrique
Oestrogènes*	Hormones produites par l'action de l'aromatase, demeurent la principale source d'oestrogènes chez les hommes et les femmes post-ménopausées
Glucocorticoïdes*	Générés par l'action de la 11-hydroxystéroïde déhydrogénase de type II, transformant la cortisone en cortisol dans le tissu adipeux blanc
Apeline	Impliquée dans la régulation de fonctions cardiovasculaires, l'homéostasie des fluides, la formation de vaisseaux sanguins, la prolifération cellulaire (revue dans Masri et al. 2005) ainsi que dans l'homéostasie du glucose (Sörhede Winzell et al. 2005)

ASP = protéine stimulant l'acylation (*acylation stimulating protein*); CETP = protéine de transfert des esters de cholestérol (*cholesterol ester transfer protein*); HGF = facteur de croissance des hépatocytes (*hepatocyte growth factor*); IGF-1 = facteur de croissance apparenté à l'insuline-1 (*insulin-like growth factor-1*); LPL = lipoprotéine lipase (*lipoprotein lipase*); MIF = facteur d'inhibition de migration des macrophages (*macrophage migration inhibitory factor*); PAI-1 = inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (*plasminogen activation inhibitor-1*); TGF $\beta$  = facteur de croissance transformant- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ); TNF $\alpha$  = facteur de nécrose tumorale- $\alpha$  (*tumor necrosis factor- $\alpha$* ); VEGF = facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (*vascular endothelial growth factor*); VLDL = lipoprotéine de très faible densité (*very low density lipoprotein*).

\* Molécules non protéiques

<sup>#</sup> Protéines sans action hormonale

<sup>&</sup> Modifié de Fonseca-Alaniz et al. 2007

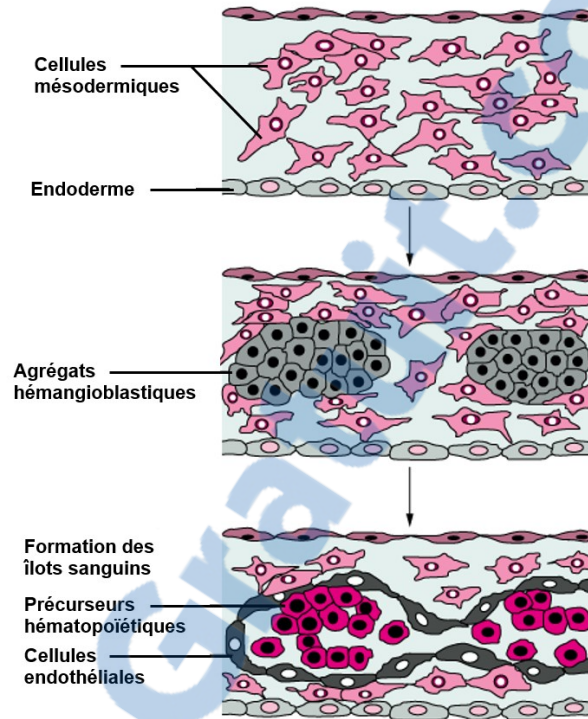
## 1.2 Formation du réseau vasculaire

Le tissu adipeux est un organe grandement vascularisé. Son développement est étroitement relié à celui du réseau vasculaire qui le compose (Crandall et al. 1997). En effet, dès l'embryogenèse, on observe, pour certains dépôts, un réseau vasculaire relativement complexe dans les zones prédestinées à former des dépôts de tissu adipeux avant même l'apparition des premiers adipocytes (Crandall et al. 1997, Wassennan 1965). Le tissu adipeux, étant doté d'une grande plasticité, doit être nourri adéquatement par le réseau vasculaire. Ainsi, lorsqu'il prend de l'expansion, par exemple, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins assurera le transport des nutriments et de l'oxygène nécessaires à la survie du tissu. Les nouveaux vaisseaux sanguins peuvent se former de deux manières, soit par vasculogenèse, qui a lieu lors de l'embryogenèse, ou par angiogenèse, qui implique la présence de vaisseaux sanguins préexistants.

### 1.2.1 Vasculogenèse

La vasculogenèse est un phénomène principalement retrouvé lors de l'embryogenèse pendant laquelle la formation du réseau vasculaire a lieu par la différenciation des cellules endothéliales *in situ* (Risau 1995) et implique des précurseurs mésodermiques communs aux cellules hématopoïétiques et aux cellules endothéliales, les hémangioblastes. Les cellules se regroupent en îlots (agrégats hémangioblastiques) à proximité du mésoderme dans le sac embryonnaire (Figure 1.4) et c'est leur réponse au VEGF qui est déterminante de la voie que prendront ces cellules. Ainsi, des observations ont montré que les cellules au pourtour de ces îlots, les angioblastes, exprimeraient le récepteur au VEGF, VEGFR-2 (ou Fetal liver kinase 1 (Flk-1)), et deviendraient des précurseurs de cellules endothéliales dans l'embryon (Risau 1997). Le VEGF joue d'ailleurs un rôle déterminant dans les stades précoces de l'angiogénèse et de la vasculogenèse. On observe d'ailleurs un effet létal chez des embryons de souris mutantes pour un seul allèle de VEGF-A (Carmeliet et al. 1996, Ferrara et al. 1996). Les angioblastes sont les précurseurs des cellules endothéliales, mais qui n'expriment pas encore les marqueurs spécifiques et ne forment pas encore de lumens (Risau 1995). La fusion de ces angioblastes formerait les premières structures vasculaires sous la forme d'un plexus primaire, qui est à l'origine des vaisseaux primitifs (Risau 1997). Les cellules situées au centre de ces agrégats, quant à elles, réguleraient négativement VEGFR-2 et deviendraient les précurseurs de cellules hématopoïétiques (Risau 1997). L'idée que les cellules vasculaires et hématopoïétiques aient une origine commune serait appuyée par le fait que des cellules souches embryonnaires murines mutantes pour *Flk-1* seraient incapables de produire l'un ou l'autre de ces types cellulaires alors que des cellules positives pour Flk-1 en auraient la possibilité (Ema et al. 2003). Éventuellement, le réseau primaire formé sera stabilisé par le recrutement de cellules murales (ou

péricytes) par l'intermédiaire du PDGF-B (*Platelet-derived growth factor B*), des angiopoïétines et du TGF $\beta$  et par la sécrétion de matrice extracellulaire (Jain 2003).

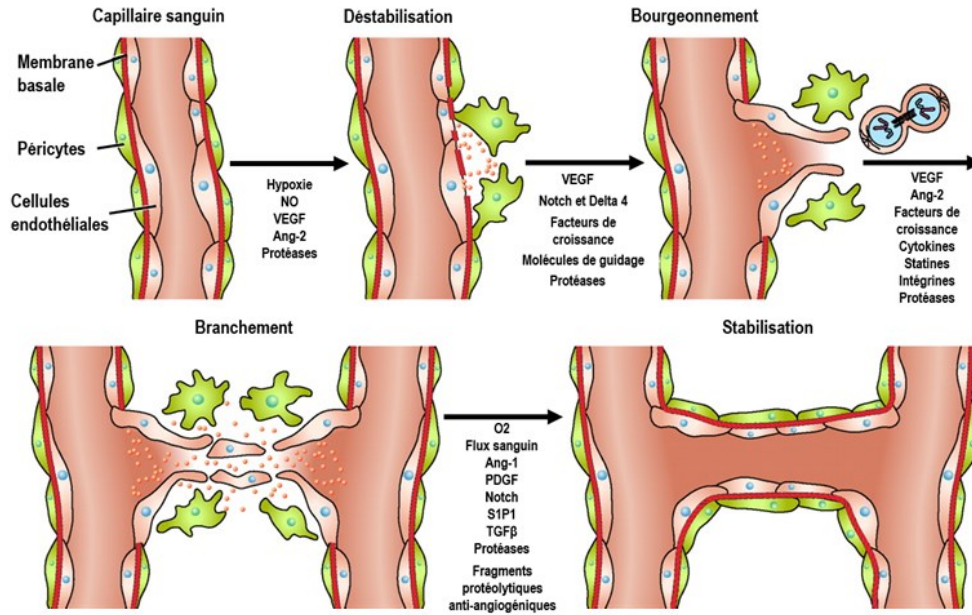


**Figure 1.4. La vasculogénèse.** Les précurseurs mésodermiques, les hémangioblastes, se regroupent sous forme d'îlots et seront à l'origine des premiers précurseurs vasculaires. Sous l'action du VEGF, les cellules situées en périphérie, les angioblastes, deviendront les précurseurs des cellules endothéliales alors les cellules situées au centre des agrégats deviendront des précurseurs de cellules hémato-poïétiques. [Modifiée de (Chagraoui and Uzan 2001)]

## 1.2.2 Angiogenèse

L'angiogenèse, contrairement à la vasculogénèse, est le mécanisme par lequel de nouveaux vaisseaux sanguins sont formés à partir de vaisseaux préexistants. C'est un processus que l'on retrouve lors du développement embryonnaire et fœtal, mais également plus tardivement dans le développement, lors de la réparation tissulaire suite à une blessure, la croissance osseuse, le cycle menstruel chez la femme ainsi que lors de la grossesse. L'angiogenèse est un processus qui est parfois altéré dans certaines maladies, telles que le psoriasis, et nécessaire à la croissance de tumeurs. Il existe quatre mécanismes d'angiogenèse : par bourgeonnement et par intussusception, qui sont les plus importants, et par élongation/élargissement ou par l'incorporation de précurseurs de cellules endothéliales en circulation dans les parois de vaisseaux sanguins, dans une moindre mesure (Chung and Ferrara 2011).

L'angiogenèse par bourgeonnement est constituée d'une suite d'événements séquentiels comprenant la dégradation de la matrice extracellulaire, la migration et la prolifération des cellules endothéliales dirigées par un gradient de molécules chimiotactiques, la formation d'un lumen et enfin la maturation fonctionnelle de l'endothélium (Risau 1997) (Figure 1.5). Plusieurs molécules bioactives sont impliquées dans la cascade de ces événements. La famille des VEGF en est une importante, étant donné que c'est un des principaux facteurs de croissance auxquels les cellules endothéliales répondent. Ainsi, un stimulus, tel que l'hypoxie, induira la production de VEGF par le tissu en croissance qui a besoin de nouveaux vaisseaux sanguins pour être suffisamment irrigué. On assistera à l'augmentation de la perméabilité vasculaire des vaisseaux sanguins existants en réponse au VEGF. Cela permet également le relâchement de protéines plasmatiques qui agiront à titre d'échafaudage primaire pour la migration des cellules endothéliales. Le vaisseau sera alors déstabilisé. L'angiopoïétine-2 (Ang-2), un antagoniste du récepteur TIE2 et produit de manière autocrine par les cellules endothéliales, joue un rôle dans le détachement des cellules musculaires et le relâchement de la matrice extracellulaire entourant le vaisseau. La matrice extracellulaire sera dégradée par les protéinases de l'activateur du plasminogène, les métalloprotéinases matricielles (MMP), des enzymes de la famille des chymases ou des héparanases. L'action de ces enzymes permettra la libération de facteurs de croissance tels que le bFGF, le VEGF et l'IGF, qui demeuraient séquestrés dans la matrice. Une fois le chemin libéré, les cellules entameront leur migration et s'aligneront les unes avec les autres. Une fois le vaisseau assemblé, il sera stabilisé et on assistera à la formation graduelle d'un lumen et à la maturation de l'endothélium qui adoptera les caractéristiques propres au tissu dans lequel il se trouve (Carmeliet 2000). La production d'angiopoïétine-1 (Ang-1) par les cellules entourant le nouveau vaisseau (cellules murales) permet de stabiliser les jonctions entre les cellules endothéliales et de maintenir un phénotype quiescent. Son action est médiée par le récepteur TIE2 (Fukuhara et al. 2010).



**Figure 1.5. Étapes impliquées dans le processus de l'angiogenèse par bourgeonnement.** L'hypoxie entraîne la production d'oxyde nitrique et l'expression de différents facteurs (VEGF, Ang-1 et Ang-2) qui interagissent avec les protéases de la matrice extracellulaire (MEC). Cela permet l'augmentation de la perméabilité des parois des vaisseaux capillaires. La déstabilisation et la dégradation de la MEC entraîne la migration et la prolifération des cellules endothéliales qui formeront de nouveaux tubules. La libération de facteurs angiogéniques, surtout lors de la protéolyse de la MEC, va permettre la stabilisation des vaisseaux nouvellement formés. [Traduit de (Clapp et al. 2009)]

## 1.2.3 Réseau vasculaire du tissu adipeux

### 1.2.3.1 Relation entre l'adipogenèse et l'angiogenèse

Il a été mentionné précédemment que le tissu adipeux était maintenant reconnu comme un organe occupant plusieurs fonctions dans le corps humain et sécrétant de nombreuses molécules impliquées dans divers processus biologiques. De plus, le tissu adipeux se caractérise par une capacité d'adaptation remarquable : on peut observer le remodelage, l'expansion ou la régression du tissu à une échelle importante tout au long de la vie d'un individu. Pour accomplir ses fonctions liées à la synthèse, l'utilisation et l'accumulation des lipides ainsi que pour assurer sa fonction endocrine, le tissu adipeux se doit d'être doté d'un réseau vasculaire capable de s'adapter à la plasticité propre au tissu adipeux (Crandall et al. 1997). D'ailleurs, le lien étroit unissant le tissu adipeux et son réseau vasculaire est mis en évidence par des études démontrant qu'il était possible de nuire au développement du tissu adipeux par l'utilisation d'inhibiteurs de l'angiogenèse dans le modèle murin (Brakenhielm et al. 2004, Neels et al. 2004, Rupnick et al. 2002). Il existe également une communication entre les cellules endothéliales et les adipocytes dans le tissu adipeux via une signalisation paracrine impliquant des facteurs sécrétés ou encore par l'intermédiaire de contacts cellule-cellule. Le tissu adipeux produit plusieurs



molécules mitogéniques et angiogéniques (leptine et VEGF, par exemple), alors que les cellules endothéliales sécrètent des facteurs, tels que le facteur de croissance dérivé des plaquettes PDGF et des éléments matriciels (laminine, collagène de type IV, fibronectine) qui stimulent la prolifération et la différenciation des préadipocytes (Aoki et al. 2003, Hutley et al. 2001, Varzaneh et al. 1994).

### **1.2.3.2 Propriétés angiogéniques du tissu adipeux**

Tel qu'abordé précédemment, le tissu adipeux est un organe endocrine sécrétant de nombreuses molécules dont plusieurs démontrent un potentiel angiogénique intéressant. Les molécules étudiées lors de nos travaux sont présentées dans cette section.

#### **Leptine**

La leptine est une petite adipokine de 16 kDa produite principalement par les adipocytes du tissu adipeux blanc, bien que de faibles niveaux aient été détectés dans le placenta, les muscles squelettiques, l'épithélium gastrique et mammaire ainsi que dans le cerveau [revu dans (Friedman and Halaas 1998) et (Ahima and Flier 2000)]. Le gène *ob* (ou *LEP*) est responsable de la production de la leptine chez les mammifères, dont l'humain et la souris, et a largement été décrit dans le modèle murin [(Zhang Y. et al. 1994), revu dans (Tartaglia 1997)]. Le rôle premier attribué à la leptine a été de réguler l'apport alimentaire ainsi que la prise de poids par son action sur l'hypothalamus en influençant la production de neuropeptides clés dans la balance énergétique (Schwartz et al. 2000). La leptine agirait également sur divers processus hormonaux et métaboliques (Zhang Y. et al. 1994), en plus d'être un facteur pro-angiogénique dont les effets seraient d'ailleurs comparables à ceux du VEGF (Bouloumie et al. 1998). En effet, la leptine agit premièrement de manière paracrine sur les cellules endothéliales puisque ces dernières expriment la forme longue du récepteur de la leptine (OB-Rb) (Bouloumie et al. 1998, Sierra-Honigmann et al. 1998). Cela mène à l'activation des voies signalétiques de JAK/Stat impliquées dans l'angiogenèse, la prolifération et la survie cellulaire. Outre son effet direct sur les cellules endothéliales, la leptine agit également comme facteur pro-angiogénique en promouvant la production de VEGF, facteur de survie et de prolifération des cellules endothéliales, de MMP-2 et MMP-9 (Bouloumie et al. 2001, Park et al. 2001), nécessaires à la dégradation de la matrice extracellulaire, et de FGF-2, qui, combiné au VEGF, augmente la néovascularisation *in vivo* (Cao R. et al. 2001).

#### **Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF)**

La famille de facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire comporte 5 isoformes chez les mammifères : VEGF A à D, ainsi que le facteur de croissance du placenta (*Placenta growth factor*, PlGF). Dans le tissu

adipeux, le VEGF est produit par les cellules de la fraction stromale vasculaire ainsi que par les adipocytes matures (Ledoux et al. 2008, Rehman et al. 2004). Trois récepteurs de type tyrosine kinase sont associés au VEGF : VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/KDR/Flk-1 et VEGFR-3/Flt-4 (Gale et Yancopoulos, 1999). Le VEGF-A, isoforme le mieux caractérisé, serait responsable en grande partie du potentiel angiogénique du tissu adipeux (Zhang Q. X. et al. 1997) et sa signalisation implique les récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2. Le VEGF influence la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales, la tubulogénèse, la perméabilité vasculaire, les MMP ainsi que le système de l'activateur du plasminogène (Liekens et al. 2001). Le récepteur VEGFR-3, quant à lui, joue un rôle principalement dans la lymphangiogénèse.

### **Angiopoïétines : Angiopoïétine-1 et Angiopoïétine-2**

Les angiopoïétines sont des glycoprotéines sécrétées ayant un poids moléculaire d'environ 75 kDa. Il existe quatre isoformes connus de la protéine : angiopoïétine-1 (Ang-1) et angiopoïétine-2 (Ang-2), qui sont les plus caractérisées, puis angiopoïétine-3 et angiopoïétine-4. Le récepteur tyrosine kinase des angiopoïétines, TIE2, est exprimé par les cellules endothéliales vasculaires et lymphatiques et les cellules précurseurs hématopoïétiques (Dumont et al. 1992, Iwama et al. 1993). Il existe également le récepteur TIE1, mais les ligands de ce dernier sont encore mal connus. Il aurait cependant un rôle à jouer dans le processus d'angiogénèse puisqu'on a observé un effet létal au stade embryonnaire chez des souris déficientes en TIE1 ainsi qu'un système vasculaire compromis (Sato et al. 1995).

L'angiopoïétine-1 est sécrétée par les adipocytes et les cellules stromales du tissu adipeux, en quantité équivalente en culture (Verseijden et al. 2009), ainsi que par les cellules musculaires lisses et autres cellules périvasculaires (Thomas and Augustin 2009, Verseijden et al. 2009). La liaison d'Ang-1 sur son récepteur entraîne l'autophosphorylation de ce dernier (Davis et al. 1996), qui, par le recrutement de plusieurs protéines adaptatrices, activera des voies signalétiques relatives à la survie cellulaire, à la migration, l'inflammation et la perméabilité cellulaire par l'intermédiaire de la voie Akt principalement (Thomas and Augustin 2009). Ang-1 permet la stabilisation des vaisseaux par son action sur les jonctions cellulaires (Thurston et al. 2000), en promouvant le contact des cellules endothéliales avec les cellules murales (cellules musculaires lisses et péricytes) (Carlson et al. 2001).

Ang-2 agit de manière autocrine et est presque exclusivement sécrétée par les cellules endothéliales, qui l'emmagasinent dans les corps de Weibel-Palade (Fiedler et al. 2004). Bien que l'expression d'Ang-1 soit constitutive chez l'adulte, Ang-2 est exprimée principalement lors du remodelage du réseau vasculaire, tel que dans le système reproducteur féminin (Maisonpierre et al. 1997) ou lors de la croissance de tumeurs (Holash et

al. 1999). Ang-2 est un antagoniste de Ang-1 et sa liaison sur le récepteur TIE2 n'entraîne pas la phosphorylation de ce dernier, mais conduit à la déstabilisation des vaisseaux existants pour permettre le remodelage et la migration des cellules endothéliales, d'où son activité étroitement liée à celle du VEGF.

En effet, Ang-1, Ang-2, ainsi que leurs récepteurs sont des partenaires importants du VEGF lors de la vasculogénèse et de l'angiogénèse (Liekens et al. 2001, Papetti and Herman 2002, Yancopoulos et al. 2000). Lors de l'embryogénèse, le VEGF permet la prolifération et la différenciation des cellules endothéliales qui formeront alors un réseau immature. Ang-1, par l'intermédiaire de TIE2, induit le remodelage et la stabilisation des vaisseaux nouvellement formés impliquant un contact avec la matrice extracellulaire. En présence de stimuli adéquat (VEGF ou d'hypoxie, par exemple), on assiste à l'augmentation de Ang-2, qui, en agissant comme antagoniste de Ang-1, provoque la déstabilisation du vaisseau. Les cellules endothéliales ont désormais la capacité de répondre à la présence de VEGF. En absence de facteurs stimulants, il y aura régression du vaisseau.

### **Facteur de croissance des hépatocytes (HGF)**

Le facteur de croissance des hépatocytes (*Hepatocyte Growth Factor*, HGF) est un facteur dont les effets mitogènes et angiogéniques sont connus (Morishita et al. 2002, Nakagami et al. 2001). Il participerait également à augmenter le potentiel angiogénique du VEGF *in vivo* et *in vitro* (Van Belle et al. 1998). Le tissu adipeux est un producteur important de HGF : il est sécrété autant par les adipocytes matures que par les cellules stromales et les préadipocytes (Bell et al. 2006, Rehman et al. 2003, Rehman et al. 2004), ainsi que par les cellules endothéliales (Nakamura et al. 1995). Le HGF agit par l'intermédiaire du récepteur tyrosine kinase c-Met, produit du proto-oncogène *c-met*, qui se retrouve à la surface des cellules endothéliales et d'autres cellules comme les cellules musculaires lisses (Nakamura et al. 1995). Il stimule la migration et la prolifération de ces dernières (Nakamura et al. 1995). Ce facteur de croissance occupe un rôle important dans la prolifération ainsi que dans le remodelage des vaisseaux (Hewett et al. 1993) puisqu'il entraînerait la formation de tubules chez les cellules endothéliales de veine de cordon ombilical (HUVEC) en culture dans un environnement tridimensionnel de collagène (Saiki et al. 2006).

### **L'inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1 (PAI-1)**

L'inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1 (PAI-1), tel que son nom l'indique, inhibe l'activation du plasminogène, le précurseur de la plasmine, dont le rôle est de lyser la fibrine. Le tissu adipeux blanc semble être un site important de production de PAI-1, en étant sécrété par les cellules endothéliales, les adipocytes matures, les préadipocytes en culture et les cellules stromales, qui en seraient les principales productrices



(Bastelica et al. 2002, Crandall et al. 2000b). PAI-1 agirait de deux manières au niveau des processus d'angiogenèse dans le tissu adipeux. Premièrement, le système protéolytique PA-Plasmine, dans lequel intervient PAI-1, joue un rôle essentiel dans la régulation de la dégradation de la matrice extracellulaire, permettant ainsi de conserver un échafaudage pour la migration des cellules endothéliales et la formation de capillaires (Pepper 2001). Deuxièmement, PAI-1 agirait à titre de compétiteur pour le site de liaison de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  sur la vitronectine, une protéine matricielle (Stefansson and Lawrence 1996). On retrouve l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  à la surface des cellules musculaires lisses (SMC) et des préadipocytes, entre autres, et la migration de ces cellules sur une matrice composée de vitronectine *in vitro* est compromise lorsque les cellules sont en présence de PAI-1 (Crandall et al. 2000a, Stefansson and Lawrence 1996). Bien que la vitronectine soit présente au niveau du foie, elle n'avait jamais été identifiée dans des cultures de préadipocytes ou d'adipocytes provenant de biopsies. Crandall *et al.* ont cependant montré la présence de la protéine au niveau de la fraction stromale du tissu adipeux, ce qui vient appuyer la seconde hypothèse (Crandall et al. 2000a).

### **1.2.3.3 Modèles d'étude de l'angiogenèse *in vitro***

Étant donné qu'il existe une relation étroite entre les adipocytes et les cellules endothéliales composant les capillaires du tissu adipeux, plusieurs modèles *in vitro* ont été élaborés afin d'étudier les interactions que ces types cellulaires peuvent entretenir. Hutley *et al.* ont mis en évidence les interactions paracrines entre les deux populations cellulaires dans un modèle de culture simple en monocouche. En effet, les milieux conditionnés par des cellules endothéliales extraites de tissu adipeux omental et sous-cutané semblent favoriser la prolifération des préadipocytes en culture, extraits des mêmes tissus (Hutley et al. 2001). Cependant, ce modèle d'étude ne reproduit pas de manière fidèle l'environnement tridimensionnel dans lequel évoluent physiologiquement les populations cellulaires étudiées. C'est pourquoi plusieurs modèles intègrent une matrice extracellulaire tridimensionnelle qui peut être composée de plusieurs biomatériaux différents. Aoki *et al.* ont observé l'effet de la présence de cellules endothéliales sur des adipocytes matures provenant de rats dans un modèle de gel de collagène au niveau de la maturation et de l'apoptose des adipocytes (Aoki et al. 2003). Bien que le collagène soit une composante importante de la matrice extracellulaire du tissu adipeux, il existe de nombreuses autres composantes matricielles qui ne sont pas représentées dans ce type de gel. La fibrine est une autre protéine filamenteuse utilisée comme biomatériau dans la reconstruction de modèles tridimensionnels, puisque c'est un composé biodégradable et biocompatible sans avoir de propriétés toxiques ou carcinogènes pour les cellules (Borges et al. 2007). Le gel de fibrine a été choisi pour ces propriétés intéressantes dans l'étude des interactions entre les préadipocytes et des cellules endothéliales microvasculaires dermiques (HDMVEC) arrangées sous forme de microsphères dans un environnement 3D (Borges et al. 2007). En utilisant ce modèle, les auteurs ont pu constater l'effet du milieu conditionné par des préadipocytes sur les cellules endothéliales, qui semble

favoriser le nombre de bourgeons ainsi que la longueur des prolongements formés par les microsphères de HDMVEC. Le bFGF et le VEGF sécrétés par les préadipocytes semblent avoir un rôle important puisque l'effet observé sur les cellules endothéliales est diminué lorsque des anticorps dirigés contre ces deux protéines sont utilisés. De plus, contrairement aux modèles en monocouche, la prolifération des préadipocytes ne semble pas être influencée par la présence des cellules endothéliales dans ce modèle tridimensionnel (Borges et al. 2007). Kachgal *et al.* utilisent également ce type d'échafaudage dans leur modèle où des microbilles sont recouvertes d'HUVEC et mises en coculture avec des CSTA ou des BM-MSK dans un gel de fibrine (Kachgal and Putnam 2011). Ce modèle est avantageux pour l'étude de l'angiogenèse *in vitro* puisqu'il est assez aisé d'observer et de caractériser les bourgeons et les prolongements formés à partir des microbilles. Cette étude a aussi permis de mettre en évidence des différences entre les interactions qu'entretiennent les BM-MSK avec les cellules endothéliales comparativement aux CSTA puisque ces deux types de cellules stromales ne stimulent pas les mêmes voies signalétiques reliées à l'angiogenèse chez les cellules endothéliales (Kachgal and Putnam 2011). Une autre équipe priorise un modèle composé de protéines de soie, extraites de cocons du ver à soie *Bombyx mori*, pour la coculture de cellules endothéliales de veine de cordon ombilical (HUVEC) et de CSTA, différenciées ou non en adipocytes. Ils ont montré la formation de capillaires continus comportant un lumen dans leur modèle (Kang et al. 2009). Plus récemment, Yao et al. ont utilisé des microsphères de collagène et d'alginate recouverte de fibrilles de collagène comme modèle de coculture entre les CSTA différenciées en adipocytes et les HUVEC. Ils estiment que leur modèle mime de manière fidèle le tissu adipeux natif, car il comporte des CSTA différenciées (adipocytes), des cellules endothéliales (HUVEC) ainsi qu'un stroma (fibrilles de collagène), ce qui en fait un modèle à considérer pour l'étude des interactions entre les différents types cellulaires et dans un contexte de thérapies reliées à l'obésité. Cependant, étant donné que le stroma qui le compose ne contient que des fibrilles de collagène, il n'est pas aussi complexe que la matrice extracellulaire du tissu adipeux, qui contient des éléments matriciels variés, notamment de la fibronectine et de la laminine. D'autres modèles ingénieux ont été proposés, bien que certaines lacunes rendent leur utilisation clinique impossible. Par exemple, certains tissus reconstruits sont produits à partir de Matrigel™ (Kimura et al. 2002). Bien que des résultats prometteurs aient été observés chez la souris, ce biomatériau est dérivé de membranes de sarcome de rat. En plus d'être xénogénique, le fait que le Matrigel™ soit d'origine néoplasique rend son utilisation impossible chez l'humain.

