

THÈSE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
SPÉCIALITÉ BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOPATHOLOGIE

Par LESIEUR Romane

Ingénierie tissulaire de l'œsophage

Sous la direction du Pr Laurence BORDENAVE

Soutenue le 13 février 2024

Membres du jury :

Mme LE VISAGE, Catherine	DR INSERM, Université de Nantes	Présidente
Mme BORDENAVE, Laurence	Professeure émérite, Université de Bordeaux	Directrice
Mme LE VISAGE, Catherine	DR INSERM, Université de Nantes	Rapporteuse
Mme GERMAIN, Lucie	Full Professor, Université de Québec	Rapporteuse
Mr. BERGER, Arthur	PH, CHU de Bordeaux	Examinateur
Mr. CARRERE, Nicolas	PU-PH, Université de Toulouse	Examinateur
Mme EL OMAR, Reine	MCU CNRS, Université de Lorraine	Invitée
Mr. COLLET, Denis	Professeur émérite, Université de Bordeaux	Invité

RÉSUMÉ

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

Résumé : La restauration de la continuité digestive suite à l'ablation d'une portion de l'œsophage consiste à la réalisation chirurgicale d'une anastomose œsogastrique intra-thoracique. Néanmoins des complications post-opératoires sont décrites telles que des atteintes pulmonaires, des fistules, des sténoses, des nécroses de plastie, et un reflux gastro-œsophagien. Le développement d'un substitut issu de l'ingénierie tissulaire dérivé de la matrice œsophagienne biologique décellularisée (MBD) est prometteur dans la perspective d'améliorer la prise en charge du traitement chirurgical pour la réparation de l'œsophage. L'objectif principal de cette étude était d'optimiser la conception d'une MBD de porc et de caractériser ses propriétés biologiques et mécaniques. Le second objectif était de cellulariser la MBD au moyen de cellules immuno-privilégiées, facilement disponibles : les cellules stromales mésenchymateuses humaines issues de la gelée de Wharton (CSM-GW).

La décellularisation de l'œsophage était réalisée selon un protocole basé sur la perfusion dynamique de solutions chimiques et enzymatiques de la lumière de l'organe. L'analyse histologique et la quantification de l'acide désoxyribonucléique (ADN) résiduel de la MBD permettaient de déterminer l'efficacité du protocole de décellularisation. L'ultrastructure de la MBD était analysée par des marquages immunohistochimiques (IHC), et la composition du contenu protéique de la matrice extracellulaire (MEC) était décrite par spectrométrie de masse. Les tests de cytotoxicité *in vitro* de la MBD étaient réalisés conformément à la norme ISO 10993-5. L'évaluation de la force de rétention à la suture, la résistance à la traction et la pression à l'éclatement de la MBD consistaient à décrire le comportement mécanique du substitut en regard de son utilisation clinique. Les CSM-GW utilisées pour la cellularisation de la MBD étaient extraites à partir de cordons ombilicaux humains et leur profilage par cytométrie en flux permettait de confirmer la pureté de la population cellulaire. Le potentiel immunitaire des CSM-GW était évalué après une co-culture avec des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC). Le phénotypage des PBMC permettait d'évaluer l'expression des marqueurs immunitaires au contact des CSM-GW, et l'étude du sécrétome, par une méthode immuno-enzymatique (ELISA), permettait de quantifier le relargage des cytokines. La stratégie de cellularisation de la MBD proposée reposait sur le développement de feuillets

cellulaires de CSM-GW. La validation du protocole de fabrication des feuillets consistait en la caractérisation du phénotype cellulaire par IHC et l'étude mécanique des feuillets permettait de mesurer leur résistance à la perforation.

L'absence de contenu cellulaire et la quantification de l'ADN résiduel de la MBD confirmaient l'efficacité de la décellularisation selon les critères de validation en vigueur. L'ultrastructure et les composants biologiques de la MEC étaient préservés et l'analyse protéomique de la MEC mettait en évidence une complexité du contenu protéique. La MBD était biocompatible et son comportement mécanique était adapté à son utilisation en tant que substitut œsophagien.

La culture des CSM-GW sous forme de feuillets favorisait la cellularisation de la MBD. Une fois ensemencés, les feuillets avaient conservé leur phénotype cellulaire et leurs caractéristiques immuno-privilégiées. Un remodelage tissulaire *in vitro* était visible ainsi que la formation d'une nouvelle MEC produite par les CSM-GW.

Les caractérisations de la MBD obtenue offraient une complexité biologique et un comportement mécanique favorable à son utilisation en tant que substitut œsophagien. La MBD était cellularisable avec des feuillets cellulaires de CSM-GW, pouvant favoriser ainsi l'intégration et le remodelage des tissus.

Mots clés : Matrice décellularisée, substitut œsophagien, cellules stromales mésenchymateuses de la gelée de Wharton.

Title : Implementation of manufacturing processes for a biological esophageal matrix

Abstract : Upon removal of a portion of the esophagus, the restoration of the digestive continuity involves the surgical creation of an intrathoracic esophagogastric anastomosis. However, postoperative complications such as lung impairments, fistulas, strictures, graft necrosis, and gastroesophageal reflux are reported. The improvement of surgical procedures for esophageal repair has made promising progress by the development of a substitute through tissue engineering that utilizes a decellularized biological esophageal matrix (DEM). The primary objective of this study was to optimize the design of porcine DEM and characterize its biological and mechanical properties. The secondary objective was to cellularize DEM using readily available immune-privileged human mesenchymal stromal cells derived from Wharton's jelly (MSCs-WJ).

Esophageal decellularization was performed according to a protocol based on the dynamic perfusion of chemical and enzymatic solutions through the organ lumen. Histological analysis and residual DNA quantification of the DEM were conducted to determine the efficiency of the decellularization protocol. The ultrastructure of the DEM was analyzed using immunohistochemical (IHC) labeling, and the composition of the extracellular matrix (ECM) protein content was described by mass spectrometry. *In vitro* cytotoxicity tests of DEM were conducted following ISO 10993-5 standards. The evaluation of suture retention strength, tensile strength, and bursting pressure of DEM aimed to describe the mechanical behavior of the substitute for clinical use.

MSCs-WJ used for DEM cellularization were extracted from human umbilical cords, and their flow cytometry profiling confirmed the purity of the cell population. The immune potential of MSCs-WJ was evaluated after co-culture with peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). PBMCs phenotyping assessed the expression of immune markers in contact with MSCs-WJ, while enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantified cytokine release. The proposed DEM cellularization strategy involved the development of cell sheets from MSCs-WJ. The validation of the cell sheet production protocol involved the characterization of the cellular

phenotype by IHC analysis, and the mechanical study of the sheets measured their resistance to perforation.

The absence of cellular content and residual DNA quantification in DEM confirmed the efficacy of decellularization according to current validation criteria. The ultrastructure and biological components of the ECM were preserved, and proteomic analysis highlighted the complexity of protein content. Decellularization treatment did not induce DEM toxicity, and the mechanical behavior of DEM was suitable for its use as an esophageal substitute.

Culturing MSCs-WJ as cell sheets promoted the cellularization of the DEM. Once seeded, the sheets retained their cellular phenotype and immune-privileged characteristics. *In vitro* tissue remodeling was visible, along with the formation of a new ECM produced by MSCs-WJ.

Characterization of the obtained DEM offered biological complexity and favorable mechanical behavior for its use as an esophageal substitute. DEM was cellularizable with MSCs-WJ cell sheets, potentially promoting tissue integration and remodeling.

Keywords : Decellularized matrix, esophageal substitute, mesenchymal stromal cells derived from Wharton's Jelly.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement les membres du jury pour m'avoir consacré leur temps, leur expertise et pour leur évaluation de mes travaux de thèse. Merci au Pr Lucie Germain, et au Pr Catherine Levisage de m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury en tant que rapportrices. Merci au Dr Arthur Berger, au Pr Nicolas Carrere ainsi qu'au Dr Reine El Omar et au Pr Denis Collet pour votre implication dans ce projet.

Laurence, merci pour votre engagement infatigable envers l'excellence. Je suis convaincue que votre expertise continuera d'inspirer les chercheurs de demain. Ce fut un plaisir d'avoir été votre étudiante.

Marlène, je tiens à te remercier pour l'accompagnement tout au long de ces années. Ta patience et tes conseils éclairés ont grandement enrichi mon travail. Merci pour ta bienveillance et ton écoute qui ont rendu cette expérience d'autant plus précieuse.

Mes chers collègues du laboratoire, je tiens à vous remercier pour avoir fait de ces années de thèse une expérience mémorable. Votre aide, vos encouragements, votre soutien, et votre amitié ont été essentiels. Votre contribution ne peut être sous-estimée, et je vous remercie du fond du cœur pour avoir fait partie de cette aventure.

A nous, les doctorants, ceux qui démystifient les sciences, tout en se demandant pourquoi nous avons choisi cette vie. Vous me manquerez.

A mes amis. Votre présence a été une source de force et de joie, et m'a rappelé l'importance de persévérer. Vous m'avez apporté l'équilibre instable parfait dont j'avais besoin pour avancer dans mes travaux de thèse.

Mathieu, t'avoir à mes côtés a été un réconfort inestimable dans cette dernière course folle. Je te remercie pour ta patience infinie, et j'ai hâte que l'on soit réunis.

A mes grands-parents, mes parents, mon frère, et ma sœur. Je vous serai éternellement reconnaissante d'être à mes côtés, et de compter sur votre présence bienveillante. Sans vous, tout cela n'aurait pas été possible. Je vous remercie d'avoir été là, pour partager mes doutes mais également nos innombrables moments de joies.

*Cette thèse porte la marque de chacun d'entre vous, et je remercie tous ceux qui y ont
contribué, de près ou de loin.*

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 – Anatomie descriptive de l'œsophage. ¹	23
Figure 2 - Coupe transversale d'un œsophage. Structure de la paroi œsophagienne.	24
Figure 3 - Embryologie de l'œsophage à la 8e semaine. 1 : trachée. 2 : vertèbre cervicale n°7. 3 : œsophage. 4 : poumon. 5 : estomac. 6. vertèbre thoracique n°12. ¹	25
Figure 4 - Vascularisation de l'œsophage. ⁴	26
Figure 5 - Troubles du cloisonnement entre trachée et œsophage, variété anatomiques d'AO associée ou non à une connexion anormale entre l'œsophage et la trachée par une fistule trachéo-œsophagienne. ¹¹	28
Figure 6 – Œsophagectomies avec gastrop拉斯ies.....	32
Figure 7 – Ingénierie tissulaire basée sur des biomatériaux issus de matrice décellularisée. ⁷¹	38
Figure 8 – Sources de CS aux différents stades du développement humain et extraction de CS par reprogrammation. ⁵⁵	40
Figure 9 - Bioréacteur de décellularisation Rotary Cell Culture System (RCCMax Dual Chambers, SYNTHETCON, Inc©)	61
Figure 10 – Test de résistance à la traction d'un échantillon de MBD avec l'équipement Shimadzu Autograph AGS-X series.....	73
Figure 11 – Test de résistance à la suturabilité d'un échantillon de MBD avec l'équipement Shimadzu Autograph AGS-X series.....	74
Figure 12 – Coloration à l'HES d'un ON et d'une MBD.	77
Figure 13 - Coloration à l'HES d'un ON et d'une MBD.....	78
Figure 14 – Quantification de l'ADN résiduel des MBD et évaluation de la longueur des fragments résiduels par migration sur gel d'agarose.....	79
Figure 15 – Observations au MEB d'une coupe transversale de MBD.	80
Figure 16 – Analyse de la qualité du microbiote des ON(a) et ON(b). Identification et quantification de la charge bactérienne.	82
Figure 17 - Phénotypage du contenu protéique de l'ON et de la MBD par IHC.	83
Figure 18 - Phénotypage du contenu protéique de l'ON et de la MBD par IHC.....	84
Figure 19 - Phénotypage du contenu protéique de l'ON et de la MBD par IHC.....	85
Figure 20 - Phénotypage du contenu protéique de l'ON et de la MBD par IHC.....	86
Figure 21 - Phénotypage du contenu protéique de l'ON et de la MBD par IHC.....	87
Figure 22 - Analyse protéomique du contenu collagénique de la MBD (n=3) par LC-MS/MS.89	
Figure 23 – Analyse de la cytotoxicité des faces externe et interne de la MBD (n=3) selon la norme ISO 10993-5.	93
Figure 24 – Analyses des propriétés mécaniques selon un test de traction de l'ON et de la MBD dans les axes circonférentiels et longitudinaux.	96
Figure 25 – Analyses des propriétés mécaniques de l'ON et de la MBD selon un test de traction.	97
Figure 26 – Analyse des propriétés mécaniques des ON et des MBD selon un test de résistance à l'éclatement (mmHg).	98
Figure 27 - Analyses des propriétés mécaniques de l'ON et de la MBD selon un test résistance à la suture réalisé selon la direction longitudinale des fibres musculaires du tissu.	99
Figure 28 - Coloration à l'HES d'un ON immergé dans une solution à pH 2.....	100
Figure 29 - Coloration à l'HES d'une MBD immergée dans une solution à pH 2.	101
Figure 30 - Observations au MEB d'une coupe transversale de MBD _{A-24} et MBD _{A-72}	102

Figure 31 - Volcano plot représentant la quantité de protéines down-régulées et up-régulées pour la conditions MBD _{A-24} par rapport à la MBD.	103
Figure 32 - Volcano plot représentant la quantité de protéines down-régulées et up-régulées pour la conditions MBD _{A-72} par rapport à la MBD.	104
Figure 33 - Analyses des propriétés mécaniques de l'ON et de la MBD après une exposition à l'acide pendant 24 heures selon un test de traction dans les axes circonférentiels et longitudinaux.....	107
Figure 34 – Analyses des propriétés mécaniques de l'ON et de la MBD après une exposition à l'acide pendant 24 heures selon un test de traction.	108
Figure 35 – Analyses des propriétés mécaniques de l'ON et de la MBD en comparaison avec les ON _{A-24} et MBD _{A-24} selon un test de traction représentant la Max_Force (N) observée avant la rupture dans les axes circonférentiels et longitudinaux.	109
Figure 36 – Analyses des propriétés mécaniques de l'ON _{A-24} et de la MBD _{A-24} selon un test résistance à la suture réalisé selon la direction longitudinale des fibres musculaires.....	110
Figure 37 - Analyses des propriétés mécaniques de l'ON et de la MBD en comparaison avec les ON _{A-24} et MBD _{A-24} selon un test de résistance à la suture réalisé selon la direction longitudinale des fibres musculaire du tissu, représentant la Max_Force (N) observée avant la rupture.....	111
Figure 38 - Sources et caractéristiques des CSM. ²⁰²	124
Figure 39 - Anatomie de cordon ombilical humain. ²³⁵	128
Figure 40 - Phénotypage des CSM-GW du COe à P3 par cytométrie en flux selon l'expression des marqueurs anti-CD90, anti-CD105, anti-CD73, anti-CD45, anti-CD86 et anti-HLA-DR. ..	144
Figure 41 – Phénotypage des CSM-GW du COd à P6 par cytométrie en flux selon l'expression des marqueurs anti-CD90, anti-CD105, anti-CD73, anti-CD45, anti-CD86 et anti-HLA-DR. ..	145
Figure 42 - Phénotypage du profil immuno-privilegié des CSM-GW selon les marqueurs anti-HLA-ABC et anti-HLA-DR, par cytométrie en flux.....	146
Figure 43 – Phénotypage des PBMCs#1 et #2 au contact des CSM-GW après 24 heures d'incubation.....	148
Figure 44 – Evaluation quantitative des IFN-γ relargués dans le sécrétome des CSM-GW de P3 à P6 en co-culture avec des PBMC par méthodes ELISA.....	149
Figure 45 - Coloration à l'HES de feuillets de CSM-GW.	150
Figure 46 - Phénotypage du profil stromal des CSM-GW en feuillet après 2 semaines de culture à une densité de 13x10 ³ cellules.cm ⁻² en M1 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate par IHC.	151
Figure 47 – Phénotypage du profil stromal des CSM-GW en feuillet après 2 semaines de culture à une densité de 13x10 ³ cellules.cm ⁻² en M2 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate par IHC.	152
Figure 48 – Phénotypage des CSM-GW en feuillet après 2 semaines de culture à une densité de 13x10 ³ cellules.cm ⁻² en milieu M1 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate par coloration au Bleu Alcian et au VK.....	153
Figure 49 - Phénotypage des CSM-GW en feuillet après 2 semaines de culture à une densité de 13x10 ³ cellules.cm ⁻² en milieu M2 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate par coloration au Bleu Alcian et au VK.....	154
Figure 50 - Caractérisation de la résistance à la perforation des feuillets. Force de perforation obtenue (gf) pour le donneur COb selon les conditions de culture d1t1 en milieu M2 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate.....	157

Figure 51 – Caractérisation de la résistance à la perforation des feuillets COa, COb, COc ensemencés à 13×10^3 cellules.cm ⁻² (d1) et de 30×10^3 cellules.cm ⁻² (d2) pendant 4 semaines (t2) en M1 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate.....	158
Figure 52 – Caractérisation de la résistance à la perforation des feuillets COa, COb, ensemencés à 13×10^3 cellules.cm ⁻² (d1) et de 13×10^3 cellules.cm ⁻² (d2) pendant 6 semaines (t3) en M1 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate.....	160
Figure 53 – Caractérisation de la résistance à la perforation des feuillets.....	161
Figure 54 - Caractérisation de la résistance à la perforation des feuillets.	162
Figure 55 – Caractérisation de la varitabilité inter-individuelle des donneurs COa, COb et COc selon la résistance à la perforation des feuillets.....	163
Figure 56 – Observation au microscope confocal d’un test de Live/Dead des feuillets de CSM-GW à J0 et quantification de la viabilité cellulaire par le logiciel Fidji.....	164
Figure 57 - Coloration au TM des feuillets de CSM-GW cultivés pendant 2 semaines à une densité de 13×10^3 cellules.cm ⁻² en milieu M2 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate, et ensemencés sur la MBD pendant 4 jours sur une matrice revêtue ou non.	165
Figure 58 - Coloration au TM des feuillets de CSM-GW cultivés pendant pendant 2 semaines à une densité de 13×10^3 cellules.cm ⁻² en milieu M2 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate, et ensemencés sur la MBD pendant 8 jours sur une matrice revêtue ou non.	166
Figure 59 - Coloration au TM des feuillets de CSM-GW cultivés pendant 2 semaines à une densité de 13×10^3 cellules.cm ⁻² en milieu M2 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate, et ensemencés jours sur la MBD pendant 21 jours.	167
Figure 60 – Coloration au TM des feuillets de CSM-GW cultivés pendant pendant 2 semaines à une densité de 13×10^3 cellules.cm ⁻² en M2 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate, et ensemencés sur la MBD pendant 21 jours sur une matrice revêtue ou non.	168
Figure 61 - Coloration au TM des feuillets de CSM-GW cultivés pendant 2 semaines à une densité de 13×10^3 cellules.cm ⁻² en milieu M2 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate, et ensemencés sur la MBD pendant 4, 8 et 21 jours sur une matrice revêtue ou non.	169
Figure 62 - Phénotypage du profil stromal des CSM-GW en feuillets, cultivés pendant 2 semaines à une densité de 13×10^3 cellules.cm ⁻² en M2 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate, et ensemencés pendant 21 jours sur une MBD selon les différents marqueurs positifs.	170
Figure 63 - Phénotypage du profil stromal des CSM-GW en feuillets, cultivés pendant 2 semaines à une densité de 13×10^3 cellules.cm ⁻² en milieu M2 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate, et ensemencés pendant 21 jours sur une MBD selon les différents marqueurs négatifs.....	171
Figure 64 - Phénotypage du profil stromal des CSM-GW en feuillets, cultivés pendant 2 semaines à une densité de 13×10^3 cellules.cm ⁻² en milieu M2 et 0,5 mM de sodium L-ascorbate, et ensemencés pendant 21 jours sur une MBD par coloration au Bleu Alcian et au VK.....	172
Figure 65 - Observation au microscope à confocal d’un test de Live/Dead des feuillets de CSM-GW ensemencés sur une MBD pendant 21 jours.....	173

TABLE DES SCHÉMAS

Schéma 1 - Tumeur œsophagienne de pleine épaisseur.....	30
Schéma 2 - Principe d'ingénierie tissulaire. ³³	34
Schéma 3 - Cahier des charges d'une MBD œsophagienne.	47
Schéma 4 - Protocole de décellularisation d'un œsophage porcin.	59
Schéma 5 - Protocole de cellularisation d'une MBD œsophagienne.....	131

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 - Les traitements chimiques et physiques utilisées pour la préparation de MBD. ⁶⁸	53
Tableau 2 – Utilisation de l'ingénierie tissulaire dans la reconstruction de l'œsophage. ⁹⁸ ...	57
Tableau 3 - Classification des 28 types de collagènes présents chez l'Homme. ¹⁵⁹	90
Tableau 4 - Abondance peptidique des actines de la MEC œsophagienne (n=3).	91

TABLE DES ABRÉVIATIONS

- ACK : Ammonium-Chloride-Potassium
- ADN : Acide désoxyribonucléique
- ADNdb : ADN double brin
- AH : acide hyaluronique
- AM : Acétoxyméthyl calcéine
- AmBic : Ammonium bicarbonate
- AO : Atrésie de l'œsophage
- ARMCX-3 : Armadillo Repeat Containing X-Linked 3
- BMP : Bone morphogenic protein
- BSA : Albumine de sérum bovin
- CEMO : Cellules épithéliales de la muqueuse orale
- CHAPS : 3-[(3-cholamidopropyl) diméthylammonio]-1-propane-sulfonate
- CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
- CMI : Concentration minimale inhibitrice
- CMS : Cellules musculaires striées
- CML : Cellules musculaires lisses
- CO : Cordon ombilical
- COL : Collagène
- CO₂-SC : Dioxyde de carbone supercritique
- CPA : Cellules présentatrices d'antigènes
- CS : Cellules stromales
- CSE : Cellules stromales embryonnaires
- CSF : Cellules stromales fœtales
- CSM : Cellules stromales mésenchymateuses
- CSM-GW : Cellules stromales mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton
- CSM-MO : Cellules stromales mésenchymateuses issues de la moelle épinière
- CSM-TA : Cellules stromales mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux
- CV : Coefficient de variation
- DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole
- DEOX : Sodium déoxycholate
- DMEM : Milieu de Eagle modifié par Dulbecco
- DO : Densité optique
- DTT : Dithiothréitol
- EDTA : Ethylène-diamine-tétra-acétique
- EGF : Epidermic growth factor
- EGTA : Acide éthylène-glycol-tétra-acétique
- ELISA : Dosage d'immuno-absorption enzymatique
- EBO : Œsophage de Barrett
- ENT : Electroporation non-thermique
- EthD-1 : Homodimer-1-d'éthidium

- EFS : Etablissement Français du sang
- FACIT : Fibrilles avec triple hélice interrompue
- FDA : Food and Drug Administration
- FGF : Fibroblast growth factor
- FMO-DR : Fluorescent Minus One DR
- GAG : Glycosaminoglycanes
- gf : Grammes.force
- GMI : Métaplasie intestinale gastrique
- GPC-1 : Glypicane-1
- GW : Gelée de Wharton
- HA : Hydroxyapatite
- HCl : Acide chlorhydrique
- HES : Hématéine-Eosine-Safran
- HLA : Human Leucocyte Antigen
- IFN- γ : Interféron-gamma
- IGF : Insulin growth factor
- IHC : Immunohistochimie
- IL : Interleukine
- Iono : Ionomycine
- ISO : International Standard Organization
- IT : Ingénierie tissulaire
- KU : Kunitz Units
- LB : Lymphocytes B
- L/D : Live/Dead
- LC-MS/MS : Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry
- LT : Lymphocytes T
- LTregs : Lymphocytes T régulateurs
- MACIT : Membranes avec triple hélice interrompue
- MBD : Matrice biologique décellularisée
- MBD_A : Matrice biologique décellularisée exposée à l'acide
- MBD_c : Matrice biologique décellularisée revêtue des protéines matricielles de la GW
- MEB : Microscope électronique à balayage
- MEC : Matrice extra-cellulaire
- NF : Neurotrophic factor
- NK : Natural killer
- NM : Non marquée
- ON : Œsophage natif
- OPTN : Organ Procurement and Transplantation Network
- PCL : Poly(ϵ -caprolactone)
- PCR : Polymerase chain reaction
- PDGF : Platelet-derived growth factor

- PEG : Polyéthylène glycol
- PFA : Paraformaldéhyde
- PIT : Produit d'ingénierie tissulaire
- PKP-3 : Plakophiline-3
- PLA : Acide poly-lactique
- PLGA : Acide polylactique-co-glycolique
- PLLA : Acide poly-L-lactique
- PO : Perforation œsophagienne
- PSA : Pénicilline-Streptomycine-Amphotéricine B
- PTC : Produit de thérapie cellulaire
- PTFE : Poly-tétra-fluoro-éthylène
- PU : Polyuréthane
- RGO : Reflux gastro-œsophagien
- RPM : Rotation par minute
- RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium
- SDS : Dodécylsulfate de sodium
- SFM : Société Française de microbiologie
- SIS : Sous-muqueuse de l'intestin grêle
- SVF : Sérum de veau fœtal
- TAE : Tris acétate EDTA
- TGF : Transforming growth factor
- TM : Trichrome de Masson
- TMB : 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine
- TPM1 : Tropomyosine-1
- UTS : résistances ultimes à la traction
- UV : Ultra-violets
- VEGF : Vascular endothelium growth factor
- VK : Von Kossa

SOMMAIRE

RESUME	3
REMERCIEMENTS	8
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	10
TABLE DES SCHEMAS	13
LISTE DES TABLEAUX	13
TABLE DES ABREVIATIONS	14
SOMMAIRE	17
INTRODUCTION GENERALE.....	21
I. CARACTERISTIQUES DE L'ŒSOPHAGE	22
1. Anatomie de l'œsophage.....	22
2. Histologie de l'œsophage.....	23
3. Embryologie de l'œsophage	24
4. Vascularisation de l'œsophage.....	25
5. Innervation de l'œsophage.....	26
6. Propriétés mécaniques de l'œsophage	27
II. PATHOLOGIES DE L'ŒSOPHAGE ET BESOIN CLINIQUE	27
1. Pathologies œsophagiennes retrouvées chez l'enfant.....	27
2. Pathologies œsophagiennes retrouvées chez l'adulte	29
3. Méthodes chirurgicales actuelles pour la reconstruction de l'œsophage	30
4. Besoins cliniques	32
III. L'INGENIERIE TISSULAIRE : DEFINITIONS ET CONCEPT	33
1. Les biomatériaux utilisés en ingénierie tissulaire	34
2. Les cellules utilisées en ingénierie tissulaire	38
3. Les biomolécules utilisées en ingénierie tissulaire	41
IV. OBJECTIFS DE LA THESE.....	42
CHAPITRE 1.....	44
I. INTRODUCTION.....	46
1. L'ingénierie tissulaire de l'œsophage	46
2. Les substituts œsophagiens d'origine synthétique	48
3. Les substituts œsophagiens d'origine biologique.....	49
4. Les matrices biologiques décellularisées utilisées en ingénierie tissulaire de l'œsophage .	54
5. Objectifs	58
II. MATERIELS ET METHODES.....	59
A. PREPARATION D'UNE MATRICE BIOLOGIQUE ŒSOPHAGIENNE DECELLULARISEE	59
1. Prélèvements d'œsophages porcins.....	59
2. Décontamination du prélèvement œsophagien.....	60
3. Décellularisation du prélèvement œsophagien	60
4. Détoxification de la matrice biologique décellularisée (MBD)	62
5. Inactivation virale de la MBD	62
B. CARACTERISATION D'UNE MATRICE BIOLOGIQUE ŒSOPHAGIENNE DECELLULARISEE	63

1.	Confirmation de la décellularisation	63
2.	Analyse des échantillons par microscopie électronique à balayage (MEB)	65
3.	Validation de la décontamination par analyse du microbiote aérobie & anaérobie	66
4.	Analyse du contenu protéique de la MBD	67
5.	Analyse de la cytotoxicité de la MBD par étude de la viabilité cellulaire.....	69
6.	Etude des propriétés mécaniques de la MBD	72
C. PREPARATION ET CARACTERISATION D'UNE MATRICE BIOLOGIQUE		
ŒSOPHAGIENNE DECELLULARISEE EN ENVIRONNEMENT ACIDE.....		74
1.	Préparation des MBD en environnement acide	74
2.	Analyses de la MBD en environnement acide par imagerie	75
3.	Analyse du contenu protéique de la MBD en environnement acide par LC-MS/MS	75
4.	Caractérisation mécanique de la MBD en environnement acide.....	76
III. RESULTATS		77
1.	Confirmation de la décellularisation	77
2.	Analyse des MBD par imagerie MEB.....	79
3.	Validation de la décontamination.....	80
4.	Contenu protéique de la MBD	83
5.	Analyse de la cytotoxicité de la MBD par contact direct.....	92
6.	Description des propriétés mécaniques de la MBD	93
7.	Analyses de la MBD en environnement acide par imagerie	99
8.	Contenu protéique de la MBD en environnement acide.....	103
9.	Description des propriétés mécaniques de la MBD en environnement acide	105
IV. DISCUSSION		112
1.	Décellularisation de l'œsophage et exploitation de la MEC	112
2.	Décontamination de l'œsophage et concept de stérilité	113
3.	Cytotoxicité de la MBD	115
4.	Comportement mécanique de la MBD	116
5.	Comportement de la MBD en conditions acides	117
V. CONCLUSION.....		118
CHAPITRE 2		119
I. INTRODUCTION		121
1.	Cellularisation des substituts œsophagiens	121
2.	Les cellules utilisées en IT de l'œsophage	121
3.	Les méthodes de cellularisation	124
4.	Les cellules stromales mésenchymateuses de la gelée de Wharton	126
5.	Objectifs	129
II. MATERIELS ET METHODES.....		131
A. EXTRACTION ET CARACTERISATION DES CELLULES STROMALES DE LA GELEE DE WHARTON		131
1.	Extraction des CSM de la gelée de Wharton et amplification	131
2.	Détection de mycoplasmes par Polymerase Chain Reaction (PCR)	132
3.	Caractérisation du profil stromal des CSM de la gelée de Wharton par cytométrie en flux	132
4.	Caractérisation du profil immuno-privilegié des CSM de la gelée de Wharton	133

5.	Extraction des protéines matricielles issues de la gelée de Wharton et revêtement des MBD	138
B.	FEUILLETS CELLULAIRES DE CSM DE LA GELEE DE WHARTON	139
1.	Culture et production des feuillets cellulaires	139
2.	Analyses histologiques des feuillets cellulaires.....	140
3.	Caractérisation mécanique des feuillets cellulaires	140
4.	Etude de la viabilité cellulaire des feuillets par Live/Dead	141
5.	Caractérisation du profil stromal et du maintien du phénotype des cellules en feuillets par imagerie	141
C.	CELLULARISATION DE LA MBD PAR LES FEUILLETS CELLULAIRES DE CSM DE GELEE DE WHARTON	142
1.	Ensemencement des feuillets cellulaires de CSM sur les MBD et les MBD revêtues pendant 4, 8 et 21 jours.....	142
2.	Observation de la cellularisation des CSM en feuillet sur les MBD par histologie	142
3.	Caractérisation du profil stromal et du maintien du phénotype des cellules en feuillets ensemencés sur les MBD après 21 jours par imagerie	143
4.	Etude de la viabilité des feuillets de CSM sur les MBD après 21 jours par L/D.....	143
III.	RESULTATS	144
1.	Confirmation du profil stromal des CSM issues de la gelée de Wharton	144
2.	Confirmation du profil immuno-privilégié des CSM issues de la gelée de Wharton	146
3.	Histologie des feuillets cellulaires produits à partir des CSM de la gelée de Wharton et phénotypage des CSM en feuillets.....	149
4.	Caractérisation mécanique des feuillets cellulaires de CSM de la gelée de Wharton par test de perforation	156
5.	Confirmation de la viabilité des cellules en feuillets avant cellularisation.....	164
6.	Observations de la cellularisation des MBD revêtues ou non par protéines matricielles de la GW.....	165
7.	Etude du maintien du phénotype stromal des CSM ensemencées pendant 21 jours par IHC	170
8.	Observation de la viabilité cellulaire après 21 jours par L/D	172
IV.	DISCUSSION	174
1.	Les cellules stromales mésenchymateuses de la gelée de Wharton	174
2.	Les feuillets cellulaires de CSM-GW.....	175
3.	Cellularisation de la MBD	177
V.	CONCLUSION.....	179
	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	180
	BIBLIOGRAPHIE.....	182

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Préambule

L'œsophage est un organe essentiel du tube digestif, il permet d'assurer la progression du bol alimentaire de la bouche à l'estomac. Face aux limitations des approches traditionnelles chirurgicales du traitement des pathologies œsophagiennes, le Pr. Collet et le Dr. Luc de l'Hôpital Haut-Lévêque du CHU de Bordeaux ont dirigé leurs recherches vers le développement d'un substitut œsophagien d'ingénierie tissulaire (IT) afin d'améliorer la prise en charge des patients. L'objectif de ces travaux de thèse est d'offrir de nouvelles perspectives dans le traitement des affections œsophagiennes afin de participer à l'amélioration de la qualité de vie des patients après une résection totale ou partielle de l'œsophage.

I. CARACTÉRISTIQUES DE L'ŒSOPHAGE

1. Anatomie de l'œsophage

L'œsophage est la partie initiale du tube digestif, c'est un organe tubulaire musculo-membraneux qui conduit le bol alimentaire du pharynx à l'estomac.¹ L'œsophage intervient dans la phase terminale de la déglutition et transporte le bol alimentaire grâce à un mécanisme de péristaltisme.² Il traverse successivement la région cervicale, la région thoracique, la région abdominale et s'abouche dans l'estomac. Dans le sens transversal, l'œsophage présente trois légères courbures : une inflexion cervicale sur la gauche, et deux inflexions thoraciques.³ (Fig. 1) L'œsophage thoracique est défini selon trois régions définies telles que le tiers supérieur, moyen et inférieur. L'œsophage est délimité selon une limite crâniale, représentée par le muscle constricteur inférieur du pharynx. La limite caudale de l'œsophage correspond au cardia à la jonction œsogastrique.¹

Le diamètre de l'œsophage est de 3 cm, et sa longueur totale est de 25 cm chez l'adulte. Sur sa partie initiale, estimée à 6 cm de longueur pour l'œsophage cervical, les fibres du muscle constricteur inférieur du pharynx s'associent aux fibres circulaires de la musculature de l'œsophage pour constituer le sphincter supérieur. L'œsophage thoracique mesure 16 cm, et l'œsophage abdominal a une longueur estimée à 3 cm.¹

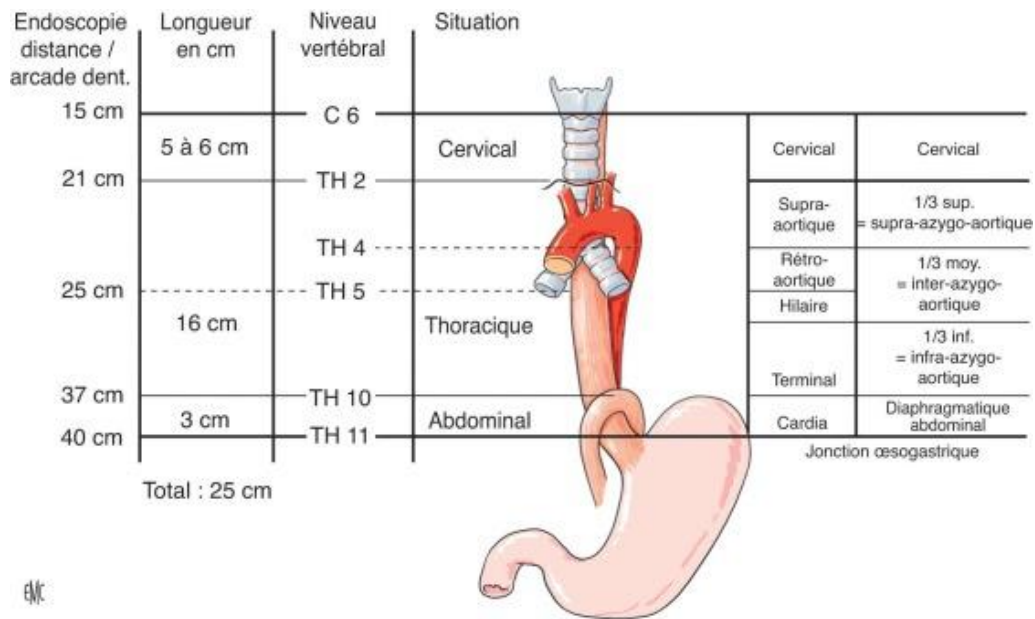


Figure 1 – Anatomie descriptive de l'œsophage.¹

2. Histologie de l'œsophage

La paroi de l'œsophage a une épaisseur de 3 à 5 mm⁴ et comprend quatre couches histologiques. Sont retrouvées, la muqueuse œsophagienne formée d'un épithélium pavimenteux stratifié non kératinisé, la sous-muqueuse œsophagienne, formée d'un tissu conjonctif riche en fibres de collagène et élastine contenant des glandes qui sécrètent un mucus composé de muco-polysaccharide et la musculuse qui est formée d'une couche musculaire circulaire interne et d'une couche musculaire longitudinale externe. La musculuse est constituée de cellules musculaires striées (CMS) dans le tiers supérieur de l'œsophage qui, progressivement, font place à des cellules musculaires lisses (CML).³ L'œsophage est également recouvert d'une séreuse qui contient les vaisseaux et les fibres nerveuses.¹



Figure 2 - Coupe transversale d'un œsophage. Structure de la paroi œsophagienne.

3. Embryologie de l'œsophage

Au cours du développement embryonnaire, l'intestin antérieur s'allonge selon un axe longitudinal, du diverticule respiratoire jusqu'à l'ébauche gastrique, dans la cavité abdominale. Lors du développement, un défaut du septum trachéo-œsophagien peut être responsable de fistules œso-trachéales néonatales et une insuffisance de l'allongement peut entraîner une atrésie de l'œsophage (AO).¹

Au cours de son développement, l'épithélium de l'œsophage d'origine endodermique est modifié, en regard de la présence de vacuoles qui vont canaliser l'œsophage initialement tapissé d'un épithélium pluristratifié. L'épithélium devient alors prismatique pluristratifié cilié. Il sera remplacé au milieu de la grossesse par un épithélium pavimenteux pluristratifié non kératinisé définitif. Les tissus de soutien, la musculature et la vascularisation sont d'origine mésodermique.⁵ L'ensemble de la structure est innervé par le nerf vague (X^e paire crânienne du 4^e arc pharyngien).¹

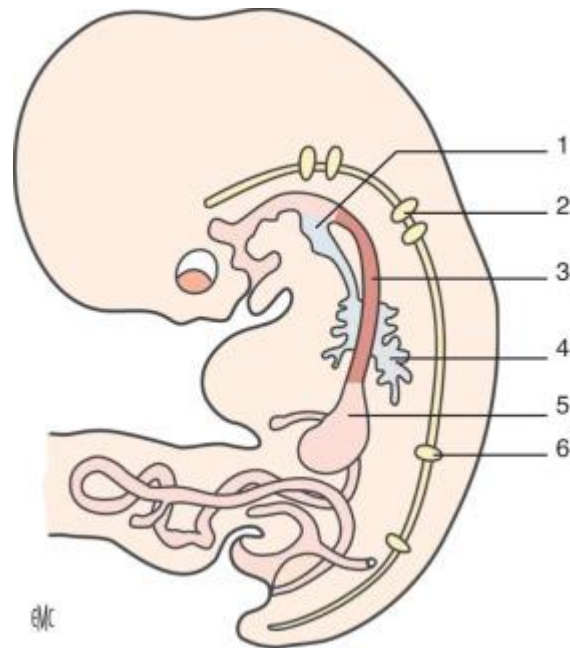


Figure 3 - Embryologie de l'œsophage à la 8e semaine. 1 : trachée. 2 : vertèbre cervicale n°7. 3 : œsophage. 4 : poumon. 5 : estomac. 6. vertèbre thoracique n°12.¹

4. Vascularisation de l'œsophage

L'œsophage reçoit une vascularisation d'origine artérielle, relative à la région œsophagienne décrite et peut être commune aux régions anatomiques avoisinantes telles que la trachée ou les bronches. L'œsophage cervical est vascularisé par les deux artères thyroïdiennes inférieures, alors que le tiers moyen et le tiers supérieur de l'œsophage thoracique sont vascularisés par les artères œso-phago-trachéales antérieures et postérieures. Le tiers inférieur de l'œsophage thoracique est vascularisé par des rameaux issus de l'aorte descendante.

Le drainage veineux des deux tiers supérieurs de l'œsophage se fait par les veines thyroïdiennes inférieures, les veines bronchiques et péricardiques supérieures. Le drainage veineux du tiers inférieur de l'œsophage se fait par la veine gastrique.¹

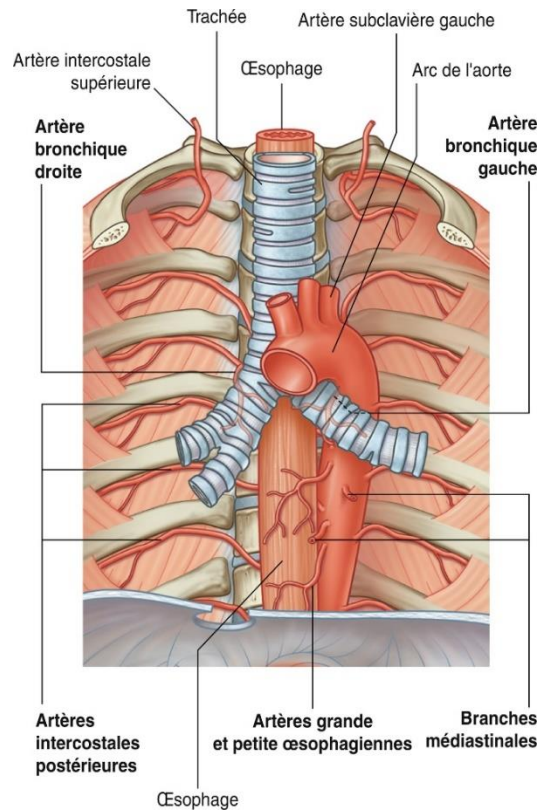


Figure 4 - Vascularisation de l'œsophage.⁴

5. Innervation de l'œsophage

La paroi œsophagienne contient deux types de plexus nerveux myentériques qui forment des cellules ganglionnaires et reçoivent les axones des nerfs vagues. Il s'agit des plexus de Meissner localisés dans la sous-muqueuse de l'œsophage, ainsi que des plexus d'Auerbach localisés entre la couche longitudinale et la couche circulaire de la musculature de l'œsophage. Les plexus de Meissner sont essentiellement responsables de la coordination des mouvements musculaires ainsi que de la sécrétion des glandes à mucus permettant la lubrification de la muqueuse, alors que les plexus d'Auerbach assurent la fonction motrice, notamment lors du passage du bol alimentaire.^{1,6}

À l'état de vacuité, l'œsophage est un tube aplati d'avant en arrière, particulièrement dans sa partie supérieure, les sphincters supérieurs et inférieurs sont fermés, et la pression locale enregistrée est négative. Lors de la déglutition, les CML sont innervées à partir des plexus myentériques et la propagation de l'onde péristaltique est évaluée de 3 à 4 cm.s⁻¹ le long de l'œsophage, permettant un déversement du bol alimentaire dans l'estomac. Dans la partie

abdominale de l'œsophage, les ondes péristaltiques œsophagiennes entraînent une contrainte estimée entre 60 et 140 mmHg.³

6. Propriétés mécaniques de l'œsophage

La déformation de l'œsophage humain, de par sa fonction physiologique, mais également, lors des examens cliniques tels que les endoscopies, est assurée par le comportement mécanique anisotropique de l'organe.^{3,7} La sous-muqueuse œsophagienne est caractérisée par un tissu conjonctif, formé de fibres de collagène, qui lui offre une haute résistance à la traction. Après un étirement, l'œsophage est capable de revenir à un état physiologique grâce aux fibres élastiques.^{8,9}

Une contrainte mécanique appliquée dans un axe circonférentiel entraîne une déformation des fibres musculaires, des micro-ruptures des fibrilles de collagène et une rupture des microfibrilles. Lors d'une contrainte mécanique appliquée dans un axe longitudinal, les fibres de collagène conservent leur configuration ondulée et hélicoïdale. Les myofibrilles sont peu sollicitées, c'est pourquoi la résistance mécanique de l'œsophage dans l'axe longitudinal est plus importante.^{9,10}

Les valeurs de pression intra-œsophagienne retrouvées lors des ruptures de la paroi sont de 55 kPa, mais certaines situations objectivent une rupture à une pression de 32 kPa. La rupture de la paroi de l'œsophage se produit selon un axe longitudinal et se retrouve majoritairement dans la partie thoracique ou la partie abdominale. Les contraintes mécaniques de l'œsophage sont les plus importantes dans la partie cervicale. Les valeurs des propriétés mécaniques de l'œsophage diminuent à partir de 45 ans, alors que le module d'élasticité augmente.⁹

II. PATHOLOGIES DE L'ŒSOPHAGE ET BESOIN CLINIQUE

1. Pathologies œsophagiennes retrouvées chez l'enfant

Pathologies congénitales

Lors du développement embryonnaire, des cas de cloisonnements anormaux entre la trachée et l'œsophage peuvent apparaître : c'est l'AO. Cette affection congénitale correspond à l'interruption du développement de l'œsophage, qui se termine alors en « cul-de-sac » et qui dans certains cas, s'abouche anormalement à la trachée en formant une fistule trachéo-

œsophagienne. La prévalence d'une AO est d'une naissance sur 3 000, et dans 85% des cas, c'est l'AO avec fistule en aval qui est retrouvée (Fig. 5, type III).¹¹

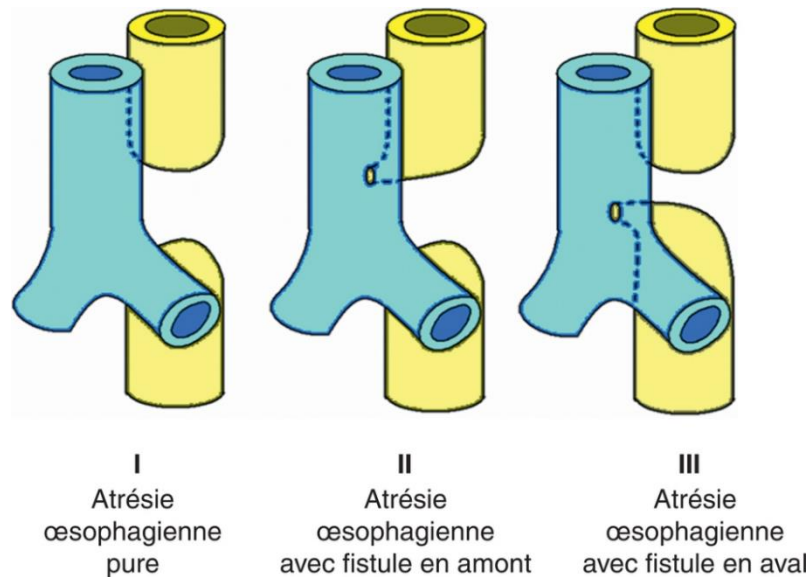


Figure 5 - Troubles du cloisonnement entre trachée et œsophage, variété anatomiques d'AO associée ou non à une connexion anormale entre l'œsophage et la trachée par une fistule trachéo-œsophagienne.¹¹

Pathologies acquises

Le reflux gastro-œsophagien (RGO) est la principale pathologie acquise retrouvée chez l'enfant. Le RGO correspond à une immaturité du sphincter inférieur de l'œsophage. Dans les cas où le sphincter inférieur de l'œsophage est endommagé, des complications associées apparaissent telles que l'endo-brachy-œsophage (EBO), également appelé l'œsophage de Barrett. L'EBO est décrite sur le plan histologique comme étant la modification de la muqueuse de type glandulaire gastrique en métaplasie intestinale (GMI) correspondant à un état intermédiaire dans le processus de cancérogénèse retrouvé dans les stades précoces d'adénocarcinomes chez l'adulte. La prévalence de l'EBO est estimée à 6 et 12 % dans la population totale, mais reste rare en pédiatrie. Dans ce cas, l'EBO est majoritairement retrouvée chez les enfants ayant un RGO sévère et chronique, ou une AO.²

D'autres altérations de l'œsophage interviennent également dans les cas d'ingestions de produits caustiques, ou de corps étrangers qui révèlent le plus souvent d'une ingestion accidentelle chez l'enfant, contrairement aux adultes pour qui elle est le plus souvent

intentionnelle.¹² Le risque principal d'ingestion de produits caustiques ou de corps étrangers est la survenue d'ulcérations œsophagiennes, qui peuvent se compliquer de sténoses ou de perforations œsophagiennes (PO).²

2. Pathologies œsophagiennes retrouvées chez l'adulte

Chez l'adulte, les pathologies organiques ou fonctionnelles de l'œsophage sont variées. Dans 90 % des cas, la première manifestation est une dysphagie, associée à une perte de poids, un développement de fistule trachéo-œsophagienne et des douleurs thoraciques.^{13,14}

Les PO sont décrites dans un contexte iatrogène, spontané ou accidentel, à l'origine d'une mortalité globale proche de 20 %. La généralisation des techniques mini-invasives d'endoscopie est à l'origine de l'augmentation de l'incidence des PO iatrogènes. Le choix du traitement dépend de différents facteurs tels que le délabrement des tissus œsophagiens, le sepsis associé et l'état général du patient. Le diagnostic précoce d'une pathologie œsophagienne sous-jacente conditionne le traitement de la PO.^{15,16}

Les cancers sont les pathologies œsophagiennes les plus répandues. A l'échelle mondiale, le nombre de nouveaux cas en 2020 était de 604 100 cas dont 418 400 chez l'homme et 185 800 chez la femme ce qui correspond au 7^{ème} cancer en terme d'incidence.^{17,18} En France, l'incidence du cancer de l'œsophage en 2018 est estimée à 5 445 nouveaux cas, avec 3 725 décès.¹⁹ L'incidence du cancer de l'œsophage est déterminée comme étant la plus élevée chez les patients âgés de 50 à 75 ans et concerne surtout les hommes (environ 75 %). Les tumeurs cancéreuses de l'œsophage sont localisées au niveau de la muqueuse œsophagienne, elles sont soit malpighiennes (cancers épidermoïdes) soit glandulaires (adénocarcinomes).¹³

Le principal facteur de risque connu d'adénocarcinome est l'EBO, tandis que la consommation d'alcool et le tabagisme sont les facteurs de risque identifiés lors des cancers épidermoïdes de l'œsophage.¹⁴ L'incidence des cancers épidermoïdes diminue du fait de la prévention en santé publique avec la baisse des consommations d'alcool et de tabac, mais une augmentation de l'incidence des adénocarcinomes est observée, due à une augmentation de cas de RGO et d'obésité. Les adénocarcinomes représentent aujourd'hui plus de 50 % des cancers de l'œsophage.¹³

L'exérèse de la tumeur par chirurgie est le traitement envisagé pour les cancers localisés.¹⁴ A ce jour, il est rarement envisageable de réséquer une tumeur de l'œsophage de pleine épaisseur de façon isolée (Schéma 1), l'ablation circonférentielle totale de l'organe est principalement décrite.

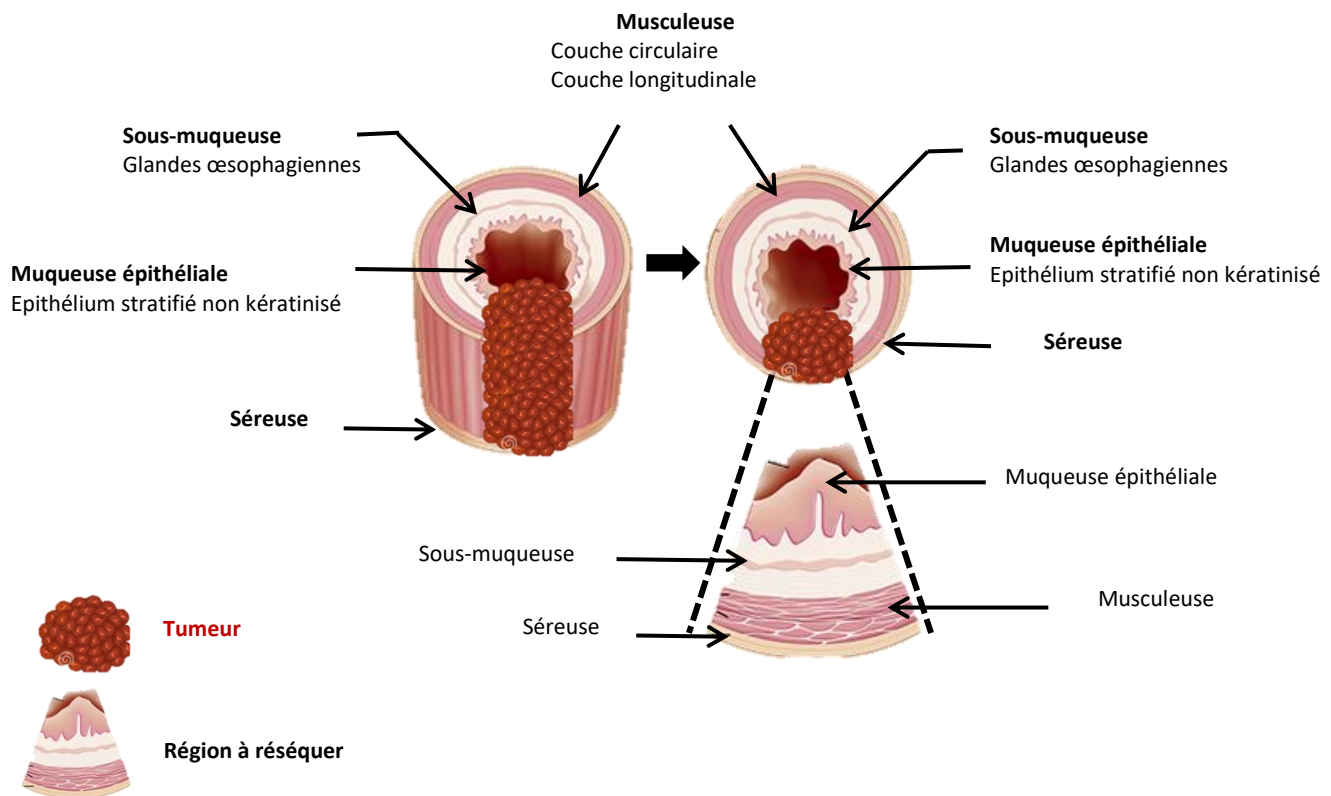


Schéma 1 - Tumeur œsophagienne de pleine épaisseur.

3. Méthodes chirurgicales actuelles pour la reconstruction de l'œsophage

Les résections chirurgicales étendues ou segmentaires de l'œsophage permettant le rétablissement de la continuité digestive sont des interventions chirurgicales lourdes et invasives.²⁰ L'accès à la tumeur dépend de sa localisation et de la disponibilité des voies d'abord : thoracoabdominale droite (technique d'Igor-Lewis-Santy), thoracoabdominale gauche et trans-hiatale.¹³ Les méthodes chirurgicales actuelles de reconstruction de l'œsophage consistent en la résection de la zone altérée de l'organe et un rétablissement de la continuité digestive par une anastomose œsogastrique, une gastroplastie ou une coloplastie. Les œsophagectomies avec coloplastie sont réalisées lorsque l'estomac n'est pas disponible dans le cas d'antécédents chirurgicaux gastriques.²¹

Dans les premiers jours post-opératoires, les complications sont d'ordre respiratoire dans 15% à 30% des cas, et d'ordre septique suite à un lâchage anastomotique. Des fuites anastomotiques sont retrouvées avec une fréquence de 5 et 17% et l'apparition de fistules est fréquemment décrite avec les gastroplasties, notamment celles réalisées sans thoracotomie. Des complications tardives sont également observées, telles que les sténoses digestives, les dilatations de la plastie, les fistules digestives, la réapparition des manifestations du RGO et de la dysphagie ; cette dernière peut réapparaître chez 10% des patients deux ans après la chirurgie.^{3,21}

La survie à 5 ans après la chirurgie est de 15%, soit 3 300 décès en 2015 en France. En 2019, les complications post-opératoires représentaient 8% de mortalité et 20% de morbidité.²¹ Les taux de morbidité et de mortalité post-opératoires sont similaires selon les différentes voies d'abord utilisées.¹³ L'état général du patient, associé aux comorbidités dues à l'alcool et au tabac pour les patients atteints de cancers épidermoïdes, justifient cette faible survie. Pour les patients atteints d'adénocarcinomes, l'obésité est à l'origine de morbidité et de mortalité post-opératoire. Les récurrences de cas de cancer surviennent dans la zone tumorale initiale, alors que les métastases sont retrouvées dans les régions hépatiques et pulmonaires.¹⁴

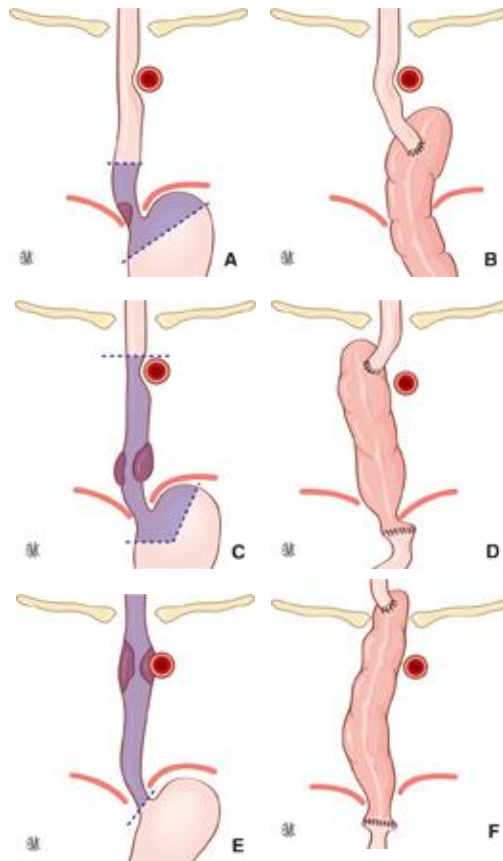


Figure 6 – Œsophagectomies avec gastroplasties.

A-B : œsophagectomie inférieure. C-D : œsophagectomie sub-totale. E-F : œsophagectomie totale.²¹

4. Besoins cliniques

Dans le contexte de la réparation de l'œsophage, deux types de besoins cliniques émergent. La méthode prédominante des recherches actuelles consiste à remplacer entièrement l'organe par des procédures chirurgicales invasives et souvent associées à des risques importants.^{20,22,23} Cependant, la réalité observée par les chirurgiens indique fréquemment un besoin plus ciblé : pour éviter de recourir à une approche aussi délétère, proposer un pansement d'occlusion, ou patch de pleine épaisseur permettrait de combler une zone spécifique de l'œsophage lésé, afin d'assurer la restauration de la continuité digestive sans remplacer l'organe. (Schéma 1)

Sans patch de pleine épaisseur, la substitution de l'œsophage est réalisée par un segment digestif et est à l'origine de complications fonctionnelles, quelle que soit l'approche. Il n'y a actuellement pas de consensus sur la méthode idéale pour le remplacement total de l'œsophage. La nécrose de la plastie, les sténoses récurrentes, les fuites anastomotiques, le

RGO, les troubles gastriques, et les atteintes pulmonaires sont conséquentes à une substitution œsophagienne.^{16,24,25} L'allo-transplantation d'organes ou de cellules offre une solution limitée à la reconstruction œsophagienne. Le manque de donneur représente un obstacle significatif à l'allo-transplantation, restreignant ainsi leur intérêt.²⁶⁻²⁸ Aussi, lors de précédentes études, de nombreux cas de la maladie aiguë du greffon contre l'hôte ont été identifiés. La prescription d'un traitement immunosuppresseur permettait néanmoins d'atténuer la réaction.²⁹

Notre hypothèse est que l'IT peut offrir une alternative thérapeutique prometteuse pour la reconstruction de l'œsophage chez les patients atteints de pathologies œsophagiennes.³⁰ Cette approche vise à fournir une solution pour les patients nécessitant une reconstruction complète de l'organe ainsi que dans le développement d'une méthode moins invasive, basée sur un patch de pleine épaisseur pour des applications ciblées des zones lésées. Notre démarche est de proposer des options variées qui s'adapteraient aux différents *scenari* cliniques rencontrés dans la réparation de l'œsophage.

