

ANNÉE 2022

N°

**THÈSE**  
**pour le**  
**DIPLÔME D'ÉTAT**  
**DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**par**

**Thomas Massaloup**

-----

*Présentée et soutenue publiquement le 17/10/2022*

**L'ingénierie tissulaire et les médicaments de thérapie  
innovante qui en sont issus : promesses et réalité**

**Président :** **Mr Johann CLOUET**, Professeur de Pharmacie Galénique,  
UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologique de Nantes.

**Membres du jury :** **Mr Gaël GRIMANDI**, Professeur de Biophysique et  
Pharmacie Galénique, UFR Sciences Pharmaceutiques et  
Biologique de Nantes.

**Mme Sophie FOUGERAY**, Maître de Conférences  
d'Immunologie, UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologique  
de Nantes.

**Mr Jean-Baptiste DUPONT**, Docteur en Biologie, Nantes.



ANNÉE 2022

N°

**THÈSE**  
**pour le**  
**DIPLÔME D'ÉTAT**  
**DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**par**

**Thomas Massaloup**

-----

*Présentée et soutenue publiquement le 17/10/2022*

**L'ingénierie tissulaire et les médicaments de thérapie  
innovante qui en sont issus : promesses et réalité**

**Président :** **Mr Johann CLOUET**, Professeur de Pharmacie Galénique,  
UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologique de Nantes.

**Membres du jury :** **Mr Gaël GRIMANDI**, Professeur de Biophysique et  
Pharmacie Galénique, UFR Sciences Pharmaceutiques et  
Biologique de Nantes.

**Mme Sophie FOUGERAY**, Maître de Conférences  
d'Immunologie, UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologique  
de Nantes.

**Mr Jean-Baptiste DUPONT**, Docteur en Biologie, Nantes.



# REMERCIEMENTS

---



# SOMMAIRE

---

|   |    |
|---|----|
| REMERCIEMENTS .....   | 3  |
| SOMMAIRE .....  | 5  |
| TABLE DES FIGURES.....  | 8  |
| TABLE DES TABLEUX.....  | 11 |
| ABBREVIATIONS .....   | 12 |
| INTRODUCTION.....   | 15 |
| <hr/>   |    |
| PARTIE I : L'INGENIERIE TISSULAIRE .....  | 17 |
| <hr/>   |    |
| I- DE L'ORIGINE DU CONCEPT A LA DEFINITION ACTUELLE .....                       | 18 |
| I-1. HISTORIQUE .....   | 18 |
| I-2. ACTUELLEMENT .....   | 25 |
| II- MATERIAUX ET PROCEDES.....  | 27 |
| II-1. MATERIAUX.....  | 27 |
| II-1.1. CELLULES .....  | 28 |
| II-1.1.1. Cellules souches embryonnaires .....                                  | 32 |
| II-1.1.2. Cellules souches pluripotentes induites.....                          | 35 |
| II-1.1.1. Cellules souches adultes .....  | 39 |
| II-1.2. BIOMATERIAUX.....   | 43 |
| II-1.2.1. Définition .....  | 44 |
| II-1.2.2. Evolution et propriétés essentielles .....                            | 45 |
| II-1.2.3. Principales propriétés des biomatériaux d'ingénierie tissulaire ..... | 47 |
| II-1.2.4. Paramètres clés des biomatériaux d'Ingénierie Tissulaire .....        | 49 |
| II-1.2.5. Classes de biomatériaux utilisés en Ingénierie Tissulaire.....        | 54 |
| II-1.2.5.1. Céramiques .....  | 54 |
| II-1.2.5.2. Métaux.....   | 56 |
| II-1.2.5.3. Polymères synthétiques.....   | 56 |
| II-1.2.5.4. Polymères naturels .....  | 58 |
| II-1.2.5.5. Hydrogels.....  | 61 |
| II-1.2.5.6. Biomatériaux intelligents.....                                      | 62 |
| II-1.3. COFACTEURS.....   | 66 |
| II-2. PROCEDES DE FABRICATION .....   | 69 |

|                    |   |            |
|--------------------|---|------------|
| II-2.1.            | PROCEDES DE FABRICATION CONVENTIONNELS .....  | 69         |
| II-2.1.1.          | Moulage par solvant et lixiviation des particules .....   | 69         |
| II-2.1.2.          | Séparation de phase.....  | 70         |
| II-2.1.3.          | Lyophilisation.....   | 70         |
| II-2.2.            | PROCEDES DE FABRICATION AVANCES .....   | 71         |
| II-2.2.1.          | Electrofilage .....   | 71         |
| II-2.2.2.          | Technologies d'impression tridimensionnelle .....   | 73         |
| II-2.2.2.1.        | <i>Stéréolithographie .....</i>   | <i>73</i>  |
| II-2.2.2.2.        | <i>Bio-impression par jet d'encre.....</i>  | <i>75</i>  |
| II-2.2.2.3.        | <i>Bio-impression par extrusion.....</i>  | <i>76</i>  |
| II-2.2.2.4.        | <i>Bio-impression assistée par laser.....</i>   | <i>77</i>  |
| II-2.2.3.          | Organoïdes.....   | 77         |
| II-2.2.4.          | Bioréacteurs.....   | 80         |
| <b>III-</b>        | <b>DOMAINES D'APPLICATIONS.....</b>   | <b>82</b>  |
| III-1.             | MODELES D'ETUDES .....  | 82         |
| III-1.1.           | EN RECHERCHE FONDAMENTALE .....   | 82         |
| III-1.2.           | EN RECHERCHE PRECLINIQUE.....   | 85         |
| III-2.             | APPLICATION EN CLINIQUE .....   | 90         |
| <hr/>              |   |            |
| <b>PARTIE II :</b> | <b>APPLICATIONS CLINIQUES DE L'INGENIERIE TISSULAIRE .....</b>  | <b>93</b>  |
| <hr/>              |   |            |
| <b>I-</b>          | <b>L'EMERGENCE D'UNE INDUSTRIE.....</b>   | <b>94</b>  |
| I-1.               | DEBUTS PROMETTEURS ET FORTE CROISSANCE.....   | 94         |
| I-2.               | DIFFICULTES ET CONTRACTION ECONOMIQUE .....   | 95         |
| I-3.               | REPRISE COHERENTE.....  | 97         |
| <b>II-</b>         | <b>CADRE REGLEMENTAIRE.....</b>   | <b>102</b> |
| II-1.              | EN FRANCE .....   | 102        |
| II-1.1.            | DEFINITION .....  | 102        |
| II-1.2.            | AUTRES PRODUITS TISSULAIRES .....   | 106        |
| II-1.3.            | SPECIFICITES DE L'ENCADREMENT DES MTI .....   | 107        |
| II-1.4.            | PRODUITS ENTRANT DANS LA FABRICATION ET/OU LA COMPOSITION DES<br>MEDICAMENTS ISSUS DE L'INGENIERIE TISSULAIRE ..... | 110        |
| II-2.              | HORS DE L'UNION EUROPEENNE .....  | 111        |

|   |            |
|---|------------|
| <b>III- MEDICAMENTS ISSUS DE L'INGENIERIE TISSULAIRE.....</b>     | <b>114</b> |
| III-1. PRODUITS COMMERCIALISES.....                               | 114        |
| III-2. FOCUS SUR QUELQUES PRODUITS.....                           | 121        |
| III-2.1. SPHEROX® .....   | 123        |
| III-2.2. APLIGRAF® .....  | 128        |
| III-3. PRODUITS EN ESSAI CLINIQUE .....                           | 133        |
| <b>IV- DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>                        | <b>138</b> |
| IV-1. LES OBJECTIFS DE L'IT .....                                 | 138        |
| IV-2. LES DEFIS SCIENTIFIQUES.....                                | 140        |
| IV-2.1. BIOMATERIAUX.....   | 140        |
| IV-2.2. CELLULES .....  | 141        |
| IV-2.3. PROCEDES DE FABRICATION ET INTEGRATION DES MATERIAUX..... | 143        |
| IV-3. LES DEFIS ECONOMIQUES ET REGLEMENTAIRES.....                | 144        |
| IV-3.1. MAITRISER LA PRODUCTION.....                              | 144        |
| IV-3.2. ADAPTER LA REGLEMENTATION .....                           | 145        |
| IV-3.3. PROUVER L'EFFICACITE .....                                | 146        |
| IV-3.4. OBTENIR UN REMBOURSEMENT .....                            | 147        |
| IV-4. QUELQUES PISTES D'EVOLUTION.....                            | 148        |
| <b>CONCLUSION .....</b>   | <b>150</b> |
| <b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>  | <b>151</b> |

## TABLE DES FIGURES

---

|   |    |
|---|----|
| Figure 1 : Remplacement de tissus ou organes via des greffes. ....  | 19 |
| Figure 2 : Epithélium cultivé par H. Green <i>et al.</i> à partir d'une seule cellule épithéliale. ....   | 21 |
| Figure 3 : Joseph P. Vacanti (gauche) et Robert S. Langer (droite). ....  | 23 |
| Figure 4 : Nombre de publications référencées sur PubMed mentionnant le terme "tissue engineering" dans leur titre ou résumé par année .....  | 23 |
| Figure 5 : L'analyse bibliométrique de l'Ingénierie Tissulaire confirme que c'est un domaine multidisciplinaire et en phase de consolidation, notamment via la parution croissante d'articles de revue..... | 24 |
| Figure 6 : Substitut cellulaire de peau vivant Apligraf.....  | 25 |
| Figure 7 : Représentation schématique des différents paramètres de l'Ingénierie Tissulaire. ....  | 27 |
| Figure 8 : Types de cellules ou de tissu greffés selon l'organisme dont ils proviennent.....  | 28 |
| Figure 9 : Répartition entre les deux feuilletts du grand omentum d'un macaque de capsules d'alginate contenant des cellules allogéniques d'ilots $\beta$ de pancréas.....                                  | 30 |
| Figure 10 : Différente sources de cellules souches pour l'ingénierie tissulaire. ....   | 32 |
| Figure 11 : Les cellules souches embryonnaires. ....  | 34 |
| Figure 12 : Schéma explicatif de l'utilisation des iPSCs humaines pour la modélisation pathologique A) et en médecine régénérative B).....  | 37 |
| Figure 13 : Exemples de transdifférenciation et des facteurs de transcription utilisés. ....  | 38 |
| Figure 14 : Les cellules souches mésenchymateuses.....  | 41 |
| Figure 15 : Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) et les macrophages communiquent entre eux. ....   | 42 |
| Figure 16 : Matrice extracellulaire (MEC). ....   | 44 |
| Figure 17 : Différentes générations de biomatériaux pour une relation toujours plus étroite avec l'organisme.....   | 46 |
| Figure 18 : Images de microscopie électronique à balayage de tissu adipeux porcin avant (C) et après (D) décellularisation.....   | 48 |
| Figure 19 : Paramètres structuraux et physico-chimiques des biomatériaux influençant leur interaction avec les cellules.....  | 52 |
| Figure 20 : Micrographie de microscope électronique à balayage (A,B,C,D) d'échafaudage macroporeux d'hydroxyapatite vue à différents grossissements ; (E) d'os trabéculaire.....                            | 55 |

|  |     |
|--|-----|
| Figure 21 : Micrographie de microscopie électronique à balayage de fibroblastes de souris cultivés sur un matériau d'échafaudage nanofibreux électrofilé composé de polycaprolactone et de gélatine..... | 57  |
| Figure 22 : Micrographie de microscopie électronique à balayage d'un échafaudage en composite de polymère naturels pour la culture d'hépatocytes. ....   | 60  |
| Figure 23 : Les hydrogels, forme de biomatériaux polymérique prometteuse pour l'ingénierie tissulaire. ....  | 62  |
| Figure 24 : Trois stratégies pour l'immobilisation de cofacteurs au sein de biomatériaux.....  | 66  |
| Figure 25 : Les différentes étapes de fabrication d'un échafaudage macroporeux en biomatériau par moulage par solvant et lixiviation des particules. ....  | 70  |
| Figure 26 : Schéma illustrant le principe du procédé de fabrication par électrofilage. ....  | 72  |
| Figure 27 : Schéma illustrant le principe du procédé de fabrication par stéréolithographie classique et DLP. ....  | 74  |
| Figure 28 : Schéma illustrant le principe des procédés de bio-impression par jet d'encre, par extrusion et assistée par laser. ....  | 77  |
| Figure 29 : Description du système de culture d'organoïdes cérébraux.....  | 79  |
| Figure 30 : Schéma de bioréacteurs pouvant créer des flux de milieu de culture adaptés aux tissus. ...   | 81  |
| Figure 31 : Gels de fibrine permettant la culture en trois dimensions de myoblastes. ....  | 83  |
| Figure 32 : Image de microscopie en immunofluorescence de myotubes issus d'une lignée de myoblastes humains cultivés dans des gels de fibrines après 10 jours de différenciation... ..                   | 84  |
| Figure 33 : Image de microscopie en immunofluorescence de myotubes issus d'une lignée de myoblastes humains cultivés dans des gels de fibrines après 10 jours de différenciation... ..                   | 85  |
| Figure 34 : Tubule contourné proximal 3D sur puce.....   | 88  |
| Figure 35 : Augmentation du plancher sinusien par ostéosynthèse à partir d'un échafaudage de collagène contenant le facteur de croissance rhBMP-2.....   | 91  |
| Figure 36 : La « souris de Vacanti ».....  | 94  |
| Figure 37 : Les premières entreprises d'IT ne génèrent pas assez de revenus pour compenser leurs pertes, les investisseurs perdent patience et la faillite ne tarde pas. ....                            | 96  |
| Figure 38 : Courbe de Gartner ou "cycle du hype" décrivant l'évolution de l'intérêt pour une nouvelle technologie.....   | 101 |
| Figure 39 : Procédure centralisée d'autorisation de mise sur le marché pour les MTI dans l'Union Européenne.....   | 109 |
| Figure 40 : Répartition des médicaments issus de l'ingénierie tissulaire actuellement commercialisés.....  | 121 |

|  |     |
|--|-----|
| Figure 41 : Indication de SPHEROX® : les lésions du cartilage de stade ICRS III ou IV inférieures à 10 cm <sup>2</sup> . ..... | 124 |
| Figure 42 : Processus d'adhésion et d'intégration des sphéroïdes autologues à la lésion. ....                                  | 126 |
| Figure 43 : Administration de SPHEROX® sous arthroscopie d'un coude droit en décubitus latéral. ...                            | 127 |
| Figure 44 : Apligraf® est un substitut de peau bicouche.....   | 129 |
| Figure 45 : Etapes de l'implantation d'Apligraf® sur un ulcère. ....   | 131 |
| Figure 46 : Utilisation d'Apligraf® dans le traitement d'un ulcère veineux de la jambe de 4 mois chez un homme de 77 ans. .... | 132 |
| Figure 47 : Répartition de produits issus de l'ingénierie tissulaire actuellement en essai clinique. ....                      | 134 |

## TABLE DES TABLEAUX

---

|   |     |
|---|-----|
| Tableau 1 : Résumé des caractéristiques des principales classes de biomatériaux utilisés en ingénierie tissulaire. ....                                       | 65  |
| Tableau 2 : Grandes familles de facteurs de croissance, fonctions et applications cliniques. ....   | 67  |
| Tableau 3 : Résultats majeurs en recherche fondamentale et préclinique des systèmes d'organe-sur-puce pour différents organes. ....                           | 87  |
| Tableau 4 : Activité commerciale en médecine régénérative et valeur du capital des entreprises de médecine régénérative cotées en bourse de 1994 à 2007. .... | 97  |
| Tableau 5 : Aperçu des principaux éléments réglementaires applicables aux produits issus de l'Ingénierie Tissulaire pour les différentes juridictions. ....   | 113 |
| Tableau 6 : Médicaments issus de l'ingénierie tissulaire commercialisés (ou l'ayant été) dans le monde. ....  | 117 |
| Tableau 7 : Produits issus de l'Ingénierie Tissulaire en essais cliniques de phase 2 ou 3. ....   | 136 |

## ABBREVIATIONS

---

**2D** : Bidimensionnel

**3D** : Tridimensionnel

**3R** : Remplacer, Réduire, Raffiner

### -A-

**ACI** : Implantation de Chondrocytes Autologues

**ADN** : Acide DésoxyRibonucléique

**ARN** : Acide RiboNucléique

**AMM** : Autorisation de Mise sur le Marché

**ANSM** : Agence Nationale de Sécurité du Médicament

**ATMP** : Advanced Therapy Medicinal Products

### -B-

**BLA** : Biologics Licences Application

**BMP** : Protéine morphogénétique osseuse (Bone Morphogenetic Protein)

**BPF** : Bonnes Pratiques de Fabrication

### -C-

**CAO** : Conception Assistée par Ordinateur

**CAT** : Comité pour les Thérapies Avancées

**CBER** : Center for Biologic Evaluation and Research

**CDRH** : Center for Devices and Radiological Health

**CE** : Commission Européenne

**CHPM** : Comité pour les Produits Médicaux à usage Humain

**CMH-I** : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I

**CSA** : Cellules Souches Adultes

**CSE** : Cellules Souches Embryonnaires

**CSM** : Cellules Souches Mésenchymateuses

### -D-

**Da** : Dalton

**DLP** : Projection de Lumière Dynamique

**DM** : Dispositif Médical

**DPI** : Diagnostic PréImplantatoire

### -E-

**EHS** : Engelbreth-Holm-Swarm

**EMA** : Agence Européenne du Médicament

**EPAR** : Rapport public européen d'évaluation (European Public Assessment Report)

### -F-

**FAO** : Fabrication Assistée par Ordinateur

**FDA** : Food and Drug Administration

**FGF** : Facteur de croissance fibroblastique (Fibroblastic Growth Factor)

**FIV** : Fécondation *In Vitro*

### -G-

**GMP** : Good Manufacturing Practice (BPF en anglais)

### -H-

**HDE** : Humanitarian Device Exemption  
**HGF** : Facteur de croissance hépatique (Hepatic Growth Factor)  
**HLA** : Antigène Leucocyte Humain  
**HUD** : Humanitarian Use Device

### -I-

**ICRS** : International Cartilage Repair Society  
**IGF** : Facteur de croissance insulín-like (Insulin-like Growth Factor)  
**IL-6** : Interleukine-6  
**iPSCs** : Cellules Souches Pluripotentes induites  
**IT** : Ingénierie Tissulaire

### -K-

**KLF4** : Kruppel-Like Factor 4  
**KO** : Knock-Out

### -M-

**MEC** : Matrice ExtraCellulaire  
**miARN** : micro ARN  
**MMP-13** : MétalloProtéinase de Matrice 13  
**MTI** : Médicaments de Thérapie Innovante  
**MTI-PP** : Médicaments de Thérapie Innovante - Préparés Ponctuellement

### -N-

**Na/K ATPase** : Pompe sodium/potassium dégradant l'adénosine triphosphate  
**NFκB** : Facteur nucléaire kappa B (Nuclear Factor-kappa B)  
**NGF** : Facteur de croissance neural (Neural Growth Factor)  
**NIH** : National Institute of Health  
**Cellules NK** : cellules Natural Killer  
**NSF** : National Science Foundation

### -O-

**OCT4** : Facteur de transcription liant les octamères 4  
**OCP** : Office of Combination Products  
**OTAT** : Office of Tissues and Advanced Therapies

### -P-

**PCL** : PolyCaproLactone  
**PEG** : Poly(Ethylène Glycol)  
**PGA** : Acide PolyGlycolique  
**PGE<sub>2</sub>** : Prostaglandine E<sub>2</sub>  
**PLA** : Acide PolyLactique  
**PLGA** : Acide Poly(Lactique-co-Glycolique)  
**PMA** : PreMarket Approval  
**PME** : Petites et Moyennes Entreprises  
**PTEC** : Cellules Epithéliales de Tubules Proximal  
**PVDF-TrFE** : Poly(Vinylidène Fluoride-co-TriFluoroEthylene)

**-R-**

**séquence RGD** : séquence Arginine-Glycine-Aspartate

**rhBMP-2** : Protéine morphogénétique osseuse recombinante humaine de type 2 (recombinant human Bone Morphogenetic Protein 2)

**RMAT** : Regenerative Medicine Advanced Therapy

**-V-**

**VEGF** : Facteur de croissance vasculaire endothélial (Vascular Endothelial Growth)

**-S-**

**siARN** : Petit ARN interférent (small interference RNA)

**SOX2** : Facteur de transcription à boîte SRY 2 (SRY-Box Transcription Factor 2)

**-T-**

**TEM** : Microscopie Electronique à Transmission

**THA** : Tissus ou organes d'origine Humaine ou Animale

**TNF** : Facteur de Nécrose Tumorale

**TPP** : Polymérisation à deux photons (Two Photons Polymerization)

**-U-**

**UCLA** : Université de Californie, Los Angeles

**UE** : Union Européenne

**USA** : États-Unis d'Amérique (United State of America)

**UV** : Ultra-violet

## INTRODUCTION

---

Le corps humain est une machinerie biochimique complexe dans laquelle divers systèmes physiologiques interagissent pour assurer les fonctions du corps de la manière la plus adaptée possible à son environnement. De nombreuses pièces ; organes et tissus, constituent ces systèmes. Le tout est le fruit de plusieurs milliards d'années d'évolution, d'une succession de modifications mineures qui a commencé bien avant l'apparition de notre espèce. Cette machinerie complexe n'est cependant pas invulnérable, des contraintes d'ordre physique, chimique et biologique ou tout simplement le temps peuvent l'altérer voire l'arrêter par le phénomène naturel de la mort. Il peut alors être tentant pour l'humain, qui n'a de cesse que de vouloir repousser la mort et la maladie, de s'imaginer changer les pièces endommagées de cette machine pour en prolonger la vie.

Les avancées scientifiques des derniers siècles ont rendu ce rêve réalisable en permettant dans un premier temps de greffer des organes et tissus d'un individu à un autre ou de produire des prothèses de substitution. Ces approches présentant des limites, les avancées scientifiques ont permis dans un second temps d'en imaginer une nouvelle fusionnant les deux premières pour les dépasser. Cette troisième approche vise à produire en laboratoire des organes et tissus « de rechange », des prothèses vivantes si perfectionnées qu'elles mimeraient parfaitement les tissus qu'elles remplacent, au point de pouvoir être considérées comme tel. Cette approche c'est celle de l'ingénierie tissulaire et ce but de produire des organes en laboratoire pour remplacer les nôtres lorsqu'ils faillent est l'objectif qui l'anime.

Cet objectif est-il atteint ou même atteignable ? Pour tenter de répondre à cette question, je présenterai dans un premier temps l'ingénierie tissulaire, son origine, ses récents développements et les différentes applications qui sont apparues au-delà de ce but qui peut paraître utopique. Cette première partie fournira des éléments de compréhension permettant d'appréhender la deuxième partie de ce travail dans laquelle un état des lieux des médicaments issus de l'ingénierie tissulaire et de leur industrie sera réalisé. Les technologies utilisées dans les médicaments commercialisés ou en essai clinique pourront ainsi être appréciées en comparaison de celles qui sont développées. L'émergence du secteur privé des médicaments issus de l'ingénierie tissulaire sera également étudiée dans cette deuxième partie, de même que l'environnement réglementaire qui les encadre. Enfin, je proposerai une analyse synthétisant les différentes informations de ce travail et comparant les promesses originelles

qui ont stimulé l'apparition de ce secteur à la réalité des médicaments qui en sont issus. Les avantages, les inconvénients, les obstacles à surmonter et les perspectives d'évolution seront alors discutés.

Le sujet abordé dans ce travail est vaste et chaque partie fait l'objet d'ouvrages et d'articles spécialisés. Ce travail n'a donc pas vocation à être exhaustif et certaines parties seront rapidement obsolètes mais j'espère que ses lecteurs le trouveront néanmoins intéressant et pertinent.

---

## PARTIE I : L'INGENIERIE TISSULAIRE

---

## I- DE L'ORIGINE DU CONCEPT A LA DEFINITION ACTUELLE

---

### I-1. HISTORIQUE

---

*« On ne connaît pas complètement une science tant qu'on n'en sait pas l'histoire. »*

**Auguste Comte – Cours de philosophie positive (1)**

Si l'ingénierie tissulaire (IT) est aujourd'hui évoquée dans des domaines variés de la recherche et de la médecine, son apparition ainsi que ses précurseurs historiques les plus évidents se retrouvent dans le domaine clinique. Son objectif de développer des tissus artificiels a été une étape logique de l'évolution de pratiques médicales, en particulier chirurgicales, ayant pour objectif de toujours mieux adapter les techniques de réparation, reconstruction ou remplacement d'organes ou de tissus défaillants aux exigences de la physiologie et de l'anatomie humaine (2).

En effet, lorsqu'un organe est lésé, son ablation partielle ou totale peut être nécessaire pour éviter, par exemple, qu'il ne s'infecte ou se nécrose. Cela peut entre autres entraîner des conséquences fonctionnelles mais également psychologiques. De plus, si l'organe lésé est vital, son ablation complète est impossible.

Ces problématiques ont entraîné le développement et l'utilisation de prothèses faites en divers matériaux mais également l'utilisation des propres tissus des patients (autogreffe) comme l'autogreffe de peau pour les grands brûlés ou l'utilisation de la veine saphène ou de l'artère mammaire dans la réalisation des pontages cardiaques. Pour les organes vitaux, les praticiens ont développé et pratiqué à partir des années 1950 des greffes d'organes de donneurs humains (allogreffe) ou non humains (xénogreffe), voire d'organes artificiels au 21<sup>ème</sup> siècle (3) (figure 1). Ces stratégies de recouvrement d'une fonction perdue par remplacement du tissu concerné par un implant (biologique ou non) ne sont pas nouvelles. Les premières tentatives de remplacement de dents remonteraient ainsi à la période gallo-romaine, des implants métalliques ayant été retrouvés dans des crânes humains de cette période (4) et pourraient même être antérieures (5). Par la suite, au XVIII<sup>ème</sup> siècle, les transplantations homologues de dents mortes sont devenues une méthode courante (6). La première substitution réussie d'un

tissu lésé par un tissu vivant est une greffe autologue de peau réalisée par Heinrich Christian Büniger en 1823 (7).

Ces solutions, bien qu'ayant permis aux médecins de prolonger et d'améliorer les conditions de vie de leurs patients là où il n'existait souvent aucune alternative, présentent néanmoins des limites. L'utilisation des tissus du patient peut entraîner une morbidité importante du site donneur. De plus, les structures biologiques ainsi créées sont fonctionnellement inférieures et moins durables que les originales. La durée de vie d'un pontage cardiaque est par exemple souvent inférieure à celle du cœur ayant bénéficié du pontage. Dans le cas des prothèses, les matériaux qui les composent présentent des limites liées à leur imparfaite compatibilité avec l'organisme (biocompatibilité) et à leur usure dans le temps. La durée de vie d'une valve cardiaque artificielle est par exemple souvent inférieure à celle du cœur greffé. Pour ce qui est des greffes d'organes, il peut y avoir des complications liées à l'immunité du patient (histocompatibilité) occasionnant des rejets de greffe. Les traitements visant à contrôler cette immunité posent également problème car, en affaiblissant l'immunité du patient, ils augmentent le risque d'apparition de cancer ou d'infections opportunistes. Enfin, l'offre d'organes issus de donneurs est très restreinte en comparaison du nombre de personnes nécessitant une greffe (8). En 2015, 552 patients sont décédés alors qu'ils étaient sur liste d'attente pour une greffe (9).

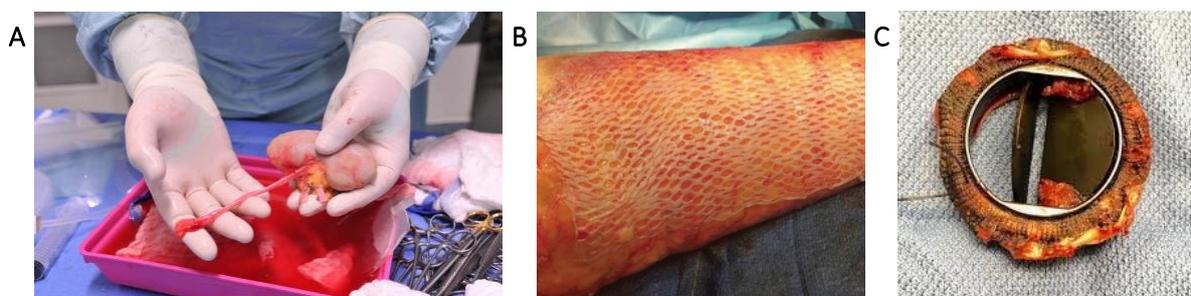


Figure 1 : **Remplacement de tissus ou organes via des greffes** : **A)** d'organe entier (rein) (10) ; **B)** de tissus autologue (peau en filet) (11) ; **C)** de prothèse artificielle (valve cardiaque à double ailette thrombosée) (12)

Lorsque l'altération (d'origine infectieuse, traumatique, auto-immune, etc.) de certains organes ou tissus détériore la fonction physiologique qu'ils sont censés remplir, les médecins peuvent avoir recours à plusieurs types de traitement pour tenter de restaurer ces fonctions sans procéder à l'ablation de l'organe ou du tissu en cause. Des traitements utilisant des médicaments classiques issus de la chimie ou des biomédicaments peuvent être mis en place. Leurs objectifs pourront être de corriger l'insuffisance ou la surabondance dans l'organisme

d'espèces moléculaires pour lutter contre leurs effets néfastes. Cela peut être réalisé directement lorsque le traitement supplée les molécules qui font défaut ou neutralise celles en excès ou indirectement lorsque le traitement agit sur les voies de signalisation qui contrôlent la production de ces molécules. D'autres thérapies comme la dialyse vont se substituer à l'organe défaillant en assurant dans cet exemple, la fonction d'épuration rénale. Cependant, même si ces thérapies sauvent des vies et ont eu des succès retentissants, ce sont des solutions rarement curatives et la plupart du temps imparfaites. En effet, face à la complexité et à l'interconnexion des fonctions métaboliques qu'elles cherchent à rétablir, elles présentent une approche souvent trop simpliste et cloisonnée.

C'est dans l'objectif de répondre à ces défis et d'enrichir l'arsenal thérapeutique que certains chercheurs ont exploré et développé des approches par greffe de cellules. Il y a deux approches qui sont l'administration de cellules seules (thérapie cellulaire) ou organisées au sein d'un tissu synthétique (ingénierie tissulaire). Elles doivent permettre d'accéder à la complexité et la finesse du vivant et de permettre ainsi de restaurer un tissu et ses fonctions de manière plus adéquate. Cette greffe peut être en remplacement ou en addition du tissu existant, l'objectif étant alors de stimuler la régénération de ce dernier. Les fonctions que l'on cherche à restaurer peuvent être structurelles comme pour les os ; de barrière et de transport comme pour la peau ; biochimiques et sécrétoires comme pour le foie ou les reins. La possibilité d'utiliser des cellules issues du patient lui-même offre une perspective de résolution des problèmes de réaction immunitaire (rejet et durée de vie limitée des greffons) et de disponibilité des organes et tissus greffables. En théorie, l'ingénierie tissulaire offre par rapport à la thérapie cellulaire simple l'avantage de créer une structure semblable à un tissu, c'est-à-dire protectrice des cellules, organisée en trois dimensions et fonctionnelle, conçue et développée pour être greffée dans un espace précis (8).

L'apparition de travaux de recherche et de pratiques médicales pouvant être considérées comme du domaine de l'IT répond donc en premier lieu à un besoin clinique. Cela n'a pu être possible sans une évolution des connaissances scientifiques et techniques. Dans différents domaines, elles sont arrivées à un niveau de maturité suffisant pour pouvoir imaginer leur utilisation de manière combinée et nouvelle, afin de répondre à des objectifs nouveaux, dans la filiation des enjeux évoqués précédemment. Les connaissances et technologies permettant le développement de l'IT sont issues de nombreux domaines comme la biologie cellulaire et du développement, les sciences médicales et vétérinaires de base comme l'anatomie ou la

physiologie, les technologies pour la transplantation comme l'immunologie appliquée et la préservation d'organes, les biomatériaux, la biophysique et la biomécanique, ainsi que l'ingénierie biomédicale. La recherche dans ces domaines est antérieure à l'émergence de l'IT comme discipline scientifique à part entière et se poursuit parallèlement à celle-ci, stimulant par ses découvertes le développement de l'IT et réciproquement (8,13,14).

Dans la deuxième moitié du XX<sup>ème</sup> siècle, avant l'apparition du terme « ingénierie tissulaire » (« tissue engineering » en anglais), des travaux pouvant relever du domaine de l'IT tel qu'elle est définie actuellement ont été produits, principalement dans l'objectif de traiter des lésions de la peau, tissu assez simple (globalement bidimensionnel), accessible, fréquemment endommagé et parfois sans capacité de régénération (certaines brûlures).

Ainsi, en 1979, H. Green *et al.* ont produit une fine feuille obtenue à partir de kératinocytes isolés d'une biopsie du patient et cultivés avec des cellules mésenchymateuses de souris (Figure 2). La feuille obtenue avait une surface bien supérieure à celle de la biopsie mais elle était très fragile et ne pouvait être utilisée qu'en attendant une greffe de peau pour les brûlures sévères car elle ne reproduisait que la couche superficielle de celle-ci : l'épiderme (15).

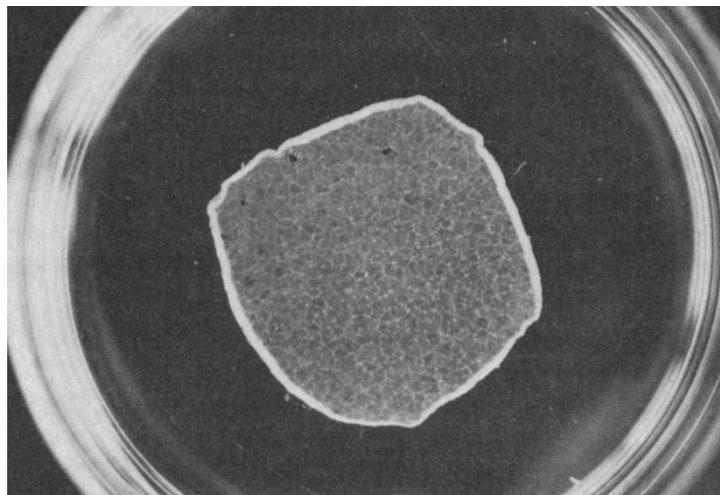


Figure 2 : **Epithélium cultivé** par H. Green *et al.* à partir d'une seule cellule épithéliale. Issue de Green *et al.* (15).

En 1981, Bell *et al.* ont quant à eux produit un tissu cutané reproduisant à la fois le derme et l'épiderme. Ils y sont parvenus en cultivant des fibroblastes dermiques dans un gel de collagène formant ainsi un néoderme sur lequel des kératinocytes ont été cultivés pour former un épiderme kératinisé. Les cellules utilisées étaient allogéniques et ont été isolées d'un prépuce humain néonatal. De ce fait, le greffon pouvait être rejeté (16). A travers l'utilisation de tissu néonatal comme source de cellules, on peut voir dans ces travaux l'intérêt suscité, à l'époque

déjà, par le potentiel des cellules souches et progéniteurs (présents en plus grande quantité dans les tissus néonataux).

En 1982, Yannas *et al.* ont produit une matrice poreuse à base de collagène de type I et de chondroïtine 6-sulfate afin de favoriser la régénération du derme de patients brûlés dans le cas où les caractéristiques des lésions ne permettaient pas une greffe de peau. La cicatrisation du derme guidée par cette membrane biodégradable permettait ensuite une greffe de peau (17). Il est important de noter qu'aucune cellule vivante était incorporée dans la matrice poreuse, ce qui la rapprochait plus d'un pansement sophistiqué favorisant la régénération que d'un tissu vivant de substitution.

Bien que le terme « ingénierie tissulaire » ait pu être utilisé plusieurs fois dans des contextes différents, sa plus ancienne utilisation recensée sur PubMed date de 1984, dans un article où il décrit une membrane semblable à un endothélium qui s'est développée à la surface d'une prothèse ophtalmique implantée depuis longtemps (18). Cependant, dans cet article, aucune définition du terme n'est donnée. Le terme réapparaît à partir de 1987 lorsque des scientifiques de la National Science Foundation (NSF) tentent de le définir. Cette initiative prend place dans le cadre de la création d'un centre de recherche en ingénierie s'intéressant au niveau d'organisation faisant le lien entre celui des cellules et celui des organes, étudiés séparément jusqu'alors. Par la suite, en 1988 (19), 1990 et 1992 (20), plusieurs réunions et symposiums de l'Université de Californie (UCLA) soutenue par la NSF prolongent la réflexion et font évoluer cette définition pour l'articuler autour de la délimitation d'un domaine de recherche à part entière avec des objectifs définis.

En 1988 la définition donnée est la suivante :

*« L'ingénierie tissulaire est l'application des principes et des méthodes de l'ingénierie et des sciences de la vie à la compréhension fondamentale des relations structure-fonction dans les tissus normaux et pathologiques des mammifères et au développement de substituts biologiques pour restaurer, maintenir ou améliorer la fonction des tissus. »*  
(19)

Hormis ces réunions et leur comptes-rendus, le premier véritable article scientifique donnant une définition et un cadre à l'IT est publié en 1993 par Langer & Vacanti (13) (figure 3). Cet article et sa définition de l'Ingénierie Tissulaire sont généralement cités comme référence dans



Figure 3 : **Joseph P. Vacanti (gauche)** (21) et **Robert S. Langer (droite)** (22) : à l'origine de l'article le plus ancien et influent sur l'IT, ils sont considérés comme les fondateurs de la discipline.

les publications ultérieures sur l'IT (14). Il semble exister une dissonance et une rivalité quant à savoir qui a donné en premier cette définition moderne de l'IT, comme on peut le lire dans un article de Joseph P. Vacanti sur l'histoire de l'IT publié en 2006 (23). On note toutefois, eu égard à son article de 2006, que la définition de Vacanti de 1993 semble reprendre celle du symposium de 1988 en la condensant (symposium cité par ailleurs comme source de cette définition) :

*« Le génie tissulaire est un domaine interdisciplinaire qui applique les principes de l'ingénierie et des sciences de la vie au développement de substituts biologiques qui restaurent, maintiennent ou améliorent la fonction des tissus. »* (13)

Ici, l'utilisation de l'IT à des fins de recherche fondamentale est écartée. A la suite de cette définition, Vacanti identifie « *trois stratégies générales [...] pour la création de nouveaux tissus* :

- 1) *Les cellules isolées ou les substituts cellulaires. [...]*
- 2) *Substances inductrices de tissus. [...]*
- 3) *Cellules placées sur ou dans des matrices. [...]*» (13)

L'année suivant la parution de cet article fondateur, le terme « ingénierie tissulaire » est cité dans les titres et résumés de plus de 10 articles sur PubMed. Par la suite, ce chiffre est quasiment doublé tous les ans jusqu'aux années 2000 puis croît quasiment de manière linéaire jusqu'à maintenant (figure 4). Cette percée du terme intervient alors que d'une part, il nomme un nouveau domaine de recherche et que, d'autre

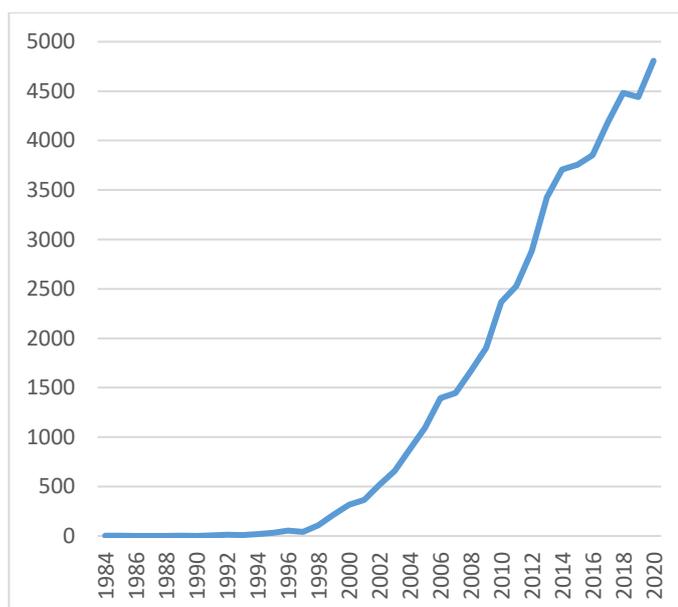


Figure 4 : Nombre de publications référencées sur PubMed mentionnant le terme "tissue engineering" dans leur titre ou résumé par année.

part, les premiers produits d'IT issus des recherches précédemment citées trouvent un usage clinique aux Etats-Unis (Apligraf® d'Organogenesis en 1998 (24) ; Epicel® de Genzyme en 1988 (25) ; Dermal Regeneration Template® d'Integra en 1996 (26)) (figure 6).

En 2020, Martin-Piedra *et al.* ont réalisé une analyse bibliométrique de l'évolution des publications relatives à l'IT pour en évaluer la maturité en tant que domaine scientifique (27). Ils concluent que ce domaine peut être considéré comme en consolidation et non comme émergent en se basant sur un modèle de courbe gompertzienne couramment utilisé à cette fin. Cette tendance à la consolidation des connaissances en IT, signe d'une certaine maturité du domaine, est également attestée par l'évolution du ratio (articles de recherche original) / (articles de revue) qui diminue constamment et de manière linéaire ces dernières années (figure 5). Selon les auteurs, cela indique que dernièrement, il y a eu dans le domaine de l'IT le rassemblement et la synthèse des données des recherches originales recueillies au cours des trois dernières décennies afin de confirmer ou de réfuter les hypothèses et de construire un cadre théorique plus fiable au développement du domaine. Les auteurs ont également observé l'évolution des publications d'articles de revues traitant d'IT classées en fonction des domaines scientifiques des journaux les publiant. La distribution des articles dans les différentes catégories atteste du profil multidisciplinaire de ce domaine (figure 5).

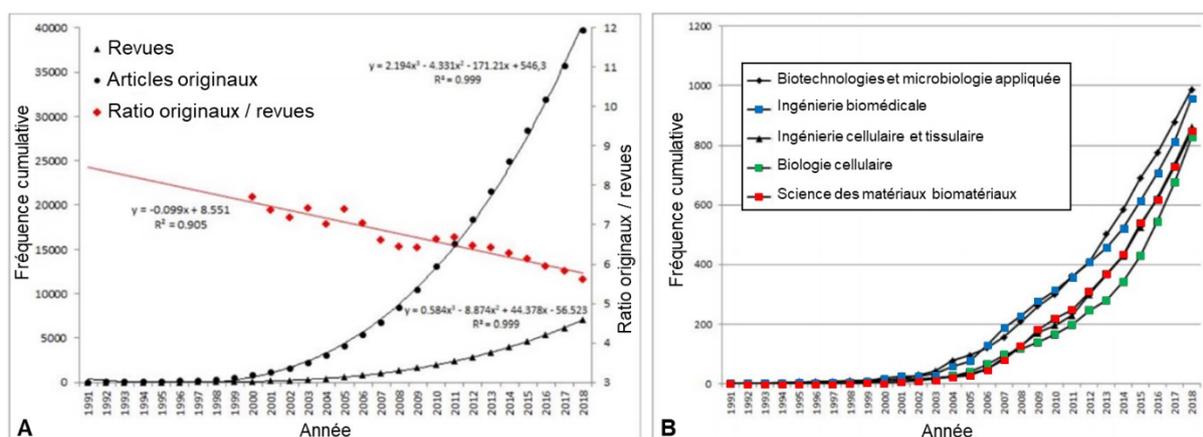


Figure 5 : L'analyse bibliométrique de l'Ingénierie Tissulaire confirme que c'est un domaine multidisciplinaire et en phase de consolidation, notamment via la parution croissante d'articles de revue. **A)** Courbes du taux de croissance des publications de recherche original et de revue de la littérature en Ingénierie Tissulaire de 1991 à 2018 et du ratio entre ces deux types de publication sur la même période. **B)** Courbe du taux de croissance des publications de revue de la littérature en Ingénierie Tissulaire de 1991 à 2018 selon les différents domaines scientifiques des journaux les publiant. *Adaptée de Martin-Piedra et al. (27).*

En résumé, l'IT apparaît à l'origine dans les années 1980, principalement aux Etats-Unis, à un moment où les connaissances et techniques de différents domaines scientifiques (médecine,

biologie, ingénierie) arrivent à un niveau de maturité suffisant pour envisager une approche innovante les combinant, dans l'objectif de combler les lacunes des thérapies d'alors. Des équipes pluridisciplinaires ont recours aux connaissances de différents domaines scientifiques et les alimentent en retour par leurs découvertes. Dans ce contexte, le terme « ingénierie tissulaire » est inventé pour désigner cette nouvelle approche. Le champ d'application et les objectifs de ce nouveau domaine sont alors définis à la fin des années 1980 et l'intérêt pour cette discipline grandit durant les années 1990.

Certains chercheurs sont séduits par cette approche et ses possibilités alors que d'autres présentent désormais les travaux qu'ils mènent ou ont menés par le passé et qui entrent dans le champ de l'IT comme tel. Par la suite, la définition et les objectifs de l'IT continuent d'évoluer sous l'influence de découvertes scientifiques majeures comme l'avènement de la recherche sur les cellules souches (28) et plus tard la création des cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) (29). De nouveaux procédés de bio-ingénierie étendent les perspectives de fabrication de tissus synthétiques au début des années 2000 avec le développement de la bio-impression puis la commercialisation d'appareils dédiés (30). La première bio-imprimante par extrusion est conçue en 2002 (31) et la première bio-imprimante à jet d'encre en 2003 (32). Progressivement, l'ingénierie tissulaire ne cherche plus uniquement à répondre à des objectifs cliniques mais sert également la recherche fondamentale. Les attentes en termes d'applications cliniques restent fortes car les promesses sont ambitieuses.



Figure 6 : **Substitut cellulaire de peau vivant Apligraf**. Il correspond à l'empilement d'une couche épidermale composée de kératinocyte et d'une couche dermale composée de fibroblastes et de collagène. <https://apligraf.com/product-details/>

---

## I-2. ACTUELLEMENT

---

L'ingénierie tissulaire est aujourd'hui un domaine scientifique pour lequel plusieurs définitions coexistent. Celle de 1988 citée précédemment ne restreint pas son application à la clinique et paraît toujours adaptée actuellement :

*« L'ingénierie tissulaire est l'application des principes et des méthodes de l'ingénierie et des sciences de la vie à la compréhension fondamentale des relations structure-fonction dans les tissus normaux et pathologiques des mammifères et au développement de substituts biologiques pour restaurer, maintenir ou améliorer la fonction des tissus. » (19)*

On peut toutefois apporter quelques précisions à cette définition. Les « méthodes de l'ingénierie » font principalement référence à l'utilisation de biomatériaux et de procédés issus de l'ingénierie. Pour résumer simplement, le postulat de base est de parvenir à produire un tissu - un ensemble homogène et organisé de cellules vivantes exerçant une fonction définie (structurelle, métabolique, etc.) - à partir de cellules, de facteurs biochimiques appropriés et d'un échafaudage de biomatériaux qui doivent permettre de le structurer (14). L'approche du projet sous tous ses aspects (biologique, chimique, physique, ...) et le recours à un travail de synthèse coordonnant les travaux de plusieurs équipes de spécialistes afin de conceptualiser et de réaliser des tissus fonctionnels rattachent philosophiquement ce domaine à l'ingénierie.

La démarche de soigner en restaurant, remplaçant ou régénérant des gènes, des cellules, des tissus ou des organes pour restaurer une fonction altérée est au fondement de la médecine régénérative. Ses principaux outils sont le génie génétique et la greffe de cellules pouvant éventuellement être mises en forme et combinées à d'autres matériaux via des techniques d'IT (33). Les cellules souches sont également au cœur de ce domaine. L'IT peut donc être incluse dans la médecine régénérative mais n'en est pas un synonyme.

Après avoir défini et délimité ce domaine scientifique qu'est l'IT, nous allons dans le chapitre suivant tenter de répondre à la question : Quels sont les éléments constitutifs de l'ingénierie tissulaire ?

## II- MATERIAUX ET PROCEDES

La production d'un tissu ou d'un organe par Ingénierie Tissulaire comprend plusieurs étapes et implique l'ingénierie de différents matériaux séparément. Ceux-ci seront par la suite combinés de manière plus ou moins complexe via différents procédés de fabrication afin de générer le néo-tissu ou l'organe souhaité. Dans ce chapitre, nous présenterons les caractéristiques des différents matériaux utilisés pour produire des tissus par IT ainsi que les procédés qui les mettent en forme (figure 7).

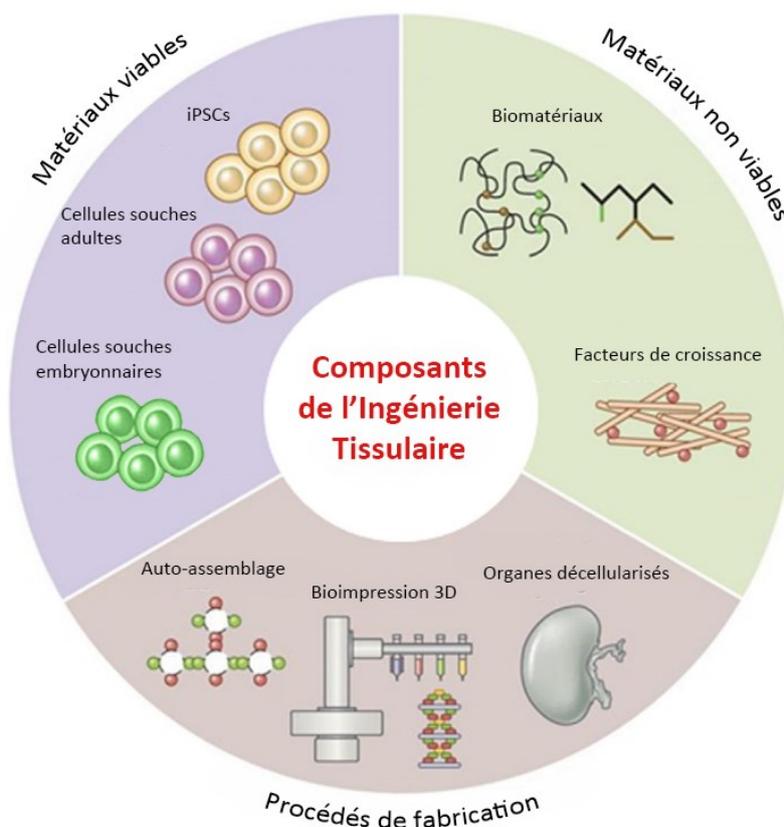


Figure 7 : Représentation schématique des différents paramètres de l'Ingénierie Tissulaire. Chaque paramètre (matériaux viables, non viables, procédés) peut être modifié séparément ou en combinaison avec les autres pour permettre la fabrication d'un tissu. Adaptée de Khademhosseini & Langer (34).

### II-1. MATERIAUX

On peut distinguer deux types de matériaux élémentaires en IT:

- Les matériaux viables, au cœur du concept de tissu vivant, sont en pratique les cellules qui seront au cœur du tissu, qui conditionneront son type et qui lui donneront sa fonction. Les cellules somatiques sont les premières à avoir été utilisées mais

présentent des limites et, dans la majorité des développements actuels, on utilise des cellules souches. Différentes sources de cellules souches existent et sont étudiées. Dans l'IT à vocation thérapeutique, au-delà de leur type, souche ou somatique, les cellules utilisées peuvent être d'origine autologue, allogénique ou parfois même xénogénique.

- Les matériaux non viables doivent permettre de structurer et d'organiser les cellules. Ils confèrent également au tissu ses propriétés mécaniques. On les appelle « biomatériaux ». Ils peuvent être d'origine synthétique ou naturelle et doivent être biocompatibles ; c'est-à-dire compatibles avec les processus biologiques que l'on cherche à préserver ou à induire, et qui sont liés à l'activité des cellules du néo-tissu et de l'organisme qui reçoit la greffe. Dans les matériaux non viables, on peut également compter les molécules exerçant une action pharmacologique sur les cellules de l'hôte ou du néo-tissu pour favoriser sa croissance, sa maturation ou son intégration. La plupart du temps, ces cofacteurs sont des facteurs de croissance intégrés aux biomatériaux.

Intéressons-nous d'abord aux différents types de cellules retrouvés et à leurs caractéristiques.

### II-1.1. CELLULES

Indépendamment du type des cellules utilisées (souches ou non), leur origine est un critère important, particulièrement pour les tissus développés à des fins cliniques (figure 8). Par rapport au patient qui reçoit le tissu, les cellules peuvent ainsi être :

- Autologues : les cellules du tissu greffé viennent du patient greffé.
- Allogéniques : les cellules ne viennent pas du patient mais d'un autre individu de la même espèce ; humain donc.

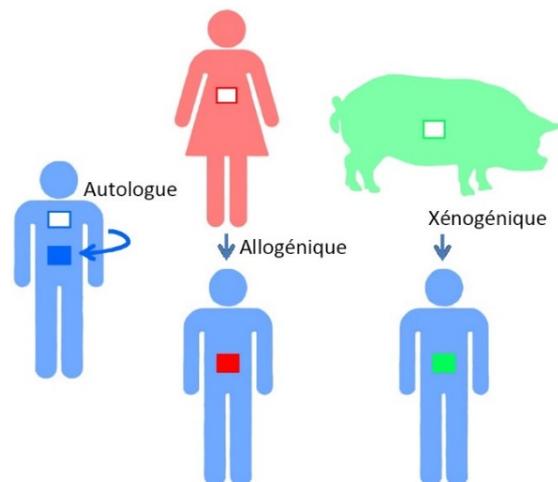


Figure 8 : Types de cellules ou de tissu greffés selon l'organisme dont ils proviennent. Adaptée de <https://pathologia.ed.ac.uk>

- Xénogénique : les cellules ne viennent pas du patient mais d'un individu d'une autre espèce.

L'origine des cellules a un impact conséquent sur l'intégration du tissu greffé au sein de l'organisme hôte. Pour des cellules non-autologues non modifiées, un rejet du néo-tissu par l'organisme du patient sera inévitable sans traitement immunosuppresseur et ce dans un délai plus ou moins long selon le type de tissu. Cela est dû au fait que chaque cellule de l'organisme présente à sa surface des antigènes du système HLA (Human Leukocyte Antigen) reconnus par le système immunitaire de l'organisme dont les cellules sont issues, empêchant leur destruction par celui-ci ; c'est l'histocompatibilité. Des cellules issues d'un autre organisme présenteront donc des antigènes qui ne sont pas reconnus par le système immunitaire de l'organisme hôte et seront attaquées par celui-ci, résultant en un rejet des cellules greffées. L'utilisation de cellules autologues permet une approche de médecine personnalisée où le traitement est adapté à chaque patient, sur-mesure, pour correspondre au mieux aux spécificités de celui-ci et ainsi éviter les rejets et les traitements immunosuppresseurs.

D'un autre côté, l'utilisation de cellules autologues rend la standardisation des caractéristiques du produit final complexe. C'est pourtant cette standardisation qui permet de fournir une partie des garanties quant à la sécurité des médicaments produits industriellement. La standardisation est un élément central dans l'application des normes qualité. L'utilisation de cellules autologues pourrait impliquer leur sélection et leur caractérisation pour chaque prélèvement donc chaque patient pour atteindre les normes de sécurité et de qualité. L'approvisionnement d'un nombre de cellules autologues suffisant peut également être difficile pour certains tissus.

L'approches allogéniques et xénogéniques semblent plus propices à la standardisation car, à partir d'un nombre restreint de prélèvements et donc de contrôles de leur qualité, on peut traiter de nombreux patients. Cela implique de pouvoir obtenir une grande quantité de cellules à partir d'un seul prélèvement, rendant les cellules que l'on peut cultiver et amplifier facilement *in vitro*, telles que les cellules souches, particulièrement intéressantes. L'utilisation de cellules allogéniques ou xénogéniques posent toutefois des problèmes d'histocompatibilité et donc de rejet à terme. Au-delà des molécules immunosuppressives, une approche d'ingénierie tissulaire via l'utilisation de biomatériaux encapsulant les cellules de manière semi-perméable pourrait permettre de résoudre ce problème dans certains cas. Les échanges de nutriments et autres

molécules essentielles à la survie des cellules pourraient être permis par le biomatériau tout en les protégeant de l'attaque par les immunoglobulines ou les cellules immunitaires. Cette approche a par exemple été réalisée pour des cellules allogéniques d'îlots  $\beta$  de pancréas transplantées à des macaques. L'encapsulation dans un polymère réticulé composé d'alginate a permis le passage de l'insuline sécrétée (figure 9) (35). Des problèmes éthiques peuvent cependant intervenir, liés à l'usage de cellules d'origine animale ou à la monétisation indirecte du corps d'un individu via la production de thérapies à grande échelle à partir de ses cellules.

Pour certains tissus, l'utilisation de cellules somatiques issues de biopsie est possible car elles peuvent proliférer *in vitro*. C'est par exemple le cas de l'urothélium vésical pour lequel des cellules ont été amplifiées *in vitro* puis greffées et ont formé un épithélium stratifié dont les critères phénotypiques testés étaient conformes à la fonction du tissu (36). C'est également le cas pour la peau comme dans les exemples cités précédemment (chapitre 1) où des kératinocytes et des fibroblastes ont pu être cultivés *in vitro* avant d'être greffés (15,16). Cela est rendu possible par la présence de nombreuses cellules progénitrices au sein de la couche basale (*stratum germinativum*) de ces tissus épithéliaux qui sont en croissance constante afin de faire face à



Figure 9 : Répartition entre les deux feuillets du grand omentum d'un macaque de capsules d'alginate contenant des cellules allogéniques d'îlots  $\beta$  de pancréas. Adaptée de Bochenek *et al.* (35).

à l'abrasion liée à leur fonction de barrière (37). Il est intéressant de noter que, malgré l'usage de cellules allogéniques comme dans les travaux de Bell *et al.* et dans le produit Apligraf® qui en issu, aucun rejet aigu de la greffe n'a été observé. Les auteurs expliquent ce phénomène par la faible vascularisation des couches superficielles de la peau (38,39). L'intégration de ces substituts cutanés est toutefois rendue impossible par leur nature allogénique et ils doivent être retirés ou changés au bout de quelques semaines. Ils ne sont donc pas rejetés mais pas non plus intégrés (limitant leur viabilité) et agissent plutôt comme une barrière protectrice vivante qui stimule également la régénération des tissus via la sécrétion de cytokine appropriées. D'autres tissus comme le cartilage ou les muscles contiennent suffisamment de peuvent être cultivés et amplifiés *in vitro* (40). Si l'amplification et l'utilisation de ces tissus est

portée par la présence en leur sein de précurseurs et progéniteur, peut-on encore parler de cellules somatiques ?

Tous les tissus ne permettent pas cette amplification *in vitro*. Il est par exemple très difficile d'obtenir et d'amplifier directement à partir de biopsies des cellules comme les hépatocytes, les cardiomyocytes, les neurones, les cellules pancréatiques  $\beta$  ou les cellules rénales. L'avènement des cellules souches a permis de pallier à ce problème de disponibilité.

