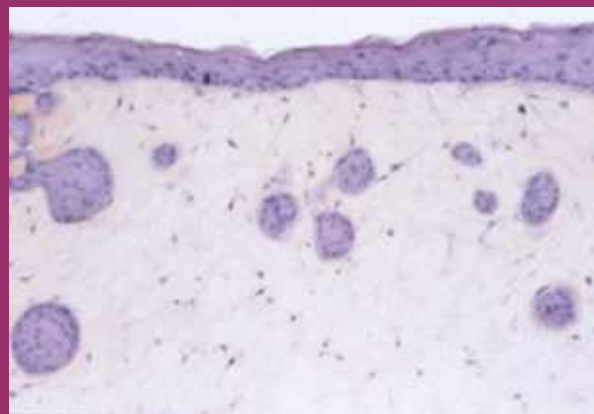
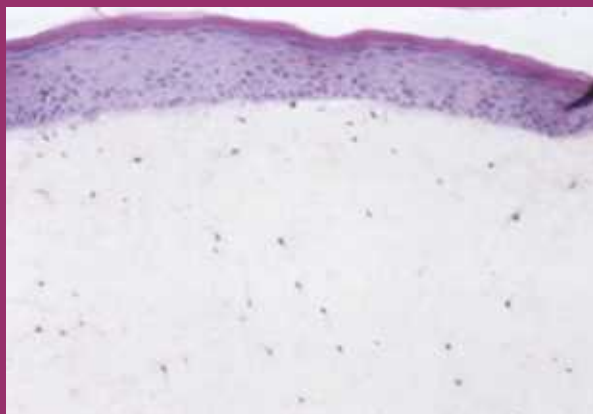




5. Comparée à une peau reconstruite normale (à gauche), la peau reconstruite avec des cellules d'un sujet atteint de la maladie génétique

Xeroderma pigmentosum (à droite) présente des invaginations de l'épiderme dans le derme. C'est le signe des phénomènes de cancérisation précoce.

épidermes de culture qui sont greffés sur les plaies et participent à la fermeture de l'ulcère. Ces modèles de peaux reconstruites sont aussi utilisés pour traiter les plaies aiguës qui apparaissent parfois après une intervention chirurgicale visant à retirer une zone de peau cancéreuse ou un tatouage.

À ce jour, la thérapie tissulaire à partir des peaux reconstruites a permis de sauver des milliers de vies humaines dans le cas des grands brûlés et a apporté de nouvelles façons de traiter les ulcères. Toutefois, la reconstruction n'est généralement ni parfaite ni complète. C'est pourquoi les biologistes étudient de nouveaux substrats qui facilitent la culture et la transplantation des épithéliums, par exemple des films de fibrine, et qui favorisent la réorganisation et la revascularisation du derme.

Les cellules souches, matériau de reconstruction de demain ?

Dans les tissus adultes, des cellules souches pluripotentes persistent. Elles assurent la survie et le renouvellement du tissu tout au long de la vie de l'individu. Capables d'autorenouvellement, elles donnent naissance à des cellules dont la capacité de prolifération est limitée et qui sont à la source de cellules différenciées. Les cellules souches épidermiques sont localisées au niveau du follicule pileux et dans l'épiderme interfolliculaire. Elles ont un important potentiel de prolifération *in vitro*. Aujourd'hui, les cellules souches sont difficiles à isoler parce qu'elles ne sont que partiellement caractérisées : elles n'expriment quasiment pas de marqueurs de surface à l'exception de certaines protéines d'adhérence qui les maintiennent à leur place. Disposer d'une carte d'identité plus précise des cellules souches épidermiques nous permettra de les sélectionner plus aisément. Bien qu'elles soient déjà engagées dans une voie de différenciation (celle des cellules de l'épiderme), elles conservent une plasticité notable. Ainsi sous l'influence de signaux dermiques appropriés, il est possible d'orienter leur différenciation en follicules pileux, en glandes sébacées et en glandes sudoripares.

Toutefois, la multiplication de ces cellules est régulée par un mécanisme naturel, une « horloge mitotique » qui limite le nombre possible des divisions cellulaires. Cette horloge est contrôlée par la perte progressive des séquences d'ADN situées à l'extrémité des chromosomes, les télomères. L'étude de cette horloge montre que le potentiel de division

des cellules est réduit lorsque les cellules sont multipliées en culture, et l'un des principaux enjeux du futur sera de décrypter et de maîtriser l'horloge mitotique de ces cellules.

Malgré les nombreuses similitudes entre la peau humaine normale et les modèles de peaux reconstruites, certaines limites existent, et, selon l'application, les paramètres à améliorer diffèrent. Dans le cas de l'utilisation de ces modèles pour des applications *in vitro*, il est nécessaire de renforcer la fonction barrière, et d'activer les enzymes responsables de la desquamation. Dans le cas des applications cliniques, les biologistes cherchent à optimiser le support de greffe en préparant le lit de greffe avec des pansements biologiques, et à développer un substrat dermique qui aura les propriétés élastiques du derme. Bien que des améliorations aient déjà été apportées au niveau du substrat dermique, la prise de greffe est toujours délicate, et l'aspect esthétique limité. Disposer des annexes cutanées, notamment des glandes sudoripares essentielles pour la régulation thermique et des follicules pileux, est un défi à relever.

L'ingénierie tissulaire de la peau progressera quand on maîtrisera mieux l'identification, l'isolement et la multiplication des cellules souches adultes, et le rôle de leur microenvironnement. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans le vieillissement de la peau et une amélioration du traitement des grands brûlés en sont deux enjeux majeurs.

Corinne FERRARIS dirige l'équipe Nouveaux modèles du Département des peaux reconstruites des Laboratoires L'Oréal.

V. FACY et al., *Langerhans cells integrated into human reconstructed epidermis respond to known sensitizers and ultraviolet exposure*, in *J. Invest. Dermatol.*, vol. 122, pp. 552-553, 2004.

N. FORTUNEL et al., *Long-term expansion of human functional epidermal precursor cells: promotion of extensive amplification by low TGF- β 1 concentrations*, in *J. Cell Sciences*, vol. 116, pp. 4043-4052, 2003.

F. BERNERD et al., *Clues to epidermal cancer proneness revealed by reconstruction of DNA repair-deficient xeroderma pigmentosum skin in vitro*, in *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 98 (14), pp. 7817-22, 2001.

V. RONFARD et al., *Long-term regeneration of human epidermis on third degree burns transplanted with autologous cultured epithelium grown on fibrin matrix*, in *Transplantation*, vol. 70, pp. 1588-1598, 2000.

C. FERRARIS et al., *Adult epidermal keratinocytes are endowed with pilosebaceous forming abilities*, in *Int. J. Dev. Biol.*, vol. 41, pp. 491-498, 1997.

M. RÉGNIER et al., *Integration of Langerhans cells into a pigmented reconstructed human epidermis*, in *J. Invest. Dermatol.*, vol. 109, pp. 510-512, 1997.

La reconstruction des cœurs endommagés

La réparation d'une lésion due à un infarctus du myocarde est un enjeu majeur de la médecine. Aujourd'hui, les spécialistes de l'ingénierie tissulaire cardiaque parviennent à éviter la dégradation du cœur après un infarctus, chez le rat.

Smadar Cohen • Jonathan Leor

Si une peine de cœur finit en général par guérir, une lésion du muscle cardiaque due à un infarctus s'aggrave avec le temps. Contrairement au foie ou à la peau, le tissu cardiaque ne se régénère pas, de sorte que la cicatrice qui subsiste après une crise cardiaque reste une zone morte qui ne se contracte plus. En perturbant les contractions synchrones normales du muscle cardiaque, la cicatrice renforce les contraintes qui s'exercent sur les parties saines du muscle, ce qui déforme encore davantage la paroi cardiaque et entraîne la mort de nombreuses cellules. La taille de la cicatrice (l'infarctus) peut doubler en quelques mois.

Grâce aux progrès de la médecine, un nombre croissant de personnes survivent à une crise cardiaque, mais un tiers d'entre elles finissent par souffrir d'une insuffisance cardiaque qui, à terme, nécessite une transplantation, solution complexe, coûteuse, et limitée par le manque de donneurs. L'espérance de vie des personnes qui ne bénéficient pas d'une transplantation diminue progressivement, et moins de 40 pour cent d'entre eux sont encore en vie cinq ans après leur première attaque.

