

Université de Montréal

**Mise au point d'un protocole de recellularisation d'une
matrice bronchique équine décellularisée**

par Selma Ben Hamouda

Département de sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de *Maîtrise ès sciences* (M. Sc.)
en sciences vétérinaires option sciences cliniques

Août, 2018

© Selma Ben Hamouda, 2018

Résumé

Les interactions entre la matrice extracellulaire et le muscle lisse jouent un rôle important dans l'asthme, principalement dans le remodelage bronchique asthmatique. Leur étude *in vitro* semble donner des résultats souvent non extrapolables *in vivo*, les modèles monocouches n'étant pas fidèles aux interactions tridimensionnelles se produisant du vivant des patients.

Cette étude est une mise au point d'un protocole de décellularisation et de recellularisation d'une bronche équine par des cellules musculaires lisses bronchiques. Elle a pour but l'investigation d'une manière plus fidèle à un environnement *in vivo* de l'impact d'une matrice extracellulaire bronchique asthmatique sur la variation du phénotype des cellules musculaires lisses bronchiques et réciproquement. Une bonne décellularisation nous permettrait d'obtenir une bronche équine exempte de cellules, mais qui maintiendrait une architecture et une composition matricielle inchangées. L'élimination du matériel cellulaire est nécessaire afin de ne pas confondre les cellules natives du tissu avec les cellules de culture et de ne pas affecter la qualité de la recellularisation. Suite à la décellularisation d'une bronche équine au moyen du protocole Triton / Sodium déoxycholate, nous avons obtenu une bronche acellulaire (échafaud) présentant une très faible quantité d'ADN double brin (moins de 100 pg/100 mg de poids sec) et l'ADN restant était d'un poids moléculaire inférieur à 100 paires de bases. Cet échafaud a maintenu une très bonne architecture et un contenu protéique presque inchangé en collagènes, en fibronectine et en élastine. La recellularisation de cette matrice avec des cellules musculaires lisses bronchiques primaires a donné des résultats exploitables entre 31 et 41 jours de culture. L'évaluation histologique des recellularisations a montré une colonisation spécifique des cellules musculaires lisses bronchiques de la matrice du muscle lisse bronchique.

Cette étude montre qu'il est possible de décellulariser une bronche tout en maintenant un contenu protéique et une architecture favorables à sa recellularisation par des cellules musculaires lisses bronchiques. Ceci représente une base valable pour l'étude subséquente de

l'effet de la matrice extracellulaire asthmatique sur le phénotype des cellules musculaires lisses bronchiques.

Mots-clés : cellule musculaire lisse, bronche, échafaud, ingénierie tissulaire, asthme, cheval.

Abstract

The interactions between the bronchial extracellular matrix and the bronchial smooth muscle contribute to the asthmatic bronchial remodeling. Results from *in vitro* studies indicate that the *in vitro* monolayer models do not recapitulate the complex interactions occurring *in vivo*. Decellularized tissues are natural three-dimensional matrices permitting the investigation of these interactions as closely as possible to the *in vivo* models.

The aim of this study was to develop a protocol for the decellularization and recellularization of an equine bronchus by bronchial smooth muscle cells. Its purpose is to investigate how the asthmatic bronchial extracellular matrix affects the bronchial smooth muscle cells phenotype. A good decellularization is characterized by a respiratory bronchus completely free of cells while the architecture and the matricial composition remain unchanged. The elimination of the cellular material is necessary to not confound the native cells of the tissue with the cells of culture and to not affect the quality of the recellularization. Following the decellularization of an equine respiratory bronchus using Triton / Sodium deoxycholate protocol, we obtained an acellular bronchus (scaffold) presenting very low double-stranded DNA concentrations (less than 100 pg/100 mg dry weight) and the molecular weight of the remnant DNA was less than 100 base pair. This scaffold maintained a very good architecture and the protein content remained almost unchanged. The recellularization of this matrix gave usable results between 31 and 41 days. The histological evaluation of the recellularizations showed a specific colonisation of the muscular extracellular matrix by bronchial smooth muscle cells.

This study shows that it is possible to decellularize an equine bronchus while maintaining a protein composition and an architecture favorable to its recellularization by bronchial smooth muscle cells. This represents a valid basis for the subsequent study of the effect of the extracellular asthmatic matrix on the smooth muscle cells phenotype.

Keywords : smooth muscle cell, bronchus, scaffold, tissue engineering, asthma, horse.

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures	ix
Liste des sigles	x
Liste des abréviations.....	xi
Remerciements.....	xiv
Introduction.....	1
Recension des écrits.....	1
1. Asthme humain	2
1.1. Classification de l’asthme	2
2. Remodelage tissulaire asthmatique.....	3
3. Muscle lisse.....	8
3.1. Définition et rôle	8
3.2. Phénotypes	8
3.3. Comportement dans l’asthme	13
4. Matrice extracellulaire	18
4.1. Définition	18
4.2. Composition normale.....	18
4.3. Modifications observées dans l’asthme	19
5. Interactions matrice extracellulaire / muscle lisse	20
6. Modèles animaux dans l’étude de l’asthme	22
6.1. Cheval : modèle pour l’étude de l’asthme	23
6.2. Limites du modèle équin.....	26
7. Ingénierie tissulaire.....	26
7.1. Définition	26
7.2. Les échafauds : méthodes de production et utilités	27

7.3. Nouvelle perspective pour l'ingénierie tissulaire	29
Mise en contexte	30
Objectifs et hypothèse.....	32
Objectifs.....	32
Hypothèse	32
Matériel et méthodes.....	33
1. Introduction.....	33
2. Plan expérimental et animaux.....	33
3. Isolement des cellules musculaires lisses bronchiques.....	34
3.1. Prélèvement du muscle lisse bronchique	34
3.2. Digestion enzymatique.....	34
3.3. Culture primaire et conditions de culture.....	35
4. Congélation des cellules musculaires lisses.....	35
5. Obtention d'une bronche décellularisée.....	36
5.1. Prélèvement et conservation des bronches	36
5.2. Décellularisation par méthode enzymatique et détergente	36
5.3. Vérification de la décellularisation	38
5.4. Vérification de l'intégrité structurale de la bronche décellularisée	40
6. Obtention d'une bronche recellularisée	43
6.1. Préparation des cellules musculaires lisses.....	43
6.2. Préparation de la bronche décellularisée.....	44
6.3. Recellularisation	45
6.4. Vérification de la recellularisation.....	45
6.5. Statistiques	46
1. Efficacité de la décellularisation.....	47
1.1. Évaluation histologique : coloration Movat Pentachrome.....	47
1.2. Quantification fluorométrique de l'ADN.....	47
1.3. Électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose	48
2. Maintien de l'intégrité et de la composition protéique de la bronche décellularisée....	49
2.1. Évaluation histologique : coloration Movat Pentachrome.....	50
2.2. Dosage des protéines totales par fluorométrie	51

2.3. Immunohistochimie sur bronches natives et décellularisées	51
2.4. Coloration histologique Bleu Alcian	54
3. Évaluation qualitative de la recellularisation	55
Discussion	60
Perspectives d'avenir	66
Conclusion	67
Bibliographie.....	69
Annexe I : Protocole de décellularisation des bronches	i
Annexe II : Protocole de recellularisation des bronches.....	v
Annexe III : Protocole de coloration histologique Movat Pentachrome.....	viii

Liste des tableaux

Tableau I. Niveau d'expression des protéines de la cellule musculaire lisse suivant le phénotype.....	11
Tableau II. Molécules sécrétées par les cellules musculaires lisses vs. Fonction du muscle lisse bronchique	17
Tableau III. Principaux constituants de la matrice extracellulaire des voies respiratoires centrales et périphériques.....	19
Tableau IV. Échafauds obtenus par ingénierie tissulaire et leurs utilisations.....	27
Tableau V. Signalement et caractéristiques physiologiques des 7 chevaux identifiés	34
Tableau VI. Enzymes utilisées pour le démasquage des sites de fixation antigénique	42

Liste des figures

Figure 1.	Anatomie des poumons.....	5
Figure 2.	Structure histologique d'une bronche.....	6
Figure 3.	Biopsie endobronchique d'un patient asthmatique sévère.....	7
Figure 4.	Mécanismes du remodelage du muscle lisse bronchique dans l'asthme	15
Figure 5.	Interactions myocytes bronchiques / matrice extracellulaire dans l'asthme.....	22
Figure 6.	Principales applications de l'ingénierie tissulaire.....	28
Figure 7.	Cycles de décellularisation des bronches respiratoires.....	37
Figure 8.	Coloration Movat Pentachrome de bronches native et décellularisée	47
Figure 9.	Concentration de l'ADN en ng/ μ l dans les bronches natives et décellularisées ...	48
Figure 10.	Électrophorèse d'ADN de bronches natives et décellularisées	49
Figure 11.	Comparaison qualitative de bronches natives et décellularisées	50
Figure 12.	Concentration en mg/ml des protéines totales dans les bronches natives et décellularisées.	51
Figure 13.	Coloration immunohistochimique des bronches natives et décellularisées.....	53
Figure 14.	Glycosaminoglycanes des bronches natives et décellularisées.....	54
nnnn.....	55
Figure 15.	Évolution de la recellularisation entre J0 et J46	55
Figure 16.	Comparaison de la recellularisation à J41 avec et sans transfert de tissus	56
Figure 17.	Comparaison de la recellularisation avec transfert à J41 et à J46.....	57
Figure 18.	Coloration Movat Pentachrome d'une bronche recellularisée à J33	58
Figure 19.	Comparaison de bronches décellularisées et recellularisées sur base de coloration histologique Bleu Alcian	59

Liste des sigles

°C : degré celsius

µg : microgramme

µl : microlitre

µm : micromètre

3D : trois dimensions

Cat : numéro de catalogue

CD44 : cluster of differentiation 44 (cluster de différenciation 44)

cm² : centimètre carré

CO₂ : dioxyde de carbone

Delta PI : variation de la pression transpulmonaire

DMEM / F12 : dulbecco modified eagle medium / nutrient mixture F-12

DMSO : diméthylsulfoxyde

EDTA : éthylène diamine tétra-acétique

E_L : élastance pulmonaire

FBS : fetal bovine serum (sérum bovin fœtal)

g : force g

GINA : global initiative for asthma

IAD : inflammatory airway disease (maladie inflammatoire des voies respiratoires)

J : jours

mg : milligramme

ml : millilitre

NAEPP : national asthma education and prevention program

ng : nanogramme

OMS : organisation mondiale de la santé

PBS : phosphate buffered saline

RANTES : regulated upon activation normal T cell expressed and secreted

R_L : Resistance pulmonaire

T-PER : tissue protein extraction reagent

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

BSM : bronchial smooth muscle (muscle lisse bronchique)

CC16 : Clara cell protein 16 (protéine 16 de la cellule en massue)

Cdc42 : cell division control protein 42 homolog (homologue 42 de la protéine de contrôle de la division cellulaire)

CE : cellules épithéliales

Cys-LT : cystéinyl leucotriène

ECM : extracellular matrix (matrice extracellulaire)

EMT : epithelial mesenchymal transition (transition mésenchymateuse épithéliale)

FGF : fibroblast growth factor (facteur de croissance fibroblastique)

GM-CSF : granulocyte macrophage - colony stimulating factor (facteur de stimulation des colonies de granulocytes)

IgE : immunoglobuline E

Il : interleukine

Kb : kilobase

LBA : lavage broncho-alvéolaire

LIF : leukemia inflammatory factor (facteur d'inflammation leucémique)

LTD₄ : leucotriène D₄

MAPK : mitogen-activated protein kinases (protéines kinases activées par un mitogène)

MCP : monocyte chemoattractant protein (protéine chimio-attractive monocyttaire)

MEC : matrice extracellulaire

ML : muscle lisse

MLCK : myosin light chain kinase (kinase de la chaîne légère de la myosine)

MMP : matrixial metalloproteases (métalloprotéases matricielles)

MT1-MMP : membrane type 1 metalloprotease (membrane type 1 métalloprotéase)

NOS I : nitric oxyde synthase type I (synthase de l'oxyde nitrique type I)

PDGF : platelet-derived growth factor (facteur de croissance plaquettaire)

PGA : polyglycolic acid (acide polyglycolique)
PGE₂ : prostaglandine E₂
PKC : protein Kinase C (protéine kinase C)
PLA : polylactic acid (acide polylactique)
PLGA : poly (d,l-lactic-co-glycolic acid)
REG : reticulum endoplasmique granuleux
SMMHC : smooth muscle myosin heavy chain (chaîne lourde de la myosine du muscle lisse)
SRF : serum response factor (facteur de réponse sérique)
TGFβ: transforming growth factor β (facteur de croissance transformant β)
Th1 : lymphocyte T helper 1
Th2 : lymphocyte T helper 2
TIMP : tissue inhibitor of metalloproteinase (inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases)
TNFα : tumor necrosis factor α (facteur de nécrose tumoral α)
VEF₁ : volume expiratoire forcé en une seconde
α-SMA : α-smooth muscle actin (α actine du muscle lisse)

" Il faut toujours viser la lune car même en cas d'échec on atterrit dans les étoiles."

Oscar Wilde

Une pensée particulière à Naddour et à mes parents. Vous avez toujours été là pour moi et avez toujours eut les bons mots et les bons gestes pour me soutenir et me pousser de l'avant.

Merci infiniment d'être ce que vous êtes.

Remerciements

Je remercie toute l'équipe du laboratoire de l'asthme équin, tous ceux qui ont cru en la réussite de ce projet de maîtrise, particulièrement Dr Jean-Pierre Lavoie pour sa patience, son optimisme, son objectivité et surtout pour son aide précieuse dans mon initiation à la recherche.

Introduction

Le rôle pathophysiologique du muscle lisse bronchique dans l'asthme est de première importance, notamment au niveau de ses interactions avec la matrice extracellulaire environnante. Au-delà de son action contractile mécanique, le muscle lisse bronchique semble jouer un rôle pro-inflammatoire et pro-fibrotique à travers ses différentes sécrétions. D'ailleurs, l'augmentation des dépôts matriciels en collagènes type I et type III et en élastine a été corrélée avec une augmentation de la prolifération des cellules musculaires lisses ainsi qu'une altération de leurs sécrétions et l'établissement d'un profil migratoire. Ceci implique un effet autocrine et paracrine régissant les interactions entre la matrice extracellulaire bronchique et le muscle lisse bronchique.

L'asthme équin sévère, aussi connu sous l'appellation de « Souffle », est une pathologie respiratoire spontanée du cheval très similaire à l'asthme humain sévère. Chez l'humain comme chez le cheval, les signes cliniques attribués à cette maladie sont une intolérance à l'effort, de la toux et un bronchospasme soutenu en réponse à une exposition antigénique. Une altération de la structure bronchique est observée et dite « remodelage bronchique asthmatique ». Ce remodelage peut être accompagné par une réponse atténuée ou absente aux traitements usuels, à savoir les corticostéroïdes et les bronchodilatateurs.

Pour des raisons éthiques, mais également, en regard des grandes similitudes déjà établies entre l'asthme humain et l'asthme équin, le cheval est un modèle expérimental de choix pour étudier le remodelage bronchique et sa réversibilité.

Recension des écrits

1. Asthme humain

La Global Initiative for Asthma (GINA) définit l'asthme comme une maladie sévère et évolutive due à une hypersensibilité des voies respiratoires à des stimuli entraînant une inflammation chronique et persistante. Malgré une symptomatologie hétérogène, les principaux signes cliniques retrouvés sont un essoufflement, une respiration sifflante, une oppression thoracique et une dyspnée expiratoire. Ils sont surtout dus à un bronchospasme mais aussi à une hypersécrétion de mucus (1). Cette définition est le fruit d'un « consensus basé sur les considérations des caractéristiques typiques de l'asthme qui le distinguent des autres atteintes respiratoires. » (2).

Le diagnostic de l'asthme chez l'humain est confirmé par des tests de fonction respiratoire. L'identification de son type inflammatoire (neutrophilique ou éosinophilique) se fait par l'induction de crachat qui est une technique non invasive ou par bronchoscopie qui est plus invasive.

La GINA et la National Asthma Education and Prevention Program (NAEPP) ont respectivement publié une classification phénotypique et une classification selon la sévérité des symptômes et leur moment d'apparition. Ces classifications ne considèrent que les aspects cliniques de l'asthme sans le lier à son étiologie et à sa pathophysiologie. Actuellement en cours d'étude, la classification endotypique permet de faire ce lien (3). Elle se dit encore plus spécifique et caractéristique et permet d'associer différents mécanismes pathogéniques aux phénotypes observés. Ces classifications sont complémentaires car elles permettent d'établir le pronostic de la pathologie et les traitements appropriés.

1.1. Classification de l'asthme

Selon l'intensité des symptômes et leur récurrence en phase d'exacerbation, il est possible de classer l'asthme comme suit (4) :

- Asthme intermittent,
- Asthme léger persistant,

- Asthme modéré persistant, et
- Asthme sévère persistant.

Les différents types d'asthme (léger, modéré ou sévère) semblent être modulés par certains profils cellulaires. Les éosinophiles, les mastocytes et les lymphocytes T sont souvent incriminés dans l'inflammation des voies respiratoires observée dans l'asthme léger à modéré (5, 6). Les neutrophiles sont également présents dans l'asthme léger à modéré mais sont avec les élastases d'origine neutrophilique fortement prédominants dans les crachats de la majorité des cas d'asthme sévère et lors des exacerbations aiguës d'asthme (7).

Les concentrations en éosinophiles aux niveaux sanguin et respiratoire sont plus élevées chez les patients atteints d'asthme sévère par rapport aux patients asthmatiques légers. Cependant, leur présence chez les asthmatiques sévères n'est pas systématique. En revanche, les concentrations en neutrophiles sont plus importantes dans la plupart des lavages bronchoalvéolaires des patients atteints d'asthme sévère (8). Une stimulation antigénique persistante des voies respiratoires causerait un afflux continu de neutrophiles à partir de la circulation générale (9) et un remodelage tissulaire caractéristique de l'asthme.

2. Remodelage tissulaire asthmatique

Le remodelage tissulaire asthmatique est caractérisé par des changements structuraux de la paroi bronchique entraînant son épaissement d'où une obstruction et une hypersensibilité persistantes des voies respiratoires (10). En comparaison à des individus sains, cet épaissement peut augmenter pour atteindre 100 % à 300 % respectivement dans les cas d'asthme non fatal et d'asthme fatal (11). Lors d'asthme sévère chronique, le remodelage tissulaire est faiblement réversible voire même irréversible suite aux traitements conventionnels (corticostéroïdes/bronchodilatateurs) et ce même dans les périodes de rémission (12).

Les corticostéroïdes sont les médicaments les plus prescrits dans l'asthme après les bronchodilatateurs. Une diminution des signes cliniques, de l'hypersensibilité bronchique et des concentrations en cytokines pro-inflammatoires a été rapportée suite à l'administration de fluticasone à faible ou à forte dose (12). Une réduction significative des interleukines (IL) IL-

17 et IL-11 a été observée après deux semaines d'administration de corticostéroïdes par voie orale (13). Cependant, chez les patients atteints d'asthme sévère aucun effet des corticostéroïdes n'a été observé sur les scores cliniques, notamment sur le volume expiratoire forcé en une seconde (VEF1) (13) et leur impact sur le remodelage reste peu élucidé. En effet, alors que plusieurs études ont rapporté la capacité des corticostéroïdes à réduire la fibrose sous-épithéliale et l'épaississement de la membrane basale (14-16), beaucoup d'autres ont démontré l'absence d'effets (17, 18). Aussi, aucune action stimulatrice de la production des inhibiteurs des métalloprotéases-1 (TIMP-1) n'a été observée chez les asthmatiques cortico-résistants (13). Les corticostéroïdes n'ont également pas d'effet inhibiteur sur le facteur de croissance transformant ($TGF\beta$) et par conséquent sur les dépôts des collagènes I et III qu'il initie chez les asthmatiques sévères (19).

Chez les patients cortico-résistant et ceux atteints d'asthme sévère, les corticostéroïdes ne semblent plus efficaces et n'ont plus d'influence sur le remodelage. L'inefficacité des corticostéroïdes se répercute directement sur l'efficacité des bronchodilatateurs qui se trouve altérée (13, 19). Pour mieux comprendre ce phénomène il est important d'assimiler la structure macro et microscopique des voies respiratoires.

Macroscopiquement, les poumons sont caractérisés par un réseau bronchique élastique et vascularisé et par un parenchyme composé de bronchioles respiratoires, de conduits alvéolaires et d'alvéoles permettant un échange gazeux optimal. Chez l'humain, la trachée se subdivise, au niveau de la carina principale en deux bronches souches qui se divisent elles-mêmes en bronches lobaires puis segmentaires et sous segmentaires sur 23 générations. Le cartilage disparaît des bronches qui deviendront des bronchioles, à la 8^{ème} génération de bifurcation bronchique.

Seize générations de ramifications bronchiques sont comptées avant les premières alvéoles dans la paroi des bronchioles qui deviennent alors des bronchioles respiratoires. Celles-ci se transforment progressivement en canaux alvéolaires quand la paroi n'est plus constituée que d'alvéoles (Figure 1).

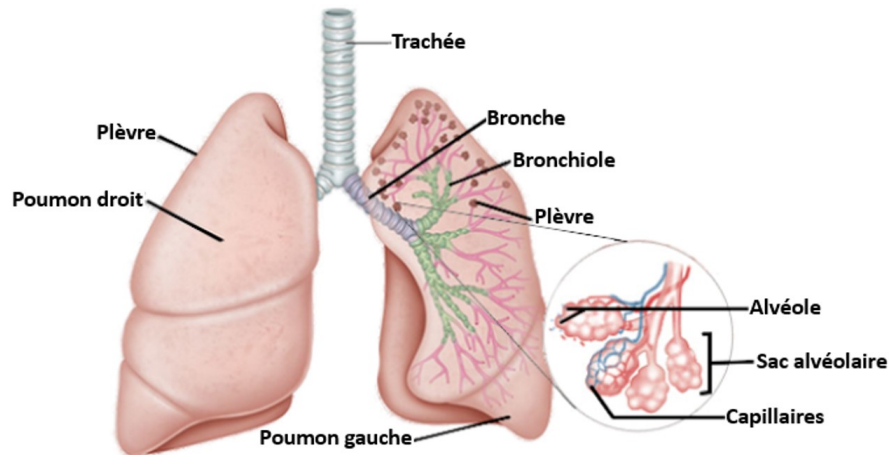


Figure 1. Anatomie des poumons

Les différentes générations bronchiques, les alvéoles et leurs positions approximatives au niveau du parenchyme pulmonaire (20)

Sur le plan histologique, partant du lumen, l'épithélium bronchique est formé de cellules épithéliales ciliées et d'environ 30 % de cellules caliciformes dont le nombre diminue en progressant vers les bronches périphériques (21, 22). Les cellules « en massue » (anciennement les cellules de Clara), dont le nombre augmente vers les voies respiratoires périphériques, représentent environ 22 % des cellules des bronchioles respiratoires (23). Elles constituent avec les cellules ciliées l'épithélium des bronchioles respiratoires terminales. En plus de leur rôle dans la sécrétion du surfactant pulmonaire (24), ces cellules participent activement aux réactions immunitaires et inflammatoires locales à travers la sécrétion de protéines spécifiques notamment la protéine humaine 1 et la CC16 (21, 24). L'épithélium est relié à une membrane basale par l'intermédiaire de petites cellules triangulaires dites cellules basales qui constituent en même temps un stock de cellules de repeuplement. Le principal rôle de la membrane basale est de rattacher les cellules basales et, donc, l'épithélium à la matrice extracellulaire sous-jacente à travers des molécules d'adhésion, des jonctions hémodesmosomales et des fibrilles (21).

La matrice extracellulaire ou ciment intercellulaire est une structure fibrillaire tridimensionnelle située à l'extérieur des cellules. Elle fournit un support structural aux cellules en permettant l'adhérence, les mouvements et l'évolution cellulaire en son sein. Elle est constituée d'un ensemble de macromolécules incluant les protéoglycanes, les

glycosaminoglycanes, les collagènes, les fibres élastiques et la fibronectine. Elle héberge les cellules immunitaires, les fibroblastes, les vaisseaux sanguins ainsi que les glandes à mucus. Celles-ci s'ouvrent au niveau de l'épithélium et leur nombre est augmenté dans l'asthme. Par la suite, on retrouve le muscle lisse qui est également séparé du cartilage bronchique par une matrice extracellulaire (25, 26) (Figure 2).

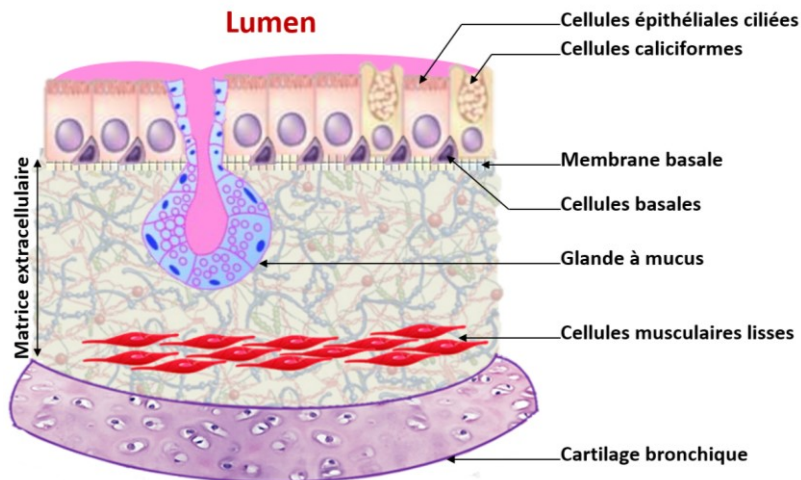


Figure 2. Structure histologique d'une bronche

Le remodelage tissulaire asthmatique des voies respiratoires est caractérisé, chez l'humain, par un épaissement conséquent de la membrane basale (fibrose sous-épithéliale), un épaissement de la couche musculaire lisse (10, 27), une hyperplasie glandulaire et des cellules caliciformes entraînant une augmentation de la sécrétion de mucus, une angiogenèse et une exsudation de l'épithélium avec une perte de la ciliature des cellules épithéliales (28, 29) et une augmentation du nombre de cellules caliciformes (30) (Figure 3). Ces mêmes altérations sont observées chez les chevaux atteints d'asthme sévère avec un épaissement de la membrane basale beaucoup moins marqué (31).

L'infiltration éosinophilique des voies respiratoires humaines, qu'elle soit ou non reliée à l'asthme, est caractérisée par un épaissement important de la membrane basale (10, 27) qui n'est pas rapporté dans l'asthme purement neutrophilique. Les cas humains d'asthme neutrophilique associés à un épaissement de la membrane basale comportent une composante éosinophilique sanguine (10). Ceci étant, bien que la neutrophilie ait été rapportée dans différents types d'asthmes et à différentes sévérités, elle est surtout associée à une

condition plus sévère de la maladie avec une obstruction plus importante des voies respiratoires et aux exacerbations fatales (7, 32).

