

Greffes et cellules souches : jusqu'où ira-t-on ?

Imprimer un os, fiction ou réalité ?

1. Introduction

De nos jours, le problème majeur concernant les greffes d'organes est le nombre important de personnes inscrites sur la liste d'attente par rapport au nombre d'organes disponibles. En Belgique, au cours de l'année 2019, 1225 patients se sont inscrits sur la liste d'attente pour une greffe. Cependant, seuls 984 patients ont subi une greffe d'organe provenant d'un donneur décédé (1).

Un autre problème pouvant survenir lors d'une transplantation est le rejet de greffe, c'est-à-dire que le tissu biologique greffé sera perçu comme étranger et ne va pas être accepté par l'organisme du receveur. En effet, les patients greffés sont susceptibles de faire un rejet de greffe et celui-ci peut survenir à n'importe quel moment dans la vie du patient greffé. Les rejets de greffes ont cependant pu être diminués au cours des années notamment grâce au développement de médicaments tels que les immunosuppresseurs qui préviennent le rejet de greffe (2).

La bio-impression pourrait être la solution à ces problèmes de liste d'attente et de rejets de greffes ainsi qu'à certains problèmes médicaux tels que des déformations osseuses ou des problèmes vasculaires. La bio-impression peut également être utile dans le domaine de la recherche médicale en modélisant par exemple des tumeurs afin d'analyser leurs comportements et donc d'élaborer des traitements contre ces cancers (3).

Qu'est-ce que la bio-impression ? C'est l'impression en 3D de tissus biologiques vivants qui seront utilisés pour traiter les patients ayant besoin d'une greffe. Bien que la bio-impression soit un sujet de recherche assez récent, elle se développe rapidement notamment grâce aux nouvelles avancées technologiques (3,4,5). Plusieurs transplantations de tissus bio-imprimés tels que la peau, les os et le tissu cartilagineux se sont déroulées avec succès, notamment en Belgique avec un enfant atteint d'une pseudarthrose congénitale (déformation osseuse) (6). Dans ce dossier, nous nous focaliserons sur la création de tissu osseux par bio-impression à partir de cellules souches extraites du tissu adipeux, c'est-à-dire de la graisse.

2. Principe et fonctionnement :

Le principe de la bio-impression consiste à reconstituer, à partir de cellules vivantes, un tissu vivant couche par couche. Il faut bien faire la différence entre l'impression 3D et la bio-impression. La bio-impression est la création d'un tissu vivant à partir d'une bio-encre tandis que l'impression 3D permet de créer une plus grande variété d'objets non-vivants à partir de matériel non-vivant comme du plastique ou du métal (5). La méthode la plus courante dans la bio-impression est la méthode de jet d'encre. Cette méthode consiste à l'éjection de microgouttelettes de bio-encre provoquée par une variation de chaleur ou une variation électrique sur une plateforme (7). La bio-encre a pour but de garder les cellules qu'elle contient dans des conditions maintenant leur survie et favorisant leur développement. Sa composition, toujours en amélioration, reste variable et diffère selon le type de cellules. Plusieurs équipes de recherche essayent d'améliorer l'organe/tissu imprimé en rajoutant des biomatériaux spécifiques à cet organe. La composition de base de la bio-encre peut se classer en deux catégories : la matrice et les cellules d'intérêt. La matrice est composée de biomatériaux, principalement les hydrogels. Les hydrogels ont pour but de créer une structure 3D reliant et connectant les cellules (7). La bio-encre est produite, dans la majeure partie des cas, à partir de cellules provenant du patient dans le but d'éviter toute forme de rejet (1). Ces cellules peuvent être des cellules souches. Les cellules souches sont des cellules non spécialisées qui peuvent donner n'importe quel type de cellules du corps. Celles utilisées sont : 1. des « induced pluripotent stem cells » (iPSC) qui sont des cellules adultes de l'organisme qui vont subir, dans un laboratoire, un retour vers un état moins différencié, plus proche de l'état embryonnaire; 2. des cellules souches mésenchymateuses (qui sont les plus utilisées en bio-impression notamment grâce à leur facilité de culture et leur solidité) et des cellules souches neuronales (8).