Si les médecins pouvaient réparer un infarctus, ou simplement l'empêcher de s'étendre, des millions de vies en seraient transformées. C'est pourquoi la fabrication de fragments de tissu cardiaque humain vivant est devenue l'un des principaux objectifs de l'ingénierie tissulaire. C'est aussi l'un des plus ambitieux. Les fibres d'un muscle cardiaque s'organisent pour former des connexions

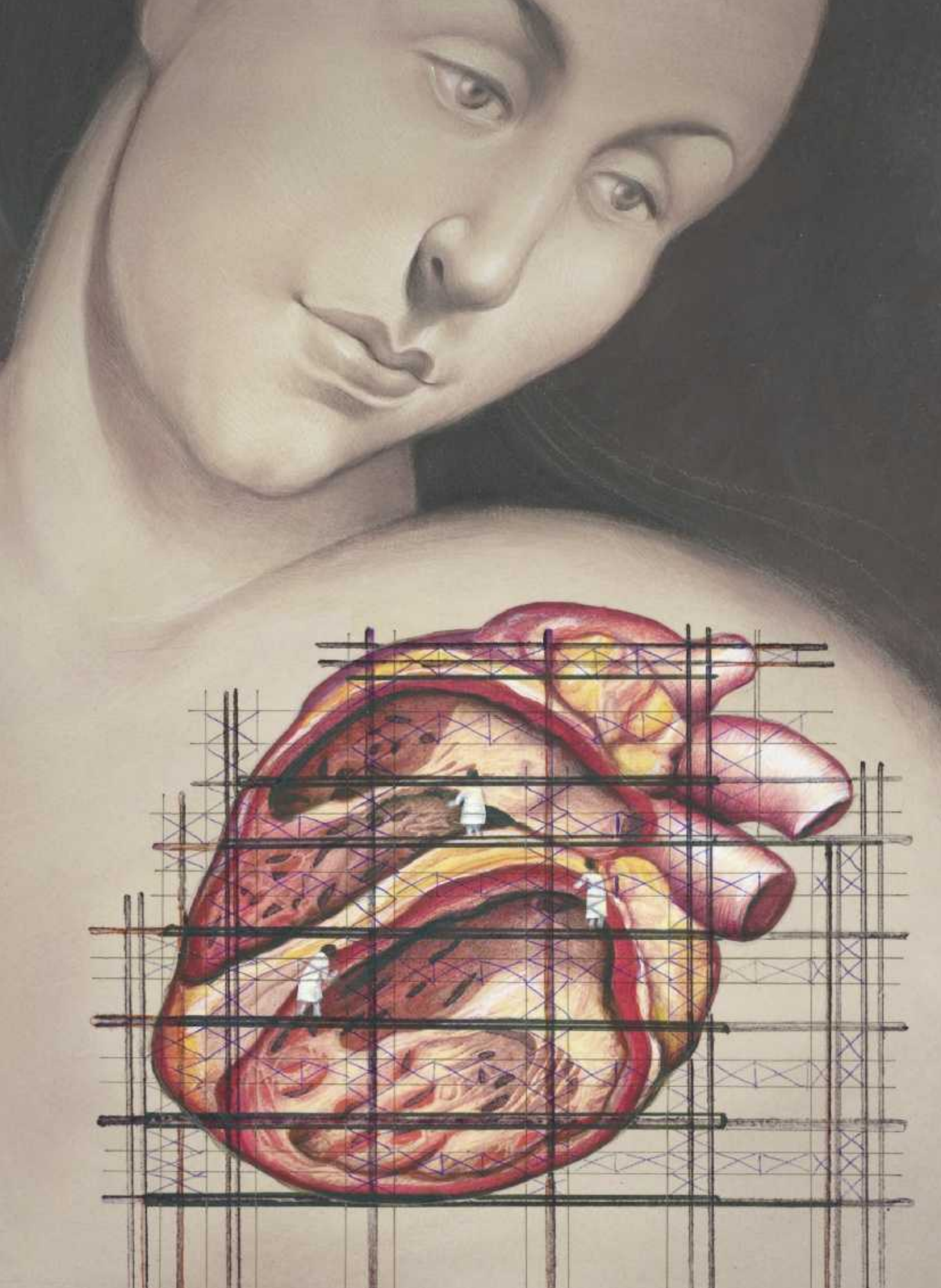
physiques et nerveuses qui acheminent les signaux électriques et permettent aux fibres de synchroniser les contractions. La peau et le cartilage sont moins complexes à faire croître en laboratoire, car ils ne sont pas vascularisés. Pour le muscle cardiaque, la principale difficulté est de vasculariser un morceau de tissu tridimensionnel.

Bien sûr, il y a une quinzaine d'années, la perspective de « fabriquer » un tissu vivant en dehors de l'organisme tenait de la science-fiction. Pourtant, les biologistes et les ingénieurs des matériaux ont fait des progrès notables ; par exemple, nous avons mis au point un support qui favorise la croissance des cellules cardiaques et des vaisseaux sanguins dans la zone morte d'un infarctus.

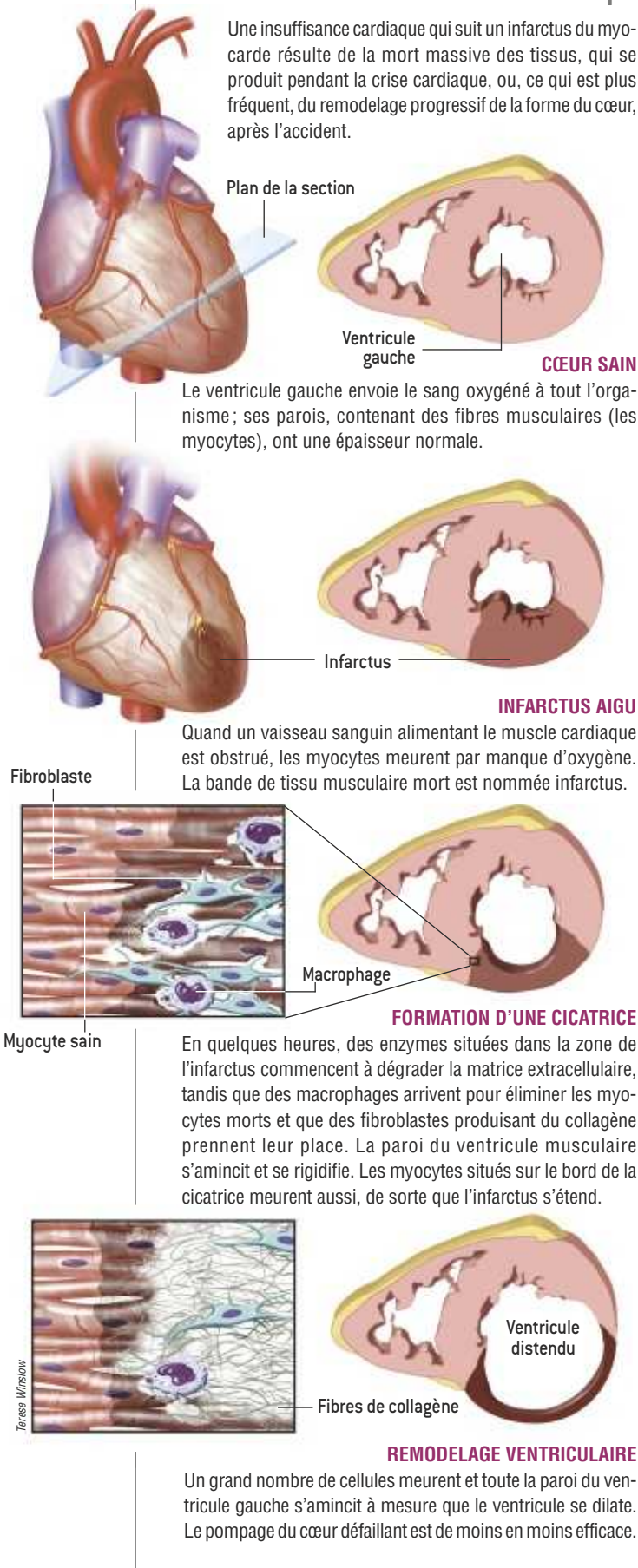
À la recherche du support idéal

Un infarctus du myocarde – une crise cardiaque – survient généralement lorsqu'un important vaisseau sanguin d'alimentation du ventricule gauche du cœur est obstrué par un caillot. Une partie du muscle cardiaque, le myocarde, est privée de sang et donc d'oxygène, ce qui détruit les cellules (les cardiomyocytes) de cette zone. La dimension de l'infarctus dépend de la taille de la zone alimentée par le vaisseau sanguin avant son obstruction.

Comme les myocytes se divisent peu, les cellules survivantes ne peuvent pas repeupler la zone endommagée. Les cellules souches locales, qui agissent comme progéniteurs de nouvelles cellules dans d'autres tissus, sont inefficaces dans le cœur et incapables de réparer la lésion. Au contraire,



Insuffisance cardiaque



des cellules fibreuses non contractiles remplacent peu à peu les myocytes morts. Les myocytes sains qui bordent l'infarctus peuvent mourir eux aussi, ce qui accroît l'étendue de l'infarctus. Au cours de ce processus, connu sous le nom de remodelage, la paroi du ventricule dans la zone de l'infarctus s'amincit et parfois même se rompt.