III. L'INGÉNIERIE TISSULAIRE : DÉFINITIONS ET CONCEPT

La norme de soins pour les patients atteints d'une défaillance irréversible d'un organe est la transplantation.³¹ D'après les données du réseau de prélèvement et de transplantation d'organes (l'OPTN, Organ Procurement and Transplantation Network), en 2018, 36 529 personnes ont reçu une greffe d'organe aux Etats Unis d'Amérique, et plus de 113 000 personnes sont toujours sur la liste d'attente.³²

Le développement d'approches alternatives vise à réduire les listes d'attentes de patients, liées à la pénurie de donneurs d'organes ainsi qu'aux traitements immunosuppresseurs nécessaires administrés aux patients tout au long de leur vie.³¹

En 1993 Langer et Vacanti définissent le concept d'IT comme étant « *un domaine interdisciplinaire qui applique les principes des sciences de l'ingénieur et du vivant dans le but de développer des substituts biologiques qui restaurent, maintiennent ou améliorent la fonction tissulaire d'un organe* ». ^{34,35}

Le concept d'IT est caractérisé par l'assemblage de trois éléments : les biomatériaux, qui permettent de soutenir la structure tissulaire, les cellules et les biomolécules comme les facteurs de croissance, permettant la différenciation cellulaire (Schéma 2).³⁴⁻³⁶

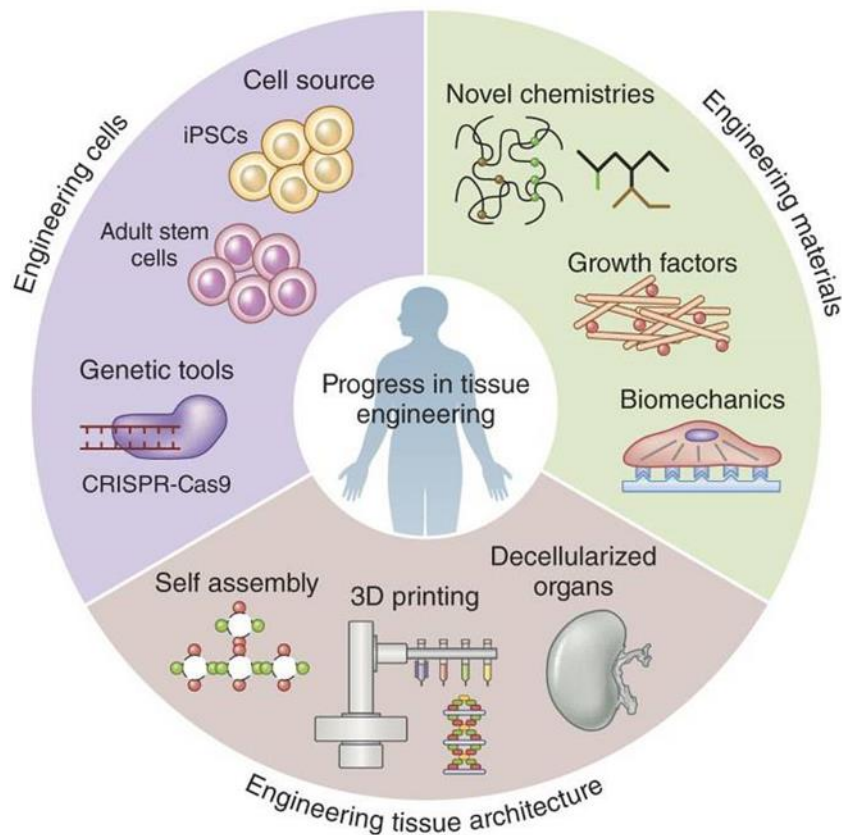


Schéma 2 - Principe d'ingénierie tissulaire.³³

1. Les biomatériaux utilisés en ingénierie tissulaire

L'hypothèse selon laquelle l'utilisation de matériaux prothétiques d'IT permettrait d'offrir une alternative thérapeutique aux greffes d'organes ou de tissus est prometteuse.³⁷ La conception de biomatériaux pour l'IT nécessite un contrôle précis des signaux biophysiques et biochimiques pour diriger les cellules endogènes vers la régénération tissulaire.³⁸

1.1 Cahier des charges d'un biomatériau d'ingénierie tissulaire

Les biomatériaux sont des supports plan ou 3D qui *in situ*, facilitent l'organisation des cellules tout en stimulant la croissance et la formation des néo-tissus.³⁹ L'intégration du biomatériau

par les tissus hôtes ainsi que la colonisation par les cellules avoisinantes favorisent le remodelage et la régénération tissulaire.^{39,40} Ces processus sont favorisés par les propriétés biologiques du biomatériau permettant ainsi l'adhérence, la migration, la prolifération, et la différenciation cellulaire *in situ*. Pour cela, les biomatériaux doivent être biocompatibles, c'est à dire ne pas déclencher de réactions inflammatoires chroniques ou aiguës et doivent posséder une cinétique de dégradation adaptée à la formation des néo-tissus et au remodelage. Le transport des biomolécules, la migration des nutriments et la vascularisation sont favorisés par la porosité du biomatériau.³²

Les propriétés mécaniques des biomatériaux sont nécessairement compatibles avec leur utilisation en contexte clinique.⁴¹ Les biomatériaux destinés à la régénération des tissus durs doivent avoir un module de compression d'environ 10 à 1500 MPa, tandis que les biomatériaux utilisés dans la réparation des tissus mous doivent avoir un module de compression d'environ 0,4 à 350 MPa.³²

Avant d'être implantés, la stérilisation des biomatériaux selon des méthodes conventionnelles validées et leur conservation doivent être adaptées à leur utilisation.⁴²

La compatibilité biologique doit être corrélée à la résistance mécanique adaptée pour soutenir les fonctions physiologiques requises. Cet équilibre est essentiel dans le développement des biomatériaux, et nécessite souvent des compromis.⁴³

1.2 Les biomatériaux d'origine synthétique

Les biomatériaux permettent d'apporter un support aux cellules, il en existe une variété disponible en IT.⁴¹ Le choix des biomatériaux est défini selon la morphologie, la dimension et les propriétés mécaniques nécessaires à leur utilisation et leur application clinique.³²

L'exigence initiale était d'imiter les propriétés physiques du tissu remplacé, tout en minimisant la réponse immunitaire. Par conséquent, les biomatériaux initialement développés étaient biologiquement inertes.⁴⁴ Les matériaux inorganiques sont nombreux tels que l'acier inoxydable, le cobalt et le titane^{45,46}, les matériaux céramiques, avec l'alumine et le zircon^{46,47} ainsi que les matériaux minéraux comme l'hydroxyapatite (HA) et le phosphate de calcium.^{48,49} Les biomatériaux synthétiques inorganiques offrent des avantages tels que la résistance mécanique et la reproductibilité de leur méthode de fabrication. Cependant, ils présentent

également des inconvénients tels que l'absence de bioactivité, la stimulation de la réaction immunitaire au corps étranger et une dégradation très lente du matériau.⁵⁴

Dans le principe de l'amélioration continue, de nouveaux biomatériaux ont été développés à partir de matériaux bioactifs et biorésorbables, capables d'interagir avec l'environnement tissulaire pour améliorer la réponse biologique, et de se dégrader tandis que les nouveaux tissus se remodelent.⁴⁴ Sont retrouvés, les polymères synthétiques biodégradables, tels que le poly(ϵ -caprolactone) (PCL)⁵⁰ et le polyéthylène glycol (PEG)³², l'acide polyglycolique (PGA)⁵¹, l'acide polylactique (PLA)⁵², l'acide polylactique-co-glycolique (PLGA)⁵⁰ et le polyuréthane (PU).⁵³ Ces derniers sont approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) pour des applications cliniques chez l'homme.^{32,53} Les concepts de bioactivité et de biodégradabilité combinés ont stimulé l'émergence de biomatériaux capables de favoriser une activité et un comportement cellulaires spécifiques.⁴⁴ Les biomatériaux utilisés sous forme d'hydrogel sont administrés de façon peu invasive, évitant ainsi le risque d'infection. Ils ont l'avantage de fournir un soutien biologique idéal. La cinétique de dégradation de l'hydrogel permet au biomatériau d'être remodelé une fois la nouvelle matrice extra-cellulaire (MEC) synthétisée par les cellules recrutées. En parallèle, les hydrogels ont l'inconvénient de proposer des propriétés mécaniques limitées.^{32,54}

L'étude réalisée par Gonzales-Vichis *et al.* démontre que l'utilisation de biomatériaux d'origine synthétique (18,75%) est moins représentée par rapport aux matériaux d'origine biologique (41,96%).⁵⁵

1.3 Les biomatériaux d'origine biologique

Les biomatériaux d'origine biologique permettent de reproduire les conditions naturelles de l'environnement dans lesquelles les processus de différenciation et de prolifération cellulaires sont favorisés. Les biomatériaux les plus utilisés en IT sont le collagène de type I, le chitosane, la gélatine, l'acide hyaluronique (AH), la fibre de soie, l'alginate et la fibrine.⁵⁶ Le collagène de type I est largement utilisé, bien que ce biomatériau soit potentiellement vecteur d'agents pathogènes et puisse également être à l'origine de réactions immunologiques. Les propriétés mécaniques inadéquates et sa manipulation délicate réduisent son intérêt.⁵⁷

L'utilisation du chitosane est une alternative prometteuse du fait de sa biodégradabilité, biocompatibilité, de ses propriétés mécaniques et chimiques modulables.⁵⁸ En parallèle, la gélatine présente une faible stabilité mécanique, mais reste utilisée du fait de sa biocompatibilité, de sa structure poreuse, et de sa faible immunogénicité.⁵⁹⁻⁶¹ L'AH est non-immunogène, biocompatible et biodégradable, il est utilisé avec succès pour la régénération tissulaire.³² La fibre de soie est un biomatériau biocompatible, avec un faible potentiel immunogène et dispose de propriétés mécaniques robustes.⁶² L'alginate est un biomatériau biocompatible, non-thrombogénique et structurellement adaptable selon ses différentes utilisations (éponges, mousses et hydrogels). L'alginate peut également être combiné avec d'autres biomatériaux afin d'améliorer sa résistance mécanique.⁶³ La fibrine est un biomatériau utilisé dans un contexte autologue. Elle est biodégradable, et favorise l'adhésion, la migration, la prolifération et la différenciation des cellules *in situ*. Les biomatériaux de fibrine sont retrouvés dans diverses applications en IT des tissus durs.^{64,65}

Les matrices biologiques décellularisées

Les MEC issues de tissus décellularisés sont également identifiées comme biomatériaux. Les biomatériaux biomimétiques issus des MEC des tissus favorisent la régulation de la fonction cellulaire et l'orientation de la régénération du néo-tissu.⁶⁶

La fabrication d'un biomatériau à partir d'une matrice biologique décellularisée (MBD) de donneur allogénique ou xénogénique fournit un support structurel relatif aux fonctions biologiques et aux propriétés mécaniques des tissus.⁶⁷

L'environnement apporté par la MEC permet de fournir les signaux et les biomolécules nécessaires à l'attachement, la prolifération et la migration des cellules. L'utilisation des MBD s'apparente à une approche de bio-mimétisme du tissu natif.⁶⁸ Lors du processus de décellularisation, les éléments immunogènes tels que les antigènes cellulaires et l'ADN, sont éliminés des tissus.⁴¹ Les techniques de décellularisation sont nombreuses, elles impliquent des combinaisons de méthodes physiques, chimiques et enzymatiques.³¹

Les protéines de la MEC sont conservées après le processus de décellularisation mais ne provoquent pas de réaction immunitaire. L'optimisation des procédures de décellularisation permet d'obtenir une MBD conforme aux critères définis par Crapo *et al.* qui suggérait une

élimination complète des cellules et des noyaux évaluée par histologie, réduisant l'ADN à une quantité inférieure à 50 ng/ mg de masse sèche, et une taille de fragment d'ADN double brin (ADNdb) inférieure à 200 paires de bases, et ce, tout en limitant les dommages sur la MEC.⁶⁹

En résumé, le choix des matériaux pour la production de biomatériaux doit tenir compte de leurs avantages et inconvénients, ainsi que de l'application clinique prévue, et cela reste un défi majeur dans le domaine de l'IT.⁶⁶

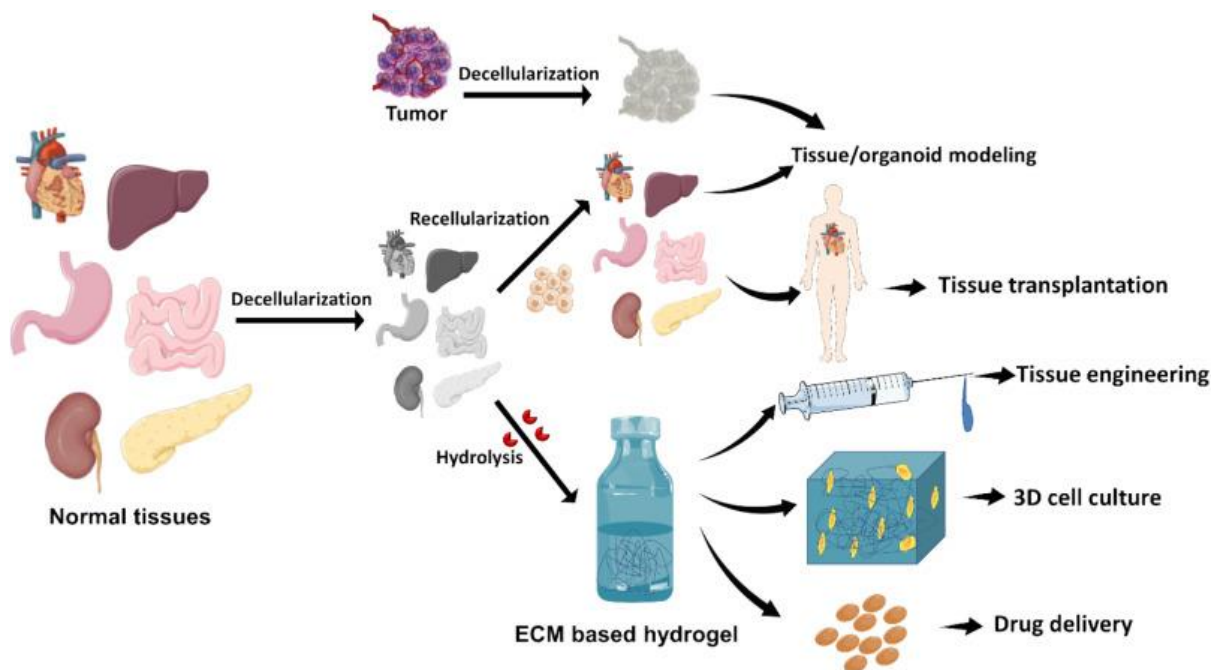


Figure 7 – Ingénierie tissulaire basée sur des biomatériaux issus de matrice décellularisée.⁷¹

2. Les cellules utilisées en ingénierie tissulaire

Il existe deux grandes approches dans la régénération des tissus. Il est possible d'implanter le biomatériau acellulaire ou alors, il est possible de le cellulariser avant implantation en site orthotopique. Les techniques d'implantation de biomatériaux acellulaires consistent à favoriser le recrutement des cellules *in situ*, présentes dans l'environnement. Dans ce cas, le biomatériau est cellularisé *in vivo* directement au sein de l'organisme hôte, permettant d'exploiter l'environnement biologique naturel de l'organisme, favorable à la différenciation cellulaire et à l'interaction des cellules avec les signaux biochimiques endogènes.⁷⁰

Autrement, la cellularisation du biomatériau peut être réalisée *in vitro*, en amont de l'implantation, par des cellules d'intérêt selon l'application clinique visée. La cellularisation *in vitro* des biomatériaux peut être associée, ou non, avec des biomolécules.⁷¹

Les cellules utilisées en IT sont des cellules différenciées ou des cellules stromales (CS). Le manque de donneurs et le rejet immunitaire représentent des contraintes à l'utilisation de ces cellules différenciées. C'est pourquoi, les cellules autologues différenciées pour la cellularisation des biomatériaux permettent de s'affranchir des problèmes de rejet immunitaire. Par ailleurs, l'utilisation des cellules stromales mésenchymateuse (CSM) a suscité un grand intérêt en IT. Les CSM sont une population cellulaire multipotente, d'origine mésodermique issue de la crête neurale, retrouvée dans les tissus adultes et fœtaux. Les CSM possèdent des fonctions de différenciation et d'auto-renouvellement, leur rôle est de maintenir l'homéostasie et de fournir des cellules spécialisées de lignée.⁴¹ La cellularisation des biomatériaux par les CSM facilite la production des facteurs sécrétoires qui assurent les phénomènes de chimiotaxie et soutiennent l'intégration du greffon permettant d'assurer les fonctions trophiques nécessaires.⁷²

En IT, les CSM dérivées de la moelle osseuse (CSM-MO) sont les cellules principalement utilisées. La moelle osseuse est la première source à partir de laquelle l'isolation et la caractérisation des cellules stromales (CS) a été réalisée. Les CSM issues de la moelle osseuse présentent, parmi les différentes CSM disponibles, la capacité de différenciation la plus aboutie. Cependant, l'extraction de ces CSM est limitée car inconfortable, voire à risque, pour le patient donneur.^{73,74}

D'autres types de CS ont été identifiés : les CS embryonnaires (CSE)⁷⁵, les CS fœtales (CSF)⁷⁶, et les CS adultes (CSA) telles que les CSM dérivées du tissu adipeux (CSM-TA), qui représentent une source cellulaire accessible, largement utilisées dans la collecte de CSM.^{77,78} Les CS pluripotentes induites (CSPi) sont également décrites comme niches de cellules utilisées en IT.^{79,80}

Stem Cells

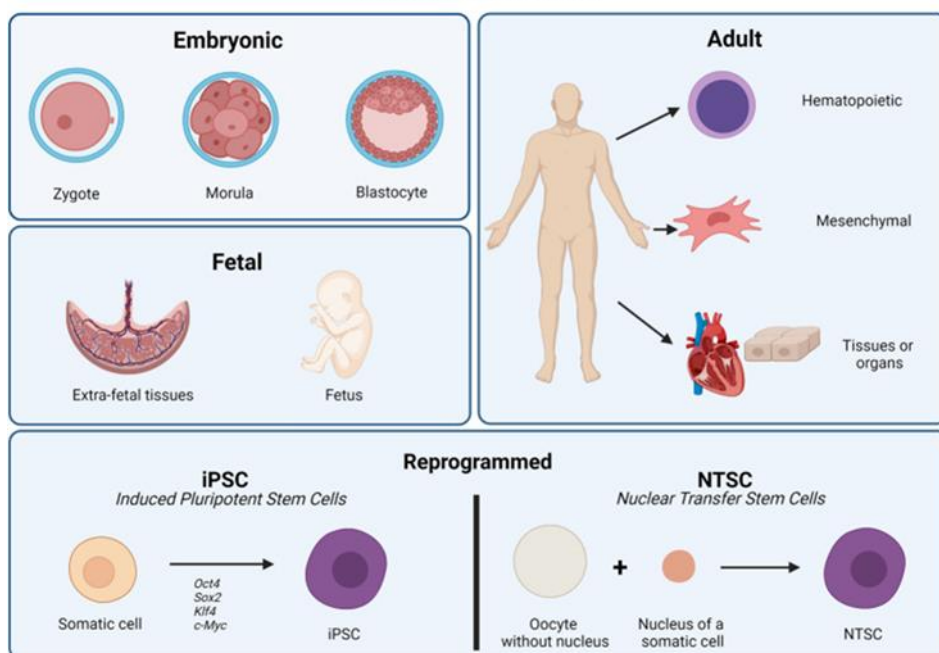


Figure 8 – Sources de CS aux différents stades du développement humain et extraction de CS par reprogrammation.⁵⁵

Alors qu'elles représentent une source accessible, les CS du cordon ombilical (CO), appartenant aux CSE, induisent des préoccupations éthiques. Néanmoins, en raison de leur nature fœtale, les CSM dérivées du CO ont une capacité d'expansion et de prolifération supérieure parmi les CSM décrites précédemment.⁵⁵ Aussi, les CSM d'origine embryonnaire ont l'avantage de s'auto-renouveler sur une plus longue période avant de se différencier contrairement aux CSM d'origine adulte.⁴¹ Les CSPi, bien que contournant les problèmes éthiques, peuvent présenter des mutations génétiques lors de leur manipulation *in vitro*.⁸¹

Les CSM offrent une capacité de différenciation et des propriétés immunosuppressives, mais leur capacité de prolifération diminue avec l'âge du donneur.⁸² En résumé, les CSM, en raison de leur potentiel de différenciation élevé, sont prometteuses pour la régénération tissulaire, mais leur utilisation soulève des préoccupations éthiques et comporte des risques tumorigènes.

Selon l'International Society for Cellular Therapy (ISCT), les CSM présentent trois caractéristiques principales : leur capacité d'adhérence au plastique dans des conditions de culture cellulaire, l'expression de marqueurs de surface spécifiques définis, et la capacité de

se différencier *in vitro* en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes.⁵⁵ Des études suggèrent que les CSM peuvent également se différencier en progéniteurs endothéliaux, en myoblastes ainsi qu'en neuroblastes.⁸³

Les marqueurs positifs des CSM définis par l'ISCT sont les Cluster de Différenciation (CD) 105, CD73, et CD90, alors que les marqueurs négatifs des CS sont les CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19, et le Human Leukocyte Antigen isotype DR (HLA-DR). De plus, il a été observé que les CSM présentaient des similitudes d'un point de vue morphologique à celle des fibroblastes et ne généraient pas de réponse immunitaire.⁵⁵ En effet, des études ont mis en évidence les propriétés immunomodulatrices des CSM, décrivant leur faible immunogénicité, et l'absence d'expression des molécules HLA-DR ou de molécules co-stimulatrices, notamment CD40, CD80, CD83, CD86 et CD154.⁸³

Les CSM ont également la capacité d'affecter les fonctions des cellules immunitaires, selon des actions paracrines ou directes, telles que les lymphocytes T (LT), lymphocytes B (LB), les tueurs naturels (natural killer, NK), les monocytes, les cellules dendritiques et les macrophages.^{41,83} Les CSM modulent à la fois les cellules immunitaires innées et adaptatives en perturbant leur activation, leur prolifération, leur maturation, leur production de cytokines, leur activité cytolytique ou leur production d'anticorps.⁸³

Le choix des cellules dépend des besoins spécifiques du traitement, du type de tissu à régénérer, et des considérations éthiques, soulignant l'importance d'une approche contextuelle dans leur application clinique.

3. Les biomolécules utilisées en ingénierie tissulaire

Les biomolécules utilisées en IT sont généralement les facteurs de croissance (growth factor, GF), mais il est également possible d'utiliser des ions, ou des médicaments.⁸⁴⁻⁸⁶

Les facteurs de croissance agissent sur les processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, la migration, la sécrétion et l'apoptose.⁴¹ Les facteurs de croissance dépendent du contexte d'IT dans lequel ils sont utilisés. Il existe des facteurs de croissance transformant (TGF), ils sont principalement retrouvés dans la régulation de la croissance cellulaire et dans la fonction immunitaire,⁸⁷ alors que le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) permet d'induire l'angiogenèse.⁸⁸ Le facteur de croissance

des fibroblastes (FGF) joue également un rôle dans l'angiogenèse mais aussi dans l'épithélialisation, la migration et la prolifération des kératinocytes et des fibroblastes.⁸⁹ Les chondrocytes sont stimulés par le facteur de croissance épidermique (EGF).⁹⁰ La différenciation des neurones est contrôlée par le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), et leur survie est assurée par les facteurs neurotrophiques (NF).⁹¹ Le facteur de croissance des hépatocytes (HGF) peut être utilisé en combinaison, ou indépendamment selon le contexte.⁹² Dans un contexte de réparation osseuse, c'est le facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF) qui va agir dans la régulation endocrinienne, et induire la différenciation des CSM dans une voie de différenciation adaptée.⁹³ La protéine morphogénique osseuse (Bone Morphogenic Protein, BMP) est utilisée pour favoriser la régénération, la prolifération des cellules, l'homéostasie métabolique et la réduction des facteurs pro-inflammatoires.^{55,88}

L'intégration de facteurs de croissance permet stimuler la régénération tissulaire, mais une stimulation non contrôlée entraîne un risque de prolifération excessive avec la formation de tumeurs. Par ailleurs, la spécificité des réponses cellulaires peut varier en fonction des types de facteurs de croissance utilisés, et des interactions complexes peuvent survenir, affectant la qualité du remodelage tissulaire.⁸⁶

IV. OBJECTIFS DE LA THESE

Les solutions chirurgicales à l'œsophagectomie, chez les patients atteints d'un cancer ou suite à un traumatisme de l'œsophage, sont reconnues unanimement comme très insatisfaisantes par la communauté médicale internationale.²² Ce projet concerne principalement les patients ayant subi une ablation de l'œsophage suite à un cancer ou un traumatisme, ce qui correspond à 2000 patients en France chaque année et s'inscrit dans la continuité d'un programme de recherche débuté en 2013, avec les travaux conduits conjointement par le Centre d'Investigations Cliniques en Innovations Technologiques (CIC-IT, CIC1401) de Bordeaux, le service de chirurgie digestive du CHU de Bordeaux, et l'unité mixte de recherche (UMR 1026) de Bio-ingénierie Tissulaire (BioTis, INSERM) à l'Université de Bordeaux.

Ces travaux ont permis de conclure que la matrice biologique obtenue par décellularisation d'œsophage de porc présentait de nombreux avantages par rapport aux substituts

synthétiques déjà envisagés. Les résultats *in vitro* et *in vivo* chez le porc ont confirmé l'intérêt de cette approche et la faisabilité de cellulariser cette MBD avant son implantation.⁹⁴

Les objectifs de cette thèse étaient d'optimiser la matrice pour la rendre exploitable sous forme de produit d'ingénierie tissulaire (PIT) implantable chez l'homme et d'explorer ses capacités à la cellularisation *in vitro* en vue d'un remodelage *in situ*. Nous visons l'obtention d'un greffon sous 2 formes possibles, plan et tubulaire, aux propriétés mécaniques adaptées à la fonction digestive et capables d'intégration *in situ*.

Pour cela, il était nécessaire d'adapter le protocole de fabrication de la MBD mis au point par Luc *et al.*⁹⁴ pour le rendre acceptable par les autorités de santé (International Standard Organization 22442-1 (ISO 2244-2))⁹⁵, de caractériser biologiquement et mécaniquement la matrice obtenue, et d'évaluer son caractère inflammatoire et immunogène *in vitro* et *in vivo*.

Secondairement, l'optimisation du protocole de cellularisation de la matrice *in vitro* était également nécessaire, afin d'évaluer l'adhésion et la prolifération de CSM au potentiel très prometteur pour faciliter l'intégration et le remodelage tissulaire.

La première partie de ces travaux décrira le développement et la caractérisation d'une matrice biologique œsophagienne décellularisée. Une seconde partie concernera la stratégie de cellularisation de la matrice biologique œsophagienne.

CHAPITRE 1

**DÉVELOPPEMENT ET CARACTÉRISATION D'UNE
MATRICE BIOLOGIQUE ŒSOPHAGIENNE**

I. INTRODUCTION

1. L'ingénierie tissulaire de l'œsophage

La nécessité de restaurer la contuité digestive après résection de toute ou partie de l'œsophage est décrite pour des altérations superficielles nécessitant la restauration des muqueuses, mais également dans le remplacement circonférentiel étendu ou segmentaire de pleine épaisseur.⁹⁶ (Schéma 1)

Les stratégies chirurgicales d'allogreffes œsophagiennes ne sont pas une option viable, notamment en raison du manque de donneur, de la complexité de l'organe et de la nécessité d'administrer un traitement immunosuppresseur au patient.⁹⁷ De nos jours, l'approche chirurgicale couramment retrouvée est la tunnelisation de l'estomac (Igor Lewis-Santy) ou l'interposition d'une portion du côlon. Cependant, ces procédures chirurgicales sont associées à des complications post-opératoires importantes comme décrites précédemment. De plus, la nécessité de prélever les tissus de remplacement autologues entraîne des chirurgies complexes à l'origine de complications.⁹⁸

Le potentiel offert par l'IT a été reconnu comme une alternative prometteuse pour le remplacement de l'œsophage.⁹⁹ Comme décrit précédemment, les biomatériaux synthétiques présentent des propriétés mécaniques fiables et des procédés de fabrication validés, néanmoins ils sont à l'origine d'une réaction immunitaire au corps étranger. Les matériaux biologiques bien que moins reproductibles dans leur développement, et moins robustes mécaniquement, assurent un remodelage tissulaire inhérent aux fonctions spécifiques du site.⁹⁶

La validation des biomatériaux œsophagiens issus de l'IT est réalisée selon un cahier des charges strict, confirmé par des études *in vitro* et *in vivo*. (Schéma 3) L'architecture du matériau doit être inhérente à l'organe cible, et ses propriétés mécaniques compatibles avec son utilisation en tant que substitut œsophagien. L'évaluation de la cytocompatibilité et de la cytotoxicité permet de limiter la réponse immunitaire de l'hôte et d'assurer les processus cellulaires, tels que la migration, la prolifération et la différenciation des cellules. Le biomatériau n'engendre pas d'infection, et possède une porosité contrôlée permettant l'angiogenèse et le remodelage fonctionnel des tissus *in situ*.^{56,67,94,96,97}

Le développement d'une MBD œsophagienne doit également prendre en compte son environnement physiologique et préserver son intégrité en cas d'évènements pathologiques indésirables. L'acidité gastrique, associée aux RGO généralement décrits dans les atteintes œsophagiennes altère les muqueuses de l'œsophage et peut entraîner la formation d'une sténose, des ulcères de la muqueuse ou le développement d'épithélium cylindrique métaplasique précoce à une EBO.¹⁰⁰ La validation du cahier des charges précédemment décrit doit être compatible avec l'évaluation d'une MBD exposée à un environnement acide.

Le développement d'une MBD tubulaire dans ces travaux, permettrait également de proposer une matrice de comblement 2D, sous forme de patch de pleine épaisseur.

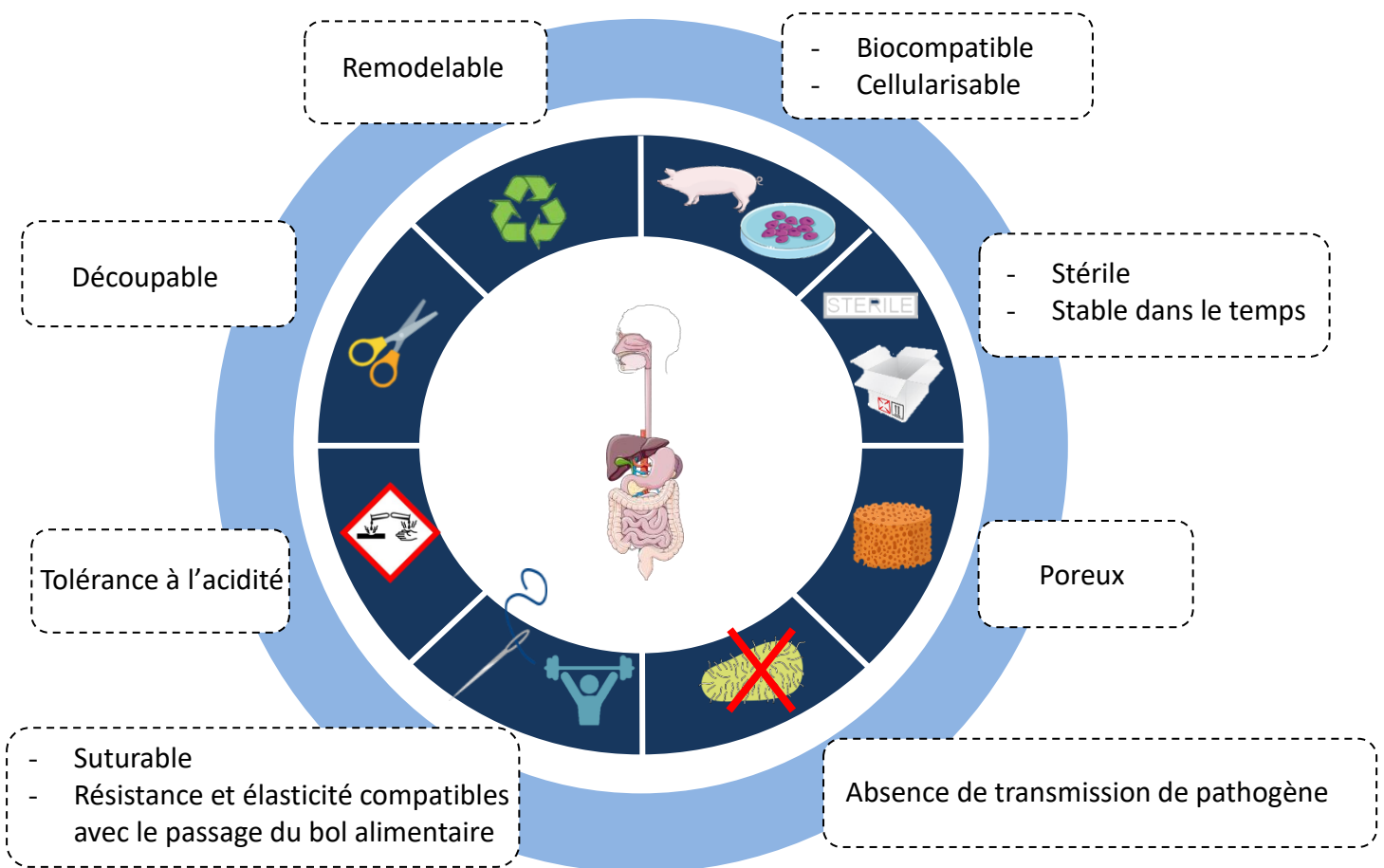


Schéma 3 - Cahier des charges d'une MBD œsophagienne.

2. Les substituts œsophagiens d'origine synthétique

Des premières études ont été envisagées afin de restaurer la continuité digestive à l'aide de substituts synthétiques non résorbables en polytétrafluoroéthylène (PTFE) et en Dacron.^{101,102}

Les tentatives de substitution de l'œsophage à l'aide de matériaux non résorbables ont échoué. Ces matériaux n'étaient pas biocompatibles, et entraînaient des infections chroniques, des fuites anastomotiques, et des sténoses œsophagiennes.⁹⁷

Dès 1989, d'autres approches synthétiques utilisées pour la substitution œsophagienne consistaient en une construction tubulaire composée d'une éponge de collagène soutenue par un tube en silicone. L'éponge de collagène offrait la composante biologique, et le silicone permettait d'assurer le rôle mécanique. Néanmoins, des complications de sténoses étaient fréquemment décrites et la nécessité du retrait des matériaux de soutien par des procédures chirurgicales était une limite à leur utilisation.¹⁰³

C'est pourquoi, des substituts synthétiques résorbables ont été envisagés, comme le PGA, le PLA, le PLLA, et le PLGA.¹⁰⁴⁻¹⁰⁸ Les résultats de ces différentes études ont montré une absence de cellularisation *in situ* et *in vivo*, due à une faible bioactivité et biocompatibilité des matériaux, une absence de vascularisation, des fuites et des sténoses conséquentes à une réaction inflammatoire au corps étranger. La cinétique de dégradation des substituts résorbables ne permettait pas de conserver leurs propriétés mécaniques.¹⁰³

Une autre étude chez l'Homme a démontré que la régénération du tissu œsophagien était réalisable à l'aide d'un implant œsophagien Cellspan™ (Biostage, Holliston, MA) composé d'un échafaudage synthétique en PU et ensemencé de CSM autologues. La substitution de l'œsophage, la stimulation de la régénération des tissus néo-œsophagiens et la préservation de l'œsophage natif (ON) étaient mises en évidence. Le composant synthétique était néanmoins retiré par endoscopie lorsque celui-ci n'était pas résorbé.¹⁰⁹⁻¹¹¹

L'utilisation clinique de la preuve de concept de polymères synthétiques suggère que cette approche peut sembler attrayante mais qu'il est nécessaire de développer davantage de matériaux appropriés afin d'améliorer la réponse inflammatoire, la biocompatibilité et la

dégradation de ces substituts. Cette approche synthétique ne permettait pas de reproduire la complexité du tissu œsophagien lorsqu'elle n'était pas associée à une entité biologique.²²

3. Les substituts œsophagiens d'origine biologique

Les progrès de l'IT ont permis le développement de différents modèles expérimentaux axés principalement sur l'utilisation de MBD.⁹⁷ Les MBD œsophagiennes sont dérivées d'organes ou de tissus d'origine humaine ou animale. Elles sont obtenues après un protocole de décellularisation qui consiste en l'élimination du contenu cellulaire et protéique. Elles sont décrites comme étant un support naturel, biocompatible et biodégradable et sont idéalement décrites comme biomatériaux n'induisant pas de réaction inflammatoire.^{94,112,113} Les MBD sont riches en collagène, en élastine, en fibronectine et en laminine, elles conservent la configuration tri-dimensionnelle inhérente de l'organe ainsi que les macro et micro-architectures, le réseau vasculaire et les composantes de la MEC du tissu natif.^{56,67} Il a été démontré que les MEC spécifiques d'un organe permettaient une régénération adéquate avec la recolonisation spécifique des cellules *in vivo*.¹¹⁴

La MBD doit être stérilisable selon des méthodes conventionnelles tout en conservant l'intégrité structurelle de la MEC de l'organe.⁶⁸

Bien que cela dépende de la méthode de décellularisation utilisée, les MBD œsophagiennes présentent l'avantage de favoriser l'orientation, et la prolifération des cellules *in situ*, grâce à la conservation de leurs signaux chimiques et structuraux, permettant *in-fine*, le remplacement de la MBD par les cellules hôtes.^{22,30,97} Elles comportent les éléments nécessaires facilitant la fixation des cellules avec une porosité comprise entre 50 et 200 μm permettant la prolifération cellulaire, le transport des nutriments et l'élimination des déchets. Des pores de 35 à 70 μm sont présents afin de promouvoir l'angiogenèse.^{16,103}

La morphologie et la structure d'une MBD doivent être compatibles avec les fonctions de l'œsophage, et posséder les propriétés mécaniques adaptées aux pressions intraluminales exercées lors du passage du bol alimentaire.¹⁶ Sa viscoélasticité doit supporter les phases de contraction-relaxation du péristaltisme. L'exposition régulière de l'œsophage à l'acide gastrique, du fait de sa localisation anatomique, peut endommager la muqueuse épithéliale.

Les propriétés biologiques et mécaniques de la MBD doivent être préservées lorsqu'elle est exposée à un environnement acide.^{115,116}

3.1 Les matrices biologiques décellularisées et méthodes de décellularisation

Les méthodes de décellularisation sont variées et présentent chacune des avantages et inconvénients. Il n'y a pas de consensus quant à la méthode idéale de décellularisation préconisée.³¹ Les traitements des tissus natifs sont réalisés selon des méthodes physiques, chimiques et enzymatiques.¹¹⁷ (Tableau 1)

Les méthodes physiques

Les méthodes physiques de décellularisation sont adaptées afin de préserver la structure et la composition biochimique essentielle de la MEC et contribuent ainsi à la conservation de ses propriétés mécaniques.¹¹⁸ Il a été démontré que des variations de température préliminaires permettaient de réduire le temps d'expositions des organes et des tissus aux solutions de décellularisation et endommageaient les cellules sans altérer la MEC. Des méthodes d'immersion et d'agitation des organes et des tissus dans les solutions de décellularisation sont également décrites. Les durées d'immersion et les vitesses d'agitation sont déterminées selon l'épaisseur et la densité cellulaire de l'organe ou du tissu, et par l'agent chimique de décellularisation utilisé.^{31,118} D'autres méthodes, telles que l'application d'une pression hydrostatique, l'électroporation non thermique (ENT), qui consiste en l'application d'impulsions électriques sur les composants cellulaires du tissu vivant, ou encore l'application d'un gradient transmural, ou flux convectif, sont employées.^{31,69,119}

Les méthodes chimiques

L'évolution des techniques d'ingénierie des organes entiers au cours des deux dernières décennies a été possible grâce à la méthode de perfusion de l'organe avec des solutions chimiques de décellularisation, essentielle à la préservation des structures tissulaires.^{94,112}

Les méthodes chimiques sont généralement associées à des méthodes physiques afin d'optimiser la décellularisation des organes ou des tissus. La décellularisation par l'utilisation

de solutions chimiques composées de détergents anioniques, ou cationiques permet d'éliminer de façon efficace le contenu cellulaire des organes ou des tissus. La diversité des méthodes permet d'ajuster les protocoles et ainsi, de réduire les altérations de la MEC. Les solutions chimiques de décellularisation sont constituées d'un agent de détergence ou de différentes associations de détergents.^{31,119}

Les bases alcalines utilisées dans les processus de décellularisation, telles que l'hydroxyde d'ammonium, l'hydroxyde de sodium (NaOH), l'hydroxyde de calcium et le sulfure de sodium, modifient la structure et les propriétés biomécaniques de la MEC, tout en réduisant la teneur en glycosaminoglycanes (GAG) et en éliminant les facteurs de croissance. Les acides (ex. acide paracétique à 0,1% (v/v), acide chlorhydrique (HCl)) endommagent la micro-architecture de la MEC lors de la décellularisation. En réduisant la teneur en collagène, les acides diminuent la résistance mécanique des tissus. Des chélateurs, tels que l'éthylènediaminetétraacétique (EDTA) et l'acide éthylène-glycol-tétraacétique (EGTA) sont généralement utilisés avec des enzymes ou des détergents afin d'améliorer l'efficacité de la décellularisation. Les détergents décrits sont le dodécylsulfate de sodium (SDS), le sodium déoxycholate (DEOX), le Triton X-100 et le 3-[(3-cholamidopropyl) diméthylammonio]-1-propane-sulfonate (CHAPS).^{31,67,69,117,119,120}

Une étude comparative de ces différents agents de décellularisation a mis en évidence une élimination des contenus cellulaires et nucléaires supérieures pour le SDS, le Triton X-100 et le DEOX.¹²¹ Le SDS altère la cytocompatibilité de la matrice, l'attachement des cellules spécifiques du site et perturbe la composition de la MEC contrairement au Triton X-100.¹²² Le DEOX offre un maintien structurel, et la conservation des propriétés mécaniques de la MEC, il est toutefois décrit comme étant plus destructif pour la MEC que le SDS.^{123,124}

Les méthodes enzymatiques

Les méthodes enzymatiques sont essentielles à la décellularisation des organes et des tissus, elles permettent d'éliminer les composants cellulaires et l'ADN résiduel après un traitement chimique de la MEC. Elles assurent une élimination ciblée du contenu nucléaire, tout en préservant l'intégrité structurelle de la MEC. Les solutions enzymatiques (ex. DNase et

trypsine) dégradent également les composantes immunitaires présentes dans la MEC telles que le HLA.¹²⁵⁻¹²⁷

Sorts	Method	Mechanism	Disadvantage	Advantage
Physical treatments	Freeze–thaw cycles	Intracellular ice crystals disrupt cell membranes and cause cell lysis	Disrupt ECM microstructure by ice crystals; subsequent treatments were performed to remove cellular contents Damage underlying basement membranes, Need standards for controlling mechanical force	Diminish the amount of chemical lysing agents to reduce the toxicity caused by the eluent Maintain morphological characteristics
	Scraping	Mechanically remove cells from ECM surface	Cannot process tissues without innate vascular networks Alter ECM architecture. Need optimal standards for mechanical force and exposure time. Cause more damages to tissues due to chemicals by agitation	This process helps in preserving the 3D ultrastructure of tissue ECM decellularization of complex organs
	Pertusion	Remove cellular components and debris within the Organ's natural vasculature		Facilitate chemical exposure and cellular material removal decellularization of small, fragile and thin organs without innate vascular structures
	Immersion and agitation	Rupture cells and tissues Removal of cellular debris	The In-appropriate acoustic power can damage the tissues The pressurization effect damages both collagen and elastin fibres and alters their mechanical properties The freezing phase needs to be avoided	Preservation of the ECM structure and increase in the efficiency of cellular removal Reduce exposure time to harsh detergents
	Sonication	Depends primarily on the cavitation phenomenon, in which bubbles form to physically dissociate molecules		Minimal alteration of ECM mechanical properties high safety level due to the absence of cytotoxic chemicals the ability to process tissue in dry conditions Preserves the extracellular matrix including ECM and microvascular structure, which allows for recellularization by host cells
	Pressurization	Cells can be lysed by applying direct pressure to tissue	Pressure gradient can disrupt ECM Damages collagen integrity; Reduce the contents of GAGs and growth factors; SDS can be difficult to completely remove from the remaining matrix	Maintenance of tissue composition and ultrastructure Efficient and easy to obtain;
	Supercritical fluids	The low viscosity and high transport characteristics of a supercritical fluid allow for simple and short decellularization protocols	Not yet widely used	
	Electroporation	Due to the irreversible change of permeability, the cell membrane forms micro pores, leading to cell lysis.	Expensive to operate Hard to process large sized tissues	
	Pressure gradient	Pressure gradient can help deliver cell-lysing agents into the tissue and force cellular debris out of the tissue		
	Chemical treatments	Ionic detergents (Sodium dodecyl sulfate, Sodium deoxycholate)	Solubilize membrane proteins; dissociate DNA from protein	
Nonionic detergents (TritonX-10, octyl-glucopyranoside)		Solubilize cell membranes and dissociate DNA from proteins without disrupting protein–protein interactions	Alter the ECM structure; Reduce laminins/fibronectin content; Remove cells incompletely	The better preservation of ultrastructure by nonionic than ionic detergents; relatively low cost The better preservation of ultrastructure by Zwitterionic than ionic detergents; Preserve collagen content; relatively low cost
Zwitterionic detergents/ CHAPS		Exhibit properties of both ionic and nonionic detergents	Disrupt and dissociate proteins in the ECM	
Acids/Peraetic acid		Catalyze hydrolytic degradation of biomolecules	Disrupt ECM constituents and structures; reduce the collagen content; decrease the tissue tensile strength. Influence GAG content, collagen and growth factors;	Supported the growth of human mesenchymal stem cells Efficiently remove hairs from dermal tissue
Bases/sodium hydroxide		Catalyze hydrolytic degradation of biomolecules	Weaken mechanical properties	
Hypotonic/hypertonic treatments		Rupture cell membranes and cause cell lysis by osmotic shock	Difficult to remove the residual cellular remnants from the tissue	Little effects on matrix molecules or the tissue structure
Organic solvents/Alcohols, acetones		Dehydrate the cells and solubilize cell membrane, leading to cell lysis and removal	Cross-link and precipitate proteins, including collagen. Disrupt protein–protein interactions, and denature proteins in ECM	As a final wash to remove residual nucleic acids from tissue
Chelators/EDTA, EGTA		Dissociate cells and ECM by binding divalent cations	Hard to achieve sufficient long exposure times damage the collagen matrix Have limited cell removal abilities when used alone;	The combination of EDTA and trypsin can appropriately preserve the unique collagenous structure Effectively decellularize ECM without inducing a cytotoxic effect
Enzymatic treatments		Cleave peptide bonds on the carboxy terminus of arginine or lysine		
Trypsin		Hydrolyze deoxyribonucleotide and ribonucleotide chains	Hard to be removed incompletely; long-standing processing time can disrupt ECM constituents	Essential for the complete removal of residual DNA and RNA
Nuclease				

Tableau 1 - Les traitements chimiques et physiques utilisées pour la préparation de MBD.⁶⁸

4. Les matrices biologiques décellularisée utilisées en ingénierie tissulaire de l'œsophage

Les MBD ont permis d'apporter des résultats prometteurs en tant que biomatériaux dans la substitution œsophagienne circonférentielle de pleine épaisseur. Elles induisent moins de réaction inflammatoire et moins de fibrose, qui sont des facteurs limitants dans le remodelage tissulaire.⁹⁷

Les MBD décrites pour la substitution œsophagienne proviennent de différents tissus et également de tissus dérivés de l'œsophage.^{94,112} D'autres tissus sont utilisés dans le développement de matrice acellulaire, tels que la sous-muqueuse d'intestin grêle (SIS)¹²⁸⁻¹³⁰, la vessie urinaire^{131,132}, la MEC gastrique¹³³, l'aorte porcine¹³⁴ ou un tissu dermique : AlloDerm®.¹³⁵ (Tableau 2)

L'interposition d'un feuillet de SIS dans le comblement de défaut œsophagien favorise le remodelage tissulaire, mais des sténoses, des fuites, des dysphagies et des infections post-opératoires sont décrites pour un remplacement circonférentiel de pleine épaisseur. De plus, aucune colonisation de la SIS par les cellules musculaires n'a été observée.^{128,132,136,137}

Le comblement de défaut œsophagien à l'aide d'un patch de vessie urinaire décellularisée permettait la régénération du muscle squelettique orienté et contigu au muscle natif adjacent. Néanmoins la formation de sténoses post-opératoires était observée lors du remplacement circonférentiel de pleine épaisseur.^{131,132} Alternativement, l'implantation d'un patch de MEC gastrique décellularisée ne permettait aucune régénération des tissus musculaires.¹³³ Le comblement d'un défaut œsophagien à l'aide d'un patch d'aorte porcine décellularisée s'est montré favorable.¹³⁴ Le patch AlloDerm® a démontré son intérêt dans la régénération des tissus œsophagiens.¹³⁵ La cellularisation *in vitro* des biomatériaux objective de meilleurs résultats pour les matériaux d'origine biologique.¹³⁸

Les MEC spécifiques de l'œsophage orientent la régénération tissulaire selon le phénotype adéquat. Luc *et al.* ont alors développé une matrice œsophagienne d'origine porcine décellularisée à partir d'un système de perfusion BOSE (BioDynamic®). La lumière de l'organe était perfusée par les solutions de décellularisation, et les tissus extérieurs étaient également

en contact dynamique avec les détergents.⁹⁴ Arakelian *et al.* utilisent un bioréacteur (SYNTHICON, Inc©) permettant d'assurer une perfusion de la lumière de l'organe dans une chambre de décellularisation rotative.¹¹²

Les travaux d'Ozeki *et al.* ont permis de démontrer l'avantage de la DEOX par rapport au Triton X-100 dans la décellularisation de l'œsophage avec des propriétés mécaniques supérieures, une préservation de l'intégrité de la MEC et une élimination des composants cellulaires plus efficace.¹²⁴ D'autres solutions de décellularisation sont également décrites pour la SIS avec l'acide péracétique, le NaOH associé à l'EDTA, ainsi que la trypsine.¹³⁹ La vessie urinaire était rendue acellulaire par des méthodes ioniques, avec un traitement au chlorure de sodium (NaCl).¹³² Urita *et al.* obtenaient une MEC gastrique acellulaire à partir de solutions de détersions constituées de SDS et de DNase.¹³³ Alors que l'aorte décellularisée était obtenue après un traitement au Triton X-100 et de la DNase.¹³⁴

La décellularisation d'un œsophage de porc proposée par Luc *et al.* consistait à combiner la DEOX et l'azide de sodium⁹⁴, Bhrany *et al.* ont, quant à eux, proposé une association de SDS et de Triton X-100, alors qu'Arakelian *et al.* ont suggéré l'utilisation d'une solution de SDS et d'EDTA.^{112,113}

En IT de l'œsophage, différents modèles animaux ont été utilisés pour simuler les conditions humaines et étudier les approches en régénération tissulaire spécifiques. Parmi les modèles couramment décrits, les porcs sont souvent privilégiés en raison de la similitude anatomique de leur tractus gastro-intestinal avec ceux des humains.^{23,94,140,141} Ces modèles porcins permettent de tester les implants mais surtout, les techniques de régénération tissulaire dans un contexte plus proche de la réalité clinique. Parallèlement, d'autres modèles animaux murins sont utilisés pour la validation des études préliminaires et offrent des informations précieuses sur les mécanismes cellulaires.⁹⁶

Luc *et al.* ont décrit le premier modèle de MBD œsophagienne de porc. Le remplacement du tiers inférieur de l'organe dans un modèle de porc s'est avéré réalisable chirurgicalement, tout en assurant la nutrition et la survie de l'animal. Cependant, les résultats cliniques étaient mitigés, avec la présence de fistules, d'abcès et de sténoses.⁹⁴

Sur la base de ces travaux, Arakelian *et al.* ont développé un modèle de MBD œsophagienne porcine de grade clinique.¹¹² Cette MBD a été implantée chez le porc, afin d'assurer un remplacement circonférentiel au niveau du tiers supérieur de l'organe. La lumière de la MBD était maintenue ouverte à l'aide d'une endo-prothèse œsophagienne temporaire. La migration récurrente de l'endoprothèse entraînait des sténoses.²³ La maturation du greffon dans l'épiploon n'a pas permis d'apporter de bénéfice, ni sa recellularisation.^{23,94} Néanmoins, le remplacement circonférentiel de l'œsophage par une MBD œsophagienne était réalisable et permettait un remodelage tissulaire qui s'orientait vers un phénotype œsophagien.²³

Year	Author	Animal	Portion	Cell source	Scaffold	Bioreactor	Outcome
Partial-thickness defects model							
2005	Badyalak SF [20]	canine	Cervical	–	UB-ECM (porcine)	–	no stenosis
2006	Ohki T [21]	canine	Chest	mucosal epithelial cell (sheet)	–	–	no stenosis
2007	Sakurai T [22]	porcine	Chest	buccal keratinocyte (injection)	–	–	no stenosis
2009	Nieponice A [23]	canine	Cervical	–	UB-ECM (porcine)	–	no stenosis
2011	Honda M [24]	canine	abdominal	adipose tissue-derived cell (injection)	–	–	no stenosis
2013	Nieponice A [25]	rodent	Cervical	bone marrow-derived cell	UB-ECM (porcine)	–	no stenosis
Full-thickness, partial defect model							
2000	Badyalak SF [26]	canine	Cervical	–	UB-ECM (porcine)	–	no stenosis
2001	Isch JA [27]	canine	Cervical	–	decellularized collagen (human)	–	no stenosis
2002	Komuro H [6]	porcine	Chest	(autologous epithelium remained)	collagen sponge	–	no stenosis
2003	Grikscheit TC [17]	rodent	Abdominal	esophageal organoid unit	biodegradable polymer tube	Omentum	no stenosis
2004	Lynen JP [28]	rabbit	Abdominal	–	polyvinylidene fluoride (PVDF) mesh	–	unobstructed
2004	Lynen JP [28]	rabbit	Abdominal	–	polygractin910 (Vicryl) mesh	–	no stenosis
2005	Badyalak SF [20]	canine	Cervical	–	UB-ECM (porcine)	–	anastomotic leakage
2006	Lopes MF [29]	rodent	Cervical	–	SIS-ECM (porcine)	–	stenosis
2007	Urita Y [18]	rodent	Abdominal	–	gastric acellular matrix (rodent)	omentum	no stenosis
2009	Wei RQ [7]	canine	Cervical	oral mucosal epithelial cells	SIS-ECM (porcine)	–	no stenosis
2013	Tan B [10]	canine	Cervical	MSC	SIS-ECM (porcine)	–	no stenosis
2015	Diemer P [30]	rabbit	Abdominal	–	poly-e-caprolactone mesh	–	pseudodiverticulum
2016	Park SY [12]	rabbit	Cervical	MSC	poly-e-caprolactone mesh	–	no stenosis
2017	Okuyama H [31]	canine	Abdominal	–	In-body tissue architecture	–	no stenosis
Full-thickness, circumferential defect model							
2000	Saito M [32]	rodent	Cervical	split-thickness skin	collagen sponge + silicone membrane	latissimus dorsi muscle	no stenosis
2000	Badyalak SF [26]	canine	Cervical	–	SIS-ECM (porcine)	–	stenosis
2003	Grikscheit T [33]	rodent	Abdominal	esophageal organoid unit	biodegradable polymer tube	Omentum	stenosis
2007	Urita Y [18]	rodent	Abdominal	–	gastric acellular matrix (rodent)	omentum	asphyxation
2008	Nakase Y [19]	canine	Chest	keratinocyte, fibroblast, smooth muscle tissue	amniotic membrane + polyglycolic acid felt	omentum	no stenosis
2009	Doeede T [34]	porcine	Cervical	–	SIS-ECM (porcine)	–	stenosis
2010	Gaujoux S [35]	porcine	Cervical	–	allogenic aorta	–	no stenosis
2014	Šlogvič S [11]	rodent	Cervical	MSC	esophageal ECM (rodent)	–	no stenosis
2015	Poghosyan T [8]	porcine	Cervical	oral mucosa, myoblast	SIS-ECM + amniotic membrane	omentum	no stenosis
2017	Catry J [36]	porcine	Abdominal	MSC	SIS-ECM (porcine)	omentum	stenosis
2018	Luc G [37]	porcine	Abdominal	–	esophageal ECM (porcine)	omentum	stenosis
2019	Takeoka Y [38]	rodent	Abdominal	dermal fibroblasts, smooth muscle cells, MSC	bio 3D printer	omentum	no stenosis

Tableau 2 – Utilisation de l'ingénierie tissulaire dans la reconstruction de l'œsophage.⁹⁸

5. Objectifs

L'objectif principal de ce travail était d'améliorer le développement de la matrice œsophagienne décellularisée façonnée par Luc. *et al.*⁹⁴ qui récemment, ont rapporté un remplacement œsophagien circonférentiel de pleine épaisseur dans un modèle de « mini-pig » à partir d'un œsophage porcin décellularisé. Ce modèle xénogénique permet d'analyser *in vivo* la réponse inflammatoire et le remodelage tissulaire de la matrice acellulaire dans un environnement physiologique proche de l'Homme.¹⁴²

La décellularisation de l'œsophage respectait les critères de validation définis par Crapo *et al.*⁶⁹ La MBD était stérilisée par rayonnement γ , ce qui engendrait une détérioration importante des fibres de collagène. L'épiploon de l'animal était utilisé comme bioréacteur afin de promouvoir une vascularisation du greffon pré-implantation. D'un point de vue chirurgical, la continuité digestive était restaurée mais tous les animaux présentaient des complications post-opératoires. Une cellularisation de la muqueuse et de la sous-muqueuse était observée, mais la couche musculaire était presque absente à 4 semaines.⁹⁴ Aucune MBD ne permettait à elle seule une régénération œsophagienne complète. C'est pourquoi, une cellularisation a été envisagée afin d'améliorer l'intégration tissulaire du greffon à partir des feuillets de CSM-TA de porc, ou par maturation *in vivo* de la MBD préalablement à la substitution œsophagienne circonférentielle de pleine épaisseur. Ces approches proposées *in vitro* et *in vivo* chez le gros animal ont montré une cellularisation insuffisante.⁹⁴

Dans ces travaux de thèse, l'objectif était d'obtenir une MBD à partir d'œsophage de porc selon un procédé de fabrication de qualité « grade-clinique » tout en respectant les critères de décellularisation définis par Crapo *et al.*⁶⁹ Une fabrication de la MBD dans ces conditions impliquait la mise en place de procédures rigoureuses, avec un contrôle qualité conforme aux normes réglementaires, assurant la sécurité, la biocompatibilité et l'efficacité du substitut. La MBD était caractérisée biologiquement et mécaniquement, afin de répondre au cahier des charges précédemment décrit selon des tests standardisés permettant de garantir la conformité aux exigences réglementaires.¹⁴³ L'objectif était de produire des matrices fiables et fonctionnelles pour une application clinique.

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

A. PRÉPARATION D'UNE MATRICE BIOLOGIQUE ŒSOPHAGIENNE DÉCELLULARISÉE

Protocole de décellularisation d'un œsophage porcine

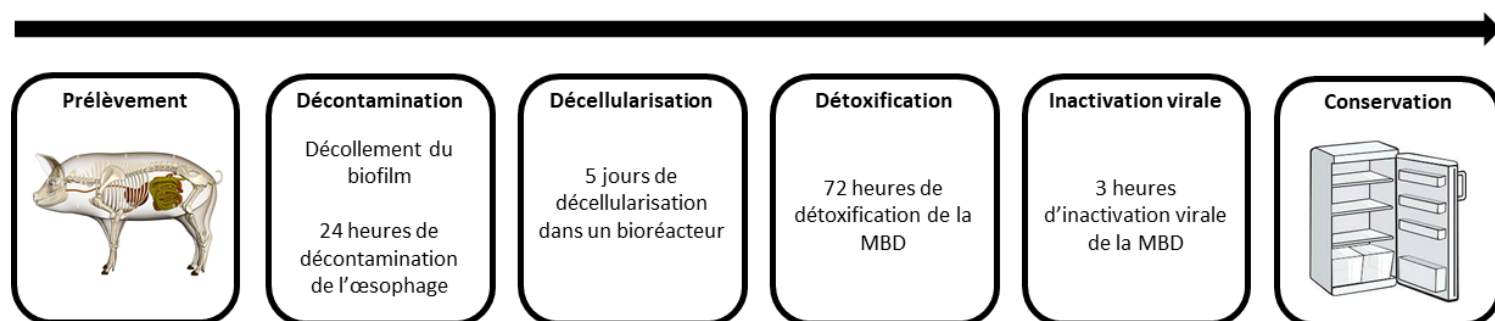


Schéma 4 - Protocole de décellularisation d'un œsophage porcine.

1. Prélèvements d'œsophages porcins

Le modèle animal utilisé pour ces travaux était le porc domestique. Les porcs sélectionnés étaient âgés de 3 à 5 mois et pesaient entre 30 et 50 kilogrammes (kg). Conformément à la législation en vigueur, les prélèvements d'œsophages étaient effectués sur des porcs préalablement euthanasiés dans le cadre d'une expérimentation cardiaque, menée à l'Institut Hospitalo-Universitaire – L'institut des maladies du rythme cardiaque (IHU LIRYC, Pessac) et au DETERCA (Université de Bordeaux). Le protocole pour cette étude n'a pas nécessité l'approbation d'un comité d'éthique, car il impliquait l'utilisation d'animaux sacrifiés dans le cadre d'une expérimentation autorisée par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Tous les prélèvements ont été effectués en conditions stériles, par des personnes compétentes et qualifiées en expérimentation animale (niveau 1 - concepteur).

Suite à un prélèvement cardiaque, une œsophagectomie a été réalisée. L'adventice a été ouverte, puis un passage rétro-œsophagien a été réalisé par digitoclasie à environ un tiers inférieur. La dissection s'est poursuivie jusqu'au hiatus œsophagien. L'œsophage a été sectionné au niveau du cardia, puis la libération s'est poursuivie au niveau du tiers supérieur de l'organe. Les tissus environnants des œsophages tels que les nerfs et l'adventice étaient retirés par dissection chirurgicale.¹⁶

Les échantillons d'œsophage étaient coupés au niveau de leurs extrémités de façon à obtenir un prélèvement de 10 centimètres. Les œsophages étaient ensuite soigneusement rincés, ainsi qu'au niveau de la lumière de l'organe, avec une solution saline tamponnée au phosphate (DPBS, Gibco®). Une fois les liquides de rinçages clairs, les prélèvements étaient incubés dans 50 mL de solution de DPBS (Gibco®) contenant 1% de pénicilline, streptomycine et amphotéricine 250µg/ mL (PSA, Eurobio Scientific®) à une température de 4°C et à l'abri de la lumière. La conservation des prélèvements était de 5 jours maximum.

2. Décontamination du prélèvement œsophagien

2.1 Décollement du biofilm des prélèvements œsophagiens

Les prélèvements étaient placés dans 50 mL de solution stérile d'EDTA, (Sigma-Aldrich®) ajustée à pH 8 et à une concentration de 25 mM. Les échantillons étaient mis sous agitation à l'aide d'un vortex à pendant 30 secondes et d'un bain de sonication pendant 5 minutes. Les prélèvements étaient soigneusement rincés, et particulièrement leur lumière, avec du DPBS (Gibco®), jusqu'à obtenir des liquides de rinçages clairs.¹⁴⁴

2.2 Antibiothérapie des prélèvements œsophagiens

Les prélèvements ont été traités selon le mode opératoire MO-CIC-2609 du CIC IT (CIC1401). Ils étaient incubés dans 50 mL de solution de décontamination composée de : 320 mg/ L de gentamycine sulfate (Dominique Dutscher), 600 mg/ L de clindamycine hydrochloride (Sigma Aldrich®), de 500 mg/ L de vancomycine hydrochloride (BioChemica®) et de 100 mg/ L d'amphotéricine B à 250µg/mL (Sigma-Aldrich®). Les prélèvements étaient traités pendant 24 heures, sous agitation orbitale à 200 rotations par minute (RPM) et à température ambiante (20°C). A l'issue de ces 24 heures, les antibiotiques et antifongiques étaient éliminés selon plusieurs rinçages et conservés dans une solution de 50 mL DPBS (Gibco®), à 4°C et à l'abri de la lumière.¹¹²

3. Décellularisation du prélèvement œsophagien

Les prélèvements préalablement décontaminés étaient decellularisés dans un bioréacteur, le Rotary Cell Culture System (Fig. 9, RCCMax Dual Chambers, SYNTHICON, Inc®).

En environnement stérile, les prélèvements étaient ligaturés au niveau des écrous de perfusion, avec des fils de suture 2-0 Vicryl (Ethicon, US LLC©) et installés au niveau de la double chambre de décellularisation. Cette dernière correspondait à la cavité interne du RCCMax (SYNTHICON, Inc©) dans laquelle étaient décellularisés les prélèvements œsophagiens selon une action mécanique et chimique.

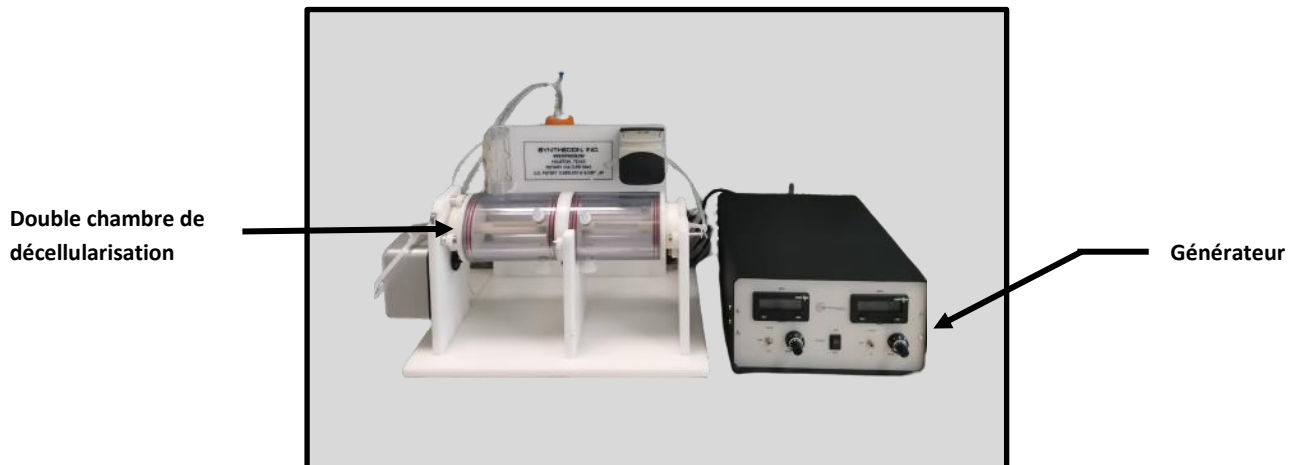


Figure 9 - Bioréacteur de décellularisation Rotary Cell Culture System (RCCMax Dual Chambers, SYNTHICON, Inc©)

Les solutions chimiques et enzymatiques de décellularisation étaient contenues dans un réservoir de 500 mL (PYREX®), traversaient un oxygénateur, une pompe péristaltique, et enfin circulaient dans la première chambre de décellularisation afin de perfuser la lumière de l'œsophage. La seconde chambre de décellularisation, montée en série, était quant à elle reliée au réservoir, et les prélèvements étaient perfusés en cycle fermé, selon un flux unidirectionnel continu. Les solutions de détersion étaient également versées dans la double chambre rotative afin d'assurer le contact des solutions avec la surface externe du prélèvement œsophagien. Les prélèvements étaient perfusés à un débit de 54 RPM et la rotation des chambres était de 27 RPM, permettant ainsi une action mécanique efficace. Le réservoir disposait d'une mise à l'air filtrée à 0,2 μm afin de pallier d'éventuelles suppressions.¹¹²

Les cycles de décellularisation par les solutions chimiques et enzymatiques étaient entrecoupés par 4 étapes de rinçages à l'eau milliQ. Le premier cycle de décellularisation était

de 17 heures, les échantillons étaient traités à l'azide de sodium (Sigma-Aldrich®) à 9 g/L. Le second cycle de décellularisation était composé d'une solution DEOX (Sigma-Aldrich®) à 36 g/L et d'azide de sodium (Sigma-Aldrich®) à 0.9 g/L. Et enfin, le troisième cycle de déterision, réalisé à 37°C, permettait de soutenir l'action de la DNase-I from bovine pancreas (Sigma-Aldrich®) à 2000 Kunitz Units (KU).⁹⁴

À la fin de la décellularisation, les muqueuses épithéliales des matrices biologiques ainsi obtenues étaient retirées avec une curette de Volkmann. L'absence de muqueuse épithéliale avait montré ses bénéfices dans la perspective d'une re-cellularisation de la MBD.¹⁶

4. Détoxification de la matrice biologique décellularisée (MBD)

Les résidus chimiques des étapes de décontamination et de décellularisation étaient éliminés au moyen d'une résine absorbante (Amberlite XAD 16N, Sigma-Aldrich®). L'intérêt de l'utilisation de la résine Amberlite en clinique a déjà été démontré. Grâce à sa forte capacité d'adsorption et sa sélectivité, la résine peut neutraliser efficacement les toxines. De plus, sa structure poreuse offre une grande surface spécifique favorisant ainsi une interaction maximale avec les composants à éliminer.¹¹²

La résine Amberlite (Sigma-Aldrich®) était activée dans une solution de tampon phosphate de potassium à 10 mM (VWR, Int™), à une concentration de 6 g de résine/ 200 mL de solution de tampon phosphate de potassium, et à un pH ajusté à 6.5. Une fois la solution de détoxification stérilisée par autoclavage, les échantillons y étaient incubés pendant 72 heures, sous agitation orbitale à 150 RPM et à 30°C. A la suite de la détoxification, les matrices biologiques œsophagiennes étaient soigneusement rincées au DPBS (Gibco®).^{112,145,146}

5. Inactivation virale de la MBD

L'inactivation virale de la MBD était réalisée dans une solution d'acide péracétique (Merck, Supelco®) à 0,18% dans du DPBS (Gibco®) pendant 3 heures, à pH 7, sous agitation orbitale à 200 RPM et à température ambiante. Les MBD étaient ensuite conditionnées dans 50 mL de solution DPBS (Gibco®) pour un rinçage de 12 heures, sous agitation orbitale à 200 RPM et à température ambiante. Les MBD se conservaient dans une solution de 50 mL de DPBS (Gibco®), à 4°C, et à l'abri de la lumière.¹⁴⁷

B. CARACTÉRISATION D'UNE MATRICE BIOLOGIQUE ŒSOPHAGIENNE DÉCELLULARISÉE

1. Confirmation de la décellularisation

Afin de confirmer la validation du protocole de décellularisation de l'œsophage, des critères de validation ont été défini par Crapo *et al.*⁶⁹ qui considéraient une élimination complète des cellules et des noyaux évaluée par histologie, une quantité d'ADN inférieure à 50 ng/ mg de masse sèche, et une taille de fragment ADNdb inférieure à 200 pb.

1.1 Par analyses histologiques

L'ON sans traitement de décontamination était utilisé en tant que contrôle des expériences réalisées.

Des échantillons tubulaires de 1 cm de long d'ON et de MBD étaient traités selon les modes opératoires MO-CIC-2406 et MO-CIC-2415 en vigueur au CIC IT (CIC1401). Ils étaient d'abord fixés dans 20 mL de paraformaldéhyde (PFA) à 4% (VWR, Int™) et à 4°C pendant 48 heures, et déshydratés selon des bains d'éthanol de concentrations croissantes (70, 80, 90 et 100%) dans un automate de traitement de tissus (LEICA®, TP1020). Les échantillons étaient ensuite inclus en paraffine et conservés à -20°C de façon à être coupés au microtome selon une épaisseur de 6 µm. Une fois les coupes des échantillons déposées sur lames, elles étaient placées 30 minutes sur une plaque chauffante, puis installées au niveau de l'automate de coloration (MYREVA SS30, Microm Microtech®).

L'analyse histologique permettait de s'assurer de l'absence de noyaux cellulaires traduisant une décellularisation efficace, de la conservation de l'intégrité des couches histologiques et de leur cohésion. Pour cela des colorations trichromatiques étaient adaptées. La coloration à l'Hématéine Eosine Safran (HES) était obtenue par l'ajout d'une étape de coloration avec le safran dans la procédure de coloration HE initiale, afin de colorer en jaune les fibres de collagène des tissus conjonctifs. Le safran colorait de manière directe et régressive, il contribuait également à déplacer l'éosine qui n'aurait pas été totalement éliminée du collagène lors de bains d'éthanol. La coloration au trichrome de Masson (TM) était utilisée pour différencier les fibres de collagène et le tissu musculaire dans des coupes histologiques. La différenciation des fibres de collagène était basée sur leur perméabilité. Le colorant

cytoplasmique acide allait colorer en premier les éléments tissulaires acidophiles dont les fibres de collagène. Lors d'une incubation des coupes dans l'acide phosphomolybdique, les éléments tissulaires les moins perméables allaient rester colorés en rouge alors que la liaison entre les fibres de collagène et le colorant allait se rompre, laissant la place au vert lumière pour se fixer. Les échantillons étaient montés à l'Entellan (VWR, Int™) et observés au microscope LEICA© associé au logiciel NIS-Elements D 4.20.0364.

1.2 Par quantification d'ADN

La quantification de l'ADN résiduel de la MBD était réalisée selon le kit Qiagen® (DNeasy Blood and Tissue Kit). Des fragments de 0,5 cm² de MBD étaient prélevés puis déshydratés par lyophilisation et broyés. Une quantité de 200 µL de solution enzymatique, composée de 20 µL de protéinase K et de 180 µL de Buffer ATL, était ajoutée aux 10 mg d'échantillons de MBD broyés, préalablement pesés et le tout était incubé à 56°C pendant 12 heures. A l'issue de l'incubation, les échantillons étaient homogénéisés, puis la solution était complétée par une quantité de 200 µL de buffer AL et 200 µL d'éthanol à 96%. Les échantillons étaient de nouveau homogénéisés avant d'être placés dans les colonnes Qi-Amp et centrifugés à 8 000 RPM pendant 1 minute, à température ambiante. Les échantillons étaient rincés dans 500 µL de buffer AW1 puis centrifugés à 8 000 RPM pendant 1 minute. Les échantillons étaient de nouveaux rincés dans 500 µL de buffer AW2 et centrifugés à 14 000 RPM pendant 3 minutes. Afin d'obtenir la solution d'intérêt dans laquelle l'ADN sera quantifié, une quantité de 200 µL de buffer AE était ajoutée aux échantillons qui étaient incubés à température ambiante puis centrifugés à 8 000 RPM pendant 1 minute. La solution était homogénéisée puis le dosage de l'ADN était effectué au spectromètre (NanoPhotometer™, Pearl) à une absorbance de 260 nm.