Avant d'entamer la bio-impression, il est nécessaire de réaliser un scanner ou une IRM (imagerie par résonance magnétique) de l'organe concerné pour avoir une image médicale. À partir de celle-ci, les chercheurs vont créer un tissu/organe sur mesure pour le patient (7). Les cartouches de l'imprimante biologique sont ensuite chargées de cellules, d'hydrogel (alginate), de gélatine (qui est liquide lors de

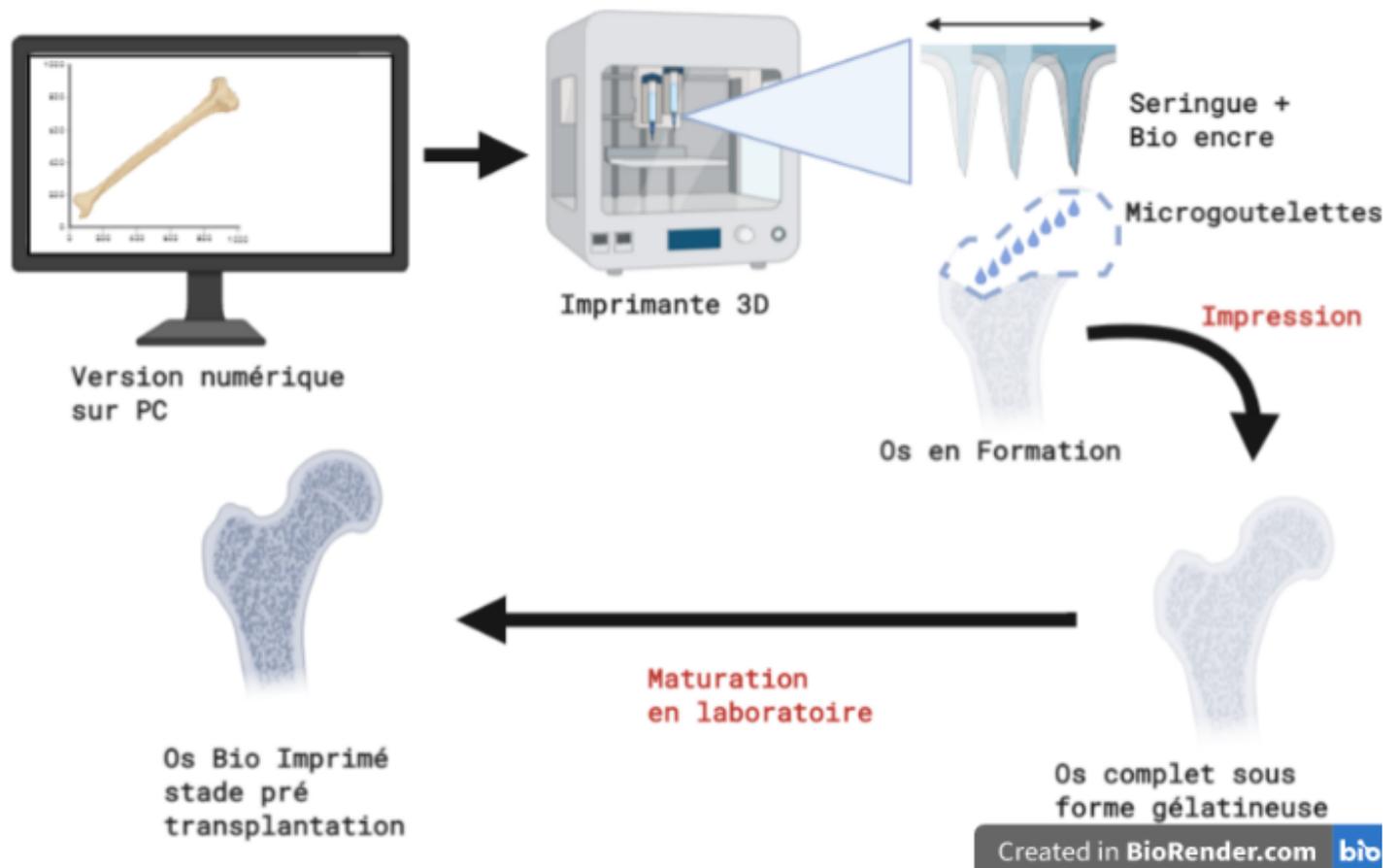


Figure 1 : Bio-impression d'un os par jet d'encre

l'impression mais qui se gélifie lors de la maturation de l'organe) et de fibrinogène dont le rôle est de permettre l'adhésion cellulaire. Cette cartouche constituée de ces différents éléments (sous forme liquide) sera ensuite placée dans une seringue reliée à un ordinateur sur lequel on retrouve le modèle numérique de l'organe (7, 9). Comme illustré sur la **figure 1**, l'impression consiste au dépôt couche par couche de cellules. Au fur et à mesure de ce dépôt de cellules, l'organe imprimé va passer de la forme liquide à une forme de gélatine, étape essentielle appelée maturation. L'impression dure en moyenne 15 à 40 min à une température de 28°C et l'étape de maturation dure quant à elle 60 min à température ambiante. Cette étape de maturation consiste en la polymérisation de l'hydrogel, solidifiant ainsi le tissu imprimé (7).

3. L'utilité de la Bio-impression dans le traitement des pathologies osseuses

Les défauts osseux sont des pathologies pour lesquelles la bio-impression va être d'une grande aide grâce à différentes méthodes qui consisteront notamment à cultiver des cellules souches avant de les implanter dans le patient pour réparer des lésions de tailles et d'épaisseurs différentes (10).

Rappel sur la structure et la composition du tissu osseux

Le tissu osseux est un constituant important de l'appareil squelettique. Il est essentiel sur le plan mécanique mais aussi sur le plan métabolique. Ce tissu est une structure dynamique en perpétuel remaniement. En effet, il est continuellement produit par les ostéoblastes, modifié par les ostéocytes et détruit par les ostéoclastes (11). L'os est donc constitué de ces cellules ainsi que d'une matrice extracellulaire. Celle-ci est

