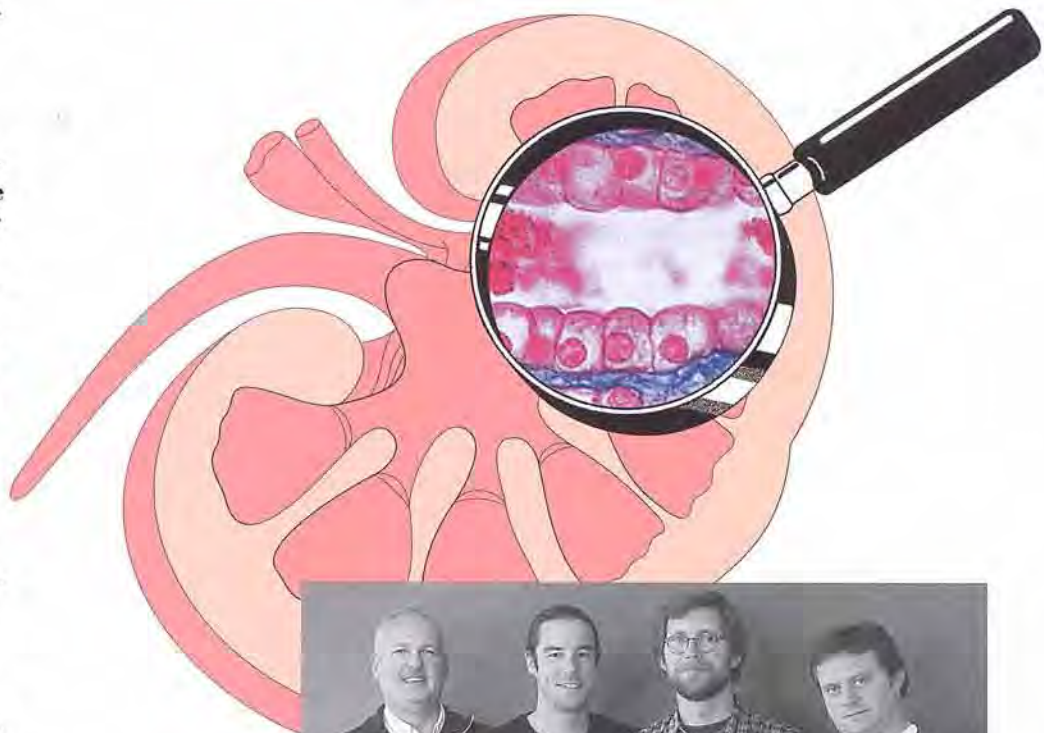


Épithélie – Biomatériaux – Génie tissulaire

Les épithélie forment des barrières fonctionnelles au sein de notre organisme et sont exposés à différents environnements sur leurs parties luminale et basale. Cet aspect important doit être pris en considération lors des essais de nouveaux biomatériaux ainsi que dans le cadre de l'ingénierie tissulaire. Afin d'obtenir des informations réalistes sur les interactions entre les épithélie et la matrice artificielle dans des conditions *in vitro*, les tissus doivent être exposés à des contraintes physiologiques, mécaniques et rhéologiques pendant une période prolongée. Pour éviter tout dysfonctionnement de la barrière épithélie, les fuites ou les différences de pression au sein du système de culture doivent être écartées. En outre, l'environnement cellulaire doit être conçu de manière à prendre en charge la fonction spécifique du tissu de culture et à éviter la dédifférenciation cellulaire. Nous avons développé des méthodes de culture de tissus améliorées parce que ces expériences ne peuvent pas être réalisées dans des bassins de culture conventionnels.