1.3 Par électrophorèse sur gel d'agarose

La mesure de la longueur des brins d'ADN résiduels des MBD était réalisée par électrophorèse sur gel d'agarose.

Préparation du gel : Le gel était obtenu après dissolution de 0,5g d'agarose dans 50 mL de Tris Acétate EDTA (TAE). Une quantité de 7 µL de GelRed™ était ajoutée pendant la phase de refroidissement du gel. Préalablement au dépôt du gel d'agarose dans un moule adapté à la

cuve de migration, un peigne permettant de former les puits de dépôt des échantillons y était déposé. Une fois le gel polymérisé, le peigne était retiré et la cuve de migration était immergée de tampon de migration, le TAE à 0,5X.

Préparation des échantillons: Une quantité de 10 μL d'échantillons de MBD préalablement traités conformément au paragraphe Ch1. B. I. 1.2 était prélevée et complétée de 2 μL d'un tampon de charge. Afin de permettre l'identification des bandes sur le gel après migration, un marqueur de faible poids moléculaire (allant de 50 à 1 500 paires de bases), composé d'un tampon de charge et d'un tampon de migration, était placé dans un puits isolé. Les échantillons étaient déposés dans les puits correspondants, et la cuve de migration était mise sous tension à 100 volts pendant 30 minutes. La révélation des bandes sur le gel après leur migration était obtenue sur une table ultra-violet (UV).

2. Analyse des échantillons par microscopie électronique à balayage (MEB)

Le cahier des charges de la MBD idéale rappelle que cette dernière doit permettre la colonisation des cellules *in vitro* et/ou *in vivo*, ainsi que le développement des différents tissus œsophagien. La taille des pores doit comprise entre 50 et 200 μm et entre 35 à 70 μm .^{16,103}

2.1 Fixation et préparation des MBD

Les échantillons plats d'une superficie de 0,5 cm^2 d'ON et de MBD étaient d'abord fixés dans 20 mL de PFA à 4% (VWR, Int™) et à 4°C pendant 48 heures et déshydratés selon des bains d'éthanol de concentrations croissantes (70, 80, 90 et 100%) dans un automate de traitement de tissus (LEICA®, TP1020). Les échantillons étaient ensuite inclus en paraffine et conservés à -20°C de façon à être coupés au microtome selon une épaisseur de 30 μm .

Une couche d'or était déposée sur la surface des échantillons de MBD selon une étape de métallisation, réalisée à l'aide d'un métalliseur (EMScope® SC500) dans une enceinte sous atmosphère contrôlée. Lors du processus de métallisation, les échantillons étaient soumis à un flux d'argon à haute pureté, créant un plasma permettant la vaporisation de l'or. La couche d'or était déposée de façon uniforme sur la surface des échantillons.

2.2 Observation des échantillons au microscope à balayage (MEB)

Les échantillons étaient montés sur des supports de MEB en utilisant un adhésif conducteur. Les échantillons étaient placés dans la chambre du MEB (Hitachi© TM4000Plus) et observés sous un faisceau d'électrons à une tension de 15 kV (mode Mix). Des images à haute résolution étaient capturées allant d'un grossissement x25 à x1000, pour une analyse détaillée.

3. Validation de la décontamination par analyse du microbiote aérobie et anaérobie

L'œsophage est un organe naturellement colonisé de nombreux micro-organismes. La vérification de la stérilité de la MBD était nécessaire afin d'envisager une implantation ultérieure. L'absence de contamination bactérienne a été évaluée au laboratoire Aquitaine Microbiologie (CNRS, Bordeaux). Une analyse microbiologique des échantillons d'ON et des MBD a été réalisée selon des approches culturomiques. Tous les échantillons étaient mis en culture selon différentes conditions : milieux de croissance spécifiques, températures, taux d'oxygène et temps d'incubation définis. La recherche du microbiote incluait l'identification de contaminants appartenant à la flore aérobie, micro-aérophile et anaérobie, ainsi que la recherche de mycoplasmes et d'endotoxines. Toutes les colonies isolées étaient identifiées par spectrométrie de masse. ¹⁴⁸

En parallèle, pour déterminer l'efficacité du traitement de décontamination, la concentration minimale inhibitrice (CMI) de chaque composant antimicrobien de la solution de décontamination, constituée de gentamycine sulfate (Dominique Dutscher©), de clindamycine hydrochloride (Sigma Aldrich®), de vancomycine hydrochloride (BioChemica®) et d'amphotéricine B à 250µg/ mL (Sigma-Aldrich®) était déterminée pour chaque micro-organisme contaminant décrit.

4. Analyse du contenu protéique de la MBD

4.1 Par immuno-histochimie et histologie

Immuno-histochimie (IHC)

Selon les modes opératoires MO-CIC-2415 du CIC IT (CIC1401), des échantillons plans de 1 cm² d'ON et de MBD étaient d'abord fixés dans 20 mL de PFA à 4 % (VWR, Int™) et à 4°C pendant 48 heures, et déshydratés selon des bains d'éthanol de concentrations croissantes (70, 80, 90 et 100%) dans un automate de traitement de tissus (LEICA©, TP1020). Les échantillons étaient ensuite inclus en paraffine et conservés à -20°C de façon à être coupés au microtome selon une épaisseur de 5 µm. Une fois les coupes des échantillons déposées sur lames, ces dernières étaient placées 30 minutes sur une plaque chauffante, puis installées au niveau de l'automate MYREVA SS30, (Microm Microtech©) pour les premières étapes de déparaffinage. La fixation des échantillons à au PFA à 4% (VWR, Int™) nécessitait un démasquage des sites des antigènes au PT Link (Dako© PT200) afin d'améliorer la reconnaissance de l'antigène par l'anticorps primaire. Le marquage des anticorps primaires concernait : l'anticorps anti-collagène-1 (Abcam©, ab138492), et anti-actine (Zytomed®, MSK030-05) qui étaient utilisés à pH = 9 pour le démasquage des antigènes. L'anti-vimentine (Abcam©, ab92547), l'anti-élastine (Thermo Fisher Scientific©, MA1-27129), ainsi que l'anti-fibronectine (Thermo Fisher Scientific©, P1A-23693) étaient utilisés quant à eux, à pH = 6. Ces 2 derniers marquages nécessitaient également un démasquage à la protéine kinase. Les anticorps primaires étaient utilisés à différentes concentrations selon les marquages : au 1/500 pour l'anti-collagène-1, au 1/100 pour l'anti-actine, au 1/200 pour l'anti-vimentine, au 1/50 pour l'élastine et au 1/50 pour la l'anti-fibronectine. Le marquage secondaire utilisé était la peroxydase de Raifort HRP, Zytochem Plus HRP One Step Polymer, (Zytomed®, kit anti-mouse/rabbit), il était appliqué à l'issue des différents temps d'incubation des marquages primaires. Les marquages secondaires étaient révélés après une incubation au 3-Amino-9-Ethylcarbazole, (AEC, Zytomed®), selon leurs différents temps d'incubation. Les échantillons étaient montés à l'Entellan (VWR, Int™) et observés au microscope LEICA© associé au logiciel NIS-Elements D 4.20.0364.

Colorations au bleu Alcian et Von Kossa

Selon les modes opératoires MO-CIC-2415 du CIC-IT (CIC1401), les échantillons étaient immergés dans 20 mL de PFA à 4% (VWR, Int™), à 4°C pendant 48 heures. L'analyse histologique était réalisée après déshydratation, inclusion et coupe de 6 µm. Les échantillons étaient installés au niveau de l'automate MYREVA SS30, (Microm Microtech©) afin de réaliser la coloration des échantillons au bleu Alcian (MO-CIC-2425, CIC1401). A pH 2,5, ce colorant permettait de mettre en évidence les glandes muqueuses sécrétant des glycosaminoglycanes sulfatés tels que le sulfate d'héparane et le sulfate de chondroïtine que l'on retrouve au niveau de la sous-muqueuse de l'œsophage.

Une coloration au Von Kossa (VK) était également réalisée, et permettait de détecter la présence de dépôts anormaux de calcium dans l'organisme grâce à la transformation des sels de calcium en sels d'argent. Les échantillons étaient montés à l'Entellan (VWR, Int™) et observés au microscope LEICA© associé au logiciel NIS-Elements D 4.20.0364.

4.2 Par spectrométrie de masse LC-MS/MS (Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry)

Procédure d'extraction et digestion de la MBD

L'étude du protéome de la MBD a été évaluée au Centre Génomique Fonctionnelle de Bordeaux (CGFB, Université de Bordeaux). Des punchs de biopsie de 8 mm de MBD étaient préparés et placés à 4°C dans du DPBS (Gibco©). Les échantillons étaient réhydratés dans 300 µL de tampon composé de TrisHCl 50 mM, d'EDTA à 25 mM, de NaCl à 3 M, de CHAPS à 0,25% complété avec 30 µL d'antiprotéase (Sigma-Aldrich®) à pH 7,6, pendant 3 heures, et sous agitation constante, à 4°C. Les échantillons étaient ensuite centrifugés à 10 000 RPM pendant 10 minutes, à 4°C. Des lavages successifs étaient effectués dans 300 µL de tampon composé de TrisHCl 50 mM, d'EDTA à 25 mM, de NaCl à 3 M, de CHAPS à 0,25% pendant 15 minutes, sous agitation, à 4°C. Les culots étaient re-suspendus dans 300 µL de tampon d'extraction constitué de 6 M d'urée, de 2 M de Thio-Urée, de 100 mM d'ammonium bicarbonate (AmBic), et de 10 mM de Dithiothréitol (DTT) puis centrifugés à 10 000 RPM, pendant 10 minutes, à 4°C. Des lavages successifs ont ensuite été effectués dans 300 µL de tampon composé de Tris-HCl 50 mM, d'EDTA 25 mM, de NaCl à 3 M, de CHAPS à 0,25% pendant 15 minutes sous

agitation à 4°C. Les culots ont été reconstitués dans 300 µL de tampon d'extraction constitué de 6 M d'urée, de 2 M de Thio-Urée, de 100 mM d'AmBic, et de 10 mM de DTT à pH 8,0, pendant 15 minutes, sous agitation à 4°C. Les échantillons étaient ensuite centrifugés à 10 000 RPM pendant 10 minutes, à 4°C. Puis, ils étaient incubés dans 50 µL de tampon d'hydroxylamine composé de 1 M d'hydroxylamine, de 4,5 M de guanidine-HCl, et de 0,2 M de carbonate de potassium (K₂CO₃) à pH 9,0, pendant 12 heures sous agitation à 45°C avant d'être centrifugés à 14 000 RPM pendant 15 minutes à 4°C. Une quantité de 50 µL de surnageant était collectée et mélangée avec 5 µL de DTT à 200 mM, pendant 60 minutes à température ambiante. Ensuite, 10 µL d'iodo-acétamide à 1 M étaient ajoutés pendant 60 minutes à température ambiante, à l'abri de la lumière. Enfin, 65 µL d'AmBic à 100 mM et 70 µL d'AmBic à 50 mM étaient ajoutés pour obtenir la solution définitive. La solution était incubée dans 50 µL de trypsine à 10 ng/µL à pH 8,5 pendant 12 heures, à 37°C pour le dessalage des protéines. L'éluat des protéines était réalisé dans 2x100 µL d'eau, d'acétonitrile et d'acide trifluoroacétique (H₂O/ACN/TFA à 30/70/0,1). Les échantillons étaient séchés par évaporation puis re-suspendus dans 50 µL d'eau acidifiée supplémentée avec 0,1 % d'acide formique, pour débiter la chromatographie. La teneur en protéines de la MEC était analysée par une méthode LC-MS/MS.¹⁴⁹

Analyse du protéome

Le mélange de peptides était analysé sur un système Ultimate 3000 nanoLC (Dionex, Thermo Fischer Scientific®), couplé à un spectromètre de masse Electrospray Orbitrap Fusion-TM Lumos-TM Tribrid-TM (Thermo Fisher Scientific®). Les spectres obtenus étaient analysés à l'aide de Proteome Discoverer 2.5 (Thermo Fisher Scientific®) avec Sequest HT comme algorithme de recherche, en utilisant une base de données « Uniprot Sus Scrofa », incluant : 2 sites de clivage marqués par la trypsine, la carbamidométhylation de la cystéine, l'oxydation de la méthionine, l'acétylation de l'extrémité N de la protéine, la perte de méthionine et la perte de méthionine/acétylation.¹⁴⁹

5. Analyse de la cytotoxicité de la MBD par étude de la viabilité cellulaire

Dans le but d'évaluer la toxicité de la MBD après utilisation des produits de décontamination et de la décellularisation, un test de viabilité cellulaire au Rouge Neutre (RN) était réalisé,

conformément à la norme ISO 10993-5 (Évaluation biologique des dispositifs médicaux - Partie 5 : Essais concernant la cytotoxicité *in vitro*) et en suivant le protocole MO-CIC-2526 actuellement en vigueur au CIC-IT (CIC1401). Le RN est un colorant vital qui se lie électrostatiquement aux sites anioniques présents dans la matrice lysosomiale des cellules. Une diminution de l'incorporation de ce colorant traduit une altération de l'intégrité membranaire cellulaire. Conformément à la norme, 3 essais indépendants ont été réalisés. L'évaluation de la toxicité des MBD a été réalisée à la fois sur les faces internes et les faces externes de ces échantillons. Les échantillons de surface plane de 1 cm² étaient préparés dans un environnement stérile.

Contrôle plastique: Ce contrôle correspondait aux cellules traitées uniquement avec du milieu de culture complet correspondant au milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) avec du rouge phénol (Gibco©) à 10% de sérum de veau (SV, American Type Culture Collection® (ATCC®)) et 1X de PSA (Eurobio Scientific©), permettant d'évaluer les effets potentiels induits par le récipient et le processus d'extraction de substances relargables.

Contrôle négatif: L'utilisation de thermanox en PTFE a permis de déterminer la réponse basale des cellules sans l'induction d'une réponse cytotoxique, tout en simulant l'écrasement cellulaire apporté par l'échantillon.

Contrôle positif: Du latex, sous la forme de caoutchouc dentaire (DuranDam©), était utilisé pour induire une réponse cytotoxique reproductible.

Conformément aux recommandations de la norme ISO 10993-5, des fibroblastes murins BALB/3T3 Clone 31 (ATCC®, lot : 7001008) étaient utilisés. Une amplification de minimum trois passages avant de réaliser le test de viabilité cellulaire était indispensable. Les cellules étaientensemencées à une densité de 10 000 cellules/cm² dans des flacons de culture (T75, TPP, Dominique Dustcher©) contenant du DMEM avec rouge phénol (Gibco©) à 10% de SV (ATCC®) et 1X de PSA (Eurobio Scientific©), jusqu'à atteindre la confluence. Les cellules adhérentes au plastique étaient rincées avec 5 mL de DPBS (Gibco©) pendant 1 minute. Les cellules étaient détachées par l'action de d'une solution de trypsine/ EDTA (ATCC®) composée de 0,25 % de trypsine et de 0,53 mM d'EDTA dans une solution saline équilibrée de Hanks sans

calcium ni magnésium, à une quantité de 2 mL, à 37°C pendant 5 minutes. Une fois décollées, les cellules étaient récupérées dans 10 mL de milieu de culture composé de DMEM avec du rouge phénol (Gibco®) à 10% SV (ATCC®) et à 1X de PSA (Eurobio Scientific®). La suspension cellulaire était déposée dans un tube Falcon™ 50 mL et centrifugées à 900 RPM, pendant 10 minutes, à température ambiante. Le culot cellulaire était remis en suspension dans du DMEM avec du rouge phénol (Gibco®) à 10% SV (ATCC®) et à 1X de PSA (Eurobio Scientific®). Les cellules étaient ensuite réensemencées à raison de 10 000 cellules/cm² dans une flasque (T75, TPP, Dominique Dustcher®). Les cellules étaient incubées en atmosphère humide enrichie avec 5% de CO₂ à 37°C et les milieux de culture étaient changés tous les 3 jours. Après amplification des cellules selon le nombre de passage recommandé, les cellules étaient ensemencées dans des plaques 6 puits, à raison de 30 000 cellules/cm², dans 3 mL/ puits de milieu de culture complet. Les cellules étaient placées dans un incubateur à 37°C, enrichi à 5% de CO₂, pendant 24 heures. Préalablement au dépôt des MBD, les cellules étaient contrôlées par observations microscopiques (LEICA®) afin de s'assurer de la qualité des cellules, et de la formation d'une monocouche semi-confluente. Les cellules étaient rincées avec du DPBS (Gibco®) et les échantillons de MBD étaient déposés dans les puits. Un anneau de lestage permettait d'assurer un contact entre la surface des échantillons de MBD ou des contrôles, et la couche cellulaire. Après une incubation de 24 heures à 37°C en atmosphère humide enrichie en 5% de CO₂, les échantillons de MBD, et les contrôles étaient retirés des puits. La couche cellulaire était rincée avec du DPBS (Gibco®) et une solution de travail de RN était ajoutée à raison de 3 mL/ puits. La solution de travail de RN (Sigma-Aldrich®) était obtenue par dilution au 1/66^{ième} du RN dans du Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Gibco®) sans rouge de phénol. Les plaques de culture étaient placées dans l'incubateur pendant 2 heures à 37°C et 5% de CO₂. Les surnageants étaient ensuite aspirés et les cellules lavées avec une solution de DPBS (Gibco®). La lyse des cellules était réalisée par l'addition de 4,5 mL/ puits de solution composée de 50% d'éthanol (v/v, VWR, Int™) et 1% d'acide acétique (v/v, Sigma-Aldrich®). Les échantillons obtenus étaient déposés à raison de 100 µL/ puits, dans une plaque 96 puits, en triplicata. Les échantillons obtenus étaient soumis à une longueur d'onde d'excitation de 540 nm (Tecan Infinite™ 500) pour calculer la viabilité cellulaire selon la formule :

$$\text{Viabilité (\%)} = 100 \times (\text{DO}_{\text{ech}} - \text{DO}_{\text{lyse}}) / (\text{DO}_{\text{blanc}} - \text{DO}_{\text{lyse}})$$

Les résultats de viabilité cellulaire étaient exprimés en pourcentage par rapport au témoin négatif. Les valeurs de viabilité cellulaire attendues devaient dépasser 70% de viabilité cellulaire par rapport au témoin, selon la norme ISO 10993-5, pour que le matériau testé soit considéré comme étant non-cytotoxique.¹⁵⁰

6. Etude des propriétés mécaniques de la MBD

6.1 Tests de tractions longitudinale et circonférentielle

Des essais de traction ont été réalisés pour évaluer les propriétés mécaniques des fibres longitudinales et circonférentielles de la MBD, selon le protocole en vigueur à l'UMR 1026 (INSERM, BioTis) et adapté. Des échantillons d'ON et des MBD étaient découpés sous forme de patches en 2 dimensions (2D) mesurant 1 cm sur 3 cm, selon l'orientation des fibres musculaires. Les extrémités des échantillons ont été installées entre les mors de l'équipement (Fig. 10, Shimadzu Autograph AGS-X series, force sensor of 100 N).

Les échantillons ont été pré-chargés à une force de 0,05 N et à une vitesse de 20 mm.min⁻¹. Après cette étape d'étalonnage, la longueur de l'échantillon (L0) présente entre les 2 mors a été mesurée afin de soumettre les échantillons à une vitesse de traction équivalente à 1% de L0. La force de traction maximale (MAX_Force, N), la contrainte maximale ou résistance ultime à la traction (UTS, MPa) et le pourcentage de déformation à la rupture (mm), ont été recueillis à l'aide du logiciel Trapezium X. Les résultats obtenus étaient analysés statistiquement à l'aide du logiciel GraphPad (Prism8, Dotmatics©), obtenus selon un T-test bilatéral, non apparié, afin de représenter la moyenne \pm l'écart type. La différence était significative lorsque $p < 0,05$.¹⁵¹

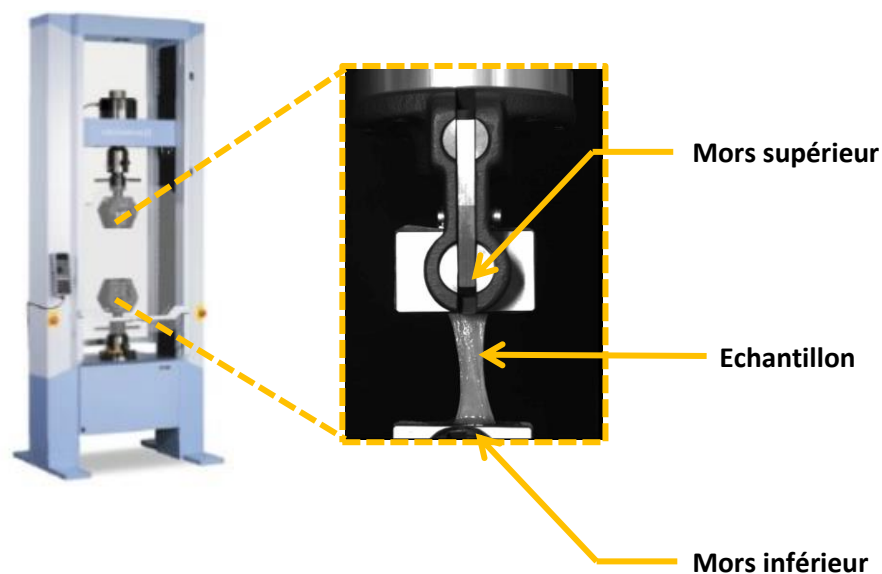


Figure 10 – Test de résistance à la traction d'un échantillon de MBD avec l'équipement Shimadzu Autograph AGS-X series.

6.2 Test d'éclatement

La capacité de la MBD à résister au passage du bol alimentaire était évaluée par un test d'éclatement. Selon le protocole en vigueur à l'UMR 1026 (INSERM, BioTis) et adapté, des ON et des MBD de structure circonférentielle et de 6 cm de longueur étaient fixés sur un banc d'éclatement, façonné par la société RESCOLL©. De l'azote pressurisé était utilisé permettant ainsi d'augmenter la pression au niveau intra-luminale des échantillons fixés. Un capteur de pression LEO 5 (KELLER Pressure©, mmHg) a été utilisé avec le logiciel Kolibri Desktop (KELLER Pressure©) pour mesurer la pression intra-luminale. La pression maximale était atteinte une fois que les parois des échantillons étaient rompues. Les résultats obtenus étaient analysés statistiquement à l'aide du logiciel GraphPad (Prism8, Dotmatics©), obtenus selon un T-test bilatéral, non apparié, afin de représenter la moyenne \pm l'écart type. La différence était significative lorsque $p < 0,05$.¹⁵²

6.3 Tests de suturabilité

Des tests de suturabilité étaient réalisés afin de s'assurer de la faisabilité de l'implantation chirurgicale. Des échantillons d'ON et de MBD ont été découpés sous forme de patches 2D mesurant 1 cm sur 3 cm. Selon le protocole en vigueur à l'UMR 1026 (INSERM, BioTis) et

adapté, un fil de suture 6-0 (Prolène®) a été placé à 2 mm du bord de l'échantillon, selon une orientation longitudinale des fibres musculaires. Les échantillons ont été placés dans les mors de l'équipement et pré-chargés à une force de 0,05 N et à une vitesse de 20 mm.min⁻¹ (Fig. 11). Le test a ensuite été lancé à une vitesse de 150 mm.min⁻¹. La MAX_Force et le pourcentage de déformation à la rupture ont été mesurées à l'aide du logiciel Trapezium X. Les résultats obtenus étaient analysés statistiquement à l'aide du logiciel GraphPad (Prism8, Dotmatics©), obtenus selon un T-test bilatéral, non apparié, afin de représenter la moyenne ± l'écart type. La différence était significative lorsque $p < 0,05$.¹⁵²

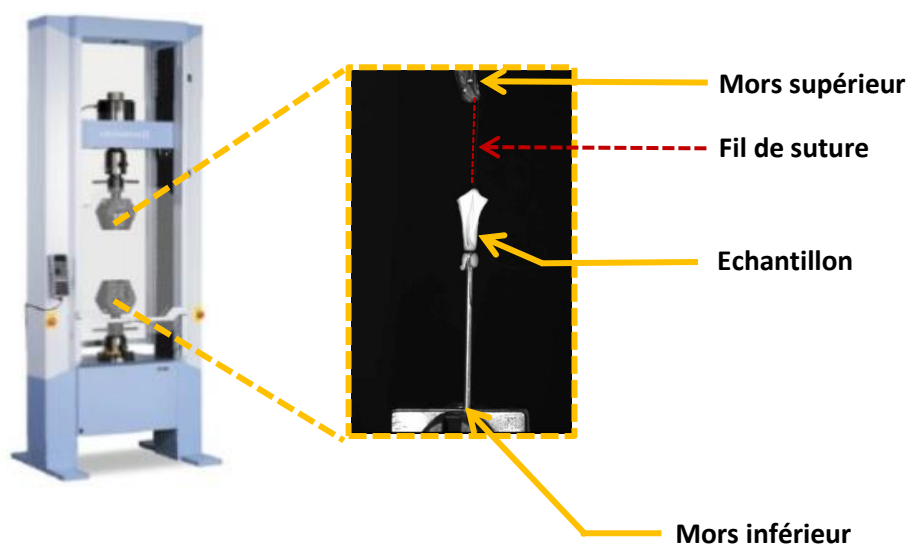


Figure 11 – Test de résistance à la suturabilité d'un échantillon de MBD avec l'équipement Shimadzu Autograph AGS-X series.

C. PRÉPARATION ET CARACTÉRISATION D'UNE MATRICE BIOLOGIQUE OESOPHAGIENNE DÉCELLULARISÉE EN ENVIRONNEMENT ACIDE

1. Préparation des MBD en environnement acide

Afin de contribuer à la compréhension des interactions entre les MBD et leur environnement physiologique acide, des échantillons de MBD ont été préparés conformément au protocole de décellularisation décrit – se référer au paragraphe *Ch1. II. A.*

Une fois décellularisées, les MBD étaient découpées sous forme de patch en 2D de 1 cm sur 3 cm. Les échantillons de MBD et des ON étaient immergés dans une solution stérile de 50 mL

d'eau milliQ maintenue à un pH 2.¹⁵³ Les ON étaient incubés à une température de 37°C, sous agitation orbitale à une vitesse de 150 RPM, pour une durée de 24 heures et de 72 heures (désignés respectivement ON_{A-24} et ON_{A-72}). Les MBD étaient également incubées à 37°C, sous agitation orbitale (150 RPM), pendant 24 et 72 heures, notées MBD_{A-24} et MBD_{A-72}.

2. Analyses de la MBD en environnement acide par imagerie

2.1 Analyses histologiques

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'impact d'un traitement à pH 2 sur l'intégrité des différentes couches histologiques des MBD ainsi que sur leur cohésion. Des prélèvements provenant d'ON_{A-24}, ainsi que des prélèvements de MBD_{A-24} et MBD_{A-72}, étaient fixés dans 20 mL de PFA à 4% (VWR, Int™) pendant 48 heures.

Conformément aux MO-CIC-2406 et MO-CIC-2415 en vigueur au CIC-IT (CIC1401), les échantillons ON_{A-24}, MBD_{A-24} et MBD_{A-72}, étaient traités et analysés – se référer au paragraphe *Ch1. II. B. 1.1.*

2.2 Analyses par MEB

La MEB permettait d'évaluer d'éventuelles altérations conséquentes au traitement à l'acide, sur la surface des échantillons. Des échantillons plats d'une superficie de 0,5 cm² des MBD_{A-24} et MBD_{A-72} étaient d'abord fixés dans 20 mL de PFA à 4% (VWR, Int™) et à 4°C pendant 48 heures.

Les échantillons étaient préparés et observés conformément au paragraphe *Ch1. II. B. 2.*

3. Analyse du contenu protéique de la MBD en environnement acide par LC-MS/MS

Des punches de biopsie de 8 mm de MBD_{A-24} et MBD_{A-72} étaient préparés et incubés à 4°C dans du DPBS (Gibco©). La préparation des échantillons ainsi que l'analyse de la teneur en protéines de la MEC étaient réalisées conformément au paragraphe *Ch1. II. B. 4.2.*¹⁴⁹

4. Caractérisation mécanique de la MBD en environnement acide

4.1 Tractions longitudinales et circonférentielles

Des échantillons d'ON_{A-24} et des MBD_{A-24} étaient découpés sous forme de patchs en 2D mesurant 1 cm sur 3 cm, selon l'orientation des fibres musculaires. Des essais de traction étaient réalisés afin d'évaluer les propriétés mécaniques des fibres longitudinales et circonférentielles des échantillons ON_{A-24} et MBD_{A-24}, conformément au paragraphe *Ch1. II. B. 6.1.*¹⁵¹

Les MBD_{A-72} et les ON_{A-72} n'ont pas été traités, du fait d'un glissement important des échantillons entre les mors de l'équipement.

4.2 Résistance à la suturabilité

Des échantillons d'ON_{A-24} et des MBD_{A-24} étaient découpés sous forme de patchs en 2D mesurant 1 cm sur 3 cm. Les essais de résistance à la suturabilité des échantillons ON_{A-24} et MBD_{A-24} étaient réalisés conformément au paragraphe *Ch1. II. B. 6.2.*¹⁵²

Les MBD_{A-72} et les ON_{A-72} n'ont pas été traités, du fait d'un glissement important des échantillons entre les mors de l'équipement.

III. RÉSULTATS

1. Confirmation de la décellularisation

1.1 Histologie

Les différentes couches histologiques de l'œsophage étaient identifiables, présentant une prédominance de dépôts de collagène au sein de la sous-muqueuse ainsi que des couches musculaires circulaires et longitudinales. (Fig. 12A) Les noyaux cellulaires dans les ON avaient conservé leur intégrité et étaient visibles. (Fig. 13)

Suite à la décellularisation, les MBD obtenues apparaissaient dépourvues de noyaux cellulaires. L'intégrité structurelle des couches histologiques était préservée, et leur cohésion s'était révélée caractéristique de l'œsophage. (Fig. 12B, Fig. 13)

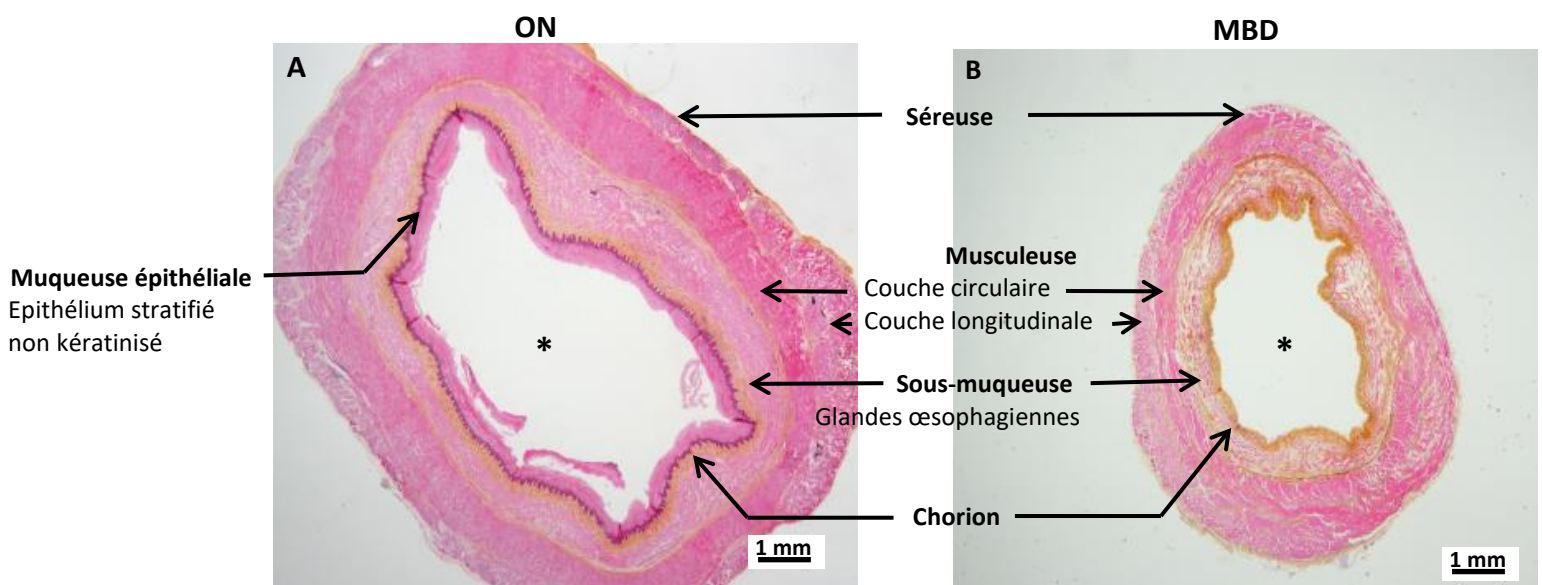


Figure 12 – Coloration à l'HES d'un ON et d'une MBD.

A : Observation des différentes couches histologiques d'un ON (Grossissement x4). B : Observation des différentes couches histologiques d'une MBD (Grossissement x4).

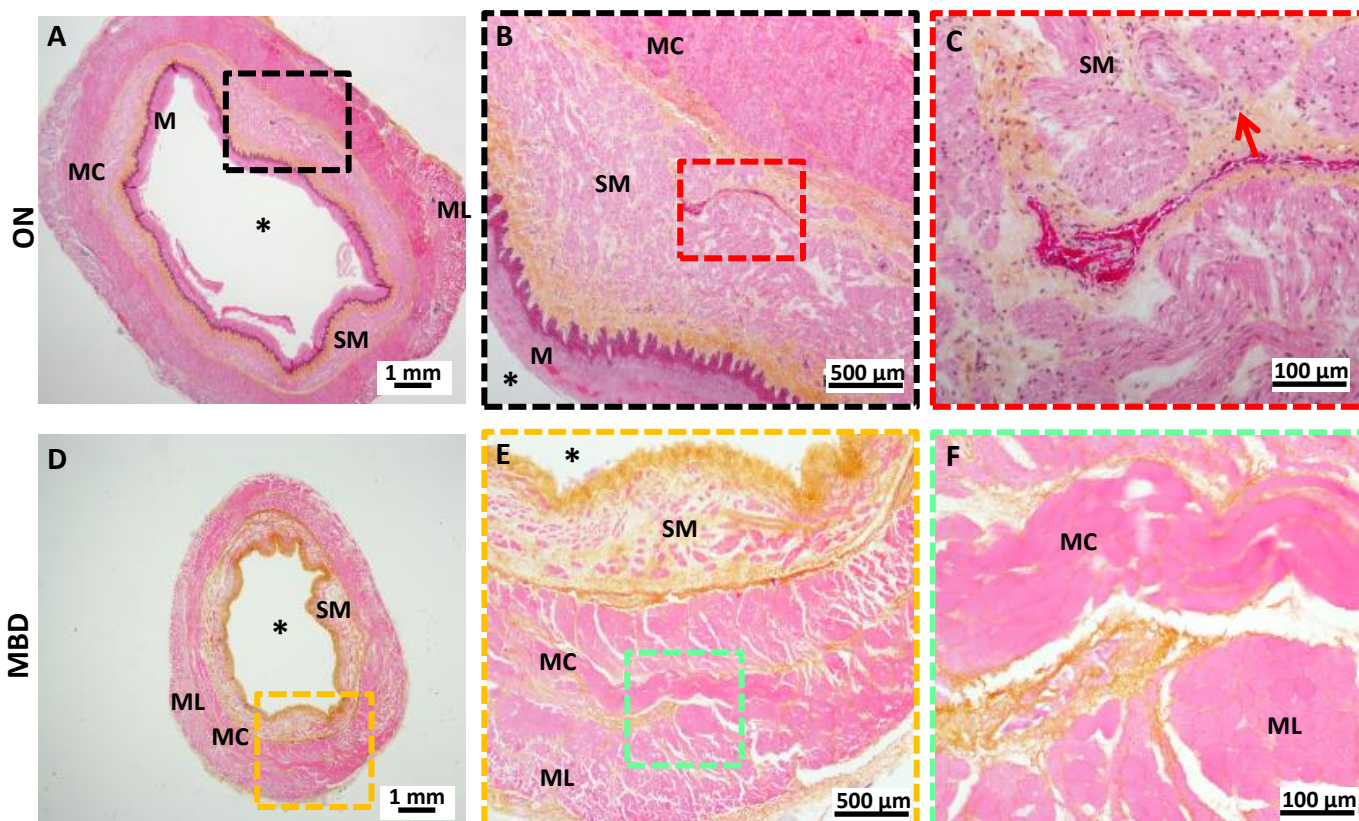


Figure 13 - Coloration à l'HES d'un ON et d'une MBD.

A-C : Observations histologiques d'un ON. Mise en évidence des noyaux cellulaires (flèche rouge) (A : Grossissement x1 ; B : Grossissement x10 ; C : Grossissement x20). D-F : Observations histologiques d'une MBD. Mise en évidence de la conservation de la cohésion et de l'intégrité tissulaire après décellularisation et absence de noyaux cellulaires (D : Grossissement x1 ; E : Grossissement x10 ; F : Grossissement x20).

1.2 Quantification et caractérisation de l'ADN résiduel

La quantification de l'ADN résiduel était réalisée sur des échantillons de MBD (n=3). La mesure était réalisée en triplicata pour une MBD donnée. La concentration d'ADN obtenue pour chaque échantillon était inférieure à 2 ng/ μL de solution d'intérêt. Ce seuil de 2 ng/ μL correspondait à la limite minimum mesurable par l'équipement. En effet, pour une solution d'intérêt de 200 μL préparée à partir d'une quantité de 10 mg d'échantillon, on obtenait une quantité totale d'ADN résiduel inférieure à 40 ng/ mg de tissu sec.

Luc *et al.* avaient évalué la concentration moyenne d'ADN résiduel pour un ON à 1630 ng/ mg de tissu sec.¹⁶ (Fig. 14A)

La longueur des fragments d'ADN résiduels était mesurée par électrophorèse sur gel d'agarose. La migration des solutions d'extraction de l'ADN issu des MBD objectivait des fragments résiduels inférieurs à 50 pb.

Luc *et al.* avaient évalué la longueur des fragments d'ADN résiduel à 20 000 paires de bases.¹⁶ (Fig. 14B)

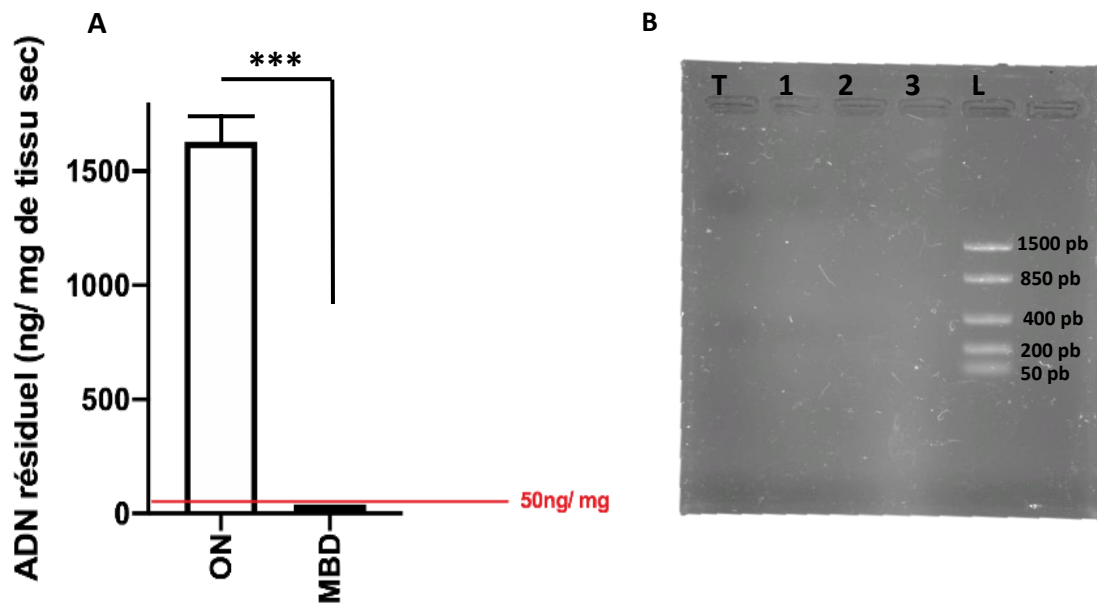


Figure 14 – Quantification de l'ADN résiduel des MBD et évaluation de la longueur des fragments résiduels par migration sur gel d'agarose.

A : Quantification de l'ADN résiduel des échantillons ON et MBDa. B : Evaluation de la longueur des fragments de l'ADN résiduel des MBDa par électrophorèse sur gel d'agarose (puits T : buffer AE, puits 1 : MBDa1, puits 2 : MBDa2, puits 3 : MBDa3, puits L : échelle de longueur de pb).

La quantité résiduelle d'ADN est inférieure aux seuils décrits par Crapo *et al.*, attestant de l'efficacité du processus de décellularisation.⁶⁹

2. Analyse des MBD par imagerie MEB

Les analyses des coupes transversales des MBD suggéraient la présence de structures fibrillaires enchevêtrées, assimilables au contenu collagénique décrit dans les MEC. La structure du collagène proposait une texture dense ou lâche selon les zones observées. Des microcavités étaient présentes, ce qui permettait de confirmer l'hypothèse selon laquelle la MEC était poreuse en surface. (Fig. 15C, flèche rouge, Fig. 15D, flèche jaune)

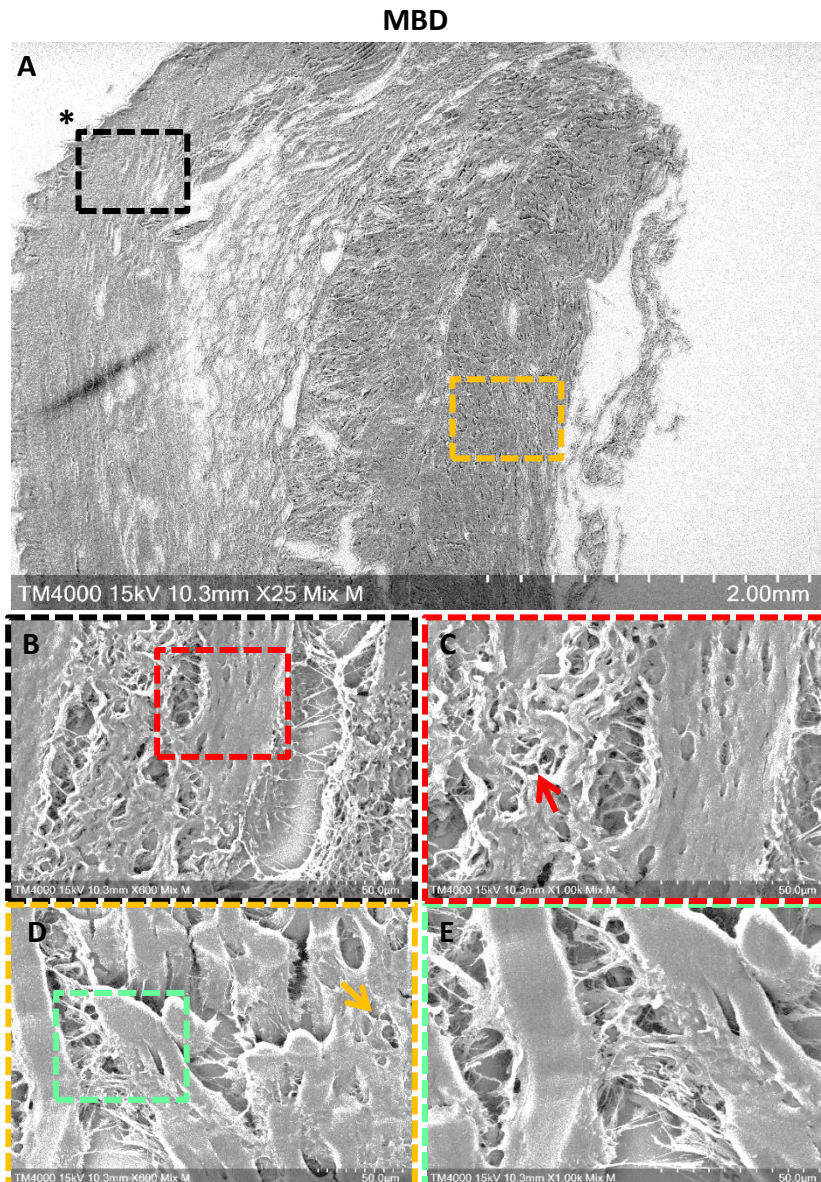


Figure 15 – Observations au MEB d’une coupe transversale de MBD.
 A : Grossissement x25, B et D : Grossissement x600, C et E : Grossissement x1000.

L’exposition de la MBD était mise en évidence afin d’orienter la sous muqueuse et la musculuse. La texture de la MEC était différente selon les couches histologiques. Le collagène semblait dense et cohésif au niveau de la sous-muqueuse (Fig. 15B), alors que la musculuse objectivait la présence de filaments protéiques isolés enchevêtrés (Fig 15D).

3. Validation de la décontamination

Les résultats avaient permis d’identifier la qualité du microbiote des échantillons d’ON (n=2). Les analyses étaient réalisées en triplicata pour chacun des échantillons. Différentes bactéries étaient observées selon les prélèvements d’ON.

La qualité microbiologique de l'ON(a) décrit la présence de bactéries telles que la *Paeniglutamicibacter gangotriensis*, une bactérie Gram positive (+). D'après les CMI et selon la Société Française de Microbiologie (SFM), cette bactérie est sensible à la vancomycine (0.06 mg/ L). Les valeurs de la CMI de la gentamycine à la *Paeniglutamicibacter gangotriensis* obtenues étaient de 0,5 mg/ L, la bactérie semble y être sensible mais résistante à la clindamycine pour laquelle la valeur de la CMI obtenue est de 256 mg/ L. La *Citrobacter sedlakii* est une bactérie à Gram négative (-), résistante à la vancomycine selon la CMI (512 mg/ L), ainsi qu'à la clindamycine (256 mg/ L). Les bactéries Gram- sont, pour la plupart, résistantes à la vancomycine ainsi qu'à la clindamycine. Les CMI objectivent des valeurs de 1mg/ L concernant la gentamycine. Le seuil de résistance décrit par la SFM pour la *Citrobacter sedlakii* à la gentamycine étant de 8 mg/ L, la bactérie y est donc sensible. *Filifactor villosus* (ou *Clostridium villosum*), est une bactérie Gram- présente parmi les micro-organismes contaminants l'ON(a). (Fig. 16) Les analyses objectivaient des valeurs de CMI de 0.06 mg/ L pour la vancomycine, de 0,5 mg/ L pour la gentamycine et de 256 mg/ L pour la clindamycine vis-à-vis de la *Filifactor villosus*. Cette bactérie semble être sensible à la vancomycine ainsi qu'à la gentamycine, mais résistante à la clindamycine. L'*Acinetobacter junii* est une bactérie Gram- résistante à la vancomycine (512 mg/ L) ainsi qu'à la clindamycine (512 mg/ L). Elle est néanmoins sensible à la gentamycine (4 mg/ L) pour laquelle le seuil de résistance déterminé par la SFM est supérieur à 4 mg/ L.

La qualité microbiologique de l'ON(b) décrit la présence de bactéries telles que la *Klebsiella aerogenes* et *Klebsiella oxytoca*, des bactéries Gram-, résistantes à la vancomycine ainsi qu'à la clindamycine avec des valeurs de CMI de 512 mg/ L pour les 2 antibiotiques. Les valeurs obtenues pour la CMI de la gentamycine concernant *K. aerogenes* est de 1 mg/ L et de 16 mg/ L pour *K. oxytoca*. Ces propriétés semblent conférer une sensibilité de *K. aerogenes* vis-à-vis de l'antibiotique et une résistance de *K. oxytoca*. Le *Proteus penneri* est une bactérie Gram- et présente donc une résistance à la vancomycine ainsi qu'à la clindamycine selon les valeurs obtenues de la CMI (512 mg/ L pour les 2 antibiotiques). Le profil bactérien de *Proteus penneri* est similaire à *Klebsiella aerogenes*, avec une sensibilité pour la gentamycine selon la CMI qui objectivait une valeur de 2 mg/ L. *Proteus mirabilis*, bactérie Gram-, est résistante pour la vancomycine et la clindamycine avec une CMI de 512 mg/ L et 128 mg/ L, respectivement et

semble également être résistante à la gentamycine selon les valeurs obtenues pour la CMI (16 mg/ L). *Falsarthrobacter nasiphocae* est une bactérie Gram+ présente parmi les micro-organismes contaminants l'ON(b). Une sensibilité à la vancomycine (0,06 mg/ L) ainsi qu'à la gentamycine (0,5 mg/ L) semble être associée à la bactérie, alors que la CMI décrit une résistance de *Falsarthrobacter nasiphocae* à la clindamycine avec une valeur obtenue de 128 mg/ L. Le *Proteus penneri* (Gram-) est retrouvé une seconde fois pour le même échantillon ON(b) avec une résistance à la vancomycine ainsi qu'à la clindamycine selon les mêmes valeurs CMI (512 mg/ L pour les 2 antibiotiques) et semble cependant être résistante à la gentamycine selon les valeurs obtenues pour la CMI (16 mg/ L). (Fig. 16)

Les espèces bactériennes présentes dans les prélèvements d'ON ne sont pas connues pour libérer des endotoxines. Aussi, une absence de mycoplasme était observée.

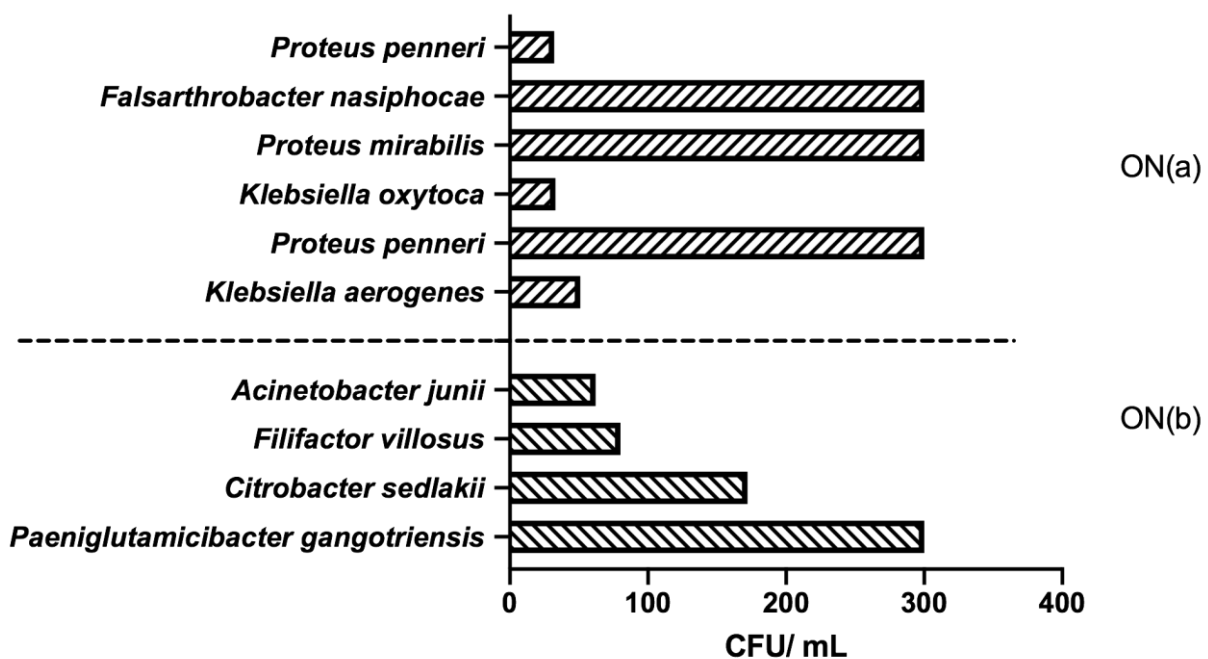


Figure 16 – Analyse de la qualité du microbiote des ON(a) et ON(b). Identification et quantification de la charge bactérienne.

Les MBD (n=3) analysées sont exemptes de micro-organisme contaminant, cela était traduit par l'absence de croissance microbienne visible dans les géloses de dénombrement de contaminants. L'absence d'endotoxine et de mycoplasme était également remarquée. Ces

résultats confirment que le protocole de décontamination est efficace afin d'obtenir une MBD stérile.

4. Contenu protéique de la MBD

4.1 Analyses IHC et histologiques des MBD

Le collagène-1

Le collagène-1 était mis en évidence au niveau de la muqueuse, de la sous-muqueuse et de la musculuse de l'ON et de la MBD. Les analyses IHC objectivaient une diminution de la présence en collagène-1 dans la MBD (Fig. 17C, 17F). Il s'agit d'une protéine structurale et composante majeure de la MEC qui fournit un soutien mécanique et une résistance en fonction des forces de tractions et de compressions subies par les tissus biologiques.

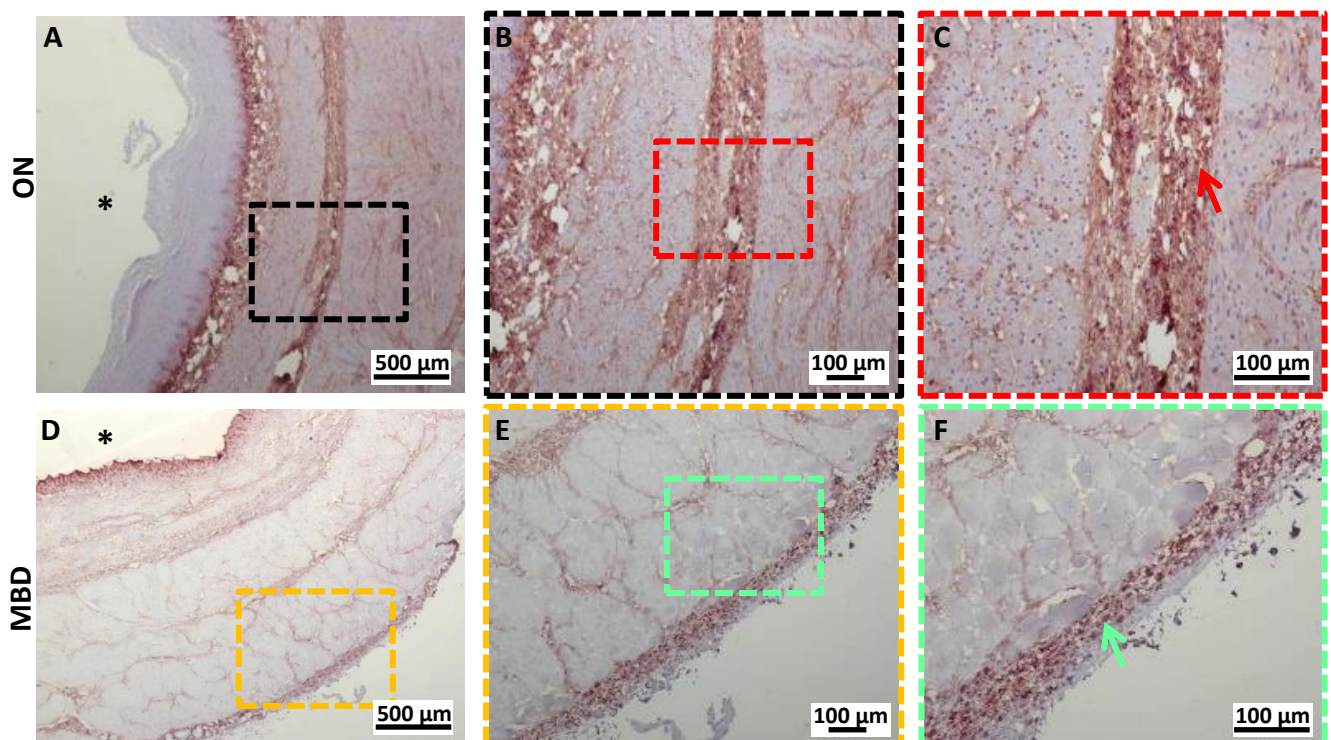


Figure 17 - Phénotypage du contenu protéique de l'ON et de la MBD par IHC.

A-C : Marquage anti-collagène-1 de l'ON (flèche rouge) (A : Grossissement x4 ; B : Grossissement x10 ; C : Grossissement x20). D-F : Marquage anti-collagène-1 de la MBD (flèche verte) (D : Grossissement x4 ; E : Grossissement x10 ; F : Grossissement x20).

Le collagène est formé d'un réseau tridimensionnel de fibrilles; c'est le collagène de type I qui s'assemble en fibrilles, afin d'assurer la structure de base des tissus conjonctifs. Aussi, le

collagène fournit-il un environnement pour l'adhésion cellulaire, favorisant la communication et l'interaction entre les cellules et leur environnement extracellulaire.¹⁵⁴

L'actine

L'actine était répartie de façon abondante et cohésive au niveau des différentes couches histologiques des ON et des MBD, de façon similaire (Fig. 18C, 18F). L'actine est une protéine essentielle du cytosquelette cellulaire, réseau dynamique de protéines qui permet aux cellules de se déplacer et de répondre aux signaux environnementaux. Il existe des protéines qui, liées à l'actine, peuvent influencer la MEC de façon à faciliter la migration cellulaire ainsi que la formation de jonctions cellulaires ayant des répercussions sur l'environnement extracellulaire. L'actine est donc principalement associée au cytosquelette intracellulaire et aux processus cellulaires internes tels que la motilité, la forme cellulaire et la transmission de signaux.¹⁵⁵

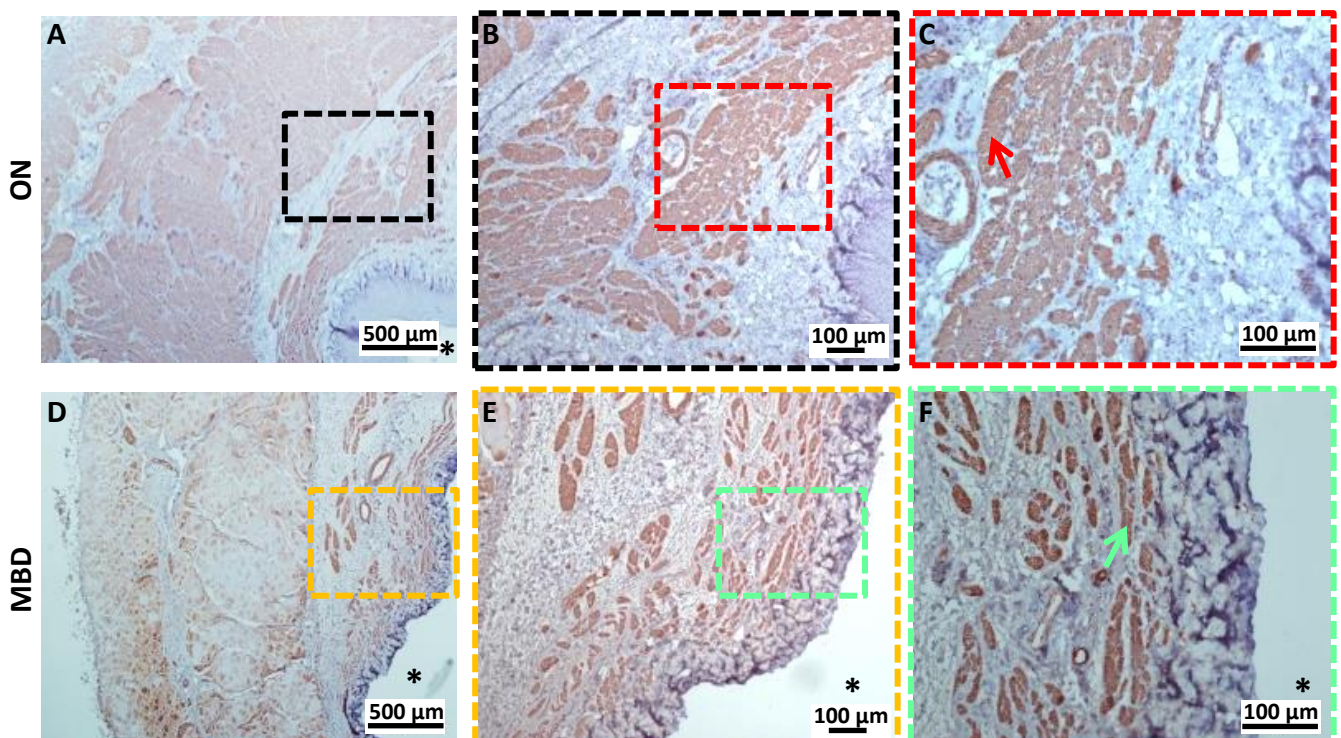


Figure 18 - Phénotypage du contenu protéique de l'ON et de la MBD par IHC.

A-C : Marquage anti-actine de l'ON (flèche rouge) (A : Grossissement x4 ; B : Grossissement x10 ; C : Grossissement x20). D-F : Marquage anti-actine de la MBD (flèche verte) (D : Grossissement x4 ; E : Grossissement x10 ; F : Grossissement x20).

La vimentine

La vimentine était observée au niveau des couches histologiques de la sous-muqueuse et la musculuse de l'ON et de la MBD (Fig. 19C, 19F). Les analyses IHC objectivaient une diminution de la densité de vimentine dans la MBD. La vimentine est une protéine du cytosquelette appartenant à la famille des filaments intermédiaires, composants importants du réseau de soutien cellulaire. Associée à d'autres protéines du cytosquelette, la vimentine permet de maintenir la forme, la structure et la résistance mécanique des cellules.¹⁵⁶ Elle reste présente dans la MEC de la MBD car certaines protéines, y compris la vimentine, persistent dans les MBD du fait de leur résistance aux traitements de décellularisation.¹²⁷

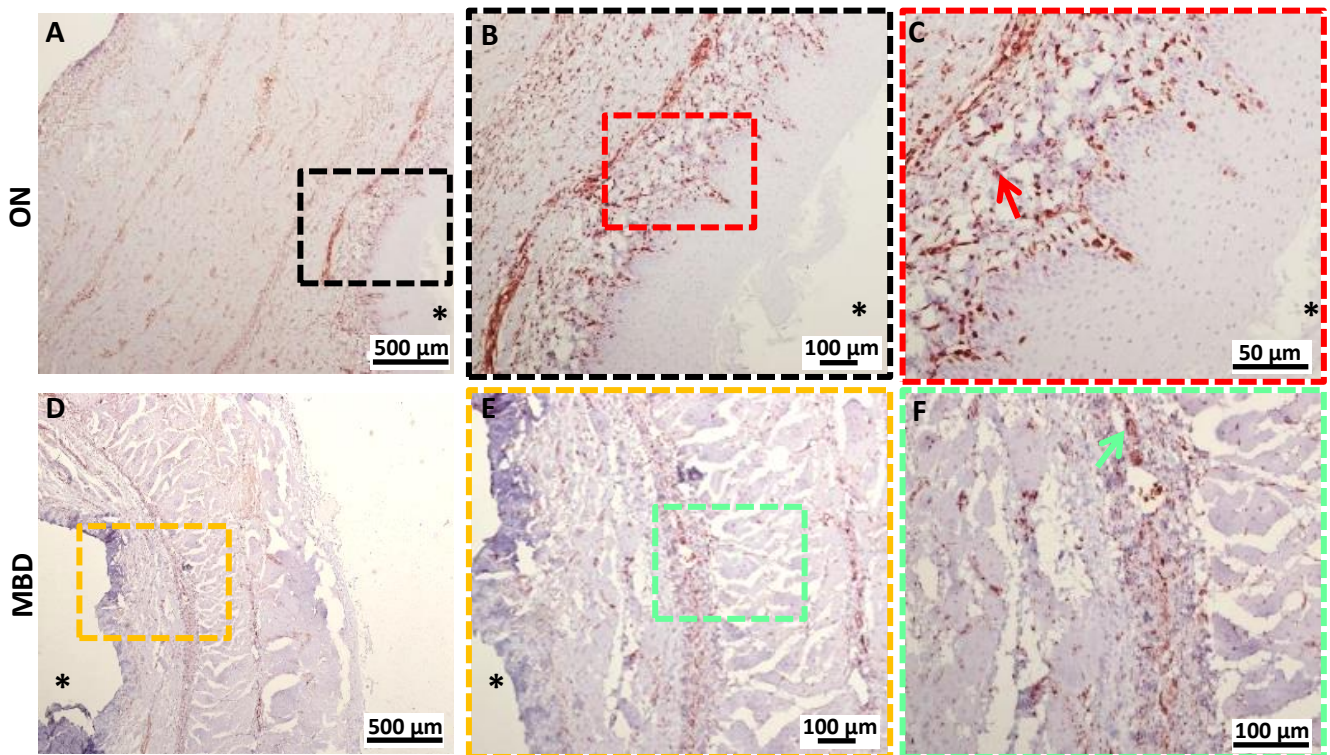


Figure 19 - Phénotypage du contenu protéique de l'ON et de la MBD par IHC.

A-C : Marquage anti-vimentine de l'ON (flèche rouge). (A : Grossissement x4 ; B : Grossissement x10 ; C : Grossissement x20). D-F : Marquage anti-vimentine de la MBD (flèche verte). (D : Grossissement x4; E : Grossissement x10 ; F : Grossissement x20).

L'élastine

L'élastine était observée au niveau des couches histologiques de la sous-muqueuse et la musculuse de l'ON et de la MBD. Les analyses IHC objectivaient une quantité de la protéine plus importante au niveau de la musculuse des tissus d'ON et de MBD, et diminution de la

densité de l'élastine dans la MBD (Fig. 20C, Fig. 20F). L'élastine est une protéine structurale de la MEC qui confère aux tissus la capacité de s'étirer et de retrouver leur forme initiale après avoir été soumis à une déformation. Cette protéine joue un rôle crucial dans la préservation de l'architecture des tissus d'origine.¹⁵⁷

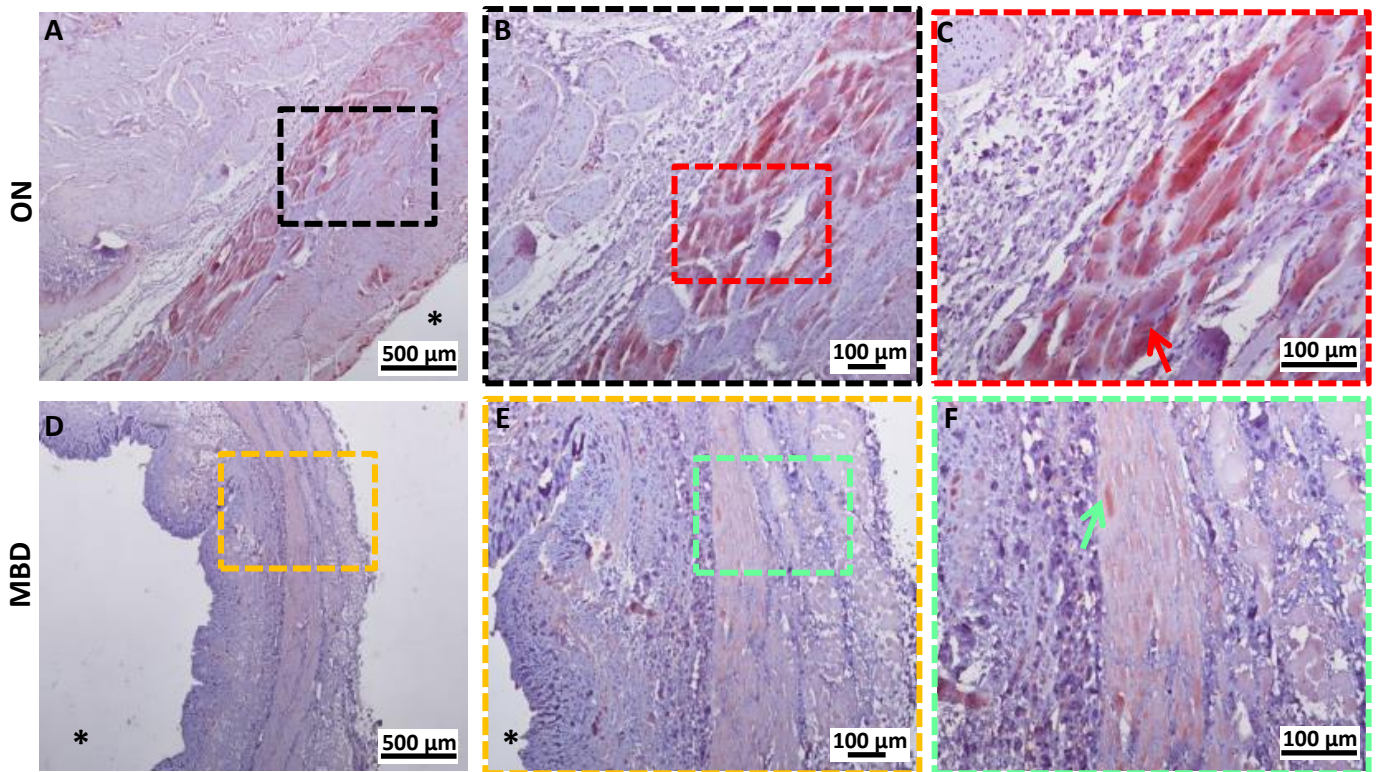


Figure 20 - Phénotypage du contenu protéique de l'ON et de la MBD par IHC.