Au cours des dernières années, des biologistes ont tenté de réamorcer la croissance du tissu cardiaque dans une zone d'infarctus en transplantant des cellules souches provenant d'autres tissus, par exemple la moelle osseuse ou un muscle, avec l'espoir que ces cellules s'adaptent à leur environnement et produiraient de nouveaux cardiomyocytes, ou stimuleraient la capacité naturelle de régénération du cœur. Malheureusement, les résultats ont été décevants : très peu de cellules souches ont survécu après la transplantation, et celles qui ont survécu se sont généralement rassemblées sur les bords de l'infarctus, mais sans établir de contact avec le tissu sain adjacent ou sans conduire les signaux électriques qui permettent aux cellules cardiaques de synchroniser leurs contractions.

Ces cellules implantées ne sont pas fonctionnelles dans la zone lésée, car la structure naturelle qui soutient les cellules vivantes a disparu. Dans un tissu sain, la matrice extracellulaire, composée de protéines de structure, telles que le collagène, et de molécules de sucre complexes, les polysaccharides, produit des facteurs de croissance et fournit un support physique aux cellules.

À la recherche du support idéal

Les biologistes ont alors cherché un support idéal pour la croissance de tissus vivants, permettant aux cellules de se diviser et de s'organiser en un tissu tridimensionnel. Ces cellules auraient ensuite commencé à sécréter leur propre matrice extracellulaire, l'armature se serait dissoute, ne laissant derrière elle que du tissu sain. Qui plus est, l'armature stimulerait la vascularisation du nouveau tissu, les vaisseaux sanguins apportant de l'oxygène aux cellules et évacuant leurs déchets.

À la fin des années 1980, l'un de nous (Smadar Cohen) a travaillé avec Robert Langer, un pionnier de l'ingénierie tissulaire, à l'Institut de technologie du Massachusetts. À cette époque, l'idée de fabriquer des tissus vivants était encore du domaine du rêve. En 20 ans, de nombreux matériaux (synthétiques et naturels) ont été étudiés pour favoriser la croissance de cellules en un tissu fonctionnel.

Les polyesters dégradables sont parmi les matériaux synthétiques les plus utilisés, mais ils présentent plusieurs inconvénients. Ils sont hydrophobes, de sorte que les cellules vivantes y adhèrent mal, et des armatures réalisées avec ces polymères tendent à se désagréger plutôt qu'à se dégrader à un rythme régulier. Les sous-produits acides de leur dégradation déclenchent des inflammations locales des tissus, et menacent la survie des cellules transplantées. De nouveaux hydrogels synthétiques ne présentent pas ces inconvénients, et leur texture ressemble à celle d'une matrice extracellulaire naturelle, mais ils sont dépourvus des protéines d'une matrice extracellulaire naturelle, par exemple le collagène, indispensables au bon fonctionnement des cellules.

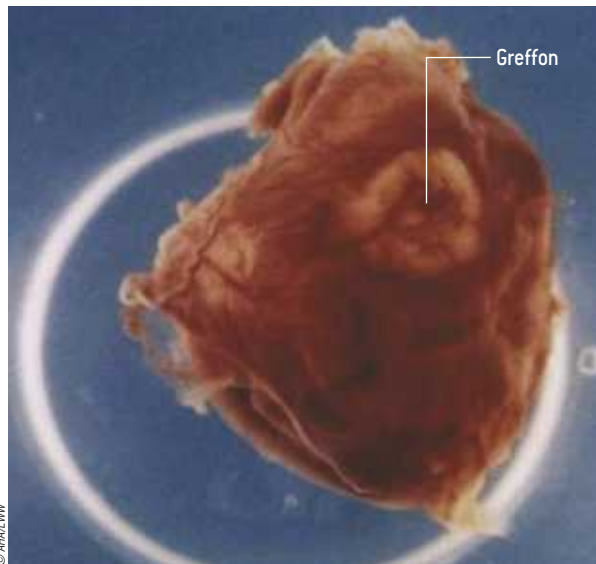
Le collagène lui-même, ainsi que d'autres protéines de la matrice extracellulaire, telle la fibronectine, ont également été testés en tant que support. Bien que ces protéines contiennent des acides aminés auxquels des cellules vivantes adhèrent, elles n'ont pas une résistance mécanique suffisante pour supporter un grand nombre de cellules, et, qui plus est, le collagène est rapidement consommé par les enzymes de l'organisme. En outre, certaines protéines peuvent être rejetées par le système immunitaire, ce qui ne ferait qu'accroître les risques encourus par le patient.

Nous avons donc décidé de fabriquer une armature faite avec un alginat, un polysaccharide dérivé d'algues. Il est biocompatible, c'est-à-dire qu'il n'est pas rejeté par le système immunitaire. Et, quand certains alginates sont dissous dans l'eau, puis exposés à des ions calcium chargés positivement, ils se comportent comme un hydrogel contenant 98 pour cent d'eau : leur consistance est gélatineuse et ils ont des propriétés élastiques semblables à celles d'une matrice extracellulaire naturelle.

Cependant, pour utiliser cet hydrogel d'alginat comme support, il nous fallait lui donner une forme et une structure interne, tout en renforçant sa résistance mécanique pour qu'il puisse conserver sa forme malgré le poids des cellules qui le coloniseraient. Pour ce faire, nous avons versé la solution d'alginat dans une série de moules, puis nous les avons refroidis selon trois méthodes produisant des gradients de température distincts durant la congélation. Des cristaux de glace séparés par de minces parois d'alginat se sont formés dans tous les échantillons. Après avoir éliminé ces cristaux par sublimation, il nous restait une armature ressemblant à une éponge dont les minuscules pores reflétaient la forme des cristaux. En agissant sur les paramètres de la congélation, nous changions la densité des pores, leur taille et leur direction, ainsi que la densité des connexions (voir l'encadré pages 80 et 81).

Les pores doivent être interconnectés, car cela permet aux cellulesensemencées de pénétrer dans l'armature. Il faut aussi que les nutriments puissent atteindre les cellules et que leurs déchets soient éliminés. Le degré d'interconnexion des pores influe aussi sur la revascularisation du tissu transplanté. Enfin, l'architecture d'une telle armature, qui ressemble à une mousse ou à une ruche, contribue à sa résistance mécanique. Bien qu'elles soient surtout constituées de vide (elles contiennent 95 pour cent de pores), ces structures sont très résistantes. Ainsi, nous disposons d'une armature ayant la structure souhaitée, n'activant pas le système immunitaire, non toxique, ayant une bonne stabilité mécanique à long terme, et se désagrégeant dans l'organisme en un temps raisonnable. Encore fallait-il vérifier que des cellules vivantes colonisaient ce support.

Avant d'implanter ces armatures dans des animaux de laboratoire, nous avons observé le comportement des cellules cardiaques sur de l'alginat *in vitro*. Nous avons prélevé des cellules de cœurs d'embryons de rats – qui, contrairement à des cardiomyocytes matures, se divisent – et nous les avons mises en suspension dans un milieu liquide contenant des nutriments. Nous avons ensuite placé dans ce milieu de culture des armatures rondes de six millimètres de diamètre et de un millimètre d'épaisseur. L'ensemble a été soumis à une force centrifuge modérée ; nous avons



Deux mois après son implantation sur un cœur de rat, un supportensemencé avec des cellules s'est intégré dans une zone d'infarctus. Des vaisseaux sanguins locaux ont pénétré dans le greffon, alimentant les cellules cardiaques matures à l'intérieur de l'implant et empêchant ainsi l'extension de l'infarctus.

constaté que les cellules se répartissent dans les pores des armatures en moins de 30 minutes. La rapidité est un avantage précieux pour préserver la viabilité de ces cellules sensibles au manque d'oxygène. Par conséquent, nous avons pu placer une densité élevée de cellules sur nos supports (10^8 cellules par centimètre cube, densité comparable à celle du muscle cardiaque mature).