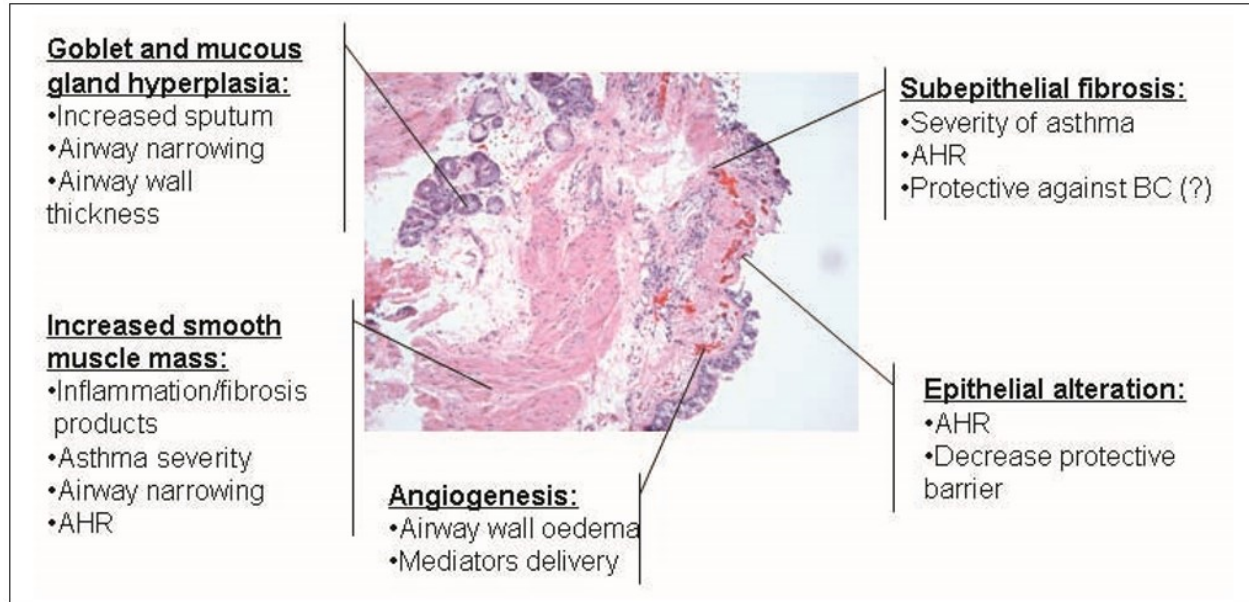


Figure 3. Biopsie endobronchique d'un patient asthmatique sévère
Les principaux changements observés dans les voies respiratoires et leurs conséquences cliniques (29)

La membrane basale est une matrice extracellulaire qui sépare l'épithélium de la lamina propria. Elle est constituée de 3 feuillets distincts : La lamina rara qui est en contact avec les cellules épithéliales, la lamina densa au milieu et la lamina reticularis qui fusionne avec la lamina propria. En microscopie électronique, les voies respiratoires issues d'individus asthmatiques présentent un épaississement de la lamina reticularis seulement, les deux autres feuillets apparaissant inchangés. Cette fibrose de la lamina reticularis est due à l'accumulation de fibronectine et des collagènes I, III et V (28).

L'inflammation et le remodelage tissulaire observés dans l'asthme impliquent plusieurs processus mécaniques et chimiques. Le muscle lisse bronchique semble jouer un rôle actif et majeur dans ces mécanismes à travers une interaction autocrine et paracrine avec sa matrice extracellulaire (33). En effet, il a été démontré que les cellules musculaires lisses bronchiques saines produisent différentes protéines matricielles incluant les collagènes I, III, IV et V, la fibronectine, le perlecane, l'élastine, la laminine, la thrombospondine, la chondroïtine sulfate,

le versican et la décorine. Cette production est altérée qualitativement et quantitativement dans l'asthme (34).

3. Muscle lisse

3.1. Définition et rôle

Le muscle lisse bronchique s'étend de la trachée jusqu'aux bronchioles terminales. Il est organisé en faisceaux adjacents à la matrice extracellulaire, juste en dessous de la couche épithéliale. Son orientation est tout d'abord circonférentielle et finit par devenir spiralée et en plus grande proportion en progressant vers les voies périphériques (21). En plus d'être responsable du diamètre des voies aériennes, le muscle lisse semble réguler la composition de sa matrice extracellulaire à travers la synthèse et la sécrétion de certaines molécules matricielles telles que le collagène, la fibronectine et la laminine en plus des métalloprotéases (MMPs) et des inhibiteurs des métalloprotéases (TIMPs) (35-37).

Bien que son rôle physiologique soit non élucidé, le muscle lisse bronchique est l'un des pivots de la pathogenèse des maladies respiratoires obstructives et notamment de l'asthme (34, 38). Il est admis qu'à travers ses capacités biomécaniques et synthétiques, le muscle lisse est un effecteur principal dans l'hypersensibilité bronchique observée dans l'asthme (39).

3.2. Phénotypes

L'unité fonctionnelle du muscle lisse respiratoire est la cellule musculaire lisse bronchique. C'est une cellule fusiforme contenant un cytoplasme dense et un noyau central ovoïde. Le cytoplasme contient un nombre important de mitochondries, un appareil de Golgi et un réticulum endoplasmique granuleux développés témoignant d'un grand pouvoir de synthèse (40).

In vivo comme *in vitro*, certaines protéines permettent la reconnaissance et la distinction des cellules musculaires lisses bronchiques des autres cellules et notamment des fibroblastes avec lesquels elles partagent une forte ressemblance structurale. L' α -smooth muscle actine (α -SMA), la smooth muscle myosine heavy chain (SMMHC) et la desmine sont des protéines synthétisées par les cellules musculaires lisses bronchiques. L' α -SMA est

exprimée par les cellules musculaires lisses bronchiques en tout temps mais à des concentrations variables selon le phénotype de la cellule. Cependant, elle ne lui est pas spécifique étant donné qu'elle est retrouvée dans les fibroblastes entre autres cellules. La synthèse de la SMMHC des cellules musculaires lisses bronchiques est partagée à moindre degré avec celle des myofibroblastes mais pas avec des fibroblastes. La desmine permet d'identifier les cellules musculaires lisses bronchiques matures mais elle est également produite par les cellules musculaires squelettiques et cardiaques. En somme, la cellule musculaire lisse bronchique est la seule capable d'exprimer simultanément ces trois protéines (41, 42).

Les cellules musculaires lisses bronchiques sont capables d'exprimer différents phénotypes contractile, prolifératif synthétique et migratoire (43, 44). Dans sa revue, Hirst spécifie que « La fonction principale du phénotype contractile est de maintenir une certaine tension mécanique au niveau des bronches alors que le phénotype prolifératif synthétique permet l'approvisionnement de la matrice extracellulaire en molécules structurales ainsi que la production paracrine et autocrine de facteurs promoteurs de croissance. » (40).

3.2.1. Phénotype Contractile

Un muscle lisse bronchique normal mature exprime préférentiellement un phénotype contractile qui est mis en évidence par une contraction en réponse à un agent spasmogène tel que la méthacholine (40, 45). Un grand nombre de myofilaments épais et fins constitue la cytostructure d'une cellule musculaire lisse bronchique en phase contractile. Ces filaments sont parallèles à l'axe longitudinal des myocytes et sont représentés par la SMMHC et l' α -SMA dont les filaments paraissent épais (40, 41).

Sur le plan biomécanique, le phénotype contractile du muscle lisse bronchique est caractérisé par la contraction des cellules musculaires lisses. Sur le plan moléculaire il se définit par l'expression de protéines contractiles spécifiques, notamment, l' α -SMA, la SMMHC (43), la desmine et la calponine dont la présence semble caractéristique d'une cellule musculaire lisse bronchique contractile mature étant donné qu'elle est indétectable dans le phénotype prolifératif (41). Pour toutes les autres protéines citées, l'expression est réduite à

des importances variables lorsque les cellules sont en phase de transition vers le profil prolifératif et lorsqu'elles l'adoptent (41, 43) (Tableau I).

Une étude *in vitro* faite sur le muscle lisse bronchique montre que son phénotype contractile est augmenté sur une matrice de collagène type V et de laminine et réduit sur une matrice de collagène type I et de fibronectine (46). Plus spécifiquement, la laminine induit la maturation du phénotype contractile des cellules musculaires lisses bronchiques alors que la fibronectine réduit leur contractilité en diminuant leur expression protéique en α -SMA, en SMMHC et en calponine (34). L'induction du phénotype contractile des cellules musculaires lisses en culture se fait aussi par privation de sérum (40). Le manque de sérum entraîne une stimulation des activités de liaison du facteur de réponse sérique (SRF) aux CARG qui sont des séquences répétées de nucléotides au niveau génique des cellules musculaires lisses formant un signal régulateur ou une transcription (47).

3.2.2. Phénotype prolifératif

Les cellules musculaires lisses bronchiques exprimant un phénotype prolifératif ont un noyau allongé contenant de très faibles proportions d'hétérochromatine (caractéristique d'une cellule en mitose). Au niveau du cytoplasme, un développement important de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique granuleux, une augmentation du nombre de ribosomes, de mitochondries et de jonctions est associée à une diminution importante des myofilaments contractiles (34, 41). À partir de ces données, il est possible d'affirmer que le phénotype prolifératif de la cellule musculaire lisse est intimement lié à un phénotype synthétique et sécrétoire.

D'un point de vue protéique, les cellules musculaires lisses en prolifération révèlent une chute des concentrations en SMMHC et en α -SMA corrélée avec une diminution de plus de 70 % de leurs ARN messagers (ARNm) (41). Cependant, l'accumulation de leurs isoformes non musculaires respectifs fait que la concentration totale en actine et en myosine reste inchangée (40). Aussi, la diminution significative des protéines contractiles à savoir la calponine, la desmine, la myosine light chain kinase (MLCK), la β -tropomyosine et la h-caldesmone est accompagnée d'une augmentation tout aussi conséquente des concentrations en protéines non musculaires notamment la l-caldesmone, la vimentine, la protéine kinase C

(PKC) et le CD44 (40, 41) (Tableau I). Des études électrophysiologiques des cellules musculaires lisses montrent que leur excitabilité est beaucoup plus importante dans leur phénotype prolifératif que dans leur phénotype contractile (40).

Tableau I. Niveau d'expression des protéines de la cellule musculaire lisse suivant le phénotype (40, 41)

Protéines	Phénotype	
	Contractile	Prolifératif
SMMHC	+++	+
α -SMA	+++	+
nmMHC	+++	+++
β -Actine	+	+++
γ -Actine	+	+++
Calponine	+++	+
Desmine	+++	+/-
h-caldesmone	+++	+
l-caldesmone	+	+++
MLCK	+++	+
Vimentine	+	+++
PKC	+/-	+++
CD44	+	+++

α -SMA : α -smooth muscle actin; nmMHC: non muscle myosin heavy chain; MLCK: myosin light chain kinase; PCK: protein kinase C; CD44: cluster of differentiation 44

Parameswaran et *al.* ont rapporté que les substrats de fibronectine, des collagènes type I et IV, de laminine et de vitronectine ont un effet potentialisateur de la survie des cellules musculaires lisses à l'inverse du substrat d'élastine (35). La prolifération de ces cellules, quant à elle, semble potentialisée sur une matrice de collagène type I et de fibronectine et inhibée sur du collagène type V et de laminine (35, 41).

Les cellules musculaires lisses bronchiques en phase synthétique sont capables de produire et de sécréter un grand nombre de molécules matricielles ainsi que différentes cytokines et chimiokines et des facteurs de croissance (34). Ces sécrétions, par effet autocrine direct ou indirect peuvent orienter le phénotype des myocytes (43). À titre d'exemple, les cellules musculaires lisses bronchiques sécrètent des IL-13 et des leucotriènes D4 (LTD4) qui potentialisent leur prolifération (48).

Les facteurs qui stimulent la prolifération des cellules musculaires lisses inhibent leur contraction et réciproquement. Par exemple la cystéinyl leucotriène (Cys-LT) diminue la contractilité des myocytes et stimule leur prolifération (35, 48). Ceci implique que l'expression de l'un de ces deux phénotypes est associée à l'inhibition de l'autre. Cependant, les cellules musculaires lisses bronchiques ne doivent pas être considérées comme étant seulement prolifératives ou contractiles. En effet, « l'état contractile ou synthétique de chaque cellule représente un équilibre des caractéristiques communes aux deux phénotypes. Ainsi, certaines cellules musculaires lisses, tout en étant encore contractiles, seront également capables de se diviser. » (30).

3.2.3. Phénotype migratoire

La migration des cellules musculaires lisses est normalement observée durant l'organogenèse pulmonaire. Cependant, en réponse à un processus inflammatoire chronique, cette migration contribue à l'hyperplasie cellulaire du muscle lisse et donc au remodelage (34, 49).

La migration cellulaire se fait sur 5 étapes synchrones qui sont la polarisation, la protrusion, l'adhésion, la traction et la contraction (49). L'homologue 42 de la protéine de contrôle de la division cellulaire (Cdc42) régule la polarisation des myocytes et prépare leur protrusion qui est régulée par les protéines Rho (50). L'accumulation de phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) et de l'homologue de phosphatase et de tensine (PTEN) respectivement au niveau de l'extrémité antérieure et sur les côtés et le bords postérieur des myocytes en migration leur permet de s'orienter même si le gradient chimiotactique est faible (49).

Il a été rapporté qu'un gradient de facteurs de croissance et de cytokines peut entraîner le chimiotactisme des cellules musculaires lisses bronchiques asthmatiques (35, 49). Le facteur de croissance plaquettaire PDGF et le facteur de croissance transformant TGF β -1 stimulent la migration des cellules musculaires lisses bronchiques *in vitro* (51, 52). Le facteur de croissance plaquettaire entraîne l'haptotaxie des cellules alors que le facteur de croissance transformant TGF β -1 facilite la migration cellulaire en modifiant la balance entre les métalloprotéases et leur inhibiteurs à travers la voie de signalisation des protéines kinases activées par un mitogène (MAPK) (51, 53).

Les protéines de la matrice extracellulaire jouent un rôle important dans la migration des cellules musculaires lisses bronchiques. Parameswaran et *al.* ont montré que les matrices de collagène III, de collagène V et de fibronectine stimulaient plus la migration que les matrices de lamine, d'élastine et de collagène I (54). Les liaisons entre les intégrines et les protéines cytosquelettiques (vinculine, taline et α -actinine) permettent l'ancrage et la stabilisation des cellules à la matrice extracellulaire durant leur mouvement (49). Dans l'asthme, les myocytes expriment leurs phénotypes d'une manière altérée et exagérée menant au maintien de l'inflammation et au remodelage tissulaire (55, 56).

3.3. Comportement dans l'asthme

Le muscle lisse bronchique joue un rôle pivot dans l'inflammation et le remodelage tissulaire asthmatique (34). La plasticité phénotypique des cellules musculaires lisses bronchiques (34, 40) et leur fort potentiel synthétique font d'elles des effectrices dans le remodelage tissulaire asthmatique et la chronicité de la maladie (36, 43).

En effet, les cellules musculaires lisses bronchiques sensibilisées orientent le type d'infiltration cellulaire des voies respiratoires et contribuent au maintien de l'inflammation (35). Ces myocytes sécrètent différents types de molécules pro-inflammatoires et des facteurs de croissances impliqués dans la pathogénie de l'asthme (43) dont les métalloprotéases, les inhibiteurs des métalloprotéases, l'IL-1 β , l'IL-13 et le facteur de nécrose tumorale TNF α (36, 48). Ainsi, sous l'effet combiné de l'IL-1 β et du TNF α , les cellules musculaires lisses sécrètent l'éotaxine et le RANTES (Regulation upon activation, normal T expressed and secreted), un des plus puissants chimio-attractants d'éosinophiles (43). La sécrétion de l'éotaxine peut se faire directement suite à un rétrocontrôle positif de l'IL-13 et du TNF α sur les cellules musculaires lisses bronchiques (48). L'interféron gamma (IFN γ) peut soutenir, l'action du TNF α (57) et potentialiser la sécrétion du RANTES par les cellules musculaires lisses bronchiques (43). Il peut aussi inhiber la sécrétion de l'éotaxine par un rétrocontrôle négatif dose dépendant sur le TNF α (57).

Dans l'asthme, il est démontré que les cellules musculaires lisses bronchiques tendent plus vers un profil prolifératif sous l'effet de plusieurs cytokines et facteurs de croissance. En réponse aux stimulations du facteur de croissance transformant TGF β et du facteur de

croissance des fibroblastes FGF, les cellules musculaires lisses bronchiques cultivées *in vitro* augmentent leur sécrétion en collagènes type I et III (35) ce qui favorise leur prolifération. Cette tendance proliférative est mise en évidence par un changement structural synthétique et mitogène de la cellule (40). Macroscopiquement, ceci induit un épaissement du muscle lisse de tout l'arbre bronchique et surtout au niveau des bronchioles respiratoires (33, 40). Ces bronches semblent être le siège des sécrétions de facteurs de croissance et de médiateurs immunologiques divers (34, 40, 58).

Certains auteurs affirment que l'augmentation de la masse du muscle lisse bronchique dans l'asthme est due à une altération intrinsèque des cellules musculaires lisses bronchiques entraînant leur hyperplasie (35). Cependant, il a été démontré que ce phénomène est surtout dû à une synergie dans l'hypertrophie et l'hyperplasie de ces cellules (29) incluant des phénomènes de migration cellulaire, de différenciation / dédifférenciation ainsi qu'un phénomène encore mal cerné d'inhibition de l'apoptose (59).

En effet, les causes de l'hyperplasie des cellules musculaires lisses bronchiques sont encore controversées. Les auteurs divergent entre une augmentation de la prolifération, une diminution de l'apoptose ou une association entre les deux phénomènes qui pourrait être potentialisée par une migration des cellules mésenchymateuses et leur différenciation en myocytes (33) (Figure 4).

La prolifération des cellules musculaires lisses bronchiques est influencée par beaucoup de molécules dont les récepteurs couplés à la protéine G, les récepteurs activant la tyrosine kinase, le collagène I ainsi qu'un nombre de facteurs de croissance et de cytokines incluant le facteur de croissance fibroblastique FGF, le Facteur de croissance plaquettaire PDGF, le Facteur de croissance épidermique EGF, le facteur de nécrose tumorale $TNF\alpha$, l'IL-6 et l'endothéline-1 (33). Des études faites *in vitro* ont démontré que la prolifération et la migration des myocytes requiert la libération et l'activation des métalloprotéases, notamment les MMP-1, MMP-2, MMP-3 et la métalloprotéase membranaire type 1 (MT1-MMP). Ces métalloprotéases sont synthétisées par différentes cellules dont les cellules musculaires lisses et les fibroblastes (34, 49, 60-62).

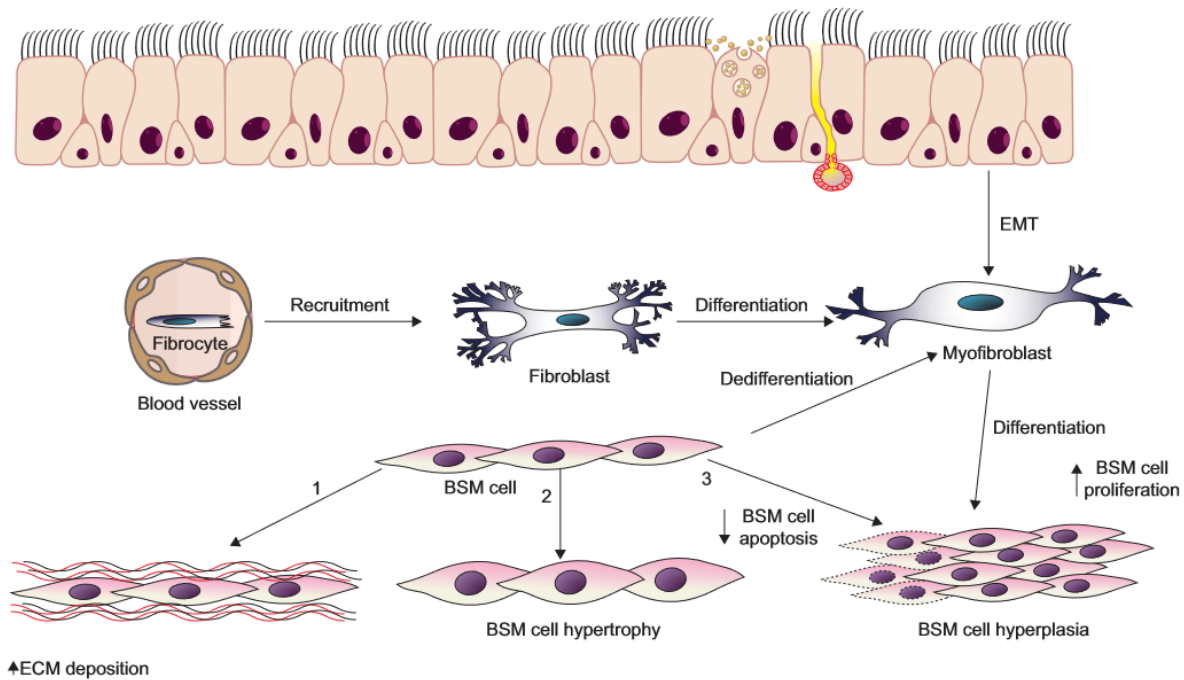


Figure 4. Mécanismes du remodelage du muscle lisse bronchique dans l'asthme
 EMT: epithelial mesenchymal transition; ECM: extracellular matrix; BSM : Bronchial smooth muscle (34)

La morphologie de la membrane cytoplasmique des cellules musculaires lisses bronchiques semble changer lors de différentes affections respiratoires dont l'asthme. Elles expriment des molécules d'adhésion (intégrines) à leurs surfaces permettant un contact direct avec les cellules inflammatoires et potentialisant ainsi la réaction inflammatoire (43). Des études *in vitro*, ont démontré qu'un signal anti-apoptique pour les cellules musculaires lisses bronchiques est émis par la matrice extracellulaire à travers les intégrines $\alpha 5$ et $\beta 1$. Aussi, d'autres études encore controversées associent la survie cellulaire à une diminution de la composition matricielle en décorine et à l'expression de certains facteurs tels que la cardiothrophine-1 et l'endothéline (35). L'hypertrophie des cellules musculaires lisses bronchiques, quant à elle, a été associée à une augmentation de l'expression de la kinase de la chaîne légère de la myosine MLCK (35).

Par ailleurs, les cellules musculaires lisses bronchiques asthmatiques semblent migrer vers le sous-épithélium (35, 59). Une apparition de myofibroblastes dans la lame réticulaire à proximité de la couche musculaire lisse bronchique a été observée chez les patients

asthmatiques. Ceci suggère que ces cellules dérivent de cellules musculaires lisses bronchiques en migration, de fibroblastes ou de cellules mésenchymateuses (35).

Les cellules musculaires lisses bronchiques asthmatiques peuvent sécréter différents médiateurs et cytokines de type Th1 et Th2 (57) (Tableau II). Elles sont aussi capables de sécréter des métalloprotéases dont les gélatinases MMP-9 et les métalloélastases MMP-12 (36). Ces sécrétions agissent sur leur comportement et elles finissent même par développer une résistance aux corticostéroïdes (57). La plupart des sécrétions pro-inflammatoires des cellules musculaires lisses bronchiques semblent principalement induites par une exposition autocrine à l'IL-1 β , au facteur de nécrose tumorale TNF α et à l'interféron gamma. Ceci fait de ces 3 molécules, entre autres, des facteurs importants agissant directement sur l'expression d'autres facteurs et cytokines et indirectement sur l'expression du profilé mitogène et prolifératif des myocytes (43).

Le tableau II présente une liste non exhaustive des différents médiateurs sécrétés par les cellules musculaires lisses bronchiques et leurs interactions avec celles-ci. Ceci mène à admettre que ces myocytes peuvent être considérés comme des cellules pro-inflammatoires dans les affections respiratoires dont l'asthme (33, 38).

Tableau II. Molécules sécrétées par les cellules musculaires lisses vs. Fonction du muscle lisse bronchique (33, 34, 43, 48)

Médiateurs		Synthétisés par les cellules musculaires lisses bronchiques	Effet autocrine sur le muscle lisse	Module les fonctions du muscle lisse
Cytokines/Chimiokines	IL-1 β	+	+	+++
	IL-2	+	+	+
	IL-4/13	+/-	+/-	+++
	IL-5	+	+	+++
	IL-6	+++	++	++
	IL-8	+++	-	-
	IL-11	++	-	-
	IL-12	++	+	+
	IL-13	+/-	+/-	+++
	RANTES	++	-	-
	Éotaxine	++	-	-
	INF γ	++	+++	+++
	MCP-1,2 et 3	++	-	-
	LIF	++	-	-
	GM-CSF	++	+/-	++
Facteurs de croissance	TNF α	+	+	+++
	PDGF	++	++	++
	FGF β	++	++	++
	Stem cell factor	+++	-	-
	MMP-1	++	+/-	++
Médiateurs inflammatoires	LTD $_4$	+/-	+/-	+++
	PGE $_2$	+++	+++	+++
	NOS I	+	++	+++
Éléments de la matrice extracellulaire	Collagène	++	+++	+++
	Laminine	++	+++	+++
	Fibronectine	++	+++	+++

(+++) Effet important; (+) Effet modéré; (-) Effet léger à absent

MCP: Monocyte chemoattractant protein-1, -2 et -3; LIF : Leukemia Inflammatory Factor; GM-CSF : Granulocyte Macrophage- Colony Stimulating Factor; PDGF : Platelet-Derived Growth Factor; NOS I : Nitric Oxyde Synthetase type I.

4. Matrice extracellulaire

4.1. Définition

La matrice extracellulaire bronchique ou ciment intercellulaire est un réseau complexe tridimensionnel fibreux. Elle est essentielle au bon fonctionnement mécanique des voies respiratoires puisqu'elle soutient et interagit avec les cellules environnantes (63). Elle est constituée principalement de collagènes (I, III, IV), de glycoprotéines (fibronectine, laminine, tenascine), de protéoglycanes et d'élastine (35, 36). Elle héberge différentes populations cellulaires dont les cellules immunitaires et les fibroblastes. Ceux-ci forment, sous la membrane basale, un faisceau cellulaire dit « gaine fibroblastique atténuée » (21).

Le collagène prodigue une résistance mécanique aux bronches alors que l'élastine est garante de leur élasticité (63). Les protéoglycanes semblent avoir un rôle protecteur des voies respiratoires. Aussi, ils participent selon leurs structures aux interactions entre la matrice extracellulaire et les cellules et à l'expression de différentes cytokines et chimiokines (64).

Au niveau des voies respiratoires, la matrice extracellulaire participe à la survie, la prolifération, la migration, la contraction et agit sur la fonction synthétique des cellules musculaires lisses et d'autres cellules via des récepteurs d'adhésion cellulaire qui lui sont spécifiques, les intégrines. Ces récepteurs sont exprimés à la surface des cellules et interagissent avec les protéines de la matrice extracellulaire environnante (35, 61). Grâce aux intégrines, la cellule peut donc définir l'aspect tridimensionnel de la matrice extracellulaire ainsi que ses propriétés physiques et biomécaniques. Par effet direct ou indirect à travers la modulation de certains signaux intracellulaires mettant en jeu des facteurs de croissance, les intégrines agissent sur le remodelage tissulaire et contrôlent le comportement cellulaire et l'organisation tissulaire qui en découle (61).