Les cellules souches sont définies par deux caractéristiques essentielles qui les distinguent des autres types cellulaires : i) Elles n'expriment pas de phénotype les spécialisant à une fonction et peuvent se renouveler quasi-indéfiniment par division cellulaire *in vivo*. Cette capacité est dite d'« auto-renouvellement ». ii) Elles ont également une capacité de différenciation. En effet sous certaines conditions, elles sont capables d'effectuer une division asymétrique où l'une des deux cellules filles sera engagée dans une voie la différenciant en un type cellulaire particulier, exprimant un phénotype particulier mais perdant sa capacité d'auto-renouvellement.

Selon le nombre de différents types cellulaires qu'elles sont capables de produire, les cellules souches sont hiérarchisées en cellules souches toti/pluri/multi/uni-potentes. Les totipotentes pourront donner tous les types cellulaires humains, annexes embryonnaires incluses. Les pluripotentes pourront donner tous les types cellulaires humains hors annexes embryonnaires. Les multipotentes pourront donner plusieurs centaines de types cellulaires dérivés d'un même feuillet embryonnaire (mésoderme, ectoderme ou endoderme). Les unipotentes quant à elles ne pourront donner qu'un seul type cellulaire mais sont capable d'auto renouvellement (41).

Il est ainsi possible d'isoler des cellules souches et de les amplifier pour pouvoir ensuite les différencier dans le type cellulaire recherché afin de produire le néo-tissu. On peut par exemple prélever des cellules souches mésenchymateuses dans la graisse ou la moelle osseuse où elles sont abondantes afin de les amplifier et de les différencier en cardiomyocytes. L'avantage des cellules souches est ici évident, les cardiomyocytes n'étant pas amplifiable tel quel, quand bien même une biopsie présentant des risques acceptables serait possible (42).

On distingue également les cellules souches selon leur origine embryonnaire, adulte ou induite (41) (figure 10). Chaque origine cellulaire forme un ensemble assez homogène du point de vue des caractéristiques biologiques générales, des avantages et des inconvénients (éthiques, techniques, etc.) que présentent les cellules qui en font partie. Dans les chapitre

suivant, je présenterai donc plus en détails les différentes sources de cellules souches envisageable pour l'IT.

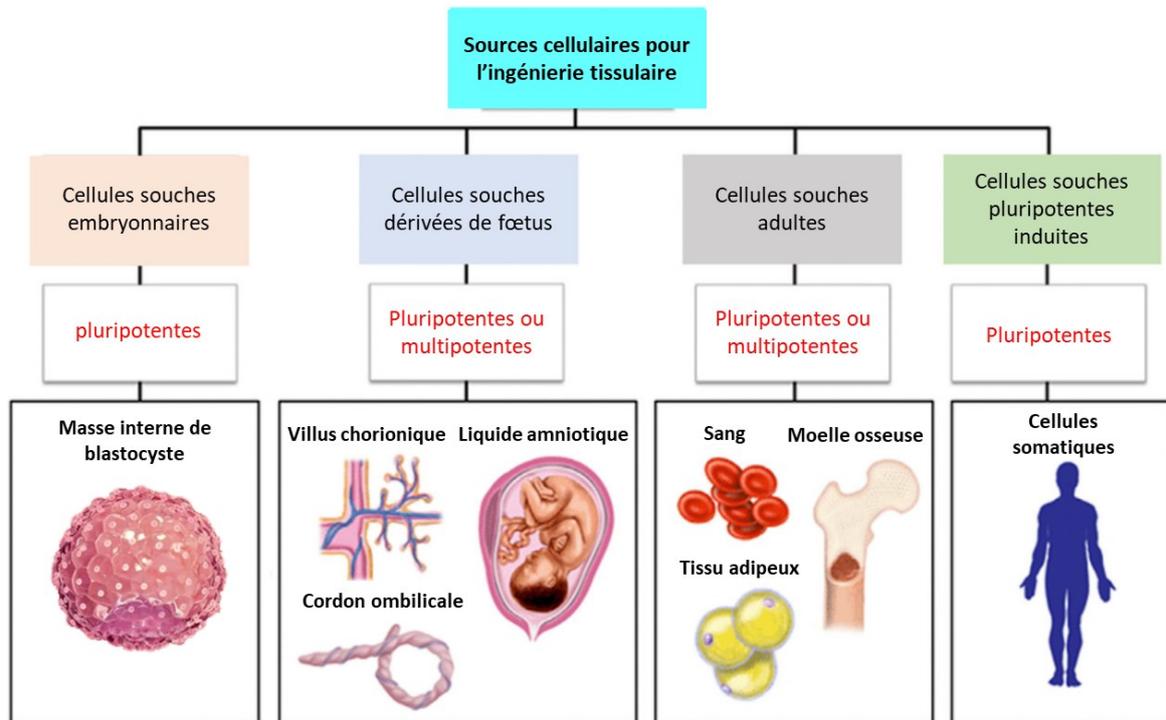


Figure 10 : Différente sources de cellules souches pour l'ingénierie tissulaire. Adaptée de Al-Himdani S. et al. (43).

### II-1.1.1. CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES

Les cellules souches embryonnaires (CSE) sont issues de la masse cellulaire interne d'embryon au stade blastocyste ; un stade pré-implantatoire compris entre 5 et 7 jours après la fécondation (figure 11). De ce fait, elles sont pluripotentes alors que les cellules issues d'un embryon au stade morula (J-4 post-fécondation) sont totipotentes (44).

En France, les embryons dont sont issues les cellules souches embryonnaires sont des embryons surnuméraires issus de fécondation *in vitro* (FIV) et qui ne font plus l'objet d'un projet parental. Dans le cas d'étude de maladies, les embryons peuvent également être issus de diagnostics pré-implantatoires (DPI) lorsque ceux-ci ont révélé que les embryons étaient porteurs d'une maladie génétique particulièrement grave et incurable et qu'ils ne pouvaient donc pas être implantés. Dans tous les cas, les parents biologiques doivent donner leur consentement écrit pour en faire don à la recherche. Le plus souvent, les CSE sont issues de lignées détenues et commercialisées par des laboratoires (en raison de leur capacité d'auto-renouvellement), évitant ainsi le recours extensif à des embryons (45,46). L'utilisation des CSE

à des fins de recherche est encadrée de manière plus ou moins stricte selon les pays en raison des questionnements éthiques qu'elle soulève.

D'un point de vue technique, un des grands défis de l'utilisation de ces cellules souches réside dans l'obtention de populations de cellules différenciées spécialisées pures et ce en raison du grand degré de plasticité des cellules souches dont elle sont issues (47,48). Ces cellules sont en effet beaucoup plus difficiles à isoler et maintenir stables en culture que les cellules somatiques. Néanmoins, durant les dernières années, des méthodes plus robustes ont été développées pour répondre à ce challenge tout en respectant les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF), conditions indispensables à la production des médicaments à partir de ces cellules. Les CSE peuvent désormais être différenciées, cultivées et cryoconservées sans les exposer à des cellules ou protéines non humaines (49,50). A l'avenir, l'utilisation de bioréacteurs compatibles avec des milieux de cultures sans sérum et sans produits d'origine xénogénique, ainsi que le développement de nouvelles molécules contrôlant la différenciation des CSE, pourraient faciliter l'obtention de population cellulaire d'une taille suffisante pour développer les produits plus simplement et en respectant les BPF, permettant ainsi leur application en clinique (51,52).

La différenciation des CSE est réalisée par étape et guidée par des molécules développées grâce au savoir accumulé sur les événements régulant le développement embryonnaire (53). Par exemple, la modulation des voies de transcription régulées par les facteurs nodal et activine appartenant à la famille des TGF- $\beta$  peut permettre la génération, à partir de CSE, de cellules spécifiques de l'endoderme (54,55) ou spécifique de l'ectoderme (56). Cette étape est l'une des premières de la séquence permettant d'obtenir des cellules différenciées à partir de CSE (figure 11).

Une importante question de sécurité se pose lorsque l'on veut utiliser des cellules issues de CSE en thérapie. Les cellules pluripotentes pouvant former des tératomes *in vivo*, y a-t-il persistance de cellules non différenciées pluripotentes au sein de la population de cellules différenciées implantée dans le patient et si oui, que deviennent-elles.. Ce risque rend essentielle la détermination i) du niveau résiduel de cellules indifférenciées au sein des populations produites ; ii) de la relation entre ce niveau et le risque de développer une tumeur iii) de la réduction potentielle de ce risque via l'utilisation de molécules pharmacologiques (57).

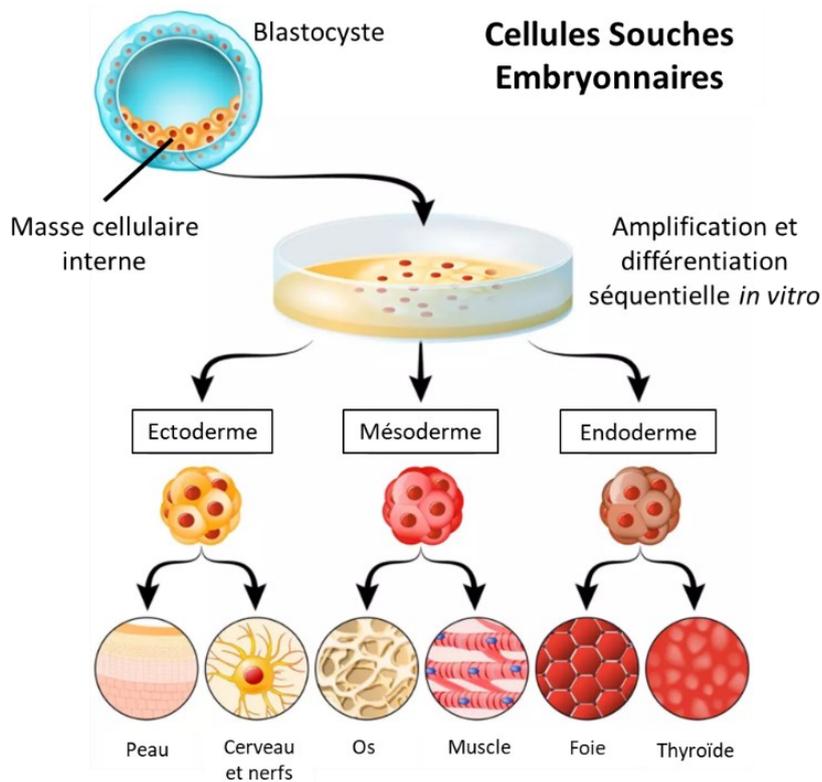


Figure 11 : Les cellules souches embryonnaires, issues de la masse interne d'un embryon au stade blastocyste peuvent être cultivées *in vitro*. Leur différenciation séquentielle guidée permet d'obtenir, grâce à leur pluripotence, les différents tissus de l'organisme issus des trois feuillets embryonnaires. Adaptée de <https://www.biorbyt.com/stem-cells>

Pour les thérapies à base de CSE, l'utilisation de cellules allogéniques voire xénogénique semble plus envisageable que celui de cellules autologues en raison de l'origine des CSE. L'inverse supposerait que l'on dispose pour chaque patient de cellules prélevées à un stade précoce de son développement embryonnaire par une procédure dangereuse pour la poursuite de ce développement (hors cas de FIV). Plusieurs moyens sont applicables pour limiter le risque de rejet de ces cellules (58). Premièrement, il a été noté que les CSE expriment faiblement les HLA (CMH-I) et il en résulte un faible potentiel immuno-stimulateur (59). Des doses inférieures de molécules immunosuppressives pourraient être administrées pour éviter les rejets. Des approches visant à modifier génétiquement les CSE pour qu'elles n'expriment plus les HLA (CMH-I KO) ont aussi été étudiées (60). Une autre approche consiste en la génération de banques de cellules souches constituées à partir d'un nombre restreint de donneurs sélectionnés pour que la banque couvre la majorité des versions du système HLA présents dans la population. Cela permettrait d'obtenir la compatibilité des *loci* les plus importants des HLA, diminuant statistiquement le risque de rejets pour la majorité de la population. Il serait par exemple intéressant de sélectionner des donneurs homozygotes pour le HLA. La génération de telles banques est cependant une entreprise longue et coûteuse (61,62). Enfin, comme expliqué précédemment, l'inclusion des cellules au sein de certains biomatériaux via des

techniques d'IT est une voie de recherche pour les protéger contre le système immunitaire tout en garantissant leur survie et leur fonction thérapeutique.

On peut également noter que, sous certaines conditions, les cellules primordiales germinales (issues d'embryon et qui donnent *in fine* les gamètes) peuvent acquérir des propriétés similaires à celles des CSE. *In vivo*, si elles sont injectées, elles donnent, tout comme les CSE, des tératomes illustrant leur pluripotence latente (63). *In vitro*, contrairement aux CSE, l'ajout de certains facteurs de croissance est nécessaire à l'induction de leur pluripotence (64,65). Elles sont alors nommées cellules germinales embryonnaires et prolifèrent à long terme en l'absence de ces facteurs dans les mêmes conditions que les CSE.

#### II-1.1.2. CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES INDUITES

Découvertes en 2006, les cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) présenteraient des propriétés très similaires à celles des CSE (pluripotence, auto-renouvellement, formation de tératomes *in vivo*) sans leurs principaux défauts que sont les questionnements éthiques liés à l'utilisation d'embryons, la difficulté d'approvisionnement et l'immunocompatibilité liée à l'usage principalement allogène et xénogénique des CSE (29). Cette découverte valut à ses inventeurs Shinya Yamanaka et Sir John B. Gurdon le prix Nobel de médecine en 2012 (66). Pour obtenir ces cellules, des cellules somatiques adultes sont reprogrammées en cellules souches via l'induction de l'expression de quatre facteurs de transcriptions, initialement OCT4, SOX2, KLF4 et MYC (29), les deux derniers pouvant être remplacés par NANOG et LIN28 (67).

A l'origine, les iPSCs étaient issues de la reprogrammation de fibroblastes (29,67) mais d'autres cellules somatiques adultes ont par la suite pu être reprogrammées, telles que des cellules sanguines (68), des kératinocytes (69), ou des cellules épithéliales rénales exfoliées présentes dans l'urine (70) ... Il semble que parmi toutes ces sources, les cellules sanguines mononuclées issues de sang de cordon ombilical ou de sang d'adulte soient la meilleure option. En plus d'être facilement obtenues par une prise de sang, elles présentent une signature épigénétique et une expression génique similaire à celles des CSE, permettant une reprogrammation en iPSCs plus efficace et plus sûre (71). Certains mécanismes derrière la reprogrammation en iPSCs semblent en effet d'ordre épigénétique. Cependant, certaines variations ou anomalies génétiques et épigénétiques pourraient ainsi persister dans les cellules différenciées issues des iPSCs et

représenter un problème de sécurité dans le cas d'une utilisation clinique, rendant nécessaires des études plus approfondies sur le sujet (72,73).

Parmi les caractéristiques des cellules qui doivent être analysées et vérifiées, il y a tout d'abord la capacité de différenciation. En effet, la reprogrammation cellulaire n'est efficace qu'entre 0,5 et 1% (74) et les cellules effectivement reprogrammées doivent donc être triées des autres. Il faut ensuite surveiller les éventuelles aberrations présentes comme la trisomie chromosomique, le raccourcissement des télomères ou les anomalies génétiques. L'obtention et la qualification d'une lignée d'iPSCs prend environ 6 mois. Une fois différenciées, la stabilité des cellules spécialisées, c'est-à-dire la persistance de leur phénotype et des fonctions associées dans le temps, est un autre critère important. Peut-il y avoir une résurgence du phénotype de la cellule somatique à l'origine des iPSCs ou de celui d'une cellule souche ? Sachant que certains des gènes induits comme c-MYC sont des proto-oncogènes et que certains vecteurs utilisés pour la reprogrammation sont intégratifs, la tumorigénicité des cellules doit également être investiguée (75,76). Ces critères doivent être étudiés et définis pour assurer la qualité et la sécurité des produits issus d'iPSCs afin d'envisager une application clinique.

Le moment le plus critique et sensible pour ces paramètres est la reprogrammation. Récemment, plusieurs méthodes ont été mises au point pour maîtriser et sécuriser cette étape afin de passer à un usage clinique. Historiquement, l'expression des 4 facteurs de transcription permettant la reprogrammation était induite par l'utilisation de rétrovirus ou de lentivirus qui sont intégratifs. Le taux de reprogrammation était bon mais le risque de mutations génétiques était non négligeable. En outre, l'expression des 4 facteurs de transcription n'était pas transitoire, ce qui pouvait empêcher une reprogrammation complète. Des vecteurs non intégratifs ont donc été développés, notamment des vecteurs viraux différents des rétrovirus et lentivirus (77), des épisomes (78), des mi- ou si-ARN (79,80), ou des mélanges de petites molécules (81,82). L'optimisation des vecteurs n'est pas l'unique amélioration du protocole d'obtention d'iPSCs à l'étude. Comme nous l'avons vu plus haut, le cocktail de facteurs de transcription et d'autres protéines à faire exprimer dans les cellules à reprogrammer est également sujet à amélioration. C'est par exemple le cas de la protéine Zscan4 (protéine en doigt de zinc). Lorsque son expression est induite dans la reprogrammation de cellules murines en iPSCs aux côtés des 4 facteurs de transcription habituels, cela permet une diminution des dommages à l'ADN et une augmentation du taux de réussite de la reprogrammation (83).

Ces différentes voies de développement pourraient permettre d'améliorer la qualité et la sécurité des cellules produites tout en garantissant l'uniformité des lignées. Cela permettrait ainsi de produire ces cellules de manière compatible avec les contraintes qu'impliquent une utilisation généralisée en clinique (quantités à produire, délais associés, respect des normes BPF). A ce niveau, les contraintes et enjeux sont du même ordre que ceux décrits pour les CSE.

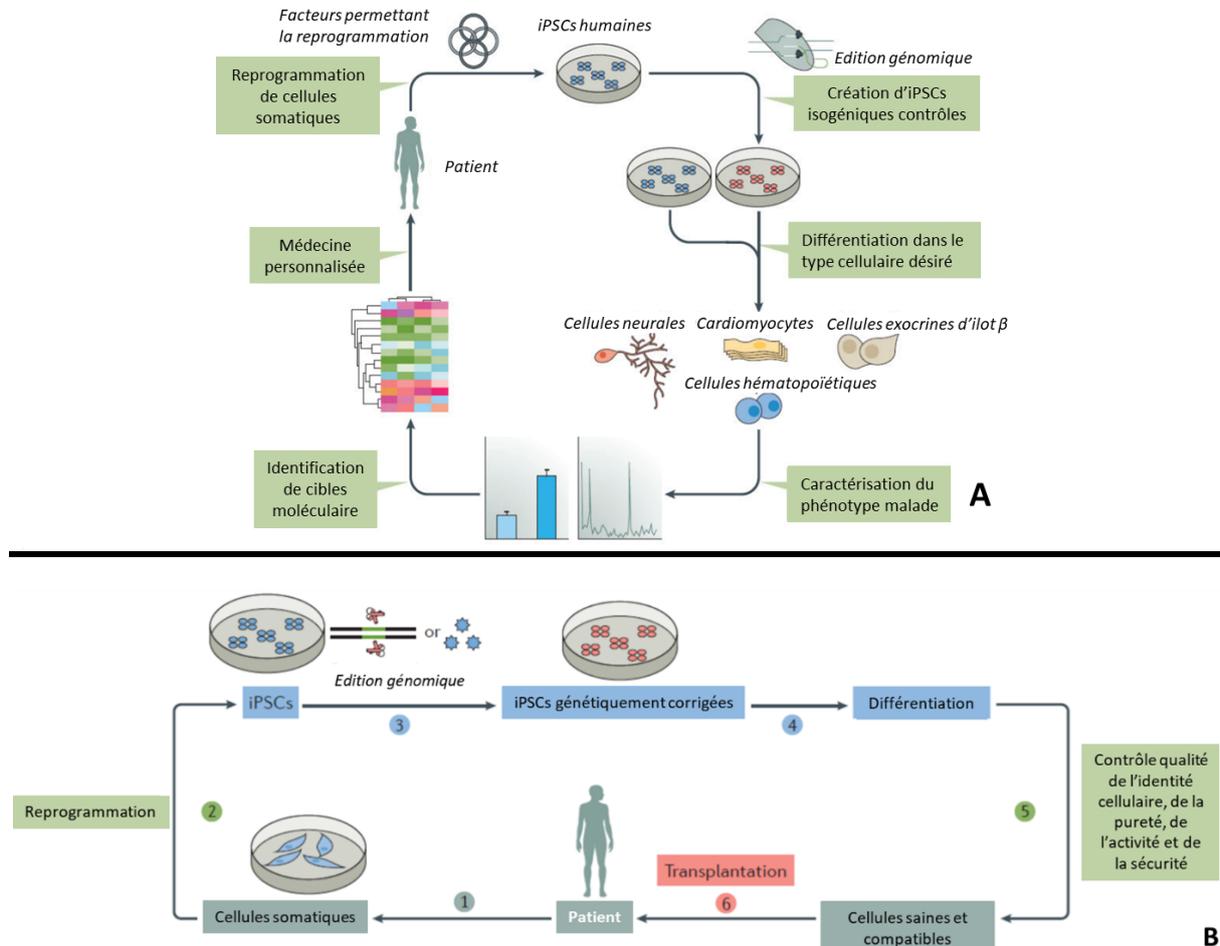


Figure 12 : Schéma explicatif de l'utilisation des iPSCs humaines pour la modélisation pathologique A) et en médecine régénérative B). Adaptée de Shi et al. (84).

Les CSE sont la référence historique en terme de cellules souches pluripotentes et c'est avec elles que les iPSCs sont comparées dans leur développement. La production d'iPSCs à partir de cellules somatiques issues par exemple de prise de sang est un énorme avantage par rapport au CSE. Les questionnements éthiques soulevés par ces dernières suite à l'utilisation d'embryon sont également éludés. Avec l'approche autologue, les problèmes de compatibilité pourraient également être plus facilement surmontés en utilisant comme matériau de base pour la production d'iPSCs les cellules du patient lui-même, servant *in fine* à le traiter. Cependant, dans cette approche, les procédés de production et de qualification des cellules pourraient s'avérer

trop lourds, complexes et long à mettre en place pour chaque patient. La constitution d'une banque cellulaire sur des critères immunologiques comme expliqué pour les CSE serait alors une bonne alternative et serait, dans le cas des iPSCs, plus simple à mettre en place que pour les CSE.

Dans l'étude des maladies, l'utilisation d'iPSCs issues de patients permet de développer des modèles d'étude pathologiques pour différents tissus notamment via l'utilisation de l'IT. Cette modélisation permet une étude plus aisée et une meilleure compréhension de la physiopathologie de certaines maladies tout en fournissant des plateformes de criblage de médicaments personnalisées, voire des modèles de tests pré-cliniques des traitements développés (figure 12). Cette approche facilite donc le développement de thérapies de médecine personnalisée (74). En médecine personnalisée également, il est envisageable, dans le cadre de maladies génétiques, de remplacer ou suppléer les tissus touchés par la maladie en utilisant les cellules du patient lui-même. Après avoir prélevé au patient ses cellules somatiques, on obtiendrait des iPSCs que l'on rendrait fonctionnelles et saines par édition génomique et l'on différencierait dans le type cellulaire voulu (figure 12).

Enfin, suivant la même philosophie que celle des iPSCs, une nouvelle méthode d'obtention de cellules différenciées et disponibles « facilement » a été développée récemment à partir de travaux plus anciens. Il s'agit de la transdifférenciation.

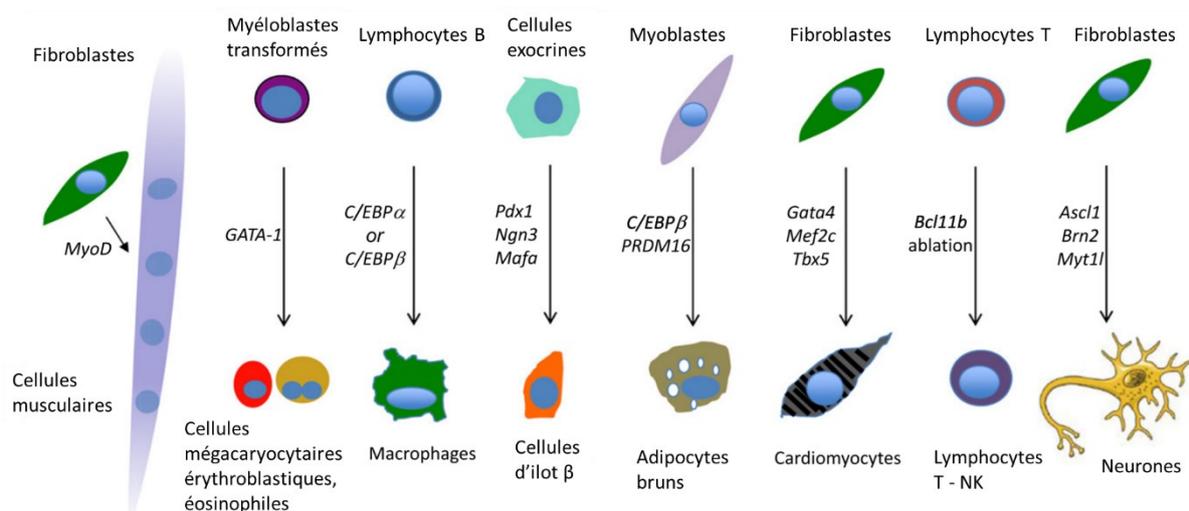


Figure 13 : **Exemples de transdifférenciation et des facteurs de transcription utilisés.** Les exemples présentés sont issus de différents travaux avec de gauche à droite Davis *et al.* (85), Kulesa *et al.* (86), Xie *et al.* (87), Zhou *et al.* (88), Kajimura *et al.* ((89), Ieda *et al.* (90), Li *et al.* (91,92), et Vierbuchen *et al.* (93). Adaptée de Thomas Graf (94).

En induisant l'expression différents cocktails de facteurs de transcription dans des cultures de cellules somatiques, il est possible de modifier leur lignage cellulaire et donc leur phénotype et leurs fonctions sans passer par l'étape cellule souche. Les facteurs de transcription à exprimer varient en fonction du type cellulaire que l'on veut produire (85). Plusieurs types de cellules ont été obtenus à partir de différentes lignées comme montré en figure 13. Beaucoup de questions relatives à cette technologie demeurent en suspens. La différenciation est-elle complète et permet-elle d'obtenir des cellules fonctionnelles ? Est-elle stable dans le temps ? Les risques liés aux modification génétique et épigénétique sont-ils supérieurs à ceux des iPSCs ? Encore plus que pour les iPSCs, ces points restent à clarifier afin d'envisager une utilisation clinique.

### II-1.1.3. CELLULES SOUCHES ADULTES

On entend par cellules souches adultes (CSA), les cellules présentant naturellement les caractéristiques des cellules souches mais qui ne sont pas des cellules souches embryonnaires et qui sont présentes dans les tissus matures (cellules souches tissulaires). Par rapport à la figure 10, on regroupe ainsi sous cette appellation les « cellules souche dérivées de fœtus » et les « cellules souches adultes ».

Les CSA permettent le maintien, voire la croissance, de la population cellulaire des tissus et par là même de leur fonction sur la durée de vie des organismes. Cette fonction est remplie lorsqu'une cellule souche se divise asymétriquement en une cellule « fille » souche identique (maintien du pool de cellules souches) et en une cellule « fille » engagée dans une voie de différenciation l'orientant vers un phénotype spécialisé propre au tissu dans lequel la division a lieu. Ces cellules ainsi que les autres cellules souches peuvent également faire des divisions symétriques où les deux cellules filles sont identiques ; soit identiques à la cellule mère soit engagées dans une voie de différenciation. Ces divisions ont lieu en permanence dans des organes soumis à une certaine usure et nécessitant leur renouvellement constant comme le sang, la peau ou l'intestin. Pour les autres CSA identifiées chez l'humain, la division est activée lorsque des signaux de réparation leur parviennent. Ces CSA sont par exemple certaines cellules souches hématopoïétiques, nerveuses, osseuses, pancréatiques, hépatobiliaires, musculaires lisses et musculaires squelettiques (41,95,96).

Le nombre de divisions des CSA à l'état indifférencié est limité *in vivo*. Leurs caractéristiques sont beaucoup plus hétérogènes que celles des CSE ou les iPSCs compte tenu de la diversité

des tissus de l'organisme auxquels elles appartiennent. Les CSA sont rarement pluripotentes et sont généralement programmées pour un tissu donné. Certaines sont multipotentes et peuvent ainsi se différencier en cellules de phénotypes divers mais généralement groupées au sein d'un même organe ou tissu. D'autres CSA sont unipotentes et ne produisent donc qu'un seul type de cellules (cellules souches épidermiques et kératinocytes par exemple). Les CSA sont plus abondantes dans les tissus néonataux ou les annexes fœtales (cordons ombilical, placenta, liquide amniotique). En effet, ces tissus sont encore en forte croissance et/ou finissent de s'organiser nécessitant une présence accrue des cellules souches. En outre, celles-ci ont parfois un potentiel de différenciation supérieur aux autres CSA mentionnées (41,95,96).

Les CSA sont issues de prélèvement chez le patient. Ceux-ci peuvent prendre différentes formes selon le tissu d'origine. Les sources les plus utilisées sont plutôt pourvoyeuse de cellules souches multipotentes et sont la moelle osseuse, la moelle hématopoïétique, la graisse (tissu très disponible en raison des liposuccions), les voies biliaires extra-hépatique et les annexes fœtales. De nombreux autres tissus sont également étudiés et utilisés pour leurs CSA spécifiques (souvent unipotentes) comme par exemple la peau (96). Par rapport aux CSE, les CSA présente un risque tumorigènes plus faible et sont engagées dans un lignage cellulaire plus restreint, leur sécurité est donc accrue pour une utilisation en clinique (96).

Ces dernières années, les CSA les plus étudiées et utilisées dans le développement de thérapies cellulaires et d'ingénierie tissulaire sont les cellules souches mésenchymateuses (CSM) (figure 14). Elles sont issues de la moelle osseuse et ne doivent pas être confondues avec les cellules souches hématopoïétiques qui sont à l'origine de toutes les lignées sanguines et que l'on retrouve également dans la moelle osseuse de certains os (os longs et os plats). Les CSM peuvent quant à elles se différencier en cellules de plusieurs types de tissus comme le cartilage, les os, la graisse, certains muscles, les ligaments et les tendons (98). Elles sont également étudiées pour leur potentiel de différenciation *in vitro* en cellules neuronales, en cardiomyocytes, en cellules endothéliales vasculaires ou en hépatocytes (42,99–101). La viabilité de ces dernières est toutefois incertaine *in vivo*.

D'autres sources de CSM comme le cordon ombilical ont été identifiées, plus particulièrement la gelée de Wharton qui l'entoure et dans une moindre mesure le sang de cordon ombilical bien qu'il soit surtout source de cellules souches hématopoïétiques (102). Le liquide amniotique est également décrit comme une source de CSM de même que les vili chorioniques

(103,104) et le tissu adipeux (105). Ces sources présentent l'intérêt d'être des produits secondaires d'interventions comme les accouchements, les amniocentèses et les liposuccions augmentant ainsi leur disponibilité et encourageant la recherche à leur sujet. De plus, les CSM issues d'annexes fœtales semblent avoir un potentiel de prolifération et de différenciation supérieur aux CSM issues de biopsies de tissus adultes et seraient pour certaines pluripotentes (102,103).

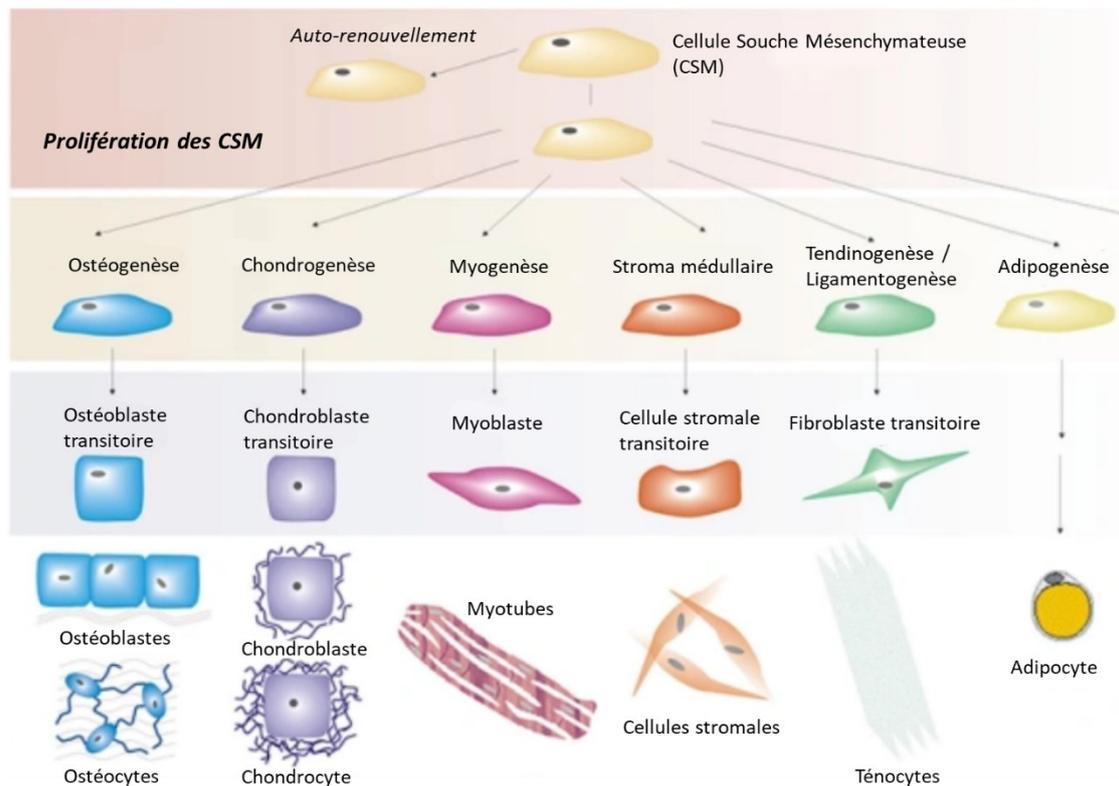


Figure 14 : **Les cellules souches mésenchymateuses (CSM)** sont des CSA que l'on trouve en petite quantité dans la moelle osseuse, dans la graisse ainsi que dans les annexes fœtales. Elles sont multipotentes et peuvent se différencier en cellules osseuses, cartilagineuses, musculaires, graisseuses, des tendons et ligaments. *Adaptée de Caplan & Bruder (97).*

Les CSM sont également intéressantes pour leurs propriétés immunomodulatrices. Celles-ci sont médiées par la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles que PGE2, le monoxyde d'azote, l'IL-6 ou le TNF- $\alpha$  leur permettant de réguler l'action des cellules de l'immunité acquise (lymphocytes T) et innée (neutrophiles, macrophages, cellules dendritiques, cellules NK) (106). Elles les régulent également par contact et, ce faisant, influent sur la sécrétion de cytokines par les cellules immunitaires (exemple figure 15). Ces propriétés permettent d'éviter les rejets lors des transplantations de CSM allogéniques (107).

Elles permettent également d'envisager le traitement de maladies auto-immunes bien que leur efficacité soit pour l'heure incertaine (108). Enfin, elles permettent de traiter certaines formes de réaction du greffon contre l'hôte et ont donné lieu à une autorisation de mise sur le marché pour un médicament à base de CSM dans cette indication au Canada (109).

Les CSM possèdent également des propriétés antibactériennes liées en partie à leur propriétés immunomodulatrices mais également à la sécrétion de peptides antibactériens (111).

Enfin, les CSM peuvent sécréter des facteurs trophiques pouvant induire la régénération des tissus notamment via l'activation de leurs cellules souches endogènes (112). Ces effets ont été particulièrement étudiés pour le cœur. Il a été montré que les CSM stimulent la prolifération et la différenciation des cellules souches cardiaques (113) induisant ainsi un remodelage du tissu cardiaque et une amélioration de sa fonction suite à des cardiomyopathies ischémiques chez l'humain(114,115).

Les CSM, de par leurs propriétés, sont donc très intéressantes en médecine régénérative et en IT. Leur co-administration au sein d'un produit d'IT avec des cellules différenciées ou non pourrait permettre d'avancer sur les problématiques de conception, d'intégration et de rejet des thérapies d'IT.

Ces cellules ne sont cependant pas exemptes de défauts. Chez l'humain, la tumorigénicité des CSM semble faible mais cet aspect est largement discuté et des études à plus long terme sont nécessaires alors que leur utilisation, encore faible, augmente. Plusieurs paramètres influeraient sur ce risque tels que l'âge du donneur, le tissu hôte et la durée de la culture cellulaire. Lors de mise en culture sur de longues périodes, leur potentiel de différenciation

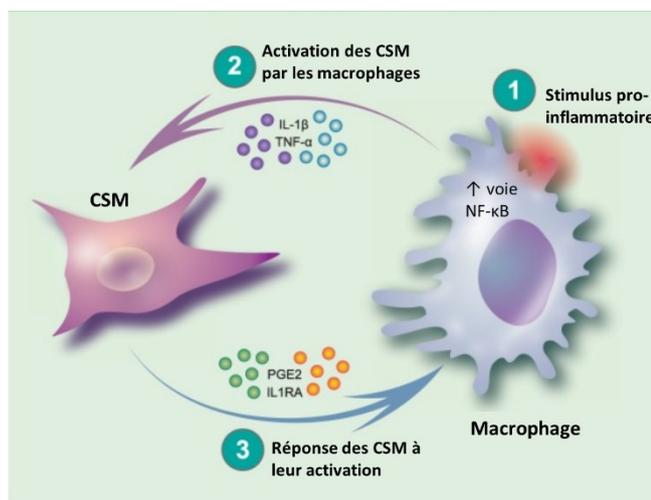


Figure 15 : **Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) et les macrophages communiquent entre eux.** Les macrophages sont activés par des stimuli via la voie du NF-κB pour produire des facteurs pro-inflammatoires comme l'IL-1β et le TNF-α. Cela crée une boucle de rétroaction par laquelle les cytokines pro-inflammatoires produites par les macrophages stimulent la production de la prostaglandine E2 (PGE2) et de l'interleukine (IL-1RA) par les CSM, entre autres modulateurs immunitaires, régulant à la baisse l'activité pro-inflammatoire des macrophages et des autres cellules avoisinantes. *Adaptée de Carty et al.* (110)

diminuerait, leur morphologie changerait et la probabilité de transformation maligne augmenterait. De plus, alors que ces cellules montrent une activité antiproliférative sur les cellules cancéreuse *in vitro*, *in vivo* elles causeraient plutôt une augmentation de la croissance tumorale et du potentiel métastatique (116). Les CSM pourraient également être thrombogéniques, plus particulièrement au niveau pulmonaire où elles s'accumulent après injection systémique, induisant en un risque d'embolie pulmonaire. Ces risques doivent être investigués de manière approfondie et maîtrisés mais n'enlèvent rien au fort potentiel des CSM en médecine régénérative et en IT (116).

Pour permettre un usage large en clinique, les CSA et les produits qui en sont issus doivent se conformer aux norme BPF. Les sources principales de difficultés pour mettre la production de CSA en conformité avec les normes BPF sont similaires à celles évoquées pour les CSE et les iPSCs. Les standards établis en terme de qualité, sécurité et uniformité pour les autres thérapies cellulaires existantes constituent un objectif et une référence à atteindre.

## II-1.2. BIOMATERIAUX

---

Après avoir passé en revue les différentes sources de cellules utilisables en IT, intéressons-nous maintenant à l'autre type de matériaux fondamental de ces technologies : les biomatériaux. Dans l'organisme, les cellules sont organisées et structurées en tissus par la matrice extra-cellulaire (MEC). C'est un assemblage de macromolécules qui entoure les cellules qui la synthétisent et à travers laquelle elles expriment une partie de leur phénotype (figure 16 et 18). La MEC détermine par ses caractéristiques et sa composition les propriétés du tissu (flexibilité, élasticité, résistance mécanique, etc.) et certaines de ses fonctions (117). Elle est constituée de composants protéiques, principalement le collagène de type I ; de glycoprotéines telles que la fibronectine et la laminine ; de glycosaminoglycanes et protéoglycanes (comme l'acide hyaluronique) ; et de composants minéraux dans certains tissus (notamment l'hydroxyapatite, dans le tissu osseux et les dents) (118). Comme nous l'avons vu, l'ingénierie tissulaire cherche en particulier à créer des substituts de tissus. Le rôle joué par la MEC dans les tissus de l'organisme doit également être rempli dans les tissus produits par IT, les cellules seules ne suffisent pas et ne survivent pas. Les biomatériaux doivent tendre à remplir ce rôle. Ils sont également essentiels à la mise en forme des tissus car contrairement aux tissus natifs qui prennent forme progressivement avec la croissance de l'organisme, la forme et la taille

finales des tissus d'IT sont souvent définies lors de leur fabrication via les différentes techniques et procédés disponibles.

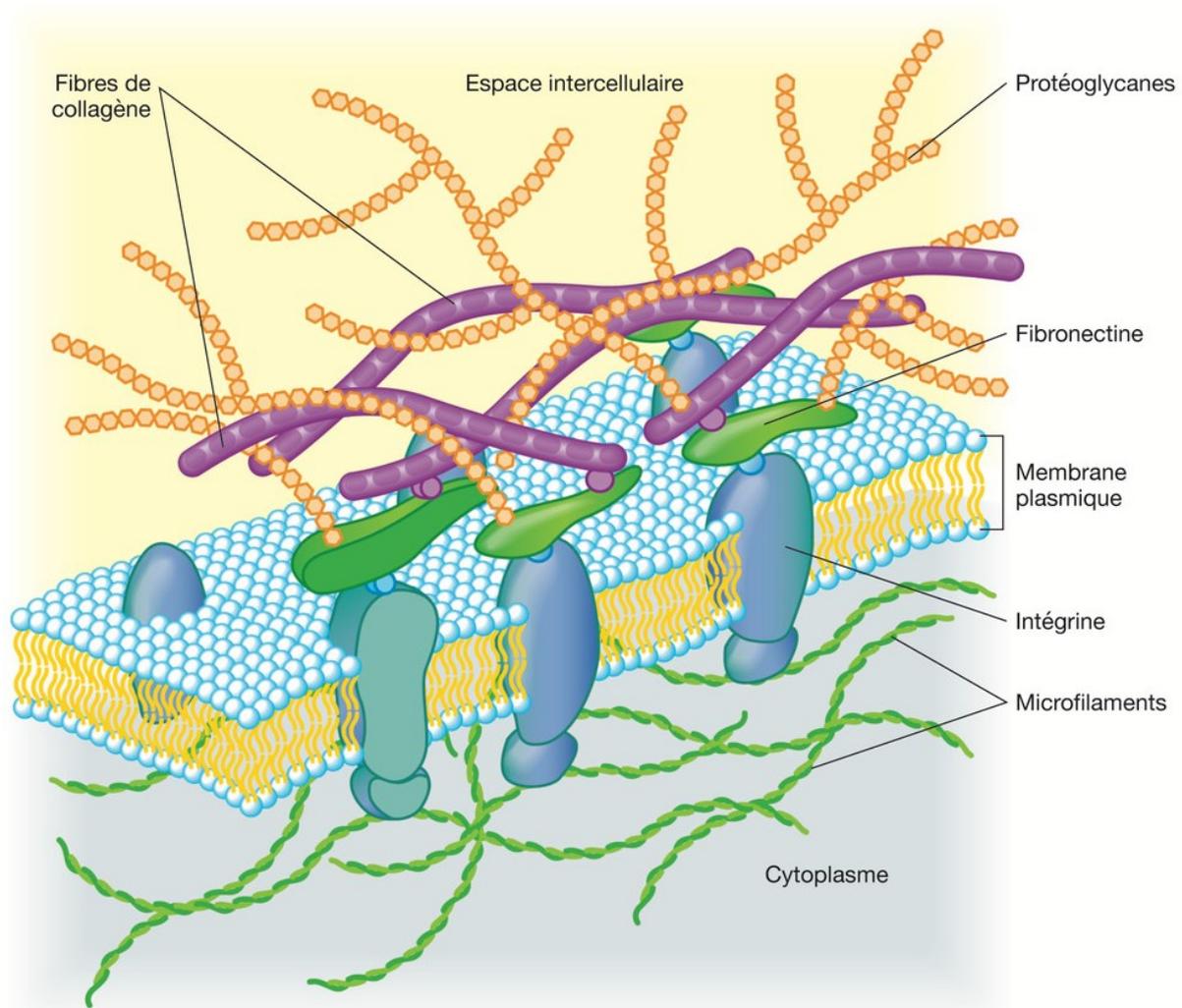


Figure 16 : **Matrice extracellulaire (MEC)**. La MEC constitue l'essentiel de l'espace interstitiel ou intercellulaire des cellules animales. Elle contient des protéines sécrétées par les cellules avoisinantes, la principale étant le collagène. D'autres protéines, telles que les protéoglycanes, la fibronectine ou la laminine, y sont également présentes. Ensemble, elles offrent un support aux cellules qui peuvent y adhérer à l'aide de molécules telles les intégrines. La MEC joue un rôle important dans la différenciation des cellules et le développement des tissus. *Issue de Campeau-Péloquin & Roy (119)*

### II-1.2.1. DEFINITION

Qu'est-ce qu'un biomatériau ? L'Union internationale des sociétés pour la science et l'ingénierie des biomatériaux a actualisé en 2018 sa définition précédente datant de 1986 lors de sa « Conférence sur les définitions en matière de biomatériaux ». Elle définit un biomatériau comme un « *matériau conçu pour prendre une forme qui peut diriger, par des interactions avec des systèmes vivants, le déroulement de toute procédure thérapeutique ou diagnostique* » (120). Une autre définition couramment utilisée est celle du NIH (National Institutes of Health)

donnée en 1982 lors de sa « Conférence pour le développement de consensus ». Un biomatériau y est défini « *comme toute substance (autre qu'un médicament) ou combinaison de substances, d'origine synthétique ou naturelle, qui peut être utilisée pendant une période donnée, dans son ensemble ou en tant que partie d'un système qui traite, augmente ou remplace tout tissu, organe ou fonction du corps* » (121).

#### II-1.2.2. EVOLUTION ET PROPRIETES ESSENTIELLES

Les biomatériaux ne sont pas utilisés uniquement en ingénierie tissulaire et étaient utilisés bien avant l'émergence de celle-ci. De nombreuses prothèses et autres dispositifs médicaux en sont fait et ce depuis longtemps, avant même l'invention du terme « biomatériau ». On peut distinguer plusieurs générations de biomatériaux dont les propriétés et les caractéristiques ont évolué, notamment grâce aux avancées en biologie, en chimie et en physique. Ces évolutions permettent une adaptation toujours plus fine à l'organisme via des interactions de plus en plus étroites et complexes avec celui-ci. Cela est particulièrement vrai avec les biomatériaux destinés à l'IT qui doivent permettre une intégration du néo-tissu dans l'organisme ainsi que la survie, la croissance voire la différenciation des cellules en son sein.

Les premiers matériaux pouvant être considérés comme des biomatériaux sont ceux issus des premières prothèses avec par exemple les prothèses oculaires, les premières prothèses dentaires et les prothèses de remplacement de membres. Les propriétés recherchées pour ces biomatériaux étaient alors leur fonctionnalité et l'absence d'altération suite à leur contact avec l'organisme ; on parlait alors de bio-inertie. Ainsi, le verre utilisé pour des prothèses oculaires permettait de mimer l'œil et était inerte, il ne provoquait ainsi pas ou peu de réaction des tissus de l'orbite où il était implanté et n'était pas altéré par eux. (122).

Par la suite, au cours du XX<sup>ème</sup> siècle, est apparue une seconde génération de prothèses conçues pour être insérées dans le corps des patients au cours d'interventions chirurgicales. Il s'agissait par exemple des prothèses d'os et de cartilages (prothèse de hanche et de genou, plaques d'ostéosynthèse) ou des premières prothèses cardiaques (valves artificielles ou stents). De par leur contact bien plus étroit avec les tissus du milieu intérieur, la bio-inertie revendiquée précédemment ne suffisait plus et semblait même ne plus correspondre à la réalité des connaissances que ces nouvelles interactions biomatériaux-organismes faisaient émerger. Les biomatériaux de ces prothèses ne devaient pas induire de réaction néfaste de l'organisme.

Qu'elles fussent néfastes pour l'organisme ou pour la prothèse. La conception de ces prothèses et la nature des biomatériaux utilisés ont donc évolué (122,123).



Figure 17 : Différentes générations de biomatériaux pour une relation toujours plus étroite avec l'organisme. **A)** Prothèse oculaire en verre. Issue de (124) **B)** Prothèse de hanche en alliage biocompatible cobalt-chrome-molybdène (Vitallium) dite de Mac Kee conçue dans les années 1960. Issue de (125) **C)** Cellules encapsulées dans des billes d'alginate, biomatériau biocompatible, bioactif et biorésorbable. Issue de Hoesli et al. (126)

La troisième génération de biomatériaux apparaît au cours des années 1970 et est directement issue d'évolutions liées aux insuffisances de la deuxième génération pour des applications similaires. La longévité des prothèses de seconde génération pouvait par exemple être insuffisante en raison d'une mauvaise intégration aux tissus environnants. Pour reprendre l'illustration précédente, les biomatériaux des prothèses d'orthopédie ou des prothèses cardiaques ont évolué pour permettre une colonisation maîtrisée par certaines cellules environnantes, participant à leur intégration dans l'organisme. Autre exemple, il a été intéressant de développer les fils de sutures biorésorbables, permettant leur élimination de l'organisme, pour qu'elles disparaissent une fois la cicatrisation terminée, sans avoir à les enlever. Des biomatériaux ont également été conçus pour être injectés dans l'organisme et remplacer la MEC en favorisant la colonisation cellulaire et le remodelage (122,123). Il s'agit notamment des ciments osseux utilisés pour le comblement osseux ou la fixation de prothèses et dont les biomatériaux ont évolués, passant de résines synthétiques à des ciments phosphocalciques dont la composition chimique se rapproche de celle de l'os, permettant au cycle naturel du remodelage osseux d'y prendre place (127). Pour permettre une meilleure intégration des prothèses dans l'organisme voire de traiter celui-ci, des biomatériaux relarguant des médicaments ont également été développés. C'est par exemple le cas des stents actifs ou enrobés qui présentent à la surface de leur alliage métallique un polymère sur lequel est fixé une molécule antiproliférative libérée *in vivo* avec pour objectif de réduire le risque de resténose (128). Avec cette troisième génération de biomatériaux, la biocompatibilité est améliorée et la bioactivité et la biorésorption sont développées. Les interactions avec l'organisme sont étudiées au niveau de la relation cellule-biomatériau. L'adhésion, la

colonisation, la prolifération cellulaire et le dépôt de MEC au sein des biomatériaux deviennent des facteurs essentiels à étudier pour contrôler ces trois propriétés (biocompatibilité, bioactivité, biorésorption) (129).

L'ingénierie tissulaire a émergée à la fin des années 1980 pendant et avec l'essor de ces biomatériaux de 3<sup>ème</sup> génération. Elle y a eu recours et les a également fait évoluer par ses besoins spécifiques liés à la relation très étroite entre cellules et biomatériaux, élément central de cette discipline. Relever certains des défis posés par le développement de tissus artificiels a été l'un des moteurs de l'apparition de nouveaux biomatériaux biomimétiques reproduisant certaines caractéristiques de la MEC et de l'environnement cellulaire. De même, de nouveaux biomatériaux intelligents ont été proposés, permettant la transmission de signaux physiques ou chimiques et réagissant à ceux-ci ; ces deux notions ne s'excluent pas mutuellement, bien au contraire. Ces biomatériaux constituent la 4<sup>ème</sup> génération et sont toujours en développement. Pour ce faire, les dernières découvertes en chimie, physique et biologie cellulaire sont évidemment exploitées, de même que celles issues de certains domaines scientifiques jusqu'alors peu utilisés tels que les nanotechnologies (123,130).

### II-1.2.3. PRINCIPALES PROPRIETES DES BIOMATERIAUX D'INGENIERIE TISSULAIRE

Pour remplir leur rôle, les biomatériaux et notamment ceux utilisés en IT doivent présenter plusieurs propriétés déjà évoquées : biocompatibilité, bioactivité, biorésorption. Celles-ci peuvent s'exprimer de différentes manières en fonction du tissu et du biomatériau. L'objectif est que cette expression soit la plus adaptée à l'usage prévu dans le contexte biologique spécifique. Ces propriétés sont sous l'influence de différents paramètres d'ordre mécaniques, chimiques, physiques et biologiques qui sont imbriqués et s'influencent mutuellement.

De manière générale, la biocompatibilité d'un biomatériau implique qu'il soit compatible avec le sang, non toxique, non inflammatoire, non pyrogène, non allergène et non cancérogène ; bien que dans des cas particuliers, certains de ces effets puissent être recherchés pour que le biomatériau exerce sa fonction ( exemple de la cytotoxicité recherchée en oncologie de certains biomatériaux intégrés au sein de « smart bomb ») (118,123). En IT, comme toutes les fonctions cellulaires telles que l'adhésion, la prolifération, la migration et la différenciation peuvent potentiellement se produire dans l'échafaudage du biomatériau, la biocompatibilité de celui-ci

est très importante pour obtenir ce résultat. Divers facteurs tels que le type de polymère utilisé, la structure, une éventuelle fonctionnalisation et les éventuels produits de dégradation déterminent la biocompatibilité d'un biomatériau (123). On peut parler d'une biocompatibilité du biomatériau avec les cellules auxquelles il sert d'échafaudage et également avec les cellules de l'organisme dans lequel il est implanté.

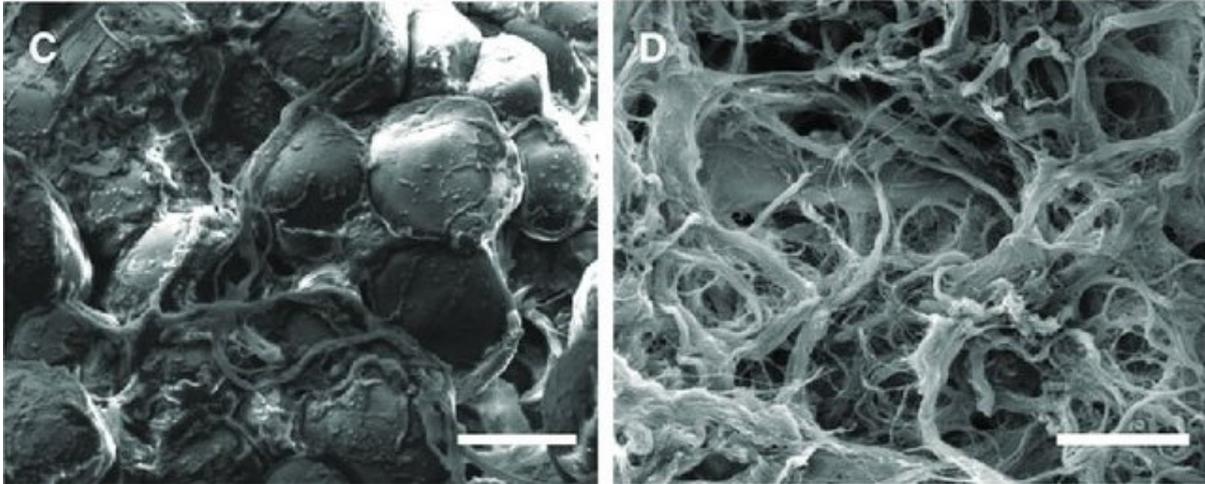


Figure 18 : Images de microscopie électronique à balayage de tissu adipeux porcin avant (C) et après (D) décellularisation. La matrice extracellulaire, principalement du collagène ici, forme un réseau poreux de soutien aux cellules. Les barres d'échelle représentent 50 µm. Adaptée de YC Choi et al. (131)

La bioactivité est la propriété d'un biomatériau à interagir avec le tissu environnant en favorisant l'adhésion, la prolifération et la différenciation des cellules (132). Les biomatériaux dont la composition chimique est proche à celle du tissu hôte présentent en général une bioactivité plus élevée. Ils peuvent présenter des motifs de reconnaissance cellulaire et susciter une réponse spécifique comme la prolifération ou la différenciation. Pour rendre un biomatériau bioactif, il est possible de modifier sa surface en y ajoutant des macromolécules de la MEC comme la laminine, le collagène ou la fibronectine ou des motifs protéiques qui en sont issus. Cela permet de produire un environnement biomimétique similaire au tissu original et d'ainsi moduler le comportement cellulaire (133). Les applications d'IT favorisent en général les biomatériaux bioactifs (118).

Pour certaines applications, en particulier en IT, il peut être nécessaire que les biomatériaux soient biodégradables ou biorésorbables. C'est encore plus vrai pour les biomimétiques. Ils doivent se dégrader pour permettre aux cellules de produire leur propre MEC en les remplaçant. Les sous-produits de cette dégradation doivent être non toxiques et facilement éliminés par l'organisme (134). La connaissance des cinétiques de dégradation des biomatériaux *in vivo* est essentielle pour s'assurer qu'ils ne soient pas dégradés trop lentement

ou trop rapidement. Dans le premier cas, la persistance du biomatériau trop longtemps peut provoquer une inflammation pouvant aller jusqu'à la nécrose. Dans le second, sa dégradation précoce ferait disparaître l'échafaudage structurant la croissance et l'organisation des cellules avant que celles-ci ne puissent s'en passer grâce à la synthèse de leur propre MEC (135,136). Dans l'idéal et dans la majorité des cas, le taux de dégradation du biomatériau doit correspondre au taux de régénération des tissus, permettant au biomatériau de structurer et favoriser leur croissance ou régénération et de disparaître progressivement lorsqu'il n'est plus utile (123).

#### II-1.2.4. PARAMETRES CLES DES BIOMATERIAUX D'INGENIERIE TISSULAIRE

De nombreux paramètres influencent les propriétés des biomatériaux. Dans la partie qui suit nous passeront en revue les plus importants à prendre en compte pour les biomatériaux d'IT. Il est important de noter qu'il n'existe pas une combinaison idéale de valeurs de ces paramètres permettant de créer un biomatériau optimal et universel pour toutes les applications d'IT. Les tissus physiologiques remplissant des fonctions différentes, leur composition et leurs caractéristiques sont différentes et adaptées à ces fonctions. Il en va de même pour les biomatériaux destinés à les remplacer.

On peut séparer les différents tissus en deux classes qui conditionnent les paramètres recherchés.