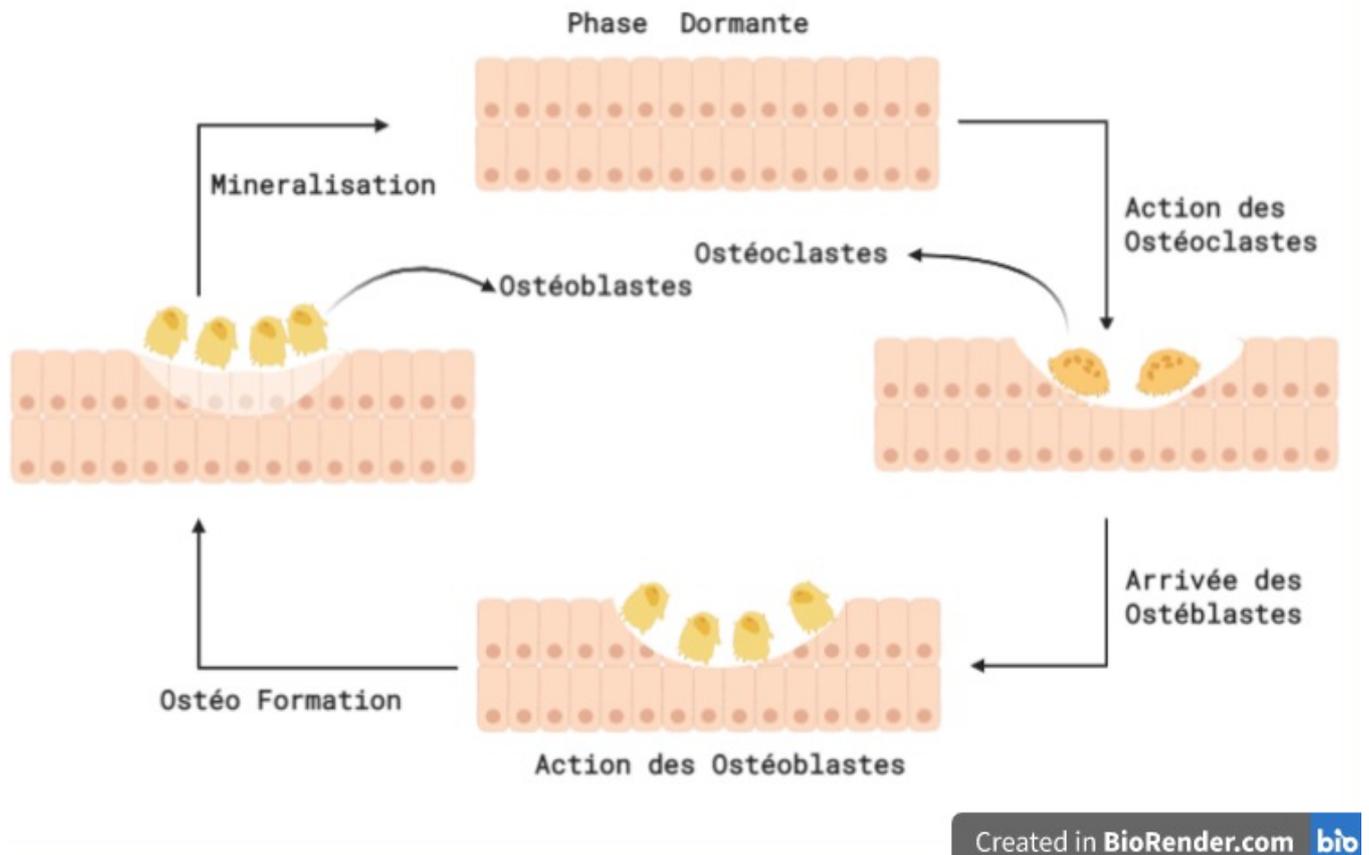


Figure 2 : Processus du remaniement osseux

produite par les ostéoblastes et forme des lamelles qui s'interconnectent et confèrent à l'os sa résistance à l'étirement et à la pression. Les ostéoblastes sont des cellules dont le cytoplasme est rempli d'organites impliqués dans la synthèse et la sécrétion de macromolécules matricielles. Durant la synthèse de cette matrice, une large part des ostéoblastes meurent, d'autres retournent à un état de repos principalement sur les surfaces osseuses, d'autres encore sont emprisonnés dans la matrice qu'ils ont synthétisé. Ceux-ci sont appelés ostéocytes. Les ostéoclastes sont des cellules géantes dérivant des monocytes sanguins. Ils libèrent des hydrolases acides qui digèrent la matrice organique (12). On a donc un processus de renouvellement grâce à l'équilibre entre l'action des ostéoblastes et des ostéoclastes. En effet, quand les ostéoclastes éliminent le tissu osseux vieillissant, les ostéoblastes synthétisent la matrice osseuse (**Figure 2**). Ce processus donne donc à l'os des propriétés d'autoréparation le rendant capable de se régénérer en cas de lésion. Ainsi, après une fracture, ce processus d'autoréparation suffit généralement à la guérison. Cependant, dans certains cas, il est insuffisant (13). Certaines pathologies (comme la pseudo-arthrose) ou interventions chirurgicales (ablation de tumeurs, de kystes) peuvent aboutir à d'importantes pertes de substance osseuse que l'ostéogénèse ne suffira pas à combler. La reconstruction de l'os doit alors être assistée (14).