A-C : Marquage anti-élastine de l'ON (flèche rouge) (A : Grossissement x4 ; B : Grossissement x10 ; C : Grossissement x20). D-F : Marquage anti-élastine de la MBD (flèche verte) (D : Grossissement x4 ; E : Grossissement x10 ; F : Grossissement x20).

La fibronectine

La fibronectine était répartie de façon abondante et conforme au niveau des différentes couches histologiques des ON et des MBD, de façon similaire (Fig. 21C, Fig. 21F). La fibronectine est une glycoprotéine multifonctionnelle, composée de plusieurs domaines distincts. Elle peut s'organiser de façon à obtenir une structure tridimensionnelle au sein de la MEC afin de se lier au collagène et à l'élastine, pour former un réseau structuré. La

fibronectine agit comme un échafaudage pour guider la migration des cellules, leur prolifération, ainsi que leur différenciation, nécessaires à la réparation des tissus.¹⁵⁸

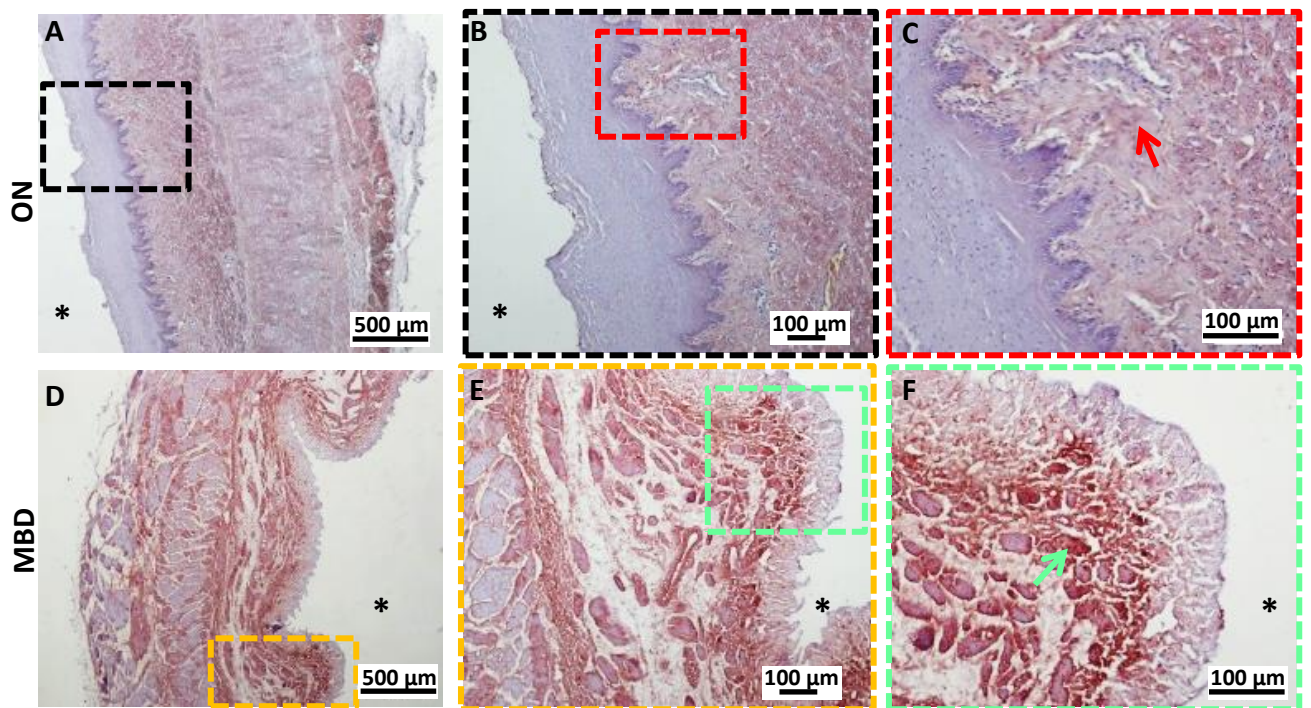


Figure 21 - Phénotypage du contenu protéique de l'ON et de la MBD par IHC.

A-C : Marquage anti-fibronectine de l'ON (flèche rouge) (A : Grossissement x4 ; B : Grossissement x10 ; C : Grossissement x20). D-F : Marquage anti-fibronectine de la MBD (flèche verte) (D : Grossissement x4 ; E : Grossissement x10 ; F : Grossissement x20).

Les différentes protéines de la MEC telles que le collagène-1, l'actine, la vimentine, l'élastine, et la fibronectine étaient observées selon des analyses IHC réalisées sur les échantillons d'ON.

Les protéines structurales comme le collagène-1, l'élastine et la fibronectine, ainsi que l'actine, et la vimentine étaient conservées bien que parfois diminuées après la décellularisation. Les protéines étaient distribuées de façon conforme dans les différentes couches histologiques.

4.2 Analyse du protéome en spectrométrie

Le collagène

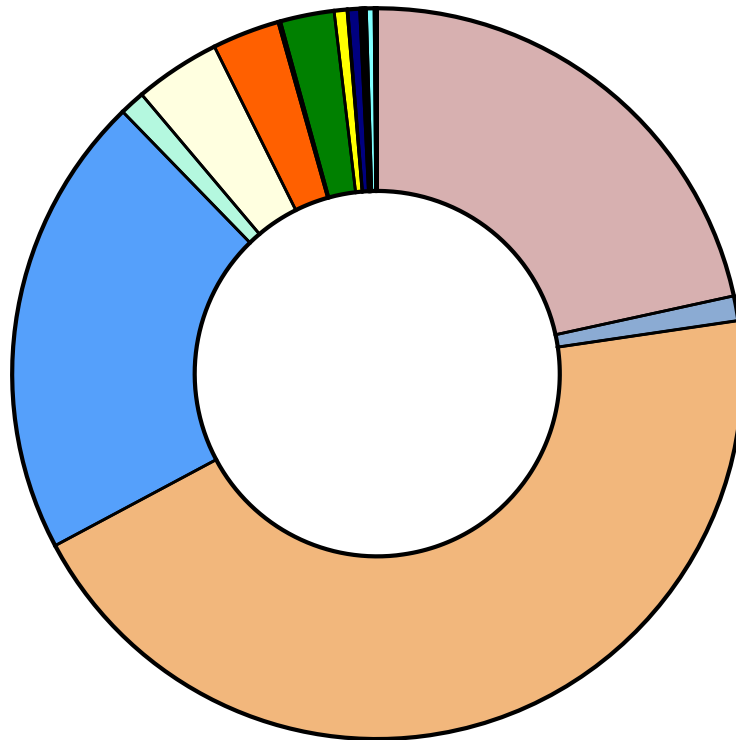
Les collagènes majoritairement décrits dans la MEC des MBD (n=3) étaient les collagènes fibrillaires α -1 et α -2 de type I (respectivement COL1A1 et COL1A2) et les collagènes fibrillaires α -1 de type III (COL3A1). (Fig. 22)

Plus de 90% des collagènes évoqués dans la littérature appartiennent au collagène de type I, parmi les 28 collagènes décrits chez l'Homme. (Tableau 3) Le collagène de type I est le composant principal des organes et des tissus conjonctifs, il appartient à la classification des collagènes fibrillaires. Le collagène de type I est majoritairement retrouvé au niveau du derme, des os, des tendons et des ligaments. Le collagène de type III est localisé dans la peau, les vaisseaux sanguins et l'intestin.¹⁵⁹

L'abondance peptidique moyenne du COL1A1 présent dans les MBD (n=3) était de $7\,891\,874\,441 \pm 2\,967\,672\,961$ (soit 21,58% du contenu collagénique total), alors qu'elle était de $15\,197\,956\,657 \pm 4\,389\,004\,548$ pour le COL1A2 (soit 44,51%), et de $7\,183\,414\,267 \pm 2\,385\,866\,571$ pour le COL3A1 (soit 20,52%).

Les collagènes également représentés dans la MEC œsophagienne étaient des collagènes fibrillaires (de type 2, de type 5 et 24), des collagènes formant les réseaux (de type 4, de type 6 et 8), des collagènes d'ancrage (de type 7), des collagènes associés aux fibrilles avec triple hélice interrompue (FACIT, de type 12, de type 14 et 21), des collagènes multiplexines (de type 15 et 18) et des collagènes associés aux membranes avec triple hélice interrompue (MACIT, de type 17).

Collagène



21.58% COL1A1	0.06% COL4A1
1.09% COL6A3	0.02% COL4A5
0,01% COL6A3	0.06% COL4A6
0.01% COL6A3	0.03% COL2A1
44.51% COL1A2	0.02% COL18A1
20.52% COL3A1	0.05% COL15A1
1.12% COL14A1	0.34% COL5A3
3.80% COL6A1	0,01% COL6A5
2.97% COL6A2	0.03% COL21A1
0.12% COL12A1	0,01% COL17A1
2.38% COL5A2	0.01% COLGALT1
0.57% COL4A2	0.04% COL4A3
0.04% COL7A1	0.04% COL8A1
0.52% COL5A1	0,01% COL4A4
0.05% COL6A6	0.01% COL24A1

Figure 22 - Analyse protéomique du contenu collagénique de la MBD (n=3) par LC-MS/MS.

Type	Class	Composition	Distribution ^b	Type	Class	Composition	Distribution ^b
I	Fibrillar	$\alpha 1 [I]_2 \alpha 2 [I]_1$	Abundant and widespread: dermis, bone, tendon, ligament	X	Network	$\alpha 1 [X]_3$	Cartilage
				XI	Fibrillar	$\alpha 1 [XI] \alpha 2 [XI] \alpha 3 [XI]$	Cartilage, intervertebral disc
II	Fibrillar	$\alpha 1 [II]_3$	Cartilage, vitreous	XII	FACT	$\alpha 1 [XII]_3$	Dermis, tendon
III	Fibrillar	$\alpha 1 [III]_3$	Skin, blood vessels, intestine	XIII	MACT	—	Endothelial cells, dermis, eye, heart
IV	Network	$\alpha 1 [IV]_2 \alpha 2 [IV] \alpha 3 [IV] \alpha 4 [IV] \alpha 5 [IV] \alpha 5 [IV]_2 \alpha 6 [IV]$	Basement membranes	XIV	FACT	$\alpha 1 [XIV]_3$	Widespread: bone dermis, cartilage
V	Fibrillar	$\alpha 1 [V]_3$ $\alpha 1 [V]_2 \alpha 2 [V]$ $\alpha 1 [V] \alpha 2 [V] \alpha 3 [V]$	Widespread: bone dermis, cornea, placenta	XV	MULTIPLEXIN	—	Widespread: bone dermis, cartilage
VI	Network	$\alpha 1 [VI] \alpha 2 [VI] \alpha 3 [VI]^d$ $\alpha 1 [VI] \alpha 2 [VI] \alpha 4 [VI]$	Widespread: bone, cartilage, cornea, dermis	XVI	FACT	—	Capillaries, testis kidney, heart,
VII	Anchoring fibrils	$\alpha 1 [VII]_2 \alpha 2 [VII]$	Dermis, bladder	XVII	MACT	$\alpha 1 [XVII]_3$	Dermis, kidney
VIII	Network	$\alpha 1 [VIII]_3$ $\alpha 2 [VIII]_3$ $\alpha 1 [VIII]_2 \alpha 2 [VIII]$	Widespread: dermis, brain, heart, kidney	XVIII	MULTIPLEXIN	—	Hemidesmosomes in epithelia
IX	FACT ^e	$\alpha 1 [IX] \alpha 2 [IX] \alpha 3 [IX]$	Cartilage, cornea, vitreous	XIX	FACT	—	Dermis, kidney
				XX	FACT	—	Dermis, kidney
				XXI	FACT	—	Dermis, kidney
				XXII	FACT	—	Dermis, kidney
				XXIII	MACT	—	Dermis, kidney
				XXIV	Fibrillar	—	Dermis, kidney
				XXV	MACT	—	Dermis, kidney
				XXVI	FACT	—	Dermis, kidney
				XXVII	Fibrillar	—	Dermis, kidney
				XXVIII ^f	—	—	Dermis, kidney

Tableau 3 - Classification des 28 types de collagènes présents chez l'Homme.¹⁵⁹

L'actine

L'actine est la principale protéine du cytosquelette. Elle apporte un soutien mécanique aux cellules, tout en contribuant au maintien de sa structure, ou à sa déformation. L'actine permet également aux cellules de migrer et de se diviser lors des processus de mitoses.¹⁵⁵

4 sous-unités d'actines étaient présentes dans la MBD œsophagienne (n=3) (Tableau 4). L'actine γ -1 était la sous-unité majoritairement abondante, elle était représentée à 93% parmi les protéines d'actines totales décrites. La sous-unité γ -2 était exprimée à 5%, alors que les sous-unités α -2 et β -like-2 étaient très faiblement représentées (respectivement 1% des protéines totales d'actines présentes).

	Abondance (moyenne \pm écart type)	
Actine γ -2	34 993 266 \pm 4 948 076	5%
Actine α -2	7 308 942 \pm 2 340 655	1%
Actine γ -1	590 829 863 \pm 260 546 455	93%
Actine β -like-2	1 396 223 \pm 1 658 423	1%

Tableau 4 - Abondance peptidique des actines de la MEC œsophagienne (n=3).

L'élastine

Avec le collagène, l'élastine appartient aux principaux composants de la MEC. L'élastine assure l'élasticité et la résistance des tissus leur permettant de se déformer de manière réversible.¹⁶⁰

Parmi les protéines d'élastines décrites dans les MBD (n=3), l'abondance peptidique des élastines était de 12 365 770 \pm 4 231 640, soit 89% de l'abondance peptidique totale. 11% des peptides décrits appartenaient aux élastines d'interfaces microfibrillaires, ils étaient estimés à 1 500 037 \pm 469 844.

La fibronectine

La fibronectine est l'une des deux glycoprotéines prédominantes retrouvée dans la MEC, avec la laminine. L'affinité de la fibronectine avec les différents composants de la MEC permet d'induire des comportements cellulaires spécifiques nécessaires au développement de la cellules.¹⁵⁸

L'abondance peptidique moyenne de la fibronectine présente dans les MBD œsophagiennes (n=3) était de $26\,336\,474 \pm 8\,052\,636$.

La laminine

La laminine est la seconde glycoprotéine prédominante de la MEC. Elle est nécessaire à la formation des membranes basales.¹⁶¹

Parmi les protéines de laminines décrites dans les MBD (n=3), l'abondance peptidique de la sous-unité α -4 des laminines était majoritairement représentée. Elle était estimée à $69\,003\,499 \pm 14\,871\,353$, soit 88% de l'abondance peptidique totale. 12% des peptides de laminines décrits appartenaient à la sous-unité β -3, qui correspondaient à une quantité de peptides estimée à $9\,395\,363 \pm 1\,042\,984$.

La conservation de la complexité biologique de la MBD et des interactions entre les différents composants de la MEC favorisent l'utilisation de cette dernière en qualité de PIT.

La corrélation entre les analyses IHC et les analyses de spectrométrie de masse confirme la complexité biologique d'une MBD et son contenu protéique. D'une part, l'IHC démontrait une caractérisation spatiale des marqueurs alors que la spectrométrie de masse offrait une approche plus précise, permettant une identification exhaustive des protéines présentes dans la MBD.

5. Analyse de la cytotoxicité de la MBD par contact direct

Le test de cytotoxicité par contact direct au RN (n=3, en triplicata) était réalisé selon la norme ISO 10993-5. La viabilité cellulaire était exprimée en pourcentage, selon la moyenne et l'écart type pour chaque MBD.

La valeur moyenne de la viabilité cellulaire obtenue pour le témoin négatif (Thermanox, PTFE) était de $92,67 \% \pm 3,5 \%$ (Fig. 23A). Les résultats de viabilité cellulaire étaient exprimés en pourcentage par rapport au témoin négatif, et devaient être supérieurs à une viabilité cellulaire de 70%. (Fig. 23B)

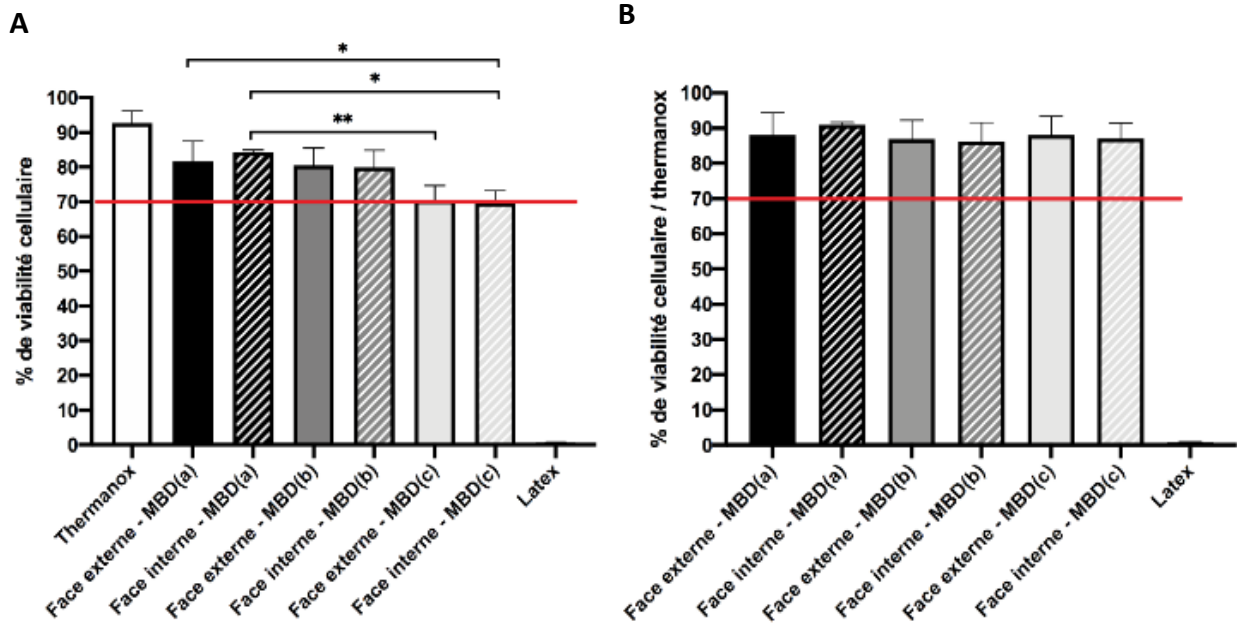


Figure 23 – Analyse de la cytotoxicité des faces externe et interne de la MBD (n=3) selon la norme ISO 10993-5.

Le seuil de viabilité est représenté à 70% selon A : le pourcentage de viabilité cellulaire, et B : le pourcentage de viabilité cellulaire par rapport au témoin négatif (la thermanox).

La cytocompatibilité de la MBD n'a pas pu être vérifiée pour tous les échantillons, car les résultats obtenus n'étaient pas reproductibles.

6. Description des propriétés mécaniques de la MBD

6.1 Etudes de tractions longitudinale et circonférentielle

De par sa fonction, l'œsophage subit des déformations, et principalement dans l'axe circonférentiel. Les tissus œsophagiens doivent être suffisamment élastiques pour permettre la déglutition et le passage des aliments, tout en revenant à leur état initial. La résistance à la traction mesure la force maximale qu'un tissu œsophagien peut supporter avant de se rompre. Cette résistance a été évaluée pour la MBD afin de valider son utilisation en tant que substitut œsophagien implantable.

Les études menées ont permis d'évaluer les déformations longitudinales (n=15) et circonférentielles (n=15) des ON et des MBD. Les valeurs moyennes de la Max_Force enregistrées pour les ON étaient respectivement de $17,25 \text{ N} \pm 7,09 \text{ N}$ et de $7,27 \text{ N} \pm 3,02 \text{ N}$ dans les axes longitudinaux et circonférentiels. Les valeurs obtenues pour les ON étudiés dans

l'axe longitudinal étaient significativement plus élevées ($p < 0,0001$) par rapport à l'axe circonférentiel (Fig. 24A). Concernant les MBD, les valeurs moyennes de la Max_Force observées étaient respectivement de $34,16 \text{ N} \pm 9,60 \text{ N}$ et de $11,76 \text{ N} \pm 2,86 \text{ N}$ selon les directions longitudinales et circonférentielles. Les valeurs obtenues pour les MBD étudiés dans l'axe longitudinal étaient significativement plus élevées ($p < 0,0001$) par rapport à l'axe circonférentiel (Fig. 24D). Une meilleure résistance à la traction était notable selon l'axe longitudinal par rapport à l'axe circonférentiel pour les ON et MBD. Les valeurs obtenues étaient significativement plus élevées pour les MBD selon les directions longitudinale ($p < 0,0001$) et circonférentielle ($p < 0,0003$), comparées aux ON (Fig. 25A, Fig. 25D).

Les MBD disposaient d'une résistance à la traction plus élevée que les ON dans les 2 axes.

Les moyennes des pourcentages des déformations maximales observées chez les ON étaient de $71,26 \text{ mm} \pm 30,37 \text{ mm}$ et $98,49 \text{ mm} \pm 32,90 \text{ mm}$ selon les directions longitudinales et circonférentielles, respectivement. Les valeurs obtenues pour les ON étudiés dans l'axe circonférentiel étaient significativement plus élevées ($p < 0,03$) (Fig. 24B). Concernant les MBD, les moyennes des déformations maximales observées étaient respectivement de $37,19 \text{ mm} \pm 8,73 \text{ mm}$ et $68,90 \text{ mm} \pm 19,41 \text{ mm}$ selon les directions longitudinales et circonférentielles. Les valeurs obtenues pour les MBD étudiées dans l'axe circonférentiel étaient significativement plus élevées ($p < 0,0001$) en comparaison à l'axe longitudinal (Fig. 24E). Les moyennes des déformations obtenues pour les ON étaient significativement plus élevées ($p < 0,006$) dans l'axe circonférentiel par rapport aux MBD (Fig. 25E).

Les valeurs moyennes des déformations enregistrées pour l'axe longitudinale étaient significativement plus élevées pour les ON ($p < 0,0007$), par rapport aux MBD. (Fig. 25B)

Les UTS enregistrées selon les directions longitudinales concernant les ON objectivaient des valeurs moyennes de $2,1 \text{ MPa} \pm 0,8 \text{ MPa}$. Les valeurs moyennes obtenues des UTS pour les axes circonférentiels étaient de $2,65 \text{ MPa} \pm 2,78 \text{ MPa}$. Ces valeurs n'étaient pas significativement différentes entre-elles ($p < 0,47$) (Fig. 24C).

Les valeurs moyennes des UTS enregistrées pour les MBD étaient de 4,53 MPa \pm 2,04 MPa et 8,22 MPa \pm 5,47 MPa dans les axes longitudinaux et circonférentiels, respectivement. Les valeurs obtenues pour les MBD étudiées dans l'axe circonférentiel étaient significativement plus élevées ($p < 0,025$), en comparaison à l'axe longitudinal (Fig. 24F).

Les valeurs obtenues étaient significativement plus élevées pour les MBD selon les directions longitudinale ($p < 0,0004$) et circonférentielle ($p < 0,002$), comparées aux ON. (Fig. 25C, Fig. 25F)

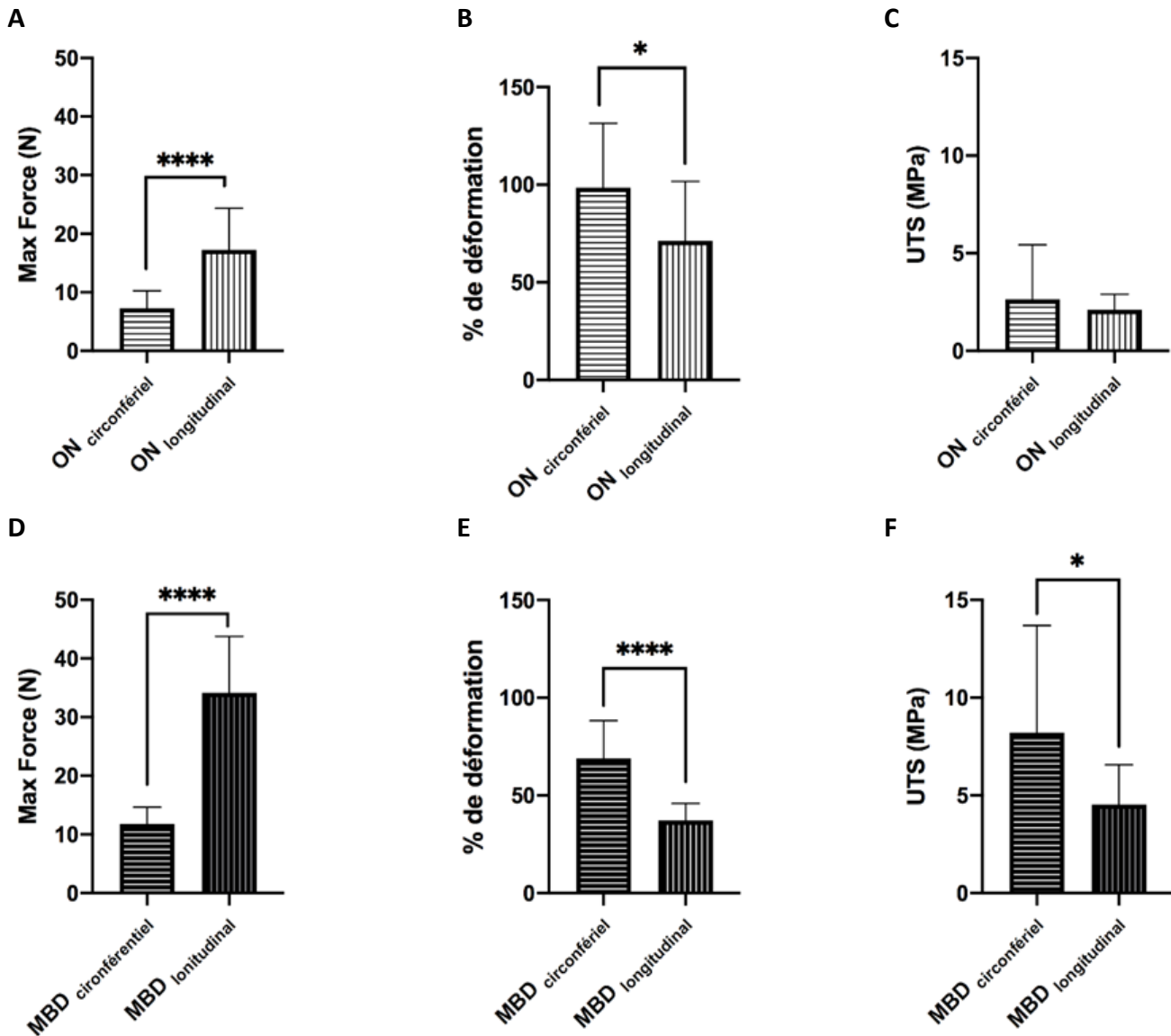


Figure 24 – Analyses des propriétés mécaniques selon un test de traction de l’ON et de la MBD dans les axes circonférentiels et longitudinaux.

A-C : Description des propriétés mécaniques des ON. A : Max_Force (N) observée avant la rupture, B : pourcentage de déformation (mm) observé avant la rupture, C : UTS (MPa) observée avant la rupture. D-E : Description des propriétés mécaniques des MBD. D : Max_Force (N) observée avant la rupture, E : pourcentage de déformation (mm) observé avant la rupture, F : UTS (MPa) observée avant la rupture.

Ces différences de déformations selon les axes longitudinaux et circonférentiels objectivaient un comportement anisotrope du tissu œsophagien. Cette caractéristique offre aux tissus la capacité de moduler leur comportement mécanique (résistance ou élasticité) en fonction de l'orientation des forces appliquées par rapport à la structure du tissu. Cette propriété peut

influencer la manière dont l'œsophage se comporte lors de la déglutition, ou de la contraction musculaire.⁹

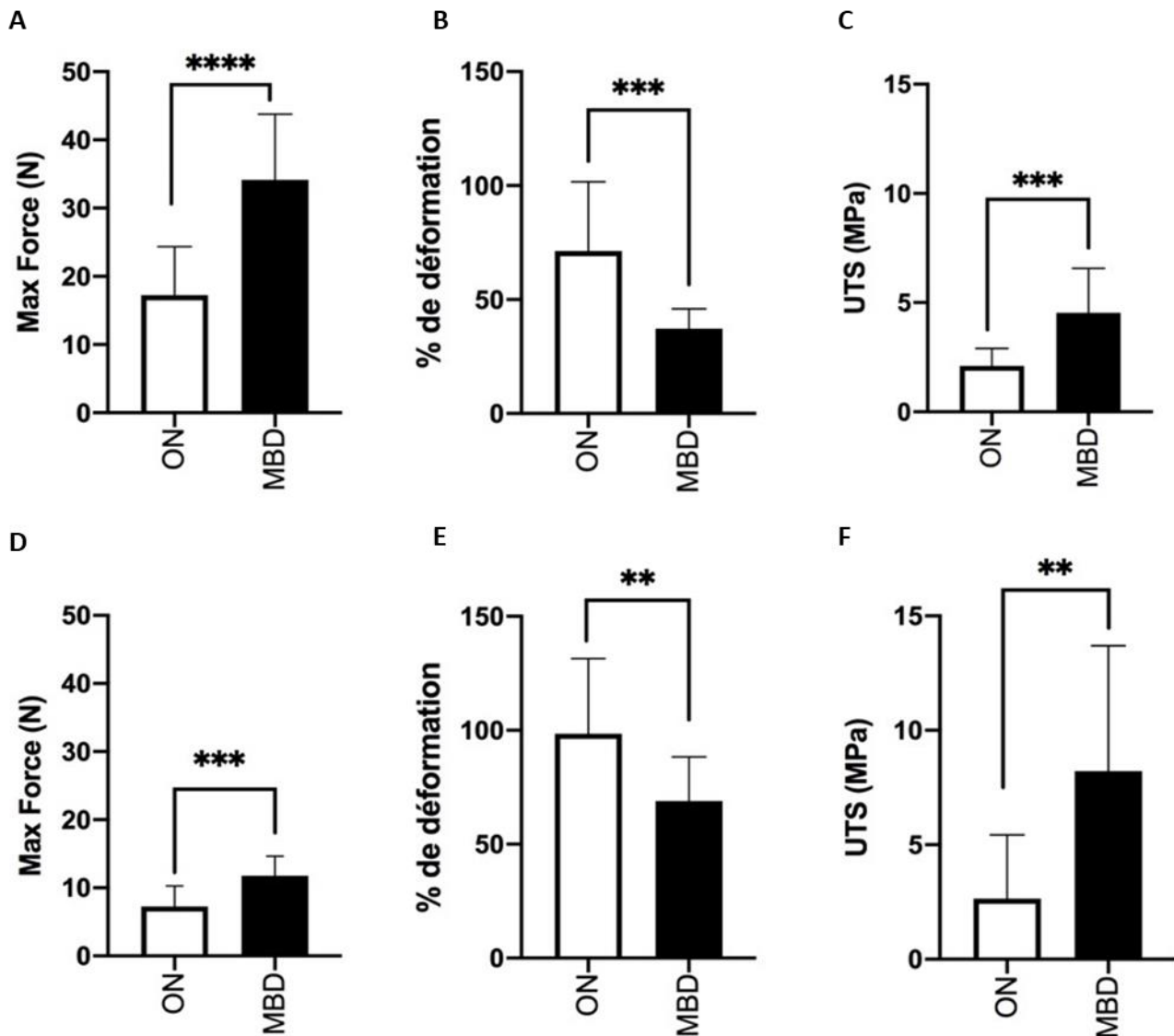


Figure 25 – Analyses des propriétés mécaniques de l'ON et de la MBD selon un test de traction. A-C : Description des propriétés mécaniques des ON et MBD dans l'axe longitudinal. A : Max_Force (N) observée avant la rupture, B : pourcentage de déformation (mm) observé avant la rupture, C : UTS (MPa) observée avant la rupture. D-E : Description des propriétés mécaniques des ON et MBD dans l'axe circonférentiel. D : Max_Force (N) observée avant la rupture, E : pourcentage de déformation (mm) observé avant la rupture, F : UTS (MPa) observée avant la rupture.

6.2 Etudes de résistance à l'éclatement

Les études menées ont permis de mesurer les valeurs moyennes de la pression endoluminale maximale des ON (n=6) et des MBD (n=6), avant la rupture de la paroi. Ces études étaient réalisables car la MBD n'était pas perméable.

Les ON supportaient une pression maximale de $1038,49 \text{ mmHg} \pm 185,77 \text{ mmHg}$ alors que la pression maximale enregistrée pour les MBD était de $830,32 \text{ mmHg} \pm 295,50 \text{ mmHg}$. La résistance à l'éclatement n'était pas significativement différente entre les échantillons d'ON et de MBD ($p < 0,18$) (Fig. 26A).

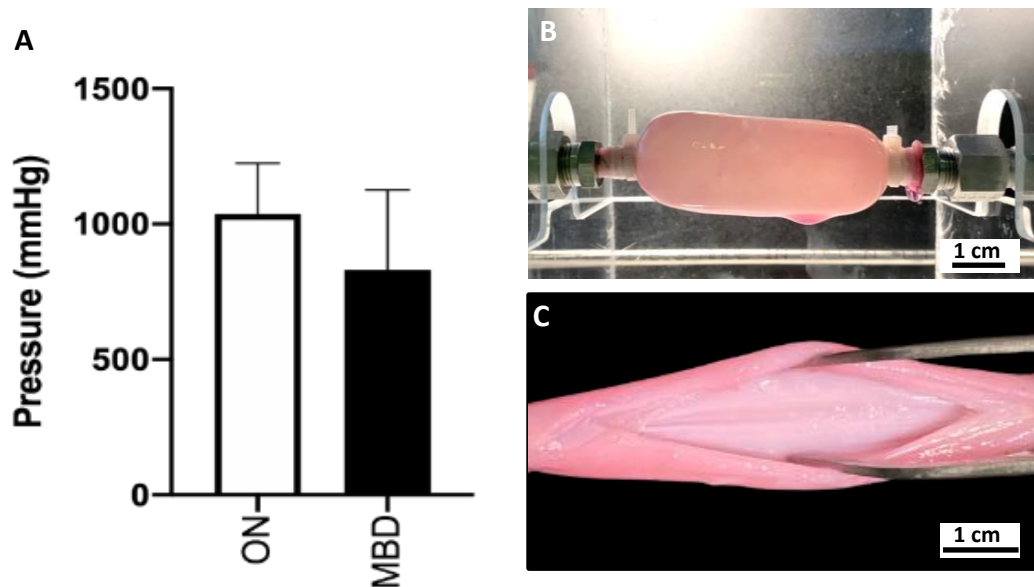


Figure 26 – Analyse des propriétés mécaniques des ON et des MBD selon un test de résistance à l'éclatement (mmHg).

A : Description des propriétés mécaniques avant la rupture selon la direction longitudinale des fibres musculaires du tissu des ON et MBD. B : Aspect macroscopique d'une MBD pendant le test d'éclatement. C : Aspect macroscopique d'une MBD après le test d'éclatement.

6.3 Etudes de résistance à la suturabilité

La MBD doit être suffisamment résistante pour permettre son utilisation en clinique. Lors de l'implantation chirurgicale, sa suture aux tissus œsophagiens au niveau des anastomoses proximale et distale affecte son intégrité. Le comportement mécanique de la MBD, après avoir été perforée par un fil de suture, est évalué en mesurant la Max_Force nécessaire avant la

rupture. Les études menées ont permis d'évaluer la résistance à la suture des ON (n=15) et des MBD (n=15).

La valeur moyenne de la Max_Force enregistrée pour les ON était de $6,90 \text{ N} \pm 1,77 \text{ N}$. Concernant les MBD, la valeur moyenne de la Max_Force mesurée était significativement différente ($p < 0,015$) avec une moyenne de $5,54 \text{ N} \pm 0,89 \text{ N}$. Une meilleure résistance à la suturabilité était notable pour les ON, par rapport aux MBD. (Fig. 27A)

Les moyennes des déformations maximales mesurées chez les ON étaient de $24,53 \text{ mm} \pm 7,35 \text{ mm}$ et de $23,15 \text{ mm} \pm 4,55 \text{ mm}$ pour les MBD. Ces valeurs n'étaient pas significativement différentes ($p < 0,90$). (Fig. 27B)

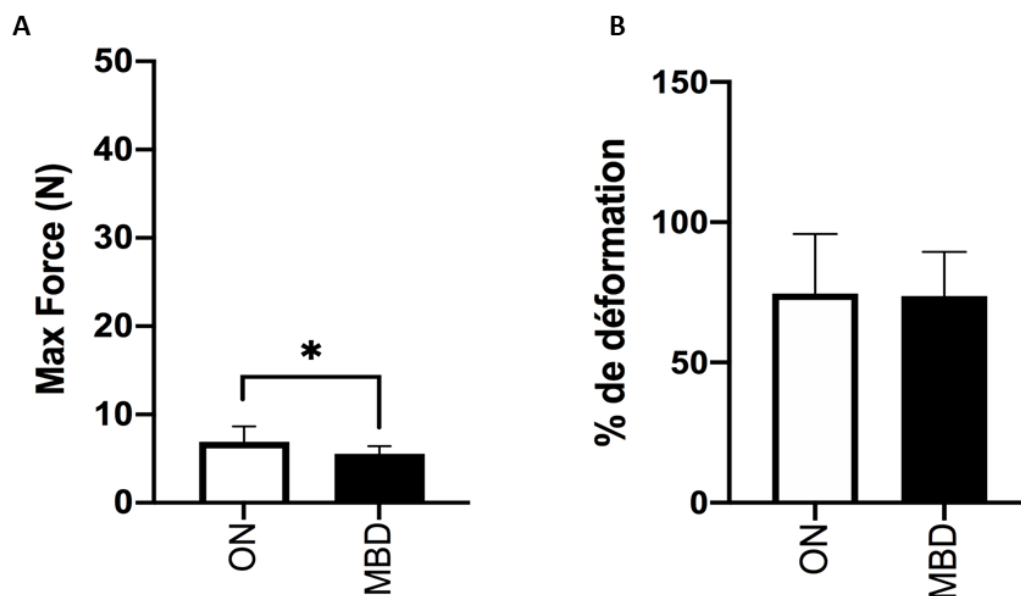


Figure 27 - Analyses des propriétés mécaniques de l'ON et de la MBD selon un test résistance à la suture réalisé selon la direction longitudinale des fibres musculaires du tissu.

A : la Max_Force (N) observée avant la rupture, B : le pourcentage de déformation (mm) observé avant la rupture.

7. Analyses de la MBD en environnement acide par imagerie

7.1 Analyses histologiques

Après un traitement des ON à pH = 2 pendant 24 heures, les noyaux cellulaires étaient visibles mais leur intégrité n'était pas conservée (Fig. 28C, flèche rouge). Les différentes couches

histologiques de l'œsophage étaient identifiables, néanmoins, les fibres de collagènes semblaient sensibles au traitement à l'acide, leur structure était moins compacte et dense en comparaison aux ON sans traitement (Fig. 13, Fig. 28).

Les noyaux cellulaires étaient très peu représentés après un traitement des ON à l'acide pendant 72 heures. (Fig. 28F). Les couches histologiques étaient présentes et discernables, mais les fibres de collagènes étaient comme desquamées. (Fig. 13, Fig. 28)

Le traitement à l'acide n'a pas permis aux ON_{A-24} et ON_{A-72} de conserver l'intégrité structurelle décrite lors des observations histologiques de l'ON.

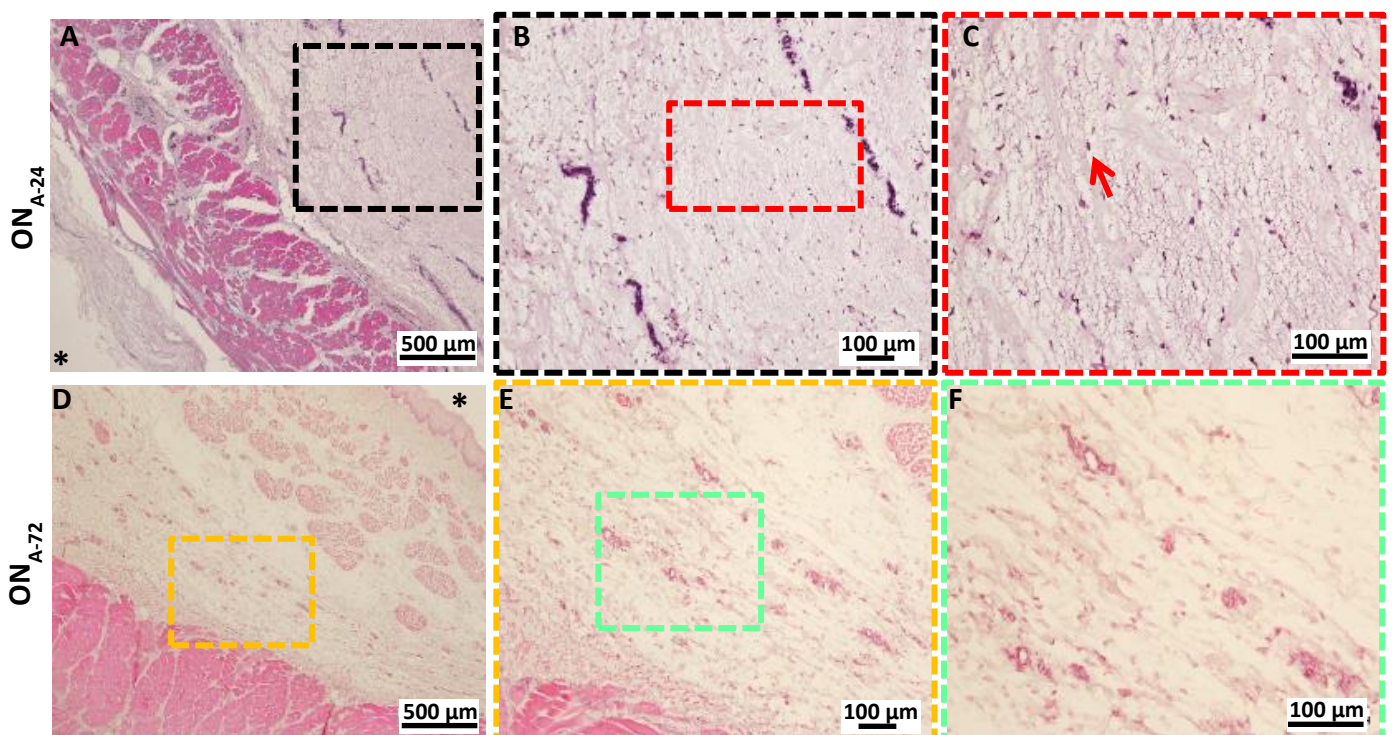


Figure 28 - Coloration à l'HES d'un ON immergé dans une solution à pH 2.

A-C : Observations histologiques d'un ON_{A-24} (A : Grossissement x4 ; B : Grossissement x10 ; C : Grossissement x20). D-F : Observations histologiques d'un ON_{A-72} (D : Grossissement x4 ; E : Grossissement x10 ; F : Grossissement x20).

Aucun noyau cellulaire n'était observé pour les MBD_{A-24} et les MBD_{A-72}. Après un traitement de 24 heures en acide, l'intégrité structurelle des couches histologiques était conservée, ainsi que la densité et la cohésion des fibres de collagène (Fig. 29B, Fig. 29C).

Comparés aux ON_{A-24}, les analyses histologiques objectivaient une meilleure résistance des MBD_{A-24} au traitement à l'acide. Un épaissement d'origine collagénique était décrit pour les MBD_{A-72}. Les fibres de collagène étaient non-cohésives, et lâches. (Fig. 29F)

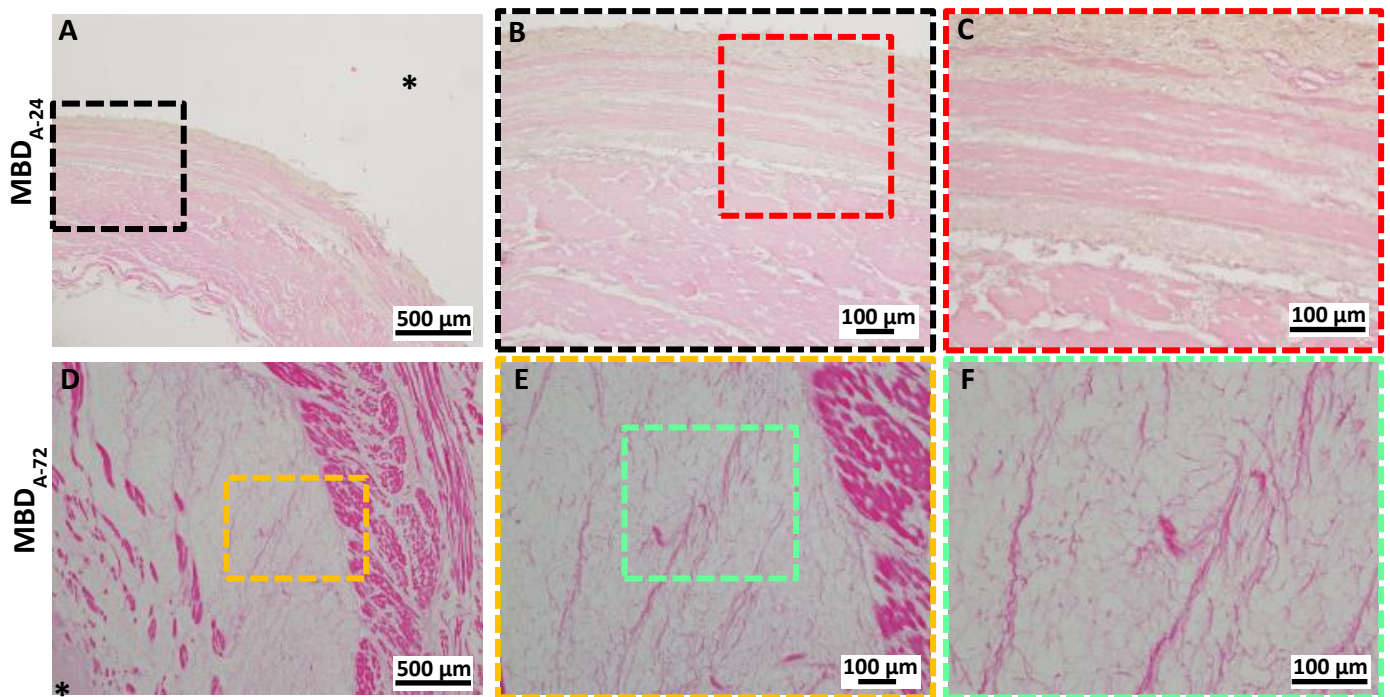


Figure 29 - Coloration à l'HES d'une MBD immergée dans une solution à pH 2.

A-C : Observations histologiques d'un MBD_{A-24} (A : Grossissement x4 ; B : Grossissement x10 ; C : Grossissement x20). D F : Observations histologiques d'un MBD_{A-72} (D : Grossissement x4 ; E : Grossissement x10 ; F : Grossissement x20).

L'affinité des échantillons avec le traitement à l'acide était décrite pour la MBD_{A-24}. Concernant les échantillons ON_{A-24} et ON_{A-72}, les composantes nucléaires et collagéniques étaient altérées. Les fibres de collagènes des MBD_{A-72} étaient affectées de façon comparables aux ON_{A-72}.

7.2 Analyses par MEB

Les analyses des coupes transversales des MBD_{A-24} montraient la présence de structures collagéniques fibrillaires compactes, comparables aux MEC des MBD non traités à l'acide. La présence de microcavités au niveau de la MBD_{A-24} était décrite pour les différentes couches histologiques constitutives de la MEC œsophagienne. (Fig. 30A, Fig. 30C, Fig. 30E)

Les analyses des coupes transversales des MBD_{A-72} objectivaient un épaissement du chorion avec une altération des fibres collagénique, conforme aux analyses histologiques précédentes (Fig. 29E). Les fibres de collagènes décrites dans les sous muqueuses et musculées restaient cohésives, denses et la structure était poreuse en surface. Le traitement à l'acide pendant 72

heures entraînant une dégradation de la qualité de la surface des MBD. Ces dernières apparaissaient plus lisses, et moins en relief que les MBD_{A-24}. (Fig. 30F, Fig. 30H, Fig. 30J)

Le traitement à l'acide de 24 heures ne semblait pas altérer l'intégrité structurale de la MBD, permettant ainsi de conserver une architecture tissulaire cohésive. Cependant, le traitement à l'acide pendant 72 heures était plus délétère pour la MEC de la MBD.

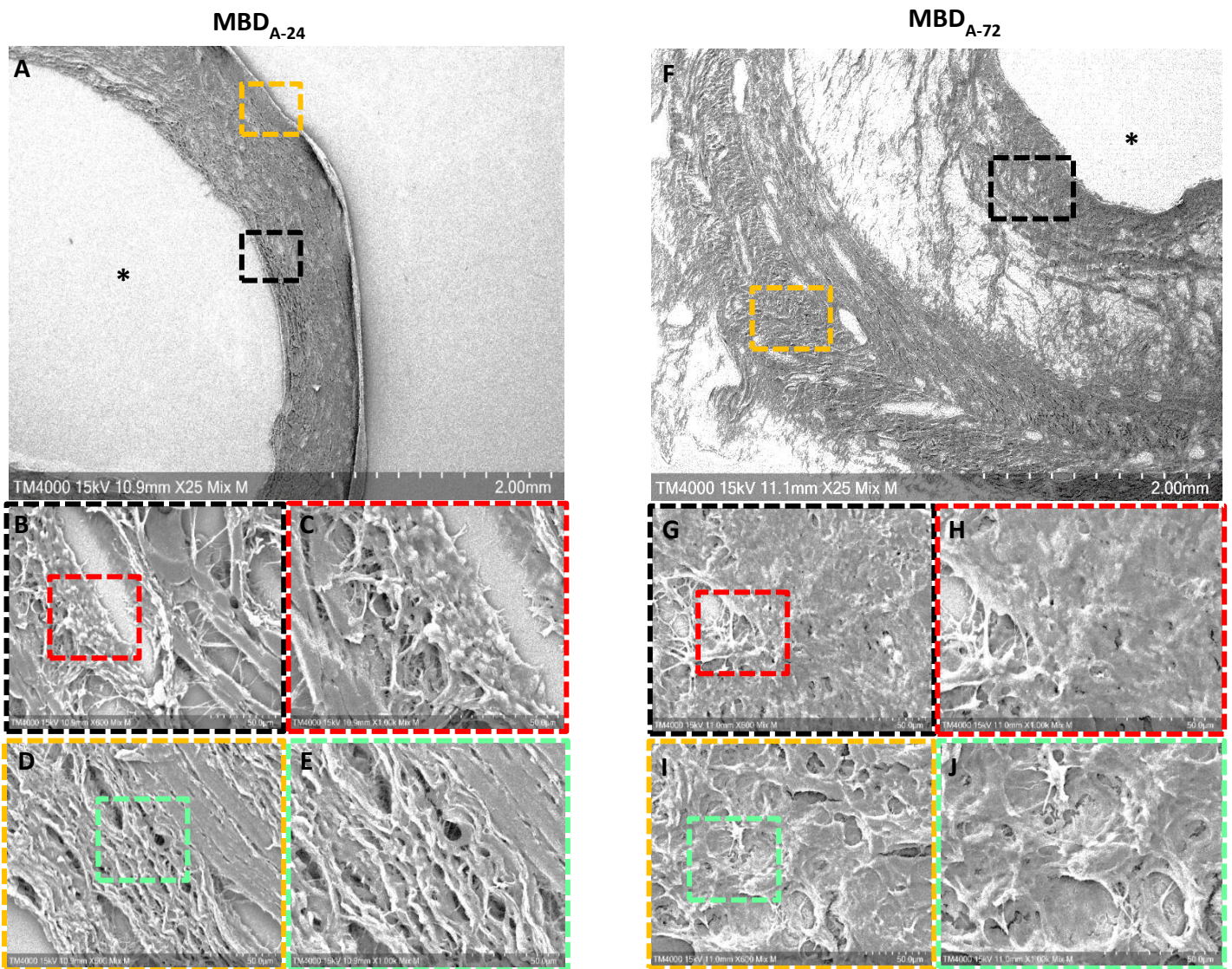


Figure 30 - Observations au MEB d'une coupe transversale de MBD_{A-24} et MBD_{A-72}.

A-E : Observations d'une coupe transversale de MBD_{A-24} (A : Grossissement x25, B et D : Grossissement x600, C et E : Grossissement x1000). F-J : Observations d'une coupe transversale de MBD_{A-72} (F : Grossissement x25, G et I : Grossissement x600, H et J : Grossissement x1000).

8. Contenu protéique de la MBD en environnement acide

Le contenu protéique des MBD_{A-24} (n=3) par rapport aux MBD (n=3) était analysé afin de déterminer l'effet du traitement à l'acide sur la composition de la MEC. L'hypothèse établie selon laquelle l'abondance peptidique des composants de la MEC était similaire pour les 2 conditions était vérifiée par un test statistique du T test. La composition de la MEC était significativement différente lorsque l'abondance peptidique était $p < 0,05$.

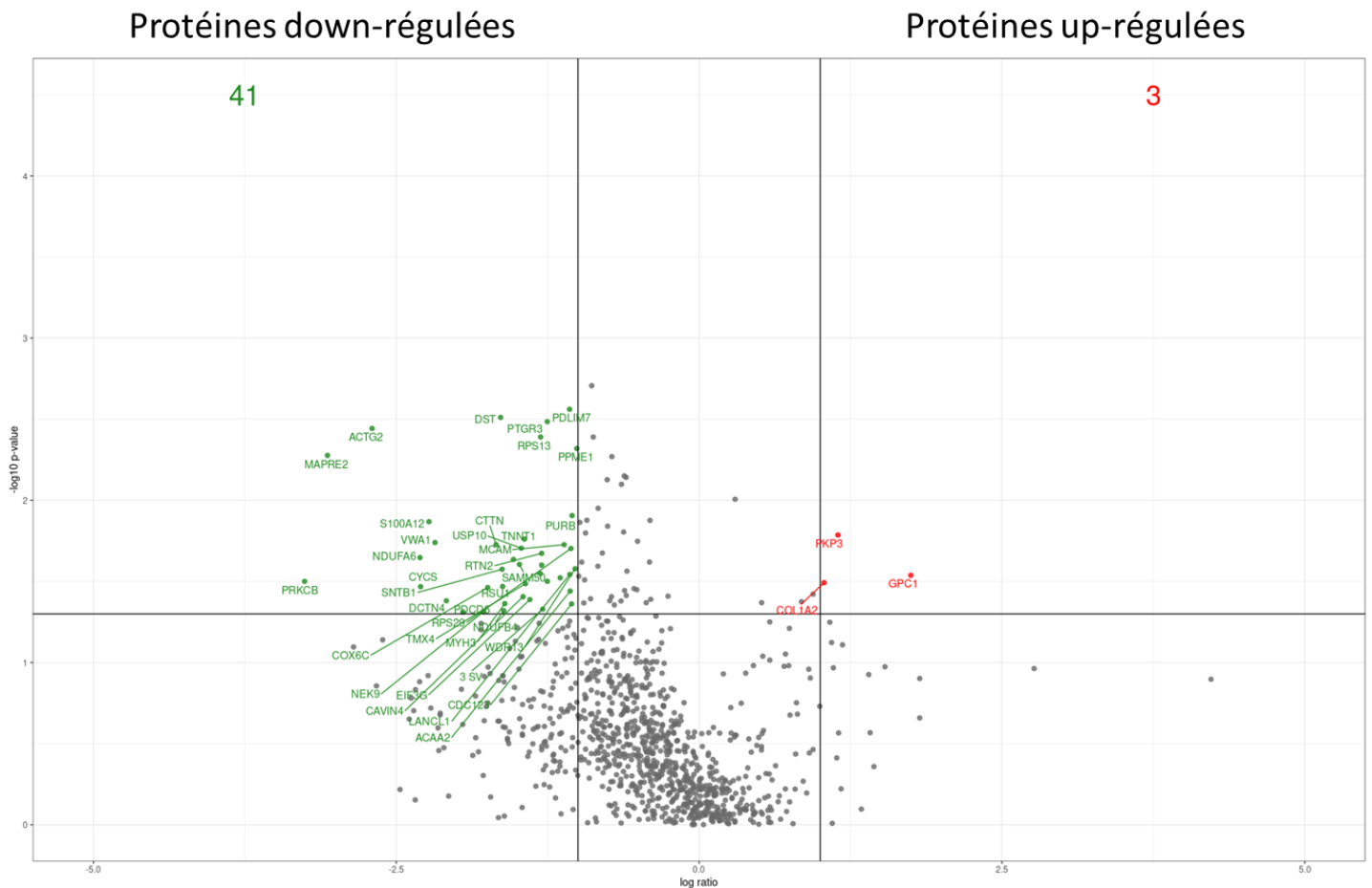


Figure 31 - Volcano plot représentant la quantité de protéines down-régulées et up-régulées pour la conditions MBD_{A-24} par rapport à la MBD.

La MBD_{A-24} sur-exprimait 3 protéines : la Plakophiline-3 (PKP3), le COL1A2, et le Glypicane-1 (GPC1) (Fig. 31). Parmi ces protéines, seul le COL1A2 était décrit dans la MBD. (Fig. 22)

La MBD_{A-24} sous-exprimait 41 protéines, dont l'actine γ -2 (ACTG2). Parmi toutes les protéines d'actines décrites dans la MBD, l'ACTG2 était représentée à seulement 5% (Tableau 5). Aucune protéine de collagène n'était sous-exprimée après un traitement à l'acide de 24 heures. (Fig. 31)

Le contenu protéique des MBD_{A-72} (n=3) par rapport aux MBD (n=3) était également étudié selon les mêmes critères d'analyses que la MBD_{A-24}.

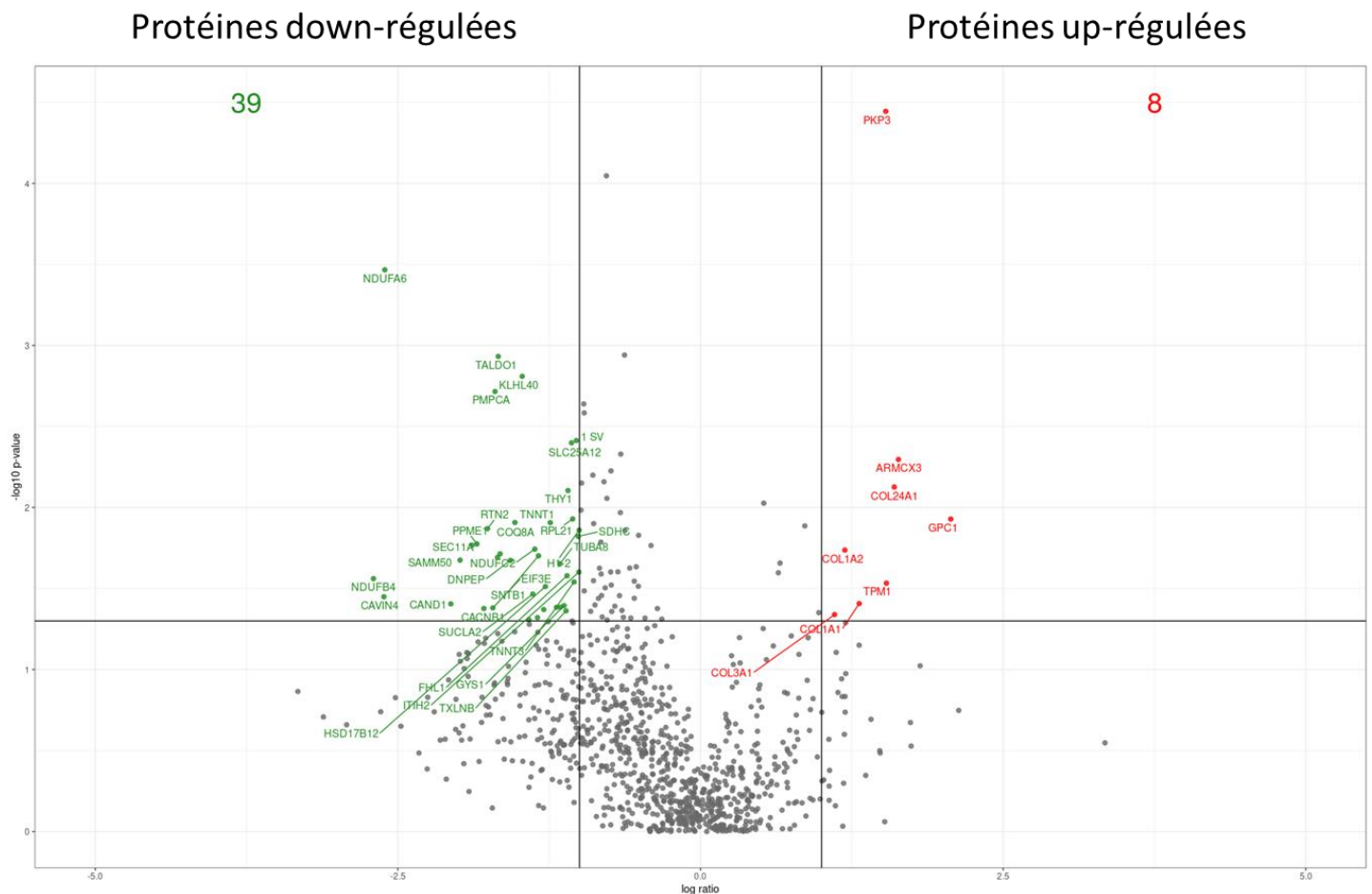


Figure 32 - Volcano plot représentant la quantité de protéines down-régulées et up-régulées pour la conditions MBD_{A-72} par rapport à la MBD.

La MBD_{A-72} sur-exprimait 8 protéines : le COL24A1, le COL1A2, le COL1A1, le COL3A1, le PKP3, le GPC1, l'Armadillo Repeat Containing X-Linked 3 (ARM CX3) et la tropomyosine-1 (TPM1) (Fig. 32).

Le PKP3 et le GPC1 n'apparaissaient pas dans la liste des protéines décrites dans la MBD, contrairement aux autres protéines sur-exprimées (données non présentées).

La MBD_{A-72} sous-exprimait 39 protéines. Aucune protéine de collagène n'était sous-exprimée après un traitement à l'acide pendant 72 heures. (Fig. 32)

Le postulat d'une synthèse de nouvelles protéines (PKP-3, GPC-1, COL24A1, COL1A2, COL1A1, COL3A1, ARM CX-3, TPM-1) après un traitement à l'acide ne peut pas être accepté. Néanmoins,

le traitement à l'acide semblerait être à l'origine d'une pré-exposition des régions peptidiques avant la procédure d'extraction et de digestion de la MBD, à l'origine du découvrément d'un plus grand nombre de peptides.

9. Description des propriétés mécaniques de la MBD en environnement acide

9.1 Etudes de tractions longitudinale et circonférentielle

Les propriétés mécaniques des ON_{A-24} et des MBD_{A-24} étaient étudiées afin d'évaluer la résistance aux déformations longitudinales ($n=6$) et circonférentielles ($n=6$).

Les valeurs moyennes de la Max_Force enregistrées pour les ON_{A-24} étaient respectivement de $8,52\text{ N} \pm 0,92\text{ N}$ et de $4,30\text{ N} \pm 1,41\text{ N}$ selon les axes longitudinaux et circonférentiels. Les valeurs obtenues pour les ON_{A-24} étudiés selon l'axe longitudinal étaient significativement plus élevées ($p < 0,0002$) par rapport aux ON_{A-24} selon l'axe circonférentiel (Fig. 33A).

Concernant les MBD_{A-24} , les valeurs moyennes de la Max_Force étaient de $11,29\text{ N} \pm 5,62\text{ N}$ selon l'axe longitudinal et de $7,83\text{ N} \pm 4,88\text{ N}$ selon l'axe circonférentiel. Les valeurs obtenues pour les MBD_{A-24} n'étaient significativement pas différentes ($p < 0,28$) (Fig. 33D). Les valeurs obtenues pour les enregistrements en traction longitudinale et circonférentielle selon les échantillons ON_{A-24} et MBD_{A-24} n'étaient pas significativement différentes selon un T-test bilatéral, (respectivement $p < 0,28$ et $p < 0,14$) (Fig. 34A, Fig. 34D).