L'angiogenèse est un processus important dans le développement et le maintien du tissu adipeux dans le corps humain et les modèles d'étude *in vitro* sont des outils précieux pour mieux comprendre les phénomènes sous-jacents. Afin que les observations faites *in vitro* soient représentatives de ce qui est retrouvé *in vivo*, le modèle utilisé se doit d'être assez fidèle au tissu natif par les cellules ou les éléments matriciels qui le composent. Il serait d'ailleurs avantageux que ces modèles soient non seulement des outils valides pour les études *in vitro*,

mais qu'ils possèdent également toutes les caractéristiques nécessaires pour être utilisés en chirurgie de reconstruction, soit par l'utilisation de cellules humaines, d'un échafaudage compatible, naturel et sans biomatériaux exogènes.

### **1.3 La greffe de tissu adipeux**

Les tissus mous de remplacement sont nécessaires en chirurgie de reconstruction afin de combler les zones atrophiées résultant de blessures graves, de résections de tumeurs ou de l'atrophie du tissu adipeux causée par des maladies acquises ou congénitales. En effet, on observe des lipodystrophies chez des patients atteints du VIH en raison de l'utilisation des inhibiteurs de protéases dans les traitements anti-rétroviraux (Capeau et al. 2006). Des maladies congénitales telles que le syndrome de Romberg et le syndrome de Poland se caractérisent aussi par une atrophie du tissu adipeux sous-cutané, au niveau du visage et de la poitrine respectivement (Finch and Dawe 2003, Fokin and Robicsek 2002). En 2013, on estimait qu'environ 77 % des chirurgies de reconstruction étaient nécessaires à la suite de résections de tumeurs (American Society of Plastic Surgeons 2014). La chirurgie de reconstruction améliore certes le bien-être émotionnel et l'estime de soi des patients, mais son utilité va au-delà de l'apparence physique. En effet, l'atrophie de la masse adipeuse peut engendrer des complications métaboliques préoccupantes, telles que le diabète et la résistance à l'insuline, souvent associées à l'obésité. De tels cas sont souvent répertoriés chez des patients atteints de divers syndromes lipodystrophiques, caractérisés par « une altération de la quantité et/ou de la répartition de tissu adipeux » (Capeau et al. 2006). Il est alors primordial de procéder au remplacement du tissu adipeux pour permettre à ce dernier de jouer son rôle au niveau du métabolisme des glucides et des lipides et d'autres processus physiologiques.

La méthode privilégiée en chirurgie de reconstruction pour combler les zones affectées consiste en un transfert de gras autologue, c'est-à-dire de prélever du tissu adipeux à un site anatomique pour le réinjecter à un autre. Cette méthode existe depuis la fin du 19<sup>e</sup> siècle et a grandement évolué au niveau des techniques et des outils utilisés (Mojallal and Foyatier 2004). De nos jours, le prélèvement de gras par aspiration (lipoaspiration ou à l'aide d'une seringue) est priorisé pour l'obtention de matériel à greffer puisque les risques liés à la chirurgie sont moindres que ceux liés à la résection de gras. Dr. Sydney R. Coleman a grandement contribué au regain d'intérêt envers l'utilisation de la lipoaspiration pour la greffe de gras autologue par l'élaboration d'outils spécifiques et de lignes directrices qui contribuent au succès de l'opération (Mojallal and Foyatier 2004). Malgré les réussites associées à la technique au fil du temps, on observe tout de même une perte de volume récurrente au site de greffe causée principalement par la nécrose du tissu. La diminution de la viabilité des adipocytes à la

suite de l'intervention chirurgicale, la sensibilité des adipocytes à l'ischémie et l'apport initial sanguin insuffisant au site de greffe pourraient expliquer le phénomène (Tanzi and Fare 2009). Des études ont montré que le temps et la quantité de gras injecté initialement sont des facteurs déterminants dans la rétention du volume lors de reconstructions mammaires. En effet, le volume de rétention varie entre 27 et 52 % selon le volume initial injecté (variant entre 51 et 151 cc) et ce, à 20 semaines post-chirurgie (Choi M. et al. 2013). D'autres facteurs sont également à considérer, soit le chirurgien procédant à l'opération, la technique utilisée ainsi que le patient lui-même. Faute d'alternatives comparables, l'injection de gras autologue reste la méthode privilégiée pour pallier le manque de tissu mou en chirurgie de reconstruction.

Considérant les limitations actuelles, il serait optimal de développer un produit qui se compare avantageusement à la greffe de gras autologue par sa reproductibilité et son efficacité à long terme. La reconstruction de tissu adipeux viable et fonctionnel par génie tissulaire représente une option à considérer dans le développement d'alternatives à la greffe de gras autologue. En combinant les cellules et les biomatériaux appropriés, il sera sans doute possible de maintenir, réparer, régénérer ou de reconstruire des tissus *in vitro* pour éventuellement reconstruire des organes entiers. Les modèles de tissus adipeux reconstruits par génie tissulaire disponibles à ce jour seront abordés à la section 1.3.1.

Il a également été démontré que la vascularisation précoce d'un tissu greffé est requise pour assurer sa survie ainsi que la persistance du volume (Masuda et al. 2004). Différentes approches peuvent être envisagées pour favoriser l'angiogenèse dans le tissu, dont l'ajout de facteurs angiogéniques au site d'intérêt. Silva *et al.* ont d'ailleurs implanté chez la souris des capsules d'hydrogel contenant du VEGF à un site ischémique afin de favoriser l'angiogenèse (Silva and Mooney 2007). Bien qu'elle semble attrayante, cette avenue comporte certains désavantages. Dans l'optique d'une application clinique, l'utilisation de telles protéines angiogéniques recombinantes représente des coûts très élevés, et la distribution du facteur de manière contrôlée au site d'implantation est difficile, ce qui peut soulever des inquiétudes quant à la formation de tumeurs ou de vaisseaux se développant de manière aberrante (Binder et al. 2013). D'autres modèles proposent alors d'utiliser le potentiel angiogénique des cellules stromales et adipeuses dans un modèle de coculture avec des cellules endothéliales afin de favoriser la formation de capillaires dans le tissu reconstruit. Cette dernière option représente une voie à envisager dans l'élaboration d'un substitut adipeux doté d'un réseau préformé de capillaires comme agent de comblement en chirurgie de reconstruction. Les modèles utilisant cette approche seront détaillés à la section 1.3.2.

### 1.3.1 Modèles de tissus adipeux reconstruits *in vitro*

La reconstruction de tissu adipeux *in vitro* implique une source de cellules ayant le potentiel de se différencier en adipocytes matures et de former un tissu adipeux fonctionnel, un échafaudage tridimensionnel et un microenvironnement qui fournit les signaux appropriés pour la croissance et la formation du tissu. La matrice extracellulaire joue un rôle déterminant dans le développement du tissu adipeux *in vitro*. Par exemple, la fibronectine est l'une des premières composantes de la matrice extracellulaire à être sécrétée lors de l'adipogenèse et elle permet l'organisation du collagène interstitiel (Kubo et al. 2000). Les nombreuses protéines de la famille du collagène sont les composantes de la MEC du tissu adipeux qui sont les plus abondantes. Ces protéines fibrillaires agissent à titre de substrat pour l'adhésion et la migration des cellules et permettent l'ancrage des cellules lors de la croissance cellulaire (Ibrahimi et al. 1992). Leur présence est également nécessaire pour la différenciation des adipocytes. Au fil de la maturation des adipocytes, la fibronectine sera dégradée au profit de la laminine, composante de la membrane basale entourant chaque adipocyte mature, ainsi que du collagène de type IV (Kubo et al. 2000).

Plusieurs modèles de tissus adipeux reconstruits *in vitro* sont proposés et utilisent différents composés synthétiques ou naturels pour mimer l'environnement des cellules dans le tissu adipeux humain. Il existe des échafaudages à base de poly (acide lactique) (PLA), de poly (acide glycolique) (PGA), de poly (acide lactique - co-acide glycolique) (PLGA), de fluoropolymères ou encore de silicone [revue dans (Choi J. H. et al. 2010)]. Bien que ces polymères synthétiques supportent l'adipogenèse *in vitro* et que certains peuvent promouvoir la vascularisation du tissu implanté, plusieurs de ces composés se dégradent rapidement *in vivo* (en 4 à 12 semaines), d'autres manquent de flexibilité, ont des lacunes au niveau de la biocompatibilité ou leur surface est parfois moins favorable à l'adhésion cellulaire.

On retrouve également des matériaux naturels disponibles pour la reconstruction de tissus adipeux *in vitro* (Tableau 1.2). Plusieurs de ces échafaudages sont constitués d'éléments matriciels retrouvés dans le tissu adipeux (collagène, fibrine), de dérivés du collagène (gélatine) ou encore produits à partir de matrices de tissus décellularisées (placenta, tissu adipeux). Ces échafaudages sont souvent utilisés en combinaison avec des cellules souches extraites du tissu adipeux ou de la moelle osseuse, lesquelles pourront alors proliférer, se différencier et remodeler la matrice. D'autres modèles sont composés d'un échafaudage naturel tridimensionnel, mais auquel aucune cellule n'est ajoutée. Ainsi des essais *in vivo* chez la souris ont démontré que l'implantation de Matrigel™ contenant des facteurs de croissance tels que le bFGF (ou FGF-2) délivrés directement au site d'implantation ou encapsulés dans des microsphères de gélatine pour un relargage contrôlé favorisait l'adipogenèse *de novo* (Tabata et al. 2000, Toriyama et al. 2002). Bien que du tissu adipeux se soit formé à

l'endroit de l'implantation de la mixture de Matrigel™ et de facteurs de croissance, cette avenue n'est pas envisageable chez l'humain pour un usage clinique étant donné l'origine de ce biomatériau tel que discuté précédemment.

**Tableau 1.2. Stratégies actuelles utilisées pour la reconstruction de tissus adipeux *in vitro* par génie tissulaire**

Matériau	Année	Modèle	Références
Collagène	2001	Éponge de collagène	<i>von Heimbürg et al. 2001a; von Heimbürg et al. 2001b</i>
	2003	Préadipocytes humains et microsphères de gélatine contenant du bFGFensemencés dans une éponge de collagène	<i>Kimura et al. 2003</i>
	2007	Microbilles de collagène	<i>Rubin et al. 2007</i>
Hyaluronane	2003	Disques à base d'acide hyaluronique	<i>Halbleib et al. 2003</i>
	2007	Matrice de placenta humain décellularisé encapsulée dans un gel de hyaluronane réticulé	<i>Flynn L. et al. 2007</i>
Fibrine	2006	Gel de fibrine contenant des préadipocytes cultivés en présence ou non de bFGF lors de l'induction à la différenciation	<i>Cho et al. 2006</i>
Gélatine	2005	Cellules stromales de la moelle osseuseensemencées dans une éponge de gélatine	<i>Hong et al. 2005</i>
	2013	Cryogel composé de gélatine et d'acide hyaluronique contenant des CSTA de porc différenciées en adipocytes	<i>Chang et al. 2013</i>
Placenta humain décellularisé	2006	Matrice dérivée de placenta humain décellularisé	<i>Flynn L. et al. 2006</i>
Soie	2007	Comparaison entre des échafaudages à base de fibroïne de soie, de collagène et de poly(acide lactique) (PLA)	<i>Mauney et al. 2007</i>
	2009	Échafaudage à base de fibroïne de soie et de chitosan	<i>Altman et al. 2009</i>
Matrice dérivée du tissu adipeux	2007	Matrice extracellulaire du tissu adipeux humain auto-assemblée	<i>Vermette et al. 2007</i>
	2010	Gel composé de matrice extracellulaire dérivée du tissu adipeux humain	<i>Flynn L. E. 2010</i>
	2013	Hydrogel injectable composé de matrice extracellulaire dérivée du tissu adipeux humain enrichi de CSTA (études <i>in vitro</i> ) ou de cellules de la FSV (études <i>in vivo</i> )	<i>Wang et al. 2013</i>
	2014	Hydrogel injectable composé de matrice extracellulaire dérivée du tissu adipeux humain enrichi de CSTA et/ou de transglutaminase	<i>Young et al. 2014</i>

bFGF: Facteur de croissance basique des fibroblastes (*Basic fibroblast growth factor*); CSTA = Cellules stromales/souche: extraites du tissu adipeux (*Adipose-derived stromal/stem cells, ASC*); FSV = Fraction stroma-vasculaire du tissu adipeux (*Stromal vascular fraction, SVF*)

Le Laboratoire d'Organogenèse Expérimentale (LOEX) a su se démarquer par son expertise pour la reconstruction de différents tissus par génie tissulaire. La méthode d'auto-assemblage en génie tissulaire développée au centre de recherche permet la production de tissus reconstruits totalement humains, sans biomatériaux exogènes (L'Heureux et al. 1998). Selon cette méthode, les cellules sont cultivées en présence d'acide ascorbique (vitamine C), qui est un cofacteur essentiel de la proline-4-hydroxylase, une enzyme impliquée dans l'assemblage de la triple hélice du procollagène intracellulaire (Peterkofsky 1991). Les cellules en culture sont donc en mesure de fabriquer leur environnement tridimensionnel par la production optimisée de matrice extracellulaire.

Lorsque la méthode standard d'auto-assemblage est utilisée en combinaison avec des cellules stromales/souches du tissu adipeux, il est possible de former des feuillets conjonctifs, non différenciés, qui pourront être superposés et former des tissus conjonctifs reconstruits (TCR). Ces tissus peuvent être utilisés à plusieurs endroits, comme derme dans une peau reconstruite, par exemple (Trottier et al. 2008). La méthode d'auto-assemblage peut également être adaptée pour la production de tissus adipeux reconstruits (TAR) *in vitro*. Ainsi, les cellules stromales/souches sont induites à se différencier en adipocytes en même temps qu'elles sécrètent de la matrice extracellulaire (Vermette et al. 2007). L'environnement tridimensionnel dans lequel évoluent les cellules mime celui du tissu adipeux humain étant donné qu'il est fabriqué par les cellules elles-mêmes dans le tissu. Les feuillets adipeux manipulables ainsi formés ont la possibilité d'être empilés, de la même manière que les tissus conjonctifs, pour former des tissus plus épais (Vermette et al. 2007).

### **1.3.3 Modèles de tissus adipeux reconstruits enrichis en cellules endothéliales**

La vascularisation rapide des tissus épais reconstruits à la suite d'une greffe est un élément déterminant dans la survie et le maintien du tissu à long terme. Le LOEX oriente également ses recherches dans le but d'optimiser ce paramètre lors de greffes de tissus. Ainsi, des peaux humaines reconstruites dont le derme est doté d'un réseau préformé de capillaires ont été produites (Black et al. 1998, Hudon et al. 2003, Tremblay et al. 2005). Ces dernières sont constituées d'éponges de collagène bovin dans lesquelles des cellules humaines ont étéensemencées. Tremblay *et al.* ont démontré que la présence des capillaires formés *in vitro* dans les peaux favorisait leur vascularisation rapide lorsqu'elles étaient greffées chez la souris athymique (Tremblay et al. 2005). La vitesse à laquelle le greffon était vascularisé par l'hôte était augmentée et il était possible d'observer une connexion entre les capillaires humains de leur modèle et les capillaires murins, et ce, en moins de quatre jours (Tremblay et al. 2005). Étant donné que la diffusion de molécules nécessaires à la survie du tissu lors d'une greffe est limitée, la vascularisation rapide du greffon par le réseau vasculaire de l'hôte prend de l'importance avec l'augmentation du volume du tissu implanté. Des peaux enrichies en cellules endothéliales

produites selon la méthode d'auto-assemblage ont également été produites (Rochon et al. 2010). Des modèles de tissus adipeux reconstruits *in vitro* à base de différents biomatériaux et enrichis d'un réseau vasculaire préformé sont également proposés par diverses équipes (Tableau 1.3).

**Tableau 1.3. Modèles enrichis de cellules endothéliales pour la reconstruction adipeuse par génie tissulaire**

Matériau	Année	Modèle	Références
Fibrine	2003	Gel de fibrine enrichi de préadipocytes et de HDMVEC (humain)	<i>Borges et al. 2003</i>
Collagène et fibronectine	2009	Coculture de CSTA (non différenciées) et de EPC (humain)	Traktuev et al. 2009
Soie	2009	CSTA (différenciées et non différenciées) et HUVEC (humain)	<i>Kang et al. 2009</i>
	2013	CSTA différenciées et cellules endothéliales microvasculaires primaires (humain)	Bellas et al. 2013
Matrice dérivée du tissu adipeux	2011	CSTA, fibroblastes, MSC et HUVEC (humain) dans une matrice auto-assemblée	<i>Sorrell et al. 2011</i>
	2014	Matrice dérivée de tissu adipeux humain décellularisé et enrichie de bFGF, sans ajout de cellules, adipogenèse et angiogenèse <i>de novo</i> chez la souris	<i>Lu et al. 2014</i>
Microsphère de collagène et d'alginate	2013	Microsphères de collagène et d'alginate contenant des CSTA avec des HUVEC ajoutées en surface (humain)	<i>Yao et al. 2013</i>

CSTA = Cellules stromales/souches extraites du tissu adipeux (*Adipose-derived stromal/stem cells, ASC*); HDMVEC = Cellules endothéliales microvasculaires dermiques (*Human dermal microvascular endothelial cells*); HUVEC = cellules endothéliales de veines de cordon ombilical (*Human umbilical vein endothelial cells*); BM-MSC (ou MSC) = Cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse (*Bone marrow mesenchymal stem cells*); RLE = Cellules endothéliales de poumons de rat (*Rat lung endothelial cells*); EPC = Précurseurs de cellules endothéliales (*Endothelial precursor cells*); bFGF: Facteur de croissance basique des fibroblastes (*Basic fibroblast growth factor*)

La plupart de ces modèles sont produits à partir de biomatériaux naturels mentionnés précédemment. Borges *et al.* ont démontré que leur tissu reconstruit, constitué de préadipocytes non différenciés et de cellules endothéliales microvasculaires dermiques (HDMVEC) dans une matrice de fibrine, était capable de former un réseau de capillaires *in vitro* et de se connecter au réseau d'un hôte *in vivo* (membranes chorio-allantoïdes d'embryons de poussins ou *chick embryo chorioallantoic membrane, CAM assay*) sans l'ajout de facteurs pro-angiogéniques exogènes (Borges et al. 2003). Une équipe a usé d'une stratégie différente en injectant une



solution de bFGF encapsulé dans une matrice dérivée du tissu adipeux humain décellularisé, sans ajout de cellules, pour favoriser l'adipogenèse et l'angiogenèse *de novo* chez la souris (Lu et al. 2014). L'utilisation du bFGF dans ce modèle semble nécessaire à l'adipogenèse *de novo* puisque l'implantation de la matrice seule ne favorise pas la formation de tissu adipeux au site d'implantation. Tel qu'abordé précédemment, le contrôle de la diffusion de facteurs de croissance *in vivo* dans un tel modèle est difficile, bien que des vérifications aient été faites *in vitro*, et peut causer des inquiétudes quant à la formation d'une vascularisation anarchique ou le développement de tumeurs potentielles. Des cocultures de CSTA non différenciées et de précurseurs de cellules endothéliales (EPC) dans un gel de collagène ont également été implantés chez la souris SCID, 24h suivant l'ensemencement des cellules dans le gel (Traktuev et al. 2009). Les greffons semblent bien vascularisés deux semaines suivant l'implantation. Les EPC semblent avoir formé un réseau vasculaire ayant connecté avec celui de l'hôte et des structures exprimant CD31 comportant un lumen sont visibles lors de l'analyse de coupes histologiques. Cependant, dans ce contexte, les auteurs ont privilégié l'utilisation des EPC d'origine allogène (extraites de sang de cordons ombilicaux), ce qui peut rendre l'accès à ces cellules plus difficile et entraîner des problèmes d'immunocompatibilité dans le cas d'une utilisation clinique (Traktuev et al. 2009). Des CSTA différenciées ou non en adipocytes en présence d'HUVEC ont été ensemencées dans une matrice à base de protéines de soie et des lumens ont été quantifiés dans les deux types de tissus *in vitro* (Kang et al. 2009). Bien que la leptine soit produite par les tissus adipeux reconstruits, démontrant une fonctionnalité du tissu, la coloration et la quantification des lipides par la méthode de l'Oil Red O (ORO), quant à elle, ne révèle que très peu d'adipocytes remplis de lipides toujours présents dans le tissu. Sorrell et al. proposent, quant à eux, un modèle basé sur la méthode d'auto-assemblage impliquant plusieurs types de cellules, dont des CSTA différenciées en adipocytes, des fibroblastes, des BM-MSc et des HUVEC (Sorrell et al. 2011). Les auteurs mentionnent que la coculture des CSTA différenciées en adipocytes et des cellules endothéliales seule ne suffisait pas pour supporter la formation de tubules vasculaires, d'où l'introduction de populations cellulaires supplémentaires dans le modèle capables de supporter la formation du réseau vasculaire *in vitro* (fibroblastes dermiques, CSTA et BM-MSc) par la production de facteurs de croissance et de matrice extracellulaire. Plus récemment, Yao et al. ont proposé un modèle de tissu adipeux enrichi en cellules endothéliales sous forme de microsphères de collagène et d'alginate (Yao et al. 2013b). Ce modèle semble approprié pour des études d'interactions entre les cellules adipeuses et endothéliales *in vitro* (Yao et al. 2013a), mais son utilisation en clinique est surtout limitée par la taille des microsphères (diamètre d'environ 40 µm).

## 1.4 Problématique et objectifs

Il a été abordé précédemment que divers traumatismes peuvent nécessiter le recours à des tissus de remplacement en chirurgie de reconstruction. On assiste également à une demande croissante de tissus mous pour combler les zones atrophiées résultant de pertes de tissus causées par des brûlures profondes, des maladies comme les lipodystrophies et des résections de tumeurs, entre autres. La reconstruction de tissus mous par génie tissulaire représente une alternative prometteuse pour pallier ce manque de tissus utilisés en chirurgie de reconstruction. Les CSTA, cellules stromales/souches multipotentes extraites du tissu adipeux, peuvent être employées dans la reconstruction de tissus conjonctifs et adipeux par génie tissulaire dont les applications sont diversifiées : les tissus conjonctifs ont la possibilité de former un derme dans une peau reconstruite (Trottier et al. 2008) ou un stroma pour des substituts vésicaux (Rousseau et al. 2013). Pour leur part, les tissus adipeux peuvent agir en tant qu'hypoderme dans une peau reconstruite (Trottier et al. 2008), et comme tissu adipeux de remplissage en chirurgie maxillo-faciale ou à la suite d'une résection d'une tumeur. Comme la vascularisation précoce des tissus greffés est déterminante pour leur survie, notre équipe propose d'utiliser un modèle basé sur la méthode d'auto-assemblage pour la reconstruction de tissus conjonctifs et adipeux enrichis d'un réseau de capillaires formé *in vitro* qui aurait la possibilité de se connecter au réseau de l'hôte une fois greffé. Ces tissus ne contiennent aucun biomatériau exogène et les cellules utilisées ont la possibilité d'être complètement autologues (CSTA et cellules endothéliales microvasculaires dermiques), évitant donc un rejet immunologique. La matrice dont ces tissus sont constitués est abondante et représentative du tissu adipeux natif étant donné que les protéines qui la composent sont sécrétées par les cellules stromales et adipeuses dans le tissu même. Enfin, la possibilité de produire des tissus conjonctifs et adipeux à partir de la même population cellulaire représente un avantage important dans une étude où la comparaison des deux modèles est impliquée.

De plus, puisque ces modèles de tissus reconstruits sont produits à partir de cellules humaines, que ces dernières sécrètent une matrice extracellulaire complexe, et qu'ils ont été démontrés comme fonctionnels (Vermette et al. 2007), ils ont le potentiel de devenir des outils à considérer dans l'étude de processus reliés à l'adipogenèse et l'angiogenèse *in vitro*.

Il a également été vu que le tissu adipeux est un organe endocrine important chez l'humain et qu'il sécrète de nombreuses molécules bioactives. Comme les adipocytes présents dans les tissus adipeux reconstruits sécrètent de nombreuses molécules aux propriétés angiogéniques et que plusieurs applications sont possibles pour ces tissus reconstruits, nous avons voulu déterminer si les réseaux de capillaires étaient équivalents entre

les deux types de tissus. Ainsi, nous avons posé l'**hypothèse** selon laquelle les adipocytes présents dans les tissus adipeux reconstruits pourraient influencer le réseau de capillaires résultant *in vitro*.