Comment obtenir des cellules osseuses à partir de tissu adipeux

Les cellules osseuses proviennent de 2 types de cellules souches : les cellules souches mésenchymateuses (CSM) et les cellules souches hématopoïétiques (Figure 3). Les CSM sont dites « multipotentes », c'est-à-dire qu'elles peuvent se transformer en différents types de cellules qui auront une fonction précise. Comme illustré sur la figure 3, elles peuvent se différencier en adipocytes (cellules du tissu graisseux), chondrocytes (cellules du tissu cartilagineux) ou ostéocytes (os) en fonction notamment des facteurs de transcription présents (protéines qui vont provoquer la transformation de la cellule souche) (15). Il est donc possible d'obtenir des cellules osseuses (ostéoblastes et ostéocytes) à partir des CSM si ces dernières sont mises en présence de facteurs de transcription spécifiques (ici Cbfa1/Runx2) (16). Un des avantages des CSM est leur présence dans plusieurs tissus, notamment la moelle osseuse et le tissu adipeux. La graisse corporelle est d'ailleurs 100 à 500 fois plus riche en CSM que la moelle osseuse et son prélèvement présente moins de risques pour le donneur (15,16). Les CSM ont par ailleurs d'autres fonctions justifiant leur utilisation en

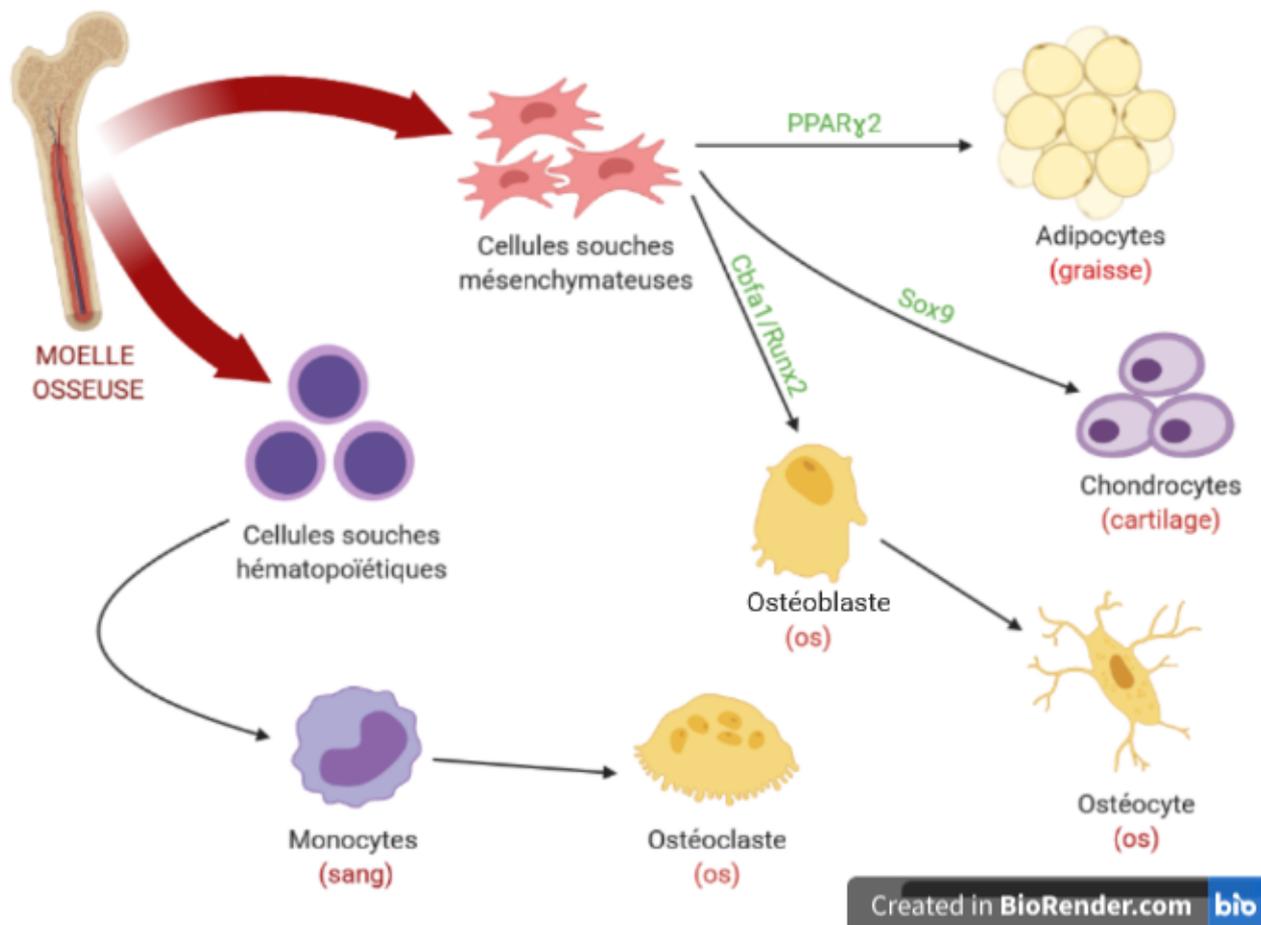


Figure 3 : Origine des cellules osseuses et principaux facteurs de transcription (en vert) impliqués dans leur différenciation

bio-impression. Elles ont notamment des propriétés immunomodulatrices, c'est-à-dire qu'elles peuvent agir sur le système immunitaire en favorisant la guérison de la lésion et en réduisant les réponses immunitaires impliquées dans le rejet du tissu greffé (16). Les CSM utilisées en bio-impression ne doivent donc pas nécessairement provenir du patient : elles peuvent être prélevées d'un donneur sain (15). De plus, les CSM communiquent avec les cellules environnantes en libérant des substances qui vont guérir les lésions osseuses et stimuler la formation de vaisseaux sanguins, ce qui permet d'intégrer le tissu