4.2. Composition normale

La matrice extracellulaire constitue 25 % du poids sec des poumons sains. Elle se compose de macromolécules protéiques fibrillaires qui, au niveau des bronches, sont constituées de 70 % de collagène (65-67). L'élastine, la fibronectine, la laminine et le versicane font aussi partie de la composition protéique bronchique (36, 65). La présence des

métalloprotéases et de leurs inhibiteurs permet un équilibre constant de la composition de la matrice entre synthèse et dégradation (Tableau III).

Tableau III. Principaux constituants de la matrice extracellulaire des voies respiratoires centrales et périphériques (36, 65, 66)

Éléments non collagéniques	Éléments collagéniques	Enzymes
Fibronectine	Collagène type I	MMP-1
Versicane	Collagène type II	MMP-2
Élastine	Collagène type III	MMP-9
Laminine	Collagène type IV	MMP-12
Glycosaminoglycanes	Collagène type V	TIMP-1
	Collagène type XI	TIMP-2

MMP : metalloproetase; TIMP : tissue inhibitor of metalloprotease

4.3. Modifications observées dans l'asthme

Des mécanismes synthétiques, mécaniques et / ou protéolytiques peuvent induire le remodelage de la matrice extracellulaire. Les principaux inducteurs de ce remodelage sont les intégrines. Elles traduisent les forces mécaniques de la matrice extracellulaire en signaux chimiques à travers la transduction des signaux de cette matrice vers la cellule. Celle-ci répond à l'information qu'elle reçoit par des agents chimiques ou autres signaux. De ce fait, la transduction du signal peut induire une modification de l'activité de la cellule cible. À travers ces mécanismes, les intégrines modulent la prolifération, la survie, la migration et la contractilité cellulaire en cas de variation constitutive de la matrice extracellulaire (61).

Les sujets asthmatiques présentent une augmentation globale des protéines matricielles avec une altération de leur ratio (68) causant un changement pro-fibrotique de la matrice extracellulaire bronchique (36). Ces modifications sont dues à un déséquilibre dans la sécrétion des protéases et des anti-protéases. En effet, leur sécrétion est augmentée par certaines cellules inflammatoires dont les macrophages et les neutrophiles. Les fibroblastes

augmentent considérablement leur production en protéoglycanes et en anti-protéases TIMP-2 au détriment des gélatinases MMP-2 suite à une altération intrinsèque (29).

En effet, certaines études relient les métalloprotéases aux états asthmatiques, notamment les gélatinases MMP-2 et MMP-9, les stromélysines MMP-3, les collagénases MMP-8, et les métalloélastases MMP-12 (36, 69). Une augmentation des concentrations de MMP-12 et de MMP-9 est observée dans l'asthme avec des concentrations de MMP-9 positivement proportionnelles à la sévérité de la maladie (36, 70) et des concentrations de MMP-12 positivement corrélées à l'augmentation de dépôts de fibres élastiques (36). Le rôle de ces enzymes dans le remodelage tissulaire asthmatique humain ne se limite pas au remaniement protéique de la matrice extracellulaire. Il semblerait qu'elles participent activement au recrutement des éosinophiles, à la multiplication des cellules musculaires lisses bronchiques et à l'angiogenèse (71).

Ces changements dans les concentrations des protéases et des anti-protéases influent directement sur les dépôts protéiques dans la matrice extracellulaire. Une diminution du collagène type IV (36) et une augmentation des dépôts des collagènes types I et V, de tenascine, de lumécane et de fibronectine (68) sont observés notamment au niveau des voies respiratoires centrales. Bien qu'une augmentation globale de fibres élastiques ait été observée, celles-ci semblent anormalement diminuées dans les régions alvéolaires et de qualité altérée au niveau des grosses bronches (36, 63).

L'augmentation des dépôts protéiques dans la matrice extracellulaire et l'hypertrophie du muscle lisse bronchique peuvent contribuer significativement à l'épaississement caractéristique d'une paroi respiratoire remodelée (72). Ceci rend compte de l'importance de ces deux composantes dans l'asthme menant à la suggestion d'une interaction possible.

5. Interactions matrice extracellulaire / muscle lisse

La matrice extracellulaire influence le comportement des cellules musculaires lisses bronchiques. Un changement même minime dans sa composition pourrait altérer le phénotype (prolifération, migration, survie, sécrétions et contraction) des myocytes (36). D'ailleurs, Parameswaran et *al.* ont démontré que l'augmentation des fibres de collagène et de

fibronectine dans la matrice extracellulaire observé dans l'asthme stimule la survie et la croissance des cellules musculaires lisses bronchiques (35). Une autre expérience faite par Johnson et *al.* a montré que le sérum d'origine asthmatique stimulait le profil sécrétoire des cellules musculaires lisses (73) qui sécréteront, entre autres, plus de protéases et d'anti-protéases (36). Ces protéases ont une action immunorégulatrice de la composition de la matrice extracellulaire chez les patients asthmatiques (36). Une autre recherche menée par Chung et *al.* a montré une surexpression d'un grand nombre de facteurs pro-inflammatoires dans la matrice extracellulaire de sujets asthmatiques. Une bonne fraction de ces sécrétions est assurée par les cellules musculaires lisses bronchiques d'une manière directe ou indirecte (43).

D'ailleurs, grâce à leur capacité sécrétoire, les cellules musculaires lisses bronchiques participent à l'augmentation des dépôts de fibronectine dans la matrice extracellulaire. Réciproquement, la fibronectine renforce les cellules musculaires lisses bronchiques, améliore leur aptitude proliférative et stimule leur sécrétion en IL-13 menant à l'expression d'éotaxine (36) et à l'afflux d'éosinophiles dans les voies respiratoires. Une matrice extracellulaire asthmatique peut affecter la réponse contractile des myocytes en la potentialisant (74) et risque même d'altérer la réponse du muscle lisse aux bronchodilatateurs et aux corticostéroïdes (68). Les intégrines sont le noyau de ces interactions puisqu'elles agissent à différents niveaux dont celui de l'homéostasie des cellules musculaires lisses bronchiques (68). Plusieurs études faites sur des sujets asthmatiques ont démontré la surexpression de ces intégrines au niveau des myocytes bronchiques (68) notamment les intégrines 1 et 2 (43).

En somme, l'inflammation observée dans les voies respiratoires asthmatiques est en partie la résultante de plusieurs interactions entre la matrice extracellulaire et le muscle lisse bronchique à travers leurs expressions respectives de différents médiateurs inflammatoires, protéines, enzymes et récepteurs. Ces produits de sécrétion pourraient moduler la composition de la matrice extracellulaire et le phénotype du muscle lisse bronchique par effet autocrine et paracrine. Ceci entraînera une accentuation de leur propre sécrétion, une aggravation des altérations de la matrice extracellulaire et du muscle lisse ainsi qu'un maintien de l'inflammation (27, 35) (Figure 5).

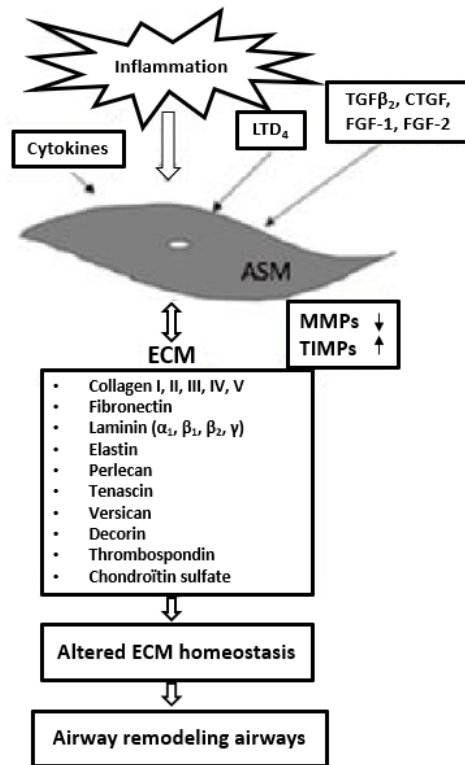


Figure 5. Interactions myocytes bronchiques / matrice extracellulaire dans l’asthme
 TGF β_2 : transforming growth factor β_2 ; LTD $_4$: leucotriènes D $_4$; FGF-1: fibroblast growth factor-1; FGF-2: fibroblast growth factor-2; MMPs: metalloproteases; TIMPs: tissue inhibitor of metalloproteases (35)

6. Modèles animaux dans l’étude de l’asthme

L’asthme étant un syndrome très hétérogène, il nécessite souvent pour la caractérisation de ses mécanismes biologiques et moléculaires des méthodes invasives et éthiquement non utilisable chez l’humain. Pour cette raison, les recherches se sont souvent basées sur des modèles animaux.

Les rongeurs sont les animaux les plus anciennement et les plus souvent utilisés en recherche pour différentes raisons dont la facilité de leur manipulation, la parfaite connaissance de leur biologie et leur coût réduit (75). Bien qu’ils ne manifestent pas naturellement la condition asthmatique, leur sensibilisation permet d’obtenir une réponse de type Th2 avec une prédominance éosinophilique et l’expression des immunoglobulines E (IgE) (76).

La possibilité de provoquer artificiellement une condition respiratoire similaire à l'asthme chez les rats et les souris permettent l'exploration de plusieurs facettes génétiques, cellulaires et inflammatoires de l'asthme puisque les différentes lignées de souris et de rats répondent différemment à un même challenge antigénique (76). Les cochons d'Inde sont également des candidats de laboratoires assez utilisés pour l'étude de l'asthme et l'exploration du mode d'action des molécules thérapeutiques *in vivo* (77, 78).

Moins souvent, des animaux tels que les chiens, les chats et les moutons sont utilisés pour leur prédisposition innée à développer une réponse allergique à un antigène naturel. Cette réponse est comparable à celle observée chez l'humain dans sa variabilité (79, 80). Un certain intérêt a été manifesté pour les chats car ils peuvent souffrir d'une pathologie respiratoire comparable à un certain degré à l'asthme humain connu comme « asthme félin » ou « bronchite féline » (81, 82).

L'étude de ces animaux comme modèles pour l'asthme humain n'est pas sans limitations. Des différences anatomiques, immunologiques et dans les durées de vie existent entre ces animaux et l'être humain. De toutes les espèces animales citées, aucune n'est connue pour développer naturellement une maladie comparable à l'asthme sévère et leur utilisation comme modèle limite l'étude des mécanismes à leur phase aiguë (80, 82). Plus encore, sur le plan moléculaire, les éosinophiles des souris sensibilisées sont rarement dégranulés alors que chez l'humain c'est l'inverse qui se produit. D'ailleurs, les rongeurs finissent par développer une adaptation immunitaire à l'allergène utilisé pour les sensibiliser à la suite d'une stimulation prolongée ou répétée (76).

Tout ceci fait qu'il y a trop de paramètres à prendre en compte lors de l'extrapolation des résultats obtenus chez les animaux à l'humain avec de fortes probabilités d'incompatibilités notamment dans les explorations thérapeutiques. Aussi, il devient impossible d'explorer l'un des piliers de ce syndrome : la chronicité. En effet, l'étude de la phase chronique permettrait de comprendre le remodelage tissulaire.

6.1. Cheval : modèle pour l'étude de l'asthme

Le cheval présente plusieurs caractéristiques le rendant un modèle idéal pour l'étude de l'asthme humain. Tout d'abord, sa taille permet des investigations impossibles chez d'autres

espèces telles que les souris. À titre d'exemple, les biopsies endobronchiques et le prélèvement de quantités importantes de liquide broncho-alvéolaire (LBA) et de sérum sans danger. Ensuite, sa longévité (25 – 30 ans en moyenne) qui se rapproche de celle de l'humain et qui permet donc d'étudier des phénomènes sur une longue période sur un même individu (83). Pour finir, le cheval, tout comme l'humain, peut développer naturellement une pathologie respiratoire chronique et très hétérogène d'un sujet à l'autre dite « asthme équin sévère » (souffle) (31, 84). Cette pathologie cause, autant chez l'humain que chez le cheval, une hypersensibilité respiratoire, une inflammation respiratoire chronique entraînant un remodelage épithélial, une hyperplasie des cellules en gobelet et des cellules musculaires lisses bronchiques, une obstruction respiratoire partiellement réversible due au remodelage tissulaire bronchique et une infiltration neutrophilique des voies respiratoires (83, 85).

Comme pour l'humain, l'asthme équin sévère est à caractère évolutif (84), les exacerbations observées chez les chevaux asthmatiques font suite à une stimulation antigénique chronique (moisissure et poussière) (86). La rémission peut être observée suite à la soustraction de l'exposition antigénique (mise au pâturage des chevaux) et / ou par administration de corticostéroïdes et de bronchodilatateurs (87, 88). Ceci fait que les chevaux asthmatiques sont un modèle de choix pour l'exploration de certaines découvertes thérapeutiques pour le traitement de l'asthme chez l'humain (31).

L'asthme équin peut être léger (à modéré). Il est alors caractérisé par une légère augmentation des neutrophiles, des éosinophiles et / ou des cellules mastocytaires dans les voies respiratoires avec une détresse respiratoire à l'effort. Le souffle ou asthme équin sévère est caractérisé par une augmentation des taux de neutrophiles dans le LBA (> 25 %), du mucus, de la toux, une détresse respiratoire au repos et une intolérance à l'effort (89). Il a été démontré que comme l'humain le cheval asthmatique sévère développe une inflammation pulmonaire de type Th2 prédominant (83). De plus, plusieurs recherches s'accordent sur le fait qu'une neutrophilie respiratoire caractérise les cas d'asthme les plus sévères et les exacerbations aiguës et fatales chez l'humain (5, 32). Ceci suggère que les neutrophiles peuvent participer au remodelage tissulaire observé dans l'asthme (90).

Chez les chevaux asthmatiques sévères, une augmentation des dépôts des collagènes I et III ainsi que des fibres élastiques non fonctionnelles a été démontrée au niveau de la lamina propria (63). Les collagènes augmentent la rigidité des voies respiratoires alors que les fibres élastiques surajoutées n'étant pas polymérisées n'améliorent pas l'élastance et ne limitent pas la constriction du muscle lisse bronchique (91). Ceci suggère le rôle potentiel du remodelage dans l'obstruction respiratoire observée dans l'asthme.

La myosine SMMHC a 4 isoformes différents dont 2 sont caractérisés par la présence ou l'absence d'un insert de sept acides aminés au niveau du domaine moteur (92). Dans une étude faite par Boivin et collaborateurs en 2014, la surexpression de cet insert a été démontré au niveau du muscle lisse bronchique des voies respiratoires centrales et périphériques des chevaux asthmatiques (93). Cette surexpression est à caractère réversible après une thérapie de soustraction antigénique ou un traitement au corticostéroïdes inhalés. Cet insert étant responsable d'une contraction plus rapide du muscle lisse autant chez l'humain que chez le cheval (92, 93), sa présence au niveau des cellules musculaires lisses bronchiques pourrait accentuer la bronchoconstriction et l'hyperréactivité des voies respiratoires dans l'asthme. Aussi, il a été démontré que le muscle lisse bronchique au niveau des bronches intermédiaires et périphériques est plus important chez les chevaux asthmatiques par rapport aux chevaux contrôles (94). Sachant que l'épaississement du muscle lisse bronchique atteint une phase plateau, le degré de l'épaississement refléterait plus la sévérité de l'atteinte que sa durée et ce chez l'humain et le cheval (94, 95).

La surexpression de l'insert (+) de la myosine étant réversible alors que l'épaississement du muscle lisse ne l'est que partiellement. D'autres phénomènes causent, donc, l'épaississement du muscle lisse bronchique comme l'hyperplasie et l'inhibition de l'apoptose des cellules musculaires lisses bronchiques (94) ou la migration et la différenciation probable des myofibroblastes en myocytes. L'hyperplasie des cellules musculaires lisses bronchiques pourrait, entre autres, être causée par les exosomes que libèrent les neutrophiles. Ces exosomes sont des nanovisicules pouvant être internalisées par les cellules et affectant ainsi leur comportement (90). Tous ces paramètres font du cheval un excellent modèle d'étude pour l'asthme humain notamment les phénotypes non allergiques, sévères et d'apparition tardive (31).

6.2. Limites du modèle équin

Le cheval a, également, des limites à prendre en considération quant à son utilisation comme modèle d'étude en recherche. La disponibilité d'anticorps qui sont spécifiques au cheval est faible sur le marché or ceux-ci sont indispensables dans plusieurs protocoles de recherche. Ceci entraîne un processus de validation plus long que pour d'autres espèces qui peut parfois même limiter l'investigation. Aussi, le nombre de sujets inclus dans les études est souvent restreint vue le coût significativement plus élevé et les facilités requises pour l'entretien de base de cet animal par rapport aux animaux de laboratoire traditionnels. Au-delà des nécessités de bases comme le foin et les boxes, le suivi d'un projet demande plus de temps et d'argent quant à l'obtention et à l'administration des médicaments, des substances et des équipements utilisés dans les protocoles (31). Cela va sans dire des risques d'accidents plus élevés encourus par le manipulateur d'une espèce comme le cheval.

La souris étant une espèce parfaitement étudiée et de manutention facile, sa manipulation au niveau génétique pour surexprimer un gène ou abolir son expression est devenue une routine codifiée. Ce genre de manipulation reste impossible à faire avec les équidés.

Bien que l'asthme équin et humain soient très similaires, la différence de posture entre l'humain et le cheval peut influencer sur la réponse à l'obstruction bronchique en modifiant l'importance des pressions pulmonaires sous l'effet de la gravité et de la paroi thoracique (76, 96). Pour finir, un même groupe de chevaux peut montrer une grande hétérogénéité de résultats ce qui complique l'interprétation des données collectées (31).

7. Ingénierie tissulaire

7.1. Définition

L'ingénierie tissulaire est l'ensemble des techniques et des méthodes s'inspirant de différents domaines scientifiques dont l'ingénierie et la biologie cellulaire. Elle consiste à combiner des matrices (échafauds) biologiques ou de synthèse avec des cellules et / ou des molécules biologiquement actives afin de développer des substituts biologiques fonctionnels

qui restaurent, entretiennent ou améliorent des tissus endommagés ou des organes entiers (97, 98).

Différentes techniques d'ingénierie tissulaire sont mises au point ou en cours de l'être. Ce domaine reste encore très peu exploré et est principalement orienté vers la médecine régénérative. C'est une stratégie thérapeutique consistant à réparer une lésion ou un organe malade en le remplaçant par un nouveau tissu cellulaire créé pour l'occasion. Cette thérapie utilise principalement des cellules souches qui se différencieront pour substituer les cellules altérées. Certains échafauds biodégradables sont déjà sur le marché et utilisés en chirurgie afin d'aider à la restauration des fonctions biologiques de certains tissus musculo-tendineux et cardiovasculaires entre autres (99-101).

7.2. Les échafauds : méthodes de production et utilités

Plusieurs types de matrices peuvent être produits par ingénierie tissulaire. Les différences entre ces échafauds sont résumées dans le tableau IV ci-après.

Tableau IV. Échafauds obtenus par ingénierie tissulaire et leurs utilisations

Nature de l'échafaud	Méthode de production	Définition de la méthode	Principales utilisations
Biologique	Bio-impression	Impression tridimensionnelle de tissus par la superposition de couches de cellules vivantes en utilisant ou non des éléments matriciels biologiques. C'est un secteur très récent de l'ingénierie tissulaire et il est encore au stade expérimental.	-Médecine régénérative (102). -Évaluation de la réponse cellulaire aux médicaments (103).
Biologique naturel	Décellularisation d'organe	L'élimination de tout matériel cellulaire présent dans un tissu naturel (organes ou parties d'organes) par différentes méthodes physiques, chimiques ou enzymatiques (104).	-Médecine régénérative (105). -Étude des différenciations cellulaires (106, 107).
Synthétique	Reproduction d'organe à partir de matériaux de synthèse	La production d'une copie de synthèse d'un tissu biologique moyennant des matériaux biocompatibles et biodégradables (108).	-Médecine régénérative (108). -Évaluation de la réponse cellulaire aux médicaments (109). -Interactions cellules – matrice extracellulaire (110, 111).

Actuellement, l'ingénierie tissulaire est fortement impliquée dans le domaine de la médecine régénérative mais également dans les études des différenciations cellulaires et dans l'évaluation des médicaments (Figure 6). Plusieurs travaux publiés s'articulent autour de la mise au point de poumons ou de tissus pulmonaires comme la trachée et les bronches parfaitement fonctionnels. Ces tissus de substitution pourront être greffés sans risque de rejet et permettront de réduire les mortalités dues à l'attente de donneurs et aux rejets post-transplantation (105, 108, 112, 113).

Dans le domaine pharmaceutique, l'ingénierie tissulaire est utilisée pour l'étude des effets de certains traitements sur les cellules. Depuis peu, elle est employée en biologie cellulaire pour l'étude des cellules dans un environnement tridimensionnel sachant que les cellules agissent différemment selon la conformation dimensionnelle de leur substrat de culture (109, 114, 115). L'étude de l'interaction substrat - cellule permet, à partir d'une culture *in vitro*, d'extrapoler d'une manière plus précise les comportements et les phénotypes cellulaires exprimés *in vivo* (109, 116).

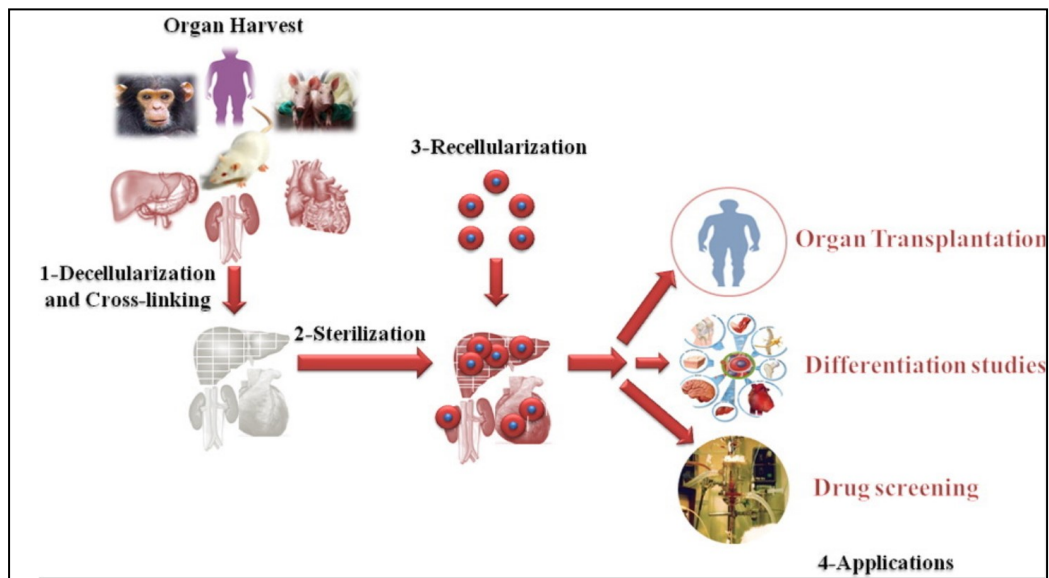


Figure 6. Principales applications de l'ingénierie tissulaire (106)

7.3. Nouvelle perspective pour l'ingénierie tissulaire

Les études menées *in vitro* en culture cellulaire monocouche ne sont pas représentatives du comportement cellulaire et des interactions cellules – matrice extracellulaire et cellules – cellules *in vivo*. À titre d'exemple, les études monocouches des lignées cellulaires tumorales ont un taux d'échec thérapeutique de 95 %. Ces cultures sont donc non représentatives de l'effet des médicaments *in vivo* (117).

Il a été démontré que la culture cellulaire tridimensionnelle améliorerait différents paramètres cellulaires en comparaison à une culture monocouche incluant la viabilité, l'adhésion, la prolifération, etc. Une étude comparant la culture de fibroblastes de peau sur des matrices tridimensionnelles naturelles à leur culture en monocouche sur différents substrats a révélé des variations notables. L'adhésion cellulaire est 5 à 6 fois plus importante sur une matrice tridimensionnelle qu'en culture monocouche, la migration cellulaire est aussi augmentée et l'acquisition d'une morphologie effilée mimant l'aspect *in vivo* est plus rapide (118). Une étude de la différenciation des cellules embryonnaires souches humaines sur une matrice tridimensionnelle a montré que les cellules sont physiologiquement et morphologiquement plus représentatives du milieu *in vivo* (119). Ceci est conforté par une étude des fibroblastes pulmonaires durant un processus inflammatoire. Cette étude a montré que les cellules en culture tridimensionnelle étaient plus sensibles au facteur de nécrose tumorale TNF α qu'en culture monocouche avec des modèles d'expression du récepteur I du TNF α et d'activation du facteur nucléaire NF κ B différents (120).

Les matrices biologiques naturelles n'ont, jusque-là, jamais été utilisées pour l'étude des interactions matrice extracellulaire – cellules. Ce modèle semble pourtant être le plus fidèle à la réalité et permettrait de mettre à jour ou de comprendre les mécanismes pathophysiologiques régissant certaines pathologies encore mal cernées comme l'asthme. La culture de cellules musculaires lisses sur une matrice bronchique naturelle permettrait l'étude inédite des interactions entre la matrice extracellulaire et les myocytes dans un environnement quasi-naturel.

Mise en contexte

L'asthme équin tout comme l'asthme humain représente un syndrome respiratoire à caractère évolutif et à composantes multiples. Ces pathologies s'accompagnent de symptômes respiratoires obstructifs qui dans les cas les plus sévères deviennent résistant aux traitements conventionnels et s'accompagnent d'un remodelage des voies respiratoires partiellement voire totalement irréversible. Chez les individus asthmatiques, les cellules musculaires lisses bronchiques ont longtemps été connues pour leur rôle dans le bronchospasme asthmatique mais leur importance semble dépasser un simple effet mécanique. Ces cellules sont aussi sécrétrices de différentes molécules incluant des protéines matricielles et un nombre de cytokines et de chimiokines d'où leur rôle dans l'altération de la composition de la matrice extracellulaire et le maintien de l'inflammation bronchique. La matrice extracellulaire influence sur le comportement des cellules environnantes à travers les intégrines qui permettent aux cellules de reconnaître l'environnement tridimensionnel dans lequel elles sont et d'interagir avec. Ceci implique qu'un changement dans la composition de la matrice extracellulaire aura impérativement une conséquence sur le phénotype des cellules avoisinantes. De ce fait, le remodelage bronchique asthmatique pourrait être dû à un effet autocrine et paracrine dans l'interaction entre les cellules musculaires lisses endo-bronchiques et la matrice extracellulaire bronchique.

