



DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT

(Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : **28 août 2017**

Nom de famille et prénom de l'auteur : **Antoine ALVES**

Titre de la thèse : « Approche novatrice de l'évaluation de la régénération des tissus mous en histopathologie quantitative »



RÉSUMÉ DE THÈSE :

Le basculement de paradigme apporté par le développement considérable de l'ingénierie tissulaire et de la médecine régénérative par rapport à l'approche thérapeutique utilisant les biomatériaux, questionne aujourd'hui les méthodes d'évaluation en histopathologie de la réponse locale de ces thérapies avancées. Les outils d'évaluation actuellement disponibles en histopathologie ne sont pas pleinement satisfaisants pour l'évaluation de ces thérapies avancées, notamment en matière d'évaluation de leur performance. Nous avons développé une nouvelle méthode quantitative numérique, simple, peu coûteuse fournissant des indicateurs clés pour la caractérisation structurelle et compositionnelle des tissus régénérés. Cet indicateur mesure le taux de croissance tissulaire prenant en compte deux autres indicateurs : le taux de croissance cellulaire (CIR) et le contenu total en collagène (TCC), traduisant l'équation suivante $TIR (\%) = CIR (\%) + TCC (\%)$. D'autre part, un sous-ensemble d'indicateurs quantitatifs décrivant l'organisation directionnelle du collagène (relation entre structure et propriétés mécaniques des tissus), le ratio collagène 1 / collagène 3 et la propriété anisotropique optique du collagène (indicateur de maturité), a été également produit automatiquement. À l'aide d'un analyseur d'images assisté par ordinateur tous les indicateurs sont extraits uniquement à partir de deux lames sériées colorées soit avec du Feulgen & Rossenbeck (spécificité cellulaire) ou avec la coloration au rouge picrosirius F3BA (spécifique du collagène). Pour valider cette nouvelle approche, des échafauds 3D identiques ont été implantés en site intrapéritonéal chez un groupe de rats sains et chez un groupe de rats diabétiques. L'hypothèse émise était que quantitativement le tissu régénéré serait significativement retardé et défectueux chez les rats diabétiques par rapport aux rats sains. De plus, un échafaud 3D chimiquement modifié a été similairement implanté chez un troisième groupe de rats sains avec l'hypothèse qu'une modulation de la croissance tissulaire serait mise en évidence quantitativement par rapport au groupe de rats sains implantés avec l'échafaud 3D non modifié. Après 21 jours d'implantation, les deux hypothèses ont été vérifiées validant cette nouvelle approche d'analyse quantitative informatisée. Les résultats quantitatifs ont révélé des différences fines au niveau des détails tissulaires qui n'ont pas été détectées par l'évaluation semi-quantitative conduite en parallèle. Cette méthode automatisée et supervisée réduit la dépendance à l'opérateur à un minimum et s'est montrée sensible, simple, peu coûteuse et permettant

de gagner du temps. Elle offre le double avantage d'objectiver les comparaisons thérapeutiques et de comprendre la régénération des tissus fonctionnels localement et dans le temps.

Mots clés: colonisation tissulaire, régénération, échafaud, cicatrisation, ingénierie tissulaire, polarisation, anisotropie, ratio collagène I/III, directionnalité, diabète, pathologie quantitative.

Abstract

The paradigm shift brought about by the expansion of tissue engineering and regenerative medicine away from the use of biomaterials, currently questions the value of histopathologic methods in the evaluation of biological changes. To date, the available tools of evaluation are not fully consistent and satisfactory for these advanced therapies. We have developed a new, simple and inexpensive quantitative digital approach that provides key metrics for structural and compositional characterization of the regenerated tissues. For example, metrics provide the tissue ingrowth rate (TIR) which integrates two separate indicators; the cell ingrowth rate (CIR) and the total collagen content (TCC) as featured in the equation, $TIR\% = CIR\% + TCC\%$. Moreover a subset of quantitative indicators describing the directional organization of the collagen (relating structure and mechanical function of tissues), the ratio of collagen I to collagen III and the optical anisotropy property of the collagen (maturity indicator) was automatically produced as well. Using an image analyzer, all metrics were extracted from only two serial sections stained with either Feulgen & Rossenbeck (cell specific) or Picrosirius Red F3BA (collagen specific). To validate this new procedure, 3D scaffolds were intraperitoneally implanted in healthy and diabetic rats. It was hypothesized that quantitatively; the healing tissue would be significantly delayed and of poor quality in diabetic rats in comparison to healthy rats. In addition, a chemically modified 3D scaffold was similarly implanted in a third group of healthy rats with the assumption that modulation of the ingrown tissue would be quantitatively present in comparison to the 3D scaffold-healthy group. After 21 days of implantation, both hypotheses were verified by use of this novel computerized approach. When the two methods were run in parallel, the quantitative results revealed fine details and differences not detected by the semi-quantitative assessment, demonstrating the importance of quantitative analysis in the performance evaluation of soft tissue healing. This automated and supervised method reduced operator dependency to a minimum and proved to be simple, sensitive, cost-effective, time-effective, a way of doing objective therapeutic comparisons and a way to elucidate regeneration and the dynamics of a functional tissue.

Key words: tissue ingrowth, regeneration, scaffold, wound healing, tissue engineering, polarization, anisotropy, ratio collagen I/III, directionality, diabetes, quantitative pathology.