Reconstruire un fragment de cœur

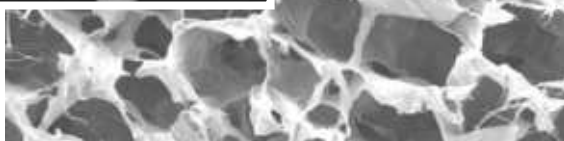
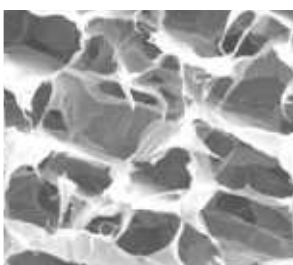
Nous avons transféré nos supportsensemencés dans un bioréacteur, qui maintient des conditions de culture idéales tout en assurant une circulation continue du milieu contenant les nutriments. Au bout de 24 heures, nous avons détecté des myocytes en train de battre. Au bout de sept jours, nous avons transplanté ces édifices dans des cœurs vivants. Nous avons anesthésié des rats adultes qui avaient eu un infarctus du myocarde sept jours auparavant. La cicatrice était bien visible, et nous avons placé les supportsensemencés sur l'infarctus, refermé l'incision, et attendu. Deux mois plus tard, nous avons ouvert pour observer le cœur, et nous avons constaté que de nombreux vaisseaux sanguins issus du tissu cardiaque sain irriguaient le greffon (voir la figure ci-dessus). Les implants s'étaient bien intégrés à la cicatrice, et les supports d'alginat avaient commencé à se dissoudre, une matrice extracellulaire naturelle prenant leur place. Les cellules cardiaques embryonnaires s'étaient développées en fibres musculaires matures, et quelques-unes étaient même organisées en structures parallèles comme dans un tissu cardiaque en développement. Les connexions mécaniques et les synapses électriques indispensables pour que les cellules cardiaques se contractent et conduisent les signaux nerveux étaient également présentes entre les fibres.

La conception du support

Support en alginate



Structure en éponge



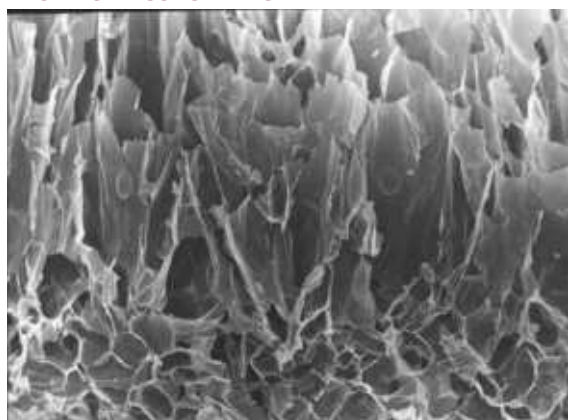
R. Bashir et S. Cohen; Ben-Gurion Univ.

Les cellules ont besoin d'un support qui les guide pour s'organiser en un tissu. La structure idéale contient des pores interconnectés, dont le diamètre est supérieur à 200 micromètres (la taille moyenne d'un capillaire), ce qui permet à des vaisseaux sanguins de s'infiltrer.

Nous avons choisi l'alginate, un dérivé d'algues, en raison de sa ressemblance avec la matrice extracellulaire naturelle. Il nous fallait cependant trouver un moyen de transformer une solution visqueuse d'alginate et d'eau en une armature solide dont la forme (*ci-contre à gauche*) et l'architecture interne (*ci-contre à droite*) seraient contrôlables avec précision.

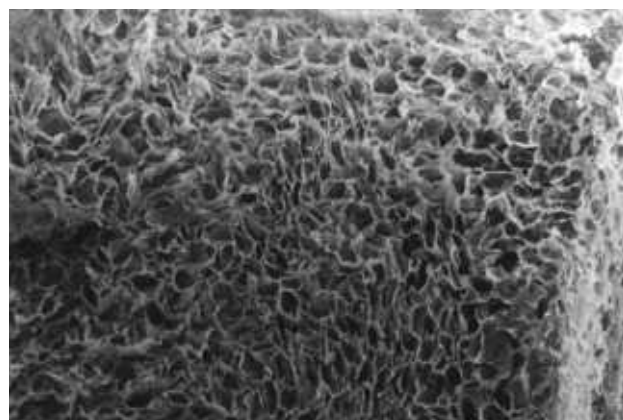
La congélation de l'hydrogel a permis d'obtenir une architecture en éponge, les cristaux de glace étant séparés par de minces parois solides d'alginate. La sublimation des cristaux libère des pores de formes, de taille et d'orientation variées reflétant la vitesse et la direction de la croissance des cristaux lors du refroidissement.

RÉGIMES DE CONGÉLATION



Elsavler et S. Zmora et S. Cohen; Ben-Gurion Univ.

Dans un bain d'huile à -35°C , de la glace s'est formée très rapidement, produisant de minuscules pores interconnectés et denses sur le fond. Des pores allongés et plus grands, au-dessus, suivent la direction du front de refroidissement.



Dans de l'azote liquide à -196°C , un gradient similaire apparaît. La forme complexe des pores dans la partie supérieure de l'échantillon résulterait de la grande volatilité de l'azote, qui produit des fronts de refroidissement pluridirectionnels là où le gaz rencontre la solution d'alginate.

Avant d'effectuer les transplantations, nous avons mesuré par échographie la fonction cardiaque des rats, en faisant de même pour un groupe de rats de contrôle ayant eu un infarctus, et ayant subi une ouverture du thorax, mais pas de transplantation. Deux mois plus tard, nous avons à nouveau examiné tous les rats par échographie cardiaque. Dans le groupe contrôle, nous avons observé le scénario habituel de dégradation du cœur: dilatation du ventricule gauche et diminution notable de la fonction cardiaque. Au contraire, chez les rats transplantés, la taille du ventricule gauche, l'épaisseur de sa paroi et la fonction cardiaque étaient stables.

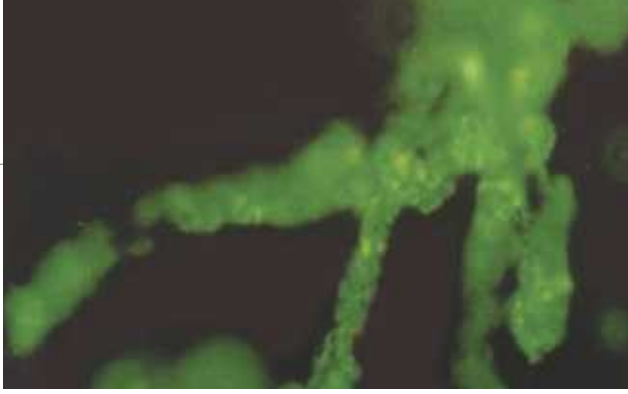
Ainsi, nous avons prévenu toute nouvelle détérioration pouvant aboutir à une insuffisance cardiaque. Pour autant, on ignore encore le mécanisme grâce auquel ce traitement a protégé le muscle cardiaque, car le tissu greffé ne contribuait pas encore aux contractions du cœur. Il semble qu'en empêchant la croissance de l'infarctus et en épaississant artificiellement la paroi du cœur dans la zone de l'infarctus, le greffon ait évité le remodelage habituel du ventricule.

Nous pensons que la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins dans la zone de l'infarctus a également contri-

bué à ralentir la détérioration du tissu. Le nombre et la taille des nouveaux vaisseaux sanguins ont augmenté quand nous avons implanté des supports peuplés de cellules, mais nous avons constaté que même des supports dépourvus de cellules stimulent la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins dans un infarctus.

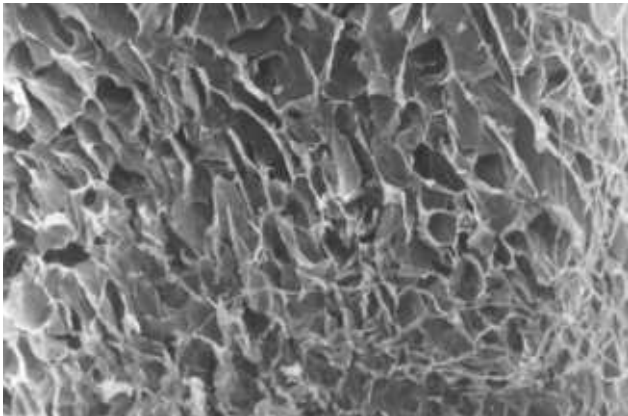
L'armature d'alginate stimule peut-être la croissance des vaisseaux sanguins simplement parce qu'elle leur fournit un support lorsqu'ils pénètrent dans la zone endommagée. Le matériau lui-même doit attirer des cellules souches qui stimulent la régénération, car la structure moléculaire de l'alginate ressemble à celle d'un des principaux polysaccharides de la matrice extracellulaire naturelle. Pour tester cette hypothèse, nous avons récemment injecté un hydrogel d'alginate directement dans des infarctus de rats. Même sous cette forme, l'alginate a préservé la structure et la fonction du ventricule, en agissant, semble-t-il, comme un substitut de la matrice extracellulaire et en stimulant l'angiogenèse.

Nous nous efforçons d'identifier les sources potentielles de cellules cardiaques qui seraient utilisables dans des transplantations humaines. Les cellules cardiaques matures d'un



ARCHITECTURE DES PORES

Notre aptitude à contrôler l'architecture des supports avec les techniques de congélation est précieuse parce que la structure des pores a une influence notable sur la fonction du tissu en formation. Des pores allongés, par exemple, favorisent la formation de vaisseaux sanguins. Nous avons utilisé de l'azote liquide pour créer des supports contenant de longs canaux, puis nous les avonsensemencés avec des cellules endothéliales marquées par une substance fluorescente : nous avons constaté que les cellules se sont arrangées en structures qui ressemblaient à des capillaires.