Will W. Minuth, Karl Schumacher, Raimund Strehl, Uwe de Vries

Les nouveaux défis : la recherche sur les biomatériaux et le génie tissulaire

Au-delà du vaste domaine de l'ingénierie des tissus conjonctifs tels que le cartilage et l'os

[1], les épithélie suscitent un intérêt grandissant. Les objectifs fixés aujourd'hui portent sur la création d'équivalents cutanés parfaits [2,3], les implants de vaisseaux [4,5,6], les organoïdes producteurs d'in-

suline [7,8], les modules de foie [9,10] et de rein [11,12] ainsi que le développement de constructs de vessie [13], d'œsophage [14] et de trachée [15]. L'application biomédicale de ces tissus artificiels ne sera une réussite que si les épithélie conservent le degré nécessaire de différenciation fonctionnelle et forment une liaison fonctionnelle étroite avec leur matrice artificielle de support. La matrice artificielle qui assure une stabilité mécanique au construct et le tissu vivant ont une influence réciproque. Il est essentiel d'évaluer *in vitro* la qualité de liaison de cellules épithélie à la matrice de support et la durée pendant laquelle elles peuvent résister à une charge fonctionnelle tout en prés-

ervant une fonction de transport et de barrière spécifique.

Techniques de culture innovantes

S'il existe une multitude de techniques efficaces pour l'expansion de cellules en culture, de nouvelles méthodes sont fondamentalement requises pour la création de constructs tissulaires [2-15]. On sait peu de choses sur la manière dont les cellules embryonnaires se développent dans un épithélium adulte. Des expériences montrent

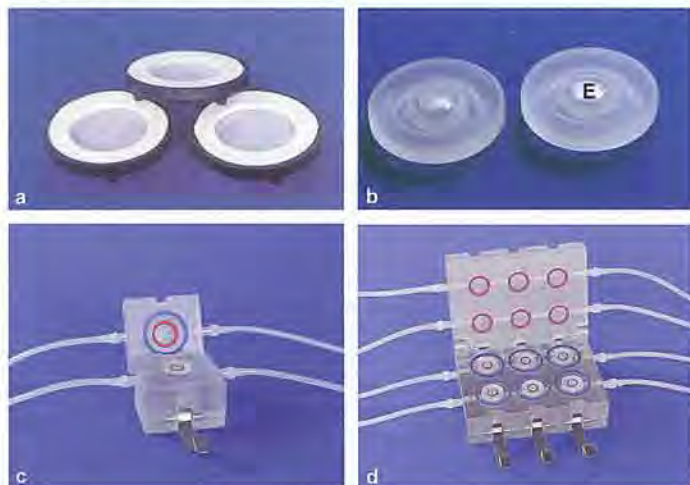


Fig.1 a-d : porteurs de tissus et récipients de perfusion de gradient. a) Les porteurs de tissu peuvent retenir toute matrice artificielle (13 mm de diamètre). b) Porteurs de tissu modifiés pour membranes collagènes. c) Récipient de culture de gradient pour 1 porteur de tissu d) Récipient de culture de gradient pour 6 porteurs de tissu. Les compartiments luminale et basal peuvent être perfusés individuellement.

Mots-clés

Épithélium, recherche sur les biomatériaux, génie tissulaire, culture par perfusion de gradient