Les moyennes des pourcentages des déformations maximales observées chez les ON_{A-24} étaient de $66,58\text{ mm} \pm 3,09\text{ mm}$ et $59,99\text{ mm} \pm 17,25\text{ mm}$ selon les directions longitudinales et circonférentielles. Les valeurs obtenues pour les ON_{A-24} étudiés selon l'axe longitudinal n'étaient significativement pas différentes ($p < 0,40$) (Fig. 33B). Concernant les MBD_{A-24} , les valeurs moyennes observées des déformations maximales étaient de $60,45\text{ mm} \pm 20,09\text{ mm}$ selon l'axe longitudinal, et de $82,30\text{ mm} \pm 26\text{ mm}$ selon l'axe circonférentiel. Les valeurs obtenues pour les MBD_{A-24} étudiées selon l'axe longitudinal n'étaient significativement pas différentes ($p < 0,14$) (Fig. 33E). Les valeurs obtenues pour les enregistrements en traction longitudinale et circonférentielle selon les échantillons ON_{A-24} et MBD_{A-24} n'étaient pas significativement différentes selon un T-test bilatéral, (respectivement $p < 0,49$ et $p < 0,11$). (Fig. 34B, Fig. 34E)

Les résistances ultimes à la traction (UTS) étaient enregistrées dans les axes longitudinaux et circonférentiels. Concernant les tractions selon la direction longitudinale, les ON_{A-24} présentaient des valeurs moyennes de $0,48 \text{ MPa} \pm 0,07 \text{ MPa}$. Les valeurs moyennes obtenues pour les ON_{A-24} étaient de $0,21 \text{ MPa} \pm 0,05 \text{ MPa}$ selon l'axe circonférentiel. Les valeurs obtenues pour les ON_{A-24} étudiés selon l'axe longitudinal étaient significativement plus élevées ($p < 0,0001$) par rapport aux ON_{A-24} étudiés selon l'axe circonférentiel (Fig. 33C). Les valeurs moyennes des UTS enregistrées pour les MBD_{A-24} étaient de $0,46 \text{ MPa} \pm 0,18 \text{ MPa}$ et $0,24 \text{ MPa} \pm 0,08 \text{ MPa}$ dans les axes longitudinaux et circonférentiels, respectivement (Fig. 33F). Les valeurs obtenus pour les enregistrements en traction longitudinale et circonférentielle selon les échantillons ON_{A-24} et MBD_{A-24} n'étaient pas significativement différentes (respectivement $p < 0,73$ et $p < 0,45$). (Fig. 34C, Fig. 34F)

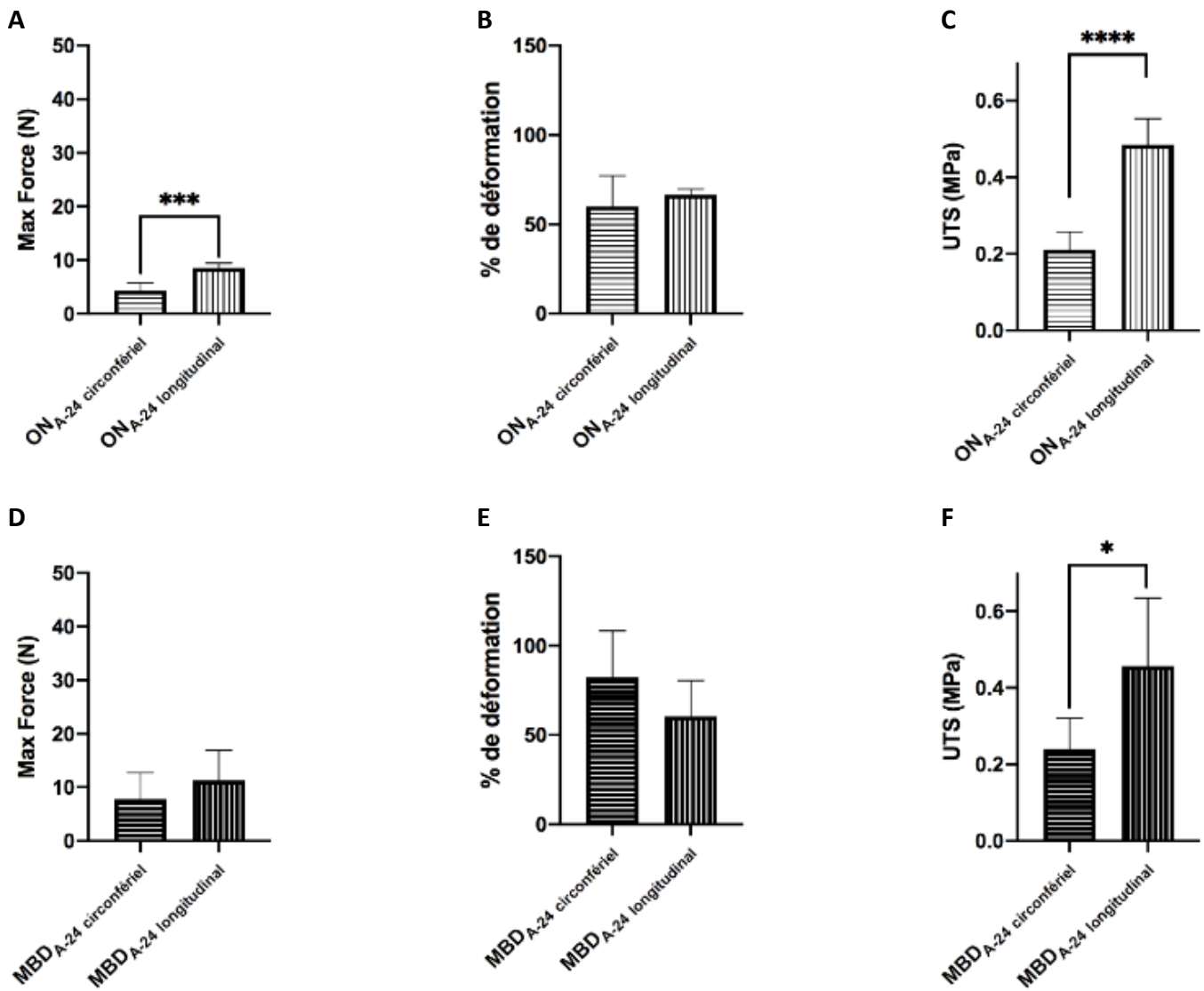


Figure 33 - Analyses des propriétés mécaniques de l'ON et de la MBD après une exposition à l'acide pendant 24 heures selon un test de traction dans les axes circonférentiels et longitudinaux.

A-C : Description des propriétés mécaniques des ON_{A-24}. A : Max_Force (N) observée avant la rupture, B : pourcentage de déformation (mm) observé avant la rupture, C : UTS (MPa) observée avant la rupture. D-E : Description des propriétés mécaniques des MBD_{A-24}. D : Max_Force (N) observée avant la rupture, E : pourcentage de déformation (mm) observé avant la rupture, F : UTS (MPa) observée avant la rupture.

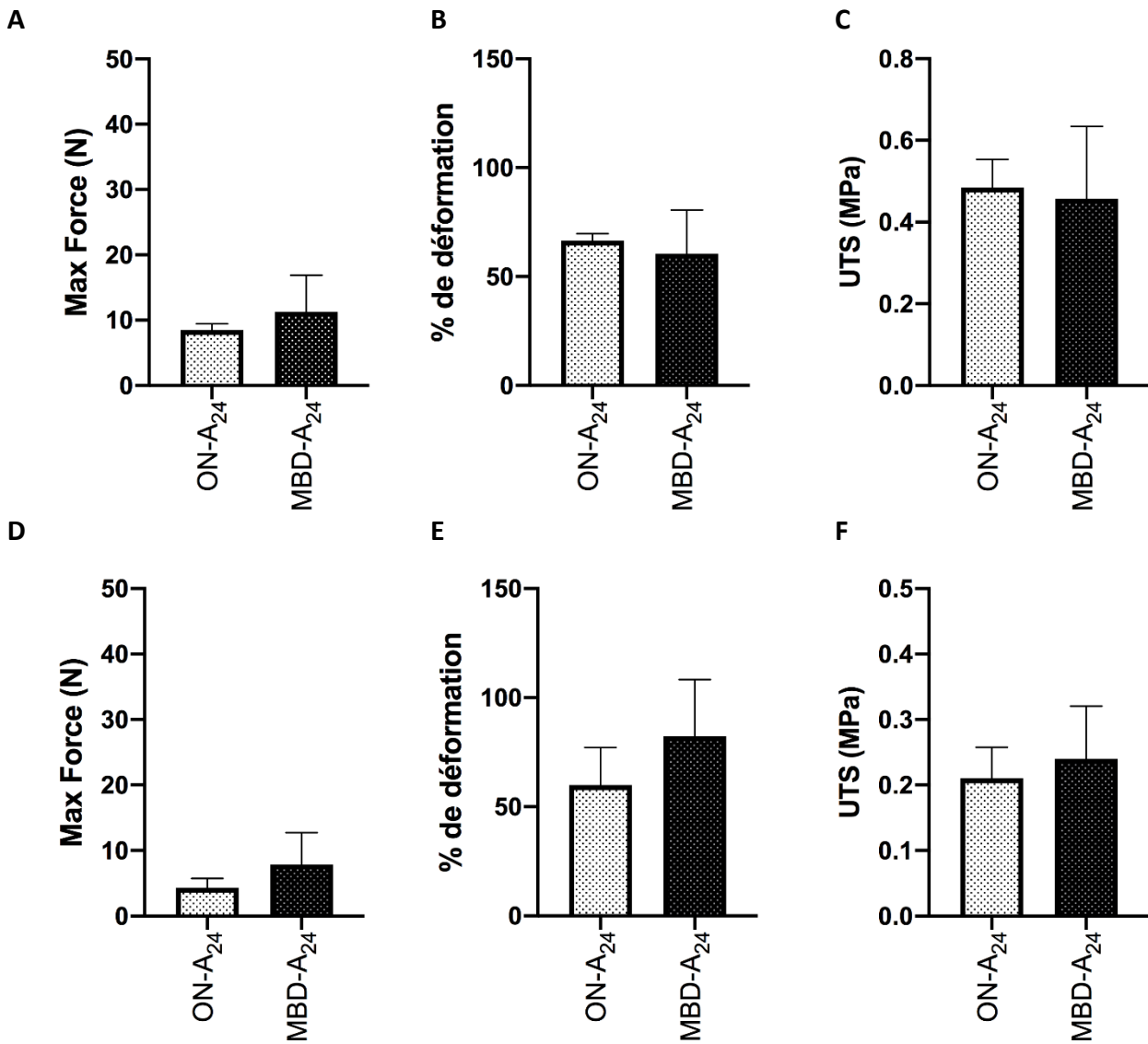


Figure 34 – Analyses des propriétés mécaniques de l’ON et de la MBD après une exposition à l’acide pendant 24 heures selon un test de traction.

A-C : Description des propriétés mécaniques des ON_{A-24} et MBD_{A-24} dans l’axe longitudinal représentant : A : la Max_Force (N), B : le pourcentage de déformation (mm), C : l’UTS (MPa).

D-F : Description des propriétés mécaniques des ON_{A-24} et MBD_{A-24} dans l’axe circonférentiel représentant, D : la Max_Force (N) observée avant la rupture, E : le pourcentage de déformation observé avant la rupture (mm), F : l’UTS (MPa) observée avant la rupture.

L’analyse du comportement mécanique des contraintes de traction dans les axes longitudinaux et circonférentiels des ON, MBD, ON_{A-24} et MBD_{A-24} permettait de mettre en évidence les différences obtenues selon le traitement de l’échantillon, ainsi que l’orientation des fibres dans le test par un test statistique 2way-ANOVA avec une différence significative obtenue pour $p < 0,05$.

Cette analyse objectivait une diminution significative de la Max_Force (N) des échantillons d'ON_{A-24} étudiés dans les axes circonférentiels ($p < 0,0004$) et longitudinaux ($p < 0,05$) par rapport aux ON étudiés dans l'axe longitudinal. Le comportement de la MBD était similaire à l'ON, une diminution significative de la Max_Force (N) de la MBD_{A-24} était remarquée selon l'orientation circonférentielle ($p < 0,0001$) et longitudinale ($p < 0,0001$). (Fig. 35)

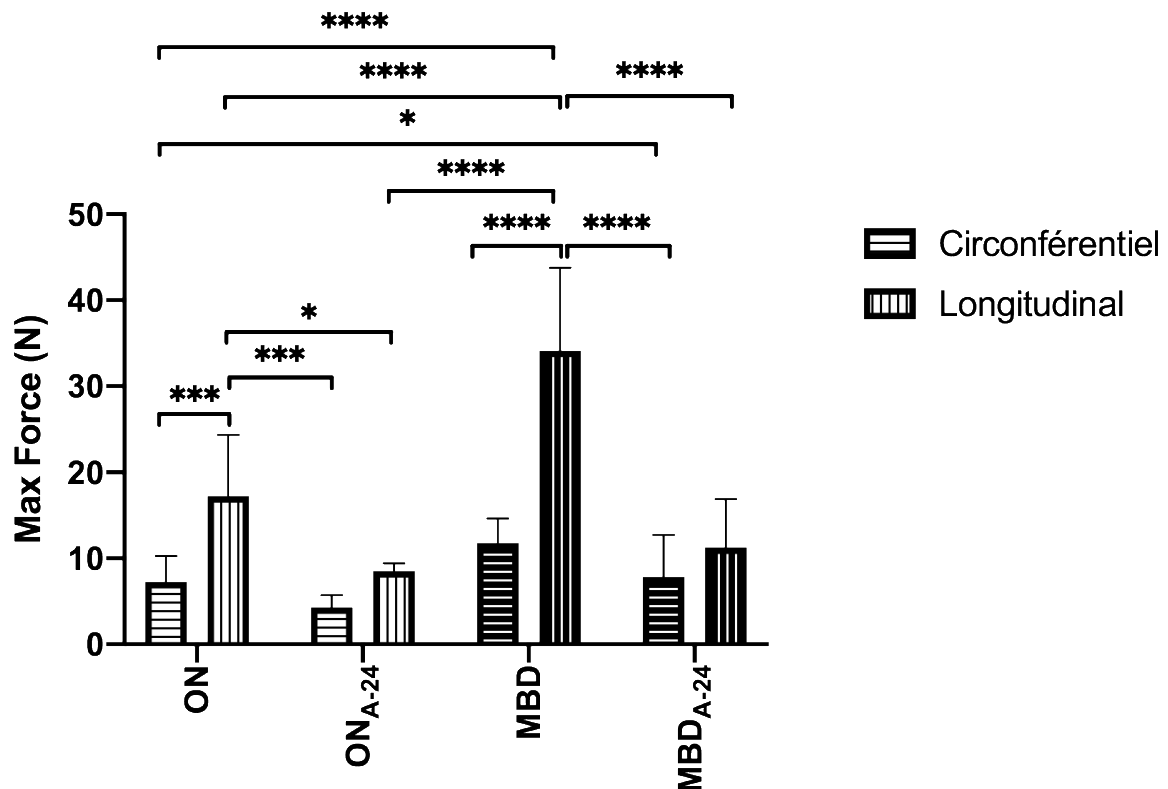


Figure 35 – Analyses des propriétés mécaniques de l'ON et de la MBD en comparaison avec les ON_{A-24} et MBD_{A-24} selon un test de traction représentant la Max_Force (N) observée avant la rupture dans les axes circonférentiels et longitudinaux.

9.2 Etudes de résistance à la suturabilité

Les études menées ont permis d'évaluer la résistance à la suture des ON_{A-24} (n=6) et des MBD_{A-24} (n=6). La valeur moyenne de la Max_Force enregistrée pour les ON_{A-24} était de $4,01 \text{ N} \pm 0,73 \text{ N}$. Concernant les MBD_{A-24}, la valeur moyenne de la Max_Force mesurée était de $4,77 \text{ N} \pm 0,96 \text{ N}$.

Ces valeurs n'étaient pas significativement différentes ($p < 0,16$) (Fig. 36A).

Les moyennes des pourcentages des déformations maximales mesurées chez les ON_{A-24} étaient de 80,66 mm ± 9,49 mm et de 52,03 mm ± 12,47 mm pour les MBD_{A-24}.

Ces valeurs étaient significativement différentes ($p < 0,001$), avec une diminution significative de la déformation maximale des MBD_{A-24}. (Fig. 36B)

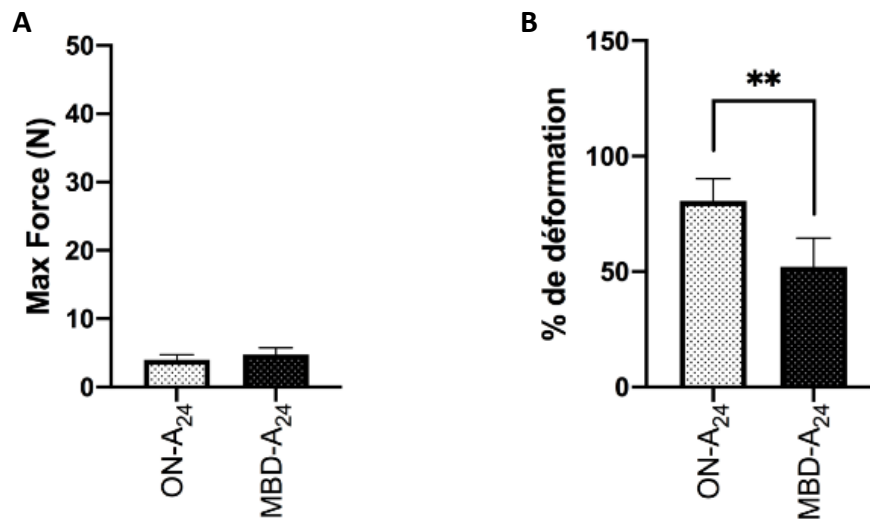


Figure 36 – Analyses des propriétés mécaniques de l'ON_{A-24} et de la MBD_{A-24} selon un test résistance à la suture réalisé selon la direction longitudinale des fibres musculaires.

A : la Max_Force (N) observée avant la rupture, B : le pourcentage de déformation (mm) observé avant la rupture.

L'analyse du comportement mécanique lors des contraintes résistance à la suturabilité dans les axes longitudinaux des ON, MBD, ON_{A-24} et MBD_{A-24} permettait de mettre en évidence les différences obtenues selon le traitement de l'échantillon, par un test statistique 2way-ANOVA avec une différence significative obtenue pour $p < 0,05$.

Cette analyse objectivait une diminution significative de la Max_Force (N) des échantillons de ON_{A-24} ($p < 0,0002$) par rapport aux ON. Il n'y avait pas de différence significative observée entre les MBD et des MBD_{A-24}. (Fig. 37)

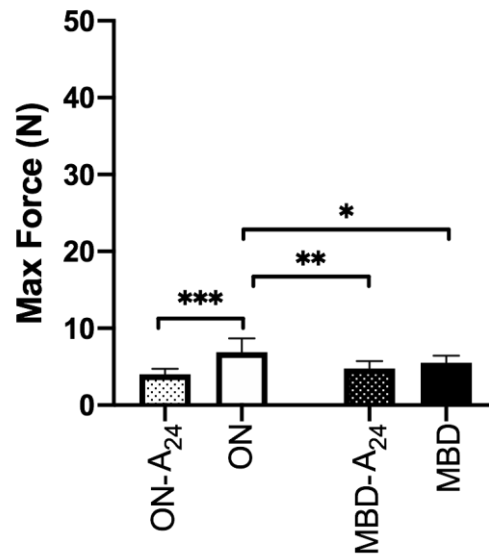


Figure 37 - Analyses des propriétés mécaniques de l'ON et de la MBD en comparaison avec les ON_{A-24} et MBD_{A-24} selon un test de résistance à la suture réalisé selon la direction longitudinale des fibres musculaire du tissu, représentant la Max_Force (N) observée avant la rupture.

Une analyse descriptive de l'impact de l'environnement acide sur la MBD a permis de mettre en évidence des altérations des propriétés mécaniques cohérentes avec les résultats obtenus pour un ON décrit dans un même environnement. Malgré une diminution de la résistance mécanique par rapport aux MBD et ON non traités à l'acide, aucune perte de contenu collagénique n'a été constatée selon l'analyse protéomique. Cependant, la dénaturation des protéines et l'altération des liaisons peptidiques sembleraient être à l'origine des modifications macroscopiques et microscopiques des échantillons traités à l'acide. Des études approfondies permettraient d'expliquer les mécanismes moléculaires responsables de ces différentes observations.

Ces analyses préliminaires fournissent des indications sur l'utilisation potentielle de la MBD comme substitut œsophagien capable de résister aux conditions supra-physiologiques du système digestif. Des études *in vivo* supplémentaires sont nécessaires pour comprendre les effets de l'acidité gastrique sur la MBD.

IV. DISCUSSION

1. Décellularisation de l'œsophage et exploitation de la MEC

Les MBD décrites dans ces travaux de thèse étaient obtenues après la perfusion de solutions chimiques et enzymatiques, constituées d'azide de sodium, de DEOX et de DNase. L'association d'une solution enzymatique permettait d'assurer l'élimination de l'ADN afin de favoriser la décellularisation.¹⁶² L'azide de sodium complétait les solutions de décellularisation, dans le but d'assurer la lyse des cellules, mais également d'inhiber le risque de contamination grâce à son activité bactériostatique.^{163,164}

Les MBD décrites dans ces travaux étaient obtenues après un processus de décellularisation efficace, précédemment décrit par Luc *et al.*⁹⁴ Les MBD étaient dépourvues de noyau cellulaire, selon une coloration à l'HES, la quantité d'ADN résiduel était inférieure à 40ng/ mg de masse sèche, et la longueur des fragments d'ADN résiduel était inférieure à 50 pb.⁶⁹ Les MBD présentaient des microcavités en surface, comme démontré en MEB, néanmoins elles n'étaient pas perméables. Cette caractéristique a été évaluée lors des tests mécaniques, pour lesquels aucune fuite d'azote n'était enregistrée lors des tests de résistance à l'éclatement de la MBD.

Des altérations de la MEC associées à une dénaturation protéique lors de la décellularisation des tissus par méthodes chimiques sont démontrées dans la littérature.¹⁶⁵ La conservation de l'intégrité des couches histologiques, et la cohésion tissulaire des MBD développées dans nos travaux étaient confirmées par des analyses histologiques. L'exploitation du contenu protéique de la MBD par spectrométrie de masse n'était pas réalisable pour l'ON du fait de l'abondance des cellules qui masquaient les protéines. Les protéines structurales de la MEC de la MBD ainsi que la complexité biologique de la MEC œsophagienne à l'issue du protocole de décellularisation étaient préservées. Luc *et al.* précisaient la conservation des GAG dans les MBD.¹⁶ Ces protéoglycanes interviennent dans la modulation des différentes voies de signalisation régulant ainsi les processus cellulaires. Elles jouent également un rôle dans le maintien des propriétés biomécaniques des tissus.¹⁶⁶

Les évaluations *in vitro* de l'inflammation et de l'immunogénicité de la MBD par Arakelian *et al.* ont permis de démontrer l'absence de prolifération lymphocytaire.¹¹² Des expériences *in*

vivo à long terme n'ont pas exploré ces paramètres permettant de confirmer l'absence d'immunogénicité de la MBD.^{23,94}

La conservation des MBD envisagées en IT fait l'objet de nombreuses études dans l'amélioration du développement de ces produits issus de l'IT. La préservation de l'architecture de la MEC œsophagienne, de la teneur en collagène et des propriétés mécaniques était démontrée à 6 mois, lorsque la MBD était conservée après un traitement au dioxyde de carbone super-critique (CO₂-SC).¹⁶⁷ La cryopréservation était également utilisée dans la conservation des MBD à long terme, sans altérations majeures de la MBD (données non présentée).¹⁶⁸

2. Décontamination de l'œsophage et concept de stérilité

La stérilisation est définie comme étant une procédure permettant de tuer ou d'éliminer tous les micro-organismes. Une MBD est considérée comme stérile lorsqu'elle est dépourvue de la totalité de ses contaminants et ce, sans toxicité résiduelle issue de la méthode. La stérilisation doit également permettre la conservation des propriétés mécaniques ainsi que l'activité biologique de la MBD.¹⁶⁹ A l'image de la décellularisation, il n'y a pas de consensus quant à l'utilisation d'une méthode de stérilisation standard pour les MBD.

Les méthodes de stérilisation les plus courantes retrouvées en IT des tissus mous sont l'irradiation γ et l'oxyde d'éthylène (OE).^{94,170} La stérilisation par irradiation γ présente des avantages du fait de sa réalisation à température ambiante sans relargage de résidus toxiques, et de la forte pénétration du rayonnement au travers le tissu. Néanmoins, la dénaturation des protéines et la diminution de la résistance mécanique sont les principales limites liées à son utilisation.^{94,171} Quand à l'OE, bien que son utilisation ne cause aucune dégradation de l'intégrité mécanique de la MBD, les résidus toxiques relargués réduisent son intérêt en tant que méthode de stérilisation terminale.¹⁶⁹ D'autres méthodes de stérilisation sont décrites dans le développement de MBD, telles que le plasma à basse température de peroxyde d'hydrogène, l'acide péracétique¹⁷²⁻¹⁷⁵, les rayons UV^{174,176} et le CO₂-SC.^{177,178}

Aucune de ces méthodes ne permet de recueillir un consensus strict assurant l'obtention d'une MBD stérile, aux propriétés biologiques et mécaniques préservées. C'est pourquoi, la

stratégie utilisée dans ces travaux était de ne pas traiter les MBD par des méthodes de stérilisation terminale reconnues comme délétères pour la MEC.

Le caractère septique de l'ON nécessitait l'utilisation d'un traitement antibiotique et antifongique.^{174,179} Arakelian *et al.* suggéraient la décontamination de l'œsophage en amont de la décellularisation et la réalisation des étapes de fabrication de la MBD en conditions stériles. Le traitement décrit par Arakelian *et al.* correspond à une procédure déjà utilisée en clinique pour la préparation des greffons vasculaires et cutanés.¹¹²

L'application d'une action mécanique précoce associée à une incubation avec un chélateur tel que l'EDTA permettait de décoller le biofilm. L'utilisation de l'EDTA servait à déstabiliser le biofilm, tout en inhibant l'adhérence microbienne.^{144,180} Les antibiotiques et les antifongiques utilisés lors de la décontamination ciblaient des spectres bactériens et fongiques spécifiques retrouvés dans l'œsophage.¹¹² La gentamicine cible les bactéries à Gram-, cet antibiotique est décrit dans le traitement des infections du tractus gastro-intestinal.¹⁸¹ La clindamycine est un antibiotique approuvé par la FDA, et permet de cibler les contaminants anaérobiques, mais également les infections à streptocoques et staphylocoques.¹⁸² La vancomycine est recommandée principalement dans le traitement contre les organismes à Gram+ et également contre les infections à staphylocoques.¹⁸³ L'amphotéricine B est un antifongique « idéal » en raison de son large spectre d'activité et de son action pharmacologique efficace.¹⁸⁴

Les analyses microbiologiques démontraient que les MBD obtenues étaient exemptes de contaminants aérobiques et anaérobiques. L'absence de mycoplasme et d'endotoxine était également confirmée. Ces données permettaient de valider l'état de stérilité du produit final.

Une inactivation virale de la MBD a été proposée en dernière intention du protocole de décellularisation dans ces travaux, afin de répondre aux réglementations en vigueur.¹⁸⁵ La justification de l'utilisation de l'acide péracétique pour l'inactivation virale des MBD repose sur les travaux de Hodde *et al.* décrivant son efficacité contre le virus de l'intestin grêle porcin, lors du développement de dispositifs médicaux dérivés de matrices biologiques animales.¹⁸⁶ L'acide péracétique ne présente aucune toxicité, mais son utilisation à une forte concentration peut affecter les propriétés physiques et chimiques des MBD.¹⁶⁹

Lors de nos travaux, la quantité virale de la MBD n'a pas été contrôlée après l'exposition à l'acide péracétique. De plus, le profil sérologique des donneurs n'était pas transmis lors des prélèvements œsophagiens. Afin de répondre aux réglementations cliniques en vigueur, la connaissance de ces données est nécessaire.

3. Cytotoxicité de la MBD

Le protocole initial établi par Luc *et al.* utilisé pour cette étude ne décrivait pas de procédure de détoxification isolée, contrairement aux travaux d'Arakelian *et al.*^{94,112} Ces derniers utilisaient une résine XAD 16N, afin d'absorber les résidus chimiques de la décontamination et de la décellularisation de la MBD. La résine XAD 16N possède des pores de diamètre moyen équivalent à 100 Å, correspondant à 10 nm, permettant d'assurer les échanges d'ions.¹⁴⁵

L'analyse de la cytotoxicité par contact direct de la MBD traitée avec la résine pouvait démontrer l'obtention d'un seuil de viabilité cellulaire supérieur à 70% mais de façon non systématique (données non présentées). Une limite technique peut être à l'origine de ces résultats, concernant la préparation de la résine. En effet, il n'existe pas de consensus quant à la méthode d'activation de la résine. Arakelian *et al.* ne précisant pas leur procédure¹¹², différentes méthodes étaient décrites, avec des rinçages spécifiques permettant d'éliminer les conservateurs et autres résidus ainsi que des conditions de séchage particulières¹⁸⁷, ou encore l'ajout d'une solution tamponnée et ajustée à un pH défini.¹⁴⁶ Une adaptation du protocole de détoxification semble nécessaire à notre étude afin d'obtenir des résultats reproductibles.

Une récente étude suggérait le remplacement de la résine par l'utilisation de cartouches de charbon, communément retrouvées dans un contexte d'hémo-perfusion. L'approche de cette technique permettrait de détoxifier la MBD selon des procédures déjà validées en clinique.¹⁶⁸

La mise en place d'une détoxification par les cartouches de charbon ainsi que la quantification par spectrométrie de masse des résidus chimiques des produits de la décellularisation permettraient d'améliorer nos résultats.^{112,168}

4. Comportement mécanique de la MBD

De récents travaux ont décrit le comportement de l'œsophage comme non linéaire, capable de s'adapter au processus de déglutition tout en préservant l'organe d'une dilatation excessive.⁷ Le péristaltisme de l'œsophage suggère que la distensibilité circonférentielle de l'organe doit être supérieure à la distensibilité longitudinale.¹¹⁵

Dans cette étude, l'ON et la MBD étaient exploités selon une forme plane. Les valeurs obtenues de Max_Force pour les MBD étaient significativement supérieures à celles des ON. Cette augmentation de résistance à la traction de la MBD était également retrouvée dans les travaux décrits par Arakelian *et al.*¹¹² Nos échantillons présentaient une plus grande résistance à la déformation dans l'axe longitudinal que dans l'axe circonférentiel, comme Luc *et al.* qui décrivaient une analyse mécanique selon une forme tubulaire de l'échantillon, avec une déformation des MBD inférieure selon un axe longitudinal.⁹⁴ La résistance de la MBD à l'éclatement a démontré que la pression intraluminale maximale évaluée avant la rupture des parois était doublement supérieure aux valeurs décrites par Vanags *et al.* qui suggéraient un seuil de rupture à l'éclatement de l'ON à 400 mmHg.⁹

La distribution des fibres de collagène est majoritaire dans les couches histologiques des muqueuses et sous-muqueuses. Ces dernières favorisent la rigidité des tissus dans l'axe longitudinal et interviennent lors de l'application de contraintes mécaniques élevées grâce à leur structure plissée. La musculature de l'œsophage est préservée par les muqueuses et sous-muqueuse d'une distension excessive, et intervient lors de l'application de faibles pressions intraluminales.^{7,115}

Le comportement mécanique anisotropique conservé après la décellularisation corrélait à la conservation de la structure biologique et de la cohésion tissulaire observées en HES. Il est néanmoins probable que les différents traitements apportés à la MEC altèrent les composantes élastiques de la MEC, et favorisent sa rigidité.

Bien que l'analyse mécanique démontrait une diminution significative de la résistance à la suturabilité de la MBD, Luc *et al.* et Arakelian *et al.* ont exploré la MBD en tant que substitut œsophagien circonférentiel de pleine épaisseur chez le gros animal, et mettaient en évidence sa manipulation et sa suturabilité.^{23,94}

5. Comportement de la MBD en conditions acides

L'exposition à l'acide œsophagien est corrélée à une augmentation de la dysmotilité œsophagienne et à une altération de la réponse contractile après une distension de l'organe.^{188,189} Dans un contexte d'EBO, consécutive à une exposition à l'acide prolongée, une modification des voies de signalisation biologiques était décrite avec une prolifération accrue des cellules résistantes, à l'origine de mutations génétiques.¹⁵³

Après une exposition à l'acide pendant 24 et 72 heures, un changement macroscopique était notable pour les ON et les MBD, associé à un épaississement de la paroi œsophagienne. La texture des échantillons semblait également gélatineuse.

L'analyse histologique à l'HES de l'ON a démontré une altération importante du collagène après le traitement à l'acide pendant 24 et 72 heures alors que la MBD_{A-24} conservait une bonne cohésion tissulaire. Comme décrit précédemment, l'hypothèse selon laquelle la modification de la composition biologique de la MBD après le traitement de décellularisation favorise sa rigidité expliquerait la tolérance de la MBD à l'acidité, permettant ainsi la conservation de la structure histologique des tissus.

L'analyse protéomique de la MBD_{A-24} et MBD_{A-72} n'a pas montré de diminution significative du contenu collagénique après l'exposition à l'acide. L'UTS des MBD dans l'axe longitudinal était néanmoins inférieure par rapport aux MBD et aux ON non traités. La diminution de la résistance à la traction longitudinale peut entraîner des dysfonctionnements mécaniques, augmentant le risque de rupture et diminuant la motilité œsophagienne, compromettant ainsi la capacité de cicatrisation et la régénération tissulaire.

L'acidité prolongée caractéristique du RGO, pourrait donc influencer la MBD, nécessitant donc de prendre en considération son environnement physiologique lors de sa conception.

V. CONCLUSION

Nos travaux ont permis d'obtenir une MBD qui répondait aux critères internationaux de décellularisation des produits d'IT. Elle conservait les caractéristiques protéiques et architecturales conformes aux ON après la décellularisation. Elles étaient cytocompatibles, mais de façon non-systématique, nécessitant une amélioration de la procédure de détoxification au moyen de cartouches de charbon actif, déjà utilisées en clinique. L'optimisation du protocole de décontamination permettait d'obtenir une MBD stérile, exempte de micro-organisme, de mycoplasme et d'endotoxine, sans l'application de méthodes de stérilisations terminales délétères pour la MEC. La conservation des propriétés mécaniques de la MBD permettait sa manipulation et son utilisation en tant que substitut œsophagien.

Ce travail de recherche a permis d'optimiser une méthode de décellularisation d'un organe œsophagien, et une caractérisation représentative des exigences réglementaires pour les dispositifs médicaux.

Par la suite, des essais pré-cliniques *in vivo* chez le rongeur permettront de valider la biocompatibilité de la MBD avant de réaliser les essais chez le porc confirmant la réparation œsophagienne par la MBD sous forme de patch en première intention et la substitution œsophagienne sous forme tubulaire en deuxième intention.

L'utilisation d'une MBD œsophagienne en tant que substitut œsophagien pourrait également être appliquée dans un contexte de réparation gastrique. Le comportement biologique et mécanique de la MBD en environnement acide sera validé *in vivo* dans un contexte de comblement gastrique après gastrectomie chez le petit animal. Le choix du modèle animal pour les études *in vivo* doit être représentatif de la fonction de l'organe chez l'Homme qui est resté la préoccupation de ce travail.

CHAPITRE 2

**CELLULARISATION D'UNE MATRICE
BIOLOGIQUE PAR LES CELLULES STROMALES
MÉSENCHYMATEUSES ISSUES DE LA GÉLÉE DE
WHARTON**

I. INTRODUCTION

Il a été démontré que la cellularisation des matrices acellulaires pouvait favoriser la reconstruction de l'œsophage.¹⁹⁰ La cellularisation des biomatériaux regroupe un ensemble de procédés nécessaires dans l'obtention d'un produit de thérapie cellulaire (PTC). La définition d'une source cellulaire idéale et les méthodes d'ensemencement des cellules sur le biomatériau représentent des défis majeurs en IT. De nombreuses études tentent de définir des protocoles efficaces et reproductibles, mais aucune n'a pu établir une méthode de référence.¹⁹¹

1. Cellularisation des substituts œsophagiens

Le remodelage constructif de l'œsophage avec des greffes acellulaires biodégradables repose sur la capacité des populations cellulaires de l'hôte à remodeler le greffon et à faciliter le développement du néo-tissu.¹⁹² Les substitutions œsophagiennes circonférentielles de pleine épaisseur n'ont pas permis d'obtenir des résultats sûrs et sans complications.¹⁶ Pour cela, l'ensemencement des biomatériaux avant la transplantation est envisagé afin d'améliorer les résultats obtenus, afin d'apporter les cellules nécessaires à la reconstitution de l'épithélium et des couches musculaires de l'œsophage.¹⁹¹ La production des facteurs sécrétoires par les cellules assure les phénomènes de chimiotaxie et soutient l'intégration du greffon, permettant d'assurer les fonctions trophiques nécessaires.⁷²

L'identification de sources cellulaires appropriées au contexte clinique est essentielle pour le succès de cette approche, ainsi qu'une méthode de culture et une stratégie d'ensemencement du biomatériau.¹⁹³

2. Les cellules utilisées en IT de l'œsophage

Le manque de donneurs et le rejet immunitaire représentent les principales contraintes à l'utilisation de cellules différenciées dans un contexte allogénique. La cellularisation des biomatériaux par des cellules autologues différenciées permet de s'affranchir de ces limites.^{41,98} Bien qu'elles présentent de nombreux avantages, la faible capacité proliférative de ces cellules différenciées limite leur utilisation.

Les CSM se sont révélées prometteuses en raison de leur potentiel de différenciation, leur prolifération ainsi que leur degré d'attachement et d'adhésion aux biomatériaux.^{190,193,194}

Il est à noter qu'aucune étude de cellularisation des MBD ne décrit la régénération des composantes nerveuses, nécessaires au bon développement d'un œsophage fonctionnel.

Les cellules différenciées utilisées en IT de l'œsophage

L'injection de cellules autologues par voie endoscopique dans des défauts œsophagiens *in situ* permettrait de favoriser la ré-épithélialisation et la cicatrisation des plaies. A ce jour, différentes cellules sont étudiées, comme les cellules autologues épithéliales de la muqueuse orale (CEMO) et les kératinocytes.^{195,196}

D'autres études ont décrit les bénéfices apportés par l'ensemencement de cellules autologues musculaires, de fibroblastes et de kératinocytes sur des substituts œsophagiens formés de PGA.¹⁴¹ Il a été démontré qu'un revêtement collagénique ou de fibronectine améliorerait la biocompatibilité des biomatériaux synthétiques et favorisait l'adhérence des cellules.^{141,197}

L'émergence des matériaux biologiques essentiellement collagéniques est prometteuse dans l'amélioration des procédures de cellularisation. En effet, la régénération de l'épithélium et de la couche musculaire était observée après un ensemencement de kératinocytes et des fibroblastes sur des matrices acellulaires.¹⁹⁸ Une régénération des cellules œsophagiennes épithéliales et musculaires était décrite par Wei *et al.*, lorsque les MBD étaient cellularisées avec des CEMO.¹⁹⁹ Poghosyan *et al.* observaient une cellularisation du biomatériau avec des myoblastes et des CEMO.¹⁹¹

Les cellules différenciées, telles que les cellules épithéliales et les cellules musculaires favorisent la régénération tissulaire dans un contexte de réparation œsophagienne. Néanmoins, leur utilisation est limitée en raison de leur faible capacité proliférative, et du risque de récurrence tumorale.¹⁹⁷

Les cellules stromales mésenchymateuses utilisées en IT de l'œsophage

Des études récentes ont suggéré que les CSM pouvaient participer à la régénération œsophagienne.^{99,200} Les CSM sont des cellules indifférenciées qui présentent un intérêt majeur en IT. Elles sont impliquées dans la réparation tissulaire et facilitent le remodelage du greffon de façon spécifique et adaptée.¹⁹³ Elles jouent un rôle dans la régénération des lésions tissulaires et des altérations fonctionnelles grâce à leur capacité intrinsèque de chimiotaxie, leur permettant ainsi de migrer de manière dirigée en réponse à des signaux chimiques spécifiques de leur environnement.²⁰¹

D'autres études rapportent l'utilisation des CSM dans des contextes de thérapie génique.²⁰²

Les CSM sont principalement retrouvées dans la moelle osseuse, le tissu adipeux et le CO. Elles peuvent également être isolées à partir des muscles ou des dents. (Fig. 38) Leur potentiel de différenciation, associé à leur capacité de prolifération est caractéristique de leur profil cellulaire, et leur confère une utilisation reconnue en IT.^{31,202}

Parmi les CSM utilisées dans le développement des stratégies de cellularisation, les CSM-MO sont les plus décrites.²⁰³ Arakelian *et al.* cellularisaient des greffons d'IT œsophagiens à partir de CSM-MO.¹¹² Cellularisées par des CSM-MO, les matrices biologiques acellulaires montraient une régénération supérieure des cellules épithéliales et musculaires *in vivo*, en comparaison d'une matrice non-cellularisée.^{200,204} Les CSM-MO sont donc nécessaires à la réépithélialisation, la revascularisation et la régénération musculaire de l'œsophage.^{110,200,205-207}

Les CSM-TA et les CSM issues de l'amnios sont également utilisées dans IT de l'œsophage.^{94,147} La régénération tissulaire *in vivo* était favorisée après un ensemencement de CSM-TA avec l'observation de la formation de muqueuse et de musculature et d'une néo-vascularisation du greffon œsophagien.^{111,208} L'ensemencement de MBD avec des CSM amniotiques permettait d'identifier des profils cellulaires différenciés de cellules musculaires et endothéliales.¹⁴⁷

Parmi les différentes sources de CSM décrites, les CSM issues du CO suscitent un intérêt croissant en raison de leur plasticité et de leur disponibilité. Cependant, il est intéressant de préciser qu'à l'heure actuelle, aucune étude concernant la potentialité des CSM du CO pour la cellularisation spécifique des œsophages n'est évoquée, notamment, les CSM-GW.

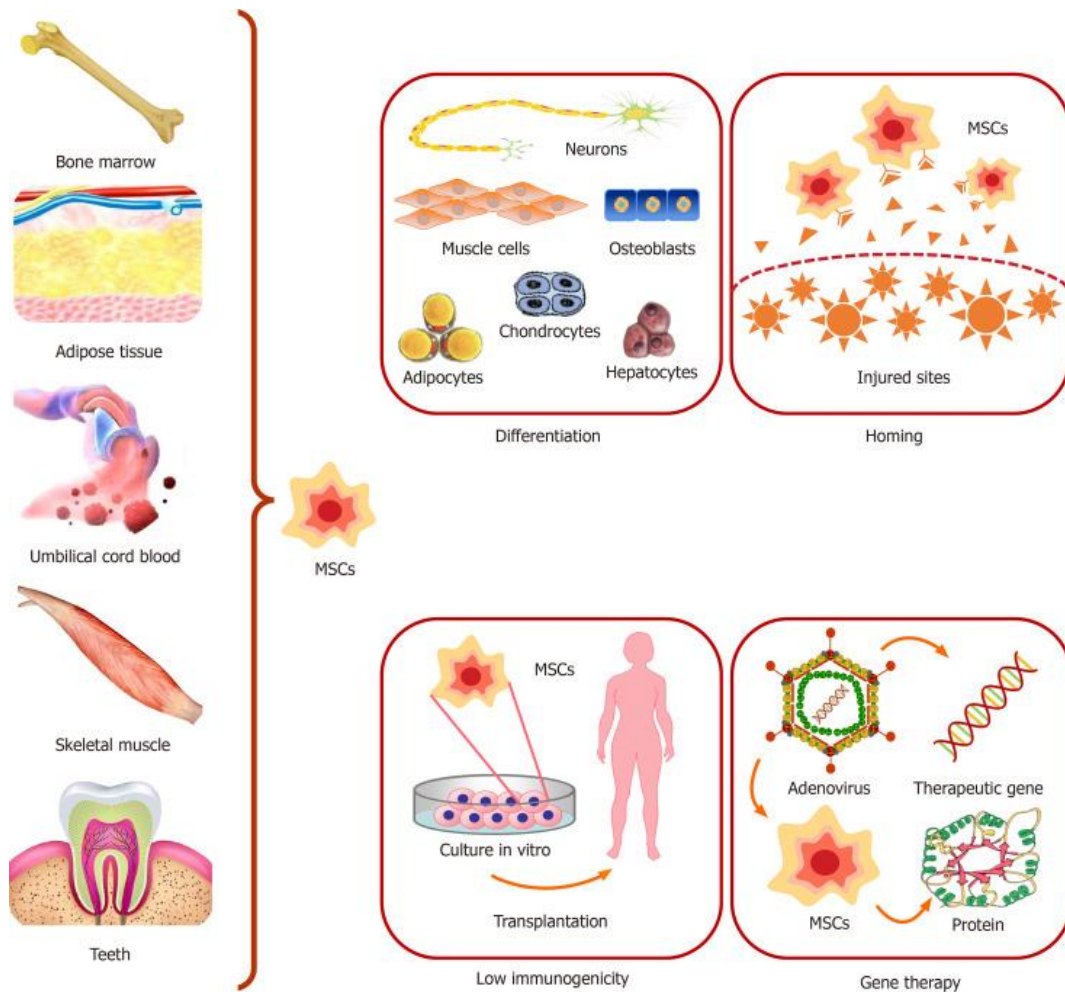


Figure 38 - Sources et caractéristiques des CSM.²⁰²

Les CSM-GW présentent des caractéristiques très favorables à leur utilisation en thérapie cellulaire.^{209–211}

Nous axerons nos travaux sur le potentiel des CSM-GW pour la cellularisation de la MBD œsophagienne. De précédentes études ont déjà exploré leur intérêt dans la régénération de tissus vasculaires, cutanés et osseux, démontrant leur capacité à se différencier en plusieurs types cellulaires et leur tolérance immunitaire.^{212–214}

3. Les méthodes de cellularisation

L'ensemencement des cellules constitue une étape fondamentale pour l'obtention d'un tissu fonctionnel. Plusieurs approches ont été développées dans le domaine de l'IT, chacune présente ses avantages et ses limites.³¹

La communication des cellules ensemencées avec la MEC inhérente à l'organe favorise la différenciation des CSM de façon spécifique et permet leur orientation.¹⁹³

Les cellules ensemencées peuvent survivre jusqu'à une distance de 200 µm du réseau capillaire le plus proche pour l'approvisionnement en nutriments, en oxygène et l'élimination des déchets.⁴¹

Suspension cellulaire

L'ensemencement d'une matrice biologique par une suspension cellulaire permet aux cellules de pénétrer par diffusion à travers les pores.¹⁹³ La perfusion d'une suspension cellulaire permet un ensemencement homogène de la structure poreuse du biomatériau, contrairement à la cellularisation par méthode statique, qui elle, favorise l'adhérence cellulaire.^{215,216} Des approches plus avancées incluent l'utilisation des bioréacteurs et des systèmes de culture dynamique.^{112,217-219} Arakelian *et al.* utilisaient un système de culture dynamique, alors que Nayakawde *et al.* développaient une MBD recellularisée par des CSM amniotiques à l'aide d'un bioréacteur.^{112,147} Les forces mécaniques appliquées par ces systèmes permettent de favoriser la régénération tissulaire par rapport à une culture en statique.^{112,218,219} Néanmoins, l'utilisation d'un bioréacteur requiert une bonne maîtrise des paramètres environnementaux afin de réduire les potentiels stress cellulaires.^{112,147}

Feuillet cellulaire

La cellularisation des biomatériaux par des feuillets cellulaires permet de créer des structures adaptées aux constructions multi-couches qui imitent la complexité tissulaire naturelle tout en protégeant les défauts œsophagiens du contenu qui le traverse.²²⁰

L'utilisation de cellules à faible potentiel immunogène dans le développement du feuillet cellulaire permet de s'affranchir de la réaction immunitaire, lorsqu'il est implanté. De la même façon que les cellules en suspension, des cytokines et des facteurs de croissance sont sécrétés par les feuillets cellulaires, favorisant la prolifération des cellules épithéliales et la réparation des tissus musculaires.²⁰²

Différentes études ont porté leur intérêt dans le développement de feuillets cellulaires issus des CSM-TA, de CEMO, de kératinocytes.^{94,199,220,221} La cellularisation des MBD

circonférentielles avec des feuillets de CSM-TA décrite par Luc *et al.* consistait à ensemercer les feuillets cellulaires sur les faces lumineales et externes de la MBD œsophagienne. L'adhésion du feuillet à la MBD pendant la phase d'ensemencement semblait être un facteur important. En effet, la cellularisation par le feuillet de CSM-TA n'était pas satisfaisante sur la surface lumineale, alors qu'une migration cellulaire était observée du feuillet externe vers la MBD.¹⁶

En revanche, la technologie des feuillets cellulaires représente un coût élevé et la procédure de préparation *in vitro* est complexe.²²² La viabilité cellulaire au sein des feuillets doit être évaluée, en tenant compte des conditions de culture pouvant moduler le phénotype cellulaire et influencer la survie des cellules.^{220,221}

In vivo

La cellularisation *in vivo* des biomatériaux présente l'avantage d'exploiter l'environnement biologique, offrant ainsi un contexte favorable à la différenciation cellulaire et à l'interaction dynamique avec les signaux biochimiques endogènes.^{94,223} Cette approche permet de capitaliser sur les réponses biologiques naturelles, créant ainsi un micro-environnement bénéfique pour la prolifération cellulaire et la différenciation fonctionnelle en site orthotopique.^{94,224,225}

Luc *et al.* proposaient une maturation précoce de la MBD dans l'omentum du receveur, favorisant la vascularisation du greffon. L'apparition de fibrose au sein de la MBD suggérait de réduire le temps de maturation du greffon.⁹⁴

Cette approche semble apporter des avantages potentiels en termes d'intégration tissulaire, de réponse immunitaire et de résultats cliniques, mais cette méthode nécessite la réalisation d'un acte chirurgical supplémentaire chez le patient, en amont de la greffe. Une seconde contrainte à la cellularisation *in vivo* réside dans la maîtrise totale des interactions entre les cellules et les tissus hôtes.²²⁶

4. Les cellules stromales mésenchymateuses de la gelée de Wharton

Le potentiel thérapeutique des CSM suscite un intérêt grandissant en médecine régénérative.⁵⁵ Bien que les CSM-MO et les CSM-TA soient les plus représentées en thérapie

cellulaire, leurs méthodes de prélèvement requièrent des procédures invasives ne permettant d'isoler qu'une faible quantité de CSM, plus ou moins viables selon le profil du donneur.²²⁷ De plus, elles représentent un risque important d'infections virales.⁴⁴

Le cordon ombilical et les CSM-GW

Le CO représente une source cellulaire accessible et non controversée.²²⁸ McElreavey *et al.* ont mis en évidence pour la première fois des cellules de type fibroblastes dans le tissu conjonctif du CO.²²⁹ Ce tissu conjonctif est la gelée de Wharton (GW), formée de GAG, de protéoglycanes et de collagènes, elle permet de protéger les vaisseaux ombilicaux des torsions et des pressions exercées au cours de la gestation (Fig. 39).²³⁰

Les cellules de la GW, isolées à partir du CO, ont été caractérisées par des marqueurs de surface décrits par l'ISCT permettant d'attester leur identification en qualité de CSM.²¹¹ Elles se distinguent par l'expression de marqueurs de surface caractéristiques tels que le CD73, le CD90 et le CD105, ainsi que l'absence ou la faible expression de marqueurs hématopoïétiques, tels que CD45, CD34 et CD14.^{227,231} Elles sont capables de se différencier selon les lignées adipocytaires, ostéocytaires et chondrocytaires.^{44,211,231,232} Par ailleurs, une caractéristique particulière des ces CSM-GW réside dans leur expression, bien que modérée, de marqueurs de pluripotence tels que Oct-4, Nanog et Sox2, élargissant ainsi leur répertoire fonctionnel.^{233,234}

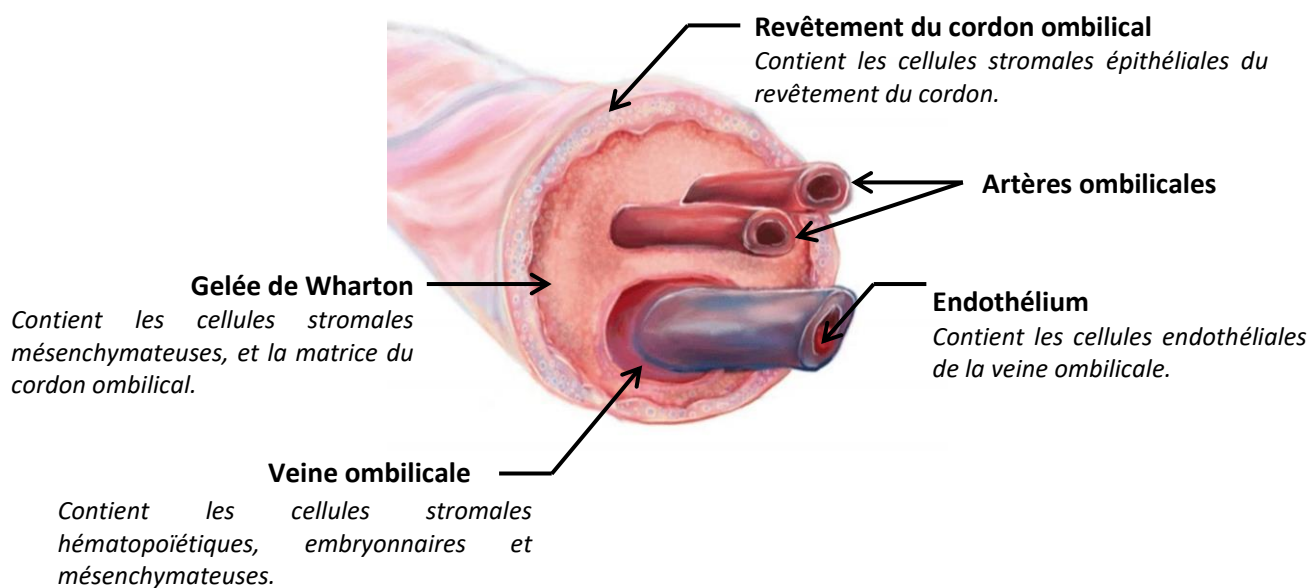


Figure 39 - Anatomie de cordon ombilical humain.²³⁵

L'extraction des CSM-GW du CO permet d'obtenir un rendement cellulaire supérieur à celui obtenu avec les CSM-MO, ou les CSM-TA.²³⁶ Cependant, les méthodes de recueil et de culture des CSM-GW influencent et modulent l'expression des marqueurs de surface.²³⁷

Il a été démontré que les CSM-GW ont une capacité de différenciation en lignées adipocytaire et ostéocytaire inférieure à celle des CSM-MO,^{44,231} alors que les capacités de croissance et prolifération cellulaire des CSM-GW sont supérieures aux CSM-MO, qui par ailleurs, entrent plus rapidement en phase de sénescence.^{44,227} Ce phénotype s'accompagne de capacités immunomodulatrices, permettant aux CSM-GW de moduler la réponse immunitaire et de créer un environnement favorable à la régénération tissulaire.^{212,238,239}

Le profil immuno-privilegié des CSM-GW

Les caractéristiques immunomodulatrices des CSM dans la réponse immunitaire en médecine régénératrice ont déjà été démontrées.^{240,241} La réaction immunitaire consiste en la reconnaissance des marqueurs allogéniques à l'origine de l'activation des LT du donneur et de leur migration dans les tissus hôte.²⁴² Le HLA-DR joue un rôle primordial dans la présentation des antigènes aux cellules du système immunitaire, et en particulier aux LT CD4+.²⁴³ Le HLA-DR est principalement exprimé sur les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), telles que les

cellules dendritiques, les macrophages et les LB, impliquées dans l'initiation et la régulation des réponses immunitaires.²⁴⁴ La présence du HLA-DR sur la surface cellulaire permet aux CPA de présenter des peptides anti-géniques aux LT CD4+, déclenchant ainsi des réponses immunitaires spécifiques.^{209,245}

Les CSM-GW présentent un profil unique de caractéristiques immunomodulatrices, conférant un potentiel thérapeutique prometteur.^{209,210,246} En effet, elles sont caractérisées par un profil immuno-phénotypique privilégié, qui exclut l'expression du HLA-DR.²¹⁰ Les CSM-GW sécrètent activement des facteurs anti-inflammatoires tels que l'interleukine-10 (IL-10), le facteur de croissance transformant β (TGF- β), et l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO), contribuant à la suppression des réponses inflammatoires.^{247,248} Elles inhibent efficacement plusieurs types de cellules immunitaires pro-inflammatoires, notamment les LT en favorisant leur différenciation en LT régulateurs (LTregs).^{247,249} Les CSM-GW sont également reconnues pour inhiber les cellules NK et les cellules dendritiques.²⁰⁹ De plus, les CSM-GW influencent les réponses des LB, impactant la production d'anticorps.²⁴¹ Des études suggèrent que les CSM-GW seraient moins immunogènes que les CSM-MO.^{44,227}

Les CSM-GW représentent une source alternative aux CSM isolées depuis la MO, par leur recueil, leur abondance et leurs caractéristiques intrinsèques. De plus, elles permettent de réduire l'inflammation localisée et de supprimer l'allo-réactivité lymphocytaire.²²⁷ Leurs propriétés d'auto-renouvellement et de différenciation ainsi que leur rendement cellulaire élevé laissent envisager de multiples applications thérapeutiques.²²⁸ Cependant, les procédures d'extraction et de culture des CSM-GW doivent être maîtrisées afin d'obtenir une quantité de cellules nécessaire, sans altérer leurs capacités thérapeutiques.^{250,251}

5. Objectifs

L'objectif principal de ce travail était d'optimiser la cellularisation de la matrice œsophagienne décellularisée qui ne permettait pas à elle seule une régénération œsophagienne complète, afin de favoriser l'intégration tissulaire de la MBD. Luc *et al.* proposaient la cellularisation de la MBD par des feuillets de CSM-TA de porcs, qui s'est révélée insuffisante *in vitro*.⁹⁴

Compte tenu de l'émergence des CSM-GW utilisées en thérapie cellulaire, les CSM-TA n'ont finalement pas été les cellules retenues pour notre application. En reprenant cette approche de feuillet cellulaire, nos travaux visaient à développer un feuillet de CSM-GW viable, conservant leurs propriétés immunologiques et manipulable pour l'ensemencement de la MBD. L'optimisation de ces protocoles de cellularisation de la matrice *in vitro* reposait sur l'exploitation et la caractérisation des CSM-GW en tant que candidates pour la cellularisation de la MBD.

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

Protocole de cellularisation d'une MBD

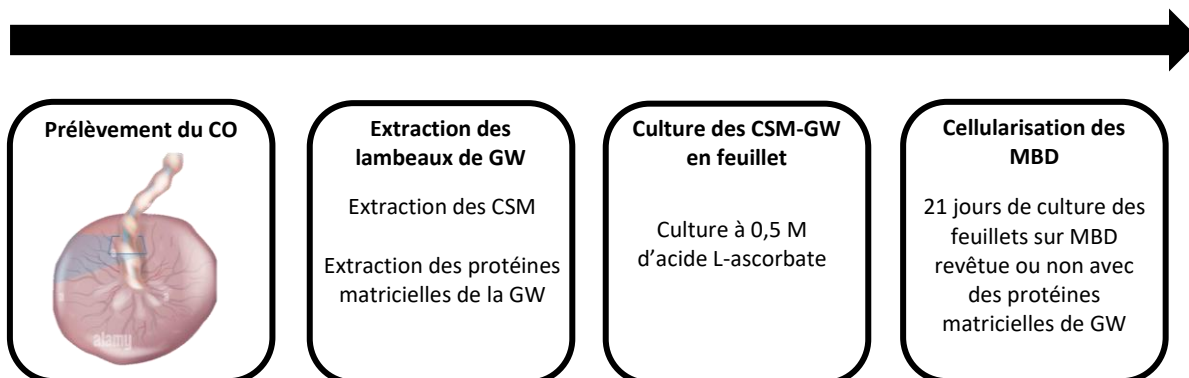


Schéma 5 - Protocole de cellularisation d'une MBD œsophagienne.

A. EXTRACTION ET CARACTÉRISATION DES CELLULES STROMALES DE LA GÉLÉE DE WHARTON

1. Extraction des CSM de la gelée de Wharton et amplification

Les CSM-GW étaient isolées à partir de CO humains²³⁰. Les prélèvements ombilicaux étaient obtenus après délivrance par césarienne, en conditions stériles, et avec le consentement des patientes, au Centre Aliénor d'Aquitaine (Maternité du CHU de Bordeaux), selon la déclaration CODECOH CD-2008-412.

Les prélèvements étaient traités avec de l'héparine sodique 25 000 UI/ 5 mL (Choay, Chéplapharm®), afin d'éliminer la réaction de coagulation du sang au niveau des artères et de la veine ombilicale, et des lavages successifs étaient réalisés au DPBS (Gibco®). Les vaisseaux sanguins ombilicaux étaient exposés de façon à mettre en évidence la GW, qui était délicatement isolée puis rincée dans du DPBS (Gibco®). Les lambeaux de gelée étaient transférés dans des plaques 6 puits, pendant 10 jours dans 3 mL milieu de culture de base : α -MEM (Pan BioTech™) supplémenté à 10% de SVF (Pan BioTech™), et 1% de L-glutamine 200 mM (Sigma-Aldrich®) en atmosphère humide, enrichie avec 5% de CO₂, à 37°C. Le milieu de culture, appelé M1, était changé tous les 3 jours, jusqu'à atteindre la confluence. Les cellules adhérentes au plastique correspondantes aux CSM-GW étaient rincées avec 2 mL/ puits de DPBS (Gibco®) pendant 15 minutes, en changeant de solution tamponnée toutes les 5 minutes. Les cellules étaient détachées par l'action de la trypsine/ EDTA (ATCC®), à une

quantité de 500 µL/ puits, pendant 5 minutes, à 37°C. Une fois décollées, les cellules étaient récupérées dans 2 mL/ puits de milieu de culture M1. La suspension cellulaire était déposée dans un tube Falcon™ 50 mL et centrifugée à 300 g, pendant 5 minutes, à température ambiante. Le culot cellulaire était remis en suspension dans le M1. Les cellules étaient ensuite réensemencées à raison de 300 000 cellules par flasque T75 (Corning™), pour amplification jusqu'au passage 3, avec changement de milieu de culture tous les 3 jours.²³⁰

2. Détection de mycoplasmes par Polymerase Chain Reaction (PCR)

Une recherche de mycoplasme sur les cultures cellulaires de CSM-GW était réalisée par PCR. Une quantité de 1 mL de surnageant de milieu de culture M1 était prélevée une fois la confluence atteinte à un passage 2, et déposée à 94°C pendant 10 minutes puis refroidie sur de la glace. 2 µL de surnageant des échantillons à traiter étaient mixés dans une préparation constituée de : 17,5 µL d'eau de qualité biologie moléculaire, 1,25 µL de DMSO à 100%, 0,5 µL de dNTP 10mM, 0,5 µL de *primer* GPO3 10µM, 0,5 µL de *primer* MGSO 10 µM, 2,5 µL de Dream Taq Buffer 10X, et 0,25 µL de Dream Taq Polymérase (200U/ µL). Une fois la préparation déposée dans une plaque qPCR, une étape de centrifugation pendant 3 secondes était effectuée. La plaque qPCR était ensuite déposée dans un thermocycleur (Bio-Rad Laboratories©, Inc., CFX96), pour un cycle de polymérisation à 95°C pendant 5 minutes, puis 40 cycles comme suit : 94°C pendant 30 secondes, 55°C pendant 30 secondes, 72°C pendant 1 minute. Après ces 40 cycles, et une dernière étape de 10 minutes à 72°C, 10 µL des échantillons amplifiés étaient prélevés et déposés dans une solution de 2 µL de tampon de charge à 6X. Les échantillons étaient ensuite déposés sur un gel d'agarose qui était préparé à 1,5% dans un tampon TAE à 0,5X contenant du GelRed™ à une concentration finale 1X permettant la migration des échantillons par électrophorèse. La révélation des bandes sur le gel après leur migration était obtenue sur une table UV.

3. Caractérisation du profil stromal des CSM de la gelée de Wharton par cytométrie en flux

Le phénotype des CSM-GW était confirmé par la méthode de cytométrie en flux (BD Accuri™, C6 Plus Flow). Les CSM-GW étaient caractérisées aux passages 3 et 6. Pour cela, 50 µL de suspension cellulaire contenant 2×10^5 cellules dans du DPBS (Gibco©) supplémenté à 2% de

SVF (Pan BioTech™) étaient déposés dans des tubes Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS). Les marqueurs positifs des CSM sélectionnés étaient les anticorps anti-CD90-APC (Abcam®, ab139364), anti-CD73-APC (Abcam®, ab106675), et anti-CD105-FITC (Abcam®, ab18278), et les marqueurs négatifs concernaient les anticorps anti-CD45-PE (Biolegend®, IgG1, 304008), anti-CD86-PE (Biolegend®, IgG2b, 305406) et anti-HLA-DR-PC7 (Beckman Coulter, Inc®; B49180). Ces marqueurs étaient définis par la ISCT. Les tubes FACS étaient répartis selon : (1) non-marqué (NM) ; (2) anti-CD90-APC ; (3) anti-CD73-APC ; (4) anti-CD105-FITC ; (5) anti-CD45-PE ; (6) anti-CD86-PE ; (7) anti-HLA-DR-PC7. Pour un volume final de 50 µL de solution, 0,5 µL d'anticorps étaient dilués dans 49,5 µL de DPBS (Gibco®) à 2% SVF (Pan BioTech™), et déposés dans les tubes FACS correspondants (un tube par type d'anticorps). Les suspensions cellulaires et les solutions d'anticorps étaient homogénéisées et incubées pendant 30 minutes à l'obscurité et à 4°C. Les cellules étaient rincées dans 2 mL de DPBS (Gibco®) à 2% SVF (Pan BioTech™) puis centrifugées pendant 5 minutes, à 300 g et à température ambiante. Un second rinçage était réalisé, et le culot cellulaire re-suspendu dans 300 µL de DPBS (Gibco®) à 2% SVF (Pan BioTech™).²³⁰ Après un passage au cytomètre en flux (BD Accuri™, C6 Plus Flow), les données étaient traitées sur le logiciel d'analyse CFlowPlus.²³⁰

4. Caractérisation du profil immuno-privilégié des CSM de la gelée de Wharton

L'analyse du phénotype immunitaire des CSM-GW permettait d'identifier l'expression du HLA-DR. Ensuite, une co-culture des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) avec les CSM-GW permettait d'évaluer les interactions cellulaires ainsi que la caractérisation phénotypique des PBMC en réponse à cette interaction.

Parallèlement, la libération d'un marqueur significatif d'une réponse immunitaire spécifique dans le sécrétome, l'interféron gamma (IFN-γ), était mesurée.

4.1 Phénotypage des antigènes d'histocompatibilité par cytométrie en flux

Un typage des antigènes d'histocompatibilité permettait de caractériser le profil immuno-privilégié des CSM-GW au passage 3 et au passage 6. Une quantité de 2.5×10^5 cellules était re-suspendue dans 500 µL de tampon DPBS à 0,5% d'albumine de sérum bovin (BSA), supplémenté avec 2 mM d'EDTA. La suspension cellulaire était séparée dans 5 tubes FACS à

raison de 100 μ L par tubes. Les marqueurs utilisés correspondaient à l'anticorps anti-HLA-ABC-BV510 (Fischer Scientific™, 15871666), à l'isotype anti-HLA-ABC (Fischer Scientific™, 15420501) et à l'anti-HLA-DR-PC7 (Beckman Coulter, Inc©; B49180). Les tubes FACS étaient répartis selon: (1) NM ; (2) Fluorescent Minus One DR (FMO-DR) : anti-HLA-ABC-BV510 ; (3) Isotype anti-HLA-ABC-BV510/anti-HLA-DR-PC7 ; (4) anti-HLA-ABC-BV510/anti-HLA-DR-PC7 ; (5) anti-HLA-ABC-BV510/anti-HLA-DR-PC7. Le tube FACS (4) contenant la suspension cellulaire était incubé en amont pendant 10 minutes avec 5 μ L de Fc-Block (BD Biosciences™, AB-2728082), afin de bloquer les récepteurs Fc présents sur les cellules, pouvant induire un marquage aspécifique. Une quantité de 3 μ L d'anticorps anti-HLA-ABC-BV510, 3 μ L d'isotype anti-HLA-ABC et 2 μ L d'anti-HLA-DR-PC7 était déposée dans les tubes FACS correspondants. Après une incubation à l'obscurité pendant 15 minutes et à température ambiante, les cellules étaient rincées avec 1 mL de DPBS (Gibco ©), puis centrifugées à 300 g pendant 5 minutes et à température ambiante. Le culot cellulaire était re-suspendu dans 200 μ L de DPBS à 0,5% BSA, supplémenté avec 2 mM EDTA. Un marqueur de viabilité cellulaire : le 7-AAD (BD Biosciences™, 559925) complétait les tubes (2), (3), (4) et (5). L'analyse du phénotype immuno-privilegié des CSM-GW était réalisée par cytométrie en flux (BD FACS Canto™ II).

4.2 Co-culture des CSM issues de la gelée de Wharton avec des cellules périphériques mononucléées du sang

L'expression des marqueurs de la réponse immunitaire *in vitro* des PBMC au contact des CSM-GW était évaluée. Les CSM, ou « effecteurs », étaient amplifiées et analysées au passage 3 ainsi qu'au passage 6.