L'objectif général de ce projet est donc de comparer les réseaux de capillaires formés *in vitro* dans les tissus conjonctifs et adipeux reconstruits, produits à partir de cellules stromales/souches induites ou non à la différenciation adipocytaire.

**Le premier objectif** spécifique de ce projet consiste à comparer les réseaux de capillaires retrouvés dans chacun des deux types de tissus, au niveau du volume total de capillaires par tissu et du diamètre des capillaires formés. Ainsi, les réseaux de capillaires ont été quantifiés et caractérisés à la suite d'une reconstruction virtuelle du réseau obtenue par imagerie confocale, permettant d'analyser une grande surface du tissu, et ce, sur sa pleine épaisseur. Ces analyses ont également permis de comparer les réseaux de capillaires formés *in vitro* à ceux retrouvés dans le tissu adipeux humain.

**Le deuxième objectif** spécifique est de comparer les profils de sécrétion de molécules bioactives sécrétées par les tissus conjonctifs et adipeux reconstruits, enrichis ou non en cellules endothéliales, pouvant influencer le développement du réseau de capillaires dans chacun des deux types de tissus. Pour ce faire, nous avons procédé au dosage protéique par ELISA de cinq molécules sécrétées par les tissus ayant un rôle au niveau de la modulation de l'angiogenèse dans le tissu adipeux, soit la leptine, le VEGF, le HGF, l'angiopoïétine-1 et le PAI-1.

Les tissus conjonctifs et adipeux reconstruits enrichis en cellules endothéliales ont la capacité de former un réseau de capillaires *in vitro*, ce qui pourrait avantager la survie des tissus lors d'une utilisation potentielle en chirurgie de reconstruction. Ces tissus comportent également plusieurs caractéristiques qui miment le tissu adipeux humain, ce qui en font des outils à considérer pour l'étude de l'angiogenèse et de l'adipogenèse *in vitro*.



**Chapitre 2 : Formation de réseaux de capillaires dans des tissus humains produits par génie tissulaire : impact des adipocytes et de leurs produits sécrétoires.**



## 2.1 Avant-Propos

Ce chapitre fait l'objet d'un article intitulé **Creating capillary networks within human engineered tissues: impact of adipocytes and their secretory products** soumis pour publication dans le journal *Acta Biomaterialia* en juin 2014 et co-écrit par Kim Aubin, Caroline Vincent, Maryse Proulx, Dominique Mayrand et Julie Fradette.

Je suis co-premier auteur de ce manuscrit avec Caroline Vincent dont les travaux antérieurs ont permis la mise au point et l'optimisation de la production des tissus enrichis en cellules endothéliales avec le soutien de Maryse Proulx. Caroline Vincent a également procédé aux caractérisations initiales des capillaires (coupes congelées) et effectué de nombreux dosages protéiques inclus dans les résultats. J'ai contribué à la production de ce manuscrit par la conception et la réalisation de reconstructions de tissus adipeux et conjonctifs selon le modèle optimisé. J'ai procédé à la quantification et l'analyse détaillée des réseaux de capillaires formés *in vitro* dans les tissus reconstruits en utilisant les nouveaux outils d'imagerie confocale et les logiciels spécialisés. Dominique Mayrand a mis au point les méthodes d'immunomarquages et d'acquisition des images confocales appliquées aux tissus reconstruits *in toto* que j'ai par la suite utilisées dans le cadre d'expériences subséquentes. J'ai également procédé aux dosages protéiques, en plus de compiler et d'analyser les résultats totaux. J'ai conçu la figure 2.1, effectué le montage des figures et participé activement à l'écriture du manuscrit sous la supervision de Dr Julie Fradette.





## 2.2 Résumé

La vascularisation rapide d'un tissu lors d'une greffe est un paramètre clé pour la survie du greffon. Nous avons produit par génie tissulaire des tissus conjonctifs et adipeux à l'aide de cellules stromales/souches du tissu adipeux et favorisé la formation d'un réseau de capillaires *in vitro* par l'ajout de cellules endothéliales microvasculaires dans le modèle. Notre hypothèse propose que la présence des adipocytes dans les tissus adipeux reconstruits ou leurs produits sécrétoires auront une influence sur les réseaux de capillaires résultants. Ces derniers ont été comparés entre les tissus adipeux et conjonctifs et les analyses montrent plusieurs similarités au moment de l'analyse. Bien que les tissus adipeux reconstruits sécrètent davantage de molécules pro-angiogéniques lors des étapes précoces de production des tissus, la différence observée entre les profils de sécrétion est atténuée en présence du milieu de coculture. Le protocole établi permet la production de tissus conjonctifs et adipeux reconstruits présentant un réseau développé de capillaires préformés adéquat pour la greffe et permettant l'étude *in vitro* de processus angiogéniques dans un modèle tridimensionnel.



## 2.3 Manuscrit soumis pour publication

### Creating capillary networks within human engineered tissues: impact of adipocytes and their secretory products

Kim Aubin <sup>#a,b</sup>, Caroline Vincent <sup>#a,b</sup>, Maryse Proulx<sup>a,b</sup>, Dominique Mayrand<sup>a,b</sup> and Julie Fradette<sup>\*a, b, c</sup>

<sup>a</sup>Centre de recherche en organogénèse expérimentale de l'Université Laval / LOEX

<sup>b</sup>Division of Regenerative Medicine, CHU de Québec Research Centre

<sup>c</sup>Department of Surgery, Faculty of Medicine, Université Laval, Québec, QC, Canada

# Both authors contributed equally

\* Corresponding author:

Julie Fradette, PhD

LOEX, Aile-R, Hôpital Enfant-Jésus

CRCHU de Québec

1401, 18e Rue

Québec, QC, G1J 1Z4

Tel: 1-418-990-8255 Ext. 1713

Fax: 1-418-990-8248

Julie.fradette@chq.ulaval.ca

[www.loex.qc.ca](http://www.loex.qc.ca)

Running title: Impact of microenvironment on capillary networks *in vitro*

Keywords: Adipose-derived stem/stromal cells, adipose substitute, tissue engineering, endothelial cells, capillary formation, confocal microscopy.



### 2.3.1 Abstract

The development of tissue-engineered substitutes of substantial volume is closely associated with the need to ensure rapid vascularisation upon grafting. Strategies promoting angiogenesis include the *in vitro* formation of capillary-like networks within engineered substitutes. We generated both connective and adipose tissues based on a cell sheet technology using human adipose-derived stromal cells. This study evaluates the morphology and extent of the capillary networks that developed upon seeding of human microvascular endothelial cell during tissue production. We posited that adipocyte presence/secretory products could modulate the resulting capillary network when compared to connective substitutes. Analyses including confocal imaging of CD31-labeled capillary-like networks indicated slight differences in their morphological appearance. However the total volume occupied by the networks as well as the frequency distribution of the structure's volumes were similar between connective and adipose tissues. Average diameter of the capillary structures tended to be 20% higher in reconstructed adipose tissues. Quantification of pro-angiogenic molecules in conditioned media showed greater amounts of leptin (15x), angiopoietin-1 (3.4x) and HGF (1.7x) secreted from adipose than connective tissues at the time of endothelial cell seeding. However, this difference was attenuated during the following coculture period in endothelial cell-containing media, correlating with the minor differences noted between the networks. Taken together, we developed a protocol allowing reconstruction of both connective and adipose tissues featuring well-developed capillary networks *in vitro*. We performed a detailed characterization of the network architecture within engineered tissues that is relevant for graft assessment before implantation as well as for *in vitro* screening of angiogenic modulators using 3D models.



## 2.3.2 Introduction

Adipose tissue (AT) is endowed with great plasticity. Expansion and regression of fat depots occur throughout life. Such variations in adipose volume are generally accompanied by a concomitant adaptation of the local fat pad vascular supply [1-3]. AT features a well-defined vascular network comprising many capillaries surrounding lipid-filled adipocytes [4, 5]. This vasculature is central in mediating the metabolic roles of AT as an endocrine and paracrine organ. The numerous growth factors, hormones and pro-angiogenic factors that are produced by adipose tissue and collectively termed adipokines are now recognized as essential regulators of many biological processes including lipid metabolism, angiogenesis, reproduction and immunometabolism [6-9]. Secreted molecules from both mature adipocytes and from cell populations of the stromal-vascular fraction contribute to the adipose tissue secretome [10]. The stromal fraction contains various cell types *in vivo* including the subpopulation of cells featuring multipotent differentiation capabilities that can be extracted and amplified *in vitro* named ASCs (adipose-derived stromal/stem cells) [11]. The therapeutic effect of ASC-based cellular therapies is also reported to be mainly mediated by their trophic and paracrine functions [6, 12].

In situations necessitating soft tissue augmentation, autologous fat grafting is still the gold standard procedure. However, lipoinjections likely disrupt both adipocytes and the adipose graft vascular network, which might be contributing factors to the rather limited and variable long-term volume retention achieved by fat transfer methods in general [13, 14]. Consequently, the field of adipose tissue engineering has thrived in recent years. Various models are currently developed to help circumvent some of the actual limitations associated with fat grafting [15-17]. One of tissue engineering biggest challenges resides in the production of thick substitutes needing to be quickly and adequately vascularized after grafting. That also holds true for adipose tissues reconstructed for regenerative medicine purposes. One strategy is to favor early inosculation of the graft to the host circulation, which requires the presence of a preformed capillary network *in vitro* [18]. This can be achieved by the incorporation of endothelial cells at different steps of tissue production [19, 20].

Using ASCs as building blocks for tissue engineering by the self-assembly approach, we have reconstructed natural and functional human tissues [21]. ASCs being particularly performant for extracellular matrix deposition and cell-sheet formation, connective tissues can readily be reconstructed upon serum and ascorbic acid (AsA) stimulation in culture [22]. These human reconstructed connective tissues (hrCT) can find applications as such or as stromal compartments (dermis) upon which keratinocytes can be seeded for skin substitute production [23]. When combined with an adipogenic induction step during production, the resulting adipose tissues (hrAT)

feature functional adipocytes embedded into native extracellular matrix (ECM), as assessed by their capacity to mediate  $\beta$ -adrenergic lipolysis and secrete various adipokines [21, 24].

In this study, we demonstrate that human microvascular endothelial cells (hMVEC) incorporation at specific steps during tissue production results in the spontaneous formation of capillary-like networks both in hrCt and hrAT. We tested the hypothesis that adipocytes and their potent secretory products could modulate the resulting capillary network when compared to connective substitutes produced from the same cell populations in absence of adipogenic stimulation. Our results indicate that under specific culture conditions, hMVEC self-organize to form microvascular networks without impacting on tissue thickness or adipocyte development. The resulting CD31-labeled networks imaged by confocal microscopy were well-developed and slight variations in their morphology were associated with adipocyte presence. Bioactive molecules known to influence angiogenic processes were evaluated in conditioned media at various time-points during tissue production. Although the microenvironment seen by hMVEC was distinct in presence of adipocytes at the time of hMVEC seeding, this difference was attenuated during the following period in endothelial cell coculture media, therefore limiting the direct impact of adipocyte-derived factors. In combination with detailed imaging of capillary networks, these engineered tissues represent relevant adipose models for investigation of pro- and anti-angiogenic compounds in addition to their intended use in regenerative medicine.



## 2.3.3 Materials and methods

### 2.3.3.1 Cell isolation and amplification

All protocols were approved by the Institutional review board of the CRCHU de Québec. Human ASCs were extracted using collagenase digestion of tissues obtained after lipoaspiration procedures (N= 4 cell populations). Female donor's mean age was  $38.3 \pm 2.4$  years and mean body mass index was  $28.3 \pm 0.93$ . hASCs were amplified in standard culture medium (DH) composed of 1:1 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM): Ham's F12 medium (H) (Life Technologies, Burlington, ON, Canada) supplemented with 10% foetal calf serum (FCS) (HyClone, Logan, UT, United States) and antibiotics [100 U/ml penicillin (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) and 25 µg/ml gentamicin (Schering-Plough Canada Inc./Merck, Scarborough, ON, Canada)] (Table 2.1). They were batch frozen at passage (P) 0 until being used for tissue reconstruction [21].

Human microvascular endothelial cells (hMVEC) were kindly provided by V. Moulin and S. Chabaud. Briefly, cells were extracted from the dermis of a 59 year-old female donor as described previously [20], with the modification that the skin biopsy was incubated overnight in thermolysin solution (Sigma) [25] instead of dispase. Thawed cells were plated at  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> density on gelatin-coated culture dishes (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada) in endothelial cell media consisting of complete EGM™-2MV BulletKit™ (EGM2) media (Clonetics/Lonza, Walkersville, MD, USA) containing 5% foetal bovine serum (FBS) and antibiotics [100 U/ml penicillin (Sigma-Aldrich) and 25 µg/ml gentamicin (Schering-Plough Canada Inc./Merck) instead of the GA-1000 (Gentamicin, Amphotericin-B) provided by manufacturer], amplified and used at P6 in endothelialized reconstructed tissues.

### 2.3.3.2 Production of human connective and adipose reconstructed tissues

For tissue reconstruction, hASCs were used at P3-5. After thawing, cells were seeded in DH media at  $8 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> into Nunc flasks (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) [26]. After expansion, hASCs were seeded onto 6 Nunc well-plates for tissue production at a density of  $1.56 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>, in presence of 50 µg/ml (250 µM) AsA (Sigma-Aldrich) freshly prepared at each media change (every 2-3 days). After 7 days of culture, half of the plates were induced towards adipogenic differentiation for 3 days using a defined cocktail [100 nM insulin (Sigma), 0.2 nM T3 (Sigma), 1 µM dexamethasone (Sigma), 0.25 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) (Sigma) and 1 µM rosiglitazone (Cayman Chemical/ Cedarlane, Burlington, ON, Canada)] in 3% FCS-containing medium, followed by culture in adipocyte maintenance media for the rest of the culture period [21, 26]. Mock-induced cells were cultured for 3 days in DH media with 3% FCS and 0.038% dimethyl sulfoxide

(DMSO, diluent for IBMX and rosiglitazone), followed by culture in 10% FCS DH media until endothelial cells seeding (see Table 2.1).

After 21 days in culture and 14 days of adipogenic differentiation, hMVEC at a density of  $2.08 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> were added to a subset of the cultures previously induced or not towards adipogenesis (Fig. 2.1). Culture was performed in a mixed coculture media for both adipocytes and hMVEC, namely a (1:1) ratio of EGM2 media (5% FBS) and DH adipocyte maintenance media (10% FCS), also supplemented with AsA (Table 2.1). Cell cultures onto which no hMVEC were added were also cultured into the mixed (1:1) EGM2: DH or adipogenic maintenance media for proper comparative purposes. At day 30 of culture (and day 23 of adipocyte differentiation), the matrix secreted and organized by the cells formed a manipulatable cell sheet, containing or not adipocytes and/or hMVEC. Thicker tissues were then engineered by the superposition of 3 cell sheets (maintaining their initial orientation with hMVEC on top). These reconstructed tissues were further cultured for 12 days to favor cohesion between cell sheets before being analyzed at day 42 of culture. Therefore, hMVEC have been present in the engineered tissues for a total of 21 days. hMVEC seeding was also performed at earlier time-points during optimisation, as indicated in Fig. 2G (after 3 and 7 days of adipogenic induction). Reference tissues were also produced for the analysis of conditioned media. These adipose and connective tissues devoid of hMVEC were cultured in adipogenic or DH media only for similar culture periods (Table 2.1).

### 2.3.3.3 Histological analyses and measurements

Formalin-fixed paraffin embedded samples of the different tissues were analyzed after Masson's trichrome staining of 5  $\mu$ m-thick sections. Pictures were acquired on a microscope Nikon Eclipse Ts100 equipped with a Nikon Coolpix 4500 camera (Nikon, Montreal, Qc). Thickness determination was performed on tissue cross-sections using the ImageJ 1.48 software (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). For each type of construct, 2-5 tissues from 4 different donors were evaluated. A minimum of 12 pictures per tissue were acquired and 3 measurements were taken per picture.

### 2.3.3.4 Quantification of adipose differentiation by Oil Red O staining

Oil Red O (ORO) staining and quantification of the cytoplasmic droplets of neutral lipids was performed on adipose and their control connective sheets after a typical 14-15 day period after adipogenic induction [21]. Induction of differentiation was performed at day 7 of culture while hMVEC seeding was performed either at day 10, 14 or 21 of culture. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of the ORO values obtained for each cell

population. ORO values represent the optical density (OD) readings obtained for differentiated cultures minus the OD reading of their undifferentiated counterparts (baseline values).

### 2.3.3.5 Immunolabelings and analyses on tissue cryosections

Immunolabelings were performed on tissue samples embedded in OCT compound (Tissue-Tek, Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Height  $\mu\text{m}$  thick acetone-fixed cross-sections were labeled with primary antibodies diluted in 1% w/v BSA (Sigma) in phosphate buffered saline (PBS) for 45 min at RT, rinsed in PBS and then incubated for 30 min with secondary antibodies. Negative controls were performed by incubating tissue sections with a murine IgG1 isotype antibody (Dako, Burlington, ON, Canada). Primary antibody was a mouse monoclonal antibody (IgG1) against human CD31 (Chemicon/Millipore, Temecula, CA, USA) and secondary antibody was a rabbit anti-murine IgG (H+L)-coupled Alexa 594 (Molecular Probes/Life Technologies, Burlington, ON, Canada). Hoechst 33258 (Sigma, 5 mg/ml) counterstaining was performed for 10 min in order to visualize nuclei. Pictures were acquired on an epifluorescence Nikon Eclipse E600 microscope equipped with a Sensys digital camera. Cryosections were first used to evaluate the total number of CD31<sup>+</sup> structures per field as well as the number of CD31<sup>+</sup> structures featuring a visible lumen. The internal surface area of each visible lumen was also measured and an estimated capillary diameter was calculated from it. These analyses were performed on tissues produced from different donors (N=2) for which 2-3 tissues of each condition was reconstructed. A minimum of 20 fields per sample was assessed (60 fields per condition).

### 2.3.3.6 Confocal imaging and analyses

For confocal imaging on whole-mount tissues, the immunolabeling protocol described below has been inspired from Dent et al., Dickie et al. and Zucker [27-29]. Thus, formalin-fixed free-floating tissue samples (about 9 mm<sup>2</sup>) were dehydrated following incubations in 50% and 100% methanol solutions successively before being permeabilized in Dent's fixative (75% methanol, 25% DMSO) for two hours at room temperature and incubated overnight in 1:3 Dent's fixative and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% solution at 4°C. Rehydration occurred with successive incubations in methanol 50% and in PBS before incubation at 4°C for 48h in 1% w/v BSA (Sigma) solution containing sheep anti-human CD31 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA, AF806, 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and rabbit anti-human laminin (Abcam, AB1575, 7.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) primary antibodies, or isotypic sheep (Millipore) and rabbit (R&D Systems) antibodies as negative controls. After being washed in PBS to remove non-specific binding, samples were incubated with donkey anti-sheep IgG-coupled Alexa 633 (A-21100) and donkey anti-rabbit IgG-coupled Alexa 488 (A-21206) secondary antibodies (Molecular Probes) in 1% w/v BSA for 48h at 4°C. Labeled tissues were washed three times in PBS and dehydrated as previously described. Optical clearing of tissues was performed

by successive incubations in 33%, 66% and 100% methylsalicylate (Sigma) solutions before being mounted in methylsalicylate and sealed with nail varnish.

Confocal microscopy allowed to acquire images of a large surface area ( $928.38 \mu\text{m} \times 928.38 \mu\text{m}$ ) and to observe capillary networks through the thickness of the tissues ( $63 \pm 13 \mu\text{m}$ ). Capillary network analysis was performed on a total of 17 reconstructed adipose and 18 connective tissue samples produced from 3 different cell populations with up to 3 tissues per condition. Images were acquired with a Zeiss LSM700 scanning laser confocal microscope and image software (2011, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Germany). Capillary network volume analyses were performed on the entire tridimensional (3D) renderings of confocal microscope images for each tissue sample with the Imaris 7.0.0 Bitplane software. The vascular structures under  $1\,000 \mu\text{m}^3$  were not considered. Frequency distribution determination was performed on selected intervals of volumes for the vascular structures on 3D reconstructed images. The same labelling process was performed on formalin-fixed human native adipose tissue samples (about  $9 \text{ mm}^3$ ) to allow the comparison to human fat. Two to four samples from 4 different donors were analysed as described above for a similar surface area ( $928.38 \mu\text{m} \times 928.38 \mu\text{m}$ ) while an average of  $92 \pm 29 \mu\text{m}$  tissue thickness was analyzed.

Confocal images were also processed using Zen software (Zeiss) to obtain 2D representations of initial 3D images by applying a « Maximum Intensity Projection » method. Capillary mean diameters were measured on those 2D representations of confocal acquisitions with the ImageJ software. Briefly, each capillary diameter was obtained by the mean of 5 measures per capillary. Then, between 10 and 20 representative capillary diameters were measured per tissue sample for a total of 40-120 capillary diameters per population, per condition (adipose or connective tissues) from which the 40 highest diameters were used to calculate the mean capillary diameter.

#### 2.3.3.7 Quantification of secreted products from reconstructed tissues (ELISA)

ELISA assays for human adipokines and bioactive molecules (Leptin, angiopoietin-1, PAI-1, HGF, VEGF, angiopoietin-2) were used as per manufacturer's instructions to establish the secretion profile of the reconstructed tissues during their production (Duosets, R&D systems). Supernatants (mean of 48h incubation) were harvested at different time-points during tissue production and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until assays were performed. Controls consisted of same complete media incubated in absence of cells. Analyses were performed for 2-7 different cell populations per time point, with 1-4 sheets or tissues per condition. Some assays were repeated twice. Results are expressed as  $\text{pg}/\mu\text{g}$  of total protein per reconstructed sheet or tissue. The total protein content of the supernatants were determined by BCA protein assay (Pierce, Rockford, IL, USA) and used to normalize quantification of secreted products. Reagents were added as specified by manufacturer's instructions to proper

supernatant dilutions and standards, then incubated for one hour at 37°C before reading at 562 nm using a SpectraMax Plus spectrometer with SoftmaxPro Ver 4.7.1.

### 2.3.3.8 Statistical analyses

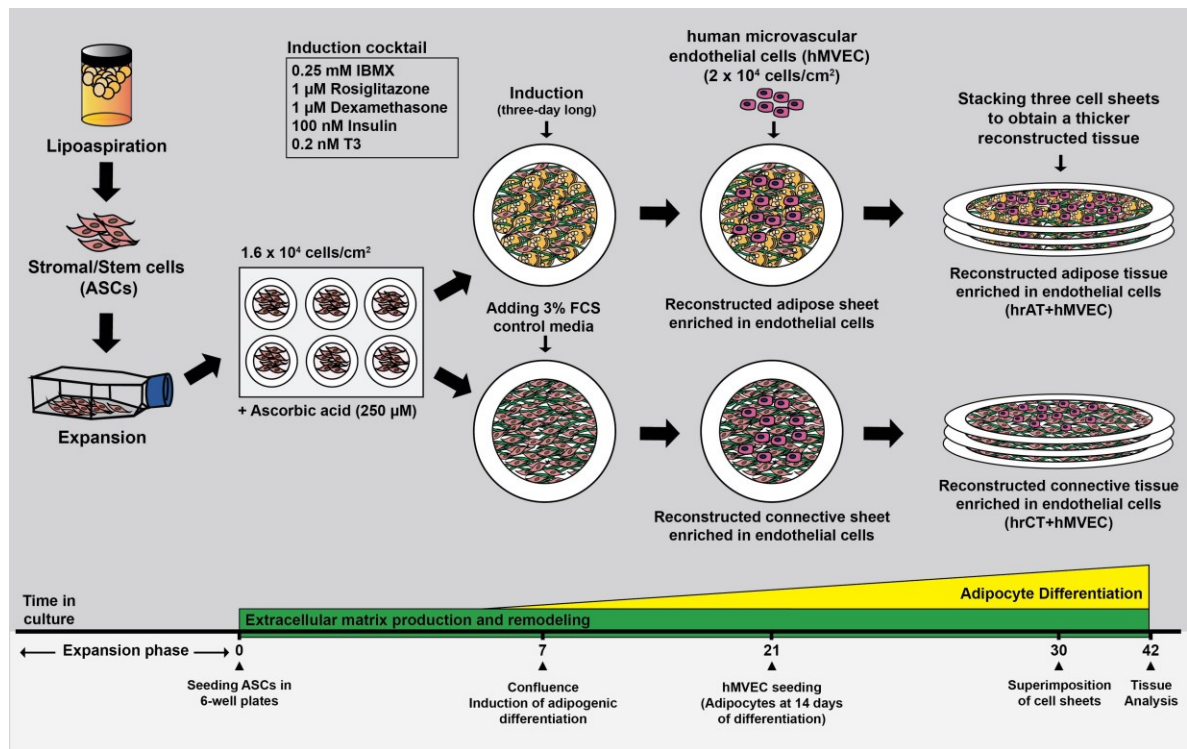
Data are represented as mean  $\pm$  SEM. Unless specified, One-way ANOVA or unpaired t tests were used for statistical comparisons using the GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software Inc., LaJolla, CA, USA). The confidence interval was set at 95% ( $P < 0.05$ ).

## 2.3.4 Results

### 2.3.4.1 Defining optimal conditions for production of endothelialized tissues

Our technology for the reconstruction of human tissues devoid of exogenous biomaterial is based on cell sheet engineering [21, 24, 26]. The key feature of this self-assembly approach of tissue engineering resides on the stimulation of ASCs with ascorbic acid and serum, which results in endogenous ECM production and assembly into cell sheet after an extended culture period (Fig. 2.1). When individual cell sheets are then lifted from the culture plates and superposed, reconstructed connective tissues are produced. If a specific step for induction of adipogenesis is performed after 7 days of such culture, extensive differentiation towards adipocyte lineage can be observed, leading to the production of reconstructed adipose tissues (Fig. 2.1).