Dans un congélateur à -20°C , la solution d'alginate est d'abord refroidie jusqu'à -10°C , réchauffée jusqu'à -2°C , et refroidie lentement jusqu'à -20°C . L'eau cristallise au même moment dans tout l'échantillon, de sorte que les pores sont répartis uniformément et interconnectés.

patient ne se répliquent pas, et ne peuvent servir pour la réparation des infarctus. Les cellules de donneurs éventuels qui pourraient devenir des cardiomyocytes comprennent les cellules souches embryonnaires et les cellules souches adultes issues de la moelle osseuse ou du sang du cordon ombilical. Toutes ces cellules de donneur seraient reconnues comme étrangères par le système immunitaire du patient, ce qui nécessiterait l'utilisation de médicaments immunosuppresseurs. Des cellules autologues – provenant du patient lui-même – seraient préférables pour éviter cette difficulté. Ce pourrait être des cellules souches et des cellules précurseurs dérivées de la moelle osseuse, des muscles ou de la graisse, ou bien des cellules souches embryonnaires produites à partir des cellules du patient par clonage thérapeutique. Ou encore des cellules souches cardiaques, mais on ne les a pas encore identifiées.

Nos résultats suggèrent plusieurs approches possibles pour l'application des supports d'alginate à la protection et à la régénération de cœurs humains endommagés par un infarctus du myocarde. Nous sommes persuadés, par exemple, que d'ici trois ans nous serons prêts à tester des

supports d'alginate non ensemencés chez des patients ayant eu un infarctus du myocarde. Nos récentes expériences sur des porcs ont confirmé ce que nous avons observé chez des rats : même sans cellules, un support d'alginate semble prévenir l'expansion d'un infarctus et empêcher le remodelage de la paroi du ventricule.

Cette aptitude de l'alginate à favoriser l'angiogenèse suggère que nous pourrions améliorer la survie de cellules transplantées en implantant d'abord une armature, en attendant la vascularisation, puis en ensemencant l'armature avec des cellules. Nous avons testé la méthode chez des rats, avec des résultats prometteurs. La vascularisation s'est également trouvée notablement renforcée lorsque nous avons incorporé dans l'armature des microsphères qui libéraient des facteurs de croissance de façon contrôlée. Malheureusement, la prévascularisation de l'armature réduit l'espace disponible pour les cellules transplantées, et nous cherchons comment ajuster l'angiogenèse en utilisant différents types de facteurs de croissance.

Aujourd'hui, on sait contrôler *in vitro* la forme, la composition et la fonction du tissu cardiaque. Pour les patients qui ont eu un infarctus du myocarde, il faudrait remplacer un morceau du cœur, et l'implantation d'un support poreux vide ne suffirait pas. Nous sommes par conséquent confrontés au problème de maintenir vivant un tissu transplanté jusqu'à ce que la vascularisation locale soit restaurée. Nous cherchons aujourd'hui à fabriquer un greffon prévascularisé.

Nous avons créé un lit capillaire *in vitro* en ensemencant un support en alginate avec des cellules endothéliales, qui tapissent normalement les parois des vaisseaux sanguins, puis nous avons mis cette structure en culture dans un bioréacteur. Dans l'étape suivante, nous cultivons ensemble, sur une armature, des cellules endothéliales et des cardiomyocytes, pour essayer de faire pousser des capillaires à l'intérieur même d'un fragment de myocarde. Même si nous réussissons, nous devons vérifier que ce lit capillaire devient fonctionnel après transplantation et à quel rythme. Si les connexions avec les vaisseaux locaux s'établissent rapidement, alors les chances de survie du tissu transplanté seraient excellentes.

De nombreux chercheurs tentent de créer un tissu prévascularisé en utilisant des stratégies variées. La mise en commun des résultats obtenus fera forcément progresser ce domaine en pleine effervescence qu'est l'ingénierie du tissu cardiaque. Cela prendra une décennie, voire deux, mais la fabrication d'un morceau de cœur humain vivant n'est plus aujourd'hui une utopie.

Smadar COHEN est professeur de biotechnologie à l'Université Ben-Gurion de Beer-Sheva, en Israël. **Jonathan LEOR** dirige l'Institut Neufeld de recherches cardiaques de l'Université de Tel-Aviv.

E. LAVIK et R. LANGER, *Tissue Engineering: Current State and Perspectives*, in *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 65, n° 1, pp. 1-9, juillet 2004.

J. LEOR et S. COHEN, *Myocardial Tissue Engineering: Creating a Muscle Patch for a Wounded Heart*, in *Annals of New York Academy of Sciences*, vol. 1015, pp. 312-319, mai 2004.

Le cœur, Dossier Pour la Science, n° 40, juillet/septembre 2003.

La réparation de l'os et du cartilage

Pour réparer les lésions osseuses et cartilagineuses qui ne se consolident pas spontanément, on pose des implants ensemencés avec des cellules multipliées en laboratoire. Les biologistes recherchent comment stimuler la prolifération et la différenciation des cellules souches du patient.

Hervé Petite

À la suite d'une fracture, une cascade d'événements reproduit, dans un contexte adulte, l'ostéogenèse embryonnaire, qui aboutit à la consolidation de la fracture. Le processus biologique de réparation osseuse est très efficace et le chirurgien se contente généralement de réaligner les os brisés et d'immobiliser le membre fracturé. On estime à près d'un million le nombre de fractures observées chaque année en France, et plus de 90 pour cent de ces fractures se consolident parfaitement. Seuls cinq à dix pour cent présentent des complications entraînant un retard, voire une absence de consolidation, à la suite de défaillances de nature mécanique ou biologique. L'absence de consolidation est souvent due à la formation d'un mélange de tissus fibreux et osseux ne permettant pas la restauration de l'os. Quant aux pertes de substance cartilagineuse, elles posent une difficulté thérapeutique : ces lésions du cartilage sont la plupart du temps irréversibles du fait de la faible capacité de réparation spontanée du cartilage, et risquent d'évoluer vers une arthrose.

Par ailleurs, le traitement de tumeurs, de kystes ou encore des infections résistant aux traitements nécessitent souvent de retirer des fragments osseux de taille trop importante pour que le processus naturel d'autoréparation soit efficace. Le comblement de ces défauts est alors généralement assuré par une autogreffe (on prélève un fragment d'os du patient que l'on réintroduit dans la zone à combler). Toutefois, la quantité d'autogreffe étant limitée, le chirurgien doit souvent utiliser soit une allogreffe (de l'os prélevé sur un donneur), soit des matériaux de substitution osseuse. Ces matériaux servent uniquement de support passif à la repousse osseuse.

Des recherches sont menées pour trouver comment favoriser cette repousse en implantant, en même temps que le support, des cellules souches dont on orienterait, au moyen de facteurs bien choisis, la différenciation vers la formation d'os ou de cartilage. On cherche aussi à fabriquer des matrices guidant la régénération des tissus squelettiques. Ces travaux ont donné naissance à un nouveau secteur d'activité en orthopédie, la bio-orthopédie, dont le but est la reconstruction de tissus squelettiques fonctionnels. Ce secteur en plein essor implique médecins, biologistes et ingénieurs spécialistes des sciences des matériaux. Après avoir rappelé les propriétés essentielles de l'os et du cartilage, nous examinerons les techniques de restauration disponibles aujourd'hui, et les espoirs que soulèvent les cellules souches, notamment pour la reconstruction de l'os.

Un cartilage quiescent et un os en perpétuel remaniement

L'os et le cartilage sont des tissus conjonctifs de soutien dont les cellules sont incluses dans une matrice extracellulaire (voir la figure 2). Ces tissus tirent leur qualité mécanique exceptionnelle d'un arrangement précis de leur matrice extracellulaire qui devra être restitué au mieux après transplantation afin que les tissus transplantés soient mécaniquement fonctionnels.

Le cartilage revêt une grande diversité de formes : cartilage hyalin (nez, articulations, par exemple), fibreux (ménisque, disque intervertébral, insertion du tendon d'Achille) ou encore élastique (oreille, trompe d'Eustache,

épiglotte et quelques cartilages du larynx). D'un point de vue médical, la réparation du cartilage hyalin présente un intérêt prépondérant, car les lésions du cartilage articulaire sont responsables des ostéoarthroses, notamment de la hanche (coxarthrose) ou du genou (gonarthrose). Les chondrocytes, les cellules assurant la formation du cartilage, synthétisent une matrice extracellulaire constituée d'un réseau de fibres de collagène et de protéoglycanes, des protéines qui retiennent l'eau et assurent l'hydratation du tissu. Cette matrice extracellulaire résiste à des contraintes en tension (*via* les fibres de collagène) et en compression (*via* le réseau macromoléculaire hydraté) notables. Les cellules cartilagineuses sont nourries par diffusion des éléments nutritifs à partir de la surface articulaire, puisque le cartilage est le seul tissu de l'organisme qui n'est ni vascularisé ni innervé.