Préparation des PBMC : Les PBMC, ou « répondeurs », étaient isolées à partir de sang recueilli à l'établissement Français du sang (EFS). La séparation des PBMC était réalisée, à partir d'un prélèvement de sang de 5 mL, et dilué au ½ dans du DPBS (Gibco©). Une solution de Ficoll était préparée dans un tube Falcon™ de 15 mL à raison de 1 volume de Ficoll pour 2 volumes de sang total dilué. Le sang dilué était versé délicatement sur le Ficoll, le mélange était centrifugé à 700 g, pendant 20 minutes, à température ambiante, avec un frein ainsi qu'une accélération programmés à 3. Une fois le surnageant retiré, l'anneau des PBMC était récupéré et déposé dans un tube Falcon™ de 15 mL. La suspension cellulaire de PBMC était rincée dans

15 mL de DPBS (Gibco©) et centrifugée à 700 g pendant 10 minutes, à température ambiante, avec un frein et une accélération programmés à 9. Le culot cellulaire était re-suspendu dans 1 mL de solution d'Ammonium-Chloride-Potassium (ACK) composée de NH_4Cl à 155 mM, de $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ à 100 μM et de KHCO_3 à 10 mM, afin de lyser les globules rouges. Une quantité de 4 mL d'ACK venait compléter la suspension cellulaire de PBMC, qui était incubée pendant 5 minutes, à température ambiante. Les PBMC étaient ensuite rincées avec 15 mL de DPBS (Gibco©) et centrifugées à 700 g pendant 10 minutes, à température ambiante avec un frein et une accélération programmés à 9. Le culot cellulaire était re-suspendu dans 15 mL de DPBS (Gibco©) et une dernière centrifugation à 1 500 RPM, pendant 10 minutes, à température ambiante, avec un frein et une accélération programmés à 9 était réalisée. La quantité de PBMC nécessaire était de 8×10^6 de cellules à mettre en suspension dans 2 mL de Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI), supplémenté à 10% SVF, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Pénicilline, 1 U/ mL de Streptomycine, et 1 mM de glutamine.

Préparation et ensemencement des CSM issues de la gelée de Wharton : Une quantité de 8×10^5 de CSM-GW aux différents passages était re-suspendue dans 400 μL de RPMI supplémenté à 10% SVF, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Pénicilline, 1 U/ mL de Streptomycine, et 1 mM de glutamine, et ensemencée dans une plaque 48 puits. L'ensemencement cellulaire consistait à créer un ratio de 1:1 et de 1:2 pour les CSM (dits « effecteurs ») et les PBMC (dits « répondeurs »), respectivement. Une suspension cellulaire de 2×10^5 CSM-GW contenue dans 100 μL de RPMI supplémenté à 10% SVF, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Pénicilline, 1 U/ mL de Streptomycine, et 1 mM de glutamine était déposée dans les puits 1:1 alors qu'une suspension de 1×10^5 CSM-GW contenue dans 50 μL de RPMI supplémenté à 10% SVF, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Pénicilline, 1 U/ mL de Streptomycine, et 1 mM de glutamine était déposée dans les puits 1:2. Le temps d'incubation était de 4 heures en atmosphère humide enrichie avec 5% de CO_2 à 37°C.

Ensemencement des PBMC : Une fois les CSM-GW adhérentes au plastique de la plaque 48 puits, les PBMC étaient ajoutées à raison de 2×10^5 cellules dans 50 μL de RPMI supplémenté à 10% SVF, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Pénicilline, 1 U/ mL de Streptomycine, et 1 mM de glutamine. La quantité de volume totale était ajustée dans chacun des puits à 300 μL de milieu RPMI supplémenté à 10% SVF, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Pénicilline, 1 U/ mL de Streptomycine, et 1 mM de glutamine. Le temps d'incubation était de 12 heures en atmosphère humide enrichie avec 5% de CO_2 à 37°C.

Contrôle négatif : 2 puits isolés étaientensemencés avec 2×10^5 de PBMC dans 50 μL de RPMI supplémenté à 10% SVF, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Pénicilline, 1 U/ mL de Streptomycine, et 1 mM de glutamine. La quantité de volume total était ajustée dans chacun des puits à 300 μL . Le temps d'incubation était de 12 heures en atmosphère humide enrichie avec 5% de CO_2 à 37°C.

Contrôle positif : 8 puits isolés étaientensemencés avec 2×10^5 cellules dans 50 μL de RPMI supplémenté à 10% SVF, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Pénicilline, 1 U/mL de Streptomycine, et 1 mM de glutamine. La quantité de volume total était ajustée dans chacun des puits à 300 μL . Le temps d'incubation était de 12 heures en atmosphère humide enrichie avec 5% de CO_2 à 37°C. 4 heures avant la fin de l'incubation, les puits contrôles contenant les PBMC étaient stimulés avec 3 μL de milieu de culture RPMI contenant 25 ng/ mL Phorbol Myristate Acetate (PMA, Sigma-Aldrich®) ainsi qu'1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ionomycine (Iono, Sigma-Aldrich®).

Phénotypage des PBMC : Après 12 heures d'incubation en atmosphère humide enrichie avec 5% de CO_2 et à 37°C, la plaque 48 puits était centrifugée à 1 500 RPM pendant 5 minutes, à température ambiante. Une quantité de 200 μL de surnageant était récupérée délicatement, et congelée à -20°C. Ces échantillons étaient utilisés dans une étude, permettant de doser les cytokines – se référer au paragraphe *Ch.2. II. A. 4.3*. Une fois le surnageant récupéré, 300 μL de DPBS supplémenté à 2% de SVF étaient ajoutés dans tous les puits de façon à re-suspendre et décoller les CSM-GW et les PBMC ayant adhéré. Chacune des suspensions cellulaires récupérées était répartie en 5 tubes FACS comme suit : (1) PBMC non stimulés – 2 puits ; (2) PBMC stimulés – 2 puits ; (3) 1:1 ; (4) 1:2 ; (5) PBMC stimulés – 6 puits. Les tubes FACS (1), (2), (3) et (4) étaient complétés de 500 μL de DPBS supplémenté à 2% SVF et centrifugés à 1 800 RPM, pendant 5 minutes, à température ambiante. Le culot cellulaire était ensuite re-suspendu dans 100 μL de DPBS à 0,5% de BSA et à 2 mM EDTA. Les marqueurs utilisés concernaient le 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI), et les anticorps anti-CD3-APC (BD Biosciences™, 559925), anti-CD4-FITC (Beckman Coulter, Inc©, 6602393), anti-CD25-PC5 (Beckman Coulter, Inc©, IM2646), anti-CD69-PE (Beckman Coulter, Inc©, IM1943U), et l'anti-HLA-DR-PC7 (Beckman Coulter, Inc©, B49180). Une solution d'anticorps contenant : 2 μL de DAPI + 6 μL d'anti-CD3-APC+ 4 μL d'anti-CD4-FITC + 5 μL d'anti-CD25-PC5+ 5 μL d'anti-CD69-PE + 2 μL d'anti-HLA DR-PC7 était ajoutée aux tubes (1) à (4). La suspension cellulaire

contenant les PBMC stimulés du tube (5) était quant à elle, re-suspendue dans 900 µL de DPBS à 0,5% de BSA et à 2 mM EDTA et répartie en 9 tubes FACS (notés de A à I). Les marqueurs étaient ajoutés aux suspensions cellulaires comme suit : (A) NM ; (B) 2 µL de DAPI (dilué au 1/100) ; (C) 6 µL d'anti-CD3-APC ; (D) 4 µL d'anti-CD4-FITC ; (E) 5 µL d'anti-CD25-PC5 ; (F) 5 µL d'anti-CD69-PE ; (G) 2 µL d'anti-HLA-DR-PC7 ; (H) FMO CD69 (2 µL de DAPI + 6 µL d'anti-CD3-APC + 4 µL d'anti-CD4-FITC + 5 µL d'anti-CD25-PC5 + 2 µL d'anti-HLA-DR-PC7) ; (I) FMO CD25 (2 µL de DAPI + 6 µL d'anti-CD3-APC + 4 µL d'anti-CD4-FITC + 5 µL d'anti-CD69-PE + 2 µL d'anti-HLA DR-PC7). Les tubes FACS étaient homogénéisés puis incubés pendant 15 minutes à l'obscurité et à température ambiante. Les tubes étaient ensuite complétés avec 1 mL de solution de DPBS à 0,5% de BSA et à 2mM EDTA et centrifugés à 1 800 RPM pendant 5 minutes, à température ambiante. Le culot cellulaire était re-suspendu dans 200 µL de BD-Fix™ 1X. L'analyse du phénotype des PBMC était réalisée par cytométrie en flux (BD LSR Fortessa™).²²⁷

4.3 Dosage du relargage l'IFN-γ

L'IFN-γ est une cytokine majeure produite par les LT et les cellules NK en réponse à des stimuli immunitaires. La mesure de l'IFN-γ permettait de prédire de l'activation du système immunitaire au contact des CSM-GW, en orientant l'analyse par une activation des LT CD4+ et des cellules NK. La quantification de l'IFN-γ nous permettait de déterminer si la réponse induite par les CSM-GW favorisait une réponse immunitaire spécifique.

Le relargage de l'IFN-γ par les PBMC au contact des CSM-GW (P3 et P6) après 12 heures d'incubation était quantifié selon un dosage d'immuno-absorption enzymatique (ELISA, kit IFN- γ humain, Fischer Scientific™) de type sandwich. Une quantité de 200 µL de surnageant issu des co-cultures des PBMC (ou « répondeurs ») au contact des CSM-GW (ou « effecteurs ») était récupérée après 12 heures d'incubation en atmosphère humide enrichie avec 5% de CO₂ et à 37°C. Les surnageants étaient stockés à -20°C.

Préparation des séries de dilution de l'IFN-γ : Afin d'obtenir une solution à une concentration initiale d'IFN-γ de 5 000 pg/ mL, l'IFN- γ lyophilisé était reconstitué dans un volume de tampon de dilution, et homogénéisé délicatement. L'IFN-γ reconstitué était dilué en série, dans le milieu de culture M1. Des tubes de solution d'IFN-γ reconstituée étaient préparés et annotés : (1) 1000 pg/ mL ; (2) 500 pg/ mL ; (3) 250 pg/ mL ; (4) 125 pg/ mL ; (5) 62,5 pg/ mL ; (6) 31,2

pg/ mL ; (7) 15,6 pg/ mL ; (8) 0 pg/ mL. Dans le tube (1) un volume de 400 µL de milieu de culture était ajouté, alors qu'un volume de 150 µL était déposé dans les tubes (2) à (8). Une quantité de 100 µL de solution d'IFN-γ reconstituée à 5 000 pg/ mL était déposée dans le premier tube (1). Après homogénéisation de la solution d'IFN-γ diluée dans le milieu de culture de base, 150 µL de la solution mixée étaient ajoutés dans le tube (2), le procédé était répété du tube (2) à (3) ; (3) à (4) ; (4) à (5) ; et ce, jusqu'au tube (7).

Dosage de l'IFN-γ relargué par les PBMC selon la méthode ELISA de type sandwich : Dans une plaque de 96 puits revêtue d'anticorps anti-biotine, étaient déposés 50 µL/ puits de tampon d'incubation, auxquels étaient ajoutés 50 µL/ puits de solution d'IFN-γ reconstituée préalablement diluée, et 50 µL/ puits de surnageants de culture cellulaire. Avant une incubation à température ambiante, pendant 1 heure et 30 minutes, un volume de 50 µL/ puits d'IFN-γ conjugué à la biotine était déposé. A l'issue de l'incubation, les puits étaient rincés à 4 reprises au DPBS 1X. Une solution de streptavidine HRP à 1X était préparée, et déposée selon un volume de 100 µL/ puits, et une seconde incubation à température ambiante, pendant 45 minutes était réalisée. A l'issue de l'incubation, les puits étaient rincés à 4 reprises au DPBS, et une quantité de 100 µL/ puits d'un substrat de chromogène stabilisé, le 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) était ajoutée. Une dernière incubation à l'obscurité, et à température ambiante pendant 30 minutes était réalisée avant d'ajouter la solution stop à raison de 100 µL/ puits. L'intensité du signal colorimétrique était mesurée à 450 nm et était directement proportionnelle à la concentration d'IFN-γ présent dans le surnageant issu des co-cultures de PBMC et de CSM-GW. ²²⁷

5. Extraction des protéines matricielles issues de la gelée de Wharton et revêtement des MBD

5.1 Extraction des collagènes et des GAG de la gelée de Wharton

L'utilisation des protéines matricielles telles que les collagènes et les GAG de la gelée de Wharton permettait selon les études de Fayon *et al.*, de favoriser la prolifération cellulaire. L'extraction de ces protéines était réalisée à partir des CO humains. Afin de limiter la variabilité interindividuelle, l'extraction des protéines matricielles était réalisée à partir d'un pool de 3 donneurs de CO. La gelée de Wharton était disséquée puis découpée en lambeaux à l'aide d'un scalpel. Les lambeaux étaient rincés à 2 reprises dans du DPBS (Gibco©) puis congelés à

sec, dans un tube Flacon™ 50 mL, à -80°C jusqu'à leur utilisation. La décongélation des lambeaux de GW était réalisée à température ambiante, de façon à ne pas altérer les collagènes présents. Une étape de lavage des lambeaux de gelée de Wharton à température ambiante dans du DPBS (Gibco™) à 1% de Triton™ (Sigma-Aldrich®) était réalisée. Après une centrifugation à 3 000 g, pendant 5 minutes, à température ambiante, les lambeaux de gelée de Wharton étaient de nouveau rincés dans une solution de DPBS (Gibco©) à 1% de Triton™ (Sigma-Aldrich®), puis centrifugés. Une seconde étape de lavage des lambeaux en DPBS (Gibco©) à 1% de Triton™ (Sigma-Aldrich®) était de nouveau appliquée mais en modifiant la température de la centrifugeuse à 37°C. Les lambeaux de GW étaient rincés trois fois à l'eau milliQ stérile et les rinçages étaient entrecoupés par des centrifugations à 3 000 g, pendant 5 minutes, à température ambiante. Une proportion d'un volume de lambeaux de GW était immergée dans deux volumes d'acide acétique à 0,5 M. Afin d'augmenter la surface de contact avec la solution d'acide acétique 0,5 M (Sigma-Aldrich®), mais également de favoriser l'extraction des protéines matricielles, les lambeaux de GW étaient placés sur de la glace et un broyage des lambeaux était réalisé avec un homogénéiseur Polytron®. La solution obtenue était ensuite incubée pendant 12 heures, à 4°C, et sur une plaque agitatrice. A l'issue de l'incubation, la solution était centrifugée pendant 30 minutes à 10 000 g, à 4°C. Le surnageant obtenu contenant les protéines matricielles extraites était conservé à -20°C.^{230,252}

5.2 Exposition de la MBD aux protéines matricielles issues de la gelée de Wharton

Les MBD préalablement préparées sous forme de patch de 1 cm² étaient déposées dans une plaque de 24 puits. La surface luminale de la MBD était mise en évidence. Les MBD étaient immergées pendant 24 heures à 37°C, dans une solution de 3 mL contenant les protéines matricielles extraites. Les MBD revêtues (MBDc) étaient ensuite rincées avec du DPBS (Gibco©) afin d'éliminer l'acide acétique 0,5 M résiduel.^{230,252}

B. FEUILLETS CELLULAIRES DE CSM DE LA GÉLÉE DE WHARTON

1. Culture et production des feuillets cellulaires

Après amplification et caractérisation, les CSM-GW étaientensemencées à un passage 3 dans une plaque 6 puits. Différentes conditions étaient testées afin d'obtenir un feuillet cellulaire

résistant et manipulable, capable de cellulariser les MBD. Des densités d'ensemencement, des durées de culture ainsi que des milieux de culture différents étaient testés.

Tout d'abord, les CSM-GW étaientensemencées à des densités de 13×10^3 cellules.cm⁻² et de 30×10^3 cellules.cm⁻². Les durées de culture variaient entre 2, 4 et 6 semaines. Les milieux de culture testés correspondaient au milieu M1, ou alors, au milieu du DMEM/F12 (Gibco©) supplémenté avec 20% de SVF (10% SVF, Hyclone™ + 10% SVF, Eurobio-Scientific©), appelé M2. Une fois les CSM-GW ensemencées dans 3 mL de milieu de culture, des clamps circulaires en inox stériles étaient déposés dans les puits, et les plaques incubées en atmosphère humide, enrichie avec 5% de CO₂, à 37°C. Les milieux de culture étaient changés tous les 3 jours, jusqu'à atteindre 80% de la confluence où ils étaient alors complétés avec 0,5 mM de sodium L-ascorbate (Sigma-Aldrich®), afin de permettre aux CSM-GW de produire de la MEC pendant 2, 4 ou 6 semaines.

L'analyse des feuillets cellulaires était réalisée par études histologiques afin de vérifier la qualité du feuillet, la densité de MEC produite, et l'orientation des cellules dans le feuillet, selon les différentes conditions de culture testées. Les feuillets cellulaires étaient également analysés selon une étude mécanique, après 2, 4 et 6 semaines de culture.

2. Analyses histologiques des feuillets cellulaires

Les échantillons en plaque 6 puits des feuillets cellulaires de CSM-GW produits selon les différentes conditions de culture étaient immergés dans 3 mL de PFA à 4%, (VWR™) pendant 48 heures et à 4°C. L'analyse histologique était réalisée après déshydratation, inclusion, et coupe de 6 µm. Les échantillons étaient disposés dans l'automate MYREVA SS30, (Microm Microtech©) afin de réaliser une coloration HES – se référer au paragraphe *Ch.1 – II. B. 1.1.*

3. Caractérisation mécanique des feuillets cellulaires

Une évaluation de la résistance mécanique des feuillets cellulaires de CSM-GW était réalisée par perforation afin de déterminer la densité d'ensemencement, la durée de culture ainsi que le milieu de culture qui permettaient d'obtenir un feuillet cellulaire manipulable et résistant pour une cellularisation de la MBD. Le feuillet cellulaire était installé sur un boîtier de

perforation et le centre du feuillet était pénétré par une sonde sphérique de Téflon® de 9 mm de diamètre avec une vitesse de 20 mm.min⁻¹ (Shimadzu Autograph AGS-X series©, 100 N). La force maximale de résistance à la perforation (gf) a été recueillie à l'aide du logiciel Trapezium X. Les résultats obtenus étaient analysés statistiquement à l'aide du logiciel GraphPad (Prism8, Dotmatics©), par un T-test bilatéral, non apparié, afin de représenter la moyenne ± l'écart type. La différence était significative lorsque $p < 0,05$.²⁵³

4. Etude de la viabilité cellulaire des feuillets par Live/Dead

Un test de viabilité cellulaire par Live/Dead (L/D, ThermoFisher™, L3224, Viability/Cytotoxicity Kit) des CSM-GW en feuillet était réalisé après 2 semaines de culture en sodium L-ascorbate (Sigma-Aldrich®). Une solution de L/D composée de 2% d'homodimer-1-d'éthidium (EthD-1, ThermoFisher™) et de 0.05% d'acétoxyméthyl calcéine (AM, ThermoFisher™) était préparée dans un volume de M2 et incubée au bain marie à 37°C pendant 15 minutes. Le feuillet cellulaire cultivé en plaque 6 puits était rincé avec une solution de DPBS (Gibco©) et recouvert de 700 µL de solution de L/D préalablement chauffée. Les plaques étaient ensuite incubées en atmosphère humide, enrichie avec 5% de CO₂, pendant 15 min à 37°C. Le colorant non fluorescent AM était transformé par l'activité estérase intracellulaire en calcéine fluorescente par les cellules vivantes et l'EthD-1 pénétrait les cellules dont les membranes étaient lésées. La fluorescence était observée en microscopie confocale et une quantification des cellules était réalisée sur le logiciel Fiji.

5. Caractérisation du profil stromal et du maintien du phénotype des cellules en feuillets par imagerie

Pour confirmer le phénotype des CSM-GW après 2, 4 et 6 semaines de culture sous forme de feuillets, les échantillons étaient immergés dans 3 mL de PFA à 4% (VWR™), pendant 48 heures à 4°C. L'analyse histologique était réalisée après déshydratation, inclusion, et coupe de 5 µm d'épaisseur. Les échantillons étaient déposés dans l'automate MYREVA SS30, (Microm Microtech©) afin de réaliser les premières étapes de déparaffinage et réhydratation. Un démasquage des sites des antigènes au PT-link (Dako, PT200©) était réalisé selon un pH 6 ou 9, afin de faciliter le marquage des anticorps primaires, sauf pour l'anticorps anti-CD90 (Abcam©, ab181469) qui ne nécessitait pas de d'étape de démasquage. L'anticorps anti-CD73

(Diagomics©, BSB3716-01) et l'anti-CD45 (Diagomics©, BSB5249) étaient utilisés à pH 6. Alors que l'anticorps anti-CD105 (Abcam©, ab252548-1001) l'anticorps anti-CD86 (Abcam©, ab234000) et l'anti-HLA-DR (Abcam©, ab92511) étaient utilisés à pH 9. Les anticorps primaires étaient utilisés au 1/200 pour l'anticorps anti-CD90, au 1/125 pour l'anti-CD73, au 1/250 pour l'anti-CD45, au 1/10 pour l'anti-CD105, au 1/50 pour l'anti-CD86 et au 1/1000 pour l'anti-HLA-DR. Le marquage secondaire utilisé était le polymère HRP (Zytochem Plus HRP One Step Polymer ©, kit anti-mouse/rabbit) et la révélation des marqueurs était permise après une incubation à l'AEC (Diagomics ©, Zytomed).

Une coloration au Bleu Alcian, ainsi qu'au VK était également réalisée – se référer au paragraphe *Ch.1 – II. B. 4.1.2.*

C. CELLULARISATION DE LA MBD PAR LES FEUILLETS CELLULAIRES DE CSM DE GÉLÉE DE WHARTON

1. Ensemencement des feuillets cellulaires de CSM sur les MBD et les MBD revêtues pendant 4, 8 et 21 jours

Les MBD étaient préalablement préparées sous forme de patch de 1 cm² et déposées dans une plaque de 24 puits, ainsi que les MBD exposées aux protéines matricielles issues de la GW. Les feuillets de CSM-GW, cultivés pendant 2 semaines dans du M2 complété à 0,5 mM de sodium L-ascorbate (Sigma-Aldrich®), étaient ensemencés sur les surfaces lumineuses des MBD et MBDc. Une bague de verre stérile était déposée sur le feuillet afin de créer et de maintenir un contact avec la surface de l'échantillon pendant les 8 premiers jours de culture. Les échantillons cellularisés étaient déposés dans une nouvelle plaque 24 puits après 14 jours de culture, afin d'éviter la prolifération des cellules sur le plastique. Le milieu de culture était changé tous les 3 jours, la durée de culture des échantillons ensemencés variait entre 4, 8 et 21 jours.

2. Observation de la cellularisation des CSM en feuillet sur les MBD par histologie

Il s'agissait ici de vérifier la qualité de la cellularisation de la MBD et de la MBDc, selon la présence des CSM-GW, l'orientation des cellules ainsi que la prolifération et la migration

cellulaire au sein des différentes couches histologiques selon les temps de culture 4, 8 et 21 jours.

Pour cela, la coloration au TM était adaptée. – se référer au paragraphe *Ch.1 – II. B. 1.1.*

3. Caractérisation du profil stromal et du maintien du phénotype des cellules en feuillets ensemencés sur les MBD après 21 jours par imagerie

Pour confirmer le phénotype des CSM-GW après 4, 8 et 21 jours de culture sur les MBD, les échantillons étaient immergés dans 20 mL de PFA à 4% (VWR™), pendant 48 heures à 4°C. L'analyse histologique était réalisée après déshydratation, inclusion, et coupe de 5 µm – se référer au paragraphe *Ch.2. II. B. 5.*

Une coloration au Bleu Alcian, ainsi qu'au VK était également réalisée – se référer au paragraphe *Ch.1. II. B. 4.1.2.*

4. Etude de la viabilité des feuillets de CSM sur les MBD après 21 jours par L/D

Un test de viabilité cellulaire par L/D (ThermoFisher™, L3224, Viability/Cytotoxicity Kit) des CSM-GW était réalisé pour les feuillets cellulaires cultivés pendant 21 jours sur les MBD, en plaques 24 puits. Une solution de L/D composée de 2% d'EthD-1(ThermoFisher™) et de 0.05% d'AM (ThermoFisher™) était préparée dans un volume de M2 et incubée pendant 15 minutes à 37°C. L'échantillon était immergé dans 1 mL de solution de L/D et incubé pendant 15 min en atmosphère humide, enrichie avec 5% de CO₂, à 37°C. La fluorescence était observée en microscopie confocale et une quantification des cellules étaient réalisée sur le logiciel Fiji.

III. RÉSULTATS

1. Confirmation du profil stromal des CSM issues de la gelée de Wharton

La caractérisation du phénotype des CSM-GW obtenues après extraction et amplification (P3 à P6) par cytométrie en flux a permis d'évaluer la pureté de chaque suspension cellulaire. Les résultats présentés ci-dessous concernaient le donneur COe à P3, et le donneur COd à P6. Les cellules sont caractérisées selon les marqueurs positifs : CD90, CD73 et CD105.

Pour un donneur de CO spécifique, le COe, à P3, le CD90 est exprimé à 100% par les CSM-GW. C'est une protéine transmembranaire impliquée dans divers processus cellulaires, notamment dans l'adhérence, la signalisation, et la régulation de la croissance. Le CD73 est présent à la surface des cellules et permet la régulation du système immunitaire, il est exprimé à 86,6% par les CSM-GW. Le CD105 est une glycoprotéine transmembranaire impliquée dans la régulation de la croissance et de la différenciation cellulaire ; elle objective une expression de 71,4% par les CSM-GW. (Fig. 40)

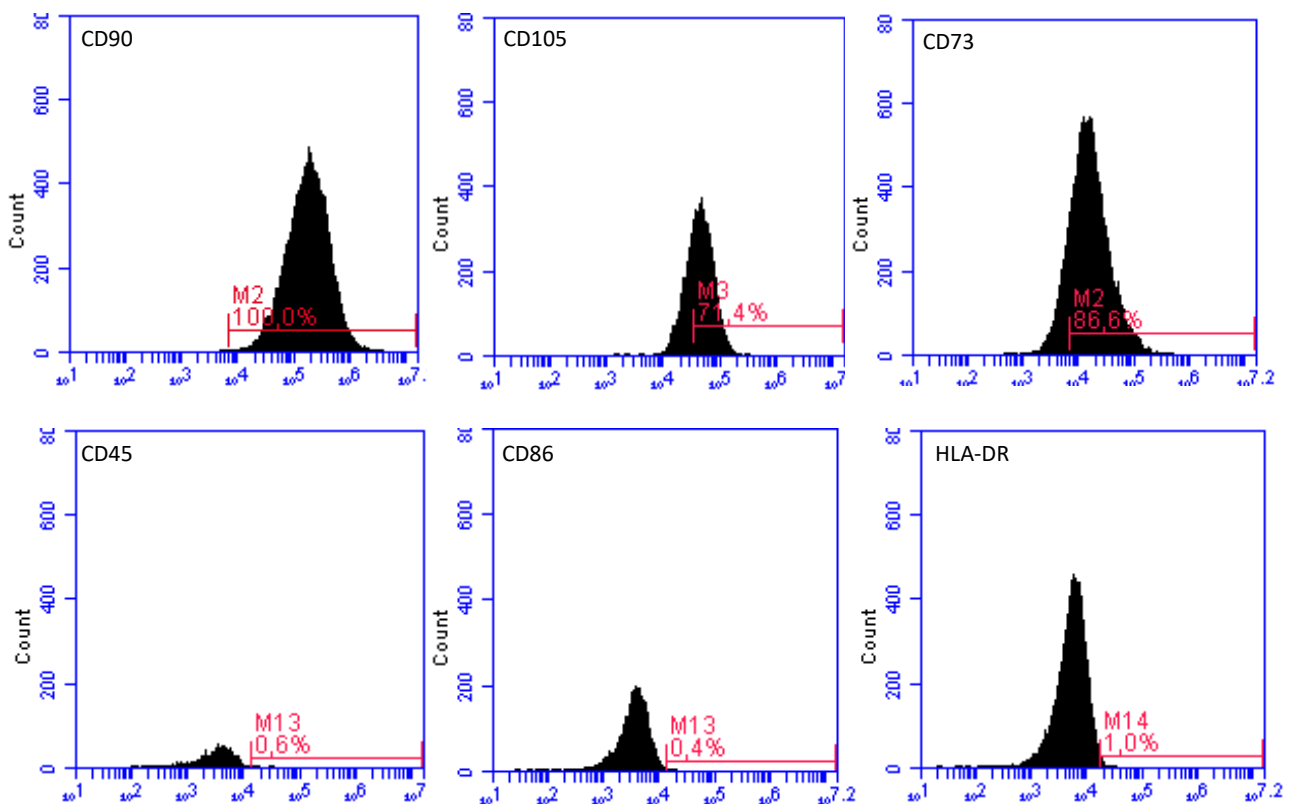


Figure 40 - Phénotypage des CSM-GW du COe à P3 par cytométrie en flux selon l'expression des marqueurs anti-CD90, anti-CD105, anti-CD73, anti-CD45, anti-CD86 et anti-HLA-DR.

Les marqueurs négatifs utilisés sont les CD45, CD86 et HLA-DR. Le CD45 est une protéine transmembranaire exprimée à la surface des leucocytes, permettant l'activation des cellules immunitaires et la modulation de la réponse immunitaire. Le CD45 est présent selon une proportion de 0,6% dans la population cellulaire donnée. Le CD86 est exprimé à 0,4% par les CSM-GW. C'est une protéine de surface des CPA impliquée dans la régulation de l'immunité adaptative. Enfin, le HLA-DR est également présent à la surface des CPA. Il joue un rôle essentiel dans l'activation de la réponse immunitaire adaptative, il n'est exprimé qu'à 1% dans la population cellulaire. (Fig. 40)

Les marqueurs positifs du COd à P6 étaient exprimés à 100% pour le marqueur anti-CD90, à 61,3% pour le marqueur anti-CD105 et à 91,1% pour le marqueur anti-CD73. Une diminution de l'expression de l'anti-CD105 était observée à P6 par rapport à P3. Les marqueurs négatifs (anti-CD45, anti-CD86 et anti-HLA-DR) n'étaient pas exprimés. (Fig. 41)

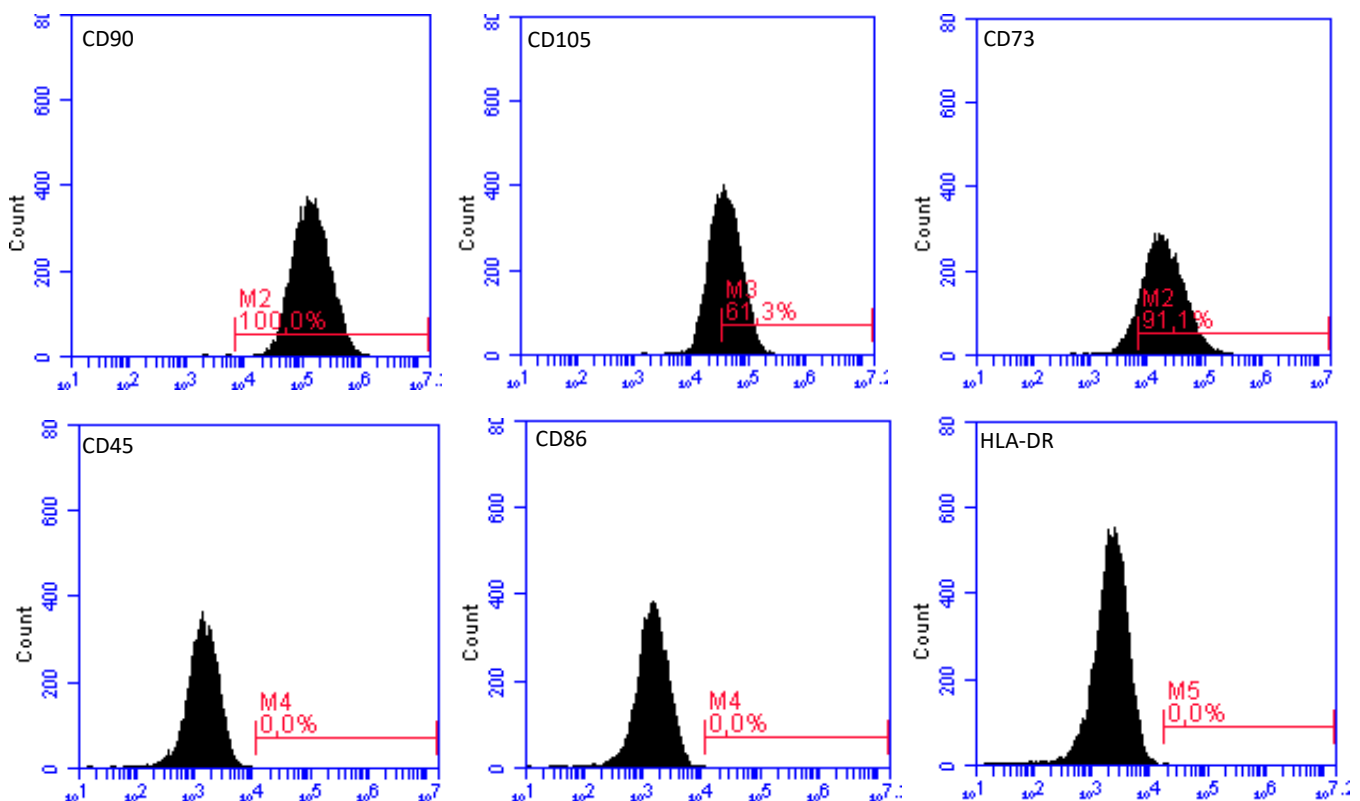


Figure 41 – Phénotypage des CSM-GW du COd à P6 par cytométrie en flux selon l'expression des marqueurs anti-CD90, anti-CD105, anti-CD73, anti-CD45, anti-CD86 et anti-HLA-DR.

Les cellules exprimaient les marqueurs positifs à P3 et à P6, avec une diminution de l'expression du marqueur anti-CD105. Egalement, les marqueurs négatifs n'étaient pas exprimés par les cellules, confirmant leur profil phénotypique de CSM.

2. Confirmation du profil immuno-privilégié des CSM issues de la gelée de Wharton

2.1 Phénotypage du profil immuno-privilégié des CSM par cytométrie en flux

Les marqueurs utilisés pour le phénotypage immuno-privilégié des CSM-GW sont l'anticorps anti-HLA-ABC et anti-HLA-DR. Ces marqueurs jouent un rôle essentiel dans la réaction immunitaire adaptative. Les CSM-GW ne sont généralement pas connue pour exprimer le HLA-DR à des niveaux élevés. Cependant, l'expression du HLA-DR peut être influencée par différents facteurs comme les conditions de cultures cellulaires.

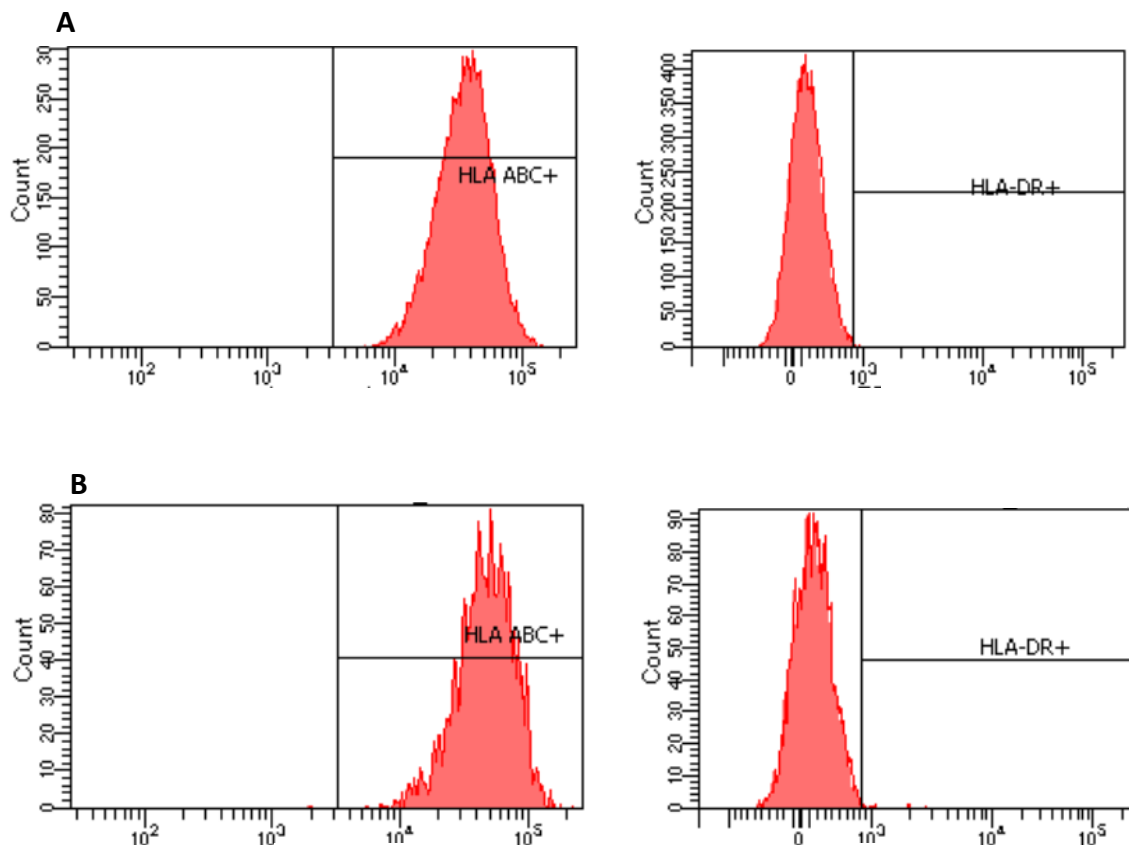


Figure 42 - Phénotypage du profil immuno-privilégié des CSM-GW selon les marqueurs anti-HLA-ABC et anti-HLA-DR, par cytométrie en flux.

A : CSM-GW au passage P3 B : CSM-GW au passage P6.

Pour un donneur COg, à P3 les CSM présentaient un phénotype HLA-ABC positif avec 99,9% d'expression, et un phénotype HLA-DR exprimé à 0,2%. A P6, le HLA-ABC était exprimé à 99,9% par les CSM, et le HLA-DR était exprimé à 0,7%. (Fig. 42)

Les CSM expriment fortement le HLA-ABC à P3 et à P6. L'absence d'expression du HLA-DR est confirmée jusqu'à P6.

2.2 Caractérisation du profil immuno-privilegié des CSM-GW par co-culture avec des PBMCs

Après 12 heures de co-culture entre les PBMC#1 et les CSM-GW (COa à P3), les PBMC#1 et #2 sont phénotypés selon les marqueurs CD3 et CD4.

Les PBMC#1 présentent un phénotype LT CD3 positif avec 56,6% d'expression parmi la population. (Fig. 43A) L'expression du CD3 à la surface des LT permet l'activation cellulaire de la réaction immunitaire.

Le CD4 est un marqueur spécifique des LT auxiliaires (ou LT CD4+), son expression est évaluée dans la population de PBMC#1 à 35%. L'augmentation de l'expression du CD4 indique l'activation des LT CD4+, connue pour interagir avec d'autres cellules immunitaires en réponse à un antigène spécifique. (Fig. 43B) L'expression conjointe de CD3+ et CD4+, estimée à 37%, permettait de caractériser l'activation d'une population de LT CD4+ par les PBMC#1 et #2 (Fig. 43B, 43C).

Le complexe HLA-DR+/CD4+, exprimé à 21%, indique que les PBMC#1 et #2 assurent leur rôle de CPA. L'expression du CD25+/CD4+ était évaluée à 16% par les PBMC#1 et #2. Le CD25 est une cytokine importante dans la régulation de la réponse immunitaire. De plus, l'expression conjointe de CD25+ et de CD4+ par les PBMC caractérise l'activation d'une population de LTregs contribuant ainsi à la tolérance immunitaire (Fig. 43B, 43C).

Le CD69 met en évidence l'activation cellulaire de la réponse immunitaire. L'expression de CD69+/CD4+ par les PBMC#1 et #2 était évaluée à 1%. Les LT CD4+ n'ont pas induits d'activation cellulaire de la réponse immunitaire après une co-culture avec les CSM-GW.

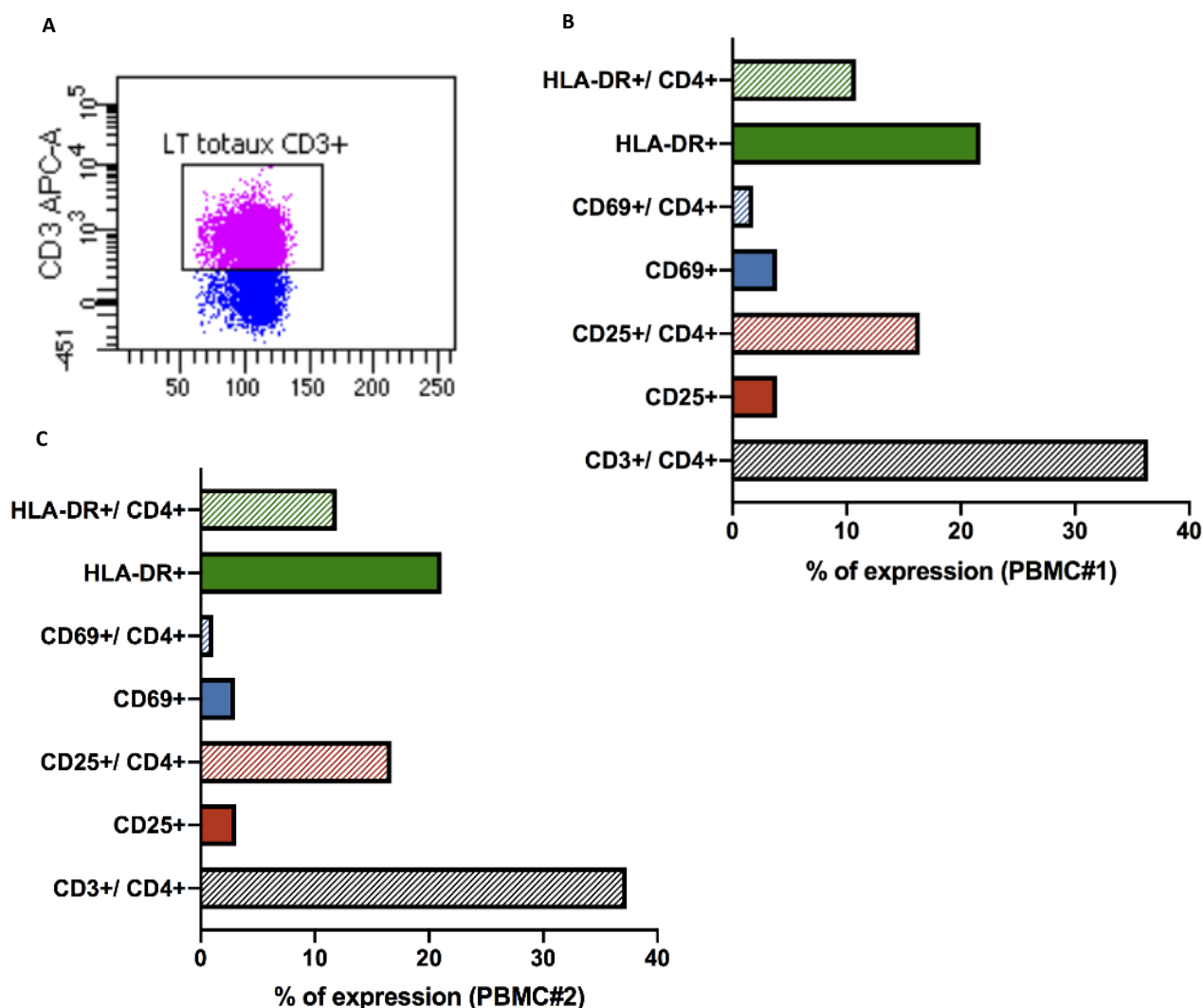


Figure 43 – Phénotypage des PBMCs#1 et #2 au contact des CSM-GW après 24 heures d'incubation.

A : Expression des LTCD3+ par les PBMCs au contact des CSM-GW. B : Expression des CD3, CD4, CD25, CD69 et HLA-DR des PBMCs#1 au contact des CSM-GW. C : Expression Expression des CD3, CD4, CD25, CD69 et HLA-DR des PBMCs#8 au contact des CSM-GW.

Les phénotypes des PBMC#1 et #2 en co-culture avec des CSM-GW à P6 étaient également réalisées. Les résultats à P6 étaient identiques à ceux mentionnés précédemment pour P3.

2.3 Dosage du relargage de l'IFN- γ

L'IFN- γ n'était pas relargué dans le sécrétome après une co-culture de PBMC et de CSM-GW (Fig. 44). Les CSM-GW induisent une tolérance immunitaire, réduisant ainsi la production d'IFN- γ et favorisant un environnement immunosuppresseur.

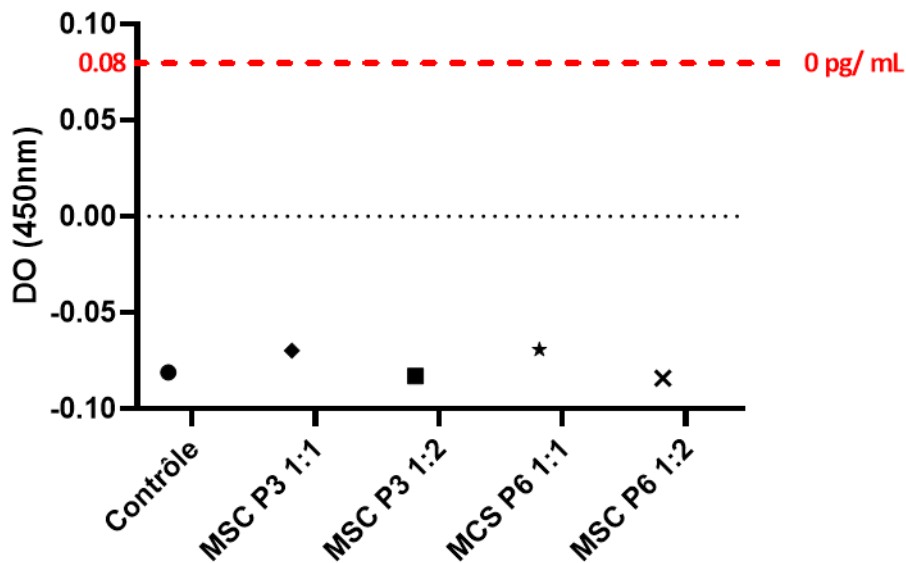


Figure 44 – Evaluation quantitative des IFN- γ relargués dans le sécrétome des CSM-GW de P3 à P6 en co-culture avec des PBMC par méthodes ELISA.
 Contrôle : DPBS 1X (Gibco©).

Les CSM-GW étaient caractérisées par l'absence d'expression de l'antigène HLA-DR jusqu'à P6. Le profil non immunogène des CSM-GW était confirmé par l'absence de prolifération lymphocytaire lorsqu'elles étaient exposées aux PBMC. De plus, une caractéristique immuno-modulatrice des CSM-GW était décrite avec une expression conjointe du CD25+ et du CD4+, renforcée par l'absence de relargage de l'IFN- γ dans le sécrétome.

3. Histologie des feuillets cellulaires produits à partir des CSM de la gelée de Wharton et phénotypage des CSM en feuillets

Les CSM-GW ne forment pas naturellement de multiples couches cellulaires dans leur état d'origine. La méthode de culture cellulaire et les conditions de culture spécifiques utilisées dans ce contexte ont permis la formation de couches cellulaires. La culture des cellules en feuillet pourrait entraîner une différenciation non désirée des cellules.

Le contrôle du phénotype de ces CSM-GW en feuillet permettait de s'assurer du maintien des cellules en qualité de CSM.

3.1 Après 2 semaines de culture

Après 2 semaines de culture les CSM-GW en milieu M1 supplémenté à 0,5 mM de sodium L-ascorbate, un feuillet cellulaire était observé et adhérait aux clamps circulaires. Les cellules étaient visibles et nombreuses, elles étaient en périphérie de la MEC produite. Concernant les CSM-GW cultivées en milieu M2 supplémenté à 0,5 mM de sodium L-ascorbate, le feuillet cellulaire était également adhérent aux clamps circulaires, les cellules étaient visibles et organisées de façon à délimiter la MEC. La MEC produite était dense et enclavée entre les cellules (Fig. 45C, 45D). La densité de collagène était plus faible en milieu M1 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate (Fig. 45A, 45B).

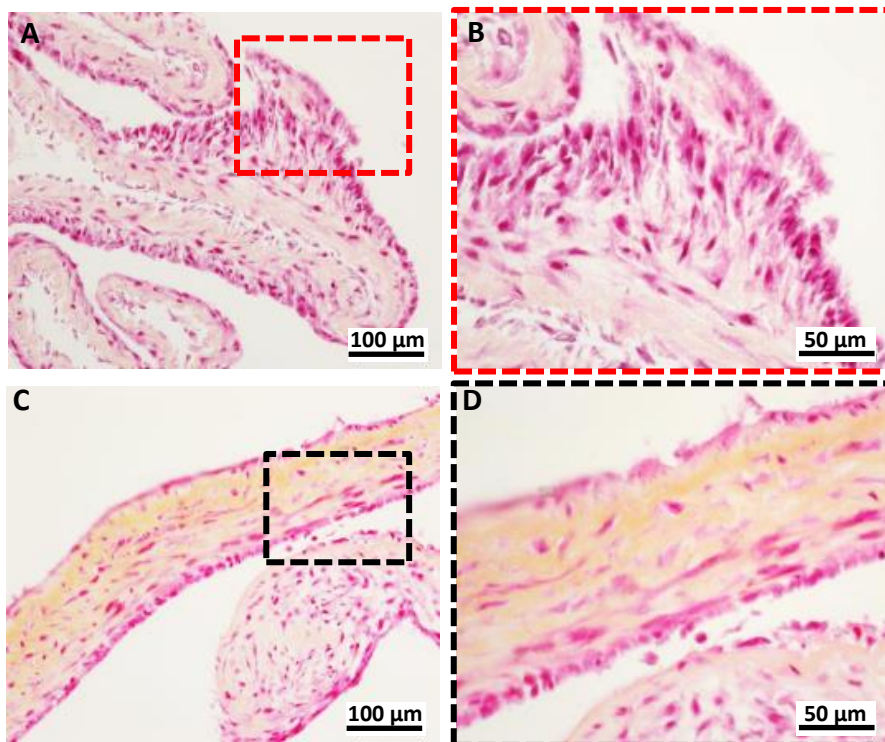


Figure 45 - Coloration à l'HES de feuillets de CSM-GW.

A-B : Coloration à l'HES de feuillets de CSM-GW après 2 semaines de culture à une densité de 13×10^3 cellules.cm⁻² en milieu M1 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate selon les différents grossissements (A : Grossissement x10 ; B : Grossissement x20).

C-D : Coloration à l'HES de feuillets de CSS-GW après 2 semaines de culture à une densité de 13×10^3 cellules.cm⁻² en milieu M2 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate selon les différents grossissements (C : Grossissement x10 ; D : Grossissement x20)

Les anticorps primaires utilisés en tant que marquage positif du profil stromal des CSM-GW cultivées en feuillet, pendant 2 semaines, selon les milieux M1 et M2 supplémentés à 0,5 mM

de sodium L-ascorbate étaient les CD90, CD105 et CD73. Ces marqueurs étaient exprimés selon les milieux de culture testés M1 et M2 (Fig. 46, Fig. 47). Le CD90 était faiblement exprimé lorsque les feuillets étaient cultivés en milieu M1 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate (Fig. 46A, 46B) et semblait être exprimé de façon plus intense en milieu M2 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate. (Fig. 47A et 47B)

D'après les observations en HES, les cellules délimitaient la MEC, le marquage mis en évidence par les anticorps était donc majoritairement présent au niveau de la périphérie des feuillets (Fig. 45). En revanche, un faible marquage des CSM-GW intégrées dans la MEC était observé, suggérant une perte de phénotype.

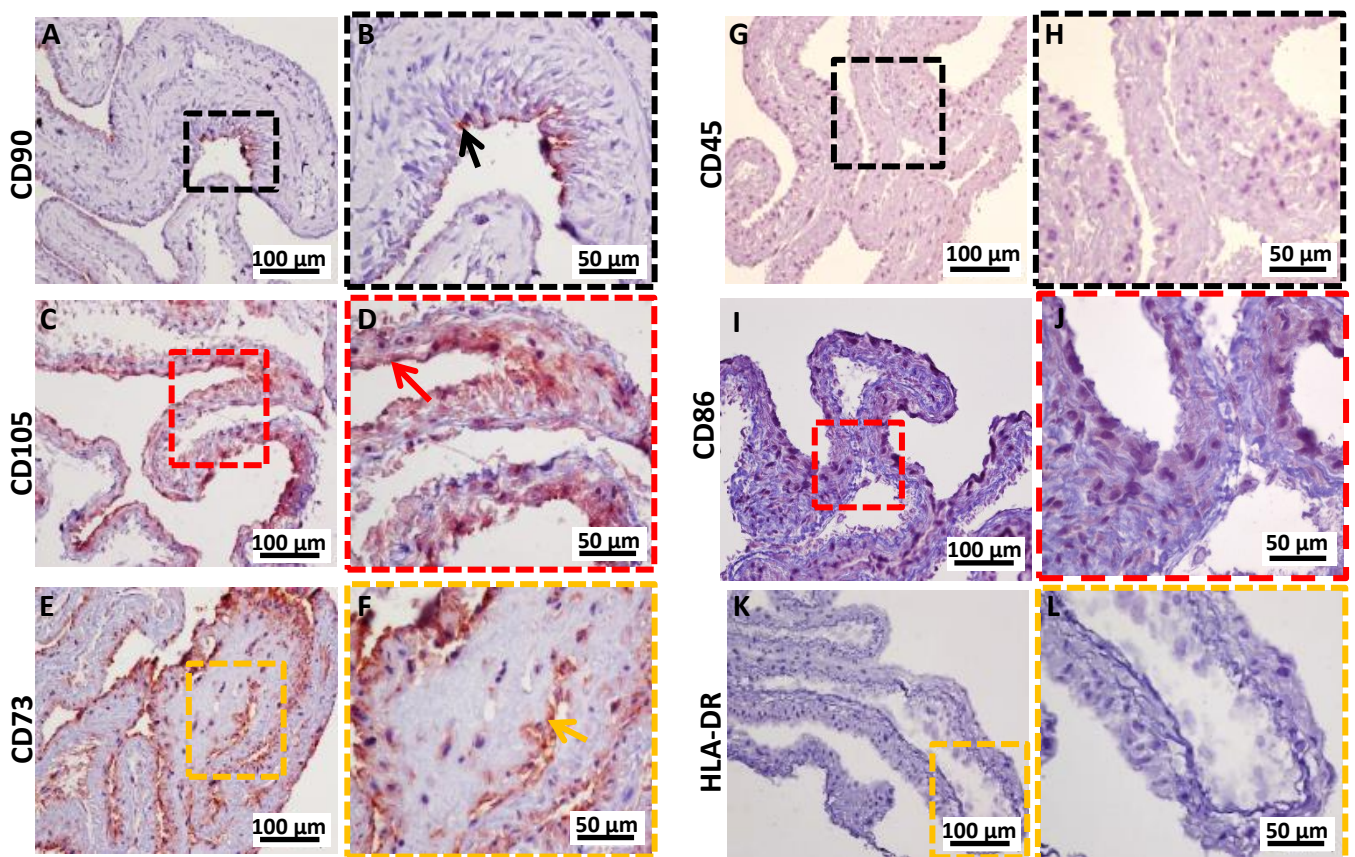


Figure 46 - Phénotypage du profil stromal des CSM-GW en feuillet après 2 semaines de culture à une densité de 13×10^3 cellules.cm⁻² en M1 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate par IHC. A-B : Marquage CD90 positif (A : Grossissement x10 ; B : Grossissement x20). C-D : Marquage CD105 positif (C : Grossissement x10 ; D : Grossissement x20). E-F : Marquage CD73 positif (E : Grossissement x10 ; F : Grossissement x20).

G-H : Marquage CD45 négatif (G : Grossissement x10 ; H : Grossissement x20). I-J : Marquage CD86 négatif (I : Grossissement x10 ; J : Grossissement x20) et K-L : Marquage HLA-DR négatif (K : Grossissement x10 ; L : Grossissement x20).

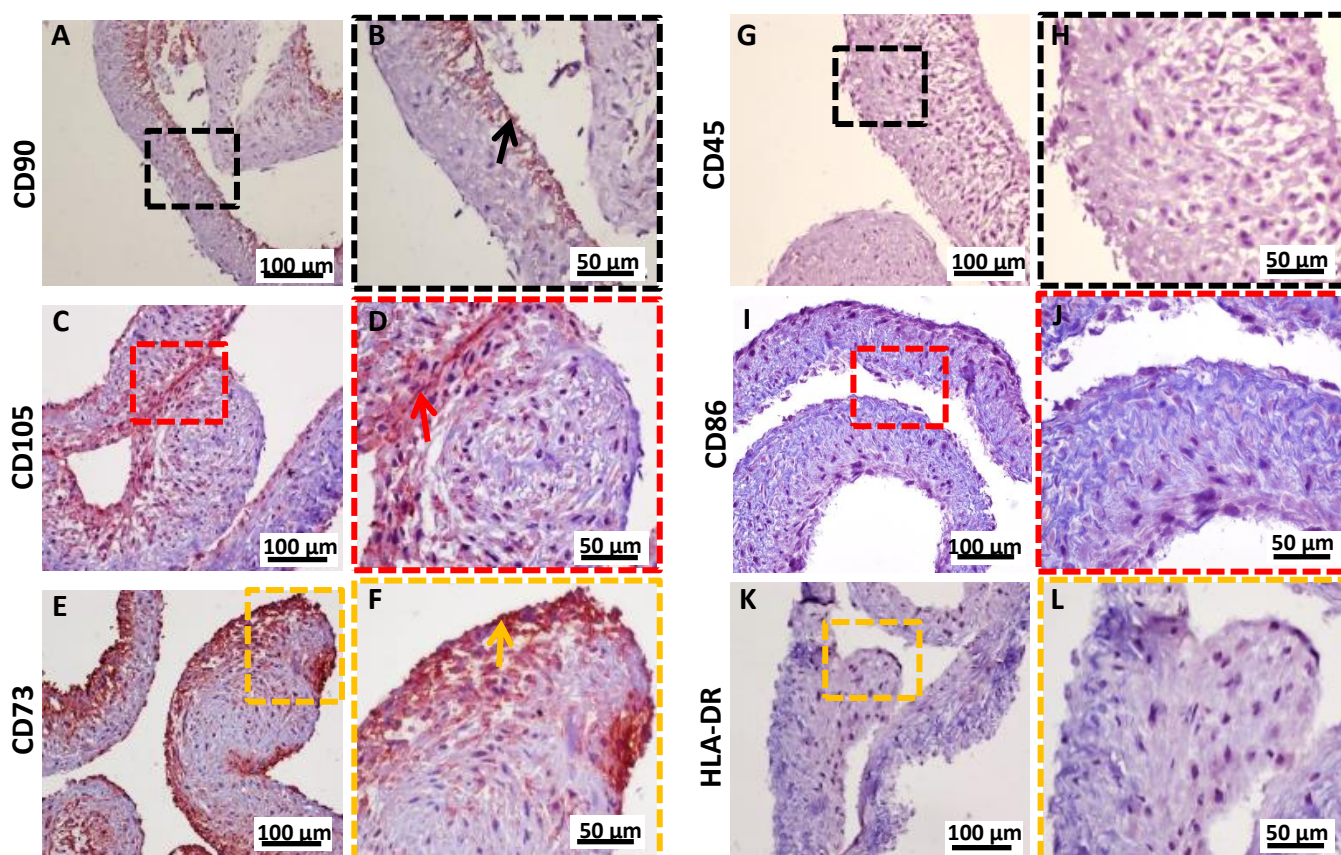


Figure 47 – Phénotypage du profil stromal des CSM-GW en feuillet après 2 semaines de culture à une densité de 13×10^3 cellules.cm⁻² en M2 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate par IHC. A-B : Marquage CD90 positif (A : Grossissement x10 ; B : Grossissement x20). C-D : Marquage CD105 positif (C : Grossissement x10 ; D : Grossissement x20). E-F : Marquage CD73 positif (E : Grossissement x10 ; F : Grossissement x20). G-H : Marquage CD45 négatif (G : Grossissement x10 ; H : Grossissement x20). I-J : Marquage CD86 négatif (I : Grossissement x10 ; J : Grossissement x20) et K-L : Marquage HLA-DR négatif (K : Grossissement x10 ; L : Grossissement x20)

Concernant les marqueurs négatifs du profil stromal des CSM-GW cultivées en feuillet cellulaire, les CD45, CD86 et HLA-DR étaient utilisés (Fig. 46, Fig. 47). L'absence d'expression du CD45, du CD86 et du HLA-DR confirmait le profil stromal des CSM.

La coloration au Bleu Alcian et au Von Kossa (VK) a permis de démontrer l'absence d'entrée de voie de différenciation des CSM-GW en chondrocytes ou de minéralisation du feuillet, et ce, indépendamment des milieux de culture utilisés (Fig. 48, Fig. 49).

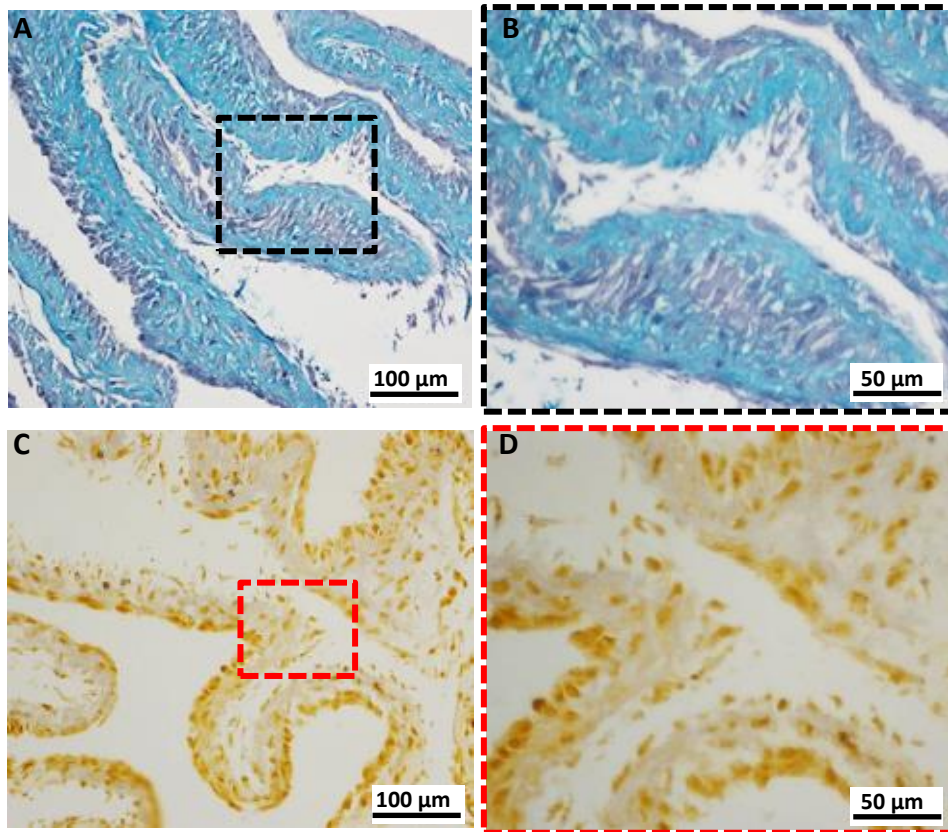


Figure 48 – Phénotypage des CSM-GW en feuillet après 2 semaines de culture à une densité de 13×10^3 cellules. cm^{-2} en milieu M1 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate par coloration au Bleu Alcian et au VK.

A-B: Coloration au Bleu Alcian (A : Grossissement x10 ; B : Grossissement x20).

C-D: Coloration au VK. (A : Grossissement x10 ; B : Grossissement x20)

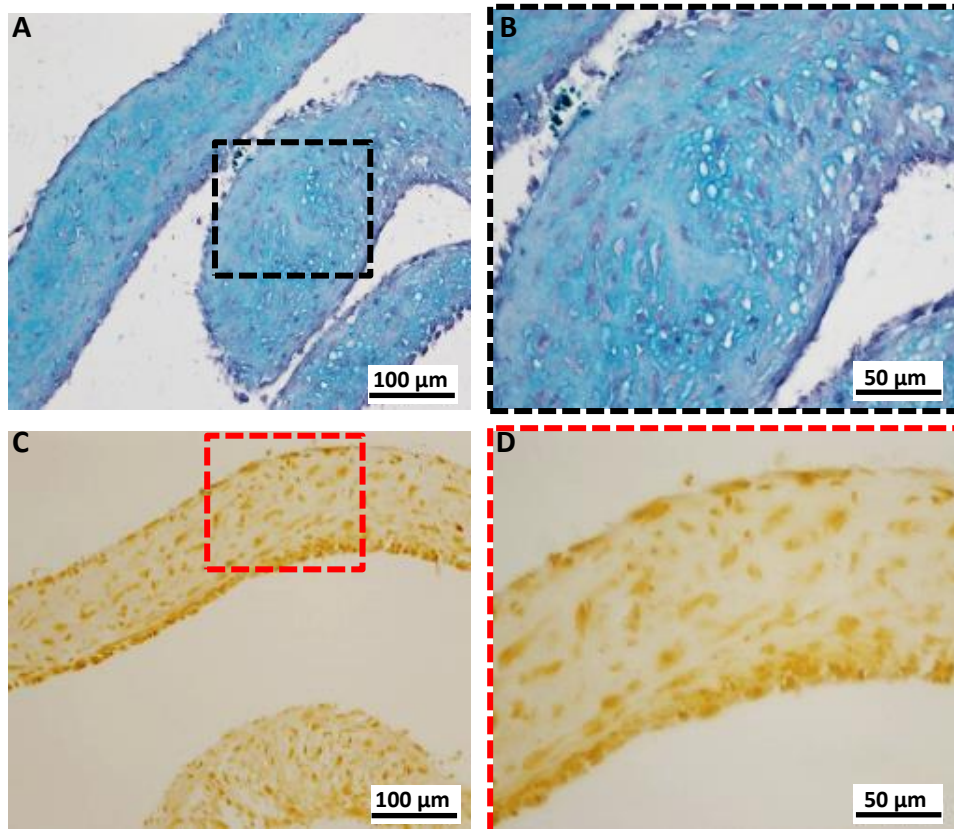


Figure 49 - Phénotypage des CSM-GW en feuillet après 2 semaines de culture à une densité de 13×10^3 cellules. cm^{-2} en milieu M2 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate par coloration au Bleu Alcian et au VK.

A-B: Coloration au Bleu Alcian (A : Grossissement x10 ; B : Grossissement x20).

C-D: Coloration au VK (A : Grossissement x10 ; B : Grossissement x20).

3.2 Après 4 semaines de culture

Après 4 semaines de culture des CSM-GW à une densité de 13×10^3 cellules. cm^{-2} en milieu M1 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate, le feuillet cellulaire était adhérent aux clamps circulaires (données non présentées). Les cellules étaient visibles et enchâssées dans la MEC, contrairement aux feuillets cellulaires cultivés pendant 2 semaines où les cellules étaient organisées en périphérie de la MEC (Fig. 45). La MEC produite après 4 semaines de culture était dense et cohésive.