greffé au corps (15,16). En effet, dans le cas où l'os greffé n'est pas alimenté par le sang, l'os meurt et doit être enlevé rapidement. La présence de vaisseaux sanguins dans le greffon est également importante pour les ostéoclastes. Ce type de cellules osseuses est issu des monocytes sanguins produits par les cellules souches hématopoïétiques (**Figure 3**). Les monocytes arrivant vers l'os via le sang vont fusionner pour créer des ostéoclastes qui s'attachent à l'os afin de murer et acquérir leur fonction complète (17). D'un point de vue technique, pour obtenir des cellules osseuses à partir du tissu adipeux, un échantillon de graisse est prélevé du patient ou du donneur et passe par différents processus de purification pour en extraire les CSM. Ces dernières sont ensuite cultivées dans des conditions similaires à celles du corps (18). Ce détail est très important car une modification du milieu de vie habituel des cellules souches représente un stress qui peut provoquer leur transformation en cellules cancéreuses (19). Les CSM sont ensuite ajoutées à la bio-encre. Celle-ci contiendra également des facteurs de croissance qui sont ici des protéines favorisant le développement des vaisseaux sanguins telles que le VEGF et la croissance et maturation de l'os telles que la BMP-2. Les vaisseaux sanguins devant se former avant le tissu osseux, il est important de contrôler la libération des facteurs de croissance osseuse. À cet effet, différentes techniques ont été développées consistant notamment à encapsuler les CSM et/ou la BMP-2 impliquée dans la formation de l'os, permettant ainsi de retarder leur action (10). Une fois le tissu imprimé implanté dans le patient, les vaisseaux sanguins se formeront en premier et seront suivis par la transformation des CSM en ostéoblastes, transformation nécessitant la présence du facteur de transcription Runx2. Pour être fabriqué par la cellule souche, le gène de Runx2 doit être apporté par un rétrovirus (20).

Cette technique a-t-elle déjà été utilisée en Belgique ?