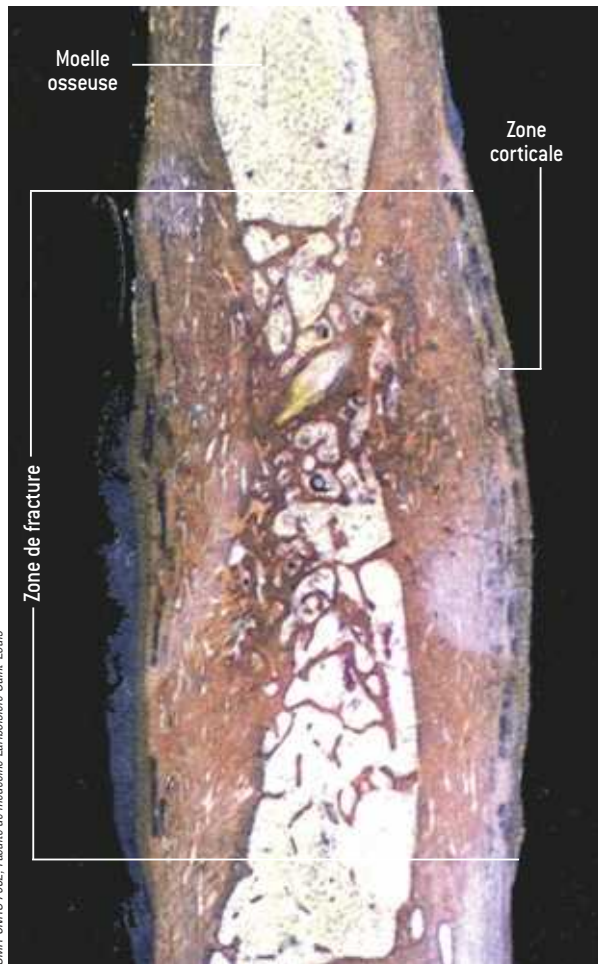
Le cartilage a un potentiel de régénération inférieur à celui de l'os, car il n'est pas vascularisé et contient peu de cellules, lesquelles migrent difficilement au sein de la matrice extracellulaire. Si des lésions de petite taille (inférieures à deux centimètres carrés) se réparent spontanément, celles de grande taille sont comblées par du fibrocartilage dont les propriétés mécaniques et la durabilité sont médiocres.

Le tissu osseux se présente sous deux architectures différentes (spongieuse ou compacte) en fonction de la localisation anatomique ; il est vascularisé et innervé. Il contient des ostéoblastes, des ostéoclastes et des ostéocytes. Les ostéoblastes, les cellules responsables de la formation du tissu osseux, sécrètent une matrice à base de collagène qui s'imprègne progressivement d'hydroxyapatite (un phosphate de calcium) conférant sa rigidité au matériau. Les ostéoclastes sont les cellules qui éliminent l'os ancien. Les ostéocytes sont des cellules osseuses matures qui emplissent les petits espaces vides de la matrice extracellulaire nommés lacunes. Ce tissu n'est pas figé : il est en perpétuel remaniement et s'adapte sans cesse aux sollicitations mécaniques. Par un processus de remodelage osseux, l'os ancien est éliminé (phase de résorption osseuse) et remplacé par de l'os nouveau (phase de formation osseuse).

Les stratégies de réparation

Une lésion osseuse se répare spontanément sauf quand elle est de grande taille. Pour accélérer la réparation du tissu osseux quand elle ne se fait pas spontanément, on dispose de plusieurs stratégies. Dans sa version la plus simple, la régénération des lésions squelettiques est guidée par des matériaux poreux recréant un environnement favorable à la repousse tissulaire. En pratique, les cellules présentes sur le pourtour de la lésion migrent au cœur du matériau, se multiplient et comblent le défaut.

Cette stratégie thérapeutique a un intérêt en clinique lorsque la lésion est de petite taille et que le tissu squelettique environnant est sain. On comble, par exemple, des pertes de substance osseuse à l'aide de céramiques poreuses à base de phosphate de calcium. Le revêtement de ces matériaux par des molécules bioactives favorise la colonisation par les cellules souches présentes dans l'environnement. Enfin, une autre solution consiste à préparer les substituts d'os ou de cartilage en laboratoire : des cellules souches sont multipliées en culture, puis mises en place sur le matériau



1. Lors d'une fracture, l'os se reconstruit d'abord de façon désorganisée, emplissant tout le canal médullaire (*en haut, os normal, en bas os en reconstruction*). Pour favoriser la consolidation de cet os de brebis, un support poreux constitué d'un bloc de corail et portant des cellules souches mésenchymateuses a été introduit dans la lésion. Lorsque la perte de substance osseuse a été consolidée, l'os s'est réarrangé, les zones corticales (périphériques) se sont homogénéisées, le canal médullaire s'est progressivement creusé et a été recolonisé par la moelle osseuse.

poreux et l'ensemble est transplanté. Cette approche aura un intérêt particulier chez les patients âgés dont le nombre de cellules souches est limité, mais encore faudra-t-il que le transplant s'intègre dans le tissu environnant.

La source des cellules souches

Pour régénérer les tissus squelettiques, on pourrait théoriquement utiliser toute cellule souche ayant un fort potentiel de prolifération et capable de se différencier en cellules squelettiques. Cependant, alors que la vie du patient n'est pas menacée, il paraît difficile d'envisager l'utilisation de cellules souches issues d'un donneur nécessitant l'administration à vie d'immunosuppresseurs pour éviter le rejet des cellules greffées.

C'est pourquoi, dans ce cas, les cellules souches embryonnaires ne semblent pas une solution réaliste à court terme. Néanmoins, le développement de banques de cellules souches embryonnaires, compatibles avec les antigènes du soi existant dans la population, pallierait cette difficulté. Cette approche éviterait les risques d'incompatibilité immunologique et garantirait un approvisionnement suffisant en cellules souches dans les cas d'urgence. Toutefois, jusqu'à présent, la majorité des études ont été effectuées avec des cellules souches adultes autologues (issues du patient lui-même), car elles évitent les problèmes de compatibilité immunologique.

Où peut-on prélever ces cellules chez le patient ? Le tissu source idéal serait riche en cellules souches capables de proliférer de se différencier en cellules squelettiques, et leur prélèvement serait peu invasif. Bien que l'on ait démontré la présence de cellules souches squelettiques dans de nombreux tissus, dont le tissu adipeux ou le muscle, la moelle osseuse reste la principale source de cellules souches pour la médecine régénératrice du squelette.

La moelle osseuse est une source majeure de cellules souches pluripotentes hématopoïétiques (cellules primitives ayant un haut pouvoir de prolifération et de différenciation vers toutes les lignées de cellules sanguines), mais c'est aussi un réservoir de cellules souches non hématopoïétiques, les cellules souches mésenchymateuses. Ces cellules contribueraient à la régénération des tissus d'origine mésenchymateuse (os, cartilage, tendon, tissu adipeux, etc.). On les isole assez facilement à partir d'un prélèvement de moelle osseuse, et on sait les amplifier : après quelques semaines de culture, on obtient une centaine de millions de cellules à partir d'un prélèvement de moelle osseuse. Cependant, elles ne prolifèrent pas de façon infinie et après 30 à 40 divisions, elles meurent. Lorsqu'elles sont utilisées sous forme d'allo-greffes, elles ne semblent pas engendrer de réactions de rejet, car elles auraient des propriétés immunosuppressives. De ce fait, on pourrait envisager la constitution de banques de cellules souches mésenchymateuses

Des cellules souches au cartilage

Après avoir obtenu une quantité suffisante de cellules souches, encore faut-il les assembler en une structure tridimensionnelle capable, après transplantation, de se transformer en un tissu fonctionnel. Toutefois, l'enjeu semble davantage d'orienter les cellules vers le phénotype désiré (os ou cartilage) que d'organiser ces cellules en un tissu dont