Les CSM-GW qui étaient ensemencées à 30×10^3 cellules. cm^{-2} et cultivées en milieu M1 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate pendant 4 semaines permettaient d'obtenir un feuillet cellulaire adhérent aux clamps circulaires. Les cellules étaient visibles et présentes à l'intérieur ainsi qu'à

la périphérie du feuillet. La MEC était peu visible, aucune organisation n'était mise en évidence.

Les marqueurs positifs associés au profil stromal (CD90, CD105 et CD73) étaient exprimés selon les densités d'ensemencement 13×10^3 cellules.cm⁻² et 30×10^3 cellules.cm⁻² pendant 4 semaines, en milieu M1 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate. Le marquage mis en évidence par l'anticorps anti-CD90 semblait être exprimé de façon plus intense pour une densité d'ensemencement à 13×10^3 cellules.cm⁻². Le CD105 étaient faiblement marqués pour les 2 densités d'ensemencement testées. Il n'y avait qu'une très faible intensité de marquage pour le CD73 selon la condition d'ensemencement à 13×10^3 cellules.cm⁻², contrairement aux cellules ensemencées à 30×10^3 cellules.cm⁻² qui n'exprimaient pas le CD73.

Les marqueurs négatifs du profil stromal des CSM-GW cultivées en feuillet cellulaire tels que les CD45 et CD86 n'étaient pas exprimés. Un faible marquage du HLA-DR suggérait une perte de phénotype.

3.3 Après 6 semaines culture

Après 6 semaines de culture des CSM-GW à une densité de 13×10^3 cellules.cm⁻² en milieu M1 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate, le feuillet cellulaire était adhérent aux clamps circulaires, mais présentait des défauts (données non présentées). Les cellules et la MEC produite étaient visibles, néanmoins, les cellules s'intégraient dans le feuillet de façon individuelle ou en îlots de cellules au sein de la MEC, elles étaient également retrouvées en périphérie du feuillet cellulaire. Il n'y avait pas d'organisation définie comme retrouvée pour les feuillets cultivés pendant 2 et 4 semaines. La MEC semblait être déstructurée, et éparse.

Les CSM-GW qui étaient ensemencées à 30×10^3 cellules.cm⁻² et cultivées en milieu M1 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate pendant 6 semaines permettaient d'obtenir un feuillet cellulaire adhérent aux clamps circulaires mais présentait également des défauts. Les cellules étaient retrouvées de façon isolée ou en îlots de cellules au sein de la MEC et également en périphérie. Contrairement aux feuillets ensemencées à une densité de 13×10^3 cellules.cm⁻², la MEC est plus cohésive et semble plus dense.

Les marqueurs positifs associés au profil stromal étaient exprimés selon les densités d'ensemencement 13×10^3 cellules.cm⁻² et 30×10^3 cellules.cm⁻² pendant 6 semaines, en milieu M1 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate. Le CD90 était très faiblement exprimé pour les feuillets cultivés selon une densité d'ensemencement à 13×10^3 cellules.cm⁻², contrairement aux cellules ensemencées à 30×10^3 cellules.cm⁻² qui elles, ne l'exprimaient pas. Le CD105 était exprimé pour les 2 conditions de culture testées. Il n'y avait qu'une très faible intensité de marquage mis en évidence par l'anticorps anti-CD73 pour les feuillets cellulaires ensemencés à 30×10^3 cellules.cm⁻². Le CD73 n'était pas exprimé pour les cellules ensemencées à 13×10^3 cellules.cm⁻².

Les marqueurs négatifs du profil stromal des CSM-GW cultivées en feuillet cellulaire utilisés étaient les CD45, CD86 et HLA-DR, ils n'étaient pas exprimés par les feuillets cellulaires, à l'exception du HLA-DR qui était faiblement marqué.

Les analyses histologiques et IHC démontraient l'efficacité des conditions de culture des feuillets de CSM-GW en milieu M2, ensemencés à une densité de 13×10^3 cellules.cm⁻² pendant 2 semaines. La production de MEC, la préservation partielle du phénotype cellulaire et une manipulation aisée du feuillet étaient mises en évidence.

4. Caractérisation mécanique des feuillets cellulaires de CSM de la gelée de Wharton par test de perforation

La caractérisation mécanique permettait d'évaluer l'adaptabilité des feuillets cellulaires aux contraintes lors de leur manipulation.

Les feuillets cellulaires cultivés selon les conditions d1t1 en milieu M1 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate n'étaient pas manipulables. Les feuillets cellulaires étudiés correspondaient à un ensemencement de 13×10^3 cellules.cm⁻² (d1) en M2 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate, pendant 2 semaines (t1). La rupture du feuillet était enregistrée après perforation de l'échantillon à une vitesse de 20 mm.min⁻¹.

Densité d'ensemencement de 13×10^3 cellules.cm⁻² (d1) pendant 2 semaines (t1) : La force maximale moyenne atteinte pour les feuillets cellulaires COb (n=3), cultivés dans les mêmes conditions d1t1 était de $24,31 \text{ gf} \pm 6,16 \text{ gf}$ (Fig. 50).

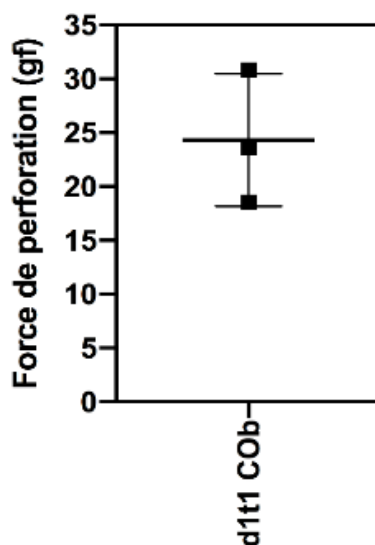


Figure 50 - Caractérisation de la résistance à la perforation des feuillets. Force de perforation obtenue (gf) pour le donneur COb selon les conditions de culture d1t1 en milieu M2 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate.

Les feuillets cellulaires suivants étaient obtenus à partir de deux densités différentes. Ils correspondaient à un ensemencement d1 et d2, soit 30×10^3 cellules·cm⁻², en M1 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate, pendant 4 (t2) ou 6 semaines (t3).

Densité d'ensemencement de 13×10^3 cellules·cm⁻² (d1) pendant 4 semaines (t2) : Pour les mêmes conditions de culture d1t2, les valeurs moyennes obtenues en gf étaient de $5,77 \text{ gf} \pm 0,17 \text{ gf}$ pour le donneur COa (n=3), de $9,39 \text{ gf} \pm 3,42 \text{ gf}$ pour le donneur COb (n=2) et de $14,53 \text{ gf} \pm 2,56 \text{ gf}$ pour COc (n=2) (Fig. 51A).

Densité d'ensemencement de 30×10^3 cellules·cm⁻² (d2) pendant 4 semaines (t2) : La perforation des feuillets cellulaires cultivés selon les conditions d2 t2 était objectivée pour les donneurs COa (n=2), COb (n=2) et COc (n=2). La résistance mécanique à la perforation des feuillets cellulaire issus du donneur COa était de $6,63 \text{ gf} \pm 2,35 \text{ gf}$, de $12,74 \text{ gf} \pm 2,77 \text{ gf}$ pour le donneur COb et de $13,85 \text{ gf} \pm 0,89 \text{ gf}$ pour le donneur COc (Fig. 51B).

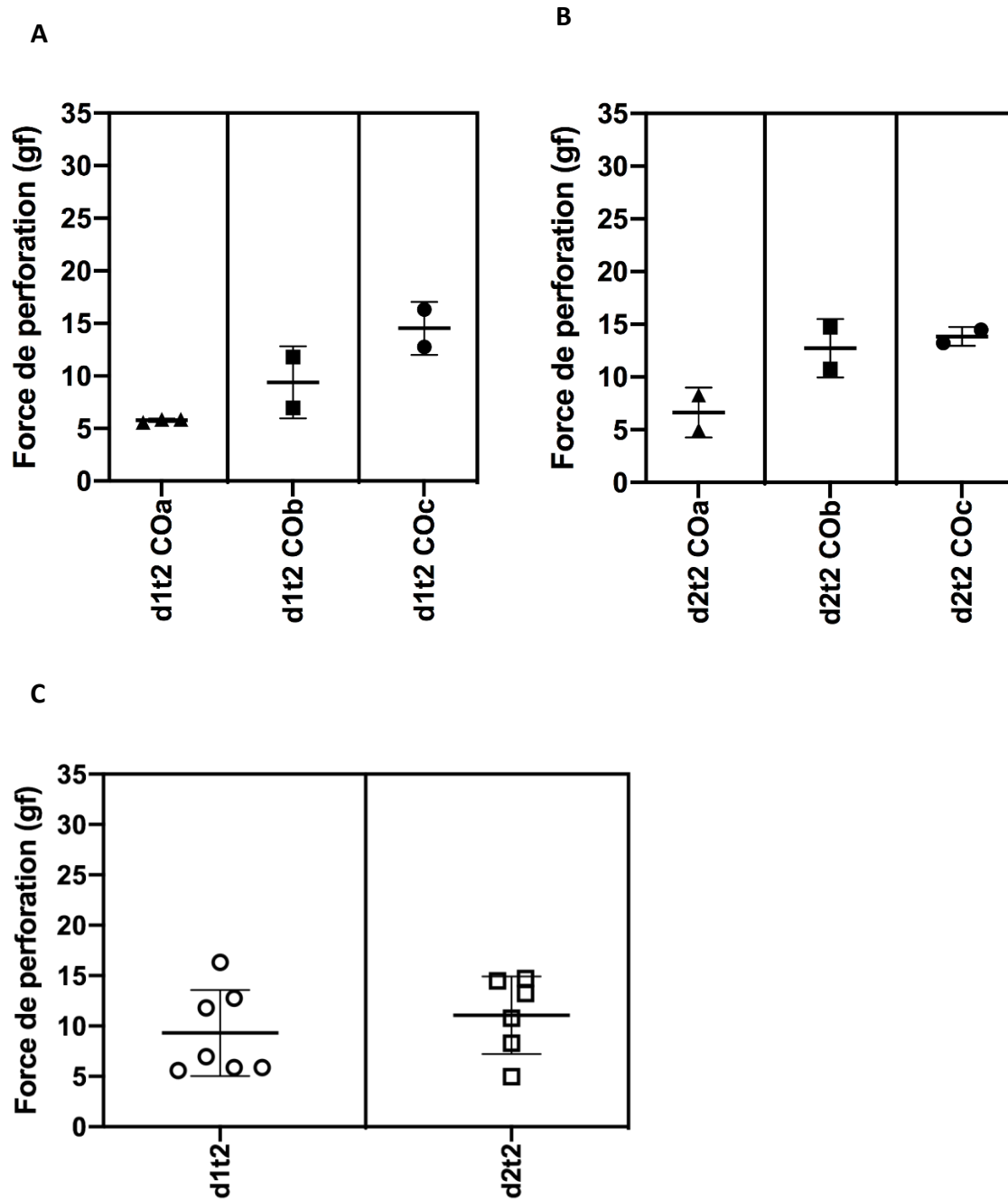


Figure 51 – Caractérisation de la résistance à la perforation des feuillets COa, COb, COc ensemencés à 13×10^3 cellules. cm^{-2} (d1) et de 30×10^3 cellules. cm^{-2} (d2) pendant 4 semaines (t2) en M1 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate.

A-B : Force de perforation obtenue (gf). A : COa, COb et COc selon les conditions de culture d1t2. B : COa, COb, COc, selon les conditions de culture d2t2.

C : Force de perforation individuelle obtenue (gf) et distribuée selon les conditions d1t2 et d2t2.

Densité d'ensemencement de 13×10^3 cellules.cm⁻² (d1) pendant 6 semaines (t3): La force maximale atteinte pour les feuillets cellulaires COa (n=3) et COb (n=3), cultivés dans les mêmes conditions d1t3, était respectivement de $7,62 \text{ gf} \pm 1,04 \text{ gf}$ et de $12,51 \text{ gf} \pm 5,56 \text{ gf}$, cette différence n'était pas significative ($p < 0,26$) (Fig. 52B).

Les feuillets cellulaires d1 t3 COc n'ont pas pu être évalués, car ils n'étaient pas manipulables.

Densité d'ensemencement de 30×10^3 cellules.cm⁻² (d2) pendant 6 semaines (t3): Les feuillets cellulaires cultivés selon les conditions d2t3 obtenaient une valeur moyenne de la force de perforation de $10,82 \text{ gf} \pm 5,27 \text{ gf}$ pour les échantillons COa (n=2) (Fig. 52C).

Les feuillets cellulaires d2t3 COb et d2t3 COc n'ont pas pu être évalués.

Pour un donneur COa à même densité d1, les valeurs moyennes des forces de perforations obtenues à t2 (n=3) et à t3 (n=3) n'étaient pas significativement différentes entre-elles ($p < 0,09$; avec des valeurs moyennes de $5,77 \text{ gf} \pm 0,17 \text{ gf}$ et $7,62 \text{ gf} \pm 1,04 \text{ gf}$, respectivement t2 et t3) (Fig. 52D).

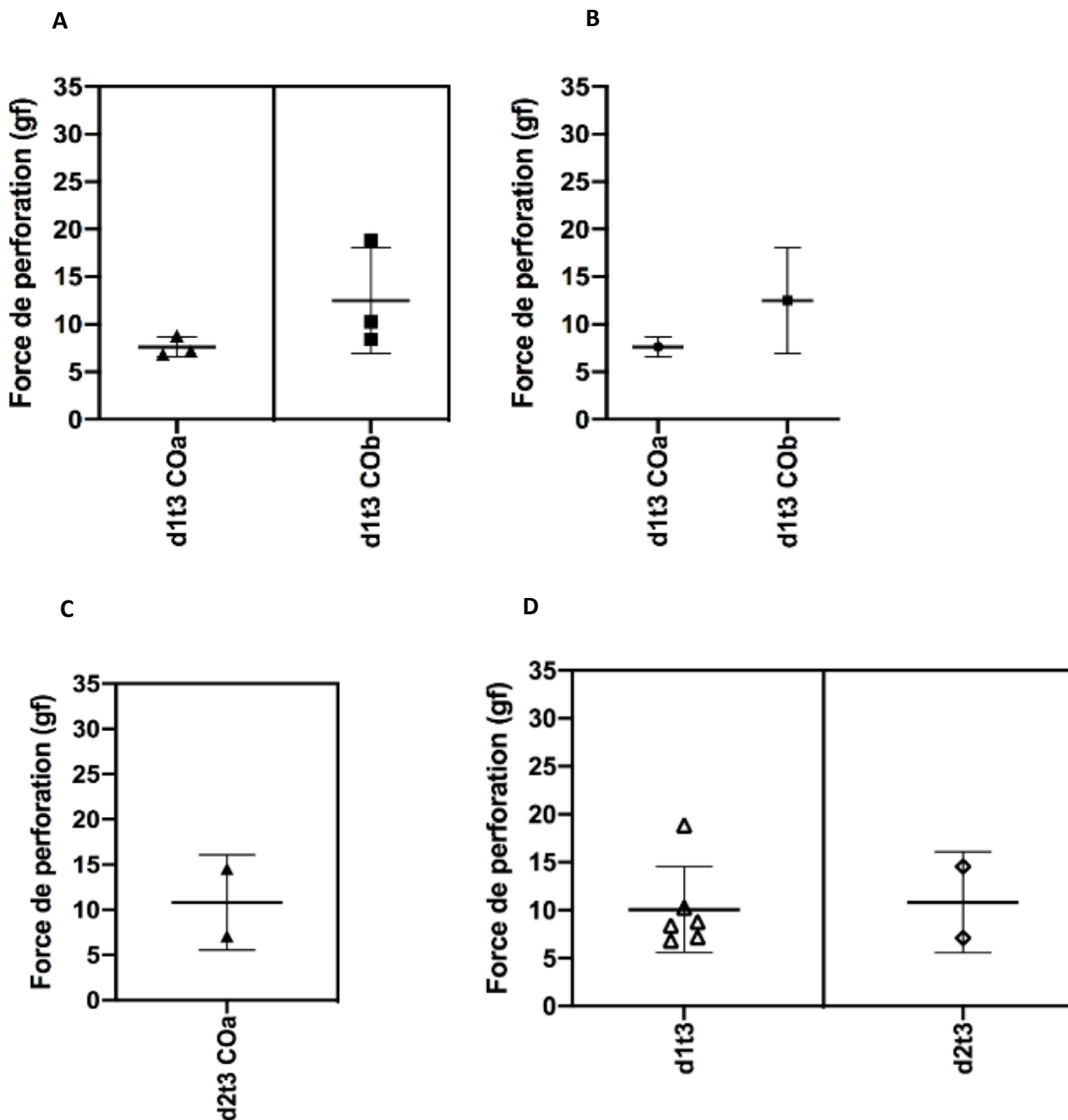


Figure 52 – Caractérisation de la résistance à la perforation des feuillets COa, COb, ensemencés à 13×10^3 cellules·cm⁻² (d1) et de 13×10^3 cellules·cm⁻² (d2) pendant 6 semaines (t3) en M1 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate.

A-C : Force de perforation obtenue (gf). A : COa, COb selon les conditions de culture d1t3. B : Test de statistique du T test selon COa et COb ensemencés selon les conditions de culture d1t3. C : COa selon les conditions de culture d2t3.

D : Force de perforation individuelle obtenue (gf) et distribuée selon les conditions d1t3 et d2t3.

La durée de culture du feuillet ne semble pas avoir de conséquence sur la résistance des feuillets cellulaires à la perforation en milieu M1 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate pour le COa (Fig. 53).

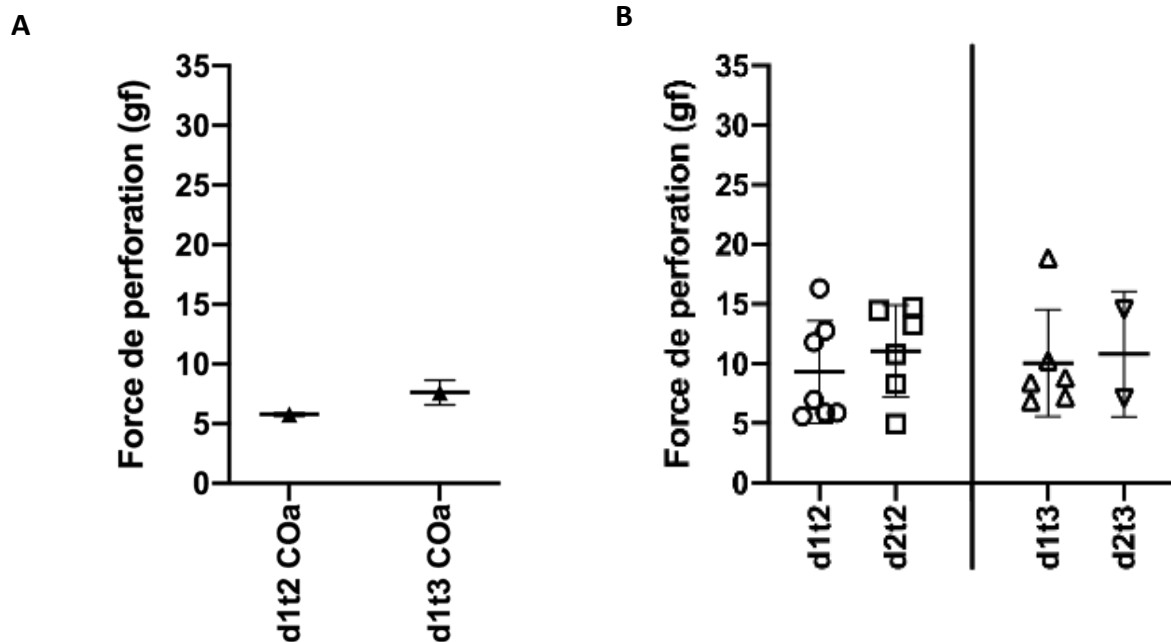


Figure 53 – Caractérisation de la résistance à la perforation des feuillets.

A : Test statistique du T test selon COa ensemencé à 13×10^3 cellules·cm⁻² (d1) pendant 4 semaines (t2) et pendant 6 semaines (t3) en M1 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate. B : Force de perforation individuelle obtenue (gf) et distribuée selon les conditions d1t2, d2t2, d1t3 et d2t3.

L'influence de la densité d'ensemencement sur la qualité des feuillets cellulaires était étudiée. Pour une densité d1, les valeurs moyennes de perforation obtenues à t2 et à t3 étaient de 14,53 gf ± 4,28 gf et de 10,06 gf ± 4,47 gf respectivement. A une densité d'ensemencement d2, les valeurs moyennes des forces de perforation étaient de 11,07 gf ± 3,86 gf pour t2 et de 10,82 gf ± 5,27 gf pour t3 (Fig 53). Les densités d'ensemencement étudiées ne semblaient pas avoir de conséquence sur la résistance des feuillets cellulaires à la perforation en M1 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate.

Les résultats de perforations objectivaient une tendance à l'utilisation de feuillets cellulaires avec un temps court de 4 semaines de culture (t2), ainsi qu'une densité d'ensemencement de 13×10^3 cellules·cm⁻² (d1). (Fig. 53A)

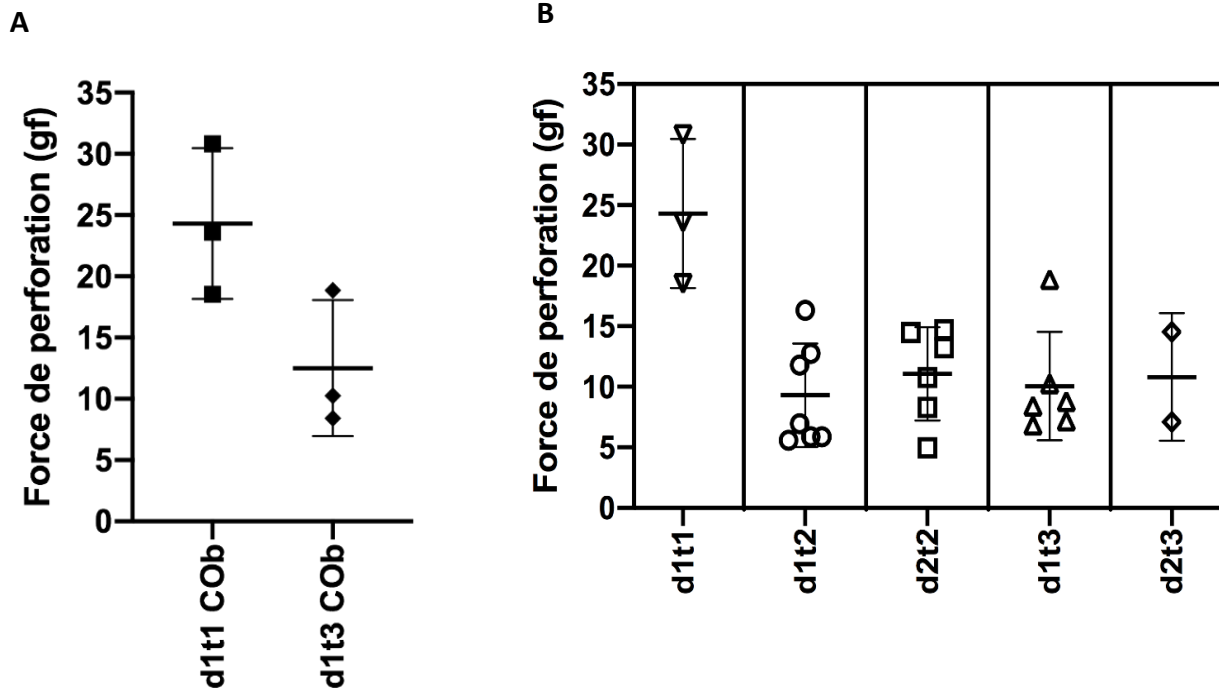


Figure 54 - Caractérisation de la résistance à la perforation des feuillets.

A : Test statistique du T test selon CObensemencé à 13×10^3 cellules- cm^{-2} (d1) pendant 1 semaines (t1) et pendant 6 semaines (t3). B : Force de perforation individuelle obtenue (gf) et distribuée selon les conditions d1t1, d1t2, d2t2, d1t3 et d2t3.

Pour un donneur COb à même densité d'ensemencement d1, les valeurs moyennes des forces de perforations obtenues à t1 (n=3) en milieu M2 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate et à t3 (n=3) en milieu M1 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate n'étaient pas significativement différentes entre-elles ($p < 0,07$). (Fig. 54A)

Selon les milieux M1 et M2 utilisés, la durée de culture du feuillet ne semble pas avoir de conséquence sur la résistance mécanique des feuillets cellulaires. (Fig. 54B)

Les forces de perforation individuelle obtenues (gf) selon toutes les conditions étudiées objectivent une tendance à l'utilisation des feuillets d1t1 en milieu M2 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate.

Les feuillets cellulaires étaient produits en milieu M1 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate selon différents temps de culture et densités d'ensemencement. La production des feuillets était réalisée à partir de CSM-GW selon des donneurs humains de différents CO : COa, COb et COc.

Pour les densités d1 et d2, ainsi que les temps de culture t2 et t3, les feuillets produits selon le donneur COa (n=10) présentaient une valeur moyenne de force de perforation de $7,51 \text{ gf} \pm 2,75 \text{ gf}$. Le coefficient de variation (CV) des valeurs obtenues pour COa était de 36,60 %. Les valeurs moyennes obtenues pour les feuillets produits dans ces mêmes conditions de cultures selon le COb (n=7) étaient de $11,68 \text{ gf} \pm 4 \text{ gf}$ (CV = 34,26 %), et enfin, pour le donneur COc (n=4), les valeurs moyennes enregistrées objectivaient une force de perforation des feuillets de $14,19 \text{ gf} \pm 1,59 \text{ gf}$ (CV = 11,20 %). Seul le donneur COb était étudié en milieu M2 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate, selon les conditions d1t1 (n=3). Pour les densités d1 et d2, ainsi que les temps de culture t1, t2 et t3, les valeurs moyennes des forces de perforation des feuillets produits selon le donneur COb (n=10) étaient de $15,47 \text{ gf} \pm 7,51 \text{ gf}$ (CV = 48,52 %) (Fig.55).

Il existe une variabilité inter-individuelle, le COa avait une tendance à produire des feuillets cellulaires ayant une force de perforation inférieure aux COb ou COc. Les valeurs enregistrées pour le COc étaient supérieures au COa, mais la manipulation des échantillons COc était limitée.

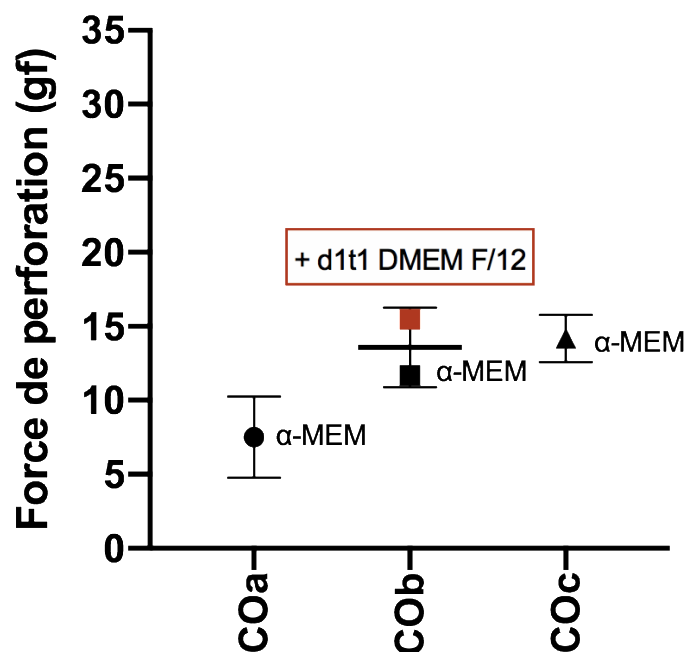


Figure 55 – Caractérisation de la variabilité inter-individuelle des donneurs COa, COb et COc selon la résistance à la perforation des feuillets.

Les analyses mécaniques de la force de perforation des feuillets étaient en corrélation avec les analyses histologiques et IHC. Les conditions de culture des feuillets de CSM-GW en milieu M2,ensemencés à une densité de 13×10^3 cellules·cm⁻² permettaient d’obtenir des feuillets plus robustes.

5. Confirmation de la viabilité des cellules en feuillets avant cellularisation

La viabilité des CSM-GW en feuillet cellulaire était mise en évidence par un test de L/D après 2 semaines de culture cellulaire en milieu M2 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate, en plaque 6 puits. (Fig. 56)

Pour un donneur COe (n=3), le nombre de cellules mortes était quantifié selon une surface de feuillet de CSM-GW vivantes. La moyenne de la surface du feuillet de CSM-GW vivantes des 3 puits était de 0,88 mm² pour un nombre moyen de 56,7 cellules mortes.

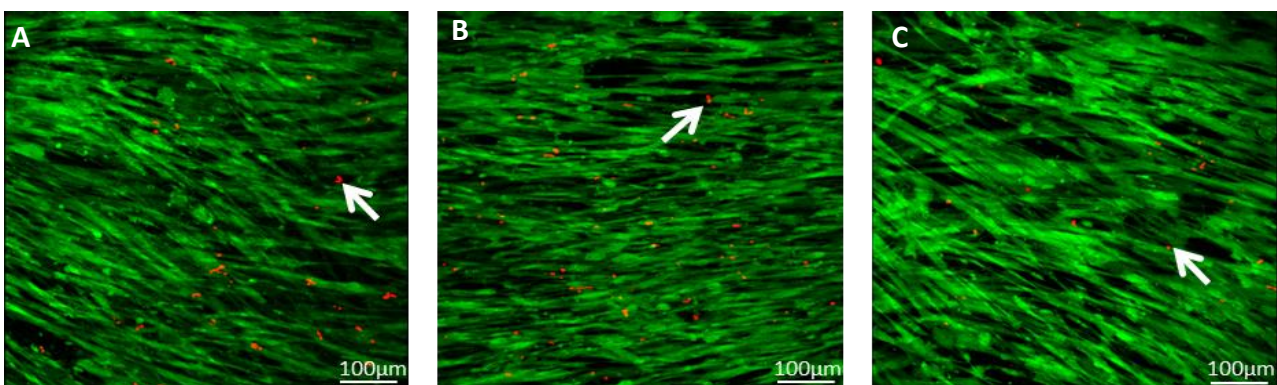


Figure 56 – Observation au microscope confocal d’un test de Live/Dead des feuillets de CSM-GW à J0 et quantification de la viabilité cellulaire par le logiciel Fiji.

Les flèches correspondent aux cellules mortes. A : Puits contenant 51 CSM-GW mortes pour une surface de 0,93 mm² de feuillet vivant. B : Puits contenant 82 CSM-GW mortes pour une surface de 0,89 mm² de feuillet vivant. C : Puits contenant 37 CSM-GW mortes pour une surface de 0,83 mm² de feuillet vivant.

Les feuillets de CSM-GW étaient formés selon des multi-couches cellulaires. La culture des CSM-GW en feuillet n’a pas altéré la viabilité cellulaire, de plus, les cellules présentaient une orientation selon un plan horizontal.

6. Observations de la cellularisation des MBD revêtues ou non par protéines matricielles de la GW

6.1 Analyses histologiques après 4 jours

L'analyse histologique après traitement au TM objectivait une cellularisation de la MBD après 4 jours de cellularisation. Un feuillet cellulaire en bordure de la MBD était apparent et adhérait à la sous-muqueuse (Fig. 57B, flèche noire).

La MBDc avec les protéines matricielles issues de la GW était dépourvue de cellules. Un léger contraste en bordure de MBD est observé, il pourrait s'agir du dépôt du feuillet issu des CSM-GW non viables. (Fig. 57D, flèche rouge)

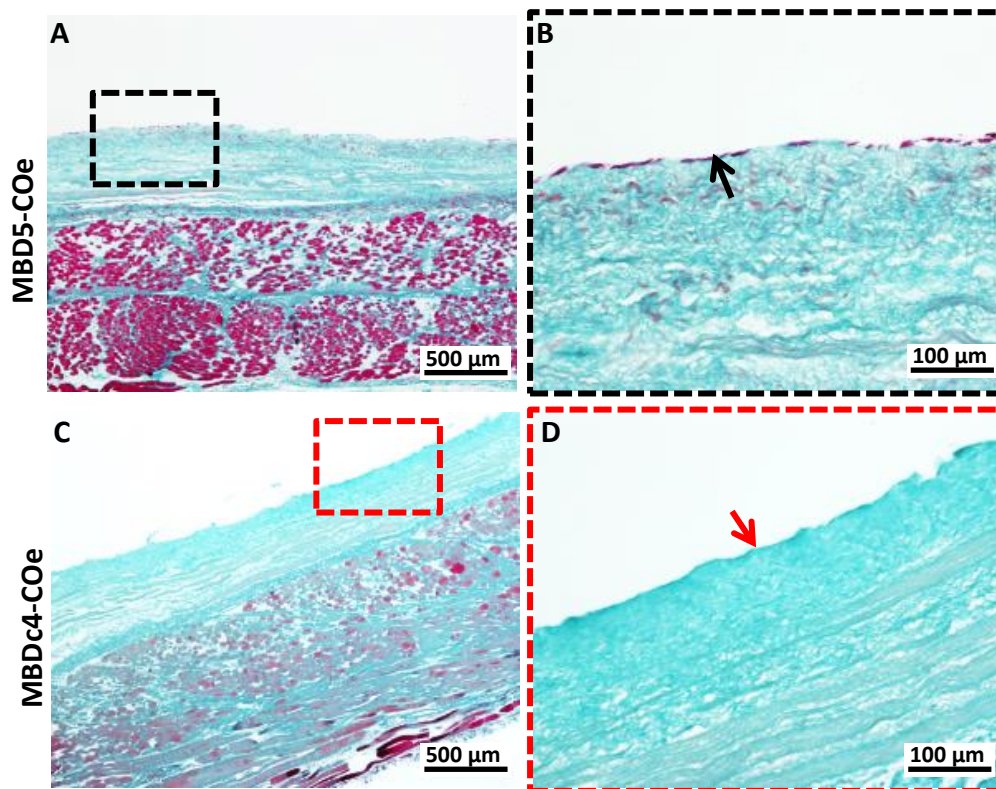


Figure 57 - Coloration au TM des feuillets de CSM-GW cultivés pendant 2 semaines à une densité de 13×10^3 cellules. cm^{-2} en milieu M2 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate, et ensemencés sur la MBD pendant 4 jours sur une matrice revêtue ou non.

A-B : Observation d'un feuillet cellulaire (flèche noire) sur la face interne de la MBD (A : Grossissement x10 ; B : Grossissement x20).

C-D : Absence de feuillet cellulaire sur la face interne de la MBD (C : Grossissement x10 ; D : Grossissement x20).

6.2 Analyses histologiques après 8 jours

L'analyse histologique après traitement au TM à 8 jours de cellularisation indiquait une prolifération cellulaire en bordure de la MBD. Un épaissement du feuillet de CSM-GW était observé, par rapport aux analyses histologiques à 4 jours de cellularisation, résultant d'une augmentation du nombre de multi-couches de cellules dans le feuillet. La cellularisation restait néanmoins superficielle (Fig. 58B, flèche noire).

Un feuillet cellulaire non-adhérent et contenant des cellules mortes était observé pour la MBDc. Le feuillet cellulaire semblait néanmoins avoir proliféré avant de se détacher de la bordure de la MBD (Fig. 58D, flèche rouge).

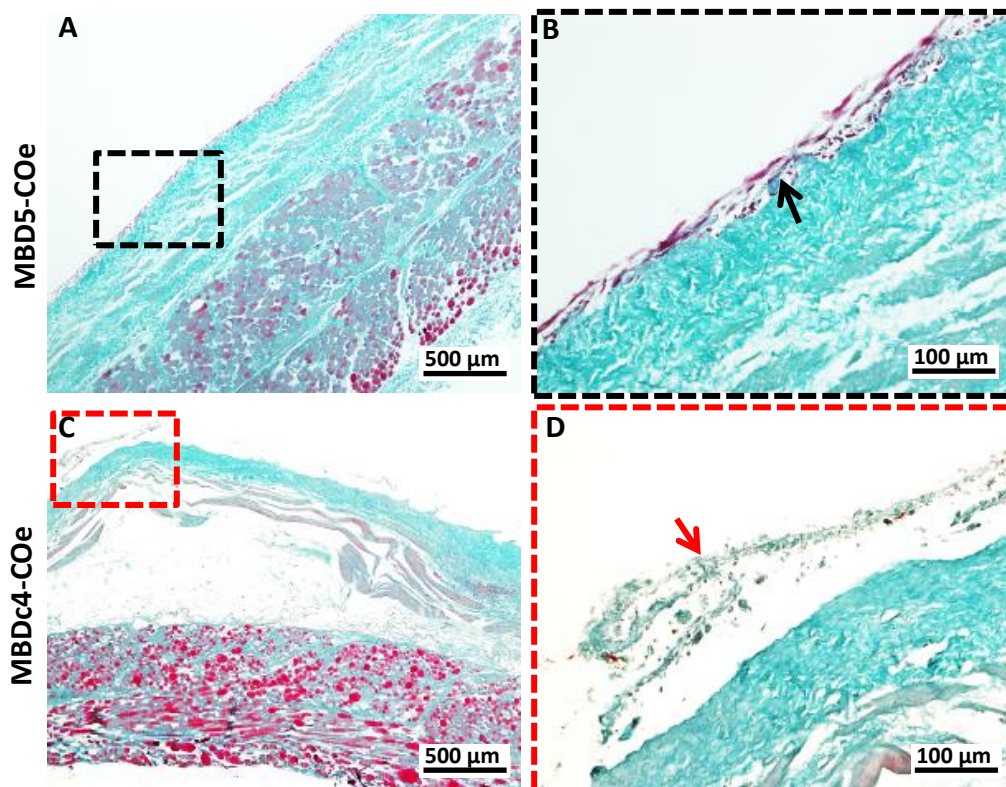


Figure 58 - Coloration au TM des feuillets de CSM-GW cultivés pendant 2 semaines à une densité de 13×10^3 cellules.cm⁻² en milieu M2 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate, et ensemencés sur la MBD pendant 8 jours sur une matrice revêtue ou non.

A-B : Observation d'un feuillet cellulaire (flèche noire) sur la face interne de la MBD (A : Grossissement x10 ; B : Grossissement x20).

C-D : Observation d'un feuillet cellulaire non adhérent (flèche rouge) sur la face interne de la MBD. Absence de viabilité cellulaire dans le feuillet (C : Grossissement x10 ; D : Grossissement x20).

6.3 Analyses histologiques après 21 jours

L'analyse histologique après traitement au TM objectivait une cellularisation de la MBD après 21 jours. Un important épaissement du feuillet cellulaire en bordure de la MBD était observé, par rapport aux analyses histologiques à 8 jours, et le feuillet adhérait à la sous-muqueuse de la MBD (Fig. 59E, flèche verte).

Les CSM-GW semblaient s'individualiser afin d'assurer une infiltration cellulaire au sein des couches histologiques de la MBD (Fig. 59F, flèche blanche). Une nouvelle MEC était synthétisée par les cellules, elle n'était pas organisée (Fig. 59C).

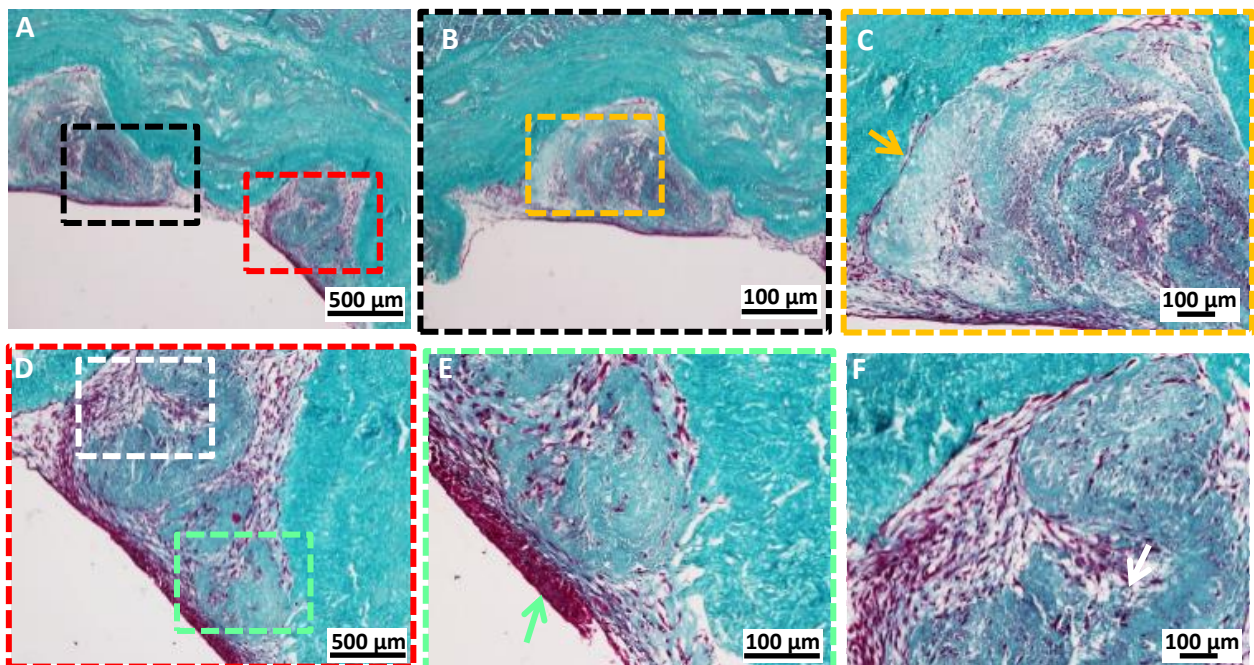


Figure 59 - Coloration au TM des feuillets de CSM-GW cultivés pendant 2 semaines à une densité de 13×10^3 cellules. cm^{-2} en milieu M2 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate, et ensemencés jours sur la MBD pendant 21 jours.

A-D : Grossissement x4 ; B-E : Grossissement x10 ; C-F : Grossissement x20.

La flèche jaune met en évidence la délimitation créée par les cellules entre la MEC œsophagienne et la nouvelle MEC synthétisée par les CSM-GW.

Au cours des 21 jours de cellularisation de la MBD, le feuillet de CSM-GW avait adhéré, et s'était épaissi au cours du temps. La formation de multiples couches cellulaires favorisée par la méthode d'ensemencement était visible entre les J4 et les J21. L'infiltration des cellules

dans la sous-muqueuse de la MBD était observée, elle était accompagnée d'un processus de remodelage de la MBD par une nouvelle MEC sécrétée par les CSM-GW (Fig. 60A, Fig. 60B).

Les observations de la MBDc avec les protéines matricielles issues de la GW permettaient de mettre en évidence un feuillet cellulaire non adhérent et contenant des cellules mortes. Le feuillet cellulaire semblait avoir proliféré avant de se rétracter sur lui-même et de se détacher de la bordure de la MBD (Fig. 60C, Fig. 60D).

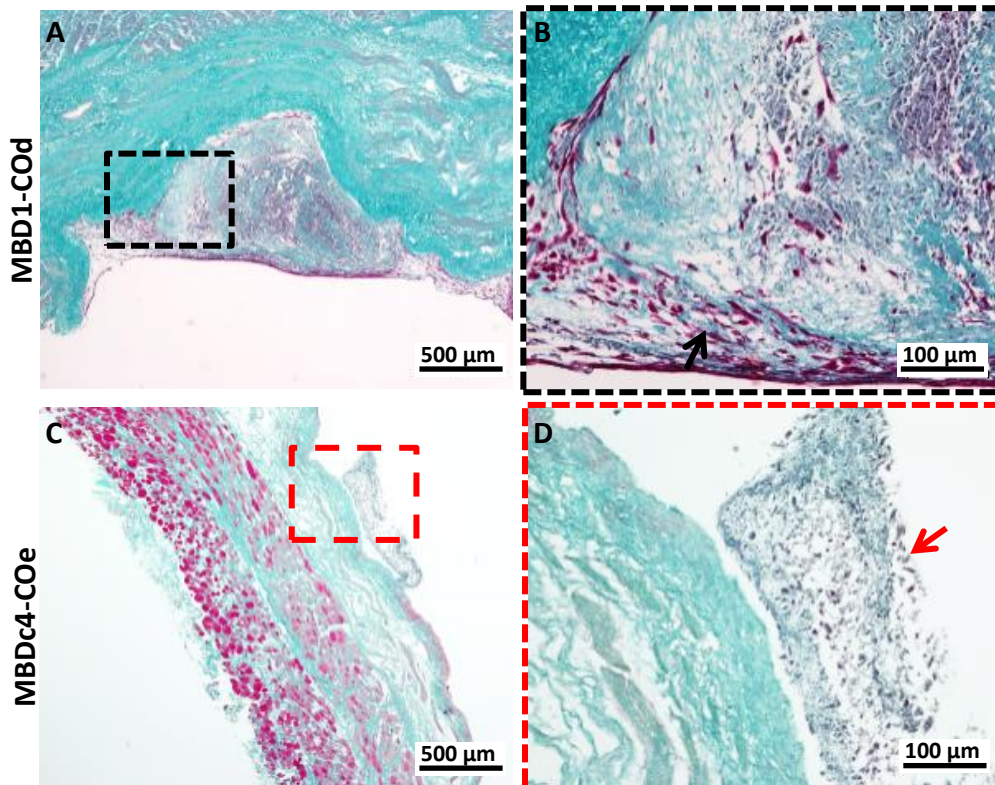


Figure 60 – Coloration au TM des feuillets de CSM-GW cultivés pendant pendant 2 semaines à une densité de 13×10^3 cellules.cm⁻² en M2 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate, et ensemencés sur la MBD pendant 21 jours sur une matrice revêtue ou non.

A-B : Observation d'un feuillet cellulaire (flèche noire) sur la face interne de la MBD, avec infiltration cellulaire (A : Grossissement x10 ; B : Grossissement x20).

C-D : Observation d'un feuillet cellulaire non adhérent (flèche rouge) sur la face interne de la MBD. Absence de viabilité cellulaire dans le feuillet (C : Grossissement x10 ; D : Grossissement x20).

La cellularisation sur la MBD avait montré des résultats encourageants, soulignant la capacité des CSM-GW à adhérer, à s'infiltrer et à migrer dans le tissu après 21 jours de culture. En revanche, le revêtement de la MBD avec les protéines matricielles de la GW ne facilitait pas la cellularisation, suggérant même une potentielle cytotoxicité du revêtement (Fig. 61).

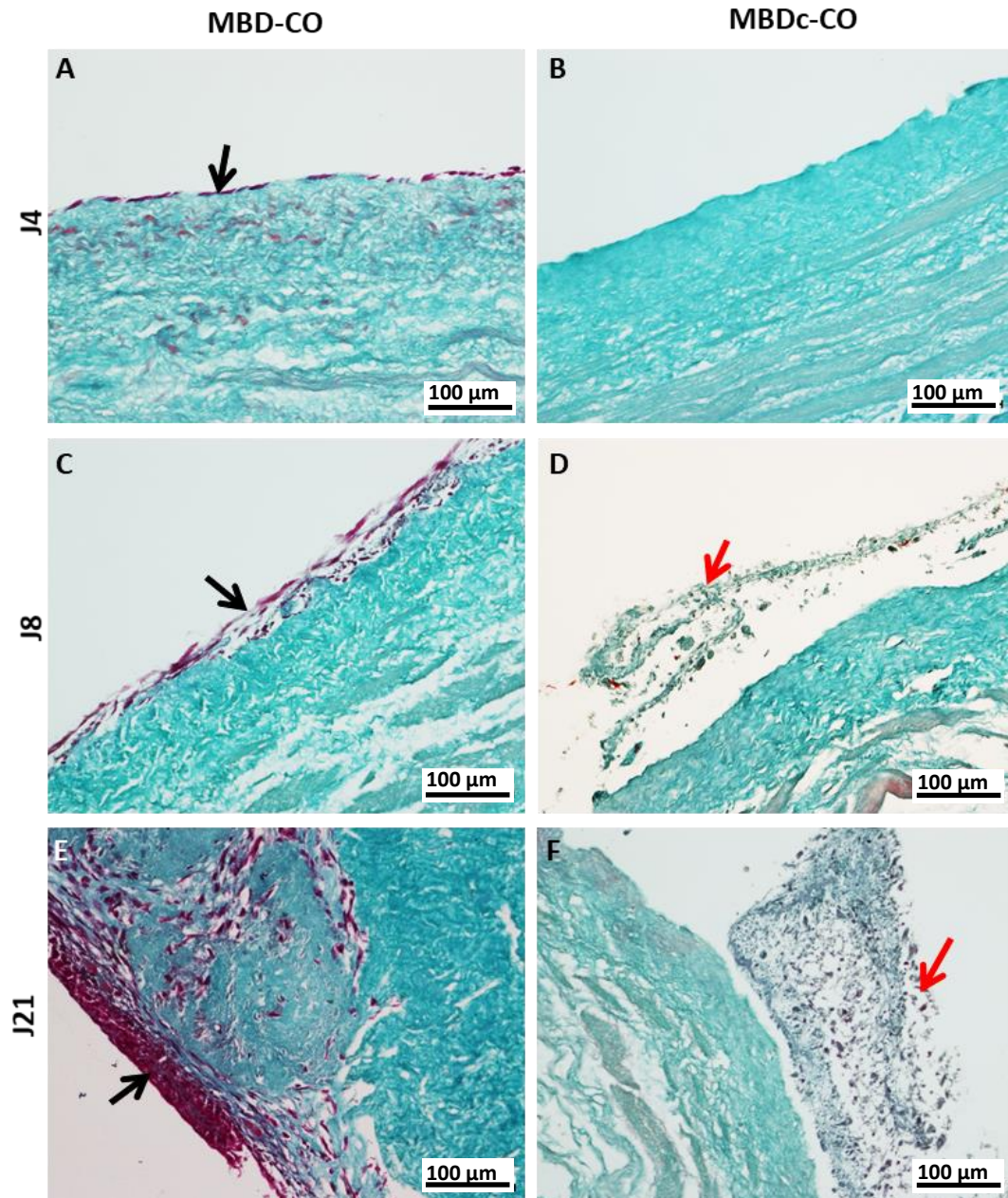


Figure 61 - Coloration au TM des feuillets de CSM-GW cultivés pendant 2 semaines à une densité de 13×10^3 cellules. cm^{-2} en milieu M2 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate, et ensemencés sur la MBD pendant 4, 8 et 21 jours sur une matrice revêtue ou non.

A: Observation d'un feuillet cellulaire sur la face interne de la MBD (flèche noire), pendant 4 jours au grossissement x20. B: Observation d'un feuillet cellulaire sur la face interne de la MBD revêtue, pendant 4 jours au grossissement x20. C: Observation d'un feuillet cellulaire sur la face interne de la MBD (flèche noire), pendant 8 jours au grossissement x20. D: Observation d'un feuillet cellulaire sur la face interne de la MBD revêtue (flèche rouge), pendant 8 jours au grossissement x20. E: Observation d'un feuillet cellulaire sur la face interne de la MBD (flèche noire), pendant 21 jours au grossissement x20. F: Observation d'un feuillet cellulaire sur la face interne de la MBD revêtue (flèche rouge), pendant 21 jours au grossissement x20.

7. Etude du maintien du phénotype stromal des CSM ensemencées pendant 21 jours par IHC

Après 21 jours d'ensemencement des feuillets issus des CSM-GW sur la MBD, une analyse histologique par IHC était réalisée. Les marqueurs positifs (CD90, CD73 et CD105) étaient exprimés de manière significative et homogène (Fig. 62C, 62F, 62I).

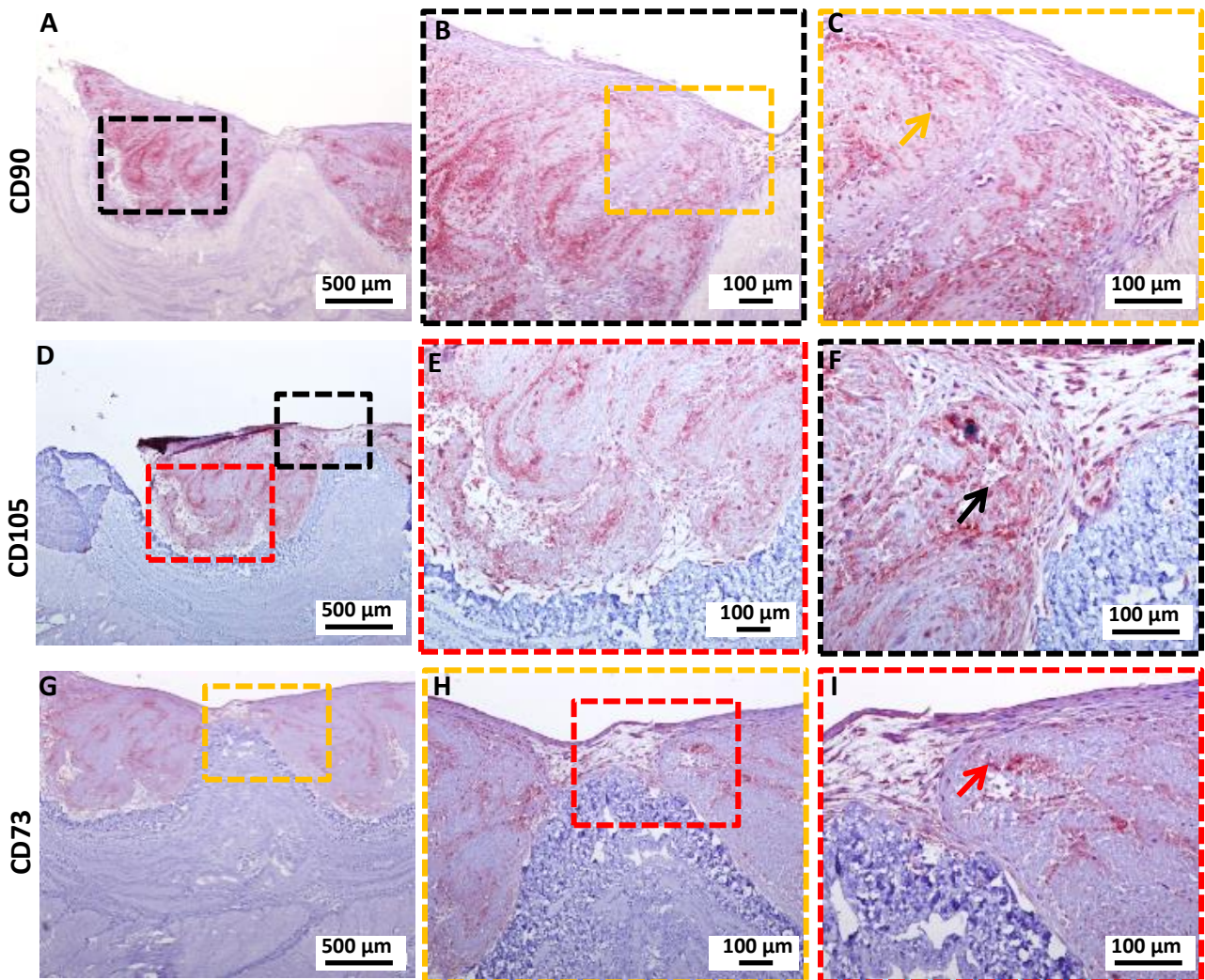


Figure 62 - Phénotypage du profil stromal des CSM-GW en feuillets, cultivés pendant 2 semaines à une densité de 13×10^3 cellules. cm^{-2} en M2 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate, et ensemencés pendant 21 jours sur une MBD selon les différents marqueurs positifs.

A-C : Marquage CD90 positif (flèche jaune) (A : Grossissement x4 ; B : Grossissement x10 ; C : Grossissement x20).

D-F : Marquage CD105 positif (flèche noire) (D : Grossissement x4 ; E : Grossissement x10 ; F : Grossissement x20).

G-I : Marquage CD73 positif (flèche rouge) ; (G : Grossissement x4 ; H : Grossissement x10 ; I : Grossissement x20).

L'absence d'expression du CD45, du CD86 et du HLA-DR permettait de valider l'hypothèse selon laquelle les CSM-GW conservaient leur phénotype stromal après 21 jours d'ensemencement sur la MBD. Un marquage résiduel aspécifique était cependant observé pour le HLA-DR. (Fig. 63C, 63F, 63I)

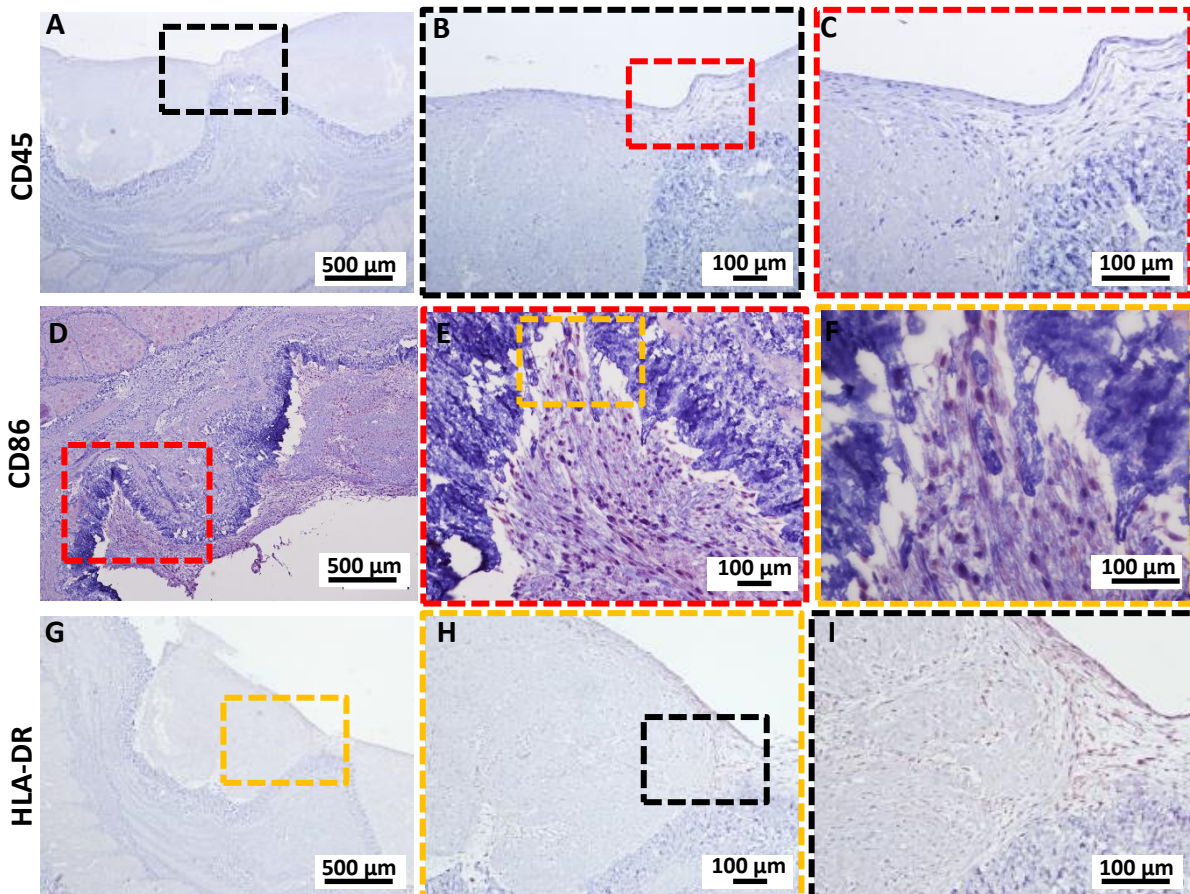


Figure 63 - Phénotypage du profil stromal des CSM-GW en feuillets, cultivés pendant 2 semaines à une densité de 13×10^3 cellules.cm⁻² en milieu M2 à 0,5 mM de sodium L-ascorbate, et ensemencés pendant 21 jours sur une MBD selon les différents marqueurs négatifs.

A-C : Marquage CD45 négatif (A : Grossissement x4 ; B : Grossissement x10 ; B : Grossissement x20).

D-F : Marquage CD86 négatif (C : Grossissement x4 ; D : Grossissement x10 ; E : Grossissement x20).

G-I : Marquage HLA-DR négatif (G : Grossissement x4 ; H : Grossissement x10 ; I : Grossissement x20).

Les colorations au Bleu Alcian et au VK ont permis de démontrer l'absence de différenciation des CSM-GW en chondrocytes ou de minéralisation du tissu, après 21 jours d'ensemencement en milieu M2 (Fig. 64). La présence de GAG dans la MEC synthétisée par les CSM-GW était mise en évidence par la coloration au Bleu Alcian. (Fig. 64, flèche jaune)

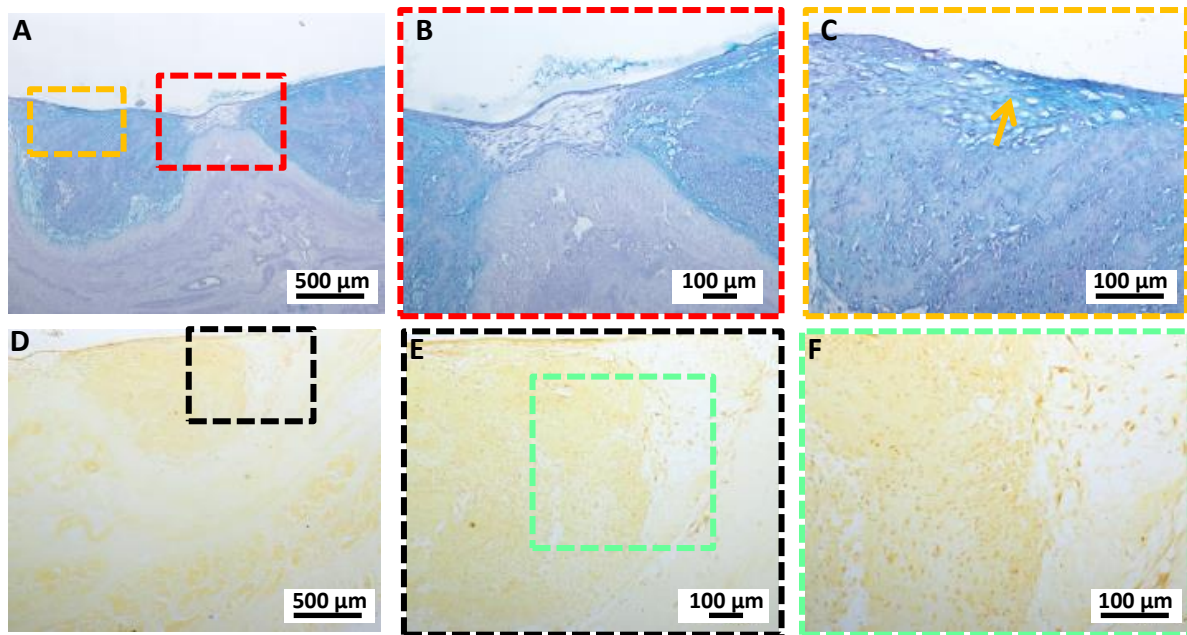


Figure 64 - Phénotypage du profil stromal des CSM-GW en feuillets, cultivés pendant 2 semaines à une densité de 13×10^3 cellules. cm^{-2} en milieu M2 et 0,5 mM de sodium L-ascorbate, et ensemencés pendant 21 jours sur une MBD par coloration au Bleu Alcian et au VK.

A-C : Coloration au Bleu Alcian (A : Grossissement x4 ; B : Grossissement x10 ; C : Grossissement x20).
D-F : Coloration au Von Kossa (D : Grossissement x4 ; E : Grossissement x10 ; F : Grossissement x20).

8. Observation de la viabilité cellulaire après 21 jours par L/D

La viabilité des CSM-GW en feuillet était mise en évidence par un test de L/D après 21 jours d'ensemencement sur la MBD en milieu M2. Pour chaque donneur ($n=3$), le nombre de cellules mortes étaient quantifiées selon une surface de feuillet de CSM-GW vivantes.

Pour l'échantillon cellularisé MBD1-CO_d, 43 cellules mortes étaient présentes sur une surface donnée de feuillet de cellules vivantes de $0,03 \text{ mm}^2$ (Fig. 65B). Concernant l'échantillon MBD2-CO_c, une surface de feuillet de CSM-GW vivantes de $0,12 \text{ mm}^2$ était calculée pour laquelle 220,5 cellules étaient mortes (Fig. 65D). Un dénombrement de 487 cellules mortes sur une surface $0,21 \text{ mm}^2$ était réalisé pour l'échantillon MBD3-CO_c (Fig. 65F).

L'orientation des CSM-GW en feuillet selon un plan horizontal observée à J0 était conservée à J21.

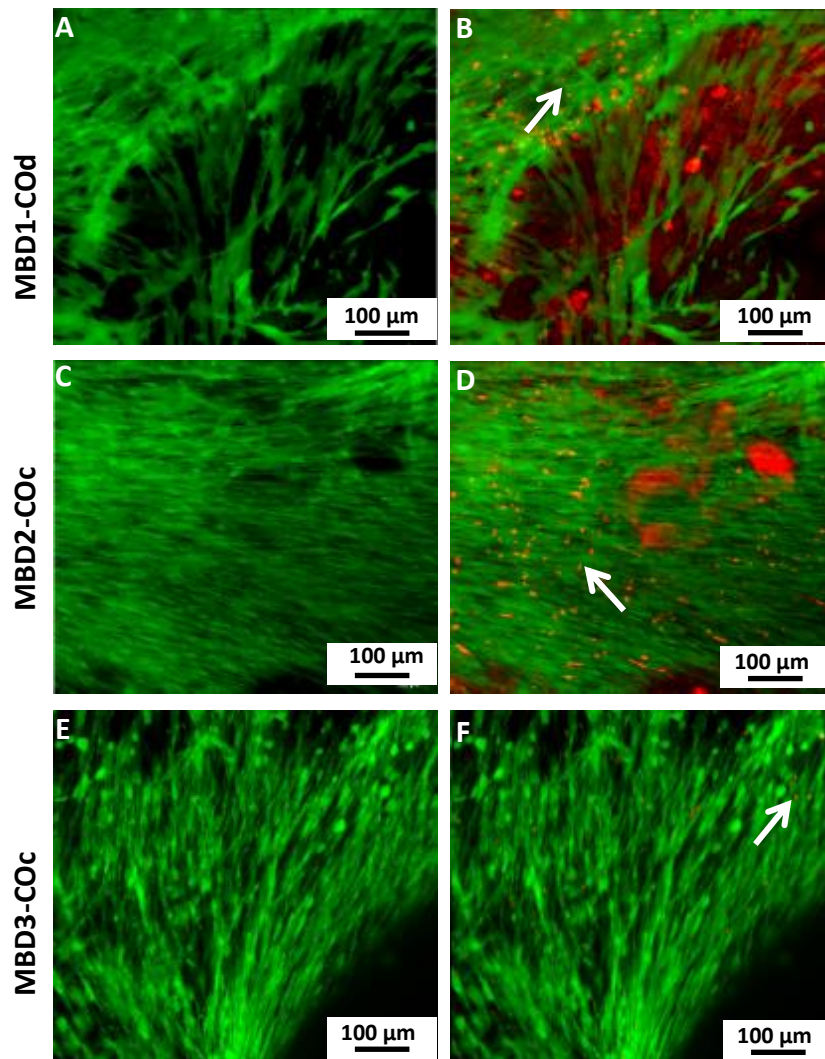


Figure 65 - Observation au microscope à confocal d'un test de Live/Dead des feuillets de CSM-GW ensemencés sur une MBD pendant 21 jours.