Les différentes études faites *in vitro* sur des cultures monocouches de cellules musculaires lisses bronchiques ont démontré les interactions possibles entre les cellules musculaires lisses et la matrice qui l'entoure. Il est, toutefois, probable qu'elles ne soient pas fidèles aux comportements que ces cellules peuvent avoir *in vivo*. Il a été démontré que la conformation dimensionnelle du substrat à elle seule est susceptible de moduler le comportement cellulaire, cela sans parler de la complexité et de la composition du substrat matriciel naturel par rapport à un substrat de synthèse. Tout ceci fait que la culture en monocouche ou sur substrat 3D de synthèse pourrait ne pas être le meilleur choix pour l'investigation de l'interaction matrice extracellulaire bronchique - cellules musculaires lisses et pour l'étude de l'effet de la matrice extracellulaire asthmatique sur les cellules musculaires lisses.

Il est maintenant possible de décellulariser des organes entiers ou des portions d'organes et de les recellulariser dans le but de les transplanter chez des receveurs sans avoir à les traiter par des immunosuppresseurs et sans risque d'échec par rejet de la greffe. Cette méthode prometteuse pourrait être appliquée dans le cadre de l'étude des interactions matrice extracellulaire - cellules dans le contexte de l'asthme. Ceci sera fait en décellularisant une portion bronchique et en la recellularisant par une lignée de cellules musculaires lisses bronchiques donnée. Chose qui permettra, par la suite, d'étudier la variation du comportement adoptée par ces cellules suivant la nature de la matrice (saine ou asthmatique). Pour ce faire, des protocoles de décellularisation et de recellularisation adéquats sont requis. De là découlent nos objectifs et l'hypothèse qui leur est reliée.

Objectifs et hypothèse

Objectifs

- Mettre au point un protocole de décellularisation des bronches équines fraîches et congelées afin d'obtenir un tissu acellulaire tout en maintenant une architecture et une composition protéique normale.

- Mettre au point un protocole de recellularisation des bronches décellularisées par des cellules musculaires lisses bronchiques matures.

Hypothèse

Il est possible de décellulariser une bronche respiratoire équine tout en maintenant son architecture et sa composition protéique afin de permettre une recellularisation par des cellules musculaires lisses bronchiques.

Matériel et méthodes

1. Introduction

Nos expériences ont été menées en quatre étapes : tout d'abord, à partir de poumons équins récupérés en nécropsie, nous avons disséqués du muscle lisse bronchique pour isoler les cellules musculaires lisses par digestion enzymatique et nous avons effectué une dissection manuelle des bronches. Tout ce matériel biologique a été congelé. Puis, nous avons procédé à la décellularisation des bronches et vérifié que la congélation préalable n'avait pas d'effets néfastes sur nos échafauds. Ensuite, nous avons mis en place un protocole de recellularisation de ces bronches avec des cellules musculaires lisses bronchiques primaires en veillant à vérifier tous les paramètres de la culture.

2. Plan expérimental et animaux

Afin de réaliser l'ensemble des expériences, les poumons de 11 chevaux ont été utilisés, 7 d'entre eux étaient physiologiquement identifiés (résistance, élastance, variation de la pression intrapulmonaire, neutrophilie respiratoire). Les poumons des 4 chevaux restant provenaient de l'abattoir et aucune information les concernant n'était disponible. Sur les 7 chevaux identifiés, 4 étaient des chevaux asthmatiques sévères et 3 étaient des chevaux non atteints d'affection respiratoire (Tableau V).

Le protocole expérimental a obtenu l'approbation du comité d'éthique de l'utilisation des animaux de l'Université de Montréal numéro Rech-1578.

Les poumons étaient récupérés immédiatement après l'euthanasie ou l'abattage et placés sur glace. Les bronches et le muscle lisse bronchique ont été respectivement prélevés et disséqués dans les 2 heures post-mortem.

Tableau V. Signalement et caractéristiques physiologiques des 7 chevaux identifiés

Chevaux asthmatiques					Chevaux contrôles		
Identification	404	406	396	397	680	682	188
Sexe	Jument	Hongre	Jument	Hongre	Jument	Jument	Jument
Age	16 ans	15 ans	19 ans	11 ans	9 ans	10 ans	9 ans
Delta P_L (cm H₂O)	74,47	35	64,63	30,27	7,36	7,92	5,93
E_L (cm H₂O/L)	12,58	1,5	7,56	2,61	0,78	0,43	0,37
R_L (cm H₂O/L/s)	3,64	1,99	4,10	3,08	0,61	0,44	0,37
Neutrophiles dans LBA	34,75 %	81,5 %	16 %	7,75 %	3,75 %	9,75 %	8,4 %

Delta P_L: variation de la pression intrapulmonaire au cours de la respiration (valeur normale si ≤ 15 cm H₂O); E_L: élastance pulmonaire qui est la variation du volume pulmonaire en fonction de la pression (valeur normale si < 1 cm H₂O/L); R_L: résistance pulmonaire qui est la variation du volume d'air circulant dans les voies respiratoires en fonction de la dilatation des bronches (valeur normale si < 1 cm H₂O/L/s). LBA : lavage broncho-alvéolaire, pourcentage obtenu à partir d'un comptage de neutrophiles sur un volume de 400µl du fluide broncho-alvéolaire (valeur normale si < 25 %).

3. Isolement des cellules musculaires lisses bronchiques

3.1. Prélèvement du muscle lisse bronchique

La première bifurcation bronchique a été prélevée pour une dissection fine de la couche musculaire lisse après l'avoir dénudé de la couche épithéliale. Cette manœuvre doit se faire à 4 °C (sur glace) et le plus rapidement possible (42).

3.2. Digestion enzymatique

Le muscle lisse a été morcelé à l'aide de ciseaux et placé dans une solution de digestion favorisant la survie des cellules musculaires lisses bronchiques par rapport aux autres populations cellulaires. Cette solution est un mélange 3:1 respectivement du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, Cat : 12800-058) et du mélange de nutriments F12 (Gibco, Cat : 21700-026) contenant 1 U/ml d'élastase (Worthington biochem, Cat : LS006365), 0,125 U/ml de collagénase H (Sigma Aldrich, Cat : 11074059001) et 1

mg/ml de Trypsine (Sigma Aldrich, Cat : T6522-1G). La digestion du muscle lisse s'est faite sous agitation à 37 °C et 5 % CO₂. Elle a duré 3 heures et a débuté dans les deux heures qui ont suivi l'euthanasie.

3.3. Culture primaire et conditions de culture

À la fin de la digestion, les cellules ont été quantifiées à l'aide d'un hémacytomètre (Fisher scientific, Cat : 0267110) et ensemencées dans des flasques de culture cellulaire ventilées (Progène) à raison de 300 000 cellules/ml.

Le milieu de culture cellulaire utilisé est un milieu DMEM / F12 additionné de 0,0024 mg/ml d'adénine, de 10 % de sérum bovin fœtal (FBS) non décomplémenté (Wisent, Cat : 080150) ainsi que de 1 % d'antibiotique (Pénicilline-Streptomycine, Wisent, Cat : 450-201-EL) et de 0,1 % d'antifongique (Fungizone, Thermofisher, Cat : 15290-018).

Une incubation de 48 heures a été appliquée avant le premier changement de milieu pour favoriser une adhésion cellulaire primaire optimale. Ensuite, les changements de milieux ont été faits toutes les 48 à 72 heures et les passages à 80 % de confluence à chaque fois.

4. Congélation des cellules musculaires lisses

Les cellules ont été décollées de la flasque de culture moyennant une exposition de 5 minutes à la trypsine 0,025 % (Wisent, Cat : 325-043-EL). Ensuite, du milieu DMEM / F12 a été ajouté à un volume, au moins 6 fois supérieur à celui de la trypsine, pour inhiber l'effet de celle-ci et pour bien homogénéiser les cellules avant de les transférer dans un tube de 50 ml (Progene centrifuge tubes, Cat : 71-5000-B). Les cellules musculaires lisses bronchiques ont, par la suite, été centrifugées 5 minutes à 1 600 révolutions par minute (rpm) et quantifiées au compteur automatique (ADAM, MBI lab equipment) pour être re-suspendues dans du milieu FBS-DMSO 10 % extemporanément préparé. Les cellules musculaires lisses bronchiques ont été congelées dans le milieu FBS-DMSO dont la quantité est calculée selon le nombre de cellules de manière à avoir une concentration minimale de 1,5 millions de cellules par tube cryogénique.

Ceci étant fait, les tubes ont été placés directement à -80 °C dans un conteneur cryogénique (Mr Freeze) qui permet une congélation des cellules à une vitesse de -1 °C par minute. Ceci leur assure une cryoconservation optimale et une bonne viabilité à la décongélation. Après 24 à 48 heures, les cellules congelées sont transférées dans l'azote liquide.

5. Obtention d'une bronche décellularisée

5.1. Prélèvement et conservation des bronches

Les bronches intermédiaires entre la 2^{ème} et la 4^{ème} génération ont été extraites manuellement dans l'heure suivant l'euthanasie. Elles ont été nettoyées à l'aide de compresses stériles pour enlever autant que possible les débris de parenchyme pulmonaire. Par la suite, elles ont été coupées en morceaux de 4 à 10 cm et congelées dans l'azote liquide avant d'être transférées à -80 °C.

5.2. Décellularisation par méthode enzymatique et détergente

La phase de congélation / décongélation des bronches ne détruit pas les protéines matricielles (121). C'est une manœuvre qui peut être considérée comme une étape du processus de décellularisation étant donné qu'elle permet l'élimination d'un certain nombre de matériel cellulaire. Cependant, elle n'est pas suffisante, à elle seule, pour l'obtention d'une matrice extracellulaire acellulaire et exempte de matériel nucléaire (104, 122). Aussi, il a été démontré, dans une étude similaire sur les reins, que les matrices obtenues à partir d'un tissu cryogénisé sont parfaitement recellularisables (123).

Après la décongélation, les bronches ont été soumises à un protocole de décellularisation moyennant les mêmes réactifs et les mêmes étapes décrites précédemment (124) avec quelques modifications. Elles ont subi, deux cycles consécutifs de traitements détergents et enzymatiques suivis d'une stérilisation à l'acide paracétique - éthanol. Toute la décellularisation s'est faite sous agitation modérée et continue afin de s'assurer de l'élimination de tout matériel cellulaire immunogène pouvant gêner la recellularisation (Figure 7).

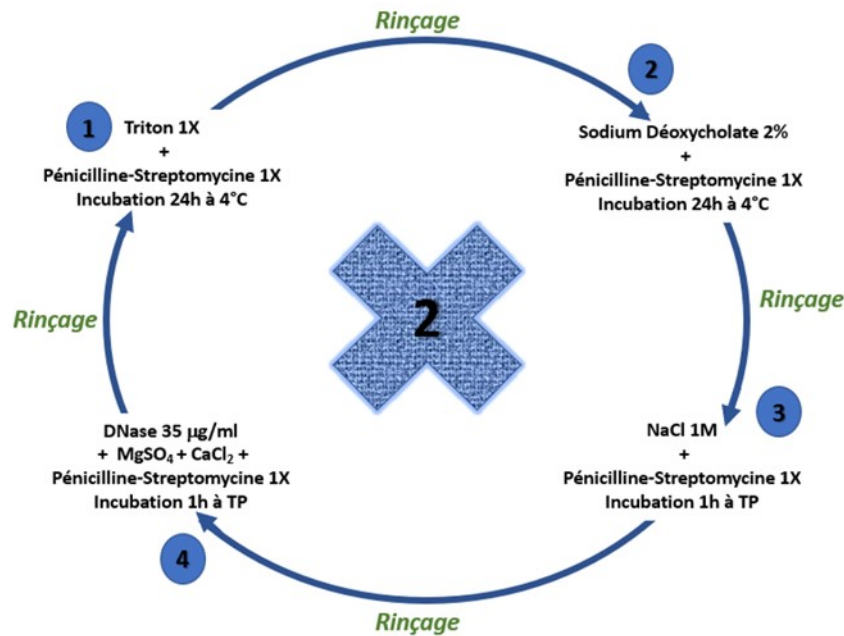


Figure 7. Cycles de décellularisation des bronches respiratoires
 Les bains de triton 1X et de sodium déoxycholate permettent une perméabilisation de la membrane cellulaire pour favoriser la pénétration du chlorure de sodium qui par phénomène osmotique entrainera la condensation du cytoplasme autour du noyau et permettra un accès plus facile à la DNase. L'ADN cellulaire est digéré par la DNase. 1X : 1 facteur X est la concentration d'usage; TP : température pièce

Idéalement, les bronches sont directement utilisées après la décellularisation vue que la conservation influence la structure de l'échafaud (bronche décellularisée) et donc la prolifération et la survie des cellulesensemencées (125, 126). Sinon, elles doivent être placées dans une solution de conservation à base de PBS 1X stérile (Wisent, Cat : 311012-LL) de pénicilline-streptomycine (Wisent, Cat : 450-201-EL), d'amphotéricine B (Sigma Aldrich, Cat : A2942-50ML) et de gentamycine (Wisent, Cat : 450-135-xl). La solution de conservation doit être changée aux 3 semaines (124).

Les critères d'une bonne décellularisation ne sont pas standardisés. Nous nous sommes référés à ce qui était fréquemment utilisés dans les travaux de nos prédécesseurs. À savoir, la vérification de l'élimination du matériel cellulaire et le maintien de l'intégrité histologique et la composition protéique de la bronche, tel que détaillé plus bas.

5.3.Vérification de la décellularisation

5.3.1. Histologie : coloration Movat Pentachrome

L'histologie a été utilisée comme méthode de vérification de première intention de l'efficacité de la décellularisation. Des échantillons de bronches natives (n=3) et décellularisées (n=11) ont été placés dans du Formol 10 % pendant 24 heures avant leur enrobage en paraffine. Ensuite, les tissus ont été coupés au microtome à une épaisseur de 4 µm, montés sur des lames adhésives (Superfrost Ultra plus, Thermofisher, Cat : 12-550-15) et laissés sécher 24 heures à 37 °C et 24 heures à température ambiante pour une meilleure fixation.

Une fois les lames prêtes, une étape de déparaffinage a précédé la phase de coloration histologique Movat Pentachrome comme décrite précédemment avec quelques modifications (127). Cette coloration particulière et laborieuse permet une mise en évidence de la majorité des structures tissulaires ainsi qu'une bonne contre-coloration des noyaux cellulaires. En bref, le bleu alcian (Sigma Aldrich, Cat : A5268) qui est précipité par l'alcool alcalin en « monostral blue » permet de colorer la mucine et les glycosaminoglycanes sulfatés en bleu. S'en suit une coloration des structures acidophiles par une solution d'hématoxyline (mélange d'hématoxyline alcoolique, de chlorure ferrique, d'alcool, d'iode et de chlorure iodure). Celle-ci est contre-colorée par le chlorure ferrique à 2 % (Anachemia, Cat : 40814-300) en noir au niveau des fibres élastiques et par la solution de crocéine-acide fuchshine en violet au niveau des cellules. Finalement, l'alcool safran (Chaptec, Lot : 224) permet une coloration jaune du collagène.

Les lames ainsi colorées ont été montées au Micromount (Leica, Cat : 3801731). Leur évaluation a été faite au microscope optique aux grossissements 100 et 200 à l'aide du logiciel Panoptiq qui est relié à une caméra Prosilica GT (modèle : GT1920C) montée sur un microscope Leica DM4000 B.

5.3.2. Dosage de l'ADN des bronches natives et décellularisées

5.3.2.1. Extraction de l'ADN bronchique

Sachant qu'aucune méthode de décellularisation n'est, à ce jour, capable d'offrir une élimination totale du matériel cellulaire (99), les traces d'ADN sont considérées négligeables dans les tissus décellularisés si la longueur des fragments rémanents ne dépasse pas les 200 paires de bases (99, 122). L'efficacité du procédé de décellularisation peut donc être vérifié en comparant le nombre de paires de bases d'ADN rémanentes dans des extractions d'ADN bronchiques natives et décellularisées.

Cent milligrammes par échantillon de bronches natives et décellularisées ont été récupérées dans 1 ml de Trizol (Invitrogen, Cat : 15596018) et maintenus sur glace pendant toute la durée de la manipulation. Ces tissus ont, ensuite, été broyés dans le Trizol à l'aide d'un broyeur automatique (Tissue ruptor). Deux cents millilitres de chloroforme par tube ont été alors ajoutés au Trizol et incubés 5 minutes sur glace avant d'être centrifugés à 12 000 g pendant 15 minutes à 4 °C pour éliminer l'ARN. Ceci étant fait, 300 µl d'éthanol absolu ont été ajoutés à chaque tube et incubés 5 minutes sur glace avant une centrifugation de 5 minutes à 2 000 g et à 4 °C pour faire précipiter l'ADN. S'en est suivit, 2 lavages de l'ADN par 1 ml d'une solution de 0,1 M de citrate de sodium dans 10 % d'éthanol et un lavage par 1,5 ml d'éthanol 75 % achever par une centrifugation de 5 minutes à 2 000 g. Le culot restant contient l'ADN purifié qui a été re-suspendu dans 300 µl de tampon TE pour être utilisé dans le dosage des concentrations d'acide nucléique et l'électrophorèse sur gel d'agarose.

5.3.2.2. Quantification fluorométrique de l'ADN

La quantification de l'ADN bronchique double brin avant et après décellularisation (n=7) a été faite moyennant un kit de dosage (Qubit ds DNA BR Assay kit, Invitrogen, Cat : Q32850) en suivant les recommandations du manufacturier. La lecture des résultats s'est faite par un fluor-mètre Qubit 3.0 de life technologies (Fisher scientific, Cat : Q33216).

5.3.2.3. Électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose

L'électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose a été effectuée selon un protocole usuel. Différents échantillons d'ADN de bronches natives (n=4) et de bronches décellularisées (n=11) extraits de 11 chevaux différents ont été utilisés.

En bref, le gel a été fabriqué à travers la dissolution de poudre d'Agar dans une solution tampon commerciale à base de Tris, d'acétate et d'EDTA (Tampon TAE) bouillante à une concentration de 1,5 % (poids/volume). Une fois le mélange refroidi, un marqueur d'ADN à base de bromure d'éthidium (SYBR-Safe, Thermofisher, Cat : S33102) y a été ajouté avant de le transférer dans un support à gel et de le laisser polymériser. Une fois durci, le gel a été placé dans une cuve à électrophorèse pleine de tampon TAE. Dans le premier puits, l'échelle d'ADN (TRACK IT, Invitrogen, Cat : 10488-085) a été placée et ensuite, les échantillons d'ADN ont été, un à un, mélangés à un tampon de chargement (Thermofisher, Cat : R0611) et mis chacun dans un puits différent. La cuve a été, alors, branchée à une source de courant continu de 100 volts pendant environ 2 heures. La lecture du gel a été faite par trans-luminescence ultraviolette (Fusion FX, MBI Lab Equipment).

Cette électrophorèse permet de séparer les fragments d'acides nucléiques chargés négativement dans une matrice en gel d'agarose afin d'en déterminer la taille. Les ADN de petite taille migrent plus loin que les plus grands. Malgré sa simplicité, c'est une technique très sensible sachant que les quantités d'ADN détectées peuvent être aussi basses que 5 ng alors que la taille des fragments possibles à séparer varie de 0,2 à 50 kilos base.

5.4.Vérification de l'intégrité structurale de la bronche décellularisée

5.4.1. Histologie : coloration Movat Pentachrome

L'histologie a, également, été utilisée comme méthode de vérification qualitative de première intention de la conservation de l'intégrité structurale de la bronche décellularisée. Des échantillons de bronches natives (n=3) et décellularisées (n=9) ont été prélevées, colorées au Movat Pentachrome et montées entre lame et lamelle comme décrit dans les pages précédentes.

Les tissus ont été observés au microscope optique aux grossissements 100 et 200 à l'aide du logiciel Panoptiq qui est relié à une caméra Prosilica GT (modèle : GT1920C) montée sur un microscope Leica DM4000 B. Par comparaison aux tissus natifs, une évaluation visuelle du maintien de l'intégrité de la matrice extracellulaire a été faite sur les tissus décellularisés. Cette évaluation étant subjective, il est important de la confirmer d'une manière plus objective moyennant la quantification des protéines totales bronchiques par fluorométrie et le marquage spécifique de certaines protéines matricielles par immunohistochimie et par la coloration histologique Bleu Alcian.

5.4.2. Dosage des protéines totales par fluorométrie

À partir de 7 chevaux différents, des échantillons de bronches avant et après leur décellularisation (n=7) ont été récupérés et broyés dans une solution de T-PER (Thermofisher, Cat : 78510) additionnée d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Invitrogen, Cat : 78430). Ensuite, une centrifugation à 10 000 g pendant 5 minutes a été faite et le surnageant contenant les protéines a été récupéré. Toute l'extraction s'est déroulée à 4 °C.

Pour le dosage de ces extraits protéiques, le kit "Qubit Protein Assay Kit" (Thermofisher, Cat : Q33211) a été utilisé en suivant les instructions du fabricant. La lecture a été faite par le fluor-mètre Qubit 3.0 de life technologies (Fisher scientific, Cat : Q33216). La quantification des protéines totales des bronches natives et décellularisées a permis la comparaison des concentrations obtenues dans les 2 groupes et l'évaluation de la capacité du protocole de décellularisation à conserver ces protéines.

5.4.3. Immunohistochimie sur bronches natives et décellularisées

Le collagène I, le collagène IV et la fibronectine sont des protéines proéminentes de la matrice extracellulaire. Leurs dépôts varient dans l'asthme causant les phénomènes de fibrose observés et pouvant être à l'origine des changements comportementaux des cellules avoisinantes (36, 63, 68). Un marquage immunohistochimique a été fait pour ces protéines.

Des bronches natives (n=7) et après décellularisation (n=7) ont été préparées suivant la même procédure utilisée dans la coloration histologique Movat Pentachrome. Après une phase de déparaffinage et de réhydratation, les tissus ont subi une étape de démasquage enzymatique

de 30 minutes à 37 °C (tableau VI) suivi d'un blocage des sites de fixation non spécifiques par la peroxydase endogène et un sérum normal à 10 %. Par la suite, les anticorps primaires ont été appliqués : le collagène IV (IgG de souris anti-humain, Dako, Cat : MD785) dilution 1 :50, le collagène I (IgG de lapin anti-bovin, Cederlane, Cat : CL50121AP) dilution 1 :500 et la fibronectine (anticorps polyclonal de lapin non conjugué, Biorbyt, Cat : orb221410) dilution 1 :150. Le lendemain, les anticorps secondaires biotynilés ont été appliqués aux mêmes concentrations que les anticorps primaires pendant 45 minutes : Une IgG de chèvre anti-lapin (CS, Cat : 7074) pour la fibronectine et le collagène I et une IgG d'âne anti-souris (Jackson immunoresearch, Cat : 711-065-152) pour le collagène IV. À la fin de cette incubation, un complexe d'avidine biotine couplé à la peroxydase (Vectastain ABC kit, Biolynx, Cat : VECTPK6100) a été appliqué pendant 45 minutes suivi d'une révélation à l'aide d'un kit de révélation de la peroxydase (DAB, Vector laboratories, Cat : SK-4100) et d'une contre-coloration à l'hématoxyline de Harry (Fisher Health care, Cat : 245-677). Chaque anticorps marqué, était accompagné d'un contrôle isotopique (une IgG2a de souris pour le collagène IV et une IgG de lapin pour la fibronectine et le collagène I) pour confirmer les résultats positifs.

Tableau VI. Enzymes utilisées pour le démasquage des sites de fixation antigénique

Protéines	Démasquage
Collagène IV	Pepsine (Sigma Aldrich, Cat : R2283-15ML)
Collagène I	Trypsine (Gibco, Cat : 15090-046)
Fibronectine	

Sur les lames colorées, en prenant les contrôles négatifs comme repère, un score semi-quantitatif a été établi pour le marquage de la membrane basale, du muscle lisse, des vaisseaux sanguins et de la lamina propria comme suit :

- Grade 0 : aucun marquage
- Grade 1 : présence de marquage

À partir de ce score, une moyenne est établie pour comparer la différence du marquage entre les bronches natives et décellularisées.

5.4.4. Coloration des glycosaminoglycanes au Bleu Alcian

À pH très acide, le bleu alcian peut se fixer aux groupements acides des mucopolysaccharides et colorer spécifiquement les glycosaminoglycanes. Pour contre-colorer les noyaux cellulaires, le bleu alcian est couplé avec le Fast Red qui colore les noyaux en rouge et permet d'augmenter le contraste.

Quatre bronches natives, 7 décellularisées et 14 recellularisées (2 bronches pour chaque temps de recellularisation : 48h, J7, J14, J21, J31, J41 et J46) ont été colorées au bleu alcian et contre-colorées au Fast Red. Après une étape de déparaffinage et de réhydratation, les coupes ont été chauffées 30 secondes à 700 Watt dans la solution de bleu alcian puis lavées à l'eau courante pendant 5 minutes. Ensuite, elles ont été immergées dans une solution de Fast Red pendant 2 minutes avant d'être rincées. Après 3 passages dans des bains d'alcool, elles ont été immergées dans le xylène et montées au Micromount. L'observation et l'évaluation des lames a été faite sur les grossissements 100 et 200 à l'aide du logiciel Panoptiq, tel que décrit précédemment.

6. Obtention d'une bronche recellularisée

6.1. Préparation des cellules musculaires lisses

6.1.1. Décongélation des cellules musculaires lisses

Sous la hotte biologique, tout le matériel nécessaire à la décongélation des cellules musculaires lisses bronchiques a été préparé, incluant une flasque de culture T75 (Progène, Cat : 229341) contenant 12 ml de milieu DMEM / F12 non décomplémenté chauffé à 37 °C destiné à l'ensemencement. Les cellules musculaires lisses bronchiques ont été récupérées de l'azote liquide et décongelées rapidement dans un bain-marie à 37 °C. Immédiatement après, sous la hotte biologique, les cellules ont été re-suspendues dans 500 µl de milieu DMEM / F12, transférées dans la flasque T75 et incubées à 37 °C et 5 % de CO₂. Vingt-quatre heures plus tard, le milieu de culture a été changé. À la confluence de ces cellules (au bout de 7 à 10 jours), il nous a été possible de les utiliser dans les manipulations.

6.1.2. Culture et caractérisation des cellules musculaires lisses

Les cellules musculaires lisses bronchiques décongelées ont été maintenues en culture dans du milieu DMEM / F12 non décomplémenté jusqu'au 7^{ème} passage. Une fraction d'environ 1 à 3 millions des cellules utilisées pour la recellularisation a été récupérée pour une caractérisation par cytométrie de flux. Nous évaluons leur taux d'expression en α -SMA (IgG2a de souris, Sigma Aldrich, 5,9mg/ml, Cat : A2547), en SMMHC (MYHII, Biomedial technologies, IgG de lapin, 0,5mg/ml, Cat : BT-562) et en desmine (IgG polyclonal de lapin, Abcam, 0,2mg/ml, Cat : ab15200) comme décrit précédemment (42).

Les myocytes caractérisés par la méthode de cytométrie de flux ont montré une expression simultanée d' α -SMA pour 90 % +/- 8,6 des cellules, de myosine pour 71 % +/- 16 des cellules et de desmine pour 85 % +/- 9,2 des cellules. Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment obtenus et témoignent de la pureté des cellules musculaires lisses utilisées dans les recellularisations (42).