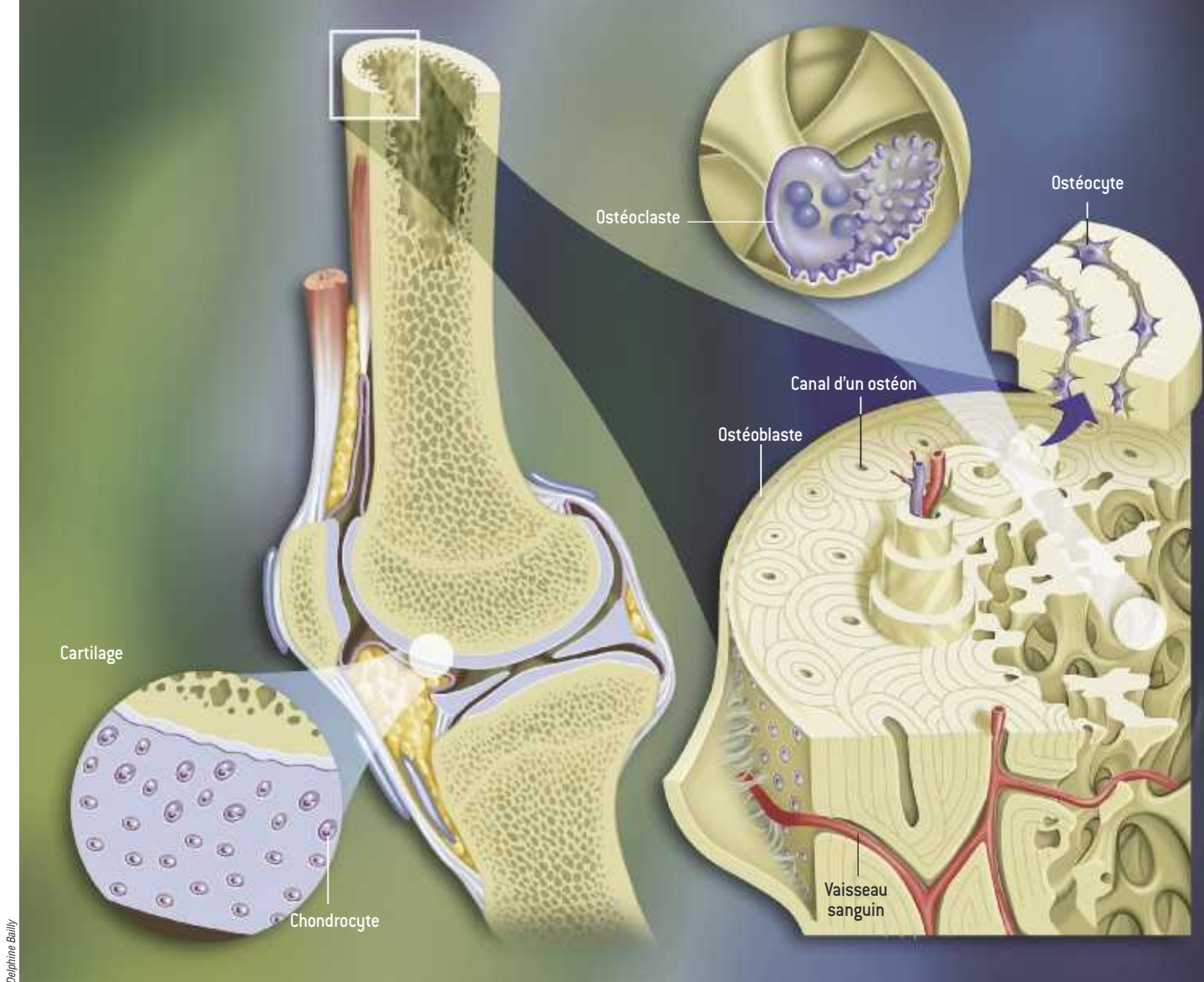
la micro-architecture serait identique à celle du tissu à réparer : l'étape d'organisation des cellules s'effectuera après transplantation chez le patient et dépendra surtout du biomatériau où les cellules auront été ensemencées et de l'environnement biomécanique du transplant.

La cascade biologique conduisant, lors du développement embryonnaire, à la formation de cartilage chez l'embryon à partir de cellules souches est complexe. Elle est régulée par des molécules bioactives (de nombreux facteurs de croissance) et par l'environnement biophysique (concentration en oxygène, sollicitations mécaniques). Les protocoles expérimentaux utilisés pour déclencher la différenciation des cellules souches en chondrocytes recréent *in vitro* une version simplifiée de leur environnement naturel. L'engagement vers la voie chondrocytaire est amorcé par le facteur de croissance TGF β 1 ajouté au milieu de culture. Certains protocoles de culture stimulent la différenciation en chondrocytes par le biais de différents facteurs et en imposant des sollicitations mécaniques proches de celles subies par le cartilage ou une faible concentration en oxygène (le cartilage n'étant pas vascularisé, les cellules sont exposées à une concentration en oxygène très inférieure à celle du reste de l'organisme).

Toute cellule mésenchymateuse produit spontanément en culture des macromolécules s'auto-assemblant en une matrice extracellulaire, laquelle interagit directement avec la cellule et module ses propriétés d'adhérence, de migration, de prolifération, d'apoptose (la mort cellulaire programmée) et de différenciation. Hélas, l'essentiel de cette matrice se dissout rapidement dans le milieu de culture et la cellule doit sans cesse recommencer son travail de Sisyphe et reconstruire son environnement. Afin de pallier cette difficulté, les cellules sont, de plus en plus souvent, cultivées sur des hydrogels qui retiennent les macromolécules synthétisées permettant aux cellules d'élaborer progressivement un environnement macromoléculaire de type cartilage et de renforcer leur identité. Ces hydrogels d'origine naturelle ou synthétique ont aussi pour rôle de faciliter l'intégration à la lésion du cartilage préparé en laboratoire. Plusieurs équipes recherchent actuellement des supports injectables offrant des niches propices à la différenciation des cellules souches en chondrocytes, par exemple des matrices qui polymérisent *in situ* sous l'action d'ultraviolets.

Aujourd'hui, on sait obtenir à partir de cellules souches mésenchymateuses des cellules exprimant les marqueurs spécifiques des chondrocytes. Il faudra vérifier que les cellules cartilagineuses obtenues expriment uniquement les marqueurs chondrocytaires et n'ont pas une « double identité » (par exemple os-cartilage) et que les cellules gardent leurs caractéristiques de chondrocytes après transplantation. Malgré ces difficultés techniques, et même s'il n'existe pas encore d'études cliniques publiées prouvant l'efficacité de cette stratégie thérapeutique, l'obtention de chondrocytes à partir de cellules souches adultes est la voie d'avenir, car, à terme, elle permettrait l'obtention aisée d'un nombre important de cellules fonctionnelles à partir d'un prélèvement limité.

La transplantation de chondrocytes autologues est aujourd'hui la seule stratégie thérapeutique utilisée pour régénérer le cartilage en clinique. Le chirurgien prélève sous arthroscopie des petits copeaux de cartilage articulaire au niveau de zones non portantes (généralement en périphérie)



2. Structure de l'os et du cartilage. Le cartilage est un tissu homogène, une sorte de gel dense non vascularisé et contenant des chondrocytes. L'os est traversé de nombreux canaux où passent les vaisseaux sanguins et les nerfs. L'unité structurale de l'os compact est nommée ostéon. Chaque ostéon est constitué d'un ensemble de cylindres creux emboîtés, l'ensemble formant un cylindre orienté

selon l'axe de l'os. Chacun des cylindres est une lamelle constituée de fibres de collagène parallèles, et les fibres de deux lamelles adjacentes sont toujours orientées dans des directions différentes, ce qui confère sa résistance au matériau. Les ostéoblastes fabriquent la matrice osseuse, les ostéocytes assurent l'entretien de la matrice osseuse que les ostéoclastes résorbent.

et il les envoie à un centre de thérapie cellulaire. Là, les chondrocytes sont isolés de leur matrice, puis cultivés et multipliés (pour obtenir entre 3 et 30 millions de cellules). Ces cellules sont alors réinjectées dans la lésion sans support. Le faible potentiel de prolifération des chondrocytes et l'absence de matériau support limitent les indications cliniques de cette technique au comblement de perte de substance cartilagineuse d'origine traumatique chez le patient jeune. La méthode ne s'adresse pas pour l'instant aux lésions arthrosiques ou aux lésions d'origine inflammatoire même si, à moyen terme, le but sera de traiter des débuts d'arthrose par thérapie cellulaire afin de retarder la mise en place d'une prothèse.

Le cas de l'os

Les cellules souches mésenchymateuses sont aussi utilisées pour préparer du tissu osseux au laboratoire. Dans ce cas, elles sont mises en culture pour qu'elles se multiplient et se différencient en un phénotype osseux. La veille de la chirurgie, les cellules sont placées sur un biomatériau poreux

et résorbable. Les résultats précliniques de ces études sont très encourageants puisque, chez l'animal, on répare de grandes pertes de substance osseuse. Les cellules peuvent être cultivées sur un biomatériau poreux ; l'ensemble est placé dans un bioréacteur, où les fluides en mouvement stimulent la production de tissu par les cellules. On a observé que la production de tissu minéralisé par des cellules osseuses est multipliée par six quand on met en mouvement le fluide où elles se développent.

La transplantation de ces cellules exige un support physique sur lequel les cellules adhèrent, migrent, prolifèrent et se différencient. Il doit être poreux, pour permettre à de nombreuses cellules de s'y développer et pour autoriser une revascularisation rapide de l'implant. La lésion est progressivement recolonisée par de l'os, et le matériau support se « dissout ». Les matrices préparées à partir de polymères naturels sont généralement bien tolérées par l'organisme. En ingénierie tissulaire osseuse, les céramiques à base de phosphate ou carbonate de calcium ont donné jusqu'à présent les meilleurs résultats.