A-B : Quantification de la viabilité cellulaire de MBD1-COd. A : Observation des cellules vivantes issues du donneur COd. B : Observation des cellules vivantes sur la MBD1.

C-D : Quantification de la viabilité cellulaire de MBD2-COc. C : Observation des cellules vivantes issues du donneur COc. D : Observation des cellules vivantes sur la MBD2.

E-F : Quantification de la viabilité cellulaire de MBD3-COc. E : Observation des cellules vivantes issues du donneur COc. F : Observation des cellules vivantes sur la MBD3.

Les flèches blanches indiquent la présence de cellules mortes.

IV. DISCUSSION

1. Les cellules stromales mésenchymateuses de la gelée de Wharton

Luc *et al.* ont démontré la faisabilité de développer un feuillet de CSM-TA de porc dans le but de cellulariser une MBD œsophagienne.⁹⁴ Bien que les CSM-TA soient reconnues comme cellules candidates pour la cellularisation des biomatériaux, leurs méthodes de prélèvements représentaient un risque élevé d'infection et requéraient des procédures invasives ne permettant d'isoler qu'une faible quantité de cellules, plus ou moins viable selon le profil du donneur.²²⁷

Comparées aux CSM-MO utilisées par Arakelian *et al.* en tant que cellules candidates pour la recellularisation de la MBD^{23,112}, les CSM-GW présentaient une sénescence cellulaire ralentie après une culture *in vitro* prolongée, une capacité proliférative supérieure et un faible potentiel de différenciation *in vitro* en adipocytes et ostéocytes.²⁵⁷ De plus, les CSM-GW diffèrent des CSM-MO de par leur sur-expression des molécules de régulation immunitaire et les facteurs trophiques.²⁵⁸ L'exploration du profil immunologique des CSM-GW est essentielle pour définir leur potentiel en médecine régénératrice. En effet, les CSM-GW ont été reconnues pour leur capacité unique à moduler la réponse immunitaire, offrant ainsi un attrait significatif pour des applications cliniques.²⁰⁹ Leur faible immunogénicité en partie attribuée à l'absence d'expression du HLA-DR, suggère une tolérance immunitaire lors des transplantations allogéniques. Des études ont également révélé que ces CSM-GW pouvaient limiter, voire supprimer les réponses immunitaires innées et adaptatives, grâce à leur capacité à moduler les LTregs et les CPA.²²⁷

Dans ces travaux de thèse une expression conjointe du CD25+ et du CD4+ après une co-culture des CSM-GW avec des PBMC, ainsi que l'absence de prolifération lymphocytaire et l'absence de l'expression du HLA-DR par les CSM-GW confirmaient le profil non-immunogène de ces cellules. Aussi, l'absence de relargage d'IFN- γ dans le sécrétome par les CSM-GW renforçait l'hypothèse selon laquelle ces cellules présentaient un phénotype immuno-modulateur. L'IFN- γ est une cytokine essentielle du système immunitaire qui joue un rôle central dans la modulation et la coordination de la réponse immunitaire.²⁵⁴ Principalement produit par les LT activés, l'IFN- γ favorise l'activation des LT cytotoxiques.²²⁷ L'IFN- γ renforce également la

cytotoxicité des cellules NK, tout en augmentant l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) sur les CPA, favorisant ainsi la réponse immunitaire par la reconnaissance et la présentation des antigènes aux LT.²⁵⁵

L'exploration d'un éventail plus large de cytokines relarguées dans le sécrétome des CSM-GW en contact avec les PBMC, telles que l'Interleukine-10 (IL-10), l'Interleukine-6 (IL-6), le TGF- β , l'Interleukine-4 (IL-4), l'Interleukine-13 (IL-13), le Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) et l'Interleukine-17 (IL-17) permettrait d'approfondir la compréhension de la régulation de la réponse immunitaire par les CSM-GW, notamment sur la différenciation des LT et les mécanismes de tolérance immunitaire.^{231,255}

Les CSM-GW génèrent donc un environnement immuno-suppressif afin de favoriser leur survie une fois transplantées.^{209,255} Néanmoins, des questions peuvent être soulevées concernant la capacité des CSM-GW à induire une réponse immunitaire protectrice.²⁵⁶

Des expérimentations *in vivo* des MBD cellularisées avec les feuillets de CSM-GW permettraient d'étudier la conservation du caractère immuno-privilegié des CSM-GW.

2. Les feuillets cellulaires de CSM-GW

Au cours de la dernière décennie, les feuillets cellulaires provenant de CSM dérivées du CO ont suscité un intérêt croissant en tant que solution alternative aux suspensions injectées pour les thérapies cellulaires. En effet, les feuillets de CSM dérivées du CO implantés *in vivo* présentent une viabilité supérieure aux suspensions cellulaires injectées ainsi que des capacités de prolifération et d'auto-renouvellement notables comparées aux CSM issues de l'amnios.^{259,262} La démarche de notre étude s'appuyait sur ces observations, permettant ainsi de définir une méthode idéale pour cellulariser de façon optimale la MBD œsophagienne.

De récentes études ont démontré que les CSM-GW étaient capables de produire des feuillets cellulaires riches en MEC.²⁶⁰ La stratégie adoptée dans ces travaux s'appuyait sur les travaux de Luc *et al.*, dans lesquels ils développaient des feuillets de CSM-TA. Cependant, la manipulation des feuillets cellulaires était le critère majeur, aucune caractérisation exhaustive des propriétés mécaniques et biologiques n'était décrite.⁹⁴

En adaptant cette approche aux CSM-GW, il a été démontré la capacité de ces cellules à créer un feuillet orienté et fonctionnel. La culture de feuillets cellulaires de CSM-GW permettait d'obtenir des multicouches cellulaires intégrées dans la MEC. Jaimes-Parra *et al.* décrivaient les feuillets de CSM-GW comme hétérogènes et se composant de zones acellulaires de MEC, formées de collagènes et de protéoglycanes, entourées de zones cellulaires denses et prolifératives.²⁶¹

Les analyses de ces feuillets démontraient une préservation partielle du phénotype cellulaire des CSM-GW ainsi qu'une résistance mécanique satisfaisante permettant leur manipulation. La viabilité cellulaire au sein des feuillets était évaluée, ainsi que la stabilité et la conservation du phénotype cellulaire selon les marqueurs décrits par l'ISCT.^{220,221} Le phénotypage des CSM-GW en feuillet était réalisé par un marquage IHC, permettant une analyse qualitative de l'expression des marqueurs. Les CSM-GW en feuillet conservaient l'expression positive des CD90, CD105 et CD73 majoritairement présente en périphérie. Les CD90, le CD105, et le CD73 peuvent contribuer à la modulation de l'inflammation, à la régulation de la réponse immunitaire adaptative, et à la création d'un microenvironnement favorisant la tolérance immunitaire.²⁶⁴⁻²⁶⁶ La production de MEC au sein du feuillet serait à l'origine de la perte partielle du phénotype d'origine des CSM-GW.²⁶⁷ Une production de collagène peut entraîner des modifications des interactions cellulaires et des signaux biochimiques, conduisant à des changements phénotypiques. Les cellules s'intègrent ainsi dans un nouveau contexte créé par la MEC, l'objectif étant de maintenir l'équilibre entre la modification du phénotype cellulaire et la préservation des caractéristiques fonctionnelles des CSM-GW.²⁶⁸ L'absence d'expression du CD86 n'a pas été observée systématiquement (données non présentées), alors que les marqueurs CD45 et HLA-DR n'étaient pas exprimés. Il convient de noter que CD86 n'est généralement pas considéré comme un marqueur classique des CSM.²⁶⁹ Le CD86 joue un rôle important dans la co-stimulation des cellules du système immunitaire, en particulier dans l'activation des LT,²⁰⁹ alors que le CD45 participe à l'activation des LT et régule la réponse inflammatoire.²⁷⁰

L'objectif de notre approche est de prévenir la différenciation prématurée des cellules pendant la production des feuillets, et de conserver leur profil cellulaire, préservant ainsi leur capacité à se différencier *in situ* en fonction de la physiologie spécifique de l'organe cible. Les

CSM-GW en feuillet devraient également être capables de chimiotactisme *in situ*. Concernant l'œsophage, l'obtention de cellules épithéliales et musculaires était envisagée en premier lieu, considérant un développement ultérieur cohérent avec l'environnement de l'organe.

L'acide ascorbate utilisé pour la production de feuillet de CSM-GW permet la stimulation de la prolifération cellulaire associée à une capacité à soutenir la minéralisation des CSM.²⁷¹ L'absence de minéralisation des CSM-GW en feuillet ainsi que l'absence de différenciation des cellules selon un profil chondrogénique était confirmée. Par ailleurs, l'acide ascorbate peut également jouer un rôle dans la différenciation adipogénique.²⁷¹ L'évaluation de la différenciation des CSM-GW en adipocytes (données non présentées) permettait de valider le phénotype des cellules en qualité de CSM non différenciées.

Nos travaux ont démontré une modification partielle du phénotype des cellules lorsque celles-ci étaient cultivées en feuillet. La plasticité des CSM-GW ainsi que leur capacité à se différencier en divers phénotypes cellulaires remettent en cause la stabilité et la conservation de leur profil immunologique des cellules en feuillet.²⁶³

3. Cellularisation de la MBD

L'utilisation de feuillets de CSM-TA par Luc *et al.* permettait la cellularisation de la MBD sous sa forme tubulaire. L'application du feuillet cellulaire était possible sur les faces internes et externes, avec une éversion de la MBD. La migration cellulaire du feuillet vers la face externe de la MBD était observée alors que la cellularisation des MBD n'était pas satisfaisante sur la face interne.⁹⁴ La maturation des MBD cellularisées n'a pas démontré d'avantages en termes d'inflammation et de vascularisation.^{16,23}

La cellularisation de la MBD sous forme de patch 2D par les feuillets de CSM-GW après 21 jours de culture a démontré l'infiltration et la migration des cellules au sein de la MBD, la préservation partielle du phénotype des CSM, ainsi que le maintien de la viabilité cellulaire.

L'évaluation de la capacité des CSM-GW à remodeler l'environnement *in vitro* par un marquage IHC collagénique, selon les espèces humaines et porcines, permettrait d'évaluer la qualité et l'origine de la MEC néo-synthétisée.

L'utilisation d'un revêtement collagénique issu de la GW décrit par Fayon *et al.* permettait de favoriser la prolifération cellulaire dans un contexte de régénération de substitut vasculaire.²³⁰

Le revêtement des MBD nécessitait une extraction préalable des protéines de collagènes, de fibronectines et de lumicans de la GW à l'acide d'acide acétique.^{212,230} La transposition de la technique au contexte d'IT de l'œsophage consistait à exposer les MBD aux protéines de la GW dans le but d'améliorer la cellularisation, bien que déjà satisfaisante. Cependant, le revêtement obtenu par extraction à l'acide acétique des protéines de la GW n'a pas permis d'obtenir les résultats souhaités. Une cytotoxicité du revêtement était observée, avec un décollement du feuillet cellulaire dès 8 jours.

V. CONCLUSION

L'exploration des différentes sources de CSM en IT permettait de mettre en évidence les avantages quant à l'utilisation des CSM-GW, comme la sénescence cellulaire ralentie, la capacité proliférative supérieure, le faible potentiel de différenciation, et l'expression de molécules de la régulation immunitaire.

Dans cette étude, le choix de l'utilisation des CSM-GW reposait principalement sur leur caractéristiques phénotypiques immuno-modulatrices, définies par l'absence d'expression du HLA-DR, l'absence de prolifération lymphocytaire et l'absence de relargage d'IFN- γ dans le sécrétome, leur permettant ainsi une tolérance lors des transplantations allogéniques.

Nos travaux ont permis d'explorer la faisabilité de développer des feuillets de CSM-GW, afin d'obtenir un procédé de cellularisation efficace de la MBD sous forme de patch. Les conditions de culture permettaient d'obtenir des feuillets cellulaires viables et fonctionnels. La cellularisation de MBD par les feuillets mettait en évidence un remodelage *in vitro*, une infiltration et une migration des CSM-GW au sein de la MBD oesophagienne. Cependant, la production de MEC collagénique par les CSM-GW semblait entraîner des modifications phénotypiques, remettant en question la stabilité de leur profil immunologique. Une étude de la régulation génique des différents mécanismes cellulaires impliqués dans le développement du feuillet par les CSM-GW permettrait d'explorer les résultats obtenus.

L'utilisation d'un revêtement collagénique issu de la GW ne permettait pas de favoriser la prolifération des CSM- GW sur la MBD. Une optimisation du protocole d'extraction des protéines de la GW est nécessaire afin d'évaluer pleinement le potentiel de la GW dans un contexte de cellularisation.

Des expérimentations *in vivo* des MBD cellularisées avec les feuillets de CSM-GW permettraient d'étudier le comportement des CSM-GW, ainsi que leur rôle dans les étapes d'intégration et de remodelage tissulaire *in situ*.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

L'un des objectifs de ce travail de recherche était d'optimiser la MBD afin de la rendre exploitable sous forme de PIT implantable chez l'homme. Les MBD étaient décrites selon 2 formes possibles, plan et tubulaire.

Les résultats de ces travaux ont permis le développement d'une MBD conforme au cahier des charges précédemment décrit. La MBD était obtenue à partir d'une méthode chimique et enzymatique de décellularisation de l'œsophage dans un bioréacteur, approuvé par la FDA. A l'issue de la décellularisation, la MEC œsophagienne était conservée assurant ainsi la préservation de ses caractéristiques histologiques et protéiques. La MBD était dépourvue de noyau cellulaire, et présentait une faible quantité d'ADN, une longueur de brins d'ADN réduite. Des tests *in vitro* démontraient une faible immunogénicité de la MBD. La MBD présentait des propriétés poreuses en surface alors qu'elle était non perméable.

Un second objectif était d'explorer les capacités de la MBD comme PTC. Pour cela, la cellularisation *in vitro* de la MBD en vue d'un remodelage *in situ* était étudiée.

L'exploration des CSM-GW dans cette étude, obtenues de façon non-invasive et non douloureuse, permettait de confirmer les propriétés immuno-modulatrices des cellules, montrant une faible immunogénicité ainsi qu'une capacité à réguler les réponses immunitaires. Les CSM-GW étaient cultivées de façon à obtenir des feuillets cellulaires, décrits comme une approche prometteuse pour la thérapie cellulaire. La cellularisation des MBD par les feuillets montrait une infiltration et une migration des CSM-GW ainsi qu'un remodelage *in vitro* à 21 jours. Bien que ces feuillets démontraient une viabilité cellulaire élevée, une capacité proliférative et une résistance mécanique satisfaisante, des changements phénotypiques sous l'influence de la MEC collagénique produite étaient observés, soulevant des interrogations sur la stabilité du profil phénotypique des cellules.

En résumé, nous avons réussi à obtenir un substitut œsophagien produit à partir d'une MBD conforme au cahier des charges. La MBD était cellularisable pendant 21 jours au moyen de feuillets de CSM-GW.

Des améliorations au protocole de détoxification et des analyses de la biocompatibilité *in vivo* de la MBD conduites chez le rongeur sont nécessaires pour la suite des travaux. D'autres études *in vivo* de la MBD cellularisée par les feuillets de CSM-GW pourraient apporter des informations sur l'intégration et le remodelage tissulaire *in situ*, permettant de comprendre la dynamique entre la MBD, les CSM-GW, et leur environnement physiologique. Afin d'étudier la fonctionnalité de la MBD, sous forme de PIT ou PTC, il est également essentiel de tester la réparation par comblement partiel de pleine épaisseur, et d'autre part, la substitution œsophagienne sous forme tubulaire de pleine épaisseur dans un modèle de porc, déjà maîtrisé par l'équipe.

BIBLIOGRAPHIE

1. Gronnier C, Collet D. Anatomie chirurgicale de l'œsophage. Techniques chirurgicales. *Appareil digestif*. 2019 ;**14**(1):1-12 [Article40-170]
2. Lecoindre P. Pathologie de l'œsophage. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Vétérinaire, Gastro-entérologie, 0700, 2010.
3. Mir, M., Ali, M. N., Ansari, U. & Sami, J. Structure and motility of the esophagus from a mechanical perspective. *Esophagus* **13**, 8–16 (2016).
4. Montaudan, M. Appareil digestif - Manuel d'anatomie descriptive, fonctionnelle et clinique. (2022).
5. Oezcelik, A. & DeMeester, S. R. General Anatomy of the Esophagus. *Thorac. Surg. Clin.* **21**, 289–297 (2011).
6. Kahia, E. Les maladies du système digestif haut: physiopathologie, diagnostic et place des IPP dans la prise en charge thérapeutique. *Medicine* (2005)
7. Durcan, C. *et al.* Experimental investigations of the human œsophagus: anisotropic properties of the embalmed mucosa–submucosa layer under large deformation. *Biomech. Model. Mechanobiol.* **21**, 1685–1702 (2022).
8. Natali, A. N., Carniel, E. L. & Gregersen, H. Biomechanical behaviour of œsophageal tissues: Material and structural configuration, experimental data and constitutive analysis. *Med. Eng. Phys.* **31**, 1056–1062 (2009).
9. Vanags, I. *et al.* Biomechanical properties of œsophagus wall under loading. *J. Biomech.* **36**, 1387–1390 (2003).
10. Saxena, A. K., Biro, E., Sommer, G. & Holzapfel, G. A. Esophagus stretch tests: Biomechanics for tissue engineering and possible implications on the outcome of esophageal atresia repairs performed under excessive tension. *Esophagus* **18**, 346–352 (2021).
11. Tachdjian G. Appareil respiratoire - Embryologie et histologie humaines. *DFGSM* (2016).
12. Dray, X. & Cattan, P. Foreign bodies and caustic lesions. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **27**, 679–689 (2013).
13. CDU-HGE - Chirurgie digestive - Hépatogastro-entérologie. *Tumeurs de l'œsophage*. (2018)

14. Taylor M, O'Neil B. Cancers du tractus gastro-intestinal supérieur. *Médecine interne de Netter* (2011)
15. Chirica, M. *et al.* Perforations de l'œsophage. *J. Chir. Viscérale* **147**, 169–181 (2010).
16. Luc, G. Ingénierie tissulaire : Mise en oeuvre d'un procédé de fabrication d'une matrice œsophagienne biologique. (Université de Bordeaux, 2016).
17. Ferlay, J. *et al.* Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int. J. Cancer* **149**, 778–789 (2021).
18. Abnet, C. C., Arnold, M. & Wei, W.-Q. Epidemiology of Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Gastroenterology* **154**, 360–373 (2018).
19. Defosse, G. *et al.* Cancer incidence and mortality trends in France over 1990–2018 for solid tumors: the sex gap is narrowing. *BMC Cancer* **21**, 726 (2021).
20. Luc, G., Durand, M., Chiche, L. & Collet, D. Major Post-Operative Complications Predict Long-Term Survival After Esophagectomy in Patients with Adenocarcinoma of the Esophagus. *World J. Surg.* **39**, 216–222 (2015).
21. G. Schmutz, D. Régent, *et al.* Œsophage opéré. *Radiologie et imagerie médicale abdominale digestive*, Vol. **37**,3:1-25 (2019)
22. Luc, G., Durand, M., Collet, D., Guillemot, F. & Bordenave, L. Esophageal tissue engineering. *Expert Rev. Med. Devices* **11**, 225–241 (2014).
23. Levenson, G. *et al.* Circumferential esophageal replacement by a decellularized esophageal matrix in a porcine model. *Surgery* **171**, 384–392 (2022).
24. Lerut, T. E. & van Lanschot, J. J. B. Chronic symptoms after subtotal or partial œsophagectomy: diagnosis and treatment. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **18**, 901–915 (2004).
25. Mariette, C. & Triboulet, J. P. [Complications following œsophagectomy: mechanism, detection, treatment and prevention]. *J. Chir. (Paris)* **142**, 348–354 (2005).
26. Anderson, D. J. & Locke, J. E. Progress towards solving the donor organ shortage. *Nat. Rev. Nephrol.* **19**, 83–84 (2023).
27. Kupiec-Weglinski, J. W. Grand Challenges in Organ Transplantation. *Front. Transplant.* **1**, (2022).
28. Saidi, R. F. & Hejazii Kenari, S. K. Challenges of Organ Shortage for Transplantation: Solutions and Opportunities. *Int. J. Organ Transplant. Med.* **5**, 87–96 (2014).

29. Kreft, A., Neumann, H., von Bach, D. S. & Wagner-Drouet, E. M. Histologic diagnosis and grading of esophageal acute graft-versus-host disease. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* **474**, 325–332 (2019).
30. Maghsoudlou, P., Eaton, S. & De Coppi, P. Tissue engineering of the esophagus. *Semin. Pediatr. Surg.* **23**, 127–134 (2014).
31. Paulo Zambon, J., Atala, A. & Yoo, J. J. Methods to generate tissue-derived constructs for regenerative medicine applications. *Methods* **171**, 3–10 (2020).
32. Shimojo, A. A. M. *et al.* Scaffolds for Tissue Engineering: A State-of-the-Art Review Concerning Types, Properties, Materials, Processing, and Characterization. in *Racing for the Surface: Antimicrobial and Interface Tissue Engineering* (eds. Li, B., Moriarty, T. F., Webster, T. & Xing, M.) 647–676 (Springer International Publishing, 2020). doi:10.1007/978-3-030-34471-9_23.
33. Khademhosseini, A. & Langer, R. A decade of progress in tissue engineering. *Nat. Protoc.* **11**, 1775–1781 (2016).
34. Langer, R. & Vacanti, J. P. Tissue engineering. *Science* **260**, 920–926 (1993).
35. Langer, R. & Vacanti, J. Advances in tissue engineering. *J. Pediatr. Surg.* **51**, 8–12 (2016).
36. Sahakyants, T. & Vacanti, J. P. Tissue engineering: from the bedside to the bench and back to the bedside. *Pediatr. Surg. Int.* **36**, 1123–1133 (2020).
37. Letourneur, D. & Bordenave, L. Ingénierie tissulaire - Une approche multidisciplinaire. *médecine/sciences* **33**, 46–51 (2017).
38. Gaharwar, A. K., Singh, I. & Khademhosseini, A. Engineered biomaterials for *in situ* tissue regeneration. *Nat. Rev. Mater.* **5**, 686–705 (2020).
39. Schneider, R. K. *et al.* The role of biomaterials in the direction of mesenchymal stem cell properties and extracellular matrix remodelling in dermal tissue engineering. *Biomaterials* **31**, 7948–7959 (2010).
40. Schneider, R. K. *et al.* The osteogenic differentiation of adult bone marrow and perinatal umbilical mesenchymal stem cells and matrix remodelling in three-dimensional collagen scaffolds. *Biomaterials* **31**, 467–480 (2010).
41. Ercal, P. & Pekozer, G. G. A Current Overview of Scaffold-Based Bone Regeneration Strategies with Dental Stem Cells. *Cell Biology and Translational Medicine*, Vol. **9**, 61–85 (2020).

42. dos Santos, V., Brandalise, R. N. & Savaris, M. Biomaterials Sterilization Methods. in *Engineering of Biomaterials* (eds. dos Santos, V., Brandalise, R. N. & Savaris, M.) 61–73 (Springer International Publishing, 2017).
43. Curtis, A. & Riehle, M. Tissue engineering: the biophysical background. *Phys. Med. Biol.* **46**, R47-R65. *Phys. Med. Biol.* **46**, R47-65 (2001).
44. Abla, A. B. Développement de biomatériaux bio-activés et fonctionnalisés par des domaines de la Fibronectine humaine. (Université Paris-Nord - Paris XIII, 2021).
45. Marin, E. Forged to heal: The role of metallic cellular solids in bone tissue engineering. *Mater. Today Bio* **23**, 100777 (2023).
46. Khaohoen, A. *et al.* Biomaterials and Clinical Application of Dental Implants in Relation to Bone Density-A Narrative Review. *J. Clin. Med.* **12**, 6924 (2023).
47. Finiels, P. J. [Interest of porous biomaterials in spinal surgery]. *Neurochirurgie.* **50**, 630–638 (2004).
48. Hoveidaei, A. H. *et al.* Nano-hydroxyapatite structures for bone regenerative medicine: Cell-material interaction. *Bone* 116956 (2023) doi:10.1016/j.bone.2023.116956.
49. Kelsey, L. J., Arcelona, C., Aronson, S. & Gosain, A. K. Prolonged Inflammatory Reaction to Fractured Calcium Phosphate Cement Cranioplasty Secondary to Sequestration Within the Diploe. *J. Craniofac. Surg.* (2023)
50. Dodda, J. M. *et al.* Bioresorbable films of polycaprolactone blended with poly(lactic acid) or poly(lactic-co-glycolic acid). *Int. J. Biol. Macromol.* **248**, 126654 (2023).
51. Amiri, S. *et al.* Evaluation of polyglycolic acid as an animal-free biomaterial for three-dimensional culture of human endometrial cells. *Clin. Exp. Reprod. Med.* **49**, 259–269 (2022).
52. Maduka, C. V. *et al.* Polylactide Degradation Activates Immune Cells by Metabolic Reprogramming. *Adv. Sci. Weinh. Baden-Wurtt. Ger.* **10**, e2304632 (2023).
53. Mitevaska, A. *et al.* Polyurethane Culture Substrates Enable Long-Term Neuron Monoculture in a Human *in vitro* Model of Neurotrauma. *Neurotrauma Rep.* **4**, 682–692 (2023).
54. Aldana, A. A., Bauer, J. & Baker, M. B. Chapter 6 - Synthetic biomaterials. in *Tissue Engineering (Third Edition)* (eds. De Boer, J., Blitterswijk, C. A. V., Uquillas, J. A. & Malik, N.) 173–212 (Academic Press, 2023).

55. Gonzalez-Vilchis, R. A., Piedra-Ramirez, A., Patiño-Morales, C. C., Sanchez-Gomez, C. & Beltran-Vargas, N. E. Sources, Characteristics, and Therapeutic Applications of Mesenchymal Cells in Tissue Engineering. *Tissue Eng. Regen. Med.* **19**, 325–361 (2022).
56. Liu, C., Pei, M., Li, Q. & Zhang, Y. Decellularized extracellular matrix mediates tissue construction and regeneration. *Front. Med.* **16**, 56–82 (2022).
57. Liu, X., Zheng, C., Luo, X., Wang, X. & Jiang, H. Recent advances of collagen-based biomaterials: Multi-hierarchical structure, modification and biomedical applications. *Mater. Sci. Eng. C* **99**, 1509–1522 (2019).
58. Scanga, V. I., Goraltchouk, A., Nussaiba, N., Shoichet, M. S. & Morshead, C. M. Biomaterials for neural-tissue engineering--Chitosan supports the survival, migration, and differentiation of adult-derived neural stem and progenitor cells. *Can. J. Chem.* **88**, 277 (2010).
59. Al-Mofty, S. E.-D. & Azzazy, H. M. E.-S. Effect of mold shape on the microstructure of gelatin sponges for tissue engineering applications. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **142**, 105832 (2023).
60. Zhai, Y. *et al.* [Application of gelatin microspheres in bone tissue engineering]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao Chin. J. Biotechnol.* **39**, 3724–3737 (2023).
61. Arif, M. M. A. *et al.* Fabrication of Bio-Based Gelatin Sponge for Potential Use as A Functional Acellular Skin Substitute. *Polymers* **12**, 2678 (2020).
62. Mousa, H. M. *et al.* Development of biocompatible tri-layered nanofibers patches with endothelial cells for cardiac tissue engineering. *Eur. Polym. J.* **129**, 109630 (2020).
63. Song, R. *et al.* Current development of biodegradable polymeric materials for biomedical applications. *Drug Des. Devel. Ther.* **12**, 3117–3145 (2018).
64. Chandrababu, K. *et al.* *In vivo* neural tissue engineering using adipose-derived mesenchymal stem cells and fibrin matrix. *J. Spinal Cord Med.* **46**, 262–276 (2023).
65. Noori, A., Ashrafi, S. J., Vaez-Ghaemi, R., Hatamian-Zaremi, A. & Webster, T. J. A review of fibrin and fibrin composites for bone tissue engineering. *Int. J. Nanomedicine* **12**, 4937–4961 (2017).
66. Hoshiba, T., Lu, H., Kawazoe, N. & Chen, G. Decellularized matrices for tissue engineering. *Expert Opin. Biol. Ther.* **10**, 1717–1728 (2010).

67. Golebiowska, A. A., Intravaia, J. T., Sathe, V. M., Kumbar, S. G. & Nukavarapu, S. P. Decellularized extracellular matrix biomaterials for regenerative therapies: Advances, challenges and clinical prospects. *Bioact. Mater.* **32**, 98–123 (2024).
68. Zhang, Y. *et al.* Evolution of biomimetic ECM scaffolds from decellularized tissue matrix for tissue engineering: A comprehensive review. *Int. J. Biol. Macromol.* **246**, 125672 (2023).
69. Crapo, P. M., Gilbert, T. W. & Badylak, S. F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* **32**, 3233–3243 (2011).
70. Zhu, M. *et al.* *In vivo* engineered extracellular matrix scaffolds with instructive niches for oriented tissue regeneration. *Nat. Commun.* **10**, 4620 (2019).
71. Yao, Q. *et al.* Recent development and biomedical applications of decellularized extracellular matrix biomaterials. *Mater. Sci. Eng. C* **104**, 109942 (2019).
72. Wang, J. *et al.* Characterization and therapeutic applications of mesenchymal stem cells for regenerative medicine. *Tissue Cell* **64**, 101330 (2020).
73. Polymeri, A., Giannobile, W. V. & Kaigler, D. Bone Marrow Stromal Stem Cells in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Horm. Metab. Res. Horm. Stoffwechselforschung Horm. Metab.* **48**, 700–713 (2016).
74. Wang, Y., Wang, D., Guo, Y., Liu, J. & Pan, J. The application of bone marrow mesenchymal stem cells and biomaterials in skeletal muscle regeneration. *Regen. Ther.* **15**, 285–294 (2020).
75. Hauser, H., Editor, Fussenegger, M., Editor, Kitsberg, D. & Walker, J. M., Editor. Human Embryonic Stem Cells for Tissue Engineering. *Tissue Eng.* **33** (2007) doi:10.1007/978-1-59745-443-8.
76. Wu, P., Moschidou, D. & Fisk, N. M. *Fetal Tissue Engineering: Regenerative Capacity of Fetal Stem Cells*. 157 (Springer Berlin Heidelberg, 2009). doi:10.1007/978-3-540-77755-7_12.
77. Eberli, D. & Atala, A. Tissue Engineering Using Adult Stem Cells. *Methods Enzymol.* **420**, 287–302 (2006).
78. Kucia, M. *et al.* Adult marrow-derived very small embryonic-like stem cells and tissue engineering. *Expert Opin. Biol. Ther.* **7**, 1499–1514 (2007).
79. Takao, T. *et al.* A novel chondrocyte sheet fabrication using human-induced pluripotent stem cell-derived expandable limb-bud mesenchymal cells. *Stem Cell Res. Ther.* **14**, (2023).

80. Prakash, N. *et al.* Progress and emerging techniques for biomaterial-based derivation of mesenchymal stem cells (MSCs) from pluripotent stem cells (PSCs). *Biomater. Res.* **27**, (2023).
81. Li, Y.-C., Zhu, K. & Young, T.-H. Induced pluripotent stem cells, form *in vitro* tissue engineering to *in vivo* allogeneic transplantation. *J. Thorac. Dis.* **9**, 455–459 (2017).
82. Rosenbaum, A. J., Grande, D. A. & Dines, J. S. The use of mesenchymal stem cells in tissue engineering. *Organogenesis* **4**, 23–27 (2008).
83. Naji, A. *et al.* Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **76**, 3323–3348 (2019).
84. Rambhia, K. J. & Ma, P. X. Controlled Drug Release for Tissue Engineering. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **219**, 119–128 (2015).
85. Mouriño, V., Cattalini, J. P. & Boccaccini, A. R. Metallic ions as therapeutic agents in tissue engineering scaffolds: an overview of their biological applications and strategies for new developments. *J. R. Soc. Interface* **9**, 401–419 (2012).
86. Ren, X., Zhao, M., Lash, B., Martino, M. M. & Julier, Z. Growth Factor Engineering Strategies for Regenerative Medicine Applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **7**, (2020).
87. El-Sayed, M. E. *et al.* Mesenchymal stem cell transplantation in burn wound healing: uncovering the mechanisms of local regeneration and tissue repair. *Histochem. Cell Biol.* (2023)
88. Li, W. *et al.* Emerging advances in hydrogel-based therapeutic strategies for tissue regeneration. *Regen. Ther.* **24**, 459–471 (2023).
89. Pot, S. A., Lin, Z., Shiu, J., Benn, M. C. & Vogel, V. Growth factors and mechano-regulated reciprocal crosstalk with extracellular matrix tune the keratocyte-fibroblast/myofibroblast transition. *Sci. Rep.* **13**, 11350 (2023).
90. Zhu, Y., Zhang, C., Jiang, B. & Dong, Q. MiR-760 targets HBEGF to control cartilage extracellular matrix degradation in osteoarthritis. *J. Orthop. Surg.* **18**, 186 (2023).
91. Lambrichts, I., Wolfs, E., Bronckaers, A., Gervois, P. & Vanganswinkel, T. The Effect of Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin on Central and Peripheral Nervous System Neurons- Implications for Biomaterial Applicability. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 14314 (2023).
92. Xu, Z. *et al.* Poly(ethylene glycol) Hydrogels with the Sustained Release of Hepatocyte Growth Factor for Enhancing Vascular Regeneration. *ACS Appl. Bio Mater.* (2023) doi:10.1021/acsabm.3c00516.

93. Wang, J. *et al.* Bone marrow-derived IGF-1 orchestrates maintenance and regeneration of the adult skeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **120**, e2203779120 (2023).
94. Luc, G. *et al.* Decellularized and matured esophageal scaffold for circumferential esophagus replacement: Proof of concept in a pig model. *Biomaterials* **175**, 1–18 (2018).
95. ISO 22442-1:2020.
96. Londono, R. & Badylak, S. F. Regenerative Medicine Strategies for Esophageal Repair. *Tissue Eng. Part B Rev.* **21**, 393–410 (2015).
97. Arakelian, L. *et al.* Esophageal tissue engineering: from bench to bedside. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1434**, 156–163 (2018).
98. Kanetaka, K. & Eguchi, S. Regenerative medicine for the upper gastrointestinal tract. *Regen. Ther.* **15**, 129–137 (2020).
99. Zani, A., Pierro, A., Elvassore, N. & De Coppi, P. Tissue engineering: an option for esophageal replacement? *Semin. Pediatr. Surg.* **18**, 57–62 (2009).
100. Antunes, C., Aleem, A. & Curtis, S. A. Gastroesophageal Reflux Disease. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2023).
101. González Sáez, L. A., Arnal Monreal, F., Pita Fernández, S. & Machuca Santa Cruz, J. Experimental Study Using PTFE (Goretex) Patches for Replacement of the Esophageal Wall. *Eur. Surg. Res.* **35**, 372–376 (2003).
102. Freud, E., Efrati, I., Kidron, D., Finally, R. & Mares, A. J. Comparative experimental study of esophageal wall regeneration after prosthetic replacement. *J. Biomed. Mater. Res.* **45**, 84–91 (1999).
103. Tan, J. y. *et al.* Esophageal tissue engineering: An in-depth review on scaffold design. *Biotechnol. Bioeng.* **109**, 1–15 (2012).
104. Korkmaz, M. *et al.* Esophageal muscle cell interaction with biopolymers. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **13**, BR46-49 (2007).
105. Saito, Y. *et al.* Novel biodegradable stents for benign esophageal strictures following endoscopic submucosal dissection. *Dig. Dis. Sci.* **53**, 330–333 (2008).
106. Grower, M. F., Russell, E. A. & Cutright, D. E. Segmental neogenesis of the dog esophagus utilizing a biodegradable polymer framework. *Biomater. Artif. Cells. Artif. Organs* **17**, 291–314 (1989).
107. Bao, C., Ding, F. & Mei, J. [Experimental studies on tissue engineered esophagus reconstructed with artificial biodegradable scaffold]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke*

- Za Zhi Zhongguo Xiufu Chongjian Waike Zazhi Chin. J. Reparative Reconstr. Surg.* **20**, 1235–1239 (2006).
108. Saito, Y. *et al.* Usefulness of biodegradable stents constructed of poly-L-lactic acid monofilaments in patients with benign esophageal stenosis. *World J. Gastroenterol.* **13**, 3977–3980 (2007).
109. Meng, L. *et al.* Biomechanics of regenerated esophageal tissue following the implantation of a tissue engineered Cellspan™ Esophageal Implant. *J. Biomech.* **140**, 111162 (2022).
110. Sundaram, S. *et al.* Esophageal regeneration following surgical implantation of a tissue engineered esophageal implant in a pediatric model. *Npj Regen. Med.* **7**, 1–12 (2022).
111. Aho, J. M. *et al.* First-in-Human Segmental Esophageal Reconstruction Using a Bioengineered Mesenchymal Stromal Cell-Seeded Implant. *JTO Clin. Res. Rep.* **2**, 100216 (2021).
112. Arakelian, L. *et al.* A clinical-grade acellular matrix for esophageal replacement. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **13**, 2191–2203 (2019).
113. Bhrany, A. D. *et al.* Development of an esophagus acellular matrix tissue scaffold. *Tissue Eng.* **12**, 319–330 (2006).
114. Muncie, J. M. & Weaver, V. M. The Physical and Biochemical Properties of the Extracellular Matrix Regulate Cell Fate. *Curr. Top. Dev. Biol.* **130**, 1–37 (2018).
115. Vogt, C. D. & Panoskaltsis-Mortari, A. Tissue Engineering of the Gastroesophageal Junction. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **14**, 855–868 (2020).
116. Haghdel, M., Imanieh, M. H., Hosseinpour, H., Ghasemi, Y. & Alizadeh, A. A. Development of Bio-artificial Esophageal Tissue Engineering Utilization for Circumferential Lesion Transplantation: A Narrative Review. *Iran. J. Med. Sci.* **47**, 406–421 (2022).
117. Gilpin, A. & Yang, Y. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. *BioMed Res. Int.* **2017**, e9831534 (2017).
118. Rabbani, M., Zakian, N. & Alimoradi, N. Contribution of Physical Methods in Decellularization of Animal Tissues. *J. Med. Signals Sens.* **11**, 1 (2021).
119. Keane, T. J., Swinehart, I. T. & Badylak, S. F. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and *in vivo* relevance. *Methods* **84**, 25–34 (2015).

120. Hrebikova, H., Diaz, D. & Mokry, J. Chemical decellularization: a promising approach for preparation of extracellular matrix. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czechoslov.* **159**, 12–17 (2015).
121. Talaei-Khozani, T. & Yaghoubi, A. An overview of post transplantation events of decellularized scaffolds. *Transpl. Immunol.* **74**, 101640 (2022).
122. Sauter, J. *et al.* Effect of different decellularization protocols on reendothelialization with human cells for a perfused renal bioscaffold of the rat. *BMC Biotechnol.* **23**, 8 (2023).
123. Gilbert, T. W., Sellaro, T. L. & Badylak, S. F. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials* **27**, 3675–3683 (2006).
124. Ozeki, M. *et al.* Evaluation of decellularized esophagus as a scaffold for cultured esophageal epithelial cells. *J. Biomed. Mater. Res. A* **79**, 771–778 (2006).
125. Allu, I., Sahi, A. K., Koppadi, M., Gundu, S. & Sionkowska, A. Decellularization Techniques for Tissue Engineering: Towards Replicating Native Extracellular Matrix Architecture in Liver Regeneration. *J. Funct. Biomater.* **14**, 518 (2023).
126. Neishabouri, A., Soltani Khaboushan, A., Daghigh, F., Kajbafzadeh, A.-M. & Majidi Zolbin, M. Decellularization in Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Evaluation, Modification, and Application Methods. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **10**, (2022).
127. Kasravi, M. *et al.* Immunogenicity of decellularized extracellular matrix scaffolds: a bottleneck in tissue engineering and regenerative medicine. *Biomater. Res.* **27**, 10 (2023).
128. Badylak, S. F. *et al.* Esophageal preservation in five male patients after endoscopic inner-layer circumferential resection in the setting of superficial cancer: a regenerative medicine approach with a biologic scaffold. *Tissue Eng. Part A* **17**, 1643–1650 (2011).
129. Poghosyan, T. *et al.* *In vitro* development and characterization of a tissue-engineered conduit resembling esophageal wall using human and pig skeletal myoblast, oral epithelial cells, and biologic scaffolds. *Tissue Eng. Part A* **19**, 2242–2252 (2013).
130. Syed, O., Walters, N. J., Day, R. M., Kim, H.-W. & Knowles, J. C. Evaluation of decellularization protocols for production of tubular small intestine submucosa scaffolds for use in oesophageal tissue engineering. *Acta Biomater.* **10**, 5043–5054 (2014).
131. Schomisch, S. J. *et al.* Commercially available biological mesh does not prevent stricture after esophageal mucosectomy. *Endoscopy* **46**, 144–148 (2014).
132. Badylak, S., Meurling, S., Chen, M., Spievack, A. & Simmons-Byrd, A. Resorbable bioscaffold for esophageal repair in a dog model. *J. Pediatr. Surg.* **35**, 1097–1103 (2000).

133. Urita, Y. *et al.* Regeneration of the esophagus using gastric acellular matrix: an experimental study in a rat model. *Pediatr. Surg. Int.* **23**, 21–26 (2007).
134. Kajitani, M. *et al.* Successful repair of esophageal injury using an elastin based biomaterial patch. *ASAIO J. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* 1992 **47**, 342–345 (2001).
135. Isch, J. A., Engum, S. A., Ruble, C. A., Davis, M. M. & Grosfeld, J. L. Patch esophagoplasty using AlloDerm as a tissue scaffold. *J. Pediatr. Surg.* **36**, 266–268 (2001).
136. Doede, T., Bondartschuk, M., Joerck, C., Schulze, E. & Goernig, M. Unsuccessful alloplastic esophageal replacement with porcine small intestinal submucosa. *Artif. Organs* **33**, 328–333 (2009).
137. Lopes, M. F. *et al.* Esophageal replacement in rat using porcine intestinal submucosa as a patch or a tube-shaped graft. *Dis. Esophagus Off. J. Int. Soc. Dis. Esophagus* **19**, 254–259 (2006).
138. Beckstead, B. L. *et al.* Esophageal epithelial cell interaction with synthetic and natural scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* **26**, 6217–6228 (2005).
139. Ji, Y. *et al.* Diverse preparation methods for small intestinal submucosa (SIS): Decellularization, components, and structure. *J. Biomed. Mater. Res. A* **107**, 689–697 (2019).
140. Hannon, E. *et al.* Lessons learned from pre-clinical testing of xenogeneic decellularized esophagi in a rabbit model. *iScience* **25**, 105174 (2022).
141. Model, L. & Wiesel, O. A narrative review of esophageal tissue engineering and replacement: where are we? *Ann. Transl. Med.* **9**, (2021).
142. Meehan, G. R. *et al.* Developing a xenograft model of human vasculature in the mouse ear pinna. *Sci. Rep.* **10**, 2058 (2020).
143. Yadav, S., Khan, J. & Yadav, A. Applications of Scaffolds in Tissue Engineering: Current Utilization and Future Prospective. *Curr. Gene Ther.* **24**, 94–109.
144. Karbysheva, S. *et al.* Comparison of sonication with chemical biofilm dislodgement methods using chelating and reducing agents: Implications for the microbiological diagnosis of implant associated infection. *PLoS One* **15**, e0231389 (2020).
145. Abburi, K. Adsorption of phenol and p-chlorophenol from their single and bisolute aqueous solutions on Amberlite XAD-16 resin. *J. Hazard. Mater.* **105**, 143–156 (2003).
146. Cheetham, P. S. J. Removal of Triton X-100 from aqueous solution using amberlite XAD-2. *Anal. Biochem.* **92**, 447–452 (1979).

147. Nayakawde, N. B. *et al.* *In vitro* Regeneration of Decellularized Pig Esophagus Using Human Amniotic Stem Cells. *BioResearch Open Access* **9**, 22–36 (2020).
148. Lagier, J.-C. *et al.* Culturing the human microbiota and culturomics. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 540–550 (2018).
149. Barrett, A. S. *et al.* Hydroxylamine Chemical Digestion for Insoluble Extracellular Matrix Characterization. *J. Proteome Res.* **16**, 4177–4184 (2017).
150. ISO 10993-5:2009.
151. Potart, D. *et al.* The cell-assembled extracellular matrix: A focus on the storage stability and terminal sterilization of this human “bio” material. *Acta Biomater.* **166**, 133–146 (2023).
152. Borchiellini, P., Rames, A., Roubertie, F., L’Heureux, N. & Kawecki, F. Development and characterization of biological sutures made of cell-assembled extracellular matrix. *Biofabrication* **15**, 045018 (2023).
153. Dvorak, K. *et al.* Esophageal acid exposure at pH ≤ 2 is more common in Barrett’s esophagus patients and is associated with oxidative stress. *Dis. Esophagus* **19**, 366–372 (2006).
154. Shoulders, M. D. & Raines, R. T. COLLAGEN STRUCTURE AND STABILITY. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 929–958 (2009).
155. Cooper, G. M. Structure and Organization of Actin Filaments. in *The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition* (Sinauer Associates, 2000).
156. Pérez-Sala, D. *et al.* Vimentin filament organization and stress sensing depend on its single cysteine residue and zinc binding. *Nat. Commun.* **6**, 7287 (2015).
157. Wang, K., Meng, X. & Guo, Z. Elastin Structure, Synthesis, Regulatory Mechanism and Relationship With Cardiovascular Diseases. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, 596702 (2021).
158. Dalton, C. J. & Lemmon, C. A. Fibronectin: Molecular Structure, Fibrillar Structure and Mechanochemical Signaling. *Cells* **10**, 2443 (2021).
159. Sun, B. The mechanics of fibrillar collagen extracellular matrix. *Cell Rep. Phys. Sci.* **2**, 100515 (2021).
160. Pérez-Rico, C. *et al.* Elastin Development-Associated Extracellular Matrix Constituents of Subepithelial Connective Tissue in Human Pterygium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **55**, 6309–6318 (2014).
161. Hohenester, E. Structural biology of laminins. *Essays Biochem.* **63**, 285–295 (2019).

162. Yu, B.-T., Li, W.-T., Song, B.-Q. & Wu, Y.-L. Comparative study of the Triton X-100-sodium deoxycholate method and detergent-enzymatic digestion method for decellularization of porcine aortic valves. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **17**, 2179–2184 (2013).
163. Kuna, V. K., Kvarnström, N., Elebring, E. & Holgersson, S. S. Isolation and Decellularization of a Whole Porcine Pancreas. *J. Vis. Exp. JoVE* 58302 (2018) doi:10.3791/58302.
164. Porzionato, A. *et al.* Tissue-Engineered Grafts from Human Decellularized Extracellular Matrices: A Systematic Review and Future Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 4117 (2018).
165. McInnes, A. D., Moser, M. A. J. & Chen, X. Preparation and Use of Decellularized Extracellular Matrix for Tissue Engineering. *J. Funct. Biomater.* **13**, 240 (2022).
166. Silva, J. C. *et al.* Compositional and structural analysis of glycosaminoglycans in cell-derived extracellular matrices. *Glycoconj. J.* **36**, 141–154 (2019).
167. Giobbe, G. G. *et al.* Preservation over time of dried acellular esophageal matrix. *Biomed. Phys. Eng. Express* **4**, 065021 (2018).
168. Godefroy, W. *et al.* Development and qualification of clinical grade decellularized and cryopreserved human esophagi. *Sci. Rep.* **13**, 18283 (2023).
169. Tao, M. *et al.* Sterilization and disinfection methods for decellularized matrix materials: Review, consideration and proposal. *Bioact. Mater.* **6**, 2927–2945 (2021).
170. Lun, S. *et al.* A functional extracellular matrix biomaterial derived from ovine forestomach. *Biomaterials* **31**, 4517–4529 (2010).
171. Johnson, C. M., Guo, D., Ryals, S., Postma, G. N. & Weinberger, P. M. The feasibility of gamma radiation sterilization for decellularized tracheal grafts. *The Laryngoscope* **127**, E258–E264 (2017).
172. Huang, Q., Dawson, R. A., Pegg, D. E., Kearney, J. N. & Macneil, S. Use of peracetic acid to sterilize human donor skin for production of acellular dermal matrices for clinical use. *Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc.* **12**, 276–287 (2004).
173. Pellegata, A. F. *et al.* Terminal sterilization of equine-derived decellularized tendons for clinical use. *Mater. Sci. Eng. C* **75**, 43–49 (2017).
174. Moradi, L. *et al.* Evaluation of different sterilization methods for decellularized kidney tissue. *Tissue Cell* **66**, 101396 (2020).

175. Fidalgo, C. *et al.* A sterilization method for decellularized xenogeneic cardiovascular scaffolds. *Acta Biomater.* **67**, 282–294 (2018).
176. Gosztyla, C. *et al.* A Comparison of Sterilization Techniques for Production of Decellularized Intestine in Mice. *Tissue Eng. Part C Methods* **26**, 67–79 (2020).
177. Balestrini, J. L. *et al.* Sterilization of Lung Matrices by Supercritical Carbon Dioxide. *Tissue Eng. Part C Methods* **22**, 260–269 (2016).
178. Hennessy, R. S. *et al.* Supercritical Carbon Dioxide–Based Sterilization of Decellularized Heart Valves. *JACC Basic Transl. Sci.* **2**, 71–84 (2017).
179. Balasundari, R. *et al.* Complete microbe free processed porcine xenograft for clinical use. *Indian J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **23**, 240–245 (2007).
180. Mirghani, R. *et al.* Biofilms: Formation, drug resistance and alternatives to conventional approaches. *AIMS Microbiol.* **8**, 239–277 (2022).
181. Chaves, B. J. & Tadi, P. Gentamicin. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2023).
182. Murphy, P. B., Bistas, K. G. & Le, J. K. Clindamycin. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2023).
183. Hermans, P. E. & Wilhelm, M. P. Vancomycin. *Mayo Clin. Proc.* **62**, 901–905 (1987).
184. Cavassin, F. B., Baú-Carneiro, J. L., Vilas-Boas, R. R. & Queiroz-Telles, F. Sixty years of Amphotericin B: An Overview of the Main Antifungal Agent Used to Treat Invasive Fungal Infections. *Infect. Dis. Ther.* **10**, 115 (2021).
185. Hodde, J. *et al.* Effects of sterilization on an extracellular matrix scaffold: Part I. Composition and matrix architecture. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **18**, 537–543 (2007).
186. Hodde, J. & Hiles, M. Virus safety of a porcine-derived medical device: Evaluation of a viral inactivation method. *Biotechnol. Bioeng.* **79**, 211–216 (2002).
187. Wolters, K. D. & Dietz, M. L. Characterization of a solid-supported aqueous biphasic system for the sorption of dyes from aqueous solution. *J. Chromatogr. A* **1705**, 464215 (2023).
188. Jiang, L. Q., Ye, B. X., Wang, M. F. & Lin, L. Acid exposure in patients with gastroesophageal reflux disease is associated with esophageal dysmotility. *J. Dig. Dis.* **20**, 73–77 (2019).
189. Carlson, D. A. *et al.* The relationship between esophageal acid exposure and the esophageal response to volumetric distention. *Neurogastroenterol. Motil.* **30**, (2018).

190. García-Gareta, E. *et al.* Decellularised scaffolds: just a framework? Current knowledge and future directions. *J. Tissue Eng.* **11**, 2041731420942903 (2020).
191. Poghosyan, T. *et al.* Circumferential esophageal replacement using a tube-shaped tissue-engineered substitute: An experimental study in minipigs. *Surgery* **158**, 266–277 (2015).
192. Gundogdu, G. *et al.* Molecular mechanisms of esophageal epithelial regeneration following repair of surgical defects with acellular silk fibroin grafts. *Sci. Rep.* **11**, 7086 (2021).
193. Scarritt, M. E., Pashos, N. C. & Bunnell, B. A. A Review of Cellularization Strategies for Tissue Engineering of Whole Organs. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **3**, 43 (2015).
194. Welman, T., Michel, S., Segaren, N. & Shanmugarajah, K. Bioengineering for Organ Transplantation: Progress and Challenges. *Bioengineered* **6**, 257–261 (2015).
195. Bao, Y. *et al.* Recent Advances of Biomedical Materials for Prevention of Post-ESD Esophageal Stricture. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **9**, (2021).
196. Sakurai, T., Miyazaki, S., Miyata, G., Satomi, S. & Hori, Y. Autologous buccal keratinocyte implantation for the prevention of stenosis after EMR of the esophagus. *Gastrointest. Endosc.* **66**, 167–173 (2007).
197. Xu, R. *et al.* Development and Prospect of Esophageal Tissue Engineering. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **10**, 853193 (2022).
198. Nakase, Y. *et al.* Intrathoracic esophageal replacement by *in situ* tissue-engineered esophagus. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **136**, 850–859 (2008).
199. Wei, R.-Q. *et al.* Grafts of porcine small intestinal submucosa with cultured autologous oral mucosal epithelial cells for esophageal repair in a canine model. *Exp. Biol. Med. Maywood NJ* **234**, 453–461 (2009).
200. Catry, J. *et al.* Circumferential Esophageal Replacement by a Tissue-engineered Substitute Using Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplant.* **26**, 1831–1839 (2017).
201. Chudickova, M. *et al.* The Effect of Wharton Jelly-Derived Mesenchymal Stromal Cells and Their Conditioned Media in the Treatment of a Rat Spinal Cord Injury. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 4516 (2019).
202. Gao, Y. & Jin, S.-Z. Strategies for treating oesophageal diseases with stem cells. *World J. Stem Cells* **12**, 488–499 (2020).

203. Bhat, S., Viswanathan, P., Chandanala, S., Prasanna, S. J. & Seetharam, R. N. Expansion and characterization of bone marrow derived human mesenchymal stromal cells in serum-free conditions. *Sci. Rep.* **11**, 3403 (2021).
204. Sjöqvist, S. *et al.* Experimental orthotopic transplantation of a tissue-engineered oesophagus in rats. *Nat. Commun.* **5**, 3562 (2014).
205. Marzaro, M. *et al.* Successful muscle regeneration by a homologous microperforated scaffold seeded with autologous mesenchymal stromal cells in a porcine esophageal substitution model. *Ther. Adv. Gastroenterol.* **13**, (2020).
206. Tan, B. *et al.* Tissue engineered esophagus by mesenchymal stem cell seeding for esophageal repair in a canine model. *J. Surg. Res.* **182**, 40–48 (2013).
207. Marzaro, M. *et al.* Decellularized esophageal tubular scaffold microperforated by quantum molecular resonance technology and seeded with mesenchymal stromal cells for tissue engineering esophageal regeneration. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **10**, (2022).
208. Wang, F., Maeda, Y., Zachar, V., Ansari, T. & Emmersen, J. Regeneration of the oesophageal muscle layer from oesophagus acellular matrix scaffold using adipose-derived stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **503**, 271–277 (2018).
209. Vieira Paladino, F., de Moraes Rodrigues, J., da Silva, A. & Goldberg, A. C. The Immunomodulatory Potential of Wharton’s Jelly Mesenchymal Stem/Stromal Cells. *Stem Cells Int.* (2019).
210. Kim, D.-W. *et al.* Wharton’s Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells: Phenotypic Characterization and Optimizing Their Therapeutic Potential for Clinical Applications. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 11692–11712 (2013).
211. El Omar, R. *et al.* Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies? *Tissue Eng. Part B Rev.* **20**, 523–544 (2014).
212. Fayon, A. *et al.* New approach in the design of a human tissue engineered vascular graft and preliminary studies in arterial bypass models in the pig. *Artery Res.* **29**, S4–S4 (2023).
213. Cabrera-Pérez, R. *et al.* Human Wharton’s jelly-derived mesenchymal stromal cells promote bone formation in immunodeficient mice when administered into a bone microenvironment. *J. Transl. Med.* **21**, 802 (2023).
214. Correa-Araujo, L. *et al.* Bioengineered skin constructs based on mesenchymal stromal cells and acellular dermal matrix exposed to inflammatory microenvironment releasing growth factors involved in skin repair. *Stem Cell Res. Ther.* **14**, 306 (2023).

215. Cobzac, V., Jian, M. & Nacu, V. Cellularization of small sized grafts from biological material using the gravitational modality principle. *J. Phys. Conf. Ser.* **1960**, 012004 (2021).
216. López-Fernández, A. *et al.* Comparability exercise of critical quality attributes of clinical-grade human mesenchymal stromal cells from the Wharton's jelly: single-use stirred tank bioreactors versus planar culture systems. *Cytotherapy* S1465-3249(23)01039-3 (2023)
217. Drochon, A., Lesieur, R. & Durand, M. Fluid dynamics characterisation of a rotating bioreactor for tissue engineering. *Med. Eng. Phys.* **105**, 103831 (2022).
218. Kim, I. G. *et al.* Assessment of Esophageal Reconstruction via Bioreactor Cultivation of a Synthetic Scaffold in a Canine Model. *Clin. Exp. Otorhinolaryngol.* **16**, 165–176 (2023).
219. Kim, I. G. *et al.* Tissue-Engineered Esophagus via Bioreactor Cultivation for Circumferential Esophageal Reconstruction. *Tissue Eng. Part A* **25**, 1478–1492 (2019).
220. Ohki, T. & Yamamoto, M. Esophageal regenerative therapy using cell sheet technology. *Regen. Ther.* **13**, 8–17 (2020).
221. Kanai, N., Yamato, M., Ohki, T., Yamamoto, M. & Okano, T. Fabricated autologous epidermal cell sheets for the prevention of esophageal stricture after circumferential ESD in a porcine model. *Gastrointest. Endosc.* **76**, 873–881 (2012).
222. Xing, Q. *et al.* Decellularization of Fibroblast Cell Sheets for Natural Extracellular Matrix Scaffold Preparation. *Tissue Eng. Part C Methods* **21**, 77–87 (2015).
223. Hou, N. *et al.* Tissue-engineered esophagus: recellular esophageal extracellular matrix based on perfusion-decellularized technique and mesenchymal stem cells. *Biomed. Mater. Bristol Engl.* **16**, (2021).
224. Buyukdogan, K. *et al.* Peritoneum and omentum are natural reservoirs for chondrocytes of osteochondral autografts: A comparative animal study. *Acta Orthop. Traumatol. Turc.* **50**, 539–543 (2016).
225. Baumert, H. *et al.* Terminal urothelium differentiation of engineered neoureter after *in vivo* maturation in the Omental Bioreactor. Commentary. *Termin. Urothelium Differ. Eng. Neoureter Vivo Matur. Omental Bioreact. Comment.* **52**, 1492–1498 (2007).
226. Nakandakari-Higa, S. *et al.* Universal recording of cell-cell contacts *in vivo* for interaction-based transcriptomics. *BioRxiv Prepr. Serv. Biol.* 2023.03.16.533003 (2023) doi:10.1101/2023.03.16.533003.

227. Wang, Q. *et al.* Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from fetal-bone marrow, adipose tissue, and Wharton's jelly as sources of cell immunomodulatory therapy. *Hum. Vaccines Immunother.* **12**, 85–96 (2015).
228. Abbaszadeh, H. *et al.* Regenerative potential of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: A new horizon of stem cell therapy. *J. Cell. Physiol.* **235**, 9230–9240 (2020).
229. McElreavey, K. D., Irvine, A. I., Ennis, K. T. & McLean, W. H. Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. *Biochem. Soc. Trans.* **19**, 29S (1991).
230. Fayon, A. *et al.* Characterization of an Innovative Biomaterial Derived From Human Wharton's Jelly as a New Promising Coating for Tissue Engineering Applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **10**, (2022).
231. Fayon, A. Nouvelles approches dans la conception d'un substitut vasculaire de petit diamètre d'origine foetale et premières évaluations de pontage artériel chez le gros animal.
232. Stefańska, K. *et al.* Expression Profile of New Marker Genes Involved in Differentiation of Human Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells into Chondrocytes, Osteoblasts, Adipocytes and Neural-like Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 12939 (2023).
233. Nekanti, U. *et al.* Optimization and scale-up of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells for clinical applications. *Stem Cell Res.* **5**, 244–254 (2010).
234. Musiał-Wysocka, A., Kot, M., Sułkowski, M., Badyra, B. & Majka, M. Molecular and Functional Verification of Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells (WJ-MSCs) Pluripotency. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1807 (2019).
235. Cord Tissue Banking. *Americord Registry* <https://www.americordblood.com/cord-tissue>.
236. Elia, E., Brownell, D., Chabaud, S. & Bolduc, S. Tissue Engineering for Gastrointestinal and Genitourinary Tracts. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 9 (2022).
237. Salehinejad, P. *et al.* Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly. *In vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **48**, 75–83 (2012).
238. Taghizadeh, R. R., Cetrulo, K. J. & Cetrulo, C. L. Wharton's Jelly stem cells: future clinical applications. *Placenta* **32 Suppl 4**, S311-315 (2011).

239. Jin, H. J. *et al.* Comparative Analysis of Human Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue, and Umbilical Cord Blood as Sources of Cell Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 17986–18001 (2013).
240. Liu, J., Liu, Q. & Chen, X. The Immunomodulatory Effects of Mesenchymal Stem Cells on Regulatory B Cells. *Front. Immunol.* **11**, 1843 (2020).
241. Rasmusson, I., Le Blanc, K., Sundberg, B. & Ringdén, O. Mesenchymal Stem Cells Stimulate Antibody Secretion in Human B Cells. *Scand. J. Immunol.* **65**, 336–343 (2007).
242. Talley, S., Rademacher, D. J. & Campbell, E. M. Inflammasome activation occurs in CD4+ and CD8+ T cells during graft-versus-host disease. *Cell Death Dis.* **14**, 632 (2023).
243. Duffy, M. M., Ritter, T., Ceredig, R. & Griffin, M. D. Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways. *Stem Cell Res. Ther.* **2**, 34 (2011).
244. Stefańska, K. *et al.* Human Wharton's Jelly—Cellular Specificity, Stemness Potency, Animal Models, and Current Application in Human Clinical Trials. *J. Clin. Med.* **9**, 1102 (2020).
245. Najjar, M. *et al.* Mesenchymal stromal cells use PGE2 to modulate activation and proliferation of lymphocyte subsets: Combined comparison of adipose tissue, Wharton's Jelly and bone marrow sources. *Cell. Immunol.* **264**, 171–179 (2010).
246. Shawki, S. *et al.* Immunomodulatory effects of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Microbiol. Immunol.* **59**, 348–356 (2015).
247. Wang, A. Y. L. *et al.* Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cell-Mediated Sciatic Nerve Recovery Is Associated with the Upregulation of Regulatory T Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 6310 (2020).
248. Crain, S. K. *et al.* Extracellular Vesicles from Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells Suppress CD4 Expressing T Cells Through Transforming Growth Factor Beta and Adenosine Signaling in a Canine Model. *Stem Cells Dev.* **28**, 212–226 (2019).
249. Engela, A. U. *et al.* Mesenchymal stem cells control alloreactive CD8(+) CD28(-) T cells. *Clin. Exp. Immunol.* **174**, 449–458 (2013).
250. Laborde, A. Les cellules souches issues de la gelée de Wharton, culture dynamique et contrôle qualité. 126 (2021).
251. Acuto, S. *et al.* An optimized procedure for preparation of conditioned medium from Wharton's jelly mesenchymal stromal cells isolated from umbilical cord. *Front. Mol. Biosci.* **10**, 1273814 (2023).

252. Dan, P., Velot, É., Francius, G., Menu, P. & Decot, V. Human-derived extracellular matrix from Wharton's jelly: An untapped substrate to build up a standardized and homogeneous coating for vascular engineering. *Acta Biomater.* **48**, 227–237 (2017).
253. Torres, Y. *et al.* Cell-assembled extracellular matrix (CAM) sheet production: Translation from using human to large animal cells. *J. Tissue Eng.* **12**, 2041731420978327 (2021).
254. Erol, A. *et al.* Evaluation of the relationship between mesenchymal stem cells and immune system *in vitro* conditions. *Mol. Biol. Rep.* **50**, 4347–4356 (2023).
255. Shafeghat, Z. *et al.* Mesenchymal stem cell-derived exosomes for managing graft-versus-host disease: An updated view. *Transpl. Immunol.* **81**, 101957 (2023).
256. Wang, X. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells and their Extracellular Vesicles Modulate Pro- and Anti-inflammatory Cytokines in Ligature-induced Periodontitis. *Iran. J. Immunol. IJI* **20**, (2023).
257. Batsali, A. *et al.* Comparative Analysis Of Bone Marrow and Wharton's Jelly Mesenchymal Stem/Stromal Cells. *Blood* **122**, 1212 (2013).
258. Donders, R. *et al.* Human Wharton's Jelly-Derived Stem Cells Display a Distinct Immunomodulatory and Proregenerative Transcriptional Signature Compared to Bone Marrow-Derived Stem Cells. *Stem Cells Dev.* **27**, 65–84 (2018).
259. Nakao, M. *et al.* Umbilical cord-derived mesenchymal stem cell sheets transplanted subcutaneously enhance cell retention and survival more than dissociated stem cell injections. *Stem Cell Res. Ther.* **14**, 352 (2023).
260. Sánchez-Porrás, D. *et al.* Expression of Basement Membrane Molecules by Wharton Jelly Stem Cells (WJSC) in Full-Term Human Umbilical Cords, Cell Cultures and Microtissues. *Cells* **12**, 629 (2023).
261. Jaimes-Parra, B. D. *et al.* Membranes derived from human umbilical cord Wharton's jelly stem cells as novel bioengineered tissue-like constructs. *Histol. Histopathol.* **33**, 147–156 (2018).
262. Pu, L. *et al.* Compared to the amniotic membrane, Wharton's jelly may be a more suitable source of mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering and clinical regeneration. *Stem Cell Res. Ther.* **8**, 72 (2017).

263. Sabapathy, V., Sundaram, B., Vm, S., Mankuzhy, P. & Kumar, S. Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells Plasticity Augments Scar-Free Skin Wound Healing with Hair Growth. *PLOS ONE* **9**, e93726 (2014).
264. Pham, H., Tonai, R., Wu, M., Birtolo, C. & Chen, M. CD73, CD90, CD105 and Cadherin-11 RT-PCR Screening for Mesenchymal Stem Cells from Cryopreserved Human Cord Tissue. *Int. J. Stem Cells* **11**, 26–38 (2018).
265. Riekstina, U. *et al.* Embryonic Stem Cell Marker Expression Pattern in Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow, Adipose Tissue, Heart and Dermis. *Stem Cell Rev.* **5**, 378–86 (2009).
266. Debnath, T. & Chelluri, L. K. Standardization and quality assessment for clinical grade mesenchymal stem cells from human adipose tissue. *Hematol. Transfus. Cell Ther.* **41**, 7–16 (2019).
267. Santiago, J. A., Pogemiller, R. & Ogle, B. M. Heterogeneous Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells in Response to Extended Culture in Extracellular Matrices. *Tissue Eng. Part A* **15**, 3911–3922 (2009).
268. Assis-Ribas, T., Forni, M. F., Winnischofer, S. M. B., Sogayar, M. C. & Trombetta-Lima, M. Extracellular matrix dynamics during mesenchymal stem cells differentiation. *Dev. Biol.* **437**, 63–74 (2018).
269. Saleh, M., Fotook Kiaei, S. Z. & Kavianpour, M. Application of Wharton jelly-derived mesenchymal stem cells in patients with pulmonary fibrosis. *Stem Cell Res. Ther.* **13**, 71 (2022).
270. Rheinländer, A., Schraven, B. & Bommhardt, U. CD45 in human physiology and clinical medicine. *Immunol. Lett.* **196**, 22–32 (2018).
271. Fujisawa, K. *et al.* Evaluation of the effects of ascorbic acid on metabolism of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* **9**, 93 (2018).