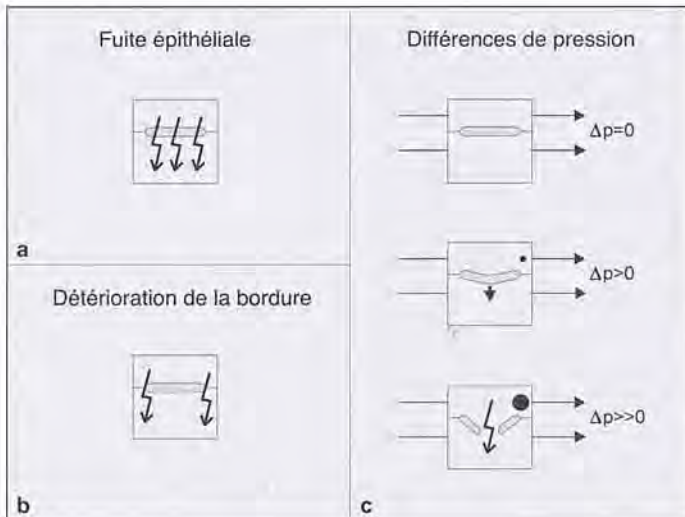


Fig. 2 a-c : représentation schématique de problèmes associés à la culture de gradient d'épithélie. a) Les fuites épithéliales sont provoquées par un contact insuffisant entre les cellules voisines. b) Une détérioration de la bordure peut se produire lorsque le tissu vivant entre en contact avec le porteur de tissu ou le matériau de la cellule extracellulaire artificielle. c) Des différences de pression peuvent rompre la fonction de barrière épithéliale. La situation optimale veut qu'il existe une différence de pression zéro entre les deux compartiments ($\Delta p=0$). Des différences de pression peuvent survenir du fait de la formation unilatérale de bulles de gaz (un petit point noir dans la voie de passage) provoquant une protrusion réversible de l'épithélium vers le compartiment ayant la pression la plus basse ($\Delta p>0$). La formation d'un embole plus important (un grand point noir dans la voie de passage) et des différences de pression croissantes conduisent à la rupture de l'épithélium ($\Delta p>>0$).

qu'une combinaison de facteurs incluant la matrice extracellulaire et le milieu ionique exerce une influence directionnelle sur le développement [16]. Afin de reproduire ces influences, de nouvelles techniques de culture in vitro spécifiques aux tissus deviennent indispensables.

Les porteurs de tissu (Fig.1a, b) qui abritent une grande variété de filtres ou de membranes afin d'y ensemer des cellules épithéliales [16,17] sont placés dans des récipients de culture de gradient. Les récipients sont séparés dans un compartiment luminal et dans un compartiment basal par l'épithélium se développant sur le porteur. Les deux compartiments peuvent être perfusés individuellement afin de créer des environnements individuels pour les épithélias embryonnaires et adultes.

Epithélias sous contrainte permanente

Un problème couramment rencontré dans ces expériences de culture est le développement inachevé ou la

perte de la fonction de barrière épithéliale pendant la culture. Des fuites épithéliales (Fig. 2a) peuvent être provoquées par un manque de confluence cellulaire, une distribution géométrique inégale ou un contact insuffisant entre des cellules voisines. Une détérioration de la bordure (Fig. 2b) est constatée aux endroits de contrainte mécanique accrue où le tissu vivant, le porteur de tissu et la matrice artificielle entrent en contact [18].

Les différences de pression entre les compartiments luminal et basal peuvent conduire à une rupture de l'intégrité épithéliale (Fig. 2c). Dans des conditions parfaites, il n'existe aucune différence de pression entre les compartiments luminal et basal (Fig.2c; $\Delta p=0$). Pendant la transition de la bouteille de stockage au récipient du gradient, les milieux de culture sont saturés par la diffusion de gaz atmosphériques via la tubulure. Des problèmes surviennent lorsque des bulles de gaz s'accroissent de façon unilatérale au sein de la tubulure pour former un em-