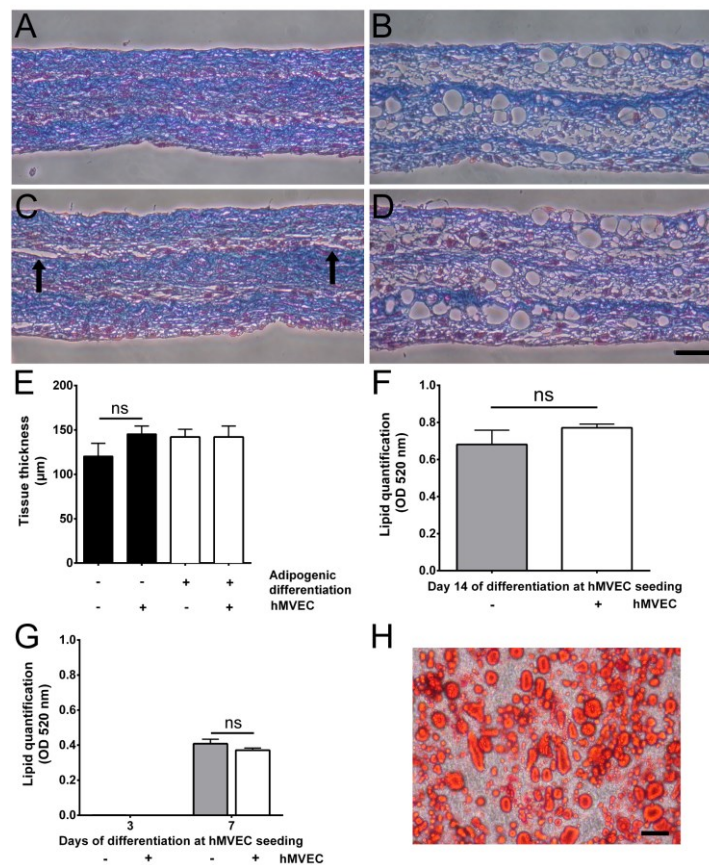
First, we aimed to develop a protocol enabling reconstruction of both connective (hrCT) and adipose (hrAT) tissues containing a capillary network in vitro. Then, we determined if the presence of differentiated adipocytes and their secreted factors would impact on endothelial cell self-organization into tubular structures and affect the morphology of the resulting capillary-like networks. This is of particular interest since one of the challenges faced in reconstructive surgery is the need to provide sufficient blood perfusion to the grafted tissue. One way to achieve early perfusion is to implant reconstructed tissues containing an in vitro preformed network to facilitate inosculation with the host circulation [30].



**Figure 2.1. Schematic representation of tissue production according to the self-assembly method of tissue engineering.** Both connective (hrCT) and adipose (hrAT) reconstructed tissues were produced using the self-assembly approach of tissue engineering based on enhanced matrix deposition leading to cell sheet formation upon cell stimulation with ascorbic acid and serum. Incorporation of endothelial cells in the constructs was achieved by seeding the upper surface of individual cell sheets that were then superimposed to create thicker tissues. Accordingly, four types of tissues were generated since connective and adipose tissues without hMVEC were also produced following the same steps but replacing cells with respective media only.

After optimization, successful production of hrCT and hrAT enriched in hMVEC was achieved. Seeding of hMVEC onto the tissue sheets was performed at day 21 of culture, namely 9 days before their superposition (3 cell sheets) followed by further cultivation for 12 days (Fig. 2.1). While adipocyte presence is easily noticed among matrix elements on tissue histological cross-sections (Fig. 2.2B vs A), constructs enriched with hMVEC were very similar to their counterparts into which no hMVEC were incorporated (Fig. 2.2D vs B). While some tubule-like structures cross-sections (lumen) could sometimes be identified for connective tissues (Fig. 2.2C, arrows), their detection was highly difficult in presence of adipocytes (Fig. 2.2D). The latter appear as rounded void spaces resulting from lipids extracted during tissue processing. Interestingly, neither adipogenic differentiation nor hMVEC addition impacted of tissue thickness (Fig. 2.2E). Moreover, hMVEC seeded and cultured during 8 days on these cell sheets containing 14 day-differentiated adipocytes at the time of seeding did not impact on final lipid accumulation as determined by neutral lipids quantification after ORO staining (Fig. 2.2F, H). This is important, because protocols for production of prevascularized hrAT must support three biological processes in parallel: optimal ECM production, adipogenic differentiation and development of capillary-

like structures by endothelial cells. Finding the right coordinated sequence for cell seeding and specialized media supplementations (adipogenic induction vs hMVEC media) during tissue production is of utmost importance (Table 2.1). We noted that seeding hMVEC earlier during the differentiation process, on cell sheet containing young adipocytes differentiated for only 7 days, was also compatible with adipose tissue production and did not impact on the resulting lipid accumulation (Fig. 2.2G). However, seeding hMVEC on cell sheets only 3 days after adipogenic induction, resulted in complete abrogation of adipocyte development (Fig. 2.2G). This is likely due to the EGM2 media used to support hMVEC proliferation since control EGM2 media without hMVEC also inhibited differentiation on its own (Fig. 2.2G).



**Figure 2.2. Reconstructed tissue characterization.** (A-D) Representative histological appearance of engineered constructs. Tissue cross-sections were stained with Masson's trichrome for human reconstructed A) connective and B) adipose tissues, and their respective counterparts seeded with endothelial cells in C and D, respectively. E) Adipogenic differentiation or hMVEC incorporation did not affect tissue thickness. F) Co-culturing endothelial cells for 8 days on reconstructed adipose sheets containing adipocytes differentiated for 14 days did not interfere with adipocyte maturation. G) hMVEC seeded unto cell sheets containing younger adipocytes (d7 of differentiation) did not affect lipid accumulation (over 14 days of culture) while it abrogated adipocyte development when seeded only 3 days after adipogenic induction. H) Typical appearance after Oil Red O staining of an adipose cell sheet after 22 days of *in vitro* differentiation. Bars: 50 μm.

**Tableau 2.1. Media composition at different steps of tissue production**

Time in culture (day)	Culture step	Connective (hrCT)	Adipose (hrAT)
0-7	Expanding cells in 6-well plates	DH medium (1:1 DMEM : Ham's F12) + 10% FCS + 250 $\mu$ M AsA	DH medium (1:1 DMEM : Ham's F12) + 10% FCS + 250 $\mu$ M AsA
7	Induction of adipogenesis	DH medium (3% FCS) + 0.038% DMSO + 250 $\mu$ M AsA	DH medium (3% FCS) + 100 nM insulin, 0.2 nM T3, 1 $\mu$ M dexamethasone, 0.25 mM IBMX and 1 $\mu$ M rosiglitazone + 250 $\mu$ M AsA
21-42 (-hMVEC, -EGM2)	Culture without hMVEC	DH medium (10% FCS) + 250 $\mu$ M AsA	Adipogenic maintenance medium [DH medium (10% FCS) + 100 nM insulin, 0.2 nM T3, 1 $\mu$ M dexamethasone] + 250 $\mu$ M AsA
21-42 (+ hMVEC, +EGM2)	Coculture with hMVEC	1:1 DH (10% FCS) : EGM2 (5% FBS) + 250 $\mu$ M AsA	1:1 Adipogenic maintenance medium : EGM2 (5% FBS) + 250 $\mu$ M AsA
21-42 (-hMVEC, +EGM2)	Culture without hMVEC (control)	1:1 DH (10% FCS) : EGM2 (5% FBS) + 250 $\mu$ M AsA	1:1 Adipogenic maintenance medium : EGM2 (5% FBS) + 250 $\mu$ M AsA

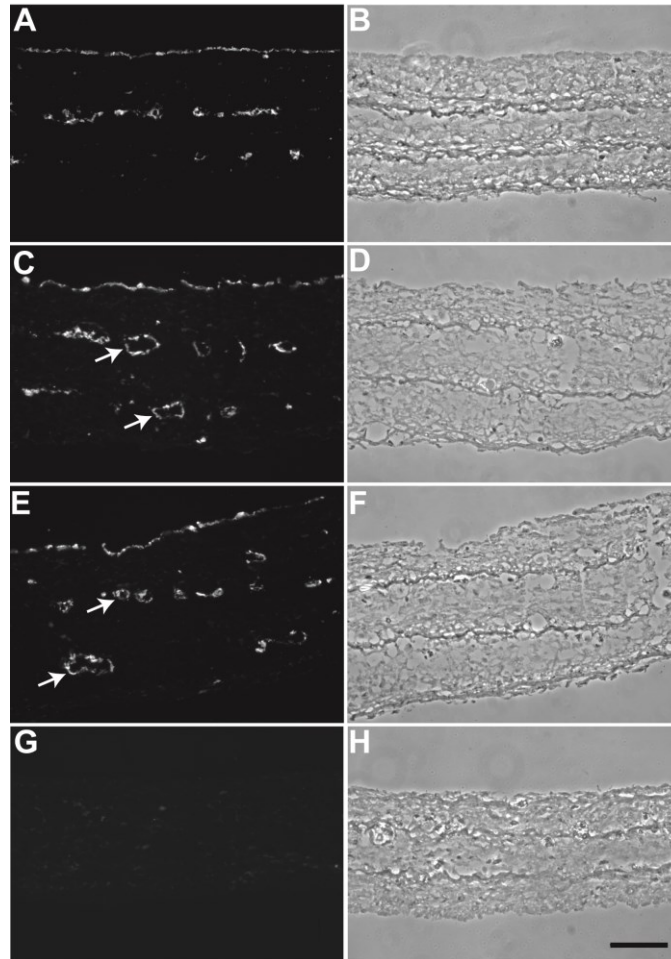
### 2.3.4.2 Revealing the endothelial networks formed in presence or absence of adipocytes

#### 2.3.4.2.1 Analysis of endothelial structures on tissue cryosections

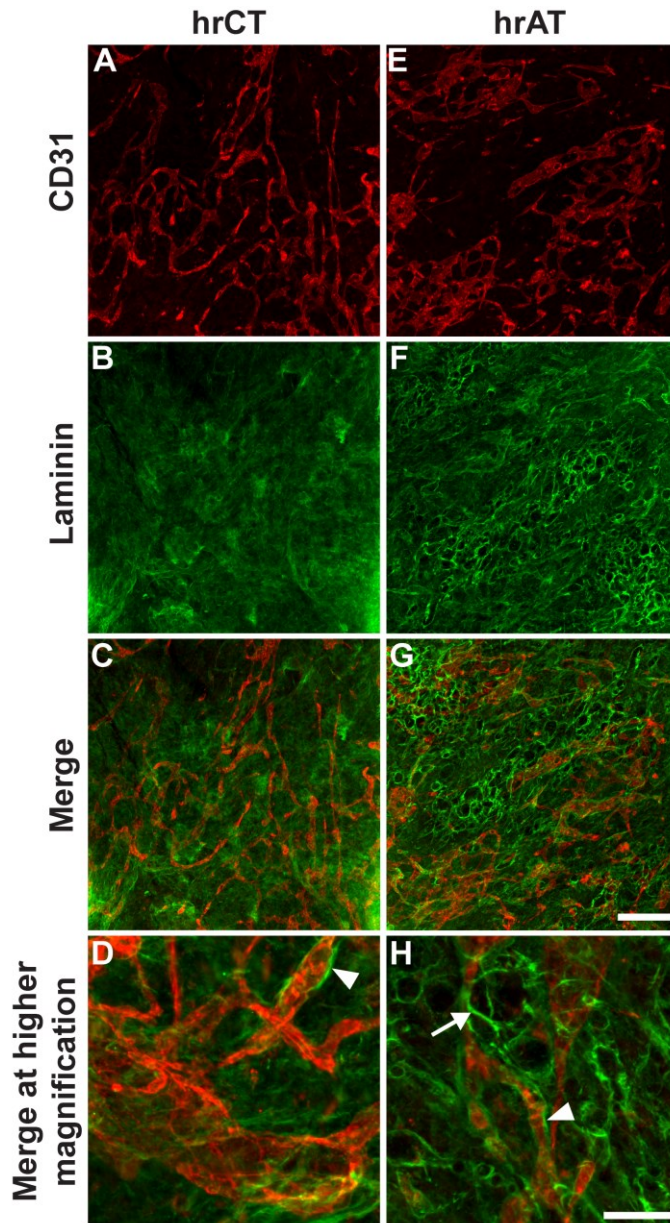
Immunolabelings on thin tissue cross-sections for the cell surface marker CD31 expressed by vascular cells including endothelial cells [31] clearly revealed that hMVEC reorganized themselves to form tubular structures when surrounded by ECM (Fig. 2.3, arrows). Importantly, CD31 expression was not detected in tissues that were not seeded with endothelial cells (Fig. 2.3G). As expected from our culture conditions of expanded cells at passage 3, no spontaneous differentiation of ASCs into CD31-expressing cells or no remaining AT-derived endothelial cells were observed. While the total number of CD31-expressing structures remained the same between connective and adipose tissues (Table 2.2), structures featuring a clearly defined internal lumen (Fig. 2.3C, E arrows) were more numerous for adipose tissues. Namely, the mean percentage of such tubular structures on these labeled tissue cross-sections was twice higher in presence of adipocytes (Table 2.2). This analysis was performed according to classical observations of multiple sequential cryosections which is time-consuming and dependent on the sectioning angle. Therefore, the presence of numerous CD31-expressing structures within hrCT and hrAT was best revealed using confocal microscopy after labelings of whole-mount



samples (Fig. 2.4A, E). Staining for laminin (Fig. 2.4B, F) revealed the presence of a basement membrane around adipocytes (Fig. 2.4H, arrow) as well as lining the external surface of capillary-like structures (Fig. 2.4D, H, arrowheads).



**Figure 2.3. Detection of tubular structures formed by hMVEC within reconstructed tissues.** Transversal cryosections of A-B) connective and C-F) adipose reconstructed tissues seeded with hMVEC after immunolabeling for CD31. Lumen-like structures (arrows) can be identified more easily on adipose tissue sections. G-H) Adipose tissues not enriched in hMVEC do not reveal CD31-expressing cells or structures. B, D, F, H are corresponding phase contrast images of A, C, E, G, respectively. Bar: 100  $\mu$ m.

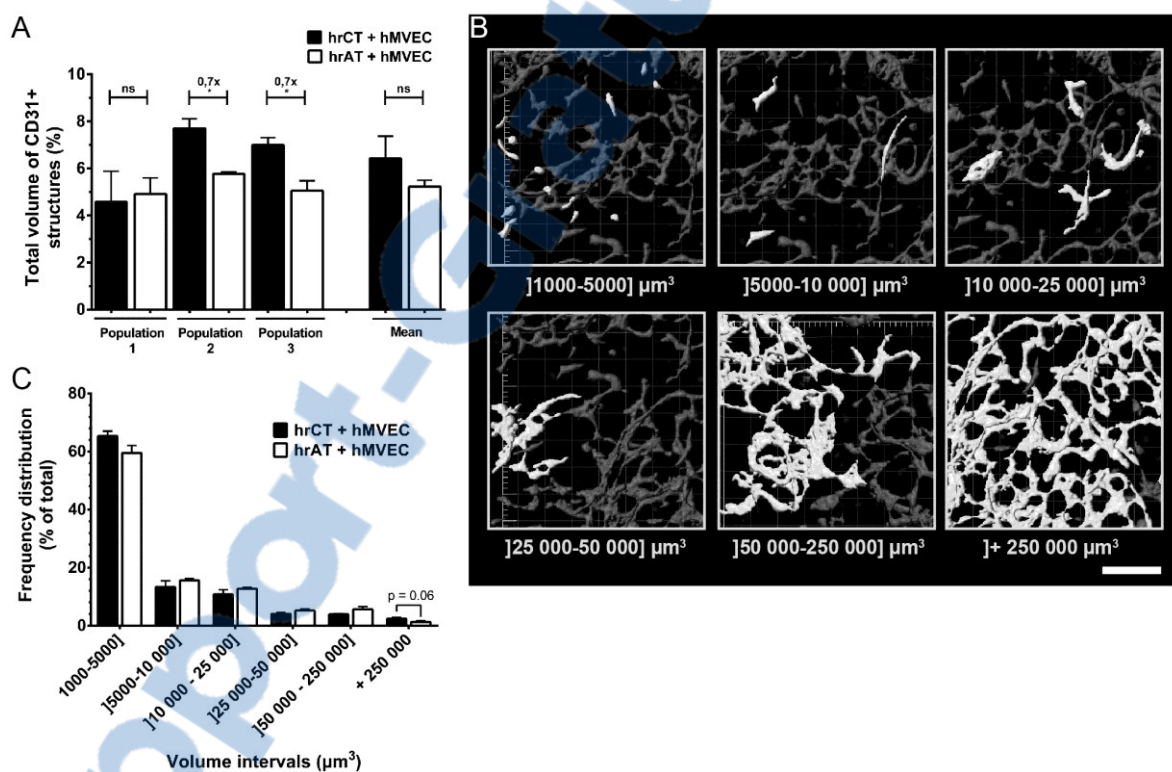


**Figure 2.4. Confocal imaging of capillary-like networks within engineered tissues.** (A-D) Connective and (E-H) adipose tissue whole-mount samples were imaged by confocal microscopy after (A, E) CD31 and (B, F) laminin immunolabelings. C, G represent merging of the labelings. (D, H) Higher magnification images indicating laminin presence around capillaries (D, H, arrowheads) and adipocytes (H, arrow). Bars: 150  $\mu\text{m}$  except for D, H 50  $\mu\text{m}$ .

#### 2.3.4.2.2 Imaging and quantification of the networks using confocal microscopy

This imaging method allowed the evaluation of larger tissue surface areas ensuring a more representative assessment of the structure distribution in these tissues. The extent of the capillary-like network and its morphology could easily be visualized and then rendered as 3D images for detailed software analysis. A slight

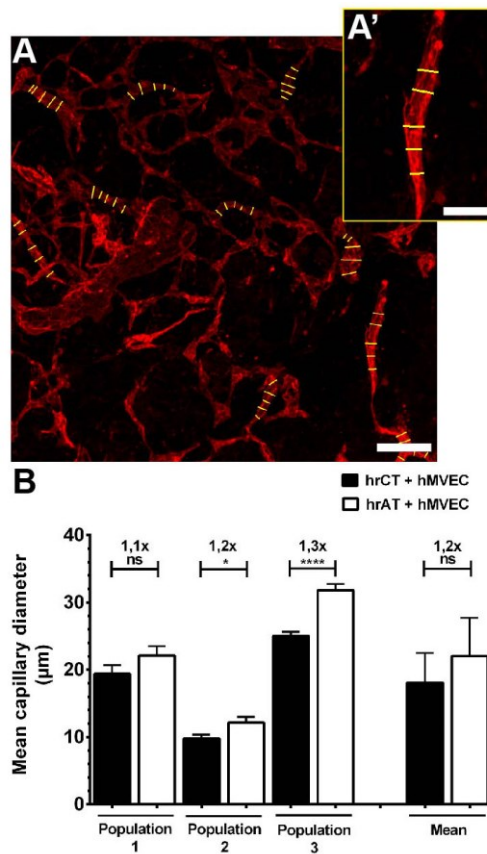
difference was noted in the global appearance of the networks created by hMVEC in presence of adipocytes, with mesh-like regions that were not present among the more « elongated » network seen within the connective tissue devoid of adipocytes (Fig. 2.4E vs A). Analyses using Imaris software provided more quantitative data. The total volume occupied by the network was  $6.4 \pm 0.9\%$  for hrCT and  $5.2 \pm 0.3\%$  for hrAT indicating no significant difference in the total volume of vessels (Fig. 2.5A). Moreover, this percentage was closely related to human adipose tissue samples for which  $6.8 \pm 1.2\%$  of the total tissue volume consisted of vessels. The total volume occupied by endothelial structures of the reconstructed tissues was then subdivided into specific ranges of structure's volumes as illustrated on Fig. 2.5B. Software parameters allowed to determine individual structure volumes that could be visualized (highlighted in white) and quantified. Frequency distribution for these volume intervals was quite similar between connective and adipose tissues for all the intervals (Fig. 2.5C).



**Figure 2.5. Characterization of the endothelial networks.** A) Quantification of the tissue volume occupied by CD31-expressing structures for tissues reconstructed using ASCs from three different donors. B) 3D renderings of confocal images used for software analysis. Representation of structures present within the specified volume intervals are shown in white. C) Frequency distribution of the structures according to the specified intervals for hrCT and hrAT (mean of three donors). \* :  $p < 0.05$ . Bar :  $100 \mu\text{m}$

### 2.3.4.3 Determination of capillary's mean diameter

Finally, ImageJ analyses of confocal images were used to estimate the average diameter of capillary structures in presence or absence of adipocytes (Fig. 2.6A). Mean diameters varied depending on the cell population initially used to produce connective and adipose tissues (Fig. 2.6B). However, after paired analysis of the data combined from three distinct cell populations, a 1.2x fold non-significant tendency was observed (Fig. 2.6B, Mean). This is also in accordance with the results obtained after the more traditional cryosection analysis for which the average diameter was estimated from measurements of the internal lumen cross-sections and tended to be 28% superior in presence of adipocytes (Table 2.2).



**Figure 2.6. Determination of capillary diameter.** A) Representation of measurements performed on 2D renderings of confocal images. B) Mean capillary diameter of CD31-labeled hrCT and hrAT reconstructed using ASCs from three different donors. \* :  $p < 0.05$ , \*\*\*\* :  $p < 0.0001$ . Bars: A) 100 µm ; A') 50 µm.

#### 2.3.4.4 Influence of the tissue microenvironment: kinetics of bioactive molecule secretion

The presence of basement membrane components such as laminin (Fig. 2.4B, F) and collagen type IV (not shown), in addition to fibronectin and structural collagens found in our reconstructed tissues [24], likely provided essential cues favoring the endothelial network development. In addition, soluble factors secreted by ASCs and/or adipocytes such as leptin, VEGF, angiopoietin-1 (Ang-1), HGF, and PAI-1 represent known modulators of angiogenic processes [8]. Their quantification in conditioned media (CM) would likely reflect the local environment seen by hMVEC during tissue production. Therefore we performed a detailed investigation of the secretory profiles of these molecules for hrCT and hrAT at major steps of tissue reconstruction *in vitro* (Fig. 2.7).

**Tableau 2.2. Comparison of CD31-labeled structures detected on hrCT and hrAT tissue cryosections**

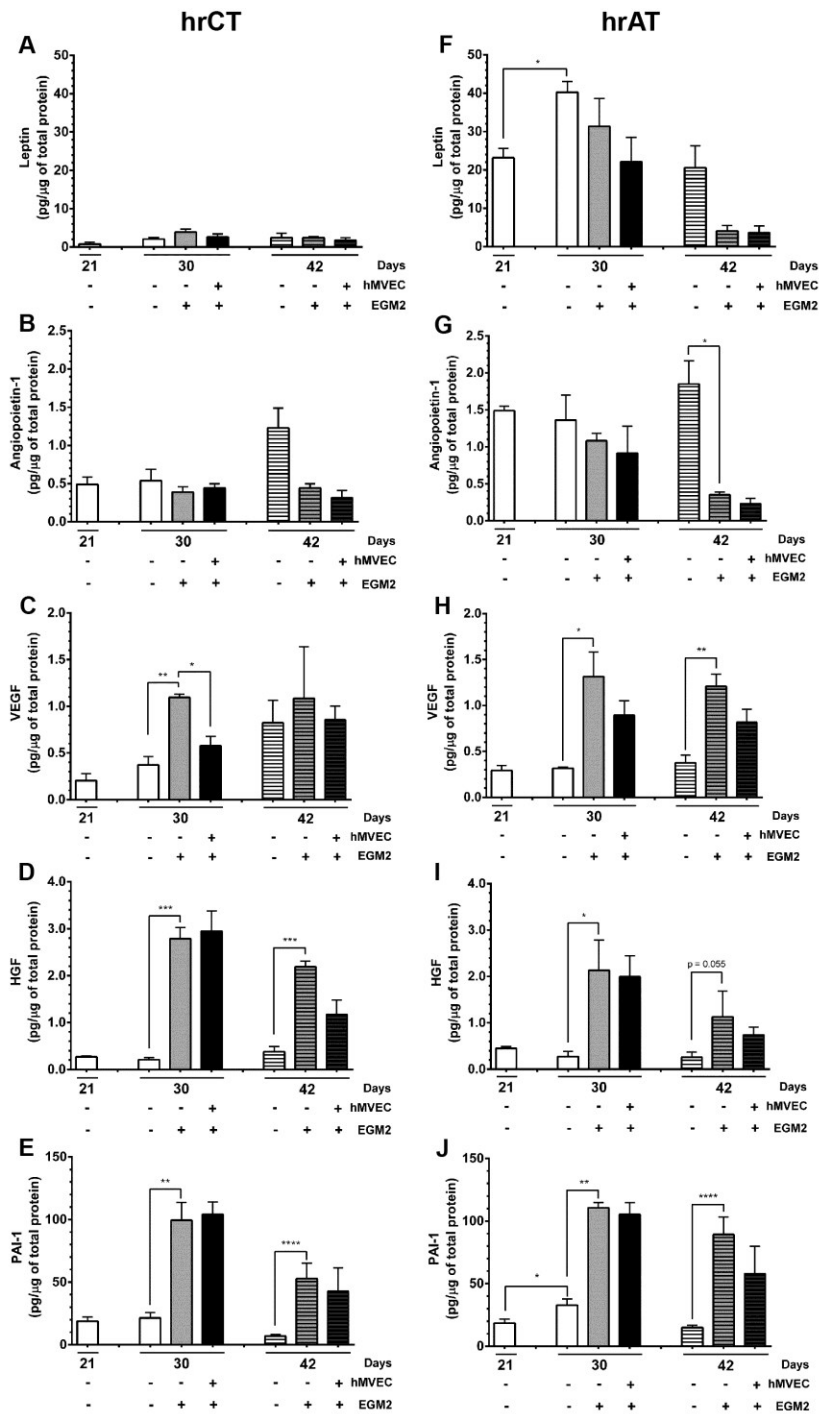
Tissue type	Total number of CD31 <sup>+</sup> structures	Number of tubular CD31 <sup>+</sup> structures	Mean % of tubular structures	Measured internal lumen (μm <sup>2</sup> )	Estimated mean diameter (μm)
hrCT	7.9 (2.7)	1.7 (0.8)	17.9 (4.2)	180.7 (13.0)	14.0 (0.5)
hrAT	7.5 (2.3)	2.6 (0.7)	35.2 (4.6)* p= 0.0381	304.1 (59.0) p= 0.2000	17.9 (2.3) p= 0.2508

Data is expressed as mean per field (SEM)

\*  $p < 0.05$

#### 2.3.4.5 Impact of endothelial cells within the substitutes

First, the presence of hMVEC per se did not impact the secretory profiles of leptin, Ang-1, HGF and PAI-1 from hrCT (Fig. 2.7A, B, D, E) or hrAT (Fig. 2.7F, G, I, J), with none to slight modulation of VEGF secretion depending on the time-point (Fig. 2.7C, H). This was evaluated by comparing tissues enriched in hMVEC with their reference tissues devoid of hMVEC but cultured in the same coculture EGM2-containing media at day 30 and 42 of culture (Fig. 2.7). At day 21 (before hMVEC seeding) and 30 of culture, the media is conditioned by cell sheets while at day 42, it is conditioned by thicker tissues reconstructed by superposition of 3 cell sheets. Importantly, endothelial cell contribution to tissue functionality was shown by detection of angiopoietin-2 (Ang-2) secretion. Ang-2 was detected only in hMVEC-enriched conditioned media at levels ranging from  $1.16 \pm 0.08$  to  $0.31 \pm 0.02$  pg/μg protein for reconstructed connective and adipose tissues respectively (at day 42, n=3).