En 2018, un petit garçon de 5 ans a bénéficié d'une greffe osseuse par bioimpression. Il était atteint de pseudarthrose congénitale caractérisée par une courbure de la jambe avec une perte de substance osseuse importante du tibia soit une maladie rare et invalidante où une fracture du tibia ne guérit pas. L'enfant a été pris en charge par les Cliniques universitaires Saint-Luc et a bénéficié d'une technologie innovante de la spin-off UCLouvain Novadip : un implant tissulaire en 3D de plus de 18 cm³. Le greffon, qui pourrait être comparé à une sorte de plasticine, a été directement implanté dans la fracture non cicatrisante. Un an après l'implantation, les résultats montrent un remodelage osseux suffisant pour permettre à l'enfant de marcher sans douleur et sans récurrence apparente de la maladie. Aujourd'hui, 2 ans plus tard, le petit bonhomme marche normalement, l'opération est une réussite (6).

4. Complications possibles et limitations

L'utilisation des rétrovirus pour provoquer la transformation des CSM en ostéoblastes n'est pas sans danger. En effet, pour que la cellule souche puisse produire le facteur de transcription nécessaire à sa transformation, le virus doit pénétrer dans la cellule et intégrer son ADN viral à un endroit de l'ADN de la cellule à un endroit non-codant, c'est-à-dire un endroit de l'ADN qui n'est pas essentiel au fonctionnement de la cellule. Il arrive malheureusement que l'ADN viral s'intègre dans une région codante de l'ADN, ce qui peut provoquer des dysfonctionnements de cette cellule et être responsable de cancers (20). Un problème majeur de la bioimpression est le manque de précision : la reproduction d'organes entiers complexes tels que le cœur, le rein et le foie ainsi que leurs réseaux veineux, artériel et capillaire associé est actuellement impossible (3,4). En fonction de la méthode de bio-impression choisie, des limitations techniques peuvent s'ajouter, notamment dans la composition des bio-encre. En effet, une quantité de cellules trop élevée augmente la viscosité de l'encre et présente ainsi un risque d'obstruction de la seringue (3,4). Le coût des bio-imprimantes, souvent proportionnel à leur précision, peut également présenter un obstacle à l'accessibilité de cette technologie au grand public (10). Enfin, une limitation importante de la bio-impression est l'absence d'études sur le long terme. En effet, cette technologie ayant vu le jour au cours de cette dernière décennie, les conséquences sur le long terme d'une greffe par bio-impression sont encore inconnues (4).

5. Conclusion

La bio-impression est une technique innovante qui possède des perspectives intéressantes dans le traitement des pathologies osseuses. Cependant, les limites existantes et les effets sur le long terme encore inconnus nous montrent qu'il y a du chemin à parcourir.

6. Bibliographie

- (1) Prof. Jon J. van Rood. (page consultée le 01/12/2020). Cooperating saves lives, [en ligne]. <https://www.eurotransplant.org>
- (2) Raymond Marcellin. (page consultée le 10/11/2020). La sciences pour la santé, [en ligne]. <https://www.inserm.fr/>
- (3) Fricain J-C, De Olivera H, Devillard R, Kalisky J, Remy M, Kériquel V, et al. Impression 3D en médecine régénératrice et ingénierie tissulaire. *Med Sci (Paris)*. 2017;33(1):52-9. DOI: 10.1051/medsci/20173301009
- (4) Mandrycky C, Wang Z, Kim K, Kim D-H. 3d bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnol Adv*. 2016;34(4):422-34. DOI : 10.1016/j.biotechadv.2015.12.011.
- (5) Li J, Chen M, Fan X, Zhou H. Recent advances in bioprinting techniques: approaches, applications and future prospects. *Journal of Translational Medicine*. 2016;14(1):271. DOI: 10.1186/s12967-016-1028-0.
- (6) Thirion G, Docquier P, Veriter S, Lebrun V, Adnet P, Caty C, et al. A scaffold-free graft for large critical size bone defect: preclinical evidence to clinical proof of concept. *Cytotherapy*. 2020;22(5):S33. DOI: 10.1016/j.jcyt.2020.03.019
- (7) Pourchet L. Développement d'une bio-encre pour la bioimpression 3D de tissus vivants : étude de la formulation et caractérisation du développement tissulaire. *Biotechnologie*. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1232 . tel-02065562. Disponible sur : <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02065562/file/TH2018POURCHETLEA.pdf>
- (8) Skeldon G, Lucendo-Villarin B, Shu W. Three-dimensional bioprinting of stem-cell derived tissues for human regenerative medicine. *Phil Trans R Soc B*. 2018;373(1750):20170224. DOI: 10.1098/rstb.2017.0224
- (9) Mouser VHM, Levato R, Mensinga A, Dhert WJA, Gawlitta D, Malda J. Bio-ink development for three-dimensional bioprinting of hetero-cellular cartilage constructs. *Connective Tissue Research*. 3 mars 2020;61(2):137-51. DOI: 10.1080/03008207.2018.1553960.
- (10) Ashammakhi N, Hasan A, Kaarela O, Byambaa B, Sheikhi A, Gaharwar AK, et al. Advancing Frontiers in Bone Bioprinting. *Adv Healthcare Mater*. 2019;8(7):1801048. DOI: 10.1002/adhm.201801048