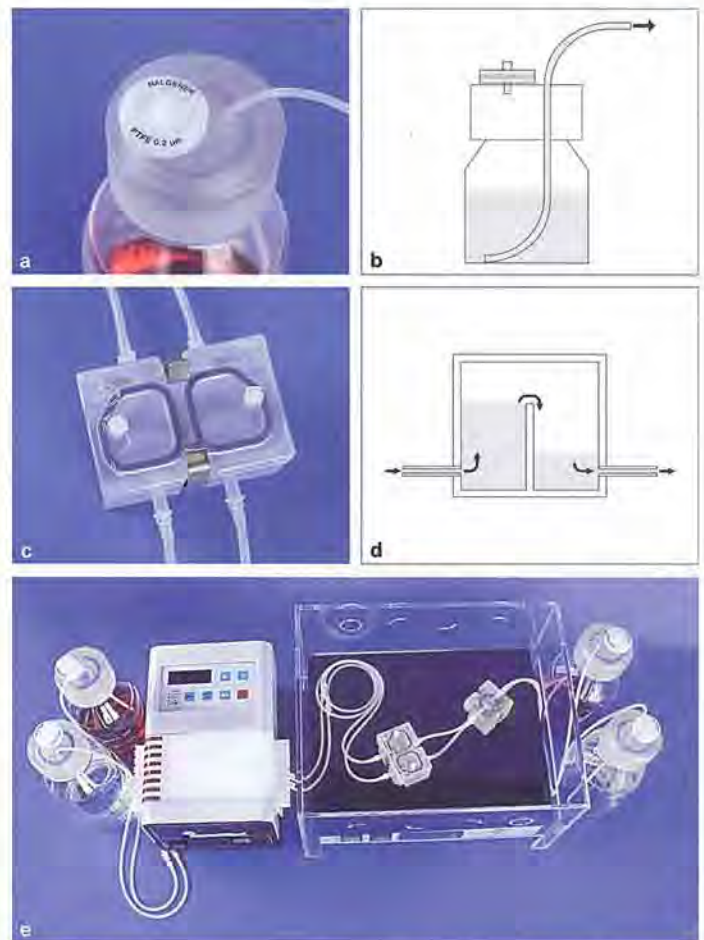


Fig. 3 a-e : nouveaux développements visant à minimiser la formation de bulles dans les expériences de culture de gradient. a,b) Capsules de bouteille spécialement conçues. Le milieu peut être extrait de la bouteille par une tubulure silicone empêchant tout contact avec le matériau de la capsule. c) Module d'expansion des gaz permettant d'éliminer les bulles de gaz. d) Pendant le passage à travers le module d'expansion des gaz, le milieu passe au-dessus d'une barrière forçant les bulles de gaz à se séparer de la phase liquide.

bole conduisant à une augmentation unilatérale de la pression hydrostatique. Les petites différences de pression entraînent une protrusion réversible de l'épithélium (Fig. 2c; $\Delta p>0$). Des différences de pression croissantes aboutissent en dernier lieu à la rupture de l'épithélium (Fig. 2c, $\Delta p>>0$).

Environnement

Pour éviter les différences de pression, la formation de bulles de gaz doit être réduite au minimum. Pour des raisons physiques, les bulles se forment plutôt là où différents matériaux polymères entrent en contact. C'est pour cela que des capsules de bouteille spéciales (Fig. 3a) ont été développées pour permettre d'extraire le milieu de culture de la bouteille par

une tubulure silicone empêchant tout contact avec la capsule ou le matériau du connecteur (Fig. 3b).

Les bulles de gaz peuvent encore être réduites en installant en série un module d'expansion des gaz spécialement conçu à cet effet en amont du récipient de culture du gradient (Fig. 3c).

Les paramètres du milieu dans les expériences de perfusion de gradient sont contrôlés tout au long de la période de culture de 14 jours (Fig. 4) à l'aide d'un analyseur Stat 9 Plus Analyzer (Nova Biomedical) dans des échantillons de 500 µl prélevés de la partie luminaire et de la partie basale, en amont et en aval du récipient de culture du gradient.

Tous les milieux de culture sont tamponnés avec une solution de HEPES (Gibco BRL)

			en amont	en aval
a	IMDM + NaCl luminal	Na ⁺ mmol/l	130,0	129,7
		K ⁺ mmol/l	4,01	3,93
		Cl ⁻ mmol/l	91,5	91,0
		Ca ⁺⁺ mmol/l	1,11	1,11
		Osmolarité mOsm	275	275
	pH	7,4	7,4	
	pO ₂ mmHg	193,7	191,6	
	pCO ₂ mmHg	10,7	6,2	
	Glucose mg/dl	443	443	
	Lactate mmol/l	0	0	
Rouge de phénol	+	+		
b	IMDM basal	Na ⁺ mmol/l	117,7	117,9
		K ⁺ mmol/l	3,96	3,96
		Cl ⁻ mmol/l	79,8	80,4
		Ca ⁺⁺ mmol/l	1,15	1,15
		Osmolarité mOsm	253	253
	pH	7,4	7,4	
	pO ₂ mmHg	191,8	191,6	
	pCO ₂ mmHg	11,9	6,5	
	Glucose mg/dl	446	445	
	Lactate mmol/l	0	0	
Rouge de phénol	-	-		

Fig. 4 : paramètres physiologiques d'une expérience de culture de gradient au bout de 10 jours. Le milieu de culture a été analysé en amont et en aval du récipient de culture dans les voies de passage luminale et basale. Un gradient de 130 mmol/l de Na -luminal- pour 117 mmol/l de Na -basal- est maintenu tout au long de la période de culture démontrant l'intégrité épithéliale.