- Les tissus durs qui comprennent les os et les dents. Leur fonction de soutien nécessite une certaine résistance mécanique rendues possible par leur MEC minéralisée. Les biomatériaux utilisés pour l'IT de ces tissus devront également présenter des caractéristiques proches. Les céramiques et les alliages métalliques sont de ce fait très utilisés (118).
- Les tissus mous comprennent les autres tissus comme la peau, le cartilage, les ligaments, le foie, etc. Leurs fonctions et caractéristiques sont très variables. Différents polymères synthétiques et naturels aux caractéristiques tout aussi variées sont utilisés dans l'IT de cette classe de tissus (118).

Ces biomatériaux doivent présenter des paramètres mécaniques adaptés à leur rôle et aux contraintes auxquelles ils seront soumis. Cela est nécessaire pour permettre l'intégrité

mécanique du tissu et ainsi fournir un support aux cellules à partir de leur ensemencement et ce éventuellement jusqu'à la fin du processus de remodelage où la MEC néoformée les remplacera. Parmi ces paramètres mécaniques, la résistance correspond à la valeur de la contrainte à partir de laquelle le biomatériau commence à se fracturer. Cette valeur varie selon le sens de la contrainte et on peut par exemple dissocier résistance à la traction et résistance à la compression (118). L'élasticité ou module de Young correspond à la capacité d'un biomatériau à se déformer sous la contrainte ou au contraire à rester rigide. L'élastance correspond quant à elle à la capacité d'un biomatériau élastique à retrouver sa forme initiale lorsque la contrainte qui le déformait disparaît (118). Ces différents paramètres dépendent principalement de la nature des liaisons entre les atomes et entre les molécules d'un biomatériau ainsi que de leur structure (129). On cherche la plupart du temps à obtenir des biomatériaux reproduisant les mêmes paramètres mécaniques que ceux du tissu dans lequel ils seront intégrés. Au-delà de la continuité mécanique, ces paramètres influencent également le comportement cellulaire. Il a par exemple été observé une différence d'adhésion et d'étalement des cellules sur différents supports de rigidité variable. Cela se traduit par une migration préférentielle le long d'un gradient de rigidité, appelée durotactisme. Engler *et al.* ont également montré dans leur travaux que la différenciation de CSM de moelle osseuse semble significativement régulée par la rigidité du biomatériau support. Dans leur expérience, selon la rigidité des support, les CSM s'engageaient dans une voie de différenciation neurogénique, myogénique ou ostéogénique (137).

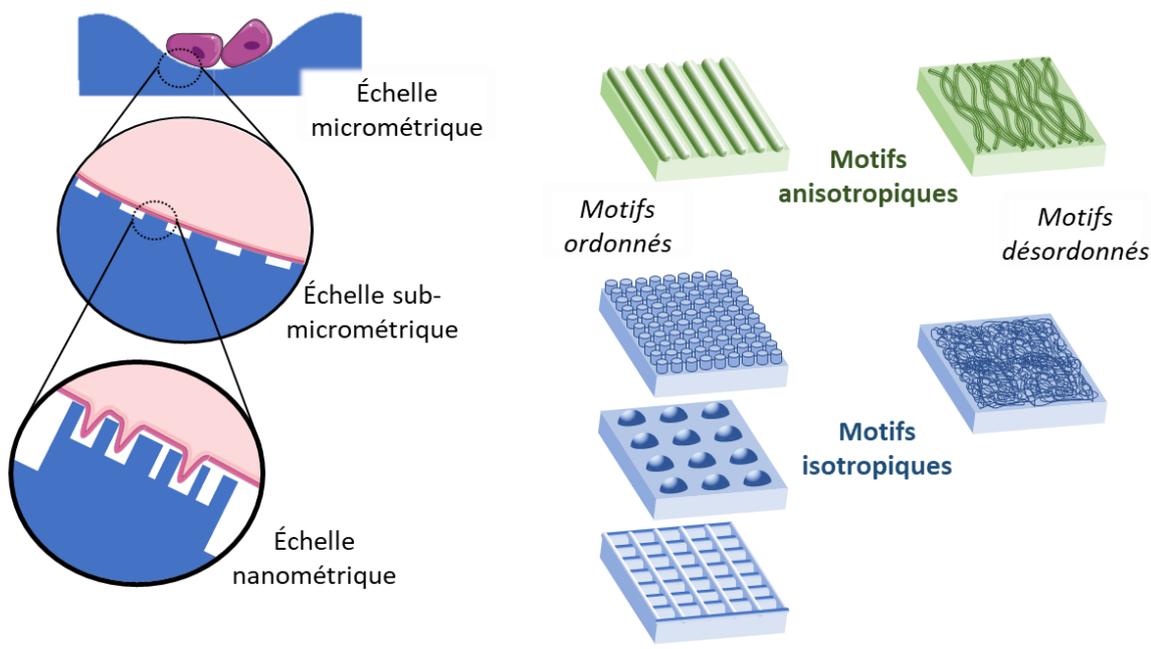
Les paramètres structurels des biomatériaux sont définis par leur composition et par leur méthode de fabrication. Ils vont influencer les paramètres mécaniques ainsi que le comportement des cellules dans les biomatériaux. En particulier, ces paramètres définissent la micro et la macro architecture des structures formées par le biomatériau pour servir de support aux cellules. L'architecture de cet échafaudage est déterminante pour l'adhésion, la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire mais également pour la vascularisation et la diffusion de nutriments et autres substances à partir ou vers les cellules (138). Pour les polymères, une partie de ces paramètres structurels est conditionnée par la taille et la forme des monomères ainsi que par leur agencement entre eux et donc leurs liaisons. Les polymères utilisés constituent généralement une maille dont la taille influence leur perméabilité, c'est-à-dire la taille des molécules qui pourront pénétrer dans le biomatériau. On peut grâce à ce paramètre et à d'autre comme la charge du polymère, moduler la perméabilité du biomatériau

pour permettre le passage des nutriments vers les cellules à l'intérieur de celui-ci tout en empêchant celui de molécules plus grandes comme les immunoglobulines. Cela peut conférer au biomatériau une propriété d'immunoprotection des cellules (139).

Idéalement, un biomatériau d'ingénierie tissulaire destiné à accueillir des cellules doit présenter une surface spécifique ou aire volumique élevée. Ce paramètre correspond au rapport entre sa surface réelle et son volume apparent. En étant élevé, il permet en théorie une fixation des cellules plus importante (123). Cela implique que le matériau soit poreux. La porosité, l'interconnexion et la taille des pores sont des paramètres structuraux importants car ils influencent la pénétration et la migration des cellules dans le biomatériau (figure 19). Ils influencent également la vascularisation et les échanges en nutriments et autres substances vers les cellules à l'intérieur du biomatériau et la synthèse de MEC par celles-ci. La porosité doit donc être élevée tout en étant compatible avec des paramètres mécaniques adéquats, l'équilibre entre les deux peut être difficile à atteindre. La taille des pores doit être assez élevée pour permettre l'accueil des cellules en leur sein mais suffisamment petit pour ne pas dépasser une masse critique de cellules par pores au-delà de laquelle leurs conditions de prolifération ne sont plus réunies (129). Cette taille dépend du type de cellules et de l'usage recherché. La croissance des fibroblastes et des hépatocytes nécessite par exemple des pores de 20  $\mu\text{m}$  (129). Des pores de 20 à 150  $\mu\text{m}$  seront plus adaptés pour des applications de régénération des tissus mous (129) et des pores de 200 à 400  $\mu\text{m}$  pour l'ingénierie des tissus osseux (129). Il est également important que les pores soit interconnectés pour permettre la migration cellulaire au sein du biomatériau ainsi que les échanges de nutriments et autres substances (129).

La mouillabilité de la surface du biomatériau est un autre paramètre important à prendre en compte (figure 19). Il va influencer la bioactivité d'un biomatériau en influant sur l'adhésion des cellules à celui-ci via les protéines de la MEC qu'elles produisent. Une surface hydrophobe altère la structure protéique des molécules de la MEC, empêchant l'adhésion des cellules à celle-ci (140). Il a été prouvé qu'au contraire, l'hydrophilie favorise l'adhésion et l'étalement cellulaire grâce à un dépôt accru de protéines de la MEC à la surface du biomatériau (141). Une surface trop hydrophile entrainera par contre un mauvais attachement des protéines de la MEC à celle-ci et donc une mauvaise adhésion cellulaire (142).

### Topographie de la surface



### Pores



### Paramètres physico-chimiques

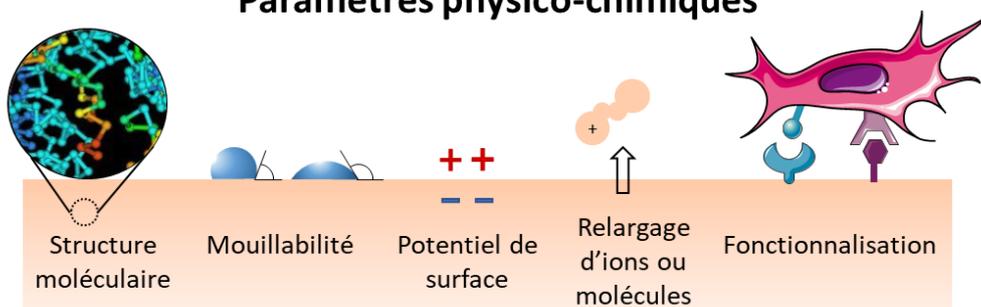


Figure 19 : Paramètres structuraux et physico-chimiques des biomatériaux influençant leur interaction avec les cellules.

La charge électrique à la surface du biomatériau participe à définir l'hydrophilie de celle-ci et influence donc sa bioactivité (figure 19). La charge influence également la bioactivité par d'autres moyens. Il a été démontré qu'une surface chargée positivement favorisait plus l'adhésion et l'étalement des cellules qu'une surface chargée négativement (141). Il peut y avoir plusieurs raisons à cela, la surface des cellules est recouverte d'une couche de

glycoprotéines et de protéoglycanes, le glycocalyx, la chargeant négativement. Une attraction électrostatique des charges opposées à la surface du biomatériau et des cellules a lieu. Les protéines de la MEC produites par les cellules et chargées négativement adhéreront plus efficacement à la surface du biomatériau grâce à ces mêmes interactions électrostatiques, faisant le lien avec les cellules et facilitant donc leur adhésion et leur étalement (141).

La topographie de la surface des biomatériaux impacte fortement le comportement cellulaire et peut être considérée de l'échelle micrométrique à nanométrique. Les motifs retrouvés sont variables avec par exemple des mailles, des rainures et des crêtes. Leur taille est également variable. Cette topographie de la surface avec laquelle les cellules sont en contact influe sur leur survie, leur prolifération, leur migration et leur différenciation et il est important de comprendre les mécanismes sous-jacents pour obtenir un biomatériau adapté à un usage spécifique (143). Les motifs en rainures ou crêtes sont des surfaces anisotropes car leurs propriétés topographiques varient selon la direction. Sur de telles surfaces, les cellules auront tendance à s'aligner et à s'allonger le long des crêtes (144,145). La migration cellulaire est sensible à ces caractéristiques topographiques de la surface sur laquelle elle a lieu par un phénomène appelé topotactisme ou thigmotactisme ; les cellules ont tendance à suivre les hétérogénéités rencontrées au cours du déplacement, plus particulièrement les discontinuités linéaires comme les rainures ou les crêtes. La largeur de celles-ci semble également impacter la vitesse de la migration cellulaire (146). La différenciation des cellules souches peut également être affectée par la topographie. Il a par exemple été montré que des CSE pouvaient se différencier efficacement et rapidement en une lignée neuronale en étant cultivées sur une surface à motifs de crêtes et de rainures de taille spécifique et ce, sans aucun autre agent induisant leur différenciation (147).

Au-delà des paramètres physiques et chimiques évoqués, quelques paramètres d'ordre pratique doivent être pris en compte dans la conception ou le choix d'un biomatériau d'IT. Le biomatériau doit être transformable pour pouvoir être fabriqué à la forme souhaitée, manipulé facilement par les chirurgiens et compatible avec leurs instruments et leurs techniques (123). Son prix doit être accessible et son industrialisation possible. Le stockage doit être aisé et sûr et le biomatériau doit pouvoir rester stable pendant une durée suffisante (148).

Le biomatériau idéal pour chaque application n'existe pas. Certains ont des paramètres mécaniques et structuraux intéressants pour une application mais des propriétés de surface

inadéquates. Il peut alors être intéressant de modifier la surface de ces biomatériaux pour en améliorer la mouillabilité, la charge, les motifs d'adhésion cellulaire. Pour ce faire, le biomatériau doit pouvoir être facilement modifiable et fonctionnalisable. Plusieurs procédés sont utilisables selon le type de biomatériau : adsorption physique, modification médiée par radiation, greffage moléculaire, la modification protéique, etc (149).

#### II-1.2.5. CLASSES DE BIOMATERIAUX UTILISES EN INGENIERIE TISSULAIRE

Les biomatériaux pouvant servir à l'ingénierie tissulaire sont nombreux et peuvent être classés selon leur nature et selon leur origine naturelle ou synthétique. Nous passerons ici en revue ces différentes classes et leurs caractéristiques.

##### II-1.2.5.1. CERAMIQUES

Les céramiques sont des composés inorganiques pouvant contenir des éléments métalliques et non métalliques. Ils peuvent être d'origine naturelle ou synthétique. Ce sont généralement des solides polycristallins et sont rarement amorphes (129). Si leurs propriétés dépendent de la manière dont elles sont produites et de leur composition, ces biomatériaux sont en général rigides, faiblement élastiques, avec une surface dure et se dilatent faiblement avec la chaleur (150). De par ces caractéristiques, les biomatériaux céramiques sont couramment utilisés en régénération osseuse et dentaire. Ils sont de plus fortement biocompatibles et engendrent peu de formation de tissu fibreux à leur proximité. Selon certains auteurs il peuvent être ostéoinducteurs car ils favorisent le recrutement des cellules environnantes et favorisent leur différenciation ostéogéniques (150,151).

Trois types de céramiques non mutuellement exclusifs peuvent être distingués en fonction de leur caractéristique principale : i) Les céramiques bioactives recrutant et interagissant avec les cellules à leur surface. ii) Les céramiques résorbables pouvant être dégradées *in vivo* par phagocytose ou dissolution. iii) Les céramiques bioinertes ne subissant aucune modification de leur environnement biologique (152).

Parmi les biomatériaux céramiques les plus utilisés en IT on retrouve les phosphates de calcium qui incluent l'hydroxyapatite ( $\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$ ), les phosphates tricalciques bêta ( $\text{Ca}_3[\text{PO}_4]_2$ ) et les phosphates de calcium biphasiques qui sont un mélange des deux précédents ; le

Bioglass® qui est un phosphosilicate de sodium et de calcium ; l'alumine ( $Al_2O_3$ ) et l'oxyde de zirconium ( $ZrO_2$ ).

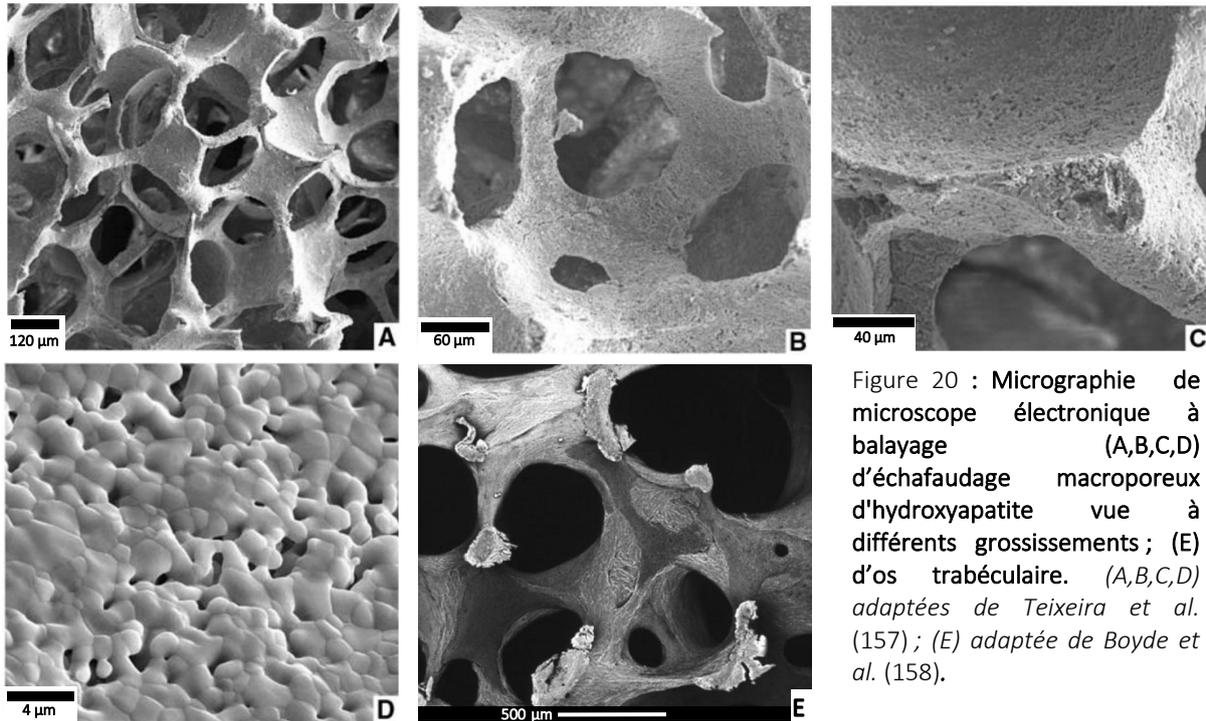


Figure 20 : Micrographie de microscope électronique à balayage (A,B,C,D) d'échafaudage macroporeux d'hydroxyapatite vue à différents grossissements ; (E) d'os trabéculaire. (A,B,C,D) adaptées de Teixeira et al. (157) ; (E) adaptée de Boyde et al. (158).

Les phosphates de calcium ont pour principal intérêt d'imiter la composition du tissu osseux. L'os est constitué en grande partie d'hydroxyapatite et les biomatériaux qui en sont fait peuvent avoir une origine naturelle (os d'animaux) ou synthétique (figure 20). En plus d'être biocompatible, il a été montré que l'hydroxyapatite favorise la différenciation des CSM en lignée ostéochondrale (153,154).

Le Bioglass®, est riche en calcium et en phosphore ce qui favorise la formation par l'organisme de cristaux d'apatite à sa surface. Il est de ce fait particulièrement adapté à la greffe osseuse. Ce matériau est peu résistant et peu résilient mais est biodégradable et offre une très bonne bioactivité avec une ostéoinductivité élevée (155).

L'alumine a une structure cristalline et une bonne résistance mécanique. Malheureusement cette résistance est en partie liée à sa faible porosité, ce qui réduit sa bioactivité (156).

L'oxyde de zirconium a quant à lui une structure polymorphe et offre une surface dure, une bonne résistance et une bonne biocompatibilité (159).

## II-1.2.5.2. METAUX

Autres types de matériaux inorganiques, les métaux présentent de très bonnes propriétés mécaniques. Si certains d'entre eux présentent une excellente biocompatibilité, leur bioactivité est faible et leur biorésorbabilité est quasi nulle et parfois néfaste par la libération d'ions métalliques toxiques. Pour ces raisons, ils sont très présents dans les prothèses osseuses et dentaires mais plutôt inadaptés à l'IT. Les principaux alliages utilisés en médecine sont les aciers inoxydables, les alliages de titane et les alliages de cobalt. La fonctionnalisation de la surface de ces alliages et la production de structures adaptées à l'IT pourrait faire envisager leur usage en IT, notamment avec des matériaux composites (160).

## II-1.2.5.3. POLYMERES SYNTHETIQUES

Un polymère est constitué de macromolécules généralement organique et de masse moléculaire élevée. Celles-ci sont composées d'un grand nombre de répétitions d'un ou plusieurs monomères liés entre eux par des liaisons covalentes.

Les biomatériaux en polymères synthétiques sont largement utilisés dans divers dispositifs médicaux et également en IT. Ceux utilisés en IT sont généralement biodégradables et ont des propriétés mécaniques et physiques prévisibles mais variables entre les polymères. Leur résistance mécanique peut toutefois s'avérer trop faible pour certaines applications. Leur biocompatibilité est variable et certains peuvent relarguer des composés de synthèse ou additifs secondaires à leur polymérisation pouvant présenter une toxicité *in vivo*. Un autre inconvénient des polymères synthétiques est qu'ils sont souvent insuffisamment hydrophiles pour avoir une bonne bioactivité. Les plus couramment utilisés en IT sont l'acide polylactique (PLA), l'acide polyglycolique (PGA), l'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA) et le polycaprolactone (PCL) (161).

Le PLA est un polymère hydrophobe à faible vitesse de dégradation. Le PGA est un polymère hydrophile avec de bonnes propriétés mécaniques et une dégradation rapide. Ces deux polymères ont été principalement utilisés pour des applications dans l'IT de l'os et du cartilage (162). En se dégradant, ils entraînent cependant une diminution du pH qui peut provoquer une réaction inflammatoire. Le PLGA est un polymère dont l'usage en médecine est approuvé par la FDA et l'EMA. Il est le plus fréquemment utilisé en IT de par son excellente biocompatibilité

et sa dégradation rapide et prévisible. Il est notamment très étudié pour des applications d'IT de l'os et des vaisseaux (163). Le PCL est également approuvé pour l'usage médical et est couramment utilisé dans des applications biomédicales comme les sutures chirurgicales. Ses propriétés chimiques et physiques sont similaires à celles du PLGA mais sont plus uniformes et sa dégradation plus longue. Son coût est inférieur. La transformabilité du PCL est cependant moindre de même que sa bioactivité (164).

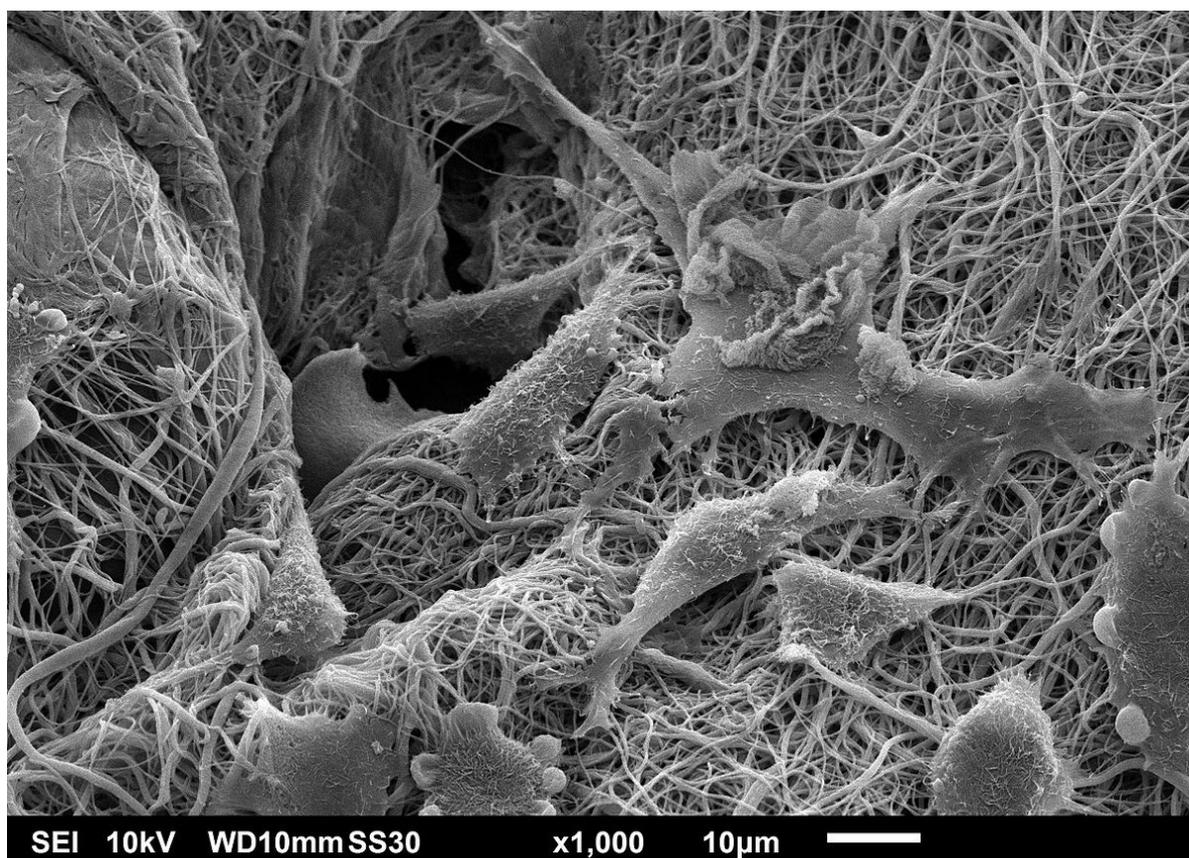


Figure 21 : Micrographie de microscopie électronique à balayage de fibroblastes de souris cultivés sur un matériau d'échafaudage nanofibreux électrofilé composé de polycaprolactone et de gélatine. Issue de Judyta Dulnik (165)

Pour améliorer la bioactivité des polymères synthétiques, une stratégie couramment utilisée est de les associer avec d'autres biomatériaux pour former des biomatériaux composites, généralement avec des polymères naturels (figure 21) (166). Si cette stratégie permet d'ajouter les avantages de chaque biomatériau pour combler leurs lacunes individuelles, les méthodes de production sont inévitablement complexifiées et la transformabilité est souvent réduite (130).

## II-1.2.5.4. POLYMERES NATURELS

Les biomatériaux en polymères naturels sont des composés organiques issus d'organismes vivants. Ils sont largement utilisés en IT et partagent comme caractéristiques communes leur grande biocompatibilité et leur bioactivité, l'adhésion et la croissance cellulaire étant généralement favorisée à leur surface. Ils présentent cependant des propriétés mécaniques souvent médiocres et, si leur biorésorption peut être bonne, elle peut également être trop rapide dans certaines situations. Grâce à leur bonne solubilité dans des solvants communs et à leur fonctionnalisation chimique aisée, leur transformation est facile et il est possible de leur donner de nombreuses formes allant des fibres et films aux échafaudage en 3D plus complexes (167). Les polymères naturels peuvent être séparés en deux groupes : les polysaccharides et les protéines. Les polymères polysaccharidiques peuvent être d'origine végétale comme l'alginate issu d'algues, l'agarose, la cellulose ; ou d'origine animale comme le chitosan issu de la chitine des arthropodes et céphalopodes (168). Les polymères protéiques les plus couramment utilisés sont d'origine animal et sont les collagènes, la fibrine, l'acide hyaluronique et la gélatine issue de l'hydrolyse partielle du collagène. Mis à part ces protéines de la MEC et de la coagulation, on retrouve également la soie (168,169).

Le collagène, en tant que composant essentiel de la MEC, est particulièrement intéressant comme biomatériaux d'IT. La MEC du cartilage, des os, des ligaments et des tendons est principalement composée de collagène ce qui en fait un très bon candidat pour l'IT de ces tissus (170–172). Le collagène est souvent associé à d'autres biomatériaux afin d'améliorer ses propriétés mécaniques. Il a par exemple été associé dans l'IT de l'os à de la cellulose (173) ou à l'acide poly(lactique-co-glycolique). Il peut être associé à des facteur de croissance tel que le BMP4 utilisé pour favoriser l'ostéogénèse (174). Le collagène est également intéressant pour l'IT d'autres tissus comme la graisse (175). Il peut poser des problèmes d'immunogénicité *in vivo*, qui demeurent cependant rares (176).

La gélatine est issue du collagène après hydrolyse partielle de celui-ci et présente une immunogénicité et un coût plus faible que ce dernier (figure 22) (177). Elle présente l'intérêt d'être thermosensible ; sa gélification peut être contrôlée par la température. Son champs d'application est similaire à celui du collagène avec divers types d'échafaudages réalisables et la possibilité de l'imprimer en 3D et de la combiner à d'autres polymères (178).

L'alginate, qui est issu d'algues brunes, est un polymère formé de deux monomères en proportions variables : le mannuronate dont certains sont acétylés et le guluronate. Il existe différents alginates en fonction des proportions de chaque monomère. Lorsqu'il entre en contact avec des ions divalents comme le calcium, il se réticule immédiatement pour donner un hydrogel (179). L'alginate présente de nombreuses applications en IT en raison de sa faible toxicité, de son faible coût et de la facilité à le modifier chimiquement (180). Cependant il présente des inconvénients comme une dégradation incontrôlée pouvant libérer des ions divalents et un manque de bioactivité ainsi que des propriétés mécaniques inadaptées à certaines applications. Ces inconvénients peuvent toutefois être surmontés. En effet, une réticulation covalente peut permettre de contrôler la dégradation et d'améliorer les propriétés mécaniques (181) et la fonctionnalisation avec des protéines peut améliorer la bioactivité (182). C'est ainsi qu'un alginate fonctionnalisé avec de la lectine a été utilisé comme support dans la culture de cellules musculaires pour fabriquer de petits tissus musculaires (183). De l'alginate galactosylé a quant à lui été utilisé dans l'IT hépatique pour microencapsuler des hépatocytes qui y ont formé des sphéroïdes présentant certaines des fonctions hépatiques (184). L'alginate est communément utilisé dans l'IT du cartilage. Associé à l'agarose (185) ou à la gélatine (186), il a par exemple été utilisé *in vivo* combiné à des chondrocytes pour traiter des lésions du condyle fémoral et d'autres défauts ostéocondraux. Enfin, la réticulation instantanée de l'alginate en présence de cations divalents en fait un biomatériau particulièrement adapté et utilisé pour l'encapsulation de cellules (187).

Le chitosan est obtenu par la désacétylation de la chitine. Il est composé de deux monomères distribués aléatoirement : le D-glucosamine et le N-acétyl-D-glucosamine. C'est un matériau poreux présentant une grande interconnectivité des pores. En plus d'être biocompatible, bioactif et biodégradable, le chitosan peut être facilement fonctionnalisé grâce à ses amines primaires (188). Combiné à l'hydroxyapatite, il est utilisé dans l'IT de l'os (189,190). Il est également utilisé dans l'IT de la peau (191), des nerfs (192) et des vaisseaux (193). Mais c'est encore une fois dans l'IT du cartilage que le chitosan est le plus utilisé. Grâce à sa structure similaire aux glycosaminoglycanes du cartilage, il stimule la chondrogenèse (194). Il peut être administré sous forme de gel en intra-articulaire et on peut facilement y incorporer des cellules comme des CSM (195) ou des facteurs de croissance chondrogènes (196).

De manière générale, il est important de noter que ces polymères biosourcés sont de qualité hétérogène en raison de la diversité des ressources et de leur mode d'obtention selon les régions. La qualité des lots est donc variable et des impuretés potentielles peuvent parfois provoquer des réactions immunitaires indésirables.

Une autre approche d'utilisation de polymères naturels comme biomatériaux pour l'IT consiste à utiliser des extraits protéiques d'origine tissulaire. Ces extraits sont composés de diverses protéines de la MEC. Ils sont considérés comme biocompatibles et bioactifs puisqu'ils reconstituent l'environnement naturel des cellules. L'extrait le plus connu et largement utilisé en culture cellulaire est le Matrigel®. Il est composé majoritairement de collagène IV et de laminine et est extrait de la membrane basale de cellules de sarcome EHS (Engelbreth-Holm-Swarm) de souris. Il est donc souvent utilisé en culture cellulaire pour créer une pseudo-membrane basale sur laquelle les cellules adhèrent et prolifèrent. Des extraits protéiques ont également été produits à partir d'autres tissus comme le tissu adipeux, le derme (198), le muscle squelettique (199), le muscle cardiaque (200) etc. La composition de ces extraits est difficile à standardiser et leur origine souvent tumorale les rend pour l'instant incompatible avec un usage en clinique.

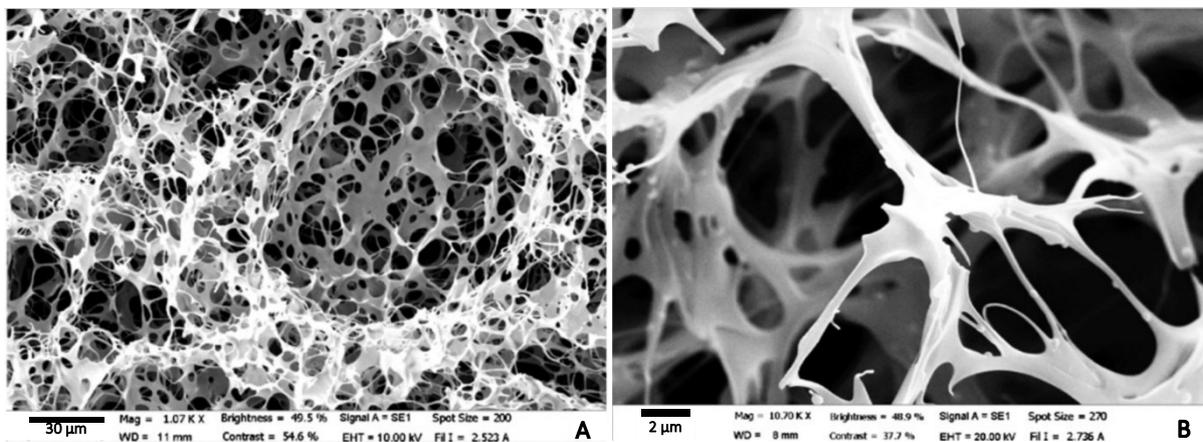


Figure 22 : **Micrographie de microscopie électronique à balayage d'un échafaudage en composite de polymère naturels pour la culture d'hépatocytes.** Le biomatériau composite est obtenue à partir de gélatine (80 % m/m), d'acide hyaluronique (10 % m/m) et de chondroïtine sulfate (10 % m/m). Les pores occupent 90% du volume total. *Adaptée de Colli et al. (197)*

Enfin, l'utilisation de l'ensemble de la MEC de certains tissus comme biomatériaux d'IT a également été développée. Ici, ce ne sont pas les protéines de la MEC qui sont extraites mais au contraire les cellules du tissu qui en sont retirées, d'où leur nom de matrices extracellulaires décellularisées. Pour ce faire, les tissus sont traités avec divers détergents, acides et enzymes afin d'éliminer tout composant cellulaire et de supprimer l'antigénicité du biomatériau obtenu.

La MEC décellularisée peut être utilisée brute avec sa structure native pour êtreensemencée avec des cellules ou être transformée (201). Elle peut par exemple être réduite en poudre pour donner après solubilisation acide un hydrogel thermosensible se gélifiant à l'injection (202). Les MEC décellularisées peuvent être produites à partir de différents tissus mais pour des raisons de disponibilité, celles issues de l'humain proviennent le plus souvent de sous-produits d'actes de soins non utilisés comme le placenta (203) ou le tissu adipeux (204). L'intérêt de ces biomatériaux serait de préserver l'environnement natif d'un tissu, de présenter une forte bioactivité, de favoriser la prolifération cellulaire et de fournir des signaux pour la différenciation cellulaire. Les MEC décellularisées ont une faible reproductibilité en raison de la variabilité des sources et des méthodes de décellularisation. De plus, l'ensemencement est difficile dans les MEC brutes denses, les propriétés mécaniques sont souvent médiocres et les processus de transformation les détériorent encore et peuvent altérer la structure et donc la bioactivité du biomatériau. Certaines de ces limitations pourraient cependant être surmontées via l'utilisation conjointe d'autres biomatériaux et avec des techniques de fabrication innovantes comme la bioimpression 3D (201).

#### II-1.2.5.5. HYDROGELS

Les hydrogels ne sont pas à proprement parler une classe de biomatériaux selon les critères séparant les précédentes classes exposées mais plutôt une forme caractéristique que certains biomatériaux peuvent prendre. Les hydrogels sont composés de polymères hydrophiles riches en groupements chimiques polaires tels que les carboxyles, les amides, les amines ou les hydroxyles. Les molécules polymériques composants l'hydrogel sont réticulées par des liaisons non covalentes, principalement des liaisons de Van der Waals, des liaisons hydrogènes et des liaisons ioniques. Les hydrogels peuvent cependant également être liés par des liaisons covalentes comme par exemple les hydrogels méthacrylés photopolymérisables. Cette réticulation entraîne la formation d'un réseau moléculaire pouvant absorber de grandes quantités d'eau ou de fluides biologiques ainsi que de cellules en raison de son hydrophilie ; le biomatériau prend ainsi la forme d'un gel. La réticulation entraînant la gélification peut être contrôlée de différentes manières selon les hydrogels : changement de température, changement de pH, irradiation UV, ajout d'ions, ajout de molécules linker etc.

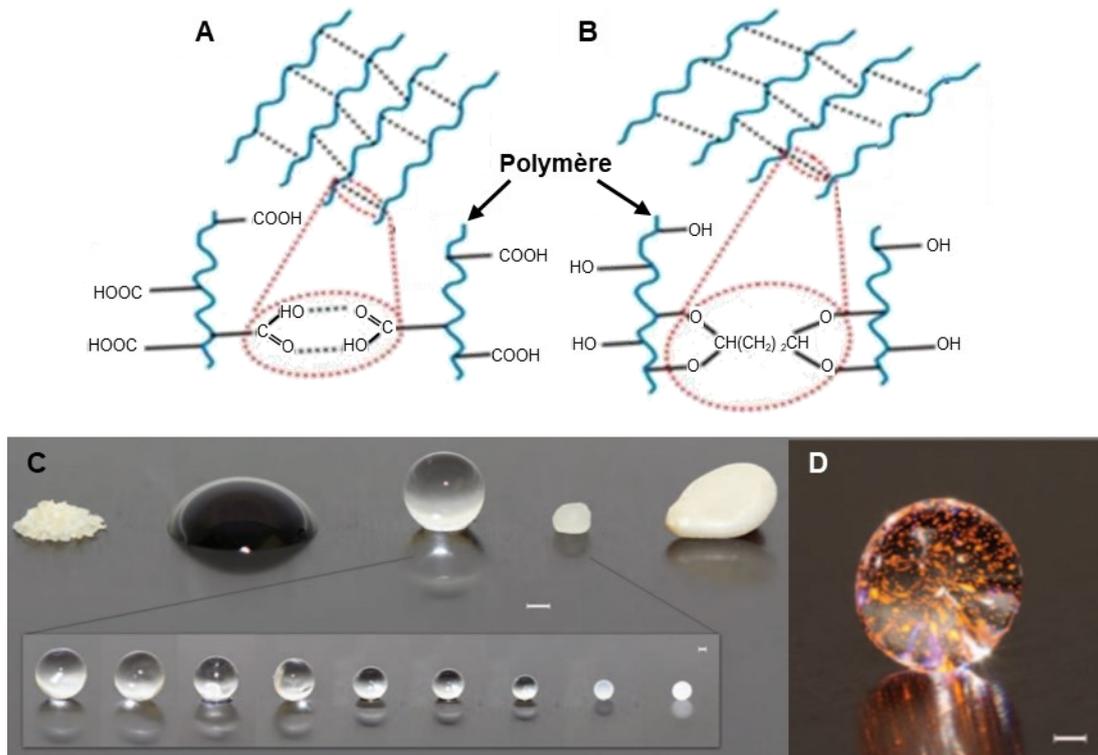


Figure 23 : Les hydrogels, forme de biomatériaux polymérique prometteuse pour l'ingénierie tissulaire. A) et B) Schéma de la structure moléculaire de l'hydrogel où les chaînes polymériques sont réticulées par liaisons hydrogène (A) ou par liaisons covalentes via une molécule linker (B). C) A l'extrême gauche, une poudre de polymère ajoutée à une goutte d'eau (à sa droite) et réticulée donne lieu à la formation d'un hydrogel (au milieu). L'hydrogel peut être déshydraté (à sa droite). Les différents stades de la déshydratation sont présentés sur la ligne en dessous. A l'extrême droite de la ligne du haut, une graine de sésame pour apprécier l'échelle. D) Un hydrogel contenant des cellules marquées par fluorescence orange. Les barres d'échelle pour C) et D) correspondent à 500  $\mu\text{m}$ . A) et B) adaptées de Hanane & Hafida (205) ; C) et D) adaptées de Seliktar (206)

Selon l'origine des biomatériaux, les hydrogels peuvent être classés en naturels, synthétiques ou composites. Selon qu'ils soient stables ou non dans un système biologique, ils peuvent être considérés comme durables ou biodégradables. Leur résistance mécanique est faible mais leur biocompatibilité, leur biorésorbabilité et la modularité de leur composition et de leurs paramètres en font des formes particulièrement adaptées et utilisées en IT. La densité de réticulation, la porosité, la fonctionnalisation et la vitesse de biodégradation sont particulièrement modulables et permettent d'obtenir des échafaudages adaptés aux processus cellulaires (129).

#### II-1.2.5.6. BIOMATERIAUX INTELLIGENTS

Parmi les dernières avancées dans le domaine des biomatériaux, on parle et on parie beaucoup sur le biomatériau intelligent. Ces biomatériaux de 4<sup>ème</sup> génération sont presque systématiquement des composites avec en général l'association de polymères naturels et de

polymères synthétiques. Ce qui définit à l'origine les biomatériaux intelligents n'est pas cette combinaison mais le fait d'obtenir un biomatériau pouvant moduler ses propriétés physiques, chimiques, mécaniques et donc biologiques en réponse à un stimuli externe ou interne. Les stimuli internes à l'organisme peuvent être un stress mécanique, une modification du pH, une augmentation des espèces réactives de l'oxygène, l'exposition à une enzyme, à une bactérie, à un antigène etc. Alors que les stimuli d'origine internes peuvent être de nature physique, chimique ou biologique, les stimuli externes sont d'origine physique comme par exemple la lumière, les champs magnétiques et électriques ou la température (207). Ces biomatériaux ne sont pas développés uniquement pour l'IT mais ont, dans cette application, l'objectif d'améliorer la biocompatibilité, la bioactivité et la biorésorbabilité en mimant au mieux les interactions complexes cellules-MEC retrouvées dans les tissus et en s'adaptant à leur évolution. Comme expliqué dans l'article de Montoya *et al.*, la notion d'innovation est indissociable du terme biomatériau intelligent car il est toujours possible de faire plus intelligent et les biomatériaux intelligents aujourd'hui ne le seront probablement plus autant demain. La définition du terme et les objets auxquels celui-ci s'appliquent sont donc évolutifs (208). Pour cette raison, les chercheurs discutent déjà de la séparation des biomatériaux intelligents en plusieurs sous-groupes et générations avec par exemple la distinction entre biomatériaux réactifs et biomatériaux autonomes (208) ou celle entre « smart biomaterials » et « intelligent biomaterials », les deux traduits par « biomatériaux intelligents » en français mais présentant des nuances en anglais, le premier évoquant la facilité d'utilisation d'une fonction acquise/apprise et le deuxième la capacité à acquérir de nouvelles fonctions (209).

De nombreux exemples de biomatériaux intelligents existent pour des applications de galénique innovante, de revêtement de dispositifs médicaux et d'ingénierie tissulaire. Les hydrogels injectables polymérisant à la température ou au pH physiologique sont les exemples les plus simples et les plus connus (210). Mais il en existe également d'autres et nous en présenterons ici deux.

Damaraju *et al.* ont pu produire un échafaudage en trois dimensions en poly(vinylidene fluoride-trifluoroethylene) (PVDF-TrFE), un biomatériau biocompatible qui présente un effet piézoélectrique (211). Cet effet consiste en une polarisation du matériau sous l'action d'une contrainte mécanique. Il a été démontré que des potentiels électriques sont présents naturellement dans les tissus et qu'ils participent à divers phénomènes de cicatrisation et régénération (212). Dans leur modèle, Damaraju *et al.* ont pu améliorer la différenciation de

CSM présentes dans le biomatériau en lignée chondrogénique ou ostéogénique en appliquant des compressions dynamiques mimant les mouvements physiologiques pour créer des potentiels électriques par effet piézoélectrique. Selon le traitement du biomatériau, les potentiels engendrés étaient plus ou moins forts et la différenciation des CSM était orientée vers la lignée ostéogénique ou chondrogénique.

Salinas & Anseth ont créé un hydrogel en poly(éthylène glycol) (PEG) fonctionnalisé par des séquences peptidiques RGD clivables enzymatiquement et dans lequel ils ont encapsulé des CSM. Cette séquence, connue pour permettre l'adhésion des cellules à la MEC via les intégrines et pour engendrer divers types de réponses cellulaires, était reliée au PEG par une séquence peptidique clivable spécifiquement par la métalloprotéinase de matrice 13 (MMP-13). En ce qui concerne les CSM, cette séquence favorise leur survie et induit leur différenciation chondrogénique précoce tout en limitant leur différenciation complète. Dans cette expérience, la présence du peptide à la surface de l'hydrogel a effectivement favorisé la survie et la différenciation des CSM jusqu'à ce qu'elles produisent la MMP-13 au bout de 9-14 jours, clivant alors la séquence RGD et permettant la poursuite de la différenciation cellulaire. Les CSM encapsulées dans des hydrogels avec une séquence RGD clivable ont montré une production de glycosaminoglycanes 10 fois supérieure à celle encapsulées dans des hydrogels présentant une séquence non clivable. Le dépôt de collagène de type II caractéristique de la MEC du cartilage était également supérieur pour la première condition (213).

Tableau 1 : Résumé des caractéristiques des principales classes de biomatériaux utilisés en ingénierie tissulaire.

| CLASSES DE BIOMATERIAUX ET EXEMPLES   | AVANTAGES   | INCONVENIENTS   | APPLICATIONS  |
|---|---|---|---|
| <b>CERAMIQUES</b><br><i>Hydroxyapatite (HA)</i><br><i>Bioglass®</i><br><i>Phosphate tricalcique</i><br><i>Alumine</i><br><i>Oxyde de zircon</i><br><i>Etc.</i>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Biocompatible</li> <li>▪ Haute résistance à la compression</li> <li>▪ Bonne rigidité</li> <li>▪ Ostéoinductivité</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Cassant</li> <li>▪ Peu résilient</li> <li>▪ Difficile à transformer/modeler</li> <li>▪ Biorésorbabilité parfois trop lente</li> </ul>  | <b>Tissus durs</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Os</li> <li>▪ Dents</li> </ul>  |
| <b>POLYMERES SYNTHETIQUES</b><br><i>Acide polylactique (PLA)</i><br><i>Acide polyglycolique (PGA)</i><br><i>Acide poly(lactique co-glycolique) (PLGA)</i><br><i>Polycaprolactone (PCL)</i><br><i>Etc.</i> | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Modulation élevée des propriétés structurales et mécaniques</li> <li>▪ Ajout de facteurs de croissances aisé</li> <li>▪ Propriétés mécaniques souvent variables</li> </ul>                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Biocompatibilité variable avec possible relargage d'additifs et de molécules résiduels de la polymérisation</li> <li>▪ Bioactivité insuffisante</li> <li>▪ Contrôle de la vitesse de biorésorbabilité</li> </ul> | <b>Tissus mous</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Peau</li> <li>▪ Os</li> <li>▪ Cartilage</li> <li>▪ Tendon</li> <li>▪ Etc.</li> </ul>      |
| <b>POLYMERES NATURELS</b><br><i>Collagène</i><br><i>Acide hyaluronique</i><br><i>Gélatine</i><br><i>Fibrine</i><br><i>Soie</i><br><i>Chitine</i><br><i>Alginate</i><br><i>Etc.</i>                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Bonne biocompatibilité</li> <li>▪ Biorésorbabilité</li> <li>▪ Bioactivité</li> <li>▪ Effet antibactérien éventuel</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Faible résistance mécanique</li> <li>▪ Risque de contamination</li> <li>▪ Qualité variable</li> <li>▪ Biorésorbabilité parfois trop rapide</li> </ul>  | <b>Tissus mous</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Peau</li> <li>▪ Cartilage</li> <li>▪ Cœur</li> <li>▪ Vaisseaux</li> <li>▪ Etc.</li> </ul> |
| <b>COMPOSITES</b><br><i>PCL/gélatine</i><br><i>PCL/chitosan</i><br><i>Collagène/chitosan</i><br><i>Collagène/HA</i><br><i>Etc.</i>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Possibilité d'allier les avantages de plusieurs biomatériaux complémentaires</li> <li>▪ Biocompatibilité</li> <li>▪ Bioactivité</li> <li>▪ Biorésorbabilité variable</li> <li>▪ Propriétés mécaniques</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Complexification</li> <li>▪ Difficulté de fabrication</li> <li>▪ Addition des contraintes de transformation</li> <li>▪ Reproductibilité</li> </ul>   | <b>Tissus dur et mous</b>   |

### II-1.3. COFACTEURS

Comme nous l'avons vu, les biomatériaux sont fondamentaux pour produire artificiellement des tissus. Ils servent de support aux cellules, ils structurent leur développement et ils peuvent induire leur adhésion, leur migration, leur prolifération et leur différenciation. Cependant, ils ne sont généralement pas suffisants seuls et il faut aller plus loin pour que ces échafaudages se rapprochent de l'environnement naturel des cellules. L'utilisation de cofacteurs comme des facteurs de croissance est une des options explorées pour soutenir et orienter les réponses cellulaires. Dans l'organisme, certaines cellules sécrètent des facteurs de croissance sous l'influence de certains signaux. Ces facteurs de croissance agissent sur les cellules situées dans le rayon de diffusion (généralement paracrine) et pourvues des récepteurs membranaires appropriés. En se liant à ces récepteurs, ils activent des voies de signalisation intracellulaires et engendrent une réponse cellulaire (adhésion, migration, prolifération, différenciation, production de MEC, etc.). Les facteurs de croissance sont impliqués aussi bien dans les processus de régénération et de remodelage physiologiques des tissus que dans les pathologiques. Ils existent de nombreux facteurs de croissances plus ou moins spécifiques de certains tissus et cellules. En choisissant les facteurs de croissance adéquats et en les incorporant de manière adaptée aux structures en biomatériauxensemencées de cellules, il est possible d'améliorer la survie cellulaire ainsi que d'orienter et de promouvoir l'activité cellulaire et le remodelage pour produire un tissu plus viable et abouti (214).

Les facteurs de croissance sont très labiles et ont une demi-vie courte. Cela pourrait suggérer qu'une utilisation de fortes doses soit nécessaire pour que les tissus ciblés soient atteints par des doses actives, cependant, les effets indésirables, l'immunogénicité et le coût des facteurs de croissance écartent cette

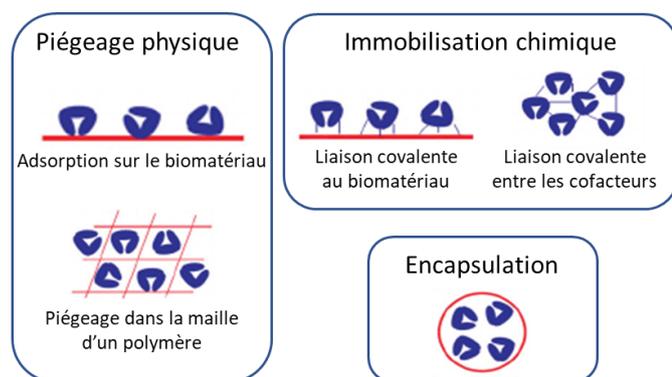


Figure 24 : Trois stratégies pour l'immobilisation de cofacteurs au sein de biomatériaux. Adaptée de Gonçalves et al. (215)

solution. Pour permettre leur présence spécifiquement dans le tissu, au contact des cellules cibles et en quantité suffisante, l'utilisation des biomatériaux d'IT comme matrice relarguant

des facteurs de croissance est une solution intéressante et utilisée. Plusieurs stratégies de piégeage de molécules au sein de biomatériaux existent. Les trois grandes stratégies qui se distinguent sont : i) l'immobilisation chimique où les molécules piégées se lient de manière covalente au biomatériaux ou entre elles ; ii) le piégeage physique où les molécules sont bloquées dans la maille du polymère ou adsorbées sur celui-ci ; iii) l'encapsulation où les molécules sont bloquées dans une capsule polymérique partiellement imperméable à celles-ci (figure 24).

Tableau 2 : **Grandes familles de facteurs de croissance, fonctions et applications cliniques.** *Adapté de Goonoo & Bhaw-Luximon (214) et Guan et al. (216).*

| FAMILLE DE FACTEUR DE CROISSANCE                             | TISSUS CIBLES   | FONCTION PRIMAIRE  | APPLICATIONS CLINIQUES   |
|--|---|--|--|
| Facteur de croissance vasculaire endothélial ( <b>VEGF</b> ) | Vaisseaux sanguins  | Migration, prolifération et survie des cellules endothéliales  | Régénération du tissu épithélial ; traitement de l'ulcère gastro-duodéal   |
| Facteur de croissance fibroblastique ( <b>FGF</b> )          | Nombreux tissus durant l'organogénèse et le remodelage tissulaire         | Prolifération, migration, différenciation cellulaire ; régénération et réponse aux lésions   | Réparation osseuse ; angiogenèse ; croissance neurale ; traitement de complications chroniques du diabète  |
| Facteur de croissance hépatique ( <b>HGF</b> )               | Foie, os, muscles, vaisseaux sanguins, nerfs                              | Prolifération, migration et différenciation des CSM  | Réparation de lésion chronique du foie ; stimulation de l'angiogenèse, de la réparation osseuse, de la neurogénèse   |
| Facteur de croissance insuline-like ( <b>IGF</b> )           | Muscle, os, cartilage, os, foie, poumons, reins, nerfs, peau, etc.        | Prolifération cellulaire et inhibition de l'apoptose   | Différenciation cellulaire ; prolifération cellulaire  |
| Facteur de croissance neural ( <b>NGF</b> )                  | Nerfs, moelle épinière, cerveau   | Survie et prolifération des cellules neurales  | Traitement de maladie neurodégénératives ; accélération de la cicatrisation des brûlures ; réduction d'effets secondaires de chimiothérapies et de radiothérapies. |
| Protéine morphogénétique osseuse ( <b>BMP</b> )              | Os, cartilage, nombreux tissus durant l'embryogénèse, follicules ovariens | Prolifération, migration, différenciation des cellules de l'os et du cartilage, ostéosynthèse ; croissance et maturation des follicules ovariens | Stimulation de l'ostéogénèse   |

Les biomatériaux intelligents, vu précédemment, ont un rôle important dans les progrès réalisés dans le domaine du piégeage et du relargage de molécule. Ils pourraient permettre de contrôler ce relargage grâce à des stimuli externes ou internes auxquels répondra le

biomatériau. Plusieurs facteurs de croissance peuvent ainsi être chargés dans un biomatériau et leur libération doit être adaptée pour qu'ils agissent sur les cellules à des doses physiologiques et dans un schéma spatio-temporel spécifique (216).

Le piégeage des facteurs de croissance ne résout toutefois pas tous les problèmes. Le contrôle de leur vitesse de libération, leur stabilité, leur immunogénicité et leur coût sont autant de paramètres à améliorer. Dans cette optique, le développement et l'utilisation de petites molécules (<1000 Da) capables de réguler, dans les tissus cibles, des voies de signalisation d'intérêt normalement activées par les facteurs de croissance est une approche intéressante (214). Ces petites molécules pourraient être produites plus facilement, à un coût inférieur à celui des facteurs de croissance et pourraient être sujettes à des optimisations chimiques augmentant leur stabilité et leur demi-vie. Elles sont cependant moins spécifiques que les facteurs de croissance et peuvent ainsi entraîner de nombreux effets indésirables. En outre, leur optimisation chimique pour augmenter leur spécificité est longue et complexe (214).

D'autres cofacteurs peuvent également être ajoutés aux biomatériaux afin d'enrichir l'environnement cellulaire et d'améliorer la viabilité et la fonctionnalité des tissus produits. Les travaux de Bekhouche *et al.* ont par exemple montré qu'un hydrogel de fibrine contenant des cellules souches mésenchymateuses de la pulpe dentaire combiné à des nanoparticules de PLA chargées en clindamycine présente un grand intérêt dans le traitement de caries avec atteinte de la pulpe (217). En effet, suite à la dévitalisation de la dent, il est intéressant de parvenir à une régénération de la pulpe dentaire afin de réduire la fragilité et la dégradation dans le temps de la dent, deux conséquences fréquemment observées au niveau des dents dévitalisées. Cette zone est cependant très sujette à infections et l'incorporation d'antibiotique dans la néo-pulpe est donc intéressante pour entreprendre la revitalisation saine de la dent (217). Les transporteurs d'oxygène sont d'autres cofacteurs qui peuvent également être incorporés aux biomatériaux afin de fournir aux cellules, dans les jours qui suivent l'implantation du tissu, le dioxygène indispensable à leur survie, l'anoxie étant un problème souvent rencontré en IT (218,219).

---

## II-2. PROCEDES DE FABRICATION

---

Après avoir présenté les différents matériaux (cellules, biomatériaux, cofacteurs) à partir desquels des tissus synthétiques peuvent être produits, nous allons nous intéresser maintenant aux différents procédés de fabrication utilisés afin de produire ces tissus. Dans ce chapitre, nous présenterons les principes généraux des principaux procédés utilisés en IT. Certains de ces procédés ne concernent que la mise en forme des biomatériaux en échafaudages auxquels les éventuels cellules et cofacteurs devront être ajoutés. D'autres permettent directement la mise en forme des trois types de matériaux. Ces procédés de fabrications peuvent être divisés en procédés de fabrication conventionnels et en procédés de fabrication avancés (130). Chacun des différents procédés n'est utilisable qu'avec certains des biomatériaux présentés précédemment.

### II-2.1. PROCEDES DE FABRICATION CONVENTIONNELS

---

Les procédés de fabrication conventionnels permettent la production d'échafaudage en biomatériaux avec une structure plus ou moins poreuse et avec un contrôle de la forme générale. L'ensemencement des cellules dans les échafaudages est nécessaire après leur production ce qui peut poser problème car les cellules migrent, de manière générale, difficilement à plus de 500  $\mu\text{m}$  de la surface d'un échafaudage (130). L'approvisionnement approprié en nutriments et oxygène au cœur de ces structures peut également poser problème et, selon la nature du biomatériau, il peut être difficile de créer, par ces procédés, des canaux internes dans les échafaudages produits pour pallier à cette difficulté (130).

#### II-2.1.1. MOULAGE PAR SOLVANT ET LIXIVIATION DES PARTICULES

Cette méthode consiste à dissoudre un polymère dans un solvant volatil, puis à le couler dans un moule de la forme désirée. Par évaporation du solvant, on obtient une structure à la forme souhaitée (figure 25). Ce procédé possède l'intérêt d'être simple, et peu coûteux (220). Cependant, ses principaux inconvénients sont une évaporation souvent incomplète du solvant et une faible porosité de l'échafaudage obtenu. Pour augmenter la porosité, un agent porogène peut être ajouté à la solution de polymère. Après évaporation du solvant, ce porogène qui peut

être un sel, un glucide ou de la cire est éliminé du polymère par dissolution par un autre solvant, créant ainsi des pores ; c'est la lixiviation. Cette méthode permet de contrôler la taille des pores et la porosité en choisissant la taille des particules de porogène et la quantité ajoutée. La distribution du porogène dans la solution de polymère n'est cependant pas uniforme et le degré d'interconnexion des pores est donc difficilement contrôlable (221).