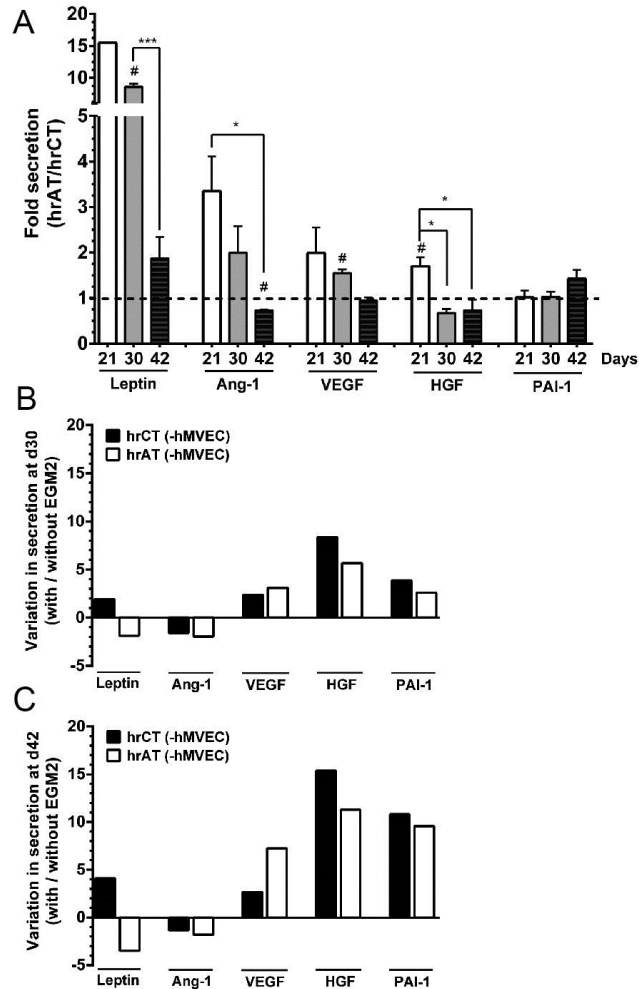
**Figure 2.7. Kinetics of adipokine secretion during production of the reconstructed tissues.** Adipokine detection in 48h-conditioned media of (A-E) connective and (F-J) adipose tissues enriched or not with hMVEC and in presence or not of EGM2-containing coculture media. Quantification was performed for important steps of sheet/tissue production namely at day 21 of culture just before endothelial cell seeding, at day 30 before cell sheet superposition into thicker tissues as well as for day 42 before the reconstructed tissues were harvested for analysis. Unpaired t tests were performed to evaluate the effect of each parameter on protein secretion : the presence of hMVEC in the model and the addition of EGM2 medium in coculture. \*\*\*\* :  $p < 0.0001$ , \*\*\* :  $p < 0.001$ , \*\* :  $p < 0.01$ , \* :  $p < 0.05$ ,  $N = 2-7$  different ASC donors with up to 4 tissues per condition (connective or adipose tissues).

#### 2.3.4.6 Impact of adipocytes

The presence of adipocytes likely impacted on tissue microenvironment through their various secretory products (Fig. 2.7, hrAT vs hrCT). Conditioned media harvested immediately before hMVEC seeding (d21) is indicative of the local environment seen by these cells on the two types of tissue. Namely, hMVEC seeded onto adipose sheets in comparison to connective sheets (ratio hrAT/hrCT, Fig. 2.8A day 21) were generally in presence of elevated amounts of leptin (15x), Ang-1 (3.4x non-sig), VEGF (2.0x, non-sig) and HGF (1.7x) while PAI-1 was secreted at similar levels by connective and adipose tissues at this time-point.

#### 2.3.4.7 Impact of coculture media

However, this profile drastically changed upon co-culturing with hMVEC (Fig. 2.8A, day 30 and 42) showing a general decrease of the hrAT/hrCT ratio over time for all molecules except PAI-1. Surprisingly, culture using the endothelial EGM2-media alone, even in absence of hMVEC, resulted in similar decreased detection of leptin in hrAT as well as decreased Ang-1 detection for hrCT and hrAT, at both time-points investigated (Fig. 2.8B, C and Figure 2.7B, F, G). Combined with increased levels of VEGF, HGF and PAI-1 in these same conditioned media (Fig. 2.8B, C and Fig. 2.7C-E, H-J), the resulting microenvironment become rather similar with time, attenuating the initial differences for these molecules between adipose and connective tissues during capillary-like network formation.



**Figure 2.8. Impact of EGM2-containing media on secretory profiles.** A) Differential expression of leptin, Ang-1, VEGF, HGF and PAI-1 between reconstructed adipose and connective tissues at important steps of tissue production (ratio hrAT/hrCT, mean  $\pm$  SEM for tissues from 1-4 different ASC donors). Before hMVEC seeding (d21), adipose sheets secreted higher amounts of leptin, Ang-1 and HGF. This was attenuated during the following culture time in EGM2-containing coculture media. B-C) The impact of EGM2-media alone was further evaluated during a side by side comparison comparing the secretory profiles of tissues reconstructed using basic growth/adipocyte maintenance media or endothelial EGM2-containing coculture media. EGM2 coculture media induced important variations at B) day 30 of culture (9 days of EGM2 presence, cell sheets) as well as C) day 42 of culture (21 days of EGM2 presence, reconstructed tissues) (N=1 cell population, repeated twice with up to 4 tissues per condition). # indicates significance from ratio of 1 (one-sample t test). For Ang-1, VEGF, HGF et PAI-1 : \* :  $p < 0.05$ , one-way ANOVA followed by Tukey's post-test. For leptin : unpaired t test was performed between d30 and d42 since N=1 donor (in triplicate) at d21. \*\*\* :  $p = 0.0007$ .

### 2.3.5 Discussion

Various strategies have been designed over the years to ensure adequate vascularization of voluminous tissues upon grafting [30, 32]. Conditions promoting both angiogenesis and adipogenesis *in vivo* are being investigated including growth factor stimulation, the use of inductive biomaterials and combinations of diverse modalities [33-39]. The concept of producing *in vitro* tissues featuring a preformed capillary network in order to favor



inosculation once grafted is also developed for a variety of tissue types and engineering models [19, 40-42]. In particular, microvascularized tissues including skin and bladder have been produced from dermal fibroblasts and endothelial cells (HUVEC and microvascular) [20, 43, 44] using a cell sheet technology adapted here to produce adipose substitutes from ASCs. Adipocytes, stromal and endothelial cells are major components of native adipose tissue. In this study, ASC and hMVEC were extracted, amplified separately in culture and later combined to produce an *in vitro* engineered adipose tissue featuring a preformed capillary network. Specific challenges are associated with hrAT production such as concomitant matrix production, lipid accumulation and endothelial cell tubule formation. Finding the right coordinated sequence for cell seeding and specialized media supplementations (adipogenic induction vs hMVEC media) during tissue production is of utmost importance. While some model systems first culture HUVECs on the scaffolds and then add mesenchymal cells that have been predifferentiated or not [45], here we added hMVEC onto cell sheets already rich in matrix components and/or adipocytes and then produced cohesive thicker tissues through sheet superposition. We noted that the sequence of adipogenic induction and hMVEC seeding that was conducive both to adipocyte maturation and tubule formation was obtained when performed at least 3 days apart, respectively.

Some advantages of this tissue-engineered model include that scaffolding elements are of human origin and therefore ECM components reflect the natural composition of native adipose tissue. Indeed, ASCs stimulated with ascorbic acid and serum produce a complex ECM including fibronectin and collagens type I and V while basement membrane components including laminin accumulate upon adipogenic induction [23, 24]. Collagen type IV have also been shown to be highly expressed around adipocytes in adipose sheets [46]. The rather efficient formation of capillary-like networks by hMVEC within our reconstructed tissues is likely mediated by the combination of signals from the ECM, the cells themselves and their soluble secreted products.

The extent of the networks formed *in vitro* was best visualized by confocal microscopy on whole-mount specimens which allowed the examination of rather large tissue areas as well as quantitative characterisation of the endothelial structures. Such three-dimensional imaging provides pertinent informations concerning morphology and the overall distribution of the networks within the tissues, which cannot be easily achieved following classical serial labeling of cryosections. Such analysis of hrCT and hrAT tissue samples determined that their total volume occupied by CD31-expressing structures were similar to the value obtained for native AT samples. Moreover, during the span of 21 days covered from hMVEC seeding to tissue analysis, endothelial cells attached, proliferated, migrated and assembled themselves into nascent tubular structures surrounded by laminin and secreting Ang-2, both for hrCT and hrAT. Ang-2 is stored in endothelial cell Weibel-Palade bodies and such expression suggests it could act in an autocrine manner to regulate endothelial cell states of quiescence and responsiveness to stimuli through TIE2 receptor [47].

Another strength of the experimental design relies on the fact that the same ASCs populations were used, under similar culture conditions, to produce paired tissues induced or not towards adipogenesis. Numerous investigations highlight the major contributions of secreted molecules from ASCs as well as adipocytes to their microenvironment [48, 49]. In particular, it is now well accepted that adipocytes are dynamic contributors to metabolic regulation via active production of adipokines, cytokines and growth factors [50]. Therefore, we wanted to ascertain if metabolically-active adipocytes would have an impact on the resulting capillary-like network *in vitro*. Considering the different soluble microenvironment as well as the distinct topology of rounded lipid-filled adipocytes that is seen by the seeded hMVEC during network formation, more significant morphological differences between hrCT and hrAT networks could have been expected. However, a study that evaluated the early events occurring after endothelial cell seeding onto adipose sheets showed that if HUVEC first attached to adipocytes, they then migrated rapidly (between 2h to 5h) to the surrounding stromal cells before developing into tube-like structures over time [46]. It is therefore possible that in our engineered tissues, the remaining ASCs that did not differentiate into adipocytes upon induction actively contributed to the network formation as vascular support cells.

The functionality of the cells within the reconstructed tissues during the culture period is demonstrated by the sustained production of adipokines and growth factors *in vitro*. At the time of hMVEC seeding (day 21 of culture), there were indeed differential expression levels of leptin, Ang-1 and HGF between hrCT and hrAT. Briefly, leptin was strongly detected in media conditioned by hrAT. This adipocyte-derived molecule has been reported to stimulate migration and proliferation of endothelial cells *in vitro*, as well as angiogenesis *in vivo* [51]. Ang-1 mediates its actions through binding to the endothelial cell TIE2 receptor. It has been reported to be chemotactic for endothelial cells [52] and involved in processes leading to vessel stabilization and maturation [53]. HGF, via c-Met receptor binding, is an important angiogenic factor for vessels growth and remodeling that stimulates proliferation and migration of endothelial cells [54]. The important effects of the endothelial EGM2 containing coculture media on hrCT and hrAT secretomes contributed to mask the potential adipocyte-related differences in the surrounding microenvironment. The important decrease in leptin secretion we observed in hrAT is in accordance with the recently reported decrease in leptin gene expression in another adipose engineering system using EGM2-containing coculture media [55]. Of course, one of the most studied and potent angiogenic factor is VEGF. The increase in VEGF and HGF we noted in presence of coculture media (Fig. 8) could likely be attributed to EGF presence in this endothelial media, since EGF has been previously shown to increase VEGF, HGF and SDF-1 secretion by ASCs [56]. Such an increase in VEGF expression mediated by EGM2 media could actually be beneficial overall, favoring the development CD31<sup>+</sup> structures as well as increased PDGF levels in conditioned media [57].

While these growth factors and adipokines all have the properties to modulate angiogenic processes, they only represent selected examples from the tissue secretomes and their potential synergistic/antagonistic effects should not be underestimated. Also it cannot be excluded that adipocyte presence might have had an effect during the earlier phases of tissue reconstruction. But importantly, despite these changes in the secreted microenvironment related to the choice of coculture media, prevascularised hrAT featuring substantial adipocytes were produced, thereby recreating the adipose tissue context.

### **2.3.6 Conclusion**

In summary, this work indicates that both connective and adipose human substitutes produced by the self-assembly method of tissue engineering can sustain the development of robust and stable capillary networks *in vitro*. These networks were quite similar in presence or absence of adipocytes under the specific culture conditions used for tissue production. Combined with a detailed characterization through confocal imaging, these substitutes represent excellent models for studying molecules that are putative angiogenic and/or adipogenic modulators. The functionality and ease of manipulation of these reconstructed tissues also contribute to their promising use as substitutes for soft-tissue regeneration.

### **2.3.7 Acknowledgments**

We thank V. Trottier, M. Vermette, J. Desjardins, S. Pouliot and V. Racine for technical assistance during tissue production and analysis. We are grateful to V. Moulin and S. Chabaud for providing skin microvascular endothelial cells. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) grants #84368 and #111233. We acknowledge the support of the Centre de recherche du CHU de Québec du Fonds de recherche du Québec–Santé (FRQS) and of the Réseau ThéCell du FRQS. The confocal imaging system was obtained through the Fonds des leaders program from Canada Foundation for Innovation (CFI) to J. Fradette. K. Aubin received a studentship from Fonds de recherche du Québec - Nature et technologies (FQRNT). M. Proulx received studentships from National Science and Engineering Research Council (NSERC), FRQS and the Canadian Federation of University Women (CFUW). J. Fradette is a FRQS career award scholar.

## 2.3.8 References

- [1] Rupnick MA, Panigrahy D, Zhang CY, Dallabrida SM, Lowell BB, Langer R, et al. Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:10730-10735.
- [2] Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumié A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* 2004;110:349-355.
- [3] Bouloumié A, Galitzky J. Angiogenesis in Adipose Tissue. In: Bastard J-P, Fève B, editors. *Physiology and Physiopathology of Adipose Tissue*: Springer Paris; 2013. p. 27-38.
- [4] Crandall DL, Hausman GJ, Kral JG. A review of the microcirculation of adipose tissue: anatomic, metabolic, and angiogenic perspectives. *Microcirculation* 1997;4:211-232.
- [5] Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Hosoya Y, Yamashita H, Fujita H, et al. Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels. *Diabetes* 2007;56:1517-1526.
- [6] Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 2004;109:1292-1298.
- [7] Trayhurn P. Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. *Acta Physiol Scand* 2005;184:285-293.
- [8] Cao Y. Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. *J Clin Invest* 2007;117:2362-2368.
- [9] Harwood HJ, Jr. The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis. *Neuropharmacology* 2012;63:57-75.
- [10] Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 2004;145:2273-2282.
- [11] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;7:211-228.
- [12] Murphy MB, Moncivais K, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp Mol Med* 2013;45:e54.
- [13] Nguyen A, Pasyk KA, Bouvier TN, Hassett CA, Argenta LC. Comparative study of survival of autologous adipose tissue taken and transplanted by different techniques. *Plast Reconstr Surg* 1990;85:378-386; discussion 387-379.
- [14] Konczalik W, Siemionow M. Experimental and clinical methods used for fat volume maintenance after autologous fat grafting. *Ann Plast Surg* 2014;72:475-483.
- [15] Tanzi MC, Fare S. Adipose tissue engineering: state of the art, recent advances and innovative approaches. *Expert Rev Med Devices* 2009;6:533-551.

- [16] Choi JH, Gimble JM, Lee K, Marra KG, Rubin JP, Yoo JJ, et al. Adipose tissue engineering for soft tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 2010;16:413-426.
- [17] Bauer-Kreisel P, Goepferich A, Blunk T. Cell-delivery therapeutics for adipose tissue regeneration. *Adv Drug Deliv Rev* 2010;62:798-813.
- [18] Laschke MW, Harder Y, Amon M, Martin I, Farhadi J, Ring A, et al. Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes. *Tissue Eng* 2006;12:2093-2104.
- [19] Black AF, Berthod F, L'Heureux N, Germain L, Auger FA. In vitro reconstruction of a human capillary-like network in a tissue-engineered skin equivalent. *FASEB J* 1998;12:1331-1340.
- [20] Rochon MH, Fradette J, Fortin V, Tomasetig F, Roberge CJ, Baker K, et al. Normal human epithelial cells regulate the size and morphology of tissue-engineered capillaries. *Tissue Eng Part A* 2010;16:1457-1468.
- [21] Vermette M, Trottier V, Menard V, Saint-Pierre L, Roy A, Fradette J. Production of a new tissue-engineered adipose substitute from human adipose-derived stromal cells. *Biomaterials* 2007;28:2850-2860.
- [22] Fortier GM, Gauvin R, Proulx M, Vallee M, Fradette J. Dynamic culture induces a cell type-dependent response impacting on the thickness of engineered connective tissues. *J Tissue Eng Regen Med* 2013;7:292-301.
- [23] Trottier V, Marceau-Fortier G, Germain L, Vincent C, Fradette J. IFATS collection: Using human adipose-derived stem/stromal cells for the production of new skin substitutes. *Stem Cells* 2008;26:2713-2723.
- [24] Vallee M, Cote JF, Fradette J. Adipose-tissue engineering: taking advantage of the properties of human adipose-derived stem/stromal cells. *Pathol Biol (Paris)* 2009;57:309-317.
- [25] Germain L, Rouabhia M, Guignard R, Carrier L, Bouvard V, Auger FA. Improvement of human keratinocyte isolation and culture using thermolysin. *Burns* 1993;19:99-104.
- [26] Labbé B, Marceau Fortier G, Fradette J. Cell Sheet Technology for Tissue Engineering: The Self-Assembly Approach Using Adipose-Derived Stromal Cells. *Adipose-Derived Stem Cells: Methods and Protocols*. New York: Humana Press; 2011. p. 429-441.
- [27] Dent JA, Polson AG, Klymkowsky MW. A whole-mount immunocytochemical analysis of the expression of the intermediate filament protein vimentin in *Xenopus*. *Development* 1989;105:61-74.
- [28] Dickie R, Bachoo RM, Rupnick MA, Dallabrida SM, Deloid GM, Lai J, et al. Three-dimensional visualization of microvessel architecture of whole-mount tissue by confocal microscopy. *Microvasc Res* 2006;72:20-26.
- [29] Zucker RM. Whole insect and mammalian embryo imaging with confocal microscopy: morphology and apoptosis. *Cytometry A* 2006;69:1143-1152.
- [30] Baiguera S, Ribatti D. Endothelialization approaches for viable engineered tissues. *Angiogenesis* 2013;16:1-14.
- [31] Ilan N, Madri JA. PECAM-1: old friend, new partners. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15:515-524.

- [32] Kannan RY, Salacinski HJ, Sales K, Butler P, Seifalian AM. The roles of tissue engineering and vascularisation in the development of micro-vascular networks: a review. *Biomaterials* 2005;26:1857-1875.
- [33] Stillaert F, Findlay M, Palmer J, Idrizi R, Cheang S, Messina A, et al. Host rather than graft origin of Matrigel-induced adipose tissue in the murine tissue-engineering chamber. *Tissue Eng* 2007;13:2291-2300.
- [34] Laschke MW, Kleer S, Scheuer C, Schuler S, Garcia P, Eglin D, et al. Vascularisation of porous scaffolds is improved by incorporation of adipose tissue-derived microvascular fragments. *Eur Cell Mater* 2012;24:266-277.
- [35] Butler MJ, Sefton MV. Cotransplantation of adipose-derived mesenchymal stromal cells and endothelial cells in a modular construct drives vascularization in SCID/bg mice. *Tissue Eng Part A* 2012;18:1628-1641.
- [36] Yao R, Zhang R, Lin F, Luan J. Biomimetic injectable HUVEC-adipocytes/collagen/alginate microsphere co-cultures for adipose tissue engineering. *Biotechnol Bioeng* 2013;110:1430-1443.
- [37] Lu Q, Li M, Zou Y, Cao T. Delivery of basic fibroblast growth factors from heparinized decellularized adipose tissue stimulates potent de novo adipogenesis. *J Control Release* 2014;174:43-50.
- [38] Traktuev DO, Prater DN, Merfeld-Clauss S, Sanjeevaiah AR, Saadatzadeh MR, Murphy M, et al. Robust functional vascular network formation in vivo by cooperation of adipose progenitor and endothelial cells. *Circ Res* 2009;104:1410-1420.
- [39] Turner AE, Yu C, Bianco J, Watkins JF, Flynn LE. The performance of decellularized adipose tissue microcarriers as an inductive substrate for human adipose-derived stem cells. *Biomaterials* 2012;33:4490-4499.
- [40] Magnan M, Berthod F, Champigny MF, Soucy F, Bolduc S. In vitro reconstruction of a tissue-engineered endothelialized bladder from a single porcine biopsy. *J Pediatr Urol* 2006;2:261-270.
- [41] Correia C, Grayson WL, Park M, Hutton D, Zhou B, Guo XE, et al. In vitro model of vascularized bone: synergizing vascular development and osteogenesis. *PLoS One* 2011;6:e28352.
- [42] Verseijden F, Posthumus-van Sluijs SJ, Farrell E, van Neck JW, Hovius SE, Hofer SO, et al. Prevascular structures promote vascularization in engineered human adipose tissue constructs upon implantation. *Cell Transplant* 2010;19:1007-1020.
- [43] Gibot L, Galbraith T, Huot J, Auger FA. A preexisting microvascular network benefits in vivo revascularization of a microvascularized tissue-engineered skin substitute. *Tissue Eng Part A* 2010;16:3199-3206.
- [44] Bouhout S, Perron E, Gauvin R, Bernard G, Ouellet G, Cattan V, et al. In vitro reconstruction of an autologous, watertight, and resistant vesical equivalent. *Tissue Eng Part A* 2010;16:1539-1548.
- [45] Kang JH, Gimble JM, Kaplan DL. In vitro 3D model for human vascularized adipose tissue. *Tissue Eng Part A* 2009;15:2227-2236.
- [46] Sorrell JM, Baber MA, Traktuev DO, March KL, Caplan AI. The creation of an in vitro adipose tissue that contains a vascular-adipocyte complex. *Biomaterials* 2011;32:9667-9676.

- [47] Fiedler U, Scharpfenecker M, Koidl S, Hegen A, Grunow V, Schmidt JM, et al. The Tie-2 ligand angiotensin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood* 2004;103:4150-4156.
- [48] Kapur SK, Katz AJ. Review of the adipose derived stem cell secretome. *Biochimie* 2013;95:2222-2228.
- [49] Salgado AJ, Reis RL, Sousa NJ, Gimble JM. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther* 2010;5:103-110.
- [50] Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI, Lima FB. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J Pediatr (Rio J)* 2007;83:S192-203.
- [51] Bouloumie A, Drexler HC, Lafontan M, Busse R. Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ Res* 1998;83:1059-1066.
- [52] Witzenbichler B, Maisonpierre PC, Jones P, Yancopoulos GD, Isner JM. Chemotactic properties of angiotensin-1 and -2, ligands for the endothelial-specific receptor tyrosine kinase Tie2. *J Biol Chem* 1998;273:18514-18521.
- [53] Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, Zhou H, Ross L, Croll SD, et al. Angiotensin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med* 2000;6:460-463.
- [54] Saiki A, Watanabe F, Murano T, Miyashita Y, Shirai K. Hepatocyte growth factor secreted by cultured adipocytes promotes tube formation of vascular endothelial cells in vitro. *Int J Obes (Lond)* 2006;30:1676-1684.
- [55] Yao R, Du Y, Zhang R, Lin F, Luan J. A biomimetic physiological model for human adipose tissue by adipocytes and endothelial cell cocultures with spatially controlled distribution. *Biomed Mater* 2013;8:045005.
- [56] Li Q, Li PH, Hou DJ, Zhang AJ, Tao CB, Li XY, et al. EGF Enhances ADSCs Secretion via ERK and JNK Pathways. *Cell Biochem Biophys* 2013.
- [57] Kolbe M, Xiang Z, Dohle E, Tonak M, Kirkpatrick CJ, Fuchs S. Paracrine effects influenced by cell culture medium and consequences on microvessel-like structures in cocultures of mesenchymal stem cells and outgrowth endothelial cells. *Tissue Eng Part A* 2011;17:2199-2212.





## **Chapitre 3 : Discussion générale**



Plusieurs modèles de tissus adipeux reconstruits par génie tissulaire sont proposés comme alternative à la greffe de gras autologue en chirurgie de reconstruction. Afin de favoriser une vascularisation rapide de ces tissus une fois greffés, des cellules endothéliales (microvasculaires et HUVEC) sont ajoutées au modèle pour induire la formation d'un réseau de capillaires *in vitro* et accélérer la connexion au réseau de l'hôte. Au LOEX, l'utilisation de la méthode d'auto-assemblage permet la reconstruction de tissus par génie tissulaire sans matériaux exogènes, puisque les cellules sécrètent elles-mêmes leur matrice. Ainsi des peaux reconstruites enrichies de cellules endothéliales (microvasculaires et HUVEC), permettant la formation d'un réseau vasculaire *in vitro*, ont été produites à l'aide de cette méthode (Black et al. 1998, Hudon et al. 2003, Rochon et al. 2010). Notre équipe propose un modèle de tissus conjonctifs (TCR) et adipeux (TAR) reconstruits par génie tissulaire par la méthode d'auto-assemblage, adaptée pour permettre la différenciation adipocytaire, à partir de cellules stromales/souches extraites du tissu adipeux (Vermette et al. 2007). Cette population cellulaire adhérant aux flacons en culture est isolée de la fraction stromale vasculaire de lipoaspirations provenant de donneurs sains. Nos travaux montrent ici que des cellules endothéliales (microvasculaires dermiques, hMVEC) ajoutées au modèle permettent également la formation de capillaires *in vitro*. Ces cellules ont d'ailleurs l'avantage, contrairement aux HUVEC, de participer activement aux processus angiogéniques dans un contexte physiologique (Hewett et al. 1993). Les cellules endothéliales optimales à intégrer dans un modèle de tissu adipeux reconstruit seraient celles extraites du tissu d'origine, le gras humain. Il est possible d'extraire les cellules endothéliales de lipoaspiration (Arts et al. 2001, Hutley et al. 2001, Springhorn 2011), mais l'obtention d'une culture pure représente un défi que peu d'équipes ont réussi avec des rendements intéressants pour le génie tissulaire. Des billes magnétiques recouvertes d'anticorps ciblant CD31 permettent une sélection positive des cellules endothéliales du tissu homogénéisé, mais la contamination occasionnée par la présence des cellules stromales est difficile à éliminer. Plusieurs passages en présence des billes magnétiques sont nécessaires et peuvent entraîner la mort des cellules endothéliales ou un changement de phénotype. Les hMVEC dermiques, quant à elles, sont relativement faciles à isoler du derme par un traitement à la thermolysine, et la pureté de la population cellulaire est satisfaisante dès le premier passage. Ces cellules demeurent un bon compromis entre les HUVEC et les cellules endothéliales de gras humain pour l'étude des processus angiogéniques dans les tissus reconstruits par notre équipe, tout en offrant la possibilité d'être autologues.