6.1.3. Récupération des cellules musculaires lisses pour un ensemencement sur la bronche décellularisée

Les cellules musculaires lisses bronchiques équines (n=3) ont été utilisées entre le 3^{ème} et le 7^{ème} passage cellulaire alors qu'elles étaient à 80 % de confluence. Le surnageant de culture cellulaire a été aspiré et les cellules ont été lavées dans 5 ml de PBS 1X (Wisent, Cat :311-012-LL) avant d'être décollées du fond de la flasque par une incubation de 5 minutes à 37 °C dans de la trypsine-EDTA 0,25 % (Wisent, Cat : 325-043-EL) préchauffée à 37 °C. Ensuite, les cellules ont été re-suspendues dans du milieu DMEM / F12 non décomplémenté et transférées vers un tube de 50 ml stérile en attendant l'ensemencement.

6.2. Préparation de la bronche décellularisée

Directement après la décellularisation, les bronches (n=4) ont été stérilisées pendant 1 heure à température ambiante et rincées dans plusieurs bains de PBS 1X stérile. Par la suite, sous la hotte biologique, chaque bronche a été scindée en 2 et fixée sur un support stérile à l'aide d'aiguilles stériles pour enlever grossièrement la couche épithéliale. Ceci étant fait, la

bronche décellularisée a été découpée en petits morceaux d'un maximum de 1/1cm et rincée puis réservée dans du PBS 1X stérile.

6.3. Recellularisation

6.3.1. Ensemencement

Les morceaux de la bronche décellularisée ont été placés dans une plaque 24 puits (Costar, Cat : 3526) et recellularisés avec les cellules musculaires lisses bronchiques à une concentration de 158 000 cellules/cm². Après une incubation de 48 heures permettant l'adhésion primaire, 1 ml du milieu a été changé dans chaque puits de recellularisation.

6.3.2. Conditions de culture

Pendant toute la durée de la recellularisation, les changements de milieu ont été fait toutes les 48 heures. Un millilitre et demi de nouveau milieu a été rajouté à chaque fois en évitant de dénuder entièrement les tissus. Ceux-ci ont été maintenus en culture, dans le même puits, entre 2 et 46 jours ou transférés entre 31 et 36 jours vers une plaque 6 puits (celltreat, Cat : 229106) pour 10 jours de plus. Ce transfert permet d'isoler la population cellulaire colonisatrice de l'échafaud de celle qui s'est développée au fond du puits de culture afin de favoriser les interactions entre la matrice extracellulaire et les cellules qui s'y sont greffées. Des prélèvements ont été faits à 48 heures, 7 jours, 14 jours, 21 jours, 31 jours sans transfert de tissus puis à 41 jours et 46 jours avec et sans transfert de tissu.

6.4. Vérification de la recellularisation

6.4.1. Histologie : Coloration Movat Pentachrome

Les tissus ont été placés dans du formol 10 % pendant 24 heures puis enrobés dans de la paraffine et coupés au microtome à 4 µm avant d'être colorés au Movat Pentachrome. La vérification de la recellularisation a été principalement qualitative. Elle s'est basée sur un examen visuel des coupes de tissus recellularisés observées au microscope optique aux grossissements 100 et 200 moyennant le logiciel Panoptiq.

6.5. Statistiques

Les résultats de la quantification de l'ADN et des protéines totales ont été analysés par un test de student apparié bilatéral avec un seuil de signification p de 0,05.

Les résultats de l'immunohistochimie des protéines matricielles ont été analysés par un test khi-carré exact.

Résultats

1. Efficacité de la décellularisation

1.1. Évaluation histologique : coloration Movat Pentachrome

L'examen visuel au microscope optique aux grossissements 100 et 200 a confirmé l'absence de structures cellulaires dans les tissus décellularisés (Figure 8). Cependant, il est admis que certains résidus cellulaires visibles en microscopie électronique peuvent persister ainsi qu'une certaine concentration d'ADN qui ne présente pas de risque si elle est faible et inférieure à 200 paires de bases (99, 128).

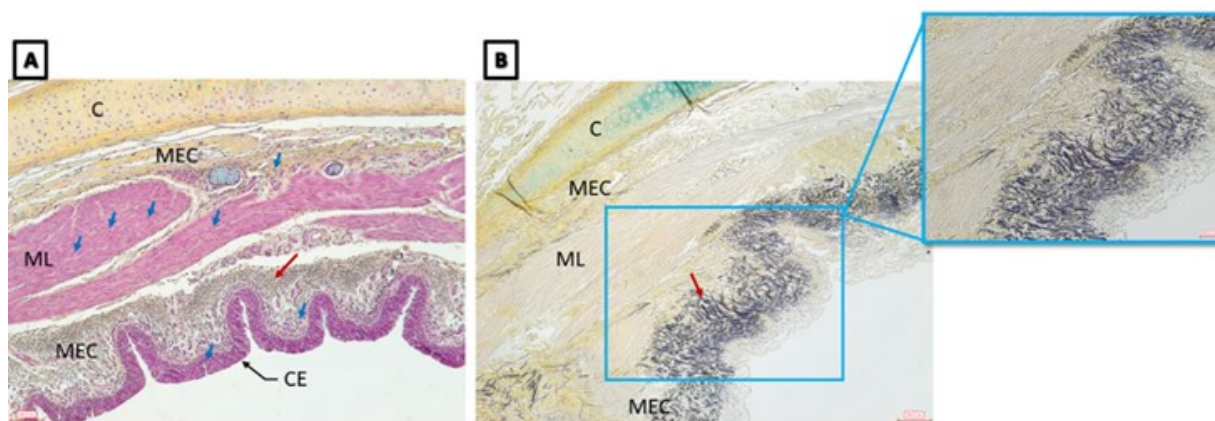


Figure 8. Coloration Movat Pentachrome de bronches native et décellularisée (A) bronche native au grossissement 100; (B) bronche décellularisée au grossissement 100; grossissement 200 pour le cadre bleu. Du haut vers le bas, sur chaque image, se trouve le cartilage bronchique (C) suivi du muscle lisse bronchique (ML) entouré de part et d'autre par la matrice extracellulaire (MEC). Au niveau de la lamina propria, celle-ci est suivie de la couche épithéliale (CE). Les flèches rouge sur (A) et (B) désignent les fibres élastiques colorées en noir et les flèches bleues sur (A) désignent les cellules colorées en violet dont on remarque l'omniprésence sur (A) et l'absence totale sur (B) aux grossissements 100 et 200.

1.2. Quantification fluorométrique de l'ADN

L'ADN double brin des mêmes bronches (n=7) a été quantifié par fluorométrie avant et après la décellularisation (Figure 9). La concentration moyenne en ADN dans les bronches natives était de 5,36 ng/ μ l +/- 4,15 SD alors que la concentration des bronches décellularisées

était en dessous du seuil de lecture du fluor-mètre qui est de 0,01 ng/μl. Les résultats non rapportés de l'analyse spectrophotométrique (spectrophotomètre NanoDrop ND-1000) de ces mêmes échantillons ont montré une concentration moyenne de 32,28 ng/μl +/- 31,46 SD pour 100 mg de poids du tissu dans les bronches décellularisées. Les concentrations trouvées aux niveaux fluorométrique et spectrométrique sont en dessous du seuil de 50 ng d'ADN double brin/mg de tissu décellularisé énoncé par Crapo et collaborateurs (122).

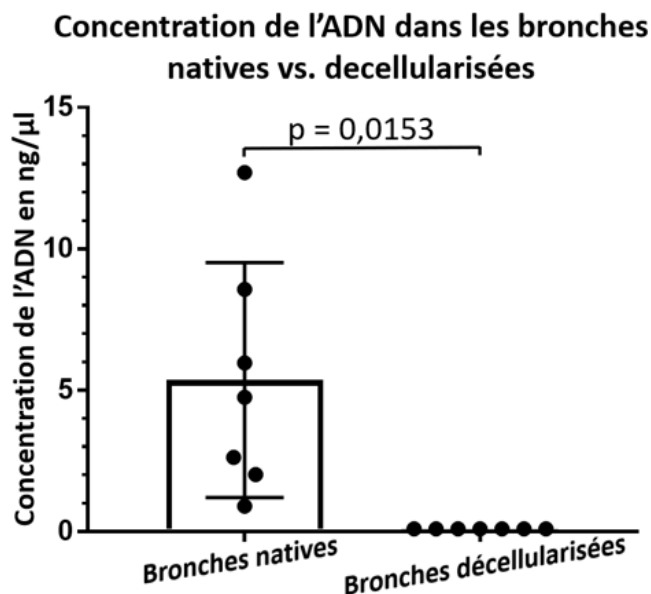


Figure 9. Concentration de l'ADN en ng/μl dans les bronches natives et décellularisées. Une différence significative des concentrations est relevée entre les concentrations d'ADN des bronches natives et les concentrations d'ADN des bronches décellularisées ($p = 0,0153$). Déviation standard des différences (SD) = 4,15; erreur standard de la moyenne (SEM) = 1,56.

1.3. Électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose

L'électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose a été effectuée sur différents échantillons d'ADN de bronches natives ($n=4$) et de bronches décellularisées ($n=11$) extraits de 11 chevaux différents. Ce test a révélé que l'ADN double brin rémanent dans les tissus décellularisés était d'une longueur inférieure à 100 paires de bases (Figure 10). Selon Crapo et *al.*, un brin d'ADN de moins de 200 paires de bases est sans effet immunogène dans un tissu décellularisé (122).

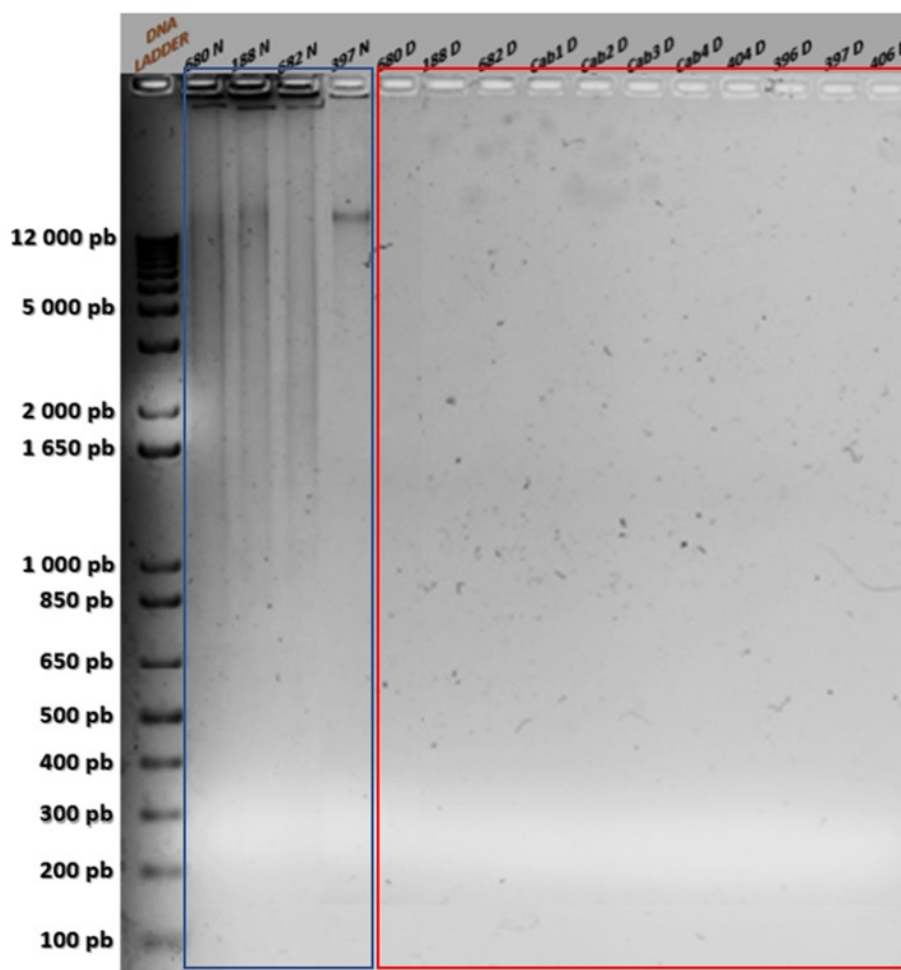


Figure 10. Électrophorèse d'ADN de bronches natives et décellularisées
 L'ADN des bronches natives (cadre bleu) sont d'une longueur supérieure ou égale à 12 000 paires de base alors que tous les ADN extraits de bronches décellularisées (cadre rouge) comptent moins de 100 paires de base.

2. Maintien de l'intégrité et de la composition protéique de la bronche décellularisée

Une évaluation histologique de la bronche décellularisée a été faite, suivit d'un dosage des protéines totales et d'un marquage par immunohistochimie du collagène I, du collagène IV et de la fibronectine. Les glycosaminoglycanes ont été colorées au Bleu Alcian. Ces protéines sont importantes pour une bonne recellularisation et dans le remodelage bronchique asthmatique autant chez l'humain que chez le cheval.

2.1. Évaluation histologique : coloration Movat Pentachrome

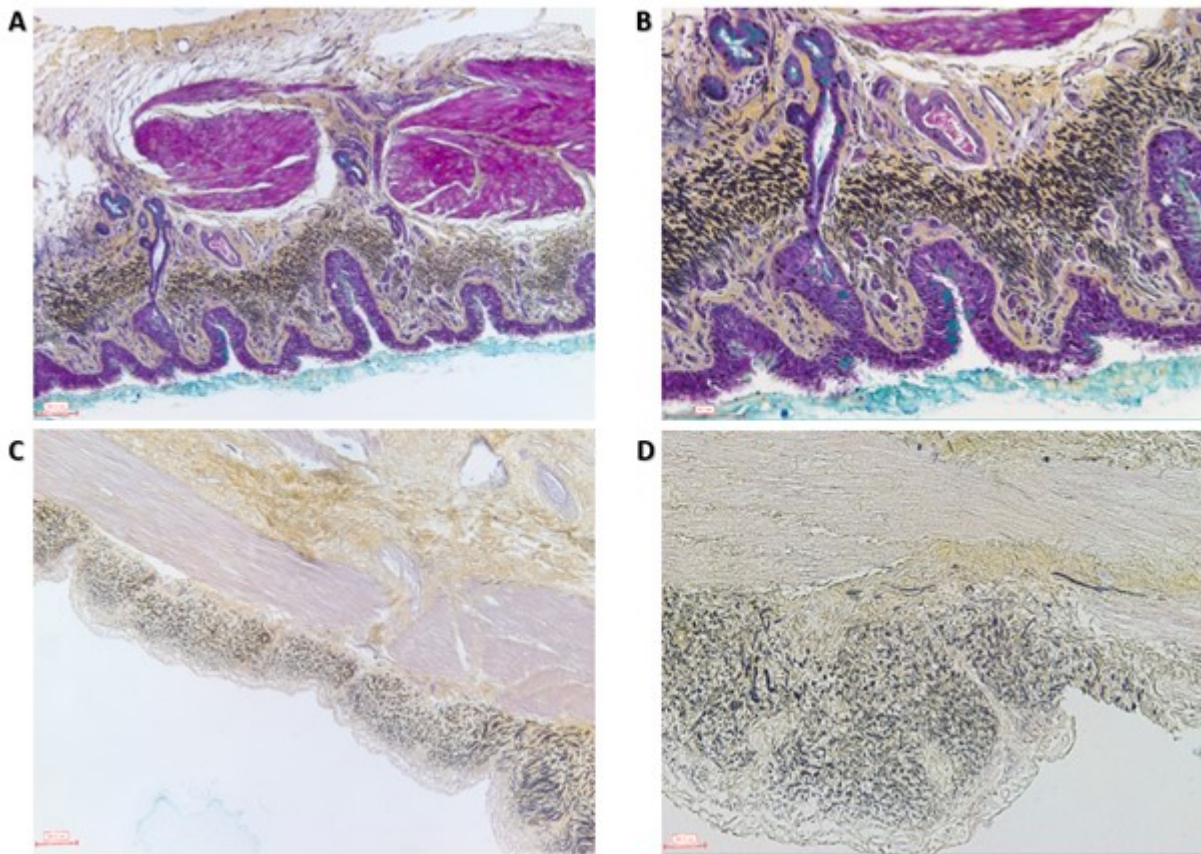


Figure 11. Comparaison qualitative de bronches natives et décellularisées (A) bronche native au grossissement 100; (B) bronche native au grossissement 200; (C) bronche décellularisée au grossissement 100; (D) bronche décellularisée au grossissement 200. Maintien de l'organisation globale du tissu entre natif et décellularisé et maintien des collagènes colorés en jaune et des fibres élastiques colorées en noir.

L'examen visuel au microscope optique aux grossissements 100 et 200 a montré une résistance globale de l'architecture bronchique au processus de décellularisation (Figure 11) avec un maintien de l'organisation du tissu qui a préservé, entre autres, sa composition qualitative en collagène coloré en jaune par le Movat Pentachrome et en fibres élastiques noires. Cette observation est en accord avec celle de Wagner et collaborateurs en 2014 et de Tsuchiya et collaborateurs en 2013 (124, 128) sur des poumons humains et porcins.

2.2. Dosage des protéines totales par fluorométrie

Bien que la différence des concentrations entre les protéines totales dans les bronches natives et décellularisées soit significative ($p= 0,0119$), la baisse de ces concentrations est restée modeste, environ de l'ordre de 100 mg/ml. En effet, la moyenne des protéines totales dans les bronches natives était de 1426 mg/ml +/- 23 SD alors que dans les bronches décellularisées, elle était de 1336 mg/ml +/- 62 SD (Figure 12).

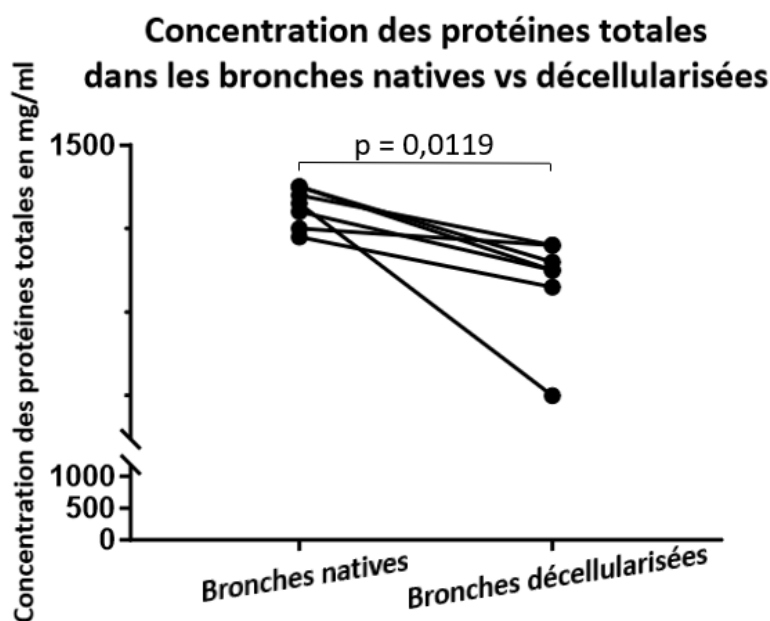


Figure 12. Concentration en mg/ml des protéines totales dans les bronches natives et décellularisées

Les concentrations des protéines totales dans les bronches décellularisées sont significativement plus faibles avec un $p = 0,0119$. Déviation standard des différences (SD) = 66,83; erreur standard de la moyenne (SEM) = 25,26.

La diminution des concentrations en protéines totales dans les bronches décellularisées était attendue étant donné que différentes protéines intracellulaires et cytosquelettiques ont été entièrement éliminées.

2.3. Immunohistochimie sur bronches natives et décellularisées

Un marquage immunohistochimique a été réalisé pour 3 protéines de la matrice extracellulaire bronchique indispensables pour la réussite d'une recellularisation et en partie

responsables du remodelage pro-fibrotique asthmatique et de l'hypertrophie du muscle lisse observés dans l'asthme. À savoir, les protéines nécessaires à l'infiltration cellulaire de la matrice extracellulaire dont le collagène I et le collagène IV et les protéines d'adhésion dont la fibronectine (63, 68, 104, 129).

Des coupes de bronches natives (n=8) et après décellularisation (n=7) ont été marquées pour chaque protéine et un score de 0 ou de 1 a été attribué selon la présence ou l'absence de celle-ci dans les différentes parties (membrane basale, vaisseaux sanguins, muscle lisse, lamina propria) des tissus (Figure 13). À partir de ce score, un test de khi-carré exact a été fait pour comparer la prévalence du marquage positif par rapport au statut des bronches (natives ou décellularisées).

L'évaluation qualitative et semi-quantitative du collagène I, du collagène IV et de la fibronectine montrent que les collagènes I et IV sont peu ou pas affectés par le processus de la décellularisation. La fibronectine, même partiellement éliminée, est toujours détectable en quantités abondantes dans la matrice extracellulaire. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans des études précédentes (105, 126, 130).

La prévalence de marquage du collagène I n'a subi aucune variation entre les bronches natives et décellularisées bien que d'un point de vue subjectif, la matrice du muscle lisse semblait plus envahie par la protéine au niveau des bronches décellularisées. En effet, Le collagène I semblait combler les espaces laissés par les cellules musculaires lisses bronchiques éliminées lors de la décellularisation. Le collagène IV, également, ne semblait pas être affecté par la décellularisation. En effet, aucune variation dans la prévalence de son marquage n'a été observée entre les bronches natives et décellularisées au niveau des vaisseaux sanguins, de la matrice du muscle lisse et de la lamina propria.

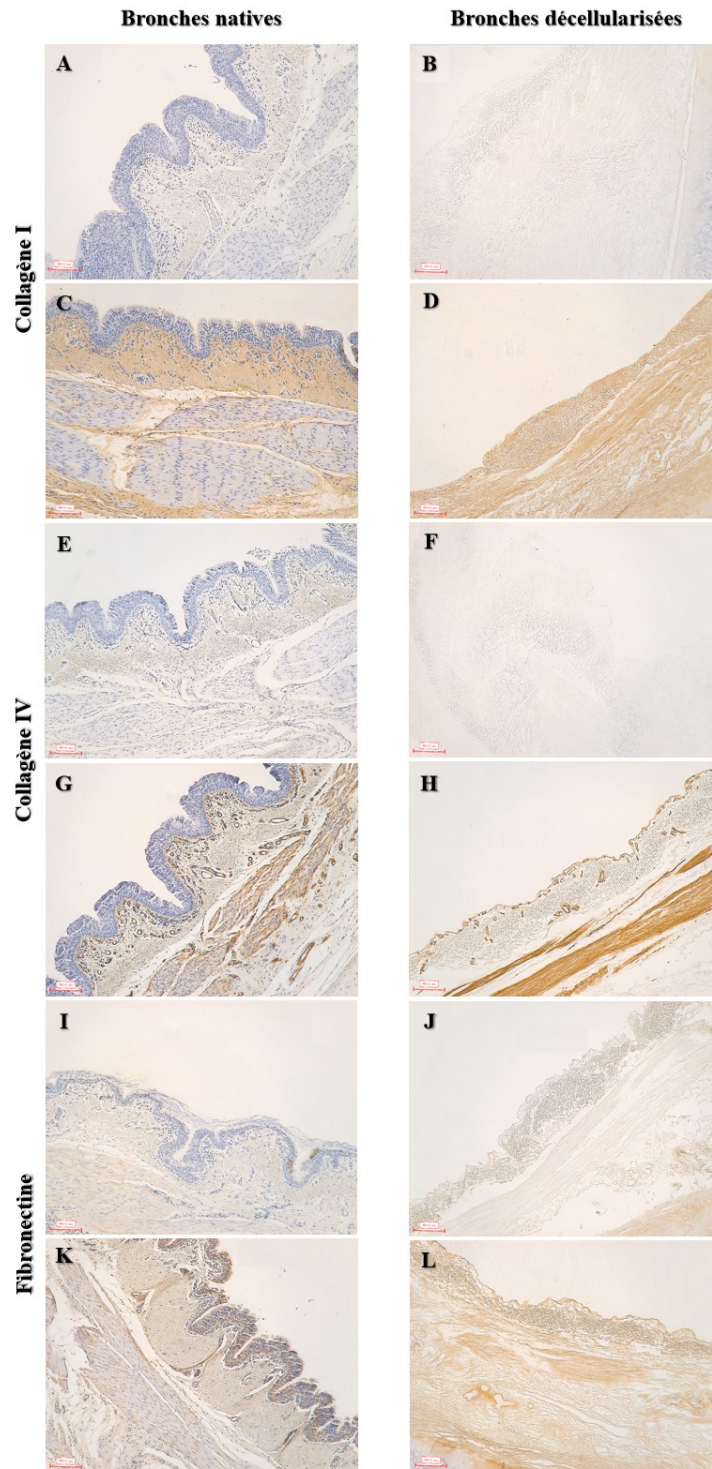


Figure 13. Coloration immunohistochimique des bronches natives et décellularisées
Grossissement 100. (A, B, C, D) collagène I; (E, F, G, H) collagène IV; (I, J, K, L)
fibronectine. Évaluation des marquages positifs (C, D, G, H, K, L) en comparaison aux
contrôles isotypiques (A, B, E, F, I, J).

2.4. Coloration histologique Bleu Alcian

La coloration histologique Bleu Alcian permet de colorer spécifiquement les glycosaminoglycanes au niveau d'un tissu. L'évaluation qualitative faite sur des coupes de bronches natives et décellularisées a montré une élimination importante mais incomplète de ces protéines au niveau des bronches décellularisées. Elle était plus importante au niveau de la lamina propria et de la membrane basale qu'au niveau de la matrice du muscle lisse bronchique (Figure 14). En effet, une perte importante des glycosaminoglycanes est observée suite à l'exposition du tissu à l'agent tensio-actif Triton lors du processus de décellularisation (104).