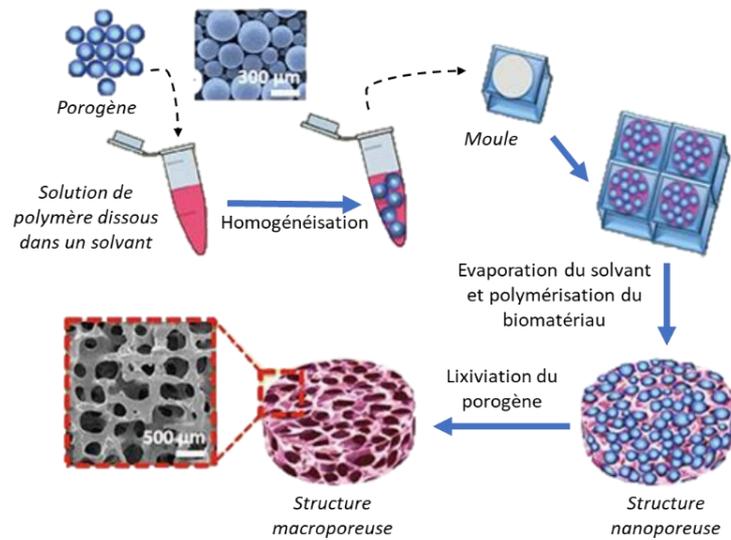


Figure 25 : Les différentes étapes de fabrication d'un échafaudage macroporeux en biomatériau par moulage par solvant et lixiviation des particules. Adaptée de Bencherif et al. (221)

### II-2.1.2. SEPARATION DE PHASE

Ce procédé de fabrication d'échafaudage en biomatériaux est similaire au précédent. Il consiste en la solubilisation d'un polymère dans un solvant constituant une phase. Le solvant est ensuite extrait par une autre phase dans laquelle le premier solvant est miscible mais pas le polymère, entraînant ainsi la solidification d'une phase concentrée en polymère autour de volumes occupés par une phase peu concentrée en polymère. Cette phase peu concentrée est ensuite lavée, ce qui crée des pores. Cette méthode permet la fabrication d'échafaudages poreux mais la distribution des pores et leur taille n'est pas uniforme et est difficile à contrôler, cela limite son utilisation pour des applications d'IT. De plus, l'extraction peut être incomplète, laissant des résidus de solvant dans l'échafaudage (222).

### II-2.1.3. LYOPHILISATION

La lyophilisation est un procédé qui consiste à solubiliser un polymère dans un solvant, souvent l'eau ou un alcool, puis à éliminer ce dernier en le congelant puis en le faisant passer directement à l'état gazeux sous très basse pression, c'est la sublimation. Cette méthode présente l'avantage de produire des échafaudages très poreux, entraînant cependant une

diminution de la résistance mécanique. Ce procédé est particulièrement adapté pour les polymères naturels ou synthétiques qui supportent mal le séchage thermique comme par exemple le collagène, le PCL ou le PLGA (223).

D'autres procédés de fabrication d'échafaudages en biomatériaux existent et ne seront pas présentés ici : moussage au gaz, moulage par fusion etc.

## II-2.2. PROCÉDES DE FABRICATION AVANCÉS

---

Par rapport aux procédés de fabrication conventionnels, les procédés avancés sont plus complexes et permettent un contrôle plus précis de différents paramètres structurels ainsi que la réalisation de formes complexes. Les échafaudages conçus ne servent alors plus seulement de support aux cellules mais permettent également de structurer le tissu produit pour améliorer les échanges et la transmission des différents signaux chimiques, mécaniques et biologiques en son sein et avec son environnement. Certains de ces procédés ouvrent par exemple la possibilité de dégager dans l'échafaudage des canaux internes pour créer un système vasculaire artificiel. Pour certains d'entre eux, la mise en forme du tissu synthétique se fait à partir de matériaux combinant déjà cellules, biomatériaux et cofacteurs (130).

### II-2.2.1. ELECTROFILAGE

L'électrofilage est une technique qui permet d'imiter la structure fibreuse et poreuse de la MEC. Une solution visqueuse de polymère solubilisé dans un solvant est injectée dans une aiguille générant une goutte à son extrémité. Une forte différence de potentiel est appliquée entre l'aiguille métallique et un collecteur conduisant le courant placé en face. De ce fait, la goutte chargée au bout de l'aiguille est déformée sous forme d'une fibre par la force électrostatique et est étirée vers le collecteur afin de s'y déposer (figure 26). La fibre formée est solide et continue car, au cours de l'étirement, le solvant s'évapore en même temps que se repoussent les charges électrostatiques à la surface de celle-ci. Ce est influencé par les facteurs suivants: la tension appliquée, le débit de solution délivré, la distance aiguille-collecteur, la concentration en polymère, la viscosité de la solution, le type de solvant et de polymère, ainsi que la température et l'humidité ambiantes (224).

Ce procédé permet d'utiliser des polymères naturels ou synthétiques et d'aboutir à des fibres dont le diamètre est compris entre quelques nanomètres et quelques micromètres. Les fibres produites peuvent être alignées ou disposées aléatoirement. En faisant varier ces paramètres, il est possible d'obtenir un échafaudage de fibres dont le diamètre, la taille des pores formés, l'orientation et la vitesse de dégradation peuvent s'approcher le plus possible de ceux de la MEC que l'on cherche à reproduire, améliorant ainsi le comportement des cellules qui y serontensemencées (130,224). Ce procédé présente un fort potentiel pour l'IT en raison de sa facilité d'utilisation, de son faible coût, du contrôle de la morphologie et de la composition des fibres, ainsi que de son importante évolutivité. Il est cependant très sensible aux conditions environnementales, entraînant des disparités entre les lots produits. De plus, la résistance mécanique des échafaudage produits est faible, rendant difficile leur utilisation ultérieure dans d'autres procédés ainsi que leur manipulation (226). Enfin, l'infiltration des cellules, après leur ensemencement, au cœur de l'échafaudage peut être limitée en profondeur en raison de la densité des fibres et de la taille des interstices. Pour pallier à ce problème, divers post-traitements ont été développés tels que l'intégration de composants sacrificiels lavés par la suite, l'ablation au laser ou l'utilisation d'ultrasons. De nombreuses évolutions de ce procédé ont également été proposées pour contrôler l'alignement des fibres (électrofilage magnétique, mandrin tournant), les organiser et augmenter le nombre d'interstices (hydrofilage), fabriquer des échafaudages avec des fibres de différente composition (coélectrofilage), augmenter la vitesse de fabrication (edge électrofilage), fabriquer des fibres composites (mélange de fibres), créer des fibres creuses (électrofilage coaxial) etc. (14).

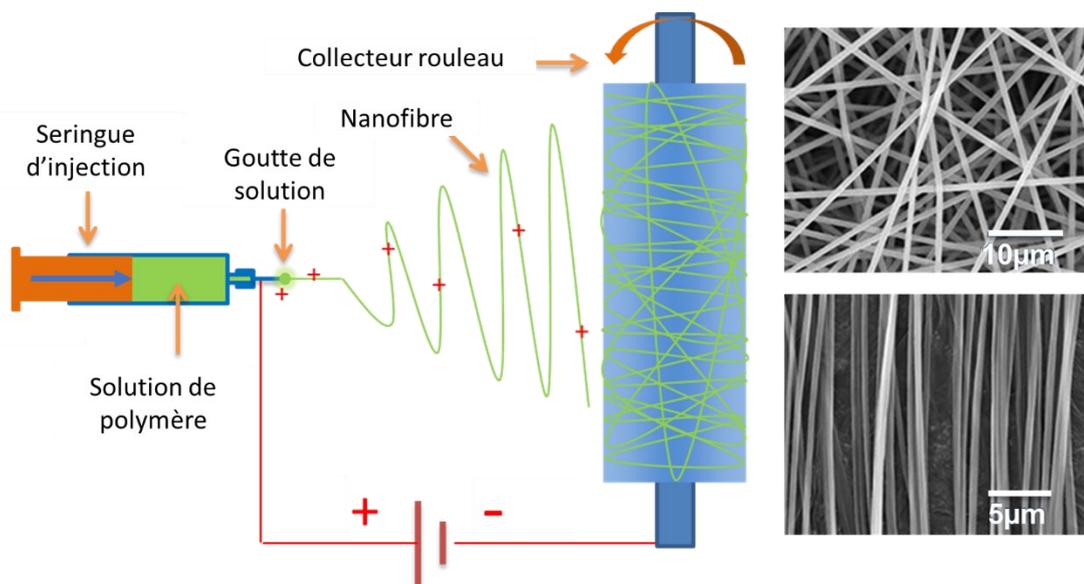


Figure 26 : Schéma illustrant le principe du procédé de fabrication par électrofilage. Adaptée de Foshan Nanofiberlabs (225)

### II-2.2.2. TECHNOLOGIES D'IMPRESSION TRIDIMENSIONNELLE

Les technologies d'impression tridimensionnelle également appelées procédés de fabrication additive, prototypage rapide, fabrication de formes libres solides ou plus communément bio-impression 3D sont des procédés de fabrication assistés par ordinateur (FAO). Ils permettent de fabriquer couche par couche, à partir d'un modèle défini figurant sur un fichier de conception assistée par ordinateur (CAO), une structure solide en trois dimensions. Des échafaudages de formes internes et externes complexes et précises, correspondant à celles des tissus humains, peuvent ainsi être réalisés à partir de différents biomatériaux afin de servir de support aux cellules. Ces procédés permettent de produire des structures à l'architecture reproductible, de composition variable et dont les propriétés sont contrôlées. Ils font l'objet d'un développement intense actuellement et certains ont d'ores et déjà permis de produire des tissus simples fonctionnels, en particulier de la peau (227). Certains de ces procédés sont basés sur l'usage de laser et d'autres sur le dépôt de matière (130,228).

#### II-2.2.2.1. STEREOGRAPHIE

La stéréolithographie est un procédé basé sur la photopolymérisation de polymères. Une solution ou résine de polymère photosensible est irradiée par un faisceau de lumière ultraviolette selon un motif précis issu du fichier de CAO. L'irradiation des molécules photoinitiatrices de la résine entraîne la création de radicaux libres provoquant localement la polymérisation de la résine et son passage à l'état solide. Une plateforme est immergée dans la résine, proche de la surface ou du fond de la cuve selon la technique utilisée. Une première couche de polymère est photopolymérisée à sa surface. Ensuite la plateforme est légèrement déplacée d'une hauteur définie pour qu'une seconde couche de forme définie puissent être photopolymérisée au contact de la première. Le processus de photopolymérisation d'une couche et de déplacement de la plateforme est répété pour chaque couche jusqu'à ce que la structure soit complète. Le faisceau lumineux peut être fin et dirigé numériquement à la surface de la résine afin de photopolymériser une couche de manière progressive (stéréolithographie classique) ou être décomposé en plusieurs faisceaux irradiant l'ensemble des zones d'une couche devant être polymérisées d'un seul coup (stéréolithographie à projection de lumière dynamique DLP) (figure 27). Dans cette dernière, des micromiroirs sont dirigés numériquement pour refléter ou non un faisceau lumineux irradiant l'ensemble des micromiroirs vers la résine.

Ils décomposent ainsi le faisceau d'origine en une multitude d'autres qui photopolymérisent la forme voulue sur une couche de résine (228).

La stéréolithographie permet de fabriquer des structures avec une finesse comprise entre 5 et 50  $\mu\text{m}$  selon les appareils. Cette finesse permet de reproduire certaines structures physiologiques précises tel que des canaux pour les vaisseaux sanguins. Il est également possible de réaliser des pores de taille, distribution et interconnexion contrôlées. Des gradients de pores peuvent également être réalisés. Les propriétés mécaniques peuvent être contrôlées dans la mesure de leur lien avec la structure de l'échafaudage. Pour le reste, elles dépendent fortement des polymères utilisés. Les principaux sont le polycaprolactone, l'acide polylactique, le poly(propylène-fumarate) ainsi que des copolymères issus de ceux-ci (228). Des biomatériaux céramiques peuvent également y être associés. Dans la majorité des cas, les cellules doivent êtreensemencées dans un second temps dans l'échafaudage produit en raison de la cytotoxicité des molécules photoinitiatrices et de l'irradiation. Des moules d'une grande finesse peuvent également être conçus par stéréolithographie pour produire pas la suite en négatif de ce moule des échafaudages en divers biomatériaux qui peuvent alors être pré-ensemencés (228,229). Un nouveau procédé prometteur et dérivé de la stéréolithographie est la polymérisation à deux photons (TPP). La photopolymérisation est réalisée lors de l'impact de deux photons simultanément au point focal d'un laser de haute intensité et pulsé pendant une durée de l'ordre de la femtoseconde. Ce procédé permet de réaliser la photopolymérisation en tout point de la résine et plus seulement à sa surface ce qui ouvre de nombreuses perspectives. La résolution est également meilleure et atteint quelques dizaines de nanomètres (230).

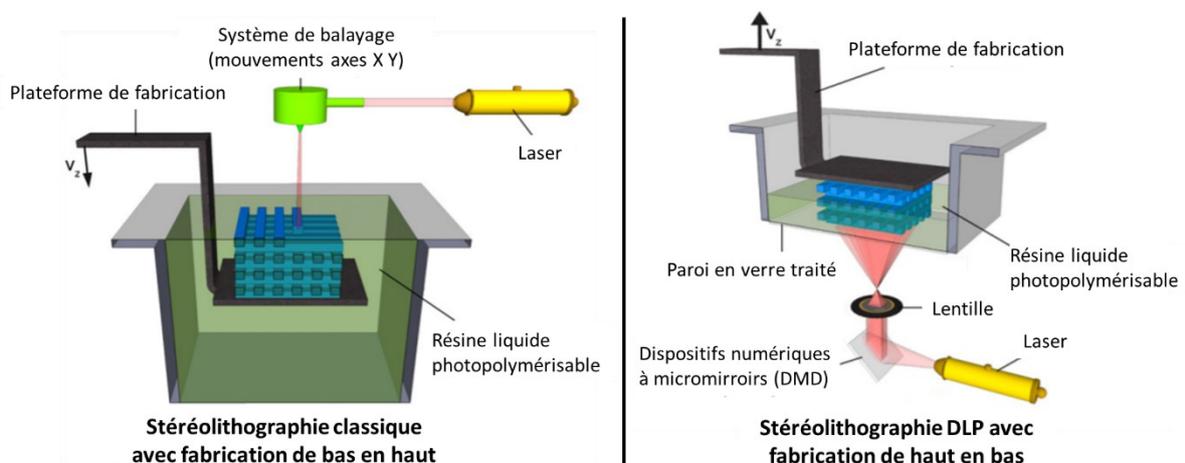


Figure 27 : Schéma illustrant le principe du procédé de fabrication par stéréolithographie classique et DLP. Adaptée de Billiet et al. (230).

## II-2.2.2.2. BIO-IMPRESSION PAR JET D'ENCRE

La bio-impression par jet d'encre est un procédé de FAO inspiré des imprimantes papier à jet d'encre classique qui permet de construire couche par couche des échafaudages de biomatériaux pouvant contenir des cellules et des cofacteurs. Le principe est d'éjecter des gouttes de biomatériau sur une plateforme mobile déplacée par ordinateur dans les différents axes et selon le modèle du fichier de CAO. Deux méthodes permettent d'éjecter les gouttes de biomatériau : la méthode de chauffage thermique et la méthode à actuateur piézoélectrique. La méthode par chauffage utilise la chaleur pour créer localement dans la buse d'impression des bulles de vapeur et ainsi former de très petites gouttes de biomatériau de quelques picolitres qui sont alors éjectées vers la plateforme. Alors que les imprimantes classiques utilisent des températures de 200 à 300°C, les bio-imprimantes à jet d'encre appliquent des températures entre 40 et 45°C afin de préserver les cellules et le biomatériau. La méthode à actuateur piézoélectrique utilise des quartz piézoélectriques qui se déforment dans la buse d'impression lorsqu'une tension électrique leur est appliquée. Cette déformation engendre une force dans la buse au niveau du biomatériau et permet l'éjection d'une très petite goutte sur la plateforme. Le contrôle de la taille des gouttes est plus aisé avec cette méthode mais l'impact physique engendré par la force exercée sur les cellules peut les affecter. Une fois éjecté, le biomatériau se solidifie par évaporation de solvant, par changement de température ou par photopolymérisation (irradiation UV). La vitesse d'impression est élevée et la résolution de l'ordre de quelques micromètres à quelques dizaines de micromètres (231,232). Les biomatériaux couramment utilisés dans ce procédé sont notamment les dérivés méthacrylés poly(éthylène glycole) ou de gélatine, le collagène, la fibrine et l'alginate (233)

Cette méthode est peu coûteuse en plus d'être compatible avec plusieurs biomatériaux polymériques ; naturels, synthétiques ou composites dont la viscosité doit cependant être limitée. Le volume déposé et sa position peuvent être contrôlés très précisément, permettant un positionnement spécifique des cellules dans le cadre de constructions multicellulaires. Toutefois, les échafaudages fabriqués via ce procédé sont peu solides et peu de couches peuvent être empilées de manière stable pour des formes complexes. Un autre inconvénient peut être l'altération des biomatériaux et cellules et la génération de gouttes aberrantes. Enfin il existe un risque non négligeable que les buses se bouchent dans le cas d'une utilisation de bio-encres à la viscosité ou concentration cellulaire inadaptée (14,231).

## II-2.2.2.3. BIO-IMPRESSION PAR EXTRUSION

Ce procédé de FAO permet d'imprimer des formes complexes couche par couche par extrusion de biomatériau pouvant être chargés de cellules et de cofacteurs. L'extrusion consiste à compresser le biomatériau pour le contraindre à traverser la buse d'impression, formant ainsi un long extrudât prenant la forme d'un cordon et dont la section est celle de la buse. Ce cordon de biomatériau se solidifie soit au contact de l'air (différence de température ou évaporation de solvant) soit par photopolymérisation (irradiation UV principalement). Il est déposé précisément sur une plateforme selon le modèle du fichier de CAO qui permet de diriger la tête d'impression ou la plateforme accueillant l'échafaudage dans les différents axes. C'est la méthode commerciale la plus largement utilisée. Deux méthodes de compression du biomatériau pour permettre son extrusion existent : la méthode pneumatique et la méthode mécanique. La méthode pneumatique utilise une pompe pour générer une pression constante contraignant le biomatériau. Cette méthode limite la possibilité de contrôler et de faire varier la pression. La méthode mécanique exerce quant à elle une force d'origine mécanique sur le biomatériau pour le contraindre via une vis sans fin ou un piston. Elle permet un contrôle plus fin de l'extrusion. La résolution de cette technique est comprise entre quelques dizaines et quelques centaines de micromètre et la vitesse d'impression est relativement faible (232,233).

La bio-impression par extrusion permet d'utiliser un large éventail de cellules et de biomatériaux qui peuvent avoir une viscosité élevée. Plusieurs biomatériaux et types de cellules peuvent également être utilisés simultanément par différentes buses. De nombreux biomatériaux en polymères synthétiques (PEG, PLGA, PCL) , naturels (soie, gélatine méthacrylée ou non, chitosan, alginate, agarose, Matrigel®, MEC de peau) et composites sont développés et adaptés à cette technologie (233). Ils peuvent prendre la forme d'hydrogels et même de matrices décellularisées. Les combinaisons possibles sont élevées et les perspectives ouvertes sont grandes. Des structures poreuses complexes et intégrant directement des cellules peuvent être réalisées. Les échafaudages conçus via ce procédé présentent cependant une stabilité structurelle faible et la réalisation de formes complexes et en hauteur est également limitée bien que supérieure à ce que propose le procédé par jet d'encre. Un autre inconvénient est le fait que les buses d'impression se bouchent fréquemment (14,232).

## II-2.2.2.4. BIO-IMPRESSION ASSISTEE PAR LASER

La bio-impression assistée par laser est un procédé de FAO permettant d'imprimer un échafaudage à partir de bio-encre composée de biomatériau, de cellules et de cofacteurs combinés ou non et sans avoir recours à une buse d'impression. Le principe est d'irradier avec un faisceau laser une surface en matériau absorbant l'énergie et qui est plaquée contre une couche de bio-encre. Sous l'action du laser, le matériau absorbant chauffe localement et des bulles se forment dans la bio-encre. Cela fait tomber sur une plateforme placée en dessous une goutte de bio-encre qui se solidifie alors. Le laser est orienté selon différents axes via un miroir pour irradier des points précis selon un modèle du fichier de CAO. Cette méthode est très précise et en s'affranchissant de buse, elle évite les problèmes liés à leur obturation et permet d'augmenter la vitesse d'impression. Cependant, elle a pour inconvénients l'endommagement possible des cellules, la fragilité des échafaudages conçus et le faible nombre de couches empilables (230,232). Les biomatériaux utilisés par ce procédé comprennent notamment le collagène, la gélatine, la laminine, la fibrine, l'alginate, l'hydroxyapatite et les MEC décellularisées (233).

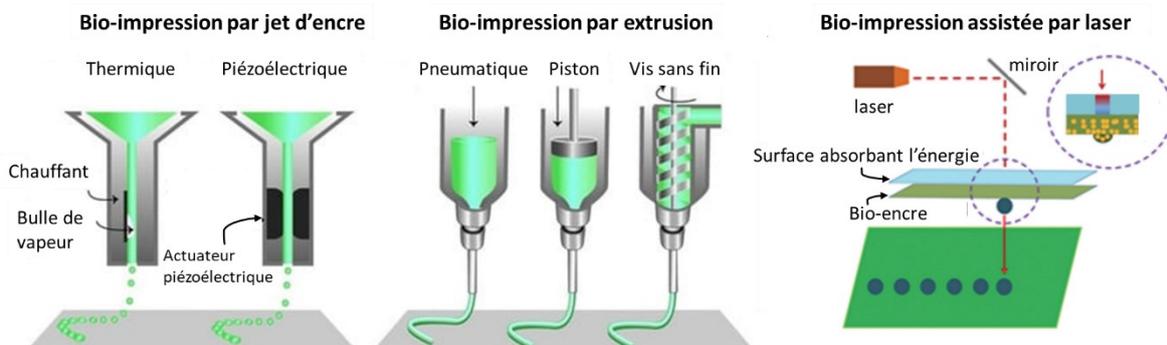


Figure 28 : Schéma illustrant le principe des procédés de bio-impression par jet d'encre, par extrusion et assistée par laser. Adaptée de Malda et al. (234) et Ahn et al. (232).

II-2.2.3. ORGANOÏDES

Les organoïdes sont des structures multicellulaires en trois dimensions obtenues à partir de cellules souches ou de précurseurs qui, cultivés en suspension ou encapsulés dans des hydrogels, s'autoorganisent spontanément en agrégats, se développent et se différencient pour reproduire *in vitro* la micro-anatomie d'un organe à l'échelle de quelques millimètres (235). Ils constituent une des grandes avancées scientifiques de la dernière décennie. Ils permettent de récapituler et d'étudier les premiers stades de l'organogénèse, produisent une

grande diversité de phénotypes cellulaires et forment des structures cellulaires dont l'architecture à l'échelle micrométrique est d'un biomimétisme inégalé par rapport aux autres techniques d'IT. Le processus de morphogénèse spontanée et non contrôlée des organoïdes à l'échelle micrométrique entraîne cependant un manque de reproductibilité et de biomimétisme aux échelles supérieures avec par exemple une taille critique au-delà de laquelle les cellules au cœur de l'organoïde nécrosent par manque d'apport en oxygène et en nutriments. Cela est dû au fait que lors de l'embryogénèse, la morphogénèse des tissus en développement est dirigée aux différentes échelles par des facteurs biochimiques et physiques organisés spatio-temporellement, processus difficilement reproductible *in vitro* (236). Certaines techniques et procédés d'IT permettent cependant d'exercer un contrôle spatio-temporel sur certains facteurs identifiés et pourraient apporter un début de réponse à ce problème. La génération d'échafaudages d'hydrogels composites présentant des micro-environnement compartimentés, la génération au sein des échafaudages de gradients divers influençant la morphogénèse et l'utilisation du génie génétique et des biomatériaux intelligents sont certaines des voies explorées (237). L'intégration des procédés d'IT précédemment exposés aux protocoles de fabrication d'organoïdes est une tâche difficile mais prometteuse dans le but de produire des tissus synthétiques anatomiquement et physiologiquement biomimétiques aux différentes échelles (237).

Plusieurs protocoles ont été mis au point pour la conception d'organoïdes humains de cerveau, de foie, de rein, de prostate, de rétine, de poumon, de muscle, et de tissu gastro-intestinal. Des organoïdes cérébraux d'un diamètre pouvant atteindre 4 mm ont par exemple été obtenus par différenciation neurale d'agrégats d'iPSCs encapsulées dans des hydrogels de Matrigel® et cultivés pendant 1 à 3 mois dans un bioréacteur (238). Une analyse immunohistochimique a révélé que les organoïdes cérébraux pouvaient contenir divers tissus cérébraux, notamment des formations miniatures de cortex cérébral (238) (figure 29). De même, des organoïdes de prostate ont été générés à partir d'agrégats de cellules souches/progénitrices primaires de prostate cultivées dans des hydrogels Matrigel 3D. Ils présentaient des cellules luminales et basales exprimant des récepteurs aux androgènes fonctionnels (239).

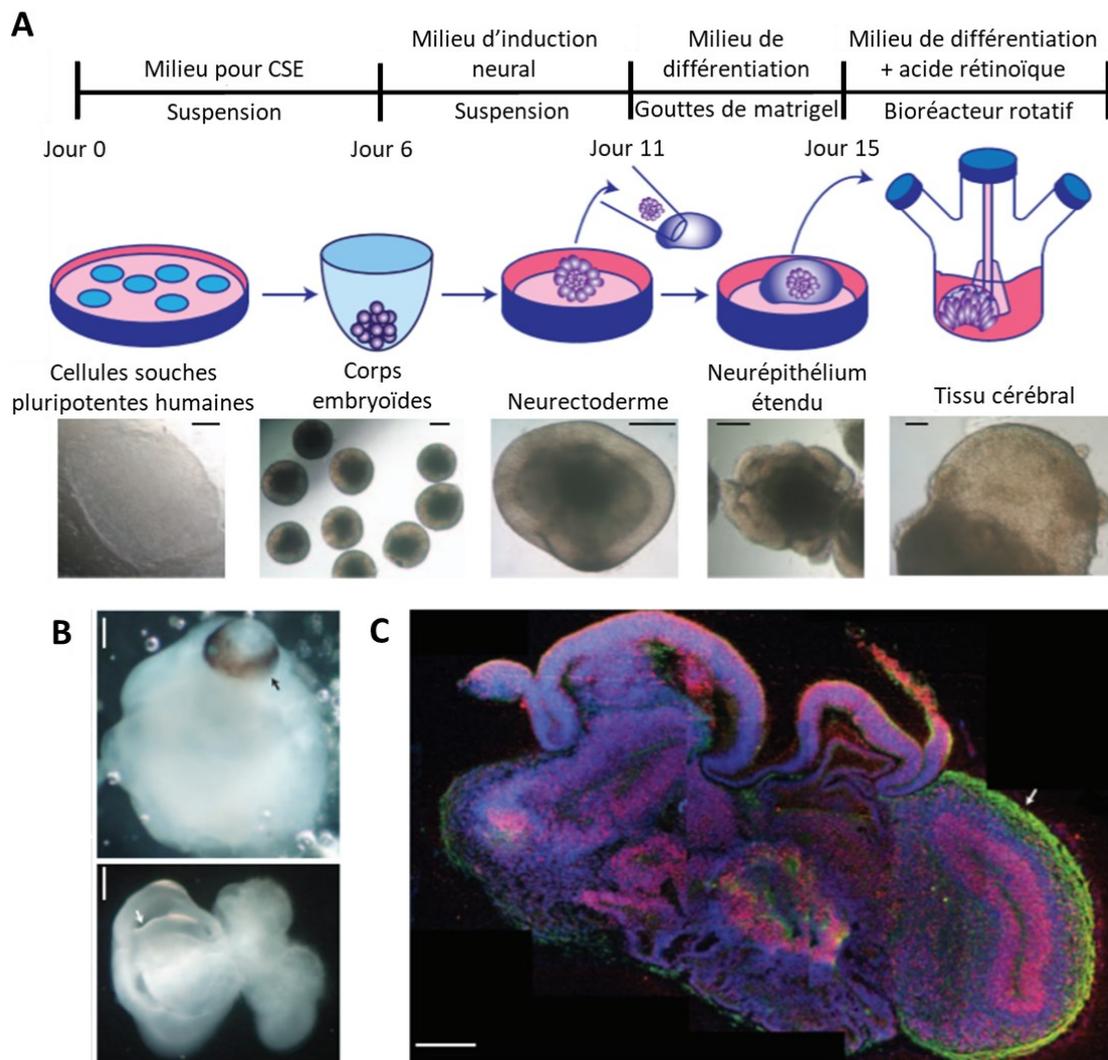


Figure 29 : **Description du système de culture d'organoïdes cérébraux.** A) Schéma du système de culture de l'organoïde avec une croissance et une différenciation progressive des cellules souches en tissu cérébral grâce à leur culture séquentielle dans différents milieux et sur différents supports. Des exemples d'images de chaque étape sont présentés. B) Images en champ clair à faible grossissement révélant des cavités remplies de liquide rappelant des ventricules (flèche blanche) et du tissu rétinien, comme indiqué par l'épithélium pigmenté de la rétine (flèche noire). Barres d'échelle, 200  $\mu$ m. C) L'immunohistochimie sur une coupe d'embryoïde a révélé une morphologie complexe avec des régions hétérogènes contenant des progéniteurs neuraux (marquage de SOX2 en rouge) et des neurones (marquage de TUJ1 en vert) (flèche). *Adaptée de Lancaster et al. (238)*

Les différents procédés présentés ci-dessus sont les plus utilisés pour la fabrication d'échafaudages d'IT. S'ils présentent chacun des avantages remarquables pour améliorer l'ensemencement, le comportement cellulaire ou la finesse de fabrication, chacun a également ses inconvénients. Le choix du procédé de fabrication nécessite d'avoir pesé ces avantages et inconvénients au regard des exigences spécifiques de l'échafaudage et du tissu attendu. Les inconvénients d'un procédé peuvent toutefois être couverts par les avantages d'un autre lorsque des associations de procédés sont possibles. Comme pour les biomatériaux, ces associations entraînent une grande complexification de la fabrication des tissus synthétiques. Un autre paramètre à prendre en compte dans la conception des tissus est le bioréacteur

éventuellement utilisé après fabrication pour permettre leur maturation. Il faut que celle-ci soit compatible avec les technologies existantes.

#### II-2.2.4. BIOREACTEURS

Les tissus créés via les différents procédés de fabrication disponibles sont vivants et doivent généralement être cultivés avant de pouvoir être utilisés dans l'usage prévu. Durant cette phase et afin que les cellules prolifèrent, se différencient et s'organisent au sein des échafaudages conçus, un environnement dynamique reproduisant certains aspects essentiels de l'environnement physiologique des cellules doit être créé via l'utilisation de bioréacteurs. Les bioréacteurs peuvent également servir à ensemercer des cellules au sein des échafaudages. Au sein des bioréacteurs, il convient de trouver un compromis entre, d'une part, recréer le mieux possible les conditions particulières aux cellules concernées et à l'objectif à atteindre et, d'autre part, limiter la complexité technique de l'appareil pour augmenter sa robustesse en se limitant aux conditions essentielles. Certains appareils sont aujourd'hui capables de soutenir la croissance de cocultures avec des cellules aux phénotypes différents, de créer des conditions de culture dynamiques facilitant les transferts de masse, et d'imager de manière précise l'évolution des paramètres biologiques des tissus cultivés afin adapter de manière fine les paramètres de culture (240).

Les bioréacteurs permettant de cultiver des tissus atteignant des volumes importants doivent engendrer un flux de milieu de culture suffisant pour que les cellules au cœur des échafaudages reçoivent de manière adaptée les nutriments et l'oxygène nécessaires à leur développement. Pour ce faire, plusieurs types de bioréacteurs sont proposés au-delà des bioréacteurs à agitation mécanique classiques. Les principaux sont (figure 30) : i) Les bioréacteurs à perfusion dans lesquels du milieu de culture enrichi en  $O_2$  arrive par une canalisation pour aller au contact du tissu synthétique immobilisé, et est évacué par une autre canalisation, créant ainsi un flux de milieu de culture passant à travers le tissu et maximisant les échanges. ii) Les bioréacteurs à lit fluidisé impliquant que les tissus non immobilisés soient d'une taille et d'une forme permettant au flux de milieu de culture arrivant par le bas de la cuve de les maintenir en suspension et de ne pas sédimenter. iii) Les réacteurs à paroi rotative où les tissus peuvent être solidaires d'une cuve en rotation ou en suspension dans les milieux de culture. La rotation de

la cuve cylindrique crée des courants de milieu de culture et un flux sur les tissus solidaires de la cuve ce qui homogénéise le milieu et augmente les échanges avec les tissus (241).

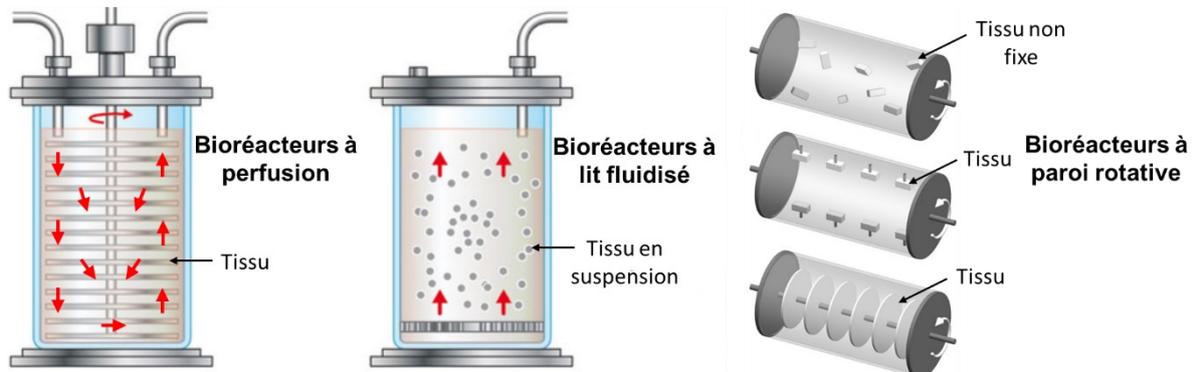


Figure 30 : Schéma de bioréacteurs pouvant créer des flux de milieu de culture adaptés aux tissus. Adaptée de Campeau-Péloquin & Roy (119) et Rauh et al. (242).

Le flux créé dans le bioréacteur doit être optimisé pour un tissu particulier sans quoi il peut avoir des effets délétères sur celui-ci. La taille des pores de l'échafaudage, leur nombre et leur interconnexion sont des paramètres à prendre en compte. Pour fournir aux cellules l'oxygène dont elles ont besoin, l'utilisation d'agents d'apport en oxygène comme les perfluorocarbones ou les hémoglobines extracellulaires est également possible (243,244). Cela permet de limiter les effets néfastes du stress oxydatif sur les cellules qui est fréquemment rencontré et est lié à l'oxygène dissout dans le milieu de culture et à l'agitation nécessaire à sa répartition. L'utilisation de sondes fluorescentes détectant l'oxygène peut également être un moyen de suivre et d'adapter sa concentration et sa répartition dans les bioréacteurs (241).

Des stimuli mécaniques ou électriques peuvent également être appliqués au sein des bioréacteurs pour favoriser la croissance et la différenciation de certains tissus comme les muscles, les ligaments ou le tissu cardiaque. Ils permettent en effet de recréer des conditions physiologiques qui activent certaines voies de signalisation cellulaire par mécano-transduction et entraîne différents types de réponses cellulaires (241).

### III- DOMAINES D'APPLICATIONS

---

Dans les chapitres précédents nous avons abordé l'émergence de l'ingénierie tissulaire en tant que concept et sa définition en tant que domaine de recherche scientifique multidisciplinaire visant à produire des tissus biomimétiques en laboratoire. Nous avons ensuite passé en revue les principaux matériaux disponibles pour réaliser des constructions biologiques artificielles se rapprochant des tissus biologiques, leurs avantages et inconvénients ainsi que les procédés de fabrication disponibles pour les mettre en forme. Dans ce chapitre nous présenterons succinctement les différents domaines dans lesquels les tissus synthétiques produits par IT sont utilisés. Alors que le développement de l'IT répondait à la base à des besoins thérapeutiques, d'autres applications ont finalement émergé pour ces technologies.

---

#### III-1. MODELES D'ETUDES

---

##### III-1.1. EN RECHERCHE FONDAMENTALE

---

Pour atteindre l'objectif de créer des tissus synthétiques reproduisant au mieux les tissus natifs afin de pouvoir les remplacer, une connaissance fine de ceux-ci, de leur processus de formation et des interactions entre leur différents constituants est primordiale. La recherche fondamentale a donc été stimulée par le développement de l'IT, ce domaine multidisciplinaire nécessitant de nombreuses connaissances voire un approfondissements des connaissances issues de domaines de recherche variés comme la biologie cellulaire ou la science des matériaux. Inversement, la recherche en IT est directement susceptible d'engendrer de nouvelles connaissances pouvant se révéler essentielles pour d'autres domaines.

D'une manière plus directe et pratique, les produits biologiques issus de technologies et procédés d'IT peuvent constituer des outils pertinents pour la recherche fondamentale. Ils constituent en effet des modèles d'étude *in vitro* souvent plus pertinents que les traditionnelles cultures cellulaires en deux dimensions. En effet, ils miment mieux l'environnement cellulaire physiologique, permettent une différenciation cellulaire plus poussée et récapitulent ainsi plus de fonctions cellulaires. Les modèles *in vitro* issus de l'IT améliorent l'étude des processus d'organogénèse, de régénération, de cicatrisation, de vieillissement et l'étude des fonctions

cellulaires et tissulaires (245). Ils permettent également l'étude des maladies car ils récapitulent mieux que les modèles 2D les phénotypes pathologiques et les processus physiopathologiques sous-jacents. Il est possible d'obtenir de tels modèles pathologiques en les soumettant aux agents causant la maladie ou en utilisant des cellules issues de patients comme matériaux de base pour leur élaboration. Ces modèles concurrencent ou complètent les modèles animaux sur certains aspects, l'extrapolation à l'humain de résultats issus de ces derniers étant souvent limitée par les divergences entre espèces (245,246).

Afin d'illustrer ce type d'application de l'IT, je vais maintenant parler de mon expérience de stage au sein du Centre de Recherche en Myologie. Dans le cadre de mon master recherche « Thérapie cellulaire, thérapie génique et Ingénierie Tissulaire » de Grenoble, j'ai pu effectuer un stage dans ce centre sous la

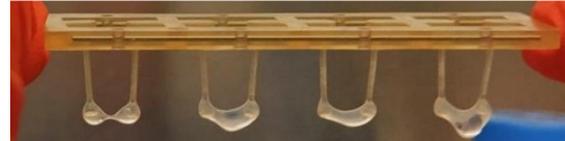
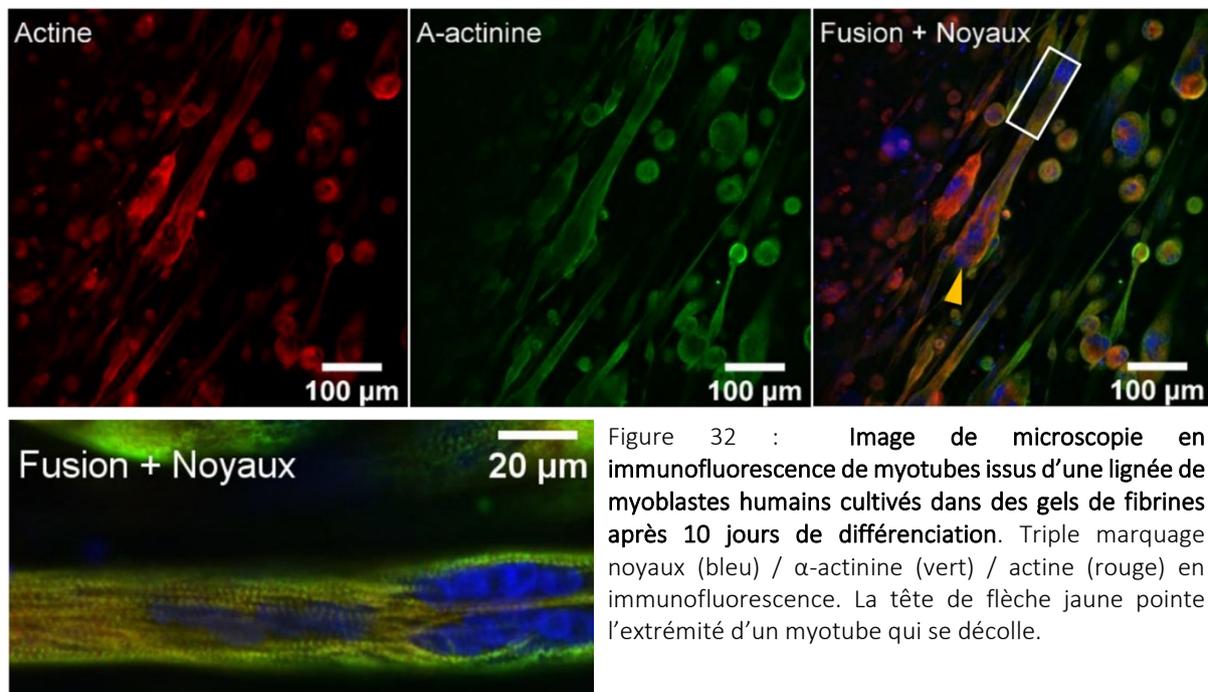


Figure 31 : **Gels de fibrine permettant la culture en trois dimensions de myoblastes.** Les myoblastes issus d'une lignée sont cultivés selon le protocole développé par Hansen *et al.* (247). La photo est prise le jour de l'ensemencement concomitant à la formation des gels.

direction du Docteur Catherine Coirault et du Docteur Jean-Baptiste Dupont. L'objectif était de cultiver en trois dimensions des iPSCs humaines afin de produire un modèle d'étude du muscle squelettique. L'échafaudage dans lequel poussait les précurseurs myogéniques dérivés d'iPSCs était constitué d'un gel de fibrine. L'objectif suivant était de soumettre les constructions d'IT à différents stimuli d'ordre mécanique, électrique ou pharmacologique afin d'augmenter leur maturation et l'acquisition de caractères phénotypiques propres au tissu musculaire. Le protocole était déjà maîtrisé au laboratoire avec une lignée de myoblastes humains et sa transposition aux iPSCs devait permettre, une fois maîtrisée et optimisée, d'utiliser des cellules issues de patients atteints de myopathies, en particulier de la dystrophie musculaire de Duchenne. La crise du Covid a limité mon temps de présence au laboratoire et l'atteinte de mes objectifs. J'ai toutefois pu réaliser des cultures cellulaires en 3D avec la lignée de myoblastes (figure 31) et j'ai pu comparer certains des caractères phénotypiques présentés avec ceux de cultures cellulaires réalisées en 2D. J'ai également pu tester le protocole avec les précurseurs myogéniques issus d'iPSCs mais je n'ai pas pu obtenir de culture 3D d'une qualité équivalente à celles obtenues avec la lignée immortalisée. Le protocole nécessitait des adaptations que le délai réduit de mon stage ne m'ont pas permis de réaliser.

Les résultats obtenus en culture 3D ont permis d'illustrer, sur quelques traits phénotypiques caractéristiques de la différenciation des cellules musculaires, l'intérêt et le potentiel de la

culture 3D et de l'IT pour la recherche fondamentale. Le système de culture 3D utilisé était le système développé par Hansen *et al.* (247) pour le muscle cardiaque. Lors de la différenciation des myoblastes, on assiste à une fusion de ceux-ci pour former des syncytiums contenant plusieurs noyaux. Ils sont alors appelés myotubes et sont les précurseurs des fibres musculaires (figure 32). Les myotubes expriment des protéines caractéristiques de la fonction contractile du muscle qui forment son unité contractile, le sarcomère. Les sarcomères, constitués notamment d'actine, de myosine et d' $\alpha$ -actinine, s'alignent en myofibrilles présentant une striation régulière (figure 33). Les myofibrilles s'alignent finalement entre elles. On peut également observer une activité contractile désynchronisée des myotubes au bout de quelques jours. Dans notre étude, cette contraction entraînait un décollement des cellules au bout de 10 jours de différenciation (figure 32). Un ajout de Matrigel® au gel de fibrine aurait peut-être pu permettre d'obtenir des cultures 3D au décollement cellulaire plus tardif. Malgré cela sans qu'aucun stimulus mécanique ou autre n'ait été appliqué aux cultures, j'ai pu observer la formation de myotubes d'une taille supérieure et contenant plus de noyaux que ceux observés en 2D. Leur striation et leur activité contractile était également plus marquée et, contrairement à la culture 2D, ils étaient alignés dans l'axe du gel de fibrine, tel que l'on peut l'observer *in vivo* (248).



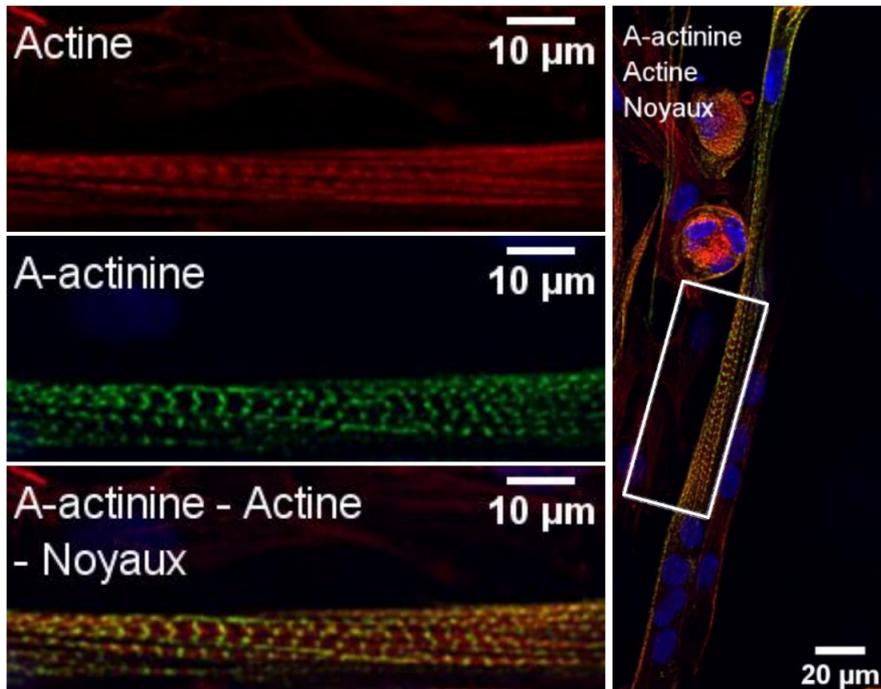


Figure 33 : Image de microscopie en immunofluorescence de myotubes issus d'une lignée de myoblastes humains cultivés dans des gels de fibrines après 10 jours de différenciation.

L'espacement entre les stries vertes est compris entre 2,8 et 3,2  $\mu\text{m}$ , taille caractéristique d'un sarcomère. Triple marquage noyaux (bleu) /  $\alpha$ -actinine (vert) / actine (rouge) en immunofluorescence. La colonne de gauche correspond au grossissement du cadre blanc de l'image de droite.

### III-1.2. EN RECHERCHE PRECLINIQUE

La suite logique à l'utilisation en recherche fondamentale de modèles d'IT reproduisant des tissus pathologiques pour en étudier la physiopathologie est de tester, sur ces mêmes modèles, l'efficacité de différentes thérapies. Les modèles animaux sont essentiels pour les essais précliniques des médicaments et permettent d'évaluer divers types de toxicité, d'arrêter leur développement s'ils ne remplissent pas les critères de sécurité et de déterminer la dose sûre pour commencer les essais cliniques de phase I chez l'humain. Cependant l'utilisation d'animaux en recherche fondamentale et préclinique est au cœur d'un intense débat éthique. S'ils sont aujourd'hui toujours indispensables au développement de médicaments, les pratiques et les normes autour de leur utilisation ont évolué selon le principe des 3R (249) visant à les i) Remplacer par d'autres méthodes lorsque cela est possible, ii) Réduire le nombre d'animaux utilisés par une analyse plus fine de la littérature, une optimisation des statistiques et une préparation rigoureuse des protocoles en amont et iii) Raffiner leur utilisation en améliorant les conditions de transport, d'élevage et d'hébergement, en limitant le stress des animaux, en privilégiant les procédures non invasives, en améliorant l'analgésie et les procédures d'euthanasie, en fixant à l'avance une limite de souffrance/détresse de l'animal au-delà de laquelle l'expérience sera interrompue. En outre, les modèles animaux ne sont pas parfaits et les divergences avec la physiologie et la physiopathologie humaine peuvent

engendrer une sous-évaluation ou une surévaluation de certains phénomènes de toxicité ou de l'efficacité des médicaments étudiés. Cela peut parfois mener à des échecs évitables et coûteux dans le développement des médicaments ou pire, à l'exposition des sujets humains des phases cliniques à des risques non prévus.

Dans l'objectif de réduire l'utilisation des modèles animaux en recherche préclinique et de les compléter pour augmenter la pertinence des résultats, les modèles de test issus de l'IT présentent un fort potentiel et un certain nombre est en développement. Les approches d'impression 3D et d'organoïdes sont particulièrement étudiées pour ce type d'application. Une manière de les adapter à cet usage est de les intégrer à des systèmes de micro-fluidique appelés organe-sur-puce ou organ-on-chip en anglais. La micro-fluidique est un domaine des sciences et techniques s'intéressant à l'écoulement des liquides dans des réseaux de canaux à l'échelle du micron. Ses premières applications sont apparues dans le domaine du diagnostic *in vitro*. Grâce aux connaissances accumulées dans ce domaine et à l'évolution des techniques de fabrication et de miniaturisation, il est également possible de fabriquer de manière standardisée des puces recréant certaines conditions physiologiques. Les puces contiennent des canaux mimant les systèmes circulatoires et des chambres contenant elles-mêmes des organoïdes ou autres constructions cellulaires en 3D mimant certains organes ou certaines de leurs fonctions. Le tout est compatible avec divers procédés d'analyse (optique, chimique, biochimique etc.) permettant de mesurer différents paramètres biologiques (245). Des puces de micro-fluidiques associant plusieurs types de tissus connectés entre eux par des canaux afin de recréer sur une même puce les principaux systèmes physiologiques du corps humain sont en cours d'élaboration et sont appelées corps-sur-puce ou body-on-chip en anglais. Ces versions miniaturisées de fonctions d'organes ou de systèmes d'organes sont très utilisées pour des applications de criblage de médicaments car elles ont un fort potentiel prédictif, sont flexibles, compatibles avec une utilisation haut débit et industrialisables (250).

Plusieurs exemples d'organe-sur-puce développés pour des applications de recherche fondamentale ou de criblage de médicaments sont présentés dans le tableau 3. Ceux recréant les fonctions hépatiques sont particulièrement intéressants pour les tests de toxicité et de métabolisme des médicaments car ils s'avèrent être supérieurs aux modèles *in vitro* issus de culture cellulaire 2D actuellement homologués pour les essais précliniques de pharmacocinétiques (251).

Tableau 3 : **Résultats majeurs en recherche fondamentale et préclinique des systèmes d'organe-sur-puce pour différents organes.** Tableau synthétisant les données issues des articles traités dans la revue de littérature de Thakare *et al.* (252).

| SYSTEMES D'ORGANE-SUR-PUCE | RESULTATS PRINCIPAUX  |
|----------------------------|---|
| Foie                       | Modèles d'étude de la toxicité médicamenteuse   |
| Reins                      | Modèles d'étude de la toxicité médicamenteuse   |
| Cœur                       | Modèles d'étude de la toxicité médicamenteuse, reproduction des battements cardiaques |
| Poumons                    | Modèles d'étude de la toxicité médicamenteuse   |
| Intestins                  | Capacité à former des tissus avec de multiples types cellulaires                      |
| Os                         | Modèles d'étude de maladies   |
| Vaisseaux sanguins         | Reproduction du flux sanguin, modèles d'étude de maladies                             |
| Tumeurs                    | Modèles d'étude de maladies, test d'efficacité de médicament                          |

Les fonctions rénales sont également étudiées grâce à ces techniques, notamment la clairance rénale des médicaments et leur néphrotoxicité. Dans cette perspective, Homan *et al.* (253) ont par exemple développé un modèle d'organe-sur-puce récréant une partie du néphron, l'unité fonctionnelle du rein. Le tubule contourné proximal a pu être récréé à partir de cellules épithéliales du tubule proximal (PTECs)ensemencées sur une matrice en gélatine et fibrinogène moulée à la forme d'un tube proximal grâce à un procédé d'impression 3D (figure 34). La culture en perfusion de la construction obtenue a permis d'obtenir un tubule proximal synthétique récapitulant mieux la morphologie et le phénotype du tissu physiologique que les cultures 2D cultivées sur biomatériaux ou non, perfusées ou non. L'expression de protéines caractéristiques comme la Na/K ATPase ou la tubuline des cils primaires était supérieure dans ce modèle 3D. La morphologie cellulaire était plus proche de la physiologique en 3D, avec une polarisation des cellules, la formation de microvillosités denses au pôle apical, de jonctions serrées entre les cellules et la sécrétion de protéines de la lame basale au pôle basal. Les chercheurs ont ensuite utilisé ce modèle pour étudier la néphrotoxicité de la cyclosporine A. Des effets cytotoxiques similaires à ceux retrouvés chez l'homme ont été retrouvés dans ce modèle avec une mort cellulaire dose-dépendante provoquant une atteinte de l'intégrité du tubule et donc une augmentation de sa perméabilité par diffusion.

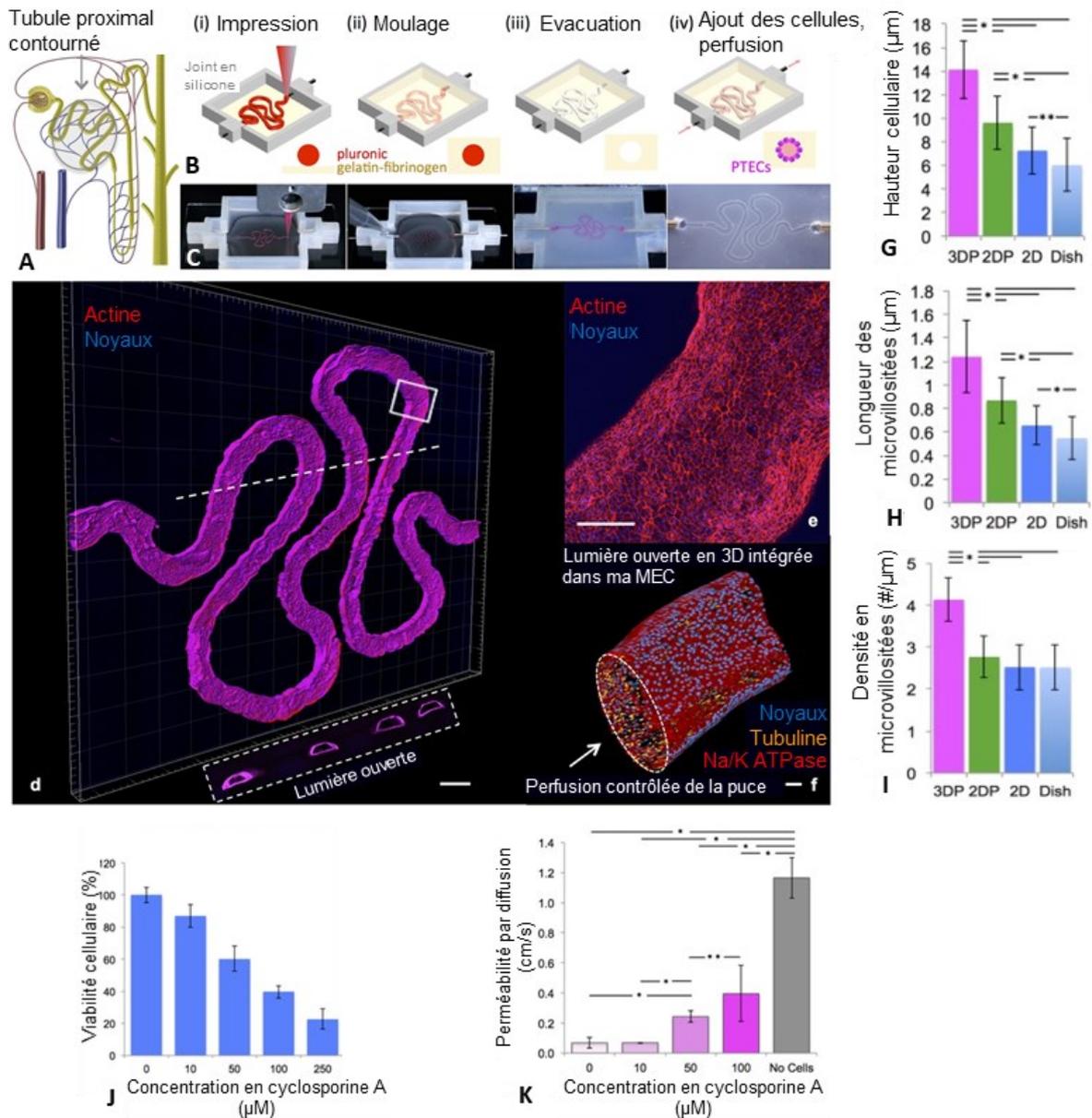


Figure 34 : **Tubule contourné proximal 3D sur puce.** **A)** Schéma d'un néphron mettant en évidence le tubule contourné proximal. **B,C)** Schémas et photographies correspondantes des différentes étapes de la fabrication de tubules contournés proximaux perfusables en 3D, dans lesquels (i) une encre dégradable est d'abord imprimée sur une MEC de gélatine-fibrinogène, (ii) une couche de MEC supplémentaire est coulée autour de l'élément imprimé, (iii) l'encre dégradable est évacuée pour créer un tubule ouvert et (iv) des PTEC sont ensemencées dans le tubule et perfusées pendant de longues périodes. **D)** Un rendu 3D du tubule contourné proximal imprimé acquis par microscopie confocale, où l'actine est colorée en rouge et les noyaux en bleu ; la ligne pointillée blanche indique l'emplacement de la vue en coupe transversale montrée ci-dessous dans laquelle les PTEC circonscrivent des lumières ouvertes en 3D, barre d'échelle = 500  $\mu\text{m}$ . **E)** Vue à plus fort grossissement de la région indiquée par le rectangle blanc en (d), barre d'échelle = 200  $\mu\text{m}$ . **F)** Rendu 3D du tubule contourné proximal où une lumière ouverte circonscrite par un revêtement épithélial est perfusée de manière directionnelle sur la puce. La Na/K ATPase est colorée en rouge, la tubuline acétylée est orange mettant en évidence les cils primaires, les noyaux sont bleus, barre d'échelle = 50  $\mu\text{m}$ . **G)** Hauteur des PTEC mesurée à partir d'images de microscopie électronique à transmission (TEM) des constructions de tubules contournés proximal 3D (3DP) ainsi que de trois contrôles 2D (2DP = PTECs sur MEC en 2D avec perfusion, 2D = PTECs sur MEC en 2D non perfusé, Dish = boîte de culture tissulaire nue non perfusée), \* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,02$ . **H)** Longueur des microvillosités et **I)** densité des microvillosités quantifiée à partir d'images TEM des constructions PT 3D (3DP) ainsi que des trois contrôles 2D (2DP, 2D Dish),  $p < 0,001$ . **J)** Viabilité cellulaire mesurée pour le contrôle 2D (sur boîte nue) après l'administration de la cyclosporine A (toutes les populations indiquées sont statistiquement significativement différentes avec un  $p < 0,005$ ). **K)** Mesures de perméabilité par diffusion effectuées après l'administration de la cyclosporine A, \* $p < 0,003$ , \*\* $p < 0,02$ . Adaptée de Homan et al. (253)

Certaines solutions sont déjà commercialisées comme la technologie exVive3D™ produite par la société Organovo qui est un tissu hépatique imprimé en 3D destiné au criblage de médicaments (254).