Les utilisations possibles pour les tissus que nous avons produits sont variées : ils peuvent être utilisés comme derme ou hypoderme dans une peau reconstruite (Trottier et al. 2008), former un stroma de substituts vésicaux (Rousseau et al. 2013) ou encore, agir à titre de pansements pour le traitement de plaies chroniques chez les patients diabétiques. Le tissu adipeux humain est également reconnu comme un organe endocrine important (Fain et al. 2004). Notre équipe s'est alors interrogée sur l'effet que pourraient avoir les adipocytes sur le réseau de capillaires formé *in vitro* dans les tissus adipeux reconstruits, comparativement à ceux retrouvés dans des

tissus conjonctifs, qui auraient été produits avec les mêmes populations cellulaires non différenciées. Plusieurs techniques d'histologie et d'imagerie ont été utilisées afin de comparer les deux conditions. Ces mêmes analyses ont été effectuées sur des explants de gras humain pour comparer les réseaux obtenus *in vitro* à ceux retrouvés *in vivo*.

### **3.1 Influence des adipocytes sur la formation du réseau de capillaires dans les tissus reconstruits**

Des expériences antérieures ont permis d'optimiser les conditions de culture favorables à l'évolution en parallèle de trois processus cellulaires importants qui ont lieu lors de la production des tissus adipeux, soit la production de matrice extracellulaire, la différenciation adipocytaire et la prolifération, la migration et le réarrangement des cellules endothéliales pour la formation des capillaires *in vitro*. Ainsi, dans le modèle de tissu préconisé dans cette étude, des cellules endothéliales microvasculaires dermiques ont étéensemencées sur les feuillets conjonctifs et adipeux lorsque les adipocytes étaient âgés de 14 jours, étant donné qu'un ensemencement précoce entrave le développement des adipocytes ainsi que l'accumulation des lipides dans le tissu. L'analyse des réseaux vasculaires a été effectuée 21 jours plus tard.

L'étude de coupes histologiques et d'immunomarquages sur des coupes congelées a démontré des différences entre les réseaux de capillaires retrouvés dans les TAR comparativement aux TCR. On retrouve une présence accrue de structures comportant un lumen visible dans les TAR, ces structures étant considérées comme tubulaires. Cependant, cette technique, qui consiste à observer les tissus reconstruits sur un plan en deux dimensions seulement, ne permet pas de visualiser la complexité des structures formées par les réseaux de capillaires ou de caractériser une grande surface par tissu. L'angle de coupe de l'échantillon, lorsqu'il n'est pas parfaitement perpendiculaire, peut également apporter un biais aux mesures effectuées par la suite. L'analyse des réseaux en trois dimensions sur une plus grande surface de façon qualitative et quantitative à l'aide de l'imagerie confocale et de logiciels spécialisés a permis d'apporter un complément important d'informations sur la comparaison des réseaux dans les deux conditions.

Les techniques d'immunofluorescence et d'acquisition des images en microscopie confocale ont été adaptées pour permettre de visualiser le réseau de capillaires sur l'épaisseur complète du tissu reconstruit ( $63 \pm 13 \mu\text{m}$  en moyenne) et du gras natif ( $108 \pm 25 \mu\text{m}$ ), et ce, sur une surface de  $0,86 \text{ mm}^2$  par échantillon de tissu analysé (mosaïque de 9 photos totalisant  $928,38 \mu\text{m} \times 928,38 \mu\text{m}$ ). Plusieurs échantillons d'un même tissu ont pu être analysés afin de visualiser de manière représentative le réseau de capillaires. Pour obtenir une résolution d'image satisfaisante sur une telle épaisseur, les tissus doivent subir différents traitements (incubations dans

des solutions de blanchiment et d'éclaircissement) qui leur permettent de perdre complètement leur opacité pour laisser passer adéquatement la lumière en microscopie (Dent et al. 1989, Dickie et al. 2006, Zucker 2006). Les réseaux retrouvés dans les TAR et les TCR ont alors été comparés.

L'analyse qualitative de la morphologie des capillaires dans les tissus reconstruits a mis en évidence des structures plus effilées dans les TCR, alors que l'on retrouve davantage de structures en amas dans les TAR, où les capillaires forment des structures dites en « treillis ». Sorrell *et al.* ont montré dans leur modèle de coculture en monocouche d'ASC et d'HUVEC que l'attachement initial des cellules endothéliales était influencé par le type de matrice avec lequel elles étaient en contact. Puisque ces cellules possèdent les intégrines pour s'attacher au collagène de type IV et à la laminine, leur distribution dans les quelques heures suivant leur ensemencement serait influencée par la présence des adipocytes des feuilletts cellulaires étant donné que ces derniers sécrètent ce type de matrice extracellulaire lors du processus de différenciation (Aratani and Kitagawa 1988, Nakajima et al. 2002). Les cellules migraient par la suite sur les cellules stromales environnantes du tissu (Sorrell et al. 2011). Un immunomarquage dirigé contre le collagène de type IV met d'ailleurs en évidence la proximité de la matrice extracellulaire des tubules formés et celle des adipocytes dans le tissu (Sorrell et al. 2011). Cette situation semble similaire à des conditions physiologiques étant donné la relation étroite qu'entretiennent les adipocytes du tissu adipeux et le réseau vasculaire (Christiaens and Lijnen 2010, Hausman G. J. and Richardson 2004). La laminine, composante de la membrane basale entourant les adipocytes dans le tissu adipeux, a aussi été mise en évidence par immunofluorescence indirecte et est sécrétée par les adipocytes présents dans les tissus adipeux reconstruits par notre équipe. La méthode d'imagerie utilisée montre bien une proximité entre les adipocytes et les capillaires formés, mais la visualisation des cellules dans les stades plus précoces de la formation des capillaires prodiguerait davantage d'informations sur l'effet de la matrice sécrétée par les adipocytes sur l'attachement initial des cellules. Il serait également intéressant d'observer l'attachement initial des cellules endothéliales dans les tissus conjonctifs que nous produisons, étant donné que la matrice offerte aux cellules au moment de l'ensemencement varie entre les deux conditions.

La sécrétion de la laminine par les cellules endothéliales dans les TAR et les TCR indique bien que les cellules forment une membrane basale et qu'elles sont aptes à produire leur matrice extracellulaire. Durant le processus d'angiogenèse, la sécrétion de matrice extracellulaire par les cellules endothéliales est une étape terminale de la formation des nouveaux vaisseaux, ce qui permet leur stabilisation (Risau 1997). Une molécule importante dans le développement et la stabilisation des capillaires sécrétée par les adipocytes et les cellules stromales, l'angiopoïétine-1, a été dosée dans les milieux conditionnés par les tissus conjonctifs et adipeux. Elle permet la stabilisation des capillaires en interagissant avec le récepteur TIE2 des cellules endothéliales (Thurston et al. 2000), mais également en favorisant le contact des cellules endothéliales et des cellules murales (péricytes)

(Carlson et al. 2001). Les capillaires dans les tissus que nous avons reconstruits ont donc atteint un certain degré de maturité. Dans un contexte *in vivo*, le recrutement de péricytes précède la formation de la matrice extracellulaire autour du vaisseau nouvellement formé pour le stabiliser (Adams and Alitalo 2007). Il serait donc intéressant de vérifier si de telles cellules se retrouvent dans les tissus reconstruits *in vitro* par auto-assemblage adapté. Comme abordé précédemment, des études ont démontré que des populations de CSTA partagent certaines caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques avec les péricytes *in vivo* dans le tissu adipeux (Tang et al. 2008, Traktuev et al. 2008). Comme les péricytes expriment également le marqueur CD31, ce qui les confond avec les cellules endothéliales des capillaires, il existe d'autres molécules qu'il serait possible de cibler en immunofluorescence pour les distinguer, telles que le récepteur au PDGF (PDGFR), que ces cellules expriment en grande quantité ainsi que le NG2 [revu dans (Geevarghese and Herman 2014)]. Les marquages multiples, la colocalisation de plusieurs marqueurs ciblés et la position des cellules sur les vaisseaux pourraient fournir des indices quant à la présence de péricytes dans les tissus. De plus, la mise en évidence des jonctions cellulaires par une immunofluorescence dirigée contre de ZO-1 (*zona occludens-1*), une protéine composant les jonctions serrées entre les cellules, permettrait également de visualiser l'étanchéité et la structure des cellules endothéliales composant les capillaires. Cependant, le dosage d'angiopoïétine-2 dans les milieux conditionnés au cours de la production des tissus témoigne de la fonctionnalité des cellules endothéliales formant les capillaires dans le modèle utilisé dans notre étude.

L'analyse quantitative des réseaux vasculaires formés *in vitro* a pu être effectuée de façon détaillée grâce au logiciel Imaris (Bitplane), qui permet la reconstruction virtuelle de l'image tridimensionnelle obtenue par microscopie confocale, ce qui est impossible de reproduire à l'aide des méthodes traditionnelles sur coupes congelées. Le logiciel quantifie le volume de chacune des structures détectées en fonction du signal obtenu par immunofluorescence. Un signal positif continu est considéré comme une structure capillaire, qui peut alors représenter un capillaire isolé ou bien un groupement complexe et ramifié. Le volume total de structures capillaires a été quantifié à l'aide du logiciel dans les TAR et les TCR, produits à partir de trois populations cellulaires différentes, et normalisé en fonction du volume total de l'échantillon de tissu analysé. Ainsi, pour deux populations étudiées, il semble y avoir un volume supérieur (30%) de capillaires dans les TCR que les TAR, mais cette différence n'est pas retrouvée pour l'une des trois populations (Population 1). Lorsque la moyenne regroupant les trois populations est effectuée, l'analyse pairée des volumes totaux de capillaires ne démontre pas de différence significative entre les deux conditions (TAR et TCR). Pour investiguer davantage ce que représente le volume total de capillaires, les volumes associés à chacune des structures dans les tissus ont été distribués selon plusieurs intervalles de volumes représentant des degrés de complexité morphologique différents. Ainsi la distribution des volumes de structures composant les réseaux de capillaires retrouvés dans les deux types de tissus selon les intervalles déterminés a permis de mettre en évidence des patrons similaires

entre les TAR et les TCR. Les TCR sembleraient cependant favoriser les structures plus complexes, étant donné que l'on observe une tendance ( $p = 0,06$ ) selon laquelle davantage de structures dont le volume est supérieur à  $250\,000\ \mu\text{m}^3$  sont quantifiées dans les TCR. La quantification des structures en fonction du volume de tissu ( $\text{mm}^3$ ) a également été effectuée (Kim Aubin, résultats non publiés). On retrouverait une tendance selon laquelle les TAR contiendraient un nombre plus élevé de structures par  $\text{mm}^3$ . Étant donné que les TCR possèdent un volume total de capillaires (%) légèrement plus élevé par tissu pour deux des trois populations observées, cela pourrait indiquer que les TAR promeuvent la formation de davantage de structures dont le volume est moins important, tandis que les TCR permettent la formation de structures plus complexes ayant un volume supérieur, mais qui s'y trouvent en moins grande quantité. La quantification du nombre total de structures par  $\text{mm}^3$  montre également que l'on en retrouve 3,1 fois plus dans les TAR que le tissu adipeux natif (Kim Aubin, résultats non publiés). En effet, les échantillons de tissu adipeux natif, issus d'explants de lipoaspirations et de lipectomies abdominales sous-cutanées, sont constitués d'un réseau de capillaires très complexe et ramifié et de quelques structures isolées seulement, diminuant ainsi le nombre de structures quantifiées dans le tissu. Le volume total occupé par le réseau de capillaires (%) ne varie pas significativement entre les tissus adipeux reconstruits ( $5.2 \pm 0.3\%$ ) et le tissu adipeux natif ( $6.8 \pm 1.2\%$ ), démontrant que la quantité de capillaires dans nos tissus est physiologique, mais que l'organisation des capillaires dans les deux conditions diffère. La présence des adipocytes dans les TAR ne semble donc pas favoriser ou, au contraire, nuire au développement du réseau de capillaire *in vitro* en termes de volume occupé par le réseau dans le tissu et de distribution des structures qui le composent.

Les diamètres moyens des capillaires ont également été mesurés et comparés entre les deux types de tissus (TAR et TCR). Les TAR semblent favoriser la formation de capillaires aux diamètres plus élevés, bien que l'analyse des résultats moyens ne montre pas de différence significative entre les deux conditions. Cette observation s'avère cependant significative pour deux des trois populations étudiées. Fait intéressant, la population cellulaire pour laquelle on ne retrouve pas de différence entre les TAR et les TCR au niveau du diamètre moyen des capillaires est la même dont le volume total de capillaire est équivalent entre les deux types de tissus (Population 1). Cette population est d'ailleurs celle dont l'indice de masse corporelle (IMC) du donneur est le plus faible (21,5) et l'âge le plus élevé (44 ans) comparativement à un IMC de 25,0 et de 25,6 et un âge de 40 et 36 ans pour les populations 2 et 3 respectivement. Un lien a été démontré entre l'augmentation de l'IMC du donneur et la diminution de la capacité de différenciation des préadipocytes humains *in vitro*, mais cette caractéristique ne semblait pas être modulée en fonction de l'âge du donneur dans cette étude (van Harmelen et al. 2003). Schipper et al. ont par contre montré que les cellules extraites de tissu provenant de donneurs plus jeunes semblaient avoir un meilleur taux de prolifération et de différenciation *in vitro* (Schipper et al. 2008). Cette équipe a également montré que le site de prélèvement peut avoir une influence : le tissu adipeux sous-cutané

provenant des bras et des cuisses conservaient un meilleur potentiel de différenciation adipocytaire *in vitro* (Schipper et al. 2008). Les sites de prélèvement du tissu adipeux dont sont extraites les trois populations cellulaires utilisées pour la reconstruction de nos tissus dans cette étude se situent au niveau de l'abdomen ou des cuisses.

Puisque les tissus sont reconstruits à partir de populations cellulaires primaires provenant de différents donneurs, il est important d'avoir un échantillonnage varié pour confirmer que la variation du paramètre observé n'est pas attribuable à une seule population cellulaire utilisée. Ainsi, outre l'âge et l'IMC des donneurs, d'autres paramètres peuvent varier entre les populations, dont la sécrétion des différentes protéines composant la matrice extracellulaire par les cellules dans le modèle. Ce facteur pourrait influencer la formation des capillaires *in vitro*. Sorrell *et al.* ont d'ailleurs observé que la capacité des fibroblastes dermiques à supporter l'angiogenèse *in vitro* dépendait grandement de la zone du derme de laquelle ils provenaient. En présence de fibroblastes de papilles dermiques (fibroblastes permissifs), les HUVEC ajoutées au modèle de coculture s'alignaient et formaient un réseau réticulé de capillaires, alors que les cellules ensemencées en présence de fibroblastes extraits du derme réticulaire (fibroblastes non permissifs) formaient moins de tubules et d'embranchements (Sorrell et al. 2008). Bien que les deux populations de fibroblastes sécrètent toutes deux des facteurs pro-angiogéniques (VEGF-A et FGF-2 et HGF), la matrice extracellulaire produite par les cellules et les molécules qui y sont liées sembleraient responsables des différences observées entre les deux populations (Sorrell et al. 2008). Dans notre étude, le profil de sécrétion de molécules pro-angiogéniques de la Population 1 est similaire à celui de la Population 2. Nous observons cependant des différences significatives au niveau du volume de capillaires entre les TAR et les TCR pour la Population 2, mais pas pour la Population 1. Il serait donc intéressant de caractériser et comparer davantage la matrice extracellulaire composant les tissus produits à partir des différentes populations cellulaires afin de déterminer si des différences ne pourraient pas expliquer le comportement variable des cellules endothéliales en présence de la Population 1 dans les TAR et les TCR.

Le diamètre des capillaires des TAR a également été comparé à ceux retrouvés dans le tissu adipeux humain. Le diamètre moyen des capillaires retrouvés dans les TAR est de 3,6 fois supérieur à ceux retrouvés dans le gras humain (22  $\mu\text{m}$  vs 6  $\mu\text{m}$ ). Il faut cependant prendre en considération que le contexte *in vitro* ne procure pas tous les stimuli nécessaires à la réorganisation des capillaires comme dans le tissu natif. Les diamètres sont toutefois semblables à ceux des capillaires formés par des cellules microvasculaires dermiques dans des dermes reconstruits par auto-assemblage, sans la présence des kératinocytes, dont les diamètres estimés varient entre 8  $\mu\text{m}$  (ou 50  $\mu\text{m}^2$ , environ 50% des capillaires) et 16  $\mu\text{m}$  (ou 200  $\mu\text{m}^2$ , environ 40% des capillaires) après 21 jours de culture en interface air-liquide (Rochon 2010). Cette technique consiste à cultiver un tissu de manière à ce que son côté supérieur soit en contact avec l'air mais que sa base soit en contact avec le milieu



de culture afin d'être nourri convenablement. Cette étape est nécessaire à la différenciation adéquate de l'épiderme lorsque des kératinocytes sont ajoutés au modèle de peau reconstruite. Les diamètres de ces capillaires formés *in vitro* ont été estimés à partir des résultats de l'article présentant l'aire des tubules ( $\mu\text{m}^2$ ) mesurés sur des coupes congelées. Les diamètres de structures tubulaires présentes dans des tissus adipeux et conjonctifs reconstruits par notre équipe ont également été mesurés de cette manière et les résultats sont similaires à ceux obtenus à l'aide de l'imagerie confocale.

Bien que quelques différences aient été observées au niveau de la morphologie des capillaires composant les TAR et les TCR, le volume, la distribution de ces derniers ainsi que leurs diamètres moyens sont relativement comparables à ce stade de la production des tissus. La présence des adipocytes ne semble donc pas affecter la formation de capillaires dans les tissus adipeux lorsque les deux conditions sont comparées. Le tissu adipeux humain est reconnu comme étant un producteur important de plusieurs facteurs pro-angiogéniques, tels que la leptine, l'Ang-1, le VEGF, le HGF et le PAI-1 (Hausman G. J. and Richardson 2004). Ces molécules agissent également de manière synergique pour promouvoir l'angiogenèse. Par exemple, la leptine, molécule sécrétée en grande quantité par les tissus adipeux reconstruits, agit de concert avec le VEGF et le FGF-2 *in vivo* pour favoriser la croissance des vaisseaux dans un modèle de cornée chez la souris (Cao R. et al. 2001). L'Ang-2, en présence de VEGF, est également capable de promouvoir l'angiogenèse *in vivo*, par l'augmentation du diamètre des capillaires, le remodelage de la matrice, la prolifération et la migration des cellules endothéliales et favorise le bourgeonnement de nouveaux vaisseaux chez la souris (cornée) (Lobov et al. 2002). Étant donné que des quantités plus importantes de ces molécules sont dosées au moment de l'ajout des cellules endothéliales dans les tissus adipeux reconstruits, des différences davantage marquées entre les réseaux étaient attendues. Il faut cependant prendre en considération que les réseaux de capillaires étaient observés et analysés au moment de la récolte des tissus, à 42 jours de culture. L'observation du réseau lors de sa formation, à différents temps de culture plus précoces, aurait sans doute permis de mettre en relief des différences qui sont moins visibles une fois le réseau formé et à un stade de maturité plus avancé, comme c'est le cas au moment des biopsies terminales. Les profils de sécrétion de molécules angiogéniques par les tissus ont donc été analysés et comparés à différents temps de culture. Les milieux conditionnés ont été prélevés à des étapes critiques dans la production des tissus, soit avant l'ensemencement des cellules endothéliales sur les feuillets cellulaires, lors de l'empilement des feuillets et avant de récolter les tissus aux fins d'analyses.

## 3.2 Comparaison des profils de sécrétion de molécules ayant des effets pro-angiogéniques

La quantification de cinq molécules discutées précédemment (leptine, angiopoïétine-1, VEGF, HGF et PAI-1) ayant un rôle important dans l'angiogenèse du tissu adipeux a été effectuée afin de comparer les profils de sécrétion des TAR à ceux des TCR, produits avec les mêmes populations cellulaires qui n'ont pas été induites à se différencier. L'impact potentiel que pourrait avoir l'ajout des cellules endothéliales dans le modèle sur les profils de sécrétion des tissus conjonctifs et adipeux a aussi été évalué en comparant ces derniers avec des tissus qui ont été produits sans l'ajout de cellules endothéliales, mais qui ont été cultivés dans les mêmes conditions optimisées pour la coculture des cellules stromales ou adipeuses et endothéliales. L'effet de l'utilisation de ce milieu a également été évalué en les comparant à des milieux conditionnés par des tissus cultivés sans cellules endothéliales dans des conditions standards, c'est-à-dire dans des milieux adaptés pour la production des tissus conjonctifs et adipeux.

Tout d'abord, la présence des cellules endothéliales ne semble pas influencer le profil de sécrétion des tissus aux différents temps d'analyse pour la majorité des molécules analysées (Leptine, Ang-1, HGF et PAI-1), puisqu'on ne retrouve pas de différences significatives entre la sécrétion de ces molécules par des tissus adipeux et conjonctifs enrichis ou non en cellules endothéliales et cultivés dans les mêmes conditions. La présence des cellules endothéliales dans le modèle ne semblent pas non plus influencer le profil sécrétoire des cellules, qu'elles soient sous forme de feuillets seuls (à jour 21 et 30 de culture) ou empilés pour former un tissu (à jour 42 de culture). Une seule différence peut être observée à 30 jours de culture, soit avant d'empiler les feuillets cellulaires, pour la sécrétion de VEGF des tissus conjonctifs (Figure 2.7C). Comme ce phénomène est retrouvé à un seul temps d'analyse, et pour une seule molécule, la différence observée pourrait être due à la variabilité entre les populations cellulaires utilisées pour produire les différents tissus. En effet, pour l'étude de ces paramètres, il n'a pas été possible de retrouver les mêmes populations cellulaires à tous les temps d'analyse et ce, pour chacune des conditions observées, ce qui peut induire une certaine variabilité. Cependant, cet impact de la variabilité inter-population a été minimisé par l'utilisation d'un grand nombre de populations cellulaires différentes pour la comparaison aux conditions standards (N=7).

Il semble y avoir un impact récurrent sur la sécrétion lors de l'ajout de milieu EGM2 en culture, une fois que les cellules endothéliales sont ajoutées au modèle. On remarque un effet sur le profil de sécrétion des TAR et des TCR dès neuf jours en présence de milieu EGM2 (à 30 jours de culture), qui est accentué lors de la récolte des tissus, à 42 jours de culture. Ainsi, on observe une diminution de la sécrétion de leptine par les tissus adipeux reconstruits, et la sécrétion de l'angiopoïétine-1 par les deux types de tissus. Par contre, une augmentation de

la sécrétion des facteurs de croissance VEGF et le HGF de même que de PAI-1 est visible pour chacun des deux types de tissus. Les profils de sécrétion entre les deux conditions ont alors été comparés et exprimés sous forme de ratios et il est alors possible de constater que l'on retrouve une quantité plus importante de facteurs angiogéniques (leptine, Ang-1 et HGF) dans les milieux conditionnés par les tissus adipeux au moment de l'ajout des cellules endothéliales, mais que les ratios se ressemblent de plus en plus au fil du temps passé en culture. L'environnement dans lequel évoluent les cellules endothéliales est davantage favorable aux processus angiogéniques dans les TAR au moment de l'ensemencement des cellules, mais la quantité de facteurs solubles ayant la capacité de moduler la formation de capillaires *in vitro* est similaire dans les deux types de tissus au moment de l'analyse des réseaux, à 42 jours de culture. Ces observations pourraient expliquer, en partie, la grande similarité observée entre les réseaux de capillaires formés dans les deux types de tissus. Par contre, seulement cinq molécules au potentiel angiogénique ont été analysées lors de cette étude alors que le tissu adipeux sécrète un vaste éventail de molécules bioactives qui pourraient jouer un rôle dans les processus investigués. Par exemple, le bFGF et le PDGF sont deux autres molécules précédemment mentionnées qui semblent jouer un rôle important dans l'angiogenèse du tissu adipeux (Gehmert et al. 2011, Pallua et al. 2014). La synergie entre les différentes molécules peut également jouer un rôle, et les concentrations de chacune d'elles peuvent influencer les effets observés. L'Ang-2, par exemple, peut stimuler la régression du réseau de capillaires en présence d'une faible concentration de VEGF, alors que ses effets sont bénéfiques sur l'angiogenèse lorsque le VEGF est présent en grande quantité (Lobov et al. 2002). L'angiogenèse *in vitro* est un processus complexe auquel plusieurs paramètres sont reliés.

Ensuite, la molécule bioactive sécrétée principalement par les tissus adipeux, la leptine, est grandement diminuée lors de la culture en présence du milieu EGM2. Yao, Du et al. ont montré que l'utilisation du milieu 1 :1 milieu de différenciation (DMEM avec IBMX, dexaméthasone et insuline) : M200 (milieu de prolifération pour HUVEC) affectait également la production de leptine au niveau génique (80% de la production initiale après deux jours de coculture et 70% après 5 jours) par les adipocytes de leur modèle (Yao, Du et al 2013). Ils notaient également la présence de dédifférenciation dans leurs cultures en monocouche, mais concluent tout de même que ce milieu est optimal pour favoriser les deux types de cellules en coculture. Il faut néanmoins préciser que malgré la diminution de leptine quantifiée dans les milieux conditionnés du modèle proposé par notre équipe, l'observation qualitative des coupes histologiques montre une présence appréciable d'adipocytes dans les tissus enrichis ou non de cellules endothéliales au moment de l'analyse des tissus, soit après 21 jours en présence du milieu EGM2. La quantité de leptine dosée à ce même moment est cependant 5 fois moins importante dans les TAR non enrichis de cellules endothéliales, mais cultivés en présence de milieu EGM2, que les TAR cultivés dans des conditions dites standards. Cette différence n'est toutefois pas significative, étant donné la variabilité qui existe entre les différentes populations cellulaires utilisées pour la production des tissus. Une quantification

comparative des lipides par Oil Red O dans des tissus cultivés en présence et en absence de milieu EGM2 ou un compte des adipocytes sur des coupes histologiques pourraient apporter des informations complémentaires aux informations prodiguées par les dosages protéiques.