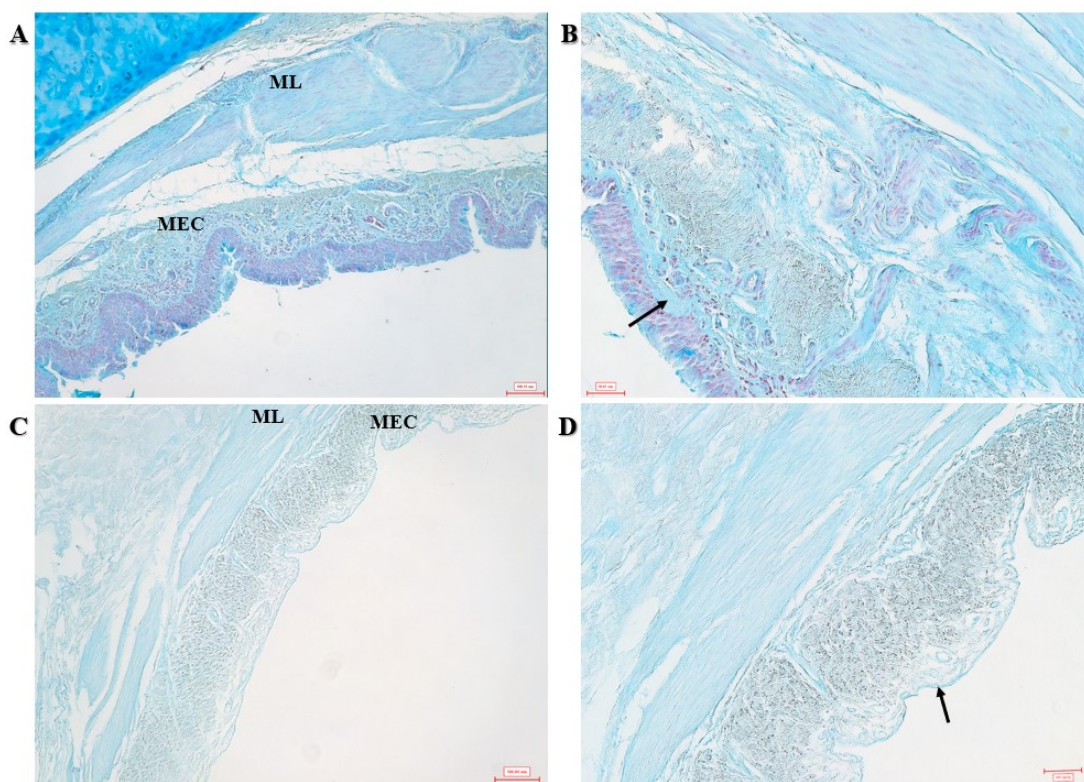


Figure 14. Glycosaminoglycanes des bronches natives et décellularisées
Coloration histologique Bleu Alcian. (A) bronche native au grossissement 100; (B) bronche native au grossissement 200; (C) bronche décellularisée au grossissement 100; (D) bronche décellularisée au grossissement 200. Une grande perte en glycosaminoglycanes est observée au niveau de la matrice extracellulaire de la lamina propria (MEC) et de la membrane basale des bronches décellularisées. La membrane basale indiquée par des flèches noires sur (B) et (D) est fortement réduite en épaisseur sur (D). La perte semble moins importante au niveau du muscle lisse (ML).

3. Évaluation qualitative de la recellularisation

Cinq bronches équines différentes ont été recellularisées par trois lignées de cellules musculaires lisses bronchiques à des passages différents. Les recellularisations entre 48 heures et 7 jours ont été très modestes voire absentes dans toutes les combinaisons cellules - tissu testées (n=19). Cependant, entre 14 et 21 jours, les cellules musculaires lisses bronchiques semblaient proliférer dans le tissu dans 17 répliques sur 19 fait durant 7 tests de recellularisations différents.

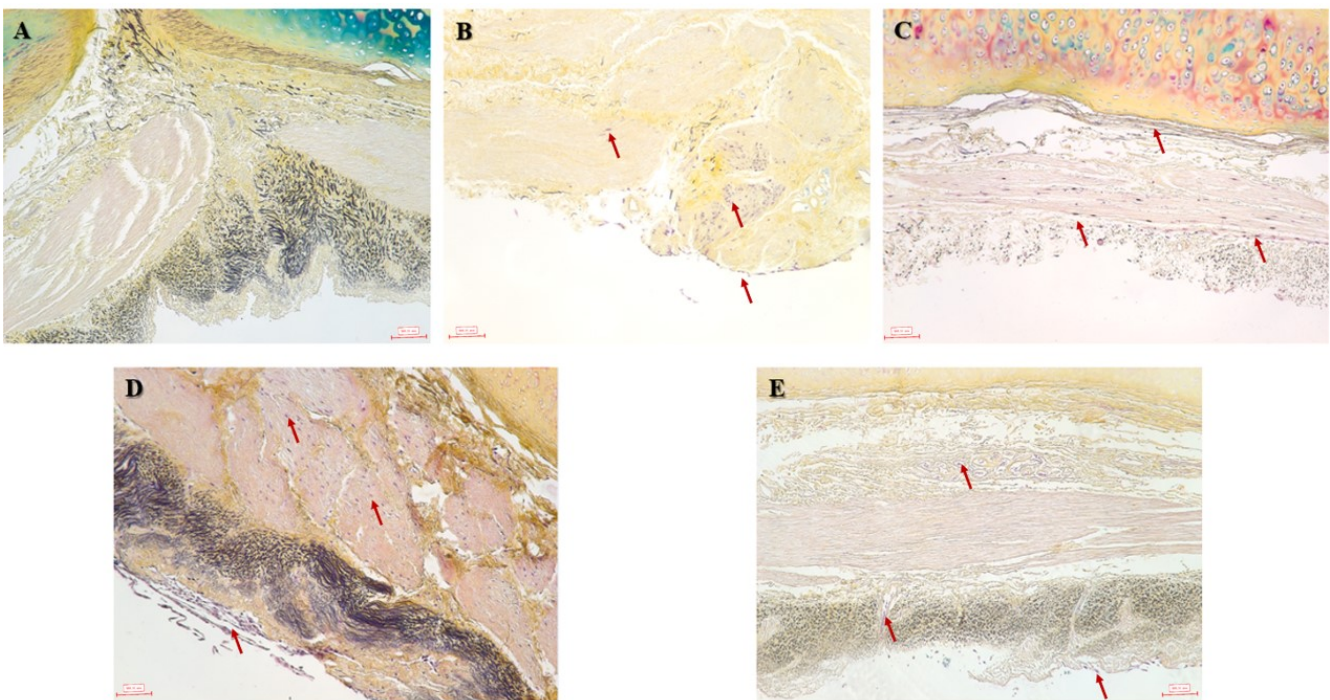


Figure 15. Évolution de la recellularisation entre J0 et J46

Coloration Movat Pentachrome au grossissement 100. Les cellules musculaires lisses sont indiquées par des flèches rouges. (A) bronche décellularisée, J0; (B) bronche recellularisée à J14 avec des cellules musculaires lisses en surface et dans la matrice extracellulaire du muscle lisse; (C) bronche recellularisée à J21 avec des cellules musculaires lisses plus organisées au niveau de la matrice extracellulaire du muscle lisse et accolées au cartilage bronchique; (D) bronche recellularisée à J31 avec des cellules musculaires lisses confluentes au niveau de la matrice extracellulaire du muscle lisse et quelques cellules à la surface de la membrane basale; (E) bronche recellularisée à J46 quelques cellules musculaires lisses à la surface de la membrane basale et au niveau des vaisseaux sanguins mais ces cellules sont quasi-absentes au niveau de la matrice extracellulaire du muscle lisse.

À 31 jours, des zones de confluences sont observés dans tous les tissus recellularisés (n=20). Sur 4 tests de recellularisation différents, cette confluence était maximale à 41 jours. En prolongeant les recellularisations à 46 jours sur deux tests différents comportant un total de 10 répliquas biologiques, nous avons noté la perte de cette confluence où sur certaines coupes, les myocytes avaient disparu du tissu (Figure 15).

Les cellules musculaires lisses qui ont recolonisé les bronches décellularisées étaient d'abord (14 jours), localisées à la surface de la membrane basale ou de la matrice extracellulaire du muscle lisse et au niveau de la lamina propria. Ensuite, à 21 jours, elles étaient plus nombreuses au niveau de la matrice extracellulaire du muscle lisse bronchique et semblaient le coloniser. Ceci a été confirmé entre 31 et 41 jours, avec des cellules confluentes au niveau de la matrice extracellulaire du muscle lisse et adjacentes au cartilage bronchique. Cependant, certaines cellules restaient localisées au niveau de la membrane basale.

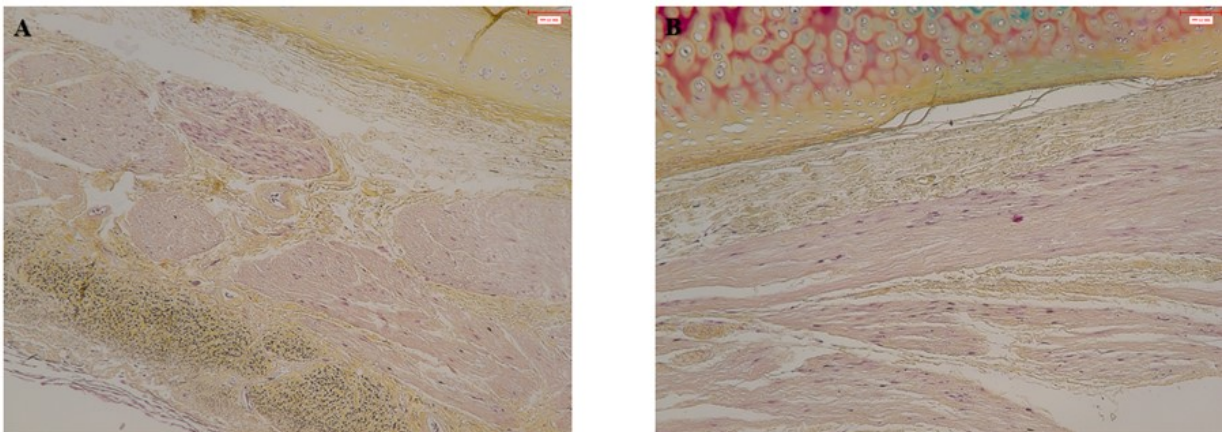


Figure 16. Comparaison de la recellularisation à J41 avec et sans transfert de tissu. Coloration histologique Movat Pentachrome de bronches recellularisées (A) avec transfert de tissu et (B) sans transfert de tissu au grossissement 100. Les cellules au niveau du tissu transféré sont plus nombreuses et proéminentes que celles dans le tissu non transféré.

Dans tous les tests de recellularisation (n=2) comprenant 3 répliquas biologiques différents, il était intéressant de remarquer que la qualité de la recellularisation était améliorée à 46 jours en transférant le tissu à 41 jours dans un autre puits pendant une dizaine de jours avant de le prélever. Les résultats obtenus pour 41 jours de recellularisation (n=3) avec

transfert des tissus à J31 pour 10 jours avant de les prélever étaient encore meilleurs (Figures 16 et 17).

Il semble que les cellules musculaires lisses bronchiques ont recolonisé leur tissu d'origine qui est la matrice extracellulaire du muscle lisse bronchique. Cependant, les cellules qui étaient restées au niveau de la membrane basale, pourraient être soit des cellules musculaires lisses en migration vers le muscle lisse soit des cellules musculaires lisses bronchiques dédifférenciées en fibroblastes ou des fibroblastes présents dans les cultures des cellules musculaires à l'ensemencement. La couche de cellules fibroblastiques est normalement localisée juste en dessous de la membrane basale dans les bronches natives (Figure 16-A).

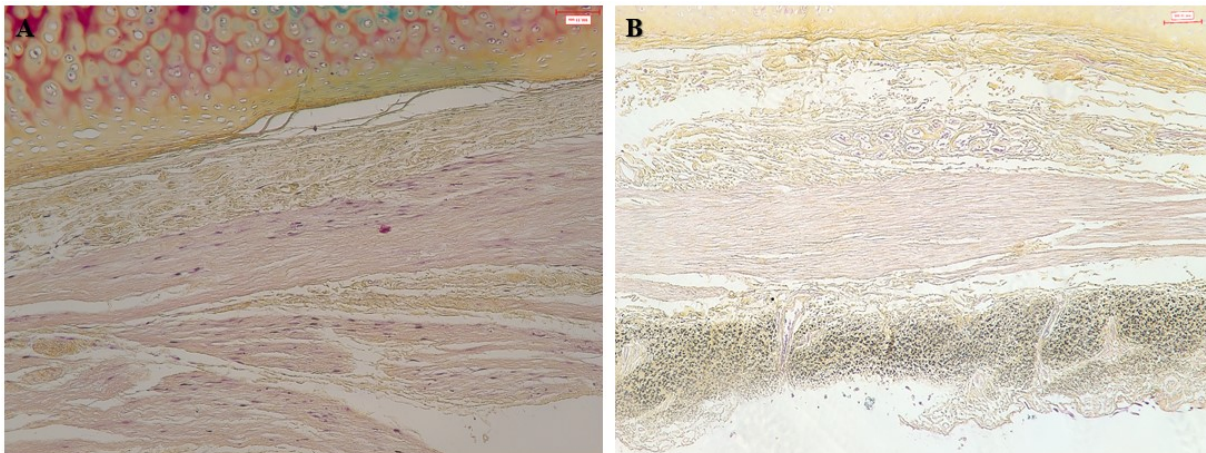


Figure 17. Comparaison de la recellularisation avec transfert à J41 et à J46
Coloration histologique Movat Pentachrome des bronches recellularisées à 41 jours (A) et à 46 jours (B). La confluence cellulaire est plus importante et plus généralisée sur le tissu à 41 jours qu'à 46 jours avec des cellules plus proéminentes dans (A).

Une culture de 46 jours serait moins optimale étant donnée la perte en cellules musculaires lisses bronchiques au niveau de la matrice extracellulaire et leur nombre en déclin, par rapport à une culture de 41 jours, quand celles-ci sont visibles.

Fait intéressant, à partir du 31^{ème} jour de recellularisation, au niveau de 4 bronches, une coloration bleue au niveau des zones fortement recellularisées est apparue sur les colorations histologiques Movat Pentachrome indiquant probablement une forte sécrétion de

glycosaminoglycanes par les cellules musculaires lisses bronchiques. Ces cellules sont connues pour être sécrétrices de ces mucopolysaccharides (Figure 18) (131).

Les glycosaminoglycanes sont variés. Selon leurs structures, ils sont impliqués dans différents processus biologiques dont les interactions matrice extracellulaire - cellules et l'activation de diverses chimiokines (64). Ils sont colorés en bleu par le bleu alcian dans les colorations histologiques Movat Pentachrome et Bleu Alcian. Cette couleur a fortement persisté sur certains cartilages bronchiques après décellularisation marquant la persistance des glycosaminoglycanes cartilagineux mais a disparu sur d'autres. En général, ils semblaient être fortement réduits par la décellularisation, notamment au niveau de la lamina propria (Figure 14).

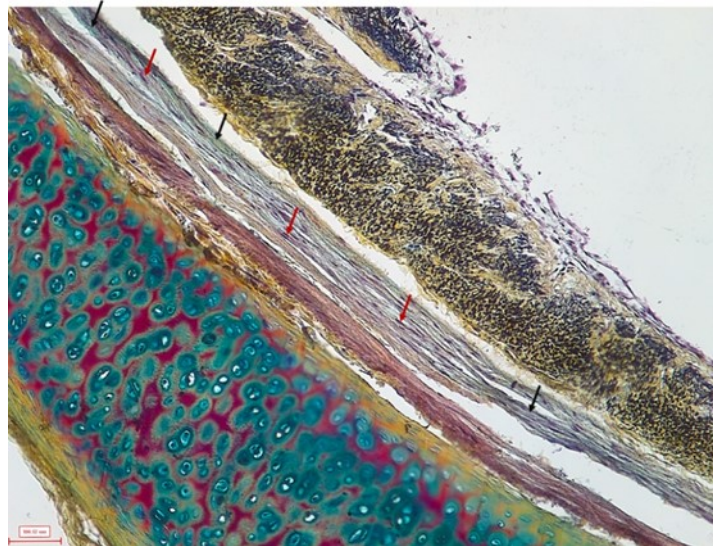


Figure 18. Coloration Movat Pentachrome d'une bronche recellularisée à J33
Les cellules musculaires lisses, indiquées par les flèches rouges, sont confluentes au niveau de la matrice extracellulaire du muscle lisse bronchique. La substance colorée en bleu par le bleu alcian et indiquée par les flèches noires semble être sécrétée par les cellules musculaires lisses bronchiques. Elle correspond aux glycosaminoglycanes.

Sur les coupes bronchiques colorées au Bleu Alcian, cette sécrétion avait débuté dès le 14^{ème} jour de recellularisation (n=2). Elle a augmenté à partir de J31 (n=2) et est devenue fortement présente à J41 (n=2) (Figure 19).

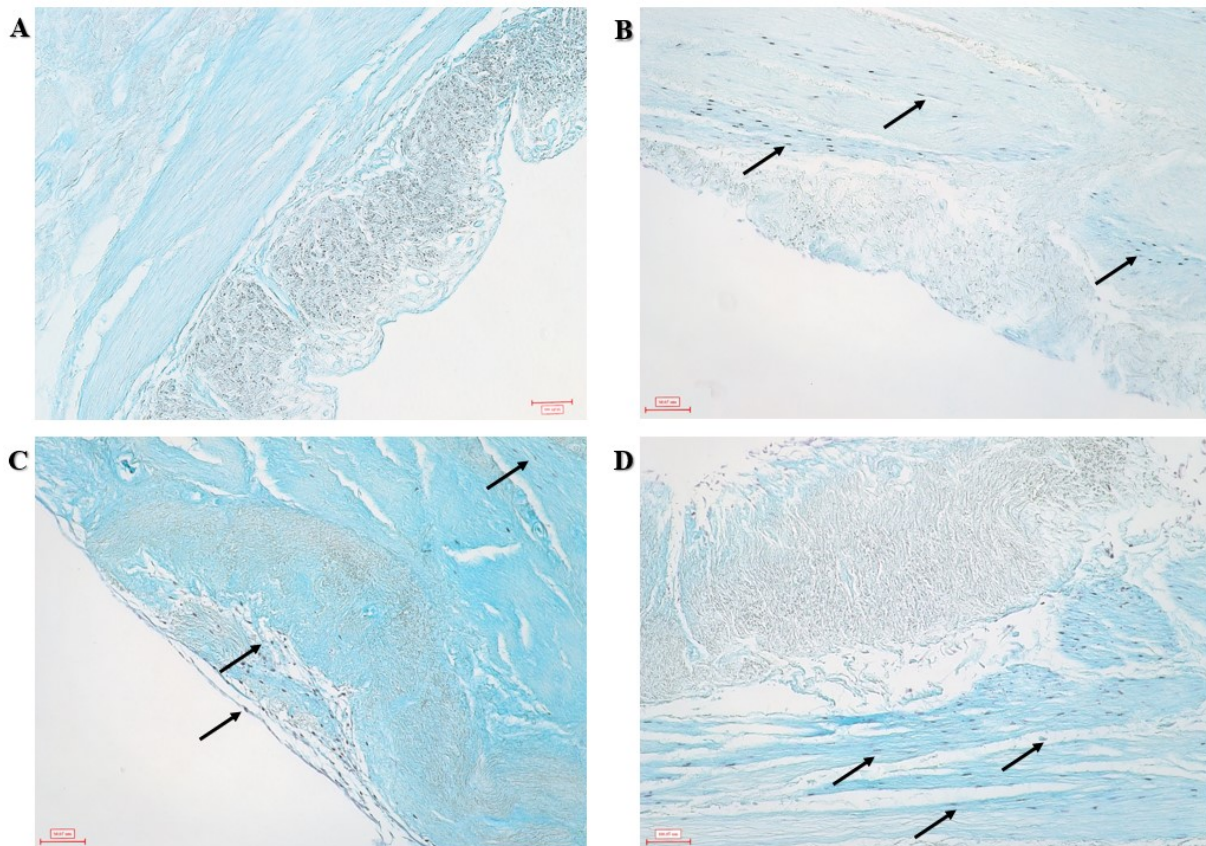


Figure 19. Comparaison de bronches décellularisées et recellularisées sur base de coloration histologique Bleu Alcian

(A) bronche décellularisée; (B) bronche recellularisée à J14; (C) bronche recellularisée à J31; (D) bronche recellularisée à J41. Les flèches noires indiquent les cellules musculaires lisses bronchiques colonisatrices. À 14 jours, il y a une augmentation ponctuelle des glycosaminoglycanes au niveau de l'emplacement des cellules. Cette augmentation devient plus diffuse et intense à J31 en comparaison à la bronche décellularisée et à la bronche recellularisée à 14 jours. À 41 jours, la coloration est fortement contrastée au niveau de la matrice du muscle lisse bronchique et de la membrane basale, lieux de prédilections des cellules musculaires lisses bronchiques colonisatrices.

Discussion

Dans cette étude nous avons mis au point un protocole de décellularisation de bronches équines fraîchement extraites ou congelées. Ces bronches ont par la suite été utilisées pour la mise au point d'un protocole de recellularisation par des cellules musculaires lisses bronchiques.

La validation du protocole de décellularisation est passée par différentes étapes. En effet, le protocole de Wagner et *al.* (124) avait été testé dans une étude préliminaire et avait montré des résultats satisfaisants. Cependant, au cours des tests de décellularisation, nous avons noté l'effet de l'intensité de l'agitation des bains sur l'intégrité du tissu décellularisé final. En effet, une faible agitation entraînait un mauvais rinçage des débris cellulaires et une agitation trop forte risquait d'entraîner la rupture de la matrice extracellulaire et donc son altération. Cette observation a été rapportée par Crapo et *al.* en 2011(122). Par la suite, toujours suivant le protocole de Wagner et *al.* (124), nous avons tenté de conserver des échafauds dans une solution de conservation contenant des agents antibactériens et antifongiques à + 4 °C. Nous voulions les préserver pour des recellularisations simultanées dans l'étude des interactions matrices extracellulaires – cellules musculaires lisses bronchiques. Cette solution permet de limiter la contamination bactérienne et fongique de l'échafaud et de réduire l'action des protéases grâce à un pH neutre. Dans un tissu normal, les protéases libérées par les cellules dégradent la matrice extracellulaire. Suite à la destruction cellulaire provoquée par la décellularisation, les protéases se trouvaient en quantités supérieures à la normale dans les échafauds. Donc, même amoindries, elles dégradaient le tissu et ceci se reflétait sur la qualité de la recellularisation.

Vu qu'il est pratiquement impossible de recueillir des bronches fraîches pour chaque recellularisation et que les bronches conservées à + 4 °C perdaient de leur intégrité dans le temps, l'utilisation d'une autre ressource était essentielle. Nous avons donc fait des tests de décellularisation et de recellularisation sur des bronches natives congelées. En effet, les bronches natives congelées, nous ont permis de mettre à profit notre banque de tissu (<http://www.btre.ca>) et d'utiliser du matériel biologique provenant de chevaux identifiés dont l'état de santé respiratoire était parfaitement connu. Les échafauds obtenus à partir des

bronches congelées étaient de qualité comparable à ceux obtenus à partir de bronches fraîchement extraites, mais leur recellularisation était de bien meilleure qualité vue qu'elle était à chaque fois faite juste après la décellularisation. D'ailleurs, le processus de congélation - décongélation peut être en soi une étape de décellularisation, la cristallisation de l'eau causant l'éclatement cellulaire.

Les bronches décellularisées par la méthode Triton / Sodium déoxycholate étaient histologiquement exemptes de matériel cellulaire avec un ADN rémanent inférieur à 0,01 ng/ μ l. Ces concentrations sont en dessous du seuil de 50 ng d'ADN double brin/mg énoncé par Crapo et collaborateurs (122). Au niveau électrophorétique, cet ADN était d'une longueur inférieure à 100 paires de bases. Or, un ADN inférieur à 200 paires de bases ainsi que certains résidus cellulaires visibles en microscopie électronique ne présentent pas de risque pour la recellularisation (99, 128). Ces mêmes tissus ont montré une diminution significative ($p = 0,0119$) mais attendue des protéines totales en comparaison à des bronches natives. Cette baisse serait probablement due à l'élimination des différentes protéines intracellulaires et cytosquelettiques. D'ailleurs, la structure générale de la matrice extracellulaire a été maintenue avec une composition protéique presque inchangée en collagènes I et IV, en fibres élastiques et en fibronectine. Ceci a été rapporté précédemment chez l'humain et le porc (124, 128). Dans notre étude, l'évaluation qualitative et semi-quantitative montre que ces protéines sont faiblement affectées par le processus de décellularisation. Ces résultats sont en accord avec ceux enregistrés dans des études précédentes (123, 125).

Des pertes en fibronectine sont observées notamment au niveau de la membrane basale, mais aussi au niveau de la matrice extracellulaire car c'est une protéine affectée par l'exposition au Triton-100X durant la décellularisation (104). Cependant, selon les résultats obtenus, ces pertes sont assez limitées étant donné que le marquage immunohistochimique reste assez fort au niveau du tissu avant et après la décellularisation. Bien que non significative, la prévalence de la fibronectine au niveau de la lamina propria semble augmenter avec le processus de décellularisation. Ceci est dû à l'aspect plus étalé qu'adopte la protéine dans la matrice extracellulaire après la décellularisation (124, 130). En effet, la fibronectine est une protéine présente en quantité abondante au niveau de la lamina propria des bronches

natives. La variation de marquage notée peut être expliquée par le fait que les sites de fixation antigéniques de cette protéine soient masqués par d'autres structures dans les tissus natifs. Celles-ci étant éliminées ou dénaturées durant la décellularisation les sites de fixation antigéniques sont devenus plus facilement accessibles et le marquage plus important.

L'évaluation qualitative des glycosaminoglycanes a montré une faible coloration de ces protéines au niveau de la matrice extracellulaire. En effet, une étude de décellularisation faite sur des valves aortiques porcines a montré que certaines protéines de la matrice extracellulaires telles que la laminine et la fibronectine sont affectées par l'exposition au Triton-100X alors que les glycosaminoglycanes sont presque totalement éliminés (132). Même si les effets du Triton-100X sont avérés pour les glycosaminoglycanes (104), l'incidence des détergents de décellularisation sur les protéines matricielles dépend de différents facteurs. En comparaison au travail de Grauss et *al.* (132), sachant que les matrices extracellulaires aortique et bronchique diffèrent, que le protocole de décellularisation impliquant le Triton-100X est différent du nôtre et que les effets du Triton-100X semblent dépendre de la nature du tissu traité (104), il est fort probable que la perte en protéines d'adhésion telles que les glycosaminoglycanes ne soit pas comparable. D'autant plus que le protocole de décellularisation choisi dans le cadre de notre étude est considéré comme étant doux et moins invasif que d'autres (128). En le comparant à d'autres méthode de décellularisation, le protocole que nous avons utilisé préserve les protéines matricielles et des concentrations plus ou moins importantes en certaines protéines cytoplasmiques et cytosquelettiques, notamment l' α -SMA et la SMMHC (104, 124, 130). Elles semblent correspondre aux résidus cellulaires observés en microscopie électronique (130). Telle qu'observée dans notre étude, la composition des poumons décellularisés en glycosaminoglycanes est qualitativement réduite dans l'étude menée par Wagner et *al.* en 2014 (132). Toutefois, une quantification de ces protéines faite par Bonvillain et *al.* en 2012 montre que le contenu de la matrice extracellulaire en glycosaminoglycanes demeure inchangé entre les poumons natifs et décellularisés par la méthode Triton / sodium déoxycholate (130). Les résultats obtenus dans notre étude sont donc en accord avec ce qui a été précédemment démontré.

Pour l'obtention d'une recellularisation efficace, il est important de bien rincer le tissu afin d'éliminer les résidus des détergents chimiques utilisés. Ces détergents, au-delà d'un certain seuil, sont toxiques pour les cellules (132). Un mauvais rinçage risquerait donc d'entraîner une recellularisation médiocre voire l'avortement de la manipulation à cause d'une forte mortalité cellulaire. Nous avons observé ce phénomène durant nos premiers tests de recellularisation avant d'optimiser le rinçage des échafauds.