Le 11 mars 2013 est entrée en vigueur en Union Européenne le règlement n°1223-2009 interdisant le recours à des tests animaux durant le développement des produits cosmétiques (255). En remplacement de ceux-ci, une analyse bibliographique approfondie et des méthodes de test alternatives sont indiquées. Certaines entreprises se sont alors tournées vers des solutions d'IT pour créer des modèles alternatifs les plus pertinents possibles. C'est notamment le cas pour la société Episkin produisant à l'origine de la peau bio-imprimée et qui a été rachetée par l'Oréal afin d'obtenir ce modèle de peau pour tester ses cosmétiques. La croissance d'Episkin a été stimulée par ce nouveau marché dont les attentes et les normes en termes de biomimétisme sont moins fortes que pour les modèles servant à tester des médicaments. Episkin commercialise aujourd'hui différents modèles d'épiderme, de derme, d'épithélium de cornée, de muqueuse orale, gingivale ou vaginale et vise également le marché des tests non cliniques de médicaments (<https://www.episkin.com/>).

Les thérapies médicamenteuses présentent des limites liées aux variations génétiques et phénotypiques entre patients qui entraînent des variations de réponses. La prédiction de leurs effets pour chaque profil de patient est difficile. Dans ce contexte, les modèles d'IT peuvent permettre d'améliorer les prédictions de réponses aux traitements pour les différents profils de patients à travers la constitution de bio-banques de modèles regroupant les principales variations phénotypiques retrouvées dans la population, voire même à travers la réalisation des tests sur des modèles spécifiques de chaque patient et issus de leur propres cellules (256). Cette approche a notamment été étudiée par Dekkers *et al.* qui ont réalisé une bio-banque d'organoïdes de cancer du côlon, sur laquelle 83 médicaments actuellement utilisés en clinique ou dans le cadre d'essais cliniques ont été examinés en vue de leur utilisation dans le traitement de cette pathologie. Le dépistage a corroboré les associations gène-médicament connues et a ainsi démontré que les bio-banques organoïdes se prêtent au dépistage à haut débit (257). Cette approche de tests personnalisés des médicaments participe à l'émergence de la médecine personnalisée.

Dans l'ensemble, les modèles développés ne sont pas encore validés. Le niveau de complexité nécessaire pour réaliser des modèles de tissus ou d'organes suffisamment pertinents pour des

essais précliniques n'est pas forcément atteint ou même défini. Quel niveau de biomimétisme de la physiologie humaine est nécessaire pour valider un modèle dans une application particulière de test ? Afin de permettre à ces puissants modèles d'être utilisés à haut débit pour la découverte de médicaments, une validation de critères de qualité et leurs normalisation systématiques sont nécessaires.

---

## III-2. APPLICATION EN CLINIQUE

---

Comme nous l'avons vu dans les parties précédentes, l'IT apparaît à l'origine pour tenter d'apporter des réponses innovantes à des besoins cliniques non couverts. Exprimés en particulier par des chirurgiens, ces besoins de nouvelles solutions sont plus particulièrement présents dans le remplacement et la régénération de tissus dans un contexte d'un manque de tissus allogéniques greffables disponibles. L'IT a par la suite montré son utilité pour des applications non cliniques cependant, elle présente toujours un fort potentiel pour des applications cliniques et continue à être développée dans cette optique. Ces développements sont complexes mais continuent à stimuler la croissance de cette discipline.

Ces applications clinique de l'IT peuvent prendre des formes différentes. Elles peuvent être intégrées à des techniques de chirurgies avec l'usage de biomatériaux stimulant la régénération et servant de support aux tissus. C'est par exemple le cas d'une procédure d'élévation du plancher sinusien où l'objectif est d'augmenter l'épaisseur de l'os maxillaire au niveau du plancher sinusien afin de permettre par la suite la pose d'un implant dentaire, dans le cas où l'épaisseur du plancher est insuffisante pour poser directement l'implant. Triplett *et al.* ont proposé d'utiliser une éponge de collagène contenant de la protéine morphogénétique de type 2 recombinante humaine (rhBMP-2) pour réaliser ce comblement sinusien et de comparer les résultats avec ceux obtenus avec la technique de référence qui utilise une greffe d'os autologue provenant des crêtes iliaques ou du menton (258) (figure 35). Le collagène est un polymère d'origine naturel présent dans tous les tissus de soutien. Cette protéine de la MEC sert, avec d'autres, d'échafaudage pour la minéralisation osseuse conférant à l'os ses caractéristiques mécaniques. La protéine BMP-2 est un facteur de croissance présent dans le tissu osseux favorisant l'ostéoinduction et l'ostéosynthèse. Pour augmenter l'épaisseur de l'os du plancher sinusien, la solution mise en place ici est donc d'introduire un biomatériau pouvant servir

d'échafaudage de base à la croissance du tissu osseux ainsi qu'un facteur de croissance attirant et stimulant les cellules impliquées dans ce processus d'ostéosynthèse.

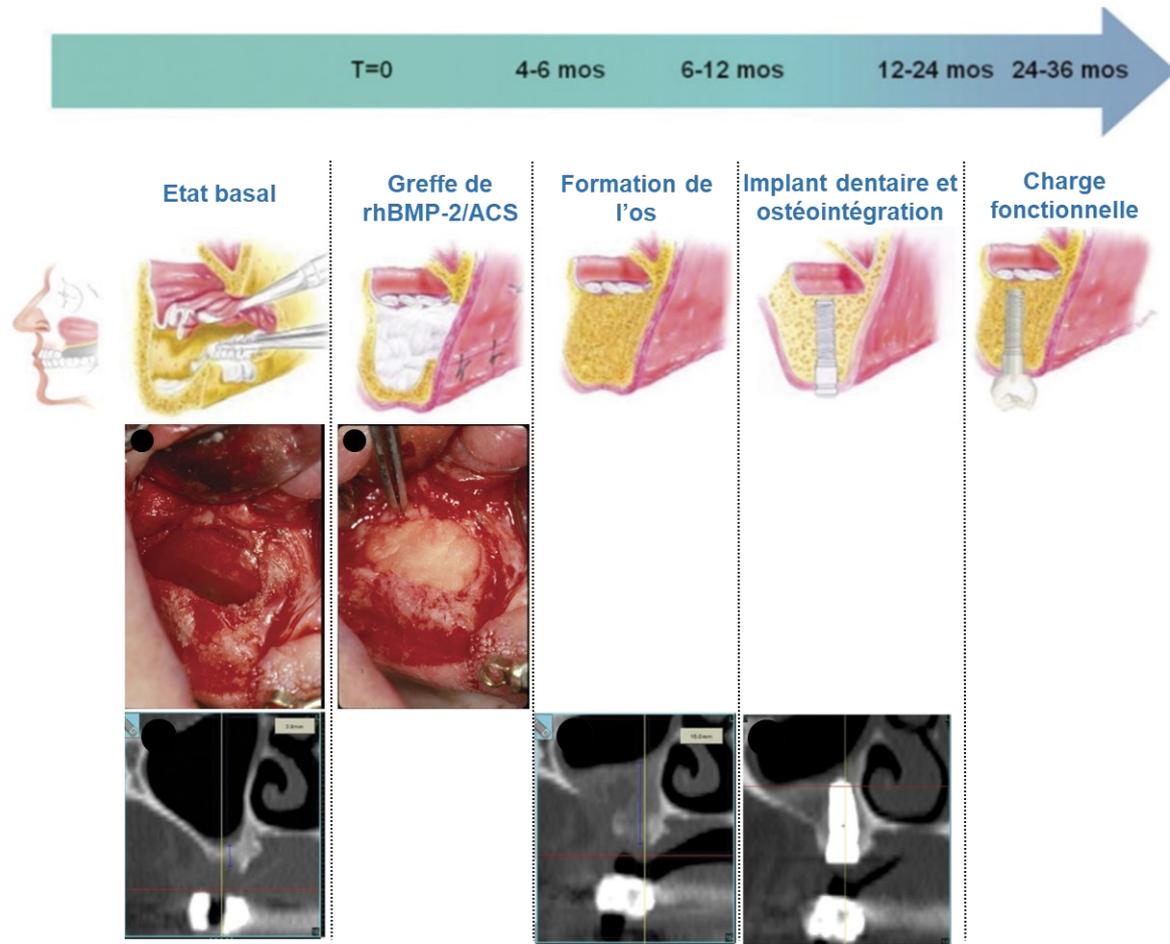


Figure 35 : Augmentation du plancher sinusien par ostéosynthèse à partir d'un échafaudage de collagène contenant le facteur de croissance rhBMP-2. Première ligne : schéma d'évolution clinique du sujet entre l'opération et 24-36 mois après celle-ci. Deuxième ligne : photos du site d'ostéotomie prises pendant l'opération, avant et après comblement du sinus maxillaire avec du collagène/rhBMP-2. Troisième ligne : tomodensitogrammes du sinus maxillaire avec de gauche à droite en préopératoire, 6 mois après l'opération, plusieurs mois après l'opération et après la pose d'un implant dentaire dans l'os du plancher sinusien épaissi. *Adaptée de Triplett et al. (258)*

Les chercheurs ont réalisé un essai clinique multicentrique randomisé pour comparer l'utilisation de collagène/rhBMP-2 à la technique de référence dans une procédure en deux étapes pour élever le plancher sinusien et placer des implants dentaires chez 160 patients. La hauteur du plancher sinusien a été augmentée de 7,83 mm en moyenne dans le groupe collagène/rhBMP-2, contre 9,46 mm en moyenne dans le groupe d'os autologue. Cependant, à 6 mois, la densité osseuse mesurée par tomodensitométrie était significativement plus importante dans le groupe collagène/rhBMP-2 que dans le groupe os autologue. Sur le principal critère d'évaluation (induction d'une formation osseuse capable de supporter avec succès une restauration sur implant dentaire après 6 mois de charge fonctionnelle) le taux de réussite était

de 79% versus un objectif de 73%. Les taux de réussite de la pose de prothèses dentaires une fois l'augmentation osseuse et les implants posés étaient comparables entre les groupes. De plus, l'approche d'IT permet d'éviter une anesthésie générale pour prélever le tissu osseux à greffer ainsi que des morbidités du site donneur telles que la douleur, la paresthésie, l'hypersensibilité, l'instabilité pelvienne ou l'infection. Dans cet exemple, il n'y a pas à proprement parler utilisation de cellules, de biomatériaux et de facteurs de croissance assemblés en amont pour constituer un tissu qui est greffé par la suite. Toutefois, il y a « *génération d'un substitut biologique qui améliore la fonction d'un tissu* » par utilisation d'une « *substance inductrice de tissu* » tel que défini par Vacanti (13) (cf chapitre I), on peut donc parler d'une stratégie d'IT.

Dans la suite de ce document, je présenterai plus en détails les applications cliniques de l'IT qui se présentent dans un schéma plus traditionnel de thérapies développées et fabriquées par l'industrie pharmaceutique de manière standardisée et destinées à être utilisées chez plusieurs patients dans une ou plusieurs indications définies. L'émergence de ce secteur d'activité n'a pas été un long fleuve tranquille et certains de ses faits marquants seront présentés dans un premier temps. Ces thérapies d'IT sont régulées différemment selon les différents pays. Le contexte réglementaire qui définit ces thérapies et leurs caractéristiques discriminantes seront également étudiés. Les différentes thérapies commercialisées seront présentées avec un focus sur deux d'entre elles et une étude des thérapies en essais cliniques donnera un aperçu des orientations prises. Les différents éléments présentés dans les parties I et II seront finalement rappelés pour alimenter mon analyse sous la forme d'une discussion sur ce que propose actuellement l'ingénierie tissulaire en terme de thérapie par rapport aux technologies disponibles ou en développement et au regard des attentes formulées lors de son apparition. Ses perspectives d'évolution seront également discutées afin de distinguer ce qui incite à être optimiste de ce qui reste à résoudre et qui incite à être prudent.

---

**PARTIE II : APPLICATIONS CLINIQUES DE L'INGENIERIE  
TISSULAIRE**

---

## I- L'EMERGENCE D'UNE INDUSTRIE

### I-1. DEBUTS PROMETTEURS ET FORTE CROISSANCE

Comme nous l'avons vu, l'ingénierie tissulaire émerge durant les années 1980 pour répondre à des attentes thérapeutiques que les traitements de l'époque ne satisfont pas entièrement. Les recherches menées par les équipes de Green (15), Bell (16) et Yannas (17) jettent les bases du développement des thérapies d'IT dans le domaine des substituts de



Figure 36 : La « souris de Vacanti ».  
[https://en.wikipedia.org/wiki/File:Vacanti\\_mouse.jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/File:Vacanti_mouse.jpg)

peau et mènent quelques années plus tard, durant les années 1990, à la commercialisation aux USA de plusieurs produits utilisés dans le traitement des plaies : Integra Dermal Regeneration Template de Integra Life Sciences en 1996 (26) ; Epicel® de Vericel disponible comme tissu humain conservé de 1988 à 1998 puis comme dispositif médical (DM) (25,259) ; Apligraf® d'Organogenesis en 1998 (24), Dermagraft® d'Organogenesis en 2001 (260). Cela fait naître un fort engouement chez les investisseurs, dans un contexte de « boom des biotechnologies », dopé par les ambitieuses promesses d'applications révolutionnaires à court terme. Ainsi durant les années 1980 et 1990, de nombreuses start-up américaines issues des laboratoires académiques du MIT ou de Harvard ont vu le jour avec comme objectif de créer divers types d'organes humains fonctionnels (261). Elles ont, pour ce faire, développé de nombreux partenariats avec des hôpitaux, des centres de recherche universitaires et des entreprises pharmaceutiques comme Novartis, Genzyme, et Smith & Nephew (262). En 1997 la BBC a réalisé un reportage mettant en lumière la « souris de Vacanti » (263) ; souris sur le dos de laquelle on voit greffée ce qui ressemble à une oreille humaine. Charles A. Vacanti, frère de Joseph P. Vacanti, aensemencé des chondrocytes bovins dans un échafaudage de biomatériaux à la forme d'une oreille humaine puis l'a implantée sous la peau d'une souris pour favoriser sa maturation grâce au métabolisme et à la vascularisation de la souris (264). La forme de l'oreille était maintenue par une attelle externe pendant son développement au sein de la souris. Au-delà de la polémique sur l'éthique de l'expérience, la médiatisation de cette souris a participé à faire grandir l'engouement de la presse et du public pour la révolution thérapeutique

annoncée qu'est la production d'organes humains par IT. L'expérience n'était toutefois qu'une preuve de concept et de nombreux obstacles devraient être franchis si cette oreille devait être greffée à l'humain.

---

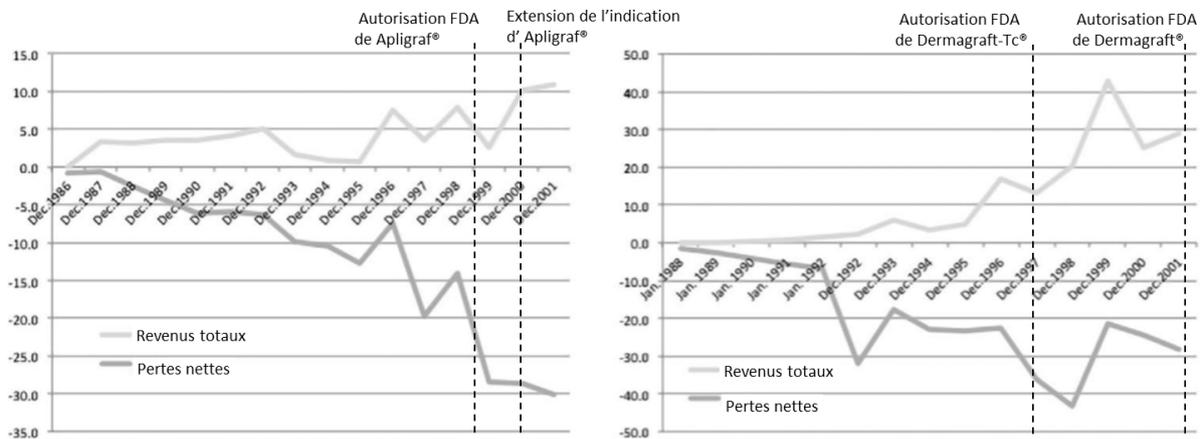
## I-2. DIFFICULTES ET CONTRACTION ECONOMIQUE

---

Après cette période de croissance et d'effervescence suivant l'émergence du secteur de l'IT vient, à la fin des années 1990 et au début des années 2000, une période plus difficile de désenchantement et de contraction économique du secteur. Une part importante des entreprises créées durant les années 1990 fait faillite. Plusieurs raisons expliquent cela : i) les objectifs fixés apparaissent trop ambitieux au regard des technologies de l'époque, la structure relativement simple de la peau, ses exigences vasculaires limitées et la facilité de cultiver des kératinocytes *in vitro* ne sont pas communes à la plupart des tissus. ii) Les start-ups et leurs partenaires de l'industrie pharmaceutique doivent apprivoiser les spécificités nouvelles de ces produits « vivants » (par rapport aux médicaments traditionnels) et s'adapter à ces spécificités sur de nombreux aspects : procédés de production, approvisionnement en matières premières, qualité, marketing, conservation, conformité réglementaire etc. Cette adaptation implique de nombreuses erreurs, entraînant des surcoûts et des délais supplémentaires. Ces spécificités impliquent également la création d'un tissu industriel spécifique et la mise en place de chaînes de sous-traitance. iii) Les business model ne sont pas viables : la durée et le coût du développement et de la production sont trop importants car complexes par rapport à la taille des marchés qui a été surévaluée. iv) L'environnement réglementaire inadapté et instable rend difficile le développement et la mise sur le marché des quelques produits aboutis ; jusque-là non régulés, les produits d'IT acquièrent à partir de 1996 un statut similaire à celui des médicaments et dispositifs médicaux aux USA et une mise aux normes coûteuse s'impose aux entreprises. v) L'indispensable prise en charge par les organismes d'assurances des onéreux produits développés est difficile à obtenir et la pénétration des marchés en est affectée malgré l'efficacité parfois supérieure des produits d'IT (262,265,266).

La grande majorité des entreprises d'IT n'était pas rentable et dépendait de levées de fonds. Pour les entreprises n'ayant pas de produit commercialisé, les investisseurs perdaient patience face aux retards de développement. Pour les entreprises ayant des produits commercialisés, la rentabilité était encore loin et les pertes liées aux coûts de fabrication et de commercialisation

des produits étaient croissantes. Leurs investisseurs perdirent également patience (267). On peut citer comme exemple deux entreprises américaines pionnières dans l'IT : Advanced Tissue Sciences et Organogenesis (figure 37). Lorsque les investisseurs se sont détournés de ces placements risqués et jusqu'alors décevants, beaucoup d'entreprises ont fermé.



Au Royaume-Uni et au Japon où quelques entreprises d'IT avaient été fondées à la fin des années 1990, les faillites ont également été nombreuses. Ce phénomène n'est pas spécifique au secteur de l'IT mais a également touché l'ensemble du secteur des biotechnologies lors de l'éclatement de la bulle internet en 2001 (262). En parallèle, les recherches sur les cellules souches menées dans l'académique depuis une dizaine d'années commence à produire des résultats concrets aboutissant à la création d'entreprises (+42% d'unités commerciales spécialisées dans les cellules souches entre 2000 et 2003 et + 300 emplois) (265). L'engouement pour ce nouveau secteur de la médecine régénérative qui émerge alors, et qui absorbera l'IT en son sein, compense une partie du désintérêt pour l'IT et ses conséquences économiques.

Ces variations de la vitalité économique de l'IT se manifestent dans les données relatives à l'activité commerciale en médecine régénérative (dont l'IT constitue une grande partie sur cette période) présentées dans le tableau 4. De 1994 à 2000, l'activité totale du secteur privé est multipliée par 2,5, passant de 246 à 610 millions de dollars. Sur la même période le nombre de personnes employées par ce secteur double, passant de 1500 à 3080 emplois équivalents

temps plein. Le nombre d'unités commerciales actives dans ce secteur croît également passant de 40 à 73. La valeur du capital des entreprises cotées permet d'apprécier l'intérêt des marchés pour ce secteur. Jusqu'en 2000, cette valeur augmente pour atteindre 2,6 milliards de dollars (265).

Tableau 4 : **Activité commerciale en médecine régénérative et valeur du capital des entreprises de médecine régénérative cotées en bourse de 1994 à 2007.** Adapté de Nerem (265).

| Année   | 1994  | 1997  | 2000  | 2003  | 2007   |
|---|-------|-------|-------|-------|--------|
| Activité totale du secteur privé (millions)   | \$246 | \$453 | \$610 | \$487 | \$2400 |
| Nombre d'unités commerciales  | 40    | 40    | 73    | 89    | 171    |
| Nombre d'employés équivalent temps plein  | 1500  | 2380  | 3080  | 2610  | 6100   |
| Valeur du capital des entreprises de médecine régénérative cotées en bourse (milliards) |       | \$1.7 | \$2.6 | \$0.3 | \$4.7  |

Après 2000, la contraction économique du secteur de l'IT entraîne une diminution de son activité privée totale qui redescend en 2003 à son niveau de 1997. Bien que le nombre d'unités commerciales continue de croître entre 2003 et 2007, le nombre d'employés a diminué. Dans un contexte de contraction économique globale (éclatement de la bulle internet en 2001), ces données peuvent être relativisées. La très forte baisse (-90%) de la valeur du capital des entreprises cotées entre 2000 (2,6 milliards de dollars) et 2003 (0,3 milliard de dollars) semble en revanche décorrélée de l'état global de l'économie américaine et cette baisse de l'intérêt des marchés boursiers pour ces technologies témoigne plus spécifiquement d'une diminution de la vitalité du secteur (265).

En parallèle de cette tendance de baisse de vitalité sur le début des années 2000, le secteur de l'IT subit d'autres mutations parmi lesquelles son internationalisation. En 2000, 80 % de l'activité totale du secteur privé se situait aux États-Unis, ce chiffre était tombé à 54 % en 2003 (265).

---

### I-3. REPRISE COHERENTE

---

Les promesses et les attentes démesurées apparues lors de l'émergence du secteur industriel de l'IT ont participé à son emballement puis à sa crise. Les potentialités des technologies d'IT sont cependant réelles et certaines promesses de traduction à court ou moyen terme de ce potentiel en applications réelles et rentables n'étaient pas irréalistes. Cela

a permis une reprise économique du secteur, également stimulée par l'apparition de nouvelles technologies (cellules souches, bio-impression etc.). Certaines entreprises en faillite ont été rachetées. Pour d'autres, les brevets générés, les compétences et les personnes qui en étaient à l'origine ont été intégrés au sein d'entreprises les ayant rachetés ou recrutées (265).

L'investissement privé est globalement inadapté au financement de projets à fort risque et dont les retours sur investissement se font à très long terme comme c'était le cas pour les start-ups visant à commercialiser des tissus et organes synthétiques complexes. Les entreprises bénéficiant de cette deuxième vague d'investissement se fixent donc des objectifs moins ambitieux, plus réalistes et pouvant générer des profits à court ou moyen terme. Les applications d'IT dans les tissus simples comme la peau et le cartilage avaient déjà atteint une certaine maturité avant la crise du secteur et commençaient à être commercialisées. Leur développement et leur exploitation sont poursuivis par les entreprises les ayant rachetées qui visent à développer des modèles commerciaux viables. Celles-ci diminuent leurs dépenses en recherche et développement pour se concentrer sur leurs produits aboutis et générant des revenus afin de réaliser des économies d'échelle. Elles restreignent leurs objectifs en terme de nombre d'indications visées et optimisent les procédés de fabrication et de commercialisation pour en diminuer les coûts afin d'atteindre la rentabilité (262).

Pour les nouvelles technologies développées, les indications pour des maladies orphelines sont souvent ciblées car elles présentent des facilités réglementaires et des perspectives de remboursement plus importantes. Des produits d'IT à visée non clinique sont également développés dans le domaine des tests de cosmétiques et de produits pharmaceutiques par exemple. Des produits cosmétiques pour lesquels la réglementation est plus souple sont également développés. Ces entreprises n'ont pas renoncé à certains des idéaux initiaux de l'IT mais essaient désormais de les atteindre sur le long terme en ne se basant plus exclusivement sur des levées de fond mais également sur les revenus issus de produits plus simples et rentables à court terme. Ces produits permettent également aux entreprises d'acquérir pas à pas les compétences et les savoir-faire nécessaires au développement de produits plus complexes. Cette reprise est également marquée par l'internationalisation du secteur. Les entreprises tissent des partenariats internationaux afin d'obtenir des financements, d'acquérir des connaissances, d'appivoiser les contextes réglementaires des différents pays et, *in fine*, de conquérir de nouveaux marchés (262,267).

Les données du tableau 4 attestent de cette reprise entre 2003 et 2007. L'activité totale du secteur privé a grimpé en flèche pour atteindre 2,4 milliards de dollars en 2007. Cette même année, il y avait au total 167 entreprises/unités commerciales privées pouvant être caractérisées comme acteurs de l'ingénierie tissulaire et de la médecine régénérative. Elles employaient plus de 6000 personnes (équivalent temps plein) dont la moitié l'était dans la cinquantaine d'entreprises rentables. Autre élément attestant de cette reprise économique, la valeur du capital des entreprises cotées en bourse a bondit, passant de 300 millions de dollars en 2003 à 4,7 milliards en 2007.

Ces chiffres doivent toutefois être nuancés car ils sont beaucoup moins spécifiques du secteur de l'IT qu'auparavant. Sur les 2,4 milliards de dollars d'activité du secteur privé en 2007, 1,3 milliard concernaient la vente de produits (et non de service). Dans ces 1,3 milliard, les ventes réelles de produits à base de cellules pèsent entre 100 et 200 millions de dollars et celles concernant des produits d'IT semblent s'élever à 90 millions de dollars. Le reste provient des cellules souches de cordon ombilical mises en banque, du produit INFUSE® de Medtronic et de biomatériaux régénératifs dont la sous-muqueuse SIS® commercialisée par Depuy et Cook Biotech (265).

L'activité du secteur privé de la médecine régénérative au stade du développement représentait 864 millions de dollars en 2007. Cette activité peut être divisée en quatre catégories distinctes selon le type de technologies développées : biomatériaux interactifs, 84 millions de dollars ; cellules et biomatériaux, 218 millions de dollars ; cellules souches, 507 millions de dollars ; et autres, 55 millions de dollars. Ces chiffres attestent de l'intérêt croissant pour le domaine des cellules souches qui avait clairement attiré le plus de fonds du secteur privé alors que la révolution des cellules souches iPSCs n'avait pas encore eu lieu (265).

En parallèle de cette reprise de l'activité aux USA, des entreprises d'IT se développent ou poursuivent, après restructuration, leur développement à l'étranger. C'est particulièrement vrai au Japon où la découverte des cellules iPSCs en 2006 par Yamanaka (29) et le prix Nobel qui a suivi en 2012 (66) ont permis d'impulser des réformes de l'enregistrement des produits de médecine régénérative, ont augmenté leur financement et ont modifié la réglementation jusqu'alors très restrictive sur la recherche en cellules souches dans le pays. Au Japon, les entreprises d'IT sont issues de grandes entreprises pharmaceutiques souhaitant se diversifier. La stratégie était à l'origine d'importer des technologies éprouvées issues de l'étranger et de

les commercialiser sur le sol japonais. Les entreprises d'IT japonaises investirent par la suite dans l'innovation et la conception de produits originaux. Des entreprises d'IT se sont également développées au Royaume-Uni où elles ont pu bénéficier dès leur début d'une réglementation souple permettant la recherche sur les cellules souches embryonnaires, de nombreux financements publics et privés, de facilités réglementaires et de liens étroits avec la recherche et les investisseurs américains (262).

La stabilité du cadre réglementaire dans lequel s'inscrivent les produits d'IT est importante à l'essor du secteur, de même que leur remboursement. En témoigne l'impact de l'évolution de la réglementation en 2013 et 2014 aux USA sur les entreprises précédemment citées commercialisant des substituts de peau. En 2013, l'activité de surveillance et d'évaluation de ces produits est transférée d'un centre de la FDA (Center for Devices and Radiological Health CDRH) à un autre (Center for Biologics Evaluation and Research CBER) entraînant une modification des critères d'évaluation continue de ces produits et de leur fabrication ainsi qu'une coûteuse mise en conformité des entreprises les commercialisant (268,269). En 2012 puis 2014, une évolution des règles de remboursement sur les indications de cicatrisation de plaies (baisse des remboursements en 2014) provoquent une diminution des ventes des substituts de peau issus d'IT, dont la majeure partie, autorisée à la vente sur cette indication et fortement dépendante des remboursements, est désormais partiellement déremboursée (267,270).

Heureusement pour le secteur, les années 2010 sont plutôt marquées par l'apparition d'une réglementation plus claire et adaptée au développement des entreprises d'IT. L'UE est pionnière en la matière et publie en 2007 une réglementation spécifique et détaillée pour les entreprises du secteur en créant le nouveau statut de « médicaments de thérapie innovante » (ATMP en anglais et MTI en français), regroupant les thérapies géniques, cellulaires et d'ingénierie tissulaire (271). Ce cadre harmonisé mis en place pour les pays de l'UE a été fourni en anticipation de l'essor annoncée des entreprises du secteur sur le continent et alors qu'elles y étaient peu présentes. En 2016 aux USA, une nouvelle réglementation spécifique aux produits de médecine régénérative a fourni un cadre plus adapté et souple pour le développement de ceux-ci avec le statut facilitateur de « Thérapie Avancée de Médecine Régénérative » (RMAT) (272). Cette nouvelle réglementation américaine est venue encourager le développement de ces produits qui étaient jusqu'aux années 1996-2001 globalement déréglementés puis

inadéquatement réglementés sous des statuts génériques ne prenant pas en compte leurs particularités en terme de composition et de développement (269,273).

En résumé, l'émergence du secteur industriel de l'IT a globalement suivi trois phases qui peuvent être résumées par la courbe de Gartner figure 38. La courbe de Gartner est une représentation de la variation de visibilité et d'intérêt pour une technologie émergente.

Elle s'applique à de nombreuses technologies émergentes et, selon Ronfard et al. (274), s'est appliquée au secteur des anticorps

monoclonaux thérapeutiques et semble s'appliquer également à l'IT. Le groupe de conseil Gartner, qui est à l'origine de cette courbe et qui propose de placer chaque année des technologies émergentes sur celle-ci, situait en 2019 l'IT sur la phase très précoce de la courbe, bien avant le « pic des attentes exagérées » (275). Les informations de ce chapitre semblent pourtant indiquer que ce pic est passé et que l'IT est actuellement sur la « rampe d'éclaircissement ». Il est difficile de savoir où en est réellement le secteur de l'IT par rapport à cette courbe. Il est possible que, bien qu'intéressante, cette courbe générique ne soit pas adaptée pour décrire l'évolution du secteur de l'IT et que celui-ci gagnerait à être découpé en sous-secteurs (comme celui de l'IT de peau) pour être mieux décrit tant les applications sont variées et les potentialités nombreuses. Quoi qu'il en soit, après avoir étudié les phases d'émergence du secteur de l'IT, il est intéressant de se pencher sur sa situation actuelle et sur celle de ses applications cliniques. Dans les prochains chapitres, je présenterai l'environnement réglementaire des produits d'IT puis détaillerai les produits actuellement disponibles et en phase avancée de développement. Cela permettra d'évaluer le chemin parcouru et d'envisager, dans un dernier temps, celui qui reste à parcourir.

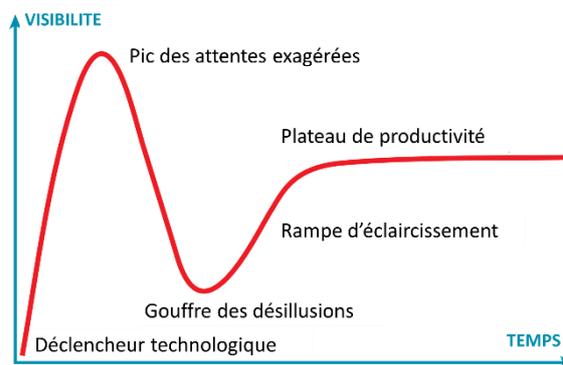


Figure 38 : **Courbe de Gartner ou "cycle du hype" décrivant l'évolution de l'intérêt pour une nouvelle technologie.**

*Adaptée de [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gartner\\_Hype\\_Cycle.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gartner_Hype_Cycle.svg)*

## II- CADRE REGLEMENTAIRE

---

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les applications cliniques industrialisables de l'ingénierie tissulaire ne sont pas des médicaments comme les autres de par leur composition vivante et leur fabrication complexe. Le cadre réglementaire classique a donc dû s'adapter dans les différents pays pour permettre de garantir la qualité, la sécurité et l'efficacité de ces thérapies tout en prenant en compte leurs spécificités.

---

### II-1. EN FRANCE

---

La France faisant partie de l'Union Européenne, je présenterai plus en détails la réglementation des produits d'IT qui s'applique à cet espace économique. Les médicaments issus de l'IT ne correspondent pas forcément une classe à part entière de médicaments dans la législation de tous les pays. L'intérêt de la réglementation européenne en matière d'IT et plus largement de thérapies innovantes est d'être l'une des premières à émerger et à donner une définition claire des médicaments classés « issus de l'ingénierie tissulaire » et pour lesquels s'applique une réglementation spécifique.

#### II-1.1. DEFINITION

---

Au sein de l'UE, et comme présenté précédemment, les médicaments issus de l'IT font partie de ce que l'EMA (European Medicine Agency) appelle les « ATMP » (Advanced Therapy Medicinal Products) ce qui donne, après retranscription dans le droit Français, les « Médicaments de Thérapie Innovante » (MTI) (276).

On trouve quatre classes de médicaments au sein des MTI : les médicaments de thérapie génique ; les médicaments de thérapie cellulaire somatique ; les produits issus de l'ingénierie tissulaire ; les médicaments combinés de thérapie innovante

On peut retrouver des produits issus de l'IT dans les deux dernières classes ; la dernière correspondant aux médicaments résultant de la combinaison d'un dispositif médical avec des technologies appartenant à l'une des 3 premières classes.

La définition d'un produit issu de l'ingénierie tissulaire est donnée dans l'article 2 du règlement européen (CE) n°1394/2007 (271) :

*« Produit issu de l'ingénierie tissulaire »: un produit:*

- *qui contient des cellules ou tissus issus de l'ingénierie cellulaire ou tissulaire, ou en est constitué, et*
- *qui est présenté comme possédant des propriétés lui permettant de régénérer, réparer ou remplacer un tissu humain, ou est utilisé chez l'être humain ou administré à celui-ci dans ce but.*

*Un produit issu de l'ingénierie tissulaire peut contenir des cellules ou des tissus d'origine humaine ou d'origine animale, ou les deux. Les cellules ou tissus peuvent être viables ou non viables. Il peut également contenir des substances supplémentaires, telles que des produits cellulaires, des biomolécules, des biomatériaux, des substances chimiques, des supports ou des matrices.*

*Les produits contenant ou consistant exclusivement en des cellules et/ou des tissus humains ou animaux non viables, qui ne comprennent pas de cellule ou tissu viable et dont l'action principale n'est pas obtenue par des moyens pharmacologiques, immunologiques ou métaboliques, sont exclus de la présente définition.*

*Sont considérés comme « issus de l'ingénierie cellulaire ou tissulaire » les cellules ou tissus qui répondent à au moins l'une des conditions suivantes :*

- *Les cellules ou tissus ont été soumis à une manipulation substantielle, de façon à obtenir des caractéristiques biologiques, des fonctions physiologiques ou des propriétés structurelles utiles à la régénération, à la réparation ou au remplacement recherchés. Les manipulations énumérées à l'annexe I, en particulier, ne sont pas considérées comme des manipulations substantielles,*
- *Les cellules ou les tissus ne sont pas destinés à être utilisés pour la (les) même(s) fonction(s) essentielle(s) chez le receveur et chez le donneur.*

*[...] Quand un produit contient des cellules ou tissus viables, l'action pharmacologique, immunologique ou métabolique de ces cellules ou tissus doit être considérée comme le mode d'action principal du produit.*

*Un médicament de thérapie innovante contenant à la fois des cellules ou tissus autologues (provenant du patient lui-même) et des cellules ou tissus allogéniques (provenant d'un autre être humain) est considéré comme étant à usage allogénique.*

*Un produit qui peut répondre à la fois à la définition de « produit issu de l'ingénierie tissulaire » et à celle de « médicament de thérapie cellulaire somatique » est considéré comme un produit issu de l'ingénierie tissulaire.*

*Un produit susceptible de relever de la définition de « médicament de thérapie cellulaire somatique » ou de « produit issu de l'ingénierie tissulaire », et de « médicament de thérapie génique », est considéré comme médicament de thérapie génique. » (271)*

Il est également précisé dans l'annexe I qu' « une succession de modifications, chacune non substantielle peut conduire à un procédé qui modifie les propriétés des cellules / tissus et constituer au final une modification substantielle » (271).

Il peut être intéressant d'explorer la définition d'un « médicament de thérapie cellulaire somatique » car celle-ci ressemble à celle des « produits issus de l'ingénierie tissulaire » sur plusieurs aspects, au point que le législateur envisage qu'un produit puisse correspondre aux deux définitions (auquel cas il est considéré comme « produit issu de l'ingénierie tissulaire »).

Cette définition est donnée dans la directive 2009/120/CE modifiant la directive 2001/83/CE :

*« Par médicament de thérapie cellulaire somatique, on entend un médicament biologique qui présente les caractéristiques suivantes :*

- a) contient ou consiste en des cellules ou des tissus qui ont fait l'objet d'une manipulation substantielle de façon à modifier leurs caractéristiques biologiques, leurs fonctions physiologiques ou leurs propriétés structurelles par rapport à l'usage clinique prévu, ou des cellules ou tissus qui ne sont pas destinés à être utilisés pour la ou les mêmes fonctions essentielles chez le receveur et le donneur;*

b) *est présenté comme possédant des propriétés permettant de traiter, de prévenir ou de diagnostiquer une maladie à travers l'action métabolique, immunologique ou pharmacologique de ses cellules ou tissus, ou est utilisé chez une personne ou administré à une personne dans une telle perspective.*

*Pour les besoins du point a), les manipulations visées à l'annexe I du règlement CE n° 1394/2007, en particulier, ne sont pas considérées comme des manipulations substantielles.» (277)*

La principale différence entre ces deux classes de médicaments tient dans la finalité de leur produits. Les médicaments de thérapie cellulaire somatique doivent permettre de traiter, prévenir ou de diagnostiquer une maladie à travers l'action métabolique, immunologique ou pharmacologique de ses cellules ou tissus. Cette finalité se rapproche beaucoup de celle des médicaments traditionnels telle qu'elle est décrite dans l'article L.5111-1 du code de la Santé publique, la citant même en partie (278). Ces produits peuvent alors être considérés comme des « cellules médicaments ». Les produits issus de l'ingénierie tissulaire doivent quant à eux permettre de régénérer, réparer ou remplacer un tissu humain. Il y a ici la notion d'obtenir à nouveau un tissu dans l'état dans lequel il a été par le passé ; avant une lésion par exemple. De plus, la présence de cellules souches (non somatiques) dans un produit semblent l'exclure de la classe des médicaments de thérapie cellulaire somatique bien que cela ne soit pas explicité dans leur définition et le faire tomber dans celle des médicaments issus de l'IT.

Les définitions de ces deux classes n'ont pas été rédigées en même temps et ne sont pas issues des mêmes textes de loi, c'est pourquoi leur rédaction ne suit pas la même trame. Hormis la finalité et le mécanisme d'action qui sont différents, les caractéristiques nécessaires pour appartenir à la classe des médicaments de thérapie cellulaire somatique sont en fait les mêmes que celles données dans la définition des produits issus de l'IT pour « *les cellules ou tissus issus de l'ingénierie cellulaire ou tissulaire* ». Pour appartenir à l'une de ces deux classes, les cellules ou tissus du produit doivent i) ne pas être destinés à être utilisés pour la (les) même(s) fonction(s) essentielle(s) chez le receveur et chez le donneur ; ii) avoir fait l'objet de manipulations substantielles ; une seule des deux conditions étant suffisante.

Pour les médicaments de thérapie cellulaire somatique, aucune information n'est donnée sur la possibilité de présence de « *substances supplémentaires* », la nécessité ou non de viabilité des cellules ou tissus et leur origine humaine ou animale.

Aucune liste de manipulation substantielle n'est fournie par le législateur. Une liste non exhaustive de manipulations non substantielles est toutefois fournie. Parmi celles-ci on peut citer le découpage, broyage, façonnage, centrifugation, trempage dans des solutions antibiotiques ou antimicrobiennes ; la stérilisation, l'irradiation, la séparation, concentration ou purification de cellules ; la filtration, lyophilisation, congélation, cryoconservation, vitrification (271). La culture de cellules ou tissus *ex vivo* semble pouvoir être considérée comme une manipulation substantielle en cela qu'elle est susceptible de modifier « *leurs caractéristiques biologiques, leurs fonctions physiologiques ou leurs propriétés structurelles* », via, au cours des divisions cellulaires, des phénomènes de différenciation cellulaire *in vivo*, de sénescence etc.

## II-1.2. AUTRES PRODUITS TISSULAIRES

---

Si, pour un produit, aucune des deux conditions précédentes ( i) et ii) ) n'est présente qu'il possède des propriétés lui permettant de régénérer, réparer ou remplacer un tissu humain, ce tissu tombe dans la classe des « tissus ou organes d'origine humaine ou animale » (THA). Ces THA sont régis au niveau national par l'article L. 1243-1 du code de santé publique, de manière plus souple que les MTI (279). Ils sont autorisés par l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) après évaluation des données qualité, non clinique et clinique et validation des indications thérapeutiques revendiquées. Ils ne nécessitent pas d'autorisation de mise sur le marché (AMM) mais d'une autorisation de "*procédés de préparation et de conservation*". Ils sont produits selon les bonnes pratiques relatives à la préparation, à la conservation, au transport, à la distribution et à la cession des tissus, des cellules et des préparations de thérapie cellulaire dans des établissements autorisés par l'ANSM et relèvent de la biovigilance.

Dans le cas où un produit issu de l'IT répond à la définition d'un MTI mais qu'il est préparé de façon ponctuelle à l'attention d'un malade déterminé, il s'agit d'un médicament de thérapie innovante préparé ponctuellement (MTI-PP). Pour les produits d'IT, il peut s'agir des « MTI-PP issus de l'ingénierie tissulaire ou cellulaire » ou des « MTI-PP combinés de thérapie innovante » lorsqu'ils sont combinés à un dispositif médical. Ce statut correspond à une retranscription dans le droit national au 17° de l'article L.5121-1 (280) d'une « exemption hospitalière » prévue par l'article 28 du règlement CE 1394/2007 (271). Il favorise le développement académique de MTI et l'accès à ces traitements sans passer par la procédure centralisée européenne pour des

patients présentant par exemple des maladies rares et dont le caractère ponctuel et personnalisé du traitement ne permet pas le recueil de données suffisantes à l'obtention d'une AMM. Ces MTI-PP sont du ressort de chaque état, sont prescrits et administrés sous la responsabilité d'un médecin, doivent être produits selon les BPF des MTI par des établissements pharmaceutiques privés ou publiques autorisés par l'ANSM ou par des établissements non pharmaceutiques tels que les unités de thérapie cellulaire, génique et tissulaire hospitalières autorisées par l'ANSM. Pour ces dernières, cela implique une lourde mise aux normes. Les MTI-PP ne peuvent pas être exportés (276).

### II-1.3. SPECIFICITES DE L'ENCADREMENT DES MTI

---

Pour ce qui est des produits issus de l'IT entrant dans le cadre des MTI classiques, leur fabrication doit être réalisée, selon les BPF des MTI, par des établissements pharmaceutiques privés autorisés par l'ANSM ou par des établissements pharmaceutiques créés au sein d'organismes à but non lucratif ou d'établissements publics autres que les établissements de santé autorisés par l'ANSM. Les MTI expérimentaux peuvent, à titre dérogatoire et dans le cadre de la recherche biomédicale, être fabriqués, importés, exportés, distribués et exploités par des établissements non pharmaceutiques disposant d'une autorisation de l'ANSM (276).

Les MTI sont complexes car ils dérivent de matériaux biologiques, ils ont des modes d'action spécifiques, les lots produits sont généralement de petite taille et les techniques évoluent vite (cf chapitre II de la partie I). Une approche et des mesures adaptées sont donc proposées pour faciliter leur développement. En raison de leur capacité voire de leur fonction à rester au long terme dans le corps humain et du fait que le matériel vivant qui les compose est amené à se développer et à interagir avec les autres éléments constitutifs du corps humain, la robustesse des preuves de sécurité des MTI semble inférieure à celle des thérapies classiques, d'autant plus que nous disposons de peu de recul sur ces thérapies. Dans ce contexte d'incertitude scientifique, il est proposé aux entreprises développant des MTI d'utiliser une approche fondée sur le risque en vue de déterminer l'étendue des données cliniques, non cliniques et de qualité à inclure dans leur demande d'AMM. Cette approche et les différentes étapes de l'analyse du risque qui la compose sont conçue et appliquée en conformité avec le bon usage du principe de précaution tel qu'il a été défini dans le droit primaire (de l'UE) puis appliqué (281). Elle doit permettre aux entreprises de développer leurs produits en conformité avec les exigences de

sécurité, d'efficacité et de qualité tout en tenant compte des spécificités de chaque produit (281,282). L'EMA édite également des guidelines scientifiques apportant aux entreprises des bases de réflexion pour leur permettre de documenter et de répondre aux exigences de démonstration nécessaires à l'obtention d'une AMM.

Cette démarche implique une consultation des agences réglementaires précoce et à chaque étape du développement. Pour ce faire, l'ANSM propose, en France, le dispositif accompagnement innovation et avis scientifique. Au niveau européen, l'EMA a mis en place l'« Innovation Task Force », la procédure d'Avis Scientifique et le programme PRIME qui sont autant de procédures de conseil et d'échanges favorisant les interactions précoces EMA-entreprises. De plus, l'EMA propose aux PME de bénéficier d'une certification de leurs données précoces ainsi que d'une assistance juridique. Enfin les montants des redevances dues par ces PME à l'EMA pour ses avis scientifiques sont réduits (283).

Les études non-cliniques et toxicologiques des MTI doivent se faire conformément aux Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL) dans un laboratoire agréé BPL. Les essais cliniques doivent être réalisés dans le respect des Bonnes Pratiques Cliniques (BPC). En accord avec l'approche basée sur le risque, le suivi de l'efficacité et de la sécurité des MTI, autrement dit leur pharmacovigilance, est adaptée et renforcée selon le plan de gestion des risques spécifique à chaque produit. La procédure d'AMM des MTI est centralisée mais il est prévu que cette autorisation ne porte pas atteinte aux restrictions éventuelles prises par les États membres concernant l'utilisation de certains types de cellules humaines ou animales pour des raisons éthiques. Un MTI autorisé au sein de l'UE peut donc être interdit de commercialisation au sein d'un ou plusieurs États membres (284).

Étant donné les spécificités des MTI, l'EMA a mis en place, pour évaluer ces thérapies et conseiller leur fabricant, un nouveau comité d'évaluation présentant une expertise spécifique des MTI. Ce Comité pour les Thérapie Avancées (CAT) a pour mission de classer les MTI, de certifier les entreprises les développant et de fournir une évaluation scientifique assortie d'un avis au Comité pour les Produits Médicaux à Usage Humain (CHMP) qui évalue et statue sur les demandes d'AMM. Le CHMP émet un avis positif ou négatif à la Commission Européenne qui accepte ou non cet avis et, en conséquence, accorde ou non une AMM au produit. Le détail des phases de la procédure de demande d'AMM à l'EMA ainsi que les délais de ces phases sont présentés dans la figure 39. Si l'AMM est accordée, l'examen de la demande est publié dans le

rapport public européen d'évaluation (EPAR). Si l'AMM n'est pas accordée, le demandeur peut faire appel de cette décision et le CHMP émet un second avis à la Commission Européenne. Si le produit ne reçoit toujours pas d'AMM à l'issue de cet appel, l'examen de l'AMM refusée est publié en tant qu' « EPAR de refus ». Trois types d'AMM peuvent être accordées pour un MTI dans une procédure centralisée, selon l'étendue des données cliniques disponibles : (i) une AMM standard, lorsque des données cliniques complètes peuvent être fournies ; (ii) une AMM conditionnelle, lorsque des données cliniques complètes ne peuvent être obtenues. Dans ce cas, l'EMA peut demander des études post-autorisation supplémentaires. (iii) Une AMM de circonstance exceptionnelle, lorsque des données cliniques complètes ne peuvent être obtenues à temps. Une AMM standard n'est valable que pour 5 ans. Par la suite, et selon les données de pharmacovigilance, la Commission Européenne peut renouveler l'autorisation indéfiniment ou décider de ne pas la renouveler (276,284).

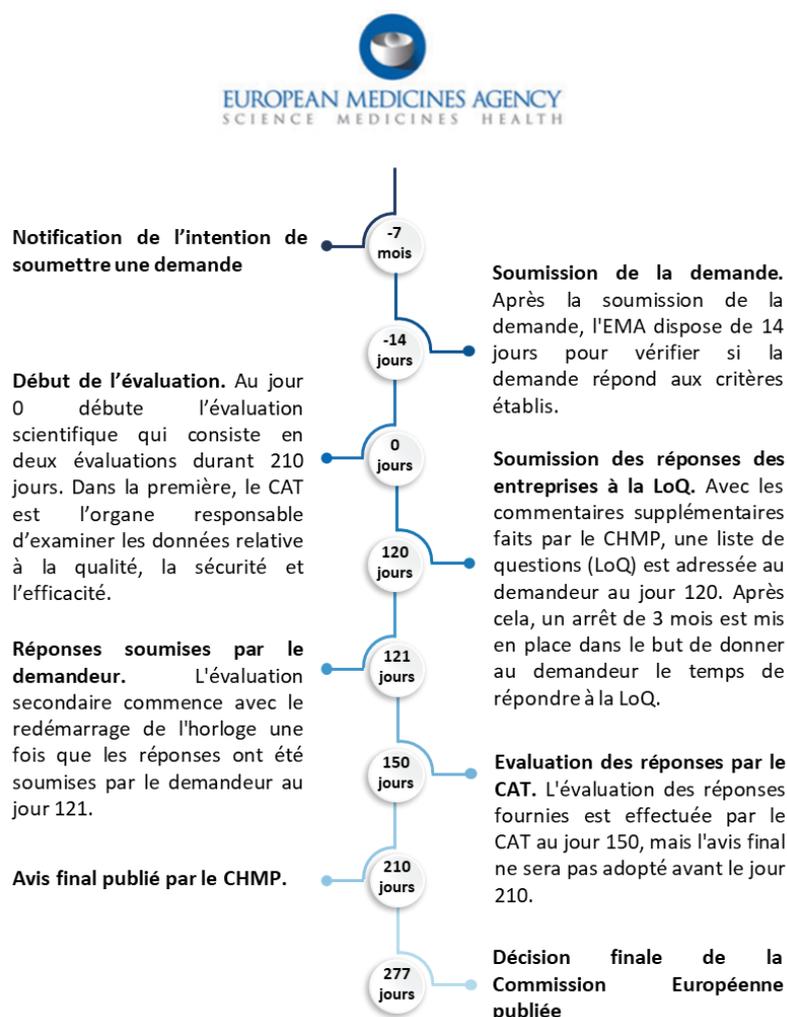


Figure 39 : **Procédure centralisée d'autorisation de mise sur le marché pour les MTI dans l'Union Européenne.** LoQ : Liste de Questions ; CAT : Comité pour les Thérapies Avancées ; CHMP : Comité pour les Produits Médicaux à usage Humain ; CE : Commission Européenne ; EMA : Agence Européenne du Médicament. *Adaptée de Oberweis et al. (284)*

Une approche adaptative a été choisie pour encadrer les MTI et des consultations précoces de l'EMA par les entreprises sont encouragées afin de les aider à réussir leur développement, dans un contexte réglementaire qui peut sembler flou en raison du faible nombre de précédents et des caractéristiques variable des thérapies de cette classe. Le caractère fortement innovant des médicaments issus de l'IT, avec par exemple des techniques de culture cellulaire, des matériaux et des procédés de fabrication en constante évolution, rend encore plus difficile l'encadrement de ces thérapies et la frontière avec les autres catégories peut parfois sembler mince, en particulier avec celle des dispositifs médicaux. Les réglementations actuelles ne prévoient pas tous les développements technologiques possibles et les entreprises innovantes devront avancer sans certitudes et en collaboration avec les régulateurs qui devront également faire des choix et préciser les règles ou leurs interprétations. Par exemple, les guidelines permettant de tester la biocompatibilité d'un biomatériau et la définition qu'elles donnent de cette biocompatibilité sont-elles toujours adaptées et cohérentes lorsque le biomatériau en question est destiné à avoir une action métabolique favorisant la régénération, à répondre à des stimuli externes, à avoir un mode d'action, etc. (285,286) ?

#### **II-1.4. PRODUITS ENTRANT DANS LA FABRICATION ET/OU LA COMPOSITION DES MEDICAMENTS ISSUS DE L'INGENIERIE TISSULAIRE**

---

La régulation des produits accessoires/annexes ou additionnels à la fabrication des médicaments issus de l'IT est également complexe et ne fait pas encore l'objet d'une harmonisation et d'une clarté suffisante. En Europe, les produits annexes sont désormais du ressort de la réglementation européenne et sont appelées « matières premières » et « matières de départ ». La directive 2009/120/CE de la Commission Européenne modifiant la directive 2001/83/CE en précise les définitions et les exigences relatives à leur utilisation (277). Il est spécifié que les procédures assurant la traçabilité à long terme de ces matières premières et de départ doivent être mise en place par les fabricants des médicaments issus de l'IT.

Les milieux de cultures et autres substances entrant en contact avec les produits au cours de leur fabrication mais ne faisant pas partie du produit final sont appelées « matières premières » et doivent répondre à certains critères de qualité et de sécurité qui ne sont pas les mêmes que ceux retrouvés en recherche. Le type de matières premières autorisées et interdites peut être trouvé dans les différentes guidelines relatives à la fabrication de ces produits, en particulier

dans les Bonnes Pratiques de Fabrication. Le niveau de qualité que doivent présenter ces matières premières est plus problématique, car si les exigences sur les différents critères de qualité sont établies, les mentions que les fabricants de matières premières associent à celles-ci ne font pas l'objet d'harmonisation et peuvent prêter à confusion. Une matière première peut par exemple porter la mention « GMP » et cela peut vouloir dire selon les fabricants qu'elle a été produite selon les BPF ou qu'elle est compatible dans son utilisation avec les BPF. Il est ainsi possible de trouver des matières premières étiquetées à la fois « GMP » et « research use only ». Le choix des bonnes matières premières est essentiel et doit être fait le plus tôt possible, un changement tardif pouvant coûter énormément de temps et d'argent. Là encore, la consultation précoce des régulateurs et des fabricants de matières premières est essentielle (287).

Pour ce qui est des substances additionnelles (supports, matrices, biomatériaux, biomolécules, etc.), qui sont combinées aux substances actives (cellules en général) et qui font partie du produit final, elles sont considérées comme des « matières de départ », qu'elles soient d'origine biologique ou non. Elles devront faire l'objet d'une analyse de risque poussée et de justifications appropriées de leur qualité, sécurité et efficacité et des tests mis en place pour s'en assurer. La directive 2009/120/CE précise par ailleurs que « *les demandes d'autorisation concernant un médicament de thérapie innovante contenant des dispositifs médicaux, des biomatériaux, des supports ou des matrices incluent une description des caractéristiques physiques et du fonctionnement dudit produit, ainsi qu'une description de ses méthodes de conception, conformément à l'annexe I de la directive 2001/83/CE* » (277). Dans cette approche, il peut être avantageux d'utiliser un biomatériau qui est déjà utilisé dans un dispositif médical implantable autorisé (marquage CE) ou un autre médicament issu de l'IT et dont le profil d'interaction avec l'hôte est comparable à celui prévu dans le médicament développé. De même pour un facteur de croissance déjà autorisé dans une autre thérapie (287–289).

---

## II-2. HORS DE L'UNION EUROPEENNE

---

Hors de l'Union Européenne, la réglementation des produits issus de l'IT est différente. Il n'existe pas toujours de définition juridique spécifique pour ce type de thérapies et elles tombent alors dans des classes génériques de médicaments biologiques (Canada, Australie) ou de thérapie cellulaire (Japon). Aux USA, ces produits n'appartiennent pas à une classe

spécifique non plus et ont été à l'origine plutôt considérés et réglementés comme des dispositifs médicaux avant d'être finalement considérés comme des produits biologiques. Aucune définition ou classe juridique spécifique n'existe pour les produits issus de l'IT dans ces pays mais leur particularité est en revanche souvent reconnue à travers des mesures spécifiques et incitatives encadrant leur développement. Ainsi, aux USA, la désignation de « Thérapie avancée de Médecine Régénérative » (RMAT) a été créée en 2016 pour que les thérapies remplissant certains critères puissent bénéficier d'une approbation accélérée et aidée. Parmi ces critères, les thérapies doivent correspondre à la définition créée pour l'occasion de « thérapie de médecine régénérative ». Il est également défini que les *« thérapies de médecine régénérative incluent les thérapie cellulaire, produits d'ingénierie tissulaire thérapeutique, produits à base de cellules et de tissus humains, et produits combinés utilisant ces thérapies ou ces produits »* (272). Cependant, aucune définition d'un produit d'ingénierie tissulaire thérapeutique n'est donné.