Ensuite, les quantités d'Ang-1 dosées pour les deux types de tissus au moment de la biopsie terminale sont moindres lorsque les tissus ont été cultivés en présence de milieu EGM2, la différence étant significative pour les TAR. Il serait intéressant de vérifier que la stabilité des vaisseaux formés *in vitro* n'est pas affectée par ce changement dans le profil de sécrétion. Dans un modèle de différenciation ostéogénique impliquant la coculture en monocouche de MSC et de OEC (*outgrowth epithelial cells*), une sous-population des précurseurs de cellules endothéliales en circulation possédant des caractéristiques des cellules endothéliales, une équipe a montré que l'utilisation du milieu EGM2 favorisait le recrutement de péricytes et la stabilisation des capillaires par une augmentation de la sécrétion de PDGF (Kolbe et al. 2011). Ces cellules murales (péricytes) étaient mises en évidence par une immunofluorescence indirecte dirigée contre l' $\alpha$ -actine du muscle lisse et du facteur de von Willbrand, permettant de localiser ces cellules autour des structures capillaires de leur modèle (Kolbe et al. 2011). L'observation des jonctions serrées et des cellules murales assurant la stabilité des capillaires *in vitro* serait encore une fois un paramètre intéressant à considérer pour valider leur aspect structural dans nos tissus.

De plus, on observe une augmentation dans la sécrétion de facteurs de croissance (VEGF et HGF) lors des étapes de coculture. Une équipe a d'ailleurs montré que l'ajout du facteur de croissance EGF, que l'on retrouve dans le milieu EGM2, mais dont la concentration est non divulguée, augmente la sécrétion de VEGF et de HGF par les CSTA en culture en monocouche (Li et al. 2013). L'effet est d'ailleurs visible dès 1 mg/ml et maximal à 15 mg/ml (Li et al. 2013). Cette variation dans la sécrétion peut représenter un avantage car ces protéines sont des joueurs clés dans les processus angiogéniques *in vitro* : ils assurent la survie, la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Cai et al. 2007, Ferrara et al. 2003). Kolbe et al. ont également montré dans leur modèle que l'utilisation du milieu EGM2 favorisait la formation de structures CD31<sup>+</sup> ainsi qu'une plus grande quantité de VEGF et de PDGF dosée dans leurs milieux conditionnés (Kolbe et al. 2011).

Le milieu employé pour la coculture semble également favoriser la sécrétion de PAI-1 par les tissus conjonctifs et adipeux. Il se peut que l'augmentation de cette molécule dans les tissus reconstruits procure des effets bénéfiques sur l'angiogenèse *in vitro*. En effet, une étape importante de l'angiogenèse est la dégradation de la matrice extracellulaire pour permettre la migration des cellules endothéliales (Risau 1997). Ainsi, une étude a démontré dans un modèle de coculture tridimensionnel contenant des CSTA et des HUVEC que le système protéolytique de la plasmine (dans lequel PAI-1 joue un rôle) est grandement impliqué dans la dégradation de la MEC et la migration des cellules endothéliales (Kachgal 2011).

L'effet du milieu 1 :1 milieu DH et milieu EGM2 utilisé pour la coculture avec les cellules endothéliales a été confirmé par la comparaison du profil sécrétoire de tissus produits à partir d'une même population, sans cellules endothéliales, cultivés en conditions standards ou en présence de milieu EGM2. L'utilisation d'une seule population cellulaire a permis d'observer les mêmes tendances sur la modulation de la sécrétion des facteurs angiogéniques analysés en éliminant le biais relatif aux variations inter-populations cellulaires.

Le paramètre modulateur de l'angiogenèse principalement investigué dans cette étude demeure la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques par les différents types cellulaires présents dans nos tissus reconstruits, bien que d'autres facteurs aient le potentiel d'agir sur les processus angiogéniques *in vitro*, dont la matrice extracellulaire et la topologie du tapis cellulaire offerte aux cellules endothéliales. Le protocole de reconstruction de tissus conjonctifs et adipeux actuellement utilisé est adapté et optimisé pour la production de tissus destinés à être utilisés comme agent de comblement en chirurgie de reconstruction. Ainsi, dans le but de confirmer notre hypothèse, l'impact des adipocytes sur la formation des capillaires *in vitro* pourrait être mis en évidence par l'utilisation d'un modèle d'étude simplifié, où des milieux conditionnés par les TAR et les TCR seraient mis en contact avec des hMVEC dans un gel de fibrine. Il serait alors possible de comparer l'effet des molécules sécrétées par les divers types de tissus sur la formation de capillaires. Notre étude actuelle démontre de façon convaincante la capacité des tissus adipeux reconstruits par la méthode d'auto-assemblage adaptée à supporter la formation de capillaires *in vitro*, dont notre équipe a montré la fonctionnalité lors de greffes chez la souris athymique (Maryse Proulx, résultats non publiés).

### 3.3 Comparaison avec d'autres modèles

D'autres équipes ont proposé des modèles de tissus adipeux reconstruits enrichis de cellules endothéliales agissant à titre de tissu de remplacement pour le comblement de zones atrophiées résultat de divers traumatismes (brûlure, résection de tumeurs), dont plusieurs ont été présentés dans le Tableau 1.3. La vascularisation rapide du tissu implanté est un élément déterminant pour la survie du greffon, et ce paramètre prend de l'importance plus l'épaisseur et le volume du tissu augmente. L'utilisation d'un réseau préformé de capillaires dans le tissu greffé ou encore l'incorporation de facteurs de croissance dans la matrice sont deux méthodes possibles pour favoriser l'angiogenèse au site d'implantation. Le tissu adipeux reconstruit peut se présenter sous deux aspects : sous forme liquide que l'on peut injecter ou sous forme prédéterminée, solide, que l'on peut implanter [revus dans (Flynn L. and Woodhouse 2008, Young and Christman 2012)]. Plusieurs types de matrices sont disponibles, qu'il est possible d'enrichir ou non de cellules et de facteurs de croissance. Lu et al. ont injecté, en sous-cutané chez la souris C57Bl/6J, 500 µL d'une matrice constituée de tissu adipeux humain décellularisé contenant de l'héparine enrichie de bFGF, sans ajout de cellules (Lu, Li et al. 2014). Il

semble que ce mélange favorise l'adipogenèse et l'angiogenèse au site d'implantation dès trois semaines suivant l'injection (Lu, Li et al. 2014). Bien que ces résultats semblent prometteurs et que ce modèle offre la possibilité d'être autologue, l'injection d'une matrice sous forme liquide cible souvent les interventions au niveau du visage ou nécessitant de petits volumes (Buck et al. 2009). De plus, l'étude montre un relargage contrôlé du bFGF contenu dans leur matrice lors de tests effectués *in vitro*. Par contre, il est possible que le taux de dégradation de la matrice diffère *in vivo* et que la grande quantité de facteurs de croissance ainsi libérée entraîne la progression anarchique de vaisseaux sanguins ou favorise un phénotype de type cancéreux chez les cellules avoisinantes. La durée de l'étude (6 semaines) ne permet peut-être pas de visualiser ces effets. La présence d'héparine dans la matrice semble cependant ralentir l'activité des protéases *in vivo* (Lu et al. 2014). Yao et al. ont proposé récemment un modèle de tissu adipeux composé de microsphères de collagène et d'alginate enrichi de CSTA et de HUVEC (Yao, Zhang et al, 2013). Ils ont injecté en sous-cutané chez la souris un volume de 300-400  $\mu$ L, contenant environ 12 500 microsphères, et il semble que le volume injecté se maintienne au cours du temps (12 semaines) et favorise le développement d'adipocytes au site d'implantation (Yao et al. 2013). Cependant, ce modèle contient des composantes matricielles exogènes (collagène de type 1 provenant de queue de rat) pouvant entraîner des réactions inflammatoires (Anderson J. M. et al. 2008) et conviendrait difficilement pour le comblement de défauts dont la taille est importante étant donné la grande quantité de microsphères que cela nécessiterait. Il a également été montré que les matrices à base de collagène se résorbent rapidement *in vivo* (dans les six mois suivant l'injection) nécessitant donc des interventions répétées pour obtenir un résultat satisfaisant (Young et al. 2014).

D'autres modèles proposés ressemblent davantage aux tissus adipeux reconstruits par auto-assemblage proposés par notre équipe. Ainsi, Traktuev et al. proposent un tissu composé de matrice de collagène et de fibronectine enrichi de CSTA et de EPC (précurseurs de cellules endothéliales) (Traktuev et al. 2009). Les cellules stromales et les cellules endothéliales sontensemencées dans le gel et ce dernier est implanté chez la souris une fois la polymérisation du gel terminée. Un tel protocole propose certes un tissu préparé dans de brefs délais, mais la manipulation de ce dernier est plus délicate et le protocole expérimental, tel que proposé, ne permet pas la différenciation des cellules *in vitro* pour l'obtention d'un tissu adipeux. L'observation de leurs tissus après 14 jours d'implantation montre tout de même une revascularisation, qui serait d'ailleurs favorisée par la présence des EPC dans le modèle. Cependant, des inconvénients liés à l'utilisation de la matrice de collagène demeurent : une équipe a rapporté la formation d'une capsule fibreuse entourant l'implant ainsi qu'une diminution importante du volume du tissu une fois greffé (von Heimburg et al. 2001a), ce qui est également observé lors de l'utilisation du collagène sous forme injecté (Orbay et al. 2011). Par contre, l'utilisation d'une matrice physiologique composée principalement de collagène, mais également d'autres protéines matricielles, comme l'ADM (matrice acellulaire de derme ou *acellular dermal matrix*) provenant de rat, semble favoriser la

réduction du volume du greffon après 8 semaines d'implantation chez la souris, lorsque comparé au gel de collagène injecté (Orbay et al. 2011). La présence des CSTA dans la matrice d'ADM est également bénéfique pour la rétention du volume *in vivo* (Orbay et al. 2011). Cette étude présente un contexte se rapprochant des tissus reconstruits par notre équipe. Bellas et al. proposent un modèle de tissu adipeux reconstruit comportant des CSTA différenciées en adipocytes et des cellules endothéliales microvasculaires primaires humaines dans une matrice de soie (Bellas et al. 2013a). Cette équipe a démontré que leurs tissus adipeux reconstruits, dont le volume initial est de 200 mm<sup>3</sup> (dimensions de 8 mm de diamètre x 4 mm de hauteur), maintenaient leurs volumes en culture statique et dynamique sur une période de six mois. Ce modèle incorpore des cellules qui ont la possibilité d'être autologues. Bien que la matrice de soie ait l'avantage de se dégrader lentement *in vivo* (Wang B. et al. 2008), et possède des propriétés mécaniques intéressantes (Altman G. H. et al. 2003), les coupes transversales de tissus colorées à l'huile rouge ne démontrent pas de façon convaincante la persistance des adipocytes dans le modèle après 1 mois et 6 mois passés en culture (Bellas et al. 2013a). Ce modèle est présenté par les auteurs comme étant un outil intéressant de l'étude *in vitro* de processus adipogéniques. Le comportement *in vivo* de ce modèle n'a pas encore été démontré, bien qu'un modèle de tissu adipeux reconstruit semblable, enrichi de CSTA différenciées en adipocytes, mais sans cellules endothéliales, ait été implanté chez le rat pour une durée maximale de 18 mois (Bellas et al. 2013b). Dans ce cas, la présence des cellules ne semble pas influencer de manière significative la rétention de volume du tissu à long terme, lorsque comparé à la matrice non enrichie de cellules (Bellas et al. 2013b). Le tissu semble vascularisé par l'hôte 6 mois suivant la greffe, bien que très peu d'adipocytes soient mis en évidence par la coloration ORO après 3 et 6 mois d'implantation (Bellas et al. 2013b). Enfin, Sorrell et al. présentent un modèle de tissu adipeux reconstruit par auto-assemblage enrichi de cellules endothéliales (HUVEC) comportant plusieurs populations cellulaires supportant le développement du réseau vasculaire *in vitro* (fibroblastes dermiques et MSCs de la moelle osseuse) (Sorrell et al. 2011). Les feuillets cellulaires semblent effectivement favoriser la formation d'un réseau de capillaires complexe et ramifié *in vitro*, mais dans le cas d'applications cliniques potentielles, l'obtention de MSCs autologues comporte une opération relativement risquée et à morbidité élevée pour le patient et l'utilisation d'HUVEC autologues est également difficile. Les autres populations cellulaires de ce modèle ont tout de même la possibilité d'être de source autologue (CSTA et fibroblastes dermiques). Par contre, le temps de production est relativement long (50 jours) et les feuillets empilés pour former les tissus présentent une contraction importante : le diamètre initial est de 35 mm et les feuillets atteignent un diamètre d'environ 5 mm (diminution de 86%) lorsqu'ils sont superposés, après avoir été laissés contracter une fois levés du puits de culture (Sorrell et al. 2011). Les tissus conjonctifs et adipeux enrichis de cellules endothéliales produits par notre équipe ont un diamètre initial de 21 mm (à l'intérieur de l'anneau d'ancrage en papier filtre) et contractent en moyenne de 40 à 50 % une fois détachés de l'ancrage (Julie Fradette, résultats non publiés). Différentes

méthodes ont d'ailleurs été élaborées pour augmenter la taille et l'épaisseur des tissus produits (volume initial moyen avant greffe de  $160 \pm 34 \text{ mm}^3$ ) (Maryse Proulx, résultats non publiés).

Les tissus conjonctifs et adipeux humains que nous proposons ont l'avantage de n'être constitués d'aucun biomatériau exogène, contrairement à certains modèles proposés qui intègrent des matrices de collagène ou de fibrine, puisque les cellules sécrètent leur propre matrice extracellulaire. Les risques de rejet reliés à l'utilisation de protéines matricielles exogènes (collagène bovin ou de rat) sont grandement diminués. La matrice extracellulaire des tissus reconstruits est complexe et représentative du tissu adipeux humain puisqu'elle est sécrétée par les cellules mêmes du tissu. De plus, les cellules utilisées dans ce modèle ont la possibilité d'être complètement autologues (CSTA et hMVEC), et les interventions nécessaires pour leur obtention sont minimalement invasives et comportent peu de risques pour le donneur. Le temps de production de ces tissus est de 42 jours, excluant le temps nécessaire à l'expansion des cellules. Bien que cette période de temps puisse sembler longue, elle demeure toutefois compétitive face à d'autres modèles également produits par auto-assemblage (Sorrell et al. 2011). Il est également important de mentionner que le temps de culture pour la production de tissus en conditions standards peut être réduit à 35 jours sans avoir d'effets négatifs sur la cohésion entre les feuillets cellulaires. En effet, les feuillets sont superposés à 28 jours de culture au lieu de 30 et sont laissés en culture une semaine supplémentaire pour permettre une bonne cohésion entre les feuillets. Des travaux précédents de notre équipe ont également démontré que la culture en condition dynamique sur des plateformes agitatrices permet la production de feuillets cellulaires plus épais ainsi que la réduction du temps de production de deux semaines (Fortier et al. 2013). Comme il est possible d'ensemencer les cellules endothéliales dès 7 jours suivant la différenciation adipogénique sans nuire au développement des adipocytes, il serait sans doute possible de modifier certains paramètres de production des tissus afin d'en optimiser le temps de production. De plus, étant donné la modulation des profils de sécrétion occasionnée lors de l'ajout du milieu de coculture, il est possible que l'observation de réseaux dans des tissus reconstruits enrichis de cellules endothéliales plus tôt dans le processus de culture permette de mieux visualiser l'impact des adipocytes dans notre modèle. Enfin, tel qu'abordé précédemment, une prochaine étape pour perfectionner le modèle de tissu adipeux et conjonctif proposé par notre équipe serait d'incorporer des cellules endothéliales extraites de tissus adipeux.



## Chapitre 4 : Conclusion

**Rapport-Gratuit.com**



Le but de cette étude consistait à déterminer si la présence des adipocytes dans des tissus adipeux reconstruits par génie tissulaire pouvait influencer la formation de capillaires *in vitro*. Ainsi, des tissus adipeux (TAR) et conjonctifs (TCR) reconstruits par génie tissulaire à partir des mêmes populations de CSTA, induites ou non à se différencier en adipocytes, ont été produits. Ces tissus sont dépourvus de tous biomatériaux exogènes et sont produits à partir d'une source avantageuse de cellules stromales/souches facilement accessible ayant la possibilité d'être de source autologue. L'ajout de cellules endothéliales microvasculaires dermiques dans le modèle a permis la formation de capillaires *in vitro*, qui ont été visualisés et caractérisés à l'aide de méthodes d'imageries adaptées. Même si l'effet des adipocytes dans les tissus reconstruits a été partiellement masqué par l'utilisation de milieux de coculture lors de la production des tissus, il a été démontré que les TAR produisent une quantité supérieure de molécules aux propriétés angiogéniques (leptine, HGF, et Ang-1) lors de l'ajout des cellules endothéliales dans le modèle. La différence initialement observée entre les profils de sécrétion des TAR et des TCR s'atténue au fil du temps passé en culture et l'analyse des réseaux formés au moment de la biopsie terminale montre des similarités entre les deux conditions. Il est possible qu'une observation à des temps plus précoces lors de la production des tissus permette de visualiser l'impact de la présence des adipocytes sur la formation des réseaux de capillaires *in vitro*.

Les protocoles proposés par notre équipe permettent la reconstruction de tissus conjonctifs et adipeux ayant le potentiel de supporter la formation de réseaux de capillaires *in vitro*. La présence d'un réseau vasculaire préformé pourrait se montrer bénéfique lors de la greffe de ces tissus, puisqu'il a été montré qu'une vascularisation trop tardive du greffon provoque souvent la nécrose du tissu et la diminution drastique du volume suivant l'implantation.

En plus de représenter une alternative intéressante pour combler le manque de tissus mous en chirurgie de reconstruction, les tissus conjonctifs et adipeux reconstruits par notre équipe, par les cellules qu'ils contiennent (adipocytes, cellules stromales et cellules endothéliales) et par la matrice dont ils sont constitués (représentative du tissu adipeux humain et sans biomatériaux exogènes), représentent des modèles d'études *in vitro* à considérer pour comprendre les processus liés à l'adipogenèse ainsi qu'à l'adaptation de l'angiogenèse (angio-adaptation) lors de l'expansion/régression du tissu adipeux.



# Bibliographie

- Adams RH, Alitalo K. 2007. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:464-478.
- Ahima RS, Flier JS. 2000. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 11:327-332.
- Ailhaud G, Dani C, Amri EZ, Djian P, Vannier C, Doglio A, Forest C, Gaillard D, Negrel R, Grimaldi P. 1989. Coupling growth arrest and adipocyte differentiation. *Environ Health Perspect* 80:17-23.
- Ailhaud G, Grimaldi P, Negrel R. 1992. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr* 12:207-233.
- Ali AT, Hochfeld WE, Myburgh R, Pepper MS. 2013. Adipocyte and adipogenesis. *Eur J Cell Biol* 92:229-236.
- Altman AM, Yan Y, Matthias N, Bai X, Rios C, Mathur AB, Song YH, Alt EU. 2009. IFATS collection: Human adipose-derived stem cells seeded on a silk fibroin-chitosan scaffold enhance wound repair in a murine soft tissue injury model. *Stem Cells* 27:250-258.
- Altman GH, Diaz F, Jakuba C, Calabro T, Horan RL, Chen J, Lu H, Richmond J, Kaplan DL. 2003. Silk-based biomaterials. *Biomaterials* 24:401-416.
- American Society of Plastic Surgeons. 2014. 2013 Reconstructive Plastic Surgery Statistics. (May, 14 2014; [www.plasticsurgery.org](http://www.plasticsurgery.org))
- Amri EZ, Dani C, Doglio A, Etienne J, Grimaldi P, Ailhaud G. 1986. Adipose cell differentiation: evidence for a two-step process in the polyamine-dependent Ob1754 clonal line. *Biochem J* 238:115-122.
- Anderson GS. 1999. Human morphology and temperature regulation. *Int J Biometeorol* 43:99-109.
- Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. 2008. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol* 20:86-100.
- Aoki S, Toda S, Sakemi T, Sugihara H. 2003. Coculture of endothelial cells and mature adipocytes actively promotes immature preadipocyte development in vitro. *Cell Struct Funct* 28:55-60.
- Aratani Y, Kitagawa Y. 1988. Enhanced synthesis and secretion of type IV collagen and entactin during adipose conversion of 3T3-L1 cells and production of unorthodox laminin complex. *J Biol Chem* 263:16163-16169.
- Arts CH, Heijnen-Snyder GJ, Joosten PP, Verhagen HJ, Eikelboom BC, Sixma JJ, de Groot PG. 2001. A novel method for isolating pure microvascular endothelial cells from subcutaneous fat tissue ideal for direct cell seeding. *Lab Invest* 81:1461-1465.
- Avram AS, Avram MM, James WD. 2005. Subcutaneous fat in normal and diseased states: 2. Anatomy and physiology of white and brown adipose tissue. *J Am Acad Dermatol* 53:671-683.
- Baer PC. 2014. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: An update on their phenotype in vivo and in vitro. *World J Stem Cells* 6:256-265.

- Bastelica D, Morange P, Berthet B, Borghi H, Lacroix O, Grino M, Juhan-Vague I, Alessi MC. 2002. Stromal cells are the main plasminogen activator inhibitor-1-producing cells in human fat: evidence of differences between visceral and subcutaneous deposits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:173-178.
- Bell LN, et al. 2006. Adipose tissue production of hepatocyte growth factor contributes to elevated serum HGF in obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291:E843-848.
- Bellas E, Marra KG, Kaplan DL. 2013a. Sustainable Three-Dimensional Tissue Model of Human Adipose Tissue. *Tissue Eng Part C Methods*.
- Bellas E, Panilaitis BJ, Glettig DL, Kirker-Head CA, Yoo JJ, Marra KG, Rubin JP, Kaplan DL. 2013b. Sustained volume retention in vivo with adipocyte and lipoaspirate seeded silk scaffolds. *Biomaterials* 34:2960-2968.
- Binder BY, Sondergaard CS, Nolte JA, Leach JK. 2013. Lysophosphatidic Acid enhances stromal cell-directed angiogenesis. *PLoS One* 8:e82134.
- Black AF, Berthod F, L'Heureux N, Germain L, Auger FA. 1998. In vitro reconstruction of a human capillary-like network in a tissue-engineered skin equivalent. *FASEB J* 12:1331-1340.
- Borges J, Mueller MC, Padron NT, Tegtmeier F, Lang EM, Stark GB. 2003. Engineered adipose tissue supplied by functional microvessels. *Tissue Eng* 9:1263-1270.
- Borges J, Muller MC, Momeni A, Stark GB, Torio-Padron N. 2007. In vitro analysis of the interactions between preadipocytes and endothelial cells in a 3D fibrin matrix. *Minim Invasive Ther Allied Technol* 16:141-148.
- Bouloumie A, Drexler HC, Lafontan M, Busse R. 1998. Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ Res* 83:1059-1066.
- Bouloumié A, Galitzky J. 2013. Angiogenesis in Adipose Tissue. Pages 27-38 in Bastard J-P, Fève B, eds. *Physiology and Physiopathology of Adipose Tissue*, Springer Paris.
- Bouloumie A, Sengenès C, Portolan G, Galitzky J, Lafontan M. 2001. Adipocyte produces matrix metalloproteinases 2 and 9: involvement in adipose differentiation. *Diabetes* 50:2080-2086.
- Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, Redl H, Rubin JP, Yoshimura K, Gimble JM. 2013. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy* 15:641-648.
- Brakenhielm E, Cao R, Gao B, Angelin B, Cannon B, Parini P, Cao Y. 2004. Angiogenesis inhibitor, TNP-470, prevents diet-induced and genetic obesity in mice. *Circ Res* 94:1579-1588.
- Buck DW, 2nd, Alam M, Kim JY. 2009. Injectable fillers for facial rejuvenation: a review. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 62:11-18.
- Butterwith SC. 1994. Molecular events in adipocyte development. *Pharmacol Ther* 61:399-411.
- Cai L, Johnstone BH, Cook TG, Liang Z, Traktuev D, Cornetta K, Ingram DA, Rosen ED, March KL. 2007. Suppression of hepatocyte growth factor production impairs the ability of adipose-derived stem cells to promote ischemic tissue revascularization. *Stem Cells* 25:3234-3243.

- Cannon B, Nedergaard J. 2004. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84:277-359.
- Cao R, Brakenhielm E, Wahlestedt C, Thyberg J, Cao Y. 2001. Leptin induces vascular permeability and synergistically stimulates angiogenesis with FGF-2 and VEGF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6390-6395.
- Cao Z, Umek RM, McKnight SL. 1991. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev* 5:1538-1552.
- Capeau J, Vigouroux C, Magre J, Lascols O, Caron M, Bastard JP. 2006. [Lipodystrophic syndromes: congenital or acquired diseases of adipose tissue]. *C R Biol* 329:639-652; discussion 653-635.
- Carlson TR, Feng Y, Maisonpierre PC, Mrksich M, Morla AO. 2001. Direct cell adhesion to the angiopoietins mediated by integrins. *J Biol Chem* 276:26516-26525.
- Carmeliet P. 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6:389-395.
- Carmeliet P, et al. 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380:435-439.
- Cawthorn WP, Scheller EL, MacDougald OA. 2012. Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future. *J Lipid Res* 53:227-246.
- Chang KH, Liao HT, Chen JP. 2013. Preparation and characterization of gelatin/hyaluronic acid cryogels for adipose tissue engineering: in vitro and in vivo studies. *Acta Biomater* 9:9012-9026.
- Cho SW, Kim I, Kim SH, Rhie JW, Choi CY, Kim BS. 2006. Enhancement of adipose tissue formation by implantation of adipogenic-differentiated preadipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 345:588-594.
- Choi JH, Gimble JM, Lee K, Marra KG, Rubin JP, Yoo JJ, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. 2010. Adipose tissue engineering for soft tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 16:413-426.
- Choi M, Small K, Levovitz C, Lee C, Fadl A, Karp NS. 2013. The volumetric analysis of fat graft survival in breast reconstruction. *Plast Reconstr Surg* 131:185-191.
- Christiaens V, Lijnen HR. 2010. Angiogenesis and development of adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol* 318:2-9.
- Christy RJ, Yang VW, Ntambi JM, Geiman DE, Landschulz WH, Friedman AD, Nakabeppu Y, Kelly TJ, Lane MD. 1989. Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes: CCAAT/enhancer binding protein interacts with and activates the promoters of two adipocyte-specific genes. *Genes Dev* 3:1323-1335.
- Chung AS, Ferrara N. 2011. Developmental and pathological angiogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27:563-584.
- Cinti S. 1999. Adipose tissues and obesity. *Ital J Anat Embryol* 104:37-51.
- Clapp C, Thebault S, Jeziorski MC, Martinez De La Escalera G. 2009. Peptide hormone regulation of angiogenesis. *Physiol Rev* 89:1177-1215.
- Crandall DL, Busler DE, McHendry-Rinde B, Groeling TM, Kral JG. 2000a. Autocrine regulation of human preadipocyte migration by plasminogen activator inhibitor-1. *J Clin Endocrinol Metab* 85:2609-2614.