UMR-CNRS 7052, Faculté de médecine Lariboisière-Saint-Louis

3. Les matrices utilisées pour les implants favorisant la recolonisation osseuse d'une lésion de grande taille sont de natures variées. Ici, il s'agit d'un bloc de corail [il mesure 2,5 centimètres de hauteur]. La structure de cet implant [observée à droite en microscopie électronique à balayage] est poreuse, ce qui facilite la colonisation par les cellules réimplantées ainsi que par les vaisseaux sanguins qui repoussent et irriguent l'os en formation. L'implant est biodégradable et finit par disparaître, remplacé par l'os néoformé.

Transplanter des pièces osseuses de grande taille pose des difficultés. Les cellules éloignées des vaisseaux souffrent d'un manque d'oxygène et de nutriments, et n'éliminent pas aisément les déchets accumulés. On espère généralement qu'après transplantation, le biomatériau jouera un rôle « d'éponge » et absorbera les fluides biologiques permettant un apport en oxygène et en nutriments suffisant pour la survie des cellules souches. Les cellules en hypoxie (manque d'oxygène) émettent des signaux qui alertent le système vasculaire, lequel déclenche la croissance de nouveaux vaisseaux. Ces signaux de détresse sont des facteurs de croissance, tels VEGF ou bFGF. Ajoutés au biomatériau, ces facteurs accélèrent la vascularisation de l'implant. Même si les résultats expérimentaux sont encourageants, des essais cliniques contrôlés seront nécessaires pour évaluer l'intérêt clinique réel de ce type de thérapie.

Stimuler les cellules souches à l'aide de facteurs de croissance

Les tissus capables de régénération (dont l'os) contiennent naturellement des cellules souches, d'où l'idée de développer des « engrais à cellules souches » qui déclencheraient la prolifération et la différenciation en cellules squelettiques de ces cellules. Ces substances sont produites par génie génétique et administrées au patient en association à un biomatériau. Elles posent deux difficultés : elles sont très facilement dégradées et doivent être libérées progressivement à des doses physiologiques.

Au cours du développement, les cellules souches prolifèrent, puis se spécialisent progressivement : un être humain constitué d'environ 100 000 milliards de cellules réparties en 200 types cellulaires est issu d'une unique cellule. La nature a élaboré au cours de l'évolution (François Jacob aurait dit bricolé) un système de communication permettant la différenciation coordonnée de ces cellules dans le respect rigou-

reux du plan d'organisation de l'embryon. Le décodage, encore partiel, de cette forme de « langage » a notamment permis l'identification des facteurs de croissance qui commandent la migration, l'adhésion, la prolifération, l'apoptose ou la différenciation des cellules.

Depuis une trentaine d'années, différents facteurs de croissance pouvant présenter un intérêt thérapeutique ont été identifiés. C'est le cas de l'érythropoïétine, dont l'administration provoque un accroissement rapide et notable du nombre de globules rouges. On a isolé à partir de la matrice osseuse des facteurs de croissance qui accélèrent la réparation de l'os : on les nomme protéines de la morphogénèse osseuse. Leur adjonction à un biomatériau déclenche la colonisation par des cellules mésenchymateuses voisines qui prolifèrent, se différencient en chondrocytes et sécrètent une matrice extracellulaire qui se minéralise. À ce stade, un réseau vasculaire envahit l'implant et de l'os commence à se former, tandis que le cartilage calcifié est résorbé. Les applications thérapeutiques de ces molécules concernent essentiellement le traitement des pseudarthroses (absence de consolidation d'une fracture) et les arthrodèses du rachis (on déclenche la fusion de deux vertèbres, car le disque qui les séparerait n'est plus fonctionnel).

Nous l'avons souligné, ces facteurs de croissance doivent être libérés de façon contrôlée, ce qui représente une des difficultés de la méthode. Divers types de matrice contrôlant cette diffusion sont à l'étude. Les unes sont synthétiques, les autres naturelles, d'autres encore hybrides. Ces matrices doivent créer un environnement autorisant la colonisation par les cellules souches et par les vaisseaux sanguins (dans le cas de l'os), et la production de tissu squelettique. La matrice doit aussi protéger le facteur de croissance des attaques enzymatiques lancées par l'organisme contre tous les corps étrangers, et le libérer progressivement à des doses physiologiques.

Ces avancées de la biologie permettent d'entrevoir de nouvelles stratégies thérapeutiques en orthopédie. Les premiers résultats sont encourageants et suggèrent que ces techniques ont un réel intérêt. Toutefois, la production des cellules à réimplanter reste fastidieuse et les matrices permettant la transplantation des cellules et la libération contrôlée des facteurs de croissance devront être améliorées. Enfin, ces stratégies thérapeutiques sont en concurrence avec d'autres méthodes, dont l'utilisation d'autogreffes. Chacune de ces techniques a probablement sa place dans l'arsenal du chirurgien, et des études cliniques rigoureuses devront déterminer leurs indications thérapeutiques respectives.

Hervé PETITE est responsable du Groupe ingénierie tissulaire du Laboratoire de recherches orthopédiques UMR-CNRS 7052, de la Faculté de médecine Lariboisière-Saint-Louis, à Paris.

X. CHEVALIER et Marie-Thérèse CORVOL, *la greffe autologue de chondrocytes. Limites et perspectives*, in *Le courrier de la transplantation*, à paraître.

H. PETITE et al., *Tissue engineered Bone Regeneration*, in *Nature Biotechnology*, vol. 18, sept. 2000.

Principles of tissue engineering, sous la direction de R. Lanza, R. Langer et W. Chick, éditions R.G. Landes, Georgetown, Texas, 1997.

Le nouveau site de Pour la Science est en ligne !

www.pourlascience.fr

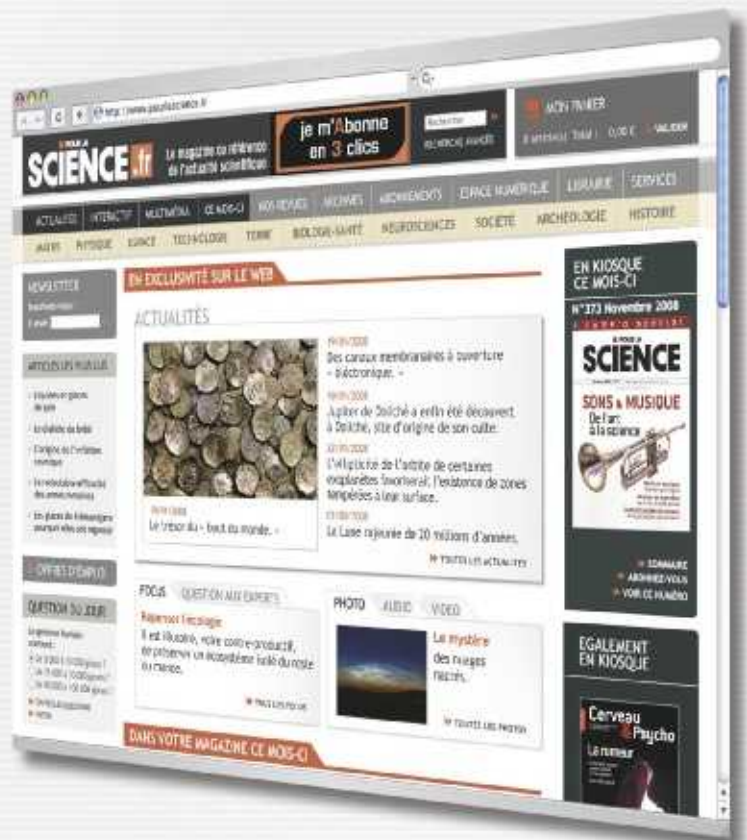
Avec son nouveau site Internet, Pour la Science vous offre plus de contenu, plus de services, plus d'interactivité.

➡ Vous êtes abonné à Pour la Science ?
Retrouvez l'intégralité
de votre magazine en ligne
et téléchargez les articles de votre
choix. Réagissez aux articles et posez
vos questions à des experts. Découvrez
chaque jour des contenus inédits.

➡ Vous n'êtes pas encore abonné
à Pour la Science ?
Découvrez chaque jour des actualités
scientifiques, des articles originaux,
des photos, des vidéos...
Achetez les articles de votre choix.

➡ Abonnez-vous en ligne en trois clics !
L'abonnement « papier » vous donne
accès au magazine imprimé et à tous
les contenus web.
L'abonnement « web » vous donne accès
à votre magazine au format numérique.

➡ Et bientôt l'accès en intégralité aux archives !



À bientôt sur **POUR LA SCIENCE.fr**