Il existe de nombreuses autres différences dans la réglementation des produits issus de l'IT selon les différentes juridictions. Les principaux éléments réglementaires qui s'appliquent à ces produits dans les principaux pays les commercialisant ou les développant sont résumés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Aperçu des principaux éléments réglementaires applicables aux produits issus de l'ingénierie tissulaire pour les différentes juridictions. Adapté de Oberweis et al. (284).

| Jurisdiction        | Organe de régulation                    | Classification des médicaments issus de l'IT   | Règlementation applicable  | Type d'AMM  | eCTD        | Comité consultatif                                  | Comité prenant la décision  | Procédure (jours) | Ré-évaluation                                       | Types de réponses aux AMM  |
|---------------------|---|--|--|---|-------------|---|---|-------------------|---|--|
| <b>UE</b>           | Agence Européenne du Médicament (EMA)   | Médicaments de Thérapie Innovante (MTI/ATMP) (médicaments issus de l'IT ou médicaments de thérapie innovante combinés à un DM)   | Règlement Commission Européenne n°1394/2007  | Demande d'AMM pour un MTI   | Obligatoire | Comité pour les thérapies avancées (CAT)            | Comité pour les produits médicaux à usage humain (CHMP)   | 277               | Au bout de 5 ans                                    | Rapport d'évaluation publique européenne (+) ; Rapport de refus à l'évaluation publique européenne (-)                   |
| <b>USA</b>          | The Food and Drug Administration (FDA)  | Cellules et tissus humains et produits à base de cellules et de tissus humains (351 HCT/PS) ou produits combinés (pouvant être considérés ou non comme un DM selon le mode d'action principal) | "The Public Health Services Act section 351" et "21 Code of Federal Regulations 1271"                | « Biologic License Application » ou « Pre-Market Approval » (si considéré comme DM) | Obligatoire | "Office of Combination Products" (OCP)              | "Office of Tissues and Advanced Therapies" (OTAT) du "Center for Biologics Evaluation and Research" (CBER) ou "Center for Devices and Radiological Health" (CDRH) | 365               | N/A   | Lettre d'approbation (+)<br>Refus de classer (-)   |
| <b>Canada</b>       | "Health Canada"                         | Médicaments Biologiques  | "Food and Drugs Regulations"   | "New drug submission"   | Obligatoire | Pas de comité                                       | "Biologics and Genetic Therapies Directorate"   | 300               | N/A   | Avis de conformité (+) ;<br>Avis de déficience (-) ;<br>Avis de non conformité (-)                                       |
| <b>Australie</b>    | "The Therapeutic Goods Administration"  | Biologiques (classe 2, 3 or 4)   | "Australian Register of Therapeutic Goods and The Australian Government Therapeutics Goods Act 1989" | New Biological Entity"  | Optionnel   | Pas de comité                                       | "The Therapeutic Goods Administration"  | 290               | N/A   | Avis de conformité (+) ;<br>Avis de déficience (-) ;<br>Avis de non conformité (-)                                       |
| <b>Japon</b>        | "Ministry of Health, Labour and Wealth" | Produits de médecine régénérative  | "Pharmaceuticals and Medical Devices Act"  | "Japan New Drug Application"  | Obligatoire | "Office of Cellular and Tissue-based products"      | "Ministry of Health, Labour and Wealth"   | N/A               | Tous les 7 ans (pour autorisations conditionnelles) | Approbation de la demande de nouveau médicament Japonais (+) ;<br>Refus de la demande de nouveau médicament Japonais (-) |
| <b>Corée du Sud</b> | "Ministry of Food and Drug Safety"      | Produits de thérapie cellulaire (Biologique)   | "Pharmaceutical Affairs Act"   | "New Drug Application"  | Obligatoire | "Central Pharmaceutical Affairs Advisory Committee" | "Biopharmaceuticals and Herbal Medicine Bureau"   | 115               | Tous les 5 ans                                      | Approbation de la demande de nouveau médicament (+) ;<br>Refus de la demande de nouveau médicament (-)                   |

### III- MEDICAMENTS ISSUS DE L'INGENIERIE TISSULAIRE

---

#### III-1. PRODUITS COMMERCIALISES

---

Afin de pouvoir apprécier l'état actuel du secteur des applications cliniques de l'IT, il est indispensable de dresser une liste des produits issus de l'IT actuellement commercialisés dans le monde (Tableau 6). Pour dresser cette liste et sélectionner les produits, et étant donné que les définitions pour de tels produits peuvent diverger selon les juridictions (Tableau 5), j'ai choisi de me baser sur la définition applicable au sein de l'Union Européenne et présentée dans le chapitre précédant.

Certains produits pouvant apparaître comme issus de l'IT ont ainsi été écartés de cette liste. Ainsi, les produits contenant des cellules n'ayant pas subi de manipulation substantielle et qui, en cas de produits allogéniques, sont destinés à être utilisés pour la (les) même(s) fonction(s) essentielle(s) chez le receveur et chez le donneur ne figurent pas dans cette liste. Des produits entrant dans le champ des dispositifs médicaux ont également été écartés. C'est par exemple le cas du produit Recell® de Avita Medical qui est un DM ayant reçu le marquage CE et l'approbation de la FDA. Ce DM sert à préparer des produits cellulaires autologues au lit du patient dans des indications de régénération de la peau chez les brûlés (290).

Il existe également dans certains pays, des produits acellulaires servant à la régénération de tissus pouvant être considérés comme des médicaments issus de l'IT selon la définition applicable en UE. C'est par exemple le cas du produit TransCyte® d'Organogenesis Inc qui est un substitut cutané temporaire autorisé aux USA dans des indications de régénération de la peau chez les brûlés. Ce produit est composé d'une maille de nylon enduite de collagène dermique porcin et liée à une membrane en silicone. Des fibroblastes allogéniques humains d'origine néonatales sont cultivés sur la membrane en biomatériaux et y sécrètent du collagène dermique humain, des protéines matricielles et des facteurs de croissance. Après la congélation, il ne reste aucune activité métabolique cellulaire et aucune cellule viable mais la matrice tissulaire et les facteurs de croissance sécrétés restent intacts. Ce produit ne contient pas de cellules ou tissus viables mais possède des propriétés lui permettant de régénérer la peau via des moyens pharmacologiques et métaboliques et est administré dans ce but (291). Ainsi il pourrait éventuellement être considéré comme un médicament issu de l'IT. Toutefois,

dans la mesure où aucun produit acellulaire de ce type n'a pour l'heure été approuvé par l'EMA comme médicament issu de l'IT et étant donné le grand nombre de produits de ce type, j'ai choisi de ne pas les inclure dans la liste du tableau 6 des médicaments issus de l'IT approuvés dans le monde.

Des produits issus de l'IT étaient commercialisés dans certains pays européens avant l'entrée en vigueur du règlement européen (CE) n°1394/2007 et ont depuis été retirés de la commercialisation dans la plupart de ces pays à l'issue de la période de transition réglementaire. C'est par exemple le cas du produit Hyalograft-C® de Fidia Advanced Biopolymers, acquis en 2009 par Anika Therapeutics et commercialisé en Italie et dans d'autres pays européens. Ce produit constitué de chondrocytes autologues dans une matrice de microfibrilles à base d'acide hyaluronique était indiqué dans le traitement de défaut de cartilage. Une demande d'approbation de ce produit en tant que médicament issu de l'IT avait été déposée auprès de l'EMA mais a ensuite été retirée et le produit n'est plus commercialisé (292,293). Ce produit ainsi que ceux du même type ne figurent pas dans la liste des médicaments issus de l'IT approuvés dans le monde du tableau 6.

Il existe un cas particulier pour des produits issus de l'IT développés en Allemagne. Comme pour Hyalograft-C®, des produits ont été développés et commercialisés en Allemagne avant l'entrée en vigueur du règlement européen (CE) n°1394/2007. Un certain nombre d'entre eux sont toujours commercialisés en Allemagne de même que d'autres arrivés sur le marché depuis l'entrée en vigueur de ce règlement. Ces produits entrent dans le cadre de l'exemption hospitalière prévue par l'article 28 du règlement CE 1394/2007 (cf. chapitre II de la partie II). Il est du ressort de chaque État membre de l'UE de retranscrire dans le droit national cette exemption qui correspond en France au MTI-PP. En Allemagne, l'interprétation de cette disposition européenne et sa retranscription dans le droit allemand a permis la poursuite de la commercialisation d'un certain nombre de produits issus de l'IT sous le statut de l'exemption hospitalière. Cette facilité proposée aux établissements privés allemands avait à l'origine pour but de permettre à ces entreprises de s'adapter à la nouvelle réglementation tout en garantissant la continuité de la disponibilité de ces produits sur le marché allemand. Cela devait permettre le remboursement de ces produits et la génération de revenus et de données pour mener les essais cliniques nécessaires à leur approbation centralisée par l'EMA. Cette disposition de transition n'a cependant pas mené à une autorisation centralisée pour tous les produits concernés et ceux ne l'ayant pas obtenue continuent pourtant à être commercialisés

en Allemagne sous le régime de l'exemption hospitalière. De plus, des médicaments relativement nouveaux et produits par des établissements privés ont été autorisés sous ce régime en Allemagne après la période de transition. Cette disposition semble donc détournée de son but premier et semble donner un avantage concurrentiel aux entreprises allemandes en court-circuitant l'approbation centralisée. Elle permet aux entreprises allemandes d'accéder à un tremplin vers une autorisation centralisée qui n'existe pas dans les autres pays de l'UE où des dispositions plus restrictives limitent la fabrication sous exemption hospitalière aux traitements de dernier recours ou aux installations publiques. Il faut également noter que pour au moins l'un de ses produits (SPHEROX® de CO.DON AG), l'obtention de l'autorisation centralisée n'a pas entraîné le retrait du produit sous exemption hospitalière en Allemagne (Chondrosphere® de CO.DON AG). Le risque est qu'une entreprise commercialisant un produit ayant une autorisation centralisée mais n'obtenant pas de remboursement dans les pays européens demande un retrait de son produit du marché européen pour se concentrer sur le marché allemand où le produit est remboursé car sous exemption hospitalière. Ainsi, bien que les patients allemands puissent bénéficier d'un plus grand nombre de produits issus de l'IT grâce à l'exemption hospitalière, l'accès à ces thérapies dans les autres pays européens pourrait être diminué en raison de cette défaillance de l'encadrement du marché européen. La plupart des produits issus de l'IT commercialisés en Allemagne et autorisés par le Paul-Ehrlich-Institut (agence du médicament allemande) sous le régime de l'exemption hospitalière sont des produits à base de chondrocytes autologues pour le traitement des défauts du cartilage. Bien qu'ils soient commercialisés par des entreprises privées, ils ne sont pas présents dans la liste du tableau 6 car ils sont officiellement dans un régime d'exception (294,295).

Tableau 6 : Médicaments issus de l'ingénierie tissulaire commercialisés (ou l'ayant été) dans le monde. (266,274,276,284,289,296,297) ; <https://alliancerm.org/available-products/>.

| NOM DU PRODUIT        | FABRICANT  | DESCRIPTION   | INDICATIONS   | STATUT ET PRIX  |
|-----------------------|--|---|---|---|
| <b>Holoclar®</b>      | Holostem<br>Terapie Avanzate<br>S.R.I.   | Cellules épithéliales cornéennes humaines autologues amplifiées <i>ex vivo</i> contenant des cellules souches limbiques   | Traitement des patients adultes présentant une déficience modérée à sévère en cellules souches limbiques, unilatérale ou bilatérale, due à des brûlures oculaires physiques ou chimiques. Un minimum de 1 à 2 mm <sup>2</sup> de limbe non endommagé est nécessaire pour la biopsie.  | <b>UE</b> : AMM conditionnelle<br>10/2013<br><br>102 977 \$ / œil   |
| <b>SPHEROX®</b>       | CO.DON AG  | Sphéroïdes de chondrocytes humains autologues cultivés <i>ex vivo</i> associés à une matrice extracellulaire auto-synthétisée   | Réparation des défauts de cartilage articulaire symptomatiques du condyle fémoral et de la rotule du genou  | <b>UE</b> : AMM avec obligation d'études post-AMM 05/2017<br><br>12 224 \$  |
| <b>Chondrocelect®</b> | TiGenix N.V.   | Chondrocytes humains autologues amplifiés <i>ex vivo</i> sur une membrane biologique  | Réparation d'anomalies cartilagineuses symptomatiques uniques du condyle fémoral du genou chez l'adulte avec des lésions de 1 à 5 cm <sup>2</sup> . Des lésions cartilagineuses asymptomatiques concomitantes peuvent être présentes.   | <b>UE</b> :<br>Autorisé 5/10/2009<br>Retiré 30/11/2016 à la demande du fabricant.<br><br>20 000 \$  |
| <b>MACI®</b>          | Genzyme<br>Biosurgery ApS<br>racheté par<br>Sanofi qui l'a<br>revendu en 2014<br>à Aastrom<br>Biosciences Inc.<br>renommé Vericel<br>Corp. | Chondrocytes humains autologues amplifiés <i>ex vivo</i> sur une membrane de collagène porcin   | <b>UE</b> : réparation de défauts cartilagineux symptomatiques uniques ou multiples de pleine épaisseur du genou avec ou sans atteinte osseuse chez l'adulte<br><br><b>USA</b> : Réparation de défauts symptomatiques du cartilage du genou de 3 à 20 cm <sup>2</sup> chez des patients adultes ayant atteint la maturité squelettique. | <b>UE</b> : MTI combiné, autorisé sous condition 06/2013<br>Retiré 09/2014 car plus de site de production autorisé<br><br><b>USA</b> : autorisé<br>12/2016<br><br>40 000 \$ |
| <b>GINTUIT®</b>       | Organogenesis<br>Inc.  | Kératinocytes et fibroblastes néonataux (allogéniques) cultivés <i>ex vivo</i> sur du collagène bovin   | Traitement topique des plaies vasculaires post-chirurgicales avec affections mucogingivales chez l'adulte   | <b>USA</b> : autorisé<br>03/2012<br>, suspendu en 2014 à la demande du fabricant  |
| <b>Dermagraft®</b>    | Organogenesis<br>Inc.  | Fibroblastes allogéniques issus d'un prépuce néonatal et cultivés <i>ex vivo</i> sur un échafaudage biodégradable en mailles tricotées en PLA et PGA supplémenté en constituants de MEC néo-synthétisés par les fibroblastes. | Ulcère du pied diabétique de pleine épaisseur > 6 semaines s'étendant à travers le derme sans exposition des tendons, des muscles, de la capsule articulaire ou des os.   | <b>USA</b> : autorisé<br>09/2001<br><br>1 700 \$  |

Tableau 6 (suite) : **Médicaments issus de l'ingénierie tissulaire commercialisés (ou l'ayant été) dans le monde.** (266,274,276,284,289,296,297) ; <https://alliancerm.org/available-products/>.

| NOM DU PRODUIT      | FABRICANT                                       | DESCRIPTION   | INDICATIONS  | STATUT ET PRIX  |
|---------------------|---|---|--|---|
| <b>Epicel®</b>      | Vericel Corp.                                   | Kératinocytes autologues cultivés <i>ex vivo</i> sur des fibroblastes murins 3T3 (ne faisant pas partie du produit final) (chaque greffon est fixé à un support de gaze de pétrolatum à l'aide de clips chirurgicaux en titane).  | Brûlures dermiques profondes ou de pleine épaisseur de plus de 30% de la surface corporelle totale                                   | <b>USA</b> : autorisé 10/2007 (en tant que dispositif à usage humanitaire (HUD) dans le cadre d'une exemption pour dispositif humanitaire (HDE))<br><br>6 000-10 000 \$ par % de la surface corporelle totale |
| <b>Apligraf®</b>    | Organogenesis Inc.                              | Fibroblastes dermiques allogéniques néonataux cultivés <i>ex vivo</i> sur un échafaudage en collagène bovin de type I (reproduction du derme) et associés à des kératinocytes épidermiques allogéniques néonataux cultivés <i>ex vivo</i> (reproduction de l'épiderme).   | Ulcères veineux chroniques et ulcères du pied diabétique chroniques (greffe temporaire)  | <b>USA</b> : autorisé 07/1998 (1 <sup>ère</sup> indication) 07/2000 (2 <sup>ème</sup> indication)<br><b>Suisse</b> : autorisé 04/2015 (pour les 2 indications)<br><br>1 000-2 000 \$ / traitement             |
| <b>Stratagraft®</b> | Stratatech Corp. – Mallinckrodt Pharmaceuticals | Fibroblastes dermiques allogéniques cultivés <i>ex vivo</i> sur un échafaudage en collagène murin de type I gélifié (reproduction du derme) et associés à des kératinocytes allogéniques NIKS (lignée issue de prépuces néonataux immortalisée en présence de fibroblastes murin 3T3) cultivés <i>ex vivo</i> sur l'échafaudage dermique. | Brûlures profondes d'épaisseur partielle   | <b>USA</b> : autorisé 06/2021   |
| <b>Heartsheet®</b>  | Terumo Corporations Ltd.                        | Feuillet de myoblastes squelettiques autologues   | Insuffisance cardiaque grave due à une cardiopathie ischémique   | <b>Japon</b> : Autorisation conditionnelle 09/2015<br><br>122 000 \$  |
| <b>JACC®</b>        | Japan Tissue Engineering Co. Ltd. (J-TEC)       | Chondrocytes autologues cultivés <i>ex vivo</i> dans un gel d'atélocollagène  | Soulagement des symptômes de l'ostéochondrite disséquante (à l'exclusion de l'arthrose) et des lésions cartilagineuses traumatiques. | <b>Japon</b> : autorisé 07/2012<br><br>21 300 \$/ genou   |

Tableau 6 (suite) : **Médicaments issus de l'ingénierie tissulaire commercialisés (ou l'ayant été) dans le monde.**  
(266,274,276,284,289,296,297) ; <https://alliancerm.org/available-products/>.

| NOM DU PRODUIT  | FABRICANT  | DESCRIPTION  | INDICATIONS   | STATUT ET PRIX   |
|---|--|--|---|--|
| <b>JACE®</b>  | Japan Tissue Engineering Co. Ltd. (J-TEC)                      | Épiderme synthétique constitué de kératinocytes autologues cultivés <i>ex vivo</i> sur des fibroblastes murins                                     | Traitement des brûlures graves (1 <sup>ère</sup> approbation)<br>Naevus mélanocytaire congénital géant (2 <sup>ème</sup> approbation)<br>Epidermolyse bulleuse dystrophique et jonctionnelle (3 <sup>ème</sup> approbation) | <b>Japon</b> : autorisé 1 <sup>ère</sup> indication 10/2007<br>2 <sup>ème</sup> indication 09/2016<br>3 <sup>ème</sup> indication 03/2016<br><br>39,25\$/cm <sup>2</sup> |
| <b>Kaloderm®</b>  | Tego Science Inc.  | Feuille de kératinocytes allogéniques cultivés <i>ex vivo</i> et issus d'un prépuce néonatal.  | Traitement des brûlures au second degré (1 <sup>ère</sup> approbation)<br>Ulcère du pied diabétique (2 <sup>ème</sup> approbation)  | <b>Corée du Sud</b> : autorisé 1 <sup>ère</sup> indication 03/2005<br>2 <sup>ème</sup> indication 06/2010<br><br>26,5\$/cm <sup>2</sup> de feuille                       |
| <b>Holoderm®</b>  | Tego Science Inc   | Feuille de kératinocytes autologues cultivés <i>ex vivo</i> .  | Brûlure 2 <sup>nd</sup> degré couvrant plus de 30% de la surface corporelle totale et brûlure 3 <sup>ème</sup> degré couvrant plus de 10% de la surface corporelle totale   | <b>Corée du Sud</b> : autorisé 12/2002<br><br>697,76 \$/cm <sup>2</sup>  |
| <b>Ossgrow® (Inde)</b><br><b>Ossron® (Corée du Sud)</b>     | RMS Regrow (Inde)<br>Sewon Cellontech Co., Ltd. (Corée du Sud) | Ostéoblastes autologues cultivés <i>ex vivo</i> pouvant être inclus dans une colle de fibrine  | Nécrose avasculaire de la hanche à un stade précoce (Inde)<br><br>Défauts osseux (Corée du Sud)   | <b>Inde</b> : autorisé 04/2017<br><br>1 988 \$ / traitement<br><br><b>Corée du Sud</b> : autorisé 08/2009  |
| <b>Cartigrow® (Inde)</b><br><b>Chondron® (Corée du Sud)</b> | RMS Regrow (Inde)<br>Sewon Cellontech Co., Ltd. (Corée du Sud) | Chondrocytes autologues cultivés <i>ex vivo</i> pouvant être inclus dans une colle de fibrine  | Perte de cartilage du genou/de la cheville (Inde)<br><br>Défaut focal du cartilage du genou (Corée du Sud)  | <b>Inde</b> : autorisé 04/2017<br><br>1 988 \$ / traitement<br><br><b>Corée du Sud</b> : autorisé 01/2009<br><br>5 890\$ / traitement                                    |
| <b>Cartistem®</b>   | Medipost Co., Ltd.   | Cellules souches mésenchymateuses allogéniques dérivées du sang de cordon ombilical humain dans un échafaudage d'hydrogel de hyaluronate de sodium | Traitement des défauts du cartilage articulaire du genou chez les patients atteints d'arthrose  | <b>Corée du Sud</b> : autorisé 01/2012<br><br>19 000 à 21 000 \$ traitement standard + 10 000 \$ / traitement additionnel.   |
| <b>Chondrocytes - T - Ortho-ACI®</b>                        | Orthocell Ltd  | Chondrocytes autologues cultivés <i>ex vivo</i> intégrés à un échafaudage en collagène porcin de type I et III.                                    | Patients présentant des lésions cartilagineuses causées par un traumatisme, l'usure ou une dégradation anormale.  | <b>Australie</b> : autorisé 03/2017<br><br>4 500 \$/ traitement  |

Tableau 6 (suite) : **Médicaments issus de l'ingénierie tissulaire commercialisés (ou l'ayant été) dans le monde.** (266,274,276,284,289,296,297) ; <https://alliancerm.org/available-products/>.

| NOM DU PRODUIT                  | NOM DU PRODUIT                           | NOM DU PRODUIT  | NOM DU PRODUIT   | NOM DU PRODUIT                                     |
|---------------------------------|--|---|--|--|
| <b>Novocart 3D®</b>             | TETEC AG                                 | Chondrocytes autologues cultivés <i>ex vivo</i> sur un échafaudage 3D en collagène et sulfate de chondroïtine.  | Lésions cartilagineuses articulaires, localisées et symptomatiques, provoquées par un traumatisme ou une ostéocondrite disséquante et ne répondant que de manière inadéquate aux méthodes de traitement conservatrices | <b>Suisse</b> : autorisé 10/2014<br>Retiré 07/2020 |
| <b>Bilayer artificial skin®</b> | Shaanxi Eyre skin Biological Engineering | Fibroblastes dermiques allogéniques cultivés <i>ex vivo</i> sur un échafaudage en collagène humain et bovin (reproduction du derme) et associés à des kératinocytes épidermiques allogéniques cultivés <i>ex vivo</i> (reproduction de l'épiderme). | Brûlures profondes du 2 <sup>nd</sup> degré, pas plus que 20 cm <sup>2</sup> de brûlure du 3 <sup>ème</sup> degré (diamètre < 5 cm)  | <b>Chine</b> : autorisé 2007                       |
| <b>Cell-Amniosin®</b>           | SinaCell                                 | Pansement cellulaire dérivé de la membrane amniotique humaine (allogénique)   | Ulcères du pied diabétique de pleine épaisseur > 6 semaines étendu à travers le derme sans exposition des tendons, des muscles, de la capsule articulaire ou des os.   | <b>Iran</b> : autorisé 03/2017                     |

La liste ci-dessus des produits issus de l'IT commercialisés dans le monde vise à être exhaustive mais peut être défailante pour des produits provenant de pays pour lesquels les informations sont difficilement accessibles en langue anglaise. Par ailleurs, elle mentionne également quelques produits retirés du marché ou suspendus après avoir été autorisés mais n'a pas vocation à être exhaustive pour ces produits.

Il est important de noter que chacun de ces produits nécessite un acte médical voir une ou plusieurs procédures chirurgicales pour être administré au patient et que, par conséquent, ils sont en général réservés à un usage hospitalier ou doivent être administrés sous la supervision d'un médecin.

On dénombre 18 médicaments issus de l'ingénierie tissulaire actuellement commercialisés dans le monde. Certains le sont dans plusieurs pays ou juridictions sous un même nom et d'autres sous des noms différents et par des entreprises différentes. Dans ce dernier cas,

l'explication peut-être qu'une entreprise commercialisant son produit dans un pays crée une filiale dans un autre pays pour y commercialiser son produit. Pour étendre la commercialisation d'un produit à un autre pays, une entreprise peut également procéder à un transfert de technologie vers une entreprise locale. C'est par exemple le cas de l'entreprise coréenne qui a procédé à un transfert de technologie pour ses produits Ossron® et Chondron® vers l'entreprise indienne RMS Regrow qui les commercialise en Inde sous les nom Ossgrow® et Cartigrow®.

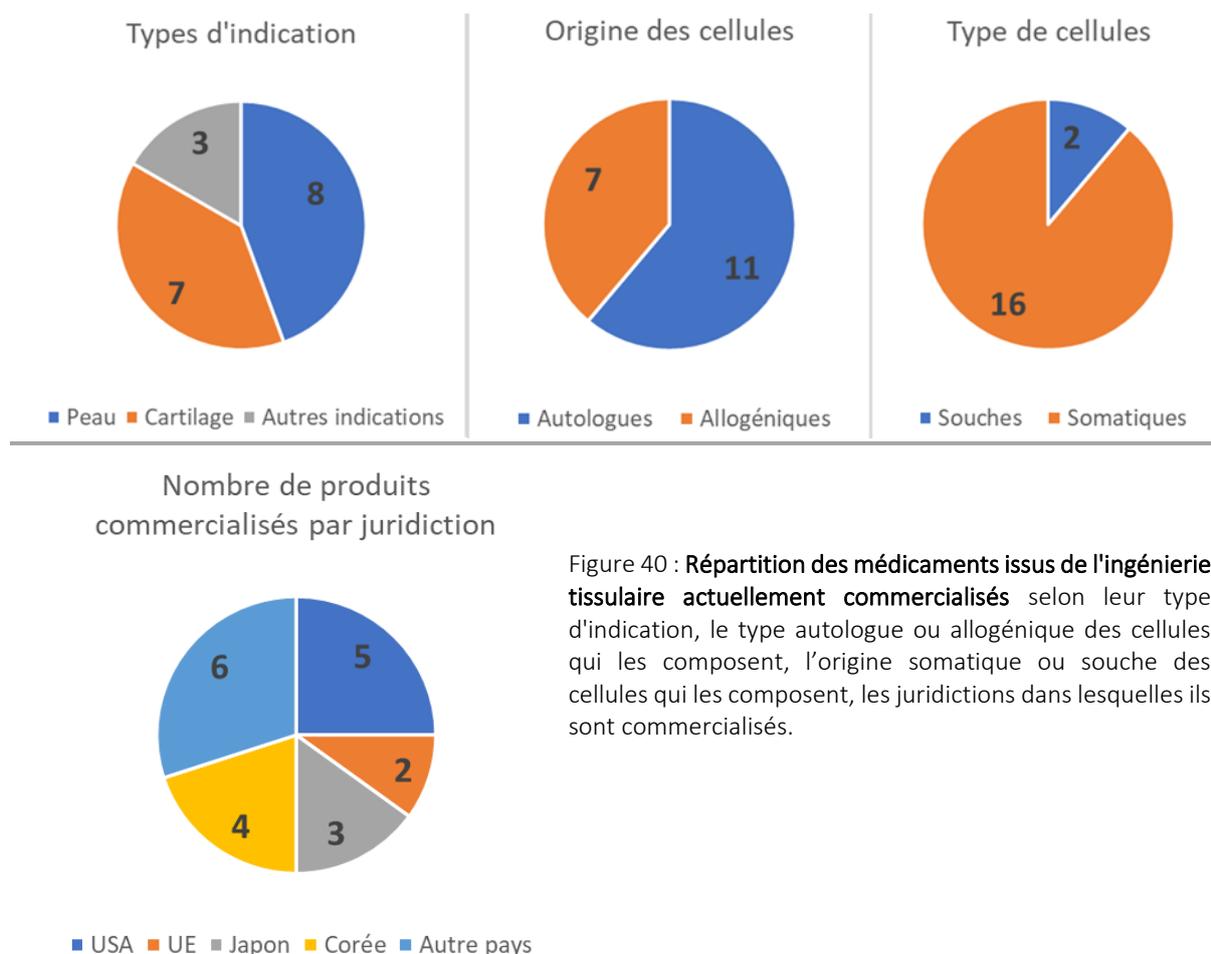


Figure 40 : Répartition des médicaments issus de l'ingénierie tissulaire actuellement commercialisés selon leur type d'indication, le type autologue ou allogénique des cellules qui les composent, l'origine somatique ou souche des cellules qui les composent, les juridictions dans lesquelles ils sont commercialisés.

On peut faire différentes observations à partir des données du tableau 6 ; observations résumées dans la figure 40. i) La plupart des produits commercialisés le sont sur des indications de régénération de la peau (ulcères diabétiques ou veineux et brûlures) et de régénération du cartilage articulaire. Ces tissus sont des tissus simples dans leur structure, souvent considérés comme en deux dimensions et faiblement vascularisés.

ii) Deux tiers de ces produits contiennent des cellules autologues ce qui témoigne d'un haut niveau de personnalisation pour pouvoir éviter d'éventuels rejets des tissus greffés ; le tiers restant de produits contenant des cellules allogéniques étant souvent voué à être

temporairement greffé. L'usage de cellules autologues peut néanmoins limiter l'industrialisation et la standardisation des procédés de fabrication et augmenter leur coût.

iii) La grande majorité de ces produits issus de l'IT contiennent des cellules somatiques qui ne sont pas issues de cellules souches différenciée en laboratoire. Pour les deux thérapies contenant des cellules souches, il s'agit de cellules souches adultes. Bien entendu les thérapies à base de cellules somatiques contiennent potentiellement des progéniteurs et des cellules souches. Les kératinocytes du stratum basale de l'épiderme sont par exemple des progéniteurs. Les substituts cutanés constitués de cellules allogéniques issus de prépuces néonataux semblent également suggérer un forte présence de cellules souches de part leur origine néonatale. On ne peut cependant pas considérer que ces thérapies reposent sur des techniques de maîtrise et de transformation des cellules souches.

iv) On distingue deux zones de commercialisation et de développement principales pour les médicaments issus de l'IT : l'Asie de l'est avec le Japon et la Corée du Sud qui est très dynamique dans ce secteur proportionnellement à la taille de son marché et à son poids économique et les USA d'où viennent une grande partie des innovations ainsi que de nombreux produits dont les technologies ont été reprises dans d'autres pays via des transferts de technologies. L'Europe, quant à elle, commercialise 3 produits alors que 2 ont été retirés (suisse incluse). C'est autant que le Japon et cela peut paraître un peu faible compte-tenu de son poids économique important et de son activité en recherche et développement dynamique et innovante dans beaucoup secteurs.

Mon analyse est que les produits actuellement commercialisés dans le monde semblent assez simples et sont pour beaucoup issus de découvertes et développement faits aux USA il y a 30 ou 40 ans (cf. chapitre I partie I) avec donc une certaine redondance des technologies et méthodes utilisées entre les 18 thérapies présentées, en particulier au niveau des substituts de peau et de cartilage. Les tissus que ces produits cherchent à reproduire sont simples du point de vue de leur organisation tridimensionnelle et contiennent globalement peu de types cellulaires différents. La totalité de ces produits se présentent sous la forme de feuille de tissu ou de gels de cellules. De plus, les cellules qui composent les tissus visés sont assez aisément mises en culture et amplifiables *in vitro* (fibroblastes, kératinocytes, chondrocytes). C'est ainsi que l'on retrouve dans ces thérapies une majorité de cellules somatiques autologues. La révolution des cellules souches qui a eu lieu dans le domaine de l'IT ne semble pas encore avoir

atteint une maturation suffisante pour donner lieu à des applications concrètes en cliniques. L'usage des cellules allogéniques ne semble pas maîtrisé et est en général synonyme de greffon temporaire. Les biomatériaux utilisés et les méthodes de fabrication des tissus semblent assez élémentaires, peu de biomatériaux composites sont utilisés et les procédés de fabrication complexes comme la bioimpression tridimensionnelle ne sont pas impliqués. Les matériaux et procédés présentés dans la partie I de ce travail semblent ainsi largement absents des produits issus d'IT actuellement commercialisés. De plus, ces thérapies sont en nombre restreint et sont diffusées assez peu largement à travers le monde avec l'absence de commercialisation de produits issus de l'IT dans les pays de l'Amérique du Sud et de l'Afrique et dans une grande partie des pays d'Asie et d'Océanie.

Il est difficile d'évaluer la taille du marché des médicaments issus de l'IT. Une solution pourrait être d'additionner la valeur des ventes de chacun des produits du tableau 5 pour une année donnée. Ces données sont cependant difficilement accessibles pour chaque produit. Les rapports disponibles produits par des cabinets d'analyse présentent des biais car que chaque analyste utilise des critères d'inclusion des produits différents et les tailles de marché obtenues sont donc très variables car ne décrivent pas la même chose. Cela permet de remarquer que de nombreux produits n'apparaissent pas dans le tableau 5 car ils sont considérés comme des dispositifs médicaux ou autres alors qu'ils sont pourtant issus ou inspirés par les principes de l'IT et sont, par exemple, constitués de biomatériaux innovants. Il est donc important de noter que l'état des lieux de la traduction des recherches dans le domaine de l'IT en applications cliniques concrètes ne se limite pas à la liste du tableau 5.

---

## III-2. FOCUS SUR QUELQUES PRODUITS

---

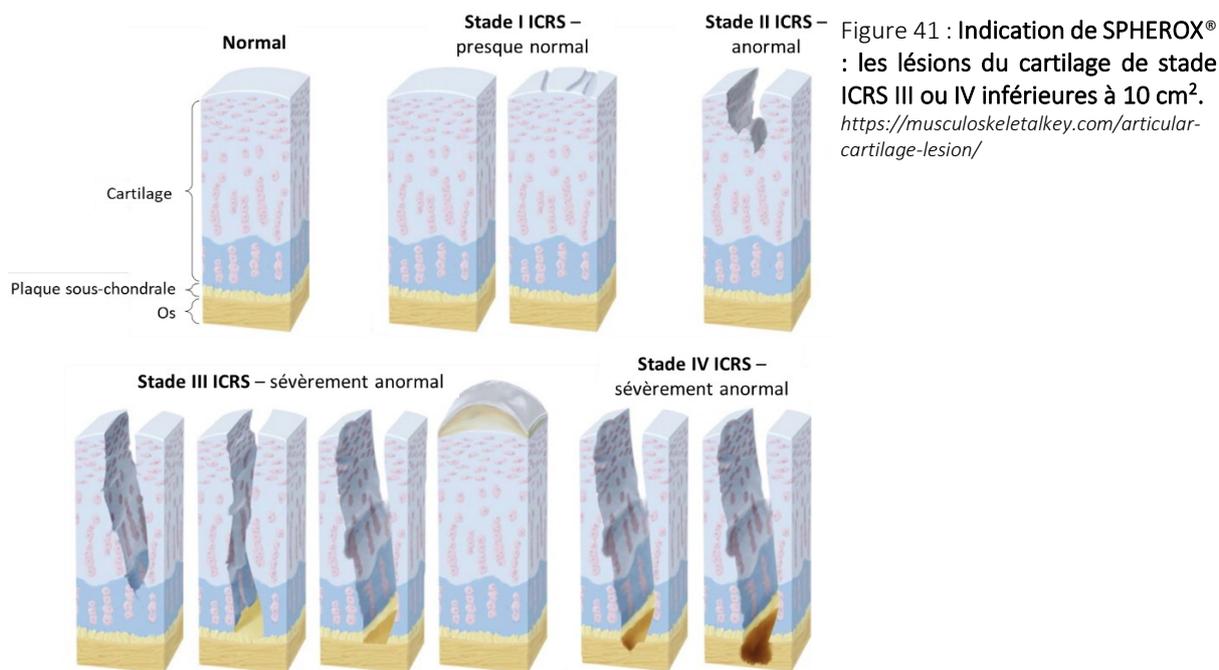
Afin d'avoir une idée plus concrète de ce que sont ces médicaments issus de l'ingénierie tissulaire, je développe ci-dessous les informations concernant deux d'entre eux.

### III-2.1. SPHEROX®

---

Les informations présentées dans ce chapitre sont issues de l'Avis de la Commission de la Transparence et de la Commission Nationale d'Évaluation des Dispositifs Médicaux et des Technologies de Santé du 30 Juin 2020 portant sur SPHEROX® (298). SPHEROX® est un produit

développé et commercialisé en France par l'entreprise allemande CO.DON AG. Ce médicament issu de l'ingénierie tissulaire a été autorisé par l'EMA via une procédure centralisée le 10 Juillet 2017. Il est composé de chondrocytes autologues humains cultivés *ex vivo* et associés à une MEC auto-synthétisée pour former des agrégats cellulaires sphériques (sphéroïdes).



SPHEROX® est indiqué dans la réparation des lésions symptomatiques cartilagineuses du genou (stade III et IV de la classification de l'International Cartilage Repair Society (ICRS)) d'une surface inférieure ou égale à 10 cm<sup>2</sup> chez l'adulte (figure 41). En France, les traitements les plus utilisés sur cette indication sont des techniques chirurgicales : la mosaïcoplastie et les microfractures pour des lésions inférieures à 2cm<sup>2</sup>, les « microfractures plus » pour des lésions supérieures à 4cm<sup>2</sup>, et l'allogreffe ostéocondrale pour des lésions profondes de plus de 4cm<sup>2</sup>.

Les chondrocytes sont prélevés lors d'une première procédure chirurgicale sur une région cartilagineuse saine du patient. Cette biopsie est réalisée sous arthroscopie permettant également au chirurgien d'estimer la taille de la lésion à traiter. La biopsie est transportée sous 48 heures dans une boîte de transport jusqu'au site de production en Allemagne. Les chondrocytes sont isolés de la biopsie et le sérum autologue est récupéré pour être inclu par la suite au milieu de culture. Les chondrocytes sont cultivés en monocouche puis transférés dans un système de culture cellulaire 3D qui, en empêchant leur adhésion à une surface, entraîne leur adhésion mutuelle, entraînant ainsi la formation d'agrégats de chondrocytes en

3 dimensions appelés sphéroïdes. Au sein de ces sphéroïdes, les cellules centrales ont une forme ronde alors que les plus externes ont une forme allongée. Une MEC de caractère hyalin est synthétisée par les chondrocytes et les encapsule. Cette MEC est notamment composée de CEP-68, d'agrécan, de glycosaminoglycane, de collagène de type II et de protéines précoces du collagène de type I qui sont des constituants communs de la MEC du cartilage articulaire. Les sphéroïdes expriment également différents facteurs chondrogéniques (TGF $\beta$ , BMP2/4, IGF-1, PDGF). Ces informations suggèrent que les sphéroïdes sont capables de soutenir et de promouvoir la croissance du cartilage hyalin et de favoriser la guérison de lésions du cartilage. Les sphéroïdes sont finalement récupérés et formulés dans une solution isotonique de chlorure de sodium sous forme d'une suspension contenant 10 à 70 sphéroïdes/cm<sup>2</sup> de lésion à traiter. La suspension de sphéroïdes est en effet fournie dans une seringue pré-remplie avec un volume et un nombre de sphéroïdes spécifiques de la surface de la lésion à traiter. Une seringue peut contenir un volume maximal de 1000  $\mu$ L de suspension et 100 sphéroïdes. Un applicateur dédié (Co.Fix) a également été développé par CO.DON AG afin de faciliter la manipulation des sphéroïdes par le chirurgien les implantant. Cet applicateur peut contenir un volume maximal de 200  $\mu$ L de suspension et 60 sphéroïdes.

L'implantation des sphéroïdes nécessitent une deuxième intervention chirurgicale par voie intra-articulaire (figure 43). Le chirurgien procède à un nettoyage des zones lésées à traiter (débridement articulaire). La plaque sous chondrale ne doit pas être endommagée. Les sphéroïdes sont répartis sur l'ensemble de la zone lésée et appliqués uniformément sur sa surface. Après l'administration des sphéroïdes et l'opération chirurgicale, le processus d'adhésion et de remodelage des sphéroïdes est une étape cruciale de leur intégration structurelle et fonctionnelle dans le cartilage natif (figure 42). Ce processus comprend 3 phases : i) la fixation initiale des sphéroïdes par adhésion cellulaire au tissu hôte, prenant approximativement 20 minutes et à l'issue de laquelle la plaie peut être refermée ; ii) l'élargissement des sphéroïdes et leur intégration dans la zone d'adhésion via la migration des chondrocytes externes le long de la surface irrégulière (fissures par exemple) du tissu hôte, entraînant un remodelage des sphéroïdes, (iii) la synthèse et la sécrétion dans la cavité de la lésion de protéines spécifiques du cartilage et ayant une fonction structurelle et régulatrice. Cette dernière étape conduit à combler les lacunes entre les sphéroïdes simples et les tissus hôtes ainsi qu'à leur intégration biochimique dans les tissus hôtes environnants.

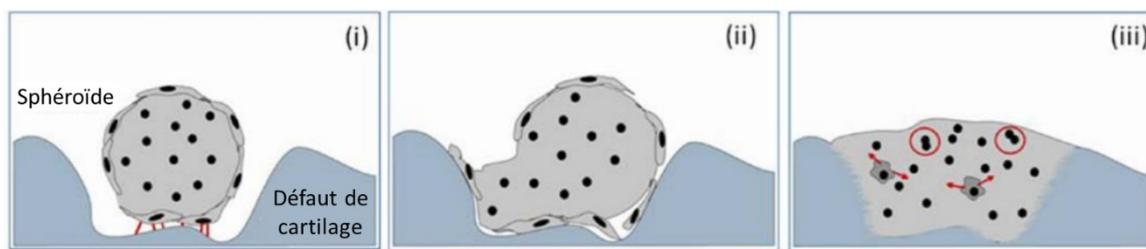


Figure 42 : **Processus d'adhésion et d'intégration des sphéroïdes autologues à la lésion.** Représentation schématique de l'adhésion (i) d'un sphéroïde de cellules cartilagineuses à la lésion par le biais de points d'adhésion (indiqués par les lignes rouges). Ceci est suivi par (ii) l'élargissement des sphéroïdes et leur intégration dans la zone d'adhésion par migration des chondrocytes de surface le long de la surface irrégulière de la lésion. Dans la dernière étape de remodelage (iii), le sphéroïde est complètement intégré dans la lésion cartilagineuse. Les flèches rouges indiquent la synthèse et la sécrétion de protéines spécifiques du cartilage dans la cavité de la lésion avec une fonction structurelle et régulatrice. Les cercles rouges indiquent une prolifération cellulaire putative conduisant à la formation de nouveaux chondrocytes dans la lésion. *Issu de l'avis de la HAS concernant SPHEROX (298).*

Suite à l'administration de SPHEROX® lors de cette seconde intervention chirurgicale, un plan de rééducation est mis en place par le médecin en fonction du patient, de la localisation de la lésion traitée et de son étendue. La rééducation se déroulera généralement sur une période de 6 à 8 semaines après l'opération, durée pendant laquelle les mouvements sollicitant particulièrement le cartilage doivent être évités.

SPHEROX® existait avant son autorisation centralisée pour l'UE sous le nom de CHONDROSPHERE®. Cette thérapie développée en Allemagne était disponible depuis 2004 dans plusieurs pays européens et avait permis de traiter plus de 3600 patients au moment de la demande d'AMM centralisée. Elle a été retirée de tous ces pays (à l'exception de l'Allemagne) à l'issue de la fin de la période transitoire d'application du règlement européen (CE) n°1394/2007 instaurant la procédure centralisée. En Allemagne cependant, CHONDROSPHERE® a continué à être commercialisé à partir de 2013 sous le régime de l'exemption hospitalière. Le 10 Juillet 2017, la commission Européenne a délivré une AMM centralisée pour ce produit sous le nom commercial de SPHEROX® mais le produit demeure disponible sous le nom CHONDROSPHERE® et sous le statut de l'exemption hospitalière en Allemagne depuis cette date.

SPHEROX® est un type de thérapie du cartilage appelé ACI (Implantation de Chondrocytes Autologues). Il en existe de plusieurs générations et de plusieurs types. En UE, deux ont déjà reçu une autorisation centralisée et ont ensuite été retirées à la demande des fabricants. Il s'agit de MACI® de Vericel Corp. Et de Chondrocelect® de TiGenix N.V. Il semble que ces deux produits n'aient pas obtenu de remboursement dans les principaux pays européens visés par

les fabricants et que ceux-ci les aient donc retirés du marché face au faible nombre de ventes qu'engendrait ce manque de remboursement.

SPHEROX® a fait l'objet d'une demande de remboursement en France en 2020. La Commission de la Transparence et la Commission Nationale d'Evaluation des Dispositifs Médicaux et des Technologies de Santé de la Haute Autorité de Santé ont rendu un avis défavorable à ce remboursement dans les indications de l'AMM.



Figure 43 : Administration de SPHEROX® sous arthroscopie d'un coude droit en décubitus latéral. (D) Vue de la voie d'accès postéro-latérale proximale montrant le défaut après débridement sous aéroscopie. Le fond du défaut était presque intact sans indication d'augmentation osseuse. (E-F) Défaut rempli de sphéroïdes après implantation entièrement arthroscopique. \* : capitulum humérale avec défaut ostéocondral ; x : tête radiale ; # : pointe de l'applicateur. Issu de Patzer et al. (299).

Le service médical rendu par SPHEROX a été jugé insuffisant au regard des alternatives disponibles (principalement la technique des microfractures) pour justifier une prise en charge par la solidarité nationale. Pour justifier cette décision, il a été mis en avant : i) le manque de pertinence dans le choix du comparateur (technique des microfractures) sur l'étendue de l'indication revendiquée ; ii) la faiblesse méthodologique de l'étude comparative fournie et l'absence de démonstration de supériorité de SPHEROX® versus technique des microfractures (seule la non-infériorité a été démontrée) ; iii) le faible nombre de résultats histologiques qui ne permet pas de conclure sur la capacité du greffon à produire du cartilage hyalin ; iv) l'absence de donnée comparative versus les techniques chirurgicales de référence (microfractures plus, allogreffes ostéocondrales, méga-OATS) et les soins de support utilisés en France ; v) le recul limité sur l'efficacité et la tolérance à long terme ; vi) l'absence de donnée pour les patients de plus de 50 ans et les lésions inférieures à 1 cm<sup>2</sup> ; vii) une certaine toxicité caractérisée par des épanchements et gonflements articulaires, des entorses ligamentaires, une délamination ou hypertrophie du greffon pouvant entraîner l'échec de la greffe.

Les données médico-économiques permettant de comparer le coût et l'impact pour la société d'une prise en charge par SPHEROX® versus traitements de référence auraient été

intéressantes mais n'ont pas pu être trouvées. On peut toutefois rappeler que le coût unitaire de SPHEROX® est d'environ 12 000 dollars, ce qui n'inclue pas les frais liés aux interventions chirurgicales, rééducation, traitements médicamenteux etc.

En 2020, SPHEROX® était remboursé dans le périmètre des indications de son AMM en Allemagne, en Autriche, aux Pays-Bas. Au Royaume-Uni, son remboursement était limité à des indications plus restreintes que celles de son AMM.

### III-2.2. APLIGRAF®

---

Apligraf® est un produit développé par l'entreprise américaine Organogenesis Inc.. Avec Apligraf®, Organogenesis Inc. a été la première entreprise à recevoir l'approbation de la FDA pour un produit vivant à base de cellules allogéniques en 1998 (24). Le produit a été autorisé comme dispositif médical et a reçu une autorisation de la FDA sous la forme d'un « Pre-Market Approval » (PMA) après évaluation par le CDRH. Par la suite, les produits issus de l'IT ont été considérés comme des produits biologiques de par leur mode d'action principal lié à leur composante cellulaire et Apligraf® est désormais du ressort du CBER. Depuis ce changement, les produits issus de l'IT ne sont plus considérés comme des dispositifs médicaux aux USA mais comme des produits biologiques et doivent donc obtenir une « Biologics License Application » (BLA) pour pouvoir être commercialisés (comme le produit similaire Stratograft en 2021). En 1996, la société a réussi à obtenir un accord de commercialisation avec Novartis. Cependant, le coût de production d'Apligraf® était trop élevé et, en 2002, Organogenesis Inc. a déposé le bilan et mis fin à son accord de commercialisation avec Novartis. Un accord de court terme avec Novartis et une restructuration de l'entreprise ont permis à Organogenesis Inc. de subsister et de développer, fabriquer et commercialiser ses propres produits seuls (270). Organogenesis Switzerland GmbH a également reçu une autorisation de mise sur le marché pour Apligraf® en Suisse en 2015 (300).

Apligraf® est indiqué en Suisse et aux USA pour le traitement des ulcères du pied diabétique de 1 à 16 cm<sup>2</sup>, ne cicatrisant pas au bout de 3 semaines et situés sur la partie médiale, latérale ou plantaire du pied (sauf les talons). Les ulcères peuvent toucher le derme et le tissu sous-cutané mais pas les tendons, les muscles, la capsule articulaire ou les os. Il est également indiqué pour le traitement des ulcères veineux des jambes qui ne cicatrisent pas au bout de 6 mois (Figure

46). Apligraf® stimule la cicatrisation en constituant, de manière similaire à la peau du patient, une barrière naturelle pour protéger la plaie contre les blessures et les infections. Il prévient le dessèchement des plaies et libère des substances biologiquement actives sur la plaie qui stimulent le processus de cicatrisation (300). De par leur caractère allogénique, les cellules composant Apligraf®, bien que ne provoquant pas de rejet immunitaire, ne survivent pas plus d'un à deux mois après l'implantation du médicament et celui-ci peut donc être considéré comme un pansement bioactif temporaire (301). Il doit être utilisé conjointement avec des mesures thérapeutiques dirigées contre les troubles à l'origine de l'ulcère (pansements ; compression, traitements veinotoniques et/ou angioplastie pour les ulcères veineux ; chaussures adaptées et accompagnement hygiéno-diététique pour les ulcères diabétiques). Le traitement standard pour ces deux types d'ulcères (en plus des éléments précédents) sont le débridement de la plaie, l'application de pansements colloïdaux ou à l'argent ou au zinc, la prise en charge éventuelle de la douleur et des infections par traitements antalgiques et antibiotiques (par voie locale ou générale) (300).

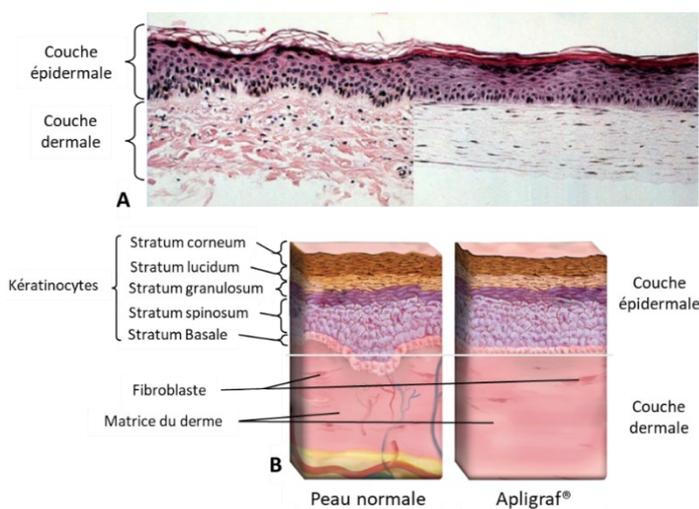


Figure 44 : **Apligraf® est un substitut de peau bicouche.** La couche épidermique contient des kératinocytes vivants et des cellules souches qui fournissent des cytokines et facteurs de croissance pro-cicatrisation. La couche dermique contient des fibroblastes vivants dans une matrice de collagène I bovin qui prolifèrent et produisent des protéines de MEC ainsi que des facteurs de croissance et cytokines pro-cicatrisation. **A)** Coupe histologique de peau normale et d'Apligraf®. **B)** Schéma en coupe d'une peau normale et d'Apligraf®.  
A) issu de Clark et al. (302); B) issu de <https://apligraf.com/apligraf-overview/>

Apligraf® est composé d'une couche épidermique et d'une couche dermique. La couche épidermique représente 33% du médicament et est composée de kératinocytes humains allogéniques vivants issus d'un prépuce néonatal qui ont formé une couche cornée. La couche dermique sous-jacente représente 67% du médicament et est composée de fibroblastes humains allogéniques vivants issus d'un prépuce néonatal cultivés dans une matrice de collagène bovin de type I (figure 44). Le médicament se présente sous la forme d'une disque d'un diamètre de 75 mm (300,301).

La production *in vitro* d'Apligraf® commence par la formation de la couche dermique. Du collagène bovin de type I extrait à l'acide et un milieu neutralisant sont coulés sur une membrane perméable en polycarbonate. On ajoute ensuite des fibroblastes humains néonataux vivants sur la surface collagénique. Pendant la période d'incubation de 6 jours, les fibroblastes prolifèrent et commencent à produire du collagène. Les filaments de collagène se contractent, et la matrice dermique se forme et se condense. Les kératinocytes humains néonataux sont ensuiteensemencés sur la matrice dermique contractée dans un milieu de culture. Après fixation sur la matrice, ils prolifèrent et se différencient de telle sorte que des couches épidermiques et dermiques distinctes sont présentes après 4 jours d'incubation. Pendant l'incubation finale de 10 jours, les kératinocytes sont exposés à l'air et poursuivent leur maturation (kératinisation) pour former un épiderme multicouche avec une couche cornée protectrice à la surface (303).

Apligraf® ne doit pas être appliqué sur une plaie cliniquement infectée avant le traitement de celle-ci. En raison de la cytotoxicité de la plupart des agents antiseptiques, Apligraf® ne peut être appliqué qu'une semaine après leur utilisation pour désinfecter une plaie. Apligraf® doit être appliqué sur une plaie préparée et débridée (dépourvue de croûte, fragment de peau, débris cutanés fibrotiques et nécrotiques) avec une solution stérile et non cytotoxique. En cas de présence importante d'exsudats de plaie, l'adhérence d'Apligraf® à celle-ci peut être réduite et il peut être nécessaire de réaliser des perforations ou entailles pour le rendre perméable avant son application (300).

Avant ouverture du conditionnement secondaire d'Apligraf®, il est nécessaire de vérifier à l'aide de la carte pH collée sur ce conditionnement que le pH du milieu de transport se situe dans l'intervalle prévu (pH 6,8-7,7). Un mauvais pH pourrait signifier la contamination ou l'altération du traitement. Apligraf® doit être appliqué maximum 15 minutes après l'ouverture de son conditionnement par un personnel qualifié utilisant des techniques aseptiques. Le produit est posé dans un récipient (conditionnement primaire) sur une membrane poreuse en polycarbonate à la forme du récipient. Celui-ci contient le milieu de transport qui assure l'apport de nutriments à travers la membrane poreuse au tissu disposé face épidermique vers le haut. Le tout est hermétiquement emballé dans un sachet en polyéthylène contenant 10% de CO<sub>2</sub> (conditionnement secondaire). La durée de conservation d'Apligraf® est de 15 jours à partir de la date d'emballage et il doit être conservé à une température de 20 à 23°C (300).

Une fois sorti de son emballage, il doit être manipulé avec des instruments stériles et non traumatiques. Il est important d'éviter la formation de plis. La membrane de polycarbonate doit rester dans le récipient (figure 45 A). Il est possible d'appliquer Apligraf® sur une gaze humidifiée afin de réaliser de petites entailles à l'aide d'un scalpel à raison d'une entaille par cm<sup>2</sup>, le rendant ainsi perméable en cas de présence importante d'exsudats dans la plaie (Figure 45 B). Apligraf® doit être coupé avec des ciseaux stériles de manière à recouvrir totalement la plaie et à permettre un chevauchement de 0,5-2 cm avec l'épiderme sous-jacent du patient au bord de l'ulcère. Apligraf® doit être appliqué sur le lit de la plaie de manière à ce que la couche dermique soit en contact direct avec la surface de la plaie. Les plis et les bulles d'air doivent être éliminés en lissant la surface d'Apligraf® avec un coton-tige humide et stérile (Figure 45 C) (300).

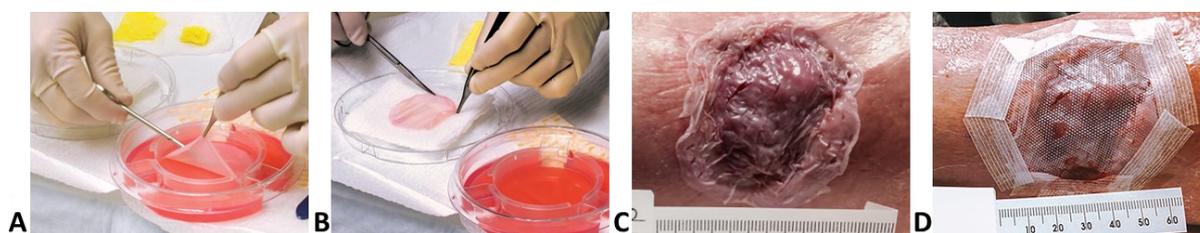


Figure 45 : **Étapes de l'implantation d'Apligraf® sur un ulcère.** **A)** Apligraf® soulevé de son contenant avec des pinces. **B)** Apligraf® placé sur une gaze imbibée de sérum physiologique afin de réaliser des entailles pour permettre le drainage de l'excès d'exsudats de la plaie. **C)** Apligraf® appliqué directement en contact avec la surface de la plaie. **D)** Apligraf® fixé à la plaie à l'aide d'adhésif et recouvert d'un pansement primaire non adhésif. Issu de <https://apligraf.com/product-details/>

Après l'application, il faut impérativement éviter le déplacement d'Apligraf® sur la plaie et s'assurer que le produit adhère à la plaie. Apligraf® peut être fixé sur la plaie via un pansement stérile, une suture stérile ou des agrafes stériles. Il est ensuite nécessaire d'appliquer par-dessus Apligraf® un pansement primaire non adhésif (Figure 45 D) puis un rembourrage fixé avec une bande élastique afin de s'assurer d'un contact continu entre le produit et la plaie. La plaie doit être réévaluée chaque semaine et le bandage compressif doit être changé à cette occasion avec une prudence particulière afin de ne pas endommager Apligraf®. Des applications supplémentaires d'Apligraf® (jusqu'à 4) sont possibles lorsqu'il n'adhère pas totalement à la plaie ou si la surface de la plaie ne se referme pas ou ne semble pas cicatriser. Les fragments non adhérents d'Apligraf® doivent alors être éliminés soigneusement avant la nouvelle application. Le tissu cicatriciel et les fragments adhérents ne doivent pas être endommagés. Les applications supplémentaires ne doivent pas être effectuées par-dessus les fragments déjà en place sur la plaie. Lors de ces changements de pansement, la plaie doit être débridée sans perturber les tissus en voie de cicatrisation et nettoyée avec une solution non

cytotoxique. Au moment du premier changement de pansement, Apligraf® peut présenter une surface translucide. Plus tard, Apligraf® peut développer un aspect jaunâtre similaire à de la gélatine et rappelant un exsudat purulent. Cet aspect peut conduire à un diagnostic erroné d'infection locale. Si un tel aspect apparaît sur Apligraf®, le médecin doit vérifier tous les signes cliniques d'une infection. Si la suspicion d'infection persiste, le médecin doit procéder aux examens microbiologiques adéquats. Dans le cas d'un ulcère de pied diabétique, une mise en décharge stricte de l'ulcère est recommandée (300).

