



Faculté de génie
Département de génie chimique et de génie biotechnologique

DÉVELOPPEMENT D'UN SYSTÈME
TRIDIMENSIONNEL DE CULTURE CELLULAIRE
POUR ORIENTER LA FORMATION DE
MICROVAISSEAUX

DEVELOPMENT OF A TRIDIMENSIONAL
CELL CULTURE SYSTEM TO ORIENT
MICROVESSEL FORMATION

Thèse de doctorat
Spécialité : génie chimique

Irza SUKMANA

Jury : Professeur Patrick VERMETTE (Directeur)
Professeur Pierre PROULX (Rapporteur)
Professeur Jean-François BEAULIEU
Professeur Elizabeth JONES

As a milestone of our 13th anniversary
I dedicate this work to my wife,
the other half of my soul
Ika Nury Wahidah.

To my mother and the memory of my late father (Almarhum)
To my beloved son and daughters
To brothers and sisters.

RÉSUMÉ :

Le développement de micro-vaisseaux fonctionnels dans la culture de substituts tissulaires constitue un énorme défi du génie tissulaire et la médecine régénératrice. Celui-ci est justifié par la nécessité de permettre une meilleure alimentation en nutriments et oxygène des tissus cultivés et une bonne élimination des déchets à l'intérieur de ceux-ci. C'est la raison pour laquelle seulement quelques substituts de tissus sont disponibles pour des applications médicales. Par conséquent, de nombreuses études de recherche dans le domaine de l'ingénierie tissulaire ont mis l'accent sur la culture de micro-vaisseaux à l'intérieur de matrices tissulaires et ce avant leur implantation, tel que présenté dans le Chapitre 1 de cette thèse. Le Chapitre 2 est consacré à l'étude bibliographique présentant l'évolution récente et les défis futurs liés au processus de micro-vascularisation de substituts tissulaires. Ce processus est souvent appelé pré-vascularisation.

Le travail expérimental présenté dans cette thèse est basé sur l'hypothèse que des mono-filaments polymériques séparés les uns des autres d'une façon précise peuvent être utilisés pour guider des cellules endothéliales dispersées dans un gel de fibrine et ainsi induire des structures tubulaires de façon directionnelle.

Le Chapitre 3 de cette thèse présente la validation de la formation de micro-vaisseaux dans un environnement tridimensionnel. La méthode de culture tissulaire présentée ici utilise des fibres de polymère pour guider des cellules endothéliales et ce afin d'orienter la formation des micro-vaisseaux. La méthode d'attachement cellulaire décrite au Chapitre 3 a permis l'adhérence et la migration de cellules endothéliales humaines de la veine ombilicale (HUVEC) sur des fibres de poly(éthylène téréphtalate) (PET) non-modifiées. Les fibres recouvertes de HUVEC ont été « sandwichées » entre deux gels de fibrine pour permettre le développement des micro-vaisseaux. Le développement de l'angiogenèse a ensuite été caractérisé à l'aide d'un certain nombre de techniques d'imagerie, y compris la microscopie par fluorescence et la microscopie confocale. Après 4 jours de culture, les micro-vaisseaux formaient de grandes structures en forme de tube (diamètre d'environ 100 μ m) entre les fibres adjacentes distancées de 0.1 mm.

Le Chapitre 4 présente d'un côté l'étude de l'effet des fibroblastes humains et, d'un autre côté, l'influence de deux facteurs de croissance angiogéniques (i.e., *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) et le *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF)) sur les réponses des HUVEC recouvrant les fibres de PET cultivées en sandwich dans des gels de fibrine. Le développement et la maturation des micro-vaisseaux ainsi que la formation des lumens ont été étudié par microscopie confocale en utilisant une matrice de fibrine fluorescente et par histologie. L'histologie et les expériences menées avec la fibrine fluorescente ont confirmé que ces pseudo-micro-vaisseaux formés entre les fibres de polymère incorporées dans la fibrine avaient un lumen. Les effets du VEGF et du bFGF étaient fonction de la concentration de ces molécules. L'utilisation de fibroblastes a considérablement amélioré la maturation des micro-vaisseaux comparativement aux échantillons contrôles et ceux cultivés avec le VEGF et le bFGF.

La conclusion et les propositions pour des travaux futurs constituent le Chapitre 5.

Les Annexe A et B présentent, respectivement, les protocoles détaillés utilisés dans cette étude pour marquer les cellules et des informations générales sur le cytosquelette.