Sachant que les 2 premiers passages cellulaires ne sont, généralement, pas assez purs (contamination fibroblastique suite à l'extraction) et que le 3^{ème} passage est très imprévisible quant au potentiel prolifératif des cellules (42), nous avons utilisé des cellules musculaires lisses bronchiques entre le 4^{ème} et le 5^{ème} passage. Le 6^{ème} passage cellulaire marquant un début d'instabilité phénotypique des cellules musculaires lisses bronchiques (42), il n'est pas souhaitable pour une recellularisation d'une durée relativement longue puisque nous avons observé une instabilité phénotypique des cellules musculaires lisses bronchiques témoins de la recellularisation à partir de 41 jours pour les cellules au passage 6 et à partir de 24 jours pour les cellules au passage 7.

La concentration optimale de cellules musculaires lisses bronchiques pour la recellularisation a été déterminée en évaluant des concentrations variant entre $1,05 \times 10^5$ et $2,1 \times 10^6$ cellules/cm². Nous avons remarqué que des concentrations trop faibles ou trop fortes inhibaient la recellularisation et la concentration optimale a été fixée à $1,58 \times 10^5$ cellules/cm².

L'addition ou pas de sérum bovin fœtal dans le milieu de culture et la présence ou l'absence de complément dans ce sérum sont des paramètres qui ont été moins investigués. L'absence totale de sérum dans des études préliminaires a entraîné un état de quiescence des cellules et donc une mauvaise recellularisation. En revanche, aucune différence qualitative n'a été notée dans la recellularisation des cellules en présence ou en absence du complément.

Les résultats non rapportés des tentatives de recellularisation à 31 jours faites sur des échafauds conservés à + 4 °C ont montré une confluence cellulaire en surface, la pénétration des cellules dans le tissu étant très rare, voire absente. Cependant, les recellularisations faites, entre 31 et 41 jours, sur des bronches congelées fraîchement décellularisées, ont montré non seulement une confluence cellulaire, mais également une migration des cellules musculaires

lisses bronchiques au niveau de la matrice du muscle lisse bronchique ainsi qu'au niveau de la matrice vasculaire. Ces résultats suggèrent qu'un échafaud fraîchement décellularisé maintiendrait une composition protéique matricielle suffisante pour induire un chimiotactisme cellulaire entraînant une recellularisation spécifique. Ceci pourrait être, en soi, une attestation de la qualité de la décellularisation et une preuve que le tissu garde assez de ses qualités natives pour permettre une colonisation ciblée des cellules en culture. En effet, les facteurs chimiotactiques libérés par le tissu ont probablement permis aux cellules de traverser les autres matrices extracellulaires et de s'implanter préférentiellement à ces deux niveaux.

À partir du 31^{ème} jour de recellularisation, sur une base de coloration histologique Movat Pentachrome, une coloration bleue au niveau des zones fortement recellularisées indiquerait une forte sécrétion de glycosaminoglycanes par les cellules musculaires lisses bronchiques lesquelles sont connues pour être sécrétrices de ces mucopolysaccharides (131). Ceci impliquerait l'établissement d'une interaction entre les cellules musculaires lisses bronchiques et la matrice extracellulaire bronchique.

Cependant, il reste difficile d'expliquer, sur deux tests successifs, la disparition des cellules musculaires lisses bronchiques de la matrice extracellulaire musculaire à 46 jours de culture sans transfert et la réduction de leur nombre par rapport à une culture de 41 jours au niveau de cette matrice avec transfert. L'explication la plus probable serait une mortalité cellulaire à ce stade, mais aucun signe n'a été observé ni au niveau des puits de culture (détachement cellulaire) ni au niveau des surnageants de culture qui devraient, dans ce cas, contenir les débris des cellules mortes et être, de ce fait, plus troubles aux moments du changement du milieu. Il serait, également, possible que l'intégration des cellules au niveau de la matrice musculaire rendrait leur observation plus difficile par cette coloration sachant qu'elles restent observables au niveau de la media des vaisseaux sanguins même à 46 jours.

En raison de la durée de chaque manipulation de recellularisation (3 mois en moyenne), certains tests n'ont pas été suffisamment répétés. D'autres investigations seraient donc nécessaires pour connaître le devenir des cellules musculaires lisses bronchiques en culture tridimensionnelle entre 41 et 46 jours. Ce protocole peut encore être optimisé pour améliorer les résultats obtenus. À ce stade, nous pouvons déjà avancer qu'une recellularisation avec des cellules musculaires lisses bronchiques entre le 4^{ème} et le 5^{ème} passage à une

concentration de $1,58 \times 10^5$ cellules/cm² pendant 41 jours sur un milieu de culture contenant du sérum bovin fœtal sans complément donnerait les meilleurs résultats pour l'étude subséquente des interactions matrice extracellulaire - cellules musculaires lisses bronchiques dans l'asthme.

Cette étude est à notre connaissance la première à rapporter une colonisation spécifique de la matrice du muscle lisse par des cellules musculaires lisses bronchiques primaires différenciées. Cette colonisation a impliqué différents mécanismes cellulaires complexes incluant l'expression d'intégrines, l'adhésion, la migration et la prolifération. Une hypothèse qui expliquerait ce phénomène de migration cellulaire ciblé est la présence de matrikines dans les échafauds. Ce sont des peptides produits à partir de la dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire (133). Vue la destruction cellulaire massive qui se produit lors de la décellularisation, la libération de protéases intracellulaires qui se produit est conséquente et peut engendrer la production d'une forte concentration en matrikines. L'enchevêtrement de la matrice extracellulaire ne permet pas leur élimination totale durant les rinçages. Ces peptides affecteraient le comportement cellulaire à travers les intégrines en stimulant la sécrétion de certains facteurs de croissance et la migration cellulaire. Les matrikines sont incriminés dans les processus métastatiques cancéreux et dans le maintien de l'inflammation dans les pathologies pulmonaires (133-135). Cependant, elles ont également plusieurs rôles bénéfiques notamment dans l'amélioration de la structure des fibres dermiques (136). Ces matrikines étant mobiles et favorisant la migration cellulaire seraient un promoteur potentiel de la migration des myocytes observée lors de la recellularisation.

Ce modèle d'étude mis au point permettrait l'investigation de ces mécanismes cellulaires et de l'influence de la matrice extracellulaire dans leur expression. Il permettrait aussi d'explorer des cocultures cellulaires et de rendre compte des interactions intercellulaires et de leur influence sur la matrice environnante. En somme, ce modèle permettrait la compréhension des interactions cellulaires encore mal investiguées et de l'impact de la matrice extracellulaire dans diverses pathologies respiratoires et notamment dans l'asthme sévère.

Perspectives d'avenir

Depuis quelques années, différentes études en biologie cellulaire ont démontré un changement dans le comportement des cellules *in vitro* qui varie selon la conformation dimensionnelle du substrat (109). En effet, les cellules ne répondent pas de la même manière en culture monocouche et en culture tridimensionnelle (109, 118). Sachant que la conformation 3D est la plus fidèle à un environnement cellulaire naturel (115), les recherches sont maintenant orientées vers l'usage de matrices extracellulaires de synthèse telles que le PLA (polylactic acid), le PGA (poly (glycolic acid)) et le PLGA (poly (d,l-lactic-co-glycolic acid)) pour l'étude des réponses cellulaires à certains stimuli ou médicaments (137, 138).

Les procédés de décellularisation et de recellularisation de portions d'organes ou d'organes entiers en ingénierie tissulaire sont principalement utilisés dans le cadre de la création d'organes recellularisés. Ces tissus de substitutions peuvent être greffés sans avoir à prendre en considération une immuno-compatibilité quelconque et permettent aux patients de recevoir leur greffe d'une manière plus rapide (108, 139).

Dans ce projet, nous nous sommes intéressés à la possibilité de recellulariser une partie d'organe qui est la bronche par des cellules musculaires lisses matures primaires. Ceci permettra une étude phénotypique de ces cellules dans une interaction avec une matrice extracellulaire naturelle. Cette interaction matrice - cellules démontrant un effet donné sur le phénotype des cellules musculaires lisses bronchiques sera d'autant plus importante à étudier en utilisant des matrices dont la composition est altérée par des maladies chroniques telles que l'asthme. En effet, ceci permettra de recueillir des informations pertinentes et très fidèles à la réalité quant aux changements phénotypiques encourues par les cellules musculaires lisses saines exposées à des matrices extracellulaires altérées et aux différents facteurs agissant dans ces interactions. Ceci nous permettra d'améliorer les connaissances en médecine personnalisée dans l'asthme.

Dans un contexte plus large, cette étude constitue une base dans le domaine de l'ingénierie tissulaire tridimensionnelle puisqu'elle permettra sûrement l'évolution des cocultures cellulaires sur matrices biologiques et pourquoi pas la création d'organes entiers à partir de portions d'organes.

Conclusion

Ce projet constitue une étude pilote dans le domaine de l'ingénierie tissulaire relative à la médecine personnalisée dans l'asthme moyennant des tissus biologiques et des cellules primaires matures. À notre connaissance cette étude est la première à exploiter une matrice biologique et naturelle et des cellules musculaires bronchiques primaires pour l'étude de phénomènes pathophysiologiques au niveau bronchique. Ces échafauds seront utiles à l'étude des interactions moléculaires entre le muscle lisse et la matrice extracellulaire bronchique et à déterminer leurs effets paracrines et autocrines dans le cadre de ces interactions. Les résultats obtenus permettront d'identifier de nouvelles thérapies pour l'asthme sévère ciblant des voies moléculaires précises.

Nous avons démontré la possibilité d'obtenir une bronche acellulaire et exempte de matériel nucléaire nuisible tout en maintenant une composition protéique matricielle favorable à une recellularisation. En effet, nous avons démontré le maintien des collagènes notamment les types I et IV nécessaires à l'infiltration cellulaire dans la matrice extracellulaire et de la fibronectine nécessaire à l'adhésion cellulaire à la matrice extracellulaire, à la sécrétion et à la régulation de bon nombre de protéines. Nous avons également observé, l'augmentation des glycosaminoglycanes au niveau des zones recellularisées de la matrice extracellulaire. Ceci témoigne d'une sécrétion de ces protéines par les cellules colonisatrices et probablement une interaction entre ces cellules et la matrice qui leur sert de substrat sachant que les glycosaminoglycanes interviennent dans les interactions matrice extracellulaire - cellules.

Nous avons pu montrer que pour une recellularisation en culture statique il est possible de maintenir la culture cellulaire jusqu'à 41 jours pour des résultats optimaux. Durée au-dessus de laquelle le nombre de cellules décroît au niveau des tissus.

Pour conclure, il est possible de décellulariser une bronche respiratoire tout en maintenant une architecture et une composition protéique favorables à une recellularisation subséquente par des cellules musculaires lisses bronchiques. Ces cellules semblent avoir une préférence de localisation correspondant à leur localisation biologique à savoir au niveau des matrices extracellulaires musculaire et vasculaire et à moindre degré à la périphérie des

cartilages bronchiques. Une confluence dans ces localisations est obtenue entre 31 et 41 jours de culture.

Bibliographie

1. GINA., GOLD. Asthma, COPD and Asthma-COPD Overlap Syndrome (ACOS) GINA and GOLD; 2015.
2. Global strategy for asthma management and prevention. Report. 2016. Report No.: Updated 2016.
3. Corren J. Asthma phenotypes and endotypes: an evolving paradigm for classification. *Discov Med.* 2013;15(83):243-9.
4. NAEPP. Expert Panel Report 3 (EPR-3): Guidelines for the diagnosis and management of asthma-Summary report 2007. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;120(5 Suppl):S94-138.
5. Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, Lim S, Chung KF, Barnes PJ. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160(5 Pt 1):1532-9.
6. Bhakta NR, Woodruff PG. Human asthma phenotypes: from the clinic, to cytokines, and back again. *Immunol Rev.* 2011;242(1):220-32.
7. Wills-Karp M. Neutrophil ghosts worsen asthma. *Science immunology.* 2018;3(26).
8. Moore WC, Hastie AT, Li X, Li H, Busse WW, Jarjour NN, et al. Sputum neutrophil counts are associated with more severe asthma phenotypes using cluster analysis. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133(6):1557-63.e5.
9. Gaga M. Fixed obstruction in severe asthma: not just a matter of time. *Eur Respir J.* 2004;24(1):8-10.
10. Gibson PG. What do non-eosinophilic asthma and airway remodelling tell us about persistent asthma? *Thorax.* 2007;62(12):1034-6.
11. James AJ. Relationship between airway wall thickness and airway hyperresponsiveness. In: Stewart AG, editor. *Airway wall remodelling in asthma.* Boca Raton, Fla: CRC Press; 1997. p. 1-27.
12. Chetta A, Marangio E, Olivieri D. Inhaled steroids and airway remodelling in asthma. *Acta Biomed.* 2003;74(3):121-5.
13. Goleva E, Hauk PJ, Boguniewicz J, Martin RJ, Leung DY. Airway remodeling and lack of bronchodilator response in steroid-resistant asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;120(5):1065-72.
14. Olivieri D, Chetta A, Del Donno M, Bertorelli G, Casalini A, Pesci A, et al. Effect of short-term treatment with low-dose inhaled fluticasone propionate on airway inflammation and remodeling in mild asthma: a placebo-controlled study. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;155(6):1864-71.
15. Hoshino M, Takahashi M, Takai Y, Sim J. Inhaled corticosteroids decrease subepithelial collagen deposition by modulation of the balance between matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;104(2 Pt 1):356-63.
16. Sont JK, Willems LN, Bel EH, van Krieken JH, Vandenbroucke JP, Sterk PJ. Clinical control and histopathologic outcome of asthma when using airway hyperresponsiveness as an additional guide to long-term treatment. The AMPUL Study Group. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;159(4 Pt 1):1043-51.
17. Barnes PJ. Pathophysiology of asthma. *Br J Clin Pharmacol.* 1996;42(1):3=10.

18. Lundgren R, Soderberg M, Horstedt P, Stenling R. Morphological studies of bronchial mucosal biopsies from asthmatics before and after ten years of treatment with inhaled steroids. *Eur Respir J.* 1988;1(10):883-9.
19. Chakir J, Shannon J, Molet S, Fukakusa M, Elias J, Laviolette M, et al. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111(6):1293-8.
20. Mbark H. Anatomie des poumons. Santé et soins infirmiers.2015 [updated 24-05-2015. Available from: <http://infirmier-freedom.blogspot.ca/2015/05/anatomie-des-poumons.html>.
21. Fraser RS. Histology and gross anatomy of the lung. In: Martin HS, editor. *Physiologic basis of respiratory disease.* United States of America: BC Decker Inc Hamilton; 2005. p. 793.
22. Barlovatz-Meimon G, Ronot X. *Culture de cellules animales (3^o éd.).* Lavoisier ed: Estelle Perez-Le Du; 2014 2014/10/23. 667 p.
23. Boers JE, Ambergen AW, Thunnissen FB. Number and proliferation of clara cells in normal human airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;159(5 Pt 1):1585-91.
24. Kierszenbaum AL. *Histologie et biologie cellulaire: Une introduction à l'anatomie pathologique* 2006 2006/05/31. 619 p.
25. Cormack DH. *PDQ histology.* BC Decker Inc ed: PMPH-USA; 2003. 224 p.
26. Lüllmann-Rauch R. *Histologie.* De Boeck Université ed2008. 704 p.
27. Brightling CE, Bradding P, Symon FA, Holgate ST, Wardlaw AJ, Pavord ID. Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med.* 2002;346(22):1699-705.
28. Elias JA, Zhu Z, Chupp G, Homer RJ. Airway remodeling in asthma. *The Journal of clinical investigation.* 1999;104(8):1001-6.
29. Bergeron C, Tulic MK, Hamid Q. Airway remodelling in asthma: from benchside to clinical practice. *Can Respir J.* 2010;17(4):e85-93.
30. Boulet LP, Turcotte H, Turcot O, Chakir J. Airway inflammation in asthma with incomplete reversibility of airflow obstruction. *Respir Med.* 2003;97(6):739-44.
31. Bullone M, Lavoie JP. Asthma "of horses and men"--how can equine heaves help us better understand human asthma immunopathology and its functional consequences? *Mol Immunol.* 2015;66(1):97-105.
32. Fahy JV. Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma: insights from clinical studies. *Proc Am Thorac Soc.* 2009;6(3):256-9.
33. Hirst SJ. Airway smooth muscle as a target in asthma. *Clin Exp Allergy.* 2000;30 Suppl 1:54-9.
34. Bara I, Ozier A, Tunon de Lara JM, Marthan R, Berger P. Pathophysiology of bronchial smooth muscle remodelling in asthma. *Eur Respir J.* 2010;36(5):1174-84.
35. Parameswaran K, Willems-Widyastuti A, Alagappan VK, Radford K, Kranenburg AR, Sharma HS. Role of extracellular matrix and its regulators in human airway smooth muscle biology. *Cell Biochem Biophys.* 2006;44(1):139-46.
36. Araujo BB, Dolhnikoff M, Silva LF, Elliot J, Lindeman JH, Ferreira DS, et al. Extracellular matrix components and regulators in the airway smooth muscle in asthma. *Eur Respir J.* 2008;32(1):61-9.
37. Johnson P.R., Black J.L., Carlin S., Ge Q., P.A. U. The production of extracellular matrix proteins by human passively sensitized airway smooth-muscle cells in culture: the effect of beclomethasone. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(6):7.

38. Panettieri RA Jr., Kotlikoff MI, Gerthoffer WT, Hershenson MB, Woodruff PG, Hall IP, et al. Airway smooth muscle in bronchial tone, inflammation, and remodeling: basic knowledge to clinical relevance. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177(3):248-52.
39. An SS, Bai TR, Bates JH, Black JL, Brown RH, Brusasco V, et al. Airway smooth muscle dynamics: a common pathway of airway obstruction in asthma. *Eur Respir J.* 2007;29(5):834-60.
40. Hirst SJ. Airway smooth muscle cell culture: application to studies of airway wall remodelling and phenotype plasticity in asthma. *Eur Respir J.* 1996;9(4):808-20.
41. Halayko AJ, Salari H, Ma X, Stephens NL. Markers of airway smooth muscle cell phenotype. *Am J Physiol.* 1996;270(6 Pt 1):L1040-51.
42. Vargas A, Peltier A, Dube J, Lefebvre-Lavoie J, Moulin V, Goulet F, et al. Evaluation of contractile phenotype in airway smooth muscle cells isolated from endobronchial biopsy and tissue specimens from horses. *Am J Vet Res.* 2017;78(3):359-70.
43. Chung KF. Airway smooth muscle cells: contributing to and regulating airway mucosal inflammation? *Eur Respir J.* 2000;15(5):961-8.
44. Wang Q, Li H, Yao Y, Lu G, Wang Y, Xia D, et al. HB-EGF-promoted airway smooth muscle cells and their progenitor migration contribute to airway smooth muscle remodeling in asthmatic mouse. *The Journal of Immunology.* 2016.
45. Madigan LA, Wong GS, Gordon EM, Chen WS, Balenga N, Koziol-White CJ, et al. RGS4 overexpression in lung attenuates airway hyperresponsiveness in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2018;58(1):89-98.
46. Hirst SJ, Twort CH, Lee TH. Differential effects of extracellular matrix proteins on human airway smooth muscle cell proliferation and phenotype. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000;23(3):335-44.
47. Han M, Wen JK, Zheng B, Cheng Y, Zhang C. Serum deprivation results in redifferentiation of human umbilical vascular smooth muscle cells. *American journal of physiology Cell physiology.* 2006;291(1):C50-8.
48. Damera G, Panettieri RA, Jr. Does airway smooth muscle express an inflammatory phenotype in asthma? *Br J Pharmacol.* 2011;163(1):68-80.
49. Salter B, Pray C, Radford K, Martin JG, Nair P. Regulation of human airway smooth muscle cell migration and relevance to asthma. *Respir Res.* 2017;18(1):156.
50. Itoh RE, Kurokawa K, Ohba Y, Yoshizaki H, Mochizuki N, Matsuda M. Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Mol Cell Biol.* 2002;22(18):6582-91.
51. Parameswaran K, Cox G, Radford K, Janssen LJ, Sehmi R, O'Byrne PM. Cysteinyl leukotrienes promote human airway smooth muscle migration. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166(5):738-42.
52. Goncharova EA, Billington CK, Irani C, Vorotnikov AV, Tkachuk VA, Penn RB, et al. Cyclic AMP-mobilizing agents and glucocorticoids modulate human smooth muscle cell migration. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;29(1):19-27.
53. Ito I, Fixman ED, Asai K, Yoshida M, Gounni AS, Martin JG, et al. Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta modulate the expression of matrix metalloproteinases and migratory function of human airway smooth muscle cells. *Clin Exp Allergy.* 2009;39(9):1370-80.

54. Parameswaran K, Radford K, Zuo J, Janssen LJ, O'Byrne PM, Cox PG. Extracellular matrix regulates human airway smooth muscle cell migration. *European Respiratory Journal*. 2004;24(4):545-51.
55. Lin AH, Shang Y, Mitzner W, Sham JS, Tang WY. Aberrant DNA methylation of phosphodiesterase [corrected] 4D alters airway smooth muscle cell phenotypes. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2016;54(2):241-9.
56. Perry MM, Baker JE, Gibeon DS, Adcock IM, Chung KF. Airway smooth muscle hyperproliferation is regulated by microRNA-221 in severe asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014;50(1):7-17.
57. Tliba O, Amrani Y. Airway smooth muscle cell as an inflammatory cell: lessons learned from interferon signaling pathways. *Proc Am Thorac Soc*. 2008;5(1):106-12.
58. Laffont S, Blanquart E, Guery JC. Sex differences in asthma: A key role of androgen-signaling in group 2 innate lymphoid cells. *Front Immunol*. 2017;8:1069.
59. Johnson PR, Roth M, Tamm M, Hughes M, Ge Q, King G, et al. Airway smooth muscle cell proliferation is increased in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(3):474-7.
60. Hasaneen NA, Zucker S, Cao J, Chiarelli C, Panettieri RA, Foda HD. Cyclic mechanical strain-induced proliferation and migration of human airway smooth muscle cells: role of EMMPRIN and MMPs. *FASEB J*. 2005;19(11):1507-9.
61. Larsen M, Artym VV, Green JA, Yamada KM. The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 2006;18(5):463-71.
62. Nishihara-Fujihara M, Shoji S, Maeda I, Shimoda T, Nishima S, Okamoto K. Involvement of fibronectin and matrix metalloproteinases in airway smooth muscle cell migration for the process of airway remodeling. *Allergol Int*. 2010;59(3):267-75.
63. Setlakwe EL, Lemos KR, Lavoie-Lamoureux A, Duguay JD, Lavoie JP. Airway collagen and elastic fiber content correlates with lung function in equine heaves. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014;307(3):L252-60.
64. Papakonstantinou E, Karakiulakis G. The 'sweet' and 'bitter' involvement of glycosaminoglycans in lung diseases: pharmacotherapeutic relevance. *Br J Pharmacol*. 2009;157(7):1111-27.
65. Stabler CT, Lecht S, Mondrinos MJ, Goulart E, Lazarovici P, Lelkes PI. Revascularization of decellularized lung scaffolds: principles and progress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015;309(11):L1273-85.
66. Raghu G, Striker LJ, Hudson LD, Striker GE. Extracellular matrix in normal and fibrotic human lungs. *Am Rev Respir Dis*. 1985;131(2):281-9.
67. Parenteau-Bareil R, Gauvin R, Berthod F. Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications *Materials*. 2010;3:1863-87.
68. Freyer AM, Billington CK, Penn RB, Hall IP. Extracellular matrix modulates beta2-adrenergic receptor signaling in human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004;31(4):440-5.
69. Suzuki R, Kato T, Miyazaki Y, Iwata M, Noda Y, Takagi K, et al. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in sputum from patients with bronchial asthma. *J Asthma*. 2001;38(6):477-84.
70. Wenzel SE, Balzar S, Cundall M, Chu HW. Subepithelial basement membrane immunoreactivity for matrix metalloproteinase 9: association with asthma severity, neutrophilic inflammation, and wound repair. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(6):1345-52.

71. Bergeron C, Page N, Joubert P, Barbeau B, Hamid Q, Chakir J. Regulation of procollagen I (alpha1) by interleukin-4 in human bronchial fibroblasts: a possible role in airway remodelling in asthma. *Clin Exp Allergy*. 2003;33(10):1389-97.
72. Vignola AM, Kips J, Bousquet J. Tissue remodeling as a feature of persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;105(6 Pt 1):1041-53.
73. Johnson PR, Black JL, Carlin S, Ge Q, PA U. The production of extracellular matrix proteins by human passively sensitized airway smooth-muscle cells in culture: the effect of beclomethasone. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162(6):2145-51.
74. Jeffery PK. Remodeling and inflammation of bronchi in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2004;1(3):176-83.
75. Vandamme TF. Use of rodents as models of human diseases. *J Pharm Bioallied Sci*. 2014;6(1):2-9.
76. Zosky GR, Sly PD. Animal models of asthma. *Clin Exp Allergy*. 2007;37(7):973-88.
77. Lowe APP, Thomas RS, Nials AT, Kidd EJ, Broadley KJ, Ford WR. Route of administration affects corticosteroid sensitivity of a combined ovalbumin and lipopolysaccharide model of asthma exacerbation in guinea pigs. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2017;362(2):327-37.
78. Keyhanmanesh R, Pejman L, Omrani H, Mirzamohammadi Z, Shahbazfar AA. The effect of single dose of thymoquinone, the main constituents of *Nigella sativa*, in guinea pig model of asthma. *BioImpacts : BI*. 2014;4(2):75-81.
79. Scheerlinck JP, Snibson KJ, Bowles VM, Sutton P. Biomedical applications of sheep models: from asthma to vaccines. *Trends Biotechnol*. 2008;26(5):259-66.
80. Szelenyi I. Animal models of bronchial asthma. *Inflamm Res*. 2000;49(12):639-54.
81. Hufnagl K, Hirt R, Robibaro B. Out of Breath: Asthma in Humans and Their Animals. In: Jensen-Jarolim E, editor. *Comparative Medicine: Disorders Linking Humans with Their Animals*. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 71-85.
82. Aun MV, Bonamichi-Santos R, Arantes-Costa FM, Kalil J, Giavina-Bianchi P. Animal models of asthma: utility and limitations. *J Asthma Allergy*. 2017;10:293-301.
83. Lavoie JP, Maghni K, Desnoyers M, Taha R, Martin JG, Hamid QA. Neutrophilic airway inflammation in horses with heaves is characterized by a Th2-type cytokine profile. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(8 Pt 1):1410-3.
84. Marti E, Harwood L. Genetics of human asthma and equine recurrent airway obstruction: can these two diseases be compared? *Pferdeheilkunde*. 2002;18(6):587-93.
85. Ferrari CR, Cooley J, Mujahid N, Costa LR, Wills RW, Johnson ME, et al. Horses With Pasture Asthma Have Airway Remodeling That Is Characteristic of Human Asthma. *Veterinary Pathology*. 2017;55(1):144-58.
86. Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Lavoie JP. Heaves, an asthma-like disease of horses. *Respirology*. 2011;16(7):1027-46.
87. Robinson NE, Jackson C, Jefcoat A, Berney C, Peroni D, Derksen FJ. Efficacy of three corticosteroids for the treatment of heaves. *Equine veterinary journal*. 2002;34(1):17-22.
88. Calzetta L, Roncada P, di Cave D, Bonizzi L, Urbani A, Pistocchini E, et al. Pharmacological treatments in asthma-affected horses: A pair-wise and network meta-analysis. *Equine veterinary journal*. 2017;49(6):710-7.
89. Couetil LL, Cardwell JM, Gerber V, Lavoie JP, Leguillette R, Richard EA. Inflammatory Airway Disease of Horses--Revised Consensus Statement. *J Vet Intern Med*. 2016;30(2):503-15.