ou Buffer-All (Sigma) afin de maintenir un pH constant de 7,4 tout au long de la période de culture. L'analyse en amont du récipient montre une pression partielle de CO₂ de 11–12 mmHg en raison du faible contenu de CO₂ dans l'atmosphère de la pièce. De l'autre côté, la haute pression partielle d'O₂ de 191 mmHg provient de la diffusion d'oxygène par la tubulure silicone perméable aux gaz. Les mesures continuellement élevées de glucose et faibles de lactate obtenues en aval du récipient démontrent que l'échange du

milieu est suffisamment élevé pour ne pas entraver les processus aérobies.

En utilisant des milieux de différente couleur côté luminale et côté basale, l'intégrité épithéliale pourrait facilement être contrôlée en vérifiant la séparation nette des couleurs des milieux tout au long de la période de culture. Le contenu électrolytique différent des milieux de culture (par ex. 130 mmol/l -luminal- contre 117 mmol/l de Na -basal-) pourrait être utilisé comme moyen de contrôle supplémentaire dans nos ex-

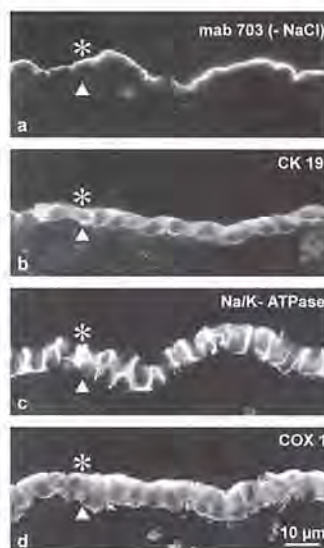


Fig. 5 a-d : profil de différenciation immunohistochimique d'un épithélium de collecteur embryonnaire au bout de 14 jours de culture de gradient. a) Toutes les cellules sont positives pour l'AcM 703 spécifique au tissu. b) Toutes les cellules sont positives pour le kératinocyte 19. c) Toutes les cellules présentent une coloration basolatérale pour l'ATPase de Na/K. d) Toutes les cellules sont positives pour la COX1.

périences. La comparaison du contenu électrolytique luminale et basal en amont et en aval du récipient a été un indicateur sensible de l'intégrité épithéliale.

Modulation des tissus

Le tissu illustré ici est un épithélium embryonnaire provenant du rein d'un mammifère, exposé à un gradient de NaCl dans des conditions de culture sans sérum. Le degré de différenciation cellulaire a été examiné immunohistochemiquement (Fig. 5). Dans des conditions de charge en NaCl, toutes les cellules sont positives pour l'anticorps monoclonal (AcM) 703 (Fig. 5a), le kératinocyte 19 (Fig. 5b), l'ATPase Na/K (Fig. 5c) et la COX1 (Fig. 5d).

Dans des groupes témoins, moins de 10 % des cellules sont positives pour l'AcM 703. Ces expériences démontrent la grande influence que l'environnement électrolytique peut exercer sur la différenciation [19].

Résumé

Ce rapport traite des difficultés expérimentales qui surviennent lors de la culture d'épithélium dans un gradient fluide. Les problèmes sont le plus souvent causés par des bulles de gaz provoquant des différences de pression hydrostatiques. En contre-mesure, de nouvelles capsules de bouteille et des modules d'expansion des gaz ont été conçus permettant une nette réduction des bulles sans diminuer la teneur en oxygène.

Les aspects abordés dans cet article sont une préoccupation particulière pour toutes les expériences de culture à long terme dans le cadre des essais de pharmacologie et de biomatériaux [20].

Produits de culture de tissus, développement et ventes : Minucells et Minutissue GmbH
www.minucells.de

Références bibliographiques

La liste des références bibliographiques peut être obtenue auprès de l'auteur sur demande.

Prof. Dr. W. W. Minuth
Institut d'Anatomie
Université de Regensburg
Universitätsstrasse 31
D-93053 Regensburg; Allemagne
E-mail :
will.minuth@vkl.uni-regensburg.de