Mots-clés: *polyéthylène téréphtalate; orientation cellulaire; angiogenèse directionnelle; micro-vaisseaux; lumens multi-cellulaires; cultures en bioréacteur.*

ABSTRACT

The development of functional and oriented microvessels within tissue constructs is a tremendous challenge in tissue engineering and regenerative medicine. It is justified by the need to allow better nutrient and oxygen supply and waste removal within the core of tissue constructs. It is one of the reasons why only few tissue substitutes are available to clinicians. Therefore, the focus of many research studies in the field of tissue engineering has been placed on promoting microvessel ingrowth inside tissue constructs prior to their implantation, as presented in Chapter 1. This process is often referred to as pre-vascularization. As such, Chapter 2 of this thesis is devoted to review the recent development and future challenges related to the microvascularization process of tissue constructs.

The experimental work in this thesis is based on the hypothesis that polymer monofilaments precisely distanced from each others can be used to guide endothelial cells when dispersed in a (fibrin) gel and to induce tube-like structures in a directional fashion. In Chapter 3 of this thesis, the use of polymer fibres as contact guidance of endothelial cells to orient microvessel formation and development in a three-dimensional environment was validated. The novel cell attachment method described in Chapter 3 has resulted in an increase in Human Umbilical Vein Endothelial Cell (HUVEC) adhesion and spreading on bare poly(ethylene terephthalate) (PET) fibres. Furthermore, HUVEC-covered fibres were sandwiched between fibrin gels to allow the development of microvessels. Angiogenesis development was characterized and evaluated using a number of imaging techniques, including fluorescence microscopy and confocal microscopy. After 4 days of culture, microvessels formed large tube-like structures (diameter of approximately 100 μm) between adjacent fibres distanced by 0.1mm. This proof-of-concept opens the door to other experiments and to possibility to scale the system to bioreactor cultures.

In Chapter 4, the effect of human fibroblasts and in another set of experiments, the influence of two angiogenic growth factors (i.e., Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)) over the responses of the HUVEC-covered fibres sandwiched in fibrin were investigated. The development and maturation of microvessels as

well as the assessment of lumen formation were evaluated using a fluorescent fibrin matrix, confocal microscopy and histology. Histology and fluorescent fibrin experiments confirmed that these microvessel-like structures formed between polymer monofilaments embedded in fibrin contained a lumen. The effects of VEGF and bFGF were dose dependent. Furthermore, the use of fibroblasts significantly improved the maturation of the microvessels compared to control and to samples cultured with VEGF and bFGF.

Conclusions and suggested future work are presented in Chapter 5.

Appendices A and B present the detailed protocols used to label cells in this study and general information about cell cytoskeleton, respectively.

Keywords: *Polyethylene terephthalate; Contact guidance; Cell patterning; Directional angiogenesis; Microvessel formation; multi-cellular lumen; bioreactor cultures.*

Acknowledgements

First of all, I would like to express my sincere gratitude to my supervisor Professor Patrick Vermette, whose enthusiastic support and good advices helped me to go through my challenging project.

I am very honoured to have Professor Pierre Proulx and Professor Jean-François Beaulieu for their guidance and for being my pre-Doctoral examiners.

A very special thanks to Mr. Yannick Laplante and Dr. Aftab Ahamed, former members of the Laboratoire de Bioingénierie et de Biophysique de l'Université de Sherbrooke, for their precious help when I started my Ph.D. I thank them also for their hints on general technical and scientific aspects.

I also want to thank all my friends in the group for sharing their ideas and for scientific discussions on daily basis during this course.

I should thank all the technicians in the Department of Chemical and Biotechnological Engineering, especially Mr. Mark Couture for his help in designing and producing frames and culture chambers for my research. Also, I want to thank Mr. Gilles Grondin and Dr. Leonid Volkov for their contribution in confocal microscopy and Mrs. Johanne Dussault and Dr. Sameh Geha who helped me with histology.

I am particularly thankful to my sponsor, the Islamic Development Bank (IDB), for all financial support and living guidance for me and my family.

I am also very grateful to the Muslim community in Sherbrooke who has given me an invaluable support and help in countless ways. I will never forget the support provided by dear brothers: Hendra Hermawan, Abdelfettah and Rachid Bannari, Brahim Selma, Mbark El Morsli, Rachid Kadouche, Taha Abd-El-Rahman, Ahmad Kamal, Hamdy and Habibie, Deyab El-Gamal, Ahmed Omran, Said and Hoccain and others, "Jazakumullahu khairan katsiran".

Finally, my most acknowledgment goes to my adorable wife, adik Ika Nury Wahidah, and our lovely kids: Muhammad, Wafa and Sky. The word “Thanks” is never enough for their love, patience and encouragement. May Allah SWT give you all the best rewards. Amen.