- Crandall DL, Groeling TM, Busler DE, Antrilli TM. 2000b. Release of PAI-1 by human preadipocytes and adipocytes independent of insulin and IGF-1. *Biochem Biophys Res Commun* 279:984-988.
- Crandall DL, Hausman GJ, Kral JG. 1997. A review of the microcirculation of adipose tissue: anatomic, metabolic, and angiogenic perspectives. *Microcirculation* 4:211-232.
- Daher SR, Johnstone BH, Phinney DG, March KL. 2008. Adipose stromal/stem cells: basic and translational advances: the IFATS collection. *Stem Cells* 26:2664-2665.
- Davis S, et al. 1996. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 87:1161-1169.
- Dent JA, Polson AG, Klymkowsky MW. 1989. A whole-mount immunocytochemical analysis of the expression of the intermediate filament protein vimentin in *Xenopus*. *Development* 105:61-74.
- Dickie R, Bachoo RM, Rupnick MA, Dallabrida SM, Deloid GM, Lai J, Depinho RA, Rogers RA. 2006. Three-dimensional visualization of microvessel architecture of whole-mount tissue by confocal microscopy. *Microvasc Res* 72:20-26.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315-317.
- Dumont DJ, Yamaguchi TP, Conlon RA, Rossant J, Breitman ML. 1992. tek, a novel tyrosine kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells and their presumptive precursors. *Oncogene* 7:1471-1480.
- Ema M, Faloon P, Zhang WJ, Hirashima M, Reid T, Stanford WL, Orkin S, Choi K, Rossant J. 2003. Combinatorial effects of Flk1 and Tal1 on vascular and hematopoietic development in the mouse. *Genes Dev* 17:380-393.
- Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. 2004. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 145:2273-2282.
- Fajas L, et al. 1997. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem* 272:18779-18789.
- Farmer SR. 2006. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab* 4:263-273.
- Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. 1996. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380:439-442.
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9:669-676.
- Fiedler U, Scharpfenecker M, Koidl S, Hegen A, Grunow V, Schmidt JM, Kriz W, Thurston G, Augustin HG. 2004. The Tie-2 ligand angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood* 103:4150-4156.
- Finch GD, Dawe CJ. 2003. Hemiatrophy. *J Pediatr Orthop* 23:99-101.



- Flynn L, Prestwich GD, Semple JL, Woodhouse KA. 2007. Adipose tissue engineering with naturally derived scaffolds and adipose-derived stem cells. *Biomaterials* 28:3834-3842.
- Flynn L, Semple JL, Woodhouse KA. 2006. Decellularized placental matrices for adipose tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 79:359-369.
- Flynn L, Woodhouse KA. 2008. Adipose tissue engineering with cells in engineered matrices. *Organogenesis* 4:228-235.
- Flynn LE. 2010. The use of decellularized adipose tissue to provide an inductive microenvironment for the adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Biomaterials* 31:4715-4724.
- Fokin AA, Robicsek F. 2002. Poland's syndrome revisited. *Ann Thorac Surg* 74:2218-2225.
- Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI, Lima FB. 2007. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J Pediatr (Rio J)* 83:S192-203.
- Fortier GM, Gauvin R, Proulx M, Vallee M, Fradette J. 2013. Dynamic culture induces a cell type-dependent response impacting on the thickness of engineered connective tissues. *J Tissue Eng Regen Med* 7:292-301.
- Friedman JM, Halaas JL. 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395:763-770.
- Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ, Burrell MA. 2001. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E827-847.
- Fukuhara S, Sako K, Noda K, Zhang J, Minami M, Mochizuki N. 2010. Angiopoietin-1/Tie2 receptor signaling in vascular quiescence and angiogenesis. *Histol Histopathol* 25:387-396.
- Geevarghese A, Herman IM. 2014. Pericyte-endothelial crosstalk: implications and opportunities for advanced cellular therapies. *Transl Res* 163:296-306.
- Gehmert S, Gehmert S, Hidayat M, Sultan M, Berner A, Klein S, Zellner J, Muller M, Prantl L. 2011. Angiogenesis: the role of PDGF-BB on adipose-tissue derived stem cells (ASCs). *Clin Hemorheol Microcirc* 48:5-13.
- Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. 2007. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* 131:242-256.
- Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. 2007. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 100:1249-1260.
- Gimble JM, Robinson CE, Clarke SL, Hill MR. 1998. Nuclear hormone receptors and adipogenesis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 8:141-168.
- Green H, Kehinde O. 1975. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* 5:19-27.
- Green H, Kehinde O. 1976. Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell* 7:105-113.
- Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78:783-809.

- Grimaldi PA. 2007. Regulatory functions of PPARbeta in metabolism: implications for the treatment of metabolic syndrome. *Biochim Biophys Acta* 1771:983-990.
- Guilak F, Lott KE, Awad HA, Cao Q, Hicok KC, Fermor B, Gimble JM. 2006. Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. *J Cell Physiol* 206:229-237.
- Gupta RK, Arany Z, Seale P, Mepani RJ, Ye L, Conroe HM, Roby YA, Kulaga H, Reed RR, Spiegelman BM. 2010. Transcriptional control of preadipocyte determination by Zfp423. *Nature* 464:619-623.
- Halbleib M, Skurk T, de Luca C, von Heimburg D, Hauner H. 2003. Tissue engineering of white adipose tissue using hyaluronic acid-based scaffolds. I: in vitro differentiation of human adipocyte precursor cells on scaffolds. *Biomaterials* 24:3125-3132.
- Hauner H. 2004. The new concept of adipose tissue function. *Physiol Behav* 83:653-658.
- Hausman DB, DiGirolamo M, Bartness TJ, Hausman GJ, Martin RJ. 2001. The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev* 2:239-254.
- Hausman GJ, Richardson RL. 2004. Adipose tissue angiogenesis. *J Anim Sci* 82:925-934.
- Hewett PW, Murray JC, Price EA, Watts ME, Woodcock M. 1993. Isolation and characterization of microvessel endothelial cells from human mammary adipose tissue. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 29A:325-331.
- Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. 1999. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 284:1994-1998.
- Hong L, Peptan I, Clark P, Mao JJ. 2005. Ex vivo adipose tissue engineering by human marrow stromal cell seeded gelatin sponge. *Ann Biomed Eng* 33:511-517.
- Hudon V, Berthod F, Black AF, Damour O, Germain L, Auger FA. 2003. A tissue-engineered endothelialized dermis to study the modulation of angiogenic and angiostatic molecules on capillary-like tube formation in vitro. *Br J Dermatol* 148:1094-1104.
- Hutley LJ, Herington AC, Shurety W, Cheung C, Vesey DA, Cameron DP, Prins JB. 2001. Human adipose tissue endothelial cells promote preadipocyte proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281:E1037-1044.
- Ibrahimi A, Bonino F, Bardon S, Ailhaud G, Dani C. 1992. Essential role of collagens for terminal differentiation of preadipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 187:1314-1322.
- Ilan N, Madri JA. 2003. PECAM-1: old friend, new partners. *Curr Opin Cell Biol* 15:515-524.
- Iwama A, Hamaguchi I, Hashiyama M, Murayama Y, Yasunaga K, Suda T. 1993. Molecular cloning and characterization of mouse TIE and TEK receptor tyrosine kinase genes and their expression in hematopoietic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 195:301-309.
- Jain RK. 2003. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 9:685-693.
- Kachgal S, Putnam AJ. 2011. Mesenchymal stem cells from adipose and bone marrow promote angiogenesis via distinct cytokine and protease expression mechanisms. *Angiogenesis* 14:47-59.

- Kang JH, Gimble JM, Kaplan DL. 2009. In vitro 3D model for human vascularized adipose tissue. *Tissue Eng Part A* 15:2227-2236.
- Kimura Y, Ozeki M, Inamoto T, Tabata Y. 2002. Time course of de novo adipogenesis in matrigel by gelatin microspheres incorporating basic fibroblast growth factor. *Tissue Eng* 8:603-613.
- Kimura Y, Ozeki M, Inamoto T, Tabata Y. 2003. Adipose tissue engineering based on human preadipocytes combined with gelatin microspheres containing basic fibroblast growth factor. *Biomaterials* 24:2513-2521.
- Kirkland JL, Hollenberg CH, Gillon WS. 1996. Effects of fat depot site on differentiation-dependent gene expression in rat preadipocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 20 Suppl 3:S102-107.
- Klaus S. 2001. Biological Significance of Fat and Adipose Tissues. Pages 10 in Klaus S, ed. *Adipose Tissues*, Landes Bioscience.
- Kolbe M, Xiang Z, Dohle E, Tonak M, Kirkpatrick CJ, Fuchs S. 2011. Paracrine effects influenced by cell culture medium and consequences on microvessel-like structures in cocultures of mesenchymal stem cells and outgrowth endothelial cells. *Tissue Eng Part A* 17:2199-2212.
- Kubo Y, Kaidzu S, Nakajima I, Takenouchi K, Nakamura F. 2000. Organization of extracellular matrix components during differentiation of adipocytes in long-term culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 36:38-44.
- L'Heureux N, Paquet S, Labbe R, Germain L, Auger FA. 1998. A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J* 12:47-56.
- Ledoux S, Queguiner I, Msika S, Calderari S, Rufat P, Gasc JM, Corvol P, Larger E. 2008. Angiogenesis associated with visceral and subcutaneous adipose tissue in severe human obesity. *Diabetes* 57:3247-3257.
- Li WH, Pappas A, Zhang L, Ruvolo E, Cavender D. 2013. IL-11, IL-1alpha, IL-6, and TNF-alpha are induced by solar radiation in vitro and may be involved in facial subcutaneous fat loss in vivo. *J Dermatol Sci* 71:58-66.
- Liekens S, De Clercq E, Neyts J. 2001. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol* 61:253-270.
- Lin FT, Lane MD. 1992. Antisense CCAAT/enhancer-binding protein RNA suppresses coordinate gene expression and triglyceride accumulation during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Genes Dev* 6:533-544.
- Lobov IB, Brooks PC, Lang RA. 2002. Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11205-11210.
- Lu Q, Li M, Zou Y, Cao T. 2014. Delivery of basic fibroblast growth factors from heparinized decellularized adipose tissue stimulates potent de novo adipogenesis. *J Control Release* 174:43-50.
- Maisonpierre PC, et al. 1997. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277:55-60.
- Mandrup S, Lane MD. 1997. Regulating adipogenesis. *J Biol Chem* 272:5367-5370.
- Masuda T, Furue M, Matsuda T. 2004. Novel strategy for soft tissue augmentation based on transplantation of fragmented omentum and preadipocytes. *Tissue Eng* 10:1672-1683.

- Maumus M, Peyrafitte JA, D'Angelo R, Fournier-Wirth C, Bouloumie A, Casteilla L, Sengenès C, Bourin P. 2011. Native human adipose stromal cells: localization, morphology and phenotype. *Int J Obes (Lond)* 35:1141-1153.
- Mauney JR, Nguyen T, Gillen K, Kirker-Head C, Gimble JM, Kaplan DL. 2007. Engineering adipose-like tissue in vitro and in vivo utilizing human bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells with silk fibroin 3D scaffolds. *Biomaterials* 28:5280-5290.
- Mizuno H, Zuk PA, Zhu M, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrick MH. 2002. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast Reconstr Surg* 109:199-209; discussion 210-191.
- Mohamed-Ali V, Pinkney JH, Coppack SW. 1998. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int J Obes Relat Metab Disord* 22:1145-1158.
- Mojallal A, Foyatier JL. 2004. [Historical review of the use of adipose tissue transfer in plastic and reconstructive surgery]. *Ann Chir Plast Esthet* 49:419-425.
- Morishita R, Aoki M, Yo Y, Ogihara T. 2002. Hepatocyte growth factor as cardiovascular hormone: role of HGF in the pathogenesis of cardiovascular disease. *Endocr J* 49:273-284.
- Nakagami H, Morishita R, Yamamoto K, Taniyama Y, Aoki M, Matsumoto K, Nakamura T, Kaneda Y, Horiuchi M, Ogihara T. 2001. Mitogenic and antiapoptotic actions of hepatocyte growth factor through ERK, STAT3, and AKT in endothelial cells. *Hypertension* 37:581-586.
- Nakajima I, Muroya S, Tanabe R, Chikuni K. 2002. Extracellular matrix development during differentiation into adipocytes with a unique increase in type V and VI collagen. *Biol Cell* 94:197-203.
- Nakamura Y, et al. 1995. Expression of local hepatocyte growth factor system in vascular tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 215:483-488.
- Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. 2007. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:E444-452.
- Neels JG, Thinnes T, Loskutoff DJ. 2004. Angiogenesis in an in vivo model of adipose tissue development. *FASEB J* 18:983-985.
- Obregon MJ. 2008. Thyroid hormone and adipocyte differentiation. *Thyroid* 18:185-195.
- Oppenheimer JH, Schwartz HL, Lane JT, Thompson MP. 1991. Functional relationship of thyroid hormone-induced lipogenesis, lipolysis, and thermogenesis in the rat. *J Clin Invest* 87:125-132.
- Orbay H, Takami Y, Hyakusoku H, Mizuno H. 2011. Acellular dermal matrix seeded with adipose-derived stem cells as a subcutaneous implant. *Aesthetic Plast Surg* 35:756-763.
- Ouellet V, Labbe SM, Blondin DP, Phoenix S, Guerin B, Haman F, Turcotte EE, Richard D, Carpentier AC. 2012. Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. *J Clin Invest* 122:545-552.
- Pallua N, Serin M, Wolter TP. 2014. Characterisation of angiogenic growth factor production in adipose tissue-derived mesenchymal cells. *J Plast Surg Hand Surg*.

- Papetti M, Herman IM. 2002. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:C947-970.
- Park HY, Kwon HM, Lim HJ, Hong BK, Lee JY, Park BE, Jang Y, Cho SY, Kim HS. 2001. Potential role of leptin in angiogenesis: leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases in vivo and in vitro. *Exp Mol Med* 33:95-102.
- Pepper MS. 2001. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:1104-1117.
- Peterkofsky B. 1991. Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy. *Am J Clin Nutr* 54:1135S-1140S.
- Pittenger MF. 2008. Mesenchymal stem cells from adult bone marrow. *Methods Mol Biol* 449:27-44.
- Planat-Benard V, et al. 2004. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 109:656-663.
- Proenca AR, Sertie RA, Oliveira AC, Campaaa AB, Caminhotto RO, Chimin P, Lima FB. 2014. New concepts in white adipose tissue physiology. *Braz J Med Biol Res* 47:192-205.
- Quach JM, Walker EC, Allan E, Solano M, Yokoyama A, Kato S, Sims NA, Gillespie MT, Martin TJ. 2011. Zinc finger protein 467 is a novel regulator of osteoblast and adipocyte commitment. *J Biol Chem* 286:4186-4198.
- Ramsay TG. 1996. Fat cells. *Endocrinol Metab Clin North Am* 25:847-870.
- Rangappa S, Fen C, Lee EH, Bongso A, Sim EK. 2003. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. *Ann Thorac Surg* 75:775-779.
- Rehman J, Considine RV, Bovenkerk JE, Li J, Slavens CA, Jones RM, March KL. 2003. Obesity is associated with increased levels of circulating hepatocyte growth factor. *J Am Coll Cardiol* 41:1408-1413.
- Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Considine RV, March KL. 2004. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 109:1292-1298.
- Rieusset J, Andreelli F, Auboeuf D, Roques M, Vallier P, Riou JP, Auwerx J, Laville M, Vidal H. 1999. Insulin acutely regulates the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in human adipocytes. *Diabetes* 48:699-705.
- Risau W. 1995. Differentiation of endothelium. *FASEB J* 9:926-933.
- Risau W. 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386:671-674.
- Rochon MH, Fradette J, Fortin V, Tomasetig F, Roberge CJ, Baker K, Berthod F, Auger FA, Germain L. 2010. Normal human epithelial cells regulate the size and morphology of tissue-engineered capillaries. *Tissue Eng Part A* 16:1457-1468.
- Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, Spiegelman BM. 2002. C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev* 16:22-26.

- Rosen ED, MacDougald OA. 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:885-896.
- Rousseau A, Fradette J, Bernard G, Gauvin R, Laterreur V, Bolduc S. 2013. Adipose-derived stromal cells for the reconstruction of a human vesical equivalent. *J Tissue Eng Regen Med*.
- Rubin JP, Bennett JM, Doctor JS, Tebbets BM, Marra KG. 2007. Collagenous microbeads as a scaffold for tissue engineering with adipose-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg* 120:414-424.
- Rupnick MA, Panigrahy D, Zhang CY, Dallabrida SM, Lowell BB, Langer R, Folkman MJ. 2002. Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10730-10735.
- Safford KM, Hicok KC, Safford SD, Halvorsen YD, Wilkison WO, Gimble JM, Rice HE. 2002. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 294:371-379.
- Saiki A, Watanabe F, Murano T, Miyashita Y, Shirai K. 2006. Hepatocyte growth factor secreted by cultured adipocytes promotes tube formation of vascular endothelial cells in vitro. *Int J Obes (Lond)* 30:1676-1684.
- Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, Gridley T, Wolburg H, Risau W, Qin Y. 1995. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* 376:70-74.
- Schipper BM, Marra KG, Zhang W, Donnenberg AD, Rubin JP. 2008. Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells. *Ann Plast Surg* 60:538-544.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG. 2000. Central nervous system control of food intake. *Nature* 404:661-671.
- Sierra-Honigmann MR, et al. 1998. Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 281:1683-1686.
- Silva EA, Mooney DJ. 2007. Spatiotemporal control of vascular endothelial growth factor delivery from injectable hydrogels enhances angiogenesis. *J Thromb Haemost* 5:590-598.
- Smith PJ, Wise LS, Berkowitz R, Wan C, Rubin CS. 1988. Insulin-like growth factor-I is an essential regulator of the differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 263:9402-9408.
- Sorrell JM, Baber MA, Caplan AI. 2008. Human dermal fibroblast subpopulations; differential interactions with vascular endothelial cells in coculture: nonsoluble factors in the extracellular matrix influence interactions. *Wound Repair Regen* 16:300-309.
- Sorrell JM, Baber MA, Traktuev DO, March KL, Caplan AI. 2011. The creation of an in vitro adipose tissue that contains a vascular-adipocyte complex. *Biomaterials* 32:9667-9676.
- Spalding KL, et al. 2008. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453:783-787.
- Springhorn JP. 2011. Isolation of human capillary endothelial cells from abdominal adipose tissue. *Cold Spring Harb Protoc* 2011:pdb prot4537.
- Stefansson S, Lawrence DA. 1996. The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin alpha V beta 3 binding to vitronectin. *Nature* 383:441-443.

- Stini WA. 1981. Body composition and nutrient reserves in evolutionary perspective. *World Rev Nutr Diet* 37:55-83.
- Strem BM, Hedrick MH. 2005. The growing importance of fat in regenerative medicine. *Trends Biotechnol* 23:64-66.
- Tabata Y, Miyao M, Inamoto T, Ishii T, Hirano Y, Yamaoki Y, Ikada Y. 2000. De novo formation of adipose tissue by controlled release of basic fibroblast growth factor. *Tissue Eng* 6:279-289.
- Tang W, Zeve D, Suh JM, Bosnakovski D, Kyba M, Hammer RE, Tallquist MD, Graff JM. 2008. White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science* 322:583-586.
- Tanzi MC, Fare S. 2009. Adipose tissue engineering: state of the art, recent advances and innovative approaches. *Expert Rev Med Devices* 6:533-551.
- Tartaglia LA. 1997. The leptin receptor. *J Biol Chem* 272:6093-6096.
- Thomas M, Augustin HG. 2009. The role of the Angiopoietins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis* 12:125-137.
- Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, Zhou H, Ross L, Croll SD, Glazer N, Holash J, McDonald DM, Yancopoulos GD. 2000. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med* 6:460-463.
- Toriyama K, Kawaguchi N, Kitoh J, Tajima R, Inou K, Kitagawa Y, Torii S. 2002. Endogenous adipocyte precursor cells for regenerative soft-tissue engineering. *Tissue Eng* 8:157-165.
- Traktuev DO, Merfeld-Clauss S, Li J, Kolonin M, Arap W, Pasqualini R, Johnstone BH, March KL. 2008. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circ Res* 102:77-85.
- Traktuev DO, Prater DN, Merfeld-Clauss S, Sanjeevaiah AR, Saadatzadeh MR, Murphy M, Johnstone BH, Ingram DA, March KL. 2009. Robust functional vascular network formation in vivo by cooperation of adipose progenitor and endothelial cells. *Circ Res* 104:1410-1420.
- Trayhurn P, Beattie JH. 2001. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc* 60:329-339.
- Tremblay PL, Hudon V, Berthod F, Germain L, Auger FA. 2005. Inosculation of tissue-engineered capillaries with the host's vasculature in a reconstructed skin transplanted on mice. *Am J Transplant* 5:1002-1010.
- Trottier V, Marceau-Fortier G, Germain L, Vincent C, Fradette J. 2008. IFATS collection: Using human adipose-derived stem/stromal cells for the production of new skin substitutes. *Stem Cells* 26:2713-2723.
- Van Belle E, Witzenbichler B, Chen D, Silver M, Chang L, Schwall R, Isner JM. 1998. Potentiated angiogenic effect of scatter factor/hepatocyte growth factor via induction of vascular endothelial growth factor: the case for paracrine amplification of angiogenesis. *Circulation* 97:381-390.
- van Harmelen V, Skurk T, Rohrig K, Lee YM, Halbleib M, Aprath-Husmann I, Hauner H. 2003. Effect of BMI and age on adipose tissue cellularity and differentiation capacity in women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27:889-895.

van Marken Lichtenbelt WD, Vanhomerig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, Schrauwen P, Teule GJ. 2009. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med* 360:1500-1508.

Varzaneh FE, Shillabeer G, Wong KL, Lau DC. 1994. Extracellular matrix components secreted by microvascular endothelial cells stimulate preadipocyte differentiation in vitro. *Metabolism* 43:906-912.

Vermette M, Trottier V, Menard V, Saint-Pierre L, Roy A, Fradette J. 2007. Production of a new tissue-engineered adipose substitute from human adipose-derived stromal cells. *Biomaterials* 28:2850-2860.

Verseijden F, Jahr H, Posthumus-van Sluijs SJ, Ten Hagen TL, Hovius SE, Seynhaeve AL, van Neck JW, van Osch GJ, Hofer SO. 2009. Angiogenic capacity of human adipose-derived stromal cells during adipogenic differentiation: an in vitro study. *Tissue Eng Part A* 15:445-452.

von Heimburg D, Zachariah S, Heschel I, Kuhling H, Schoof H, Hafemann B, Pallua N. 2001a. Human preadipocytes seeded on freeze-dried collagen scaffolds investigated in vitro and in vivo. *Biomaterials* 22:429-438.

von Heimburg D, Zachariah S, Low A, Pallua N. 2001b. Influence of different biodegradable carriers on the in vivo behavior of human adipose precursor cells. *Plast Reconstr Surg* 108:411-420; discussion 421-412.

Wang B, Wood IS, Trayhurn P. 2008. Hypoxia induces leptin gene expression and secretion in human preadipocytes: differential effects of hypoxia on adipokine expression by preadipocytes. *J Endocrinol* 198:127-134.

Wang L, Johnson JA, Zhang Q, Beahm EK. 2013. Combining decellularized human adipose tissue extracellular matrix and adipose-derived stem cells for adipose tissue engineering. *Acta Biomater* 9:8921-8931.

Wassennan F. 1965. The development of adipose tissue. Pages 87-100 in Cahill GF, Renold AE, Society AP, eds. *Handbook of Physiology: Section 5 : Adipose Tissues*. Washington, DC: American Physiological Society ; Baltimore, Md.

Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. 2000. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407:242-248.

Yao R, Du Y, Zhang R, Lin F, Luan J. 2013a. A biomimetic physiological model for human adipose tissue by adipocytes and endothelial cell cocultures with spatially controlled distribution. *Biomed Mater* 8:045005.

Yao R, Zhang R, Lin F, Luan J. 2013b. Biomimetic injectable HUVEC-adipocytes/collagen/alginate microsphere co-cultures for adipose tissue engineering. *Biotechnol Bioeng* 110:1430-1443.

Yeh WC, Cao Z, Classon M, McKnight SL. 1995. Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev* 9:168-181.

Young DA, Bajaj V, Christman KL. 2014. Award winner for outstanding research in the PhD category, 2014 society for biomaterials annual meeting and exposition, denver, colorado, april 16-19, 2014: Decellularized adipose matrix hydrogels stimulate in vivo neovascularization and adipose formation. *J Biomed Mater Res A* 102:1641-1651.

Young DA, Christman KL. 2012. Injectable biomaterials for adipose tissue engineering. *Biomed Mater* 7:024104.



Zhang JW, Klemm DJ, Vinson C, Lane MD. 2004. Role of CREB in transcriptional regulation of CCAAT/enhancer-binding protein beta gene during adipogenesis. *J Biol Chem* 279:4471-4478.

Zhang QX, Magovern CJ, Mack CA, Budenbender KT, Ko W, Rosengart TK. 1997. Vascular endothelial growth factor is the major angiogenic factor in omentum: mechanism of the omentum-mediated angiogenesis. *J Surg Res* 67:147-154.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432.

Zucker RM. 2006. Whole insect and mammalian embryo imaging with confocal microscopy: morphology and apoptosis. *Cytometry A* 69:1143-1152.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13:4279-4295.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7:211-228.