- (11) Marsot, Charlotte, et al. « Os et métabolisme ». *Annales d'Endocrinologie*, vol. 79, septembre 2018, p. S4047. ScienceDirect, doi:10.1016/S0003-4266(18)31236-8.
- (12) Le Goff, Benoit, et al. « Ostéoclastes dans la PR : hétérogénéité de leurs origines et fonctions ». *Revue du Rhumatisme*, vol. 80, no 5, octobre 2013, p. 45358. ScienceDirect, doi:10.1016/j.rhum.2013.02.021.
- (13) Dimitriou, R., Jones, E., McGonagle, D. *et al.* Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med* **9**, 66 (2011). DOI: 10.1186/1741-7015-9-66.
- (14) Docquier PL, Schubert T. Techniques et indications des greffes osseuses et ostéocartilagineuses. *EMC - Techniques chirurgicales - Orthopédie-Traumatologie* 2020;0(0):1-26 [Article 44-030]. DOI : 10.1016/S0246-0467(20)42620-0.
- (15) Charbord P, Casteilla L. La biologie des cellules souches mésenchymateuses d'origine humaine. *Med Sci (Paris)*. 2011;27(3):261-7. DOI: 10.1051/medsci/2011273261
- (16) Martinaud C, Thepenier C, Trouillas M, Peltzer J, Uzan G, Le Bousse Kerdilès M-C, et al. Les cellules souches mésenchymateuses: des cellules pour la médecine régénérative du futur? *Revue Francophone des Laboratoires*. 2010;2010(427):47-59. DOI: 10.1016/S1773-035X(10)70732-2
- (17) Baron R. L'ostéoclaste et les mécanismes moléculaires de la résorption osseuse. *Med Sci (Paris)*. 2001;17(12):1260-9. DOI: 10.1051/medsci/200117121260
- (18) Sensebé L, Bourin P. Cellules souches mésenchymateuses: Production à usage clinique et contraintes sécuritaires. *Med Sci (Paris)*. 2011;27(3):297-302. DOI: 10.1051/medsci/2011273297
- (19) Bétous R, Renoud M-L, Hoede C, Gonzalez I, Jones N, Longy M, et al. Human Adipose-Derived Stem Cells Expanded Under Ambient Oxygen Concentration Accumulate Oxidative DNA Lesions and Experience Procarcinogenic DNA Replication Stress: Oxygen-Dependent Replication Stress in Stem Cells. *STEM CELLS Translational Medicine*. 2017;6(1):68-76. DOI: 10.5966/sctm.2015-0401
- (20) Phillips JE, Burns KL, Le Doux JM, Guldberg RE, Garcia AJ. Engineering graded tissue interfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(34):12170-5. DOI: 10.1073/pnas.0801988105