90. Vargas A, Roux-Dalvai F, Droit A, Lavoie JP. Neutrophil-derived exosomes: A new mechanism contributing to airway smooth muscle remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2016;55(3):450-61.
91. Reddel CJ, Weiss AS, Burgess JK. Elastin in asthma. *Pulm Pharmacol Ther* 2012;25(2):144-53.
92. Low R, Leguillette R, Lauzon AM. (+)Insert smooth muscle myosin heavy chain (SM-B): From single molecule to human. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006; 38(11):1862-74.
93. Boivin R, Vargas A, Lefebvre-Lavoie J, Lauzon AM, Lavoie JP. Inhaled corticosteroids modulate the (+)insert smooth muscle myosin heavy chain in the equine asthmatic airways. *Tthorax* 2014;69(12):1113-9.
94. Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Gelinas-Lymburner E, David F, Martin JG, Lavoie JP. Effect of antigenic exposure on airway smooth muscle remodeling in an equine model of chronic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011; 45(1):181-7.
95. James AL, Bai TR, Mauad T, Abramson MJ, Dolhnikoff M, McKay KO, et al. Airway smooth muscle thickness in asthma is related to severity but not duration of asthma. *Eur Respir J.* 2009 34(5):1040-5.
96. D'Angelo E, Milic-Emili J. Statics of the respiratory system. In: Martin HS, editor. *Physiologic basis of respiratory disease.* BC Decker Inc. Hamilton ed. USA2005. p. 973.
97. Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. *Science.* 2002;295(5557):1009-14.
98. Lysaght MJ, Reyes J. The growth of tissue engineering. *Tissue Eng.* 2001;7(5):485-93.
99. Gilbert TW, Freund JM, SF B. Quantification of DNA biologic scaffold materials. *The journal of surgical research.* 2009;1(152):4.
100. Ge Z, Yang F, Goh JC, Ramakrishna S, Lee EH. Biomaterials and scaffolds for ligament tissue engineering. *J Biomed Mater Res A.* 2006;77(3):639-52.
101. Truskey GA. Advancing cardiovascular tissue engineering. *F1000Res.* 2016;5.
102. Yi HG, Lee H, Cho DW. 3D Printing of Organs-On-Chips. *Bioengineering (Basel).* 2017;4(1).
103. Vanderburgh J, Sterling JA, Guelcher SA. 3D Printing of Tissue Engineered Constructs for In Vitro Modeling of Disease Progression and Drug Screening. *Ann Biomed Eng.* 2017;45(1):164-79.
104. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials.* 2006;27(19):3675-83.
105. Baiguera S, Jungebluth P, Burns A, Mavilia C, Haag J, De Coppi P, et al. Tissue engineered human tracheas for in vivo implantation. *Biomaterials.* 2010;31(34):8931-8.
106. Hussein KH, Park KM, Kang KS, Woo HM. Biocompatibility evaluation of tissue-engineered decellularized scaffolds for biomedical application. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016;67:766-78.
107. Cortiella J, Niles J, Cantu A, Brettler A, Pham A, Vargas G, et al. Influence of acellular natural lung matrix on murine embryonic stem cell differentiation and tissue formation. *Tissue Eng Part A.* 2010;16(8):2565-80.
108. Miller C, George S, Niklason L. Developing a tissue-engineered model of the human bronchiole. *J Tissue Eng Regen Med.* 2010;4(8):619-27.
109. Breslin S, O'Driscoll L. The relevance of using 3D cell cultures, in addition to 2D monolayer cultures, when evaluating breast cancer drug sensitivity and resistance. *Onctarget.* 2016;7(29):12.

110. Shkumatov A, Thompson M, Choi KM, Sicard D, Baek K, Kim DH, et al. Matrix stiffness-modulated proliferation and secretory function of the airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015;308(11):L1125-35.
111. Cukierman E, Pankov R, Yamada KM. Cell interactions with three-dimensional matrices. *Current Opinion in Cell Biology*. 2002;14(5):8.
112. Barrera-Ramirez E, Rico-Escobar E, Garrido-Cardona RE. [Tissue engineering applied to the trachea as a graft]. *Gac Med Mex*. 2016;152(1):120-3.
113. Doi R, Tsuchiya T, Mitsutake N, Nishimura S, Matsuu-Matsuyama M, Nakazawa Y, et al. Transplantation of bioengineered rat lungs recellularized with endothelial and adipose-derived stromal cells. *Sci Rep*. 2017;7(1):8447.
114. Reidinger AZ, Rolle MW, editors. Culture medium effects on vascular smooth muscle cell contractile protein expression and morphology in 2D v. 3D. 2014 40th Annual Northeast Bioengineering Conference (NEBEC); 2014 25-27 April 2014; Boston, MA, USA.
115. Fang Y, Eglen RM. Three-dimensional cell cultures in drug discovery and development. *SLAS Discov*. 2017;22(5):456-72.
116. Sylaja Murikipudi, Heiko Methe, Edelman ER. The effect of substrate modulus on the growth and function of matrix-embedded endothelial cells. *Biomaterials*. 2013;43(3):7.
117. Hutchinson L, Kirk R. High drug attrition rates--where are we going wrong? *Nature reviews Clinical oncology*. 2011;8(4):189-90.
118. Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*. 2001;294(5547):1708-12.
119. Baharvand H, Hashemi SM, Kazemi Ashtiani S, Farrokhi A. Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systems in vitro. *Int J Dev Biol*. 2006;50(7):645-52.
120. Htwe SS, Harrington H, Knox A, Rose F, Aylott J, Haycock JW, et al. Investigating NF-kappaB signaling in lung fibroblasts in 2D and 3D culture systems. *Respir Res*. 2015;16:144.
121. Patel N, Solanki E, Picciani R, Cavett V, Caldwell-Busby JA, Bhattacharya SK. Strategies to recover proteins from ocular tissues for proteomics. *Proteomics*. 2008;8(5):1055-70.
122. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011;32(12):3233-43.
123. Chani B, Puri V, Sobti RC, Jha V, Puri S. Decellularized scaffold of cryopreserved rat kidney retains its recellularization potential. *PLoS One*. 2017;12(3):e0173040.
124. Wagner DE, Bonenfant NR, Sokocevic D, DeSarno MJ, Borg ZD, Parsons CS, et al. Three-dimensional scaffolds of acellular human and porcine lungs for high throughput studies of lung disease and regeneration. *Biomaterials*. 2014;35(9):2664-79.
125. Baiguera S, Del Gaudio C, Jaus MO, Polizzi L, Gonfiotti A, Comin CE, et al. Long-term changes to in vitro preserved bioengineered human trachea and their implications for decellularized tissues. *Biomaterials*. 2012;33(14):3662-72.
126. Bonenfant NR, Sokocevic D, Wagner DE, Borg ZD, Lathrop MJ, Lam YW, et al. The effects of storage and sterilization on de-cellularized and re-cellularized whole lung. *Biomaterials*. 2013;34(13):3231-45.
127. Russell HK, Jr. A modification of Movat's pentachrome stain. *Arch Pathol*. 1972;94(2):187-91.

128. Tsuchiya T, Sivarapatna A, Rocco K, Nanashima A, Nagayasu T, Niklason LE. Future prospects for tissue engineered lung transplantation: decellularization and recellularization-based whole lung regeneration. *Organogenesis*. 2014;10(2):196-207.
129. Hocking DC. Fibronectin matrix deposition and cell contractility: implications for airway remodeling in asthma. *Chest*. 2002;122(6 Suppl):275S-8S.
130. Bonvillain RW, Danchuk S, Sullivan DE, Betancourt AM, Semon JA, Eagle ME, et al. A nonhuman primate model of lung regeneration: detergent-mediated decellularization and initial in vitro recellularization with mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2012;18(23-24):2437-52.
131. Nigro J, Wang A, Mukhopadhyay D, Lauer M, Midura RJ, Sackstein R, et al. Regulation of heparan sulfate and chondroitin sulfate glycosaminoglycan biosynthesis by 4-fluoro-glucosamine in murine airway smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(25):16832-9.
132. Grauss RW, Hazekamp MG, Oppenhuizen F, van Munsteren CJ, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC. Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2005;27(4):566-71.
133. La Rocca G, Anzalone R, Magno F, Corrao S, Carbone M, Loria L, et al. New perspectives on the roles of proteinases and lung structural cells in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. 2007. In: *Experimental medicine reviews [Internet]*. Plumelia Ricerca. [328].
134. Polette M, Nawrocki-Raby B, Gilles C, Clavel C, Birembaut P. Tumour invasion and matrix metalloproteinases. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004;49(3):179-86.
135. Bekaert S, Fillet M, Detry B, Pichavant M, Maree R, Noel A, et al. Inflammation-Generated Extracellular Matrix Fragments Drive Lung Metastasis. *Cancer Growth Metastasis*. 2017;10:1179064417745539.
136. Mondon P, Hillion M, Peschard O, Andre N, Marchand T, Doridot E, et al. Evaluation of dermal extracellular matrix and epidermal-dermal junction modifications using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric imaging, in vivo reflectance confocal microscopy, echography, and histology: effect of age and peptide applications. *J Cosmet Dermatol*. 2015;14(2):152-60.
137. Mahato R. Chapter 2: multifunctional micro- and nanoparticles. In: Mitra AK, Cholkar K, Mandal A, editors. *Emerging nanotechnologies for diagnostics, drug delivery and medical devices*. Micro and nano technologies. Elsevier ed: Deans, M.; 2017. p. 22.
138. Gentile P, Chiono V, Carmagnola I, Hatton PV. An overview of poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. *Int J Mol Sci*. 2014;15(3):3640-59.
139. Mazza G, Al-Akkad W, Rombouts K, Pinzani M. Liver tissue engineering: From implantable tissue to whole organ engineering. *Hepatol Commun*. 2018;2(2):131-41.

Annexe I : Protocole de décellularisation des bronches

1. Matériel:

- Compresses stériles.
- Pinces stériles pour le transfert des bronches d'un bain à l'autre.
- Phosphate Buffered Saline 10X sterile (Wisent, Cat: 311-012-CL).
- Phosphate Buffered Saline 1X (PBS 1X), pour 1L: Mélanger 100 ml de PBS 10X à 900 ml de MiQ H₂O.
- Pour 500 ml de solution de Triton 0.1 % + Pénicilline-Streptomycine 1X : Dans 500 ml MiQ H₂O, mélanger 500 µl de Triton 100X (Triton X-100 Laboratory grade de Sigma Aldrich, Cat : X100) + 5 ml de Pénicilline-Streptomycine (Penicillin-Streptomycin, Wisent Inc., Cat : 450-201-EL).
- Pour 500 ml de solution de Sodium déoxycholate (SDC) 2 % + Pénicilline-Streptomycine 1X : Dans 500 ml MiQ H₂O, mélanger 10g de SDC en poudre (Sodium deoxycholate ≥ 97 % (titration), Sigma Aldrich, Cat : D6750) + 5 ml de Pénicilline-Streptomycine.
- Pour 500 ml de NaCl 1M + Pénicilline-Streptomycine 1X : Dans 500 ml MiQ H₂O, mélanger 24,22g de Chlorure de Sodium NaCl de poids moléculaire 58,44 g.mol⁻¹ (Sodium Chloride, Fisher BioReagents) + 5 ml de Pénicilline-Streptomycine.
- Pour 500 ml de solution de 35 µg/ml DNase + 1X Pénicilline-Streptomycine + 2mM CaCl₂ + 1,3Mm MgSO₄ : Dans 500 ml MiQ H₂O, mélanger 1,75 ml de DNase préparée à une concentration de 10 mg/ml à partir de 100 mg de DNase bovine (DNase from bovine pancreas 100 mg grade II, Sigma Aldrich, Cat : 10104159001) + 5 ml de Pénicilline-Streptomycine + 0,15 g Chlorure de Calcium CaCl₂ de poids moléculaire 147,02 g.mol⁻¹ (Fisher scientific). + 0,08 g de Sulfate de Magnésium MgSO₄ de poids moléculaire 120,37 g.mol⁻¹.

- Pour les rinçages, une solution de MiQ H₂O + 10 ml Pénicilline-Streptomycine est préparée à chaque rinçage.
- Pour 500 ml de solution de 0,1 % acide paracétique dans 4 % éthanol : Dans 480 ml MiQ H₂O, mélanger 1,56 ml de solution d'acide paracétique concentré à 32 % (Paracetic acid, Sigma Aldrich, Cat : 269336-100ML) + 20 ml d'Éthanol 100.
- Solution de conservation : PBS 1X stérile + Pénicilline-Streptomycine 5X + Gentamicine 500 mg/l + Amphotéricine B 2,5µg/ml : Dans 500 ml PBS 1X stérile préparé à partir de PBS 10X stérile (PBS 10X, Wisent Inc., Cat : 311-012-LL) + Pénicilline-Streptomycine 25 ml + 5 ml Gentamicine (Gentamicine sulfate 50 mg/ml solution, Wisent Inc., Cat : 450-136-XL) + 5 ml Amphotéricine B (Amphotiricin B solution, Sigma Aldrich, Cat : A2942-50ML).

2. Commentaires généraux :

- Le port des gants et du sarreau est obligatoire en tout temps du protocole.
- Le sarreau utilisé en nécropsie ne doit pas être utilisé durant le reste de la manipulation et ce principalement pour des raisons d'hygiène.
- Le matériel utilisé doit être stérile.

3. En nécropsie:

- À partir des poumons, extraction mécanique des bronches intermédiaires, entre la 2^{ème} et la 4^{ème} génération. Pour la facilité de la manipulation durant la recellularisation, elles ne doivent pas être très cartilagineuses.
- Les bronches sont, par la suite, nettoyées à l'aide de compresses stériles pour enlever autant que possible les débris de parenchyme pulmonaire encore collés.
- Mettre les bronches nettoyées dans un béccher sur glace contenant du PBS 1X (milieu de transport) et réserver des bronches dans l'azote liquide pour la banque.

4. Au laboratoire, sous la hotte biologique :

- Finement nettoyer les bronches à la pince pour ne garder que le tissu bronchique,

- Transférer les bronches dans un bécher contenant du PBS 1X sur glace pendant environ 30 minutes en attendant de préparer le premier bain.

Note : il est possible d'outrepasser l'étape laboratoire si les bronches sont assez propres à la fin du premier nettoyage. Il est également possible voir préférable d'utiliser des bronches préalablement congelées dans l'azote liquide.

5. Cycles de décellularisation :

Un cycle est constitué de 4 lavages dans 4 bains détergents et enzymatiques consécutifs.

- Premier bain : Triton X-100 0,1 % + Pénicilline-Streptomycine 1X (Triton est un détergeant tensio-actif qui perméabilise les membranes biologiques) dans MiQ H₂O. Incuber 24h à 4 °C, dans un réfrigérateur, sous agitation modérée.
- Rinçage dans 500 ml MiQ H₂O + Pénicilline-Streptomycine 2X.
- Second Bain : Sodium Déoxycholate 2 % + Pénicilline-Streptomycine 1X (Déoxycholate dissous la couche lipidique bipolaire des membranes cellulaires) dans MiQ H₂O. Incuber 24h à 4 °C sous agitation modérée.
- Rinçage dans 500 ml MiQ H₂O + Pénicilline-Streptomycine 2X.
- Troisième bain : NaCl 1M + Pénicilline-Streptomycine 1X (NaCl hypertonique condense le cytoplasme autour du noyau et permet un accès plus facile à la DNase). Incubation 1h15 à T° ambiante sur la paillasse, sous agitation modérée.
- Rinçage dans 500 ml MiQ H₂O + Pénicilline-Streptomycine 2X.
- Quatrième bain : DNase 35 µg/ml + CaCl₂ 2mM + MgSO₄ 1,3mM + Pénicilline-Streptomycine 1X. Incubation 1h à T° ambiante.
- Rinçage dans 500 ml MiQ H₂O + Pénicilline-Streptomycine 2X.
- Refaire les 4 bains une deuxième fois.

6. Stérilisation des scaffolds :

- Préparer solution de 0,1 % acide acétique glacial dans 4 % éthanol. Rincer le scaffold dans cette solution pendant 60 min à T° ambiante.

- Rincer dans solution de conservation : PBS 1X + Pénicilline-Streptomycine 5X + Gentamicine 500 mg/l + Amphotéricine B 2,5µg/ml.
- Conserver le scaffold dans 1L de solution de conservation à 4 °C (pas plus d'une semaine).

7. Vérification de la décellularisation :

- Prélever un échantillon de scaffold et le fixer dans du Formol 10 %.
- Montage en paraffine.
- Coupe au microtome à 4 µm d'épaisseur.
- Coloration histologique Movat Pentachrome

Annexe II : Protocole de recellularisation des bronches

Consignes générales :

- Toute la manipulation se fait sous la hotte biologique de la salle de culture cellulaire hormis pour le comptage et la centrifugation des cellules.
- Gants et sarreau pour la salle de culture sont obligatoire.
- La hotte biologique doit être parfaitement stérile.

Matériel et produits nécessaires :

- Support pour le scaffold stérilisé.
- Une paire de pinces à bords mousses stérilisées.
- Une paire de ciseaux stérilisés.
- 4 aiguilles 18g stériles.
- PBS 1X stérile fait à partir de PBS 10X stérile (PBS 10X, Wisent Inc., Cat : 311-012-LL).
- Trypsine-EDTA 0,25 % préchauffée à 37 °C (Trypsin 0.25 % / EDTA 2.21 mM in HBSS, Wisent Inc., Cat : : 325-043-EL).
- Milieu F12/DMEM non décomplémenté (NHI).
- Solution de stérilisation : 0,1 % acide paracétique dans 4 % éthanol => Dans 480 ml MiQ H₂O, mélanger 1,56 ml de solution d'acide paracétique concentré à 32 % (Paracetic acid, Sigma Aldrich, Cat : 269336-100ML) + 20 ml d'Éthanol absolu.
- Plaque de culture 24 puits.
- Plaque de culture 6 puits.

Protocole :

1. Préparation des scaffolds :

Note : Toujours travailler sous la hotte biologique.

- Choisir la portion de scaffold sur laquelle on va travailler (éviter autant que possible d'avoir du gros cartilage car il gêne dans la manipulation). Donc, choisir des bronches Intermédiaires entre la 2^{ème} et la 4^{ème} génération car le cartilage y est mou et plus facile à manipuler.
- Stériliser 1h dans la solution de stérilisation.
- Rincer le scaffold dans plusieurs bains de PBS 1X stérile.
- Ouvrir la bronche décellularisée en 2 et la fixer sur le rack stérile à l'aide des aiguilles 18g stériles.
- Avec les ciseaux, découper le scaffold en morceaux d'un maximum de 1/1cm.
- Réserver dans 50 ml de PBS 1X stérile.

2. Préparation des CML :

- Ajouter 4 ml de trypsine aux CML à confluence de P4 ou P5 dans une flasque T175 et incuber quelques minutes à 37 °C et 5 % CO₂ pour les décoller du fond.
- Ajouter du milieu de culture DMEM / F12 non décomplémenté (NHI), préalablement préparé.

3. Recellularisation :

- Transférer les morceaux de scaffolds dans une plaque 24 puits.
- Rajouter un ratio de 3X CML au-dessus des scaffolds (environ 300 000 à 350 000 cellules/puit).
- Ajouter du milieu de culture frais.
- Incuber 48h à 37 °C et 5 % CO₂.

4. Suivi de la recellularisation :

- Faire en sorte de rajouter 1,5 ml de milieu frais/changement de milieu sans dénuder entièrement le tissu à chaque fois.
- Surveiller quotidiennement la recellularisation (les morceaux des différents scaffolds peuvent ne pas évoluer de la même façon ni à la même vitesse).

- Transférer les scaffolds reccellularisés vers une plaque 6 puits à J31.

Note : Un puit témoin des cellules et un puit témoin (non reccellularisé) du tissu sont nécessaires pour vérifier la qualité des cellules et de la reccellularisation.

5. Prélèvement :

- Prélever les tissus à J41 dans du Formol à 10 % pour un montage en paraffine.
- Colorations histologiques.

Annexe III : Protocole de coloration histologique Movat

Pentachrome

Solutions à préparer :

NB : toutes les solutions doivent être mélangées dans des béchers en verre et filtrer à l'étape du transvasement vers les bouteilles.

➤ À préparer à l'avance :

- Solution Alcian blue 1 % (pour 100 ml) :
 - Alcian blue (1 g)
 - Eau distillée (100 ml)
 - Acide acétique glacial (2 ml)

Mélanger la solution et la filtrer. Conserver à la température de la pièce.

- Alcool alcalin (pour 100ml) :
 - Hydroxide d'ammonium (10 ml)
 - Alcool 95 % (90 ml)
- Solution iodine-iodine (pour 100 ml) :
 - Iodine (2 g)
 - Iodine de potassium (2 g)
 - Eau distillée (100 ml)

Ajouter l'iodine et l'iodine de potassium à 25 ml d'eau distillée et mélanger jusqu'à dissolution. Ajouter le reste de l'eau ensuite.

L'iodine ne se dissout pas complètement

- Hématoxyline alcoolique 10 % (pour 100 ml) :
 - Hématoxyline (10 g)
 - Alcool (histological grade) (100 ml)

Mélanger 15 min. et filtrer. L'hématoxyline ne sera pas complètement dissoute, un résidu sablonneux persiste. Aussi, elle met du temps à filtrer.

- Chlorure ferrique 10 % (pour 100ml) :
 - Chlorure ferrique (10 g)
 - Eau distillée (100 ml)

Bien mélanger à la pipette et insister sur le fond du bécher car le Chlorure Ferrique a tendance à s'accoler et se solidifier au fond de celui-ci.

- Thiosulfate de sodium 5 % (pour 100 ml) :
 - Thiosulfate de sodium (5 g)
 - Eau distillée (100 ml)
- Safran alcoolique (pour 100 ml) :
 - Safran Gatinais (6 g)
 - Alcool (Histological grade) (100 ml)

J'utilise une solution de Safran Gatinais commerciale, déjà diluée. À garder scellée en tout temps.

- Solutions pour le mélange crocein scarlet – acid fuchsin :
 - Solution A (pour 100 ml):
 - Crocein scarlet (1 g)
 - Eau distillée (99,5 ml)
 - Acide acétique glacial (0,5 ml)
 - Solution B (pour 100 ml) :
 - Acid fuschin (1 g)
 - Eau distillée (99,5 ml)
 - Acide acétique glacial (0,5 ml)

- Solution d'acide phosphotungstique 5 % (pour 100 ml) :
 - Acide phosphotungstique (5 g)
 - Eau distillée (100 ml)
- Solutions à préparer pendant l'expérience (ou juste avant) :

- Solution d'hématoxyline :
 - Hématoxyline alcoolique 10 %
 - Alcool absolu
 - Chlorure ferrique 10 %
 - Solution iodine-iodine

Mélanger avec un ratio 1 : 1 : 1 : 1

- Solution de chlorure ferrique 2 % :
 - Chlorure ferrique 10 %
 - Eau distillée

Mélanger avec un ratio 1 : 4

- Solution crocein scarlet – acid fuchsin :
 - Solution A
 - Solution B

Mélanger avec un ratio 4 : 1 (Solution A : Solution B)

- Solution d'acide acétique 0,5 % (pour 100 ml) :
 - Acide acétique glacial (0,5 ml)
 - Eau distillée (99,5 ml)

Coloration Movat :

- I. Déparaffinage et réhydratation des lames :

Tremper les lames dans des bacs contenant les solutions suivantes en agitant doucement.

1. Xylène 10 min.
2. Éthanol 100 % 3 min.
3. Éthanol 95 % 2 min.
4. Éthanol 70 % 2 min.
5. Eau courante 5 min en changeant l'eau du bain une fois.

II. Coloration

1. Tremper les lames dans la solution d'alcian blue 1 % pendant 20 min.

Le bleu alcian est fixé grâce à une liaison électrostatique avec les mucopolysaccharides acides et donne une couleur bleue aux glycosaminoglycanes sulfatés et à la mucine.

2. Laver à l'eau courante pendant 5 min.
3. Tremper les lames dans l'alcool alcalin pendant 1 heure.

L'alcool alcalin permet de transformer l'alcian blue en un pigment insoluble dit "monastral fast blue". Donc, permet la fixation du bleu.

4. Laver à l'eau courante pendant 10 min.

Il faut bien nettoyer le tissu de l'alcool alcalin, faute de quoi il y aura une mauvaise fixation de tous les autres colorants et donc une coloration fade.

5. Rincer à l'eau distillée.
6. Tremper les lames dans la solution d'hématoxyline pendant 15 min. Ce temps peut être réduit à 10 minutes pour les tissus parenchymateux ou si les lames ou les tissus ne sont pas frais.

L'Hématoxyline est très affine aux éléments chargés négativement, surtout les noyaux cellulaires et les fibres élastiques qui se colorent respectivement en rouge clair.

7. Rincer dans plusieurs bains d'eau distillée.

8. Tremper les lames dans la solution de chlorure ferrique 2 % jusqu'à ce que les fibres élastiques aient un bon contraste (1 minute).

Permet de contraster les fibres élastiques qui prennent alors une couleur noirâtre.

9. Rincer à l'eau distillée.

10. Tremper les lames dans la solution de thiosulfate de sodium 5 % pendant 1 min.

Fixation de la coloration à l'hématoxyline.

11. Laver à l'eau courante pendant 5 min.

12. Rincer à l'eau distillée.

13. Tremper les lames dans la solution de crocein scarlet – acid fuschin pendant 5 min.

Cette solution permet de colorer les éléments acidophiles en rouge et de différencier les noyaux cellulaires qui prennent alors une couleur bleu foncé à noire.

14. Rincer dans plusieurs bains (5) d'eau distillée.

15. Rincer dans l'acide acétique 0,5 %.

16. Tremper les lames dans 1 bain d'acide phosphotungstic 5 %, 10 min. L'acide phosphotungstic permet la décoloration du collagène et de la réticuline.

17. Rincer dans l'acide acétique 0,5 %.

18. Rincer dans 3 bains d'alcool (histological grade).

19. Tremper dans la solution de Safran du Gatinais pendant 5 min (15 minutes s'il s'agit d'un tissu vieux ou parenchymateux ou d'une vieille lame).

Coloration du collagène et de la réticuline en jaune.

20. Rincer dans 3 bains d'alcool (histological grade).

21. Tremper une minute dans un bain de xylène.

22. Sécher les lames du xylène sous l'hôte.

Fixer des lamelles sur les lames avec une résine synthétique.