Lors d'une étude ouverte, contrôlée, prospective, randomisée et multicentrique portant sur 208 patients atteints d'ulcère du pied diabétique depuis au moins 3 semaines, Apligraf® a permis une cicatrisation complète au bout de 12 semaines de 56% des patients traités (n=112) versus 39% (n=96) dans le groupe témoin (pansement standard humide) (p=0,0026). La durée médiane de cicatrisation était de 65 jours avec Apligraf® contre 90 jours dans le groupe témoin (p=0,0026). Le taux de récurrence entre la 12e et la 24e semaine a été comparable entre les groupes. Il est important de noter que les patients ont reçu pendant les 4 premières semaines jusqu'à 5 unités Apligraf® à une semaine d'intervalle (300).

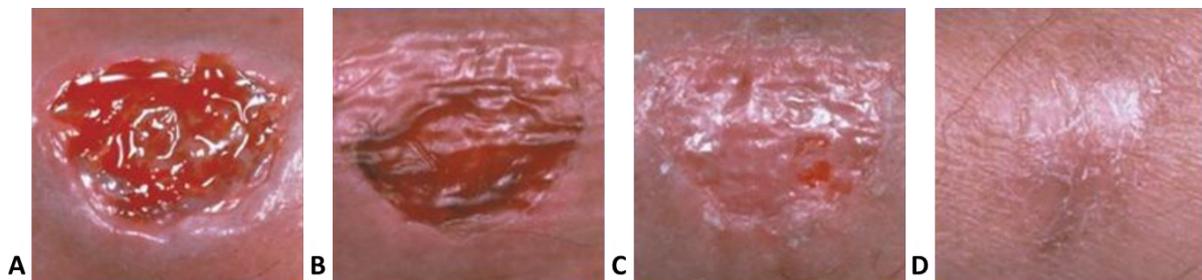


Figure 46 : **Utilisation d'Apligraf® dans le traitement d'un ulcère veineux de la jambe de 4 mois chez un homme de 77 ans.** A) Ulcère non infecté, débridé et nettoyé avant application d'Apligraf®. B) Ulcère 2 semaines après le début du traitement avec d'Apligraf® : on peut observer le produit à l'apparence claire similaire à du Cellophane® sur la plaie. C) Ulcère 3 semaines après le début du traitement d'Apligraf® : la plaie est presque entièrement fermée, la ré-épithélialisation est presque complète. D) Ulcère 6 mois après le début du traitement d'Apligraf® : la plaie est cicatrisée. *Issu de Mark E. Gottlieb (303).*

Lors d'une étude ouverte, contrôlée, prospective et randomisée portant sur 240 patients atteints d'ulcère veineux de jambe de plus de 4 semaines et ne répondant pas de manière adéquate au traitement standard, le protocole Apligraf® avec traitement compressif a permis une cicatrisation complète au bout de 6 mois de 55% des patients traités (n=130) versus 49% (n=110) dans le groupe témoin (pansement actif au zinc avec traitement compressif). La différence n'est ici pas significative avec un p=0,365. La durée moyenne de cicatrisation

complète était de 140 jours avec Apligraf® contre 181 jours dans le groupe témoin. Ici encore, la différence n'est pas significative avec un  $p=0,3916$ . Une analyse statistique plus poussée a néanmoins pu montrer l'avantage du traitement par Apligraf® versus témoin pour les ulcères plus anciens que 6 mois. L'avantage d'Apligraf semble maximal pour les ulcères persistants depuis au moins un an. Il est important de noter que les patients ont reçu pendant les 3 premières semaines jusqu'à 5 unités Apligraf® (300). D'autres études regroupées dans une méta-analyse tendent à démontrer l'efficacité d'un traitement de 12 semaines avec Apligraf® en terme de taux de cicatrisation et de durée de cicatrisation, principalement sur l'indication d'ulcère du pied diabétique (304).

Un substitut de peau Apligraf® coûte entre 1000 et 2000 euros. Des évaluations coût-efficacité ont été effectuées au début des années 2000 et révèlent que bien qu'il soit sensiblement plus cher que les traitements standards, ce traitement peut permettre de réaliser des économies en termes de coût médical direct en considérant une période d'un an car son utilisation permet une diminution du nombre de « jours d'ulcère » et donc une diminution des frais médicaux associés. L'utilisation d'Apligraf® permettrait également une diminution des coûts indirects (opportunités perdues pour le patient). Des facteurs essentiels à l'évaluation du rapport coût-efficacité d'Apligraf® sont le nombre d'unités utilisées par patient (de 1 à 4) et la prise en charge ambulatoire (moins chère) ou non (304,305). Apligraf® semble pris en charge aux USA par la couverture santé Medicare et par les couvertures santé privées.

---

### III-3. PRODUITS EN ESSAI CLINIQUE

---

Après avoir étudié les produits issus de l'IT actuellement commercialisés, il peut être utile d'étudier le futur proche des applications cliniques de l'IT en s'intéressant aux produits actuellement en essais cliniques ou engagés dans un processus d'autorisation. Pour en avoir un aperçu, j'ai effectué une liste de produits issus de l'IT actuellement en essai clinique à partir d'une recherche sur les bases de données publiques américaines ( <https://clinicaltrials.gov/> ) et européennes ( <https://www.clinicaltrialsregister.eu/> ) d'essais cliniques. Pour la base de données américaine (n° NCT), j'ai effectué une recherche avec les termes « tissue engineering » et « tissue engineered » en sélectionnant les filtres « interventional studies » ; « Phase 2, Phase 3 » ; « Funding NIH, U.S. Federal, Industry, Other ». J'ai retenu les essais en actifs, pour lesquels la dernière mise à jour publiée datait de 2020 ou plus et dont les produits étudiés semblaient

correspondre à la définition européenne des produits issus de l'IT. Pour la base de données européenne (n° EudraCT), j'ai effectué une recherche avec les termes « tissue engineered-product » ce qui a permis de sélectionner les produits ayant reçu une classification de produits issus de l'IT de la part du CAT de l'EMA. J'ai appliqué à ma recherche les filtres « Phase 2, Phase 3 » ; « Status Ongoing, Restarted, Temporarily Halted, Trial Now Transitioned ». Les doublons ont été supprimés et la liste des 22 produits obtenus figure dans le tableau 7.

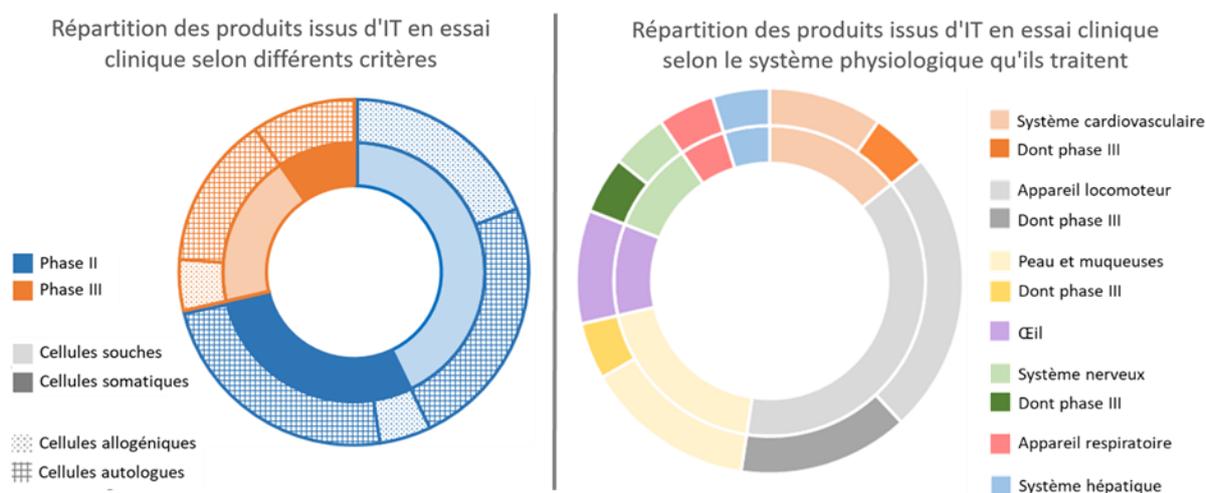


Figure 47 : Répartition de produits issus de l'ingénierie tissulaire actuellement en essai clinique selon leur phase d'essai clinique, l'origine somatique ou souche des cellules qui les composent, leur type autologue ou allogénique, leurs indications classées par système physiologique.

En analysant ces données, on peut observer certaines tendances résumées dans la figure 47. On constate tout d'abord sans surprise que presque trois quarts des produits étudiés n'ont pas dépassé la phase II des essais cliniques, avec parmi ces phases II, un nombre important de produits en réalité en phase précoce I/Ia (première administration chez l'humain).

On constate ensuite une utilisation bien plus importante des cellules souches par ces produits (majoritaire) que par ceux actuellement commercialisés. Cela annonce probablement le début du transfert des nombreuses recherches sur les cellules souches qui ont lieu depuis 25 ans en applications cliniques (cf partie I). Un autre point intéressant à noter est la présence dans cette liste d'un produit utilisant des iPSCs, ce qui peut également indiquer l'émergence de cette technologie à fort potentiel dans les applications cliniques de l'IT bien que le produit ne soit qu'en phase II. On considère également comme produits utilisant des cellules souches les produits n'explicitant pas clairement cette utilisation mais qui ont recours à des cellules stromales de moelle osseuse, de moelle hématopoïétique ou de placenta car l'utilisation du potentiel souche de ces tissus paraît évident.

Que les cellules utilisées soient souches ou somatiques, l'utilisation de cellules autologues demeure majoritaire, en particulier pour les produits en phase III. L'utilisation de cellules autologues facilite la résolution des problèmes de réaction immunitaire et d'intégration des tissus qui peuvent être causés par l'utilisation de cellules allogéniques mais implique une moindre standardisation des produits pouvant entraver leur production à grande échelle ainsi qu'entraîner des coûts de fabrication souvent supérieurs aux produits allogéniques.

Peu d'informations sont disponibles sur le détail des biomatériaux et des procédés de fabrication utilisés. On remarque toutefois deux tendances : l'utilisation importante du collagène d'origine xénogénique ainsi que des matrices décellularisées allogéniques. Un produit utilise des polymères synthétiques et un autre utilise un procédé de FAO bien que ce ne soit pas réellement un procédé de fabrication additif de bioimpression. On voit également 6 produits n'utilisant pas de biomatériaux, souvent administrés par voie centrale, mais qui sont considérés par le CAT comme des produits issus de l'IT en raison de leur mode d'action revendiqué comme régénératif.

Enfin, bien que les produits développés sur des indications de régénération du cartilage et de la peau soient toujours bien représentés, on observe une diversification des indications visées avec plusieurs produits développés pour traiter des troubles osseux, musculaires, cardiovasculaires, nerveux ou oculaires. En revanche, on n'observe toujours pas de produits visant à reproduire des tissus complexes ou des organes entiers synthétiques.

Tableau 7 : Produits issus de l'Ingénierie Tissulaire en essais cliniques de phase 2 ou 3.

| N° NCT/EudraCT                                | Nom                     | Indications  | Source cellulaire   | Biomatériaux   | Pays   | Statut     |
|---|-------------------------|--|---|--|--------|------------|
| NCT0447671                                    | TEVG-2                  | Conduit extracardiaque pour connexion totale cavopulmonaire dans de nombreuses pathologies cardiaques  | Cellules autologues dérivées de la moelle osseuse   | Acide polyglycolique et copolymère de polycaprolactone et de polylactide               | USA    | Phase I/II |
| NCT05081921 ; 2019-005000-17                  | MesoCella-Ortho         | Arthrose avec diabète/obésité  | Cellules souches mésenchymateuses autologues dérivées du tissu adipeux humain   | Acide hyaluronique   | UE     | Phase I/II |
| NCT05234658                                   |                         | Carcinome basocellulaire   | Cellules autologues de peau   | Acide hyaluronique, fibrine, agarose   | UE     | Phase I/II |
| NCT01834326                                   |                         | Troubles de la muqueuse buccale  | Kératinocytes autologues de muqueuse buccale  | MEC décellularisée allogénique   | USA    | Phase I/II |
| NCT01765244 ; 2010-024290-40                  |                         | Ulcères trophiques sévères de la cornée réfractaires au traitement conventionnel ; Séquelles d'ulcères cornéens trophiques antérieurs  | Kératocytes stromaux humains allogéniques et cellules épithéliales humaines allogéniques de cornée.   | Fibrine-agarose nanostructurée   | UE     | Phase I/II |
| NCT03678467                                   | EpiBone                 | Défaut osseux de l'os mandibulaire lié à des tumeurs, traumatismes ou déformations   | Cellules souches mésenchymateuses autologues dérivées du tissu adipeux  | Os xénogénique décellularisé et usiné en 3D à partir des données du CT-scan du patient | USA    | Phase I/II |
| NCT03933072                                   | Glial Neuropatch        | Lésion de la moelle épinière   | Cellules gliales olfactives autologues et fibroblastes olfactifs autologues   | Échafaudage de collagène   | UE     | Phase I/II |
| NCT03174522 ; 2016-000240-34 ; 2016-003980-21 | REX-001 ; Rexmyelocel T | Ulcères ischémiques causés par maladie artérielle périphérique ; Diabète Mellitus ; Diabète de type 1 ; Diabète de type 2 ; Maladie cardiovasculaire ; Ischémie critique des membres | Suspension d'une combinaison de cellules progénitrices et de cellules immunitaires (lymphocytes, monocytes, granulocytes) autologues dérivées de la moelle osseuse et enrichies en globules blancs. | Aucun, classé par le CAT comme produit issu de l'IT                                    | UE     | Phase III  |
| NCT03549299                                   | LSC2                    | Déficit en cellules souches limbiques  | Cellules souches limbiques allogéniques ABCB5-positives   | Aucun, classé par le CAT comme produit issu de l'IT                                    | UE     | Phase I/II |
| NCT04396899 ; 2019-000885-39                  | BioVAT-HF               | Insuffisance cardiaque   | Cardiomyocytes allogéniques dérivés d'iPSCs et de cellules stromales  | Hydrogel de collagène bovin de type I  | UE     | Phase I/II |
| NCT03766217                                   |                         | Chirurgie plastique des fentes labiales et palatines   | Cellules souches mésenchymateuses autologues de pulpe dentaire  | Hydroxyapatite collagène   | Brésil | Phase III  |
| NCT05120700                                   |                         | Lésion du cartilage Blessures du genou   | Fraction vasculaire stromale de membrane synoviale et graisse infrapatellaire du genou blessé (autologue)   | Collagène  | Brésil | Phase I/II |

Tableau 7 (suite) : Produits issus de l'IT en essais cliniques en phase 2 ou 3.

| N° NCT/EudraCT                                | Nom                    | Indication  | Source cellulaire  | Biomatériaux   | Pays        | Statut                  |
|---|------------------------|---|--|--|-------------|-------------------------|
| NCT04435249 ;<br>2019-004939-24               | ENTRUST                | Fistule bronchopleurale   | Cellules stromales mésenchymateuses autologues dérivées de la moelle osseuse   | Échafaudage trachéal humain décellularisé                              | Royaume-Uni | Phase I/II              |
| NCT02230514 ;<br>NCT01605383 ;<br>NCT01552707 |                        | Non-union atrophique d'une fracture ; nécrose avasculaire de la tête du fémur ; spondylolisthésis lombaire impliquant L4-L5, et/ou discopathie dégénérative impliquant L4-L5. | Cellules stromales mésenchymateuses autologues   | Échafaudage de tissu osseux spongieux humain allogénique décellularisé | UE          | Phase I/II              |
| NCT03394612 ;<br>NCT03229564 ;<br>NCT03227146 | DeNovoSkin             | Plaie de la peau de pleine épaisseur ; brûlures partielles du derme profond et brûlures de pleine épaisseur chez l'adulte et l'enfant   | Fibroblastes et kératinocytes autologues   | Hydrogel compressé de collagène bovin                                  | UE          | Phase II/III            |
| 2018-000805-22                                | Neuro-Cells            | Lésions (sub) aiguës de la moelle épinière  | Moelle osseuse autologue appauvrie en érythrocytes et lymphocytes et contenant des cellules souches hématopoïétiques et mésenchymateuses | Aucun, classé par le CAT comme produit issu de l'IT                    | UE          | Phase II/III            |
| 2013-004672-35 ;<br>2017-000956-25            | AMDC                   | Incontinence Fécale ; Incontinence urinaire à l'effort chez la femme  | Cellules myogéniques autologues dérivées d'un muscle   | Aucun, classé par le CAT comme produit issu de l'IT                    | Royaume-Uni | Phase II                |
| 2017-005165-49 ;<br>2020-001857-31            | PLX-PAD ;<br>emiplacel | Lésion musculaire après une arthroplastie pour une fracture de la hanche ; pneumonie ou syndrome de détresse respiratoire aiguë causé par une maladie grave du COVID-19       | Cellules stromales placentaires adhérentes allogéniques  | Aucun, classé par le CAT comme produit issu de l'IT                    | UE          | Phase III ;<br>Phase II |
| 2010-024290-40                                | NOVOCART®              | Défauts de cartilage du genou   | Chondrocytes autologues isolés de biopsie de cartilage   | Éponge bicouche de collagène I bovin contenant du chondroïtine sulfate | UE          | Phase III               |
| 2019-003051-11 ;<br>2018-004449-18            | HepaStem               | Insuffisance hépatique aiguë ou chronique ; stéatohépatite non alcoolique cirrhotique et pré-cirrhotique  | Cellules progénitrices /souches allogéniques humaines dérivées de foies de cadavres  | Aucun, classé par le CAT comme produit issu de l'IT                    | UE          | Phase II                |
| 2018-003890-91                                | BIOOPA                 | Epidermolyse bulleuse ; ulcères veineux chroniques de la jambe ; brûlure au second degré  | Cellules souches mésenchymateuses allogéniques issues de gelée de Wharton  | Matrice de peau allogène décellularisée                                | UE          | Phase II                |

## IV- DISCUSSION ET PERSPECTIVES

---

Après avoir présenté ce qu'est l'ingénierie tissulaire et quelles en sont les applications cliniques, je propose pour conclure cette étude de prendre du recul sur les différents aspects présentés afin de synthétiser les informations et de donner mon analyse de l'état actuel des applications cliniques de l'IT et de leurs perspectives de développement.

---

### IV-1. LES OBJECTIFS DE L'IT

---

Comme nous l'avons vu, l'IT a émergé par la convergence d'avancées scientifiques (connaissances et techniques) issues de différents domaines autour de besoins thérapeutiques non satisfaits (cf. partie I chapitre 1). En raison de cette orientation clinique dès l'origine de l'IT et des nombreuses possibilités d'évolution et de développement qu'elle offre, l'engouement des chercheurs qui développaient cette discipline ainsi que sa surmédiation ont fait naître des espoirs et des attentes démesurées (cf. partie II chapitre 1). Les entreprises issues de cette première vague d'euphorie médiatique et financière ont pour beaucoup disparu et celles qui sont demeurées ont dû rationaliser leurs objectifs et leur fonctionnement. Après quelques réalisations dans le domaine de la peau et du cartilage dans les années 1980-1990, certains évoquaient sans complexes la création *in vitro* de tous types de tissus et d'organes comme débouché principal de l'IT. Ces ambitions furent progressivement réévaluées tandis que la complexité des problèmes scientifiques à résoudre apparaissait de plus en plus grande.

Recréer en laboratoire des tissus et organes vivants, fonctionnels et greffables à l'humain implique selon moi de comprendre et de récapituler en laboratoire le fruit de plusieurs milliards d'années d'évolution. Les obstacles d'ordre technique peuvent être surmontés par l'innovation (cf. Partie I) et le manque de compréhension des processus biologiques par l'accroissement des connaissances, notamment via la recherche fondamentale. On peut penser qu'en assemblant finement par des procédés de fabrication adaptés plusieurs matériaux élémentaires (cellules, biomatériaux, cofacteurs) pour construire une structure ensuite cultivée dans un environnement optimal, un seuil de conditions minimales pourrait être atteint pour que la vie retrouve son chemin et qu'un tissu physiologique fonctionnel se développe dans ces conditions. Tout dépend du degré de mimétisme recherché et des fonctions physiologiques que l'on cherche à reproduire mais il semble en effet qu'un tel seuil existe. Les peaux artificielles

bicouches commercialisées semblent en attester en reproduisant la fonction barrière de la peau bien qu'elles ne présentent pas certaines structures et leurs fonctions associées comme les dermatoglyphes, les poils, les glandes sudoripares, les mélanocytes, etc. Certaines de ces structures et fonctions pourraient apparaître suite à l'intégration du néo-tissu par l'organisme du patient mais pourraient également nécessiter un plus grand degré de raffinement du néo-tissu pour exister. Si le degré de mimétisme visé implique la présence de ces structures dans la peau fabriquée, alors le seuil de conditions minimales requises pour qu'un tel tissu émerge à partir des matériaux et procédés mis en place n'est pas encore accessible.

Pour des tissus et organes plus complexes, ce seuil semble encore loin d'être atteint. La diversité des types cellulaires présents et la complexité de leur organisation nécessitent un niveau de connaissances et de compétences permettant de les reproduire en laboratoire afin qu'ils puissent remplir leurs fonctions physiologiques complexes une fois implantés. Compétences et connaissances que nous n'avons pas.

La production de tous les types d'organes et de tissus fonctionnels par IT est selon moi un objectif utopique car il nécessite une infinité de progrès scientifiques issus de nombreux domaines scientifiques. Il n'est cependant pas inutile de le poursuivre car il est un moteur de la recherche dans ce domaine et il implique la réalisation de nombreux objectifs intermédiaires atteignables et pouvant bénéficier à la santé des populations. Cet objectif utopique souvent mis en avant dans la littérature ne représente cependant pas l'unique moyen d'apporter de nouvelles solutions thérapeutiques issus de l'IT aux patients.

Si l'on reprend la définition de l'UE des produits issus de l'IT (cf. partie II chapitre 2), la finalité de remplacement de tissu vient en dernier et est précédée de celles de régénération et réparation des tissus. Ces manières de soigner par IT sont déjà largement représentées parmi les produits disponibles aujourd'hui. On peut citer les substituts temporaires de peau disponibles ou en essai clinique et également les cellules souches administrées par voie centrale pour régénérer un organe particulier (Tableaux 6 et 7). On peut également parler de nombreux produits qui, conceptuellement, sont du ressort de l'IT sans forcément correspondre strictement à la définition européenne que j'ai choisi d'utiliser dans le chapitre 3 de la partie II. Des produits acellulaires ou dont les cellules sont non viables, composés de biomatériaux et éventuellement de cofacteurs, sont à ce sujet particulièrement intéressants. De nombreux produits de ce type sont développés et commercialisés et sont souvent classés dans la

littérature parmi les produits issus de l'IT. Pour des applications cutanées, ils peuvent prendre la forme de pansements sophistiqués (306) (ce qui les rapprochent beaucoup de certains produits cellulaires), pour des applications osseuses il peut s'agir de ciments ostéomimétiques et ostéogéniques (307), pour des applications ophtalmiques cela peut donner des cornées artificielles (308), etc. Cette manière de soigner par IT est peu développée dans ce travail mais est très intéressante car elle illustre l'idée que l'innovation en la matière provient de différents vecteurs et que même lorsqu'elle n'est pas motivée par l'objectif de créer un tissu ou organe artificiel, elle peut y concourir. La conception de solutions acellulaires à base de biomatériaux innovants qui favorisent l'intégration, la colonisation cellulaire, le remodelage et *in fine* la régénération des tissus fait par exemple progresser la compréhension des interactions cellules-matrices et posent les bases de produits cellulaires plus aboutis grâce à des biomatériaux plus perfectionnés et adaptés.

---

## IV-2. LES DEFIS SCIENTIFIQUES

---

Dans l'objectif de produire des médicaments issus de l'IT, les nombreux progrès scientifiques des dernières décennies seront utiles et certains ont été présentés dans la partie I de ce travail. L'efficacité et la preuve de l'efficacité de ces médicaments est un axe majeur du travail scientifique qui doit être mené afin qu'ils puissent se développer et s'imposer dans l'arsenal thérapeutique. Un long chemin reste à parcourir sur le plan scientifique, en particulier pour atteindre l'objectif original de produire des tissus synthétiques greffables à l'humain.

### IV-2.1. BIOMATERIAUX

---

D'un point de vue scientifique, les biomatériaux constituent selon moi l'un des principaux obstacles au développement de l'IT. La quantité et la complexité des paramètres à maîtriser pour fournir des échafaudages adaptés pour chaque tissu et chaque type cellulaire sont énormes (cf. partie I chapitre 2). Au-delà des paramètres physiques et structuraux, les paramètres chimiques et de fonctionnalisations nécessaires à l'amélioration de la bioactivité des biomatériaux semblent encore loin d'être maîtrisés malgré l'apparition des biomatériaux intelligents. Des problèmes relatifs au contrôle de leur biorésorbabilité restent également à résoudre. Un biomatériau ou un procédé de fabrication peut être idéal pour optimiser un ou

plusieurs paramètres mais doit être combiné avec d'autres pour qu'un ensemble de paramètres soient optimaux, ajoutant de la complexité à chaque association. Dans cette optique, l'utilisation de MEC décellularisée est très intéressante car elle semble résoudre le problème en fournissant aux cellules leur environnement natif qui serait par définition idéal. Cet avantage qu'offrent ces biomatériaux par rapport aux autres classes est réel mais doit être nuancé par de nombreux inconvénients. L'approvisionnement en matière première peut poser problème du point de vue de la disponibilité ou de l'éthique, qu'ils s'agissent de produits allogénique ou xénogénique. Ces biomatériaux peuvent également présenter des risques quant à leur innocuité. Enfin, ils semblent offrir une souplesse moindre en termes de fonctionnalisation, d'ensemencement ou de mise en forme.

#### IV-2.2. CELLULES

---

Un deuxième obstacle scientifique au développement de l'IT se trouve au niveau de la composante cellulaire (cf. partie I chapitre II). L'utilisation des cellules souches telles qu'elles ou comme source de cellules différenciées offre de nombreuses possibilités et permet en théorie de surmonter des obstacles inhérents à l'utilisation des cellules somatiques (difficulté d'approvisionnement et limites à leur manipulation *in vitro*). Les cellules souches représentent a priori l'avenir de cette composante cellulaire de l'IT mais posent également des problèmes qui doivent être résolus. L'approvisionnement en cellules souches est complexe. Les cellules souches adultes facilitent l'approche autologues mais la quantité de cellules disponibles par patient est faible, quand bien même différents tissus sources de CSA émergent, quand bien même elles peuvent être amplifiées *in vitro* dans une certaine mesure.

Les cellules souches embryonnaires sont celles qui sont étudiées depuis le plus longtemps et sont probablement les mieux connues. Elles semblent, de par leur origine, plus adaptées à un usage allogénique. Leur utilisation à des fins de recherche est assez compliquée car strictement encadrée et restreinte dans la plupart des pays pour des raisons éthiques. Leur utilisation à des fins de productions de thérapies semblent donc encore plus compliquée, d'autant plus que la nature de leur approvisionnement le rend difficilement extensible. Des banques de CSE pourrait être mises en place pour régler ce problème mais ne résoudraient pas le problème éthique.

Les cellules souches pluripotentes induites et les cellules transdifférenciées sont les plus récentes. Elles semblent à plusieurs égards les plus prometteuses mais sont également celles qui présentent le plus d'inconnues. Leur origine semble pouvoir régler le problème de l'approvisionnement et on peut imaginer un usage autologue ou allogénique. On sait aujourd'hui en créer à partir de nombreux types cellulaires et les différencier en de nombreux autres. Leur devenir dans l'organisme à long terme est, comme on l'a vu, peu connu et peut donc présenter un risque important, en particulier de cancérogénicité, limitant encore leur utilisation en thérapeutique. Ce risque implique de nombreux contrôles pour être maîtrisé et pourrait ainsi limiter leur utilisation dans une approche autologue. Comme pour les autres types de cellules souches, l'approche allogénique faciliterait la standardisation des produits qui en seraient issus et donc la maîtrise de leurs coûts de production. Mais comme pour les autres types de cellules souches, l'approche allogénique pose le problème de la compatibilité des cellules ou tissus créés avec ceux du patient greffé et génère un risque de rejet. Plusieurs éléments mentionnés dans le chapitre 2 de la partie I tels que la constitution de banque de cellules ou la modification génétique du système HLA des cellules greffées pourraient potentiellement permettre de surmonter cet obstacle mais ne sont pas encore opérationnels pour l'usage thérapeutique.

Les avancées rapides de la science dans le domaine des cellules souches rendra probablement possible dans la décennie à venir leur accès à une échelle plus large qu'aujourd'hui. Cette maturité technologique qui semble proche ne suffira cependant pas à ce que les cellules souches soient largement utilisées en thérapeutique. Savoir produire n'est pas synonyme de savoir utiliser. Leurs bénéfices cliniques devront être attestés et elles devront souvent être intégrées à d'autres technologies pour pouvoir montrer leur intérêt, en particulier pour les produits issus de l'IT. On observe d'ailleurs que hormis les produits développés pour traiter des troubles osseux ou du cartilage, la majorité des thérapies à base cellules souches commercialisées ou en développement (cf. partie II chapitre 3) revendiquent un mode d'action basé sur la sécrétion de cytokines (favorisant la régénération tissulaire ou régulant l'inflammation) par des cellules avec une faible durée de vie plutôt que sur leur intégration à l'hôte et l'utilisation de leur potentiel prolifératif et de leur multipotence. Dans ces produits, les cellules souches sont peu intégrées à des biomatériaux car leur devenir au sein de ceux-ci est encore mal maîtrisé.

### IV-2.3. PROCÉDES DE FABRICATION ET INTEGRATION DES MATERIAUX

---

Enfin, un dernier obstacle scientifique majeur au développement plus large d'applications cliniques de l'IT est selon moi l'immaturation des procédés de fabrication qui jouent un rôle prédominant dans l'intégration des différentes technologies. Des procédés simples sont maîtrisés pour fabriquer des tissus simples et composés de peu de biomatériaux différents et de peu de types cellulaires différents. Pour des tissus plus complexes, des procédés de fabrication avancée plus complexes permettant une intégration plus complexe et étroite des différents matériaux sont développés mais encore au stade expérimental (cf. partie I chapitre II). S'ils semblent permettre d'affiner et d'automatiser la fabrication des tissus simples, ils n'offrent pas encore de solution aboutie pour les tissus complexes mais ouvrent seulement des pistes de réflexion. Certaines technologies de bio-impression 3D permettent par exemple l'impression multi-encre en recherche, chaque encre étant composée d'un ou plusieurs types cellulaires associés à un biomatériau. La fabrication de tissus multicellulaires complexes peut alors être envisagée mais se heurte encore à des problématiques de finesse d'impression, de tenue des structures épaisses et de survie cellulaire. En effet, pour la majorité des tissus au-delà d'une certaine taille se pose la question de l'approvisionnement des cellules en oxygène et nutriments. La solution la plus envisagée est celle du biomimétisme avec la fabrication et l'intégration de vaisseaux sanguins qui faciliteraient l'intégration du tissu à son hôte et permettraient la continuité de son système vasculaire. Cette vascularisation est très complexe à mettre en place et même si des solutions de fabrication de vaisseaux sanguins émergent, leur intégration à des tissus complexes et leur viabilité à long terme sont encore loin d'être suffisamment maîtrisées pour pouvoir envisager une utilisation clinique (309). Il en va de même pour l'intégration du système nerveux au sein des tissus (310).

Ces trois types de défis scientifiques que j'ai pu identifier et résumer reprennent en réalité les différents points abordés dans le chapitre 2 de la partie I. Il est important de noter qu'une percée scientifique majeure bénéfique à l'IT pourrait provenir d'un autre domaine scientifique que ce travail ne mentionne pas ou peu (nanotechnologie, génie génétique, etc.). Si des avancées scientifiques pourraient permettre de créer des médicaments issus de l'IT plus complexes et plus efficaces, elles ne seront pas suffisantes pour permettre l'avènement d'une industrie de l'IT forte et durable. De nombreuses problématiques autres doivent être intégrées : preuve d'efficacité et maîtrise des risques, maîtrise des procédés de fabrication et

de leur coût, mise en place de chaîne de sous-traitance, accompagnement de l'évolution du secteur par des adaptations réglementaires, remboursement des thérapies par les différents organismes, rentabilité économique etc.

---

### IV-3. LES DEFIS ECONOMIQUES ET REGLEMENTAIRES

---

#### IV-3.1. MAITRISER LA PRODUCTION

---

Dans le chapitre 1 de la partie II, on voit qu'au lancement des premiers produits issus de l'IT aux USA, les procédés de fabrication étaient inadaptés par rapport au modèle économique envisagé et ne permettaient pas d'atteindre la rentabilité. Dans un second temps et après une restructuration des entreprises, une partie des frais alloués par celles-ci aux activités de R&D a été réorientée vers la consolidation et l'optimisation des activités de production des thérapies existantes. Le secteur de production de thérapies issues d'IT est un secteur de haute technologie qui fait appel à plusieurs types de technologies innovantes et récentes. De ce fait, il n'existe pas toujours le tissu industriel et l'écosystème économique dans lequel les entreprises d'IT peuvent s'insérer afin de mettre en place une activité de production viable. Il faut souvent le construire et le stimuler avec des commandes issues de l'exploitation d'un marché avec des produits adaptés. Pour être adapté, un produit doit notamment avoir un prix en adéquation avec son utilité et sa valeur perçue qui sont, dans le cas des produits de santé, corrélées avec son rapport bénéfice/risque et son remboursement. Pour réduire le prix d'un produit, des économies d'échelle peuvent être réalisées mais impliquent également la présence d'un écosystème économique et de production adapté. Ces facteurs sont donc interdépendants (270).

La maîtrise des coûts de production passe aussi par le transfert des technologies issues de l'activité de recherche vers l'activité de production industrielle. Les choix technologiques faits en amont doivent être compatibles avec le changement d'échelle et des outils de production adaptés doivent être disponibles. Comme pour tous produits, la production de médicaments issus de l'IT doit coûter à l'entreprise un prix suffisamment inférieur à celui de vente pour lui permettre de couvrir ses autres coûts, de dégager une marge pouvant être réinvestie dans l'entreprise et de rémunérer les investisseurs. La production de ces médicaments doit

également permettre au produit de répondre aux critères de sécurité et de qualité supérieurs des produits de santé. Les médicaments issus de l'IT sont à la fois des produits biologiques et des produits issus de technologies innovantes. Ces deux caractéristiques complexifient chacun des éléments ci-dessus du passage de la R&D à la production à des coûts maîtrisés (270,289,311). Concevoir une thérapie et la produire à large échelle en maîtrisant les coûts associés sont deux choses différentes. L'avènement des anticorps monoclonaux en thérapeutique a, par exemple, été retardé par rapport à ce que beaucoup d'analystes envisageaient dans les années 1980 en partie à cause de ce type de difficultés (274). On constate qu'aujourd'hui, de nombreux produits issus de l'IT proviennent de quelques technologies et travaux de recherches des années 1980, dont le transfert vers la thérapeutique a eu lieu dans les années 1990 et dont les procédés de fabrication et les coûts ont été maîtrisés dans les années 2000. C'est le cas de la plupart des médicaments issus de l'IT destinés à traiter le cartilage et la peau dont les technologies proviennent majoritairement des USA et pour lesquels des licences d'exploitation sont accordées, notamment en Asie, ou alors pour lesquels la technologie est améliorée par des entreprises concurrentes qui n'en changent toutefois pas le concept général. Ce faible nombre de produits réellement innovants arrivant sur le marché peut en partie s'expliquer par la crainte des coûts nécessaires à la création et l'optimisation d'un nouvel outil de production et de nouveaux processus.

### **IV-3.2. ADAPTER LA REGLEMENTATION**

---

Comme nous l'avons vu dans les chapitres 1 et 2 de la partie II, des adaptations réglementaires ont été nécessaires pour permettre d'encadrer les médicaments issus de l'IT pour lesquels les réglementations classiques existantes étaient inadaptées en raison de la composition complexe de ces thérapies. Ces réglementations spécifiques doivent trouver l'équilibre entre souplesse permettant à l'innovation d'atteindre le patient et rigueur garantissant la qualité et la sécurité d'utilisation. L'approche basée sur le risque est à cet égard intéressante car elle permet de s'adapter à chaque cas. Des mesures incitatives et d'aide ont également été mises en place dans divers pays pour favoriser l'arrivée de ces produits innovants sur le marché.

Il reste cependant du travail à accomplir sur cet aspect réglementaire. Par rapport aux autres classes de produits de santé, les médicaments issus de l'IT présentent un moindre degré de

normalisation réglementaire au niveau international ce qui peut freiner le développement du secteur. C'est également vrai pour les matières premières servant à la fabrication de ces médicaments pour lesquelles il existe un certain flou sur les critères de qualité requis et sur les marquages les garantissant. Pour ce qui est de l'UE, l'autorisation centralisée pour les MTI permet aux entreprises d'accéder à un marché plus vaste avec une seule procédure ce qui peut les inciter à investir sur ce marché et doit permettre à une large population d'accéder à des thérapies innovantes. Des imperfections demeurent cependant et peuvent parasiter cette mesure comme l'interprétation allemande de l'exemption hospitalière qui peut fausser la donne (cf. partie II chapitre 2).

Les médicaments issus de l'IT sont hétérogènes dans leur composition et leurs procédés de fabrication. La réglementation européenne essaye de prendre en compte cette caractéristique, notamment avec la classe des MTI combinés. Cette réglementation pourrait toutefois se révéler inadaptée pour permettre à de nouveaux produits issus de l'IT incluant de nouvelles technologies d'arriver sur le marché. On peut imaginer un produit d'IT au format personnalisé, composé de cellules autologues et d'un biomatériau composite complexe, bioimprimé en 3D directement dans les tissus du patient. Le biomatériau pourrait être considéré comme un dispositif médical et nécessiter un marquage CE, la modification des cellules et leur association au biomatériau nécessiterait une autorisation en tant que MTI combiné, le matériel pour la bioimpression 3D *in situ* serait également considéré comme un ou plusieurs dispositifs médicaux nécessitant un marquage CE. On pourrait alors se demander dans quelle mesure une entreprise pourrait supporter les coûts et les risques d'échec liés à la demande de multiples autorisations de mises sur le marché pour un seul produit au final. Il apparaît donc que cette réglementation spécifique des médicaments issus de l'IT devra probablement encore évoluer pour soutenir l'accès à l'innovation, dans une mesure supérieure aux évolutions réglementaires liées à l'innovation dans le secteur pharmaceutique classique par exemple.

### IV-3.3. PROUVER L'EFFICACITE

---

Un autre enjeu pour le développement d'applications cliniques de l'ingénierie tissulaire réside dans leur intérêt relatif. Ces thérapies complexes et innovantes coûtent cher à développer et à produire et leur prix de vente est donc élevé et pourrait être amené à augmenter encore au fur et à mesure de leur complexification. Le caractère innovant de ses

thérapies ne peut justifier à lui seul leur achat. Elles doivent également montrer un intérêt pour les patients (relativement à ce qui existe déjà) proportionnel à leur surcoût. Celui-ci peut passer par le traitement de pathologies pour lesquelles aucun traitement n'existe ou alors par une efficacité supérieure par rapport aux thérapies existantes. Si on regarde aujourd'hui les médicaments issus d'IT indiqués pour des pathologies pour lesquelles des alternatives existent, leur supériorité par rapport à ces alternatives n'est pas évidente pour la majorité d'entre eux. Dans quelles mesures les futurs produits issus de l'IT pourront justifier leurs coûts élevés par une efficacité et une sécurité élevée ? Dit autrement, l'IT pourra-t-elle concrétiser son potentiel de révolution thérapeutique par rapport à d'autres type de traitements qui progressent également ?

#### IV-3.4. OBTENIR UN REMBOURSEMENT

---

Cette question en appelle logiquement une autre : quelle est la capacité des organismes de remboursement des frais médicaux à prendre en charge le coût de ces thérapies ? Pour reprendre le cas des médicaments issus de l'IT actuellement disponibles et pour lesquels il existe des alternatives, on constate que dans beaucoup de pays, on juge souvent qu'ils ont une certaine efficacité mais qu'ils améliorent faiblement le service médical rendu, (critère d'évaluation de la HAS) et ils sont donc rarement remboursés ou faiblement remboursés. En l'absence de remboursement, ces produits sont quasiment inaccessibles pour les patients qui voudraient néanmoins en bénéficier (en accord avec leur médecin). Surtout, ces produits, voire les entreprises qui les produisent, sont condamnés à disparaître car ils ne génèrent aucun revenu. Quand bien même un produit améliorerait le service médical rendu, dans quelle mesure les organismes de remboursement seraient prêts à payer cette amélioration ? Au sein même de l'UE, chaque État utilise une méthode différente pour répondre à cette question qui implique des interrogations éthiques et philosophiques. Faut-il fixer un prix maximal à une unité d'amélioration de santé ? Si oui, comment fait-on pour le fixer et quel est ce prix maximal. Si non, quelle est la méthode alternative utilisée pour statuer. Ces enjeux ne sont pas propres aux médicaments issus de l'IT mais seront déterminants pour leur développement.

Le cas particulier des pathologies orphelines et/ou graves sans traitement disponible est intéressant car elles bénéficient souvent de mesures incitatives supplémentaires comme la désignation de médicament orphelin en UE ou RMAT aux USA. De plus, les procédures

d'autorisation nécessitent un niveau de preuve inférieur au niveau des essais cliniques (durée et taille) et les autorités acceptent un risque supérieur au vu des bénéfices attendus pour les patients. Ces pathologies permettent plus facilement aux traitements développés d'être remboursés, même à des prix très élevés, dès lors qu'ils sont efficaces. Il est ainsi courant de voir des innovations arriver en premier lieu sur le marché sur ce type d'indications car elles permettent aux entreprises d'être accompagnées dans leur développement et d'acquérir un savoir-faire technique et sur certaines fonctions support (qualité, réglementaire, etc.) tout en limitant les pertes financières via la vente d'une petite quantité de médicaments à un prix élevé. Cette stratégie est particulièrement intéressante pour les médicaments issus de l'IT en raison des caractéristiques déjà évoquées. On constate d'ailleurs qu'en France, sur les 4 médicaments issus de l'IT disponibles ou l'ayant été, Holoclar® est le seul à avoir eu un avis favorable à son remboursement de la part de la HAS et qu'il également le seul à être un médicament orphelin (312).

---

#### IV-4. QUELQUES PISTES D'EVOLUTION

---

Avec ces différents éléments, on comprend que la réalisation du potentiel thérapeutique de l'IT est aujourd'hui assez faible et que de nombreux défis devront être surmontés pour aller plus loin. Les entreprises pionnières du secteur ont modifié leur modèles suite à la période difficile du début des années 2000 et quelques enseignements peuvent en être tirés.

Le secteur public est à l'origine de très nombreuses innovations et c'est également vrai pour l'IT. Une coopération accrue entre public et privé serait sans nul doute bénéfique à l'IT et à la recherche translationnelle dans ce domaine.

La prise en compte précoce dès les premières phases de la recherche des contraintes liées à l'usage chez l'humain et à l'industrialisation des innovations développées peut mener à plus de réussite dans leur translation vers la clinique.

L'investissement privé qui finance souvent les phases suivantes de recherche (préclinique et clinique) ainsi que la production et la commercialisation des produits sont, comme on l'a évoqué, assez inadaptées à financer des projets à risques ne pouvant générer des bénéfices qu'à long terme. Les entreprises du secteur doivent donc se fixer des objectifs réalisables à

court terme voir moyen terme et générant des profits pour pouvoir se développer et envisager des projets de plus long terme. Cela leur permettrait de réinvestir une partie de leurs éventuels bénéfices dans la production de nouvelles innovations et de lever de nouveaux fonds auprès d'investisseurs plus confiants. Parmi ces objectifs intermédiaires se trouve la production compétitive de thérapies basées sur des technologies déjà existantes comme c'est par exemple le cas actuellement pour les médicaments issus de l'IT traitant la peau et le cartilage.

Un autre type de produits relais plus facilement accessible et prometteur à court ou moyen terme se trouve dans le domaine des applications non cliniques de l'IT. Comme présenté dans le chapitre 3 de la partie I, l'IT a rapidement présenté un intérêt au-delà de sa vocation première d'innovation dans le domaine thérapeutique. Sans entrer dans les détails, il semble qu'il existe un réel besoin dans le domaine de la recherche fondamentale et de la recherche préclinique, voire du diagnostic, pour des modèles d'études et de test plus perfectionnés. L'IT propose des innovations pouvant répondre à ces besoins et en développe de nouvelles en permanence. Un avantage de ce type d'applications est qu'elles peuvent susciter un intérêt important auprès de leur clientèle cible à partir d'un degré de complexité technologique moins élevé et plus accessible que ce qui est nécessaire pour les médicaments issus de l'IT. Un autre avantage est qu'elles présentent une complexité et des contraintes de développement, de production et de commercialisation inférieures à celle des applications cliniques car elles ne sont pas directement destinées à soigner l'humain. En raison de cette finalité différente, elles présentent des risques inférieurs et exigent des niveaux de preuve de leur qualité, de leur sécurité et de leur efficacité plus faibles. Enfin, les produits issus d'IT à vocation non clinique s'adressent à des entreprises ou des organismes de recherche qui n'ont pas les mêmes contraintes économiques que les individus et les organismes de remboursement auxquelles s'adressent les produits à vocation thérapeutique. Des entreprises commercialisent déjà ce type de modèles issus de l'IT en parallèle du développement voir de la commercialisation de médicaments issus de l'IT. Le développement et la commercialisation de ces produits à vocation non clinique leur permettent de générer des revenus pour financer le développement de produits thérapeutiques et leur permettent également d'acquérir dans différents secteurs, scientifiques ou non, un savoir-faire utile au développement de leur produits thérapeutiques.

## CONCLUSION

---

L'ingénierie tissulaire est un domaine de recherche jeune et transversal. Dans la première partie de ce travail, j'ai présenté de manière synthétique son fort potentiel à travers l'étude de son histoire et des principaux éléments qui le composent. Cette première partie fournit également des éléments de compréhension afin de mieux évaluer et analyser les enjeux scientifiques et technologiques de ce domaine, en particulier dans l'optique du développement de médicaments issus de l'IT et par rapport aux premiers espoirs formulés. Dans la deuxième partie de ce travail, je fournis certains éléments permettant de recontextualiser l'apparition de ces premiers espoirs et d'expliquer leur déception relative, à l'époque de la naissance du secteur économique des applications cliniques de l'IT. Cette partie permet également d'aborder les obstacles que ce secteur a rencontrés, la composition qualitative et quantitative de l'offre actuelle de médicaments issus de l'IT et l'environnement réglementaire dans lequel ils s'inscrivent. Malgré les nombreux défis auxquels il doit faire face, ce domaine scientifique et ses applications cliniques ont selon moi un avenir prometteur mais qui nécessitera de la patience pour pouvoir être apprécié. Je trouve ce domaine particulièrement intéressant car de par sa transversalité, il récapitule ce qu'il est possible de faire à un instant donné dans différents domaines scientifiques, tant au niveau technique que des connaissances. Ce domaine m'intéresse également car, de par sa vocation à recréer des tissus ou organes, c'est un domaine de recherche appliquée.

## BIBLIOGRAPHIE

---

1. Comte A, Dupouey P. Cours de philosophie positive. Paris: Nathan; 1989. (Les Intégrales de philo).
2. Berthiaume F, Maguire TJ, Yarmush ML. Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges. *Annu Rev Chem Biomol Eng.* 15 juill 2011;2(1):403-30.
3. Linden PK. History of Solid Organ Transplantation and Organ Donation. *Critical Care Clinics.* janv 2009;25(1):165-84.
4. Crubzy E, Murail P, Girard L, Bernadou JP. False teeth of the Roman world. *Nature.* janv 1998;391(6662):29-29.
5. Johnson WW. The history of prosthetic dentistry. *The Journal of Prosthetic Dentistry.* sept 1959;9(5):841-6.
6. Hunter J. Natural history of the human teeth : explaining their structure, use, formation, growth, and diseases : illustrated with copper-plates. In: J. Johnson. London; 1771.
7. Bunker C. Gelungener versuch einer nasenbildung aus einem vollig getrennten hautstuck aus dem beine. *J Chir Augenheilk.* 1823;4:569.
8. Vacanti JP, Vacanti CA. The History and Scope of Tissue Engineering. In: Principles of Tissue Engineering [Internet]. Elsevier; 2014 [cité 22 juin 2021]. p. 3-8. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012398358900001X>
9. Ministère de la santé. Plan 2017-2021 pour la greffe d'organes et de tissus. LUCIOLE. mai 2017;74.
10. Coulomb D. Privilégier la greffe de rein vivant, même en cas d'incompatibilité HLA. 10 mars 2016; Disponible sur: <https://www.lequotidiendumedecin.fr/specialites/chirurgie/privilegier-la-greffe-de-rein-vivant-meme-en-cas-dincompatibilite-hla>
11. Barry L, Jeanne M, Martinot-Duquennoy V, Pasquesoone L. Greffes de peau chez les patients brûlés : principes et techniques. *Revue Francophone de Cicatrisation.* avr 2019;3(2):26-31.
12. Zain S, Cian O' CL, David M, Bryan L. Acute Mechanical Valve Thrombosis in the Setting of Unusual Aetiology. *Int J Clin Cardiol* [Internet]. 30 juin 2018 [cité 30 juin 2021];5(2). Disponible sur: <https://www.clinmedjournals.org/articles/ijcc/international-journal-of-clinical-cardiology-ijcc-5-119.php?jid=ijcc>
13. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science.* 14 mai 1993;260(5110):920-6.
14. Chandra PK, Soker S, Atala A. Tissue engineering: current status and future perspectives. In: Principles of Tissue Engineering [Internet]. Elsevier; 2020 [cité 22 juin 2021]. p. 1-35. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128184226000046>
15. Green H, Kehinde O, Thomas J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Natl Acad Sci U S A.* nov 1979;76(11):5665-8.
16. Bell E, Ehrlich HP, Buttle DJ, Nakatsuji T. Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science.* 6 mars 1981;211(4486):1052-4.
17. Yannas IV, Burke JF, Orgill DP, Skrabut EM. Wound tissue can utilize a polymeric template to synthesize a functional extension of skin. *Science.* 8 janv 1982;215(4529):174-6.
18. Wolter JR, Meyer RF. Sessile macrophages forming clear endothelium-like membrane on inside of successful keratoprosthesis. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1984;82:187-202.
19. Skalak R, éditeur. Tissue engineering: proceedings of a workshop held at Granlibakken, Lake Tahoe, California, February 26 - 29, 1988. New York, NY: Liss; 1988. 343 p. (UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology).
20. Tissue engineering. Selected papers from the UCLA Symposium of Tissue Engineering. Keystone, Colorado, April 6-12, 1990. *J Biomech Eng.* mai 1991;113(2):111-207.
21. AAP News. 2013 AAP Award Winners. oct 2013;34(10). Disponible sur: <https://www.aappublications.org/content/34/10/34.5>
22. Science History Institute. Robert S. Langer [Internet]. Disponible sur: <https://www.sciencehistory.org/historical-profile/robert-s-langer>
23. Vacanti C. The history of tissue engineering. *J Cell Mol Med.* 19 sept 2006;1(3):569-76.
24. Food and Drug Administration. Premarket Approval of « Organogenesis Apligraf » [Internet]. P950032 déc 17, 1998. Disponible sur: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfp/pma/pma.cfm?id=P950032>
25. Genzyme. Epicel cultured epidermal autografts - Directions for Use [Internet]. Disponible sur:

[https://www.accessdata.fda.gov/cdrh\\_docs/pdf/H990002c.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf/H990002c.pdf)

26. Food and Drug Administration, Alpert S. Premarket approval of « Integra Artificial Skin » [Internet]. P900033 mars, 1996 p. 2. Disponible sur: <https://www.integralife.com/file/general/1595965401.pdf>

27. Martin-Piedra MA, Santisteban-Espejo A, Moral-Munoz JA, Campos F, Chato-Astrain J, Garcia-Garcia OD, et al. An Evolutive and Scientometric Research on Tissue Engineering Reviews. *Tissue Engineering Part A*. 1 mai 2020;26(9-10):569-77.

28. McIntire LV. WTEC Panel Report on Tissue Engineering Research. [Internet]. Burlington: Elsevier; 2002 [cité 24 juin 2021]. Disponible sur: <http://public.ebookcentral.proquest.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=305686>

29. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 25 août 2006;126(4):663-76.

30. Gu Z, Fu J, Lin H, He Y. Development of 3D bioprinting: From printing methods to biomedical applications. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. sept 2020;15(5):529-57.

31. Landers R, Hübner U, Schmelzeisen R, Mülhaupt R. Rapid prototyping of scaffolds derived from thermoreversible hydrogels and tailored for applications in tissue engineering. *Biomaterials*. déc 2002;23(23):4437-47.

32. Wilson WC, Boland T. Cell and organ printing 1: Protein and cell printers. *Anat Rec*. juin 2003;272A(2):491-6.

33. Daar AS, Greenwood HL. A proposed definition of regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med*. mai 2007;1(3):179-84.

34. Khademhosseini A, Langer R. A decade of progress in tissue engineering. *Nat Protoc*. oct 2016;11(10):1775-81.

35. Bochenek MA, Veiseh O, Vegas AJ, McGarrigle JJ, Qi M, Marchese E, et al. Alginate encapsulation as long-term immune protection of allogeneic pancreatic islet cells transplanted into the omental bursa of macaques. *Nat Biomed Eng*. nov 2018;2(11):810-21.

36. Cilento BG, Freeman MR, Schneck FX, Retik AB, Atala A. Phenotypic and Cytogenetic Characterization of Human Bladder Urothelia Expanded in Vitro. *Journal of Urology*. août 1994;152(2 Part 2):665-70.

37. Horch RE, Kopp J, Kneser U, Beier J, Bach AD. Tissue engineering of cultured skin substitutes. *J Cellular Mol Med*. juill 2005;9(3):592-608.

38. Green H. The birth of therapy with cultured cells. *Bioessays*. sept 2008;30(9):897-903.

39. Briscoe DM, Dharnidharka VR, Isaacs C, Downing G, Prosky S, Shaw P, et al. The allogeneic response to cultured human skin equivalent in the hu-PBL-SCID mouse model of skin rejection. *Transplantation*. 27 juin 1999;67(12):1590-9.

40. Bianco P, Robey PG. Stem cells in tissue engineering. *Nature*. 1 nov 2001;414(6859):118-21.

41. Toute l'UE 2: la cellule et les tissus PACES cours + QCM. 2e éd. Issy-les-Moulineaux: Elsevier Masson; 2018.

42. Guo X, Bai Y, Zhang L, Zhang B, Zagidullin N, Carvalho K, et al. Cardiomyocyte differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: new regulators and its implications. *Stem Cell Res Ther*. 26 févr 2018;9:44.

43. Al-Himdani S, Jessop ZM, Al-Sabah A, Combella E, Ibrahim A, Doak SH, et al. Tissue-Engineered Solutions in Plastic and Reconstructive Surgery: Principles and Practice. *Front Surg* [Internet]. 23 févr 2017 [cité 15 sept 2021];4. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fsurg.2017.00004/full>

44. Thomson JA. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*. 6 nov 1998;282(5391):1145-7.

45. Inserm. Cellules souches embryonnaires humaines - Un formidable outil pour la recherche biomédicale [Internet]. 2017. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/dossier/cellules-souches-embryonnaires-humaines/>

46. Ministère des solidarités et de la santé. La recherche sur embryon et cellules souches embryonnaires [Internet]. 2019. Disponible sur: <https://solidarites-sante.gouv.fr/grands-dossiers/bioethique/le-cadre-juridique-avant-le-projet-de-loi/article/la-recherche-sur-embryon-et-cellules-souches-embryonnaires>

47. Darr H, Benvenisty N. Human embryonic stem cells: the battle between self-renewal and differentiation. *Regenerative Medicine*. mai 2006;1(3):317-25.

48. Keller G. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes & Development*. 15 mai 2005;19(10):1129-55.

49. Tannenbaum SE, Tako Turetsky T, Singer O, Aizenman E, Kirshberg S, Ilouz N, et al. Derivation of Xeno-Free and GMP-Grade Human Embryonic Stem Cells – Platforms for Future Clinical Applications. Pera M, éditeur. *PLoS ONE*. 20 juin 2012;7(6):e35325.

50. Ausubel LJ, Lopez PM, Couture LA. GMP Scale-Up and Banking of Pluripotent Stem Cells for Cellular Therapy Applications. In: Schwartz PH, Wesselschmidt RL, éditeurs. *Human Pluripotent Stem Cells* [Internet]. Totowa, NJ:

- Humana Press; 2011 [cité 17 sept 2021]. p. 147-59. (Methods in Molecular Biology; vol. 767). Disponible sur: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-201-4\\_11](http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-201-4_11)
51. Kehoe DE, Jing D, Lock LT, Tzanakakis ES. Scalable Stirred-Suspension Bioreactor Culture of Human Pluripotent Stem Cells. *Tissue Engineering Part A*. févr 2010;16(2):405-21.
  52. Marinho PAN, Vareschini DT, Gomes IC, Paulsen B da S, Furtado DR, Castilho L dos R, et al. Xeno-Free Production of Human Embryonic Stem Cells in Stirred Microcarrier Systems Using a Novel Animal/Human-Component-Free Medium. *Tissue Engineering Part C: Methods*. févr 2013;19(2):146-55.
  53. Murry CE, Keller G. Differentiation of Embryonic Stem Cells to Clinically Relevant Populations: Lessons from Embryonic Development. *Cell*. févr 2008;132(4):661-80.
  54. McLean AB, D'Amour KA, Jones KL, Krishnamoorthy M, Kulik MJ, Reynolds DM, et al. Activin A Efficiently Specifies Definitive Endoderm from Human Embryonic Stem Cells Only When Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Is Suppressed. *STEM CELLS*. janv 2007;25(1):29-38.
  55. Teo AKK, Ali Y, Wong KY, Chipperfield H, Sadasivam A, Poobalan Y, et al. Activin and BMP4 Synergistically Promote Formation of Definitive Endoderm in Human Embryonic Stem Cells. *STEM CELLS*. avr 2012;30(4):631-42.
  56. Smith JR, Vallier L, Lupo G, Alexander M, Harris WA, Pedersen RA. Inhibition of Activin/Nodal signaling promotes specification of human embryonic stem cells into neuroectoderm. *Developmental Biology*. janv 2008;313(1):107-17.
  57. Bailey AM. Balancing Tissue and Tumor Formation in Regenerative Medicine. *Science Translational Medicine*. 15 août 2012;4(147):147fs28-147fs28.
  58. Sordi V, Piemonti L. Therapeutic plasticity of stem cells and allograft tolerance. *Cytotherapy*. juill 2011;13(6):647-60.
  59. Drukker M, Katchman H, Katz G, Even-Tov Friedman S, Shezen E, Hornstein E, et al. Human Embryonic Stem Cells and Their Differentiated Derivatives Are Less Susceptible to Immune Rejection Than Adult Cells. *Stem Cells*. févr 2006;24(2):221-9.
  60. Bradley JA, Bolton EM, Pedersen RA. Stem cell medicine encounters the immune system. *Nat Rev Immunol*. nov 2002;2(11):859-71.
  61. Taylor CJ, Bolton EM, Pocock S, Sharples LD, Pedersen RA, Bradley JA. Banking on human embryonic stem cells: estimating the number of donor cell lines needed for HLA matching. *The Lancet*. déc 2005;366(9502):2019-25.
  62. Lott JP, Savulescu J. Towards a Global Human Embryonic Stem Cell Bank. *The American Journal of Bioethics*. 7 août 2007;7(8):37-44.
  63. Machev N, Fuhrmann G, Viville S. Ontogenèse des cellules germinales primordiales. *Med Sci (Paris)*. déc 2004;20(12):1091-5.
  64. Matsui Y, Zsebo K, Hogan BL. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell*. 4 sept 1992;70(5):841-7.
  65. Shambloott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *PNAS*. 10 nov 1998;95(23):13726-31.
  66. l'Académie royale des sciences de Suède. Prize announcement 2012 [Internet]. The Nobel Prize. Disponible sur: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2012/prize-announcement/>
  67. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science*. 21 déc 2007;318(5858):1917-20.
  68. DeRosa BA, Van Baaren JM, Dubey GK, Lee JM, Cuccaro ML, Vance JM, et al. Derivation of autism spectrum disorder-specific induced pluripotent stem cells from peripheral blood mononuclear cells. *Neuroscience Letters*. mai 2012;516(1):9-14.
  69. Aasen T, Belmonte JCI. Isolation and cultivation of human keratinocytes from skin or plucked hair for the generation of induced pluripotent stem cells. *Nat Protoc*. févr 2010;5(2):371-82.
  70. Zhou T, Benda C, Dunzinger S, Huang Y, Ho JC, Yang J, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples. *Nat Protoc*. déc 2012;7(12):2080-9.
  71. Chou BK, Mali P, Huang X, Ye Z, Dowey SN, Resar LM, et al. Efficient human iPSC cell derivation by a non-integrating plasmid from blood cells with unique epigenetic and gene expression signatures. *Cell Res*. mars 2011;21(3):518-29.
  72. Liang G, Zhang Y. Embryonic stem cell and induced pluripotent stem cell: an epigenetic perspective. *Cell Res*. janv 2013;23(1):49-69.
  73. Liang G, Zhang Y. Genetic and Epigenetic Variations in iPSCs: Potential Causes and Implications for Application. *Cell Stem Cell*. 1 août 2013;13(2):149-59.
  74. Inserm. Cellules souches pluripotentes induites (iPS) [Internet]. Inserm. [cité 12 oct 2021]. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/dossier/cellules-souches-pluripotentes-induites-ips/>

75. Martin U. Genome stability of programmed stem cell products. *Adv Drug Deliv Rev.* 1 oct 2017;120:108-17.
76. Ronen D, Benvenisty N. Genomic stability in reprogramming. *Curr Opin Genet Dev.* oct 2012;22(5):444-9.
77. Schott JW, Morgan M, Galla M, Schambach A. Viral and Synthetic RNA Vector Technologies and Applications. *Mol Ther.* sept 2016;24(9):1513-27.
78. Wang AYL, Loh CYY. Episomal Induced Pluripotent Stem Cells: Functional and Potential Therapeutic Applications. *Cell Transplant.* déc 2019;28(1\_suppl):112S-131S.
79. Kelley K, Lin SL. Induction of Somatic Cell Reprogramming Using the MicroRNA miR-302. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science [Internet]. Elsevier; 2012 [cité 13 oct 2021]. p. 83-107. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123984593000046>*
80. Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, et al. Highly Efficient Reprogramming to Pluripotency and Directed Differentiation of Human Cells with Synthetic Modified mRNA. *Cell Stem Cell.* nov 2010;7(5):618-30.
81. Desponts C, Ding S. Using Small Molecules to Improve Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Somatic Cells. In: Ding S, éditeur. *Cellular Programming and Reprogramming [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2010 [cité 13 oct 2021]. p. 207-18. (Methods in Molecular Biology; vol. 636). Disponible sur: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-60761-691-7\\_13](http://link.springer.com/10.1007/978-1-60761-691-7_13)*
82. Kim Y, Jeong J, Choi D. Small-molecule-mediated reprogramming: a silver lining for regenerative medicine. *Exp Mol Med.* févr 2020;52(2):213-26.
83. Jiang J, Lv W, Ye X, Wang L, Zhang M, Yang H, et al. Zscan4 promotes genomic stability during reprogramming and dramatically improves the quality of iPS cells as demonstrated by tetraploid complementation. *Cell Res.* janv 2013;23(1):92-106.
84. Shi Y, Inoue H, Wu JC, Yamanaka S. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nat Rev Drug Discov.* févr 2017;16(2):115-30.
85. Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell.* 24 déc 1987;51(6):987-1000.
86. Kulessa H, Frampton J, Graf T. GATA-1 reprograms avian myelomonocytic cell lines into eosinophils, thromboplasts, and erythroblasts. *Genes & Development.* 15 mai 1995;9(10):1250-62.
87. Xie H, Ye M, Feng R, Graf T. Stepwise Reprogramming of B Cells into Macrophages. *Cell.* mai 2004;117(5):663-76.
88. Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature.* 2 oct 2008;455(7213):627-32.
89. Kajimura S, Seale P, Kubota K, Lunsford E, Frangioni JV, Gygi SP, et al. Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16-C/EBP-beta transcriptional complex. *Nature.* 27 août 2009;460(7259):1154-8.
90. Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, Vedantham V, Hayashi Y, Bruneau BG, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell.* 6 août 2010;142(3):375-86.
91. Li L, Leid M, Rothenberg EV. An early T cell lineage commitment checkpoint dependent on the transcription factor Bcl11b. *Science.* 2 juill 2010;329(5987):89-93.
92. Li P, Burke S, Wang J, Chen X, Ortiz M, Lee SC, et al. Reprogramming of T cells to natural killer-like cells upon Bcl11b deletion. *Science.* 2 juill 2010;329(5987):85-9.
93. Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Südhof TC, Wernig M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature.* 25 févr 2010;463(7284):1035-41.
94. Graf T. Historical Origins of Transdifferentiation and Reprogramming. *Cell Stem Cell.* déc 2011;9(6):504-16.
95. Alison M, Islam S. Attributes of adult stem cells: Attributes of adult stem cells. *J Pathol.* janv 2009;217(2):144-60.
96. Hodgkinson T, Yuan XF, Bayat A. Adult stem cells in tissue engineering. *Expert Review of Medical Devices.* nov 2009;6(6):621-40.
97. Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends in Molecular Medicine.* juin 2001;7(6):259-64.
98. Krampera M, Pizzolo G, Aprili G, Franchini M. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. *Bone.* oct 2006;39(4):678-83.
99. Hernández R, Jiménez-Luna C, Perales-Adán J, Perazzoli G, Melguizo C, Prados J. Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells towards Neuronal Lineage: Clinical Trials in Nervous System Disorders. *Biomol Ther (Seoul).* janv 2020;28(1):34-44.
100. Afshari A, Shamdani S, Uzan G, Naserian S, Azarpira N. Different approaches for transformation of mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. *Stem Cell Research & Therapy.* 7 févr 2020;11(1):54.
101. Lozito TP, Kuo CK, Taboas JM, Tuan RS. Human mesenchymal stem cells express vascular cell phenotypes upon interaction with endothelial cell matrix. *J Cell Biochem.* 1 juill 2009;107(4):714-22.

102. Arutyunyan I, Elchaninov A, Makarov A, Fatkhudinov T. Umbilical Cord as Prospective Source for Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy. *Stem Cells International*. 2016;2016:1-17.
103. De Coppi P, Bartsch G, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol*. janv 2007;25(1):100-6.
104. Klemmt PA, Vafaizadeh V, Groner B. The potential of amniotic fluid stem cells for cellular therapy and tissue engineering. *Expert Opinion on Biological Therapy*. oct 2011;11(10):1297-314.
105. Mahmoudifar N, Doran PM. Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Adipose Tissue. *Methods Mol Biol*. 2015;1340:53-64.
106. Yi T, Song SU. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Arch Pharm Res*. févr 2012;35(2):213-21.
107. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 15 févr 2005;105(4):1815-22.
108. Figueroa FE, Carrión F, Villanueva S, Khoury M. Mesenchymal Stem Cell treatment for autoimmune diseases: a critical review. *Biol Res*. 2012;45(3):269-77.
109. Kurtzberg J, Prockop S, Teira P, Bittencourt H, Lewis V, Chan KW, et al. Allogeneic Human Mesenchymal Stem Cell Therapy (Remestemcel-L, Prochymal) as a Rescue Agent for Severe Refractory Acute Graft-versus-Host Disease in Pediatric Patients. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. févr 2014;20(2):229-35.
110. Carty F, Mahon BP, English K. The influence of macrophages on mesenchymal stromal cell therapy: passive or aggressive agents? *Clin Exp Immunol*. avr 2017;188(1):1-11.
111. Alcayaga-Miranda F, Cuenca J, Khoury M. Antimicrobial Activity of Mesenchymal Stem Cells: Current Status and New Perspectives of Antimicrobial Peptide-Based Therapies. *Front Immunol* [Internet]. 30 mars 2017 [cité 28 sept 2021];8. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.00339/full>
112. Fu Y, Karbaat L, Wu L, Leijten J, Both SK, Karperien M. Trophic Effects of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. déc 2017;23(6):515-28.
113. Hatzistergos KE, Quevedo H, Oskouei BN, Hu Q, Feigenbaum GS, Margitich IS, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. *Circ Res*. 1 oct 2010;107(7):913-22.
114. Williams AR, Hatzistergos KE, Addicott B, McCall F, Carvalho D, Suncion V, et al. Enhanced effect of combining human cardiac stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells to reduce infarct size and to restore cardiac function after myocardial infarction. *Circulation*. 15 janv 2013;127(2):213-23.
115. Williams AR, Trachtenberg B, Velazquez DL, McNiece I, Altman P, Rouy D, et al. Intramyocardial stem cell injection in patients with ischemic cardiomyopathy: Functional recovery and reverse remodeling. *Circ Res*. 1 avr 2011;108(7):792-6.
116. Musiał-Wysocka A, Kot M, Majka M. The Pros and Cons of Mesenchymal Stem Cell-Based Therapies. *Cell Transplant*. juill 2019;28(7):801-12.
117. Jacob MP. Matrice extracellulaire et vieillissement vasculaire. *Med Sci (Paris)*. mars 2006;22(3):273-8.
118. Hudecki A, Kiryczyński G, Łos MJ. Biomaterials, Definition, Overview. In: *Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine* [Internet]. Elsevier; 2019 [cité 27 oct 2021]. p. 85-98. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B97801281252587000071>
119. Campeau-Péloquin A, Roy S. Culture cellulaire animale et végétale [Internet]. Centre collégial de développement de matériel didactique; 2017. Disponible sur: <https://books.google.fr/books?id=yWyDtAEACAAJ>
120. Biomaterials and biomedical materials. In: *Definitions of Biomaterials for the Twenty-First Century* [Internet]. Elsevier; 2019 [cité 21 oct 2021]. p. 15-23. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012818291800002X>
121. Clinical applications of biomaterials. National Institutes of Health Consensus Development. *Natl Inst Health Consens Dev Conf Summ*. 1983;4(5):10 p.
122. Hasirci V, Hasirci N. *Fundamentals of Biomaterials*. 1st ed. 2018. New York, NY: Springer New York : Imprint: Springer; 2018. 1 p.
123. Bhaskar B, Nagarjuna V. Biomaterials, Tissue Engineering, and Regenerative Medicine: A Brief Outline. In: Bhaskar B, Sreenivasa Rao P, Kasoju N, Nagarjuna V, Baadhe RR, éditeurs. *Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative Medicine* [Internet]. Singapore: Springer Singapore; 2021 [cité 22 oct 2021]. p. 3-17. Disponible sur: [https://link.springer.com/10.1007/978-981-16-0002-9\\_1](https://link.springer.com/10.1007/978-981-16-0002-9_1)
124. Wikipédia. Prothèse oculaire [Internet]. Wikipédia, l'encyclopédie libre. Disponible sur: [https://fr.wikipedia.org/wiki/Proth%C3%A8se\\_oculaire](https://fr.wikipedia.org/wiki/Proth%C3%A8se_oculaire)
125. Science Museum Group. Vitallium hip prosthesis. 1988-514 Accessed November 25, 2021. [Internet]. Science Museum Group Collection Online. [cité 25 nov 2021]. Disponible sur: <https://collection.sciencemuseumgroup.org.uk/objects/co179832/vitallium-hip-prosthesis-prosthesis>.

126. Hoesli CA, Kiang RLJ, Raghuram K, Pedroza RG, Markwick KE, Colantuoni AMR, et al. Mammalian Cell Encapsulation in Alginate Beads Using a Simple Stirred Vessel. *JoVE*. 29 juin 2017;(124):55280.
127. JANVIER P, VERRON É. Ciments pour le comblement de défaut osseux [Internet]. Vol. base documentaire : TIB538DUO., Techniques de l'ingénieur Matériaux pour la santé et l'agroalimentaire. Editions T.I.; 2014. Disponible sur: <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/materiaux-th11/materiaux-pour-la-sante-et-l-agroalimentaire-42538210/ciments-pour-le-comblement-de-defaut-osseux-n4952/>
128. Sternberg K, Grabow N, Petersen S, Weitschies W, Harder C, Ince H, et al. Advances in coronary stent technology--active drug-loaded stent surfaces for prevention of restenosis and improvement of biocompatibility. *Curr Pharm Biotechnol*. 2013;14(1):76-90.
129. Dolcimascolo A, Calabrese G, Conoci S, Parenti R. Innovative Biomaterials for Tissue Engineering. In: Barbeck M, Jung O, Smeets R, Koržinskas T, éditeurs. Biomaterial-supported Tissue Reconstruction or Regeneration [Internet]. IntechOpen; 2019 [cité 22 oct 2021]. Disponible sur: <https://www.intechopen.com/books/biomaterial-supported-tissue-reconstruction-or-regeneration/innovative-biomaterials-for-tissue-engineering>
130. Ahadian S, Rahal R, Ramón-Azcón J, Obregón R, Hasan A. Biomaterials in Tissue Engineering. In: Hasan A, éditeur. Tissue Engineering for Artificial Organs [Internet]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2017 [cité 25 oct 2021]. p. 35-83. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9783527689934.ch2>
131. Choi YC, Choi JS, Kim BS, Kim JD, Yoon HI, Cho YW. Decellularized Extracellular Matrix Derived from Porcine Adipose Tissue as a Xenogeneic Biomaterial for Tissue Engineering. *Tissue Eng Part C Methods*. nov 2012;18(11):866-76.
132. Yu X, Tang X, Gohil SV, Laurencin CT. Biomaterials for Bone Regenerative Engineering. *Adv Healthcare Mater*. juin 2015;4(9):1268-85.
133. Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. In: The Biomaterials: Silver Jubilee Compendium [Internet]. Elsevier; 2000 [cité 25 oct 2021]. p. 175-89. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780080451541500216>
134. Mikos null, McIntire null, Anderson null, Babensee null. Host response to tissue engineered devices. *Adv Drug Deliv Rev*. 3 août 1998;33(1-2):111-39.
135. Tabata Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. *J R Soc Interface*. 6 juin 2009;6(Suppl 3):S311-24.
136. Patel NR, GOHIL P. A Review on Biomaterials: Scope, Applications & Human Anatomy Significance. *Int J Emerging Technol Adv Eng*. janv 2012;2:91-101.
137. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 25 août 2006;126(4):677-89.
138. Ratner BD, éditeur. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. 3rd ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier/Academic Press; 2013. 1519 p.
139. Gasperini L, Mano JF, Reis RL. Natural polymers for the microencapsulation of cells. *J R Soc Interface*. 6 nov 2014;11(100):20140817.
140. Delivopoulos E, Ouberaï MM, Coffey PD, Swann MJ, Shakesheff KM, Welland ME. Serum protein layers on parylene-C and silicon oxide: Effect on cell adhesion. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 1 févr 2015;126:169-77.
141. Webb K, Hlady V, Tresco PA. Relative importance of surface wettability and charged functional groups on NIH 3T3 fibroblast attachment, spreading, and cytoskeletal organization. *J Biomed Mater Res*. 5 sept 1998;41(3):422-30.
142. Bacakova L, Filova E, Parizek M, Ruml T, Svorcik V. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnol Adv*. déc 2011;29(6):739-67.
143. Green AM, Jansen JA, van der Waerden JP, von Recum AF. Fibroblast response to microtextured silicone surfaces: texture orientation into or out of the surface. *J Biomed Mater Res*. mai 1994;28(5):647-53.
144. Weiss P. Experiments on cell and axon orientation in vitro: The role of colloidal exudates in tissue organization. *J Exp Zool*. déc 1945;100(3):353-86.
145. Flemming RG, Murphy CJ, Abrams GA, Goodman SL, Nealey PF. Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior. *Biomaterials*. mars 1999;20(6):573-88.
146. Kim DH, Han K, Gupta K, Kwon KW, Suh KY, Levchenko A. Mechanosensitivity of fibroblast cell shape and movement to anisotropic substratum topography gradients. *Biomaterials*. oct 2009;30(29):5433-44.
147. Lee MR, Kwon KW, Jung H, Kim HN, Suh KY, Kim K, et al. Direct differentiation of human embryonic stem cells into selective neurons on nanoscale ridge/groove pattern arrays. *Biomaterials*. mai 2010;31(15):4360-6.
148. T. C. Lee PFN. Basic Engineering for Medics and Biologists: an ESEM Primer. [Internet]. IOS Press; 2010 [cité 11 nov 2021]. Disponible sur: <http://www.myilibrary.com?id=269280>
149. Vasita R, Shanmugam I K, Katt DS. Improved biomaterials for tissue engineering applications: surface

- modification of polymers. *Curr Top Med Chem.* 2008;8(4):341-53.
150. O'Brien FJ. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today.* 1 mars 2011;14(3):88-95.
151. Bose S, Roy M, Bandyopadhyay A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnol.* oct 2012;30(10):546-54.
152. Best SM, Porter AE, Thian ES, Huang J. Bioceramics: Past, present and for the future. *Journal of the European Ceramic Society.* janv 2008;28(7):1319-27.
153. Calabrese G, Giuffrida R, Fabbi C, Figallo E, Lo Furno D, Gulino R, et al. Collagen-Hydroxyapatite Scaffolds Induce Human Adipose Derived Stem Cells Osteogenic Differentiation *In Vitro.* Vanella L, éditeur. *PLoS ONE.* 16 mars 2016;11(3):e0151181.
154. Calabrese G, Forte S, Gulino R, Cefali F, Figallo E, Salvatorelli L, et al. Combination of Collagen-Based Scaffold and Bioactive Factors Induces Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Chondrogenic Differentiation *In vitro.* *Front Physiol* [Internet]. 2 févr 2017 [cité 15 nov 2021];8. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2017.00050/full>
155. Rahaman MN, Day DE, Sonny Bal B, Fu Q, Jung SB, Bonewald LF, et al. Bioactive glass in tissue engineering. *Acta Biomaterialia.* juin 2011;7(6):2355-73.
156. Yoon BH, Choi WY, Kim HE, Kim JH, Koh YH. Aligned porous alumina ceramics with high compressive strengths for bone tissue engineering. *Scripta Materialia.* avr 2008;58(7):537-40.
157. Teixeira S, Ferraz MP, Monteiro FJ. Biocompatibility of highly macroporous ceramic scaffolds: cell adhesion and morphology studies. *J Mater Sci: Mater Med.* févr 2008;19(2):855-9.
158. Boyde A. Scanning Electron Microscopy of Bone. In: Idris AI, éditeur. *Bone Research Protocols* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2019 [cité 3 déc 2021]. p. 571-616. (Methods in Molecular Biology; vol. 1914). Disponible sur: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-8997-3\\_31](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-8997-3_31)
159. Weng W, Wu W, Hou M, Liu T, Wang T, Yang H. Review of zirconia-based biomimetic scaffolds for bone tissue engineering. *J Mater Sci.* mai 2021;56(14):8309-33.
160. Prasad K, Bazaka O, Chua M, Rochford M, Fedrick L, Spoor J, et al. Metallic Biomaterials: Current Challenges and Opportunities. *Materials (Basel).* 31 juill 2017;10(8):884.
161. Vats A, Tolley NS, Polak JM, Gough JE. Scaffolds and biomaterials for tissue engineering: a review of clinical applications. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* juin 2003;28(3):165-72.
162. Chung C, Burdick JA. Engineering cartilage tissue. *Adv Drug Deliv Rev.* 14 janv 2008;60(2):243-62.
163. Lü JM, Wang X, Marin-Muller C, Wang H, Lin PH, Yao Q, et al. Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology. *Expert Rev Mol Diagn.* mai 2009;9(4):325-41.
164. Kweon H, Yoo MK, Park IK, Kim TH, Lee HC, Lee HS, et al. A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering. *Biomaterials.* févr 2003;24(5):801-8.
165. Judyta Dulnik. File:Fibroblasts 3.jpg [Internet]. Wikimedia. 2015 [cité 3 déc 2021]. Disponible sur: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fibroblasts\\_3.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fibroblasts_3.jpg)
166. Sekiya N, Ichioka S, Terada D, Tsuchiya S, Kobayashi H. Efficacy of a poly glycolic acid (PGA)/collagen composite nanofibre scaffold on cell migration and neovascularisation *in vivo* skin defect model. *Journal of Plastic Surgery and Hand Surgery.* 18 avr 2013;1-5.
167. Kumber S, Laurencin C, Deng M, éditeurs. *Natural and synthetic biomedical polymers.* First edition. Amsterdam ; Boston: Elsevier; 2014. 402 p.
168. Malafaya PB, Silva GA, Reis RL. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 30 mai 2007;59(4-5):207-33.
169. Dang JM, Leong KW. Natural polymers for gene delivery and tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev.* 7 juill 2006;58(4):487-99.
170. Hoyer M, Drechsel N, Meyer M, Meier C, Hinüber C, Breier A, et al. Embroidered polymer–collagen hybrid scaffold variants for ligament tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C.* oct 2014;43:290-9.
171. Vagaská B, Bacáková L, Filová E, Balík K. Osteogenic cells on bio-inspired materials for bone tissue engineering. *Physiol Res.* 2010;59(3):309-22.
172. Deponti D, Di Giancamillo A, Gervaso F, Domenicucci M, Domeneghini C, Sannino A, et al. Collagen scaffold for cartilage tissue engineering: the benefit of fibrin glue and the proper culture time in an infant cartilage model. *Tissue Eng Part A.* mars 2014;20(5-6):1113-26.
173. Aravamudhan A, Ramos DM, Nip J, Harmon MD, James R, Deng M, et al. Cellulose and collagen derived micro-nano structured scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Nanotechnol.* avr 2013;9(4):719-31.
174. Lu H, Kawazoe N, Kitajima T, Myoken Y, Tomita M, Umezawa A, et al. Spatial immobilization of bone morphogenetic protein-4 in a collagen-PLGA hybrid scaffold for enhanced osteoinductivity. *Biomaterials.* sept 2012;33(26):6140-6.

175. Tsuji W, Inamoto T, Ito R, Morimoto N, Tabata Y, Toi M. Simple and longstanding adipose tissue engineering in rabbits. *J Artif Organs*. mars 2013;16(1):110-4.
176. Lynn AK, Yannas IV, Bonfield W. Antigenicity and immunogenicity of collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 15 nov 2004;71(2):343-54.
177. Gómez-Guillén MC, Pérez-Mateos M, Gómez-Estaca J, López-Caballero E, Giménez B, Montero P. Fish gelatin: a renewable material for developing active biodegradable films. *Trends in Food Science & Technology*. janv 2009;20(1):3-16.
178. Huang J, Fu H, Wang Z, Meng Q, Liu S, Wang H, et al. BMSCs-laden gelatin/sodium alginate/carboxymethyl chitosan hydrogel for 3D bioprinting. *RSC Adv*. 2016;6(110):108423-30.
179. Rowley JA, Madlambayan G, Mooney DJ. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials*. janv 1999;20(1):45-53.
180. Cui SW. Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications [Internet]. Boca Raton: Taylor & Francis; 2005 [cité 17 nov 2021]. Disponible sur: <http://www.crcnetbase.com/isbn/9780849315749>
181. Chan BP, Leong KW. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *Eur Spine J*. déc 2008;17(S4):467-79.
182. Kim BY, Jeong JH, Park K, Kim JD. Bioadhesive interaction and hypoglycemic effect of insulin-loaded lectin-microparticle conjugates in oral insulin delivery system. *Journal of Controlled Release*. 16 févr 2005;102(3):525-38.
183. Rowley JA, Mooney DJ. Alginate type and RGD density control myoblast phenotype. *J Biomed Mater Res*. mai 2002;60(2):217-23.
184. Yang J, Goto M, Ise H, Cho CS, Akaike T. Galactosylated alginate as a scaffold for hepatocytes entrapment. *Biomaterials*. janv 2002;23(2):471-9.
185. Selmi T a. S, Verdonk P, Chambat P, Dubrana F, Potel JF, Barnouin L, et al. Autologous chondrocyte implantation in a novel alginate-agarose hydrogel: outcome at two years. *J Bone Joint Surg Br*. mai 2008;90(5):597-604.
186. Schagemann JC, Erggelet C, Chung HW, Lahm A, Kurz H, Mrosek EH. Cell-laden and cell-free biopolymer hydrogel for the treatment of osteochondral defects in a sheep model. *Tissue Eng Part A*. janv 2009;15(1):75-82.
187. Wan LQ, Jiang J, Arnold DE, Guo XE, Lu HH, Mow VC. Calcium Concentration Effects on the Mechanical and Biochemical Properties of Chondrocyte-Alginate Constructs. *Cell Mol Bioeng*. 1 mars 2008;1(1):93-102.
188. Rodríguez-Vázquez M, Vega-Ruiz B, Ramos-Zúñiga R, Saldaña-Koppel DA, Quiñones-Olvera LF. Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine. *Biomed Res Int*. 2015;2015:821279.
189. Thein-Han WW, Misra RDK. Biomimetic chitosan-nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomater*. mai 2009;5(4):1182-97.
190. Zhang Y, Venugopal JR, El-Turki A, Ramakrishna S, Su B, Lim CT. Electrospun biomimetic nanocomposite nanofibers of hydroxyapatite/chitosan for bone tissue engineering. *Biomaterials*. nov 2008;29(32):4314-22.
191. Ueno H, Yamada H, Tanaka I, Kaba N, Matsuura M, Okumura M, et al. Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. *Biomaterials*. août 1999;20(15):1407-14.
192. Itoh S, Yamaguchi I, Suzuki M, Ichinose S, Takakuda K, Kobayashi H, et al. Hydroxyapatite-coated tendon chitosan tubes with adsorbed laminin peptides facilitate nerve regeneration in vivo. *Brain Res*. 12 déc 2003;993(1-2):111-23.
193. Madihally SV, Flake AW, Matthew HW. Maintenance of CD34 expression during proliferation of CD34+ cord blood cells on glycosaminoglycan surfaces. *Stem Cells*. 1999;17(5):295-305.
194. Suh JK, Matthew HW. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials*. déc 2000;21(24):2589-98.
195. Naderi-Meshkin H, Andreas K, Matin MM, Sittinger M, Bidkhor HR, Ahmadiankia N, et al. Chitosan-based injectable hydrogel as a promising in situ forming scaffold for cartilage tissue engineering. *Cell Biol Int*. janv 2014;38(1):72-84.
196. Kim SE, Park JH, Cho YW, Chung H, Jeong SY, Lee EB, et al. Porous chitosan scaffold containing microspheres loaded with transforming growth factor- $\beta$ 1: Implications for cartilage tissue engineering. *Journal of Controlled Release*. sept 2003;91(3):365-74.
197. De Colli M, Massimi M, Barbetta A, Di Rosario BL, Nardecchia S, Conti Devirgiliis L, et al. A biomimetic porous hydrogel of gelatin and glycosaminoglycans cross-linked with transglutaminase and its application in the culture of hepatocytes. *Biomed Mater*. 1 oct 2012;7(5):055005.
198. Cheng MH, Uriel S, Moya ML, Francis-Sedlak M, Wang R, Huang JJ, et al. Dermis-derived hydrogels support adipogenesis in vivo. *J Biomed Mater Res A*. 1 mars 2010;92(3):852-8.
199. Abberton KM, Bortolotto SK, Woods AA, Findlay M, Morrison WA, Thompson EW, et al. Myogel, a Novel, Basement Membrane-Rich, Extracellular Matrix Derived from Skeletal Muscle, Is Highly Adipogenic in vivo and in vitro. *Cells Tissues Organs*. 2008;188(4):347-58.

200. Matsuda K, Falkenberg KJ, Woods AA, Choi YS, Morrison WA, Dilley RJ. Adipose-Derived Stem Cells Promote Angiogenesis and Tissue Formation for *In Vivo* Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part A*. juin 2013;19(11-12):1327-35.
201. Kim YS, Majid M, Melchiorri AJ, Mikos AG. Applications of decellularized extracellular matrix in bone and cartilage tissue engineering. *Bioeng Transl Med*. 26 oct 2018;4(1):83-95.
202. Choi JS, Yang HJ, Kim BS, Kim JD, Kim JY, Yoo B, et al. Human extracellular matrix (ECM) powders for injectable cell delivery and adipose tissue engineering. *Journal of Controlled Release*. oct 2009;139(1):2-7.
203. Flynn L, Semple JL, Woodhouse KA. Decellularized placental matrices for adipose tissue engineering. *J Biomed Mater Res*. nov 2006;79A(2):359-69.
204. Young DA, Ibrahim DO, Hu D, Christman KL. Injectable hydrogel scaffold from decellularized human lipoaspirate. *Acta Biomaterialia*. mars 2011;7(3):1040-9.
205. Hanane B, Hafida ferfera harrar. Elaboration de matériaux composites polymères superabsorbants/additifs et étude leurs performances, pour une application dans les produits d'hygiène [PhD Thesis]. 2019.
206. Seliktar D. Designing Cell-Compatible Hydrogels for Biomedical Applications. *Science*. juin 2012;336(6085):1124-8.
207. Tibbitt MW, Langer R. Living Biomaterials. *Acc Chem Res*. 21 mars 2017;50(3):508-13.
208. Montoya C, Du Y, Gianforcaro AL, Orrego S, Yang M, Lelkes PI. On the road to smart biomaterials for bone research: definitions, concepts, advances, and outlook. *Bone Res*. 11 févr 2021;9(1):1-16.
209. Kowalski PS, Bhattacharya C, Afewerki S, Langer R. Smart Biomaterials: Recent Advances and Future Directions. *ACS Biomater Sci Eng*. 12 nov 2018;4(11):3809-17.
210. Bonetti L, De Nardo L, Farè S. Thermo-Responsive Methylcellulose Hydrogels: From Design to Applications as Smart Biomaterials. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 1 oct 2021;27(5):486-513.
211. Damaraju SM, Shen Y, Elele E, Khusid B, Eshghinejad A, Li J, et al. Three-dimensional piezoelectric fibrous scaffolds selectively promote mesenchymal stem cell differentiation. *Biomaterials*. déc 2017;149:51-62.
212. Messerli MA, Graham DM. Extracellular electrical fields direct wound healing and regeneration. *Biol Bull*. août 2011;221(1):79-92.
213. Salinas CN, Anseth KS. The enhancement of chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by enzymatically regulated RGD functionalities. *Biomaterials*. mai 2008;29(15):2370-7.
214. Goonoo N, Bhaw-Luximon A. Mimicking growth factors: role of small molecule scaffold additives in promoting tissue regeneration and repair. *RSC advances*. 2019;9(32):18124-46.
215. Gonçalves I, Silva C, Cavaco-Paulo A. Ultrasound enhanced laccase applications. *Green Chem*. 2015;17(3):1362-74.
216. Guan N, Liu Z, Zhao Y, Li Q, Wang Y. Engineered biomaterial strategies for controlling growth factors in tissue engineering. *Drug Deliv*. déc 2020;27(1):1438-51.
217. Bekhouche M, Bolon M, Charriaud F, Lamrayah M, Da Costa D, Primard C, et al. Development of an antibacterial nanocomposite hydrogel for human dental pulp engineering. *J Mater Chem B*. 23 sept 2020;8(36):8422-32.
218. Le Pape F, Richard G, Porchet E, Sourice S, Dubrana F, Férec C, et al. Adhesion, proliferation and osteogenic differentiation of human MSCs cultured under perfusion with a marine oxygen carrier on an allogenic bone substitute. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. févr 2018;46(1):95-107.
219. Mouré A, Bacou E, Bosch S, Jegou D, Salama A, Riochet D, et al. Extracellular hemoglobin combined with an O<sub>2</sub>-generating material overcomes O<sub>2</sub> limitation in the bioartificial pancreas. *Biotechnol Bioeng*. mai 2019;116(5):1176-89.
220. Kuila BK, Nandi AK. Physical, Mechanical, and Conductivity Properties of Poly(3-hexylthiophene)-Montmorillonite Clay Nanocomposites Produced by the Solvent Casting Method. *Macromolecules*. 1 nov 2004;37(23):8577-84.
221. Bencherif SA, Braschler TM, Renaud P. Advances in the design of macroporous polymer scaffolds for potential applications in dentistry. *J Periodontol Implant Sci*. déc 2013;43(6):251-61.
222. Liu X, Ma PX. Phase separation, pore structure, and properties of nanofibrous gelatin scaffolds. *Biomaterials*. sept 2009;30(25):4094-103.
223. von Heimburg D, Zachariah S, Heschel I, Kühling H, Schoof H, Hafemann B, et al. Human preadipocytes seeded on freeze-dried collagen scaffolds investigated in vitro and in vivo. *Biomaterials*. mars 2001;22(5):429-38.
224. Haider A, Haider S, Kang IK. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arabian Journal of Chemistry*. déc 2018;11(8):1165-88.
225. Foshan Nanofiberlabs Co. Introductory tutorial for electrospinning [Internet]. Nanofiberlabs. 2021 [cité 14 déc 2021]. Disponible sur:

<https://www.nanofiberlabs.com/solutions/introductory-tutorial-for-electrospinning.html>

226. Braghirolli DI, Steffens D, Pranke P. Electrospinning for regenerative medicine: a review of the main topics. *Drug Discovery Today*. juin 2014;19(6):743-53.

227. Fayyazbakhsh F, Leu MC. A Brief Review on 3D Bioprinted Skin Substitutes. *Procedia Manufacturing*. 2020;48:790-6.

228. Skoog SA, Goering PL, Narayan RJ. Stereolithography in tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med*. mars 2014;25(3):845-56.

229. Melchels FPW. Preparation of advanced porous structures by stereolithography for application in tissue engineering [Internet] [PhD]. [Enschede, The Netherlands]: University of Twente; 2010 [cité 15 déc 2021]. Disponible sur: <http://purl.org/utwente/doi/10.3990/1.9789036530194>

230. Billiet T, Vandenhaute M, Schelfhout J, Van Vlierberghe S, Dubruel P. A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering. *Biomaterials*. sept 2012;33(26):6020-41.

231. Gudapati H, Dey M, Ozbolat I. A comprehensive review on droplet-based bioprinting: Past, present and future. *Biomaterials*. sept 2016;102:20-42.

232. Ahn SH, Lee J, Park SA, Kim WD. Three-dimensional bio-printing equipment technologies for tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue Eng Regen Med*. déc 2016;13(6):663-76.

233. Uludag H, Pandit A, Kuhn L. Enabling Biomaterials for New Biomedical Technologies and Clinical Therapies. [Internet]. 2020 [cité 8 juill 2022]. Disponible sur: <https://directory.doabooks.org/handle/20.500.12854/73993>

234. Malda J, Visser J, Melchels FP, Jüngst T, Hennink WE, Dhert WJA, et al. 25th Anniversary Article: Engineering Hydrogels for Biofabrication. *Adv Mater*. sept 2013;25(36):5011-28.

235. He J, Zhang X, Xia X, Han M, Li F, Li C, et al. Organoid technology for tissue engineering. *J Mol Cell Biol*. 1 août 2020;12(8):569-79.

236. Marti-Figueroa CR, Ashton RS. The case for applying tissue engineering methodologies to instruct human organoid morphogenesis. *Acta Biomaterialia*. mai 2017;54:35-44.

237. Hofer M, Lutolf MP. Engineering organoids. *Nat Rev Mater*. mai 2021;6(5):402-20.

238. Lancaster MA, Renner M, Martin CA, Wenzel D, Bicknell LS, Hurler ME, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*. sept 2013;501(7467):373-9.

239. Chua CW, Shibata M, Lei M, Toivanen R, Barlow LJ, Bergren SK, et al. Single luminal epithelial progenitors can generate prostate organoids in culture. *Nat Cell Biol*. oct 2014;16(10):951-61.

240. Plunkett N, O'Brien FJ. Bioreactors in tissue engineering. *Technol Health Care*. 2011;19(1):55-69.

241. Selden C, Fuller B. Role of Bioreactor Technology in Tissue Engineering for Clinical Use and Therapeutic Target Design. *Bioengineering (Basel)*. 24 avr 2018;5(2):32.

242. Rauh J, Milan F, Günther KP, Stiehler M. Bioreactor Systems for Bone Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. août 2011;17(4):263-80.

243. Riess JG. Perfluorocarbon-based Oxygen Delivery. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*. janv 2006;34(6):567-80.

244. Rodriguez-Brotons A, Bietiger W, Peronet C, Langlois A, Magisson J, Mura C, et al. Comparison of Perfluorodecalin and HEMOXCell as Oxygen Carriers for Islet Oxygenation in an In Vitro Model of Encapsulation. *Tissue Eng Part A*. déc 2016;22(23-24):1327-36.

245. Moysidou CM, Barberio C, Owens RM. Advances in Engineering Human Tissue Models. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021;8:1566.

246. Tissue-engineered disease models. *Nat Biomed Eng*. déc 2018;2(12):879-80.

247. Hansen A, Eder A, Bönstrup M, Flato M, Mewe M, Schaaf S, et al. Development of a Drug Screening Platform Based on Engineered Heart Tissue. *Circulation Research*. 9 juill 2010;107(1):35-44.

248. Buckingham M, Bajard L, Chang T, Daubas P, Hadchouel J, Meilhac S, et al. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J Anat*. janv 2003;202(1):59-68.

249. Russell WMS, Burch RL. The Principles of Humane Experimental Technique [Internet]. Methuen; 1959. Disponible sur: <https://books.google.fr/books?id=j75qAAAAMAAJ>

250. Bhatia SN, Ingber DE. Microfluidic organs-on-chips. *Nat Biotechnol*. août 2014;32(8):760-72.

251. Cox CR, Lynch S, Goldring C, Sharma P. Current Perspective: 3D Spheroid Models Utilizing Human-Based Cells for Investigating Metabolism-Dependent Drug-Induced Liver Injury. *Front Med Technol*. 30 nov 2020;2:611913.

252. Thakare K, Jerpseth L, Pei Z, Elwany A, Quek F, Qin H. Bioprinting of Organ-on-Chip Systems: A Literature Review from a Manufacturing Perspective. *JMMP*. 19 août 2021;5(3):91.

253. Homan KA, Kolesky DB, Skylar-Scott MA, Herrmann J, Obuobi H, Moisan A, et al. Bioprinting of 3D Convoluted Renal Proximal Tubules on Perfusable Chips. *Sci Rep.* déc 2016;6(1):34845.
254. Mazzocchi A, Soker S, Skardal A. 3D bioprinting for high-throughput screening: Drug screening, disease modeling, and precision medicine applications. *Appl Phys Rev.* mars 2019;6(1):011302.
255. Parlement Européen, Conseil de l'Union Européenne. RÈGLEMENT (CE) No 1223/2009 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques. R (CE) 1223/2009, L342/59 nov 30, 2009.
256. Takahashi T. Organoids for Drug Discovery and Personalized Medicine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 6 janv 2019;59(1):447-62.
257. Dekkers JF, Berkens G, Kruisselbrink E, Vonk A, de Jonge HR, Janssens HM, et al. Characterizing responses to CFTR-modulating drugs using rectal organoids derived from subjects with cystic fibrosis. *Sci Transl Med.* 22 juin 2016;8(344):344ra84.
258. Triplett RG, Nevins M, Marx RE, Spagnoli DB, Oates TW, Moy PK, et al. Pivotal, Randomized, Parallel Evaluation of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2/Absorbable Collagen Sponge and Autogenous Bone Graft for Maxillary Sinus Floor Augmentation. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* sept 2009;67(9):1947-60.
259. Food and Drug Administration. Humanitarian Device Exemption of « Epicel » [Internet]. oct 25, 2007 p. 8. Disponible sur: [https://www.accessdata.fda.gov/cdrh\\_docs/pdf/H990002A.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf/H990002A.pdf)
260. Food and Drug Administration, Warren RS. Premarket approval of « Dermagraft » [Internet]. sept 28, 2001 p. 7. Disponible sur: [https://www.accessdata.fda.gov/cdrh\\_docs/pdf/P000036A.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf/P000036A.pdf)
261. Viola J, Lal B, Grad O. The Emergence of Tissue Engineering as a Research Field. [Internet]. 4201 Wilson Boulevard: Abt Associates Inc. for The National Science Foundation; 2003 oct [cité 27 janv 2022]. Disponible sur: <https://www.nsf.gov/pubs/2004/nsf0450/start.htm>
262. Umemura M. Challenging the Problem of 'Fit': Advancing the Regenerative Medicine Industries in the United States, Britain and Japan. *Business History.* 3 avr 2019;61(3):456-80.
263. Mhanna R, Hasan A. Introduction to Tissue Engineering. In: Hasan A, éditeur. *Tissue Engineering for Artificial Organs* [Internet]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2017 [cité 27 janv 2022]. p. 1-34. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9783527689934.ch1>
264. Cao Y, Vacanti JP, Paige KT, Upton J, Vacanti CA. Transplantation of Chondrocytes Utilizing a Polymer-Cell Construct to Produce Tissue-Engineered Cartilage in the Shape of a Human Ear: Plastic & Reconstructive Surgery. août 1997;100(2):297-302.
265. Nerem RM. Regenerative medicine: the emergence of an industry. *J R Soc Interface.* 6 déc 2010;7 Suppl 6:S771-775.
266. Ramezankhani R, Torabi S, Minaei N, Madani H, Rezaei S, Hassani SN, et al. Two Decades of Global Progress in Authorized Advanced Therapy Medicinal Products: An Emerging Revolution in Therapeutic Strategies. *Front Cell Dev Biol.* 17 déc 2020;8:547653.
267. Dodson BP, Levine AD. Challenges in the translation and commercialization of cell therapies. *BMC Biotechnol.* déc 2015;15(1):70.
268. Pediatric Advisory Committee of the Food and Drug Administration. Annual Pediatric Safety Update for the Pediatric Advisory Committee for Epicel (cultured epidermal autografts) HDE# BH990200 [Internet]. Food and Drug Administration; [cité 31 janv 2022]. Disponible sur: <https://www.fda.gov/media/111543/download>
269. Belsky K, Smiell J. Navigating the Regulatory Pathways and Requirements for Tissue-Engineered Products in the Treatment of Burns in the United States. *Journal of Burn Care & Research.* 4 août 2021;42(4):774-84.
270. Whitaker M, Foley L, Ward S. Overview of the Cell Therapy Field. In: Connon CJ, éditeur. *Bioprocessing for Cell Based Therapies* [Internet]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2016 [cité 31 janv 2022]. p. 1-34. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118743362.ch1>
271. Parlement Européen, Conseil de l'Union Européenne. Règlement (CE) n° 1394/2007 du Parlement européen et du Conseil du 13 novembre 2007 concernant les médicaments de thérapie innovante et modifiant la directive 2001/83/CE ainsi que le règlement (CE) n° 726/2004 [Internet]. R (CE) 1394/2007, L 324/121 nov 13, 2007. Disponible sur: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32007R1394&from=DA#:~:text=Un%20produit%20qui%20peut%20r%C3%A9pondre,issu%20de%20l'ing%C3%A9nierie%20tissulaire.&text=%E2%80%94%20de%20%C2%ABm%C3%A9dicament%20de%20th%C3%A9rapie%20g%C3%A9nique,comme%20m%C3%A9dicament%20de%20th%C3%A9rapie%20g%C3%A9nique.>
272. 114th United States Congress. 21st Century Cures Act [Internet]. Public Law 114-255 déc 13, 2016 p. 312. Disponible sur: <https://www.congress.gov/114/plaws/publ255/PLAW-114publ255.pdf>
273. Yano K, Watanabe N, Tsuyuki K, Ikawa T, Kasanuki H, Yamato M. Regulatory approval for autologous

- human cells and tissue products in the United States, the European Union, and Japan. *Regenerative Therapy*. juin 2015;1:45-56.
274. Ronfard V, Vertès AA, May MH, Dupraz A, van Dyke ME, Bayon Y. Evaluating the Past, Present, and Future of Regenerative Medicine: A Global View. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. avr 2017;23(2):199-210.
275. Soos G, Ficzere D, Varga P. Towards Traffic Identification and Modeling for 5G Application Use-Cases. *Electronics*. 13 avr 2020;9(4):640.
276. Boucher H, Cras A. Médicaments de thérapie innovante : réglementation et applications cliniques. *Revue Francophone des Laboratoires*. déc 2018;2018(507):44-51.
277. Parlement Européen, Conseil de l'Union Européenne. DIRECTIVE 2009/120/CE DE LA COMMISSION du 14 septembre 2009 modifiant la directive 2001/83/CE du Parlement européen et du Conseil instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain en ce qui concerne les médicaments de thérapie innovante [Internet]. 2009/120/CE, L242/3 sept 14, 2009. Disponible sur: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009L0120&from=EN>
278. Assemblée Nationale. Code de santé publique : Dispositions générales relatives aux médicaments [Internet]. L5111-1. Disponible sur: [https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article\\_lc/LEGIARTI000006689867/](https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000006689867/)
279. Assemblée Nationale. Code de santé publique : Préparation, conservation et utilisation des tissus, des cellules et de leurs dérivés [Internet]. L1243-1. Disponible sur: [https://www.legifrance.gouv.fr/codes/section\\_lc/LEGITEX000006072665/LEGISCTA000006171034/#LEGISCTA00006171034](https://www.legifrance.gouv.fr/codes/section_lc/LEGITEX000006072665/LEGISCTA000006171034/#LEGISCTA00006171034)
280. Assemblée Nationale. Code de Santé Publique : Dispositions générales relatives aux médicaments à usage humain introduisant la notion de médicaments de thérapie innovante préparés ponctuellement [Internet]. L5121-1. Disponible sur: [https://www.legifrance.gouv.fr/codes/section\\_lc/LEGITEX000006072665/LEGISCTA000006171366?init=true&no mCode=LHIW4Q%3D%3D&page=1&query=L5121-1&searchField=ALL&tab\\_selection=code&anchor=LEGIARTI000044628485#LEGIARTI000044628485](https://www.legifrance.gouv.fr/codes/section_lc/LEGITEX000006072665/LEGISCTA000006171366?init=true&no mCode=LHIW4Q%3D%3D&page=1&query=L5121-1&searchField=ALL&tab_selection=code&anchor=LEGIARTI000044628485#LEGIARTI000044628485)
281. Mahalatchimy A. Médicaments de thérapie innovante et gestion des risques : quelle place pour le principe de précaution? *Revue du droit de l'Union européenne*. janv 2019;49-62.
282. Taboulet F. Les médicaments de thérapie innovante : quelles spécificités en droit pharmaceutique ? *quaderni*. 5 juin 2013;(81):15-27.
283. Farkas AM, Mariz S, Stoyanova-Beninska V, Celis P, Vamvakas S, Larsson K, et al. Advanced Therapy Medicinal Products for Rare Diseases: State of Play of Incentives Supporting Development in Europe. *Front Med*. 16 mai 2017;4:53.
284. Oberweis CV, Marchal JA, López-Ruiz E, Gálvez-Martín P. A Worldwide Overview of Regulatory Frameworks for Tissue-Based Products. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 1 avr 2020;26(2):181-96.
285. Guerra-Bretaña RM, Flórez-Rendón AL. Impact of regulations on innovation in the field of medical devices. *Res Biomed Eng*. 29 nov 2018;34(4):356-67.
286. Li P, Faulkner A. 3D Bioprinting Regulations: a UK/EU Perspective. *Eur j risk regul*. juin 2017;8(2):441-7.
287. Solomon J, Csontos L, Clarke D, Bonyhadi M, Zylberberg C, McNiece I, et al. Current perspectives on the use of ancillary materials for the manufacture of cellular therapies. *Cytotherapy*. janv 2016;18(1):1-12.
288. Schuh JCL, Funk KA. Compilation of International Standards and Regulatory Guidance Documents for Evaluation of Biomaterials, Medical Devices, and 3-D Printed and Regenerative Medicine Products. *Toxicol Pathol*. avr 2019;47(3):344-57.
289. Sekar MP, Budharaju H, Zennifer A, Sethuraman S, Vermeulen N, Sundaramurthi D, et al. Current standards and ethical landscape of engineered tissues—3D bioprinting perspective. *J Tissue Eng*. janv 2021;12:204173142110276.
290. Avita Medical. Avita Medical: Product overview [Internet]. [cité 28 févr 2022]. Disponible sur: Product Overview
291. Food and Drug Administration. Transcyte FDA report [Internet]. FDA.report. [cité 28 févr 2022]. Disponible sur: <https://fda.report/GUDID/00618474000046>
292. Huang BJ, Hu JC, Athanasiou KA. Cell-based tissue engineering strategies used in the clinical repair of articular cartilage. *Biomaterials*. août 2016;98:1-22.
293. European Medicines Agency. Retrait de la demande d'autorisation de mise sur le marché pour Hyalograf C autograft (chondrocytes autologues, viables, caractérisés, amplifiés in vitro, ensemencés et cultivés sur une matrice d'échafaudage à base de hyaluronate) [Internet]. 2013 févr [cité 28 févr 2022]. Report No.: EMA/52320/2013. Disponible sur: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/medicine-qa/questions-answers-withdrawal-marketing-authorisation-application-hyalograf-c-autograft\\_fr-0.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/medicine-qa/questions-answers-withdrawal-marketing-authorisation-application-hyalograf-c-autograft_fr-0.pdf)
294. Coppens DGM, Hoekman J, De Bruin ML, Slaper-Cortenbach ICM, Leufkens HGM, Meij P, et al. Advanced therapy medicinal product manufacturing under the hospital exemption and other exemption pathways in seven European Union countries. *Cytotherapy*. oct 2020;22(10):592-600.

295. Kuchenbecker U, Konstanski M, Templin C. HTA and affordability for innovative therapies in Germany, perspectives on advanced therapy medicinal product (ATMP) pathway. HTA Quarterly Fall 2020 [Internet]. 4 sept 2020; Disponible sur: <https://www.xcenda.com/insights/htaq-winter-2020-hta-affordability-innovative-therapies-germany>
296. Cuende N, Rasko JEJ, Koh MBC, Dominici M, Ikonomou L. Cell, tissue and gene products with marketing authorization in 2018 worldwide. *Cytotherapy*. nov 2018;20(11):1401-13.
297. Food and Drug Administration, Office of Tissues and Advanced Therapies, Center for Biologics Evaluation and Research. BLA approval for Stratagraft. juin 15, 2021 p. 8.
298. Commission de la Transparence, Commission Nationale d'Évaluation des Dispositifs Médicaux et des Technologies de Santé. Avis du 30 JUIN 2020 sur les sphéroïdes de chondrocytes autologues humains associés à une matrice SPHEROX 10-70 sphéroïdes/cm2, suspension pour implantation, Première évaluation. [Internet]. Haute Autorité de Santé; 2020 juin p. 44. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/upload/docs/evamed/CT-18126\\_SPHEROX\\_PIC\\_INS\\_AvisDef\\_CT18126.pdf](https://www.has-sante.fr/upload/docs/evamed/CT-18126_SPHEROX_PIC_INS_AvisDef_CT18126.pdf)
299. Patzer T, Krauspe R, Hufeland M. Arthroscopic Autologous Chondrocyte Transplantation for Osteochondritis Dissecans of the Elbow. *Arthroscopy Techniques*. juin 2016;5(3):e633-6.
300. Refdata, swissmedicinfo. Information professionnelle sur le médicament Apligraf®, Transplant standardisé [Internet]. 2015. Disponible sur: <https://www.swissmedicinfo.ch/#section2>
301. Shevchenko RV, James SL, James SE. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. *J R Soc Interface*. 6 févr 2010;7(43):229-58.
302. Clark C, Ferraro B, Andreopoulos F, Bradshaw B. Biomaterial Applications in Wound Healing. 2013 [cité 9 mars 2022]; Disponible sur: <http://rgdoi.net/10.13140/RG.2.2.35954.84161>
303. Gottlieb ME. Apligraf - Re-Engineered Living Skin - Biotechnology and Chronic Wounds [Internet]. 2005 oct 6; Dallas. Disponible sur: [https://arimedica.com/content/arimedica\\_apligraf\\_\(partially%20annotated\)\\_2005-1006.pdf](https://arimedica.com/content/arimedica_apligraf_(partially%20annotated)_2005-1006.pdf)
304. Ho C, Tran K, Hux M, Sibbald G, Campbell K. Greffes de peau artificielle dans le traitement des plaies chroniques : une méta-analyse de l'efficacité clinique et une étude coûts-efficacité. [Internet]. Ottawa: Office canadien de coordination de l'évaluation des technologies de la santé; 2005. (Rapport technologique). Report No.: 52. Disponible sur: [https://www.cadth.ca/media/pdf/252\\_artificial\\_skin\\_graf\\_ts\\_tr\\_f.pdf](https://www.cadth.ca/media/pdf/252_artificial_skin_graf_ts_tr_f.pdf)
305. HAS S des recommandations professionnelles, HAS S évaluation économique et santé publique. Prise en charge de l'ulcère de jambe à prédominance veineuse hors pansement [Internet]. Saint-Denis La Plaine, France: Haute Autorité de Santé; 2006 juin p. 424. (Recommandation pour la pratique clinique). Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/argumentaire\\_final\\_.pdf](https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/argumentaire_final_.pdf)
306. Snyder D, Sullivan N, Margolis D, Schoelles K. Skin Substitutes for Treating Chronic Wounds [Internet]. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2020 [cité 15 avr 2022]. (AHRQ Technology Assessments). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554220/>
307. Lyons JG, Plantz MA, Hsu WK, Hsu EL, Minardi S. Nanostructured Biomaterials for Bone Regeneration. *Front Bioeng Biotechnol*. 21 août 2020;8:922.
308. Holland G, Pandit A, Sánchez-Abella L, Haiek A, Loinaz I, Dupin D, et al. Artificial Cornea: Past, Current, and Future Directions. *Front Med*. 12 nov 2021;8:770780.
309. Mastrullo V, Cathery W, Velliou E, Madeddu P, Campagnolo P. Angiogenesis in Tissue Engineering: As Nature Intended? *Front Bioeng Biotechnol*. 20 mars 2020;8:188.
310. Das S, Gordián-Vélez WJ, Ledebur HC, Mourkioti F, Rompolas P, Chen HI, et al. Innervation: the missing link for biofabricated tissues and organs. *npj Regen Med*. déc 2020;5(1):11.
311. O'Donnell BT, Ives CJ, Mohiuddin OA, Bunnell BA. Beyond the Present Constraints That Prevent a Wide Spread of Tissue Engineering and Regenerative Medicine Approaches. *Front Bioeng Biotechnol*. 7 mai 2019;7:95.
312. Commission de la Transparence, HAS. Synthèse d'avis de la Commission de la Transparence de la Haute Autorité de Santé sur HOLOCLAR (cellules souches limphiques autologues amplifiées) [Internet]. 2016 juill. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2017-01/dir1/holoclar\\_synthese\\_ct15190.pdf](https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2017-01/dir1/holoclar_synthese_ct15190.pdf)

**Vu, le Président du jury,**

Johann CLOUET

**Vu, le Directeur de thèse,**

Gaël GRIMANDI

**Vu, le Directeur de l'UFR,**

**Prénom étudiant : Thomas**

**Nom étudiant : Massaloup**



---

**Nom - Prénoms : Massaloup Thomas**

**Titre de la thèse : L'ingénierie tissulaire et les médicaments de thérapie innovante qui en sont issus : promesses et réalité**

---

**Résumé de la thèse :** L'ingénierie tissulaire est un domaine transversal et pluridisciplinaire de la médecine régénérative apparu à la fin du XX<sup>ème</sup> siècle. En réponse à des besoins thérapeutiques non couverts, son objectif est de faire le lien entre les prothèses et les greffes d'organes et de pallier à leur insuffisance via une approche hybride sophistiquée faisant en particulier appel aux biomatériaux, aux cellules souches et à des procédés de mise en forme complexes pour créer des substituts tissulaires synthétiques. Les premières percées médiatisées dans ce domaine ont eu lieu il y a 30 ans et ont engendré des promesses de révolution thérapeutique et de fortes attentes. Ce travail liste les médicaments issus de l'ingénierie tissulaire commercialisés dans le monde et étudie leur environnement réglementaire afin de mesurer le chemin parcouru en 30 ans. Afin de comprendre les réussites, les échecs et les perspectives d'évolution de l'ingénierie tissulaire au-delà de ses applications cliniques, une description détaillée et un état des lieux de ses dernières avancées scientifiques est proposée.

---

**MOTS CLÉS :** INGENIERIE TISSULAIRE ; MEDECINE REGENERATIVE ; CELLULES SOUCHES ; BIOMATERIAUX ; MEDICAMENTS ISSUS DE L'INGENIERIE TISSULAIRE.

---

## **JURY**

**PRÉSIDENT :** **Mr Johann CLOUET**, Professeur de Pharmacie Galénique, UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologique de Nantes.

**ASSESEURS :** **Mr Gaël GRIMANDI**, Professeur de Biophysique et Pharmacie Galénique, UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologique de Nantes.

**Mme Sophie FOUGERAY**, Maître de Conférences d'Immunologie, UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologique de Nantes.

**Mr Jean-Baptiste DUPONT**, Docteur en Biologie, Nantes.

---